

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI

DENEYSEL MEME KANSERİ MODELİNDE
KARACİĞER REZEKSİYONUNUN
İMMÜNOLOJİK ETKİLERİ

Dr. Hilmi Aml DİNÇER

UZMANLIK TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

ANKARA

2017

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI

DENEYSEL MEME KANSERİ MODELİNDE
KARACİĞER REZEKSİYONUNUN
İMMÜNOLOJİK ETKİLERİ

Dr. Hilmi Anıl DİNÇER

UZMANLIK TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Derya KARAKOÇ

ANKARA

2017

TEŞEKKÜR

Tezimin ortaya çıkmasından tamamlanmasına kadar geçen süreçte sağladıkları katkılardan dolayı başta tez danışmanım Prof. Dr. Derya KARAKOÇ olmak üzere Doç. Dr. Güneş ESENDAĞLI'ya, çalışmanın sürdürülmesinde ve takibinde özveriyle çalışan Utku HORZUM, Alper KURŞUNEL ve Didem YÖYEN ERMİŞ'e, patoloji kısmında büyük emeği olan Dr. Ece ÖZOĞUL'a teşekkür ederim.

Tezimin finansmanının sağlanmasında destek olan Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinasyon Birimi'ne teşekkür ederim.

Eğitim ve öğretim hayatım boyunca hiçbir konuda desteğini esirgemeyen çok kıymetli aileme ve tez yazımı süresince her konuda yanımda olan sevgili eşim Uzm. Dr. Bahar DİNÇER'e teşekkürü bir borç bilirim.

Dr. Hilmi Anıl DİNÇER

ÖZET

Dinçer HA, Deneysel Meme Kanseri Modelinde Karaciğer Rezeksiyonunun İmmünolojik Etkileri Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı Uzmanlık Tezi, Ankara, 2017.

Karaciğer, meme kanserinin üçüncü en sık metastaz yaptığı solid organdır. Eğer karaciğer metastazı tedavisiz bırakılırsa ortalama yaşam süresi 4-8 aydır. Karaciğer rezeksiyonunun sağkalımı artırdığı gösterilmişse de rezeksiyon sonrası karaciğer rejenerasyonu esnasında ortaya çıkan bir takım inflamatuvar sitokinler nedeniyle hepatic ve ekstrahepatik tümör proliferasyonunda hızlanma olabileceği öne sürülmektedir. Bu çalışmanın amacı, deneysel meme kanseri modelinde karaciğer rezeksiyonunun farklı kemokin tipleri üzerindeki etkisinin incelenmesidir. Bu amaçla, 46 BALB/c dişi fareye 4T1 tümör ekilmiştir. Çalışmada farelere tümör ekimini takiben birinci ve ikinci haftalarda yapılan %30-40 hepatektominin kemokin düzeyleri üzerindeki etkisi incelenmiş olup çıkarılan karaciğer dokularında histopatolojik araştırma yapılmıştır. Hayvan modellerinde sakrifikasyon sonrası elde edilen karaciğer lizatlarından ELISA yöntemi ile CCL 2, 3, 4, 5, 11,17, 21, 22 ve CXCL1 ve CXCL9 incelenmiştir. 4T1 tümör ekilen ve %30-40 hepatektomi yapılan kısa dönem hayvan modelinde CCL 2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL22, CXCL1 ve CXCL9 kemokin düzeylerinde artış görülmektedir. Uzun dönem hayvan modellerinde ise CCL2, CCL3, CCL4, CCL5 ve CXCL1 seviyelerinde artış görülmekte; ancak, en belirgin yüksekliğin CCL2 ve CCL5 seviyelerinde olduğu dikkat çekmektedir. Tümör ekilen toplam 22 farenin dördünde metastaz tespit edilmiş olup metastaz gelişen farelerin hepsi hepatektomi yapılan gruplardadır. Hepatektomi ve kontrol grupları arasında patolojik parametrelerde istatistiksel olarak anlamlı sonuç bulunamamıştır. Sonuç olarak deneysel meme kanseri modelinde karaciğer rezeksiyonu sonrası kemokin seviyelerinde artış görülmektedir. Bu durumun metastatik etkisi bu çalışmada gösterilmemiştir.

Anahtar kelimeler: kemokin, meme kanseri, 4T1, BALB/c fare, hepatektomi, metastaz

ABSTRACT

DINÇER HA, Immunological effects of liver resection in experimental breast cancer model Hacettepe University Faculty of Medicine, Thesis of General Surgery, Ankara, 2017

Liver is the third common solid organ of breast cancer metastasis. If it is left untreated, the overall survival is only 4-8 months. Even though, liver resection for liver metastasis is shown to improve the survival, acceleration of hepatic and intrahepatic tumor proliferation during liver regeneration due to inflammatory cytokines is controversial. The aim of this study is to evaluate the effect of liver resection on different chemokine profiles in experimental breast cancer model. For this purpose, 4T1 tumor was injected to 46 Balb/c female mice and 30-40% hepatectomy was performed at the first (short term) and second weeks (long term) after injection. After sacrifice of animals, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL11, CCL17, CCL21, CCL22, CXCL1 and CXCL9 chemokine levels were evaluated. In addition, histopathological examination of resected liver tissues was performed. In animals with 4T1 tumor, levels of CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL22, CXCL1 and CXCL9 were found to be increased in short term hepatectomised mice, whereas; levels of CCL2, CCL3, CCL4, CCL5 and CXCL1 were found to be increased in long term hepatectomised mice. In total of 46 mice, 22 were injected with 4T1 tumor. In these 22 mice, only four had been found to have liver metastasis during histopathological examination. All of these four animals had been undergone hepatic resection. However, there was no statistically significant difference in histopathological analysis between sham and hepatectomy groups. In conclusion, there was an increase in chemokine levels after liver resection in this experimental breast cancer model. The metastatic effect of this condition has not been demonstrated in this study.

Keywords: Chemokine, breast cancer, 4T1, Balb/c, hepatectomy, metastasis

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER	vi
KISALTMALAR ve SİMGELER DİZİNİ	viii
TABLolar DİZİNİ	x
RESİMLER DİZİNİ	xii
GRAFİKLER DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1 Meme kanseri epidemiyolojisi ve etiyolojisi	3
2.2 Meme kanserinin alt grupları	3
2.3 Risk faktörleri	4
2.4 Kanser ve kemokin ilişkisi	6
2.4.1 Direkt pro-tümör etkileri	7
2.4.2 Direkt anti-tümör etkileri	10
2.5 Tümör dokusunda kemokin ekspresyonunun düzenlenmesi	11
2.5.1 Epigenetik mekanizmalar	11
2.5.2 Genetik mekanizmalar	12
2.5.3 Çevresel faktörler	12
2.6 Kemokinlerin kanser tedavisindeki rolü	13
2.7 Kemokinlerin meme kanserindeki yeri ve önemi	14
2.7.1 Meme kanseri hücrelerinin çoğalmasında kemokinlerin rolü	14
2.7.2 Tümör mikroçevresinde kemokinlerin rolü	15
2.7.3 Anjiogeneizde kemokinlerin rolü	16
2.7.4 Metastazda kemokinlerin rolü	17
2.8 Meme kanserinde karaciğer metastazında rol oynayan faktörler	18
2.8.1 İnflamatuvar faktörler	18

2.8.2	Kemokin ve kemokin reseptörleri	19
2.8.3	Hücre adezyon molekülleri	19
2.9	Karaciğer rezeksiyonu ve rejenerasyonu	21
2.10	Karaciğer rejenerasyonunda hayvan modelleri	25
2.11	Deneysel Meme Kanseri Oluşturulması	27
3.	MATERYAL – METOD	29
3.1	Deney hayvanları ve protokolü	29
3.2	Çalışma grupları	29
3.3	Anestezi	32
3.4	Meme kanseri oluşturulması	32
3.5	Cerrahi Teknik	32
3.6	Değerlendirme Parametreleri	40
3.7	İstatistiksel Analizler	41
4.	BULGULAR	42
4.1	Hayvan Ağırlıkları	42
4.2	Hayvan Karaciğer Ağırlıkları	43
4.3	Karaciğer Lizatlarında ELISA Çalışılması	47
4.3.1	CCL2	49
4.3.2	CCL3	50
4.3.3	CCL4	50
4.3.4	CCL5	51
4.3.5	CCL11	51
4.3.6	CCL17	51
4.3.7	CCL21	51
4.3.8	CCL22	52
4.3.9	CXCL1	52
4.3.10	CXCL9	52
4.4	Histopatolojik İnceleme	53
5.	TARTIŞMA	64
6.	SONUÇLAR	69
7.	KAYNAKLAR	70

KISALTMALAR ve SİMGELER DİZİNİ

KC	Karaciğer
ER	Östrojen reseptörü
PR	Progesteron reseptörü
EGFR2	İnsan epidermal büyüme faktörü reseptör 2
TNBC	Üçlü negatif meme kanseri
HR	Hormon reseptörü
C	Sistein
MMP	Matriks metalloproteinaz
VEGF	Vasküler endotelial büyüme faktörü
MAPK	Aktive edilmiş protein kinaz
Erk	Ekstraselüler sinyal ile regüle edilmiş kinaz
ELR	Glutamik asit-lösin-arjinin
bFGF	Fibroblast büyüme faktörü
Treg	Regülatuar T hücreleri
NK	Doğal öldürücü
TAM	Tümör ilişkili makrofaj
MDSC	Miyeloid kökenli supresör hücreler
Th1	Yardımcı T lenfosit-1
NF- κ β	Nükleer faktör- κ β
HIF1	Hipoksi ile indüklenen faktör-1
IL-10	İnterlökin-10
TNF- α	Tümör nekroz faktör- α
Ep-CAM	Epitelyal hücre adezyon molekülü
TGF- α	Transforming büyüme faktörü
EGF	Epidermal büyüme faktörü
HGF	Hepatosit büyüme faktörü
TNFR 1	Tip 1 TNF- α reseptörü
LPS	Lipopolisakkarit
TLR4	Toll-like reseptör 4

MyD88	Miyeloid differansiyasyon faktörü 88
HB-EGF	Heparin bağlayıcı EGF benzeri büyüme faktörü
sc	Subkütan
SF	Serum fizyolojik
HpX	Hepatektomi
RAS	Sağ anterior segment
RMS	Sağ orta segment
RPS	Sağ posterior segment
OS	Omental segment
LAS	Sol anterior segment
LPS	Sol posterior segment
M	Orta boy
L	Büyük boy
Tm	Tümör
LpX	Laparotomi
SD	Standart sapma
OD	Optik Dansite
KD	Kısa dönem
UD	Uzun dönem
Control(-)	negatif kontrol
Control(+)	pozitif kontrol
Dist.	Distal kısım
Prox.	Proksimal kısım
Tumor Gr.	Tümör Grupları
Control Gr.	Kontrol grupları
Rej.	Rejenerasyon
IF- γ	İnterferon- γ

TABLolar DİZİNİ

Tablo 3.1: Deney protokolünü gösterir tablo	32
Tablo 4.1: Hayvan gruplarının ağırlıklarını gösteren tablo	42
Tablo 4.2: Hayvan ortalama ağırlıklarını ve standart sapmalarını gösteren tablo	42
Tablo 4.3: Hayvan modellerinin sakrifikasyon sonrası ölçülen karaciğer ağırlıkları	44
Tablo 4.4: Kısa dönem gruplarından (Grup 1-3-5-7) elde edilen karaciğer dokusunda çalışılan kemokin seviyeleri	48
Tablo 4.5: Uzun dönem gruplarından (Grup 2-4-6-8) elde edilen karaciğer dokusunda çalışılan kemokin seviyeleri	49
Tablo 4.6: 4T1(+) laparotomi yapılan grupların (grup 3 - grup 4) kısa dönem-uzun dönem myeloid hücre skorlarının karşılaştırmaları	56
Tablo 4.7: 4T1 (-) hepatektomi yapılan grupların (grup 5 - grup 6) kısa dönem-uzun dönem KC rejenerasyon indekslerinin karşılaştırılması	56
Tablo 4.8: 4T1 (+) hepatektomi yapılan grupların (grup 7 - grup 8) kısa dönem-uzun dönem KC rejenerasyon indeksi, KC myeloid hücre skorları, tümör merkezi ve tümör çevresi myeloid hücre skorlarının karşılaştırılması	57
Tablo 4.9: 4T1 (-) hepatektomi yapılan ve 4T1 (+) hepatektomi yapılan kısa dönem gruplarının (grup 5 - grup 7) karaciğer rejenerasyon indeksleri ve karaciğer myeloid hücre skorlarının karşılaştırılması	58
Tablo 4.10: 4T1 (-) hepatektomi yapılan ve 4T1 (+) hepatektomi yapılan uzun dönem gruplarının (grup 6 – 8) karaciğer rejenerasyon indeksleri ve karaciğer myeloid hücre skorlarının karşılaştırılması	58

Tablo 4.11: 4T1 (-) laparotomi yapılan ve 4T1 (+) laparotomi yapılan kısa dönem gruplarının (grup 1 – grup 3) karaciğer rejenerasyon indeksleri ve karaciğer myeloid hücre skorlarının karşılaştırılması	59
Tablo 4.12: 4T1 (-) laparotomi yapılan ve 4T1 (+) laparotomi yapılan uzun dönem gruplarının (grup 2 – grup 4) karaciğer rejenerasyon indeksleri ve karaciğer myeloid hücre skorlarının karşılaştırılması	59
Tablo 4.13: 4T1 (+) laparotomi yapılan ve 4T1 (+) hepatektomi yapılan kısa dönem gruplarının (grup 3 – grup 7), hepatektomisiz karaciğer ve proksimal karaciğerlerin rejenerasyon indeksleri ve myeloid hücre skorları ile tümör merkez ve çevresinin myeloid hücre skorlarının karşılaştırılması	60
Tablo 4.14: 4T1 (+) laparotomi yapılan ve 4T1 (+) hepatektomi yapılan uzun dönem gruplarının (grup 4 – grup 8) hepatektomisiz karaciğer ve proksimal karaciğerlerin rejenerasyon indeksleri ve myeloid hücre skorları ile tümör merkez ve çevresinin myeloid hücre skorlarının karşılaştırılması	61
Tablo 4.15: 4T1 (+) hepatektomi yapılan kısa dönem grubun (grup 7) karaciğer proksimal kısmı ile distal kısmı arasındaki rejenerasyon indekslerinin korelasyon değerlendirilmesi (spearman testi)	62
Tablo 4.16: 4T1 (+) hepatektomi yapılan uzun dönem grubun (grup 8) karaciğer proksimal kısmı ile distal kısmı arasındaki rejenerasyon indeksleri ve myeloid hücre skorlarının korelasyon değerlendirilmesi (spearman testi)	63

RESİMLER DİZİNİ

Resim 3.1: Fare karaciğerinin şematik görünümü	34
Resim 3.2: Fare karaciğerinin karaciğer segment hacimleri (yüzde)	34
Resim 3.3: Klip yönteminde klibin üstünde bırakılan cerrahi sınır	35
Resim 3.4: Kullanılabilen klip boyutları (M: orta boy, L: büyük boy)	36
Resim 3.5: Farede bilateral subkostal kesî yapılması	37
Resim 3.6: Karaciğer sol lobu diseke edildikten sonra metalik klip yardımıyla hepatektomi yapılma görüntüsü	38
Resim 3.7: Hepatektomi sonrasında karaciğer sol lobunun çıkarılmış hali	39
Resim 3.8: Periton ve cildin kapatılması	40
Resim 4.1: Kısa dönem grupların (Grup 1-3-5-7) sakrifikasyon sonrası karaciğerlerinin önden görünümü	45
Resim 4.2: Kısa dönem grupların (Grup 1-3-5-7) sakrifikasyon sonrası karaciğerlerinin arkadan görünümü	46
Resim 4.3: Uzun dönem grupların (Grup 2-4-6-8) sakrifikasyon sonrası karaciğerlerinin önden görünümü	46
Resim 4.4: Uzun dönem grupların (Grup 2-4-6-8) sakrifikasyon sonrası karaciğerlerinin arkadan görünümü	47
Resim 4.5: Tümörsüz karaciğer parankim rejenerasyonu	54
Resim 4.6: Tümörlü karaciğer parankim rejenerasyonu	54
Resim 4.7: Tümör dokusunda myeloid hücre kümeleri (20x büyütme)	55
Resim 4.8: Tümör dokusunda myeloid hücre kümeleri (40x büyütme)	55

GRAFİKLER DİZİNİ

Grafik 4.1: Hayvan modellerinin ortalama ağırlıklarını gösteren grafik	43
Grafik 4.2: Sakrifikasyondan hemen sonra ölçülen karaciğer ağırlıklarının ortalaması	45

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Meme kanseri kadınlarda en çok görülen ve en sık ölüme neden kanser türüdür. Gelişmiş ülkelerde insidans oranı, gelişmekte olan ülkelere göre daha yüksektir. Meme kanserine bağlı ölüm oranı ise gelişmekte olan ülkelerde gelişmiş ülkelere göre %17 daha fazladır. Meme kanseri patogenezinin daha iyi anlaşılması hedefe yönelik tedavilerin geliştirilmesine ve dolayısıyla hastalık prognozunun iyileştirilmesine katkıda bulunacaktır. Bu amaçla son yıllarda kemokin adı verilen kemoatraktan sitokinler üzerinde çalışmalar yapılmaktadır. Karaciğer, meme kanserinin üçüncü en sık metastaz yaptığı solid organdır. Eğer karaciğer metastazı tedavisiz bırakılırsa ortalama yaşam süresi 4-8 aydır. Yapılan çalışmalarda karaciğer metastazı varlığında hepatik rezeksiyon sonrası ortalama sağ kalım 40 ay, 5 yıllık sağ kalım oranının ise %40 olduğu gösterilmiştir. Karaciğer rezeksiyonunun sağ kalımı artırdığı gösterilmişse de rezeksiyon sonrası karaciğer rejenerasyonu esnasında ortaya çıkan bir takım inflamatuvar sitokinler nedeniyle hepatik ve ekstrahepatik tümör proliferasyonunda hızlanma olabileceği öne sürülmektedir.

Kemokinler, lenfoid organ gelişimi ve immün hücre hareketlerini kontrol eden küçük proteinlerdir. Kemokinlerin, inflamasyon sırasında lökosit kemotaksisinin uyarılması, lenfoid doku gelişimi, hemostazın sağlanması, hücre proliferasyonu, hematopoiezin sağlanması, virüs/hücre ilişkisi, anjiogenez, neovaskularizasyon ve kanser metastazı gibi rolleri mevcuttur. Günümüzde tanımlanmış 50 farklı kemokin, 20 kemokin reseptörü ve 4 tane sessiz reseptör bulunmaktadır. Tümör dokusu birbiri ile karışık sinyalizasyon sistemi aracılığı ile iletişim kuran pek çok hücre tipinden oluşmaktadır. Bu tümör mikroçevresinde, hücre göçü ve hücre-hücre ilişkisinden esas sorumlu yapılar kemokinler olup tümör gelişimine yol açarlar. Tümör mikroçevresindeki bu kemokinler; tümör hücreleri, immün hücreler ve stromal hücreler tarafından eksprese edilirler. Belli bir kemokine yanıt olarak farklı immün hücreler, tümör mikroçevresine göç eder ve tümöre karşı immün yanıtı regüle ederler. Ayrıca kemokinler, tümör mikroçevresinde tümör hücreleri ve stromal hücreler üzerinde de etkilidirler. Bu özellikleri ile tümör hücrelerinin proliferasyonunu, kanser kök-hücresi benzeri özelliklerini, kanser invazyonu, anjiogenez ve metastazını regüle

ederler. Sonuç olarak bu mikroçevrede bulunan kanser ve konak hücreleri pek çok farklı kemokin salınımına yol açarak, anti-tümör ve pro-tümör yanıtları dengeleyen farklı hücre tiplerinin göçüne ve aktivasyonuna yol açarlar. Kemokinlerin bu rollerinin bilinmesi kemokinleri hedefleyen tedavilerin geliştirilmesine olanak sağlayabilmektedir.

Bu çalışmanın amacı deneysel meme kanseri modelinde hepatektominin farklı kemokin tipleri üzerindeki etkisinin incelenmesidir. Bu amaçla, 46 adet BALB/c dişi fare 8 alt gruba ayrılmıştır. 4 grubun meme dokusuna 4T1 tümör ekilmiştir. 4T1 tümör, meme dokusuna kolayca ekilebilmesi, yüksek tümörojenik ve invaziv özellikleri, 6-tioguanine dirençli olması sayesinde in vitro olarak mikrometastazların tespit edilebilmesi ve primer meme dokusundan kolayca çıkarılabilmesi özellikleri sayesinde günümüzde fareler başta olmak üzere hayvan modellerinde sıkça kullanılan meme kanseri oluşturma yöntemidir. Çalışmada farelere tümör ekimini takiben yapılan %30-40 hepatektominin birinci ve ikinci haftalarda kemokin düzeyleri üzerindeki etkisi incelenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Meme kanseri epidemiyolojisi ve etiyolojisi:

Meme kanseri kadınlarda en çok görülen ve en sık ölüme neden malignansidir. 2008 yılı dünya kayıt kütüklerine göre dünya genelinde 1.384.155 yeni meme kanseri vakası ve yaklaşık 459.000 ölüm bildirilmiştir.^{1,2,3} Tüm kanser insidansları içerisinde meme kanseri bunun %12'sini oluşturmaktadır. Gelişmiş ülkelerde insidans oranı geliştirmekte olan ülkelere göre daha yüksektir (71.7/100.000 ve 29.3/100.000 sırasıyla). Meme kanserine bağlı ölüm oranı ise geliştirmekte olan ülkelere göre gelişmiş ülkelere göre %17 daha fazladır. Meme kanserine bağlı 5 yıllık sağ kalımın Afrika ülkelerinde %12, Amerika, Avustralya ve Kanada'da ise %90 olduğu gösterilmiştir. İstatistiklere göre 2012 yılında 1.7 milyon yeni vaka gelişeceği ve 552.000 meme kanserine bağlı ölüm olacağı bildirilmiştir. Bu sayı 2008'den 2012 yılına kadar %18 artış göstermektedir. Amerikan Kanser Derneği verilerine göre Amerika Birleşik Devletleri'nde her 8 kadından birinde yaşamı boyunca meme kanseri gelişeceği ve 2013 yılı için 232.340 yeni vaka ve 39.620 ölüm olacağı öngörülmüştür.⁴ 2050 yılında ise tüm dünyada meme kanseri tanısı alan kadınların sayısının 3.2 milyon/yıl olacağı öngörülmektedir. İnsidans hızının geliştirmekte olan ülkelere batılı yaşam tarzının giderek yaygınlaşması, çocuk doğurma yaşının ilerlemesi ve sedanter yaşamdan dolayı daha hızlı artacağı düşünülmektedir.^{1,2}

Meme kanseri tanısı diğer kanserlere göre daha genç yaşta konulmaktadır. Meme kanseri için ortalama tanı yaşı 61 iken, akciğer kanseri için 70 ve kolorektal kanser için 68'dir. Meme kanseri tanısı alan hastaların %19'u 30-49 yaşları arasında tanı alırken, tüm meme kanserlerinin %44'üne 65 yaşından önce tanı konulmaktadır.³

2.2 Meme kanserinin alt grupları:

Meme kanseri artık tek bir hastalık olarak kabul edilmemektedir. Tümör hücrelerinden edinilen moleküler ve genetik bilgiler ışığında alt gruplara ayrılmaktadır.⁵

Luminal A: Prevelansı %40'tır. Östrojen reseptörü (ER) + ve/veya progesteron reseptörü (PR)+'tir. HER-2 negatiftir. Yavaş büyür, daha az agresiftir ve rekürensisi daha azdır. En iyi prognozlu alt gruptur.

Luminal B: Prevelansı %10-20'dir. ER (+) ve/veya PR+'tir. HER2+ (veya HER2 – ama Ki67 yüksek). Proliferasyon hızı yüksektir. Luminal A 'ya göre prognozu daha kötüdür. Hormon tedavisine yanıt verir.

HER2 + grup: Prevelansı %10'dur. İnsan epidermal büyüme faktörü reseptör 2 (EGFR2) ekspresyonu eder. ER ve PR negatiftir. Agresif seyirlidir. Yüksek gradelidir ve lenf noduna metastaz riski yüksektir. Sağ kalım kısadır. Hedefe yönelik tedavi şansı mevcuttur.

Bazal benzeri alt grup: ER ve PR (-)'tir. Miyoepitel ya da bazal hücreleri kodlayan genlerde artmış ekspresyon mevcuttur. Prognozu kötüdür.

Üçlü negatif (TNBC): Prevelansı %10-20'dir. ER(-), PR(-) ve HER2 (-) 'tir. Daha genç yaşta tanı konulur. Afro-Amerikan kadınlarda daha sıktır. BRCA1 mutasyonu olanlarda daha sık rastlanılır. Cerrahi sonrası uzak metastaz riski yüksektir. Kısa dönem prognoz kötüdür. Hedefe yönelik tedavisi yoktur. %71-90'lık kısmı bazal benzeri alt gruba aittir.

İnflamatuvar meme kanseri: Diğer 5 gruptan tamamen farklıdır. Dermal lenfatik kanallara tümör embolisi sonucu olur. Memede hassasiyet ile seyreder ve ileri evrede tanı konulur. Tanı anında hastaların çoğunda aksiller lenf nodu ve %35'inde uzak metastaz mevcuttur. Bu grup hastaların %50'de HER2'(+) 'tir.

