

T.C
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MEME KANSERİNİN FARKLI MOLEKÜLER ALT TİPLERİNİN KÖK HÜCRE
İŞARETÇİSİ, SİTOKİN RESEPTÖRÜ VE TÜMÖRLE İLİŞKİLİ MAKROFAJ
İŞARETÇİSİ DAĞILIMI AÇISINDAN DEĞERLENDİRİLMESİ

Dr. Can ILGIN

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ DOKTORA PROGRAMI
DOKTORA TEZİ

ANKARA
2017

T.C
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MEME KANSERİNİN FARKLI MOLEKÜLER ALT TİPLERİNİN KÖK HÜCRE
İŞARETÇİSİ, SİTOKİN RESEPTÖRÜ VE TÜMÖRLE İLİŞKİLİ MAKROFAJ
İŞARETÇİSİ DAĞILIMI AÇISINDAN DEĞERLENDİRİLMESİ

Dr. Can ILGIN

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ DOKTORA PROGRAMI
DOKTORA TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Prof.Dr. Sevda Fatma MÜFTÜOĞLU

ANKARA
2017

ONAY SAYFASI

**Meme Kanserinin Farklı Moleküler Alt Tiplerinin
Kök Hücre İşaretçisi, Sitokin Reseptörü ve Tümörle İlişkili Makrofaj İşaretçisi
Dağılımı Açısından Değerlendirilmesi
Dr.Can Ilgın**

Bu çalışma 23.02.2017 tarihinde jürimiz tarafından “Histoloji ve Embriyoloji Doktora Programı” nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Prof.Dr. Fevziye Figen Kaymaz
Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi

Tez Danışmanı: Prof.Dr. Sevda Fatma Müftüoğlu
Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi

Üye: Prof.Dr. Ayşe Nur Çakar
TOBB Ekonomi ve Teknoloji Üniversitesi Tıp Fakültesi

Üye: Prof.Dr. Atilla Dağdeviren
Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi

Üye: Prof.Dr. Petek Korkusuz
Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi

ONAY

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararıyla onaylanmıştır.


Prof. Dr. Diclehan Orhan
Enstitü Müdürü

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesi'ne verdiğimi bildiririm. Bu izinle üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

o Tezimin/Raporumun tamamı dünya çapında erişime açılabilir ve bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir.

(Bu seçenekle teziniz arama motorlarında indekslenebilecek, daha sonra tezinizin erişim statüsünün değiştirilmesini talep etmeniz ve kütüphane bu talebinizi yerine getirirse bile, teziniz arama motorlarının önbelleklerinde kalmaya devam edebilecektir)

o Tezimin/Raporumun tarihine kadar erişime açılmasını ve fotokopi alınmasını (İç kapak, Özet, İçindekiler ve Kaynakça hariç) istemiyorum.

(Bu sürenin sonunda uzatma için başvuruda bulunmadığım takdirde, tezimin/raporumun tamamı her yerden erişime açılabilir, kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir)

X Tezimin/Raporumun 03.03.2019 tarihine kadar erişime açılmasını istemiyorum ancak kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisinin alınmasını onaylıyorum.

o Serbest Seçenek/Yazarın Seçimi

03.03.2017


Can Ilgin

ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında zgn olduğunu, Tez danışmanım Prof.Dr. Sevdâ Fatma Müftüoğlu'nun danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.



Dr. Can İlgin



TEŞEKKÜR

Tez çalışması süresince daima bilimsel destek veren, yol gösterici olan ve bana özgür bir entelektüel ortam sağlayan tez danışmanım Prof. Dr. Sevdâ Fatma Müftüoğlu'na teşekkür ederim.

Tez çalışması boyunca laboratuvar aşamasında laboratuvar teknikleri, malzeme ve görüntüleme konusunda bana yardım eden Hacettepe Üniversitesi Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinin tümüne teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarında bana destek olan arkadaşlarım Uzm.Dr. Ayşegül Süzer, Araş. Gör. Bio. Nilgün Yersal, Araş. Gör. Dr. Selim Zırh ve Bio. Gülizar Dağışan'a teşekkür ederim.

Patoloji arşivlerinin taranması ve doku örneklerinin elde edilmesinde görev alan dostlarım Araş. Gör. Dr. Erdem Çomut ve Araş. Gör. Dr. Çağlar Sarıgül'e teşekkür ederim. İstatistik çalışmasındaki emeğinden dolayı Dr.Selçuk Korkmaz'a teşekkür ederim.

Çalışmaya gözlemci olarak katılan ve katkılarıyla laboratuvar çalışmalarını kolay ve eğlenceli hale getiren Bio. Sibel Aşım, Bio. Eymen Ece Aldemir, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi öğrencileri Stj. Dr. Eser İşler, Stj. Dr.Ali Kılınç, Stj. Dr.Emre Furkan Küçük, Bengisu Didem Saraçlı, Ali Selman Günaydın, Ayşegül Usve Türkcan, Ecem Yıldız, Ömer Faruk Gurbetoğlu, Hacettepe Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi öğrencisi Mustafa Temel, Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü öğrencisi Yavuz Adıgüzel ve Nevşehir Üniversitesi Moleküler Biyoloji öğrencisi Serhat Bayrak'a teşekkür ederim.

Doktora eğitiminde bana daima destek olan babam Kim.Müh. Yusuf Alpcan Ilgın (1950-2012) ve annem Dilek Ilgın'a içten teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

İlgin, C., Meme Kanserinin Farklı Moleküler Alt Tiplerinin Kök Hücre İşaretçisi, Sitokin Reseptörü ve Tümörle İlişkili Makrofaj İşaretçisi Dağılımı Açısından Değerlendirilmesi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Programı Doktora Tezi, Ankara, 2017. Meme kanseri prognoz ve tedaviye cevabı belirleyen farklı moleküler alt tipleri olan heterojen bir hastalıktır. Tümör mikroçevresindeki kök hücreler için işaretçi olan CD133'ün tanı ve tedavide önemi vardır. Tümörle ilişkili makrofajlar (TAM), kanser kök hücreleriyle CXCR1 aracılığıyla etkileşir. TAM'lar, M1 ve işaretçisi CD163 olan M2 fenotiplerine ayrılır. Bu çalışmada hipotezimiz, meme kanserinin farklı moleküler alt tiplerinde CD133, CXCR1 ve CD163 antijenlerinin ekspresyonları arası fark olduğudur. Bu nedenle meme kanserinin lüminal A (LA), lüminal B (LB), HER2 aşırı eksprese eden (HER2AE), triple negatif (TN) alt tiplerinde ve kanser tanısı almamış kontrol hastalarında bu antijenlerin ekspresyonları incelenmiştir. Bu amaçla hasta örneklerine indirekt immünohistokimya yöntemi uygulanmıştır. CD133 ekspresyonu tümör kitlesinin periferinde, CXCR1 ekspresyonu ise daha çok tümörün merkezi bölgelerinde görülmüştür. Sitoplazmik ve nükleer CD133, sitoplazmik CXCR1 ekspresyonları gözlemlenmiştir. Grupların CD133 ($p=0.004$), CXCR1 ($p=0.002$) ve M2/tüm makrofaj oranları ($p=0.022$) arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır. CD133 ve CXCR1 ekspresyonları arasında, zayıf pozitif korelasyon saptanmıştır ($r=0.249$, $p=0.035$). Sonuç olarak, düşük CD133 ekspresyonu TN alt tipteki hücrelerin düşük farklanma seviyesi ile açıklanabilir. Kompartmana spesifik ekspresyon nedeniyle CXCR1'i hedefleyen ilaçların tümörün merkezi bölgelerine ulaşması gerekir. TN moleküler alt tipteki hastalar, CXCR1'i hedefleyen ilaçlardan daha çok fayda görecektir. CXCR1'i hedefleyen ilaçlar, CD133 ekspresyonunu da azaltabilir.

Anahtar kelimeler: Meme kanseri, moleküler alt tip, mikroçevre, CD133, CXCR1, CD163, tümörle ilişkili makrofajlar, kanser kök hücresi

Bu çalışma Öğretim Üyesi Yetiştirme Programı (ÖYP) ile desteklenmiştir.

ABSTRACT

Ilgin, C., The Evaluation of the Distribution of the Stem Cell Marker, Cytokine Receptor and the Tumor Associated Macrophage Marker in Different Molecular Subtypes of the Breast Cancer, Hacettepe University Faculty of Medicine Department of Histology and Embryology Doctor of Philosophy Thesis, Ankara, 2017.

Breast cancer is a heterogeneous disease with different molecular subtypes, which determine the prognosis and response to the treatment. CD133 is a marker for cancer stem cells in tumor microenvironment with diagnostic/therapeutic importance. The tumor associated macrophages (TAM) interact with the cancer stem cells through the CXCR1 receptor. In this study, we hypothesized a possible difference in distribution of CD133, CXCR1 and CD163 antigens among different subtypes of breast cancer. Thus, we investigated the expression of these antigens in samples of the patients with luminal A (LA), luminal B (LB), HER2 overexpression (HER2OE), triple negative (TN) subtypes of breast cancer and control patients without cancer diagnosis. We applied indirect immunohistochemistry and evaluated immunostaining. CD133 expression was at periphery and CXCR1 expression was at the central areas of the tumor clusters. Cytoplasmic CXCR1, CD133 expressions and nuclear CD133 expression (prominent in TN subtype) were observed in patients. There was a statistically significant difference between groups for CD133 ($p=0.004$), CXCR1 ($p=0.002$) H-Score and M2 macrophages/whole TAM ratios ($p=0.022$). Between CD133 and CXCR1 expressions, there was a weak positive correlation ($r=0.249$, $p=0.035$). Due to compartment specific expression, agents targeting CXCR1 should reach to the central area of the tumor mass. Patients with TN subtype would benefit more from anti-CXCR1 treatment. Treatments, which target CXCR1 can also lower the expression of CD133 and vice versa.

Keywords: Breast cancer, molecular subtypes, microenvironment, CD133, CXCR1, CD163, tumor associated macrophages, cancer stem cell

This study was granted by Teaching Staff Training Program of Council of Higher Education.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xiii
ŞEKİLLER	xvii
TABLolar	xxi
1.GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kanser Kök Hücreleri	3
2.1.1. Meme Kanseri Kök Hücrelerinin Kökeni	4
2.1.2.Meme Kanseri Kök Hücre İşaretçileri	5
2.1.3.Meme Kanseri Kök Hücrelerinin Özellikleri	7
2.2. Meme Kanseri Kök Hücresi Mikroçevresi	10
2.2.1. Meme Kanseri Kök Hücresi Mikroçevresinde Bulunan Hücreler	10
2.2.2. Meme Kanseri Kök Hücresinin Mikroçevresinden Kaynaklanan Sinyaller	11
2.2.3. Meme Kanserinin Moleküler Alt Tiplerinde Sinyal Molekülü Dağılımı	15
2.3. Meme Kanseri Mikroçevresinde Tümörle İlişkili Makrofajlar (TAM)	16
2.3.1. Tümörle İlişkili Makrofajların (TAM) Polarizasyonu	16
2.3.1. Tümörle İlişkili Makrofajların (TAM) Meme Kanseri Kök Hücreleri ile Etkileşimi	18
2.2.3. Meme Kanserinin Moleküler Alt Tiplerinde TAM İşaretçilerinin Dağılımı	18

3.GEREÇ VE YÖNTEM	20
3.1. Etik Kurul İzin Süreci	20
3.2. Hastane Veri Tabanının Taranması	20
3.3. Çoklu Blokların Taranması	21
3.4. Kesitlerin Alınması	21
3.5. İmmunohistokimya Yönteminin Uygulanması	22
3.5.1. Deparaffinizasyon ve Rehidratasyon	22
3.5.2. Antijen Geri Çağırma	22
3.5.3. Tampon Solüsyonu ile Yıkama	23
3.5.4. Normal Serum ile Blokaj	23
3.5.5. Primer antikorun uygulanması	24
3.5.6. H ₂ O ₂ ile blokaj	25
3.5.7. Sekonder antikorun uygulanması	25
3.5.8. Kromojen uygulanması	26
3.5.9.Çekirdek boyası uygulanması	26
3.5.10. Dehidratasyon, şeffaflama ve kapama	27
3.6. Spesimenlerin Görüntülenmesi	27
3.7. İmmünohistokimya ile Boyanmanın Değerlendirilmesi	28
3.8. İstatistik Analiz	28
4.BULGULAR	30
4.1. Kanser ve Kontrol Grubunun Demografik Özellikleri	30
4.2. Hastaların CD133, CXCR1 ve CD163 İmmunohistokimya Görüntülerinin Histopatolojik Olarak Değerlendirilmesi	32
4.2.1. Kanser ve Kontrol Grubu Hastalarına Ait Meme Dokularında CD133 Ekspresyonu	33
4.2.2. Kanser ve Kontrol Grubu Hastalarına Ait Meme Dokularında CD163 Ekspresyonu	41

4.2.3. Kanser ve Kontrol Grubuna Ait Meme Dokularında CXCR1 Ekspresyonu	47
4.3. Kanser ve Kontrol Grubunun ER, PR,HER2 Durumları ve Ki67 indeksi	53
4.4. Hastaların CD133 Ekspresyonu Açısından Değerlendirilmesi	55
4.5. Hastaların M2 Makrofaj Dağılımı Açısından Değerlendirilmesi	58
4.6 Hastaların CXCR1 Ekspresyonu Açısından Değerlendirilmesi	61
4.7. Hastaların CD133 H-Skoru, M2/TM Oranı ve CXCR1 H-Skoru Değerlerinin Birbirleriyle İlişkisinin İncelenmesi	64
4.8. Hastaların ER Ekspresyon Durumlarının CD133, M2/TM Oranı ve CXCR1 Ekspresyon Durumlarıyla İlişkisinin İncelenmesi	66
4.9. Hastaların PR Ekspresyon Durumlarının CD133, M2/TM Oranı ve CXCR1 Ekspresyon Durumlarıyla İlişkisinin İncelenmesi	75
4.10. Hastaların HER2 Ekspresyon Durumlarının CD133, M2/TM Oranı ve CXCR1 Ekspresyon Durumlarıyla İlişkisinin İncelenmesi	84
4.11. Hastaların Ki67 indekslerinin CD133, M2/TM Oranı ve CXCR1 Ekspresyon Durumlarıyla İlişkisinin İncelenmesi	93
4.12. Lüминаl ve Lüминаl Olmayan Moleküler Alt Tipteki HastalarınCD133 Ekspresyon Durumu, M2/TM, M2/M1 Oranları ve CXCR1 Ekspresyon Durumları	102
4.13. Triple Negatif ve Triple Negatif Olmayan Moleküler Alt Tipteki Hastaların CD133 Ekspresyon Durumu, M2/TM, M2/M1 Oranları ve CXCR1 Ekspresyon Durumları	111
5.TARTIŞMA	119
5.1. Hastaların Demografik Özellikleri	119
5.2. Hastaların Histopatolojik Özelliklerinin Değerlendirilmesi	120
5.3. Hastaların ER, PR, HER2 Durumları ve Ki67 indeksleri	122
5.4. Hastaların CD133, CXCR1 Ekspresyon Durumları ve M2/TM, M2/M1 oranları	123

5.5. Hastaların CD133, CXCR1 Ekspresyon Durumları ve M2/TM Oranları Arası İlişkiler	126
5.6. Hastaların ER, PR, HER2 Durumları ve Ki67 indekslerinin CD133, CXCR1 Ekspresyon Durumu ve M2/MF-M2/M1 Oranlarıyla İlişkisi	127
5.7. Lüминаl ve Lüминаl Olmayan Hastaların CD133, CXCR1 Ekspresyon Durumu ve M2/MF-M2/M1 Oranları	130
5.8. TN ve TN Olmayan Hastaların CD133, CXCR1 Ekspresyon Durumu ve M2/MF-M2/M1 Oranları	132
6. SONUÇLAR	134
7. KAYNAKLAR	136
8. EKLER	
EK-1. Tez Çalışması ile İlgili Etik Kurul İzni	
9. ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER VE KISALTMALAR

ABC:	ATP bağlayan kaset (ABC)
ALDH:	Aldehit dehidrogenaz
AMPK:	Adenozin monofosfat ile aktive olan kinazı (AMPK)
ATRA:	All trans retinoik asit
Bcl-2:	B-cell lymphoma 2
Bcl-xl:	B-cell lymphoma-extra large
BMI-1:	B lenfoma Mo-MLV insersiyon bölgesi 1
BSA:	Bovin serum albümini
ÇADA:	Çeyrekler Arası Dağılım Aralığı
CCL:	Kemokin (C-C motif) ligand
CCR:	C-C kemokin reseptör
CD:	Cluster of differentiation
CK:	Sitokeratin
CSF-1:	Koloni stimüle edici faktör
CXCL:	Kemokin (C-X-C motif) ligand
CXCR1:	C-X-C kemokin reseptör tip 1
DAB:	Diaminobenzidin
ECM:	Ekstrasellüler matriks
EMAP-2:	Endotel monosit aktive edici polipeptit- 2
EMT:	Epitel-mezenşim geçişi
EpCAM:	Epithelial cell adhesion molecule
ER:	Östrojen reseptörü
FAK:	Fokal adezyon kinaz
FGF:	Fibroblast büyüme faktörü
FOXO:	Forkhead box O3
GRO-a:	Growth-regulated oncogene-a
HA:	Hyalüronik asit

HER2:	Human epidermal growth factor receptor-İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü
HER2AE:	HER2 aşırı eksprese eden
HGF:	Hepatosit büyüme faktörü
HIF:	Hipoksiyle indüklenen faktör
HRP:	Horseradish peroksidaz
IFN-γ:	İnterferon- γ
IL:	İnterlökin
iNOS:	İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
IRF:	İnterferon regülatör faktör
JAK/STAT:	Janus kinaz / Signal Transducer and Activator of Transcription
KLF-4:	Kruppel benzeri faktör 4
KNTRL:	Kontrol
LA:	Lüminal A
LB:	Lüminal B
LPS:	Lipopolisakkarit
MAPK:	Mitogen-activated protein kinases
MCP-1:	Monosit kemoatraktan protein
MDR1:	Multidrug resistance protein 1
MFG-E8:	Milk fat globül-EGF faktörü 8 proteini
MIF:	Migrasyon inhibitör faktör
mM:	milimolar
MMP:	Matriks metalloproteinazlar
MUC4:	Mucin 4
NA:	Nümerik açıklık
NAP-2:	Neutrophil activating peptide 2
NFYA:	Nuclear Transcription Factor Y Subunit Alpha
NF-κB:	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

NO:	Nitrik oksit
NOS:	Nitrik oksit sentaz
NOTCH2:	Notch homolog 2, translocation-associated
OCT4:	Oktamer-bağlayıcı transkripsiyon faktörü 4
PBS:	Phosphate-buffered saline
PCNX:	Pecanex homolog
PDGF:	Platelet kökenli büyüme faktörü
PI3K:	Fosfotidil inositol 3-kinase
PLC-β2:	Fosfolipaz C beta-2
PNG:	Portable Network Graphics
PPAR-γ:	Peroksizom proliferatör aktive reseptör-γ
PR:	Progesteron reseptörü
RBM15:	RNA Binding Motif Protein 15
SCID:	Severe combined immunodeficiency
SDF-1:	Stromal hücre kökenli faktör 1
Sema3a:	Semaphorin-3A
Shh:	Sonic hedgehog
SIRT-1:	Sirtuin 1
SNAIL:	Zinc finger protein SNAI1
ST3GAL3:	ST3 Beta-Galactoside Alpha-2,3-Sialyltransferase 3
TAM:	Tümörle ilişkili makrofajlar
TAM-RTK:	Tümörle ilişkili makrofaj-reseptör tirozin kinaz
TBS:	Tris-buffered saline
TCF3:	Transcription factor 3
TGF-β1:	Transforming growth factor beta 1
TIM-3:	T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing 3
TLR:	Toll benzeri reseptör
TM:	Tüm makrofaj popülasyonu

TN:	Triple negatif
TNF-α:	Tümör nekroz faktörü- α
TPRXL:	Tetrapeptide repeat homeobox like
TWIST:	Twist-related protein
VEGF:	Vasküler endotelyal büyüme faktörü
ZEB1:	Zinc finger E-box-binding homeobox 1



ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
4.1. Kanser ve kontrol grubu hasta yaşlarına ilişkin kutu çizgi grafiği	31
4.2. LA grubu hastalarda CD133 ekspresyonu	34
4.3. LB grubu hastalarda CD133 ekspresyonu	35
4.4. ER2AE grubu hastalarda CD133 ekspresyonu.	36
4.5. TN grubu hastalarda CD133 ekspresyonu	38
4.6. Kontrol grubu hastalarda CD133 ekspresyonu	39
4.7. Pozitif ve negatif kontrol gruplarında CD133 ekspresyonu	40
4.8. LA grubu hastalarda CD163 ekspresyonu	41
4.9. LB grubu hastalarda CD163 ekspresyonu	42
4.10. HER2AE grubu hastalarda CD163 ekspresyonu.	43
4.11. TN grubu hastalarda CD163 ekspresyonu.	44
4.12. Kontrol grubu hastalarında CD163 ekspresyonu	45
4.13. Pozitif ve negatif kontrol gruplarında CD163 ekspresyonu.	46
4.14. LA grubu hastalarda CXCR1 ekspresyonu	47
4.15. LB grubu hastalarda CXCR1 ekspresyonu	48
4.16. HER2AE grubu hastalarda CXCR1 ekspresyonu.	49
4.17. TN grubu hastalarda CXCR1 ekspresyonu	50
4.18. Kontrol grubu hastalarında CXCR1 ekspresyonu	51
4.19. Pozitif ve negatif kontrol gruplarında CXCR1 ekspresyonu	52
4.20. Hastaların CD133 H-skoru değerleri için kutu çizgi grafiği	56
4.21. CD133 antijeni ekspresyonu yüzde değerleri için kutu çizgi grafiği	58
4.22. Hastaların M2/TM oranlarına ilişkin kutu çizgi grafiği	59
4.23. Hastaların M2/M1 oranlarına ilişkin kutu çizgi grafiği	61
4.24. CXCR1 antijeni için H-skoru değerlerine ilişkin kutu çizgi grafiği	63
4.25. CXCR1 antijeni ekspresyonu yüzde değerleri için kutu çizgi grafiği	64

4.26.	Hastaların ER durumlarının CD133 H-Skoru ile ilişkisini gösteren kutu çizgi grafiği	68
4.27.	Hastaların ER durumlarının CD133 ekspresyon yüzdesi ile ilişkisini gösteren kutu çizgi grafiği	69
4.28.	Hastaların ER durumlarının M2/TM oranı ile ilişkisini gösteren kutu çizgi grafiği	71
4.29.	Hastaların ER durumlarının M2/M1 oranı ile ilişkisini gösteren kutu çizgi grafiği	72
4.30.	Hastaların ER durumlarının CXCR1 H-Skoru ile ilişkisini gösteren kutu çizgi grafiği	74
4.31.	Hastaların ER durumlarının CXCR1 ekspresyon yüzdesi ile ilişkisini gösteren kutu çizgi grafiği	76
4.32.	Hastaların PR durumlarının CD133 H-Skoru ile ilişkisini gösteren kutu çizgi grafiği	77
4.33.	Hastaların PR durumlarının CD133 ekspresyon yüzdesi ile ilişkisini gösteren kutu çizgi grafiği	78
4.34.	Hastaların PR durumlarının M2/TM oranı ile ilişkisini gösteren kutu çizgi grafiği	80
4.35.	Hastaların PR durumlarının M2/TM oranı ile ilişkisini gösteren kutu çizgi grafiği	81
4.36.	Hastaların PR durumlarının CXCR1 H-Skor değeriyle ilişkisini gösteren kutu çizgi grafiği	83
4.37.	Hastaların PR durumlarının CXCR1 ekspresyon yüzdesi ile ilişkisini gösteren kutu çizgi grafiği	84
4.38.	Hastaların HER2 durumlarının CD133 H-Skoru ile ilişkisini gösteren kutu çizgi grafiği	86
4.39.	Hastaların HER2 durumlarının CD133 ekspresyon yüzdesi ile ilişkisini gösteren kutu çizgi grafiği	87

4.40.	Hastaların HER2 durumlarının M2/TM oranı ile ilişkisini gösteren kutu çizgi grafiği	89
4.41.	Hastaların HER2 durumlarının M2/M1 oranı ile ilişkisini gösteren kutu çizgi grafiği	91
4.42.	Hastaların HER2 durumlarının CXCR1 H-Skoru ile ilişkisini gösteren kutu çizgi grafiği	92
4.43.	Hastaların HER2 durumlarının CXCR1 ekspresyon yüzdesi ile ilişkisini gösteren kutu çizgi grafiği	93
4.44.	Hastaların Ki67 indekslerinin CD133 H-Skoru ile ilişkisini gösteren kutu çizgi grafiği	95
4.45.	Hastaların Ki67 indekslerinin CD133 ekspresyon yüzdesi ile ilişkisini gösteren kutu çizgi grafiği	96
4.46.	Hastaların Ki67 indekslerinin M2/TM oranı ile ilişkisini gösteren kutu çizgi grafiği	98
4.47.	Hastaların Ki67 indekslerinin M2/M1 oranı ile ilişkisini gösteren kutu çizgi grafiği	99
4.48.	Hastaların Ki67 indekslerinin CXCR1 H-Skoru ile ilişkisini gösteren kutu çizgi grafiği	101
4.49.	Hastaların Ki67 indekslerinin CXCR1 ekspresyon yüzdesi ile ilişkisini gösteren kutu çizgi grafiği	102
4.50.	Lüminal alt tip, lüminal olmayan alt tip ve kontrol grubu CD133 H-Skorları için kutu çizgi grafiği	105
4.51.	Lüminal alt tip, lüminal olmayan alt tip ve kontrol grubu CD133 ekspresyon yüzdeleri için kutu çizgi grafiği	105
4.52.	Lüminal alt tip, lüminal olmayan alt tip ve kontrol grubu M2/TM oranları için kutu çizgi grafiği	107
4.53.	Lüminal alt tip, lüminal olmayan alt tip ve kontrol grubu M2/M1 oranları yüzdeleri için kutu çizgi grafiği	107

4.54.	Lüminal alt tip, lüminal olmayan alt tip ve kontrol grubu CXCR1 H-Skorları i çin kutu çizgi grafiği	110
4.55.	Lüminal alt tip, lüminal olmayan alt tip ve kontrol grubu CXCR1 ekspresyon yüzdeleri için kutu çizgi grafiği	110
4.56.	TN alt tip, TN olmayan alt tip ve kontrol grubu CD133 H-Skorları için kutu çizgi grafiği	113
4.57.	TN alt tip, TN olmayan alt tip ve kontrol grubu CD133 ekspresyon yüzdesi için kutu çizgi grafiği	113
4.58.	TN alt tip, TN olmayan alt tip ve kontrol grubu M2/TM oranları için kutu çizgi grafiği	115
4.59.	TN alt tip, TN olmayan alt tip ve kontrol grubu M2/M1 oranları için kutu çizgi grafiği	116
4.60.	TN alt tip, TN olmayan alt tip ve kontrol grubu CXCR1 H-Skorları için kutu çizgi grafiği	118
4.61.	TN alt tip, TN olmayan alt tip ve kontrol grubu CXCR1 ekspresyon yüzdesi için kutu çizgi grafiği	118

TABLolar

Tablo	Sayfa
4.1. Kanser ve kontrol grubu hasta sayıları ve yüzde dağılımları	30
4.2. Kanser ve kontrol grubu hasta yaşlarına ilişkin parametreler	31
4.3. Kanser ve Kontrol Grubu Hasta Cinsiyet Dağılımı	32
4.4. Hastaların ER ekspresyon durumları	53
4.5. Hastaların PR ekspresyon durumları	54
4.6. Hastaların HER2 ekspresyon durumları	54
4.7. Hastaların Ki67 indeksleri	55
4.8. CD133 antijeni için H-skoru değerleri	56
4.9. CD133 antijeni ekspresyonu yüzde değerleri	57
4.10. Hastaların M2/TM oranlarına ilişkin tablo	59
4.11. Hastaların M2/M1 oranlarına ilişkin tablo	60
4.12. CXCR1 antijeni için H-skoru değerlerine ilişkin tablo	62
4.13. CXCR1 antijeni ekspresyonu yüzde değerleri	63
4.14. Hastaların CD133 H-Skoru, M2/TM oranı ve CXCR1 H-Skoru değerlerinin birbirleriyle ilişkisinin incelenmesi	65
4.15. Hastaların CD133 ekspresyon yüzdesi, M2/TM oranı ve CXCR1 ekspresyon yüzdesi değerlerinin birbirleriyle ilişkisinin incelenmesi	66
4.16. Hastaların ER durumlarının CD133 H-Skoru ve CD133 ekspresyon yüzdesi ile ilişkisi	67
4.17. Hastaların ER durumlarının M2/TM oranı ve M2/M1 oranı ile ilişkisi	70
4.18. Hastaların ER durumlarının CXCR1 H-Skoru ve CXCR1 ekspresyonu ile ilişkisi	73
4.19. Hastaların PR durumlarının CD133 H-Skoru ile ilişkisi	76
4.20. Hastaların PR durumlarının M2/TM oranı ve M2/M1 oranı ile ilişkisi	79
4.21. Hastaların PR durumlarının CXCR1 H-Skoru ve CXCR1 ekspresyon yüzdesi ile ilişkisi	82

4.22.	Hastaların HER2 durumlarının CD133 H-Skoru ve CD133 ekspresyon yüzdesi ile ilişkisi	85
4.23.	Hastaların HER2 durumlarının M2/TM oranı ile ilişkisi	88
4.24.	Hastaların HER2 durumlarının CXCR1 ekspresyon durumu ile ilişkisi	91
4.25.	Hastaların Ki67 indekslerinin CD133 H-Skoru ile ilişkisi	94
4.26.	Hastaların Ki67 indekslerinin M2/TM oranı ve M2/M1 oranı ile ilişkisi	97
4.27.	Hastaların Ki67 indekslerinin CXCR1 H-Skoru ile ilişkisi	100
4.28.	Lüminal alt tip, lüminal olmayan alt tip ve kontrol grubu CD133 H-Skoru ve CD133 ekspresyon yüzdesi	104
4.29.	Lüminal alt tip, lüminal olmayan alt tip ve kontrol grubu M2/TM ve M2/M1 oranları	106
4.30.	Lüminal alt tip, lüminal olmayan alt tip ve kontrol grubu CXCR1 H-Skoru ve CXCR1 ekspresyon yüzdesi	109
4.31.	TN alt tip, TN olmayan alt tip ve kontrol grubu CD133 H-Skoru ve CD133 ekspresyon yüzdesi	112
4.32.	TN alt tip, TN olmayan alt tip ve kontrol grubu M2/TM ve M2/M1 oranları	114
4.33.	TN alt tip, TN olmayan alt tip ve kontrol grubu CXCR1 H-Skoru ve CXCR1 ekspresyon yüzdesi	117

1.GİRİŞ

Meme kanseri, tanı-tedavideki gelişmelere ve tarama programlarının yaygınlaşmasına rağmen, tüm dünyada kadınlarda en sık görülen ve en çok ölüme neden olan kanserdir (1,2). Meme kanseri gelişmiş ülkelerde akciğer kanserinden sonra kansere bağlı ölümlerin en sık 2.nedenidir (3,4). Meme kanseri Türkiye’de kadınlarda en sık görülen kanserdir. Türkiye’de her yıl 17.351 hastaya meme kanseri tanısı konmaktadır. Türkiye’de meme kanserine bağlı *mortalite* oranı 100.000 kişide 52,5'tir (5,6). Amerikan Ulusal Kanser Enstitüsü (*National Cancer Institute*) verilerine göre,2009-2013 yılları arasında her yıl ABD’deki 100.000 kadından 125’ine meme kanseri tanısı konmakta, 100.000 kadının 21,5'i ise meme kanserinden dolayı ölmektedir. 2010-2012 verilerine göre, kadınların yaşamları süresince meme kanseri tanısı alma oranı %12,3'tür (7).

Meme kanserinin, hastanın klinik seyri ve tedaviye cevabını belirleyen farklı moleküler alt tipleri vardır. Moleküler alt tipler için yapılan farklı sınıflamalar arasında, reseptör ekspresyonuna göre: 1. Lüminal A, 2.Lüminal B, 3.HER2 aşırı eksprese eden 4.Triple negatif (ya da sitokeratin (CK) 5/6, CK14 ve CK17'nin eksprese olduğu durumda bazal benzeri) moleküler alt tipleri bulunur. Meme kanserinin farklı moleküler alt tipleri, prognoz, tedavi şekli ve ilaç direnci açısından farklılıklar göstermektedir (8,9,10).

2003 yılında Al Hajj ve arkadaşları, meme kanserinin invazyon, metastaz ve ilaç direnci gibi özelliklerini belirleyen meme kanseri kök hücrelerini tanımlamıştır(11).Meme kanseri kök hücreleri literatürde en sık CD44⁺/CD24⁻/düşük ya da ALDH1⁺ fenotiplerine sahiptir (12). Bu fenotiplere ek olarak; meme kanseri kök hücreleri, CD133, CD49f gibi yüzey işaretçileriyle de tanımlanmıştır (13).

Tümörle ilişkili makrofajlar, birçok tümör tipinde bulunan ve tümör kitlesinin %50’ye kadarını oluşturabilen hücrelerdir (14). Tümörle ilişkili makrofajlar için tanımlanan iki işaretçi: CD68 ve CD163’tür. CD68 tüm makrofajlar için tanımlanmış bir işaretçidir. CD 163, M2 fenotipinde olan tümör oluşumunu destekleyen makrofajlar için bir işaretçidir (15).

Meme kanseri kök hücreleri, tümör mikroçevresinde bulunan tümörle ilişkili makrofajlar ile sitokinler aracılığıyla karşılıklı etkileşim halindedir:

1.Tümörle ilişkili makrofajlardan salgılanan interlökin 6 ve milkfat globülin E8 (MFG-E8), meme kanseri kök hücrelerinde bulunan interlökin 6 reseptörü ve integrin $\alpha\beta 3$ ve integrin $\alpha\beta 5$ reseptörleriyle kanser kök hücreleri üzerinde etkilidir (16).

2.Kanser hücrelerinde salgılanan interlökin 13, tümörle ilişkili makrofajlar üzerinde bulunan interlökin 13 reseptörüne bağlanarak tümörle ilişkili makrofajlar üzerinde etki gösterir (17).

3. Tümör hücreleri, mezenkimal hücreler ve makrofajlardan salgılanan interlökin-8, kanser hücrelerindeki CXCR1 ve CXCR2 reseptörleri üzerinden etki göstererek, kanser hücrelerinin kök hücre özelliği kazanmasını sağlar ve kemoterapiye direncini artırır (18).

Kanser kök hücresi işaretçisi CD133'ün meme kanserinin moleküler alt tiplerindeki dağılımı, hastalardan elde edilen dokularda daha önce gösterilmemiştir. İnterlökin 8 reseptörü CXCR1'in meme kanserinin moleküler alt tiplerindeki dağılımı geçmiş çalışmalarla ortaya konamamıştır. Tümörle ilişkili makrofaj işaretçisi CD163'ün meme kanserinin moleküler alt tiplerindeki dağılımı tam olarak gösterilememiştir. Bu üç işaretçinin meme kanserinin moleküler alt tiplerindeki dağılımının ortaya konması, meme kanserinin farklı moleküler alt tiplerinde hedefe yönelik tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesi ve meme kanseri patogenezinin anlaşılması için yol gösterici olabilir.

Çalışmanın esas araştırma sorusu, LA, LB, HER2AE, TN ve kontrol grupları arasında; CD133, CXCR1 antijenlerinin ekspresyonu ve M2 makrofajlarının dağılımı açısından anlamlı fark olup olmadığıdır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser Kök Hücreleri

Tümörler, fenotipik olarak farklı özellikler gösteren tümör hücrelerinden oluşmaktadır ve bu nedenle heterojen yapılardır. Tümör yapısında, neoplastik hücreler, damar yapıları, bağışıklık sistemi hücreleri ve stromal elemanlar bulunmaktadır (19,20).

Kanser kök hücreleri, tümör oluşturma kapasitesi yüksek olan tümör hücreleridir (12). Kanser kök hücreleri, bölünme, kendini yenileme ve farklanma kapasitesi gibi normal erişkin kök hücrelere benzer özellikler gösterir (21). Kanser kök hücrelerinin asimetric bölünmeleri sonucu, bir kök hücre ve bir progenitör hücre oluşur. Asimetric bölünme sayesinde, kanser kök hücreleri kendilerini yenilenmiş ve fenotipik olarak farklı özellikler kazanacak kanser hücreleri için progenitör hücre oluşturmuş olur. Progenitör tümör hücreleri hızla çoğalma yeteneğine sahiptir (22). Kanser kök hücreleri, tümörün klinik fenotipinin belirlenmesinde önemli rol oynar. Beyin, meme, akciğer, prostat, pankreas, baş-boyun, kolon, over ve hematopoietik sistem kanserlerinde kanser kök hücrelerinin varlığı gösterilmiştir (23).

2003 yılında Al-Hajj ve arkadaşları (24) meme kanseri kök hücrelerini keşfetmiştir. Al-Hajj ve arkadaşları, insan meme tümörlerinde, CD44⁺CD24^{-/düşük}/Lineage⁻ fenotipinde yüksek derecede tümörjenik olan hücre popülasyonu tespit etmiştir. Fare ksenograft modelleriyle araştırmacılar, kanser kök hücrelerinin diğer tümör hücrelerine göre çok daha tümörjenik olduğunu göstermiştir (25).

CD44⁺/CD24^{-/düşük} hücrelerde, kök hücre fenotipiyle ilişkili Oct-4 ve Nanog ekspresyonu ve Sonic Hedgehog sinyal yolağı aktivitesi artmıştır. Oct-4, bir kök hücre işaretleyicisidir ve pluripotensle ilişkilendirilmiştir (26,27). *Sonic Hedgehog* sinyal yolağı, kök hücrelerin kendini yenileme özelliği ile ilişkilendirilmiştir (27). ALDH⁺ (ALDH eksprese eden) hücrelerde, kök hücreyle ilişkili *Tetrapeptide repeat homeobox like* (TPRXL), *Notch homolog 2, translocation-associated* (NOTCH2), *RNA Binding Motif Protein 15* (RBM15), ST3 Beta-Galactoside Alpha-2,3-Sialyltransferase 3 (ST3GAL3),

Nuclear Transcription Factor Y Subunit Alpha (NFYA) , *Pecanex homolog (PCNX)* genleri *upregüle* olmuştur (28).

2.1.1. Meme Kanseri Kök Hücrelerinin Kökeni

Kanser kök hücrelerinin kökenine yönelik öne sürülen hipotezlerden biri, kanser kök hücrelerinin normal kök hücrelerden köken aldığını savunmaktadır (29). Normal kök hücrelerin kendini yenileyebilme ve farklanma yollarındaki *deregülasyon* ile kendini yenileme ve farklanma kapasitesi olan kanser hücrelerinin oluşması söz konusudur (21). Normal kök hücre ve kanser kök hücreleri arası benzerlikler, normal kök hücrelerin ömrünün uzun olmasına bağlı mutasyona ve onkojenik *transformasyona* yatkın olmaları ve meme kanseri kök hücreleriyle bazal meme kök hücreleri/progenitör hücreleri yüzey işaretleyici özelliklerinin benzer olması bu hipotezi desteklemektedir (30,31).

Kanser kök hücrelerinin, normal hücrelerin epitel-mezenşim geçişine (EMT) uğraması yoluyla da geliştiğini öne süren hipotezler ortaya konmuştur. EMT'ye uğrayan hücreler, transformasyona yatkın, normal ve neoplastik kök hücrelere benzer karakterde hücrelerdir. Normal meme ve meme karsinom dokusundan elde edilen CD44⁺/CD24^{-düşük} hücreler, EMT ilişkili genleri eksprese etmektedir (32,33). Meme kanseri kök hücrelerinde EMT'yi indükleyen çeşitli büyüme faktörleri, tirozin kinazlar ve transkripsiyon faktörleri bulunmaktadır. *Mitogen-activated protein kinases* (MAPK) ile ilişkili Ras onkojeni, insan meme epiteli hücrelerini EMT için *sensitize* etmektedir (34). c-Myc, tümör hücrelerindeki bazal E-kadherin ekspresyonunu azaltır (35). *Transforming growth factor beta 1* (TGF- β 1) sinyal yolağı indüklenmiş EMT, meme kanseri hücrelerinin lenfatik migrasyonunu artırmaktadır (36). Wnt, β -katenin ilişkili kanonik ve β -katenin ilişkili olmayan kanonik olmayan Wnt (*nonkanonik*) yolları ve TGF- β sinyal yolağı üzerinde otokrin sinyal ile normal ve neoplastik insan meme epiteli hücrelerinde EMT'yi indükler, hücrelerin mezenkimal/kanser kök hücresi olma durumlarını korur (37,38,39). Notch sinyal yolağı, EMT'yi ve invazyonu Slug aracılı olarak regüle eder (40). *Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells* (NF- κ B) , TGF- β 'den

bağımsız olarak EMT'nin indüksiyonu ve idamesinde rol oynar (41). EGF, vimentin ekspresyonunu artırır ve EMT'yi indükler (42). Hipoksiyle indüklenen faktör (HIF), E-kadherin downregülasyonu ve vimentin upregülasyonu yaparak *zincfinger protein SNAI1* (SNAIL), zincfinger E-box-binding homeobox 1 (ZEB1), Twist-related protein (TWIST) ve *Transcription factor 3* (TCF3) aracılı EMT'yi indükler (43).

2.1.2.Meme Kanseri Kök Hücre İşaretçileri

CD44 ekspresyonu, meme kanseri kök hücreleri için işaretçi (*marker*) olarak tanımlanmıştır. Hücre *adezyon* moleküllerinden biri olan CD44, hücre-hücre, hücre-ECM arasındaki ilişkileri düzenlemektedir. CD44'ün ekstrasellüler ligandları; kollajen, laminin, fibronektin ve hyalüronik asittir. CD44, intrasellüler tarafta Rho-GTPaz, Ras-MAPK, *Fosfotidilinositol 3-kinase* (PI3K)/Akt hücre içi sinyal yollarını aktive eder. Ekstrasellüler ortamdaki hyalüronan CD44'ün sinyal yollarıyla ilişkili aktivitesini regüle etmektedir (44,45).

CD24 negatifliği, kök hücre fenotipi ile ilişkili olarak bulunmuştur. CD24, hücre-hücre ve hücre-ECM ilişkilerinde görev alan, küçük bir hücre yüzey molekülüdür. Hematopoietik hücrelerde eksprese olur ve nöronlar için işaretleyicidir. Meme, över, prostat, mesane, böbrek ve akciğer kanserlerinde aşırı ekspresyonu saptanmıştır. CD24 aşırı ekspresyonu farklı kanser tiplerinde hücre adezyonu ve metastazla ilişkili olarak bulunmuştur (45).

Yanyuan Wu ve arkadaşlarının (46), 2013 yılında yaptığı çalışmada, CD44⁺CD24⁻ meme kanseri kök hücrelerinin, Lüminal A moleküler alt tipinde %27,0; , Lüminal B moleküler alt tipinde %10,8; , HER2 aşırı eksprese eden moleküler alt tipte %8,1 ve *triple* negatif moleküler alt tipte %54,1 sıklıkta eksprese olduğu gösterilmiştir.

ALDH (aldehit dehidrogenaz) aktivitesi de meme kanseri kök hücrelerini ve normal meme kök hücrelerini ayırmada kullanılabilir (24,78). İnsan meme kanseri örneklerinde ALDH ekspresyonu, yüksek tümör *grade'i*, metastaz varlığı, ileri kanser evresi, düşük hayatta kalma oranı ile ilişkilendirilmiştir. ALDH1A3, meme kanseri kök

hücrelerinde ALDH aktivitesinden sorumludur. ALDH1A3 ekspresyonu *prognostik marker* olarak kullanılabilir (78). Bane ve arkadaşları (47) ALDH1+ fenotipteki meme kanseri kök hücrelerinin, Lüminal moleküler alt tipte %42,4; HER2 aşırı eksprese eden moleküler alt tipte %9,1 ve triple negatif moleküler alt tipte %48,5 sıklıkta eksprese olduğunu göstermiştir. CD49f, ekstrasellüler matriksteki laminin molekülünün reseptörü olan $\alpha 6$ -integrin alt birimidir. Integrin $\alpha 6$ alt birimi, integrin $\beta 1$ ya da integrin $\beta 4$ alt birimleriyle eşleşebilir. Integrin $\alpha 6\beta 4$ sinyal yolağı çeşitli kanserlerde invazyon ve metastazla ilişkilendirilmiştir (48). CD10, membran metalloendopeptidaz sınıfından bir enzimdir ve miyoepitelyal işaretleyici özelliğindedir. CD10, meme dokusu kök hücreleri için işaretleyicidir (49). Deneysel modelde CD10⁺ hücrelerin kanser hücrelerine dönüştürülmesi, meme kanserine neden olmaktadır (50). Epithelial cell adhesion molecule (EpCAM), Ca^{++} bağımlı homofilik hücre adezyon molekülüdür. Epitel hücrelerinin bazolateral yüzeylerinde eksprese olmaktadır. CD44⁺/CD24⁻/EpCAM⁺ fenotipindeki hücreler meme ve CD44⁺/EpCAM^{yüksek} fenotipindeki hücreler meme kolon kanseri kök hücreleri için marker özelliği taşır (51,52).

CD133 olarak da adlandırılan Prominin-1, en sık kullanılan kanser kök hücresi yüzey işaretleyicilerinden biridir. CD133, hücrelerin mikrovillus gibi uzantılarında ve bazı epitel hücrelerinin apikalinde bulunan, *pentaspanin* transmembran glikoproteindir. CD133, ilk olarak hematopoetik kök hücre ve *progenitörler* için işaretleyici olarak tanımlanmıştır. Son yıllarda kolon, karaciğer, beyin, akciğer, prostat ve meme kanseri kök hücreleri için işaretleyici olarak kullanılmaktadır. Kanser kök hücrelerinin tümünde CD44⁺/CD24⁻ fenotipi görülmediği için, CD44 ve CD24 evrensel meme kanseri kök hücre *markerı* özelliği taşımaz. Bu nedenle CD133, meme kanseri kök hücrelerinin belirlenmesinde önem taşır. CD133, meme kanserinde tümörün oluşumunun başlaması, hücre migrasyonu ve damara benzer yapıların oluşumu (*vasculogenic mimicry*) ile ilişkilendirilmiştir (53,54,55,56).

CD133 ekspresyon durumuna yönelik 14 hastanın kan dolaşımından elde edilen tümör hücrelerinde yapılan çalışmada, Lüminal moleküler alt tipteki hastaların

%90,9'unda ve triple negatif moleküler alt tipteki hastaların %50'sinde CD133 ekspresyonu gözlenirken, HER2 aşırı eksprese eden moleküler alt tipteki hastaların hiçbirinde CD133 ekspresyonu görülmemiştir (57). CD133 ekspresyonu; PR negatifliği, HER2 ekspresyonu, triple negatif moleküler alt tip ile ilişkili bulunmuştur (56). Ancak kanser kök hücresi işaretçisi CD133'ün meme kanserinin moleküler alt tiplerindeki dağılımı, hastalardan elde edilen dokularda daha önce gösterilmemiştir.

Meme kanseri kök hücre işaretleyicileri kötü prognozla ilişkilendirilmiştir. Ancak meme kanseri kök hücresi olmayan hücreler de metastaz oluşturabilir ya da invazif fenotipe sahip olabilir.

2.1.3.Meme Kanseri Kök Hücrelerinin Özellikleri

Meme kanseri kök hücrelerinin; kendini yenileme, farklanma, tedaviye direnç, metastaz oluşturma ve mammosfer oluşturma özellikleri bulunmaktadır. Meme kanseri kök hücrelerinin kendilerini yenilemelerinde, Notch, Hedgehog ve Wnt gibi sinyal yolları, rol oynar (58,59). Notch sinyal yolağı, Siklin D3 aracılı proliferasyonu ve kendini yenilemeyi indüklemektedir (58). *B-cell lymphoma 2/ B-cell lymphoma-extra large* (Bcl2/Bcl-xl) aracılı olarak apoptozu düzenler, *B lenfoma Mo-MLV insersiyon bölgesi 1 homolog* (BMI-1) aracılı olarak kök hücre özelliklerinin korunmasında etkilidir (59,60). Meme kanseri kök hücrelerinde *Sonic hedgehog* (Shh) sinyal yolağı, BMI1 aracılı kendini yenileme ve oktamer-bağlayıcı transkripsiyon faktörü 4 (OCT4), Nestin ve Nanog upregülasyonu ile ilişkilendirilmiştir (61). Notch, Hedgehog ve Wnt sinyal yolları, invazyon, migrasyon, motilite ve tedaviye direnç ile de ilişkilendirilmiştir (59).

Meme kanseri kök hücreleri, in vivo ve kültür ortamında kök hücre olmayan meme kanseri hücrelerine farklanabilir. Aynı zamanda, farklanmış meme kanseri hücreleri kök hücrelere yeniden dönüşebilmektedir. Bu iki hücre tipi arasında, otokrin sinyal iletimi ve mikroçevre tarafından kontrol edilen dinamik plastisite vardır (62,63,64). İnterlökin-6 (IL-6) kök hücre olmayan meme kanseri hücrelerinden, meme kanseri kök hücrelerinin oluşumunu sağlar (65).

Meme kanseri kök hücreleri, kemo ve radyoterapiye direnç gösterir (66). Neoadjuvan kemoterapi, kök hücre olmayan meme kanseri hücrelerini öldürerek, CD44⁺/CD24⁻/_{düşük} hücre fraksiyonunu artırmaktadır (67). Neoadjuvan kemoterapi ajanları in vitro mammosfer oluşumunu artırır. Bu şekilde kemoterapinin meme kanseri kök hücreleri üzerinde yeterince etkili olmadığı gösterilmiştir (68). Paklitaksel ve epirubisin, meme tümöründe ALDH eksprese eden hücre sayısını artırmıştır (69). Meme kanseri kök hücrelerindeki ilaç direnci, Notch, Wnt, Hedgehog ve HER-2 gibi kendini yenilemeye ilişkin yollardaki değişikliklerle ilişkilidir. Notch-1 aşırı ekspresyonu, meme kanseri kök hücrelerinin kemoterapi ve radyoterapiye direnci ile ilişkilendirilmiştir (66,70,71). Kemoterapi alan hastaların plevral metastazlarında CD44⁺/CD24⁻/_{düşük} hücre popülasyonu yüksek olarak bulunmuştur. Kanser kök hücrelerinin kemoterapiye direnç özelliği ile metastaz arasında ilişki saptanmıştır (72). Diğer taraftan, tedaviye direnç, meme kanseri kök hücrelerinin mutlak özelliği değildir. Zielske ve arkadaşları(73), iki hastadan elde edilen ksenograftlardaki meme kanseri kök hücre popülasyonunun radyoterapiyle yok edildiğini göstermiştir. Tedaviye direnç, meme kanseri kök hücrelerinin intrinsik özelliği değildir, tümörün moleküler fenotipinin önem taşır. Kanser kök hücrelerinin kemoterapiye karşı direncinde, ATP bağlayan kaset (ABC) taşıyıcılarının aşırı ekspresyonu da rol oynamaktadır. ABC, ilaçların hücre dışına atılmasında görev alır(74).

Meme kanseri kök hücrelerinin tedaviye direnç yanında hastalığın nüksetmesinde de rolü vardır. Tedaviden sonra direnç özellikleriyle sağ kalan meme kanseri kök hücreleri, dirençlerini yavru hücrelerine aktarırlar. Bu nedenle, zamanla daha agresif bir tümörün evrimine neden olurlar (75,76).

Kanser kök hücresi hipotezine göre sadece kanser kök hücreleri, tümör büyümesini başlatır ve idame ettirir. Bu nedenle, metastazdan da kanser kök hücreleri sorumlu tutulmuştur. Meme kanseri kök hücreleri, hücre *motilitesi* ve *invazyonu* ile metastazı artıran genleri aşırı eksprese eder (77). NOD/SCID(*Severe combined immunodeficiency*) farelere *intrakardiyak* ALDH⁺ hücreler enjekte edildiğinde çoklu

metastazlar oluşur. Bu metastazlardaki hücreler heterojen niteliktedir (78). Meme tümör örneklerinden elde edilen $CD44^+/CD24^{-}/düşük$ hücreler içeren meme yağ dokusunun farelere implantasyonu, spontan akciğer metastazı oluşturur (79). Primer tümörlerde yüksek oranda $CD44^+/CD24^{-}/düşük$ hücrelerin bulunduğu uzak metastaz (özellikle osseöz metastazlar) görülme sıklığı artmıştır (80). Araştırmacılar, meme kanseri kök hücrelerinin metastatik özelliklere sahip alt gruplara sahip olduğunu ve metastatik meme kanseri kök hücrelerinin spesifik fenotipik özelliklere sahip olduğunu öne sürmektedir (81).

Hem $CD44^+/CD24^{-}/düşük$ hem de $ALDH^+$ fenotipindeki meme kanseri kök hücreleri, normal meme kök hücre veya progenitör hücreleri gibi kültürde yüzer sferik koloniler (mammosfer) oluşturabilir. Bu mammosfer hücreleri, *Severe combined immunodeficiency* (SCID) farelerde tümör oluşturabilir (82,83).

Meme kanseri kök hücre popülasyonu farklı tümörijenik, metastatik veya ilaç direnci özellikleri taşıyan farklı alt popülasyonlara ayrılabilir (84). Kanser hücrelerinin kök hücre özellikleri farklı mikroçevrelere bağlı olarak değişmektedir (85). Bu nedenle kanser kök hücresi mikroçevresinin anlaşılmasında *in vitro* modeller yetersiz kalmaktadır.

Meme kanseri kök hücreleri, hedefe yönelik kanser tedavileri için yeni bir hedef oluşturmaktadır. Meme kanseri kök hücrelerine karşı geliştirilecek yeni tedaviler için olası hedefler: Yüzey işaretleyicileri, taşıyıcı proteinler, intrasellüler sinyal yolları ve meme kanseri kök hücre mikroçevresidir (86).

Meme kanseri mikroçevresi üzerine etkili olan ilaçlardan biri olan anti-inflamatuar özellikteki Repertaksin, IL-8 reseptörü CXCR1 antagonistidir. Repertaksin, mikroçevre sinyallerini bozar, meme kanseri kök hücre popülasyonunu ve metastazı azaltır, tümör popülasyonunda apoptozu tetikler (87).

Antidiyabetik olan metformin, $CD44^+/CD24^{-}/düşük$ hücre popülasyonu ve mammosfer oluşumunu azaltır. Metformin, kemoterapi ile kombine edildiğinde etkinliği artar, tümör kitlesinin azalması ve relaps önlenmesini sağlar. Metformin, AMP

(Adenozin monofosfat) ile aktive olan kinazı (AMPK) aktive ederken, AsetilKoA karboksilazı inhibe etmektedir. Bu şekilde yağ asidi sentezi ve sinyal yollarıyla ilişkili lipid raft oluşumu üzerinden etki gösterir (88,89).

2.2. Meme Kanseri Kök Hücresi Mikroçevresi

Meme kanseri kök hücrelerinin tümör oluşturma kapasitesi (*tümörijenite*), kanser hücrelerinin özelliklerine ve kanser kök hücrelerinin bulunduğu mikroçevreye(niş) bağlıdır (90). Kanser kök hücreleri spesifik bir nişe ihtiyaç duyar. Bu nişin görevleri, adezyon molekülleriyle bağlanma bölgesi oluşturma ve ekstrinsik faktörlerle kanser kök hücrelerini destekleme olarak sıralanabilir (91).

Meme kanseri kök hücre nişi, hem primer tümörler hem de metastatik lezyonlarda bulunur. Metastatik bölgelerdeki kanser kök hücrelerinin hayatta kalması, proliferasyonu ve farklanması, nişten kaynaklanan sinyallere bağlıdır (92). Kanser hücreleri, ekstrasellüler matriks (ECM) bileşenleri, mezenkimal kök hücreler, stromal fibroblastlar, immun sistemden kaynaklanan infiltratif hücreler ve endotel gibi hücrelerden kaynaklanan sinyallerin tümü, regülasyon kaybına uğramış (*disregüle*) sinyalleri içeren mikroçevreyi oluşturur (93,94).

2.2.1. Meme Kanseri Kök Hücresi Mikroçevresinde Bulunan Hücreler

Meme kanseri kök hücresi mikroçevresinde bulunan mezenkimal kök hücreler, dolaşımdan gelir ya da normal stromal dokudan köken alır. Mezenkimal kök hücreler, hem primer tümör hem de metastatik bölgelerde sinyal üreterek metastatik potansiyali artırır (95,96,97). Mezenkimal kök hücreler, meme kanseri hücrelerinin migrasyon, invazyon ve metastazını artıran *Kemokin (C-X-C motif) ligand 12 (CXCL12)*, *İnterlökin-6 (IL-6)*, *IL-8*, *Kemokin (C-C motif) ligand 5 (CCL5)*, *CXCL-1*, *CXCL-5*, *CXCL-6* ve *CXCL-7* gibi sinyal molekülleri sentezler (98,99,100). Mezenkimal kök hücrelerin salgıladığı *CXCL-7*, kanser hücrelerindeki *CXCR2*'ye bağlanarak, kanser hücrelerinden *IL-6 (interlökin-6)* sentezini artırır. *İnterlökin-6*, mezenkimal kök hücreler üzerinde pozitif geri besleme

yapar. Mezenkimal kök hücreler ve tümör hücrelerinden sentezlenen IL-6, IL-8 ve CXCL6, kanser kök hücreleri üzerinde etkilidir(101).Fare modelinde, mezenkimal kök hücreler, CCL5 salgısıyla, osteosarkomda akciğer metastazını artırır (102). Mezenkimal kök hücrelerden CCL5, kanser hücrelerinin nişleri arasında karşılıklı etkileşimi sonucu salgılanır (97). Mezenkimal kök hücreler, stromal (karsinomla ilişkili) fibroblastlara farklanabilir (103,104).

Meme kanseri kök hücresi mikroçevresindeki stromal fibroblastlar CXCR4'e bağlanarak meme kanserinin büyümesi ve metastatik özelliklerini artıran CXCL-12'yi (SDF-1- stromal hücre kökenli faktör 1) üretir (105). Stromal fibroblastlar, Wnt sinyal yolağı üzerinden kolon *karsinogenezinde* rol oynayan Hepatosit büyüme faktörünü (HGF) üretir. HGF, parakrin yolla Wnt/ β -katenin yolağı ile kanser kök hücreleri üzerine etki gösterir (106). Stromal fibroblastlar ek olarak; NOS (Nitrik oksit sentaz), PDGF (Platelet kökenli büyüme faktörü), Notch ligandı, Hedgehog ligandı sentezi de yapar (107,108,109).

Meme kanseri mikroçevresindeki endotel hücreleri de kanser kök hücreleri ile etkileşir ve damar oluşumunda görev alır (110,111). Tümör endotel hücresinde, normal endotel hücresine göre ekspresyon farkı görülen gen ürünleri arasında, Fibroblast büyüme faktörü (FGF) reseptörleri, matriks metalloproteinazlar (MMP'lar) ve nükleer faktör kappa B (NF- κ B) ile regüle olan transkriptler bulunur (112,113). Glioblastoma kök hücreleri, kanser mikroçevresindeki sinyallere bağlı olarak, endotel hücrelerine transdifferansiye olup kendi vasküler desteğini oluşturabilir (114).

2.2.2. Meme Kanseri Kök Hücresinin Mikroçevresinden Kaynaklanan Sinyaller

Meme kanseri kök hücresi, mikroçevresi ile çeşitli sinyal yolları aracılığıyla etkileşim halindedir (115).

ECM'deki hyalüronik asit (HA), kanser kök hücrelerindeki adezyon moleküllerini aktive eder ve kanser kök hücre davranışını etkileyen sinyaller oluşturur (116). Hyalüronik asit ile CD44 etkileşimi sonucu, Nanog'un CD44-HA kompleksine eklenmesi

gerçekleşir. Nanog aktivasyonu sonucunda pluripotent kök hücre regülatörleri Rex1 ve Sox2 ekspresyonu artar. STAT3 transkripsiyonu artışı gerçekleşir bunun sonucunda ABC (ATP bağlayıcı kaset) özelliğindeki taşıyıcı *multidrug resistance protein 1* (MDR1) ekspresyonu artar (117). Metastatik bölgelerde hyalüronik asit ve CD44'ün aşırı ekspresyonu görülmüştür. CD44 ve hyalüronik asit etkileşimi, invazyon için gerekli olan hücre iskeleti regülasyonunu sağlar (118,119). CD44-Hyalüronik asit molekülleri, HER-2 (ErbB2/neu) sinyal yolağıyla da etkileşim halindedir. CD44'e hyalüronik asit bağlanması, HER2'nin tirozin kinaz aktivitesini artırır (120).

İntegrin $\alpha 6$ ligandları metastatik büyüme için önem taşır. İntegrin $\alpha 6$ ekspresyonu, MCF-7 seri pasajlarıyla artar. Bu hücre subpopülasyonu artmış çoğalma yeteneği ve ilaçla indüklenen apoptoza direnç gösterir (121). İntegrin $\alpha 6$ ekspresyonu, meme kanseri hastalarında azalmış hayatta kalma oranı ve artmış metastazla ilişkilidir (48). İntegrin ailesi üyeleri, kanser kök hücrelerinin hayatta kalması ve çoğalmasını modüle eder (122).

Kanser mikroçevresindeki hücreler kemokin C-X-C motif kemokin 12'yi (CXCL12) eksprese eder. CXCL12'nin reseptörü C-X-C kemokin reseptör tip 4'tür (CXCR4) (123). CXCL12-CXCR4 aksı, tümör hücrelerinin belli organlara göçmelerinden (*homing*) sorumludur (124). Meme kanserinde, CXCR4'ün aşırı ekspresyonu sıkça görülmektedir. CXCR4 ekspresyonu, uzak metastaz ve lenf nodu tutulumu ile ilişkilendirilmiştir (125). CXCR4 reseptörünün, meme kanserinin farklı moleküler alt tipleri arasında fark gösterdiği bulunmuştur. En yüksek ekspresyon oranı bazal benzeri moleküler alt tipte, en düşük ekspresyon ise lüminal A tipinde görülmüştür. CXCR4 ekspresyonu ile aksiller lenf nodu metastazı varlığı, kanserin evre III veya IV olması ve Cerb-B2 pozitifliği arasında ilişki bulunmuştur (126).

CCL5 (Kemokin (C-C motifi) ligand 5), primer ya da metastatik odaklarda, meme kanseri hücreleri, mezenkimal hücreler veya stromal hücreler tarafından salgılayabilir (127). CCL5; C-C kemokin reseptör tip 1 (CCR1), CCR3 ve CCR5'e bağlanarak etki gösterir (128). Meme kanserinin bazal benzeri ve HER-2 aşırı eksprese eden alt tiplerinde, CCL5

ve CCR5'in artmış ekspresyonu mevcuttur. CCL5'in artmış ekspresyonu, daha çok östrojen reseptörü (ER) negatif hastalardagörülmektedir. CCL5 sekresyonunun, osteosarkomda akciğer metastazını artırdığı gösterilmiştir. CCR5, meme kanseri hücrelerinin artmış invazyon yetenekleriyle ilişkilendirilmiştir. HIV'nin gp120 glikoproteini ile CCR5'in etkileşimini inhibe eden CCR5 *antagonistleri*, CCR5 aktivitesini inhibe etmekte kullanılabilir. CCR5 antagonistlerinin bazal meme kanseri hücrelerinde metastazı bloke ettiği gösterilmiştir (129).

IL-6 da meme kanseri kök hücrelerinin kendilerini yenilemesinde rol oynayan sitokinler arasındadır(130). IL-6, *Janus kinaz 1/ Signal Transducer and Activator of Transcription 3* (JAK1/STAT3) sinyal yolağını kullanarak kanser kök hücreleriyle ilişkili *transkripsiyon* faktörü Oct-4'ün *upregülasyonunu* sağlar. IL-6, JAK1/STAT3/Oct-4 aracılı olarak, kanser kök hücresi olmayan hücrelerin kanser kök hücrelerine dönüşümüne neden olur(131). Ek olarak, IL-6, EMT sürecini de indükler (132). Tümörle ilişkili makrofajlarda (TAM) IL-6 ekspresyonu yüksek bulunmuştur(133). Notch sinyal yolağı, IL-6 *upregülasyonunda* rol oynar(134,135). Meme kanseri kök hücrelerinde HER2'nin aşırı ekspresyonu, IL-6 üretimini artırmaktadır. Meme kanseri hastalarında yüksek serum IL-6 seviyesi ile kötü prognozla ilişkilendirilmiştir (136).

Milkfat globül-EGF faktörü 8 proteini (MFG-E8), apoptotik hücrelerin fagositozu, anjiogenez ve immunotoleransta rol oynayan büyüme faktörüdür (137). MFG-E8, tümörle ilişkili makrofajlar (TAM'lar) tarafından yüksek miktarda üretilmekte ve kanser kök hücrelerinin *tümörjenite* ve ilaç direncini artırır. MFG-E8, IL-6 ile Stat3 yolağı aracılığıyla koordine olarak çalışır. MFG-E8, ayrıca Shh (Sonic hedgehog) sinyal yolağını da kullanır. MFG-E8, integrin $\alpha\beta 3$ ve integrin $\alpha\beta 5$ aracılığıyla sinyal iletir(16). MFG-E8 ekspresyonu, p63 tarafından regüle edilir (138). MFG-E8'in hasta serum seviyesi, triple negatif meme kanserlerinde artmıştır. ER⁺ ve ErbB2⁺ meme kanserlerinde, MFG-E8 ekspresyonu azalmıştır. Kanser hücre hatlarında MFG-E8 geninin kapatılması (*knockdown*), meme kanserini sisplatin'e duyarlı hale getirir (139).

ALDH ve retinoik asit sinyal yolağı, meme kanseri kök hücresi farklanmasında rol oynar. Retinoik asit sinyal yolağı meme kanseri kök hücresi farklanmasını artırır (140). *All trans retinoik asit* (ATRA), retinoid sinyal yolağını ve dolayısıyla farklanmış meme kanseri hücrelerinde eksprese olan genleri indükler bu nedenle ATRA'nın meme kanserinde tedavi amaçlı kullanımı amaçlanmaktadır (141).

IL-8 (interlökin-8), nötrofiller için potent bir kemoatraktandır ve iki farklı G-proteini ilişkili reseptör aracılığıyla biyolojik işlevlerini yerine getirir (142). CXCR1 (CXC motifi reseptör 1), IL-8 ve CXCL6 (Kemokin [C-X-C motifi] ligand 6) (GCP-2, Granulosit kemotaktik protein 2) ile aktive olur (143,144). CXCR2 ise, IL-8, CXCL1 (GRO-a, Growth-regulated oncogene-a), CXCL2 (GRO-b), CXCL3 (GRO-g), CXCL5, GCP-2 ve CXCL7 (NAP-2: Neutrophil activating peptide 2) ile aktive olur (145,146,147,148,149). IL-8, meme kanserinde, normal meme dokusuna göre upregüle olmuştur, ek olarak meme kanseri hastalarının serum IL-8 seviyeleri yüksektir (150,151). Metastatik meme kanseri olan hastaların serum IL-8 seviyeleri, lokalize hastalığa göre daha yüksek olarak bulunmuştur (152). HER2'nin aşırı ekspresyonu, IL-8 upregülasyonuna neden olur. Ek olarak, IL-8 seviyesinin yüksek olması, ER kaybı ya da inaktivasyonu ile ilişkilidir. HER2 aşırı eksprese eden ve ER negatif kanserlerdeki IL-8 yüksekliği kötü prognozla ilişkilendirilmiştir (153).

CXCR1 ve CXCR2'nin, ligandları olan IL-8 upregülasyonu ile sürekli aktivasyonu meme kanseri hücrelerinin *kemoterapötiklere* karşı direnç göstermesine neden olur (153). Ayrıca çoklu ilaç direnci gösteren meme kanseri hücre hatlarında IL-8'in daha çok sentezlendiği gösterilmiştir (154). Kemoterapi, IL-8 ve CXCR1 ve CXCR2'nin diğer ligandlarının *upregülasyonuna* neden olur (155). CXCR1, meme kanser kök hücrelerinde, diğer tümör hücrelerine göre daha yüksek seviyededir. IL-8, tümörün invazif kapasitesini artırır (18,156).

IL-8, *Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 1* (ZEB1), ZEB2, SNAIL ve SLUG transkripsiyon faktörleri aracılı epitelyal-mezenşimal dönüşümünü (EMT) indükler, kök hücre olma durumunu (*stemnessstate*) artırır (157). Bu süreçte kanser hücreleri ve

tümörle ilişkili makrofajlardan kaynaklanan IL-6 ve IL-8 rol oynar (157,158). Kanseri hücrelerinden kaynaklanan IL-1 β ise, CXCL1 ve IL-8'i artırır (159).

CXCR1 ve CXCR2'nin ligand ile aktivasyonu, PI3K/ AKT, PLC/PKC, Ras/Raf/ERK1/2, Fokal adezyon kinaz (FAK), Rho ve Rac gibi birçok sinyal kaskadını aktive eder (153). CXCR1 ve CXCR2'nin aktivasyonu, Src aracılı olarak HER2'yi aktive ederken, CXCR1 ve CXCR2'nin inhibisyonu, HER2 inhibisyonu etkinliğini artırır (142).

2.2.3. Meme Kanserinin Moleküler Alt Tiplerinde Sinyal Molekülü Dağılımı

Meme kanseri mikroçevresi bileşenlerinin etkileşimini belirleyen sinyal molekülleri ve reseptörlerinin, meme kanseri moleküler alt tiplerindeki dağılımına yönelik çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Araştırmacılar tarafından en çok çalışılan sinyal yolağı interlökin-6 JAK/STAT3 yolağı olarak saptanmıştır.

İnterlökin 8 reseptörü CXCR1'in meme kanserinin moleküler alt tiplerindeki dağılımı geçmiş çalışmalarla ortaya konamamıştır. Meme kanseri hastalarının serum IL-6 seviyesinin, Lüminal A moleküler alt tipinde %39,1, Lüminal B moleküler alt tipinde %26,4, HER2 aşırı eksprese eden moleküler alt tipte %10,0 ve triple negatif moleküler alt tipte %24,6 sıklıkta yüksek olduğu gösterilmiştir. Aynı çalışmada, meme kanseri hastalarının serum IL-8 seviyesinin, Lüminal A moleküler alt tipinde %42,9, Lüminal B moleküler alt tipinde %26,9, HER2 aşırı eksprese eden moleküler alt tipte %10,7 ve triple negatif moleküler alt tipte %19,6 sıklıkta yüksek olduğu gösterilmiştir. Ancak meme kanseri moleküler alt tipleri arasında serum IL-6 ve IL-8 seviyeleri arasında istatistik olarak anlamlı fark bulunamamıştır (160). Farklı moleküler alt tiplerdeki hastaların serumlarında MFG-E8 mRNA seviyesi, tümör dokusu ER⁺ olan ve HER2⁺ olan hastalarda azalmış, triple negatif moleküler alt tipteki hastalarda ise artmış olarak bulunmuştur (139). CCL5 ve CCR5 ekspresyonu, meme kanserinin bazal ve HER2 aşırı ekspresyonu moleküler alt tiplerinde, Lüminal A ve Lüminal B moleküler alt tiplerine göre daha yüksek seviyede bulunmuştur (129). CXCR4 ekspresyonunun, meme kanserinin Lüminal A moleküler alt tipinde %31,6, Lüminal B moleküler alt tipinde

%60, HER2 aşırı eksprese eden moleküler alt tipte %66,7 ve bazal olmayan triple negatif moleküler alt tipte %75 sıklıkta olduğu gösterilmiştir (161). İntegrin $\alpha 6$ (CD49f) mRNA ekspresyonunun normal benzeri ve bazal benzeri hücre hatlarında artmış olduğu gösterilmiştir (162).

2.3. Meme Kanseri Mikroçevresinde Tümörle İlişkili Makrofajlar (TAM)

Kanser mikroçevresinde bulunan tümörle ilişkili makrofajlara (TAM) birçok solid tümörde rastlanmaktadır (163,164). Meme kanserinde, toplam hücre kitlesinin %50'sini oluşturabilir(14). Klinik çalışmalarda, tümör kitlesindeki makrofaj sayısı ile meme kanseri prognozu arasında ilişki saptanmıştır (165).

TAMlar, hipoksi, lipopolisakkaritler, CCL2, CCL3 ve koloni stimüle edici faktör (CSF-1) gibi sitokinler, tümör nekroz faktörü- α (TNF- α), interferon- γ (IFN- γ) ve Migrasyon inhibitör faktör (MIF) gibi birçok faktörden etkilenir. Dokulara makrofaj migrasyonu, *kemoatraktan* maddelerce düzenlenir (166,167). *Kemoatraktanlardan*, CCL-2 (MCP-1: Monosit kemoatraktan protein) tümör progresyonunda önem taşımaktadır. Stromadaki CCL-2, makrofajların meme kanseri stromasına toplanmasında önemli rol oynar (168).

MIF, tümör progresyonunda rol alan kemoatraktan moleküllerden biridir (169). MIF, CXCR4 ile etkileşerek, migrasyonu sağlar (170). Meme kanserinde serum MIF seviyesi artmıştır (171). MIF reseptörü CD74 ile kanserin lenf nodu tutulumu arasında ilişki bulunmuştur (172). Meme kanseri hücre hattı ve makrofaj hücre hattı ko-kültüründe; tümör hücrelerinden salgılanan MIF'in makrofaj metalloproteinaz ekspresyonunu ve tümör invazyonunu artırdığı gösterilmiştir (173).

2.3.1. Tümörle İlişkili Makrofajların (TAM) Polarizasyonu

Makrofajların dokuya migrasyon sonrası aktivasyonu, dokudaki mikroçevreye bağlıdır. Makrofajlar, M1 ve M2 makrofajlar olarak iki ana gruba ayrılmaktadır. Makrofajlar bulundukları tümör mikroçevresinden etkilenir ve çevrelerinden aldıkları

sinyallerle polarizasyon özelliklerini (M1 ya da M2) değiştirebilir. Makrofajların mikroçevrelerinden aldıkları sinyaller, tümör invazyonu ve metastazı etkileyebilir (174).

'Klasik aktive olmuş' ya da M1 tipte makrofajlar, kanser hücreleri ve indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) ile nitrik oksit (NO) üreterek intraselüler patojenlere karşı savaşır. M1 tipteki makrofajların immün aktivasyonu Th1 (tip 1 yardımcı T hücresi) ile IFN- γ aracılı olarak gerçekleşir (175). IFN- γ , TLR'nin (toll benzeri reseptör) *upregülasyonuna* neden olur (176). M1 makrofajlardaki TLR4, lipopolisakkaritler (LPS) aracılığıyla aktive olur. M1 aktivasyonunda IRF-3 ve 5 (interferon regülatör faktör 3 ve 5), STAT-5, NF- κ B transkripsiyon faktörleri rol oynar (177). M1 makrofajlar, aktive olduklarında IL-12, IL-23, TNF- α gibi proinflamatuvar sitokinler salgılar (178). M1 makrofajlar aynı zamanda antijen sunucu hücrelerdir. Bu nedenle tümör antijenlerinin sunumunda görev alarak, *antitümöral* rol üstlenirler (16).

M2 tipte makrofajlar, parazit enfeksiyonlarına karşı savaşır, doku yeniden-modellenmesi ve immün toleransta rol oynar. M2 makrofajlar, tümör büyümesi ve metastazı artırır (179,180). M2 makrofajlar, *T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing3* (TIM-3) reseptörü, tümörle ilişkili makrofaj-reseptör tirozin kinaz (TAM-RTK) ve MFG-E8 ile aktive olurlar (181,182,183). Th2 (tip 2 yardımcı T hücresi), M2 makrofajların immün aktivasyonundan sorumludur (184). M2 makrofaj aktivasyonunda, IRF-4, STAT3 ve STAT6, Peroksizom proliferatör aktive reseptör- γ (PPAR- γ), Kruppel benzeri faktör 4 (KLF-4), transkripsiyon faktörleri görev alır (177).

M2 makrofajlar, stimüle oldukları aktivasyon tipine göre 3 alt sınıfa ayrılırlar. M2a (alternatif) makrofajlar, IL-4 ve IL-13 ile indüklenmektedir. M2b makrofajlar, TLR, LPS ve immün komplekslerle aktive olur. M2 makrofajların M2a ve M2b alt tipleri, Th2 tipte immün cevabı artırır. M2c makrofajlar ise IL-10, TGF- β ve glukokortikoidlerle aktive olur ve immün cevabı baskılar ve doku yeniden modellenmesinde rol oynar (178,185).

TAMlar, solid tümördeki hipoksik mikroçevreden etkilenmektedir. Hipoksik ortam sonucu tümör hücrelerinden, vasküler endotelial büyüme faktörü

(VEGF), Endotelin, Endotel monosit aktive edici polipeptit- 2 (EMAP-2), Semaphorin-3A (Sema3a) salgılanır ve bu mediatörler makrofajları ortamı çeker (166). Hipoksik ortamda makrofajlarda; hipoksiyle indüklenen faktör 1α (HIF- 1α) ve HIF- 2α aktivasyonu olur, VEGF sekresyonu artışına bağlı olarak anjiogenez gerçekleşir, yardımcı T hücreleri üzerinde immunosupresif etkili IL-10 sekrete edilir, matriks metalloproteinaz-9 ekspresyonu artar (166,186,187).

2.3.1. Tümörle ilişkili Makrofajların (TAM) Meme Kanseri Kök Hücreleri ile Etkileşimi

TAM'lar, kanser kök hücrelerinin kendini yenileme ve kemoterapiye direnç özelliklerini farklı sitokinler, kemokinler ve büyüme faktörleriyle *regüle* eder. TAM'lar, kanser kök hücreleriyle MFG-E8 ve IL-6 aracılığıyla etkileşir, sonuç olarak hücre içinde STAT3 ve *Sonic hedgehog* yolaklarının aktivasyonu ve kanser kök hücrelerinin tümör oluşturma kapasitesinde artış gerçekleşir. Kanser kök hücreleri ise, makrofajlardan MFG-E8 ve IL-6 üretimini artırır. Kanser kök hücresi ile TAM etkileşimiyle çeşitli onkojenik yollar aktive olur. Wnt/ β -katenin, Notch, TGF- β /Forkhead box O3 (FOXO) kanser kök hücresinin kendini yenileme kapasitesi ve ilaç direncini artırır. IL-6/Stat-3 sinyal kaskadı, NF-kB bağımlı inflamatuvar sinyallerle koordine halde kanser kök hücre aktivitesini artırır (16).

Tümör hücreleri, TAM'lardaki Sirtuin 1 (SIRT-1) reseptörüyle etkileşen CD47 antijenini eksprese ederek, fagosit edilmekten kurtulur(188). Bir başka hipotezde ise, TAM'ların meme kanseri hücreleriyle füzyonu sonucu, kanser hücrelerine kanser kök hücresi fenotipi kazandırabileceği öne sürülmüştür (189).

2.2.3. Meme Kanserin Moleküler Alt Tiplerinde TAM İşaretçilerinin Dağılımı

Tüm makrofajlar için işaretleyici olan CD68'in, Lüminal A alt tipindeki primer meme kanserlerinin tümör stromasında %6 sıklıkla yoğun olarak eksprese olduğu görülmüştür. Ancak meme kanserinin bazal benzeri moleküler alt tipinde bu oran %23

olarak izlenmiştir (190). Araştırmacılar SIRT-1'in MCF-7 meme kanseri hücre hattında aşırı ekspresyonunu göstermiştir (191).

M2 fenotipindeki makrofajlar için işaretçi olan CD163'ün, Lüминаl A alt tipindeki primer meme kanserlerinin tümör stromasında %8 sıklıkla şiddetli eksprese olduğu, bazal benzeri moleküler alt tipteki tümörlerin ise %80'inde şiddetli eksprese olduğu gözlemlenmiştir (190). ER⁺ pozitif ve HER2⁻ olan meme kanseri hastalarından, tamoksifen direnci olan hastalardan elde edilen tümör örneklerindeki makrofajların %48'inde, tamoksifene sensitif olan hastaların örneklerindeki makrofajların ise %52'sinde CD163 pozitifliği saptanmıştır (192). Ancak tümörle ilişkili makrofaj işaretçisi CD163'ün meme kanserinin 4 moleküler alt tipindeki dağılımı açıkça ortaya konamamıştır.

Çalışmanın esas araştırma sorusu, LA, LB, HER2AE, TN ve kontrol grupları arasında; CD133, CXCR1 antijenlerinin ekspresyonu ve M2 makrofajlarının dağılımı açısından anlamlı fark olup olmadığıdır.

3.GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmaya, Bozyaka Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Patoloji Bölümü'nde meme kanseri tanısı almış toplam n=103 hastanın dahil edilmesi planlanmıştır. Patoloji Bölümü'nde bakılan ER, PR, HER2 ve Ki67 ekspresyonu özelliklerine göre hastalar lüminal A (LA), lüminal B (LB), HER2 aşırı eksprese eden (HER2AE) ve triple negatif (TN) moleküler alt tiplerine ayrılmıştır. LA moleküler alt tipindeki hasta sayısı n=22, LB moleküler alt tipindeki hasta sayısı n=36, HERAE moleküler alt tipteki hasta sayısı n=5, TN moleküler alt tipindeki hasta sayısı n=8 olarak saptanmıştır. Meme kanseri hastalarına ek olarak çalışmaya dahil edilen kontrol hastası sayısı n=10'dur.

3.1. Etik Kurul İzin Süreci

"Meme Kanserin Farklı Moleküler Alt Tiplerinin Kök Hücre İşaretçisi, Sitokin Reseptörü ve Tümörle İlişkili Makrofaj İşaretçisi Dağılımı Açısından Değerlendirilmesi" başlıklı tez çalışması, 18.03.2015 tarihinde Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntem başlıklarında değerlendirme sonrası etik açıdan uygun bulunmuştur.

3.2. Hastane Veri Tabanının Taranması

TC Sağlık Bakanlığı Bozyaka Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Patoloji Bölümü'nün DOS tabanlı elektronik arşivinden, 2009 yılı ve öncesine ait hastaların ve TC Sağlık Bakanlığı Bozyaka Eğitim ve Araştırma Hastanesi hastane otomasyon sisteminden (Probel Hastane Bilgi Yönetim Sistemi) 2009 yılı ve sonrasına ait hastaların; yaş, cinsiyet, östrojen reseptörü (ER), progesteron reseptörü (PR), HER2 reseptörü ekspresyonu ve Ki67 indeksi özelliklerine yönelik verilere ulaşılmıştır.

3.3. Çoklu Blokların Taranması

Bozyaka Eğitim ve Araştırma Hastanesi arşivinden elde edilen 7 adet çoklu blokta 190 adet hasta örneği tespit edilmiştir. 190 adet hasta örneğinin, meme kanseri nedeniyle opere edilmiş toplam $n=103$ hastaya ait primer meme dokusu olduğu saptanmıştır. Ek olarak, $n=10$ adet jinekomasti, mammoplasti gibi kanser dışı endikasyonlarla nedeniyle opere olmuş hastadan elde edilmiş meme dokusu, çalışmaya kontrol grubu olarak dahil edilmiştir.

Hastane veri tabanından elde edilen ER, PR, HER2 durumlarına ve Ki67 indeksine göre, kanser nedeniyle opere edilmiş $n=103$ hastanın $n=76$ 'sında, meme kanserinin moleküler alt tip tespiti yapılmıştır. Bu hastalardan $n=27$ 'sinde ER, PR, HER2 durumlarına ve Ki67 indeksine ilişkin verilerdeki eksikliklere bağlı olarak moleküler alt tip belirlenememiştir.

3.4. Kesitlerin Alınması

Bozyaka Eğitim ve Araştırma Hastanesi arşivinden elde edilen 7 adet çoklu bloktan ve 10 adet kanser dışı endikasyonla opere edilen hasta materyalinden 5'er adet kesit alınmıştır. Kesitler, Bozyaka Eğitim ve Araştırma Hastanesi Patoloji Bölümü Laboratuvarları'ndaki Leica SM 2010R kızaklı mikrotom ile 3-4 mikron kalınlığında alınmıştır.

Hastalardan elde edilen kesitler üzerinde uygulanacak immünohistokimya yöntemi için pozitif kontrol preparatı elde etmek amacıyla normal insan dokularından kesitler alınmıştır. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı'ndan CXCR1 antijeninin immünohistokimya yöntemiyle gösterilmesi amacıyla kolon ve CD166 antijeninin immünohistokimya yöntemiyle gösterilmesi amacıyla dalak dokuları temin edilmiştir. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı arşivinden temin edilen deri dokusu, CD133 antijeninin gösterilmesi için uygulanan immünohistokimya yönteminde pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Kolon, dalak ve deri

dokularından, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Işık Mikroskopu Laboratuvarları'ndaki Leica SM 2000R kızaklı mikrotom ile 3-4 mikron kalınlığında kesitler alınmıştır. Tüm kesitler poli-L-lizin kaplı lamlara alınmıştır.

3.5. İmmunohistokimya Yönteminin Uygulanması

3.5.1. Deparaffinizasyon ve Rehidratasyon

Kesitler, ksilolde 2 x 3 dakika, 1:1 oranında ksilol ve %100 etanolde 3 dakika, %100 etanolde 2 x 3 dakika, % 95 etanolde 3 dakika, % 70 etanolde 3 dakika, % 50 etanolde 3 dakika muamele edildikten sonra çeşme suyunda yıkanmıştır. Kesitler, antijen geri çağırma (*retrival*) kadar çeşme suyunda bekletilmiştir.

3.5.2. Antijen Geri Çağırma

CXCR1 ve CD163 antijenleri için geri çağırma amacıyla düdüklü tencere ve pH6.0 sitrat tamponu kullanılmıştır. Düdüklü tencereye 1500cc sodyum sitrat çözeltisi eklendikten sonra, tencere ısıtmaya başlanmıştır. Başlangıçta açık olan düdüklü tencere kapağı, kaynamaya başladıktan sonra kapatılarak 3 dakika beklenmiştir. Daha sonra düdüklü tencere, havuza alınarak soğuması beklenmiştir.

%0.05 Tween 20 içeren 10 mM sodyum sitrat tamponu hazırlamak için, 2.94 g tri-sodyum sitrat (dihidrat), 1000 ml distile suda çözülür sonrasında pH değeri 1 N HCl ile 6,0'a ayarlanmıştır. Hazırlanan solüsyona 0,5 ml Tween 20 eklenmiştir.

CD133 antijeni için, mikrodalga yöntemi ile antijen geri çağırma tekniği uygulanmıştır. Kesitler pH'sı 6,1 olan sitrat tamponu ile doldurulmuş, mikrodalga için uygun şaleye yerleştirildikten sonra mikrodalga fırın enerji seviyesi 300W'a ayarlanmıştır. 3x5 dakika boyunca preparatlar mikrodalgada ısıtılmıştır. Her 5 dakikada bir preparat şalesindeki eksilen sitrat tamponu, sıcak sitrat tamponuyla tazelenmiştir.

ER, PR, HER2 antijenleri ve Ki67 için antijen geri çağırma, pH=7,2 sitrat tampon çözeltisi içinde 100°C'de 20 dakikada gerçekleştirilmiştir.

3.5.3. Tampon Solüsyonu ile Yıkama

Düdüklü tencereyle antijen geri çağırma sonrası dokular, %0.025 Triton X-100 içeren Tris-buffered saline (TBS) çalışma solüsyonu ile 2 x 5 dakika yıkanmıştır.

10x TBS solüsyonunun hazırlanması için başlangıç pH'sı 4.5 olan 24.23 g Trizma HCl ve 80.06 g NaCl, 800 ml distile suda çözülür ve pH değeri pH 7.6'ya (7.6-7.8 arasında olabilir) ayarlanmıştır. Çözelti 1000 ml hacmine tamamlanır. 10x solüsyon 1:10 dilüe edilerek TBS çalışma solüsyonu hazırlanmıştır.

Mikrodalga ile antijen geri çağırma sonrası kesitler, Phosphate-buffered saline (PBS) solüsyonu ile 2 x 5 dakika yıkanmıştır. 0.1 M, 10x PBS solüsyonu için 1000 ml distile suda, 10,9 g Na₂HPO₄ (anhidroz), 3,2 g NaH₂PO₄ (anhidroz) ve 90 g NaCl çözünmüştür. Solüsyon pH'sı 7.4'e ayarlanmıştır. 10x solüsyon 1:10 dilüe edilerek ve pH değeri 7,6'ya ayarlanarak PBS çalışma solüsyonu hazırlanmıştır.

3.5.4. Normal Serum ile Blokaj

Yıkama sonrası hedeflenen doku kesitlerinin çevresi *hidrofobik* işaretleyici kalem ile işaretlenmiştir. Kesitler işaretleme sonrası *humidity chambera* yerleştirilmiştir.

CXCR1 ve CD163 antijenleri için uygulanan immünohistokimya yönteminde, kesitlere TBS'te %1 BSA (bovin serum albümini) içeren %10 normal keçi serumuyla 2 saat, oda sıcaklığında blokaj uygulanmıştır. Serum blokajda, sekonder antikorların geliştirildiği canlı türünün normal serumu tercih edilmiştir. 1 ml için %10 serum blokaj solüsyonunun hazırlanması için, 100 µl normal serum, 10 mg BSA ve 900 µl TBS (pH 7.6-7.8) kullanılmıştır. CD133 antijeni için uygulanan immünohistokimya yönteminde, serum blokaj basamağının atlanması uygun görülmüştür.

ER, PR, HER2 antijenleri ve Ki67 için uygulanan immünohistokimya yönteminde kesitlere, protein blokaj solüsyonu *Super Block* (ScyTek Laboratories, West Logan, UT) 5 dakika uygulanmıştır.

3.5.5. Primer antikorun uygulanması

Anti CXCR1 antikorunu kesitlere TBS'te %1 BSA ve 1/200 (dilüsyon aralığı 1/100-1/500 olarak tavsiye edilmiştir) dilüsyonla uygulanmıştır. Kesitler, *humidity chamber* içinde gece boyu 4°C'da inkübe edilmiştir. Abcam (Cambridge, MA) firması tarafından üretilen "ab124344" kodlu, tavşanda üretilmiş poliklonal, IgG izotipindeki antikor, 0.5 mg/ml konsantrasyonda 100 µg miktarda alınmıştır. Antikor 50 µl'lik *alikitlara* bölünerek -20°C'de saklanmış ve kullanım öncesinde *alikit* 4°C sıcaklığa getirilerek, dondurma çözme döngülerinden kaçınılmıştır.

Anti CD163 antikorunu kesitlere TBS'te %1 BSA ve 1/300 (dilüsyon konsantrasyonu 0.5 µg/ml olarak tavsiye edilmiştir.) dilüsyonla uygulanmıştır. Kesitler, *humidity chamber* içinde gece boyu 4°C'de inkübe edilmiştir. Abcam (Cambridge, MA) firması tarafından üretilen "ab87099" kodlu, tavşanda üretilmiş poliklonal, IgG izotipindeki antikor, 0.7 mg/ml konsantrasyonda 100 µg miktarda alınmıştır. Antikor 50 µl'lik *alikitlara* bölünerek -20°C'de saklanmış ve kullanım öncesinde *alikit* 4°C sıcaklığa getirilerek, dondurma çözme döngülerinden kaçınılmıştır.

Anti CD133 antikorunu kesitlere PBS'te 1/10 dilüsyonla (dilüsyon aralığı 1/5-1/10 olarak tavsiye edilmiştir) uygulanmıştır. Kesitler, *humidity chamber* içinde gece boyu 4°C'de inkübe edilmiştir. Miltenyi Biotec (Germany) firması tarafından üretilen "130-090422" kodlu, farede üretilmiş monoklonal IgG1 izotipindeki antikor, önerildiği biçimde 4°C'de saklanmıştır.

Gece boyu antikorla inkübasyon sonrası kesitler, 2 x 5 dakika, %0.025 Triton X-100 içeren TBS solüsyonunda (CXCR1 ve CD163 antijenleri için) veya PBS solüsyonunda (CD133 antijeni için) yıkanır.

ER, PR ve HER2 antijenleri için uygulanan immünohistokimya yönteminde kesitlere anti ER (#6F11, Leica Biosystems, Germany), anti PR (#PGR-312, Leica Biosystems, Germany) , anti HER2 (#CB 11, Leica Biosystems, Germany) ve anti MIB-1 antikorları (#IR626/IS626, Dako, Glostrup, Denmark) sırasıyla 1:40, 1:150, 1:40 ve 1:150 dilüsyonlarla, 20 dakika boyunca uygulanmıştır.

3.5.6. H₂O₂ ile blokaj

Yıkanan kesitlere, 30 dakika oda sıcaklığında %3 H₂O₂ solüsyonuyla endojen peroksidaz blokajı uygulanır. %3 H₂O₂ solüsyonu, %30 H₂O₂ stok solüsyonundan 1/10 dilüsyonla hazırlanır.

ER, PR, HER2 antijenleri ve Ki67 için uygulanan immünohistokimya yönteminde kesitlere, H₂O₂ içeren *Peroxide Block for Image Analysis* (ScyTek Laboratories, West Logan, UT) solüsyonu uygulanmıştır.

3.5.7. Sekonder antikorun uygulanması

CXCR1 ve CD163 antikorunun uygulaması sonrası, anti tavşan IgG antikorunun TBS'te %1 BSA ve 1/1000 dilüsyonla (dilüsyon oranı 1/1000 olarak tavsiye edilmiştir.) uygulanmıştır. Abcam firması tarafından üretilen "ab6721" kodlu keçi derisinde üretilmiş poliklonal antikor IgG izotipinde HRP (*horseradish peroksidaz*) ile konjuge edilmiştir. 2 mg/ml konsantrasyonda 1 mg miktarda alınan antikor 4°C'de saklanmıştır.

CD133 antikorunun uygulaması sonrası, anti fare IgG antikorunun PBS'te ve 1/500 dilüsyonla (dilüsyon oranı 1/500-1/2500 aralığında tavsiye edilmiştir.) uygulanmıştır. Abcam firması tarafından üretilen "ab6789" kodlu keçi derisinde üretilmiş poliklonal antikor IgG izotipinde HRP (*horseradish peroksidaz*) ile konjuge edilmiştir. 2 mg/ml konsantrasyonda 1 mg miktarda alınan antikor 4°C'de saklanmıştır.

Sekonder antikorların kesitlerle *inkübasyonu*, oda sıcaklığında *humidified chamber*'da bir saat boyunca gerçekleştirilmiştir.

ER, PR, HER2 antijenleri ve Ki67 için uygulanan immünohistokimya yönteminde kesitlere CRF *Anti-Polyvalent HRP Polymer* (ScyTek Laboratories, West Logan, UT) dilüe edilmeden, oda sıcaklığında uygulanmıştır.

3.5.8. Kromojen uygulanması

Bio SB Immunodetector DAB Substrate Chromogen Kit ile 1 ml tampona 1 damla DAB (diaminobenzidin) damlatılarak kromojen çalışma solüsyonu hazırlanmıştır. Hazırlanan kromojen solüsyonunun ışıktan uzak tutulması hedeflenmiştir. CXCR1 antijeni için uygulanan boyamalarda hazırlanan çalışma solüsyonu kesitlere 5-6 dakika boyunca uygulanmıştır. CD163 ile yapılan boyamalarda ise kesitlere 3 dakika boyunca kromojen solüsyon uygulanmıştır. CD133 ile yapılan boyamalarda solüsyon 9 dakika boyunca kesitlere uygulanmıştır. Kromojenle ile uygun inkübasyon süresine her boyamada, kesitler mikroskop ile incelenerek karar verilmiştir. Kesitlere kromojen uygulaması boyunca kesitlerin bulunduğu *chamber* ışık geçirmez alüminyum folyo ile kaplanmıştır. Kromojen solüsyonu uygulaması preparatların çeşme suyu içeren kaba alınmasıyla sonlandırılmıştır. Kromojen uygulaması sonrası, 5 dakika çeşme suyuyla yıkama yapılmıştır.

ER, PR, HER2 antijenleri ve Ki67 için, kromojen solüsyonu hazırlama amacıyla 50µl DAB kromojen konsantresi (#30-ACT500 DAB Chromogen Substrate Kit, ScyTek Laboratories, West Logan, UT), 1 ml DAB kromojen substratıyla (#30-ACT500 DAB Chromogen Substrate Kit, ScyTek Laboratories, West Logan, UT) karıştırılır. Solüsyon kesitlere 5 dakika uygulandıktan sonra dokular 1 dakika distile suyla yıkanır. Daha sonra kesitler yeniden 5 dakika boyunca kromojen solüsyonu ile muamele edildikten sonra 1 dakika distile suyla yıkanır.

3.5.9.Çekirdek boyası uygulanması

Çeşme suyuyla yıkama sonrası kesitlere 30-45 saniye boyunca hematoksilin uygulanmıştır. Hematoksilin sonrası kesitler, çeşme suyuyla yıkanmıştır. CD133, ER, PR, HER2 antijenleri ve Ki67 için yapılan boyamalarda Mayer'in hematoksileni kullanılmıştır. CD133 için Mayer'in hematoksileni kesitlere 30 saniye uygulanırken, diğer antijenler için 3 dakika uygulanmıştır. Mayer'in hematoksileni, 50 g alüminyum potasyum sülfat

(alum), 1 g hematoksilin, 0.2 g sodyum iyodat ve 20 ml glasiyal asetik asitin 1000 ml distile suda çözünmesiyle hazırlanmıştır.

3.5.10. Dehidratasyon, şeffaflama ve kapama

Kesitler, % 50 etanolde 3 dakika, % 70 etanolde 3 dakika, % 95 etanolde 3 dakika, %100 etanolde 2 x 3 dakika ve 1:1 oranında ksilol ve %100 etanolde 3 dakika bekletilerek dehidrate edilmiştir. Daha sonra ksilolde 2 x 3 dakika şeffaflama işleme gerçekleştirilmiştir. Sonrasında Entellan kapama mediumu kullanarak kapama yapılmıştır.

3.6. Spesimenlerin Görüntülenmesi

Spesimenler laboratuvarında Olympus BH2 Mikroskop upright trinoküler ışık mikroskobu ile görüntülenmiştir. Mikroskobun 5 adet x4- NA= 0,10, x10- NA= 0,25, x20- NA=0,40, x40-NA= 0,65 ve x100-NA= 1,30, yağlı özellikte objektifi bulunmaktadır. x100 büyütme özelliği olan yağlı objektif bu çalışmada kullanılmamıştır.

Spesimenler görüntüleme laboratuvarında Leica DM6000B upright trinoküler ışık ve *widefield* floresan mikroskobu ile görüntülenmiş ve spesimen mikrografları çekilmiştir. Çalışmada mikroskobun floresan görüntüleme kısmı kullanılmamıştır. Çalışmada kullanılan objektifler: X2,5 objektif- NA=0,07, x5 objektif-NA=0,12, x10 objektif-NA=0,25, x20 objektif-NA=0,40 ve x40 objektif-NA=0,75'tir. Leica DC490 dijital kamera ile görüntüleme, LAS v3.8 yazılımı ile dijital mikrograf çekimi yapılmıştır. Dijital mikrograflar PNG (*Portable Network Graphics*) formatında kaydedilerek saklanmıştır. Çalışma boyunca 29,5 GB büyüklüğünde toplam 2863 mikrograf çekilmiştir.

CXCR1, CD163 ve CD133 antijenleri için immünohistokimya yöntemi ile boyanmanın değerlendirilmesi için her doku kesitinden en az 5 alan, x40 büyütme ile görüntülenmiştir.

3.7. İmmünohistokimya ile Boyanmanın Değerlendirilmesi

CXCR1 ve CD133 antijenleri için uygulanan immünohistokimya yöntemi ile elde edilen boyanmanın değerlendirilmesinde, membran boyanma yoğunluğu (0, +1, +2 veya +3) ve boyanma yüzdesiyle (%0-%100 arası) hesaplanan H-Skor yöntemi (Formül 3.7.1) kullanılmıştır.

$$\begin{aligned} \text{H-skor} = & (\text{Boyanma olmayan hücrelerin yüzde değeri} \times 0) + \\ & (\text{Boyanma şiddeti} +1 \text{ olan hücrelerin yüzde değeri} \times 1) + \\ & (\text{Boyanma şiddeti} +2 \text{ olan hücrelerin yüzde değeri} \times 2) + \\ & (\text{Boyanma şiddeti} +3 \text{ olan hücrelerin yüzde değeri} \times 3) \end{aligned}$$

(3.7.1)

CD163 antijenleri için uygulanan immünohistokimya yöntemi ile elde edilen boyanmanın değerlendirilmesinde, CD163+ olan makrofaj sayısının (M2 fenotipinde makrofajlar) tüm makrofaj popülasyonuna bölünmesiyle elde edilen yüzde değer kullanılmıştır (Formül 3.7.2).

$$\text{M2/Tüm Makrofaj oranı} = \text{M2 makrofaj sayısı} / \text{Tüm makrofajların sayısı}$$

(3.7.2)

M2/TM oranlarına ek olarak, tüm makrofaj sayısından M2 makrofaj sayısı çıkarılarak M1 makrofaj sayısına ulaşılmıştır. Daha sonra M2 makrofaj sayısının M1 makrofaj sayısına bölünmesiyle M2/M1 makrofaj oranına ulaşılmıştır. (Bkz. Formül 3.7.3 ve Formül 3.7.4)

$$\text{M1 makrofaj sayısı} = \text{Tüm makrofaj sayısı} - \text{M2 makrofaj sayısı} \quad (3.7.3)$$

$$\text{M2/M1 oranı} = \text{M2 makrofaj sayısı} / \text{M1 makrofaj sayısı} \quad (3.7.4)$$

3.8. İstatistik Analiz

Grupların karşılaştırılması ve korelasyon testlerinden önce normal dağılım, Shapiro-Wilk testiyle değerlendirildi. Mann Whitney U testi, iki bağımsız grubun karşılaştırılması için uygulandı. Kruskal-Wallis testi ise ikiden fazla bağımsız grubun

karşılaştırılması için kullanıldı. Dunn-Sidak testi, *post-hoc* testlerin yapılması için uygulandı. Spearman's rho katsayısı, sayısal (*numerik*) değişkenlerin korelasyonunun incelenmesinde kullanıldı. Pearson Ki-kare testi, kategorik değişkenlerin analizinde kullanıldı. Tüm istatistik testler için anlamlılık seviyesi, 0.05 olarak belirlendi. Tanımlayıcı istatistiklerde, numerik değerler için: Mediyan değer, çeyrekler arası dağılım aralığı (ÇADA); kategorik değerler için frekanslar ve oranlar hesaplandı. İstatistiksel analiz için kullanılan yazılım IBM SPSS version 19,0'dı.



4.BULGULAR

4.1. Kanser ve Kontrol Grubunun Demografik Özellikleri

ER, PR,HER2 VE Ki67 özelliklerine göre hastalar lüminal A (LA), lüminal B (LB), HER2 aşırı eksprese eden (HER2AE) ve triple negatif (TN)moleküler alt tiplerine ayrılmıştır. LA moleküler alt tipindeki hasta sayısı n=22, LB moleküler alt tipindeki hasta sayısı n=36, HERAE moleküler alt tipteki hasta sayısı n=5, TN moleküler alt tipindeki hasta sayısı n=7 olarak saptanmıştır. Çalışmaya dahil edilen toplam meme kanseri hasta sayısı n=70'tir. Çalışmaya dahil edilen kontrol (KNTRL) hastası sayısı n=10'dur. Çalışmadaki toplam hasta sayısı n=80'dir. (Bkz. Tablo 4.1.)

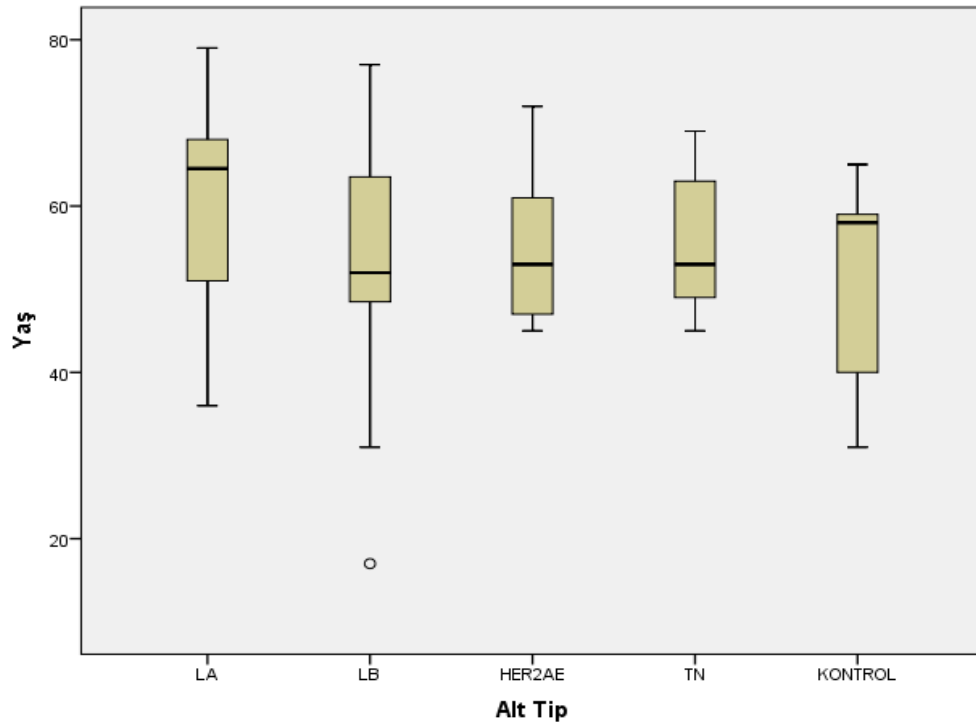
Tablo 4.1. Kanser ve kontrol grubu hasta sayıları ve yüzde dağılımları

Frekans		Yüzde (%)	Kümülatif Yüzde
LA	22	27,5	27,5
LB	36	45,0	72,5
HR	5	6,3	78,8
TN	7	8,8	87,5
KNTRL	10	12,5	100,0
Total	80	100,0	

Kanser ve kontrol gruplarındaki hastaların yaşlarının ortanca değerleri arasında (Tablo 4.2.) anlamlı fark bulunamamıştır (Kruskal-Wallis testi, $p=0,235$). Ancak, tüm gruplar arasında LA grubunun ortanca yaşı (Ortanca=64,5; 50,75-69,25) en büyük, LB grubunun ortanca yaşı en küçük (Ortanca=52,00; 48,25-63,75) olarak bulunmuştur (Bkz. Tablo 4.2. ve Şekil 4.1.)

Tablo 4.2. Kanser ve kontrol grubu hasta yaşlarına ilişkin parametreler

		LA	LB	HER2AE	TN	Kontrol
Hasta Sayısı		22	36	5	7	10
Ortalama		61,68	54,08	55,60	55,86	52,60
Ortanca		64,50	52,00	53,00	53,00	58,00
Standart Sapma		11,741	13,424	11,082	9,118	11,815
Minimum		36	17	45	45	31
Maksimum		79	77	72	69	65
Persentiller	25	50,75	48,25	48,00	48,00	39,50
	50	64,50	52,00	53,00	53,00	58,00
	75	69,25	63,75	64,00	64,00	60,25

**Şekil 4.1.** Kanser ve kontrol grubu hasta yaşlarına ilişkin kutu çizgi grafiği

Hastaların cinsiyetlerinin dağılımı tablo 4.3.'te gösterilmiştir. Çalışmaya dahil edilen 80 hastadan n=3'ü erkek cinsiyetindedir. 3 erkek hasta, LA, LB ve TN gruplarında yer almaktadır.

Tablo 4.3. Kanser ve Kontrol Grubu Hasta Cinsiyet Dağılımı

			CİNS		Total
			KADIN	ERKEK	
Tip	LA	Sayı	21	1	22
		% (alt tip içinde)	95,5%	4,5%	100,0%
	LB	Sayı	35	1	36
		% (alt tip içinde)	97,2%	2,8%	100,0%
	HR	Sayı	5	0	5
		% (alt tip içinde)	100,0%	0,0%	100,0%
	TN	Sayı	6	1	7
		% (alt tip içinde)	85.7%	14.3%	100,0%
	KNTRL	Sayı	10	0	10
		% (alt tip içinde)	100,0%	0,0%	100,0%
Toplam		Sayı	77	3	80
		%	96,3%	3,8%	100,0%

4.2. Hastaların CD133, CXCR1 ve CD163 İmmunohistokimya Görüntülerinin Histopatolojik Olarak Değerlendirilmesi

Çalışmaya dahil edilen kanser hastalarının meme dokularında, kaynaklandığı duktusla sınırlı ve invazif olmayan atipik hücrelerden oluşan karsinoma in situ ve çevre dokuya yayılan invazif karsinom odaklarını düşündüren lezyonlar görülmüştür (200).

Çalışmada yer alan farklı moleküler alt tiplerdeki hastalara ait tümör kesitlerinde yapılan histopatolojik değerlendirme sonucunda, lümenal alt tiplerdeki (LA ve LB)

hastalara ait meme dokusunda tümör hücrelerinin ortası lümene benzer boşlukları olan hücre adacıkları oluşturdukları gözlemlenmiştir. (Şekil 4.2. ve 4.3.) Ancak bu yapı, tüm lüminal grup hastalarında gözlemlenmemiştir. HER2 aşırı eksprese eden gruptaki hastalarda bağ dokusu içine disemine olmuş küçük tümör hücresi kümeleri ve kordonları görülmektedir (Şekil 4.4. ve 4.5.). TN moleküler alt tipindeki hastalara ait tümör dokusunda hücrelerin paralel ya da farklı yönelimlere sahip, ince bağ dokusu ile ayrılmış kordonlar halinde düzenlendiği görülmüştür. TN moleküler alt tipte de tümör dokusunun bağ dokusu bileşenine disemine olmuş 3-4 tümör hücresinden oluşan küçük tümör adacıkları yapısı izlenmektedir (Şekil 4.5. ve 4.11.). Ancak gözlenen bu yapılar moleküler alt tipe spesifik değildir.