2.3 Risk faktörleri:

Yaş: Genç yaşta tanı konulması kötü prognostiktir. Bu hastalarda tümör boyutu daha büyük olup lenf nodu tutulumu mevcuttur. Çalışmalarda özellikle 45 yaş altında tanı alanlarda sağ kalımın daha kötü olduğu gösterilmiştir.⁶

Menstruasyon döngüsü: Erken yaşta menarj, hormon reseptörü (+) (HR) meme kanseri riskini artırır. Geç yaşta menapoza girmek de yine meme kanseri riskini artırır. Menarj ve ilk doğum arasındaki süre, TNBC riski ile doğru orantılı iken hormon reseptörü içeren meme kanserleri riski ile ters orantılıdır.⁵

Parite ve laktasyon: Gebelik sayısı arttıkça HR(+) meme kanseri riski azalır. İlk gebelik yaşının geç olması ise HR(+) kanserlerde riski artırır. Her gebeliğin ER(+) kanser riskini %7 azalttığı gösterilmiştir.¹ Laktasyon açısından ise daha az sayıda çalışmada HR(+) kanserler ile ters orantılı ilişki bulunmuştur. TNBC'lerle ilişkisi HR(+) kanserler kadar belli olmamakla beraber, birkaç gözlemsel çalışmada parite ile TNBC arasında ters orantılı ilişki olduğu gösterilmiştir.^{5,7} Ayrıca çalışmalarda laktasyon ve triple negatif meme kanseri arasında da ters orantılı ilişki olduğu gösterilmiştir.⁵

Hormon kullanımı: Postmenapozal dönemde hormon replasman tedavisi alanlarda HR+ meme kanseri riskinin arttığı gösterilmiştir. Hormon replasman tedavisi ile TNBC ilişkisi net olmamakla beraber Tamimi ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada daha önceden alınan hormon tedavisinin TNBC riskini artırdığı gösterilmiştir.⁸

Cinsiyet: Kadın cinsiyette daha sık görülmektedir.

Aile hikayesi: Meme kanserlerinin %10'u genetik nedenlere bağlıdır. Kromozom 17 ve 13'ün uzun kollarında bulunan BRCA1 ve BRCA2 genleri yüksek riskli aileleri tanımlamaktadır. Genetik mutasyona bağlı meme kanserlerinin çoğu 65 yaşından önce ortaya çıkar. Bu kişilerde over, kolon, prostat ve diğer kanser insidansları da artmıştır. Bilateral meme kanseri olan, meme kanseri ile birlikte başka bir epitelial kanseri de olan ve genç yaşta tanı konulan hastalarda genetik mutasyon taşıma olasılığı artmaktadır. Birinci derece akrabasında meme kanseri olan kişilerde meme kanseri riski 2-3 kat artmaktadır.⁹

Etnik köken: Meme kanseri insidansı gelişmiş ülkelerde ve sosyoekonomik seviyesi yüksek kadınlarda daha yüksektir. 2003-2007 yılları arasında meme kanserinden ölüm Afro-Amerikan kadınlarda en yüksek iken, Asya ve Pasifik kökenli kadınlarda en düşüktür.⁹

Yaşam tarzı: Güçlü bir ilişki olduğu gösterilememiş olsa da, yağlı beslenme ile meme kanseri riski arasında ilişki olduğu düşünülmektedir. Obezite, meme kanseri riskini 2 kat artırır. Bazı çalışmalarda alkol alımı ile meme kanseri riski arttığı gösterilmiştir ancak sonuçlar net değildir.⁹

Daha önceden benign meme hastalığı varlığı: Atipik epiteliyal hiperplazisi olan kadınlarda meme kanseri riski 4-5 kat artmıştır. Hem bu değişikliği olan hem de eş zamanlı aile hikayesi olan kadınlarda ise risk 9 kat artmaktadır.⁹

Radyasyon: İkinci Dünya Savaşı sırasında radyasyona maruz kalan genç kadınlarda meme kanseri riskinin iki katına çıktığı gösterilmiştir. Hızlı meme gelişimi sırasında radyasyon maruziyeti, daha sonraki dönemde meme kanseri gelişme riskini artırmaktadır.⁹

2.4 Kanser ve kemokin ilişkisi:

Kemokinler, lenfoid organ gelişimi ve immün hücre hareketlerini kontrol eden küçük proteinlerdir.^{10,11,12} Kemokinlerin, inflamasyon sırasında lökosit kemotaksisinin uyarılması, lenfoid doku gelişimi, hemostazın sağlanması, hücre proliferasyonu, hematopoiezin sağlanması, virüs/hücre ilişkisi, anjiogenez, neovaskülarizasyon ve kanser metastazı gibi rolleri mevcuttur.^{11,12,13,14,15,16,17} Kemokinler, sitokin süperailisine ait en büyük grup olup ilk iki N-terminal sistein (C) rezidülerinin protein sekansı içindeki yerleşimine göre kendi içlerinde 4 ana gruba ayrılırlar.^{12,18}

- a) CC kemokinler
- b) CXC kemokinler
- c) XC kemokinler
- d) CX₃C kemokinler

Kemokin reseptörleri 7 transmembran domaine sahip G protein ilişkili reseptörler olup, CCR ailesine ait 10 adet, CXCR ailesine ait 7 adet reseptör bulunmaktadır. Bunların yanısıra XCR1, CCRL1, CCRL2 ve CX3CR1 reseptörleri de mevcuttur. Kemokin sisteminde ayrıca sessiz reseptörler bulunur. Bu sessiz reseptörler ligandalarına yüksek affinite ile bağlanmalarına rağmen sinyal iletimi sağlamazlar.¹¹ Günümüzde 50 farklı kemokin, 20 kemokin reseptörü ve 4 tane sessiz reseptör bulunmaktadır.¹² Kemokin, reseptörün ekstraselüler domainine bağlanınca reseptör yapısı değişerek intraselüler kısmın bağlanmasına ve heterotrimerik G proteinlerinin aktifleşmesine yol açar. Böylece kaskad aktifleşerek kalsiyum mobilizasyonu, ekstraselüler protein kinaz, fosfolipaz-c β , fosfatidilinozitol 3-kinaz, RAS, GTPaz, p21-aktive edilmiş kinaz ve NF- κ B aktivasyonu sağlanır.¹¹ Pek çok sitokin aynı

reseptöre bağlanır, bu da spesifik yanıtların oluşması açısından önemlidir. CC reseptörleri CXC reseptörlerine göre daha az seçicidir. Lökositler üzerinde farklı kemokin reseptörlerinin ekspresyonu sayesinde belli koşullarda spesifik hücre tiplerinin ortama toplanması ve böylece uygun ve etkili immün yanıtın oluşturulması sağlanır. Kemokinlerin ve reseptörlerinin uygunsuz ekspresyonu otoimmün ve inflamatuvar hastalıklara ve kanser gelişimine neden olmaktadır.^{12,18,19}

Tümör dokusu birbiri ile karışık sinyalizasyon sistemi aracılığı ile iletişim kuran pek çok hücre tipinden oluşmaktadır. Bu tümör mikroçevresinde, hücre göçü ve hücre-hücre ilişkisinden esas sorumlu yapılar kemokinler olup tümör gelişimine yol açarlar. Tümör mikroçevresindeki bu kemokinler; tümör hücreleri, immün hücreler ve stromal hücreler tarafından ekspresyon edilirler. Belli bir kemokine yanıt olarak farklı immün hücreler, tümör mikroçevresine göç eder ve tümöre karşı immün yanıtı regüle ederler. Ayrıca kemokinler, tümör mikroçevresinde tümör hücreleri ve stromal hücreler üzerinde de etkilidirler. Bu özellikleri ile tümör hücrelerinin proliferasyonunu, kanser kök-hücresi benzeri özelliklerini, kanser invazyonu, anjiogenez ve metastazını regüle ederler. Sonuç olarak bu mikroçevrede bulunan kanser ve konak hücreleri pek çok farklı kemokin salınımına yol açarak, anti-tümör ve pro-tümör yanıtları dengeleyen farklı hücre tiplerinin göçüne ve aktivasyonuna yol açarlar.^{12,18}

2.4.1 Direkt pro-tümör etkileri:

CCL2, CCL3 ve CCL5 kemokinler tümör invazyonu ve metastazında görev görür. CCL2, Janus kinaz 2 – STAT5 ve p38 mitojen aktive edilmiş protein kinaz yollarını kullanarak tümör vaskülarizasyonu ve metastazından sorumludur. Bu üç kemokin aynı zamanda monositlerden matriksmetalloproteinaz (MMP) 9 salınımına yol açarak matrix yıkımını ve böylece tümör ekstrasözasyonuna neden olurlar. CCL2 ve CCL5, kanser hücrelerinde proliferasyon, motilite ve epitelial-mezenkimal transizyondan sorumludurlar.^{10,20,21,22,23,24}

CCL18, meme, pankreas, over ve prostat kanserlerinde tümör hücrelerinin invazyon ve metastazını indükler. Mide kanserinde ise yüksek seviyede bulunması iyi prognostik özelliktir.^{10,24,25,26}

CCR9 ekspresyonu tümörü kemoterapi dirençli hale getirip, tümör hücrelerinden MMP salınımını artırarak invazyona yol açar. CCL25 ise CCR9⁺ tümör hücrelerinin ortama çekilmesinde ve metastazın gelişmesinde rol oynamaktadır.^{10,27,28}

CXCL8, vasküler endotel hücrelerini hedef alarak anjiogenezi artırır. Böylece tümör hücrelerinin invazyonu ve migrasyonu gerçekleşirken, hipoksi ile indüklenmiş tümör apoptozisine direnç geliştirilmesi sağlanır.^{29,30}

CXCL12 de vasküler endotel hücrelerini hedefleyerek tümör anjiogenezi, ayrıca tümör hücre proliferasyonu ve tümör sağ kalımından sorumludur. CXCR4⁺ tümör hücrelerinin kök hücre benzeri özellikleri mevcuttur, bu nedenle yüksek metastatik özellik ve radyoterapi direnci gösterirler. CXCL12-CXCR4 sinyalizasyon yolağının kanser hücrelerinde invazyon ve metastaza yol açtığı düşünülmektedir.^{10,31,32,3,34,35}

BRAX olarak da bilinen CXCL14, farklı tümör tiplerinde farklı etkilere sahiptir. Pankreas ve prostat kanserlerinde CXCL14 seviyesi yüksekken meme, böbrek, servikal ve baş-boyun kanserlerinde CXCL14 seviyesi azalmıştır.^{36,37,38,39,40,41} Dolayısıyla meme kanserinde CXCL14 uyarımının olmaması tümör büyümesi, metastaz ve invazyonu azaltır.^{40,41,42}

CXCL17; monosit ve endotel hücrelerinde vasküler endoteliyal büyüme faktörünün (VEGF) uyarımını artırarak, anjiogenez aracılı tümör büyümesine yol açar.^{43,44}

CXCR7 eksprese eden tümör hücreleri prostat, meme ve akciğer kanserlerinde adezyon, invazyon ve survivaldan sorumludur.⁴⁵ CXCR7 sinyalizasyonu ayrıca CXCL8 ekspresyonunu artırarak dolaylı yoldan anjiogenezi uyarır.⁴⁶

Tümör büyümesi ve progresyonu üzerine etkileri:

Kemokinler tümör hücrelerinin proliferasyonunu ve sağ kalımını birkaç yolak ile sağlarlar. Kemokin reseptörlerinin tümör hücrelerine bağlanması ile mitojen ile aktive edilmiş protein kinaz (MAPK)/ ekstraselüler sinyal ile regüle edilmiş kinaz (Erk) sinyal yolağı aktifleşerek büyümeyi indükleyen genler aktifleşir. Kemokinler aynı zamanda tümör hücreleri içerisinde pro ve anti-apoptotik proteinlerin dengesini

değiştirerek tümör hücrelerinin sağ kalımını artırır. Bunu da Mdm2 ekspresyonunu artırıp Bcl-2 ekspresyonunu azaltarak ve kaspaz 3 ve 9'un aktifleşmesini inhibe ederek yaparlar.^{12,47} Tümör hücreleri aynı zamanda büyümelerini artıran kemokinler de salgırlar ve bu kemokinlerin reseptörlerinin fazla salgılanması büyümeyi uyarıcı kemokinlerin etkisi ile tümör hücrelerinin daha fazla bölünmesine yol açar.¹² Meme epitel hücrelerinde normalde eksprese edilmeyen CXCR4'ün meme kanseri hücrelerinde ekspresyonu bu kanserli hücrelerin CXCL12'ye yanıtını artırır. CXCL12 de tümör hücrelerinin daha önce de bahsedildiği üzere proliferasyonunu, anjiogenezini ve sağ kalımını artırır.^{12,48,49} Tümör mikroçevresindeki stromal hücreler, kanser ilişkili fibroblastlar ve makrofajların da tümör büyümesinde rol oynayan kemokinleri salgıladıkları gösterilmiştir.^{50,51,52}

Anjiogenez üzerine etkileri:

Anjiogenez tümör progresyonunda hız kısıtlayıcı basamaktır; çünkü tümör hücrelerinin hızlı bir şekilde proliferere olabilmesi adına neoanjiogenez hızlandırması ve büyüme için gerekli oksijen ve besinleri tedarik etmesi gerekmektedir. Bu nedenle kemokin ve reseptörlerinin anjiogenezde önemli bir rolü vardır. Kemokinler endotel hücreleri üzerinde bulunan kemokin reseptörlerine bağlanarak migrasyonu ve proliferasyonu artırıp apoptozisi inhibe ederler. En güçlü anjiogenik kemokin CXCL12'dir. CXC grubu kemokinler N-terminal uçlarında ELR(Glutamik asit-lösin-arjinin) olup olmamasına göre 2 alt gruba ayrılır. ELR⁺ CXC kemokinler (CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL6, CXCL7, CXCL8) CXCR1 ve CXCR2 reseptörleri üzerinden anjiogenez stimüle ederken, ELR⁻ CXC kemokinler ise (CXCL4, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL14) anjiogenezini inhibe ederler. CXCL12 ise ELR (-) olmasına rağmen en güçlü anjiogenik kemokindir.¹² CXCL8 ve CXCL12, VEGF'i aktive ederek anjiogenezini uyarırken bazı kemokinler tümör mikroçevresine anjiogenik faktör üreten lökositlerin göçünü uyararak anjiogenezini uyarır.⁵³

CXCL4 ve CXCL10 gibi kemokinler ise anjiogenezini inhibe ederler. Bunu da temel fibroblast büyüme faktörü (bFGF)'nü, VEGF indüklenmiş anjiogenezini ve endotel hücre proliferasyonu ile kemotaksisi inhibe ederek yaparlar.^{54,55,56,57}

Metastaz üzerine etkileri:

CXCR4 ve bunun ligandı olan CXCL12'nin metastazda rolü olduğu gösterilmiştir. CXCR4/CXCL12 aksının bloke edilmesi meme kanserinin akciğerlere metastazını engellediği gösterilmiştir.⁵⁸ CXCR4/CXCL12 aksının aynı zamanda prostat kanseri, akciğer kanseri ve glioblastom metastazlarında da rolü olduğu gösterilmiştir.⁵⁹ Metastaz gelişimi için tümör hücrelerinin lenfatik dolaşıma geçmesi kritik öneme sahiptir ve bu aşamada CCR7 ve bunun ligandı olan CCL21 görev görür.⁶⁰ Aynı zamanda lenfatik endotel hücreleri tarafından subkapsüler sinüste üretilen CCL1 de CCR8⁺ tümör hücrelerini lenf nodlarına çekerek metastaz gelişimine yol açar.⁶¹

Bazı immün hücre grupları efektör hücrelerin fonksiyonlarını suprese ederek tümör büyümesine yol açarlar. Tümör hücreleri büyümek için salgıladıkları bazı kemokinler aracılığı ile bu immün hücrelerin toplanmasına yol açarlar. Hem doğal hem de kazanılmış bağışıklık sisteminin majör inhibitörü olan regülatuar T hücrelerinin (Treg) varlığı kanser hastalarında kötü prognozla ilişkilidir.⁶² Over kanserinde tümör içerisinde artmış CCL22 ve CCL28 ekspresyonu, sırasıyla CCR4⁺ ve CCR10⁺ Treglerin ekspresyonunu artırarak antitümör etkileri baskırlar ve VEGF üzerinden anjiogenezi artırır.⁶³ Aynı zamanda, meme kanseri modellerinde CCR4⁺ Treg'lerin doğal öldürücü (NK) hücrelerin apoptozisini artırarak metastazı indüklediği gösterilmiştir.⁶⁴

Bununla birlikte tümör ilişkili makrofajlar (TAM) ve miyeloid kökenli supresör hücreler (MDSC), hem NK hem de T hücre ilişkili antitümör aktiviteyi baskırlar. Ayrıca tümör dokusuna Treg göçünü artırıp protümör etkiyi artırır. CCR2/CCL2, CCR5/CCL5, CXCR2/CXCL5 ve CXCR4/CXCL12 gibi kemokin ve kemokin reseptörlerinin TAM ve MDSC oluşumunu, toplanmasını ve supresif aktivitelerini artırdıkları gösterilmiştir.^{65,66}

2.4.2 Direkt anti-tümör etkileri:

Ölen kanser hücreleri immünojenik olup anti-tümör immün yanıtı indükler. CXCL8, ölen kanser hücrelerinin immünojenitesini kalretikülini hücre zarına doğru taşıyarak artırır. Hücre yüzeyindeki kalretikülin hücrelerin immünojenitesini artırarak

bu hücrelerin fagositozunu uyarır. CXCL9 ve CXCL10 endojen tümör anjiogenez inhibitörleridir. CXCL10 hem CXCL8 ilişkili hem de bFGF ilişkili anjiogenezisi inhibe eder.^{10,67,68,69}

Kanser hücrelerinin vücuttan temizlenmesinden sorumlu immün hücrelere efektör hücre adı verilir. Bu hücrelerden en önemlileri NK hücreler, $\gamma\delta$ T hücreler ve efektör CD4+ ve CD8+ T hücreleridir.¹² Efektör hücreler tümör mikroçevresine göç ederek kanser hücrelerinin temizlenmesinden sorumludurlar. Bu göçün sağlanmasında kemokinler rol oynar. CXCR3 ve bunun ligandları olan CXCL 9 ve CXCL10, yardımcı T lenfosit-1 (Th1) ilişkili immün yanıt gelişmesini sağlar.⁷⁰ Th1-ilişkili immün yanıt, efektör hücrelerin antitümör hücrel immün yanıtında rol oynar. CXCR3 ilişkili immün yanıt, tümör mikroçevresine NK, CD4+ ve CD8+ T hücrelerinin tümöre göçünü sağlayıp bu hücrelerden salgılanan interferonlar CXCL 9 ve CXCL10 aktivitesini artırır.⁷¹ CXCR3 aynı zamanda makrofaj polarizasyonundan sorumlu olup farelerde deneysel meme kanserinde CXCR3 eksikliğinin tümör büyümesini artırdığı gösterilmiştir.¹² Bunların yanı sıra CCR5 ve bunun ligandı olan CCL5 de antitümör etkili immün hücrelerin toplanmasını sağlar.⁷²

2.5 Tümör dokusunda kemokin ekspresyonunun düzenlenmesi:

Kanserde kemokin ekspresyonu intrinsek genetik ve epigenetik mekanizmalar ve tümör mikroçevresindeki çevresel faktörlerle düzenlenir.¹⁰

2.5.1 Epigenetik mekanizmalar:

İnsan over ve kolon kanserinde PR3 kompleksi ve DNA metilasyonu aracılığı ile Th1 tipi kemokin ekspresyonu suprese edilerek tümör mikroçevresine efektör T hücre göçü engellenir.^{73,74} Akciğer kanserinde ise CXCL14 ekspresyonu DNA metilasyonu ile suprese edilir ve CXCL14 ekspresyonunun artırılmasının, tümör büyümesinde azalmaya yol açtığı gösterilmiştir.⁷⁵ Bir diğer epigenetik mekanizma ise histon deasetilaz 1 enziminin nükleer faktör- $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$) ile etkileşimi sonucu CXCL8 ekspresyonunun supresyonudur.¹⁰

2.5.2 Genetik mekanizmalar

Genetik mutasyonlar da kemokin reseptörlerinin ekspresyonunu ve fonksiyonunu etkiler. Melanom ve kolon kanseri hücrelerinde CXCR4 geninde nokta mutasyon saptanmıştır. Bu mutant reseptörü eksprese eden tümörlerin in vivo olarak büyümelerinin yavaşladığı gösterilmiştir.⁷⁶ Rabdomiyosarkomda ise PAX3 ve FKHR genlerinin mutasyonu artmış CXCR4 ekspresyonu ile ilişkili bulunmuştur. Bu mutant geni taşıyan rabdomiyosarkom hücrelerinin in vitro olarak invazyon kapasitelerinin arttığı gösterilmiştir.⁷⁷ PRC2 kompleksi ilişkili epigenetik sessizleştirme ve β -katenin sinyalizasyon yolları tümörlerin intrinsek tümörojenik mekanizmaları olup kanser mikroçevresi ve kök hücre benzeri biyolojik aktivite ile ilişkilidirler. Bu mekanizmalar kemokin ekspresyonunu ve dolayısıyla tümör dokusuna immün hücre infiltrasyonunu kontrol ederler.¹⁰ Bu intrinsek mekanizmaların manipülasyonu, tümör dokusuna T hücre infiltrasyonunu artırarak tümör boyutunda gerilemeye yol açabilir.¹⁰

2.5.3 Çevresel faktörler

Kanser mikroçevresindeki hipoksi durumunda hücrelerin hipoksiye yanıtı olarak hipoksi ile indüklenen faktör-1 (HIF1) transkripsiyon faktörü salgılanır. Bu transkripsiyon faktörü over tümör hücrelerinde, fibroblastlarda ve hematopoietik kök hücrelerde CXCL12 ekspresyonunun artmasına neden olur. HIF1 aynı zamanda tümör ilişkili miyeloid hücrelerde ve tümör hücrelerinde CXCR4 ekspresyonunda artışa neden olur. Rabdomiyosarkom hücrelerinde ise CXCR7 ekspresyonunu artırır. Sonuç olarak hipoksi belli kemokinlerin ve reseptörlerinin ekspresyonunu düzenleyerek tümör immünitesini etkiler.¹⁰

Kanser hücreleri aerobik glikolizasyon yaparlar. Aerobik glikolizasyon sonucu ortaya çıkan laktik asit, NF- κ B'yı aktive ederek vasküler endotel hücrelerinde CXCL8 ekspresyonunu artırır. Bu durum da meme ve kolon kanserlerinde anjiogenez artışına neden olur. Meme kanserinde reaktif oksijen radikalleri CXCL14 ekspresyonunu artırır, böylece tümör motilitesi ve sonuçta invazyonunda artış meydana gelir.⁷⁸

Hormonlar da kemokin ekspresyonunu etkiler. Meme kanseri hücrelerinde östrojen ile CXCR4 ve CXCL12 ekspresyonu artarken CXCR7 suprese olur.⁷⁹

Tümör mikroçevresinde bulunan mikrobiyanın kemokin ekspresyonunu etkilediğini gösteren herhangi bir kanıt yoktur. Tümör mikrobiyanının özellikle kolon kanserinde tümör immün yanıtı üzerine etkileri olduğu düşünülmektedir.¹⁰

2.6 Kemokinlerin kanser tedavisindeki rolü:

Tümör mikroçevresinde bazı kemokinlerin varlığı kanser tedavisinin etkinliğini belirler. Örneğin farelerde deneysel olarak yaratılan fibrosarkom durumunda verilen antrasiklin tedavisinin CCL2 ekspresyonunu artırarak etki gösterdiği gösterilmiştir.⁸⁰ Melanomda verilen kemoterapinin ise tümörlü dokuya efektör T hücre göçünü sağlayan CXCR3 ve CCL5 ekspresyonunu artırdığı gösterilmiştir.⁸¹

Kemokinlerin tedavi etkinliğini artırmasının yanısıra tedavi direnci yaratmada da rolleri vardır. Örneğin bir meme kanseri modelinde doksorubisin ve siklofosamid kemoterapisinin CXCL1 ve CXCL2 ekspresyonunu artırdığı, böylece tümör mikroçevresine supresör miyeloid kökenli hücre göçüne yol açıp tümör sağ kalımını ve metastazını artırdığı gösterilmiştir.¹²

Son yıllarda hem inflamatuvar hastalıklarda hem de kanser tedavisinde hedefe yönelik tedavi çalışmaları hız kazanmaktadır. CCL2, CCL3, CCL5, CXCL8, CXCL9 ve CXCL10 kanserde fazlasıyla çalışılan kemokinler olup bu kemokinleri ve bunların reseptörlerini hedefleyen tedavilerin kemoterapi ile kombinasyonu antitümöral immün yanıtı artırabileceği düşünülmektedir. CCL2, CCL3 ve CCL5, CCR1, CCR2, CCR3 ve CCR5 reseptörlerine bağlanarak immünsupresif miyeloid hücrelerin tümör dokusuna çekilmesine neden olur. Bu reseptörlerin blokajı bu işlevi önlemektedir. CCL2, CCL3 ve CCL5 sinyalizasyonunun blokajı farede meme, akciğer ve over kanserlerinde metastaz ve anjiogenezisi suprese ettiği gösterilmiştir. Bunu destekleyecek şekilde meme kanseri modelinde CCL2 nötralizasyonunun ortadan kalkması, hızlı metastaz gelişimine ve fare ölümüne yol açmıştır. Bu nedenle bu tedavinin kemoterapi ile kombine verilmesi gerektiği önerilmiştir.^{10,82} CXCL9 ve CXCL10 ise tümörlü dokuya NK ve efektör T hücre göçünden sorumludur. Bu kemokinleri kodlayan genlerin epigenetik olarak sessizleşmesi tümör dokusuna daha az T hücre infiltrasyonuna yol açar. Bu nedenle epigenetik tekrar programlanma

yapılarak bu kemokinleri kodlayan genlerin epigenetik sessizleştirilmesi engellenebilirse, tümör mikroçevresine efektör T hücre göçü artırılarak immünoterapinin etkinliği artırılabilir.¹⁰ CXCR4-CXCL12 sinyalizasyonunun blokajı ise tümör anjiogenezisini, invazyonunu ve tümörle indüklenen immüsupresyonu ortadan kaldırır. Anti-CXCR4 ve anti-CXCL12 antikorlarının prelinik çalışmalarda metastazı, tümör yükünü ve tümör ekstrasvazyonunu azalttığı gösterilmiştir.^{10,83} CXCL8-CXCR1 sinyalizasyonu, tümör anjiogenezisi ve tümör dokusuna inflamatuvar hücre göçünden sorumludur. Bu yolağı bloke eden stratejiler ile tümör mikroçevresi hedeflenebilir. Repertaksin, CXCR1 ve CXCR2'nin yarışmasız inhibitörüdür. Esas olarak CXCL8'i bloke ederek miyokard enfarktüsü ve stroke sonrası gelişen doku hasarının azaltılmasında etkilidir; ancak bu ilacın kanser tedavisindeki yerini araştıran daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.^{10,84,85}