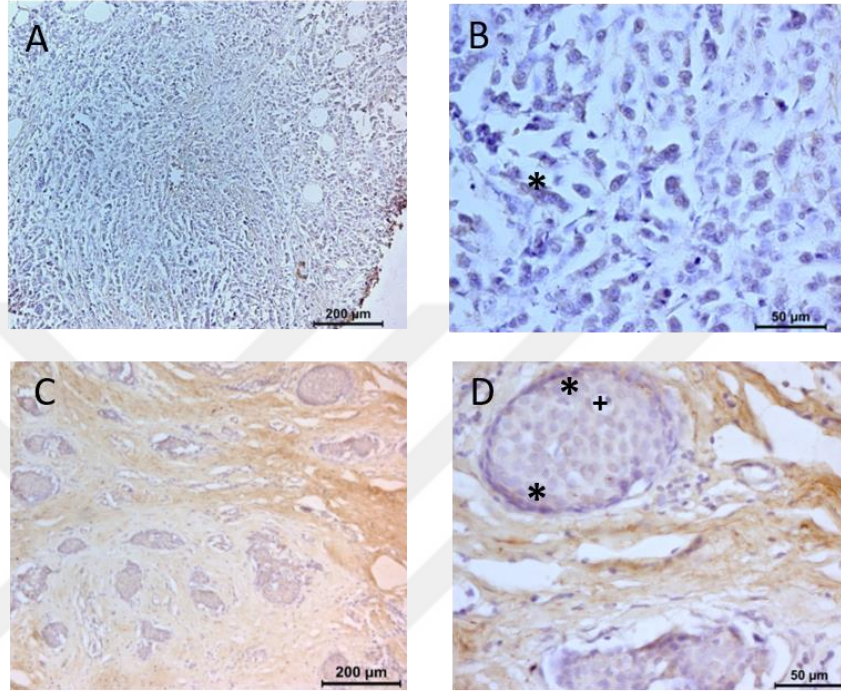
İnfiltratif hücreler, lüminal olmayan alt tiplerde daha yoğundur ve tümör hücreleriyle daha yakın ilişki halindedir. Tümör dokusundaki infiltratif hücrelerin çoğunluğunu makrofaj morfolojisinde hücreler oluşturmaktadır. HER2 ve TN moleküler alt tiplerde, bağ dokusu hücresel elemanlar açısından daha zengindir (Şekil 4.10. ve 4.11.)

Lüminal moleküler alt tiplerde belirgin olmak üzere, tümör kümelerinin periferinde daha çok CD133, merkezi ya da lümene yakın kısımlarında ise CXCR1 antijeninin daha şiddetli eksprese olduğu izlenmiştir. Lüminal moleküler alt tiplerde CD133 ekspresyonu HERAE ve TN moleküler alt tiplere göre daha şiddetlidir. TN moleküler alt tipte ise CXCR1 daha şiddetli eksprese olmaktadır (Şekil 4.14., 4.15. ve 4.17.).

4.2.1. Kanser ve Kontrol Grubu Hastalarına Ait Meme Dokularında CD133 Ekspresyonu

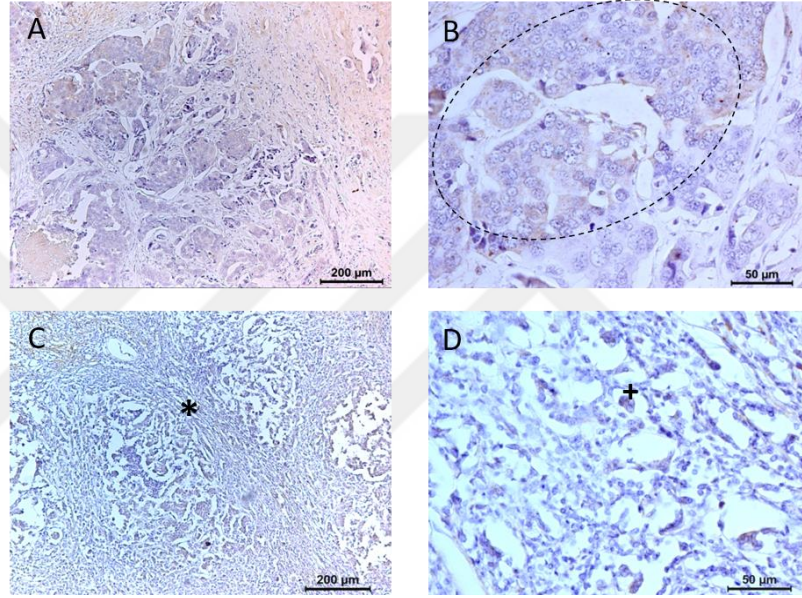
LA moleküler alt tipindeki hastalarda, tümör hücrelerinin ince bağ dokusu elemanlarıyla ayrılmış hücre kordonları oluşturduğu gözlemlenmiştir. Hücre kordonları farklı yönlere doğru uzanmaktadır. Hücre kordonlarından bazılarında CD133 ekspresyonu görülmektedir. Tümör dokusu, tümör hücrelerinin biraraya gelerek küçük

kümeler oluşturduğu görülmektedir. Kümeler arasında karsinoma in situ ve invazif karsinoma odakları bulunmaktadır. (Şekil 4.2)



Şekil 4.2. LA grubu hastalarda CD133 ekspresyonu (HRP, Mayer'in hematoksileni) A) 12523.03 numaralı hastada invazif meme karsinomu odakları izlenmektedir (x10). B) 12523.03 numaralı hastada invazif meme karsinomu odaklarında sitoplazmik ve membranöz CD133 ekspresyonu izlenmektedir. Aynı kordondaki hücrelerde görülen ekspresyon, kordondaki hücrelerin (*) aynı hücreden kaynaklanan yavru hücreler olduğunu düşündürmektedir C) 2261.12 numaralı hastada invazif meme karsinomu ve karsinoma in situ odakları (x2.5) D) 2261.12 numaralı hastada karsinoma in situ odağında sitoplazmik CD133 ekspresyonu izlenmektedir (x40) Tümör dokusunda CD133 eksprese eden hücreler, kümelerin bazalinde bulunmaktadır (*). Hücre kümelerinin ortasında lümen benzeri yapılar görülmektedir (+).

LB hastaların tümör dokusunda CD133 ekspresyonu yönünden heterojen özellikte karsinoma in situ odakları bulunmaktadır. Tümör dokusu, infiltratif hücrelerden zengin bağ dokusu ile tümör adacıklarına ayrılmıştır. İnfiltratif hücrelerden zengin bağ dokusu içinde sitoplazmik CD133 eksprese eden tümör hücreleri bulunmaktadır (Şekil 4.3.).

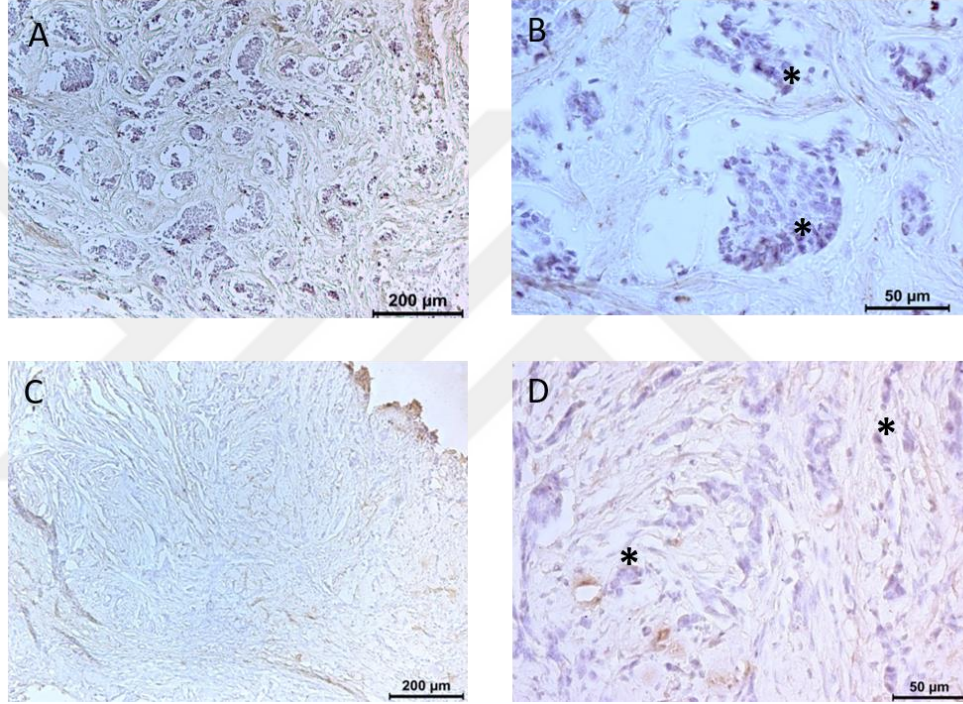


Şekil 4.3. LB grubu hastalarda CD133 ekspresyonu (HRP, Mayer'in hematoksileni) A)

484.00 numaralı hastada karsinoma in situ odaklarında CD133 ekspresyonu izlenmektedir (x10) B) 484.00 numaralı hastada karsinoma in situ odağında sitoplazmik ve granüler tarzda CD133 ekspresyonu izlenmektedir (x40).

Tümör adacıklarından bazıları CD133 eksprese ederken (kesikli çizgi) bazıları CD133 ekspresyonu açısından negatiftir. C) 9023.01 numaralı hastada invaziv meme karsinomu odaklarında CD133 ekspresyonu izlenmektedir (x10). Tümör dokusu, infiltratif hücrelerden zengin bağ dokusu (*) ile tümör adacıklarına ayrılmıştır. D) 9023.01 numaralı hastada invaziv meme karsinomu odaklarında sitoplazmik CD133 ekspresyonu izlenmektedir(x40). İnfiltratif hücrelerden zengin bağ dokusu içinde sitoplazmik CD133 eksprese eden tümör hücreleri bulunmaktadır (+).

HER2AE grubu hastaların tümör dokusunda bağ dokusu bileşenleri ile birbirlerinden ayrılmış tümör adacıkları görülmektedir. Tümör dokusunda tümör hücreleri kısmen paralel düzenlenmiş kordonlar oluşturmaktadır. Hücre kordonları arasında kollajen lifleri bulunmaktadır. Kordonlardaki hücrelerden bazılarında zayıf pozitif (+1) sitoplazmik CD133 ekspresyonu izlenmektedir. (Şekil 4.4.)

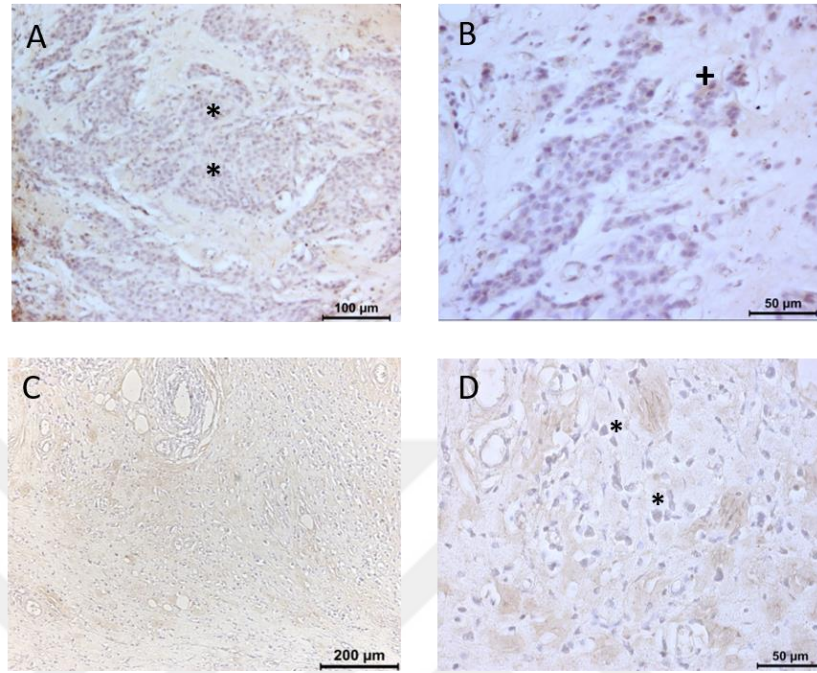


Şekil 4.4. HER2AE grubu hastalarda CD133 ekspresyonu (HRP, Mayer'in hematoksileni)

A) 2444.06 numaralı hastada invazif meme karsinomu odaklarında CD133 ekspresyonu izlenmektedir. (x10) B) 2444.06 numaralı hastada invazif meme karsinomu odaklarında CD133 ekspresyonu izlenmektedir. Tümör adacıklarındaki hücrelerden bazılarında CD133 ekspresyonu görülmektedir (*) (x40). C) 2278.02 numaralı hastada invazif meme karsinomu odaklarında CD133 ekspresyonu izlenmektedir (x10). D) 2278.02 numaralı hastada invazif meme karsinomu odaklarında sitoplazmik CD133 ekspresyonu izlenmektedir (x40). Kordonlardaki hücrelerden bazılarında zayıf pozitif (+1) sitoplazmik CD133 ekspresyonu izlenmektedir (*).

TN grubu hastaların tümör dokusunda bağ dokusu bileşenleriyle çevrili ancak birleşme eğiliminde geniş tümör adacıkları bulunmaktadır. Tümör adacıklarındaki hücreler polarite özelliklerini kaybetmiş izlenimi vermektedir ve CD133 ekspresyonu açısından heterojendir. Bazı tümör hücrelerinde şiddetli nükleer CD133 ekspresyonu dikkat çekmektedir. Tümör hücreleri, tek başına ya da ufak kümeler halinde bağ dokusuna saçılmıştır (Şekil 4.5.).

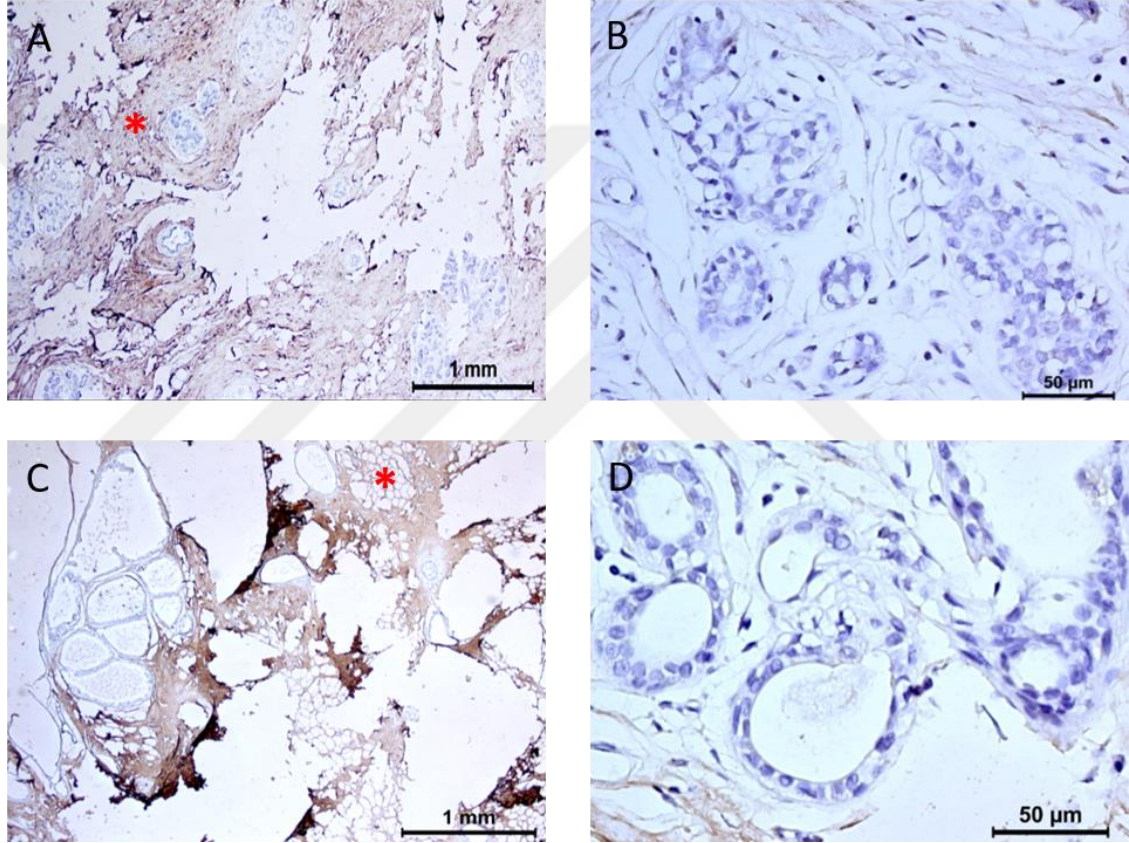




Şekil 4.5. TN grubu hastalarda CD133 ekspresyonu (HRP, Mayer'in hematoksileni) A)

7146.10 numaralı hastada invazif meme karsinomu odaklarında CD133 ekspresyonu izlenmektedir (x20). Tümör dokusunda bağ dokusu bileşenleriyle çevrili ancak birleşme eğiliminde geniş tümör adacıkları bulunmaktadır (*). B) 7146.10 numaralı hastada invazif meme karsinomu odaklarında sitoplazmik ve nükleer CD133 ekspresyonu izlenmektedir (x40). Bazı tümör hücrelerinde şiddetli nükleer CD133 ekspresyonu (+) dikkat çekmektedir. C) 12806.10 numaralı hastada invazif meme karsinomu odaklarında CD133 ekspresyonu izlenmektedir (x10). D) 12806.10 numaralı hastada invazif meme karsinomu odaklarında zayıf sitoplazmik CD133 ekspresyonu izlenmektedir (x40). Bağ dokusuna dissemine olmuş tümör hücrelerinden bazıları zayıf sitoplazmik CD133 ekspresyonu göstermektedir(*).

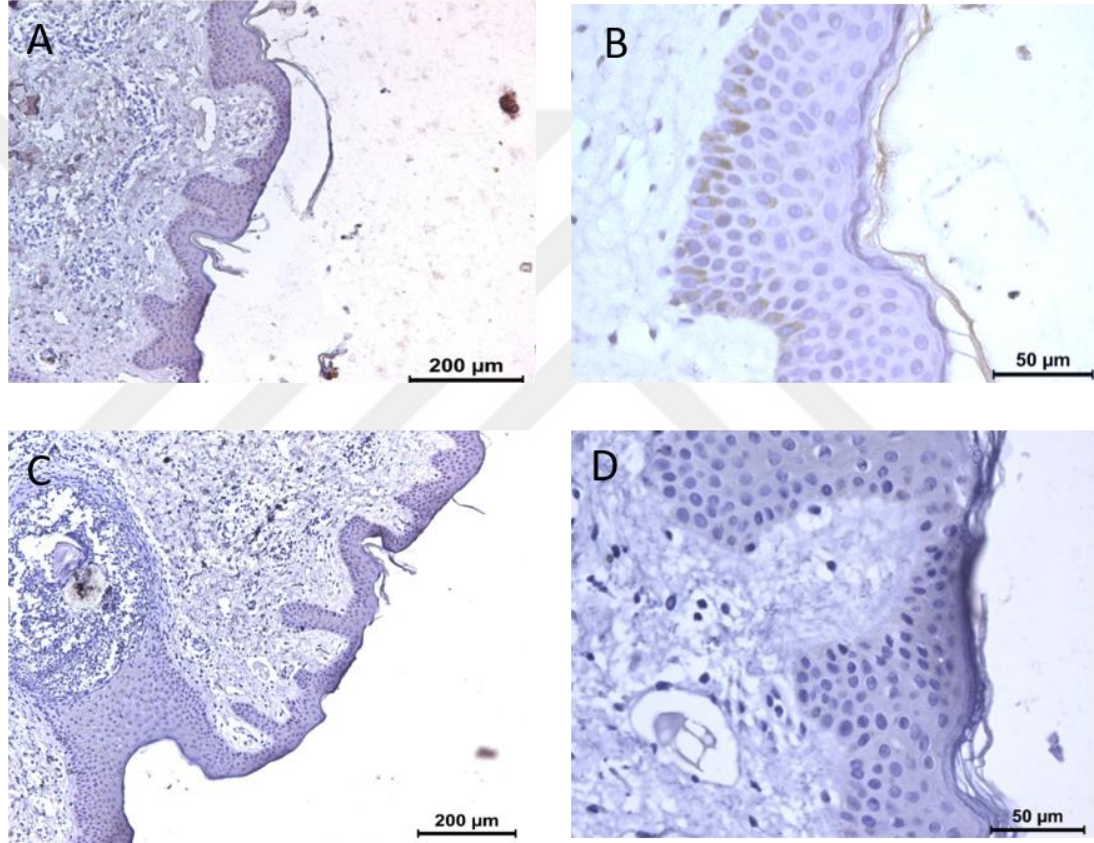
Tümöral olmayan meme dokusunda (kontrol grubu) görüntülenen damar kesitinde CD133 eksprese etmeyen hücreler çoğunluktadır. Lobül çevresindeki kollajen lifleri spesifik olmayan şekilde boyanmıştır. Tümöral olmayan meme dokusu kesitinde yağ dokusu ve bağ dokusu miktarı yüksektir. Kesitte izlenen lobüldeki hücrelerin çoğu CD133 eksprese etmemektedir (Şekil 4.6.).



Şekil 4.6. Kontrol grubu hastalarda CD133 ekspresyonu (HRP, Mayer'in hematoksileni)

- A) 8713.15 numaralı hastada CD133 ekspresyonu izlenmektedir (x10). Lobül çevresindeki kollajen lifleri (*) spesifik olmayan şekilde boyanmıştır. B) 8713.15 numaralı hastada zayıf sitoplazmik CD133 ekspresyonu izlenmektedir (x40). C) 6226.15 numaralı hastasında CD133 ekspresyonu izlenmektedir (x2.5). Tümöral olmayan meme dokusu kesitinde yağ dokusu (*) ve bağ dokusu miktarı yüksektir D) 6226.15 numaralı hastasında CD133 ekspresyonu izlenmektedir (x40).

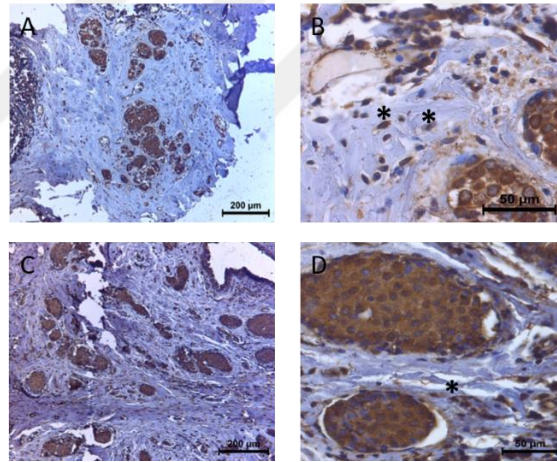
CD133 immünohistokimya protokolünde pozitif kontrol için insan deri dokusu kullanılmıştır. Stratum bazalede sitoplazmik ve membranöz CD133 ekspresyonu görülmektedir. CD133 immünohistokimya protokolünde negatif kontrol için insan deri dokusu kullanılmıştır. Negatif kontrol gruplarında CD133 ekspresyonu izlenmemiştir (Şekil 4.7.).



Şekil 4.7. Pozitif ve negatif kontrol gruplarında CD133 ekspresyonu (HRP, Mayer'in hematoksileni) A) CD133 için pozitif kontrol, insan deri dokusu. Stratum bazalede sitoplazmik ve membranöz CD133 ekspresyonu görülmüştür (x10). B) CD133 için pozitif kontrol, insan deri dokusu. Stratum bazalede sitoplazmik ve membranöz CD133 ekspresyonu görülmüştür (x40). C) CD133 için negatif kontrol, insan deri dokusu (x10). D) CD133 için negatif kontrol, insan deri dokusu (x40).

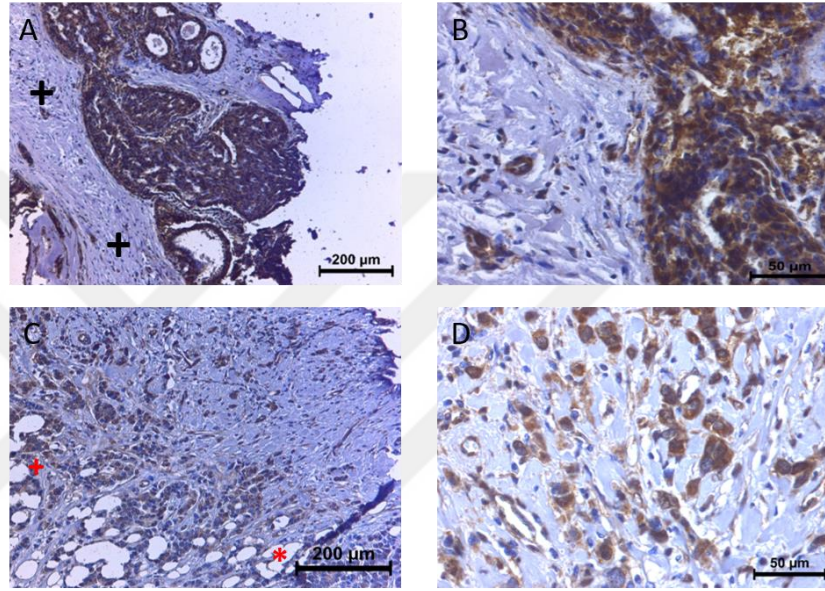
4.2.2. Kanser ve Kontrol Grubu Hastalarına Ait Meme Dokularında CD163 Ekspresyonu

LA hastalarda, tümör dokusu, infiltratif hücrelerden zengin bağ dokusu ile çevrelenmiş çeşitli büyüklüklerdeki karsinoma in situ odaklarından oluşmaktadır. Karsinoma in situ odakları çevresinde bulunan bağ dokusunda CD163 eksprese eden ve etmeyen infiltratif hücreler bulunmaktadır. Makrofaj morfolojisine sahip CD163 eksprese eden hücreler M2 makrofaj olarak değerlendirilmiştir. Karsinoma in situ odakları çevresinde M2 makrofajlar ve diğer infiltratif hücreler (M2 olmayan makrofajlar, lenfositler) bulunmaktadır. M2 makrofajlara ek olarak tümör hücrelerinde de CD163 ekspresyonu görülmektedir (Şekil 4.8.).



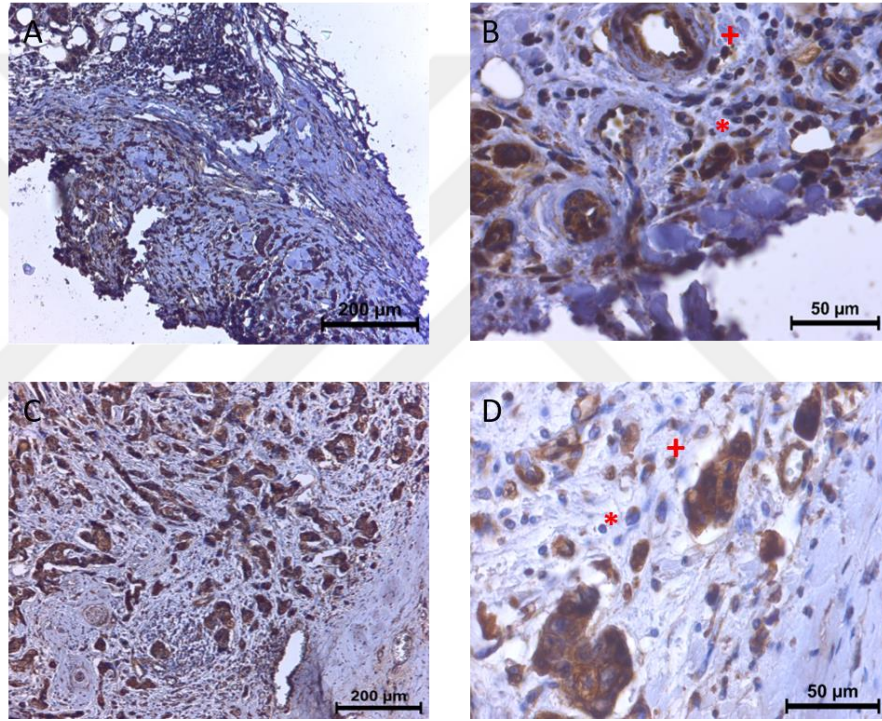
Şekil 4.8. LA grubu hastalarda CD163 ekspresyonu (HRP, Mayer'in hematoksileni) A) 3648.09 numaralı hastada karsinoma in situ ve invazif karsinom odaklarında CD163 ekspresyonu izlenmektedir (x10). B) 3648.09 numaralı hastada makrofajlarda (*) ve tümör hücrelerinde sitoplazmik ve membranöz CD163 ekspresyonu izlenmektedir. (x40) C) 2261.12 numaralı lüminal A alt grubu hastada karsinoma in situ odaklarında CD163 ekspresyonu izlenmektedir (x10). D) 2261.12 numaralı lüminal A alt grubu hastada karsinoma in situ odağı çevresindeki makrofajlarda (*) ve tümör hücrelerinde sitoplazmik ve membranöz CD163 ekspresyonu izlenmektedir (x40).

LB grubu hastaların tümör dokusunda infiltratif hücrelerden zengin bağ dokusu, karsinoma in situ odakları boyunca uzanmaktadır. Bağ dokusunda CD163 ekspresyonu olmayan infiltratif hücreler çoğunluktadır. Dissemine olmuş tümör hücreleri çevresinde CD163 eksprese eden ve etmeyen infiltratif hücreler bulunmaktadır (Şekil 4.9.).



Şekil 4.9. LB grubu hastalarda CD163 ekspresyonu (HRP, Mayer'in hematoksileni) A) 8179.10 numaralı hastada karsinoma in situ odaklarında CD163 ekspresyonu izlenmektedir (x10). Tümör dokusunda infiltratif hücrelerden zengin bağ dokusu (+), karsinoma in situ odakları boyunca uzanmaktadır B) 8179.10 numaralı hastada karsinoma in situ odaklarının çevresindeki makrofajlarda ve tümör hücrelerinde sitoplazmik CD163 ekspresyonu izlenmektedir (x40). C) 12341.10 numaralı hastada invazif meme karsinomu odaklarında CD163 ekspresyonu izlenmektedir (x10). Tümör hücreleri bağ dokusu içine yayılmıştır. Tümör hücreleri, geniş lümen benzeri yapılar oluşturmaktadır (+). Tümör hücrelerinin çevresinde adipositler de bulunmaktadır(*). D) 12341.10 numaralı hastada makrofajlarda ve tümör hücrelerinde sitoplazmik ve membranöz CD163 ekspresyonu izlenmektedir (x40).

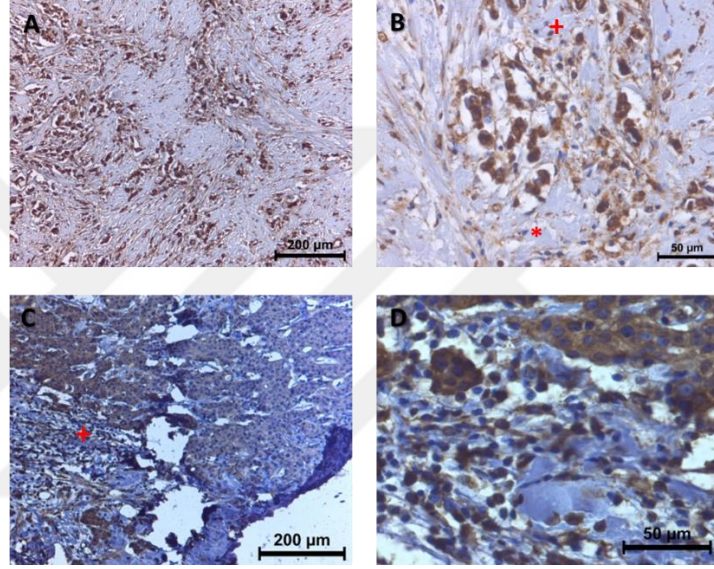
HER2AE grubu hastaların tümör dokusunda bağ dokusu içine dissemine olmuş düzensiz tümör hücre kümeleri bulunmaktadır. Tümör hücre kümeleri CD163 eksprese eden ve etmeyen infiltratif hücrelerle çevrenmiştir. Ancak CD163 eksprese eden hücreler çoğunluktadır. Tümör hücrelerinde de CD163 ekspresyonu görülmektedir. Tümör dokusunda bağ dokusu içine dissemine olmuş düzensiz tümör hücre kümeleri bulunmaktadır. Tümör hücrelerinde de CD163 ekspresyonu görülmektedir (Şekil 4.10.).



Şekil 4.10. HER2AE grubu hastalarda CD163 ekspresyonu (HRP, Mayer'in hematoksileni)

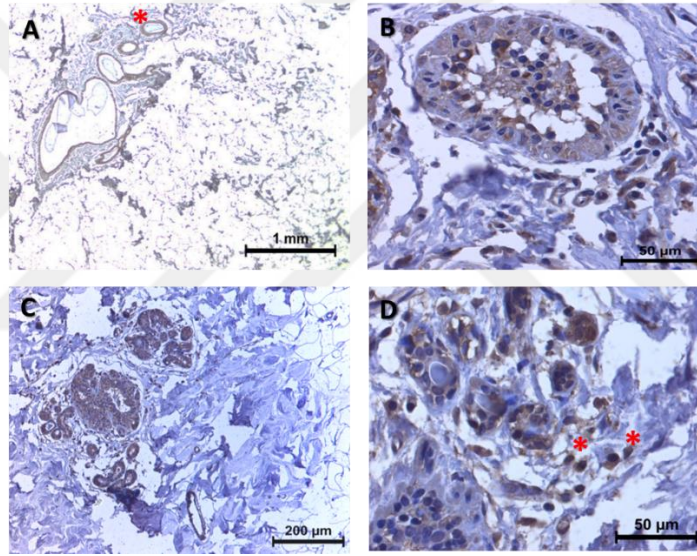
Tümör hücre kümeleri CD163 eksprese eden (+) ve etmeyen (*) infiltratif hücrelerle çevrenmiştir. A) 2278.02 numaralı hastada invazif meme karsinomu odaklarında CD163 ekspresyonu izlenmektedir (x10). B) 2278.02 numaralı hastada tümör hücreleri ve makrofajlarda CD163 ekspresyonu izlenmektedir (x40). C) 14345.01 numaralı hastada invazif meme karsinomu odaklarında CD163 ekspresyonu izlenmektedir (x10). D) 14345.01 numaralı hastada makrofajlarda ve tümör hücrelerinde, sitoplazmik ve membranöz CD163 ekspresyonu izlenmektedir (x40).

TN grubu hastaların tümör dokusunun bağ dokusu bileşeni içine yayılım gösteren tek ve kümeler halinde, CD163 eksprese eden tümör hücreleri görülmektedir. Tümör hücre kümeleri CD163 eksprese eden ve etmeyen infiltratif hücrelerle çevrelenmiştir. Tümör hücrelerini infiltre eden hücreler, CD163 ekspresyonu açısından heterojenite gösterir (Şekil 4.11.).



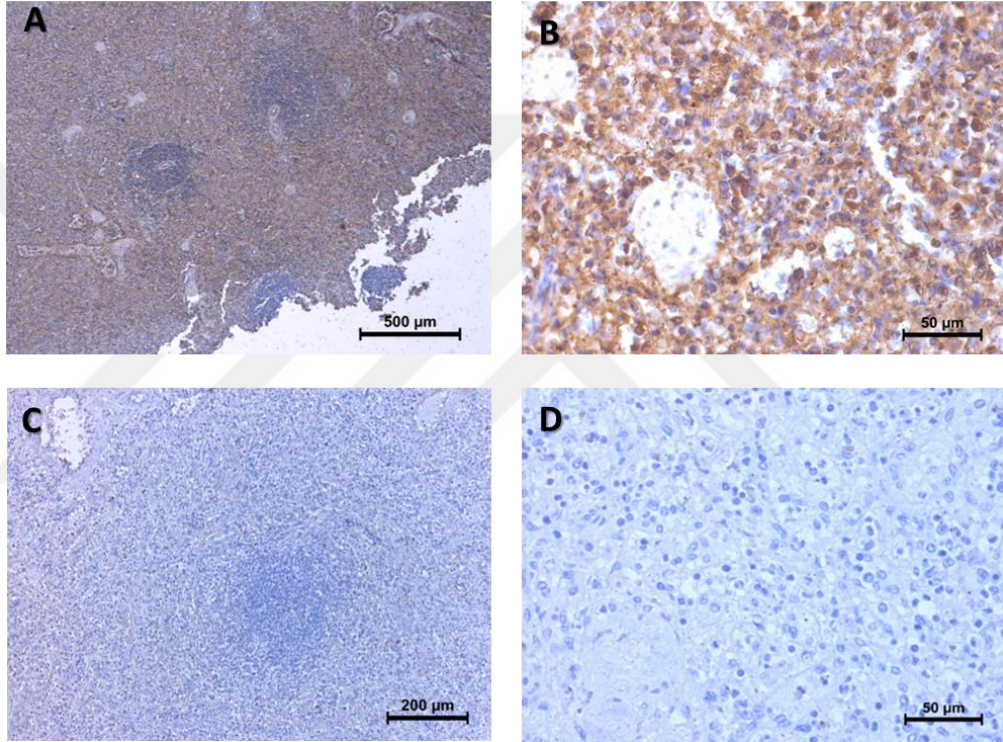
Şekil 4.11. TN grubu hastalarda CD163 ekspresyonu (HRP, Mayer'in hematoxileni) A) 11268.08 numaralı hastada invazif meme karsinomu odaklarında CD163 ekspresyonu izlenmektedir (x10). B) 11268.08 numaralı hastada invazif meme karsinomu odaklarındaki tümör hücreleri ve makrofajlarda sitoplazmik ve membranöz CD163 ekspresyonu izlenmektedir (x40). Tümör hücre kümeleri CD163 eksprese eden (+) ve etmeyen (*) infiltratif hücrelerle çevrelenmiştir C) 7146.10 numaralı hastada invazif meme karsinomu odaklarında CD163 ekspresyonu izlenmektedir (x10). Ağızlaşma eğilimi gösteren, CD163 eksprese eden tümör hücre kümeleri infiltratif hücrelerle karşılaşmıştır (+) D) 7146.10 numaralı hastada tümör hücreleri ve makrofajlarda sitoplazmik ve membranöz CD163 ekspresyonu izlenmektedir (x40).

Kontrol hastalarından elde edilen meme dokusunun büyük kısmı bağ dokusu ve adipositlerden oluşur. Bağ dokusu bileşenleri arasında az miktarda lobül yapısı vardır. Lobüler hücreler CD163 ekspresyonu açısından pozitifdir ve lobül içinde infiltratif hücreler bulunur. İnfiltratif hücrelerin yoğunluğu, kanser grubuna göre düşüktür. Kontrol hastası meme dokusunda, sıkı bağ dokusu içinde az miktarda lobül yapısına rastlanmıştır. Lobüler hücrelerin CD163 ekspresyon şiddeti ve lobüldeki infiltratif hücre sayısı, kanser grubuna göre düşüktür. Kontrol meme dokusunda M2 makrofaj hakimiyeti vardır (Şekil 4.12.).



Şekil 4.12. Kontrol grubu hastalarında CD163 ekspresyonu (HRP, Mayer'in hematoxileni) A) 15623.12 numaralı hastada meme dokusunda CD163 ekspresyonu izlenmektedir(x2.5). Bağ dokusu bileşenleri arasında az miktarda lobül yapısı vardır (*) B) 15623.12 numaralı hastada meme dokusunda sitoplazmik CD163 ekspresyonu izlenmektedir (x40). C) 6226.15 numaralı hastada meme dokusunda CD163 ekspresyonu izlenmektedir (x10). D) 6226.15 numaralı hastada meme dokusunda sitoplazmik CD163 ekspresyonu izlenmektedir (x40). Kontrol meme dokusunda M2 makrofaj hakimiyeti vardır (*)

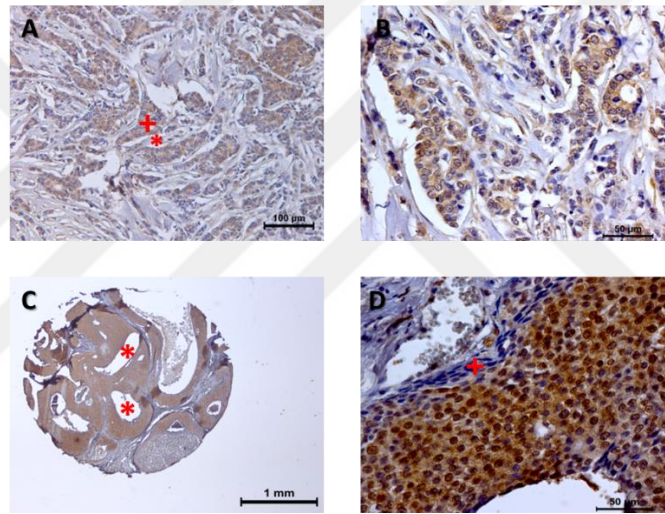
CD163 immünohistokimya protokolünde pozitif kontrol için insan dalak dokusu kullanılmıştır. Dalaktaki makrofajların büyük bölümü CD163 eksprese etmektedir. Ancak eritrositler ve trabeküllerde CD163 ekspresyonu yoktur. CD163 immünohistokimya protokolünde negatif kontrol için insan dalak dokusu kullanılmıştır. Negatif kontrol gruplarında CD163 ekspresyonu izlenmemiştir (Şekil 4.13.).



Şekil 4.13. Pozitif ve negatif kontrol gruplarında CD163 ekspresyonu (HRP, Mayer'in hematoxileni) A) CD163 için pozitif kontrol, insan dalak dokusu (x5). B) CD163 için pozitif kontrol, insan dalak dokusu (x40). C) CD163 için negatif kontrol, insan dalak dokusu (x10)ç D) CD163 için negatif kontrol, insan dalak dokusu (x40).

4.2.3. Kanser ve Kontrol Grubuna Ait Meme Dokularında CXCR1 Ekspresyonu

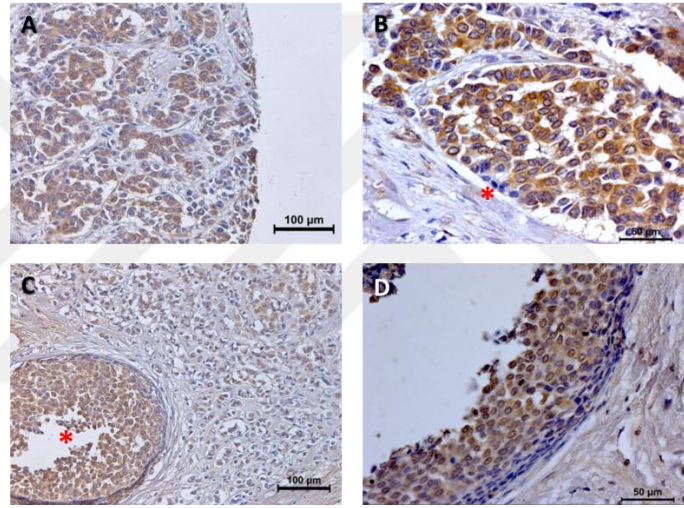
CXCR1 grubu hastaların tümör hücreleri bağ dokusunun içinde kümeler oluşturmaktadır. Tümör odaklarında lümene benzer yapılar bulunmaktadır. Hücrelerin çekirdek/sitoplazma oranında artış vardır. Tümör hücreleri lümenleri olan karsinoma in situ odakları oluşturmaktadır. Karsinoma in situ odağının periferindeki yassı hücrelerde boyanma zayıftır ya da boyanma yoktur. Ancak lümen tarafındaki hücrelerde belirgin boyanma vardır. (Şekil 4.14.)



Şekil 4.14. LA grubu hastalarda CXCR1 ekspresyonu (HRP, Mayer'in hematoksileni) A)

1433.10 numaralı hastada invazif karsinom odaklarında CXCR1 ekspresyonu izlenmektedir (x20). Tümör hücreleri bağ dokusunun içinde kümeler oluşturmaktadır (+). Tümör odakları bağ dokusu ve kollajen fibriller ile birbirlerinden ayrılmıştır (*). B) 1433.10 numaralı hastada sitoplazmik ve membranöz CXCR1 ekspresyonu izlenmektedir. (x40) C) 5228.12 numaralı hastada karsinoma in situ odaklarında (*) CXCR1 ekspresyonu izlenmektedir (x2.5). D) 5228.12 numaralı hastada sitoplazmik ve membranöz CXCR1 ekspresyonu izlenmektedir (x40). Karsinoma in situ odağının periferindeki yassı hücrelerde boyanma zayıftır ya da boyanma yoktur (+)

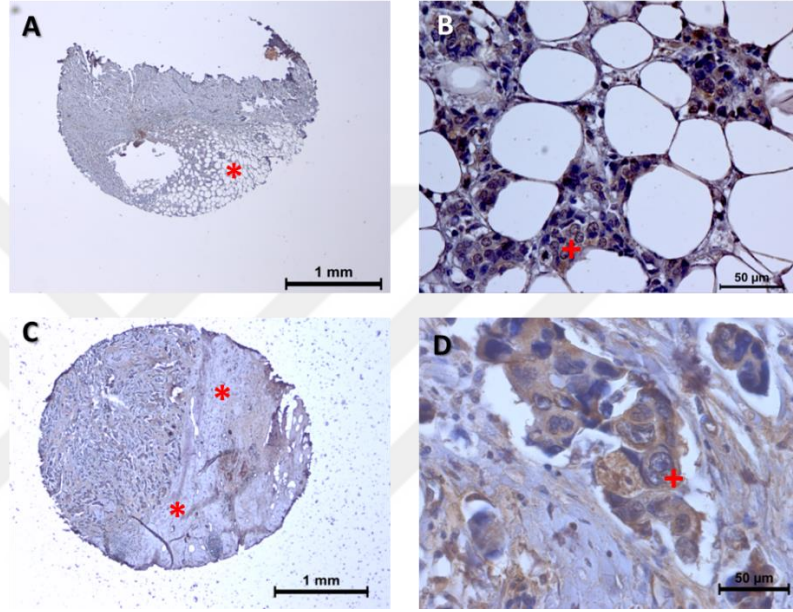
LB grubu hastaların tümör hücreleri bağ dokusunun içinde karsinoma in situ odakları oluşturmaktadır. Karsinoma in situ odakları lümene benzer yapılar oluşturmaktadır. Karsinoma in situ odaklarındaki bazal hücrelerde boyanma zayıftır (+1) ya da boyanma görülmemektedir. Ancak bazal olmayan hücrelerde şiddetli boyanma vardır. Tümör hücreleri bağ dokusu içinde karsinoma in situ odağı oluşturmuştur. Tümör kitlesinin bazalindeki yassı hücrelerde boyanma yoktur. Ancak lümen tarafındaki apikal hücrelerde belirgin boyanma vardır. (Şekil 4.15.)



Şekil 4.15. LB grubu hastalarda CXCR1 ekspresyonu (HRP, Mayer'in hematoksileni) A)

12341.10 numaralı hastada karsinoma in situ ve invazif karsinom odaklarında CXCR1 ekspresyonu izlenmektedir (x20). Karsinoma in situ odaklarındaki bazal hücrelerde boyanma zayıftır (+1) ya da boyanma görülmemektedir (*). B) 12341.10 numaralı hastada karsinoma in situ odağında sitoplazmik ve membranöz CXCR1 ekspresyonu izlenmektedir (x40). C) 3882.10 numaralı hastada invazif karsinom odaklarında ve karsinoma in situ odağında CXCR1 ekspresyonu izlenmektedir (x20). Karsinoma in situ odağı ortasına lümen benzeri bir yapı bulunmaktadır (*). D) 3882.10 numaralı hastada karsinoma in situ odağında sitoplazmik ve membranöz CXCR1 ekspresyonu izlenmektedir (x40).

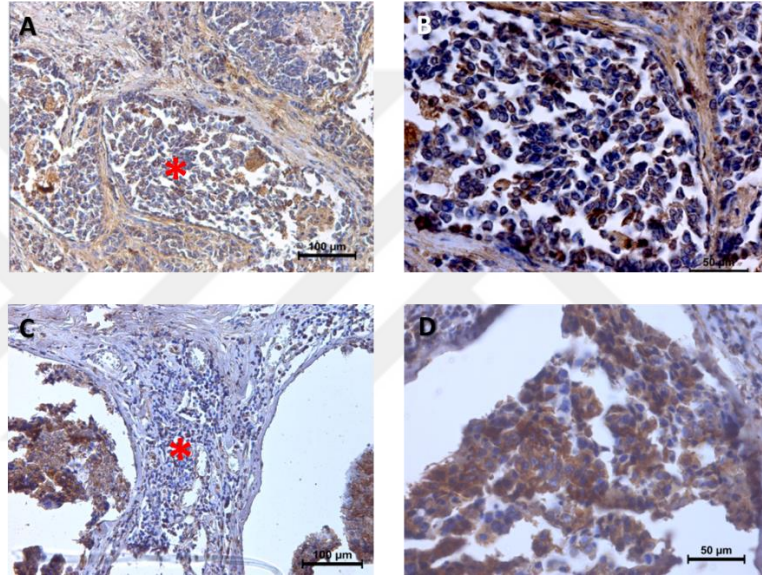
HER2AE grubuna ait bazı spesimenler adipoz dokudan zengindir (*). Adipositlerin arasında boyanmış tümör hücreleri görünmektedir (+). Tümör dokusu kalın bağ dokusu ile tümör kümelerine ayrılmıştır. Tümör kümeleri dev hücrelerden oluşmaktadır. Dev hücrelerin nükleus sitoplazma oranı yüksektir. (Şekil 4.16.)



Şekil 4.16. HER2AE grubu hastalarda CXCR1 ekspresyonu (HRP, Mayer'in hematoksileni)

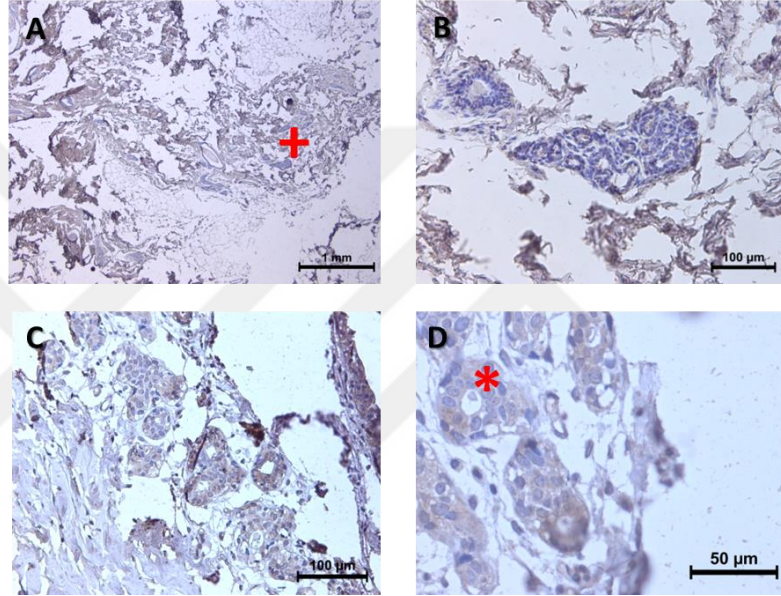
- A) 2278.12 numaralı hastada invazif karsinom odaklarında CXCR1 ekspresyonu izlenmektedir (x2.5). Spesimen adipoz dokudan zengindir (*).
- B) 2278.12 numaralı hastada invazif karsinom odaklarında sitoplazmik CXCR1 ekspresyonu izlenmektedir (x40). Adipositlerin arasında boyanmış tümör hücreleri görünmektedir (+).
- C) 14345.01 numaralı hastada invazif karsinom odaklarında CXCR1 ekspresyonu izlenmektedir (x2.5). Hastada tümör dokusu kalın bağ dokusu ile tümör kümelerine ayrılmıştır (*).
- D) 14345.01 numaralı hastada invazif karsinom odaklarında sitoplazmik ve membranöz CXCR1 ekspresyonu izlenmektedir (x40). Tümör kümeleri dev hücrelerden oluşmaktadır. Dev hücrelerin nükleus sitoplazma oranı yüksektir(+).

TN grubu hastalara ait spesimenlerdeki tümör hücreleri polaritelerini kaybederek düzensiz tümör kitleleri oluşturmuş izlenimi vermektedir. Tümör kitleleri arasında bağ dokusu elemanları bulunmaktadır. Tümör hücrelerinin çekirdek/sitoplazma oranı artmıştır. Tümör hücreleri polaritelerini kaybederek düzensiz tümör kitleleri oluşturmuştur. Tümör kitleleri arasında infiltratif hücreden zengin bağ dokusu bulunmaktadır. Tümör hücreleri farklı şiddetlerde boyanmıştır (Şekil 4.17.).



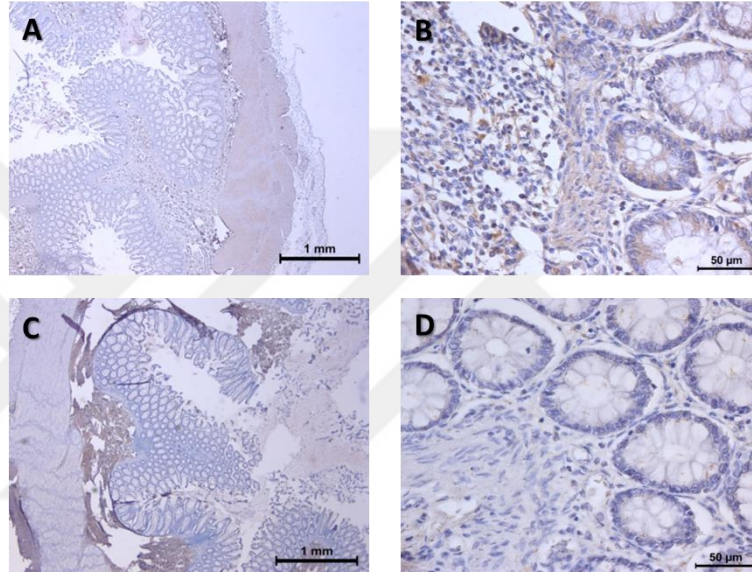
Şekil 4.17. TN grubu hastalarda CXCR1 ekspresyonu (HRP, Mayer'in hematoksileni) A) 7562.01 numaralı hastada invazif karsinom ve karsinoma in situ odaklarında (*) CXCR1 ekspresyonu izlenmektedir (x20). B) 7562.01 numaralı hastada sitoplazmik ve membranöz CXCR1 ekspresyonu izlenmektedir (x40). C) 11268.08 numaralı hastada karsinoma in situ odakları izlenmektedir (x20). Tümör kitleleri arasında infiltratif hücreden zengin bağ dokusu bulunmaktadır (*). D) 11268.08 numaralı triple negatif alt grubu hastada sitoplazmik ve membranöz CXCR1 izlenmektedir. (x40)

Kontrol grubu hastalarından elde edilen meme dokusu, yağ ve bağ dokusundan zengindir. Lobül miktarı azdır. Lobül yapısındaki alveol ve intralobüler kanal hücrelerinin CXCR1 ekspresyonu kanser grubuna göre daha düşük şiddettedir. İntralobüler kanal epitelinin CXCR1 ekspresyonu, kanser grubuna göre daha düşük şiddettedir (Şekil 4.18.).



Şekil 4.18. Kontrol grubu hastalarında CXCR1 ekspresyonu (HRP, Mayer'in hematoksileni) A) 4986.13 numaralı kontrol grubu hastada meme dokusunda CXCR1 ekspresyonu izlenmektedir. Lobül (+) miktarı azdır (x2.5). B) 4986.13 numaralı kontrol grubu hastada meme dokusunda zayıf sitoplazmik CXCR1 ekspresyonu izlenmektedir (x20). C) 6226.15 numaralı kontrol grubu hastada meme dokusunda CXCR1 ekspresyonu izlenmektedir(x20). D) 6226.15 numaralı kontrol grubu hastada intralobüler kanal epitelinde(*) zayıf sitoplazmik CXCR1 ekspresyonu izlenmektedir (x40).

CXCR1 immünohistokimya protokolünde pozitif kontrol için insan kolon dokusu kullanılmıştır. Kolon epitel altı bağ dokusu ve serozasında CXCR1 eksprese eden makrofajlar görülmüştür. CXCR1 immünohistokimya protokolünde negatif kontrol için insan kolon dokusu kullanılmıştır. Negatif kontrol gruplarında spesifik CXCR1 ekspresyonu izlenmemiştir (Şekil 4.19.).



Şekil 4.19. Pozitif ve negatif kontrol gruplarında CXCR1 ekspresyonu (HRP, Mayer'in hematoxileni) A) CXCR1 için pozitif kontrol, insan kolon dokusu (x2.5). B) CXCR1 için pozitif kontrol, insan kolon dokusu. Makrofajlarda sitoplazmik CXCR1 ekspresyonu görülmektedir (x40). C) CXCR1 için negatif kontrol, insan kolon dokusu. Epitel altı bağ dokusunda boyanma spesifik boyanma olarak değerlendirilmemiştir (x10). D) CXCR1 için negatif kontrol, insan kolon dokusu (x40).

4.3. Kanser ve Kontrol Grubunun ER, PR,HER2 Durumları ve Ki67 indeksi

HER2AE ve TN moleküler alt tiplerdeki hastalarda ER ekspresyonu yoktur. LA moleküler alt tipteki hastaların n=1'inde, LB moleküler alt tipindeki hastaların n=3'ünde ER ekspresyonu görülmemiştir. Ancak bu hastalarda PR ekspresyonu vardır. (Bkz. Tablo 4.4.)

Tablo 4.4. Hastaların ER ekspresyon durumları

			ER		Total
			NEGATİF	POZİTİF	
Tip	LA	Sayı	1	21	22
		% (alt tip içinde)	4,5%	95,5%	100,0%
	LB	Sayı	3	33	36
		% (alt tip içinde)	8,3%	91,7%	100,0%
	HR	Sayı	5	0	5
		% (alt tip içinde)	100,0%	0,0%	100,0%
	TN	Sayı	7	0	7
		% (alt tip içinde)	100,0%	0,0%	100,0%
Total		Sayı	16	54	70
		%	22,9%	77,1%	100,0%

HER2AE ve TN moleküler alt tiplerdeki hastalarda PR ekspresyonu yoktur. LA moleküler alt tipteki hastaların n=2'sinde, LB moleküler alt tipindeki hastaların n=8'inde PR ekspresyonu görülmemiştir. Ancak bu hastalarda ER ekspresyonu vardır. (Bkz. Tablo 4.5.)

Tablo 4.5. Hastaların PR ekspresyon durumları

			PR		Toplam
			NEGATİF	POZİTİF	
Moleküler alt tip	LA	Sayı	2	20	22
		% (alt tip içinde)	9,1%	90,9%	100,0%
	LB	Sayı	8	28	36
		% (alt tip içinde)	22,2%	77,8%	100,0%
	HER2AE	Sayı	5	0	5
		% (alt tip içinde)	100,0%	0,0%	100,0%
	TN	Sayı	7	0	7
		% (alt tip içinde)	100,0%	0,0%	100,0%
Total		Sayı	22	48	70
		%	31,4%	68,6%	100,0%

HER2AE moleküler alt tipindeki hastaların tümünde (n=5) HER2 ekspresyonu vardır. LA (n=22) ve TN (n=7) gruplarındaki hastalarda, HER2 ekspresyonu yoktur. LB moleküler alt tipindeki n=2 hastada HER2 ekspresyonu görülmemiştir. Bu 2 hastada Ki67 indeksi %14'ten büyüktür. (Bkz. Tablo 4.6.)

Tablo 4.6. Hastaların HER2 ekspresyon durumları

			PR		Toplam
			NEGATİF	POZİTİF	
Moleküler alt tip	LA	Sayı	22	0	22
		% (alt tip içinde)	100,0%	0,0%	100,0%
	LB	Sayı	2	34	36
		% (alt tip içinde)	5,6%	94,4%	100,0%
	HER2AE	Sayı	0	5	5
		% (alt tip içinde)	0,0%	100,0%	100,0%
	TN	Sayı	7	0	7
		% (alt tip içinde)	100,0%	0,0%	100,0%
Total		Sayı	31	39	70
		%	44,3%	55,7%	100,0%

Hastalardan en yüksek Ki67 pozitiflik oranı (Ki67>%14) LB grubundadır (n=12, %41,4). LA grubu hariç, en düşük Ki67 ekspresyon yüzdesi ise TN grubunda saptanmıştır (n=1, %14,3). Ancak hastaların Ki67 indeksleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır (Ki-kare testi, Pearson ki-kare=2,015, p=0,365). Hastalardaki Ki67 indeksi pozitiflik oranları tablo 4.7.'de belirtilmiştir.

Tablo 4.7. Hastaların Ki67 indeksleri

			Ki67>%14		Toplam
			NEGATİF	POZİTİF	
Moleküler alt tip	LA	Sayı	22	0	22
		% (alt tip içinde)	100,0	0,0	100,0%
	LB	Sayı	17	12	29
		% (alt tip içinde)	58,6%	41,4	100,0%
	HER2AE	Sayı	3	1	4
		% (alt tip içinde)	75,0	25,0	100,0%
	TN	Sayı	6	1	7
		% (alt tip içinde)	85,7%	14,3	100,0%
Total		Sayı	48	14	62
		%	77,4%	22,6%	100,0%

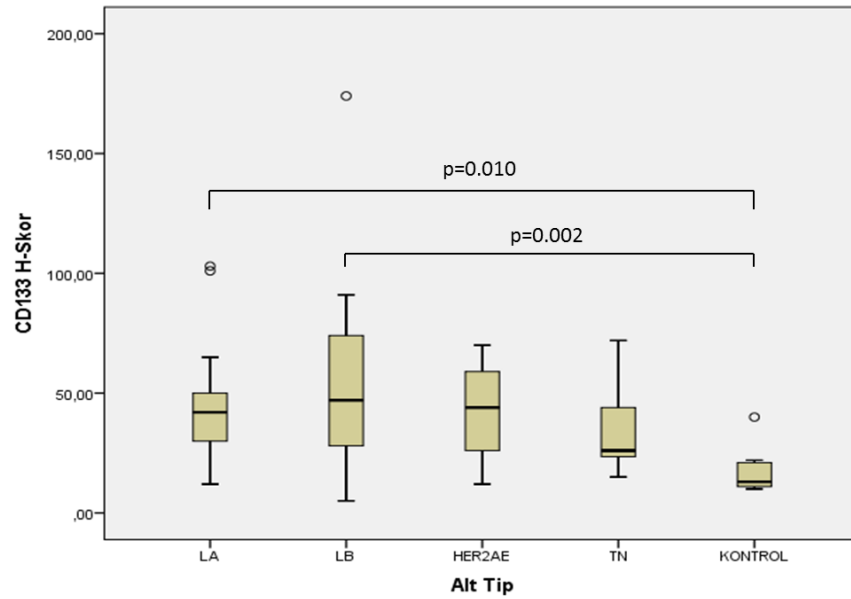
4.4. Hastaların CD133 Ekspresyonu Açısından Değerlendirilmesi

Hastalarda CD133 antijenine yönelik uygulanan immünohistokimya yöntemi, H-skoru ile değerlendirilmiştir. Hasta ve kontrol gruplarının H-skoru sonuçlarına ilişkin parametreler tablo 4.8. ve şekil 4.20.'de gösterilmiştir. En yüksek ortalama değeri (Ortanca=47,15100, 27,45700- 74,78125) LB grubundadır. En düşük ortalama değer (Ortanca=12,82900, 10,49350-21,24650) ise kontrol grubundadır.

Kanser ve kontrol gruplarındaki hastaların CD133 H-skorları, Kruskal-Wallis testi ile karşılaştırılmıştır ve gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur. (p=0.004).LA-Kontrol ve LB-Kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır (p=0.010 ve p=0.002).

Tablo 4.8. CD133 antijeni için H-skoru değerleri

		LA	LB	HER2AE	TN	Kontrol
N	Değer Sayısı	21	32	4	7	9
	Eksik Değer	1	4	1	0	1
Ortalama		45,33033	51,28947	42,56675	35,53214	17,28144
Ortanca		41,66700	47,15100	44,35450	26,29900	12,82900
Standart Sapma		22,942259	32,98529	23,778046	20,03719	9,746919
Minimum		11,655	5,196	12,041	14,963	9,918
Maksimum		103,126	174,110	69,517	71,530	40,415
Persentiller	25	29,67850	27,45700	19,12475	22,93200	10,49350
	50	41,66700	47,15100	44,35450	26,29900	12,82900
	75	53,19250	74,78125	64,22100	53,42900	21,24650

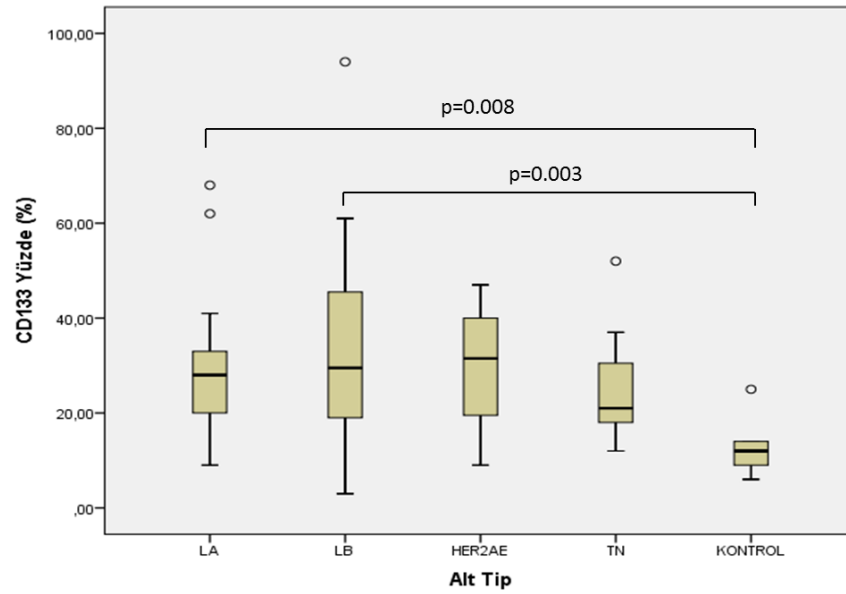
**Şekil 4.20.** Hastaların CD133 H-skoru değerleri için kutu çizgi grafiği

CD133 antijenin değerlendirilmesinde H-Skor'a ek olarak, CD133 ile boyanan hücre sayısı da hesaplanmıştır. CD133 eksprese eden hücrelerin yüzdesi için en yüksek ortanca değer (28,8305; 12,8958-43,7033) HER2AE moleküler alt tipinde saptanmıştır. CD133 eksprese eden hücrelerin yüzdesi için en düşük değer (11,9800; 7,9535-13,7705) kontrol grubunda saptanmıştır.(Bkz. Tablo 4.9. ve Şekil 4.21.)

Kanser ve kontrol grubu arasında, CD133 ekspresyonu yüzdeleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur (Kruskal-Wallis testi, $p=0.006$). LA-Kontrol ve LB-Kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır ($p=0.008$ ve $p=0.003$).

Tablo 4.9. CD133 antijeni ekspresyonu yüzde değerleri

		LA	LB	HER2AE	TN	Kontrol
N	Değer Sayısı	21	32	4	7	9
	Eksik Değer	1	4	1	0	1
Ortalama		30,5138	33,3754	28,4765	25,8959	12,5846
Ortanca		28,9310	28,0825	28,8305	18,6490	11,9800
Standart Sapma		14,19340	19,07426	16,02785	14,17503	7,12835
Minimum		9,02	3,46	8,90	12,47	6,11
Maksimum		67,74	93,91	47,35	52,31	30,05
Persentiller	25	20,3660	18,4858	12,8958	17,6480	7,9535
	50	28,9310	28,0825	28,8305	18,6490	11,9800
	75	36,0485	45,9613	43,7033	38,0000	13,7705



Şekil 4.21. CD133 antijeni ekspresyonu yüzde değerleri için kutu çizgi grafiği

4.5. Hastaların M2 Makrofaj Dağılımı Açısından Değerlendirilmesi

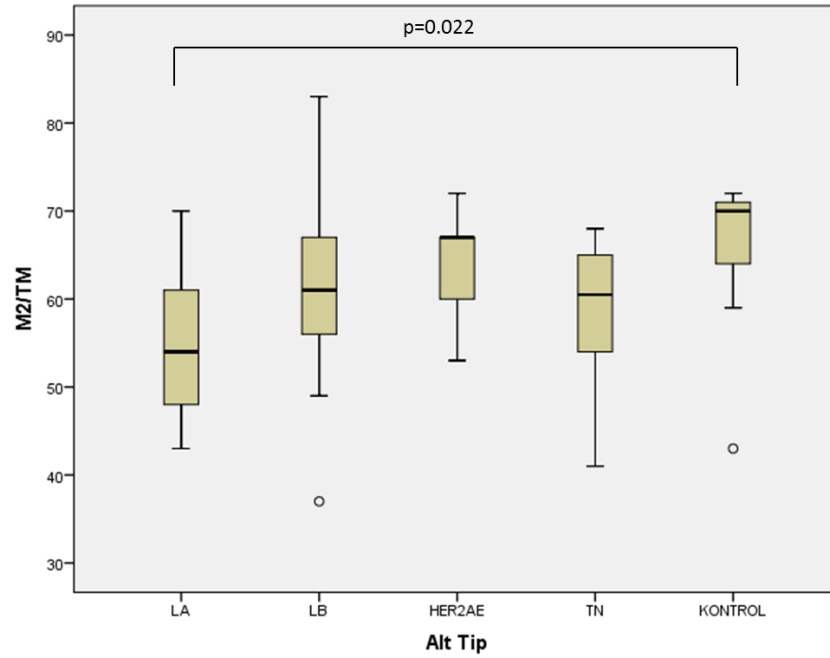
Kanser hastalarına ait tümör dokusundaki makrofaj infiltrasyonu ve kontrol hastalarına ait meme dokusundaki makrofajlar, M2 tipindeki makrofaj işaretçisi olan CD163 ile immunohistokimyasal olarak boyanmıştır. M2 tipindeki makrofajların, morfolojik olarak makrofaj olduğu belirlenen hücre sayısına bölünmesi ile M2/Tüm makrofaj popülasyonu oranı (M2/TM) hesaplanmıştır (Bkz. Formül 4.5.1).

$$\text{M2/TM oranı} = \text{M2 hücre sayısı} / \text{Tüm makrofajların sayısı} \quad (4.5.1)$$

Kanser ve kontrol grubu hastalarının ortalanca M2/TM oranları karşılaştırıldığında, en düşük ortalanca değer LA grubunda (53,84600; 48,10100-60,92000), en yüksek ortalanca değer ise kontrol grubundadır (70,27000; 59,21100-72,41400) (Bkz. Tablo 4.10., Şekil 4.22). Kanser ve kontrol grubu hastalarının ortalanca M2/TM oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur (Kruskal-Wallis testi, $p=0.022$). Yapılan ikili analizlerde LA ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p=0.036$).

Tablo 4.10. Hastaların M2/TM oranlarına ilişkin tablo

		LA	LB	HER2AE	TN	Kontrol
N	Değer Sayısı	19	29	5	6	7
	Eksik Değerler	3	7	0	1	3
Ortalama		54,810	61,3784	63,9166	58,3645	65,2294
Ortanca		53,846	61,3330	66,9490	60,7480	70,2700
Standart Sapma		7,9904	9,21470	7,33787	9,85534	10,6876
Minimum		42,857	37,179	53,191	41,176	43,284
Maksimum		70,000	83,333	72,000	68,421	72,500
Persentiller	25	48,101	55,004	56,663	50,7940	59,2110
	50	53,846	61,333	66,949	60,7480	70,2700
	75	60,920	66,670	69,654	65,9257	72,4140

**Şekil 4.22.** Hastaların M2/TM oranlarına ilişkin kutu çizgi grafiği

M2/TM oranlarına ek olarak, tüm makrofaj sayısından M2 makrofaj sayısı çıkarılarak M1 makrofaj sayısına ulaşılmıştır. Daha sonra M2 makrofaj sayısının M1 makrofaj sayısına bölünmesiyle M2/M1 makrofaj oranına ulaşılmıştır. (Bkz. Formül 4.5.2 ve Formül 4.5.3)

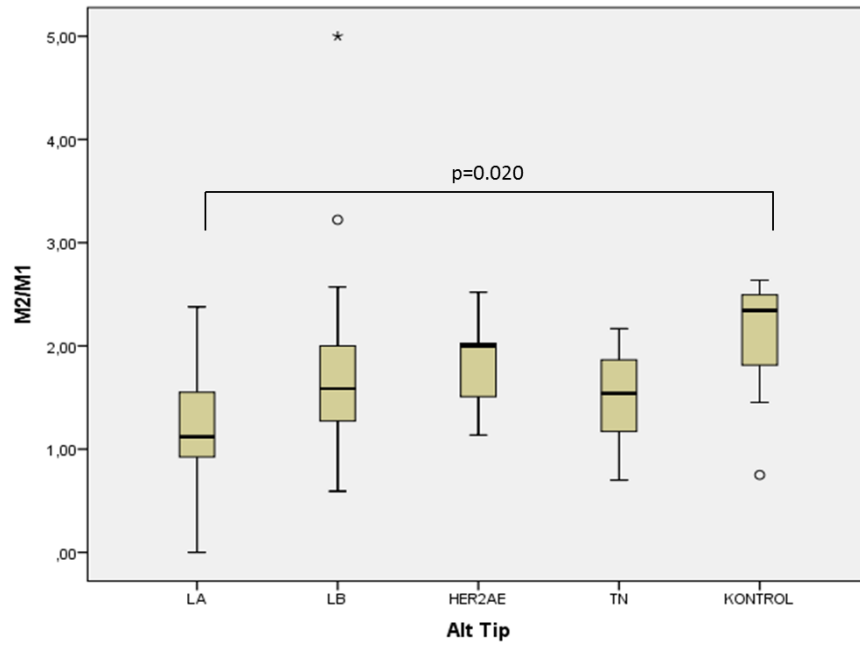
M1 makrofaj sayısı= Tüm makrofaj sayısı –M2 makrofaj sayısı (4.5.2)

M2/M1 oranı= M2 makrofaj sayısı /M1 makrofaj sayısı (4.5.3)

Kanser ve kontrol grubu hastalarının ortalanca M2/M1 oranları karşılaştırıldığında, en düşük ortalanca değer LA grubunda (Ortanca=1,1205, 0,9240-1,5550), en yüksek ortalanca değer ise kontrol grubundadır (Ortanca=2,3430, 1,4520-2,6250). (Bkz. Tablo 4.11., Şekil 4.23.) Kanser ve kontrol grubu hastalarının ortalanca M2/M1 oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur. (Kruskal-Wallis testi, p=0.020).

Tablo 4.11. Hastaların M2/M1 oranlarına ilişkin tablo

		LA	LB	HERAE	TN	Kontrol
N	Değer Sayısı	20	29	5	6	7
	Eksik Değer	2	7	0	1	3
Ortalama		1,2270	1,7666	1,8380	1,4972	2,0494
Ortanca		1,1205	1,5860	2,0000	1,5400	2,3430
Standart Sapma		,52319	,83574	,53113	,52431	,69785
Minimum		0,00	,59	1,14	,70	,75
Maksimum		2,38	5,00	2,52	2,17	2,64
Persentiller	25	,9240	1,2235	1,3220	1,0533	1,4520
	50	1,1205	1,5860	2,0000	1,5400	2,3430
	75	1,5550	2,0000	2,2730	1,9405	2,6250



Şekil 4.23. Hastaların M2/M1 oranlarına ilişkin kutu çizgi grafiği

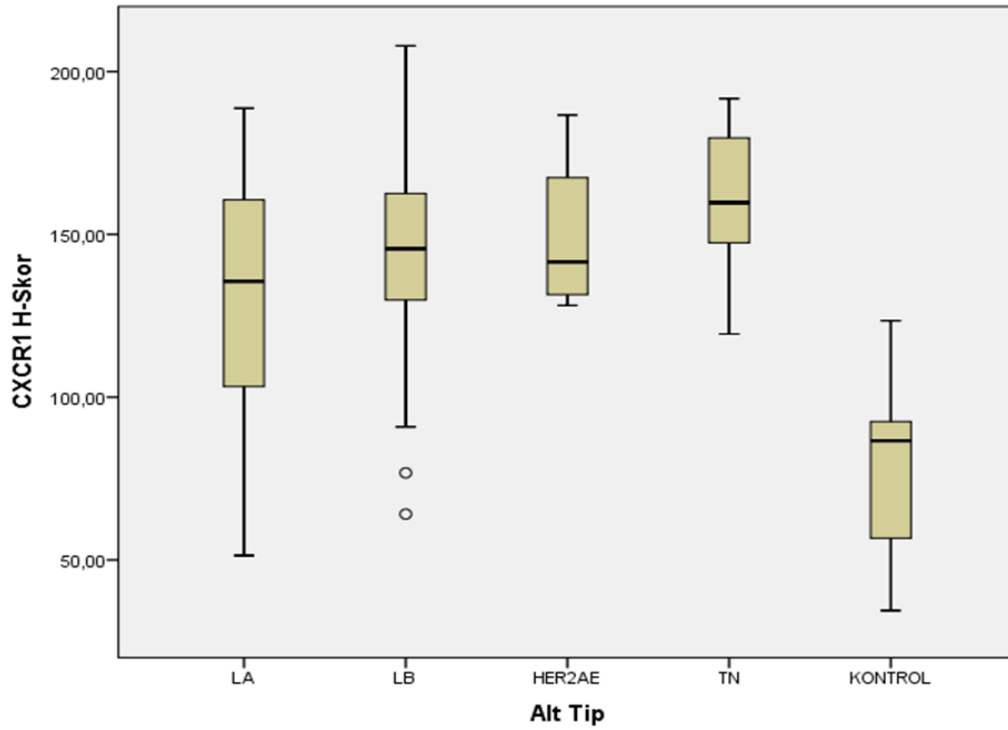
4.6 Hastaların CXCR1 Ekspresyonu Açısından Değerlendirilmesi

Hastalarda CXCR1 antijenine yönelik uygulanan immünohistokimyasal yöntemi, H-skoru ile değerlendirilmiştir. Hasta ve kontrol gruplarının H-skoru sonuçlarına ilişkin parametreler tablo 4.12. ve şekil 4.24.'de gösterilmiştir. En yüksek ortalama değeri (Ortanca=159,72; 140,00-181,4120) TN grubundadır. En düşük ortalama değer (Ortanca=86,5965; 47,8688-95,0928) ise kontrol grubundadır.

Kanser ve kontrol gruplarındaki hastaların CXCR1 H-skorları, Kruskal-Wallis testi ile karşılaştırılmıştır ve gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur. ($p=0.002$). LB-Kontrol ve TN-Kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır ($p=0.002$ ve $p=0.002$).

Tablo 4.12. CXCR1 antijeni için H-skoru değerlerine ilişkin tablo

		LA	LB	HERAE	TN	Kontrol
N	Değer Sayısı	21	34	4	7	8
	Eksik Değer	1	2	1	0	2
Ortalama		129,4520	144,9947	149,4635	160,7047	78,6898
Ortanca		135,5550	145,5755	141,5150	159,7200	86,5965
Standart Sapma		41,55558	30,77152	26,15451	25,33205	29,55648
Minimum		51,35	64,09	128,16	119,42	34,47
Maksimum		188,71	207,92	186,67	191,73	123,50
Persentiller	25	94,7640	128,7818	129,8413	140,0000	47,8688
	50	135,5550	145,5755	141,5150	159,7200	86,5965
	75	161,1405	163,7635	177,0343	181,4120	95,0928

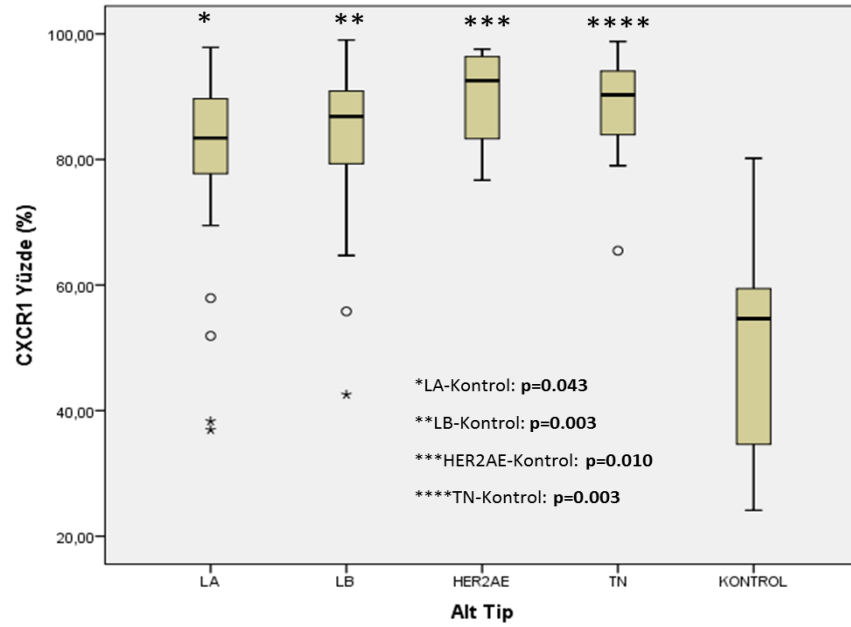
**Şekil 4.24.** CXCR1 antijeni için H-skoru değerlerine ilişkin kutu çizgi grafiği

CXCR1 antijeninin değerlendirilmesinde H-Skor'a ek olarak, CXCR1 ile boyanan hücre sayısı da hesaplanmıştır. CXCR1 eksprese eden hücrelerin yüzdesi için en yüksek ortanca değer (Ortanca=92,5605, 80,0075-96,9798) HER2AE moleküler alt tipinde saptanmıştır. CXCR1 eksprese eden hücrelerin yüzdesi için en düşük değer (Ortanca=54,6445, 29,7023-60,6320) kontrol grubunda saptanmıştır. (Bkz. Tablo 4.13. ve Şekil 4.25.)

Kanser ve kontrol grubu arasında, CXCR1 ekspresyonu yüzdeleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur (Kruskal-Wallis testi, $p=0.001$). Kontrol grubu ile kanser gruplarının tümü arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır (LA-kontrol farkı için $p=0.043$, LB-kontrol farkı için $p=0.003$, HER2AE-kontrol farkı için $p=0.010$, TN-kontrol farkı için $p=0.003$).

Tablo 4.13. CXCR1 antijeni ekspresyonu yüzde değerleri

		LA	LB	HER2AE	TN	Kontrol
N	Değer Sayısı	21	34	4	7	8
	Eksik Değer	1	2	1	0	2
Ortalama		78,0352	82,6519	89,8493	87,2250	50,2194
Ortanca		83,4170	86,8405	92,5605	90,2770	54,6445
Standart Sapma		17,49508	11,94054	9,33017	11,40910	18,85220
Minimum		36,94	42,54	76,70	65,47	24,12
Maksimum		97,85	99,01	97,58	98,78	80,18
Persentiller	25	73,6090	78,9948	80,0075	79,0000	29,7023
	50	83,4170	86,8405	92,5605	90,2770	54,6445
	75	89,6995	90,9268	96,9798	94,4830	60,6320



Şekil 4.25. CXCR1 antijeni ekspresyonu yüzde değerleri için kutu çizgi grafiği

4.7. Hastaların CD133 H-Skoru, M2/TM Oranı ve CXCR1 H-Skoru Değerlerinin Birbirleriyle İlişkisinin İncelenmesi

Kanser ve kontrol grubu hastalarının CD133 H-Skoru değeri ile CXCR1 H-Skoru değeri arasında istatistiksel olarak ancak zayıf pozitif korelasyon (Korelasyon katsayısı=0.249) saptanmıştır (Sig. 2-kuyruklu = 0.035).

Kanser ve kontrol grubu hastalarının CD133 H-Skoru değeri ile M2/TM oranı arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmamıştır (Sig. 2-kuyruklu = 0,545).M2/TM oranı ile CXCR1 H-Skoru değeri arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmamıştır (Sig. 2-kuyruklu = 0.972) (Bkz. Tablo 4.14.).

Tablo 4.14. Hastaların CD133 H-Skoru, M2/TM oranı ve CXCR1 H-Skoru değerlerinin birbirleriyle ilişkisinin incelenmesi

			CD133 H-skoru	M2/TM	CXCR1 H-skoru
Spearman's rho	CD133 H-Skor	Korelasyon katsayısı	1,000	-,080	,249*
		Sig. (2-kuyruklu)		,545	,035
		N	73	60	72
	M2/TM	Korelasyon katsayısı	-,080	1,000	,005
		Sig. (2-kuyruklu)	,545		,972
		N	60	66	60
	CXCR1 H-Skor	Korelasyon katsayısı	,249*	,005	1,000
		Sig. (2-kuyruklu)	,035	,972	
		N	72	60	74

Kanser ve kontrol grubu hastalarının CD133 ekspresyon yüzdesi ile CXCR1 ekspresyonu yüzde değerleri arasında istatistiksel olarak ancak zayıf pozitif korelasyon (Korelasyon katsayısı=0.342) saptanmıştır (Sig. 2-kuyruklu = 0.003).

Kanser ve kontrol grubu hastalarının CD133 ekspresyon yüzdesi ile M2/TM oranı arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmamıştır (Sig. 2-kuyruklu = 0.402). M2/TM oranı ile CXCR1 ekspresyon yüzdesi arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmamıştır (Sig. 2-kuyruklu = 0.853) (Bkz. Tablo 4.15.).

Tablo 4.15. Hastaların CD133 ekspresyon yüzdesi, M2/TM oranı ve CXCR1 ekspresyon yüzdesi değerlerinin birbirleriyle ilişkisinin incelenmesi

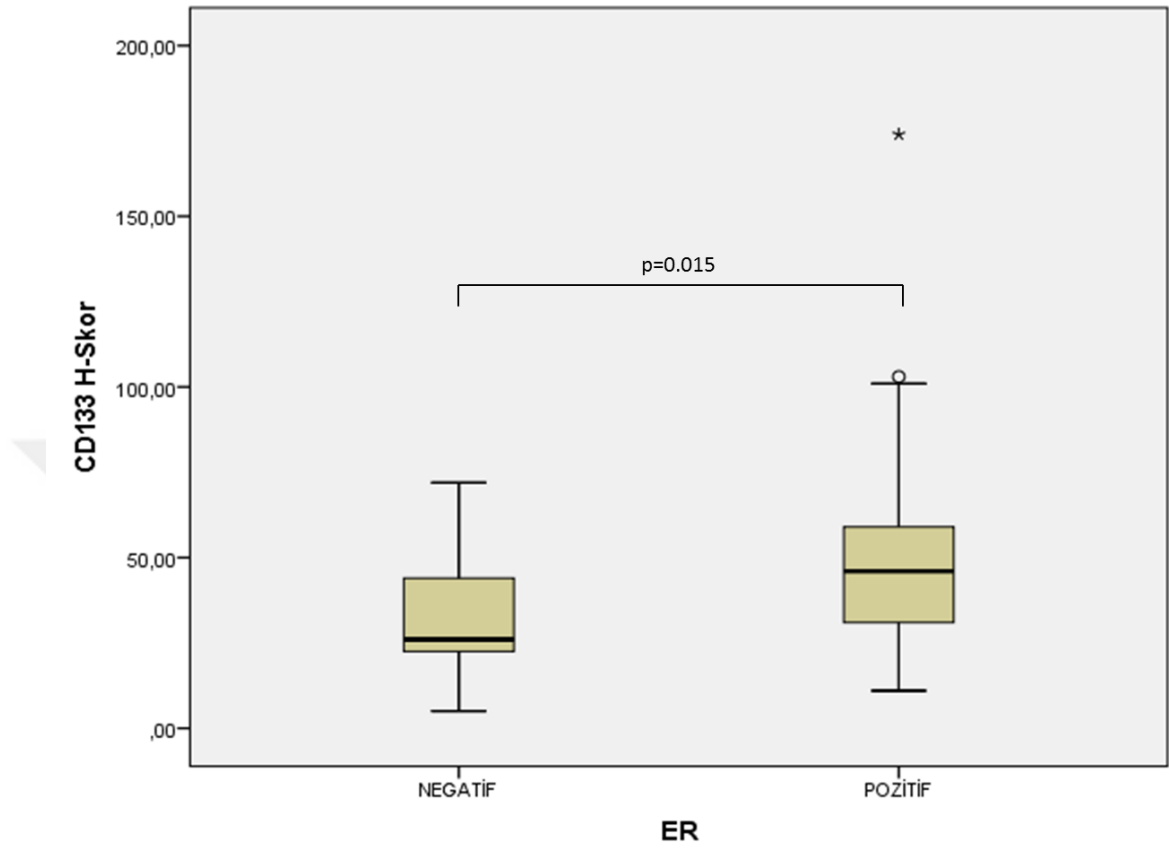
			CD 133 Yüzde (%)	M2/TM	CXCR1 Yüzde(%)
Spearman's rho	CD133 Yüzde (%)	Korelasyon katsayısı	1,000	-,110	,342**
		Sig. (2-kuyruklu)		,402	,003
		N	73	60	72
	M2/TM	Korelasyon katsayısı	-,110	1,000	,024
		Sig. (2-kuyruklu)	,402		,853
		N	60	66	60
	CXCR1 Yüzde (%)	Korelasyon katsayısı	,342**	,024	1,000
		Sig. (2-kuyruklu)	,003	,853	
		N	72	60	74

4.8. Hastaların ER Ekspresyon Durumlarının CD133, M2/TM Oranı ve CXCR1 Ekspresyon Durumlarıyla İlişkisinin İncelenmesi

Hastaların ER ekspresyonu açısından pozitif olması ile CD133 H-Skoru değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmuştur (Mann-Whitney U testi, $p=0,015$). ER ekspresyonu olan hastalarda (LA ve LB moleküler alt tiplerindeki hastalarda), CD133 H-skoru daha yüksek bulunmuştur. ER ekspresyonu olmayan hastaların ortalama CD133 H-skor değeri 26,299 (21,951-48,333) , ER ekspresyonu olan hastaların ortalama CD133 H-skor değeri 46,082 (30,678-61,987) olarak bulunmuştur.(Bkz. Tablo 4.16. ve Şekil 4.26.)

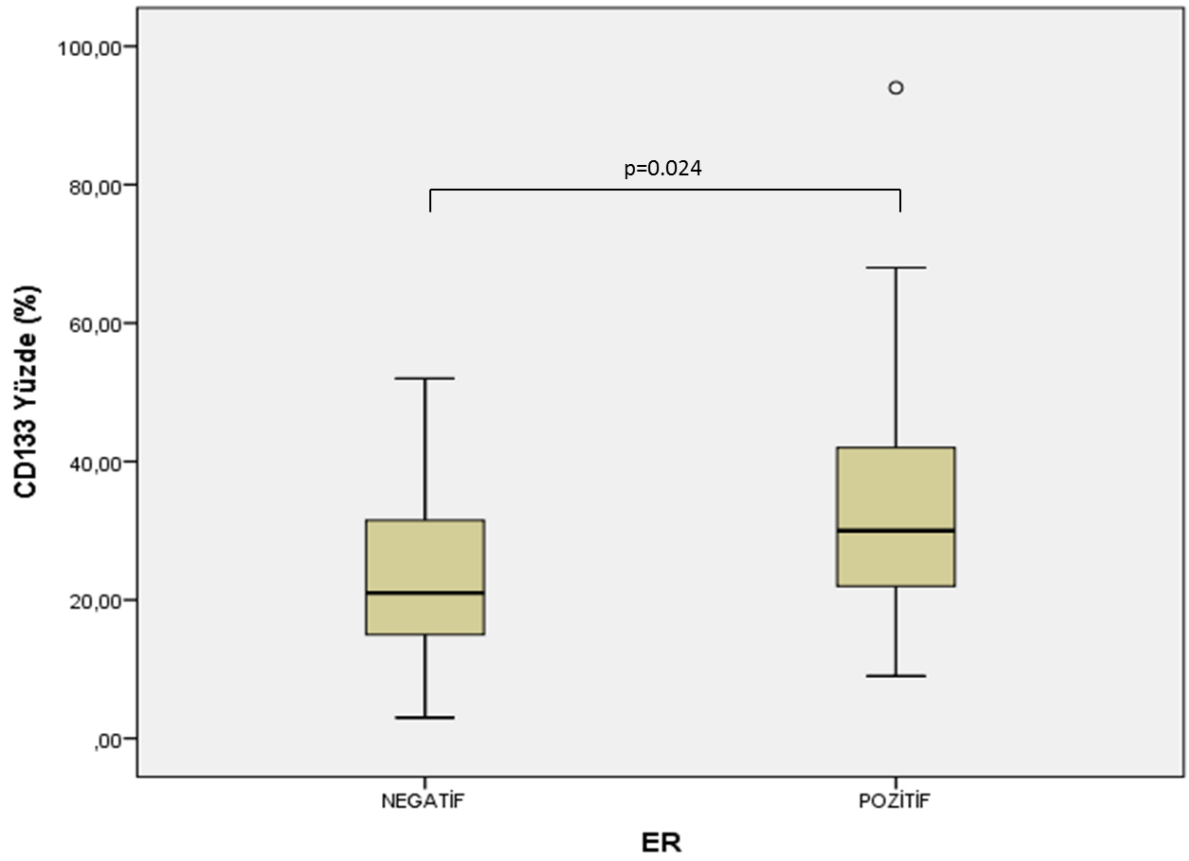
Tablo 4.16. Hastaların ER durumlarının CD133 H-Skoru ve CD133 ekspresyon yüzdesi ile ilişkisi

ER			CD133 H-Skor	CD133 yüzde
NEGATİF	N	Değer Sayısı	15	15
		Eksik Değer	1	1
	Ortalama		33,63707	23,7249
	Ortanca		26,29900	18,6490
	Standart Sapma		19,850600	13,83448
	Minimum		5,196	3,46
	Maksimum		71,530	52,31
	Persentiller	25	21,95100	12,8050
		50	26,29900	18,6490
		75	48,33300	32,7780
POZİTİF	N	Değer Sayısı	49	49
		Eksik Değer	5	5
	Ortalama		51,17624	33,6348
	Ortanca		46,08200	30,0970
	Standart Sapma		29,211057	16,99495
	Minimum		10,659	9,02
	Maksimum		174,110	93,91
	Persentiller	25	30,67800	21,4930
		50	46,08200	30,0970
		75	61,98700	42,6855



Şekil 4.26. Hastaların ER durumlarının CD133 H-Skoru ile ilişkisini gösteren kutu çizgi grafiği

Hastaların ER ekspresyonu açısından pozitif olması ile CD133 ekspresyonu yüzdesi arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki vardır (Mann-Whitney testi, $p=0,024$). ER ekspresyonu olan hastalarda (LA ve LB moleküler alt tiplerindeki hastalarda), CD133 ekspresyonu yüzdesi daha yüksek bulunmuştur. ER ekspresyonu olmayan hastaların ortalama CD133 ekspresyonu yüzdesi 18,6490 (12,8050-32,7780), ER ekspresyonu olan hastaların ortalama CD133 ekspresyonu yüzdesi 30,0970 (21,4930-42,6855) olarak bulunmuştur (Bkz. Tablo 4.16. ve Şekil 4.27.)

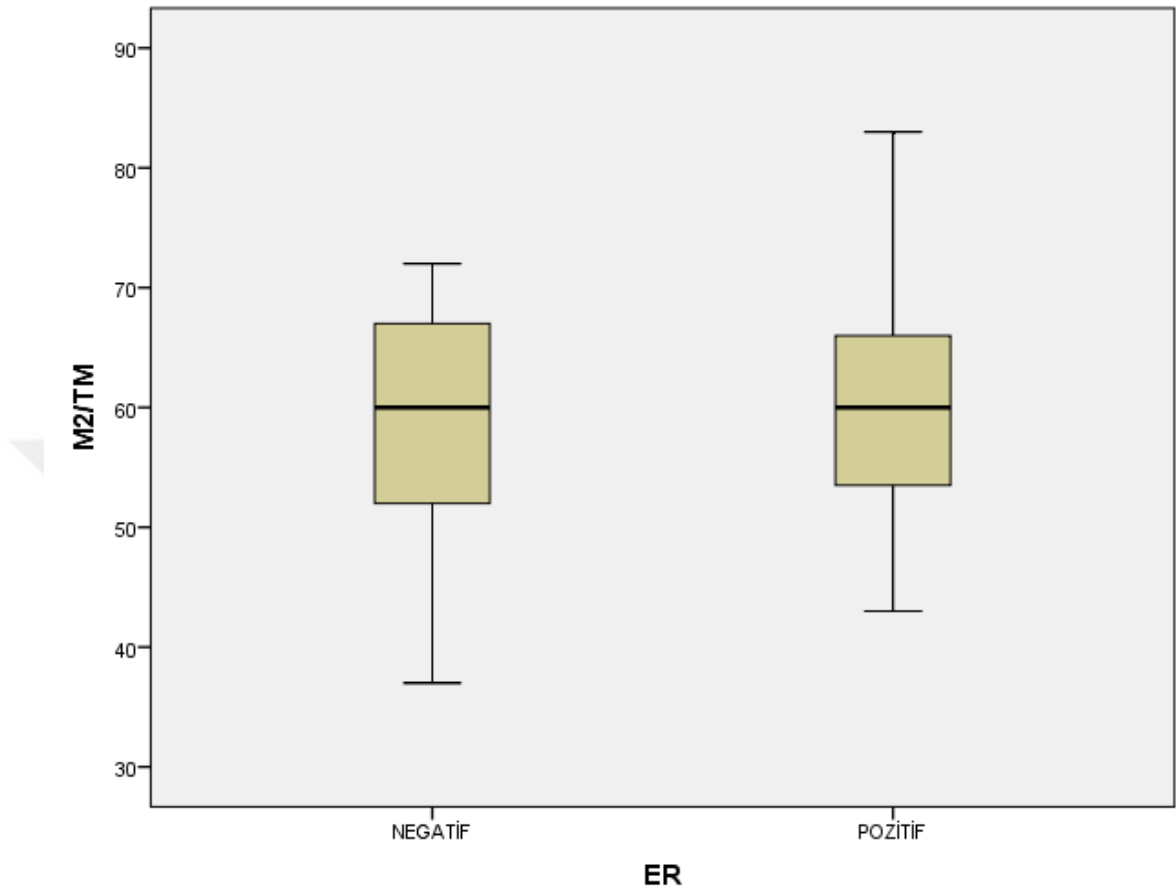


Şekil 4.27. Hastaların ER durumlarının CD133 ekspresyon yüzdesi ile ilişkisini gösteren kutu çizgi grafiği

Hastaların ER ekspresyonu açısından pozitif olması ile M2/TM oranı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki yoktur (Mann-Whitney U testi, $p=0,993$). ER ekspresyonu olmayan hastaların ortalama M2/TM oranı 60,13500 (50,63300-66,94900), ER ekspresyonu olan hastaların ortalama M2/TM oranı 60,00 (53,29175-65,866) olarak bulunmuştur. (Bkz. Tablo 4.17. ve Şekil 4.28.)

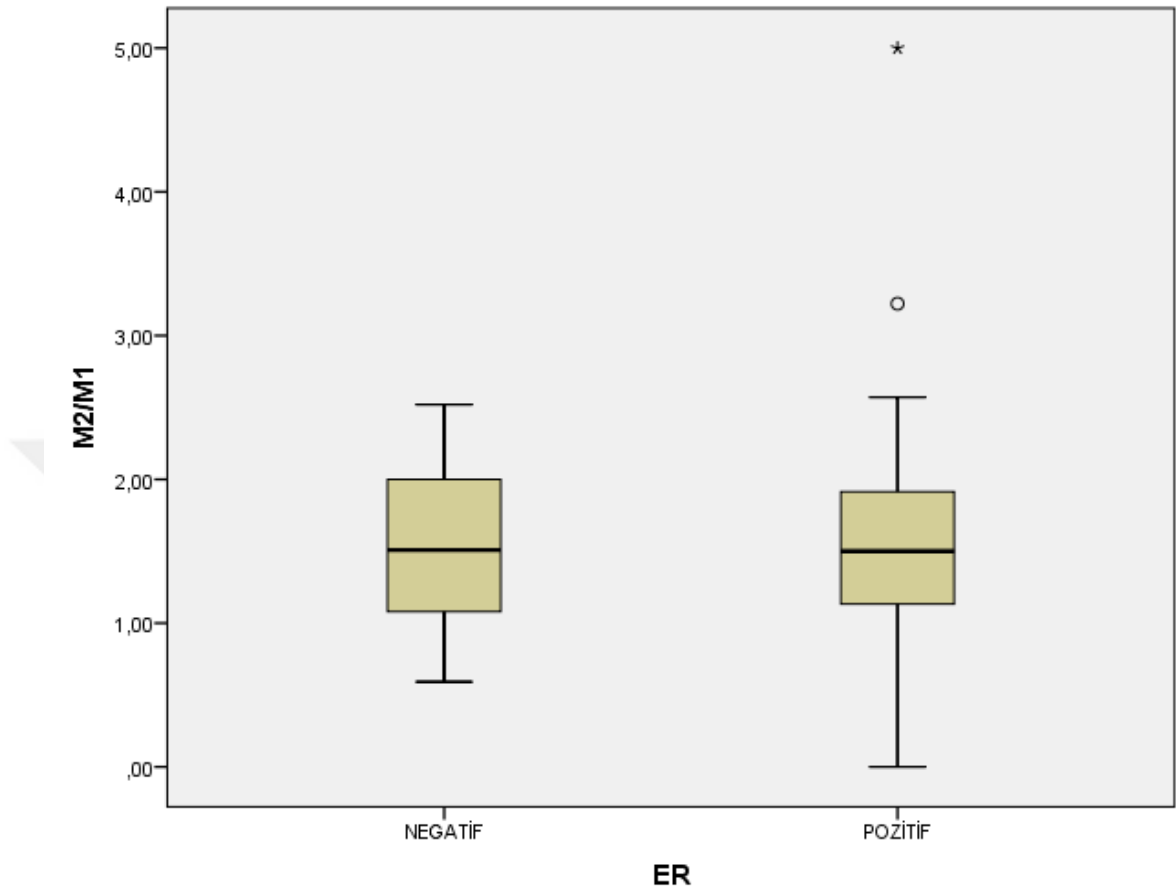
Tablo 4.17. Hastaların ER durumlarının M2/TM oranı ve M2/M1 oranı ile ilişkisi

ER			M2/TM	M2/M1
NEGATİF	N	Değer Sayısı	15	15
		Eksik Değer	1	1
	Ortalama		58,15667	1,5145
	Ortanca		60,13500	1,5080
	Standart Sapma		10,479130	,57932
	Minimum		37,179	,59
	Maksimum		72,000	2,52
	Persentiller	25	50,63300	1,0260
		50	60,13500	1,5080
		75	66,94900	2,0000
POZİTİF	N	Değer Sayısı	44	45
		Eksik Değer	10	9
	Ortalama		59,51800	1,5828
	Ortanca		60,00000	1,5000
	Standart Sapma		8,745497	,77420
	Minimum		42,857	0,00
	Maksimum		83,333	5,00
	Persentiller	25	53,29175	1,1035
		50	60,00000	1,5000
		75	65,86600	1,9245



Şekil 4.28. Hastaların ER durumlarının M2/TM oranı ile ilişkisini gösteren kutu çizgi grafiği

Hastaların ER ekspresyonu açısından pozitif olması ile M2/M1 oranı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki yoktur (Mann-Whitney U testi, $p=0,986$). ER ekspresyonu olmayan hastaların ortalama M2/M1 oranı 1,5080 (1,0260-2,0000), ER ekspresyonu olan hastaların ortalama M2/M1 oranı 1,5000 (1,1035-1,9245) olarak bulunmuştur. (Bkz. Tablo 4.17. ve Şekil 4.29.)

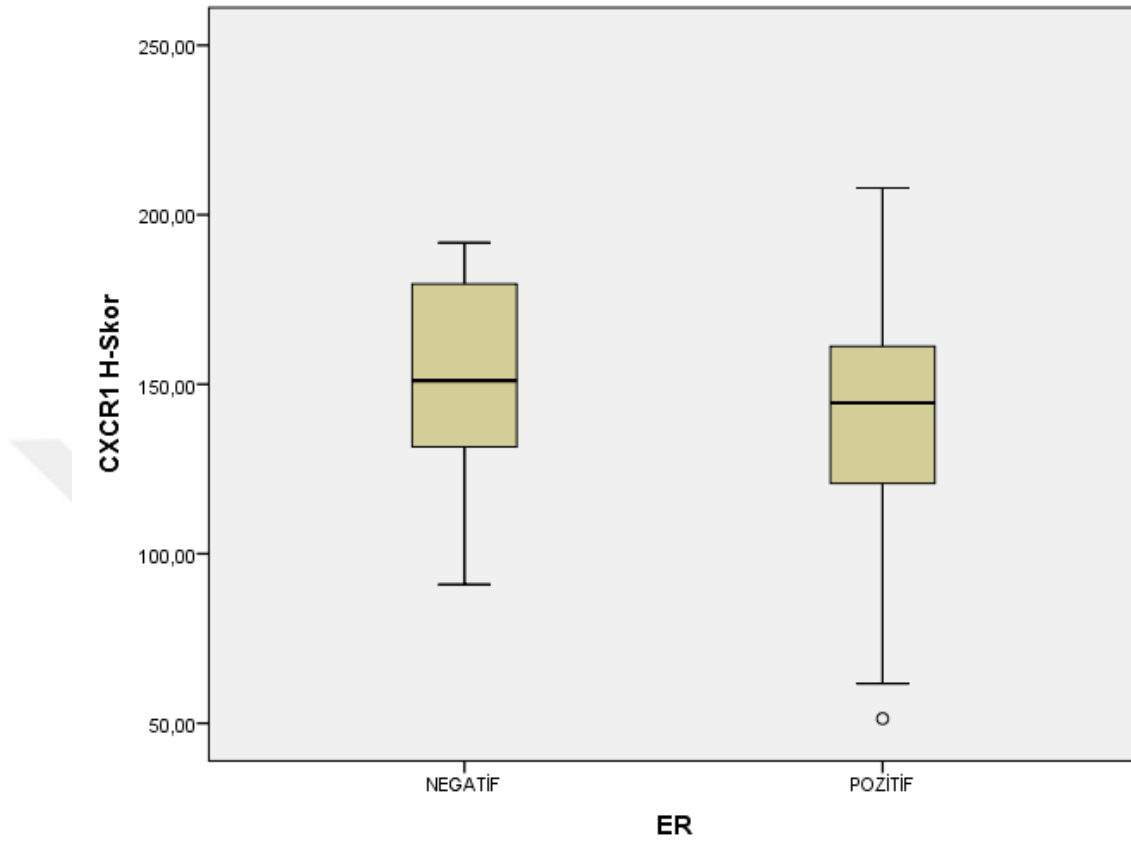


Şekil 4.29. Hastaların ER durumlarının M2/M1 oranı ile ilişkisini gösteren kutu çizgi grafiği

Hastaların ER ekspresyonu açısından pozitif olması ile CXCR1 H-Skoru değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki yoktur (Mann-Whitney testi, $p=0,274$). ER ekspresyonu olmayan hastaların ortalama CXCR1 H-Skoru değeri 151,10 (128,16-181,41), ER ekspresyonu olan hastaların ortalama CXCR1 H-Skoru değeri 144,53 (120,59-161,70) olarak bulunmuştur (Bkz. Tablo 4.18. ve Şekil 4.30.)

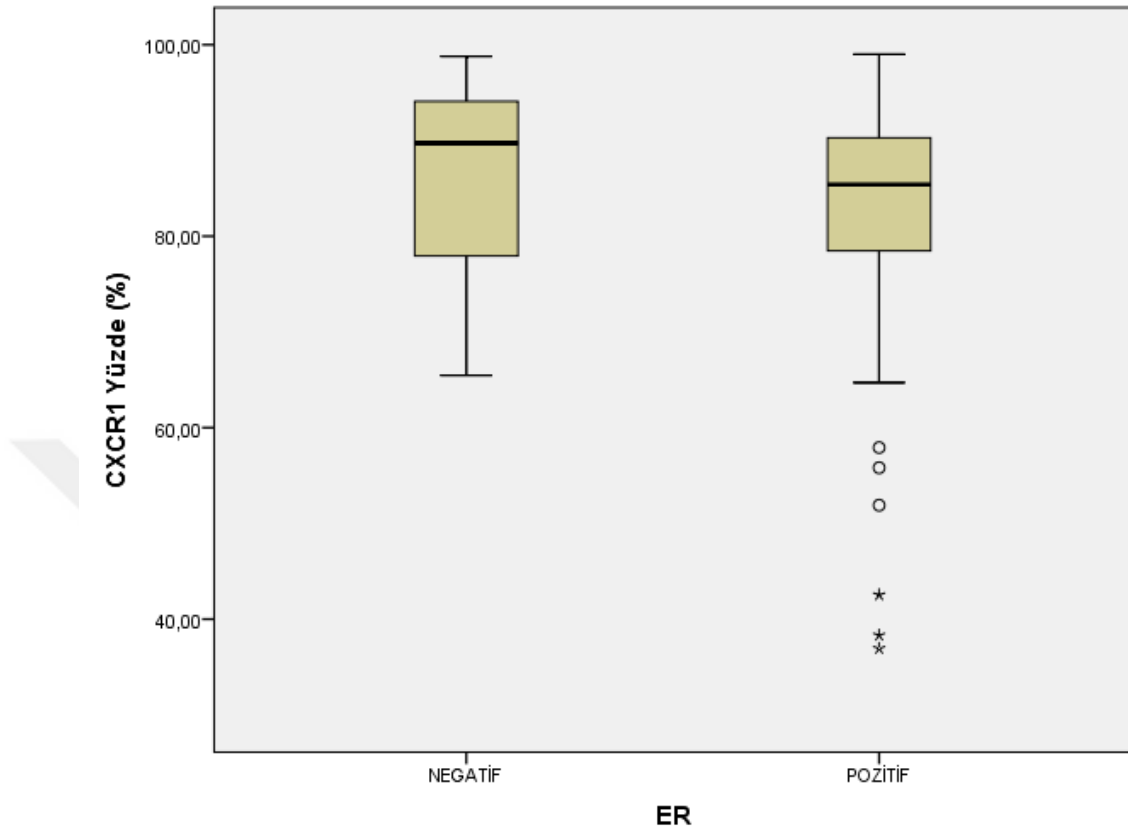
Tablo 4.18. Hastaların ER durumlarının CXCR1 H-Skoru ve CXCR1 ekspresyonu ile ilişkisi

ER			CXCR1 H-Skor	CXCR1 Yüzde (%)
NEGATİF	N	Değer Sayısı	15	15
		Eksik Değer	1	1
	Ortalama		151,7221	85,9983
	Ortanca		151,0960	89,7170
	Standart Sapma		30,00350	10,55476
	Minimum		90,91	65,47
	Maksimum		191,73	98,78
	Persentiller	25	128,1550	76,8820
		50	151,0960	89,7170
		75	181,4120	94,4830
POZİTİF	N	Değer Sayısı	51	51
		Eksik Değer	3	3
	Ortalama		139,1229	80,9588
	Ortanca		144,5330	85,3930
	Standart Sapma		35,64476	14,69430
	Minimum		51,35	36,94
	Maksimum		207,92	99,01
	Persentiller	25	120,5890	78,2410
		50	144,5330	85,3930
		75	161,7030	90,5670



Şekil 4.30. Hastaların ER durumlarının CXCR1 H-Skoru ile ilişkisini gösteren kutu çizgi grafiği

Hastaların ER ekspresyonu açısından pozitif olması ile CXCR1 ekspresyonu yüzdesi arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki yoktur (Mann-Whitney testi, $p=0,233$). ER ekspresyonu olmayan hastaların ortalanca CXCR1 ekspresyon yüzdesi 89,72 (76,88-94,48), ER ekspresyonu olan hastaların ortalanca CXCR1 ekspresyon yüzdesi 85,39 (78,24-90,57) olarak bulunmuştur (Bkz. Tablo 4.18. ve Şekil 4.31.).