2.7 Kemokinlerin meme kanserindeki yeri ve önemi:

Meme kanseri hem gelişmiş hem de gelişmekte olan ülkelerde bir toplum sağlığı sorunu olarak ortaya çıkmaktadır. Bu durumla mücadelede hastalık patogenezinin moleküler basamaklarının aydınlatılması, hedefe yönelik tedavilerin geliştirilmesine ve sonuçta tedavide daha başarılı sonuçların elde edilmesine olanak sağlayacaktır. Son yıllarda kemokinlerin ve reseptörlerinin tümör patogenezindeki rollerinin anlaşılması meme kanseri gelişiminde bu proteinlerin önemini artırmaktadır. Kemokinler sadece protümöral bir çevre yaratmakla kalmazlar ayrıca tümör progresyonu ve organ hedefli metastazların da ortaya çıkmasında rol oynarlar.⁸⁶

2.7.1 Meme kanseri hücrelerinin çoğalmasında kemokinlerin rolü:

CCL2 hem tümör hücrelerinden hem de tümöral mikroçevreden salgılanan monosit, hafıza T lenfosit ve NK hücrelerinin göçünden sorumlu güçlü bir kemotaktik faktördür. CCR2 ve CCR4 reseptörleri aracılığı ile indirekt olarak anjiogenez ve tümör ilişkili makrofaj infiltrasyonunu artırarak tümöral büyümeyi uyarır.⁸⁷ CCL2 aynı zamanda kanser kök hücre fenotipinin oluşmasını sağlar. Bu kanser kök hücreleri kendilerini yenileyebilen dolayısıyla kemoterapi ve radyoterapiye dirençli hücreler olup metastaz gelişimine yol açarlar.^{86,88}

Meme kanserinin progresyonundan sorumlu bir diğer kemokin ise CCL20'dir.⁸⁶ CCR6 reseptörüne bağlanarak lenfosit ve dendritik hücreleri hedefler. Yüksek CCL20 seviyesi artmış Siklin E düzeyi ve azalmış p27 (Siklin D'nin inhibitörü) düzeyi yaratarak hücre proliferasyonunu uyarır.⁸⁹

CXCL8 de hücre siklusunu uyarıcı bir kemokindir. Bu kemokinin sessizleştirilmesi ile Siklin D1 baskılanarak hücre bölünmesi G1'den S evresine geçemez.⁹⁰ Meme kanser kök hücrelerinin CXCR1 ekspresyonu ve CXCR1'e CXCL8 bağlanması ile bu kök hücrelerin aktivitelerinin arttığı gösterilmiştir.⁹¹

CXCL14 ise normal meme dokusu tarafından yüksek oranda ekspresyon edilen ancak meme kanser hücrelerinde ekspresyonu azalan bir kemokin olup meme kanserinin büyümesini ve metastazını engeller. CXCL14 ekspresyonunun artmış hasta sağkalımı ve azalmış metastaz insidansı ile ilişkisi olduğu düşünülmektedir.⁸⁶

2.7.2 Tümör mikroçevresinde kemokinlerin rolü:

Tümör mikroçevresindeki makrofajlar, bir seri büyüme faktörü ve sitokin etkisi ile tümör ilişkili makrofaj (TAM) haline gelerek anjiyogenik ve immünomodülatuar etkiler ortaya çıkarırlar. CCL2, monositler için güçlü bir kemoatraktandır. CCL5 (RANTES) de tip 2 yardımcı T lenfositlerin ve eozinofillerin CCR1, CCR3 ve CCR5 reseptörleri aracılığı ile tümör mikroçevresinde toplanmasına yol açar. Bu iki kemokin normal meme dokusunda az miktarda ekspresyon edilirken primer tümör hücrelerinde, tümör ile infiltrasyon nodlarında, uzak metastazlarda ve tümöre komşu hücrelerde ekspresyonları artar.^{86,87} CCL2 düzeyi arttıkça tümör mikroçevresindeki TAM düzeyi artar. CCL2'yi nötralize eden antikolar varlığında TAM düzeyi, anjiyogenez ve tümör büyümesi azalır.⁹²

CCL19, CCL20 ve CCL21 ise dendritik hücre trafiğini kontrol ederek antitümöral etki gösterirler.⁹³ Aynı şekilde CXCL9 ve CXCL10'da tümör mikroçevresinde aktive T lenfositlerin ve NK hücrelerinin toplanmasını artırarak ve anti-anjiyogenik etki yaratarak antitümöral etki gösterirler.⁹⁴ CXCL12'nin de CD8⁺ sitotoksik T lenfositlerin aktivitelerini artırdığı gösterilmiştir.⁹⁵

CX3CL1, CX3C kemokin alt grubunun tek elemanı olup monosit, T lenfosit ve NK hücrelerinin yüzeyinde bulunan CX3CR1 reseptörü üzerinden antitümöral etki

gösterir ve artmış CX3CL1 düzeyinin daha uzun hastaliksız sağ kalım süresi ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir.⁸⁶

Bunların aksine, T_{reg} infiltrasyonu kötü prognozla ilişkilidir. T_{reg} 'ler interlekin-10 (IL-10) ve TGF- β salgılayarak hem antijen sunucu hücrelerin maturasyonunu engeller hem de sitotoksik T lenfositler ile NK hücrelerinin sitotoksik etkilerini azaltır. CCL22'nin mide, özefagus ve over kanserlerinde T_{reg} infiltrasyonunu artırdığı gösterilmiştir.^{96,97,98} İnsan meme kanser hücre gruplarında CCL22'nin düşük bazal seviyelerde salgılandığı ancak inflamatuvar sinyallere cevaben seviyesinin arttığı bildirilmiştir.⁸⁶

2.7.3 Anjiogeneze kemokinlerin rolü:

CXC kemokin alt grubunda anjiogenik ve anti-anjiogenik kemokinler bulunur. Anjiogenik kemokinler; CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL6 ve CXCL8'dir. Bu kemokinler anjiogenik etkilerini CXCR2 reseptörü üzerinden gösterir veya tek başlarına ya da VEGF gibi anjiogenik faktörlerle birlikte anjiogenezi artırır.⁸⁶ En potent anjiogenik kemokinlerden biri olan CXCL8'in transkripsiyonunun ve sekresyonunun östrojen tarafından artırıldığı gösterilmiştir.⁹⁹ CXCL12 bir ELR⁻ CXC kemokin olmakla beraber diğer ELR⁻ kemokinlerden farklı olarak anjiogenik etki gösterir. Bunu da endotel hücre migrasyonu ve proliferasyonunu uyarıp VEGF salınımını artırarak yapmaktadır.⁹³

Anti-anjiogenik CXC kemokinler ise CXCL4, CXCL9, CXCL10, CXCL11 ve CXCL14'tür. CXCL4, CXCL9 ve CXCL10 kemokinleri CXCR3 reseptörüne bağlanır. Böylece mikrovasküler endotel hücre migrasyonu ve proliferasyonu engellenir.⁹⁴

CCL2 ve CCL5'in tümör mikroçevresine hücre göçünün sağlanmasının yanı sıra anjiogenezi artırıcı görevleri de bulunmaktadır. CCL2 hem direkt olarak endotel hücrelerini hem de VEGF, timidin fosforilaz ve CXCL8 üzerinden anjiogenezi uyarır. Ayrıca tümör mikroçevresine çektiği TAM'ların sayısını artırarak, indirekt olarak bunların salgıladığı diğer anjiogenik faktörler üzerinden anjiogenezi uyarır.⁸⁷

Lenfatik metastaz gelişiminde anahtar basamak olan yeni lenfatik yolların gelişimi (lenfanjiogenez) ile, CXCL12'nin lenfanjiogenik endotel hücreler üzerinde kemoatraktan özellik göstermesi arasında ilişki olduğu gösterilmiştir.¹⁰⁰

2.7.4 Metastazda kemokinlerin rolü:

CXCL12-CXCR4 aksı organ hedefli metastazda rol oynar. CXCL12, reseptörü olan CXCR4 ile bağlanarak intraselüler sinyal iletim yollarını ve efektör molekülleri aktive ederek kemotaksis, migrasyon ve adezyonu kontrol eder. Düşük CXCR4 içeren hücrelerin fareye enjeksiyonu ile metastaz gelişmediği, yüksek CXCR4 içeren hücrelerin ise uzak organ metastazı yarattığı görülmüştür.¹⁰¹ CXCL12 normal şartlarda akciğer, kemik, karaciğer ve lenf nodlarında eksprese edilir ve malign meme kanseri hücrelerinde CXCR4 ekspresyonunun artması ile bu malign hücrelerin CXCR4 ligandına hareketi uyarılır.¹⁰² Malign hücrelerin nasıl kan-beyin bariyerini geçerek beyin metastazı yaptığı net bilinmemekle beraber CXCL12 eksprese eden merkezi sinir sistemi hücrelerinin metastatik meme kanseri hücreleri için kemoatraktan görevi gördüğü düşünülmektedir.¹⁰³ TNBC, en agresif meme kanseri alt tipidir ve son yıllarda CXCR4 ekspresyonunun diğer alt gruplara kıyasla TNBC'de en yüksek olduğu gösterilmiştir.⁸⁶ CXCR4⁺ hastaların daha büyük tümör yüküne sahip olduğu, daha yüksek oranda metastaz yaptığı ve daha kısa total ve hastalısız sağ kalımları oldukları gösterilmiştir.¹⁰⁴

Kemik metastazı gelişiminde osteoblastlar ve kemik iliği hücreleri tarafından eksprese edilen kemokinlerin rolü olduğu düşünülmektedir. Osteoblastların diferansiyasyonları sırasında mezenkimal kök hücreleri CCL2 sekrete ederler ve bu durumun kanser hücrelerinin kemiğe göçünü uyardığı düşünülmektedir.¹⁰⁵ CX3CL1, kemik iliği endotel hücrelerinin lümene bakan yüzlerinde membrana bağlı olarak bulunur. Bunun reseptörü olan CX3CR1 ise normal ve malign meme dokusu tarafından eksprese edilir. Meme kanseri varlığında ekspresyonu artan CX3CR1, bu kanser hücrelerini ligandına doğru göçe zorlayarak kemik metastazına yol açar.¹⁰⁶

CCL5, CCL20, CXCL12 ve CXCR7, MMP ekspresyonunu artırarak ekstraselüler matriksin bozulmasına böylece kanser hücrelerinin mobilitesinin artmasına yol açarak metastazı destekler. CXCL7'nin en yüksek heparinaz aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir.^{89,93,107}

CCL21 de reseptörü olan CCR7'e bağlanarak aktin polimerizasyonunu aktifleştirir, psödopod oluşumuna yol açar ve özellikle lenf nodlarına meme kanseri hücrelerinin adezyonunu sağlar.¹⁰²

Chen ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ise tümör ilişkili makrofajların CCL18 ürettikleri ve CCL18 ile invazyon yeteneği arasında bir ilişki olduğu gösterilmiştir.¹⁰⁸

2.8 Meme kanserinde karaciğer metastazında rol oynayan faktörler:

Meme kanseri, her ne kadar kadınlarda en sık ölüme neden olan kanser türü olsa da 5 yıllık sağ kalım %99'dur. Ancak, hastaların 1/3'ü uzak organ metastazı ile tanı alırken, uzak organ metastazı olanlarda 5 yıllık sağkalım %23'e geriler.^{109,110} Meme kanseri en sık kemik, akciğer, karaciğer ve beyine metastaz yapar. Karaciğer 3. en sık metastaz yaptığı solid organdır. Eğer karaciğer metastazı tedavisiz bırakılırsa ortalama yaşam süresi 4-8 aydır.¹¹¹ Karaciğer dokusunda meme kanserinin oluşumu ve büyümesi kompleks bir durumdur. Meme kanserinin akciğer ve kemiğe metastazının moleküler mekanizması detaylı araştırılmışsa da karaciğere metastazında rol oynayan moleküler mekanizmalar net değildir. Bu mekanizmaların aydınlatılması karaciğer metastazı olan meme kanseri vakalarında daha etkili tedavilerin geliştirilmesi açısından önemlidir.¹⁰⁹

2.8.1 İnflamatuvar faktörler:

Meme kanser hücrelerinin inflamatuvar kaskadı başlatabildiği ve böylece karaciğer sinüzoidal endotel hücrelerine tutunabilirliği artırdıkları gösterilmiştir.¹¹² Metastaz sırasında tümör hücrelerinin endotele tutunması olayı multifaktöriyel olmakla beraber tümör nekroz faktör- α (TNF- α) ile indüklenen endotelial E-selektin anahtar rolü oynamaktadır.¹¹³ Ayrıca, metastatik meme kanserli hastalarda artmış IL-6 seviyesi meme kanseri hücrelerinin proinflamatuvar bir mikroçevre yaratarak hücre adezyonunu ve karaciğere tümör invazyonunu artırdığını desteklemektedir.¹⁰⁹

2.8.2 Kemokin ve kemokin reseptörleri:

Meme kanser hücreleri karaciğer metastazını başlatan belli kemokin reseptörlerinin ekspresyonunu yaparlar. Bunlardan en sık olanı CXCR4'tür. CXCR4 ligandı olan CXCL12 ekspresyonu da karaciğerde artmıştır. Bu sonuçlar CXCR4/CXCL12 yolağının meme kanserinin karaciğer metastazında rol oynadığını göstermektedir.^{109,114} CXCR4 aynı zamanda integrin-adezyon reseptör sinyalizasyon sistemini de etkileyerek karaciğer metastazını indükler. Aksiller lenf nodu metastazı olan primer meme kanserli hastalarda CXCR4 ekspresyonundaki artışın, karaciğere metastaz riskini artırdığı gösterilmiştir.¹¹⁵ Deneysel fare çalışmalarında CCL2'yi nötralize eden antikorların, meme kanser hücrelerinin proliferasyonunu ve tümör ilişkili makrofaj toplanmasını azaltarak karaciğer metastazını engellediği gösterilmiştir.¹¹⁶ Meme kanseri mikroçevresi tarafından salgılanan CCL5'in karaciğere metastaza yol açtığı çalışmalarda gösterilmiştir. Bu sonuç Stormes ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada da tümör ilişkili CCL5 inhibisyonu ile karaciğere metastaz kapasitesinin azaltıldığının gösterilmesi ile kanıtlanmıştır.^{117,118} Sonuç olarak belli kemokinler ve bunların reseptörleri meme kanserinin karaciğere metastazında rol oynamaktadır. Porter ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ise meme kanserinde CXCL1, CXCL2, CXCL5, CXCL6, CXCL8, CXCL20, CX3CL1, CCL2 ve CCL7 gibi kemokinlerin kaybolduğu gösterilmiştir. Bu kemokinlerin karaciğer metastazında rolleri olup olmadıklarının aydınlatılması için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.¹¹⁹

2.8.3 Hücre adezyon molekülleri:

Kadherinler: Primer meme kanserinde kanser hücrelerinde epitelden mezenkime transizyonun, artmış invazyon ve disseminasyon (yayılım) ile ilişkisi olduğu düşünülmektedir. Kanser hücreleri metastaz yaptıkları dokuya gittikten sonra gelişen bu transizyon, metastatik odağın kolonizasyonuna ve büyümesine yol açar. Meme kanser hücrelerinde bir adezyon molekülü olan E-kadherinin ekspresyonu hepatositlere adezyonu artırır.¹⁰⁹ Yapılan çalışmalarda E-kadherin eksprese eden meme kanser hücrelerinin karaciğer metastazı yapabildiği ama E-kadherin (-) tümörlerin nadiren tümör oluşturabildikleri gösterilmiştir.¹²⁰ Chao ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada da karaciğer mikroçevresinin meme kanser hücrelerinde E-kadherin ekspresyonuna yol açtığı ve böylece metastaza neden olduğu bildirilmiştir.¹²¹ Bir diğer

kadherin olan N-kadherinin de karaciğer metastazında rolü mevcuttur. Hazan ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada meme kanseri enjekte edilen tüm fareler arasında en yüksek N-kadherin seviyesine sahip olanların karaciğer metastazı geliştirdiği gösterilmiştir.¹²²

İntegrin kompleksleri: Fibronektin ve kollajen-4 reseptörü gibi fonksiyonel integrin komplekslerinin karaciğer metastazı yapan meme kanser hücrelerinin yüzeyinde arttığı gösterilmiştir. Bu integrin komplekslerini bloke eden antikörlerin varlığında ise meme kanser hücrelerinin karaciğere metastaz yeteneklerinin azaldığı bildirilmiştir.¹²³

a. Epitelyal hücre adezyon molekülü (Ep-CAM): Ep-CAM bir transmembran protein olup hücre proliferasyonu, adezyonu, migrasyonu ve doku bütünlüğünün korunmasında görev görür. Benign meme dokusunda az miktarda eksprese olur. Meme kanseri dahil pek çok karsinomda ekspresyonu artar. Karaciğer metastazı dahil metastik meme kanserinde seviyesinin artması, metastaz gelişiminde rolü olduğunu düşündürmektedir.¹⁰⁹

b. CD44: Kanser kök hücreleri üzerinde CD44 ekspresyonunun artması adezyon, invazyon, apoptoza direnç ve metastazdan sorumludur. Erin ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada karaciğere metastaz yapan meme kanser hücrelerinde CD44 ekspresyonunun en yüksek olduğu gösterilmiştir.¹²⁴ Ayrıca serum CD44 v5 ve v6'nın meme kanser hücrelerinden salındığı ve karaciğere metastazı olan hastalarda v6 seviyesinin arttığı bildirilmiştir.¹²⁵

Klaudinler:

Klaudinler komşu hücreler arasındaki sıkı bağlantı komplekslerin oluşumundan sorumlu transmembran proteinlerdir. Klaudin-2'nin meme kanserinde sadece rekürrens riskini belirleyen değil aynı zamanda karaciğere metastazdan da sorumlu olan önemli bir prognostik belirteç olduğu gösterilmiştir.¹²⁶ Klaudinlerin meme kanserindeki rolleri karmaşıktır. Bir yandan meme kanseri hücresinde normal dokuya kıyasla klaudin-2 ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir. Dolayısıyla meme kanserinde klaudin-2'nin tümör baskılayıcı bir rol oynadığı düşünülmektedir. Diğer

yandan klaudin-2, fibronektin ve tip 4 kollojen gibi ekstraselüler matriks proteinlerine adezyonu artırarak, karaciğere metastazda rol oynamaktadır.¹⁰⁹ İmmünohistokimyasal analizler tüm karaciğer metastazlarında klaudin-2'nin pozitif olduğunu ancak primer insan meme kanserinde ise zayıf eksprese olduğunu göstermektedir. Tüm bu çalışmalar klaudin-2'nin ekstraselülermatrikse adezyonda ve karaciğere metastazda yeni tanımlanan rolleri olduğunu göstermektedir. Ayrıca, klaudin-3, klaudin-4 ve klaudin-7'nin de meme kanseri hücrelerinin karaciğere metastazında rolü olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur.¹⁰⁹

Hipoksi ile indüklenen faktör ile ilişkili genler:

Hipoksi ile indüklenen faktörler (HİF) meme kanseri progresyonu, anjiogenez, lokal doku invazyonu ve metastazdan sorumlu genlerin aktivasyonunda rol oynar. HİF'ler tarafınca indüklenen osteopontin ve vasküler endotelial büyüme faktörü karaciğere metastaz gelişiminde rol oynar.¹⁰⁹ Osteopontin, fosfoprotein yapısında bir hücre adezyon molekülü olup CCL5 ve MMP ekspresyonunu artırarak tümör büyümesine ve metastazına yol açar.¹⁰⁹

ER, PR ve HER2 durumu:

Koo ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ER (+) veya PR (+) ama HER2 (-) meme kanserlerinde karaciğer metastazının daha sık olduğu gösterilmiştir.¹²⁷ Yüksek serum HER2 düzeyinin varlığı ve ER'nin negatif olması, progresyon ve mortalite riskini iki katına çıkarır. Karaciğer metastazı varlığında yapılan karaciğer biyopsisi ile ER,PR ve HER2 varlığının araştırılması daha etkili tedavi stratejisi oluşturması adına önemlidir.¹⁰⁹

2.9 Karaciğer rezeksiyonu ve rejenerasyonu:

Karaciğer aynen cilt ve kemik iliği gibi rejenerasyon yolu ile iyileşir. Karaciğer rejenerasyonu hem hipertrofi hem de hiperplazi süreçlerini içerir. Hepatik rejenerasyon özellikle hasar, iskemi ve rezeksiyon sonrası gelişirken, rezeksiyon rejenerasyonun en güçlü stimülatörüdür.¹²⁸ Karaciğerde rejenerasyon, karaciğer dokusunda bulunan tüm hücrelerin (hepatosit, ITO hücreleri, endotel ve epitel hücreleri, Kupfer hücreleri) boyut ve sayısında artış ile başlar. Özellikle parsiyel

hepatektomiye takiben intrasellüler trigliserit miktarında artış ile hafif hücresel şişme meydana gelir. Bu da karaciğerde bir miktar yağlı infiltrasyona neden olur. Hücresel düzeyde ise proliferasyon ilişkili enzimlerin ekspresyonunda artış meydana gelir. Sıçan modellerinde DNA sentezinin 36-48 saat sonra başladığı gösterilmiştir. DNA sentezi sirkadian bir ritm gösterir ve portal kan akımının arttığı postprandial dönemde artar.^{128,129} Hücre bölünmesinde sirkadian ritmi sağlayan regülatörün WEE1 kinaz olduğu düşünülmektedir. WEE1, Cdc2 kinazı fosforile ederek Cdc2/Siklin B1 kompleksini bloke eder ve hepatosit mitozunu durdurur. WEE1 ekspresyonu sirkadian ritm gösterir. Hücrelerin G2 fazından mitozu geçmeleri WEE1 düzeyi ile ters orantılıdır.¹³⁰ Normal bir karaciğerde hepatositler sessiz evrededir (G₀) ve in vitro mitojenler olan transforming büyüme faktörü- α (TGF- α), epidermal büyüme faktörü (EGF) ve hepatosit büyüme faktörlerine (HGF) karşı minimal yanıt verirler. Hepatik dokunun kaybından sonra hepatositlerde 24 saatte, kolanjiyositlerde 48 saatte, Kupfer hücrelerinde 72 saatte ve sinüzoidal endotel hücrelerinde 96 saatte pik proliferasyon görülür.¹²⁸ Hücresel proliferasyon, periportal alandan başlayıp perisantral alana doğru yayılır. Hücresel proliferasyon ile organize olmamış hücre topluluğu ortaya çıkar. Bu model daha organize olacak şekilde bir takım değişiklikler geçirerek tip 1 ve tip 4 kollojen biriktirmeye ve anjiogeneze başlar. Karaciğer dokusunun rezeksiyon sonrası toparlaması sıçanlarda 7-10 gün sürmektedir.¹²⁸ Karaciğer optimal fonksiyonel boyutuna ulaşıncaya rejenerasyon durur. Dolayısıyla karaciğer rejenerasyonu patolojik anjiogeneze ve kontrolsüz büyümeye yol açmaz.