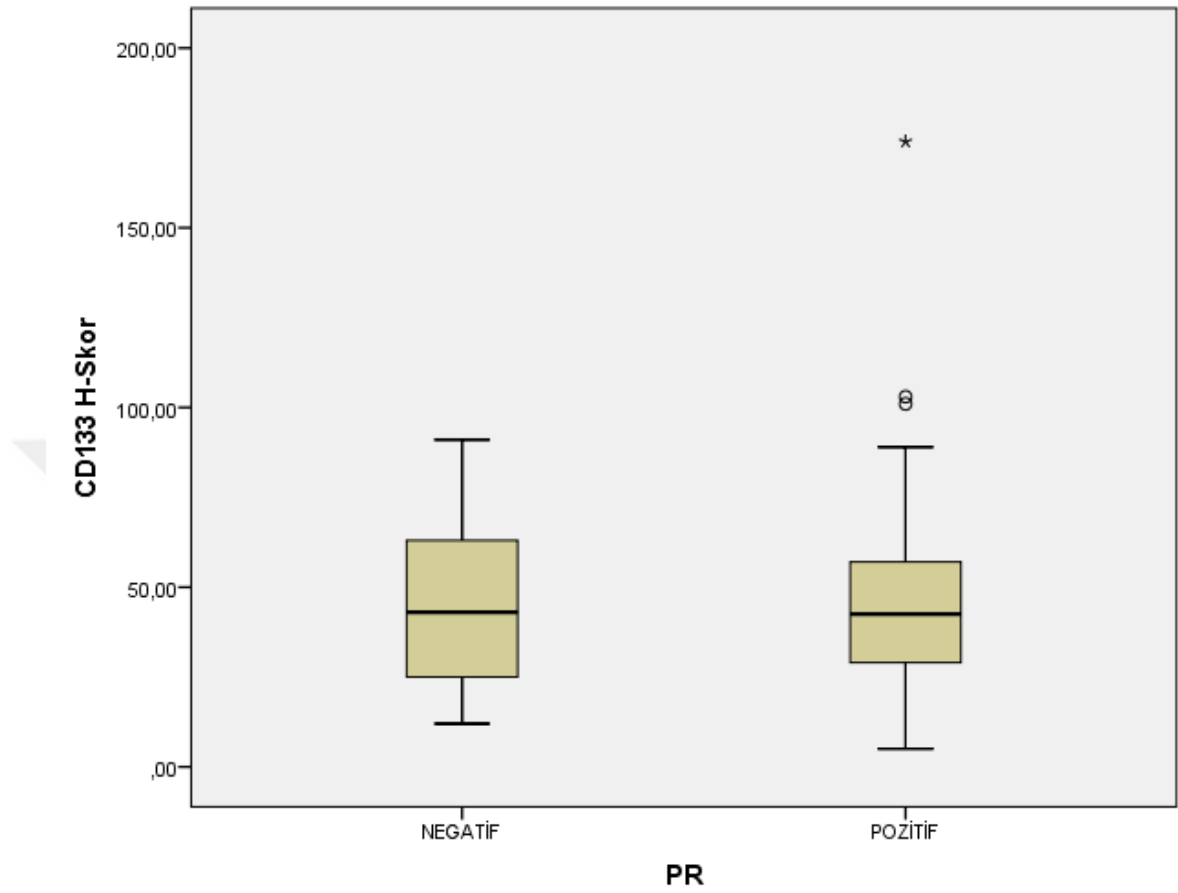
Şekil 4.31. Hastaların ER durumlarının CXCR1 ekspresyon yüzdesi ile ilişkisini gösteren kutu çizgi grafiği

4.9. Hastaların PR Ekspresyon Durumlarının CD133, M2/TM Oranı ve CXCR1 Ekspresyon Durumlarıyla İlişkisinin İncelenmesi

Hastaların PR ekspresyonu açısından pozitif olması ile CD133 H-Skoru değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki yoktur (Mann-Whitney testi, $p=0,794$). PR ekspresyonu olmayan hastaların ortalama CD133 H-skor değeri 43,28850 (24,81850-66,13775), PR ekspresyonu olan hastaların ortalama CD133 H-skor değeri 42,32450 (28,67250-58,11475) olarak bulunmuştur (Bkz. Tablo 4.19. ve Şekil 4.32.).

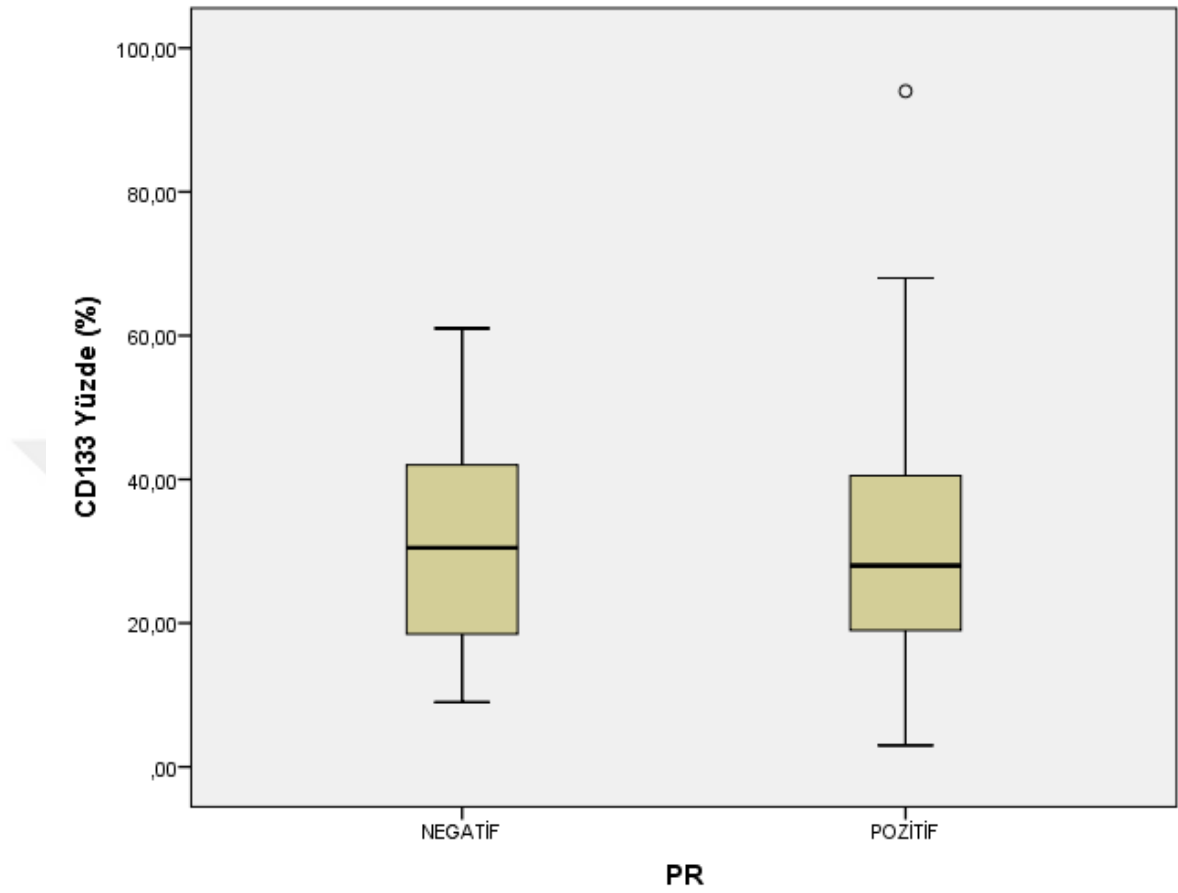
Tablo 4.19. Hastaların PR durumlarının CD133 H-Skoru ile ilişkisi

PR			CD133 H-Skor	CD133 yüzde
NEGATİF	N	Değer Sayısı	20	20
		Eksik Değer	2	2
	Ortalama		44,58190	30,1229
	Ortanca		43,28850	26,1015
	Standart Sapma		23,391664	15,39013
	Minimum		11,655	8,90
	Maksimum		90,587	61,18
	Persentiller	25	24,81850	18,4780
		50	43,28850	26,1015
		75	66,13775	44,8093
POZİTİF	N	Değer Sayısı	44	44
		Eksik Değer	4	4
	Ortalama		48,19441	31,8528
	Ortanca		42,32450	28,3690
	Standart Sapma		30,282221	17,47402
	Minimum		5,196	3,46
	Maksimum		174,110	93,91
	Persentiller	25	28,67250	18,9448
		50	42,32450	28,3690
		75	58,11475	40,7685



Şekil 4.32. Hastaların PR durumlarının CD133 H-Skoru ile ilişkisini gösteren kutu çizgi grafiği

Hastaların PR ekspresyonu açısından pozitif olması ile CD133 ekspresyonu yüzdesi arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki yoktur (Mann-Whitney testi, $p=0,706$). PR ekspresyonu olmayan hastaların ortalama CD133 ekspresyonu yüzdesi 26,1015 (18,4780-44,8093), PR ekspresyonu olan hastaların ortalama CD133 ekspresyonu yüzdesi 28,3690 (18,9448-40,7685) olarak bulunmuştur (Tablo 4.19. ve Şekil 4.33.).

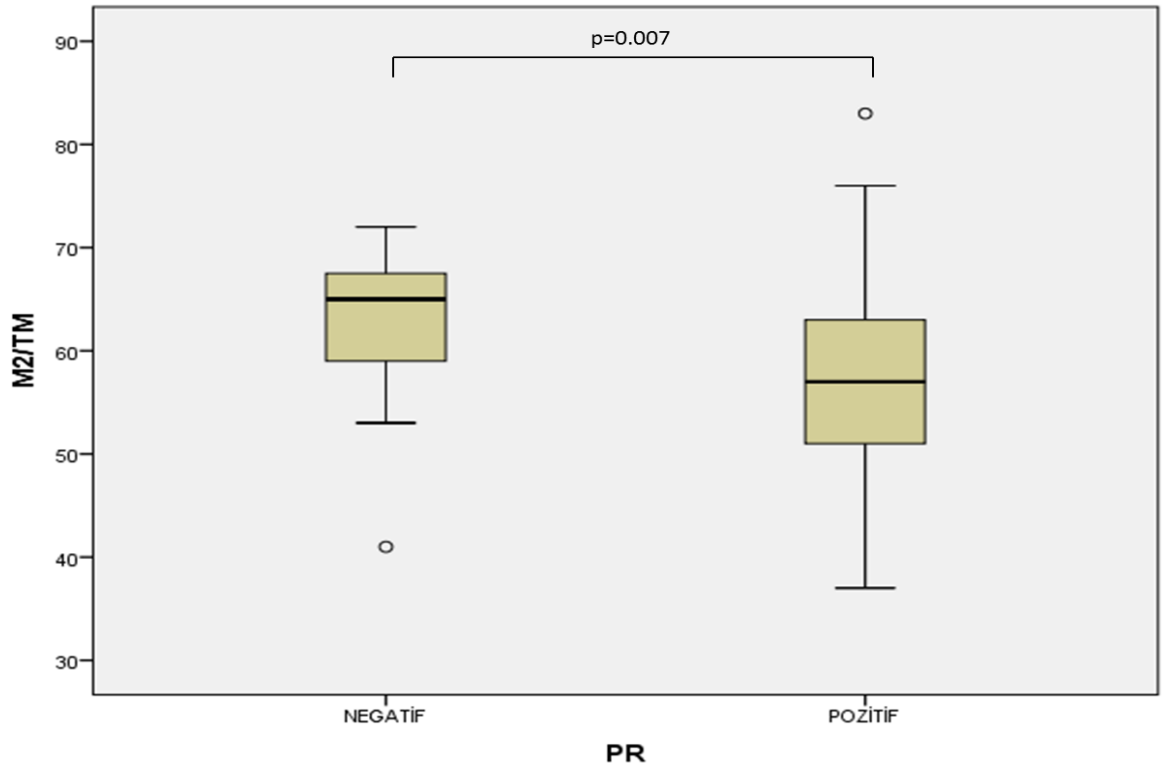


Şekil 4.33. Hastaların PR durumlarının CD133 ekspresyon yüzdesi ile ilişkisini gösteren kutu çizgi grafiği

Hastaların PR ekspresyonu açısından pozitif olması ile M2/TM oranı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki vardır (Mann-Whitney U testi, $p=0,007$). PR ekspresyonu olmayan hastalarda, M2/TM oranı daha yüksek bulunmuştur. PR ekspresyonu olmayan hastaların ortalama M2/TM oranı 65,09400 (58,16300-68,25400), PR ekspresyonu olan hastaların ortalama M2/TM oranı 57,02000 (50,66700-62,88250) olarak bulunmuştur (Bkz. Tablo 4.20. ve Şekil 4.34.).

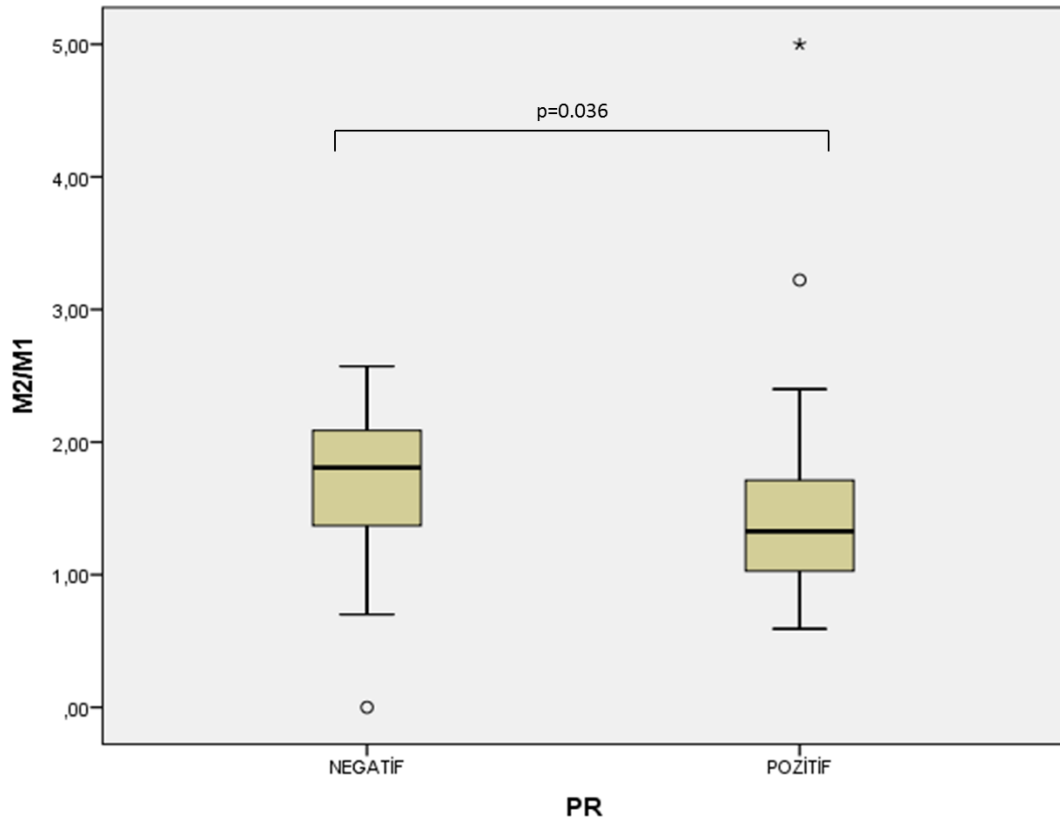
Tablo 4.20. Hastaların PR durumlarının M2/TM oranı ve M2/M1 oranı ile ilişkisi

PR			M2/TM	M2/M1
NEGATİF	N	Değer Sayısı	19	20
		Eksik Değer	3	2
	Ortalama		62,86853	1,6887
	Ortanca		65,09400	1,8075
	Standart Sapma		7,612555	,62336
	Minimum		41,176	0,00
	Maksimum		72,000	2,57
	Persentiller	25	58,16300	1,3600
		50	65,09400	1,8075
		75	68,25400	2,1190
POZİTİF	N	Değer Sayısı	40	40
		Eksik Değer	8	8
	Ortalama		57,41600	1,5042
	Ortanca		57,02000	1,3265
	Standart Sapma		9,365540	,77272
	Minimum		37,179	,59
	Maksimum		83,333	5,00
	Persentiller	25	50,66700	1,0273
		50	57,02000	1,3265
		75	62,88250	1,7193



Şekil 4.34. Hastaların PR durumlarının M2/TM oranı ile ilişkisini gösteren kutu çizgi grafiği

Hastaların PR ekspresyonu açısından pozitif olması ile M2/M1 oranı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki vardır (Mann-Whitney U testi, $p=0,036$). PR ekspresyonu olmayan hastalarda, M2/M1 oranı daha yüksek bulunmuştur. PR ekspresyonu olmayan hastaların ortalanca M2/M1 oranı 1,8075 (1,3600-2,1190), PR ekspresyonu olan hastaların ortalanca M2/M1 oranı 1,3265 (1,0273-1,7193) olarak bulunmuştur (Bkz. Tablo 4.20. ve Şekil 4.35.).

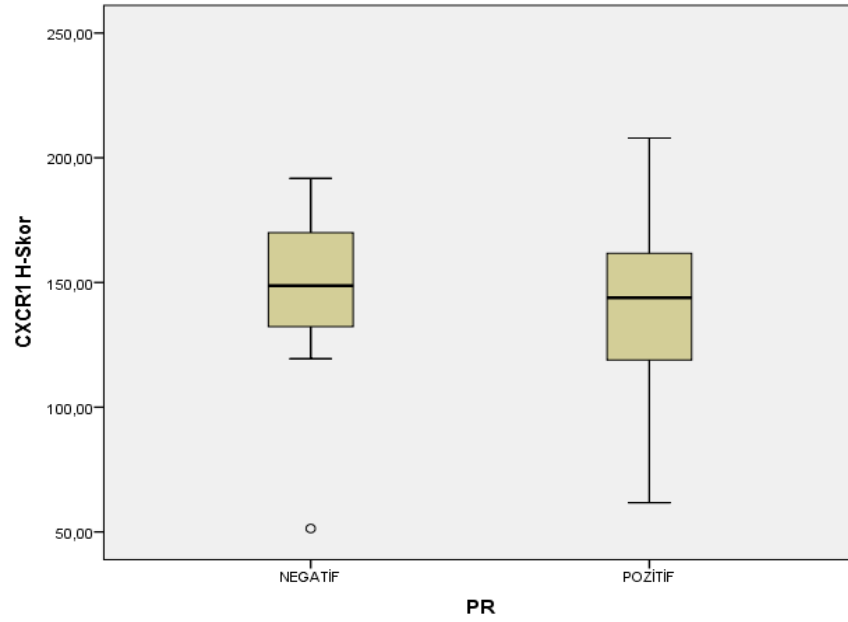


Şekil 4.35. Hastaların PR durumlarının M2/TM oranı ile ilişkisini gösteren kutu çizgi grafiği

Hastaların PR ekspresyonu açısından pozitif olması ile CXCR1 H-Skoru değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki yoktur (Mann-Whitney testi, $p=0,367$). PR ekspresyonu olmayan hastaların ortalama CXCR1 H-Skoru değeri 148,74 (132,26-173,89), PR ekspresyonu olan hastaların ortalama CXCR1 H-Skoru değeri 143,90 (117,94-162,14) olarak bulunmuştur.(Bkz. Tablo 4.21. ve Şekil 4.36.)

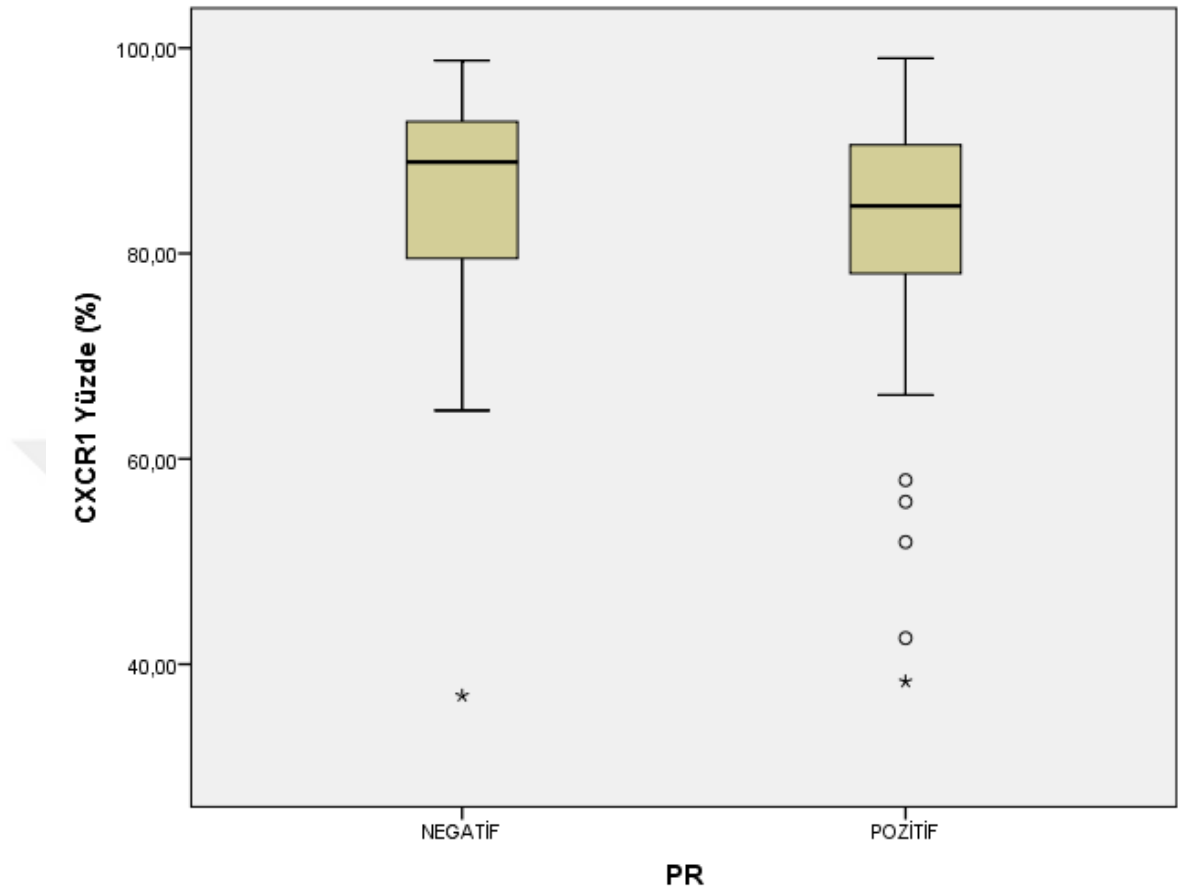
Tablo 4.21. Hastaların PR durumlarının CXCR1 H-Skoru ve CXCR1 ekspresyon yüzdesi ile ilişkisi

PR			CXCR1 H-Skor	CXCR1 Yüzde (%)
NEGATİF	N	Değer Sayısı	21	21
		Eksik Değer	1	1
	Ortalama		148,6195	84,2423
	Ortanca		148,7410	88,8880
	Standart Sapma		31,35950	14,22933
	Minimum		51,35	36,94
	Maksimum		191,73	98,78
	Persentiller	25	132,2635	79,2615
		50	148,7410	88,8880
		75	173,8880	93,2555
POZİTİF	N	Değer Sayısı	45	45
		Eksik Değer	3	3
	Ortalama		138,8909	81,1064
	Ortanca		143,9030	84,6160
	Standart Sapma		35,97563	13,86612
	Minimum		61,68	38,32
	Maksimum		207,92	99,01
	Persentiller	25	117,9390	77,8935
		50	143,9030	84,6160
		75	162,1385	90,5960



Şekil 4.36. Hastaların PR durumlarının CXCR1 H-Skor değeriyle ilişkisini gösteren kutu çizgi grafiği

Hastaların PR ekspresyonu açısından pozitif olması ile CXCR1 ekspresyon yüzdesi arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki yoktur (Mann-Whitney testi, $p=0,234$). PR ekspresyonu olmayan hastaların ortalanca CXCR1 H-Skoru değeri 88,89 (79,26-93,26), PR ekspresyonu olan hastaların ortalanca CXCR1 H-Skoru değeri 84,62 (77,89-90,60) olarak bulunmuştur (Bkz. Tablo 4.21. ve Şekil 4.37.).



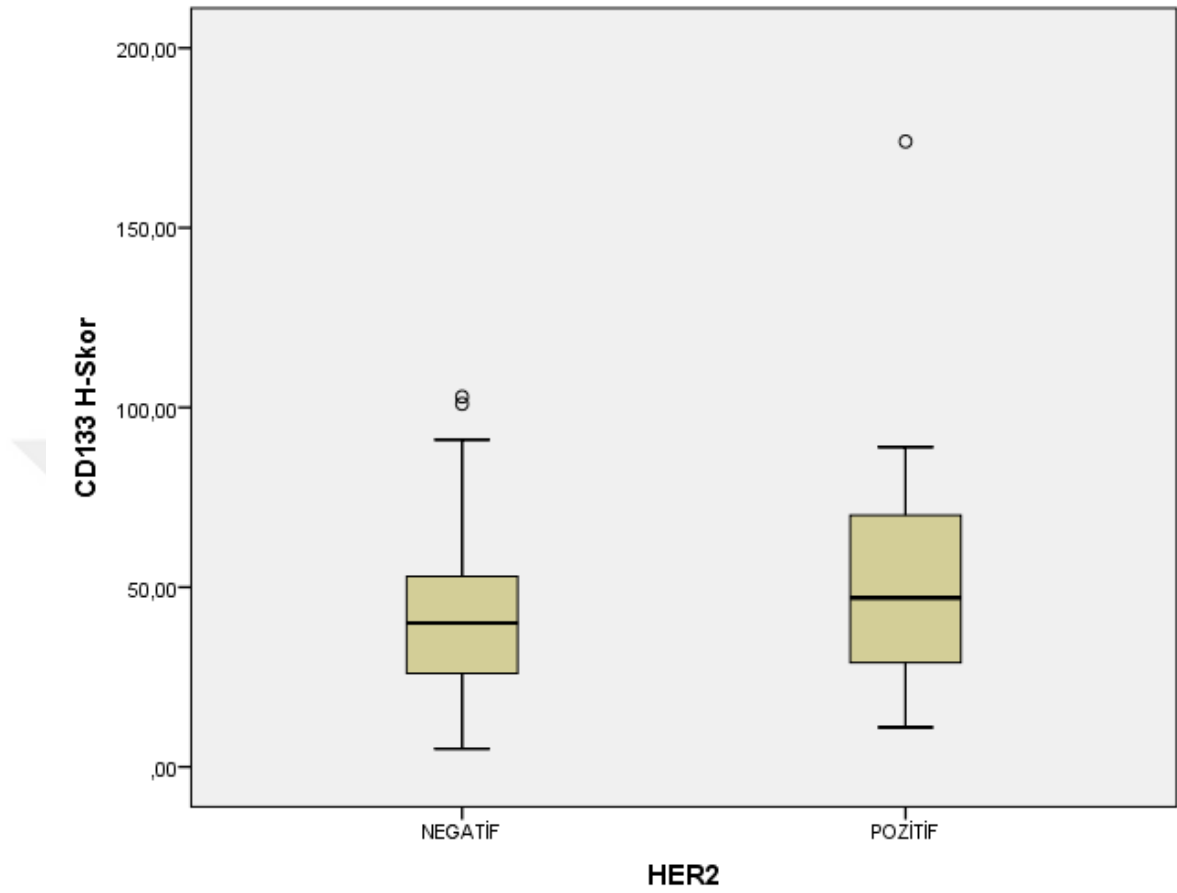
Şekil 4.37. Hastaların PR durumlarının CXCR1 ekspresyon yüzdesi ile ilişkisini gösteren kutu çizgi grafiği

4.10. Hastaların HER2 Ekspresyon Durumlarının CD133, M2/TM Oranı ve CXCR1 Ekspresyon Durumlarıyla İlişkisinin İncelenmesi

Hastaların HER2 ekspresyonu açısından pozitif olması ile CD133 H-Skoru değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki yoktur (Mann-Whitney U testi, $p=0,326$). HER2 ekspresyonu olmayan hastaların ortalama CD133 H-skor değeri 40,03350 (26,23725-54,07175, HER2 ekspresyonu olan hastaların ortalama CD133 H-skor değeri 47,15100 (28,78300-70,47550) olarak bulunmuştur.(Bkz. Tablo 4.22. ve Şekil 4.38.)

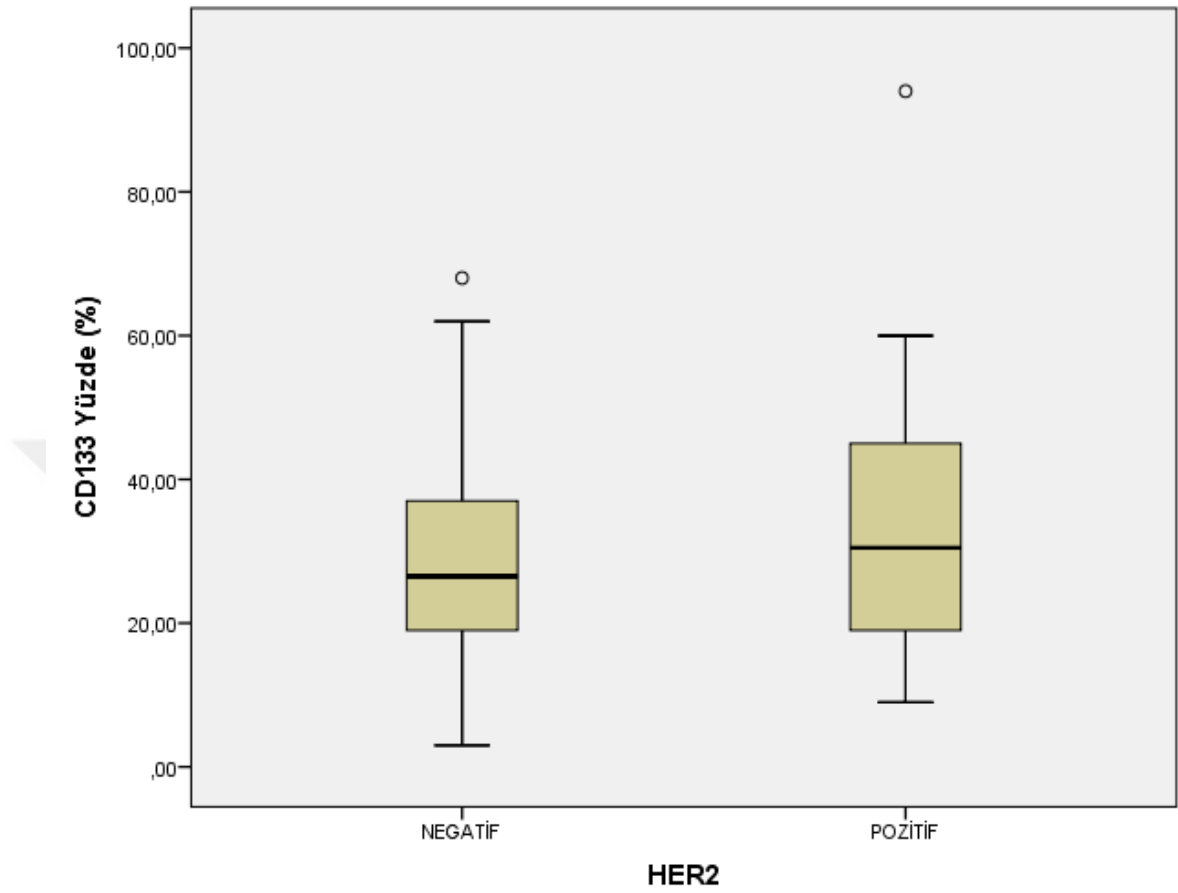
Tablo 4.22. Hastaların HER2 durumlarının CD133 H-Skoru ve CD133 ekspresyon yüzdesi ile ilişkisi

HER2			CD133 H-Skor	CD133 Yüzde (%)
NEGATİF	N	Değer Sayısı	30	30
		Eksik Değer	1	1
	Ortalama		43,21483	29,5567
	Ortanca		40,03350	27,7260
	Standart Sapma		24,305935	15,56776
	Minimum		5,196	3,46
	Maksimum		103,126	67,74
	Persentiller	25	26,23725	18,7248
		50	40,03350	27,7260
		75	54,07175	38,1910
POZİTİF	N	Değer Sayısı	34	34
		Eksik Değer	5	5
	Ortalama		50,46315	32,8611
	Ortanca		47,15100	28,0825
	Standart Sapma		31,158113	17,81110
	Minimum		10,659	8,90
	Maksimum		174,110	93,91
	Persentiller	25	28,78300	19,7673
		50	47,15100	28,0825
		75	70,47550	45,2238



Şekil 4.38. Hastaların HER2 durumlarının CD133 H-Skoru ile ilişkisini gösteren kutu çizgi grafiği

Hastaların HER2 ekspresyonu açısından pozitif olması ile CD133 ekspresyon yüzdesi arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki yoktur (Mann-Whitney U testi, $p=0,527$). HER2 ekspresyonu olmayan hastaların ortalama CD133 H-skor değeri 27,7260 (18,7248-38,1910), HER2 ekspresyonu olan hastaların ortalama CD133 H-skor değeri 28,0825 (19,7673-45,2238) olarak bulunmuştur (Tablo 4.22. ve Şekil 4.39.).

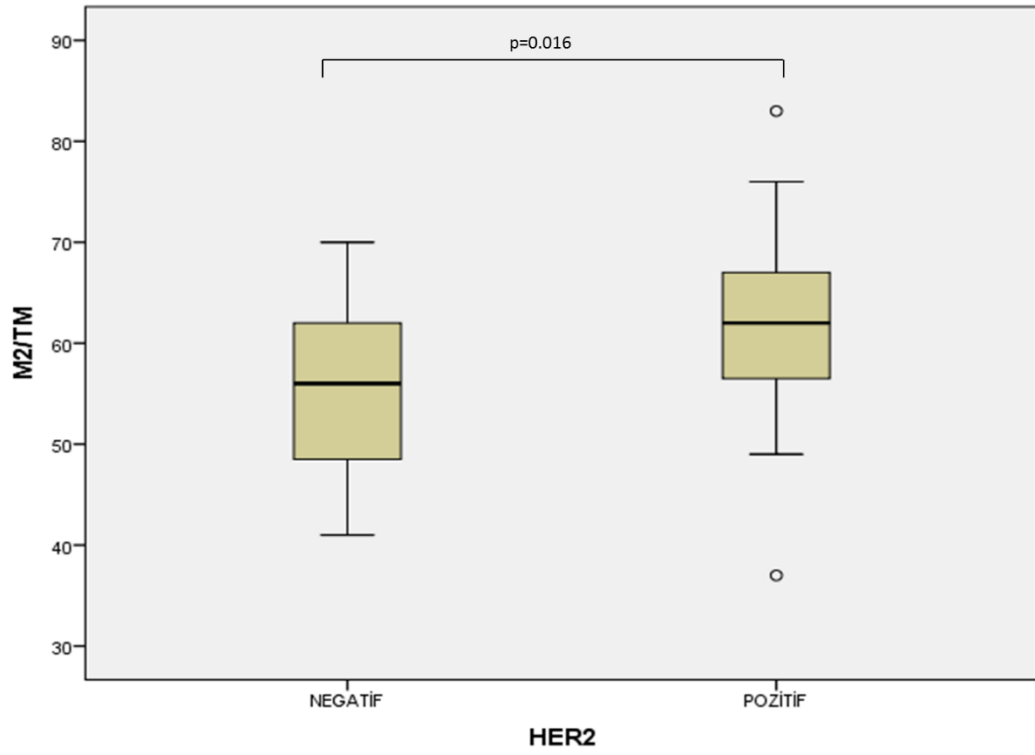


Şekil 4.39. Hastaların HER2 durumlarının CD133 ekspresyon yüzdesi ile ilişkisini gösteren kutu çizgi grafiği

Hastaların HER2 ekspresyonu açısından pozitif olması ile M2/TM oranı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki vardır (Mann-Whitney U testi, $p=0,016$). HER2 ekspresyonu olan hastalarda, M2/TM oranı daha yüksek bulunmuştur. HER2 ekspresyonu olmayan hastaların ortalama M2/TM oranı 56,00000 (48,27600-62,82100) HER2 ekspresyonu olan hastaların ortalama M2/TM oranı 62,11800 (56,27000-66,87850) olarak bulunmuştur. (Bkz. Tablo 4.23. ve Şekil 4.40.)

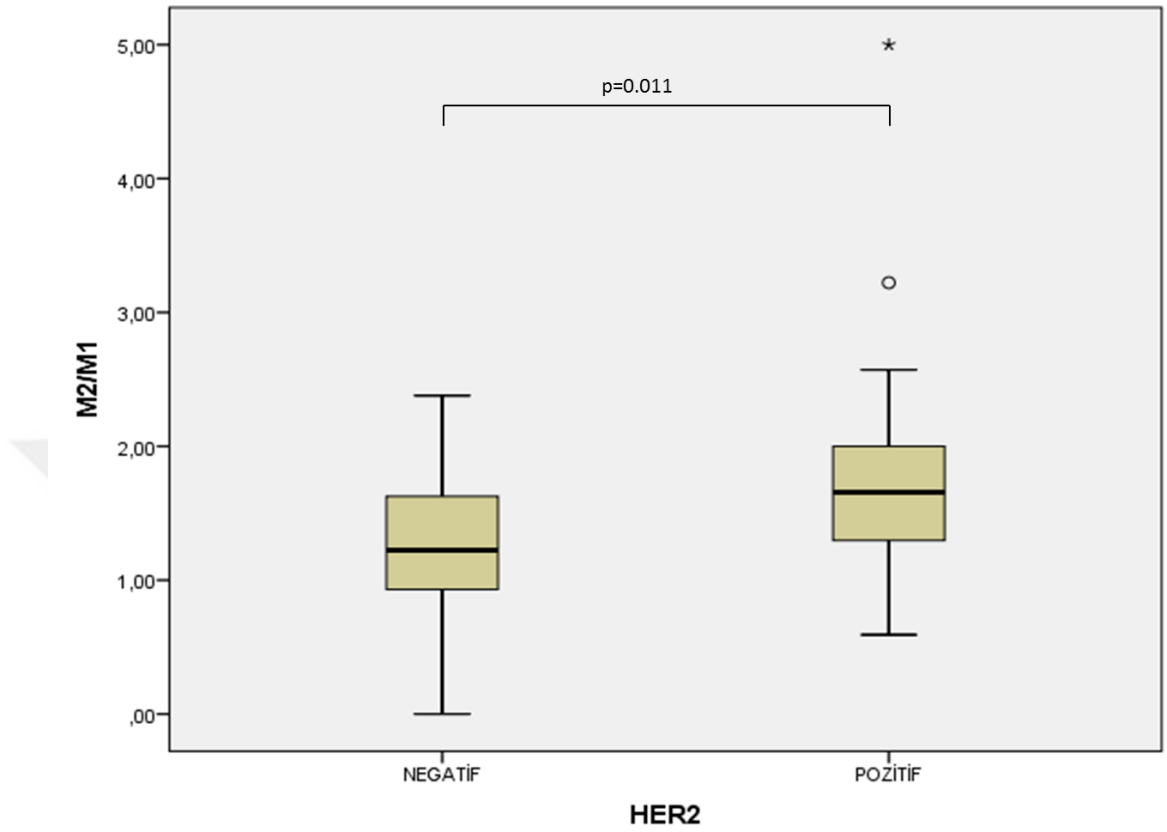
Tablo 4.23. Hastaların HER2 durumlarının M2/TM oranı ile ilişkisi

HER2			M2/TM	M2/M1
NEGATİF	N	Değer Sayısı	27	28
		Eksik Değer	4	3
	Ortalama		56,01115	1,3172
	Ortanca		56,00000	1,2235
	Standart Sapma		8,599038	,54599
	Minimum		41,176	0,00
	Maksimum		70,085	2,38
	Persentiller	25	48,27600	,9285
		50	56,00000	1,2235
		75	62,82100	1,6578
POZİTİF	N	Değer Sayısı	32	32
		Eksik Değer	7	7
	Ortalama		61,83878	1,7832
	Ortanca		62,11800	1,6565
	Standart Sapma		8,848254	,79985
	Minimum		37,179	,59
	Maksimum		83,333	5,00
	Persentiller	25	56,27000	1,2848
		50	62,11800	1,6565
		75	66,87850	2,0000



Şekil 4.40. Hastaların HER2 durumlarının M2/TM oranı ile ilişkisini gösteren kutu çizgi grafiği

Hastaların HER2 ekspresyonu açısından pozitif olması ile M2/M1 oranı arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki vardır (Mann-Whitney U testi, $p=0,011$). HER2 ekspresyonu olan hastalarda, M2/M1 oranı daha yüksek bulunmuştur. HER2 ekspresyonu olmayan hastaların ortalama M2/M1 oranı 1,2235, (0,9285-1,6578), HER2 ekspresyonu olan hastaların ortalama M2/M1 oranı 1,6565 (1,2848-2,0000) olarak bulunmuştur. (Bkz. Tablo 4.23. ve Şekil 4.41.)

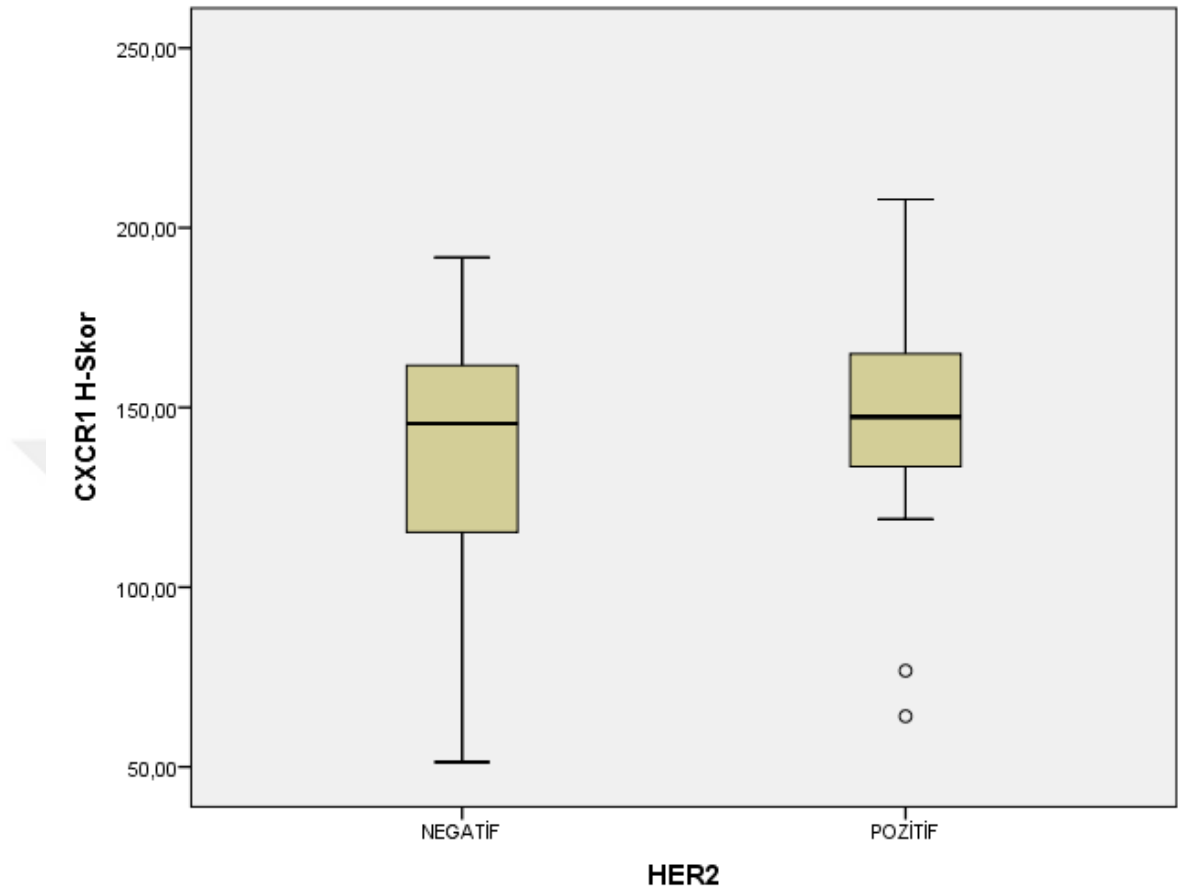


Şekil 4.41. Hastaların HER2 durumlarının M2/M1 oranı ile ilişkisini gösteren kutu çizgi grafiği

Hastaların HER2 ekspresyonu açısından pozitif olması ile CXCR1 H-Skoru değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki yoktur (Mann-Whitney U testi, $p=0,347$). HER2 ekspresyonu olmayan hastaların ortalama CXCR1 H-Skoru değeri 145,5480 (112,2780-163,3405) HER2 ekspresyonu olan hastaların ortalama CXCR1 H-Skoru değeri 147,3740 (132,9253-166,1425) olarak bulunmuştur. (Tablo 4.24. ve Şekil 4.42.)

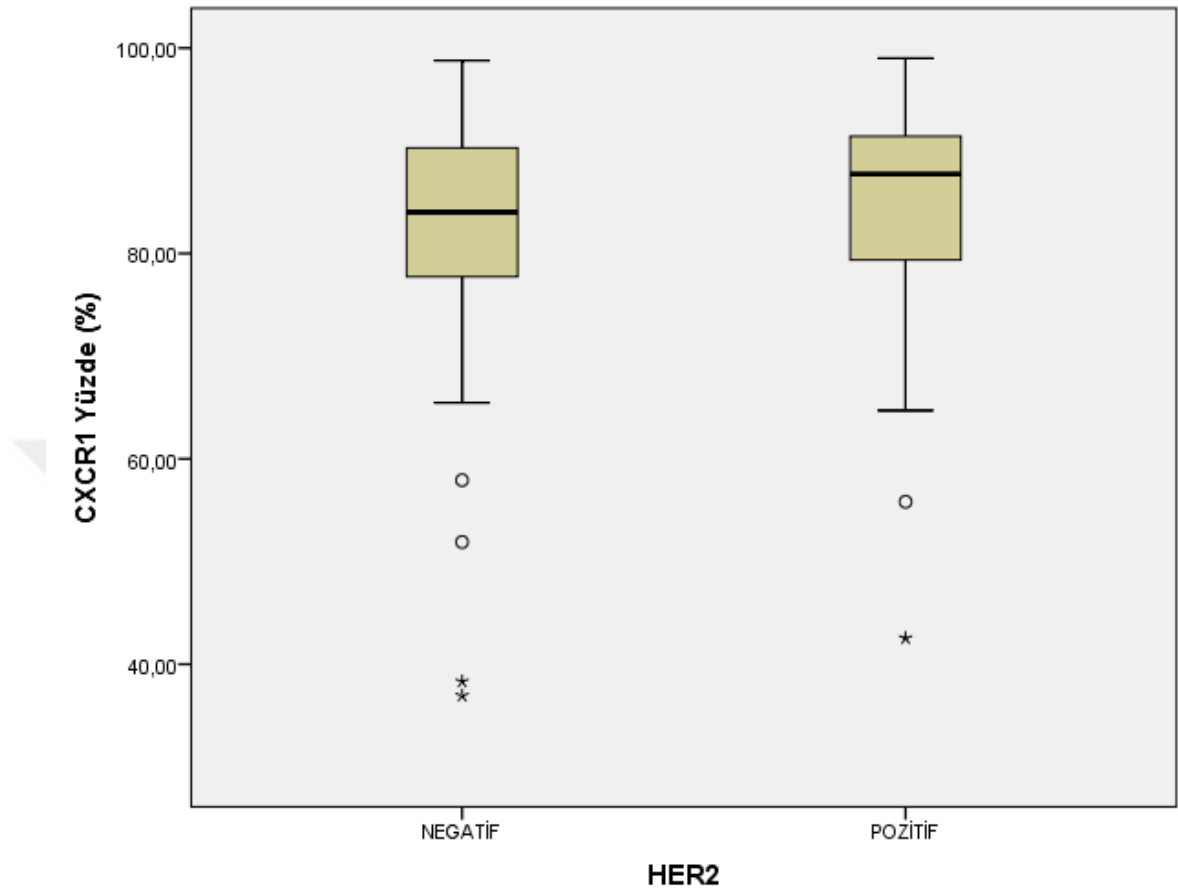
Tablo 4.24. Hastaların HER2 durumlarının CXCR1 ekspresyon durumu ile ilişkisi

HER2			CXCR1 H-Skor	CXCR1 Yüzde (%)
NEGATİF	N	Değer Sayısı	30	30
		Eksik Değer	1	1
	Ortalama		135,3327	79,9573
	Ortanca		145,5480	84,0165
	Standart Sapma		39,69163	16,09833
	Minimum		51,35	36,94
	Maksimum		191,73	98,78
	Persentiller	25	112,2780	75,6735
		50	145,5480	84,0165
		75	163,3405	90,3495
POZİTİF	N	Değer Sayısı	36	36
		Eksik Değer	3	3
	Ortalama		147,5311	83,8932
	Ortanca		147,3740	87,7280
	Standart Sapma		29,20278	11,80933
	Minimum		64,09	42,54
	Maksimum		207,92	99,01
	Persentiller	25	132,9253	79,3355
		50	147,3740	87,7280
		75	166,1425	91,6408



Şekil 4.42. Hastaların HER2 durumlarının CXCR1 H-Skoru ile ilişkisini gösteren kutu çizgi grafiği

Hastaların HER2 ekspresyonu açısından pozitif olması ile CXCR1 ekspresyon yüzdesi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki yoktur (Mann-Whitney U testi, $p=0,385$). HER2 ekspresyonu olmayan hastaların ortalama CXCR1 H-Skoru değeri 84,0165 (75,6735-90,3495), HER2 ekspresyonu olan hastaların ortalama CXCR1 H-Skoru değeri 87,7280(79,3355-91,6408) olarak bulunmuştur. (Bkz. Tablo 4.24. ve Şekil 4.43.)



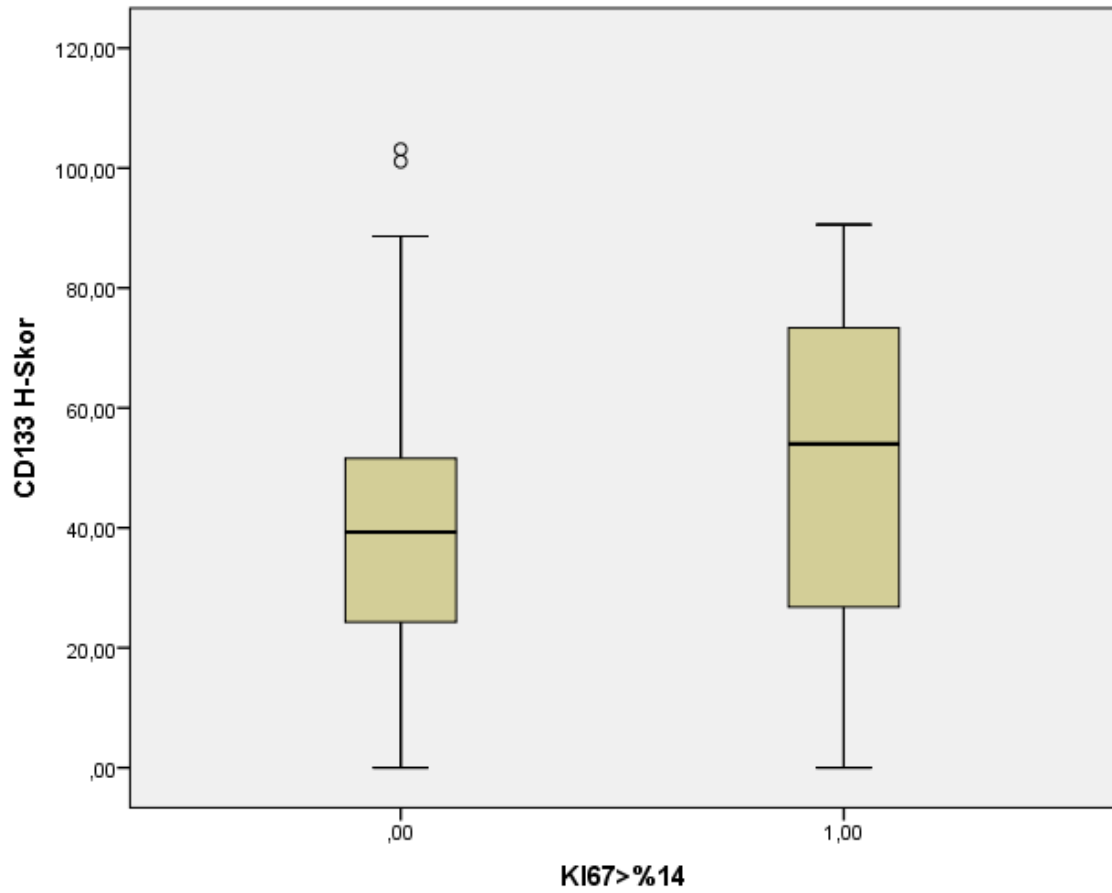
Şekil 4.43. Hastaların HER2 durumlarının CXCR1 ekspresyon yüzdesi ile ilişkisini gösteren kutu çizgi grafiği

4.11. Hastaların Ki67 indekslerinin CD133, M2/TM Oranı ve CXCR1 Ekspresyon Durumlarıyla İlişkisinin İncelenmesi

Hastalarda Ki67 indeksi (>%14) ile CD133 H-Skoru değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki yoktur (Mann-Whitney U testi, $p=0,152$). Ki67>%14 olmayan hastaların ortalama CD133 H-skor değeri 39,2805 (24,2628-52,1023), Ki67>%14 olan hastaların ortalama CD133 H-skor değeri 54,0075(26,6085-74,5655) olarak bulunmuştur.(Bkz. Tablo 4.25. ve Şekil 4.44.)

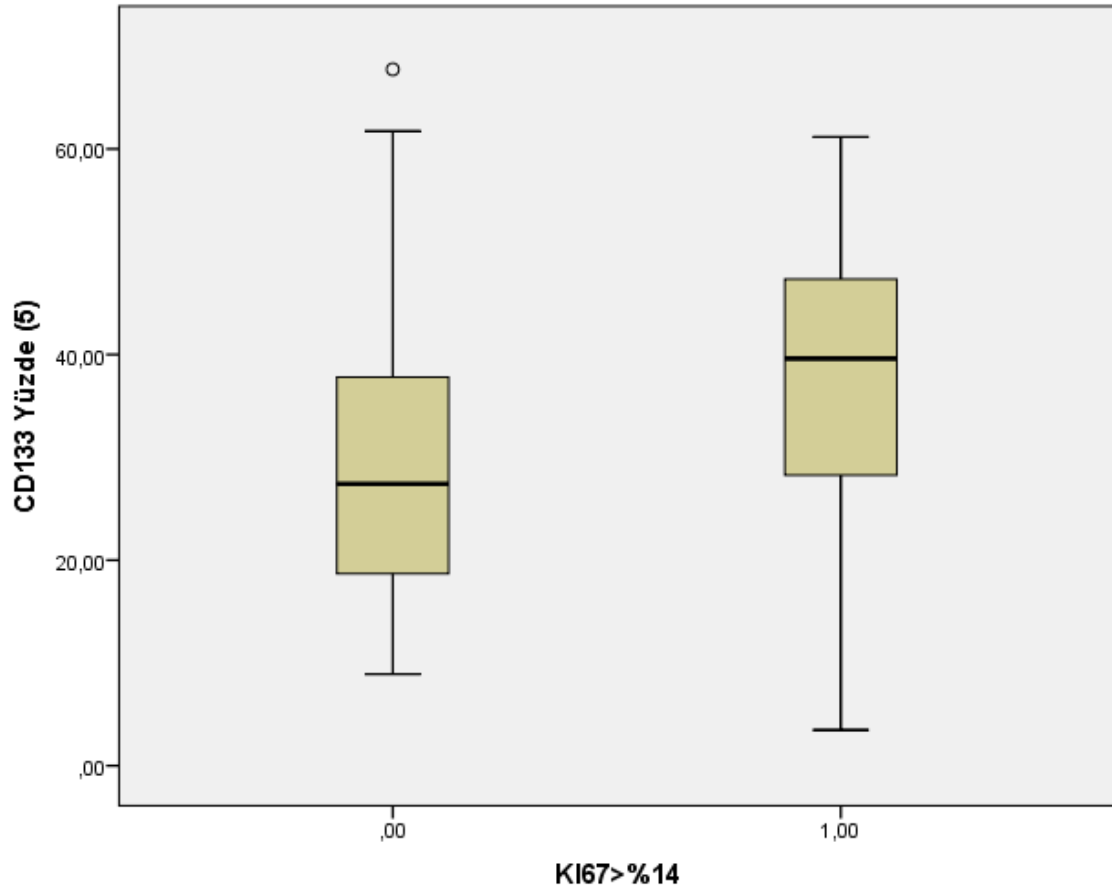
Tablo 4.25. Hastaların Ki67 indekslerinin CD133 H-Skoru ile ilişkisi

Ki67>%14			CD133 H-Skor	CD133 Yüzde (%)
NEGATİF	N	Değer Sayısı	48	44
		Eksik Değer	0	4
	Ortalama		40,7435	29,6473
	Ortanca		39,2805	27,4120
	Standart Sapma		25,04822	14,45244
	Minimum		0,00	8,90
	Maksimum		103,13	67,74
	Persentiller	25	24,2628	18,6743
		50	39,2805	27,4120
		75	52,1023	38,2835
POZİTİF	N	Değer Sayısı	14	13
		Eksik Değer	0	1
	Ortalama		50,5770	37,3245
	Ortanca		54,0075	39,5970
	Standart Sapma		27,97870	15,91178
	Minimum		0,00	3,46
	Maksimum		90,59	61,18
	Persentiller	25	26,6085	24,9035
		50	54,0075	39,5970
		75	74,5655	50,0825



Şekil 4.44. Hastaların Ki67 indekslerinin CD133 H-Skoru ile ilişkisini gösteren kutu çizgi grafiği

Hastaların Ki67>%14 olması ile CD133 ekspresyon yüzdesi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki yoktur (Mann-Whitney U testi, $p=0,065$). Ki67>%14 olmayan hastaların ortalama CD133 H-skor değeri 27,4120 (18,6743-38,2835), Ki67>%14 olan hastaların ortalama CD133 H-skor değeri 39,5970 (24,9035-50,0825) olarak bulunmuştur (Bkz. Tablo 4.25 ve Şekil 4.45.).

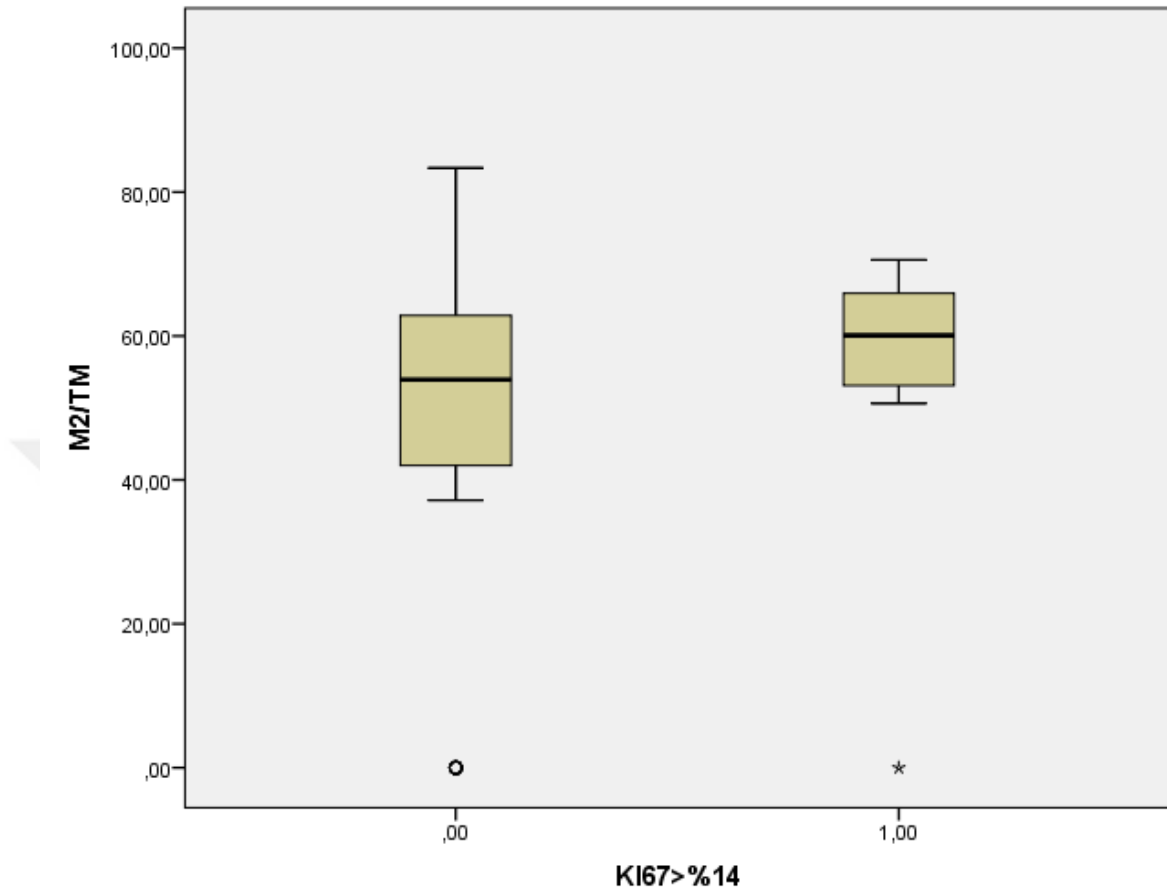


Şekil 4.45. Hastaların Ki67 indekslerinin CD133 ekspresyon yüzdesi ile ilişkisini gösteren kutu çizgi grafiği

Hastaların Ki67>%14 olması ile M2/TM oranı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki yoktur (Mann-Whitney U testi, $p=0,116$). Ki67>%14 olmayan hastaların ortalama M2/TM oranı 53,9400 (41,5963-62,8825) ,Ki67>%14 olan hastaların ortalama M2/TM oranı 60,0675 (52,5225-66,5080) olarak bulunmuştur.(Tablo 4.26. ve Şekil 4.46.)

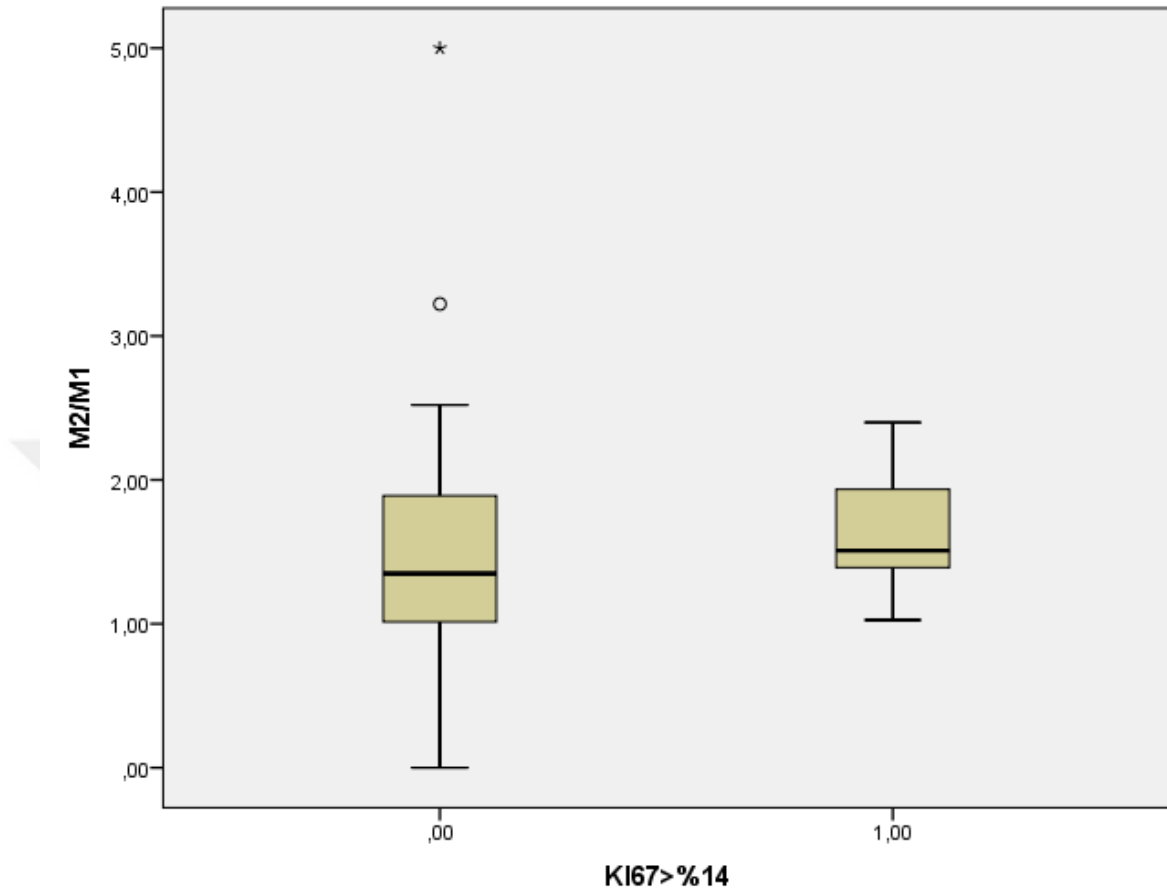
Tablo 4.26. Hastaların Ki67 indekslerinin M2/TM oranı ve M2/M1 oranı ile ilişkisi

Ki67>%14			M2/TM	M2/M1
NEGATİF	N	Değer Sayısı	48	39
		Eksik Değer	0	9
	Ortalama		45.9049	1.5131
	Ortanca		53.9400	1.3500
	Standart Sapma		25.43255	.83503
	Minimum		0.00	0.00
	Maksimum		83.33	5.00
	Persentiller	25	41.5963	.9550
		50	53.9400	1.3500
		75	62.8825	1.9140
POZİTİF	N	Değer Sayısı	14	13
		Eksik Değer	0	1
	Ortalama		56.7531	1.6448
	Ortanca		60.0675	1.5080
	Standart Sapma		17.57610	.46083
	Minimum		0.00	1.03
	Maksimum		70.59	2.40
	Persentiller	25	52.5225	1.2615
		50	60.0675	1.5080
		75	66.5080	2.0425



Şekil 4.46. Hastaların Ki67 indekslerinin M2/TM oranı ile ilişkisini gösteren kutu çizgi grafiği

Hastaların Ki67>%14 olması ile M2/M1 oranı arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki yoktur (Mann-Whitney U testi, $p=0,258$). Ki67>%14 olmayan hastaların ortalama M2/M1 oranı 1,3500 (0,9550-1,9140), Ki67>%14 olan hastaların ortalama M2/M1 oranı 1,5080 (1,2615-2,0425) olarak bulunmuştur. (Bkz. Tablo 4.26. ve Şekil 4.47.)

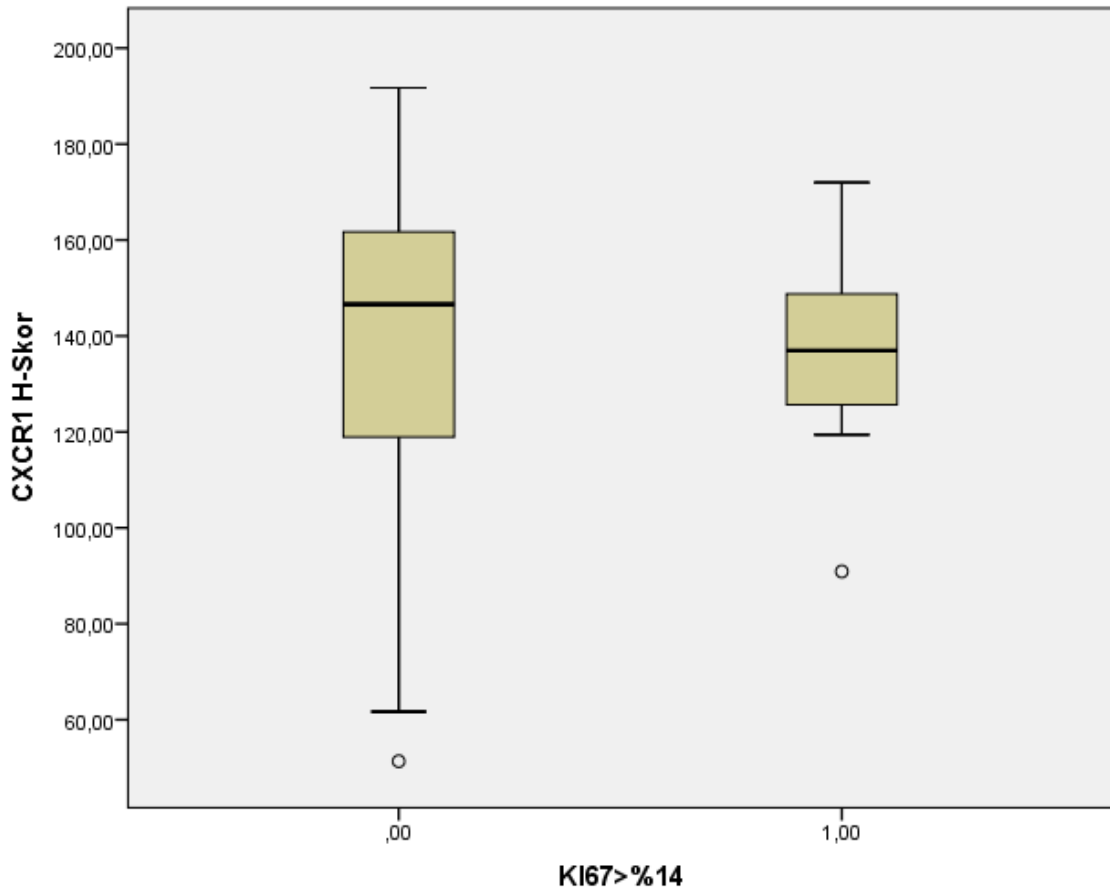


Şekil 4.47. Hastaların Ki67 indekslerinin M2/M1 oranı ile ilişkisini gösteren kutu çizgi grafiği

Hastaların Ki67>%14 olması ile CXCR1 H-Skoru değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki yoktur (Mann-Whitney U testi, , $p=0,595$). Ki67>%14 olmayan hastaların ortalama CXCR1 H-Skoru değeri 146,6180 (117,9390-164,9780), Ki67>%14 olan hastaların ortalama CXCR1 H-Skoru değeri 136,9900 (123,2715-155,6575) olarak bulunmuştur (Bkz. Tablo 4.27. ve Şekil 4.48.).

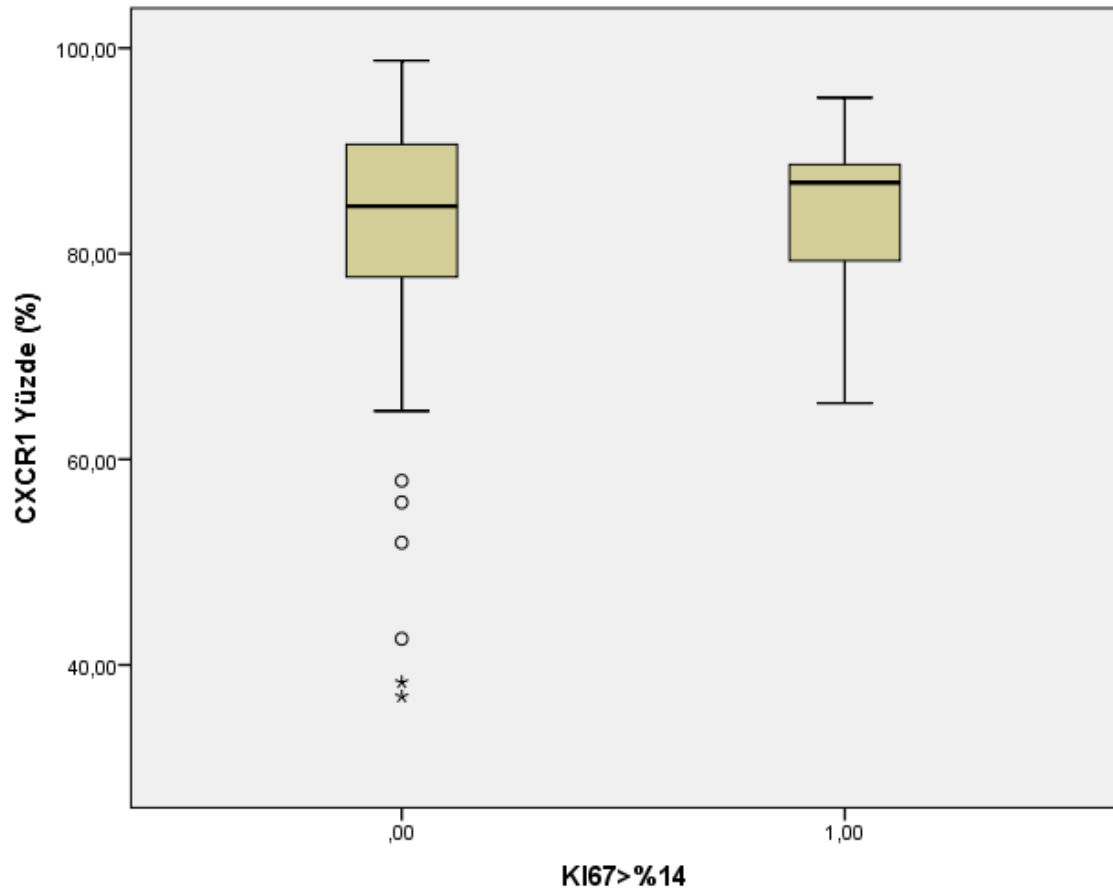
Tablo 4.27. Hastaların Ki67 indekslerinin CXCR1 H-Skoru ile ilişkisi

Ki67>%14			CXCR1 H-Skor	CXCR1 Yüzde (%)
NEGATİF	N	Değer Sayısı	45	45
		Eksik Değer	3	3
	Ortalama		139.3189	80.4700
	Ortanca		146.6180	84.6160
	Standart Sapma		37.97420	15.62847
	Minimum		51.35	36.94
	Maksimum		191.73	98.78
	Persentiller	25	117.9390	77.3100
		50	146.6180	84.6160
		75	164.9780	90.8025
POZİTİF	N	Değer Sayısı	13	13
		Eksik Değer	1	1
	Ortalama		138.3004	83.1912
	Ortanca		136.9900	86.9040
	Standart Sapma		22.31161	9.84749
	Minimum		90.91	65.47
	Maksimum		172.02	95.19
	Persentiller	25	123.2715	76.2050
		50	136.9900	86.9040
		75	155.6575	91.0340



Şekil 4.48. Hastaların Ki67 indekslerinin CXCR1 H-Skoru ile ilişkisini gösteren kutu çizgi grafiği

Hastaların Ki67>%14 olması ile CXCR1 ekspresyon yüzdesi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki yoktur (Mann-Whitney U testi, $p=0,874$). Ki67>%14 olmayan hastaların ortalama CXCR1 ekspresyon yüzdesi 84,6160 (77,3100-90,8025) Ki67>%14 olan hastaların ortalama CXCR1 ekspresyon yüzdesi 86,9040 (76,2050-91,0340) olarak bulunmuştur. (Bkz. Tablo 4.27. ve Şekil 4.49.)



Şekil 4.49. Hastaların Ki67 indekslerinin CXCR1 ekspresyon yüzdesi ile ilişkisini gösteren kutu çizgi grafiği

4.12. Lüminal ve Lüminal Olmayan Moleküler Alt Tipteki Hastaların CD133 Ekspresyon Durumu, M2/TM, M2/M1 Oranları ve CXCR1 Ekspresyon Durumları

LA ve LB moleküler alt tiplerindeki hastalar, lüminal moleküler alt tip; HER2AE ve TN moleküler alt tiplerindeki hastalar lüminal olmayan moleküler alt tip olarak sınıflandırılmıştır.

Lüminal moleküler alt tip, lüminal olmayan moleküler alt tip ve kontrol grubu arasında ortalama CD133 H-Skoru ve ortalama CD133 ekspresyon yüzdesi açısından istatistiksel olarak anlamlı fark vardır. (Kruskal-Wallis testi, $p=0,001$ ve $p=0,001$).

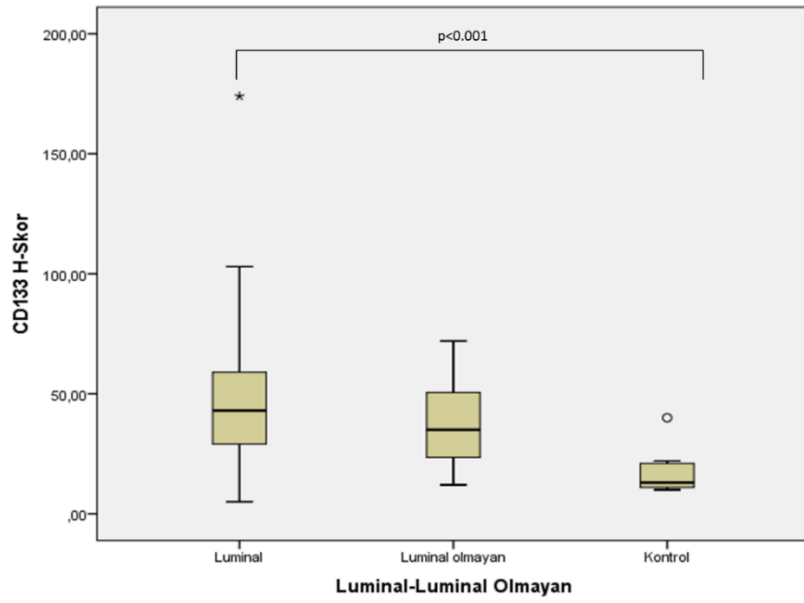
Yapılan ikili analizlerde, lüminal alt tip (43,46300; 29,29700-59,16400) ile kontrol grubu (12,82900; 10,49350-21,24650) ortalama CD133 H-Skorları arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p<0,001$).

CD133 ekspresyon yüzdeleri için yapılan ikili analizlerde lüminal alt tip (28,4620; 19,8425-41,7330) ile kontrol grubu (11,9800; 7,9535-13,7705) arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardır ($p<0,001$).

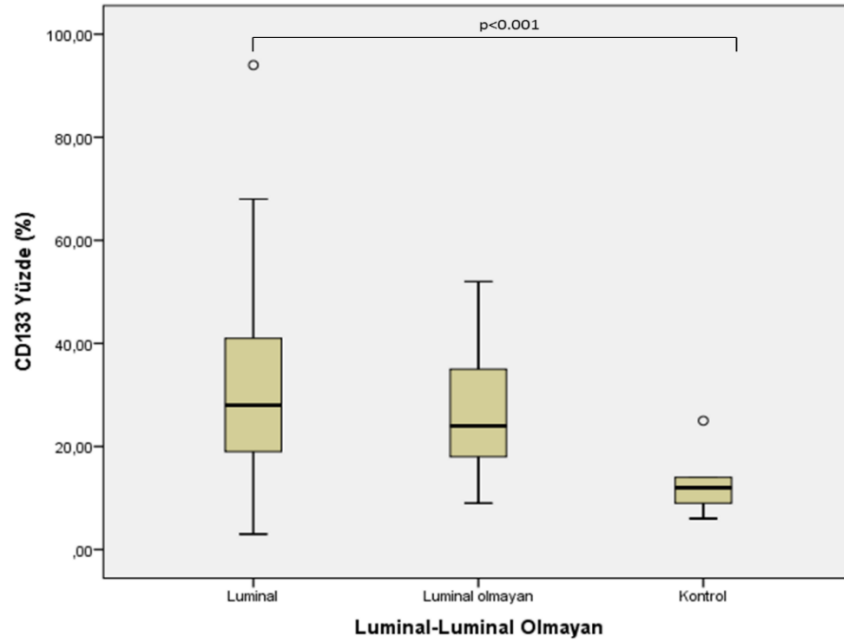
Ancak hem CD133 H-skoru hem de CD133 ekspresyon yüzdesi için yapılan ikili Kruskal Wallis analizlerinde, lüminal ile lüminal olmayan moleküler alt tipler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır ($p=0,803$ ve $p=0,920$). (Bkz. Tablo 4.28., Şekil 4.50., Şekil 4.51.)

Tablo 4.28. Lüminal alt tip, lüminal olmayan alt tip ve kontrol grubu CD133 H-Skoru ve CD133 ekspresyon yüzdesi

Alt tip			CD133 H-Skor	CD133 Yüzde (%)
Lüminal	N	Değer Sayısı	53	53
		Eksik Değer	5	5
	Ortalama		48,92830	32,2415
	Ortanca		43,46300	28,4620
	Standart Sapma		29,321204	17,21556
	Minimum		5,196	3,46
	Maksimum		174,110	93,91
	Persentiller	25	29,29700	19,8425
		50	43,46300	28,4620
		75	59,16400	41,7330
Lüminal olmayan	N	Değer Sayısı	11	11
		Eksik Değer	1	1
	Ortalama		38,09018	26,8343
	Ortanca		35,24700	23,7710
	Standart Sapma		20,569586	14,11813
	Minimum		12,041	8,90
	Maksimum		71,530	52,31
	Persentiller	25	22,93200	17,6480
		50	35,24700	23,7710
		75	53,42900	38,0000
Kontrol	N	Değer Sayısı	9	9
		Eksik Değer	1	1
	Ortalama		17,28144	12,5846
	Ortanca		12,82900	11,9800
	Standart Sapma		9,746919	7,12835
	Minimum		9,918	6,11
	Maksimum		40,415	30,05
	Persentiller	25	10,49350	7,9535
		50	12,82900	11,9800
		75	21,24650	13,7705



Şekil 4.50. Lüminal alt tip, lüminal olmayan alt tip ve kontrol grubu CD133 H-Skorları için kutu çizgi grafiği

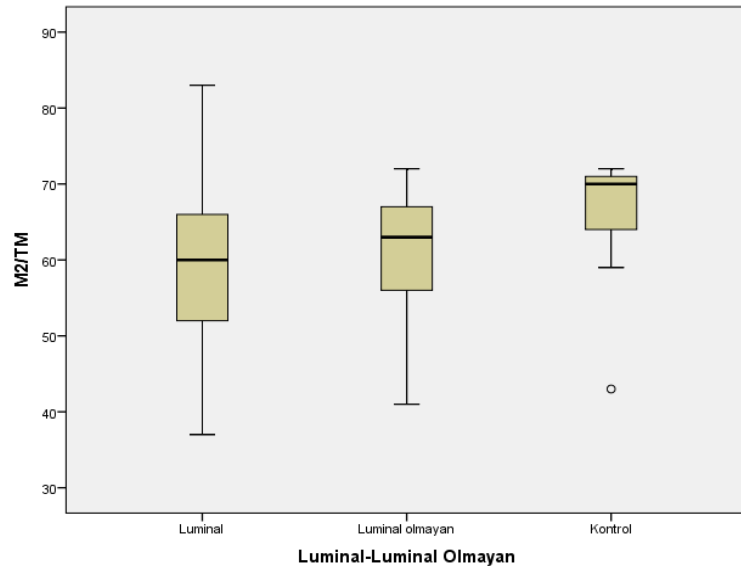


Şekil 4.51. Lüminal alt tip, lüminal olmayan alt tip ve kontrol grubu CD133 ekspresyon yüzdeleri için kutu çizgi grafiği

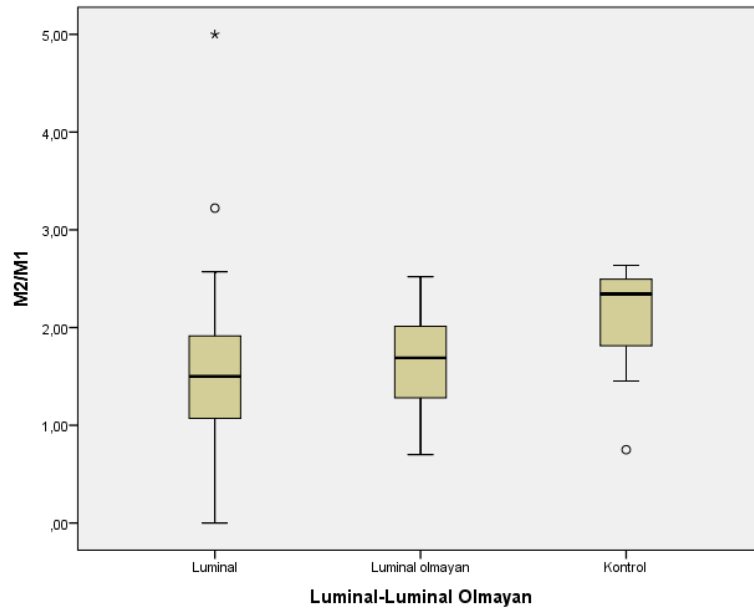
M2/TM ve M2/M1 oranları açısından, lüminal alt tip (60,000; 51,73950-65,86600) ve Ortanca=1,50; 1,0510-1,9245), lüminal olmayan alt tip (63,333; 54,000-67,308 ve Ortanca=1,6900; 1,1710-2,0260) ve kontrol grubu (70,27000; 59,211-72,414) ve Ortanca=2,3430; 1,4520-2,6250) arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur (Kruskal-Wallis testi, $p=0,082$ ve $p=0,093$) (Bkz. Tablo 4.29., Şekil 4.52., Şekil 4.53.).

Tablo 4.29. Lüminal alt tip, lüminal olmayan alt tip ve kontrol grubu M2/TM ve M2/M1 oranları

Alt tip			M2/TM	M2/M1
Lüminal	N	Değer Sayısı	48	49
		Eksik Değer	10	9
	Ortalama		58,77858	1,5463
	Ortanca		60,00000	1,5000
	Standart Sapma		9,250631	,76653
	Minimum		37,179	0,00
	Maksimum		83,333	5,00
	Persentiller	25	51,73950	1,0510
		50	60,00000	1,5000
		75	65,86600	1,9245
Lüminal olmayan	N	Değer Sayısı	11	11
		Eksik Değer	1	1
	Ortalama		60,88818	1,6521
	Ortanca		63,33300	1,6900
	Standart Sapma		8,860514	,53101
	Minimum		41,176	,70
	Maksimum		72,000	2,52
	Persentiller	25	54,00000	1,1710
		50	63,33300	1,6900
		75	67,30800	2,0260
Kontrol	N	Değer Sayısı	7	7
		Eksik Değer	3	3
	Ortalama		65,22943	2,0494
	Ortanca		70,27000	2,3430
	Standart Sapma		10,687601	,69785
	Minimum		43,284	,75
	Maksimum		72,500	2,64
	Persentiller	25	59,21100	1,4520
		50	70,27000	2,3430
		75	72,41400	2,6250



Şekil 4.52. Lüminal alt tip, lüminal olmayan alt tip ve kontrol grubu M2/TM oranları için kutu çizgi grafiği



Şekil 4.53. Lüminal alt tip, lüminal olmayan alt tip ve kontrol grubu M2/M1 oranları yüzdeleri için kutu çizgi grafiği

Lüminal moleküler alt tip, lüminal olmayan moleküler alt tip ve kontrol grubu arasında CXCR1 H-Skoru ve CXCR1 ekspresyon yüzdesi açısından istatistiksel olarak anlamlı fark vardır. (Kruskal-Wallis testi, $p < 0,001$ ve $p < 0,001$).

Yapılan ikili analizlerde, lüminal alt tip (Ortanca=144,5330; 120,5890-161,7030) ile kontrol grubu (Ortanca=47,8688; 86,5965-95,0928) ve lüminal olmayan alt tip (Ortanca=154,8770; 134,90-181,4120) ile kontrol grubu (Ortanca=86,5965; 47,8688-95,0928) CXCR1 H-Skorları arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p = 0,001$ ve $p < 0,001$).

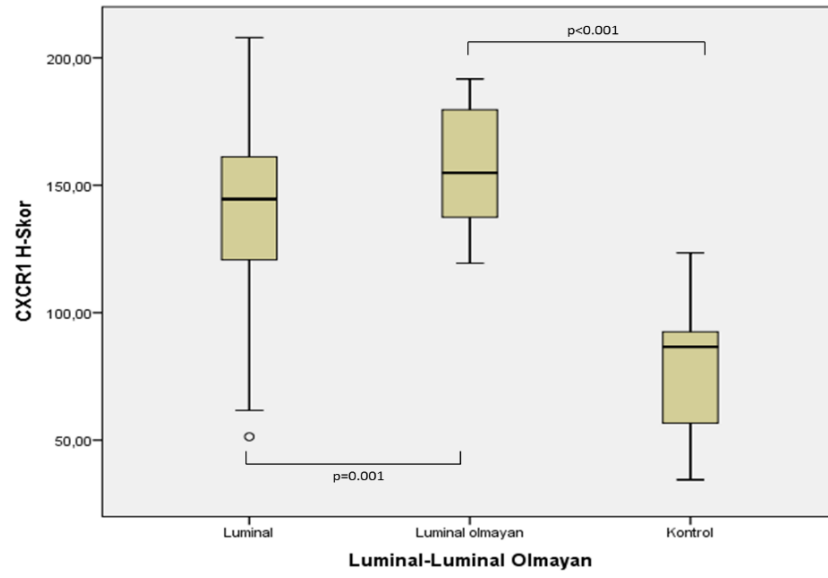
CXCR1 ekspresyon yüzdeleri için yapılan ikili analizlerde lüminal alt tip (Ortanca=85,3930; 78,0490-90,00) ile kontrol grubu (Ortanca=54,6465; 29,7023-60,6320) ve lüminal olmayan alt tip (Ortanca=90,2770; 79,00-95,1880) ile kontrol grubu (Ortanca=54,6465; 29,7023-60,6320) arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardır ($p = 0,001$ ve $p < 0,001$).

Hem CXCR1 H-skoru hem de CXCR1 ekspresyon yüzdesi için yapılan ikili Kruskal Wallis analizlerinde, lüminal ile lüminal olmayan moleküler alt tipler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır ($p = 0,562$ ve $p = 0,223$).

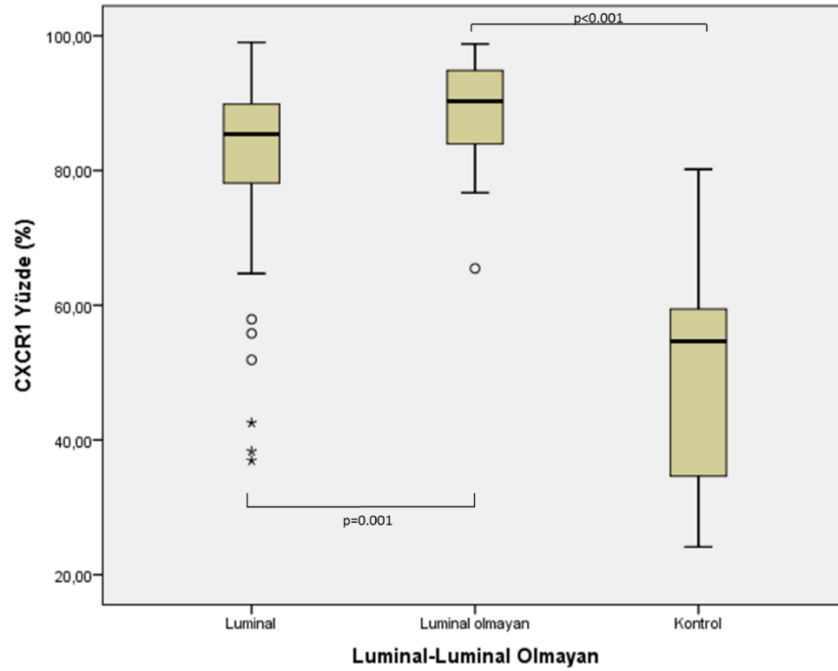
Ancak ikili Kruskal Wallis analizindeki düzeltme faktörü göz önüne alınmadığında, lüminal ile lüminal olmayan alt tipler arasında istatistiksel olarak anlamlı farka yakın bir sonuç elde edilmiştir ($p = 0,074$). (Bkz. Tablo 4.30., Şekil 4.54., Şekil 4.55.)

Tablo 4.30. Lüminal alt tip, lüminal olmayan alt tip ve kontrol grubu CXCR1 H-Skoru ve CXCR1 ekspresyon yüzdesi

Alt tip			CXCR1 H-Skor	CXCR1 Yüzde (%)
Lüminal	N	Değer Sayısı	55	55
		Eksik Değer	3	3
	Ortalama		139,0602	80,8892
	Ortanca		144,5330	85,3930
	Standart Sapma		35,72547	14,33932
	Minimum		51,35	36,94
	Maksimum		207,92	99,01
	Persentiller	25	120,5890	78,0490
		50	144,5330	85,3930
		75	161,7030	90,0000
Lüminal olmayan	N	Değer Sayısı	11	11
		Eksik Değer	1	1
	Ortalama		156,6170	88,1793
	Ortanca		154,8770	90,2770
	Standart Sapma		24,94816	10,29413
	Minimum		119,42	65,47
	Maksimum		191,73	98,78
	Persentiller	25	134,9000	79,0000
		50	154,8770	90,2770
		75	181,4120	95,1880
Kontrol	N	Değer Sayısı	8	8
		Eksik Değer	2	2
	Ortalama		78,6898	50,2194
	Ortanca		86,5965	54,6445
	Standart Sapma		29,55648	18,85220
	Minimum		34,47	24,12
	Maksimum		123,50	80,18
	Persentiller	25	47,8688	29,7023
		50	86,5965	54,6445
		75	95,0928	60,6320



Şekil 4.54. Lüminal alt tip, lüminal olmayan alt tip ve kontrol grubu CXCR1 H-Skorları için kutu çizgi grafiği



Şekil 4.55. Lüminal alt tip, lüminal olmayan alt tip ve kontrol grubu CXCR1 ekspresyon yüzdeleri için kutu çizgi grafiği

4.13. Triple Negatif ve Triple Negatif Olmayan Moleküler Alt Tipteki Hastaların CD133 Ekspresyon Durumu, M2/TM, M2/M1 Oranları ve CXCR1 Ekspresyon Durumları

LA, LB, HER2AE moleküler alt tiplerindeki hastalar triple negatif olmayan moleküler alt tip olarak sınıflandırılarak, TN moleküler alt tipteki hastalarla karşılaştırılmıştır.

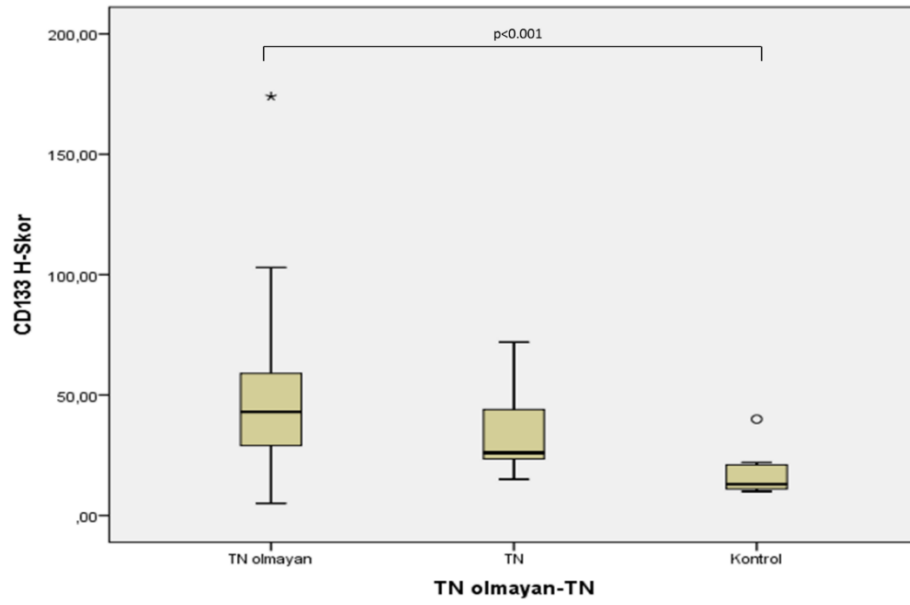
TN olmayan alt tip, TN alt tip ve kontrol grubu arasında CD133 H-Skoru ve CD133 ekspresyon yüzdesi açısından istatistiksel olarak anlamlı fark vardır. (Kruskal-Wallis testi, $p=0,001$ ve $p=0,001$).

Yapılan ikili analizlerde, CD133 H-Skorları ve CD133 ekspresyon yüzdeleri yönünden TN olmayan alt tip (Ortanca=43,463004; 29,29700- 59,16400 ve Ortanca=28,4620; 19,8425-41,7330) ile kontrol grubu (Ortanca=112,82900; 10,49350-21,24650 ve Ortanca=11,9800; 7,9535-13,7705) arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p<0,001$ ve $p=0,001$).

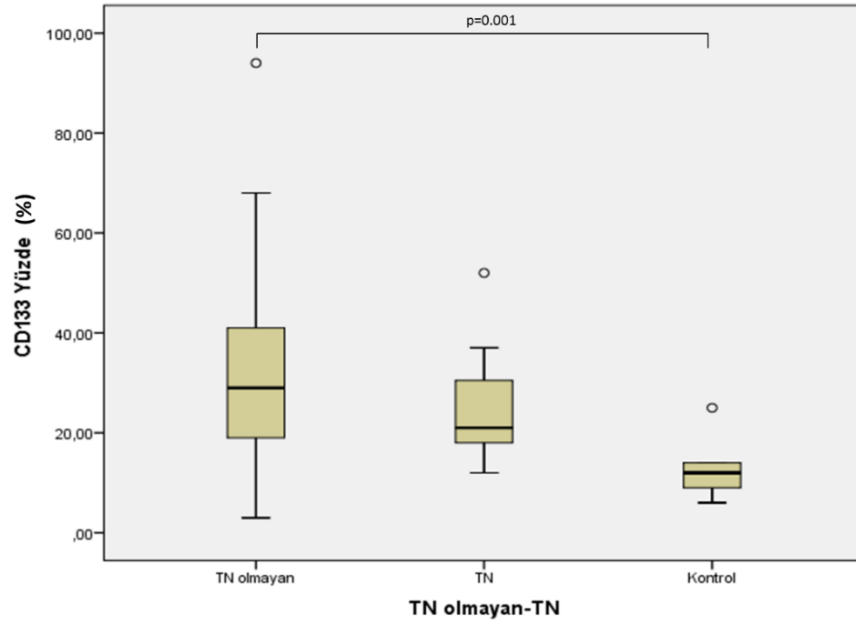
Ancak hem CD133 H-skoru hem de CD133 ekspresyon yüzdesi için yapılan ikili Kruskal Wallis analizlerinde, TN (26,29900; 22,93200-53,42900 ve 18,6490; 17,6480-38,0000) ile TN olmayan (Ortanca=43,463004; 29,29700- 59,16400 ve Ortanca=28,4620; 19,8425-41,7330) moleküler alt tipler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır ($p=0,699$ ve $p=0,902$). (Bkz. Tablo 4.31., Şekil 4.56. ve Şekil 4.57.)

Tablo 4.31. TN alt tip, TN olmayan alt tip ve kontrol grubu CD133 H-Skoru ve CD133 ekspresyon yüzdesi

Alt tip			CD133 H-Skor	CD133 Yüzde (%)
TN Olmayan	N	Değer Sayısı	57	57
		Eksik Değer	6	6
	Ortalama		48,48188	31,9773
	Ortanca		43,46300	28,4620
	Standart Sapma		28,832280	17,02673
	Minimum		5,196	3,46
	Maksimum		174,110	93,91
	Persentiller	25	29,29700	19,8425
		50	43,46300	28,4620
		75	59,16400	41,7330
TN	N	Değer Sayısı	7	7
		Eksik Değer	0	0
	Ortalama		35,53214	25,8959
	Ortanca		26,29900	18,6490
	Standart Sapma		20,037169	14,17503
	Minimum		14,963	12,47
	Maksimum		71,530	52,31
	Persentiller	25	22,93200	17,6480
		50	26,29900	18,6490
		75	53,42900	38,0000
Kontrol	N	Değer Sayısı	9	9
		Eksik Değer	1	1
	Ortalama		17,28144	12,5846
	Ortanca		12,82900	11,9800
	Standart Sapma		9,746919	7,12835
	Minimum		9,918	6,11
	Maksimum		40,415	30,05
	Persentiller	25	10,49350	7,9535
		50	12,82900	11,9800
		75	21,24650	13,7705



Şekil 4.56. TN alt tip, TN olmayan alt tip ve kontrol grubu CD133 H-Skorları için kutu çizgi grafiği

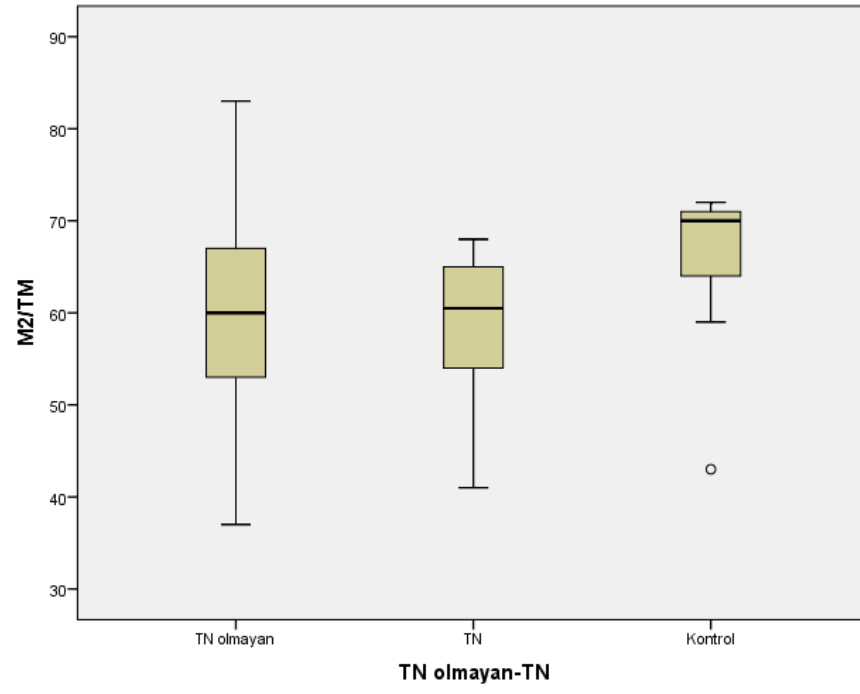


Şekil 4.57. TN alt tip, TN olmayan alt tip ve kontrol grubu CD133 ekspresyon yüzdesi için kutu çizgi grafiği

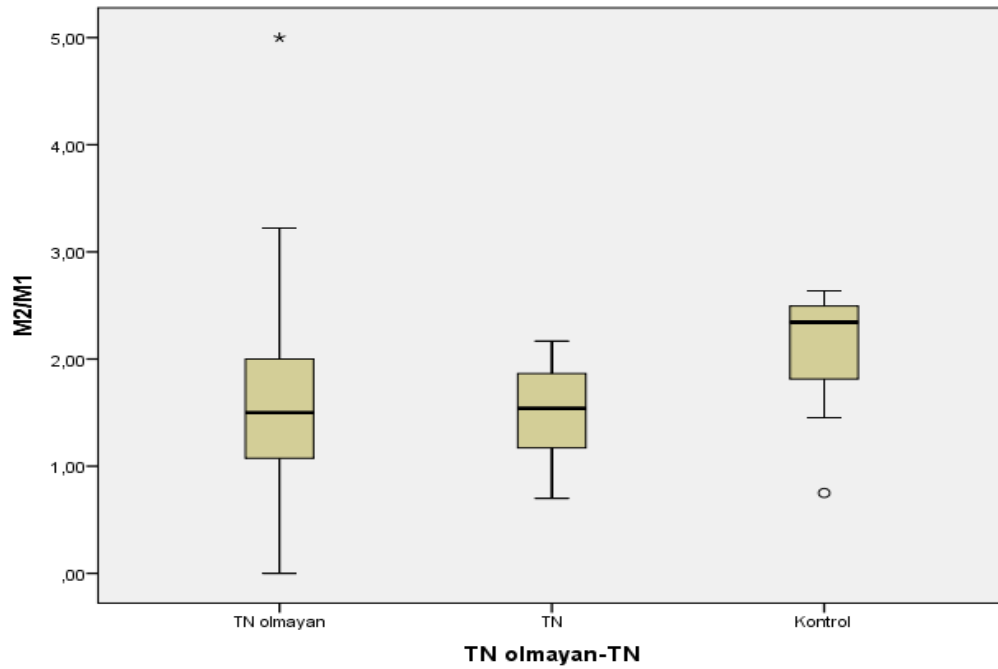
M2/TM ve M2/M1 oranları açısından, TN alt tip (60,74800; 50,79400-65,92575 ve Ortanca=1,5400; 1,0533-1,9405), TN olmayan alt tip (60,74800; 50,79400-65,92575ve Ortanca=1,50; 1,0733-2,00) ve kontrol grubu (70,27000; 59,21100-72,41400 ve 2,3430; 1,4520-2,6250) arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur. (Kruskal-Wallis testi, $p=0.127$ ve $p=0.135$). (Bkz. Tablo 4.32., Şekil 4.58. ve Şekil 4.59.)

Tablo 4.32. TN alt tip, TN olmayan alt tip ve kontrol grubu M2/TM ve M2/M1 oranları

Alt tip			M2/TM	M2/M1
TN Olmayan	N	Değer Sayısı	53	54
		Eksik Değer	10	9
	Ortalama		59,26330	1,5733
	Ortanca		60,00000	1,5000
	Standart Sapma		9,153507	,74881
	Minimum		37,179	0,00
	Maksimum		83,333	5,00
	Persentiller	25	52,44650	1,0733
		50	60,00000	1,5000
		75	66,66700	2,0000
TN	N	Değer Sayısı	6	6
		Eksik Değer	1	1
	Ortalama		58,36450	1,4972
	Ortanca		60,74800	1,5400
	Standart Sapma		9,855347	,52431
	Minimum		41,176	,70
	Maksimum		68,421	2,17
	Persentiller	25	50,79400	1,0533
		50	60,74800	1,5400
		75	65,92575	1,9405
Kontrol	N	Değer Sayısı	7	7
		Eksik Değer	3	3
	Ortalama		65,22943	2,0494
	Ortanca		70,27000	2,3430
	Standart Sapma		10,687601	,69785
	Minimum		43,284	,75
	Maksimum		72,500	2,64
	Persentiller	25	59,21100	1,4520
		50	70,27000	2,3430
		75	72,41400	2,6250



Şekil 4.58. TN alt tip, TN olmayan alt tip ve kontrol grubu M2/TM oranları için kutu çizgi grafiği



Şekil 4.59. TN alt tip, TN olmayan alt tip ve kontrol grubu M2/M1 oranları için kutu çizgi grafiği

TN alt tip, TN olmayan alt tip ve kontrol grubu arasında CXCR1 H-Skoru ve CXCR1 ekspresyon yüzdesi açısından istatistiksel olarak anlamlı fark vardır. (Kruskal-Wallis testi, $p < 0,000$ ve $p < 0,000$).