Karaciğer rejenerasyonu en az 3 yolak içermektedir. Bunlar sırasıyla sessiz evrede bekleyen hepatositleri hücre döngüsüne sokan sitokin yolağı, hücre döngüsünün ilerlemesinden sorumlu büyüme faktörü yolağı ve hücre proliferasyonu ile matürasyonunu sağlayan metabolik yolağıdır. Bu süreçte en önemli rolü oynayan sitokinler TNF- α ve IL-6'dır. TNF- α temel olarak kupfer hücrelerinden, IL-6 ise karaciğerin diğer hücrelerinden salgılanmaktadır. Rejenerasyon sürecinde, TNF- α 'nın serum düzeyinde ve karaciğer dokusunda mRNA seviyesinde artış mevcuttur. TNF- α salgılamasından özellikle bağırsak kökenli lipopolisakkaritler, C3a ve C5a gibi kompleman ürünleri ve intersellüler adezyon molekülleri sorumludur. Salınan TNF- α , tip 1 reseptörüne (TNFR1) bağlanarak NF- κ B ve STAT-3'ü aktive eder. Parankim dışı hücrelerde NF- κ B aktive olarak IL-6 üretimi ve hepatositlerde STAT3 aktivasyonuna

yol açar. Sonuçta ortaya çıkan sitokin şelalesi ile G₀/G₁ geçişi sağlanarak hücreler bölünmeye hazır hale gelir. Bundan sonraki hücre döngüsünün ilerlemesi ise büyüme faktörlerinin kontrolü altındadır. Kontrolsüz hücre büyümesini engellemek amacıyla ise aktive olan STAT3 aracılığıyla Socs3 geni aktive olarak, STAT3'ün fosforilasyonu inhibe olur ve IL-6 sinyalizasyonu bloke edilir. Böylece feed-back kontrol sağlanır.¹³⁰ Karaciğer rejenerasyonunda sitokin aktivasyonunun rolünden dolayı, bu sitokin kaskadını başlatan faktörlerin aydınlatılması önemlidir. Burada en önemli faktörün lipopolisakkaritler (LPS) olduğu düşünülmektedir. Cornell ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada LPS üretimi kısıtlı olan sıçanların parsiyel hepatektomi sonrası rejenerasyonu başlatmalarında gecikme olduğu gösterilmiştir.¹³¹ LPS, toll-like reseptör 4'e (TLR4) bağlanarak bir çok hücre içi sinyalizasyon yolağını aktive eder. Bu sinyalizasyon moleküllerinden bir kısmı miyeloid differansiyasyon faktörü 88'e (MyD88) bağlıdır. MyD88 knock-out farelerin TNF ve IL-6 üretimi yapamadıkları gösterilmiştir.¹³² Bu farelerde aynı zamanda STAT3 aktivasyonunun ve Socs3 gibi STAT3 genlerinin de aktivasyon ve ekspresyonunun yapılamadığı bildirilmiştir.¹³⁰ Sitokin aktivasyonunda C3 ve C5 gibi kompleman sistemi elemanlarının da rolü olduğu düşünülmektedir. C3 ve C5 eksikliği olan farelerde TNF ve IL-6 üretilemediği ve NF-κβ ile STAT3'ün aktive olamadığı bildirilmiştir.¹³⁰

Karaciğer rejenerasyonu sırasında hücre döngüsünde en önemli rolü oynayan büyüme faktörleri HGF ve EGFR ligand aileleridir. HGF, mezenkimal hücreler tarafından üretilerek parakrin ve endokrin yollar üzerinden hepatositleri etkiler. EGF reseptörüne bağlanan ligandlar ise EGF, TGFα, heparin bağlayıcı EGF benzeri büyüme faktörü (HB-EGF) ve amfiregulindir. TGFα otokrin bir büyüme faktörü olup hepatositlerden üretilir ve hepatositler üzerine etkilidir. Hücre proliferasyonu, motilitesi ve vaskülarizasyonundan sorumludur. Epidermal büyüme faktörü ise fare ve sıçanlarda tükürük bezlerinde üretilen bir büyüme faktörü olup sialoadenektomi yapılan farelerde hepatosit DNA sentezinde gecikme olduğu gösterilmiştir.¹³³ HB-EGF ise HGF ve TGFα'dan önce eksprese edilir ve HB-EGF knock-out farelerde parsiyel hepatektomi sonrası DNA replikasyonunda gecikme olduğu gösterilmiştir.¹³⁴ Amfirefulin eksikliği olan farelerde de parsiyel hepatektomi sonrası DNA replikasyonunun gecikmesi bu büyüme faktörünün de rejenerasyonda rolü olduğunu düşündürmektedir. Sitokinler ve büyüme faktörleri arasındaki ilişkiden sorumlu en

önemli faktör, sitokinler tarafından aktive olan MMP'dır. Parsiyel hepatektomi sonrası bir takım MMP'lerde artış meydana gelir. Kim ve arkadaşlarının çalışmasında karaciğer rejenerasyonu erken evresinde pro-MMP2 ve pro-MMP9'un aktive olduğu gösterilmiştir.¹³⁵ ADAM17 adı verilen MMP, TNF tarafından aktive edilerek TGF α salınımına, EGFR aktivasyonuna ve hepatositlerde hücre proliferasyonuna yol açar. Yine karaciğer rejenerasyonun erken evrelerinde mitokondrilerin yapısında da değişiklik olduğu Ca⁺² içeriklerinde artış olduğu gösterilmiştir.¹³³ Karaciğer rejenerasyonu sırasında ortaya çıkan lobül yapılarının hem yeni gelişen lobüllerden hem de daha önceden mevcut lobüllerin hiperplazisinden oluştuğu düşünülmektedir.

Sekonder karaciğer tümörü olan hastalarda uzun süreli sağ kalım hepatik rezeksiyon ile sağlanabilmektedir. Ancak yapılan bir takım klinik çalışmalar, karaciğer rezeksiyonu sonrası rejenerasyon evresinde ortaya çıkan bir takım sitokin ve anjiojenik faktörlerin tümör büyümesini indüklediğini düşündürmektedir. Elias ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada sağ portal ven embolizasyonu yapılan karaciğer rezeksiyonlu hastalarda karaciğer metastazının büyüme hızının normal karaciğer parankiminden sekiz kat daha fazla olduğu ve karaciğer rejenerasyonunun tümör hücreleri üzerinde belirgin proliferatif etkisinin olduğu gösterilmiştir.¹³⁶ Hayvan çalışmalarında da karaciğer rezeksiyonu sonrası tümör büyümesinde artış olduğu gösterilmiştir. Tümörün uyarılma derecesi ve ekstrahepatik metastaz gelişimi ile rezeksiyon derecesi arasında ilişki vardır. De Jong ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada karaciğer rejenerasyonunun geri kalan karaciğerdeki mikrometastazları hepatotropik faktörler aracılığı ile indüklediği gösterilmiştir. Bu çalışmada metastatik kolorektal kanserli sıçanlarda %70 hepatektomi sonrası geri kalan karaciğerde artmış tümöral büyüme görülmüştür.^{136,137} Hepatektomize farelerde hepatik metastatik tümörlerin sham hepatektomilere göre daha hızlı büyüdüğü gösterilmiştir. Bu iki grup arasında ekstrahepatik metastaz gelişimi açısından fark bulunamamıştır ve bu durum, karaciğer rejenerasyonu ile ilişkili lokal parakrin faktörlerin karaciğer dokusu içerisinde büyüme stimüle ettiğini düşündürmektedir.¹³⁶ Schindel ve Grosfeld tarafından yapılan çalışmada ise hepatik rezeksiyon yapılan deney grubunda sham hepatektomi grubuna göre hem hepatik hem de ekstrahepatik metastatazların arttığı gösterilmiştir.¹³⁶ Christophi ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada da kolorektal kanserin karaciğer metastazı varlığında %70 hepatik rezeksiyonun hem intrahepatik

metastazlarda hem peritoneal ve akciğer metastazlarında artışa sebep olduğu gösterilmiştir.¹³⁶ Hepatektomi sonrası tümör rekürens, dolaşan tümör hücreleri ya da sessiz mikrometastazlar nedeniyle gelişir. Karaciğer rejenerasyonu, rezeksiyonu takiben hemen başlamaktadır ve kompleks bir süreçtir. Karaciğer rejenerasyonu sırasında HGF, EGF, TGF- α , HIF-1 α , VEGF ve matrix metalloproteinazların ekspresyonundaki artış karaciğer rezeksiyonu sonrası gelişen metastazları artırmaktadır. Bu büyüme faktörlerinin tümör hücreleri üzerine etkisinin normal karaciğer parankim hücreleri üzerine etkisinden daha fazla olduğu düşünülmektedir. Karaciğer rejenerasyonu sırasında ortaya çıkan büyüme faktörlerinin yanısıra hepatik rezeksiyon derecesinin de tümör gelişimi ile ilgili olduğu düşünülmektedir. Rezeke edilen karaciğer dokusu miktarı arttıkça rekürens insidansı ve miktarı artmaktadır. Rezeke edilen karaciğer dokusu boyutu ile eksprese olan büyüme faktörü miktarı arasında ilişki olduğu bulunmuştur. %50'den daha az olan rezeksiyonlar minör rezeksiyon olarak kabul edilmiş olup bu rezeksiyonlar sonrası tümör proliferasyonunun artmadığı belirtilmiştir. Castillo ve arkadaşlarının farelerde yaptığı çalışmada %42'lik karaciğer rezeksiyonunun tümör büyümesini artırmadığı ve sağ kalımı uzattığı gösterilmiştir ancak bu rezeksiyon miktarının küçük olması nedeniyle yeterince büyüme faktörü ekspresyonunun uyarılmasına yol açamayacağı tartışılmıştır.¹³⁸ Harun ve arkadaşları tarafından fareler üzerinde yapılan çalışmada %37 ve %70 hepatik rezeksiyon yapılan gruplardan %37 rezeksiyonun tümör büyümesi üzerine belirgin etkisi olmadığı görülmüştür. %70 karaciğer rezeksiyonu yapılan deney grubunda ise özellikle karaciğer rejenerasyonunun geç evresinde hem intrahepatik tümör hücrelerinde hem de ekstrahepatik metastazlarda belirgin artış olduğu gösterilmiştir.¹³⁹

2.10 Karaciğer rejenerasyonunda hayvan modelleri:

Hayvan modellerinde karaciğer rejenerasyonunun deneysel olarak indüklenmesi, cerrahi rezeksiyon ve toksin aracılı hasar olmak üzere iki şekilde sağlanır. Karaciğer rejenerasyonunun indüklenmesi standart deneysel durumlar altında yapılmalıdır. Çünkü karaciğer rejenerasyonu, replikasyon öncesi süre, hayvanın türü, nütrisyonel durumu ve sirkadian ritmine bağlıdır. Eğer karaciğer rejenerasyonu cerrahi rezeksiyon ile sağlanacak ise analjezi ve postoperatif anestetik işlem de standardize

edilmelidir. Karaciğerde metabolize edilen halotan ve tramadol gibi ilaçlardan kaçınılması gerekmektedir.¹⁴⁰ İşlem sırasında ve sonrasında vücut sıcaklığı sabit kalacak şekilde işlem yapılmalı ve her deneysel işlemde mutlaka sham hayvan kullanılmalıdır. Kullanılacak hayvanlar sıçan ve fareler gibi küçük hayvanlar olabileceği gibi domuz, koyun ve köpek gibi büyük hayvanlar da olabilir. Küçük hayvanlarla çalışmanın avantajları arasında hem hayvanı kontrol etmek daha kolaydır hem de daha az maddi yüke ve etik sorunlara sahiptir. Buna karşın, küçük hayvan deneklerinde yapılan çalışmaların sonuçları insanlara genellemek zordur; çünkü bu hayvanlarda metabolizma daha hızlıdır ve karaciğer dokusunun boyutu ve anatomisi insanlardan farklıdır. Büyük hayvanların anatomisi ve fizyolojisi insanlarla daha benzer olması nedeniyle, özellikle klinik uygunluk çalışmaları için kullanılabilirler. Büyük hayvanlarla çalışma yapmanın daha fazla finansal, lojistik ve etik sorunları mevcuttur.

Parsiyel hepatektomi sonrası karaciğer rejenerasyonunun indüksiyonu çıkarılan fonksiyonel karaciğer dokusunun miktarı ile ilişkilidir. Sıçanlarda 2/3'lük rezeksiyon hem iyi tolere edilir hem de rejenerasyon hızlı olur. Eğer 2/3'ten daha az rezeksiyon yapılır ise rejenerasyon daha yavaş olmaktadır. Normalde karaciğer hücreleri G₀ evresinde beklemektedir ancak rezeksiyon ile uyarılan bu hücreler eş zamanlı olarak hücre döngüsüne girerler. Bu süreçte pek çok sinyal kaskadı elemanı yer alır. Bunlar; büyüme faktörleri, sitokinler ve hücre ölümünün moleküler yollarıdır. Karaciğer rejenerasyonu sırasında karaciğer hücrelerinde artmış bir proliferasyon mevcutken, apoptotik süreçte azalma olur. Popescu ve arkadaşlarının 30 fare üzerinde yaptığı çalışmada, histolojik olarak normal karaciğer hücrelerinin çoğunun tek hücreli poligonal yapıda ve sinüzoidal kapillerler arasında sıralı halde oldukları ancak parsiyel hepatektomi yapıp 24 saat sonra sakrifiye edilen farelerden elde edilen karaciğer dokusunda hepatositlerde hipertrofi, iki çekirdekli hale dönüş ve belirgin çekirdekçik olduğu gösterilmiştir.¹⁴¹ Sitoplazmada ise yağ vezikülleri görülmüştür. Yine aynı çalışmada 48 saat sonra sakrifiye edilen farelerde iki çekirdekli ya da hipertrofik çekirdekli ve belirgin makroveziküler steatozun olduğu histolojik olarak gösterilmiştir.¹⁴¹ Hepatosit proliferasyonun başladığı yer olan periportal alanda karaciğer lobüler mimarisinin bozulduğu, hepatositlerin kord şeklindeki diziliminin ve hepatic radyal sinüzoidlerin kaybolduğu bildirilmiştir. Bu çalışma ile karaciğer

rejenerasyonu sırasında hepatositlerdeki proliferasyonun periportal alandaki matür hepatositlerden başladığı ve bu hücrelerin bölünerek genç hepatositleri oluşturduğu gösterilmiştir. Makroveziküler steatoz ise lipidleri metabolize eden enzim sisteminin parsiyel hepatektomi sonrası sekteye uğraması sonucu meydana gelir. Farede hepatosit proliferasyonu cerrahiye takiben 10-12 saatte başlamakta ve yaklaşık 30 gün sonra sona ermektedir.¹⁴¹

2.11 Deneysel Meme Kanseri Oluşturulması

Deneysel meme kanseri oluşturulması iki farklı yöntemle yapılabilir. Bunlardan ilki, kimyasal karsinojenlerle oluşturulan meme kanseri, ikincisi ise 4T1 meme kanseri hücresi enjekte edilerek oluşturulan meme kanseridir.

Kimyasal olarak tetiklenen deneysel karsinogenez modelleri in vivo kanser çalışmalarında daha önceleri sıklıkla kullanılmıştır. Ancak, kimyasal yolla oluşturulan bu tip meme kanseri modellerinde, kullanılan kemoterapötik ajanların sistemik toksisitesi nedeni ile başka modeller araştırılmıştır.

4T1 meme kanseri, ilk kez Fred Miller ve arkadaşları tarafından izole edilmiş olup transplante edilebilen kanser hücreleridir.¹⁴² 4T1 meme kanseri hücreleri BALB/c farelerde ve doku kültüründe büyümektedir. 4T1 tümör, yüksek derecede tümörojenik ve invaziv olup diğer tümör modellerinin aksine primer meme dokusundan lenf nodu, kan, karaciğer, beyin, akciğer ve kemik gibi uzak organlara metastaz yapabilmektedir. Bu metastaz paterni insan meme kanserine benzer özellik gösterir. Kadınlarda metastatik meme kanseri öncelikle akciğer ve karaciğere metastaz yapar. 4T1 inoküle edilen BALB/c farelerde de sırasıyla > %95 ve > %75 sıklıkla akciğer ve karaciğer metastazı yapar.¹⁴²

4T1 tümörün bazı büyüme özellikleri farelerde çalışılmasını kolaylaştırır. Öncelikle, tümör hücreleri kolayca meme dokusuna enjekte edilebilir ve anatomik olarak doğru yerde primer tümör oluşumu sağlanır. 4T1 tümörün yüksek tümörojenik özelliği, naif farelerde %100 progresif tümör gelişimini sağlar. Tümörün meme dokusuna ekimini takiben ölümcül hastalık erken dönemde gelişir ve birkaç hafta içinde progrese olur. Bir diğer kolaylaştırıcı özelliği ise uzak organlara spontan metastaz yapabilmesidir. 4T1 tümörün 6-tioguanine dirençli olması sayesinde

seçilmiş organlarda in vitro olarak mikrometastazlar tespit edilebilir. Ayrıca, 4T1 tümör, primer meme dokusundan kolayca çıkarılabilir. Primer tümör cerrahi olarak eksize edildikten sonra metastaz gelişen bölgelerde çalışmaların devamı sağlanabilir.

142

4T1'in bu özellikleri sayesinde metastatik hastalık gibi önemli çalışmaların yapılmasında pek çok grup tarafından günümüzde yaygın olarak kullanılmaktadır.

3. MATERYAL METOD

3.1 Denev hayvanları ve protokolü:

Çalışma için Hacettepe Üniversitesi Denev Hayvanları Etik Kurulu'nun 09.02.2016 tarih, 2016/01 kayıt ve 2016/01 – 07 karar numaralı izni alındı.

Bu çalışma HÜTF Bilimsel Araştırma Birimi tarafından 15.02.2017 başlangıç tarihli finansal destek ile hazırlandı (Proje Kodu: THD-2017-12708).

Denevler Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Temel Onkoloji İmmünoloji Ünitesi Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi. Helsinki Deklerasyonu hayvan denevleri ile ilgili etik yasa uyarınca; denev hayvanları laboratuvarında yetiştirilen, ağırlıkları 18-22 gr arasında değişen, standart laboratuvar yemi ile beslenen ve normal musluk suyu verilen, 46 adet altı haftalık Balb-c cinsi dişi fare kullanıldı. Denev hayvanları oda sıcaklığında tutuldu ve gün aşırı olarak inokülasyon bölgesi palpe edilerek tümör gelişimi takip edildi. Tüm gruplarda vücut ağırlığı kaydedildi ve hayvanların genel sağlık durumları, su ve besin alımları göz önünde bulunduruldu.

Hayvanlar; meme kanseri oluşturulmadan sadece laparotomi yapılan kontrol grubu, meme kanseri oluşturulup sadece laparotomi yapılan grup, meme kanseri oluşturulmadan %30-40 hepatektomi yapılan grup, meme kanseri oluşturulup %30-40 hepatektomi yapılan grup olmak üzere, kısa dönem ve uzun dönem olarak ikişer alt gruba ayrılması suretiyle sekiz gruba ayrıldı. (Tablo 3.1)

3.2 Çalışma grupları:

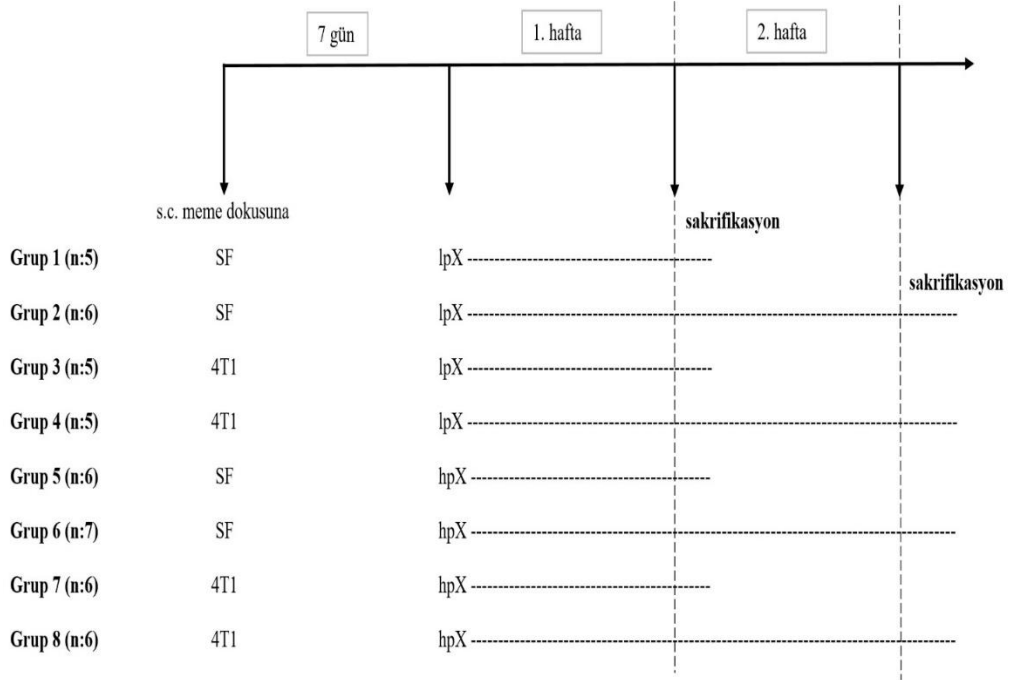
Çalışmaya toplam 8 grup dahil edildi.

1- Kontrol grubu, kısa dönem (5 adet Balb-c fare): Hepatektomi yapılmayan kontrol grubunda meme yağ dokusuna subkütan (sc) serum fizyolojik (SF) verildikten 7 gün sonra cerrahi işlemin etkisini yaratmak üzere bilateral subkostal kesi ile cilt, cilt altı ve periton açılarak iç organlara dokunulmaksızın hayvanlar 4-0 prolen dikişlerle yeniden kapatıldı. Komplikasyon gözlenmeyen hayvanlar laparotomiden 7 gün sonra sakrifiye edildi.

- 2- Kontrol grubu, uzun dönem (6 adet Balb-c fare):** Hepatektomi yapılmayan kontrol grubunda meme yağ dokusuna sc. SF verildikten 7 gün sonra cerrahi işlemin etkisini yaratmak üzere bilateral subkostal kesi ile cilt, cilt altı ve periton açılarak iç organlara dokunulmaksızın hayvanlar 4-0 prolent dikişlerle yeniden kapatıldı. Komplikasyon gözlenmeyen hayvanlar laparotomiden 14 gün sonra sakrifiye edildi.
- 3- Meme kanseri oluşturulup hepatektomi yapılmayan grup, kısa dönem (5 adet Balb-c fare):** Meme yağ dokusuna sc. 5*10⁴ 4T1 meme kanseri hücresi enjekte edildikten 7 gün sonra bilateral subkostal kesi ile cilt, cilt altı ve periton açılarak iç organlara dokunulmaksızın hayvanlar 4-0 prolent dikişlerle yeniden kapatıldı. Komplikasyon gözlenmeyen hayvanlar laparotomiden 7 gün sonra sakrifiye edildi.
- 4- Meme kanseri oluşturulup hepatektomi yapılmayan grup, uzun dönem (5 adet Balb-c fare):** Meme yağ dokusuna sc. 5*10⁴ 4T1 meme kanseri hücresi enjekte edildikten 7 gün sonra bilateral subkostal kesi ile cilt, cilt altı ve periton açılarak iç organlara dokunulmaksızın hayvanlar 4-0 prolent dikişlerle yeniden kapatıldı. Komplikasyon gözlenmeyen hayvanlar laparotomiden 14 gün sonra sakrifiye edildi.
- 5- Meme kanseri oluşturulmadan hepatektomi yapılan grup, kısa dönem (6 adet Balb-c fare):** Meme yağ dokusuna sc. SF verildikten 7 gün sonra bilateral subkostal kesi ile cilt, cilt altı ve periton açılarak büyük boy (L) metalik klip kullanılarak karaciğerin sol lobu eksize edilmek suretiyle %30-40 hepatektomi yapıldı. Karın 4-0 prolent dikişlerle yeniden kapatıldı. Komplikasyon gözlenmeyen hayvanlar laparotomiden 7 gün sonra sakrifiye edildi.
- 6- Meme kanseri oluşturulmadan hepatektomi yapılan grup, uzun dönem (7 adet Balb-c fare):** Meme yağ dokusuna sc. SF verildikten 7 gün sonra bilateral subkostal kesi ile cilt, cilt altı ve periton açılarak büyük boy (L) metalik klip kullanılarak karaciğerin sol lobu eksize edilmek suretiyle %30-40 hepatektomi yapıldı. Karın 4-0 prolent dikişlerle yeniden kapatıldı. Komplikasyon gözlenmeyen hayvanlar laparotomiden 14 gün sonra sakrifiye edildi.

- 7- Meme kanseri oluşturulup hepatektomi yapılan grup, kısa dönem (6 adet Balb-c fare):** Meme yağ dokusuna sc. 5*10e4 4T1 meme kanseri hücreleri enjekte edildikten 7 gün sonra bilateral subkostal kesi ile cilt, cilt altı ve periton açılarak büyük boy (L) metalik klip kullanılarak karaciğerin sol lobu eksize edilmek suretiyle %30-40 hepatektomi yapıldı. Karın 4-0 prolent dikişlerle yeniden kapatıldı. Komplikasyon gözlenmeyen hayvanlar laparotomiden 7 gün sonra sakrifiye edildi.
- 8- Meme kanseri oluşturulup hepatektomi yapılan grup, uzun dönem (6 adet Balb-c fare):** Meme yağ dokusuna sc. 5*10e4 4T1 meme kanseri hücreleri enjekte edildikten 7 gün sonra bilateral subkostal kesi ile cilt, cilt altı ve periton açılarak büyük boy (L) metalik klip kullanılarak karaciğerin sol lobu eksize edilmek suretiyle %30-40 hepatektomi yapıldı. Karın 4-0 prolent dikişlerle yeniden kapatıldı. Komplikasyon gözlenmeyen hayvanlar laparotomiden 14 gün sonra sakrifiye edildi.

Tablo 3.1: Deney protokolünü gösterir tablo



hpX: hepatektomi, lpX: laparotomi, SF: serum fizyolojik, 4T1: fare meme kanseri hücresi

3.3 Anestezi

Tüm gruplar için genel anestezi, 5 mg/kg xylazine (Alfazyne- %2) ve 150 mg/kg ketamin hidroklorür (Ketalar- %5) karışımı intraperitoneal verilerek sağlanmıştır.

3.4 Meme kanseri oluşturulması

4T1 meme kanseri hücre hattı %10 fetal dana serumu, %1 L-glutamin ve %1 penisilin/streptomisin içeren, RPMI1640 medyum içerisinde büyütüldü. Çoğaltılan 4T1 hücreleri (5×10^4 hücre/100 μ l) dişi BALB/c farelerin meme dokusuna sc. enjekte edildi ve tümör gelişimi izlendi.

3.5 Cerrahi Teknik

Balb/C türü deney hayvanlarının meme dokusuna SF veya 4T1 meme kanseri hücresi enjekte edildikten 7 gün sonra anestezik olarak 150 mg/kg'dan ketamin ve 5 mg/kg'dan xilazin dilüe edilerek sağ karın bölgesine sc. enjekte edildi. Daha sonra

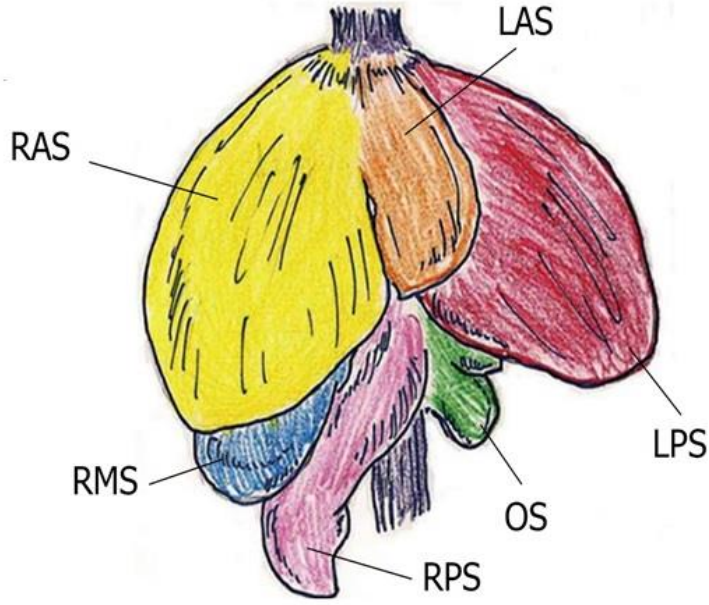
supin pozisyonda sabitlenen hayvanların ameliyat yerleri batikon ile temizlendikten sonra, 11 numara bistürü ile bilateral subkostal olarak cilt, cilt altı ve periton kesilerek laparotomi yapıldı.

Hepatektomi yapılmayacak gruplarda (grup 1-2-3-4) kanama kontrolünü takiben periton ve cilt 4-0 prolent dikiş ile devamlı olarak kapatılıp ameliyat sonlandırıldı.

Hepatektomi yapılacak gruplarda (grup 5-6-7-8) ise künt uçlu penset ile karaciğer sol lobu hafifçe tutulup diafram ile arasındaki bağlantı makas ile kesildi. Karaciğer sol lobunun pedikül kısmına safra kesesine zarar vermeyecek şekilde büyük boy (L) metalik klip konuldu ve klip farede kalacak şekilde klabin 1-2 mm üzerinden karaciğer kesilerek %30-40 hepatektomi gerçekleştirildi. Kanama kontrolünü takiben periton ve cilt 4-0 prolent dikiş ile devamlı şekilde kapatılarak ameliyat sonlandırıldı. Kısa dönem gruplarında laparotomiden 7 gün sonra, uzun dönem gruplarında ise laparotomiden 14 gün sonra hayvanlar sakrifiye edilerek deney sonlandırıldı.

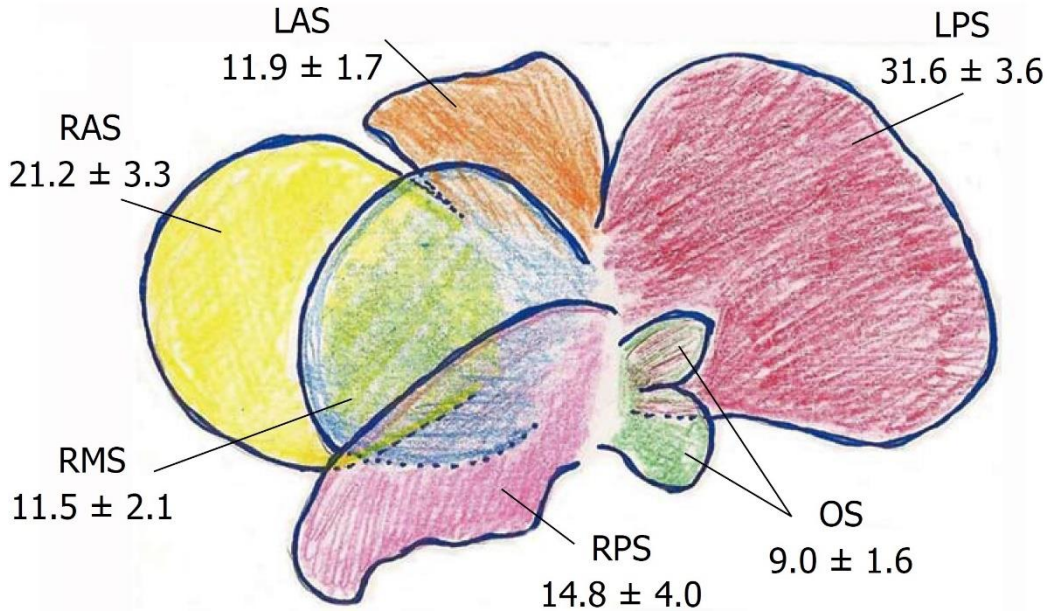
Farelere eter ile sedasyon yapıp, dekapitasyon sonrası kan örneği alındı. Sonrasında cilt, cilt altı kesilen hayvanlarda meme lojundaki tümör çıkarıldı. Ardından karın ve göğüs bölgeleri açılan hayvanlarda tüm organlar eksplore edildi.

Karaciğer lobları; süperiorda diyafragmadan ve inferior vena kavadan, solda mideden, inferiorda hepatoduodenal ligament kesilerek duodenumdan ve sağ böbrekten ayrılarak diseke edilip çıkarıldı.



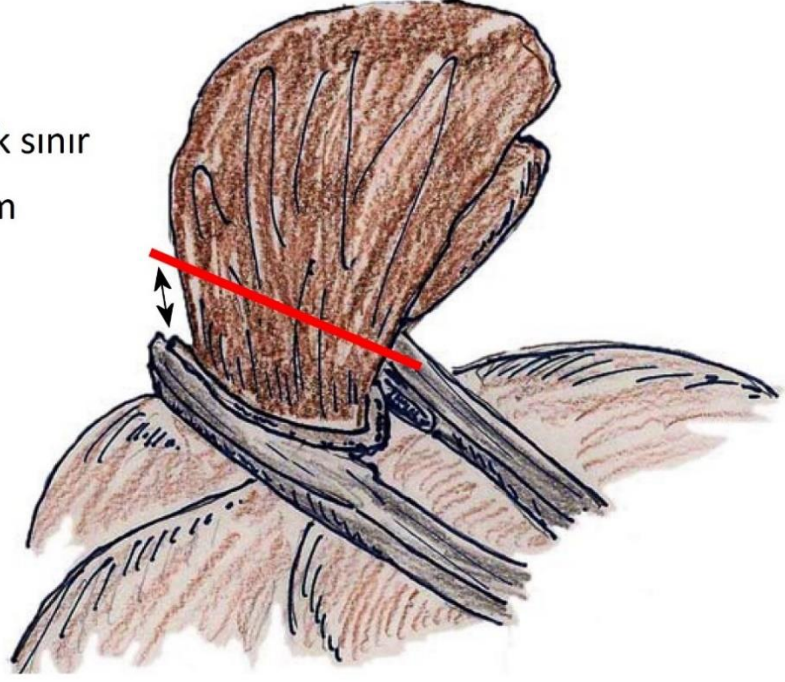
Resim 3.1: Fare karaciğerinin şematik görünümü *

RAS: Sağ anterior segment, RMS: Sağ orta segment, RPS: Sağ posterior segment,
OS: Omental segment, LAS: Sol anterior segment, LPS: Sol posterior segment

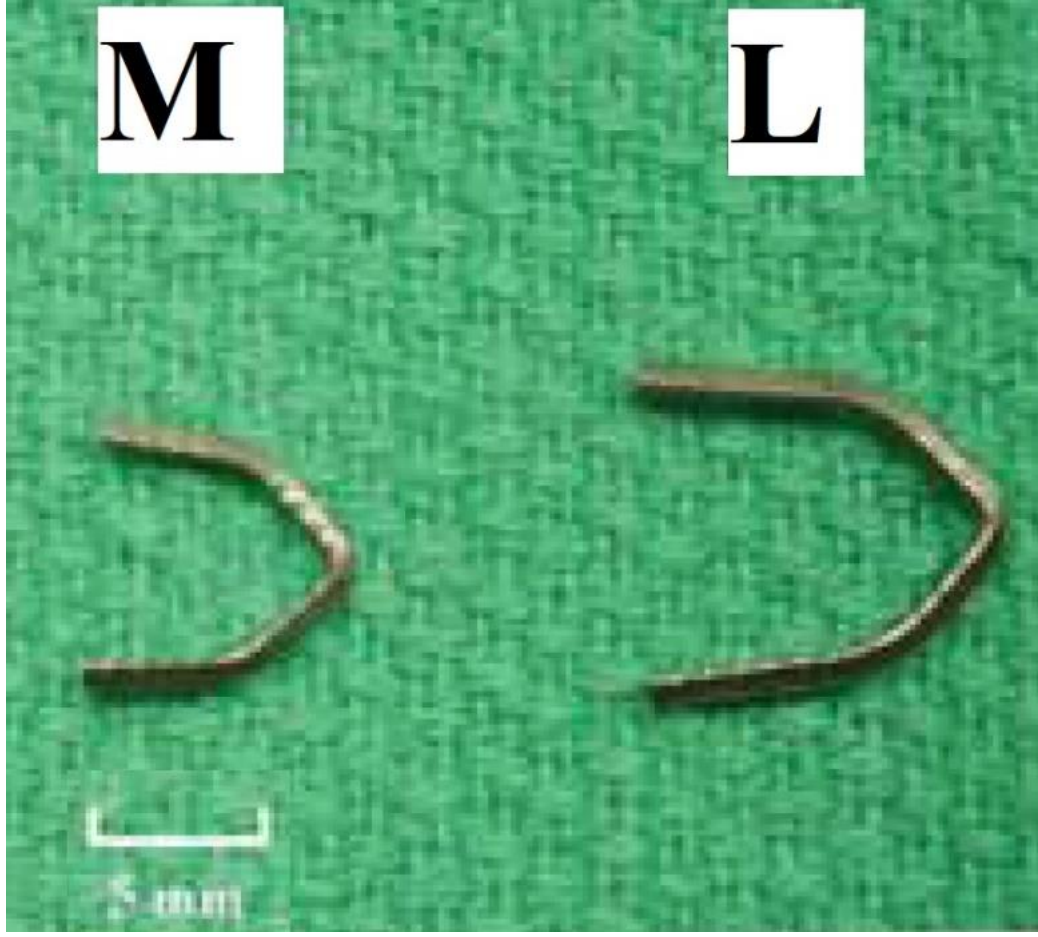


Resim 3.2: Fare karaciğerinin karaciğer segment hacimleri (yüzde) *

Distal hepatik sınır
1-2 mm



Resim 3.3: Klip yönteminde klipin üstünde bırakılan cerrahi sınır*



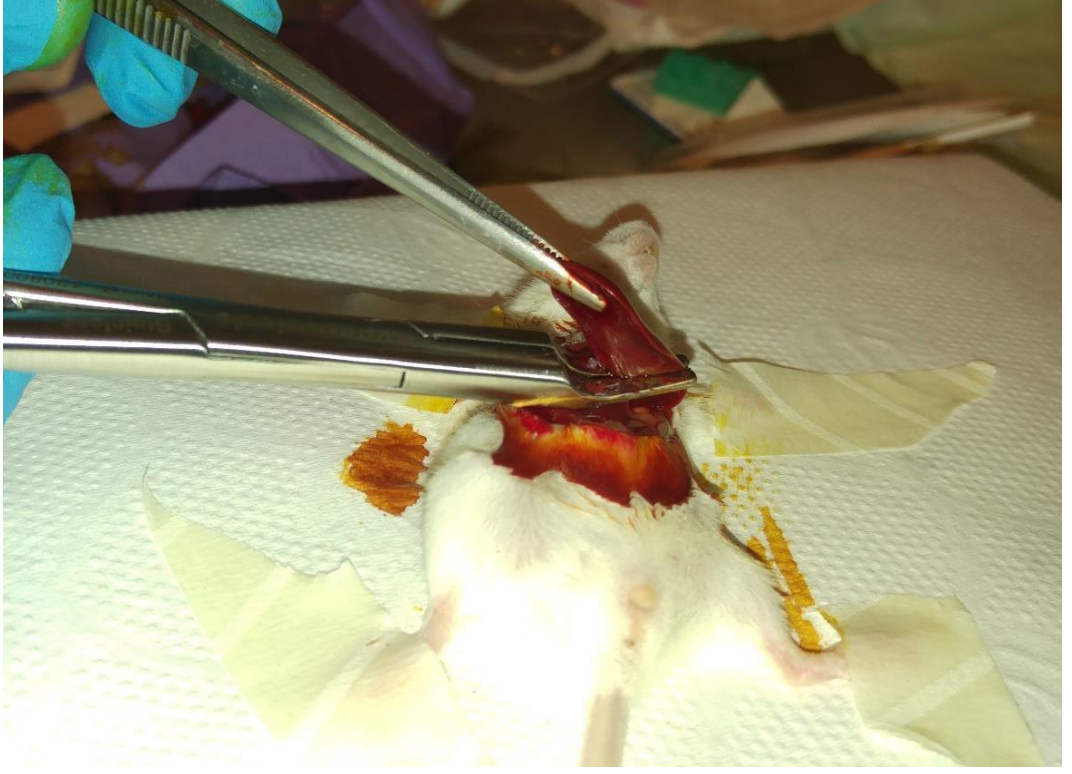
Resim 3.4: Kullanılabilen klip boyutları (M: orta boy, L: büyük boy) **

*Hori T, Ohashi N, Chen F. et al. Simple and reproducible hepatectomy in the Mouse using the clip technique. World J Gastroenterol. 2012;18(22): 2767-2774

**Hori T, Ohashi N, Chen F. et al. Simple and sure methodology for massive hepatectomy in the mouse. Annals of Gastroenterology.2011; 24:307-318



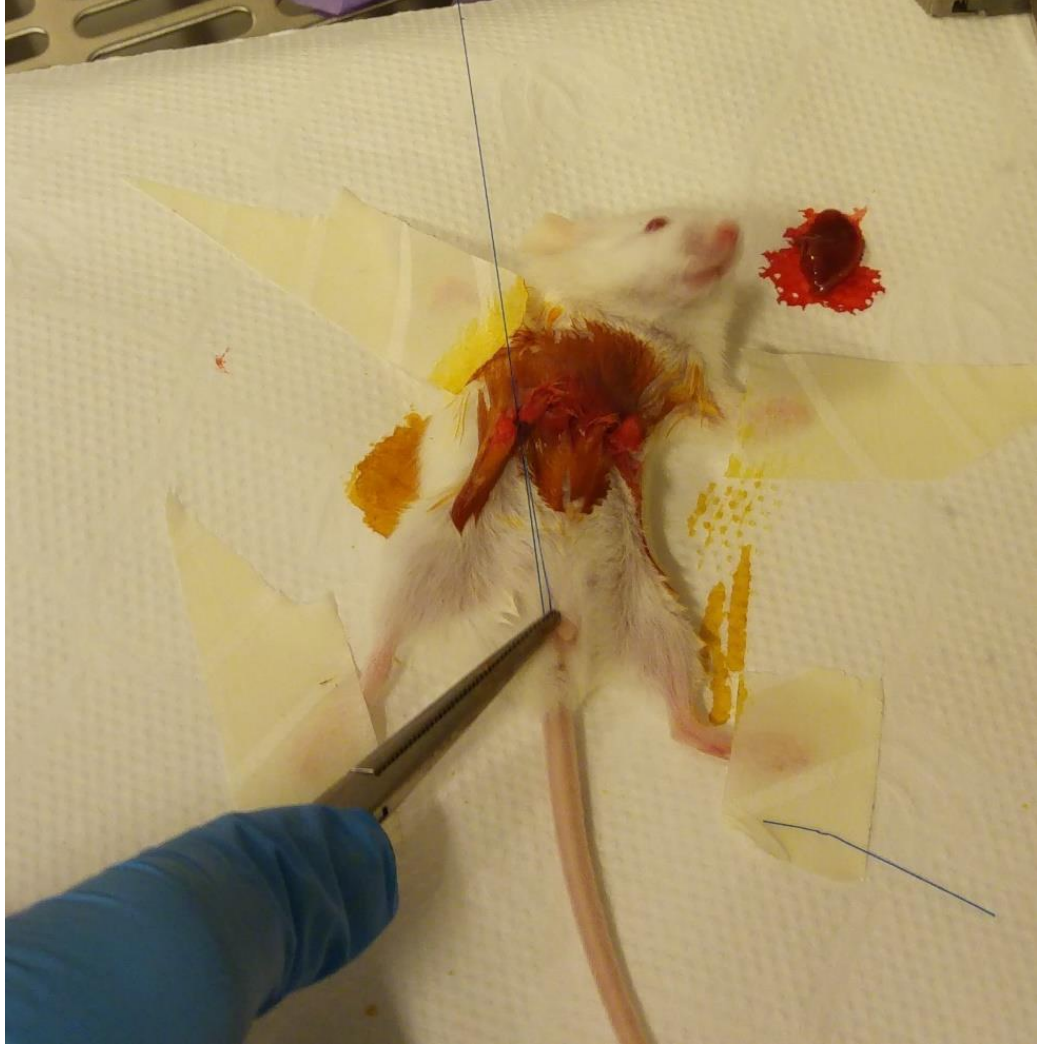
Resim 3.5: Farede bilateral subkostal kesi yapılması



Resim 3.6: Karaciğer sol lobu diseke edildikten sonra metalik klip yardımıyla hepatektomi yapılma görüntüsü



Resim 3.7: Hepatektomi sonrasında karaciğer sol lobunun çıkarılmış hali



Resim 3.8: Periton ve cildin kapatılması

3.6 Değerlendirme Parametreleri

1. Hayvan ağırlıkları: Tüm gruplarda hayvanlar 2 günde 1 kez tartılarak kısa dönem gruplar 2 hafta, uzun dönem gruplar ise 3 hafta boyunca takip edildi.

2. Karaciğer ağırlıkları: Tüm gruplarda deneyler sonlandırıldıktan sonra karaciğer ağırlıkları ölçülerek değerlendirildi.

3. Histopatolojik analiz: Meme tümörü içeren gruplarda, tümör dokusunun makroskopik özellikleri değerlendirildi. Farelerden alınan meme tümör dokusu ve karaciğer örnekleri %10 formaldehid solüsyonuna konuldu. Spesmenlerin takip ve

tespit dönemlerinden sonra parafinleme yapıldı. Sonrasında kesitler elde edildi. Preparatlar hematoksilin/eozin boyaması sonrasında ışık mikroskopisi altında incelendi. Bu inceleme esnasında karaciğerde miyeloid agregat yoğunluğu, karaciğer rejenerasyon durumu, tümörde ve peritümöral alanda miyeloid agregat yoğunlukları değerlendirildi.

4. ELİSA Array: Sakrifikasyon sonrası çıkarılan karaciğer dokuları, her grubun örnekleri kendi içlerinde aynı kaba alınarak ezildikten sonra 40 µm'lik süzgeçlerden süzülüp hücrelerin küme oluşturulması engellendi. Mikroskop altında 25×10^6 karaciğer hücresi sayılıp, bu hücreler %5 CO₂ ortamda 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılarak hücre kültürü sağlandı. Kültür sonrası sıvı kısım 1000xG'de 10 dakika santrifüj edilerek süpernatant elde edildi. Süpernatantlar -80°C'de işleme kadar saklandı. İşlem günü süpernatantlar, QIAGEN® Mouse Common Chemokins Multi-analyte ELISA, MEM-009A protokolüne uygun şekilde çalışıldı. Çalışmada CCL 2, 3, 4, 5, 11,17, 21, 22 ve CXCL1 ve CXCL9 kemokinlerinin optik dansite (OD) değerleri ELISA okuyucusunda analiz edildi.

3.7 İstatistiksel Analizler

Veriler IBM SPSS® version 21 ile incelendi. Karşılaştırma için Mann-Whitney U testi kullanıldı. Grupların korelasyon analizleri değerlendirilirken Spearman testi kullanıldı. $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1 Hayvan Ağırlıkları

Çalışmaya toplam Balb/C türü 46 deney hayvanı alındı. Farelerin kiloları 2 günde bir ölçüldü. Hayvanların ortalama kiloları benzerdi. (Tablo 4.1, 4.2, Grafik 4.1)

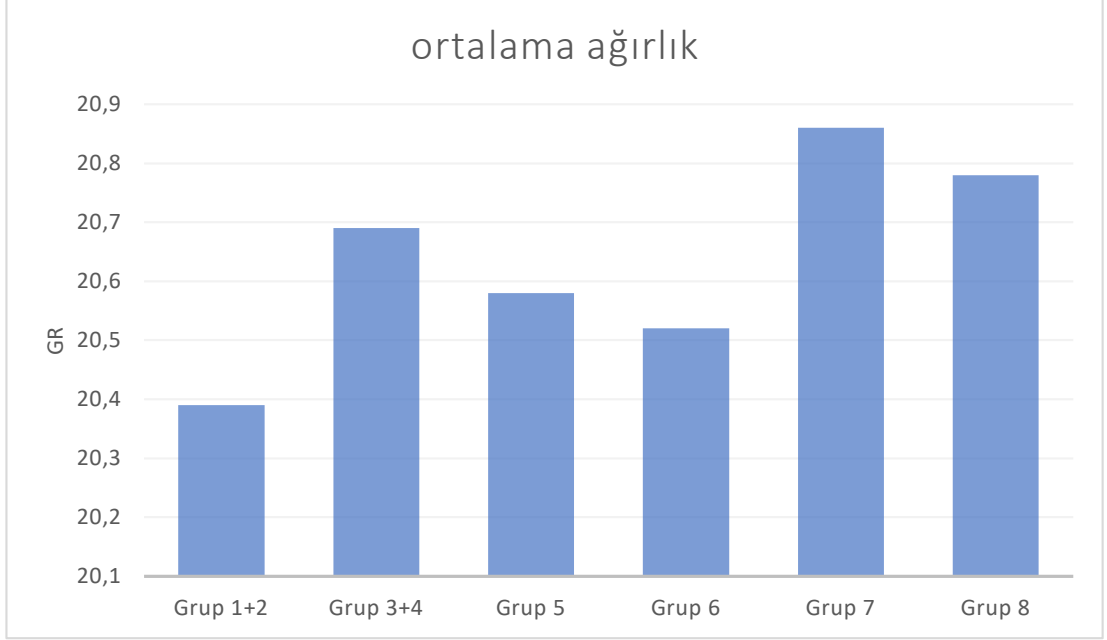
Tablo 4.1: Hayvan gruplarının ağırlıklarını gösteren tablo

Grup	1. gün	3. gün	5. gün	7. gün	9. gün	11. gün	13. gün
Grup 1+2 (Tm- /LpX/ KD+UD) (n=11)	19,45	19,79	20,84	20,74	20,04	21,34	20,58
Grup 3+4 (Tm+ /LpX/ KD+UD) (n=10)	19,30	19,88	20,82	20,53	21,34	21,93	21,05
Grup 5 (Tm- /HpX/ KD) (n=6)	20,36	20,47	20,13	21,36	Sakri fikas yon		
Grup 7 (Tm+ /HpX/ KD) (n=6)	19,96	20,52	21,34	21,65			
Grup 6 (Tm- /HpX/ UD) (n=7)	20,10	19,16	20,56	21,06	20,94	21,45	20,40
Grup 8 (Tm+ /HpX/ UD) (n=6)	20,10	19,85	20,34	21,03	21,37	21,94	20,87

Tm: tümör, LpX: laparotomi, HpX: hepatektomi, KD: kısa dönem, UD: uzun dönem

Tablo 4.2: Hayvan ortalama ağırlıklarını ve standart sapmalarını gösteren tablo

Grup No.	Ortalama Hayvan Ağırlıkları (gr)	Standart Sapma (\pm)
1+2	20,32	0,69
3+4	20,69	0,89
5	20,58	0,54
6	20,52	0,75
7	20,87	0,77
8	20,76	0,77



Grafik 4.1: Hayvan modellerinin ortalama ağırlıklarını gösteren grafik

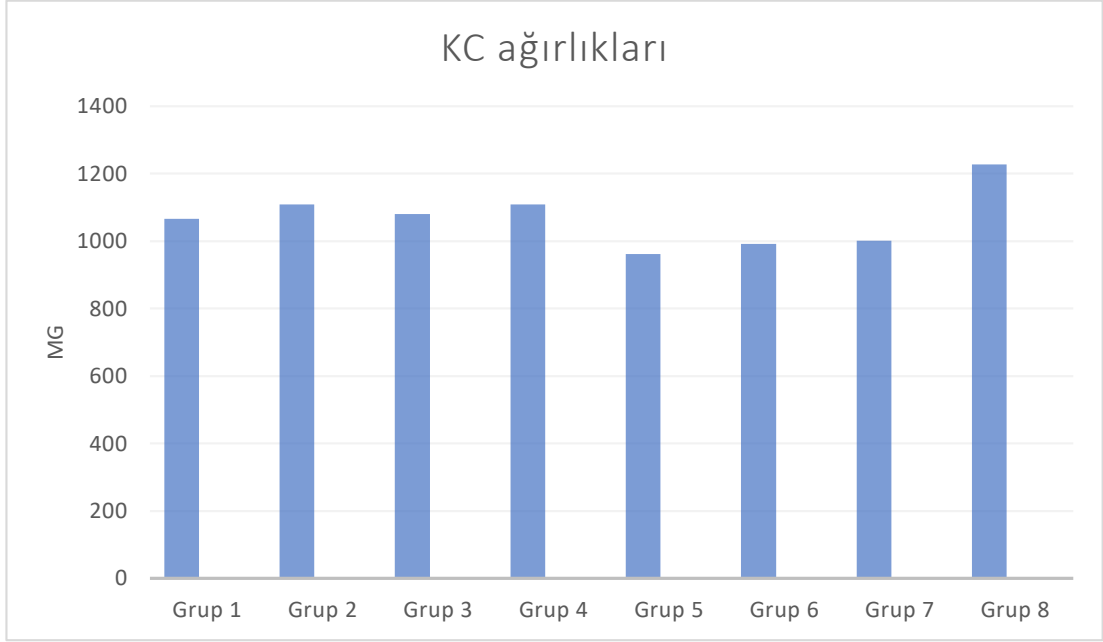
4.2 Hayvan Karaciğer Ağırlıkları

Fare grupları sakrifiye edildikten sonra karaciğer ağırlıkları ölçülmüştür. 36 mg olan klip ağırlığı çıkarıldıktan sonra kaydedilen karaciğer ağırlıkları Tablo 4.3'te gösterilmiştir. Karaciğer ağırlıkları birbirlerine benzer olmakla beraber, 4T1 tümör ekilip 2 hafta sonra sakrifiye edilen grupta ortalama karaciğer ağırlığı diğer gruplara kıyasla daha fazladır. (Grafik 4.2) Bu durum karaciğerde artmış tümör yükü veya artmış rejenerasyona bağlı olabilir.