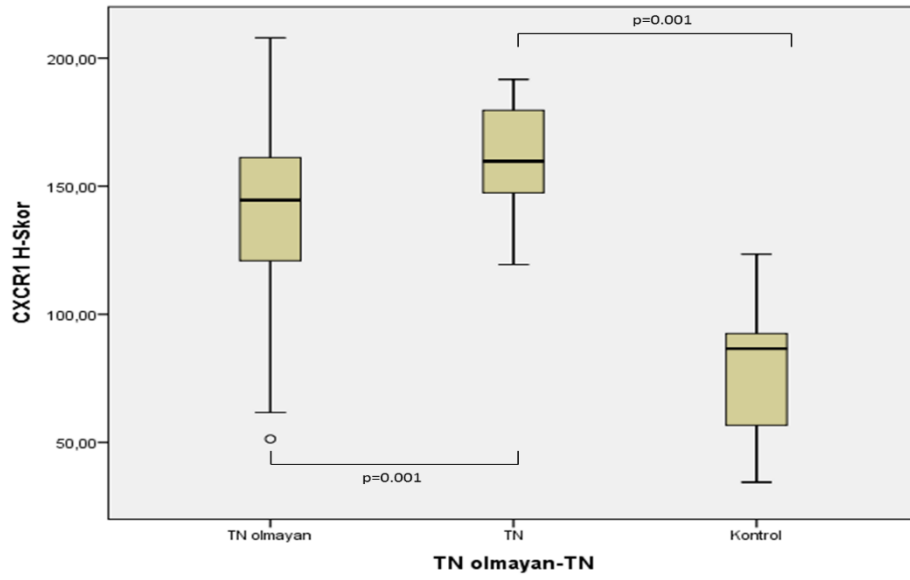
Yapılan ikili analizlerde, TN alt tip (Ortanca=159,72; 140,00-181,4120) ile kontrol grubu (Ortanca=86,5965; 47,8688-95,0928) ve TN olmayan alt tip (Ortanca=144,5330; 120,8940-161,7030) ile kontrol grubu (Ortanca=86,5965; 47,8688-95,0928) CXCR1 H-Skorları arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p=0,001$ ve $p=0,001$).

CXCR1 ekspresyon yüzdeleri için yapılan ikili analizlerde TN alt tip (Ortanca=90,2770; 79,00-94,4380) ile kontrol grubu (Ortanca=54,6445; 29,7023-60,6320) ve TN olmayan alt tip (Ortanca=86,1320; 78,0490-90,5670) ile kontrol grubu (Ortanca=54,6445; 29,7023-60,6320) arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardır ($p=0,001$ ve $p=0,001$).

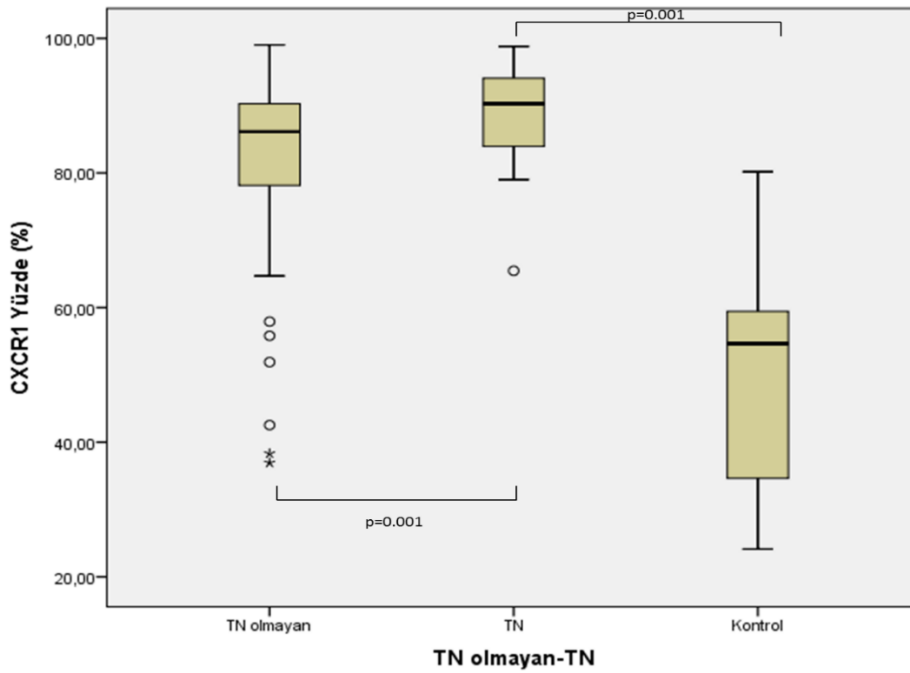
Hem CXCR1 H-skoru hem de CXCR1 ekspresyon yüzdesi için yapılan ikili Kruskal Wallis analizlerinde, TN ile TN olmayan moleküler alt tipler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır ($p=0,414$ ve $p=0.673$). (Bkz. Tablo 4.33., Şekil 4.60. ve Şekil 4.61.)

Tablo 4.33. TN alt tip, TN olmayan alt tip ve kontrol grubu CXCR1 H-Skoru ve CXCR1 ekspresyon yüzdesi

Alt tip			CXCR1 H-Skor	CXCR1 Yüzde (%)
TN Olmayan	N	Değer Sayısı	59	59
		Eksik Değer	4	4
	Ortalama		139,7655	81,4966
	Ortanca		144,5330	86,1320
	Standart Sapma		35,08031	14,18097
	Minimum		51,35	36,94
	Maksimum		207,92	99,01
	Persentiller	25	120,8940	78,0490
		50	144,5330	86,1320
		75	161,7030	90,5670
TN	N	Değer Sayısı	7	7
		Eksik Değer	0	0
	Ortalama		160,7047	87,2250
	Ortanca		159,7200	90,2770
	Standart Sapma		25,33205	11,40910
	Minimum		119,42	65,47
	Maksimum		191,73	98,78
	Persentiller	25	140,0000	79,0000
		50	159,7200	90,2770
		75	181,4120	94,4830
Kontrol	N	Değer Sayısı	8	8
		Eksik Değer	2	2
	Ortalama		78,6898	50,2194
	Ortanca		86,5965	54,6445
	Standart Sapma		29,55648	18,85220
	Minimum		34,47	24,12
	Maksimum		123,50	80,18
	Persentiller	25	47,8688	29,7023
		50	86,5965	54,6445
		75	95,0928	60,6320



Şekil 4.60. TN alt tip, TN olmayan alt tip ve kontrol grubu CXCR1 H-Skorları için kutu çizgi grafiği



Şekil 4.61. TN alt tip, TN olmayan alt tip ve kontrol grubu CXCR1 ekspresyon yüzdesi için kutu çizgi grafiği

5.TARTIŞMA

5.1. Hastaların Demografik Özellikleri

Çalışmamızda klinik ve patolojik olarak meme kanseri tanısı alan hastalarda ER, PR, HER2 reseptör ekspresyonları ve Ki67 proliferasyon indeksine göre immunofenotipleme yapılmış ve hastalar LA, LB, HER2AE ve TN moleküler alt tiplerine ayrılarak karşılaştırılmıştır.

Çalışmaya dahil edilen 70 kanser hastasının 36'sının LB alt grubuna, 22'sinin ise LA alt grubuna dahil olması, önceki çalışmalarla uyumlu şekilde, meme kanseri hastalarının daha çok lüminal moleküler alt tiplerde (LA ve LB) olduğunu göstermiştir(10,193). Literatürde en çok görülen moleküler alt tip LA (%40) olmasına karşın (193) çalışmada en sık görülen moleküler alt tip LB'dir (%45).

Çalışmamıza dahil olan farklı moleküler alt tiplerdeki hastaların yaşları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır ($p=0.235$). Ancak LA moleküler alt tipindeki hastaların ortalanca yaşı, diğer gruplara göre yüksektir. Hasta grupları içinde LA moleküler alt tipinin diğer moleküler alt tiplere göre prognozu daha iyi ve lokal *rekürrens* riski düşüktür (194). Bu nedenle daha geç yaşlarda ortaya çıktığı ileri sürülebilir. Ortanca yaşı en küçük olan moleküler alt tip ise LB'dir. Hasta grupları içinde LB moleküler alt tipinde olanların LA moleküler alt tipine göre daha genç yaşta tanı aldığı önceki çalışmalarla gösterilmiştir (195,196).

Meme kanserinin insidansı, kadınlarda erkeklere göre 122 kat daha yüksektir(197). Ancak çalışmamızda meme kanseri olan erkek oranı önceki çalışmalara göre daha yüksektir. Hasta grupları içinde 70 meme kanseri hastasının 3'ü (%3,8) erkektir. Önceki çalışmalarda erkek hastaların daha çok LA (%44-75) alt tipte olduğu gösterilmiştir (198,199). Ancak çalışmamızda erkek hastalar LA, LB ve TN gruplara eşit sayıda dağılmıştır. Ancak erkek hasta sayısı, moleküler alt tip dağılımının anlaşılması için yeterli değildir.

5.2. Hastaların Histopatolojik Özelliklerinin Değerlendirilmesi

Genel olarak meme kanserinin patolojisine yönelik diagnostik mikroskopik değişiklikler tanımlanmakla birlikte, moleküler alt tiplerine yönelik histopatolojik değişikliği tanımlayan mikroskopik bulgular referans kitaplarda yer almamaktadır (200,201).

Çalışmada yer alan farklı moleküler alt tiplerdeki hastalara ait tümör kesitlerinde yapılan histopatolojik değerlendirme sonucunda, lüminal alt tiplerdeki (LA ve LB) hastalara ait meme dokusunda tümör hücrelerinin ortası lümene benzer boşlukları olan tübüler yapılar oluşturdukları gözlemlenmiştir. Ancak bu yapı, tüm lüminal grup hastalarında gözlemlenmemiştir. Aynı moleküler alt tipteki hastalara ait tümör dokularının görüntüsü farklılıklar göstermektedir. Bu nedenle tümör dokusunun reseptör ekspresyon durumu ile morfoloji arasında direkt ilişki yoktur. Önceki yayınlarda lüminal alt tip; lobüler, mikropapiller, müsinöz, nöroendokrin, pleomorfik lobüler, tübüler, osteoklastik invazif duktal ve apokrin karsinomlarla ilişkilendirilmiştir (202). Lüminal (LA ve LB) moleküler alt tipleri en çok duktal tiptedir (sırasıyla %73,8 ve 87,2%) (203).

HER2 aşırı eksprese eden gruptaki hastalarda bağ dokusu içine dissemine olmuş küçük tümör hücresi kümeleri ve kordonları görülmektedir. HER2 aşırı eksprese eden moleküler alt tipteki kanserler, yüksek *grade'lidir* ve invazif lobüler, mikropapiller ve apokrin karsinom ile ilişkili bulunmuştur (202,204,205). Triple negatif moleküler alt tipindeki hastalara ait tümör dokusunda hücrelerin paralel ya da farklı yönelimlere sahip, ince bağ dokusu ile ayrılmış kordonlar halinde düzenlendiği görülmüştür. Triple negatif moleküler alt tipte de tümör dokusunun bağ dokusu bileşenine dissemine olmuş 3-4 tümör hücresinden oluşan küçük tümör adacıkları yapısı izlenmiştir. TN moleküler alt tipindeki kanserler içinde sınıflandırılan *claudin'i* düşük eksprese eden (claudin low) moleküler alt tip, adenoid kistik, metaplastik ve medullar karsinomlarla ilişkilendirilmiştir. TN moleküler alt tipteki kanserler, yüksek *grade'li* ve büyük çapta olma eğilimindedir (202,205, 206). Disseminasyon ve tümöre yayılmış küçük hücre

gruplarının varlığı, önceki çalışmalarla gösterilen HER2AE ve TN moleküler alt tiplerinin yüksek *grade'i* ve kötü prognozuyla ilişkilendirilebilir. Ancak gözlenen bu yapılar moleküler alt tipe özgü değildir.

İnfiltratif hücreler, lüminal olmayan alt tiplerde daha yoğundur ve tümör hücreleriyle daha yakın ilişki halindedir. Önceki çalışmalarda, lüminal A moleküler alt tipteki meme kanserinin CD68⁺ fenotipte makrofajlarla daha az infiltre olduğu belirtilmiştir (190). İnfiltratif hücrelerin üstlendikleri pro- ya da antitümörijenik roller patogeneze için önem taşımaktadır (207).

Çalışmamızda tümör dokusundaki *infiltratif* hücrelerin çoğunluğunu makrofaj morfolojisinde hücreler oluşturmuştur. Benzer şekilde önceki çalışmalarda da makrofajların tümör kitlesinin %50'ye kadarını oluşturabildiği gösterilmiştir (208). Çalışmamızda HER2 ve TN moleküler alt tiplerdeki bağ dokusu, immün sistem hücreleri açısından daha zengin olduğu görülmüştür. Önceki çalışmalarda, TN moleküler alt tipte tümörle ilişkili makrofaj infiltrasyonunun daha yüksek olduğu gösterilmiştir (190).

Lüminal moleküler alt tiplerde belirgin olmak üzere, tümör kümelerinin periferinde daha çok CD133, merkezi ya da lümene yakın kısımlarında ise CXCR1 antijeninin daha şiddetli eksprese olduğu izlenmiştir. Önceki çalışmalarda meme kanseri kök hücresi nişinin perivasküler bölgede olduğu gösterilmiştir. Bu bulgu normal meme dokusundaki kök hücrelerin, alveol ve duktus bazal kompartmanında yerleştiğine dair önceki bulgularla uyumludur (67).

CXCR1'in lümene yakın yerleşmesi, lümendeki IL-8 seviyesinin artışıyla açıklanabilir. Bu bulgular doğrultusunda, CXCR1'i hedefleyen ilaçların, tümör hücrelerinin santral ya da lümene komşu bölgelerine ulaşması, ilaç etkinliği için önem taşıyabilir düşüncesine varılmıştır. Bu konuda yapılan çalışmalarda benzer bulguya rastlanılmamıştır.

Lüminal moleküler alt tiplerde CD133 ekspresyonu HERAE ve TN moleküler alt tiplere göre daha şiddetlidir. CD133⁺ olan dolaşımdaki tümör hücreleri, daha çok lüminal moleküler alt tipteki hastalardan izole edilmektedir(57). CD133 ekspresyonu,

lüminal moleküler alt tiplerde daha çok bulunan meme kanseri kök hücre tipi için fenotipik özellik olabilir. Çalışmamızda TN moleküler alt tipte CXCR1'in daha şiddetli eksprese olduğu görülmüştür. CXCR1 upregülasyonu, invazyon, metastaz ve ilaç direnciyle ilişkilidir (156). Çalışmamızda CXCR1'in tümör hücrelerinin sadece apikal membran domaininde değil, aynı zamanda sitoplazmada da eksprese olduğu görülmüştür. Benzer bir çalışmada, prostat kanserinde apikal olmayan (sitoplazmik) IL-8, CXCR1 ve CXCR2 ekspresyonları, proliferasyon ve damar yoğunluğuyla ilişkilendirilmiştir (209). Bu nedenle çalışmamızda izlenen sitoplazmik CXCR1 ekspresyonunun tümör hücrelerinin proliferatif özelliklerinden ve çevre dokunun damarlanma artışı nedeniyle gözlemlendiği düşünülmüştür.

5.3. Hastaların ER, PR, HER2 Durumları ve Ki67 indeksleri

Çalışmamıza dahil olan LA, LB, HERAE ve TN moleküler alt tiplerdeki hastalar, ER, PR, HER2 reseptör ekspresyonları ve Ki67 proliferasyon indeksi açısından değerlendirilmiştir.

Çalışmamızda LA ve LB gruplarındaki hastaların çoğu ER ekspresyonu göstermektedir. ER ekspresyonu olmayan lüminal alt tip hastalar mutlaka PR eksprese etmektedir. PR ekspresyonu olmayan lüminal alt tip hastalar mutlaka ER eksprese etmektedir. Lüminal gruplardaki hastalar ER ya da PR'den en az birini eksprese etmektedir. HER2AE ve TN gruplar ise, beklenen biçimde hem ER ve PR ekspresyonu açısından negatiftir. HER2AE moleküler alt tipindeki hastaların tamamı ve LB moleküler alt tipteki hastaların çoğunluğu (%94,4) HER2 eksprese etmektedir. HER2 eksprese etmeyen LB grubu hastaların Ki67 indeksleri %14'ün üzerindedir. TN moleküler alt tipindeki hastalar ER, PR ve HER2 eksprese etmemektedir (8). Hastaların Ki67 indeksleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur ($p=0.350$). En yüksek Ki67 pozitiflik oranı ($Ki67>\%14$) LB moleküler alt tiptedir. Önceki benzer bir çalışmada en yüksek Ki67 pozitifliği ($Ki67>\%14$) LB moleküler alt tipinde (%77,9) izlenmiştir (210). Bu veriler doğrultusunda araştırmalarda kullanılan Ki67 indeksinin istatistiksel olarak daha iyi

değerlendirilmesi için kategorik değerden çok son yıllarda kullanıldığı gibi yüzde biçiminde *numerik* (sayısal) değer kullanılması daha uygun olabilir.

5.4. Hastaların CD133, CXCR1 Ekspresyon Durumları ve M2/TM, M2/M1 oranları

Çalışmamıza dahil olan hastalar CD133, CXCR1 ekspresyon durumları ve M2/TM, M2/M1 oranları açısından değerlendirilmiş, kontrol ve kanser gruplarındaki hastalar karşılaştırılmıştır.

Çalışmamızda kanser ve kontrol grubu hastalarının CD133 H-Skorları arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p=0,004$). Kanser gruplarının her birinin ortalama CD133 değerleri, kontrol grubunun ortalama CD133 değerinden büyüktür. Tümör dokusunun CD133⁺ fenotipe meme kanseri kök hücrelerinden zengin olması beklenen bir bulgudur (211). Ancak çalışmamızda uyguladığımız ikili analizlerde, sadece LA-kontrol ve LB-kontrol grubu çiftlerinde anlamlı fark saptanmıştır ($p=0,010$ ve $p=0,002$). Çalışmamızda meme kanserinin moleküler alt grupları arasında CD133 H-skoru açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamazken, LA, LB ve HER2AE gruplarının ortalama H-Skoru değerleri TN grubuna göre belirgin biçimde yüksek bulunmuştur. Bu nedenle sonraki çalışmalarda örneklem genişliği artırılarak, HER2AE-kontrol, TN-kontrol grupları arasında ve TN grubu-TN olmayan kanser grupları arasında anlamlı fark bulunabileceği düşünülmektedir.

Yüksek CD133 ekspresyonu, geniş *adezyon* alanı, düşük proliferasyon oranı ve daha az farklılaşmış fenotiple ilişkilidir. Bu nedenle TN moleküler alt tipte düşük CD133 ekspresyonu saptanmış olabilir. TN moleküler alt tipte CD133 düşüklüğü, anormal fosfolipaz C beta-2 (PLC- β 2) enzim ekspresyonu ile ilişkilendirilebilir (211, 212). Ek olarak çalışmamızda ve önceki çalışmalarda TN moleküler alt tipte CD133'ün nükleer *mislokasyonuna* rastlanmıştır (213). Grupların CD133 H-skorumları, CD133'ün TN olmayan alt tipler için bir kök hücre işaretçisi adayı olabileceğini göstermiştir. Ancak dolaşımdaki tümör hücreleri ile yapılan bir çalışmada, lümenal moleküler alt tipte %90 sıklıkla

CD133⁺ fenotipteki hücreler saptanmıştır. HER2AE moleküler alt tipteki hastalarda ise CD133⁺ olan dolaşımdaki tümör hücreleri tespit edilememiştir (57). Bu bulguların çalışmamızla korele edilmesine yönelik doku dağılımını tanımlayan literatürde herhangi bir bilgiye rastlanılmamıştır.

CD133 H-skoruna ek olarak, CD133 boyanma yüzdeleri açısından da gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardır ($p=0,006$). Ancak sadece LA-kontrol ve LB-kontrol gruplarının ortanca CD133 ekspresyonları arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p=0,008$ ve $p=0,003$). Kanseri grupları arasında en yüksek CD133 ekspresyon yüzdesi HER2AE gruba, en düşük ekspresyon yüzdesi ise TN grubuna aittir. CD133 ekspresyon yüzdelерinin karşılaştırılması da, CD133'ün TN olmayan meme kanseri için kök hücre işaretçisi olabileceğine yönelik hipotezi desteklemektedir. Ancak çalışmamızda CD133 H-skor ve ekspresyon yüzdesine göre, TN moleküler alt tipindeki hastaların tümör dokusunda da rölatif olarak daha düşük seviyede CD133 antijenini eksprese olduğu görülmüştür. Bu nedenle CD133'ü hedefleyen monoklonal antikörlerle uygulanan melanoma tedavilerine (214) benzer olarak tedaviden tüm moleküler alt tiplerin fayda göreceği hipotez edilebilir.

Lüminal gruplarda ve HER2AE gruptaki CD133 ekspresyon yüksekliği, ER, PR ve HER2 durumlarıyla açıklanabilir. En yüksek ortanca CD133 H-Skoru, ER, PR ve HER2 reseptörlerinin birlikte eksprese olabileceği LB alt tipinde görülmüştür. Endometrium kanseri hücre hatlarında progestin tedavisi, CD133+ kanser kök hücre popülasyonunu azaltmıştır (215). Over kanseri hücrelerinde mucin 4 (MUC4) ekspresyonunun, HER2 stabilizasyonu ve CD133 ekspresyonunu indüklediği gösterilmiştir (216).

Çalışmamızda kanser ve kontrol gruplarındaki hastaların M2/TM oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p=0,022$). Ancak tüm gruplar arasında en yüksek M2/TM oranı, kontrol grubundadır. Kontrol grubu hastaları, kanser gruplarındaki hastalara benzer yaş grubunda seçilmiştir. Bu nedenle kontrol grubu hastaları, ortanca yaşı 58 olan, postmenapozal kadınlardan oluşmaktadır. Postmenapozal meme dokusunda yağ oranı artıp, bez yapıları azaldığından yağ dokusu

göç eden monositleri ya da dokudaki makrofajları, M2 fenotipine doğru polarize ettiği düşünülmektedir. Benzer olarak, obez farelerin beyaz yağ dokusunda, myeloid kökenli *supresör* hücrelerin arttığı ve bu hücrelerin M2 fenotipindeki makrofajları indüklediği gösterilmiştir (217,218). Bu nedenle benzer olarak bizim çalışmamızda da kontrol grubu M2/TM oranı yüksek bulunmuştur.

M2 fenotipindeki makrofajlar tümör büyümesi ve metastazı artırmaktadır(179, 180). Bu nedenle çalışmada tüm makrofajlar içinde M2 makrofaj oranının artışının metastazı ve invazyonu artırdığı öne sürülmüştür. Çalışmamızda kanser grupları arasında en yüksek M2/MF oranı HER2AE grubundayken, en düşük oran LA alt grubundadır. Tümör dokusunda CD163⁺ olan M2 fenotipindeki makrofajların yüksek sayıda bulunması, meme kanserinde ER negatifliği ile ilişkilendirilmiştir (219). Çalışmamızda M2/TM oranını destekleyen biçimde en yüksek M2/M1 oranı kontrol grubu, en düşük M2/M1 oranı LA alt tipindedir. Gruplar arası anlamlı fark vardır ($p=0,020$). Ancak M2/M1 oranının belirlenmesinde sadece M2 makrofajlar için işaretçi (CD163) kullanılmış, CD163 antijenini eksprese etmeyen makrofaj morfolojisindeki hücreler M1 makrofaj olarak sınıflandırılmıştır. Sonraki çalışmalarda, M2 işaretçisine ek olarak M1 işaretçilerinin de kullanımı, M2/M1 oranının daha doğru biçimde belirlenmesini sağlayabilir. Ek olarak M2 hücrelerinin M2a, M2b, M2c moleküler alt tipleri bulunmaktadır (185). Sonraki çalışmalarda M2 makrofajlarının moleküler alt tiplerinin anlaşılması ve oranlanması, meme kanserinin patofizyolojisinin anlaşılmasında önem taşıyabilir.

Çalışmamızda CXCR1 H-Skoru açısından kanser ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardır ($p=0,002$). Yapılan ikili testlerde, LB-kontrol ve TN-kontrol grupları arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p=0,002$ ve $p=0,002$). Tüm gruplar arasında TN grubunun ortanca CXCR1 H-Skoru değeri en yüksektir. Triple negatif meme kanseri hücrelerinin büyümesinin proinflamatuvar IL-6 ve IL-8 sitokinleriyle ilişkili olduğu gösterilmiştir (220). IL-8 reseptör blokörü Repertaksin'den (221) tüm moleküler alt tipteki hastalar fayda görebilir ancak en çok faydayı TN moleküler alt tipindeki

hastaların göreceği hipotez olarak öne sürülebilir. CXCR1 H-Skoruna ek olarak, grupların ortanca CXCR1 ekspresyon yüzdeleri arasında da fark vardır ($p=0,001$). Tüm kanser gruplarında, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde artmış CXCR1 ekspresyonu vardır. Artmış CXCR1 ekspresyonu kök hücre olma durumu, metastaz, ilaç direnci ve kötü prognozla ilişkilidir (150,153, 156). Bu nedenle CXCR1 tüm meme kanseri hastaları için hedefe yönelik tedavi için bir hedeftir.

Çalışmamızda kanser gruplarının CXCR1 ve CD133 antijenleri için H-Skorları ve ekspresyon yüzde değerleri arası anlamlı fark çıkmamasının iki nedeni olabilir. Örneklem büyüklüğü artırılarak söz konusu iki antijen için gruplar arası anlamlı fark olup olmadığı araştırılabilir. Diğer neden ise, kanser dokularının CXCR1 ve CD133 ekspresyonu açısından heterojen olmasıdır (211,222). Moleküler alt tipleri aynı olsa da, farklı tümör dokuları farklı şiddette ekspresyon yapabilmektedir. Bu nedenle CD133 ve CXCR1 H-Skor değerlerinde ÇADA (Çeyrekler Arası Dağılım Aralığı) değerleri oldukça yüksek bulunmuştur.

5.5. Hastaların CD133, CXCR1 Ekspresyon Durumları ve M2/TM Oranları Arası İlişkiler

Çalışmamıza dahil olan hastaların CD133, CXCR1 Ekspresyon Durumları ve M2/TM oranları arasındaki olası ilişkiler ilişki yönü, şiddeti ve istatistiksel anlamlılığı açısından değerlendirilmiştir.

Hastaların CD133 ve CXCR1 H-Skorları arasında istatistiksel olarak anlamlı, zayıf pozitif korelasyon bulunmuştur (Korelasyon katsayısı= 0,249, $p=0,035$). Benzer bir korelasyon hastaların CD133 ve CXCR1 ekspresyon yüzdeleri arasında da bulunmuştur (Korelasyon katsayısı= 0,342, $p=0,003$). CXCR1'in tümör hücrelerinin kök hücre özelliği kazanması ve kök hücre özelliğini korunmasında rol oynadığı önceki çalışmalarla ortaya konmuştur. CXCR1'in desteklediği kanser kök hücresi fenotipleri CD44⁺/CD24⁻ ve ALDH1⁺ fenotiplerdir (142,221). Literatürde daha önce korelasyon değerlendirilmesine rastlanılmayan meme kanserinde CXCR1 ekspresyonunun CD133⁺ fenotipini

desteklediği çalışmamızda gösterilmiştir. Farklı bir kanser tipi olan pankreatik duktal adenokarsinom hastalarında benzer biçimde CXCR1 ve CD133 arasında pozitif korelasyon saptanmıştır (223).

Çalışmamızda hastaların CD133 ve CXCR1 antijenleri için H-Skorları ve ekspresyon yüzdeleri ile M2/TM makrofaj oranları arasında anlamlı korelasyon bulunamamıştır. Ancak benzer bir çalışmada tümörle ilişkili makrofajlardan kaynaklanan mucin 1'in (MUC1) akciğer kanseri hücrelerinde CD133 ekspresyonunu artırdığı gösterilmiştir (224). Başka bir çalışmada, tümörle ilişkili makrofajlardan kaynaklanan IL-6 ve IL-8 sitokinlerinin kolorektal kanser hücrelerinin invazif özelliklerini arttırdığı gösterilmiştir (225). Bu nedenle çalışmamızda M2 fenotipindeki makrofajların, tümör hücrelerinde CD133 ekspresyonunu artıracığı ve IL-8/CXCR1 sinyal yolağının M2 tipindeki makrofajları tümör mikroçevresine çekeceği öngörülmüştür. Ancak değişkenler (CD133-M2/TM ve CXCR1-M2/TM) arası istatistiksel olarak anlamlı korelasyon bulunamamıştır. Sonraki çalışmalarda örneklem sayısının genişletilmesi, M2 makrofajların M2a, M2b ve M2c alt tiplerinin incelenmesi ve M2 makrofajlara ek olarak M1 makrofajların da immünohistokimyasal olarak boyanarak M2/M1 oranlarının bulunması ile CD133 ve CXCR1 ekspresyon durumları ile M2/TM, M2/M1 oranları arasında anlamlı ilişki saptanabilir.

5.6. Hastaların ER, PR, HER2 Durumları ve Ki67 indekslerinin CD133, CXCR1 Ekspresyon Durumu ve M2/MF-M2/M1 Oranlarıyla İlişkisi

Çalışmamıza dahil ettiğimiz hastaların ER, PR, HER2 ekspresyonlarının; hastaların CD133, CXCR1 ekspresyonları, M2/MF ve M2/M1 oranları ile ilişkisi incelenmiştir.

Çalışmamıza dahil ettiğimiz hastalarda ER ekspresyonu ile CD133 H-Skoru ve CD133 ekspresyon yüzde değeri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki vardır ($p=0,015$ ve $p=0,042$). Aromataz inhibitörlerinin ER⁺ lüminal moleküler alt tipteki hastalarda, IL-6/Notch sinyal yolağı aracılı olarak CD133 ekspresyonunu artırdığı gösterilmiştir (226). Çalışmamızda lüminal moleküler alt tipteki hastalarda izlenen

CD133 ekspresyonu yüksekliği, ER+ olan hastalara uygulanan aromataz inhibitörü kullanım hikayesiyle açıklanabilir. Çalışmamızda hastaların ER durumu ile M2/TM ($p=0,993$), M2/M1 ($p=0,986$) oranları ve ER ile CXCR1 H-Skoru ($p=0,274$), ekspresyon yüzdesi ($p=0,233$) değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmamıştır. Ancak önceki bir yayında ER negatifliği ile IL-8 aşırı ekspresyonu arasında ilişki bulunmuştur, bununla birlikte çalışmamıza benzer şekilde CXCR1 ile ER negatifliği arasında ilişki saptanamamıştır (227). Ek olarak önceki bir çalışmada, CD163 ekspresyonu ile ER negatifliği arasında anlamlı ilişki bulunmuştur (219219). Sonraki çalışmalarda M2 fenotipindeki makrofajların daha büyük bir hasta grubundan elde edilen örneklerde, CD68 ve CD163 işaretçileriyle değerlendirilmesiyle; ER durumu ile M2 fenotipindeki makrofajların ilişkisi daha doğru olarak değerlendirilebilir.

Çalışmamıza dahil edilen hastalarda görülen PR negatifliği ile M2/TM ve M2/M1 makrofaj oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmıştır ($p=0,007$ ve $p=0,036$). PR negatifliği lüminal olmayan (HER2AE ve TN) moleküler alt tiplerle ilişkilidir. Benzer biçimde daha önceki bir yayında meme kanseri hastalarında tümör stromasındaki CD163⁺ makrofajların, PR negatifliğiyle korelasyon gösterdiği saptanmıştır (190). Lüminal olmayan tiplerin prognozu daha kötüdür (8, 228). Bu nedenle çalışmamızda, lüminal olmayan moleküler alt tipteki hastalara ait tümör dokusunun, tümör oluşumunu ve gelişimini destekleyici özellikte M2 tipte makrofajlardan daha zengin olacağı öngörülmüştür.

Çalışmamızda lüminal alt tipte ilişkili olan PR ekspresyonunun yine lüminal alt tiplerdeki CD133 fenotipindeki kök hücrelerle ilişkili olarak, CD133 antijeninin ekspresyonu ile korelasyon göstereceği öngörülmüştür. Ancak çalışmamıza dahil olan hastaların PR durumu ile CD133 antijeni ekspresyonları arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır (H-skoru için $p=0,794$ ve ekspresyon yüzdesi için $p=0,706$). Ancak önceki bir yayında, invazif duktal karsinom hastalarında PR negatifliği ile CD133 ekspresyonu arasında anlamlı bir ilişki saptanmıştır (229). Çalışmamızda PR eksprese etmeyen HER2AE grubunda CD133 ekspresyonu yüksekken, PR eksprese etmeyen TN

grubunda CD133 ekspresyonu düşüktür. Bu nedenle PR negatif olan hastalar CD133 ekspresyonu açısından heterojen bir gruptur ve PR durumu ile CD133 ekspresyonu arasında anlamlı ilişki bulunamamıştır.

Çalışmamızda kötü prognozla ilişkilendirilen PR negatifliğinin CXCR1 antijeni ekspresyonu ile korelasyon göstereceği öngörülmüştür. Ancak çalışmamıza dahil olan hastaların PR durumu ile CXCR1 antijeni ekspresyonları arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır (H-skoru için $p=0,367$ ve ekspresyon yüzdesi için $p=0,234$). Çalışmamızda CXCR1 ekspresyonunun en şiddetli görüldüğü grup TN'dir. Ancak çalışmamızda PR eksprese etmeyen diğer moleküler alt tip olan HER2AE'da CXCR1 ekspresyonu, TN kadar şiddetli değildir. Bu nedenle PR negatif olan hastalar CXCR1 ekspresyonu açısından heterojen bir gruptur ve PR durumu ile CXCR1 ekspresyonu arasında anlamlı ilişki bulunamamıştır.

Çalışmamıza dahil olan hastaların HER2 ekspresyonu ile M2/TM ve M2/M1 oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmıştır ($p=0,016$ ve $p=0,011$). Çalışmamızda HER2 eksprese eden HER2AE ve LB moleküler alt tiplerinde M2 makrofaj infiltrasyon oranı yüksektir. Benzer bir yayında, HER2⁺ olan primer meme kanseri örneklerinde CD163⁺ hücre sayısı yüksek olarak bulunmuştur (219). Ancak çalışmamızda HER2 ekspresyonu ile CD133 (H-skoru için $p=0,326$ ve ekspresyon yüzdesi için $p=0,527$) ve CXCR1 (H-skoru için $p=0,347$ ve ekspresyon yüzdesi için $p=0,385$) ekspresyon durumu arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmamıştır. Ancak önceki bir yayında over kanseri hücrelerinde MUC4 ekspresyonunun, HER2 stabilizasyonu ve CD133 ekspresyonunu indüklediği gösterilmiştir (216216). Ek olarak HER2 reseptörü ve HERAE moleküler alt tip, önceki çalışmalarda sıklıkla ALDH1 kök hücre işaretçisi ile ilişkilendirilmiştir (25, 230). Çalışmamızda HER2 eksprese etmeyen LA ve TN gruplarından LA'nın CXCR1 ekspresyonu düşük, TN'nin CXCR1 ekspresyonu ise yüksektir. Bu nedenle CXCR1 ile HER2 arasında anlamlı ilişki bulunamamıştır.

Çalışmamızda hastaların Ki67 pozitifliği (Ki67>%14) ile CD133 ve CXCR1 ekspresyon durumu ve M2/TM ve M2/M1 makrofaj oranları arasında ilişki

öngörülmüştür. Çalışmamızda kök hücre işaretçisi CD133'ün ekspresyonu ile tümör büyümesi ve prognozla ilişkili Ki67 indeksinin (231) pozitif olması arasında bir ilişkinin varlığı öngörülmüştür. Önceki bir yayında düşük *gradeli* tübülolobüler meme karsinomu hastalarında CD133 ekspresyonu ile Ki67 arasında anlamlı korelasyon saptanmıştır (232). Çalışmamızda invazyon ve metastazla ilişkili olan (221) CXCR1'in ekspresyonu ile Ki67 arasında bir ilişkinin varlığı ön görülmüştür. Ancak benzer bir çalışmada gastrik karsinomda CXCR1/2 ekspresyonu ile Ki67 arasında anlamlı ilişki bulunamamıştır (233). Buna karşın, prostat kanseri hastalarında sitoplazmik IL-8 ekspresyonu Ki67 indeksiyle korelasyon göstermektedir (209). Ek olarak çalışmamızda tümör proliferasyonunu destekleyen M2 tipteki makrofajlar ile Ki67 arasında ilişkinin var olup olmadığı araştırılmıştır. Önceki bir çalışmada meme kanseri hastalarının tümör stromasındaki CD163 hücrelerinin Ki67 indeksiyle korele olduğu saptanmıştır (190). Ancak çalışmamızda Ki67 pozitifliği ($Ki67 > \%14$) ile bu parametreler arasında anlamlı ilişki saptanmamıştır.

5.7. Lüminal ve Lüminal Olmayan Hastaların CD133, CXCR1 Ekspresyon Durumu ve M2/MF-M2/M1 Oranları

Çalışmamızdaki LA ve LB moleküler alt tiplerindeki hastalar, lüminal moleküler alt tip; HER2AE ve TN moleküler alt tiplerindeki hastalar lüminal olmayan moleküler alt tip olarak sınıflandırılmıştır. Lüminal ve lüminal olmayan moleküler alt tiplerdeki hastalar, CD133, CXCR1 ekspresyon durumları, M2/MF ve M2/M1 oranları açısından karşılaştırılmıştır.

Çalışmamızda lüminal ve lüminal olmayan ve kontrol hastalarının ortanca CD133 H-Skoru değerleri ve CD133 ekspresyonu yüzde değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p=0,001$ ve $p=0,001$). Çalışmamızda lüminal ve lüminal olmayan grupların ortanca CD133 H-Skorları arasında anlamlı fark bulunamamıştır ancak lüminal grubun lüminal olmayan gruba göre ortanca CD133 skoru ve CD133 ekspresyon yüzdesi daha yüksektir. Çalışmamızda kanser gruplarına ait tümör dokuları,

kontrol grubuna ait meme dokusuna göre daha fazla CD133⁺ fenotipe sahip kanser kök hücresine sahiptir. Ancak çalışmamızda kanser grupları arasında anlamlı fark olmaması, CD133'ün lüminal-lüminal olmayan grup ayrımı olmaksızın kanser kök hücresi işaretçisi olarak kullanılabileceğini göstermiştir. Çalışmamızdaki bulguları destekleyen biçimde, önceki bir yayında lüminal, HERAE ve TN moleküler alt tiplerin tamamında tedavi sonrası dönemde CD133⁺ olan dolaşımdaki tümör hücrelerine rastlanmıştır ve moleküler alt tipler arasında CD133 eksprese eden dolaşımdaki tümör hücresi sayısı açısından anlamlı fark bulunmamıştır(57). Çalışmamızda lüminal olmayan grup içinde yer alan TN alt tipindeki hastaların CD133 H-skoru ve ekspresyon yüzdesi daha düşük, HER2AE alt tipteki hastaların CD133 H-skoru ve ekspresyon yüzdesi daha yüksek olarak bulunmuştur. Bu nedenle lüminal olmayan grup, kendi içinde heterojen bir gruptur.

Çalışmamızda lüminal, lüminal olmayan kanser hastalarının ve kontrol hastalarının ortalama M2/TM ve M2/M1 oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur ($p=0,082$ ve $p=0,093$). Çalışmamızda lüminal olmayan grupta M2 makrofaj infiltrasyonunun daha yüksek olacağı öngörülmüştür. Çalışmamızda tümör mikroçevresindeki artmış IL-8 aktivitesinin M2 fenotipindeki makrofajlarla ilişkili olduğu hipotez edilmiştir(234). Ancak bulgular bu hipotezi desteklememiştir. Buna karşın daha önce yayınlanan bir çalışmada ER⁺ olan hücre hatları ve TN moleküler alt tipteki hücre hatlarının monositlerle ko-kültürü yapılmış ve TN moleküler alt tipteki meme kanseri hücrelerinin makrofajları M2 fenotipine koşullandırdığı gösterilmiştir (235).

Çalışmamızda lüminal ve lüminal olmayan ve kontrol hastalarının ortalama CXCR1 H-Skoru değerleri ve CXCR1 ekspresyonu yüzde değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardır ($p<0,001$ ve $p=0,001$). Çalışmamızda lüminal ve lüminal olmayan grupların ortalama CXCR1 H-Skorları ve ekspresyon yüzdeleri arasında anlamlı fark bulunmamıştır ($p=0,562$ ve $p=0,223$) ancak lüminal olmayan grubun lüminal gruba göre ortalama CXCR1H-skoru ve ekspresyon yüzdesi daha yüksektir. Çalışmamızda lüminal olmayan grupta IL-8 sinyal yolağının daha aktif olduğu bu nedenle CXCR1 ekspresyonunun daha yüksek olacağı öngörülmüştür. Lüminal ve lüminal olmayan

hücre hatlarının karşılaştırıldığı bir yayında, lüminal olmayan hücre hatlarında hipoksiye cevap olarak IL-8 ekspresyonu saptanmıştır (236). Bununla birlikte çalışmamızda kanser grupları, kontrol grubuna göre CXCR1'i daha fazla eksprese etmektedir. Bu nedenle CXCR1 inhibitörleri (87,221) tedavide, lüminal-lüminal olmayan ayrımı olmaksızın meme kanseri hastaları için kullanılabileceği ileri sürülebilir. Ancak lüminal olmayan grubun HER2AE ve TN alt tiplerinden oluşan heterojen bir grup olduğundan ötürü, TN alt grup hastalar IL-8 inhibitörlerinden daha fazla fayda görebilirler.

5.8. TN ve TN Olmayan Hastaların CD133, CXCR1 Ekspresyon Durumu ve M2/MF-M2/M1 Oranları

Çalışmamızdaki LA, LB ve HER2AE moleküler alt tiplerindeki hastalar, TN olmayan moleküler alt tip olarak sınıflandırılmıştır. TN ve TN olmayan moleküler alt tiplerdeki hastalar, CD133, CXCR1 ekspresyon durumları, M2/MF ve M2/M1 oranları açısından karşılaştırılmıştır.

Çalışmamızda TN ve TN olmayan ve kontrol hastalarının ortalama CD133 H-Skoru değerleri ve CD133 ekspresyonu yüzde değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p=0,001$ ve $p=0,001$). Çalışmamızda TN ve TN olmayan grupların ortalama CD133 H-Skorları ve ekspresyon yüzdeleri arasında anlamlı fark bulunamamıştır ancak TN olmayan grubun TN grubuna göre ortalama CD133 skoru daha yüksektir. Ek olarak çalışmamızda TN olmayan grubun TN grubuna göre ortalama CD133 ekspresyon yüzdesi daha yüksektir. Çalışmamızda LA, LB ve HER2AE gruplarında CD133 ekspresyonu TN grubuna göre daha yüksektir. Bu nedenle çalışmamızda CD133'ün LA, LB ve HER2AE moleküler alt tipleri için kök hücre işaretçisi olabileceği hipotez edilmiştir. Ancak önceki yayınlarda dokuda CD133 ekspresyonunun en yüksek olduğu moleküler alt tip TN (54) olarak saptanmışken, başka bir yayında tedavi öncesinde CD133⁺ olan dolaşımdaki tümör hücrelerinin en sık görüldüğü grup lüminal moleküler alt tip (57) olarak saptanmıştır. Araştırmacılar tedavi sonrası moleküler alt tipler arasında CD133 eksprese eden dolaşımdaki tümör hücreleri açısından anlamlı fark olmadığını

göstermiştir. Bu nedenle araştırmacılar CD133 yüksekliğinin kemoterapi direnciyle ilişkili olduğunu öne sürmüştür (211).

Çalışmamızda TN, TN olmayan ve kontrol hastalarının ortanca M2/TM ve M2/M1 oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır ($p=0,127$ ve $p=0,135$). TN moleküler alt tipinin invazyon ve metastaz eğilimi daha yüksektir ve prognozu daha kötüdür (237). Bu nedenle çalışmamızda TN grubuna ait tümör dokusunda *protümörojenik*M2 makrofaj infiltrasyonunun daha yüksek olacağı öngörülmüştür. Ancak çalışmamızdaki bulgular bu hipotezi desteklememektedir. Buna karşın daha önce yayınlanan bir çalışmada TN moleküler alt tipteki hücre hatlarının monositlerle ko-kültürü yapılmış ve TN moleküler alt tipteki meme kanseri hücrelerinin makrofajları M2 fenotipine koşullandırdığı gösterilmiştir (235).

Çalışmamızda TN, TN olmayan ve kontrol hastalarının ortanca CXCR1 H-Skoru değerleri ve CXCR1 ekspresyonu yüzde değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardır ($p=0,001$ ve $p=0,001$). Çalışmamızda TN ve TN olmayan grupların ortanca CXCR1 H-Skorları arasında anlamlı fark bulunamamıştır ancak TN grubunun TN olmayan gruba göre ortanca CXCR1 skoru daha yüksektir. Ek olarak çalışmamızda TN grubunun TN olmayan gruba göre ortanca CXCR1 ekspresyon yüzdesi daha yüksektir. TN moleküler alt tipindeki tümörlerde, IL-8 ekspresyonu artmıştır ve artmış interlökin 8 ekspresyonu, invazyon metastaz ve kötü prognozla ilişkilendirilmiştir (151,238). Çalışmamızda TN grubunun CXCR1 ekspresyonu, istatistiksel olarak anlamlı olmasa da diğer gruplardan yüksektir. Bu nedenle CXCR1 inhibitörlerinden (221) en çok fayda görecektir hastaların, TN moleküler alt tipte olacağı hipotez edilmiştir.

6. SONUÇLAR

1. Çalışmamızda aynı moleküler alt tipteki hastalara ait tümör dokularının histolojik görüntülerinde farklılıklar gözlemlenmiştir. Bu nedenle tümör dokusunun reseptör ekspresyon durumuna bağlı yapılan moleküler gruplama ile morfoloji arasında direkt ilişki saptanmamıştır.
2. Çalışmamızda, tümör stromasına infiltre olmuş hücrelerin çoğunluğunu makrofajların oluşturduğu gözlemlenmiştir.
3. Çalışmamızda, lüminal moleküler alt tiplerde belirgin olmak üzere, tümör kümelerinin periferinde daha çok CD133, merkezi ya da lümene yakın kısımlarında ise CXCR1 antijeninin daha şiddetli eksprese olduğu izlenmiştir. Bu nedenle CXCR1'i hedefleyen ilaç moleküllerinin etkinliklerinin artırılması için tümör kümelerinin merkezi kısmına ulaşması gerektiği düşünülmüştür.
4. Çalışmamızda meme kanserinin LA, LB ve HER2AE moleküler alt tiplerinin TN moleküler alt tipe göre CD133 antijeni ekspresyonunun daha yüksek olduğu bulunmuştur. TN grubundaki CD133 ekspresyon düşüklüğü kemoterapiye direnç ve düşük differansiasyon derecesiyle ilişkilendirilmiştir. Ancak çalışmamızda kanser ve kontrol hastaları arasında CD133 ekspresyonu açısından fark olsa da, kanser grupları arası istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır. Bu nedenle CD133'ü hedefleyen ilaçlardan tüm kanser tiplerinin fayda görebileceği düşünülmüştür.
5. Postmenapozal kadınların meme dokusu yağ dokusunda zengin ve bez açısından fakir olduğundan, çalışmamızda kontrol grubundaki hastalar M2 makrofaj infiltrasyonu açısından en zengin grup olarak bulunmuştur. Ancak kanser grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamasına karşın en yüksek M2 infiltrasyonunun HERAE grupta olduğu görülmüştür.
6. Çalışmamızda kanser gruplarının tamamının CXCR1 ekspresyonu kontrol grubundan yüksek bulunmuştur. Ancak kanser grupları arasında istatistiksel olarak fark bulunmasa da en yüksek CXCR1 ekspresyonu TN moleküler tipte

bulunmuştur. TN moleküler alt tipteki CXCR1 ekspresyonu yüksekliği, TN moleküler alt tipteki hücrelerin büyümesinin IL-6 ve IL-8 bağımlı olması ile ilişkilendirilmiştir. CXCR1'i hedefleyen ilaçlardan tüm kanser grupları fayda görse de en yüksek faydayı TN moleküler alt tipteki hastaların göreceği hipotez edilmiştir.

7. Hastaların CD133 ve CXCR1 ekspresyon düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı zayıf pozitif korelasyon saptanmıştır. CXCR1'i hedefleyen tedavilerin CD133 ekspresyonunu da etkileyebileceği düşünülmüştür.
8. Hastaların ER ekspresyonları ile CD133 ekspresyonları arasında anlamlı ilişki bulunmuştur. Bu nedenle aromataz inhibitörleriyle uygulanan tedavi ile CD133 ekspresyonunun azalacağı öngörülmüştür. Hastaların PR negatifliği ve HER2 ekspresyonu ile M2 makrofaj infiltrasyonu arası anlamlı ilişki bulunmuştur. PR negatifliği ve HER2 ekspresyonu daha çok HER2AE moleküler alt tip ile ilişkilidir. Çalışmamızda en yüksek M2 makrofaj infiltrasyonu HER2AE alt tipindedir.

7. KAYNAKLAR

1. Caplan, L. (2014). Delay in Breast Cancer: Implications for Stage at Diagnosis and Survival. *Frontiers in Public Health*, 2, 87. <http://doi.org/10.3389/fpubh.2014.00087>
2. World Health Organization Media Centre Fact Sheet (2013) Erişim: 01 Ekim 2016 <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs334/en/>
3. Centers for Disease Control and Prevention Cancer Among Women (2016) Erişim: 01 Ekim 2016 <http://www.cdc.gov/cancer/dcpc/data/women.htm>
4. Cancer Research UK (2015) Erişim: 01 Ekim 2016 <http://www.cancerresearchuk.org/health-professional/cancer-statistics/mortality/common-cancers-compared#heading=Two>
5. Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Kanser Daire Başkanlığı (2013) Erişim: 01 Ekim 2016 http://kanser.gov.tr/Dosya/2016_Haberler/KANSER_iNSiDANSLARi_2013_kisa_rapor.pdf
6. Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Kanser Daire Başkanlığı (2013) Erişim: 01 Ekim 2016 http://kanser.gov.tr/Dosya/ca_istatistik/ANA_rapor_2013v01_2.pdf
7. National Cancer Institute SEER Stat Fact Sheets: Female Breast Cancer (2016) Erişim: 01 Ekim 2016 <http://seer.cancer.gov/statfacts/html/breast.html>
8. Schnitt, S.J. (2010) Classification and prognosis of invasive breast cancer: from morphology to molecular taxonomy. *Modern Pathology*, 23, S60–S64. doi:10.1038/modpathol.2010.33
9. Badve, S., Dabbs, D.J., Schnitt, S.J., Baehner, F.L., Decker, T. et al. (2011) Basal-like and triple-negative breast cancers: a critical review with an emphasis on the implications for pathologists and oncologists. *Modern Pathology*, 24, 157–167; doi:10.1038/modpathol.2010.200
10. Howlader, N., Altekruse, S.F., Li, C.I., Chen, V.W., Clarke, C.A., et al. (2014) US Incidence of Breast Cancer Subtypes Defined by Joint Hormone Receptor and HER2 Status, *JNCI J Natl Cancer Inst* dju055 doi:10.1093/jnci/dju055
11. Velasco-Velázquez, M. A., Homsı, N., De La Fuente, M., & Pestell, R. G. et al. (2012). Breast Cancer Stem Cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 44(4), 573–577. <http://doi.org/10.1016/j.biocel.2011.12.020>

12. Nicolini, A., Ferrari, P., Fini, M., Borsari, V., Fallahi, P. et al. (2011) Stem cells: their role in breast cancer development and resistance to treatment. *Curr Pharm Biotechnol.* , 12(2):196-205.
13. Aomatsu, N., Yashiro, M., Kashiwagi, S., Takashima, T., Ishikawa, T. et al. (2012). CD133 Is a Useful Surrogate Marker for Predicting Chemosensitivity to Neoadjuvant Chemotherapy in Breast Cancer. *PLoS ONE*, 7(9), e45865. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0045865> 10.1371/journal.pone.0045865. Epub 2012 Sep 25.
14. Obeid, E., Nanda, R., Fu, Y.-X., & Olopade, O. I. (2013). The role of tumor-associated macrophages in breast cancer progression. *International Journal of Oncology*, 43(1), 5–12. <http://doi.org/10.3892/ijo.2013.1938>
15. Tang, X. (2013) Tumor-associated macrophages as potential diagnostic and prognostic biomarkers in breast cancer *Cancer Letters* 332 3–10
16. Jinushi, M., Baghdadi, M., Chiba, S., & Yoshiyama, H. (2012). Regulation of cancer stem cell activities by tumor-associated macrophages. *American Journal of Cancer Research*, 2(5), 529–539.
17. Mantovani, A., Locati M. (2013) Tumor-Associated Macrophages as a Paradigm of Macrophage Plasticity, Diversity, and Polarization: Lessons and Open Questions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 33(7):1478-83. doi: 10.1161/ATVBAHA.113.300168.
18. Singh, J.K., Simões, B.M., Clarke, R.B., Bundred, N.J. (2013) Targeting IL-8 signalling to inhibit breast cancer stem cell activity *Expert Opin. Ther. Targets* 17(11):1235-1241)
19. García-Teijido, P., Cabal, M. L., Fernández, I. P., & Pérez, Y. F. (2016). Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Triple Negative Breast Cancer: The Future of Immune Targeting. *Clinical Medicine Insights. Oncology*, 10(Suppl 1), 31–39. <http://doi.org/10.4137/CMO.S34540>
20. Gomes, L. R., Vessoni, A. T., Menck, C. F. M. (2016) Microenvironment and autophagy cross-talk: Implications in cancer therapy. *Pharmacological Research* Volume 107, 300–307. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phrs.2016.03.031>
21. Bozorgi, A., Khazaei, M., & Khazaei, M. R. (2015). New Findings on Breast Cancer Stem Cells: A Review. *Journal of Breast Cancer*, 18(4), 303–312. <http://doi.org/10.4048/jbc.2015.18.4.303>
22. Yoo, Y. D., & Kwon, Y. T. (2015). Molecular mechanisms controlling asymmetric and symmetric self-renewal of cancer stem cells. *Journal of Analytical Science and Technology*, 6(1), 28. <http://doi.org/10.1186/s40543-015-0071-4>

23. O'Flaherty, J. D. , Barr, M., Fennell, D., Richard, D., Reynolds, J. et al. (2012) The Cancer Stem-Cell Hypothesis: Its Emerging Role in Lung Cancer Biology and Its Relevance for Future Therapy *J Thorac Oncol.*, 7(12):1880-90. doi: 10.1097/JTO.0b013e31826bfbc6.
24. Al-Hajj, M., Wicha, M. S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S. J., & Clarke, M. F. (2003). Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(7), 3983–3988. <http://doi.org/10.1073/pnas.0530291100>
25. Ginestier, C., Hur, M. H., Charafe-Jauffret, E., Monville, F., Dutcher, J. et al. (2007). ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell*, 1(5), 555–567. <http://doi.org/10.1016/j.stem.2007.08.014>
26. Wang, D., Lu, P., Zhang, H., Luo, M., Zhang, X. et al. (2014). Oct-4 and Nanog promote the epithelial-mesenchymal transition of breast cancer stem cells and are associated with poor prognosis in breast cancer patients. *Oncotarget*, 5(21), 10803–10815.
27. Yang, N., Zhou, T. C., Lei, X. X., Wang, C., Yan, M. et al. (2016) Inhibition of Sonic Hedgehog Signaling Pathway by Thiazole Antibiotic Thiostrepton Attenuates the CD44+/CD24-Stem-Like Population and Sphere-Forming Capacity in Triple-Negative Breast Cancer Cell *Physiol Biochem.* , 38(3):1157-70. doi: 10.1159/000443066.
28. Charafe-Jauffret, E., Ginestier, C., Iovino, F., Wicinski, J., Cervera, N. et al. (2009). Breast cancer cell lines contain functional cancer stem cells with metastatic capacity and a distinct molecular signature. *Cancer Research*, 69(4), 1302–1313. <http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-2741>
29. Hartwig, F. P., Nedel, F., Collares, T., Tarquinio, S. B., Nör, J. E. et al. (2014) Oncogenic somatic events in tissue-specific stem cells: a role in cancer recurrence? *Ageing Res Rev.* 13:100–106. DOI: 10.1016/j.arr.2013.12.004
30. Tomita, H., Tanaka, K., Tanaka, T., & Hara, A. (2016). Aldehyde dehydrogenase 1A1 in stem cells and cancer. *Oncotarget*, 7(10), 11018–11032. <http://doi.org/10.18632/oncotarget.6920>
31. Martelotto, L. G., Ng, C. K. Y., Piscuoglio, S., Weigelt, B., Reis-Filho, J.S. (2014) Breast cancer intra-tumor heterogeneity. *Breast Cancer Research*, 16:210, DOI:10.1186/bcr3658

32. Mani, S. A., Guo, W., Liao, M.-J., Eaton, E. N., Ayyanan, A. et al. (2008). The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell*, 133(4), 704–715. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2008.03.027>
33. Czerwinska, P., & Kaminska, B. (2015). Regulation of breast cancer stem cell features. *Contemporary Oncology*, 19(1A), A7–A15. <http://doi.org/10.5114/wo.2014.47126>
34. Okada, T., Sinha, S., Esposito, I., Schiavon, G., López-Lago, M. A. et al. (2015). The Rho-GTPase Rnd1 Suppresses Mammary Tumorigenesis and EMT by Restraining Ras-MAPK signaling. *Nature Cell Biology*, 17(1), 81–94. <http://doi.org/10.1038/ncb3082>
35. Liu, M., Zhu, H., Yang, S., Wang, Z., Bai, J. et al. (2013) c-Myc suppressed E-cadherin through miR-9 at the post-transcriptional level *Cell Biol Int*. 37(3):197-202. doi: 10.1002/cbin.10039. Epub 2013 Jan 30.
36. Liu, M., Casimiro, M. C., Wang, C., Shirley, L. A., Jiao, X. et al. (2009). p21CIP1 attenuates Ras- and c-Myc-dependent breast tumor epithelial mesenchymal transition and cancer stem cell-like gene expression in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(45), 19035–19039. <http://doi.org/10.1073/pnas.0910009106>
37. Jang, G. B., Kim, J. Y., Cho, S. D., Park, K. S., Jung, J. Y. et al. (2015) Blockade of Wnt/ β -catenin signaling suppresses breast cancer metastasis by inhibiting CSC-like phenotype *Sci Rep.*, 5:12465. doi: 10.1038/srep12465.
38. Wang, Y., & Zhou, B. P. (2011). Epithelial-mesenchymal transition in breast cancer progression and metastasis. *Chinese Journal of Cancer*, 30(9), 603–611. <http://doi.org/10.5732/cjc.011.10226>
39. Many, A. M., & Brown, A. M. C. (2014). Both Canonical and Non-Canonical Wnt Signaling Independently Promote Stem Cell Growth in Mammospheres. *PLoS ONE*, 9(7), e101800. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0101800>
40. Shao, S., Zhao, X., Zhang, X., Luo, M., Zuo, X. et al. (2015). Notch1 signaling regulates the epithelial–mesenchymal transition and invasion of breast cancer in a Slug-dependent manner. *Molecular Cancer*, 14(1), 28. <http://doi.org/10.1186/s12943-015-0295-3>
41. Huber, M. A., Azoitei, N., Baumann, B., Grünert, S., Sommer, A. et al. (2004). NF- κ B is essential for epithelial-mesenchymal transition and metastasis in a model of breast cancer progression. *Journal of Clinical Investigation*, 114(4), 569–581. <http://doi.org/10.1172/JCI200421358>

42. Davis, F. M., Azimi, I., Faville, R. A., Peters, A. A., Jalink, K. et al. (2014). Induction of epithelial-mesenchymal transition (EMT) in breast cancer cells is calcium signal dependent. *Oncogene*, 33(18), 2307–2316. <http://doi.org/10.1038/onc.2013.187>
43. Liu, Z., Semenza, G. L., & Zhang, H. (2015). Hypoxia-inducible factor 1 and breast cancer metastasis. *Journal of Zhejiang University. Science. B*, 16(1), 32–43. <http://doi.org/10.1631/jzus.B1400221>
44. Louderbough, J.M., Schroeder, J.A. (2011) Understanding the dual nature of CD44 in breast cancer progression. *Mol Cancer Res.* 9(12):1573-86. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-11-0156.
45. Jaggupilli, A., Elkord, E. (2012) Significance of CD44 and CD24 as Cancer Stem Cell Markers: An Enduring Ambiguity. *Clinical and Developmental Immunology*, vol. 2012, Article ID 708036, 11 pages, 2012. doi:10.1155/2012/708036
46. Wu, Y., Sarkissyan, M., Elshimali, Y., & Vadgama, J. V. (2013). Triple Negative Breast Tumors in African-American and Hispanic/Latina Women Are High in CD44+, Low in CD24+, and Have Loss of PTEN. *PLoS ONE*, 8(10), e78259. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0078259>
47. Bane, A., Vilorio-Petit, A., Pinnaduwa, D., Mulligan, A. M., O'Malley, F. P. et al. (2013). Clinical–pathologic significance of cancer stem cell marker expression in familial breast cancers. *Breast Cancer Research and Treatment*, 140(1), 195–205. <http://doi.org/10.1007/s10549-013-2591-1>
48. Stewart, R. L., & O'Connor, K. L. (2015). Clinical significance of the integrin $\alpha 6 \beta 4$ in human malignancies. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, 95(9), 976–986. <http://doi.org/10.1038/labinvest.2015.82>
49. Maguer-Satta, V., Chapellier, M., Delay, E., & Bachelard-Cascales, E. (2011). CD10: A tool to crack the role of stem cells in breast cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(49), E1264. <http://doi.org/10.1073/pnas.1116567108>
50. Keller, P.J., Arendt, L. M., Skibinska, A., Logvinenko, T., Klebba, I. (2012) Defining the cellular precursors to human breast cancer. *PNAS* vol. 109 no. 8, 2772–2777
51. Visvader, J. E., Lindeman, G. J. (2008) Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions *Nat Rev Cancer.*, 8(10):755-68. doi: 10.1038/nrc2499.