Tablo 4.3: Hayvan modellerinin sakrifikasyon sonrası ölçülen karaciğer ağırlıkları

Grup	Karaciğer ortalama ağırlığı (mg) (± SD)
Grup 1	1066,6 ± 68,93
Grup 2	1095,3 ± 69,99
Grup 3	1079,8 ± 39,35
Grup 4	1109,0 ± 94,37
Grup 5	961,5 ± 93,93
Grup 6	991,3 ± 115,57
Grup 7	1000,7 ± 95,73
Grup 8	1227,2 ± 251,19

HpX: hepatektomi, KD: kısa dönem, UD: uzun dönem, SD: Standard Sapma



Grafik 4.2: Sakrifikasyondan hemen sonra ölçülen karaciğer ağırlıklarının ortalaması



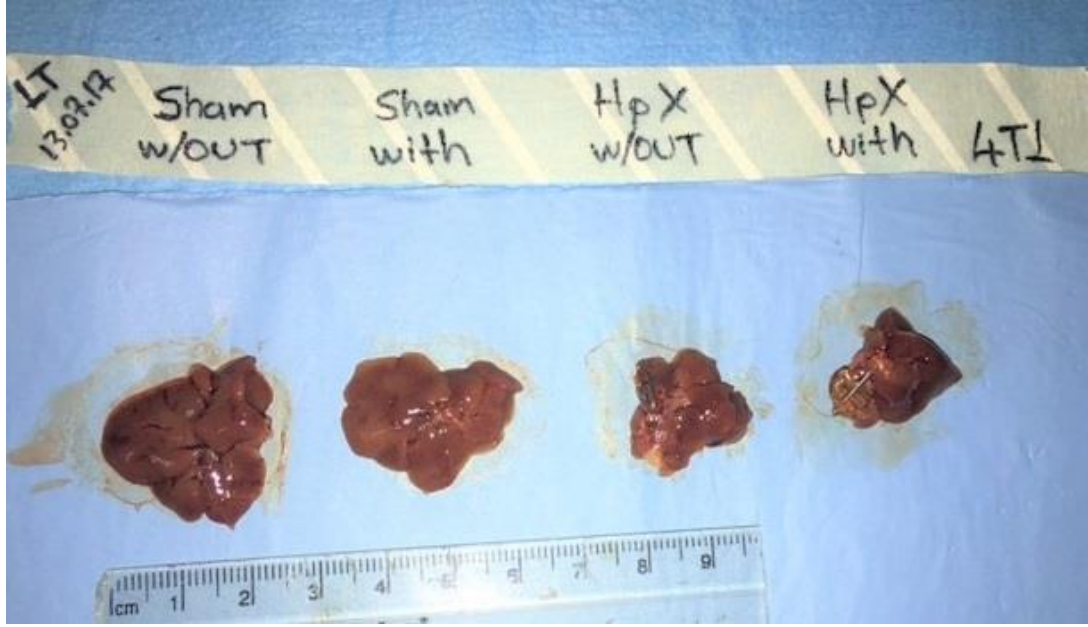
Resim 4.1: Kısa dönem grupların (Grup 1-3-5-7) sakrifikasyon sonrası karaciğerlerinin önden görünümü



Resim 4.2: Kısa dönem grupların (Grup 1-3-5-7) sakrifikasyon sonrası karaciğerlerinin arkadan görünümü



Resim 4.3: Uzun dönem grupların (Grup 2-4-6-8) sakrifikasyon sonrası karaciğerlerinin önden görünümü



Resim 4.4: Uzun dönem grupların (Grup 2-4-6-8) sakrifikasyon sonrası karaciğerlerinin arkadan görünümü

4.3 Karaciğer Lizatlarında ELISA Çalışması

Hayvan modellerinde sakrifikasyon sonrası elde edilen karaciğer lizatlarından ELISA yöntemi ile kemokinler çalışılmıştır. Çalışılan kemokinler şunlardır: CCL 2, 3, 4, 5, 11,17, 21, 22 ve CXCL1 ve CXCL9. Bu kemokinlerin seviyeleri kısa dönem ve uzun dönem fareler için aşağıda gösterilmiştir. (Tablo 4.4 ve Tablo 4.5) Negatif kontrol, ELISA yöntemi ile ölçülen en düşük düzeyi, pozitif kontrol ise en yüksek seviyeyi göstermektedir. %30-40 hepatektomi sonrası kalan karaciğerin cerrahi kesit alanına en yakın kısım “proksimal kısım”, kalan karaciğer dokusunun cerrahi kesit alanına en uzak kısmı ise “distal kısım” olarak belirtilmiştir.

Tablo 4.4: Kısa dönem gruplarından (Grup 1-3-5-7) elde edilen karaciğer dokusunda çalışılan kemokin seviyeleri

		CCL2	CCL3	CCL4	CCL5	CCL11	CCL17	CCL21	CCL22	CXCL1	CXCL9	
Control Gr.	Control (-)	0.07	0.05	0.07	0.11	0.07	0.08	0.04	0.06	0.06	0.07	
	LpX sham (grup 1)										0.14	
	HpX (grup 5)	Dist.							0.18			
		Prox.			0.19				0.18			
	Tumor Gr.	LpX sham (grup 3)				0.50				0.53		
HpX (grup 7)		Dist.		0.24	0.25							
		Prox.	0.24	0.17	0.14	0.34			0.15	0.22	0.19	
Control (+)		4	4	4	3.29	4	3.47	1.02	3.21	2.01	2.68	

HpX : hepatektomi, LpX: laparotomi, Control (-): negatif kontrol, Control (+): pozitif kontrol, Dist.: Distal kısım, Prox.: Proksimal kısım, Tumor Gr.: Tümör Grupları, Control Gr.: Kontrol grupları

Tablo 4.5: Uzun dönem gruplarından (Grup 2-4-6-8) elde edilen karaciğer dokusunda çalışılan kemokin seviyeleri

		CCL2	CCL3	CCL4	CCL5	CCL11	CCL17	CCL21	CCL22	CXCL1	CXCL9	
Control Gr.	Control (-)	0.05	0.05	0.07	0.07	0.05	0.09	0.05	0.06	0.05	0.12	
	LpX sham (grup 2)	0.24			0.19		0.23	0.17			0.40	
	HpX (grup 6)	Dist.	0.15		0.16	0.28					0.14	
		Prox.	0.24	0.15	0.22						0.21	
	LpX sham (grup 4)	0.15						0.08			0.21	
	HpX (grup 8)	Dist.	0.87	0.28	0.31	0.53					0.41	
Prox.		2.63	0.16	0.42	4					0.18		
Control (+)		4	4	4	3.77	4	4	1.28	4	3.09	4	

HpX : hepatektomi, LpX: laparotomi, Control (-): negatif kontrol, Control (+): pozitif kontrol, Dist.: Distal kısım, Prox.: Proksimal kısım, Tumor Gr.: Tümör Grupları, Control Gr.: Kontrol grupları

4.3.1 CCL2

Kısa dönemde (Grup 1-3-5-7) sadece grup 7'nin proksimal kısımda yükselmiştir.

Uzun dönem grupları (Grup 2-4-6-8) incelendiğinde grup 8'de grup 6'ya göre hem proksimal hem distal kısımda daha yüksek saptanmıştır. Proksimal kısımdaki değer diğerlerine göre çok daha yüksek bulunmuştur. Grup 8'de grup 4'e göre daha yüksek saptanmıştır. Aynı sonuç grup 2 ve 6 arasında geçerli değildir.

Uzun dönemde kısa döneme göre bütün gruplardaki seviyelerde yükseklik saptanmıştır.

4.3.2 CCL3

Kısa dönem grupları (Grup 1-3-5-7) incelendiğinde sadece grup 7'nin proksimal kısımda yükselmiştir.

Uzun dönem grupları (Grup 2-4-6-8) incelendiğinde sadece hepatektomi yapılan gruplarda (grup 6 ve 8) yükselmiştir. Kendi aralarında kıyaslama yapıldığında hepatektomi sonrası proksimal kısım değerleri grup 6 ve 8'de aynı iken grup 8'in distal kısmında daha yüksek bulunmuştur. Ayrıca grup 6'nın distal kısmında CCL3 yüksekliği saptanmamıştır. Grup 4'te de yükseklik görülmemiştir.

Uzun dönemle kısa dönem karşılaştırıldığında, grup 8'in distal kısmı ile grup 6'nın proksimal kısmında yeni ortaya çıkan kemokin seviyesinde yükselme görülmüştür.

4.3.3 CCL4

Kısa dönem grupları (Grup 1-3-5-7) incelendiğinde hem grup 5 hem de grup 7'de yükseklik saptanmıştır. Hepatektomi sonrası proksimal kısım değerleri grup 5'te daha yüksek iken grup 7'nin distal kısmında kemokin seviyesi daha yüksek bulunmuştur.

Uzun dönem grupları (Grup 2-4-6-8) incelendiğinde kısa dönemdekine benzer şekilde grup 6 ve 8'de yükseklik saptanmıştır. Her iki grup karşılaştırıldığında grup 8'deki seviyelerin ikisi de grup 6'ya göre daha yüksek bulunmuştur. Ayrıca iki grupta da kısa dönemden farklı olarak proksimal kısım seviyeleri distal kısımdan daha yüksek saptanmıştır.

Uzun dönemle kısa dönem karşılaştırıldığında, grup 6'nın distal kısmında da yükselme görülmüş olup hepatektomi yapılan grupların tamamında (grup 6 ve 8) kısa döneme göre (grup 5 ve 7) kemokin seviyeleri yükselmiştir.

4.3.4 CCL5

Kısa dönem grupları (Grup 1-3-5-7) incelendiğinde yükseklik sadece grup 7’de saptanmıştır. Bu grup içerisinde proksimal kısım değerleri distal kısımdan daha yüksek bulunmuştur.

Uzun dönem grupları (Grup 2-4-6-8) incelendiğinde esas yükseklik grup 6 ve 8’de saptanmış olmasına rağmen grup 2’de de yükseklik tespit edilmiştir. Kemokin seviyesi grup 8’de daha fazla saptanmıştır ve bu grubun proksimal kısmında çok daha fazla yükselme olduğu görülmüştür.

Uzun dönemle kısa dönem karşılaştırıldığında, grup 6’nın distal kısmı ile grup 2’de yeni gelişen yükselme saptanmış olup, kemokin seviyeleri özellikle grup 8’in proksimal kısmında ciddi miktarda yükselmiştir.

4.3.5 CCL11

Kısa dönem gruplarında (Grup 1-3-5-7) sadece grup 3’te yükseklik saptanmış olup uzun dönem gruplarının (Grup 2-4-6-8) hiçbirinde yükseklik gözlenmemiştir.

4.3.6 CCL17

Kısa dönem gruplarının (Grup 1-3-5-7) hiçbirinde yükseklik saptanmazken, uzun dönem gruplarından (Grup 2-4-6-8) sadece grup 2’de yükseklik görülmüştür.

4.3.7 CCL21

Kısa dönem gruplarının (Grup 1-3-5-7) hiçbirinde yükseklik saptanmazken, uzun dönem gruplarında (Grup 2-4-6-8) sadece sham grubu olarak belirlenen grup 2 ve 4’te yükseklik bulunmuştur.

4.3.8 CCL22

Kısa dönem grupları (Grup 1-3-5-7) incelendiğinde grup 5 ve 7’de yükseklik saptanmıştır. Grup 7’de proksimal kısımda yükseklik saptanmış olup bu yükseklik grup 5’in proksimal ve distal kısımlarına benzer seviyede tespit edilmiştir.

Uzun dönem grupların (Grup 2-4-6-8) hiçbirinde CCL22 kemokin seviyesinde yükselme olmamıştır.

4.3.9 CXCL1

Kısa dönem grupları (Grup 1-3-5-7) incelendiğinde sadece tümör grubunda (grup 3 ve 7) yükseklik saptanmıştır ancak grup 3’ün kemokin seviyesi grup 7’nin proksimal kısmında saptanandan daha yüksek bulunmuştur.

Uzun dönem grupları (Grup 2-4-6-8) incelendiğinde hepatektomi yapılan hem tümör hem de kontrol gruplarında (grup 6 ve 8) kemokin seviyeleri yükselmiştir. Grup 6’da proksimal kısımda seviye daha yüksek iken grup 8’in distal kısmında kemokin seviyesi daha yüksek bulunmuştur.

Uzun dönemle kısa dönem karşılaştırıldığında, grup 8’in distal kısmı ile grup 6’nın proksimal ve distal kısımlarında yeni gelişen yükseklik saptanmıştır. Grup 3’te görülen yükseklik uzun dönemde (grup 4) görülmemiştir.

4.3.10 CXCL9

Kısa dönem grupları (Grup 1-3-5-7) incelendiğinde grup 1 ile grup 7’nin proksimal kısmında kemokin seviyesi yükselmiştir ve bu seviyeler benzerdir.

Uzun dönem grupları (Grup 2-4-6-8) incelendiğinde tümör ve kontrol gruplarının sham gruplarında (grup 2 ve 4) yükselme olmuştur. Yükselme grup 2’de daha fazladır.

Uzun dönemle kısa dönem karşılaştırıldığında, Grup 2 ve 4’te yükseklik saptanmış olup, grup 7’de görülen yükseklik uzun dönem grubunda (grup 8) görülmemiştir.

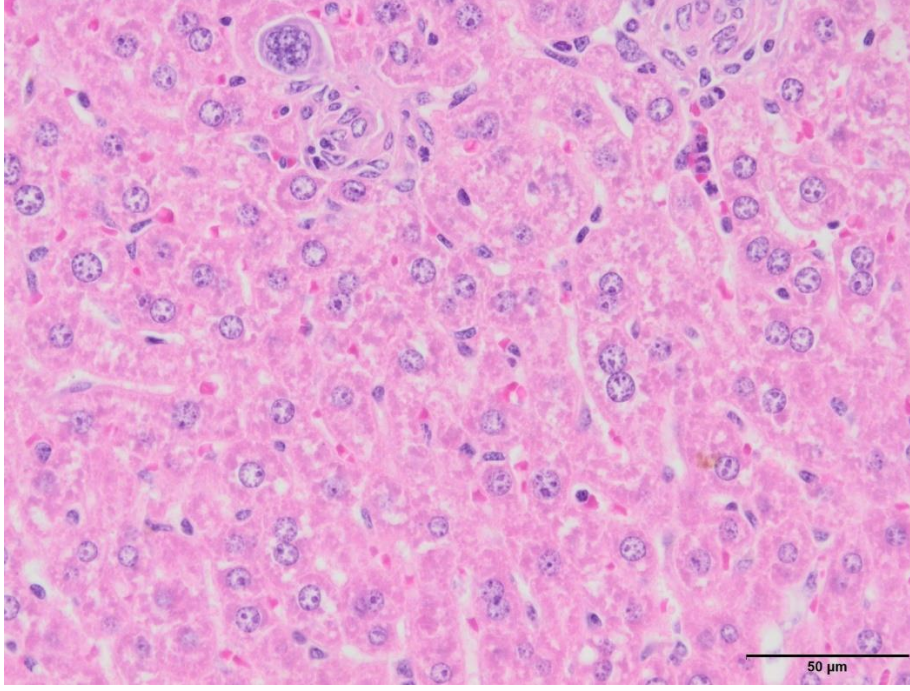
Özetle, Grup 7’de CCL 2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL22, CXCL1 ve CXCL9 kemokin düzeylerinde artış görülmektedir. Kemokin seviyeleri ise birbirlerine benzerdir. Grup 8’de ise CCL2, CCL3, CCL4, CCL5 ve CXCL1 seviyelerinde artış görülmekte; ancak, en belirgin yüksekliğin CCL2 ve CCL5 seviyelerinde olduğu dikkat çekmektedir.

Kemokin seviyelerinin değişimlerine göre inceleme yapıldığında gruplar arasında en büyük fark, karaciğer rezeksiyonu nedeniyle ortaya çıkmıştır.

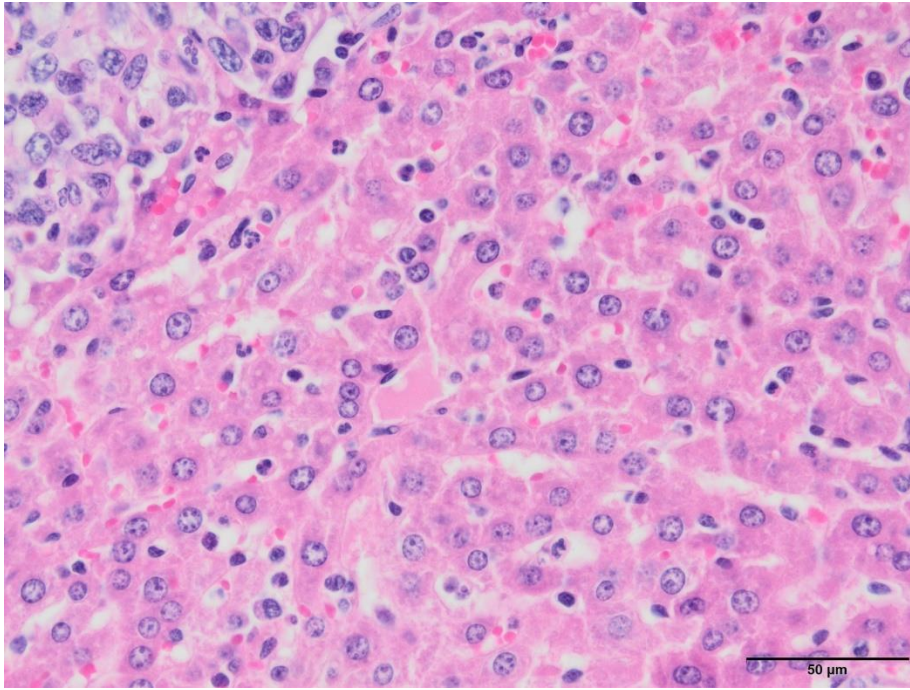
4.4 Histopatolojik İnceleme

Fareler sakrifiye edildikten sonra karaciğer dokuları ile tümör alanları çıkarılarak patolojik inceleme yapıldı. Karaciğer proksimal ve distal kısımları, rejenerasyon düzeyi ve myeloid hücre yoğunlukları açısından; tümör dokusu ise merkez ve çevre olarak myeloid hücre yoğunluğu açısından mikroskopik olarak incelendi. (Resim 4.5, 4.6, 4.7, 4.8)

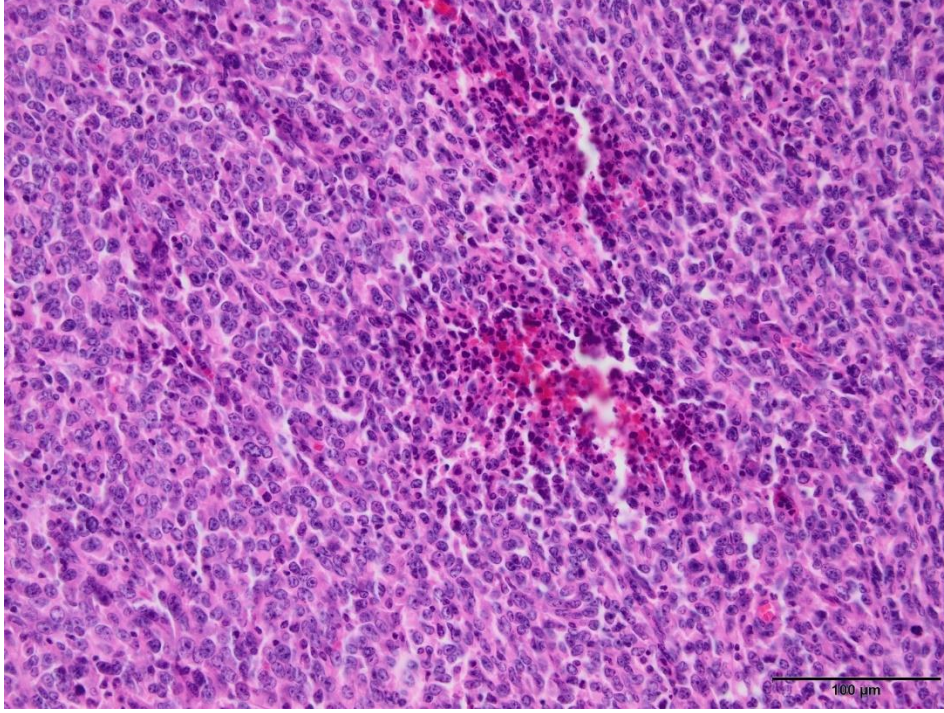
Patolojik incelemede tüm gruplar incelendiğinde 21 tane karaciğer örneğinde enfarkt alanı ve 4 tane karaciğer örneğinde ise metastaz saptandı. Enfarkt alanlarının tamamı hepatektomi yapılan gruplarda görüldü ve sadece 1 tanesi distal karaciğer alanına aitti. Bu durumun, hepatektomi için kullanılan klibe ikincil ortaya çıktığı düşünülmektedir. Metastazların 3 tanesi tümör ekilip hepatektomi yapılan kısa dönem grubunda (grup 7), 1 tanesi ise tümör ekilip hepatektomi yapılan uzun dönem grubunda (grup 8) saptandı. Metastazların 2 tanesi proksimal, 2 tanesi ise distal karaciğerde idi. Saptanan bu metastazlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.



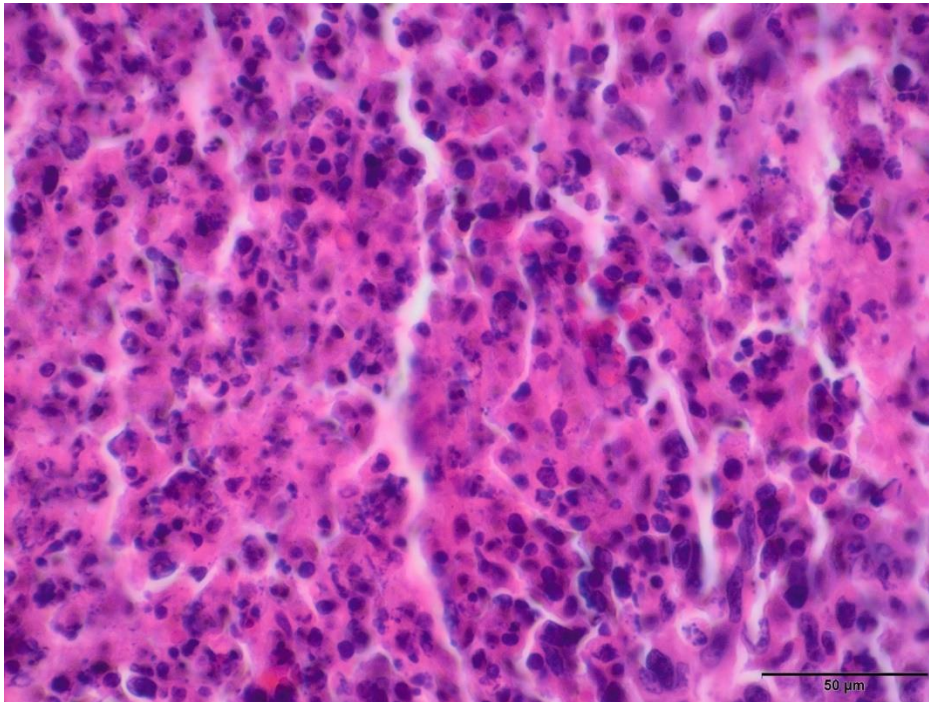
Resim 4.5: Tümörsüz karaciğer parankim rejenerasyonu



Resim 4.6: Tümörlü karaciğer parankimi rejenerasyonu



Resim 4.7: Tümör dokusunda myeloid hücre kümeleri (20x büyütme)



Resim 4.8: Tümör dokusunda myeloid hücre kümeleri (40x büyütme)

Grup 3 ve grup 4; myeloid hücre skorları açısından karşılaştırıldığında karaciğer, tümör merkez ve tümör çevresi myeloid hücre skorları açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır. (Tablo 4.6)

Tablo 4.6: 4T1(+) laparotomi yapılan grupların (grup 3 - grup 4) kısa dönem-uzun dönem myeloid hücre skorlarının karşılaştırmaları

4T1(+) lpX	Kısa dönem (ortanca, min-maks)	Uzun dönem (ortanca, min-maks)	p değeri
KC myeloid skor	1 (1-2)	1 (1-3)	0,439
Tümör merkez myeloid skor	1,5 (0-2)	3 (2-3)	0,034
Tümör çevre myeloid skor	1,5 (0-2)	2 (1-3)	0,046

Grup 5 ve grup 6; KC rejenerasyon indeksleri açısından karşılaştırıldığında proksimal ve distal KC rejenerasyon indeksleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır. (Tablo 4.7)

Tablo 4.7: 4T1 (-) hepatektomi yapılan grupların (grup 5 - grup 6) kısa dönem-uzun dönem KC rejenerasyon indekslerinin karşılaştırılması

4T1 (-) hpX	Kısa dönem (ortanca, min-maks)	Uzun dönem (ortanca, min-maks)	p değeri
Proksimal KC rej.	2 (1-3)	2 (1-2)	0,379
Distal KC rej.	2 (1-3)	1 (1-3)	0,091

Grup 7 ve grup 8; KC rejenerasyon indeksleri, KC myeloid hücre skorları, tümör merkezi ve tümör çevresi myeloid hücre skorları açısından karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı tek fark proksimal ve distal KC myeloid hücre skorlarında saptanmıştır. (Tablo 4.8)

Tablo 4.8: 4T1 (+) hepatektomi yapılan grupların (grup 7 - grup 8) kısa dönem-uzun dönem KC rejenerasyon indeksi, KC myeloid hücre skorları, tümör merkezi ve tümör çevresi myeloid hücre skorlarının karşılaştırılması

4T1 (+) hpX	Kısa dönem (ortanca, min- maks)	Uzun dönem (ortanca, min- maks)	p değeri
Proksimal KC rej.	1,5 (1-2)	3 (1-3)	0,118
Distal KC rej.	1,5 (1-2)	2 (1-3)	0,394
Proksimal KC myeloid skor	1 (1-2)	2 (1-2)	0,045
Distal KC myeloid skor	1 (1-1)	2 (1-3)	0,058
Tümör merkez myeloid skor	1 (1-2)	3 (1-3)	0,132
Tümör çevre myeloid skor	1,5 (1-2)	2 (1-3)	0,223

Grup 5 ve grup 7; KC rejenerasyon indeksleri ve KC myeloid hücre skorları açısından karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır. (Tablo 4.9)

Tablo 4.9: 4T1 (-) hepatektomi yapılan ve 4T1 (+) hepatektomi yapılan kısa dönem gruplarının (grup 5 - grup 7) karaciğer rejenerasyon indeksleri ve karaciğer myeloid hücre skorlarının karşılaştırılması

	4T1 (-) hpX. Kısa dönem (ortanca, min-maks)	4T1 (+) hpX. Kısa dönem (ortanca, min-maks)	p değeri
Proksimal KC rej.	2 (1-3)	2 (1-2)	0,336
Distal KC rej.	2 (1-3)	1,5 (1-2)	0,116
Proksimal KC myeloid skor	1 (1-2)	1 (1-2)	0,523
Distal KC myeloid skor	1 (1-2)	1 (1-1)	0,138

Grup 6 ve grup 8; KC rejenerasyon indeksleri ve KC myeloid hücre skorları açısından karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır. (Tablo 4.10)

Tablo 4.10: 4T1 (-) hepatektomi yapılan ve 4T1 (+) hepatektomi yapılan uzun dönem gruplarının (grup 6 – 8) karaciğer rejenerasyon indeksleri ve karaciğer myeloid hücre skorlarının karşılaştırılması

	4T1 (-) hpX. uzun dönem (ortanca, min-maks)	4T1 (+) hpX. uzun dönem (ortanca, min-maks)	p değeri
Proksimal KC rej.	2 (1-2)	3 (1-3)	0,113
Distal KC rej.	1 (1-3)	2 (1-3)	0,208
Proksimal KC myeloid skor	1 (1-2)	2 (1-2)	0,218
Distal KC myeloid skor	1 (1-2)	2 (1-3)	0,362

Grup 1 ve grup 3; KC rejenerasyon indeksleri ve karaciğer myeloid hücre skorları açısından karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır. (Tablo 4.11)

Tablo 4.11: 4T1 (-) laparotomi yapılan ve 4T1 (+) laparotomi yapılan kısa dönem gruplarının (grup 1 – grup 3) karaciğer rejenerasyon indeksleri ve karaciğer myeloid hücre skorlarının karşılaştırılması

	4T1 (-) lpX. kısa dönem (ortanca, min-maks)	4T1 (+) lpX. kısa dönem (ortanca, min-maks)	p değeri
KC rej.	2 (0-2)	1 (1-3)	0,735
KC myeloid skor	1 (0-2)	1 (1-2)	0,305

Grup 2 ve grup 4; KC rejenerasyon indeksleri ve karaciğer myeloid hücre skorları açısından karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır. (Tablo 4.12)

Tablo 4.12: 4T1 (-) laparotomi yapılan ve 4T1 (+) laparotomi yapılan uzun dönem gruplarının (grup 2 – grup 4) karaciğer rejenerasyon indeksleri ve karaciğer myeloid hücre skorlarının karşılaştırılması

	4T1 (-) lpX. uzun dönem (ortanca, min-maks)	4T1 (+) lpX. uzun dönem (ortanca, min-maks)	p değeri
KC rej.	2 (1-2)	2 (1-2)	0,827
KC myeloid skor	1 (1-2)	1 (1-3)	0,669

Grup 3'ün hepatektomisiz karaciğeri ile grup 7'nin proksimal karaciğer rejenerasyon indeksleri, KC myeloid hücre skorları ve tümör merkez ve çevresinin myeloid hücre skorları karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır. (Tablo 4.13) Bu durum hepatektominin güvenle yapılabileceğine işaret ediyor olabilir.

Tablo 4.13: 4T1 (+) laparotomi yapılan ve 4T1 (+) hepatektomi yapılan kısa dönem gruplarının (grup 3 – grup 7), hepatektomisiz karaciğer ile proksimal karaciğerlerin rejenerasyon indekslerinin, KC myeloid hücre skorlarının ve tümör merkez ve çevresinin myeloid hücre skorlarının karşılaştırılması

	4T1 (+) lpX. Kısa dönem (ortanca, min-maks)	4T1 (+) hpX. Kısa dönem (ortanca, min-maks)	p değeri
KC rej.	1 (1-3)	2 (1-2)	0,686
KC myeloid skor	1 (1-2)	1 (1-2)	0,892
Tümör merkez myeloid skor (KC - proksimal KC)	1,5 (0-2)	1 (1-2)	0,874
Tümör çevre myeloid skor (KC - proksimal KC)	1 (1-1)	1,5 (1-2)	0,127

Grup 4'ün hepatektomisiz karaciğeri ile grup 8'in proksimal karaciğer rejenerasyon indeksleri, KC myeloid hücre skorları ve tümör merkez ve çevresinin myeloid hücre skorları karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır. (Tablo 4.14) Kısa dönem grubunda olduğu şekilde, bu durum hepatektominin güvenle yapılabileceğine işaret ediyor olabilir.

Tablo 4.14: 4T1 (+) laparotomi yapılan ve 4T1 (+) hepatektomi yapılan uzun dönem gruplarının (grup 4 – grup 8) hepatektomisiz karaciğer ile proksimal karaciğerlerin rejenerasyon indeksleri, KC myeloid hücre skorları ve tümör merkez ve çevresinin myeloid hücre skorlarının karşılaştırılması

	4T1 (+) lpX. uzun dönem (ortanca, min-maks)	4T1 (+) hpX. uzun dönem (ortanca, min-maks)	p değeri
KC rej.	2 (1-2)	3 (1-3)	0,121
KC myeloid skor	1 (1-3)	2 (1-2)	0,488
Tümör merkez myeloid skor (KC - proksimal KC)	3 (2-3)	2,5 (1-3)	0,333
Tümör çevre myeloid skor (KC - proksimal KC)	2 (1-3)	2 (1-3)	1,0

Grup 7'nin karaciğer proksimal kısmı ile distal kısmı arasındaki rejenerasyon indekslerinin Spearman korelasyon testi ile değerlendirilmesi yapıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır. (Tablo 4.15)

Tablo 4.15: 4T1 (+) hepatektomi yapılan kısa dönem grubun (grup 7) karaciğer proksimal kısmı ile distal kısmı arasındaki rejenerasyon indekslerinin korelasyon değerlendirilmesi

4T1 (+) hpX. kısa dönem Korelasyon değerlendirmesi	r (Korelasyon Katsayısı)	p değeri
Proksimal ve distal KC rej.	0,707	0,116

Grup 8'in karaciğer proksimal kısmı ile distal kısmı arasındaki rejenerasyon indekslerinin ve myeloid hücre skorlarının Spearman korelasyon testi ile değerlendirilmesi yapıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır. (Tablo 4.16)

Tablo 4.16: 4T1 (+) hepatektomi yapılan uzun dönem grubun (grup 8) karaciğer proksimal kısmı ile distal kısmı arasındaki rejenerasyon indeksleri ve myeloid hücre skorlarının korelasyon değerlendirilmesi

4T1 (+) hpX. uzun dönem Korelasyon değerlendirmesi	r (Korelasyon Katsayısı)	p değeri
Proksimal ve distal KC rej.	0,825	0,086
Proksimal ve distal KC myeloid skor	0,559	0,327

5. TARTIŞMA

Sekonder karaciğer tümörlerinde hepatektominin hastaların sağ kalımına etkisi tartışmalı bir konudur. Bu konuya yönelik çalışmalar özellikle kolorektal kanserlerin karaciğer metastazlarında yapılan hepatektomiler üzerinedir. Karaciğer metastazı olan kolorektal karsinomlu hastalarda hepatektomi sonrası 5 yıllık sağ kalımın %20-40 arasında olduğu gösterilmiştir.¹³⁶ Ancak bu hastaların takip sürecinde özellikle hepatektomi sonrası 12-18. ayda olmak üzere hepatik ve ekstrahepatik metastazlar ortaya çıkabilmektedir. Bu durum, kalan karaciğer dokusunun rejenerasyonu ile tümör büyümesi arasında bir ilişki olduğunu düşündürmektedir.¹³⁶ Tümör rekürensini ortaya çıkmasında en çok suçlanan ajanlar karaciğer rejenerasyonu sırasında ekspresyonu artan büyüme faktörleri ve matriks metalloproteinazlardır. Son yıllarda ise tümör gelişimi ve metastazında kemokin adı verilen sitokin ailesinden küçük proteinlerin de rolü olduğu gösterilmiştir. Hepatektomi sonrası hepatik ve ekstrahepatik tümör gelişimi sırasında kemokin seviyelerindeki değişiklik ve bunların metastaz gelişimindeki rolü ise bilinmemektedir. Bu çalışmada meme kanseri ekilen fare modellerinde hepatektominin kemokin seviyeleri üzerine etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla farelere tümör ekiminden sonra sol lobektomi veya sadece laparotomi yapılmış, sonrasında 1. ve 2. haftalarda fareler sakrifiye edilmişlerdir. Farelerin karaciğer lizatlarında CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL11, CCL17, CCL21, CCL22 ve CXCL1, CXCL9 seviyeleri çalışılmıştır. Aynı zamanda patolojik inceleme yapılarak rejenerasyon ve metastaz durumları araştırılmıştır.

Kısa dönem gruplarından grup 7'nin proksimal KC kısmında CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL22, CXCL1 ve CXCL9 seviyelerinde artış tespit edilirken, distal kısımda ise sadece CCL4 ve CCL5 seviyelerinde artış tespit edilmiştir. Grup 3'te ise CCL11 ve CXCL1 seviyelerinde artış görülmüştür. Uzun dönem gruplarından grup 8'de ise hem proksimal hem de distal karaciğer lizatlarında CCL2, CCL3, CCL4 ve CCL5 ile CXCL1 seviyelerinde artış görülmüştür. Grup 4'te ise sadece CCL2, CCL21 ve CXCL9 seviyeleri artmıştır.

Farelerde CCL2, CCL3, CCL4 ve CCL5; 11. Kromozomun uzun kolu üzerinde eksprese olan ve sırasıyla JE, MPI-1 α ve RANTES ligandlarını içeren kemokinlerdir.

CCL2 hem epiteliyal kanser hücrelerinde hem de makrofaj gibi stromal hücrelerde eksprese edilir. Meme kanserinde neovaskülarizasyon ve tümör ilişkili makrofaj toplanmasından sorumludur.¹¹ Yüksek seviyede CCL2 ve CCL4 içeren meme kanserlerinde B ve T lenfosit ile makrofaj içereğinin daha fazla olduğu, dolayısıyla CCL 2 ve 4'ün bu hücreler için kemotaktik aktivite gösterdiği çalışmalarda gösterilmiştir.¹¹ Ayrıca bu iki kemokinin de tümör derecesi ve kötü prognozla ilişkili oldukları gösterilmiştir.^{143,144} Bizim çalışmamızda da CCL2 ve CCL4 seviyeleri grup 7 ve 8'de sham fare modellerine göre (grup 1-3-2-4) daha yüksek seviyede bulunmuştur. Ayrıca grup 8'de daha yüksek kemokin seviyeleri tespit edilmiştir.

Aynı şekilde CCL3 de CCR3 reseptörü üzerinden etki eden bir kemokin olup aynen CCL2, CCL4 ve CCL5 gibi tümör invazyonu ve metastazdan sorumludur. Bu çalışmada da grup 7'nin proksimal karaciğer kısımlarında ve grup 8'in hem proksimal hem de distal karaciğer dokularında CCL3 seviyelerinin artmış olduğu bulunmuştur.

CCL5'in özellikle tümör epitel hücrelerinde eksprese olduğu ve yüksek dereceli tümörlerde düşük dereceli tümörlere göre seviyesinin arttığı gösterilmiştir.¹¹ Meme kanserinde CCL5 ekspresyonu monosit infiltrasyonu ile ilişkili olup, meme kanseri hücrelerinden MMP-9 ekspresyonunda artışa yol açar. Bu durum metastaz gelişimi ile ilişkilidir.¹¹ CCL5 hem primer tümörde hem de metastatik bölgelerde yüksek oranda bulunmaktadır. Bizim çalışmamızda da CCL5 seviyesi meme kanseri ekilen fare modellerinde (grup 7 ve grup 8) yüksek bulunmuştur. Özellikle grup 8'deki hepatektomi materyallerinde, CCL5 seviyelerinde belirgin yükseklik görülmüştür. Bu sonuç, iki haftanın sonunda meme kanseri tümör yükü artışına bağlı ortaya çıkmış olabilir.

CCL21 dalakta T hücre zonunda, Peyer plaklarında ve lenf nodlarında eksprese edilen ve CCR7 reseptörüne bağlanarak temel olarak lenf nodlarına metastazdan sorumlu bir kemokindir. Meme kanserinde, gastrik karsinomda, küçük hücreli dışı akciğer kanserinde ve melanomda lenf nodu metastazında rolü olduğu literatürde gösterilmiştir.¹¹ Müller ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada CCL21 reseptörü olan CCR7'e bağlanarak aktin polimerizasyonunu ve psödopod oluşumunu artırarak lenf nodu metastazına yol açmaktadır.¹⁴⁵ Diğer yandan ise fare pankreas tümör modellerinde tümör dokusuna immün hücre toplanmasını artırarak uzak organ

metastazlarını azalttığı gösterilmiştir.¹¹⁴ Bizim çalışmamızda CCL21 seviyesi incelenmiştir hem kısa dönem hem de uzun dönemde hepatektomi yapılan meme kanserli grupların (grup 7 ve grup 8) karaciğer lizatlarında CCL21 seviyesi yüksek bulunmamıştır. Bu durum CCL21'in lenf nodlarında eksprese edilmesine bağlı olup bu çalışmada lenf nodu incelemesi yapılmamasına bağlı olabilir. Bu sonuç literatürle uyumlu bir şekilde CCL21'in karaciğerde eksprese olmadığını göstermektedir. Mumtaz ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada kolorektal karsinomda CCL21 düzeyi incelenmiş ve normal kolon dokusuna kıyasla kanserli dokuda CCL21 seviyesinin azaldığı gösterilmiştir.¹⁴⁵

CCL22 ise makrofaj kökenli bir kemokin olup Th2 ilişkili sitokinler olan IL-4 ve IL-5 tarafından üretimi artırılırken, Th1 ilişkili sitokin olan interferon- γ (IF- γ) tarafından üretimi azaltmaktadır. Literatürde bazı tümör hücrelerinin de CCL22 eksprese ettikleri gösterilmiştir. Eksprese olan CCL22, reseptörü olan CCR4'e bağlanarak mikrobiyal enfeksiyonlara ve tümör hücrelerine karşı gelişen immün yanıtı suprese eder. Bunu da ortama T_{reg} toplanmasına yol açarak yapar. Böylece enfeksiyon durumunun devam etmesine ve tümör gelişimine neden olur. CCL22 ekspresyonunda artış kolorektal adenokarsinomlar, akciğer kanseri, lenfoma, baş-boyun skuamöz hücreli karsinomları ve meme kanserinde gösterilmiştir.^{146,147} Jafarzadeh ve arkadaşlarının 100 meme kanserli kadın hastada yaptığı çalışmada meme kanserli hastaların serum CCL22 düzeylerinin sağlıklı kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu ve ayrıca serum CCL22 seviyesinin hastalık evresi arttıkça yükseldiği gösterilmiştir. Bu da CCL22 seviyesindeki artışın meme kanseri progresyonu ve gelişimine yol açtığını desteklemektedir.¹⁴⁶ Bizim çalışmamızda ise CCL22 seviyesi sadece grup 5'teki farelerin KC dokusunda artmıştır. İki hafta boyunca meme kanserine maruz kalan ve ikinci haftanın sonunda sakrifiye edilen gruplarda (grup 4 ve grup 8) ise CCL22 seviyesinde artış tespit edilmemiştir. Bu sonuçlar literatür bilgilerinden farklıdır.

Tümör metastazında yeni damar oluşumu kritik bir öneme sahiptir ve yeni damar oluşumunda anjiogenik ve anti-anjiogenik faktörler arasındaki ilişki anjiogenez lehine artmaktadır. Anjiogenez kompleks bir süreç olup kanser metastazının patogenezinde yeni damar oluşumunun yanı sıra tümör ilişkili makrofajlar (TAM), adezyon moleküllerinin ekspresyonunun değişmesi ve ekstraselüler matrikste proteaz

üretimini artırması gibi faktörler de rol oynarlar. Tümör hücreleri, fibroblastlar ve tümör ilişkili makrofajlar tümör mikroçevresinde zengin sitokin ağının oluşumuna yol açarlar. Bu sitokin ağı içerisinde bulunan bazı kemokinler de anjiogenezde rol oynamaktadır. Anjiogenezden temel olarak sorumlu kemokin alt grubu CXC kemokinler olup proanjiogenik ve antioanjiogenik etki gösterirler. Anti-anjiogenik kemokinler CXCL9, 10 ve 11 olup CXCR3 reseptörü aracılığıyla hem proanjiogenik kemokinleri hem de bFGF ve VEGF gibi sitokinleri inhibe ederler.¹¹ Pro-anjiogenik kemokinler ise CXCR1 ve CXCR2 reseptörleri üzerinden etki eden kemokinlerdir. Özellikle in vivo çalışmalarda CXCL8'in meme kanserinde tümör gelişimi, anjiogenez ve metastazdan sorumlu olduğu gösterilmiştir.^{11,148}

CXC kemokin ailesi 17 ligandan ve 7 reseptörden oluşan kemokin alt grubudur. Bu grup içerisinde bulunan CXCL1, 2, 3, 5 ve CXCL8 glutamik asit-lösin-arjinin (ELR) sekansı içerir. ELR⁺ bu kemokinler, nötrofil toplanması ve anjiogenezden sorumludur. Literatürde CXCL1 ekspresyonunda artış prostat kanseri, mide kanseri, renal hücreli karsinom ve melanomda gösterilmiştir.¹⁴⁹ Son yıllardaki çalışmalarda da artmış CXCL1 protein ekspresyonunun meme kanseri ekilen fare modellerinde artmış tümör büyümesi ve akciğer kanseri ile ilişkili olduğu bildirilmiştir.¹⁵⁰ Aynı şekilde Her-2 (+) metastatik meme kanserlerinde de CXCL1 protein ekspresyonunda artış olduğu ve bu yüksekliğin azalmış sağ kalım ile ilişkisi olduğu bildirilmiştir.^{149,151} Zou ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada meme kanseri stromasında artmış CXCL1 düzeyi olduğu, bu artışın da tümör rekürrensi ve azalmış hasta sağ kalımı ile ilişkisi olduğu gösterilmiştir.¹⁴⁹ Ayrıca, CXCL1'in stromadaki fibroblastlara lokalize olduğu ve TGF- β sinyalizasyon sistemi ile inhibe olduğu bildirilmiştir.¹⁴⁹ CXCL1 reseptörleri olan CXCR1 ve CXCR2; miyeloid hücreler ve karsinom hücreleri tarafından eksprese edilir. Dolayısıyla karsinom ilişkili fibroblastalarda CXCL1 ekspresyonunun varlığının, tümör progresyonu ve kemoterapi direnci gelişimi açısından immün hücreler ve kanser hücreleri arasındaki parakrin ilişkiyi sağladığı düşünülmektedir. Bizim çalışmamızda da CXCL1 düzeyi grup 3 ve grup 7'nin KC lizatları ile grup 8'in distal karaciğer dokusunda daha fazla olmak üzere hem grup 6 hem de grup 8'in her iki karaciğer dokusunda da artmış oranda bulunmuştur.

CXCL9, farelerde 5. kromozomun uzun kolu üzerinde kodlanan ve CXCR3 reseptörü üzerinden etki eden bir anti-anjiyogenik kemokindir. Literatürde CXCL9 seviyesindeki artışın over ve kolon kanserlerinde tümör dokusuna CD8⁺ T hücre infiltrasyonunu artırarak kanser metastazını azaltıp sağ kalımı artırdığı gösterilmiştir.^{10,152} Bizim çalışmamızda ise grup 7'de artmış CXCL9 seviyesi bulunmuştur; ancak aynı yükseklik grup 8'de gösterilmemiştir. Uzun dönem sham grupları olan grup 2 ve grup 4'te yükseklik tespit edilmiştir.

CCL2 ve 5 seviyelerinin, grup 8'in KC lizatlarında diğer gruplara kıyasla çok daha yüksek çıkması, metastaz gelişmesinden önce KC lizatlarında seviyelerinin yükselerek, bir tümör belirteci gibi kullanılabilme ihtimalini de akla getirmektedir. Bu ihtimal de KC ve periferik kan örneklerinde ileri deneylerle araştırılmalıdır.

Tümör ekilip hepatektomi yapılan gruplarda (grup 7 ve grup 8) kemokin düzeyleri kontrol gruplarına kıyasla daha yüksek bulunmuştur ancak toplamda 4 adet farede karaciğer metastazı gelişmiş olması birbiriyle paralellik göstermemektedir.

Tümör ekilen kontrol gruplarına göre (grup 3 ve 4), tümör ekilip hepatektomi yapılan gruplarda (grup 7 ve 8) kemokin düzeyleri daha yüksek bulunmuştur. Grup 7 ve grup 8 birlikte değerlendirildiğinde, ELİSA ile saptanan kemokin yoğunlukları ve kemokin çeşitliliği diğer gruplara göre daha fazla olarak görülmüştür. Patolojik inceleme sonucu istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte, KC metastazı saptanan 4 adet farenin tamamı hepatektomi yapılan gruplardadır. Birbirine paralel bu iki sonuç göz önünde bulundurulduğunda "tümör ekilen gruba KC rezeksiyonu yapıldığında metastaz oranı artmıştır" yorumu yapılabilir. Bu bilgiler ışığında, bazı çalışmalarda da gösterilen KC rezeksiyonu sonrası KC metastazının arttığı hipotezinin doğruluğu daha ileri araştırmalarla mutlaka incelenmelidir.

6. SONUÇLAR

1. Deneysel meme kanseri modelinde karaciğer rezeksiyonu kısa ve uzun dönemde kemokin artışına neden olmaktadır.
2. Kemokin artışı ile metastaz paralellik göstermemiştir.
3. İstatistiksel olarak anlamlı bulunmamış olmakla birlikte, histopatolojik olarak metastazların tamamının karaciğer rezeksiyonu uygulanan gruplarda saptanmış olması yeni çalışma gerekliliğinin göstergesi olarak değerlendirilebilir.

7. KAYNAKLAR

1. Tao Z, Shi A, Lu C, Song T, Zhang Z. ve ark. Breast cancer: Epidemiology and Etiology. *Cell Biochem Biophys* 2015; 72:333-338
2. Druesne-Pecollo, N, Touvier, M., Barrandon, E., Chan, D. S., Norat, T., Zelek, L., et al. Excess body weight and second primary cancer risk after breast cancer: A systematic review and meta-analysis of prospective studies. *Breast Cancer Research and Treatment* 2012;135: 647–654.
3. Miller DK, Siegel RL, Lin CC, Mariotto AB, Kramer JL ve ark. Cancer Treatment and Survivorship Statics 2016. *CA Cancer J Clin* 2016; 66:271-289
4. Desantis, C., Ma, J., Bryan, L., & Jemal, A. (2014). Breast cancer statistics. *CA A Cancer Journal for Clinicians* 2013; 64: 52–62.
5. Anderson KN, Schwab RB, Martinez ME. Reproductive risk factors and breast cancer subtypes: a review of the literature. *Breast Cancer Res Trest* 2014;144:1-10
6. Gajdos, C., Tartter, P. I., Bleiweiss, I. J., Bodian, C., & Brower, S. T. Stage 0 to stage iii breast cancer in young women. *Journal of the American College of Surgeons* 2000;190: 523–529.
7. Xing P, Li JG, Jin F . A case–control study of reproductive factors associated with subtypes of breast cancer in Northeast China. *Med Oncol* 2010; 27(3):926–931
8. Tamimi RM, Colditz GA, Hazra A, Baer HJ, Hankinson SE ve ark. Traditional breast cancer risk factors in relation to molecular subtypes of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2012; 131(1):159–167
9. McPherson, Steel SM, Dixon JM. Breast cancer –epidemiology, risk factors and genetics. *ABC of Breast Diseases* 2000;321:624-628
10. Nagarsheth N, Wicha MS, Weiping Z. Chemokines in the cancer microenvironment and their relevance in cancer immunotherapy. *Nature Review Immunology* 2017;17:559-570
11. Ali S, Lazenne G. Chemokines: novel targets for breast cancer metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 2007; 26:401,420

12. Dowsland MH, Harvey JR, Lennard TW, Kirby JA, Ali S. Chemokines and breast cancer: a gateway to revolutionary targeted cancer treatments? *Curr Med Chem* 2003;10:579–92
13. Thelen M. Dancing to the tune of chemokines. *Nat Immunol.* 2001;2:129–34
14. Belperio JA, Keane MP, Arenberg DA, Addison CL, Ehlert JE, Burdick MD, Strieter RM. CXC chemokines in angiogenesis. *J Leukoc Biol.* 2000;68:1–8.
15. Baggiolini M, Loetscher P. Chemokines in inflammation and immunity. *Immunol Today.* 2000;21:418–20.
16. Chen GS, Yu HS, Lan CC, Chow KC, Lin TY, Kok LF, Lu MP, Liu CH, Wu MT. CXC chemokine receptor CXCR4 expression enhances tumorigenesis and angiogenesis of basal cell carcinoma. *Br J Dermatol.* 2006;154:910–8
17. Strieter RM, Burdick MD, Gomperts BN, Belperio JA, Keane MP. CXC chemokines in angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev* 2005
18. Chow MT, Luster AD Chemokines in Cancer. *Cancer Immunol Res* 2014;2(12): 1125-1131
19. Charo I, Ransohoff R. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N Engl J Med.* 2006;354:610–21.
20. Wolf, M. J. et al. Endothelial CCR2 signaling induced by colon carcinoma cells enables extravasation via the JAK2–Stat5 and p38MAPK pathway. *Cancer Cell* 2012; 22:91–105
21. Goede, V., Brogelli, L., Ziche, M., Augustin, H. G. Induction of inflammatory angiogenesis by monocyte chemoattractant protein-1. *Int. J. Cancer* 1999; 82:765–770
22. Bonapace, L. et al. Cessation of CCL2 inhibition accelerates breast cancer metastasis by promoting angiogenesis. *Nature* 2014; 515:130–133
23. Stamenkovic, I. Matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. *Semin. Cancer Biol.* 2000; 10: 415–433
24. Fang, W. B. et al. CCL2/CCR2 chemokine signaling coordinates survival and motility of breast cancer cells through Smad3 protein- and p42/44 mitogen-activated protein kinase (MAPK)-dependent mechanisms. *J. Biol. Chem.* 2012; 287: 36593–36608

25. Chen, J. et al. CCL18 from tumor-associated macrophages promotes breast cancer metastasis via PITPNM3. *Cancer Cell* 2011;19: 541–555
26. Leung, S. Y. et al. Expression profiling identifies chemokine (C-C motif) ligand 18 as an independent prognostic indicator in gastric cancer. *Gastroenterology* 2004;127: 457–469
27. Sharma, P. K. et al. CCR9 mediates PI3K/AKT-dependent antiapoptotic signals in prostate cancer cells and inhibition of CCR9–CCL25 interaction enhances the cytotoxic effects of etoposide. *Int. J. Cancer* 2010;127: 2020–2030
28. Johnson, E. L. et al. CCR9 interactions support ovarian cancer cell survival and resistance to cisplatin-induced apoptosis in a PI3K-dependent and FAK-independent fashion. *J. Ovarian Res.* 2010; 3:15
29. Li, A. H., Dubey, S., Varney, M. L., Dave, B. J. & Singh, R. K. IL-8 directly enhanced endothelial cell survival, proliferation, and matrix metalloproteinases production and regulated angiogenesis. *J. Immunol.* 2003;170: 3369–3376
30. Gabellini, C. et al. Functional activity of CXCL8 receptors, CXCR1 and CXCR2, on human malignant melanoma progression. *Eur. J. Cancer* 2009;45: 2618–2627
31. Kryczek, I. et al. CXCL12 and vascular endothelial growth factor synergistically induce neoangiogenesis in human ovarian cancers. *Cancer Res.* 2005;65:465–472
32. Kryczek, I., Wei, S., Keller, E., Liu, R. & Zou, W. Stroma-derived factor (SDF-1/CXCL12) and human tumor pathogenesis. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2007; 292: 987–995
33. Scotton, C. J. et al. Multiple actions of the chemokine CXCL12 on epithelial tumor cells in human ovarian cancer. *Cancer Res.* 2002;62: 5930–5938
34. Zeelenberg, I. S., Ruuls-Van Stalle, L. & Roos, E. The chemokine receptor CXCR4 is required for outgrowth of colon carcinoma micrometastases. *Cancer Res.* 2003;63: 3833–3839
35. Zhang, S. S. et al. CD133+CXCR4+ colon cancer cells exhibit metastatic potential and predict poor prognosis of patients. *BMC Med.* 2012;10: 85

36. Wente, M. N. et al. CXCL14 expression and potential function in pancreatic cancer. *Cancer Lett.* 259, 209–217 (2008).
37. Schwarze, S. R., Luo, J., Isaacs, W. B. & Jarrard, D. F. Modulation of CXCL14 (BRAK) expression in prostate cancer. *Prostate* 64, 67–74 (2005).
38. Hromas, R. et al. Cloning of BRAK, a novel divergent CXC chemokine preferentially expressed in normal versus malignant cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 255, 703–706 (1999).
39. Gu, X. L. et al. Expression of CXCL14 and its anticancer role in breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 135, 725–735 (2012).
40. Sleeman, M. A. et al. B cell- and monocyte-activating chemokine (BMAC), a novel non-ELR α -chemokine. *Int. Immunol.* 12, 677–689 (2000).
41. Frederick, M. J. et al. In vivo expression of the novel CXC chemokine BRAK in normal and cancerous human tissue. *Am. J. Pathol.* 156, 1937–1950 (2000).
42. Allinen, M. et al. Molecular characterization of the tumor microenvironment in breast cancer. *Cancer Cell* 6, 17–32 (2004).
43. Matsui, A. et al. CXCL17 expression by tumor cells recruits CD11b⁺Gr1^{high}F4/80⁻ cells and promotes tumor progression. *PLoS ONE* 7, e44080 (2012).
44. Lee, W. Y., Wang, C. J., Lin, T. Y., Hsiao, C. L. & Luo, C. W. CXCL17, an orphan chemokine, acts as a novel angiogenic and anti-inflammatory factor. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 304, E32–E40 (2013).
45. Miao, Z. et al. CXCR7 (RDC1) promotes breast and lung tumor growth in vivo and is expressed on tumor-associated vasculature. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 104, 15735–15740 (2007).
46. Wang, J. et al. The role of CXCR7/RDC1 as a chemokine receptor for CXCL12/SDF-1 in prostate cancer. *J. Biol. Chem.* 283, 4283–4294 (2008).
47. Song JK, Park MH, Choi D-Y, Yoo HS, Han SB, Yoon DY, et al. Deficiency of CC chemokine receptor 5 suppresses tumor development via inactivation of NF- κ B and upregulation of IL-1Ra in melanoma model. *PLoS One.* 2012;7:e33747

48. Smith MC, Luker KE, Garbow JR, Prior JL, Jackson E, Piwnica-Worms D, et al. CXCR4 regulates growth of both primary and metastatic breast cancer. *Cancer Res.* 2004;64:8604–12.
49. Luker KE, Luker GD. Functions of CXCL12 and CXCR4 in breast cancer. *Cancer Lett.* 2006;238:30–41.
50. Lau TS, Chung TKH, Cheung TH, Chan LKY, Cheung LWH, Yim SF, et al. Cancer cell-derived lymphotoxin mediates reciprocal tumour-stromal interactions in human ovarian cancer by inducing CXCL11 in fibroblasts. *J Pathol.* 2014;232:43–56
51. Mishra P, Banerjee D, Ben-Baruch A. Chemokines at the crossroads of tumor-fibroblast interactions that promote malignancy. *J Leukoc Biol.* 2011;89:31–9.
52. Rigo A, Gottardi M, Zamò A, Mauri P, Bonifacio M, Krampera M, et al. Macrophages may promote cancer growth via a GM-CSF/HB-EGF paracrine loop that is enhanced by CXCL12. *Mol Cancer.* 2010;9:273.
53. Ueno T, Toi M, Saji H, Muta M, Bando H, Kuroi K, et al. Significance of macrophage chemoattractant protein-1 in macrophage recruitment, angiogenesis, and survival in human breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2000;6:3282–9.
54. Perollet C, Han ZC, Savona C, Caen JP, Bikfalvi A. Platelet Factor 4 Modulates Fibroblast Growth Factor 2 (FGF-2) Activity and Inhibits FGF-2 Dimerization. *Blood.* 1998;91:3289–99.
55. Luster AD, Greenberg SM, Leder P. The IP-10 chemokine binds to a specific cell surface heparan sulfate site shared with platelet factor 4 and inhibits endothelial cell proliferation. *J Exp Med.* 1995;182:219–31.
56. Campanella GS, Colvin RA, Luster AD. CXCL10 can inhibit endothelial cell proliferation independently of CXCR3. *PLoS One.* 2010;5:e12700.
57. Dimberg A. The Chemokine System in Experimental and Clinical Hematology. Springer; 2010. Chemokines in angiogenesis; pp. 59–80.
58. Müller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan ME, et al. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature.* 2001;410:50–6.

59. Darash-Yahana M, Pikarsky E, Abramovitch R, Zeira E, Pal B, Karplus R, et al. Role of high expression levels of CXCR4 in tumor growth, vascularization, and metastasis. *FASEB J.* 2004;18:1240–2.
60. Zlotnik A, Burkhardt AM, Homey B. Homeostatic chemokine receptors and organ-specific metastasis. *Nat Rev Immunol.* 2011;11:597–606.
61. Das S, Sarrou E, Podgrabinska S, Cassella M, Mungamuri SK, Feirt N, et al. Tumor cell entry into the lymph node is controlled by CCL1 chemokine expressed by lymph node lymphatic sinuses. *J Exp Med.* 2013;210:1509–28.
62. Vesely MD, Kershaw MH, Schreiber RD, Smyth MJ. Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annu Rev Immunol.* 2011;29:235–71.
63. Curiel TJ, Coukos G, Zou L, Alvarez X, Cheng P, Mottram P, et al. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med.* 2004;10:942–9.
64. Olkhanud PB, Baatar D, Bodogai M, Hakim F, Gress R, Anderson RL, et al. Breast cancer lung metastasis requires expression of chemokine receptor CCR4 and regulatory T cells. *Cancer Res.* 2009;69:5996–6004
65. Qian B-Z, Pollard JW. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell.* 2010;141:39–51.
66. Aldinucci D, Colombatti A. The inflammatory chemokine CCL5 and cancer progression. *Mediators Inflamm.* 2014;2014:292376.
67. Sukkurwala, A. Q. et al. Immunogenic calreticulin exposure occurs through a phylogenetically conserved stress pathway involving the chemokine CXCL8. *Cell Death Differ.* 21, 59–68 (2014).
68. Obeid, M. et al. Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nat. Med.* 13, 54–61 (2007).
69. Carmeliet, P. & Jain, R. K. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 407, 249–257 (2000).
70. Vesely MD, Kershaw MH, Schreiber RD, Smyth MJ. Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annu Rev Immunol.* 2011;29:235–71.
71. Oghumu S, Varikuti S, Terrazas C, Kotov D, Nasser MW, Powell CA, et al. CXCR3 deficiency enhances tumor progression by promoting macrophage M2 polarization in a murine breast cancer model. *Immunology.* 2014;143:109–19

72. González-Martín A, Gómez L, Lustgarten J, Mira E, Mañes S. Maximal T cell-mediated antitumor responses rely upon CCR5 expression in both CD4+ and CD8+ T cells. *Cancer Res.* 2011;71:5455–66.
73. Peng, D. et al. Epigenetic silencing of TH1-type chemokines shapes tumour immunity and immunotherapy. *Nature* 527, 249–253 (2015).
74. Nagarsheth, N. et al. PRC2 epigenetically silences Th1-type chemokines to suppress effector T-cell trafficking in colon cancer. *Cancer Res.* 76, 275–282 (2016).
75. Tessema, M. et al. Re-expression of CXCL14, a common target for epigenetic silencing in lung cancer, induces tumor necrosis. *Oncogene* 29, 5159–5170 (2010).
76. Ierano, C. et al. A point mutation (G574A) in the chemokine receptor CXCR4 detected in human cancer cells enhances migration. *Cell Cycle* 8, 1228–1237 (2009).
77. Libura, J. et al. CXCR4–SDF-1 signaling is active in rhabdomyosarcoma cells and regulates locomotion, chemotaxis, and adhesion. *Blood* 100, 2597–2606 (2002).
78. Pelicano, H. et al. Mitochondrial dysfunction and reactive oxygen species imbalance promote breast cancer cell motility through a CXCL14-mediated mechanism. *Cancer Res.* 69, 2375–2383 (2009).
79. Boudot, A. et al. Differential estrogen-regulation of CXCL12 chemokine receptors, CXCR4 and CXCR7, contributes to the growth effect of estrogens in breast cancer cells. *PLoS ONE* 6, e20898 (2011).
80. Ma Y, Mattarollo SR, Adjemian S, Yang H, Aymeric L, Hannani D, et al. CCL2/CCR2-dependent recruitment of functional antigen-presenting cells into tumors upon chemotherapy. *Cancer Res.* 2014;74:436–45.
81. Hong M, Puaux A-L, Huang C, Loumagne L, Tow C, Mackay C, et al. Chemotherapy induces intratumoral expression of chemokines in cutaneous melanoma, favoring T-cell infiltration and tumor control. *Cancer Res.* 2011;71:6997–7009.
82. Bonapace, L. et al. Cessation of CCL2 inhibition accelerates breast cancer metastasis by promoting angiogenesis. *Nature* 515, 130–133 (2014).

83. Bertolini, F. et al. CXCR4 neutralization, a novel therapeutic approach for non-Hodgkin's lymphoma. *Cancer Res.* 62, 3106–3112 (2002).
84. Waugh, D. J. J. & Wilson, C. The interleukin-8 pathway in cancer. *Clin. Cancer Res.* 14, 6735–6741 (2008).
85. Bertini, R. et al. Noncompetitive allosteric inhibitors of the inflammatory chemokine receptors CXCR1 and CXCR2: prevention of reperfusion injury. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 101, 11791–11796 (2004).
86. Palacios-Arreola M, Nava-Castro KE, Castro JI, Garcia-Zepeda E, Carrero J ve ark. The Role of Chemokines in Breast Cancer Pathology and Its Possible use as Therapeutic Targets. *Journal of Immunology Research* 2014
87. Soria G, Ben-Baruch A. The inflammatory chemokines CCL2 and CCL5 in breast cancer. *Cancer Letters.* 2008;267(2):271–285.
88. Tsuyada A, Chow A, Wu J, et al. CCL2 mediates cross-talk between cancer cells and stromal fibroblasts that regulates breast cancer stem cells. *Cancer Research.* 2012;72(11):2768–2779.
89. Marsigliante S, Vetrugno C, Muscella A. CCL20 induces migration and proliferation on breast epithelial cells. *Journal of Cellular Physiology.* 2013;228(9):1873–1883.
90. Shao N, Chen L-H, Ye R-Y, Lin Y, Wang S-M. The depletion of Interleukin-8 causes cell cycle arrest and increases the efficacy of docetaxel in breast cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 2013;431(3):535–541.
91. Singh JK, Farnie G, Bundred NJ, et al. Targeting CXCR1/2 significantly reduces breast cancer stem cell activity and increases the efficacy of inhibiting HER2 via HER2-dependent and -independent mechanisms. *Clinical Cancer Research.* 2013;19(3):643–656.
92. Fujimoto H, Sangai T, Ishii G, et al. Stromal MCP-1 in mammary tumors induces tumor-associated macrophage infiltration and contributes to tumor progression. *International Journal of Cancer.* 2009;125(6):1276–1284.
93. Ben-Baruch A. The multifaceted roles of chemokines in malignancy. *Cancer and Metastasis Reviews.* 2006;25(3):357–371.

94. Adler EP, Lemken CA, Katchen NS, Kurt RA. A dual role for tumor-derived chemokine RANTES (CCL5) *Immunology Letters*. 2003;90(2-3):187–194.
95. Williams SA, Harata-Lee Y, Comerford I, Anderson RL, Smyth MJ, McColl SR. Multiple functions of CXCL12 in a syngeneic model of breast cancer. *Molecular Cancer*. 2010;9
96. Mizukami Y, Kono K, Kawaguchi Y, et al. CCL17 and CCL22 chemokines within tumor microenvironment are related to accumulation of Foxp3+ regulatory T cells in gastric cancer. *International Journal of Cancer*. 2008;122(10):2286–2293
97. Maruyama T, Kono K, Izawa S, et al. CCL17 and CCL22 chemokines within tumor microenvironment are related to infiltration of regulatory T cells in esophageal squamous cell carcinoma. *Diseases of the Esophagus*. 2010;23(5):422–429.
98. Curiel TJ, Coukos G, Zou L, et al. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nature Medicine*. 2004;10(9):942–949.
99. Haim K, Weitzenfeld P, Meshel T, Ben-Baruch A. Epidermal growth factor and estrogen act by independent pathways to additively promote the release of the angiogenic chemokine CXCL8 by breast tumor cells. *Neoplasia*. 2011;13(3):230–243
100. Zhuo W, Jia L, Song N, et al. The CXCL12 -CXCR4 chemokine pathway: a novel axis regulates lymphangiogenesis. *Clinical Cancer Research*. 2012;18(19):5387–5398
101. Dewan MZ, Ahmed S, Iwasaki Y, Ohba K, Toi M, Yamamoto N. Stromal cell-derived factor-1 and CXCR4 receptor interaction in tumor growth and metastasis of breast cancer. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 2006;60(6):273–276.
102. Müller A, Homey B, Soto H, et al. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature*. 2001;410(6824):50–56.
103. Hinton CV, Avraham S, Avraham HK. Role of the CXCR4/CXCL12 signaling axis in breast cancer metastasis to the brain. *Clinical and Experimental Metastasis*. 2010;27(2):97–105.

104. Chen H-W, Du C-W, Wei X-L, Khoo U-S, Zhang G-J. Cytoplasmic CXCR4 high-expression exhibits distinct poor clinicopathological characteristics and predicts poor prognosis in triple-negative breast cancer. *Current Molecular Medicine*. 2013;13(3):410–416.
105. Molloy AP, Martin FT, Dwyer RM, et al. Mesenchymal stem cell secretion of chemokines during differentiation into osteoblasts, and their potential role in mediating interactions with breast cancer cells. *International Journal of Cancer*. 2009;124(2):326–332.
106. Jamieson-Gladney WL, Zhang Y, Fong AM, Meucci O, Fatatis A. The chemokine receptor CX3CR1 is directly involved in the arrest of breast cancer cells to the skeleton. *Breast Cancer Research*. 2011;13(5, article R91)
107. Hernandez L, Magalhaes M, Coniglio SJ, Condeelis JS, Segall JE. Opposing roles of CXCR4 and CXCR7 in breast cancer metastasis. *Breast Cancer Research*. 2011;13(6, article R128)
108. Chen J, Yao Y, Gong C, et al. CCL18 from Tumor-Associated Macrophages Promotes Breast Cancer Metastasis via PITPNM3. *Cancer Cell*. 2011;19(4):541–555.
109. Ma R, Lin S, Chen J, Lin H, Liang X ve ark. Mechanism involved in breast cancer liver metastasis. *Journal of Translational Medicine* 2015;13:64,71
110. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin*. 2012;62:10–29
111. Adam R, Aloia T, Krissat J, Bralet MP, Paule B, Giacchetti S, et al. Is liver resection justified for patients with hepatic metastases from breast cancer? *Ann Surg*. 2006;244:897–907.
112. Khatib AM, Auguste P, Fallavollita L, Wang N, Samani A, Kontogiannea M, et al. Characterization of the host proinflammatory response to tumor cells during the initial stages of liver metastasis. *Am J Pathol*. 2005;167:749–759.
113. Eichbaum C, Meyer AS, Wang N, Bischofs E, Steinborn A, Bruckner T, et al. Breast cancer cell-derived cytokines, macrophages and cell adhesion: implications for metastasis. *Anticancer Res*. 2011;31:3219–3227.

114. Muller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan ME, et al. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature*. 2001;410:50–56.
115. Andre F, Cabioglu N, Assi H, Sabourin JC, Delaloge S, Sahin A, et al. Expression of chemokine receptors predicts the site of metastatic relapse in patients with axillary node positive primary breast cancer. *Ann Oncol*. 2006;17:945–951.
116. Hembruff SL, Jokar I, Yang L, Cheng N. Loss of transforming growth factor-beta signaling in mammary fibroblasts enhances CCL2 secretion to promote mammary tumor progression through macrophage-dependent and -independent mechanisms. *Neoplasia*. 2010;12:425–433.
117. Stormes KA, Lemken CA, Lepre JV, Marinucci MN, Kurt RA. Inhibition of metastasis by inhibition of tumor-derived CCL5. *Breast Cancer Res Treat*. 2005;89:209–212
118. Soria G, Ben-Baruch A. The inflammatory chemokines CCL2 and CCL5 in breast cancer. *Cancer Lett*. 2008;267:271–285.
119. Porter DA, Krop IE, Nasser S, Sgroi D, Kaelin CM, Marks JR, et al. A SAGE (serial analysis of gene expression) view of breast tumor progression. *Cancer Res*. 2001;61:5697–5702.
120. Lou Y, Preobrazhenska O, auf dem Keller U, Sutcliffe M, Barclay L, McDonald PC, et al. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) is not sufficient for spontaneous murine breast cancer metastasis. *Dev Dyn*. 2008;237:2755–2768.
121. Chao Y, Wu Q, Shepard C, Wells A. Hepatocyte induced re-expression of E-cadherin in breast and prostate cancer cells increases chemoresistance. *Clin Exp Metastasis*. 2012;29:39–50
122. Hazan RB, Phillips GR, Qiao RF, Norton L, Aaronson SA. Exogenous expression of N-cadherin in breast cancer cells induces cell migration, invasion, and metastasis. *J Cell Biol*. 2000;148:779–790.
123. Tabaries S, Dong Z, Annis MG, Omeroglu A, Pepin F, Ouellet V, et al. Claudin-2 is selectively enriched in and promotes the formation of breast

- cancer liver metastases through engagement of integrin complexes. *Oncogene*. 2011;30:1318–1328.
124. Erin N, Kale S, Tanriover G, Koksoy S, Duymus O, Korcum AF. Differential characteristics of heart, liver, and brain metastatic subsets of murine breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat*. 2013;139:677–689.
 125. Lackner C, Moser R, Bauernhofer T, Wilders-Truschnig M, Samonigg H, Berghold A, et al. Soluble CD44 v5 and v6 in serum of patients with breast cancer. Correlation with expression of CD44 v5 and v6 variants in primary tumors and location of distant metastasis. *Breast Cancer Res Treat*. 1998;47:29–40.
 126. Kimbung S, Kovacs A, Bendahl PO, Malmstrom P, Ferno M, Hatschek T, et al. Claudin-2 is an independent negative prognostic factor in breast cancer and specifically predicts early liver recurrences. *Mol Oncol*. 2014;8:119–128.
 127. Koo JS, Jung W, Jeong J. Metastatic breast cancer shows different immunohistochemical phenotype according to metastatic site. *Tumori*. 2010;96:424–432.
 128. Khan Z, Mudan S. Liver regeneration: mechanisms, mysteries and more. *ANZ J Surg* 2007;77:9,14
 129. Souto M, Llanos J. The circadian optimal time for hepatectomy in the study of liver regeneration. *Chronobiol Int* 1985;2:169,175
 130. Fausto N, Campbell JS, Riehle KJ. Liver Regeneration. *Hepatology* 2006;2:S45-53
 131. Cornell PP, Liljequist BL, Bartizal KF. Depressed liver regeneration after partial hepatectomy of germ-free athymic and lipo-polysaccharide resistant mice. *Hepatology* 1990;11:916-922
 132. Seki E, Tsutsui H, Limuro Y, Naka T, Son G ve ark. Contribution of toll-like receptors /myeloid differentiation factor 88 signaling to murine liver regeneration. *Hepatology* 2005;41:443-450
 133. Kandilis AN, Koskinas J, Tiniakos D, Nikiteas N, Perrea D. Liver regeneration: focus on cell types and topographic differences. *Eur Surg Res* 2010;44:1-12

134. Mitchell C, Nivison M, Jackson L, Fox R, Lee D ve ark. Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor links hepatocyte friming with cell cycle progression during liver regeneration. *J Biol Chem* 2005;280:2562-2568
135. Kim T, Mars W, Stolz D, Mitchalopoulos G. Expression and activation of pro- MMP-2 and pro-MMP-9 during rat liver regeneration. *Hepatology* 2000;31:75-82
136. Christophi C, Harun N, Fifis Theodora. Liver regeneration and tumor stimulation- A review of cytokine and angiogenic factor. *J Gastrointest Surg* 2008;12:966-980
137. De Jong KP, Lont HE, Bijma AM. The effect of partial hepatectomy on tumor growth in rats: In vivo and in vitro studies. *Hepatology* 1995;22:1263-1272
138. Castillo MH, Doer RJ, Paolini N, Cohen S, Goldrosen M, et al. Hepatactomy prolongs survival of mice with induced liver metastases. *Arch Surg* 1989;124:167
139. Harun N, Nikfarjam M, Muralidharan V, Christophi C. Liver regeneration stimulates tumor metastases. *J Surg Res* 2007;138:284-290
140. Palmes D, Spiegel HU. Animal models of liver regeneration. *Biomaterials* 2004;25:1601-1611
141. Popescu R, Filimon MN, Dumitrescu G, Ciochina LP, Dumitrascu V ve ark. Histological and Morphometric studies in liver regeneration in mice. *Animal sciences and Biotechnologies* 2012;45(2);203-207
142. Pulatski B, Ostrand-Rosenberg S. Mouse T1 Breast tumor model. *Current protocols in Immunology* 2000;20(2):1-16
143. Lebrecht A, Grimm C, Lantzsch T, Ludwig E, Hefler L, et al. Monocyte chemoattractant protein-1 serum levels in patients with breast cancer. *Tumour Biol.* 2004;25:14–7
144. Goede V, Brogelli L, Ziche M, Augustin HG. Induction of inflammatory angiogenesis by monocyte chemoattractant protein-1. *Int J Cancer.* 1999;82:765–70

145. Mumtaz M, Wagsater D, Löfgren S, Hugander A, Zar N, et al. Decreased expression of chemokine CCL21 in human colorectal adenocarcinomas. *Oncology Reports* 2009;21:153-158
146. Jafarzadeh A, Fooladseresth H, Minaee K, Bazrafshani M, Khosravimashizi A. Higher circulating levels of chemokine CCL22 in patients with breast cancer: evaluation of the influences of tumor stage and chemokine gene polymorphism. *Tumor Biol* 2015;36:1163-1171
147. Li YQ, Liu FF, Zhang XM, Guo XJ, Ren MJ, et al. Tumor secretion of CCL22 activates intratumoral Treg infiltration and is independent prognostic predictor of breast cancer. *PLoS one* 2013;8:e76379
148. Bieche L, Chavey C, Andrew C, Burlinchon S, Guinebretiere J, et al. CXC chemokines located in 4q21 region are differentially expressed in breast cancer. *Endocrine Related Cancer* 2007;14(4):1039-52
149. Zou A, Lambert D, Yeh H, Yasukawa K, Behbot F, et al. Elevated CXCL1 expression in breast cancer stroma predicts poor prognosis and is inversely associated with expression of TGF- β . signalling proteins. *BMC Cancer* 2014;14:781
150. Li J, Sidell N. Growth-related oncogene produced in human breast cancer cells and regulated by Syk protein-tyrosine kinase. *Int J Cancer*. 2005; 117 (1): 14-20.
151. Vazquez-Martin A, Colomer R, Menendez JA. Protein array technology to detect HER2 (erbB-2)-induced 'cytokine signature' in breast cancer. *Eur J Cancer*. 2007; 43 (7): 1117-1124
152. Zhang L. Intratumoral T cells, recurrence and survival in epithelial ovarian cancer. *N Engl. J. Med* 2003; 348: 203-213