52. Marhaba, R., Klingbeil, P., Nuebel, T., Nazarenko, I., Buechler, M. W. et al. (2008) CD44 and EpCAM: Cancer-Initiating Cell Markers *Curr Mol Med.*, 8(8):784-804.
53. Wright, M. H., Calcagno, A. M., Salcido, C. D., Carlson, M. D., Ambudkar, S. V. et al. (2008). Brca1 breast tumors contain distinct CD44+/CD24- and CD133+ cells with cancer stem cell characteristics. *Breast Cancer Research : BCR*, 10(1), R10. <http://doi.org/10.1186/bcr1855>
54. Liu, T.J., Sun, B.C., Zhao, X.L., Zhao, X.M., Sun, T. et al. (2013) CD133+ cells with cancer stem cell characteristics associates with vasculogenic mimicry in triple-negative breast cancer, *Oncogene* 32, 544-553 doi:10.1038/onc.2012.85
55. Ajani, J. A., Song, S., Hochster, H. S., Steinberg, I. B. (2015) Cancer stem cells: the promise and the potential. *Semin Oncol.* ,42 Suppl 1:S3-17. doi: 10.1053/j.seminoncol.2015.01.001.
56. Kim, S. J., Kim, Y. S., Jang, E. D., Seo, K. J., & Kim, J. S. (2015). Prognostic Impact and Clinicopathological Correlation of CD133 and ALDH1 Expression in Invasive Breast Cancer. *Journal of Breast Cancer*, 18(4), 347–355. <http://doi.org/10.4048/jbc.2015.18.4.347>
57. Nadal, R., Ortega, F. Gabriel., Salido, M., Lorente, J. A. et al. (2013), CD133 expression in circulating tumor cells from breast cancer patients: Potential role in resistance to chemotherapy. *Int. J. Cancer*, 133: 2398–2407. doi:10.1002/ijc.28263
58. Borah, A., Raveendran, S., Rochani, A., Maekawa, T., Kumar D. S. (2015) Targeting self-renewal pathways in cancer stem cells: clinical implications for cancer therapy *Oncogenesis* 4, e177; doi:10.1038/oncsis.2015.35
59. Velasco-Velázquez, M. A., Popov, V. M., Lisanti, M. P., Pestell, R. G. (2011). The Role of Breast Cancer Stem Cells in Metastasis and Therapeutic Implications. *The American Journal of Pathology*, 179(1), 2–11. <http://doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.03.005>
60. Guo, S., Liu, M., & Gonzalez-Perez, R. R. (2011). Role of Notch and its oncogenic signaling crosstalk in breast cancer. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1815(2), 197–213. <http://doi.org/10.1016/j.bbcan.2010.12.002>
61. Cochrane, C. R., Szczepny, A., Watkins, D. N., & Cain, J. E. (2015). Hedgehog Signaling in the Maintenance of Cancer Stem Cells. *Cancers*, 7(3), 1554–1585. <http://doi.org/10.3390/cancers7030851>
62. Klevebring, D., Rosin, G., Ma, R., Lindberg, J., Czene, K. et al. (2014). Sequencing of breast cancer stem cell populations indicates a dynamic

- conversion between differentiation states in vivo. *Breast Cancer Research : BCR*, 16(4), R72. <http://doi.org/10.1186/bcr3687>
63. Gupta, P. B., Fillmore, C. M., Jiang, G., Shapira, S. D., Tao, K. et al. (2011) Stochastic state transitions give rise to phenotypic equilibrium in populations of cancer cells. *Cell*, Volume 146, Issue 4, 633 - 644 DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.07.026>
 64. Chaffer, C. L., Brueckmann, I., Scheel, C., Kaestli, A. J., Wiggins, P. A. et al. (2011). Normal and neoplastic nonstem cells can spontaneously convert to a stem-like state. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(19), 7950–7955. <http://doi.org/10.1073/pnas.1102454108>
 65. Chin, A.R., Wang, S.E. (2014) Cytokines driving breast cancer stemness. *Molecular and Cellular Endocrinology* Volume 382, Issue 1, Pages 598–602 <http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2013.03.024>
 66. Kim, Y., Joo, K. M., Jin, J., & Nam, D.-H. (2009). Cancer Stem Cells and Their Mechanism of Chemo-Radiation Resistance. *International Journal of Stem Cells*, 2(2), 109–114.
 67. Owens, T. W., & Naylor, M. J. (2013). Breast cancer stem cells. *Frontiers in Physiology*, 4, 225. <http://doi.org/10.3389/fphys.2013.00225>
 68. Li, X., Lewis, M. T., Huang, J., Gutierrez, C., Osborne, C. K. et al. (2008) Intrinsic Resistance of Tumorigenic Breast Cancer Cells to Chemotherapy *Natl Cancer Inst*, 100 (9): 672-679. doi: 10.1093/jnci/djn123
 69. Tanei, T., Morimoto, K., Shimazu, K., Kim, S.J., Tanji, Y. et al. (2009) Association of breast cancer stem cells identified by aldehyde dehydrogenase 1 expression with resistance to sequential Paclitaxel and epirubicin-based chemotherapy for breast cancers. *Clin Cancer Res.*, 15(12):4234-41. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-1479.
 70. Han, L., Shi, S., Gong, T., Zhang, Z., Sun, X. (2013) Cancer stem cells: therapeutic implications and perspectives in cancer therapy. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 3(2) 65-75, ISSN 2211-3835, <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsb.2013.02.006>.
 71. Shah, D., Osipo, C. (2016) Cancer stem cells and HER2 positive breast cancer: The story so far, *Genes & Diseases*, 3(2), 114-123, ISSN 2352-3042, <http://dx.doi.org/10.1016/j.gendis.2016.02.002>.

72. Yu, F., Yao, H., Zhu, P., Zhang, X., Pan Q. et al. (2007) let-7 regulates self renewal and tumorigenicity of breast cancer cells, *Cell Press* Volume 131, Issue 6, 1109–1123, DOI: 10.1016/j.cell.2007.10.054
73. Zielske, S. P., Spalding, A. C., Wicha, M. S., Lawrence, T. S. (2011). Ablation of Breast Cancer Stem Cells with Radiation. *Translational Oncology*, 4(4), 227–233.
74. Abdullah, L. N., Chow, E. K.-H. (2013). Mechanisms of chemoresistance in cancer stem cells. *Clinical and Translational Medicine*, 2, 3. <http://doi.org/10.1186/2001-1326-2-3>
75. Li, Y., Rogoff, H. A., Keates, S., Gao, Y., Murikipudi, S., Mikule, K., ... Li, C. J. (2015). Suppression of cancer relapse and metastasis by inhibiting cancer stemness. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(6), 1839–1844. <http://doi.org/10.1073/pnas.1424171112>
76. Yu, Y., Ramena, G., Elble, R.C. (2012) The role of cancer stem cells in relapse of solid tumors. *Frontiers in bioscience (Elite edition)* 4(4):1528-41
77. Sampieri K, Fodde R. (2012) Cancer stem cells and metastasis. *Seminars in Cancer Biology* 22(3):187-93
78. Charafe-Jauffret, E., Ginestier, C., Iovino F, F., Tarpin, C., Diebel, M. et al. (2010). ALDH1-positive cancer stem cells mediate metastasis and poor clinical outcome in inflammatory breast cancer. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 16(1), 45–55. <http://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-1630>
79. Liu, H., Patel, M. R., Prescher, J. A., Patsialou, A., Qian, D. et al. (2010). Cancer stem cells from human breast tumors are involved in spontaneous metastases in orthotopic mouse models. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(42), 18115–18120. <http://doi.org/10.1073/pnas.1006732107>
80. Abraham, B. K., Fritz, P., McClellan, M., Hauptvogel, P., Athellogou, M. et al. (2005) Prevalence of CD44+/CD24-/low cells in breast cancer may not be associated with clinical outcome but may favor distant metastasis. *Clinical Cancer Research*, 11(3):1154-9.
81. Liao, W.-T., Ye, Y.-P., Deng, Y.-J., Bian, X.-W., & Ding, Y.-Q. (2014). Metastatic cancer stem cells: from the concept to therapeutics. *American Journal of Stem Cells*, 3(2), 46–62.

82. Wang, R., Lv, Q., Meng, W., Tan, Q., Zhang, S. et al. (2014). Comparison of mammosphere formation from breast cancer cell lines and primary breast tumors. *Journal of Thoracic Disease*, 6(6), 829–837. <http://doi.org/10.3978/j.issn.2072-1439.2014.03.38>
83. Piscitelli, E., Cocola, C., Thaden, F. R., Pelucchi, P., Gray, B. (2015) Culture and characterization of mammary cancer stem cells in mammospheres. *Methods Mol Biol*. 1235:243-62. doi: 10.1007/978-1-4939-1785-3_18.
84. Liu, H.-G., Chen, C., Yang, H., Pan, Y.-F., & Zhang, X.-H. (2011). Cancer stem cell subsets and their relationships. *Journal of Translational Medicine*, 9, 50. <http://doi.org/10.1186/1479-5876-9-50>
85. Kise K., Kinugasa-Katayama Y., Takakura N. (2016) Tumor microenvironment for cancer stem cells *Adv Drug Deliv Rev.*, 99(Pt B):197-205. doi: 10.1016/j.addr.2015.08.005.
86. Chen, K., Huang, Y., Chen, J. (2013) Understanding and targeting cancer stem cells: therapeutic implications and challenges *Acta Pharmacologica Sinica* 34: 732–740; doi: 10.1038/aps.2013.27
87. Gupta, P. B., Onder, T. T., Jiang, G., Tao, K., Kuperwasser, C., Weinberg, R. A., & Lander, E. S. (2009). Identification of selective inhibitors of cancer stem cells by high-throughput screening. *Cell*, 138(4), 645–659. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2009.06.034>
88. Bednar F., Simeone D. M. (2012) Metformin and Cancer Stem Cells: Old Drug, New Targets. *Cancer Prev Res (Phila)*, 5(3), 351-4. doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-12-0026.
89. Corominas-Faja, B., Cuyàs, E., Gumuzio, J., Bosch-Barrera, J., Leis, O. et al. (2014). Chemical inhibition of acetyl-CoA carboxylase suppresses self-renewal growth of cancer stem cells. *Oncotarget*, 5(18), 8306–8316.
90. Albin, A., Bruno, A., Gallo, C., Pajardi, G., Noonan, D. M. et al. (2015). Cancer stem cells and the tumor microenvironment: interplay in tumor heterogeneity. *Connective Tissue Research*, 56(5), 414–425. <http://doi.org/10.3109/03008207.2015.1066780>
91. Hale, J. S., Li, M., & Lathia, J. D. (2012). The malignant social network: Cell-cell adhesion and communication in cancer stem cells. *Cell Adhesion & Migration*, 6(4), 346–355. <http://doi.org/10.4161/cam.21294>
92. Plaks, V., Kong, N., & Werb, Z. (2015). The Cancer Stem Cell Niche: How Essential is the Niche in Regulating Stemness of Tumor Cells? *Cell Stem Cell*, 16(3), 225–238. <http://doi.org/10.1016/j.stem.2015.02.015>

93. Ye, J., Wu, D., Wu, P., Chen, Z., Huang, J. (2014) The cancer stem cell niche: cross talk between cancer stem cells and their microenvironment *Tumor Biology*, 35 (5) 3945–3951
94. Noll J. E., Vandyke, K., Zannettino, A. C. W. (2014). The Role of the “Cancer Stem Cell Niche” in Cancer Initiation and Progression, *Adult Stem Cell Niches*, Dr Sabine Wislet-Gendebien (Ed.), InTech, DOI: 10.5772/58598.
95. Guan, J., & Chen, J. (2013). Mesenchymal stem cells in the tumor microenvironment. *Biomedical Reports*, 1(4), 517–521. <http://doi.org/10.3892/br.2013.103>
96. Cortez, E., Roswall, P., Pietras, K. (2014) Functional subsets of mesenchymal cell types in the tumor microenvironment *Seminars in Cancer Biology*, 25, 3–9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.semcancer.2013.12.010>.
97. Karnoub A.E., Dash A.B., Vo A.P., Sullivan A., Brooks M.W. et al. (2007) Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis *Nature* 449, 557–563 doi:10.1038/nature06188
98. Cukierman, E., & Bassi, D. E. (2012). The mesenchymal tumor microenvironment: A drug-resistant niche. *Cell Adhesion & Migration*, 6(3), 285–296. <http://doi.org/10.4161/cam.20210>
99. Lin, S.-Y., Dolfi, S. C., Amiri, S., Li, J., Budak-Alpdogan, T., Lee, K.-C et al. (2013). P53 regulates the migration of mesenchymal stromal cells in response to the tumor microenvironment through both CXCL12-dependent and -independent mechanisms. *International Journal of Oncology*, 43(6), 1817–1823. <http://doi.org/10.3892/ijo.2013.2109>
100. Landskron, G., Fuente, M. D., Thuwajit, P., Thuwajit C., Hermoso M .A. (2014) Chronic Inflammation and Cytokines in the Tumor Microenvironment. *Journal of Immunology Research*, vol. 2014, Article ID 149185, 19 pages. doi:10.1155/2014/149185
101. Liu, S., Ginestier, C., Ou, S. J., Clouthier, S. G., Patel, S. H. et al. (2011). Breast cancer stem cells are regulated by mesenchymal stem cells through cytokine networks. *Cancer Research*, 71(2), 614–624. <http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-0538>
102. Xu, W. T., Bian, Z. Y., Fan, Q. M., Li, G., Tang, T. T. (2009) Human mesenchymal stem cells (hMSCs) target osteosarcoma and promote its growth and pulmonary metastasis. *Cancer Lett.* 281(1):32–41. doi: 10.1016/j.canlet.2009.02.022.

103. Paunescu, V., Bojin, F. M., Tatu, C. A., Gavriliuc, O. I., Rosca, A. et al. (2011). Tumour-associated fibroblasts and mesenchymal stem cells: more similarities than differences. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 15(3), 635–646. <http://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2010.01044.x>
104. Barcellos-de-Souza, P., Comito, G., Pons-Segura, C., Taddei, M. L., Gori, V. et al. (2016), Mesenchymal Stem Cells are Recruited and Activated into Carcinoma-Associated Fibroblasts by Prostate Cancer Microenvironment-Derived TGF- β 1. *Stem Cells*. doi:10.1002/stem.2412
105. Mukherjee, D., & Zhao, J. (2013). The Role of chemokine receptor CXCR4 in breast cancer metastasis. *American Journal of Cancer Research*, 3(1), 46–57.
106. Vermeulen L., De Sousa E., Melo F., van der Heijden M., Cameron K. et al. (2010) Wnt activity defines colon cancer stem cells and is regulated by the microenvironment. *Nature Cell Biology*, 12(5):468-76.doi:10.1038/ncb2048
107. Cirri, P., & Chiarugi, P. (2011). Cancer associated fibroblasts: the dark side of the coin. *American Journal of Cancer Research*, 1(4), 482–497.
108. Pupo, M., Pisano, A., Abonante, S., Maggiolini, M., Musti, A. M. (2014) GPER activates Notch signaling in breast cancer cells and cancer-associated fibroblasts (CAFs) *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 46, 56–67. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2013.11.011>.
109. Peiris-Pagès, M., Sotgia, F., & Lisanti, M. P. (2015). Chemotherapy induces the cancer-associated fibroblast phenotype, activating paracrine Hedgehog-Gli signalling in breast cancer cells. *Oncotarget*, 6(13), 10728–10745.
110. Mao, Y., Keller, E. T., Garfield, D. H., Shen, K., & Wang, J. (2013). Stroma Cells in Tumor Microenvironment and Breast Cancer. *Cancer Metastasis Reviews*, 32(0), 303–315. <http://doi.org/10.1007/s10555-012-9415-3>
111. Dudley, A. C. (2012). Tumor Endothelial Cells. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(3), a006536. <http://doi.org/10.1101/cshperspect.a006536>
112. Tabruyn, S.P., Mémet, S., Avé, P., Verhaeghe, C., Mayo, K.H. et al. (2009) NF- κ B activation in endothelial cells is critical for the activity of angiostatic agents *Mol Cancer Ther.* ,(8) (9) 2645-2654; DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-09-0383
113. Hida, K., Maishi, N., Torii, C., Hida, Y. (2016) Tumor angiogenesis—characteristics of tumor endothelial cells *International Journal of Clinical Oncology* , Volume 21, Issue 2, pp 206–212
114. Scully, S., Francescone, R., Faibish, M., Bentley, B., Taylor, S. L. et al. (2012). Transdifferentiation of glioblastoma stem-like cells into mural cells drives

- vasculogenic mimicry in glioblastomas. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 32(37), 12950–12960. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2017-12.2012>
115. Korkaya, H., Liu, S., & Wicha, M. S. (2011). Breast cancer stem cells, cytokine networks, and the tumor microenvironment. *The Journal of Clinical Investigation*, 121(10), 3804–3809. <http://doi.org/10.1172/JCI57099>
 116. Solis, M.A., Chen, Y.H., Wong, T.Y., Bittencourt, V.Z., Lin Y.C. et al. (2012) Hyaluronan Regulates Cell Behavior: A Potential Niche Matrix for Stem Cells, *Biochemistry Research International*, vol. 2012, Article ID 346972, 11 pages, 2012. doi:10.1155/2012/346972
 117. Chanmee, T., Ontong, P., Kimata, K., & Itano, N. (2015). Key Roles of Hyaluronan and Its CD44 Receptor in the Stemness and Survival of Cancer Stem Cells. *Frontiers in Oncology*, 5, 180. <http://doi.org/10.3389/fonc.2015.00180>
 118. Misra, S., Heldin, P., Hascall, V. C., Karamanos, N. K., Skandalis, S. S. et al. (2011). HA/CD44 interactions as potential targets for cancer therapy. *The FEBS Journal*, 278(9), 1429–1443. <http://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08071.x>
 119. Jiang, W., Zhang, Y., Kane, K. T., Collins, M. A., Simeone, D. M. et al. (2015). CD44 regulates pancreatic cancer invasion through MT1-MMP. *Molecular Cancer Research: MCR*, 13(1), 9–15. <http://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-14-0076>
 120. Bourguignon, L.Y., Zhu, H., Chu, A., Iida, N., Zhang, L. (1997) Interaction between the Adhesion Receptor, CD44, and the Oncogene Product, p185 HER2 , Promotes Human Ovarian Tumor Cell Activation, *Journal of Biological Chemistry* 272(44):27913-8
 121. Cariati, M., Naderi, A., Brown, J. P., Smalley, M. J., Pinder, S. E., Caldas, C. and Purushotham, A. D. (2008), Alpha-6 integrin is necessary for the tumorigenicity of a stem cell-like subpopulation within the MCF7 breast cancer cell line. *Int. J. Cancer*, 122: 298–304. doi:10.1002/ijc.23103
 122. Desgrosellier, J. S., & Cheresh, D. A. (2010). Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nature Reviews. Cancer*, 10(1), 9–22. <http://doi.org/10.1038/nrc2748>
 123. de Oliveira K.B., Guembarovski R.L., Guembarovski A.M., da Silva do Amaral Herrera A.C., Sobrinho W.J. et al. (2013) CXCL12, CXCR4 and IFN γ genes expression: implications for proinflammatory microenvironment of breast

- cancer. *Clinical and Experimental Medicine* Volume 13, Issue 3, pp 211–219. DOI: 10.1007/s10238-012-0194-5
124. Sun, X., Cheng, G., Hao, M., Zheng, J., Zhou, X. et al. (2010). CXCL12/CXCR4/CXCR7 Chemokine Axis and Cancer Progression. *Cancer Metastasis Reviews*, 29(4), 709–722. <http://doi.org/10.1007/s10555-010-9256-x>
 125. Zhang, Z., Ni, C., Chen, W., Wu, P., Wang, Z., Yin, J., ... Qiu, F. (2014). Expression of CXCR4 and breast cancer prognosis: a systematic review and meta-analysis. *BMC Cancer*, 14, 49. <http://doi.org/10.1186/1471-2407-14-49>
 126. Zhang, M., Liu, H., Teng, X., Wang, H., Cui, J, et al.(2012) The Differences in CXCR4 Protein Expression Are Significant for the Five Molecular Subtypes of Breast Cancer. *Ultrastructural Pathology* Vol. 36 , Iss. 6,2012 DOI:10.3109/01913123.2012.728687
 127. Soria, G., Ben-Baruch, A. (2008) The inflammatory chemokines CCL2 and CCL5 in breast cancer. *Cancer Letters*, Volume 267, Issue 2, 271–285, Inflammation and Cancer Special Issue. doi: 10.1016/j.canlet.2008.03.018.
 128. Long, H., Xie, R., Xiang, T., Zhao, Z., Lin, S. et al. (2012), Autocrine CCL5 Signaling Promotes Invasion and Migration of CD133+ Ovarian Cancer Stem-Like Cells via NF-κB-Mediated MMP-9 Upregulation. *STEM CELLS*, 30: 2309–2319. doi:10.1002/stem.1194
 129. Velasco-Velázquez M., Jiao X., De La Fuente M., Pestell T. G., Ertel A. et al.(2012) CCR5 antagonist blocks metastasis of basal breast cancer cells. *Cancer Res.* ,72(15):3839-50. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-3917.
 130. Sanguinetti, A., Santini, D., Bonafè, M., Taffurelli, M., Avenia, N. (2015). Interleukin-6 and pro inflammatory status in the breast tumor microenvironment. *World Journal of Surgical Oncology*, 13, 129. <http://doi.org/10.1186/s12957-015-0529-2>
 131. Kim, S.-Y., Kang, J. W., Song, X., Kim, B. K., Yoo, Y. D. et al. (2013). Role of the IL-6-JAK1-STAT3-Oct-4 pathway in the conversion of non-stem cancer cells into cancer stem-like cells. *Cellular Signalling*, 25(4), 961–969. <http://doi.org/10.1016/j.cellsig.2013.01.007>
 132. Sullivan N. J., Sasser A. K., Axel A. E., Vesuna F., Raman V. et al. (2009) Interleukin-6 induces an epithelial-mesenchymal transition phenotype in human breast cancer cells. *Oncogene.*, 28(33):2940-7. doi: 10.1038/onc.2009.180.

133. Xu, H., Lai, W., Zhang, Y., Liu, L., Luo, X. et al. (2014). Tumor-associated macrophage-derived IL-6 and IL-8 enhance invasive activity of LoVo cells induced by PRL-3 in a KCNN4 channel-dependent manner. *BMC Cancer*, 14, 330. <http://doi.org/10.1186/1471-2407-14-330>
134. Wongchana, W., Palaga, T. (2012). Direct regulation of interleukin-6 expression by Notch signaling in macrophages. *Cellular and Molecular Immunology*, 9(2), 155–162. <http://doi.org/10.1038/cmi.2011.36>
135. Jin, S., Mutvei, A. P., Chivukula, I. V., Andersson, E. R., Ramsköld, D., et al. (2013). Non-canonical Notch signaling activates IL-6/JAK/STAT signaling in breast tumor cells and is controlled by p53 and IKK α /IKK β . *Oncogene*, 32(41), 4892–4902. <http://doi.org/10.1038/onc.2012.517>
136. Hartman, Z. C., Yang, X.-Y., Glass, O., Lei, G., Osada, T., et al. (2011). HER2 overexpression elicits a pro-inflammatory IL-6 autocrine signaling loop that is critical for tumorigenesis. *Cancer Research*, 71(13), 4380–4391. <http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-0308>
137. Aziz, M., Jacob, A., Matsuda, A., Wang, P. (2011) Review: milk fat globule-EGF factor 8 expression, function and plausible signal transduction in resolving inflammation. *Apoptosis*. 16(11):1077-86. doi: 10.1007/s10495-011-0630-0.
138. Okuyama, T., Kurata, S., Tomimori, Y., Fukunishi, N., Sato, S. (2008) p63(TP63) elicits strong trans-activation of the MFG-E8/lactadherin/BA46 gene through interactions between the TA and DeltaN isoforms. *Oncogene*, 27(3):308-17.
139. Yang, C., Hayashida, T., Forster, N., Li, C., Shen, D., Maheswaran, S., et al. (2011). The integrin $\alpha\beta$ 3-5 ligand MFG-E8 is a p63/p73 target gene in triple negative breast cancers but exhibits suppressive functions in ER+ and erbB2+ breast cancers. *Cancer Research*, 71(3), 937–945. <http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-1471>
140. Ginestier, C., Wicinski, J., Cervera, N., Monville, F., Finetti, P., et al. (2009). Retinoid signaling regulates breast cancer stem cell differentiation. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, 8(20), 3297–3302.
141. Bhat-Nakshatri P., Goswami, C.P. , Badve, S., Sledge G.W., Nakshatri H. (2013) Identification of FDA-approved Drugs Targeting Breast Cancer Stem Cells Along With Biomarkers of Sensitivity, *Scientific Reports* 3, Article number: 2530 (2013) doi:10.1038/srep02530
142. Singh, J. K., Farnie, G., Bundred, N. J., Simões, B. M., Shergill, A., et al. (2013). 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 : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 19(3), 643–656. <http://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-1063>
143. Fan X., Patera A.C., Pong-Kennedy A., Deno G., Gonsiorek W. (2007) Murine CXCR1 is a functional receptor for GCP-2/CXCL6 and interleukin-8/CXCL8. *J Biol Chem.*, 282(16):11658-66. DOI: 10.1074/jbc.M607705200
 144. Li, Z., Zhang, Q., Zhang, Q., Xu, M., Qu, Y. et al. (2016) CXCL6 promotes human hepatocyte proliferation through the CXCR1-NFκB pathway and inhibits collagen I secretion by hepatic stellate cells. *Biochem Cell Biol.*, 94(3):229-35. doi: 10.1139/bcb-2015-0136.
 145. Ravindran, A., Sawant, K. V., Sarmiento, J., Navarro, J., Rajarathnam, K. (2013). Chemokine CXCL1 Dimer Is a Potent Agonist for the CXCR2 Receptor . *The Journal of Biological Chemistry*, 288(17), 12244–12252. <http://doi.org/10.1074/jbc.M112.443762>
 146. Mestas, J., Burdick, M.D., Reckamp, K., Pantuck, A., Figlin, R.A. et al. (2005) The role of CXCR2/CXCR2 ligand biological axis in renal cell carcinoma, *J Immunol.*, 175(8):5351-7.
 147. Zhou, S.L., Zhou, Z.J., Hu, Z.Q., Li, X., Huang, X.W. et al. (2015) CXCR2/CXCL5 axis contributes to epithelial–mesenchymal transition of HCC cells through activating PI3K/Akt/GSK-3β/Snail signaling *Cancer Letters*, Volume 358, Issue 2, 28 March 2015, 124–135. DOI: 10.1016/j.canlet.2014.11.044
 148. Desurmont, T., Skrypek, N., Duhamel, A., Jonckheere, N., Millet, G. et al. (2015). Overexpression of chemokine receptor CXCR2 and ligand CXCL7 in liver metastases from colon cancer is correlated to shorter disease-free and overall survival. *Cancer Science*, 106(3), 262–269. <http://doi.org/10.1111/cas.12603>
 149. Wolf, M., Delgado, M.B., Jones, S.A., Dewald, B., Clark-Lewis, I. et al. (1998) Granulocyte chemotactic protein 2 acts via both IL-8 receptors, CXCR1 and CXCR2. *Eur J Immunol.*, 28(1):164-70.
 150. Benoy, I.H., Salgado, R., Van Dam, P., Geboers, K., Van Marck, E. et al. (2004) Increased serum interleukin-8 in patients with early and metastatic breast cancer correlates with early dissemination and survival. *Clin Cancer Res.*, 10(21):7157-62.
 151. Todorović-Raković, N., & Milovanović, J. (2013). Interleukin-8 in Breast Cancer Progression. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 33(10), 563–570. <http://doi.org/10.1089/jir.2013.0023>

152. Derin, D., Soydinc, H.O., Guney, N., Tas, F., Camlica, H. et al. (2007) Serum IL-8 and IL-12 levels in breast cancer. *Med Oncol.* 2007;24(2):163-8.
153. Singh, J. K., Simões, B. M., Howell, S. J., Farnie, G., & Clarke, R. B. (2013). Recent advances reveal IL-8 signaling as a potential key to targeting breast cancer stem cells. *Breast Cancer Research: BCR*, 15(4), 210. <http://doi.org/10.1186/bcr3436>
154. Shi, Z., Yang, W.M., Chen, L.P., Yang, D.H., Zhou, Q. et al. (2012) Enhanced chemosensitization in multidrug-resistant human breast cancer cells by inhibition of IL-6 and IL-8 production. *Breast Cancer Res Treat.* 135(3):737-47. doi: 10.1007/s10549-012-2196-0.
155. Vyas, D., Laput, G., & Vyas, A. K. (2014). Chemotherapy-enhanced inflammation may lead to the failure of therapy and metastasis. *OncoTargets and Therapy*, 7, 1015–1023. <http://doi.org/10.2147/OTT.S60114>
156. Waugh D.J., Wilson C. (2008) The Interleukin-8 Pathway in Cancer, *Clin Cancer Res.*, 14(21):6735-41. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-07-4843
157. Palena, C., Hamilton, D. H., & Fernando, R. I. (2012). Influence of IL-8 on the epithelial–mesenchymal transition and the tumor microenvironment. *Future Oncology (London, England)*, 8(6), 713–722. <http://doi.org/10.2217/fon.12.59>
158. Xie, G., Yao, Q., Liu, Y., Du, S., Liu, A., et al. (2012). IL-6-induced epithelial-mesenchymal transition promotes the generation of breast cancer stem-like cells analogous to mammosphere cultures. *International Journal of Oncology*, 40(4), 1171–1179. <http://doi.org/10.3892/ijo.2011.1275>
159. Lee, C.-H., Syu, S.-H., Liu, K.-J., Chu, P.-Y., Yang, W.-C., et al. (2015). Interleukin-1 beta transactivates epidermal growth factor receptor via the CXCL1-CXCR2 axis in oral cancer. *Oncotarget*, 6(36), 38866–38880.
160. Cho, Y. A., Sung, M.-K., Yeon, J.-Y., Ro, J., Kim, J. (2013). Prognostic Role of Interleukin-6, Interleukin-8, and Leptin Levels According to Breast Cancer Subtype. *Cancer Research and Treatment: Official Journal of Korean Cancer Association*, 45(3), 210–219. <http://doi.org/10.4143/crt.2013.45.3.210>
161. Sivrikoz, O.N., Doganay, L., Sivrikoz, U.K., Karaarslan, S., Sanal, S.M. (2013) Distribution of CXCR4 and γ -catenin expression pattern in breast cancer subtypes and their relationship to axillary nodal involvement *Pol J Pathol.*, 64 (4): 253-259 DOI: 10.5114/pjp.2013.39333
162. Mostert, B., Kraan, J., Sieuwerts, A.M., van der Spoel, P., Bolt-de Vries, J. et al. (2012) CD49f-based selection of circulating tumor cells (CTCs) improves

- detection across breast cancer subtypes. *Cancer Letters* 319(1):49-55. DOI: 10.1016/j.canlet.2011.12.031
163. Laoui, D., Movahedi, K., Van Overmeire, E., Van den Bossche, J., Schouppe, E. et al. (2011) Tumor-associated macrophages in breast cancer: distinct subsets, distinct functions. *Int J Dev Biol.* 2011;55(7-9):861-7. doi: 10.1387/ijdb.113371dl.
 164. Galdiero, M.R., Bonavita, E., Barajon, I., Garlanda, C., Mantovani, A. et al. (2013) Tumor associated macrophages and neutrophils in cancer. *Immunobiology*, 218, (11), 1402–1410. DOI: 10.1016/j.imbio.2013.06.003
 165. Bingle, L., Brown, N. J. and Lewis, C. E. (2002), The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies. *J. Pathol.*, 196: 254–265. doi:10.1002/path.1027
 166. Chanmee, T., Ontong, P., Konno, K., Itano, N. (2014). Tumor-Associated Macrophages as Major Players in the Tumor Microenvironment. *Cancers*, 6(3), 1670–1690. <http://doi.org/10.3390/cancers6031670>
 167. Guo, C., Buranich, A., Sarkar, D., Fisher, P. B., Wang, X.-Y. (2013). The role of tumor-associated macrophages in tumor vascularization. *Vascular Cell*, 5, 20. <http://doi.org/10.1186/2045-824X-5-20>
 168. Fujimoto, H., Sangai, T., Ishii, G., Ikehara, A., Nagashima, T., Miyazaki, M. and Ochiai, A. (2009), Stromal MCP-1 in mammary tumors induces tumor-associated macrophage infiltration and contributes to tumor progression. *Int. J. Cancer*, 125: 1276–1284. doi:10.1002/ijc.24378
 169. Colvin, E. K. (2014). Tumor-Associated Macrophages Contribute to Tumor Progression in Ovarian Cancer. *Frontiers in Oncology*, 4, 137. <http://doi.org/10.3389/fonc.2014.00137>
 170. Yaddanapudi, K., Putty, K., Rendon, B. E., Lamont, G. J., Faughn, J. D., et al. (2013). Control of tumor-associated macrophage alternative activation by MIF. *Journal of Immunology* (Baltimore, Md.: 1950), 190(6), 2984–2993. <http://doi.org/10.4049/jimmunol.1201650>
 171. Richard, V., Kindt, N., & Saussez, S. (2015). Macrophage migration inhibitory factor involvement in breast cancer (Review). *International Journal of Oncology*, 47(5), 1627–1633. <http://doi.org/10.3892/ijo.2015.3185>
 172. Richard, V., Kindt, N., Decaestecker, C., Gabius, H.-J., Laurent, G., et al. (2014). Involvement of macrophage migration inhibitory factor and its receptor (CD74) in human breast cancer. *Oncology Reports*, 32(2), 523–529. <http://doi.org/10.3892/or.2014.3272>

173. Hagemann T., Wilson J., Kulbe H., Li N.F., Leinster D.A. et al. (2005) Macrophages Induce Invasiveness of Epithelial Cancer Cells Via NF- κ B and JNK1, doi: 10.4049/jimmunol.175.2.1197, The Journal of Immunology, vol. 175 no. 2 1197-1205
174. Weagel E., Smith C., Liu P.G., Robison R., O'Neill K. (2015) Macrophage Polarization and Its Role in Cancer. J Clin Cell Immunol 6:338. doi:10.4172/2155-9899.1000338
175. Sica, A., & Mantovani, A. (2012). Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. The Journal of Clinical Investigation, 122(3), 787–795. <http://doi.org/10.1172/JCI59643>
176. Pivarcsi, A., Bodai, L., Réthi, B., Kenderessy-Szabó, A., Koreck, A. et al. (2003) Expression and function of Toll-like receptors 2 and 4 in human keratinocytes. International Immunology 15(6):721-30.
177. Wang, N., Liang, H., & Zen, K. (2014). Molecular Mechanisms That Influence the Macrophage M1–M2 Polarization Balance. Frontiers in Immunology, 5, 614. <http://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00614>
178. Hao, N.B., Lü, M.H., Fan, Y.F., Cao, Y.L., Zhang, Z.R., et al. (2012) Macrophages in Tumor Microenvironments and the Progression of Tumors, Clinical and Developmental Immunology, Volume 2012 Article ID 948098, 11 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2012/948098>
179. Röszer T. (2015) Understanding the Mysterious M2 Macrophage through Activation Markers and Effector Mechanisms, Mediators of Inflammation, Volume 2015, Article ID 816460, 16 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2015/816460>
180. Zhang, B., Zhang, Y., Yao, G., Gao, J., Yang, B., et al. (2012). M2-polarized macrophages promote metastatic behavior of Lewis lung carcinoma cells by inducing vascular endothelial growth factor-C expression. Clinics, 67(8), 901–906. [http://doi.org/10.6061/clinics/2012\(08\)08](http://doi.org/10.6061/clinics/2012(08)08)
181. Hou, N., Piao, X., Liu, S., Wu, C., Chen, Q. (2015). Tim-3 Induces Th2-Biased Immunity and Alternative Macrophage Activation during *Schistosoma japonicum* Infection. Infection and Immunity, 83(8), 3074–3082. <http://doi.org/10.1128/IAI.00517-15>
182. Graham, D. K., DeRyckere, D., Davies, K.D., Earp, H.S. (2014) The TAM family: phosphatidylserine sensing receptor tyrosine kinases gone awry in cancer Nature Reviews Cancer 14, 769–785 (2014) doi:10.1038/nrc3847

183. Soki, F. N., Koh, A. J., Jones, J. D., Kim, Y. W., Dai, J. et al. (2014). Polarization of Prostate Cancer-associated Macrophages Is Induced by Milk Fat Globule-EGF Factor 8 (MFG-E8)-mediated Efferocytosis. *The Journal of Biological Chemistry*, 289(35), 24560–24572. <http://doi.org/10.1074/jbc.M114.571620>
184. Mills, C.D. (2012) M1 and M2 Macrophages: Oracles of Health and Disease. *Crit Rev Immunol*. 2012;32(6):463-88.
185. Muraille, E., Leo, O., Moser, M. (2014). Th1/Th2 Paradigm Extended: Macrophage Polarization as an Unappreciated Pathogen-Driven Escape Mechanism? *Frontiers in Immunology*, 5, 603. <http://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00603>
186. Imtiyaz, H. Z., Williams, E. P., Hickey, M. M., Patel, S. A., Durham, A. C. et al. (2010). Hypoxia-inducible factor 2 α regulates macrophage function in mouse models of acute and tumor inflammation. *The Journal of Clinical Investigation*, 120(8), 2699–2714. <http://doi.org/10.1172/JCI39506>
187. LaGory, E. L., Giaccia, A. J. (2016). The Ever Expanding Role of HIF in Tumour and Stromal Biology. *Nature Cell Biology*, 18(4), 356–365. <http://doi.org/10.1038/ncb3330>
188. Sakakura K., Takahashi H., Kaira K., Toyoda M., Murata T. et al. (2016) Relationship between tumor-associated macrophage subsets and CD47 expression in squamous cell carcinoma of the head and neck in the tumor microenvironment. *Laboratory Investigation* 96(9):994-1003 doi: 10.1038/labinvest.2016.70.
189. Ding, J., Jin, W., Chen, C., Shao, Z., & Wu, J. (2012). Tumor Associated Macrophage $\times$ Cancer Cell Hybrids May Acquire Cancer Stem Cell Properties in Breast Cancer. *PLoS ONE*, 7(7), e41942. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0041942>
190. Medrek, C., Pontén, F., Jirström, K., & Leandersson, K. (2012). The presence of tumor associated macrophages in tumor stroma as a prognostic marker for breast cancer patients. *BMC Cancer*, 12, 306. <http://doi.org/10.1186/1471-2407-12-306>
191. Andreou, K., Rajendran, R., Krstic-Demonacos, M., Demonacos, C. (2012) Regulation of CXCR4 gene expression in breast cancer cells under diverse stress conditions. *Int J Oncol*. 2012 Dec;41(6):2253-9. doi: 10.3892/ijo.2012.1643.
192. Xuan, Q.J., Wang, J.X., Nanding, A., Wang, Z.P., Liu, H. (2014) Tumor-Associated Macrophages are Correlated with Tamoxifen Resistance in the

Postmenopausal Breast Cancer Patients Pathology & Oncology Research July 2014, Volume 20, Issue 3, pp 619-624

193. Sharp, A., Harper-Wynne, C. (2014) Treatment of Advanced Breast Cancer (ABC): The Expanding Landscape of Targeted Therapies. *J Cancer Biol Res* 2(1): 1036.
194. Voduc K.D., Cheang M.C., Tyldesley S., Gelmon K., Nielsen T.O., et al. (2010) Breast cancer subtypes and the risk of local and regional relapse. *J Clin Oncol.* 28(10):1684-91. doi: 10.1200/JCO.2009.24.9284
195. Metzger-Filho, O., Sun, Z., Viale, G., Price, K. N., Crivellari, D. et al. (2013). Patterns of Recurrence and Outcome According to Breast Cancer Subtypes in Lymph Node–Negative Disease: Results From International Breast Cancer Study Group Trials VIII and IX. *Journal of Clinical Oncology*, 31(25), 3083–3090. <http://doi.org/10.1200/JCO.2012.46.1574>
196. Lund, M. J., Butler, E. N., Hair, B. Y., Ward, K. C., Andrews, J. H., et al. (2010), Age/race differences in HER2 testing and in incidence rates for breast cancer triple subtypes. *Cancer*, 116: 2549–2559. doi:10.1002/cncr.25016
197. Ly, D., Forman, D., Ferlay, J., Brinton, L. A., Cook, M. B. (2013). An International Comparison of Male and Female Breast Cancer Incidence Rates. *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer*, 132(8), 1918–1926. <http://doi.org/10.1002/ijc.27841>
198. Sánchez-Muñoz A., Román-Jobacho A., Pérez-Villa L., Sánchez-Rovira P., Miramón J. (2012) Male breast cancer: immunohistochemical subtypes and clinical outcome characterization. *Oncology*. 2012;83(4):228-33. doi: 10.1159/000341537
199. Kornegoor R., Verschuur-Maes A.H., Buerger H., Hogenes M.C., de Bruin P.C. (2012) Molecular subtyping of male breast cancer by immunohistochemistry. *Mod Pathol.* 25(3):398-404. doi: 10.1038/modpathol.2011.174.
200. Kumar V., Abbas A.K., Aster J.C (2010) Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease 8th edition. Saunders Elsevier. ISBN: 9781416031215
201. College of American Pathologists, Cancer Protocol Templates http://www.cap.org/web/oracle/webcenter/portalapp/pagehierarchy/cancer_protocol_templates.jsp
202. Weigelt B., Geyer F. C., Reis-Filho J .S. (2010) Histological types of breast cancer: How special are they? *Mol Oncol.* 2010 Jun;4(3):192-208. doi: 10.1016/j.molonc.2010.04.004.

203. Salhia B, , Tapia C., Ishak E.A., Gaber S., Berghuis B, et al. (2011) Molecular subtype analysis determines the association of advanced breast cancer in Egypt with favorable biology BMC Women's Health, 11:44 DOI: 10.1186/1472-6874-11-44
204. Peppercorn J., Perou C.M., Carey L.A. (2008) Molecular Subtypes in Breast Cancer Evaluation and Management: Divide and Conquer. Cancer Invest. 26(1):1-10. doi: 10.1080/07357900701784238.
205. Correa Geyer, F., Reis-Filho, J.S. (2009) Microarray-based Gene Expression Profiling as a Clinical Tool for Breast Cancer Management Are We There Yet. Int J Surg Pathol. 2009 Aug;17(4):285-302. doi: 10.1177/1066896908328577.
206. Kumar, P., Aggarwal, R. (2016) An overview of triple-negative breast cancer. Archives of Gynecology and Obstetrics, 293(2):247-69. doi: 10.1007/s00404-015-3859-y.
207. Quail, D., & Joyce, J. (2013). Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. Nature Medicine, 19(11), 1423–1437. <http://doi.org/10.1038/nm.3394>
208. Vinogradov, S., Warren, G., & Wei, X. (2014). Macrophages associated with tumors as potential targets and therapeutic intermediates. Nanomedicine (London, England), 9(5), 695–707. <http://doi.org/10.2217/nnm.14.13>
209. Murphy, C., McGurk, M., Pettigrew, J., Santinelli, A., Mazzucchelli, R. et al. (2005) Nonapical and Cytoplasmic Expression of Interleukin-8, CXCR1, and CXCR2 Correlates with Cell Proliferation and Microvessel Density in Prostate Cancer. Clin Cancer Res. 2005 Jun 1;11(11):4117-27.
210. Wang, J., Sang, D., Xu, B., Yuan, P., Ma, F., et al. (2016). Value of Breast Cancer Molecular Subtypes and Ki67 Expression for the Prediction of Efficacy and Prognosis of Neoadjuvant Chemotherapy in a Chinese Population. Medicine, 95(18), e3518. <http://doi.org/10.1097/MD.0000000000003518>
211. Tumea L, Pacob K., Ubidia-Inciob R., Moya J. (2016) CD133 in breast cancer cells and in breast cancer stem cells as another target for immunotherapy. 15 (1), 22–30. <http://dx.doi.org/10.1016/j.gamo.2016.01.003>
212. Brugnoli, F., Grassilli, S., Piazzzi, M., Palomba, M., Nika, E., et al. (2013). In triple negative breast tumor cells, PLC- β 2 promotes the conversion of CD133^{high} to CD133^{low} phenotype and reduces the CD133-related invasiveness. Molecular Cancer, 12, 165. <http://doi.org/10.1186/1476-4598-12-165>

213. Cantile M, Collina F, D'Aiuto M, Rinaldo M, Pirozzi G, et al. (2013) Nuclear localization of cancer stem cell marker CD133 in triple-negative breast cancer: a case report. *Tumori Journal* 99(5):e245-50. doi: 10.1700/1377.15325.
214. Rappa, G., Fodstad, O., Lorico, A. (2008). The Stem Cell-Associated Antigen CD133 (Prominin-1) Is a Molecular Therapeutic Target for Metastatic Melanoma. *Stem Cells* (Dayton, Ohio), 26(12), 3008–3017. <http://doi.org/10.1634/stemcells.2008-0601>
215. Guy M.S., Qamar L., Behbakht K., Post M.D., Sheeder J. et al. (2015) Progesterone treatment decreases CD133+ cancer stem cell populations in endometrial cancer. *Gynecol Oncol.* 2016 Mar;140(3):518-26. doi: 10.1016/j.ygyno.2015.12.022.
216. Ponnusamy, M. P., Seshacharyulu, P., Vaz, A., Dey, P., Batra, S. K. (2011). MUC4 stabilizes HER2 expression and maintains the cancer stem cell population in ovarian cancer cells. *Journal of Ovarian Research*, 4, 7. <http://doi.org/10.1186/1757-2215-4-7>
217. Xia, S., Sha, H., Yang, L., Ji, Y., Ostrand-Rosenberg, S., et al. (2011). Gr-1+ CD11b+ Myeloid-derived Suppressor Cells Suppress Inflammation and Promote Insulin Sensitivity in Obesity. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(26), 23591–23599. <http://doi.org/10.1074/jbc.M111.237123>
218. Katz-Hanani I., Rothstein T., Gaitini D., Gallimidi Z., Azhari H. (2014) Age-Related Ultrasonic Properties of Breast Tissue In Vivo. *Ultrasound Med Biol.* ,40(9):2265-71. doi: 10.1016/j.ultrasmedbio.2014.03.034.
219. Sousa, S., Brion, R., Lintunen, M., Kronqvist, P., Sandholm, J. et al. (2015). Human breast cancer cells educate macrophages toward the M2 activation status. *Breast Cancer Research: BCR*, 17(1), 101. <http://doi.org/10.1186/s13058-015-0621-0>
220. Hartman, Z. C., Poage, G. M., den Hollander, P., Tsimelzon, A., Hill, J., et al. (2013). Growth of triple-negative breast cancer cells relies upon coordinate autocrine expression of the pro-inflammatory cytokines IL-6 and IL-8. *Cancer Research*, 73(11), 10.1158/0008-5472.CAN-12-4524-T. <http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-4524-T>
221. Ginestier, C., Liu, S., Diebel, M. E., Korkaya, H., Luo, M., et al. (2010). CXCR1 blockade selectively targets human breast cancer stem cells in vitro and in xenografts. *The Journal of Clinical Investigation*, 120(2), 485–497. <http://doi.org/10.1172/JCI39397>

222. Norton, K.-A., Popel, A. S., Pandey, N. B. (2015). Heterogeneity of chemokine cell-surface receptor expression in triple-negative breast cancer. *American Journal of Cancer Research*, 5(4), 1295–1307.
223. Chen, L., Fan, J., Chen, H., Meng, Z., Chen, Z. , et al. (2014) The IL-8/CXCR1 axis is associated with cancer stem cell-like properties and correlates with clinical prognosis in human pancreatic cancer cases. *Scientific Reports* 4, Article number: 5911 doi:10.1038/srep05911
224. Huang, W.C., Chan, M.L., Chen, M.J. Tsai, T.H., Chen, Y.J.(2016) Modulation of macrophage polarization and lung cancer cell stemness by MUC1 and development of a related small-molecule inhibitor pterostilbene. *Oncotarget*. 2016 Jun 4. doi: 10.18632/oncotarget.8101.
225. Xu, H., Lai, W., Zhang, Y., Liu, L., Luo, X., et al. (2014). Tumor-associated macrophage-derived IL-6 and IL-8 enhance invasive activity of LoVo cells induced by PRL-3 in a KCNN4 channel-dependent manner. *BMC Cancer*, 14, 330. <http://doi.org/10.1186/1471-2407-14-330>
226. Sansone, P., Ceccarelli, C., Berishaj, M., Chang, Q., Rajasekhar, V. K., et al. (2016). Self-renewal of CD133hi cells by IL6/Notch3 signalling regulates endocrine resistance in metastatic breast cancer. *Nature Communications*, 7, 10442. <http://doi.org/10.1038/ncomms10442>
227. Freund, A., Chauveau, C., Brouillet, J.-P., Lucas, A., Lacroix, M., et al. (2003). IL-8 expression and its possible relationship with estrogen-receptor-negative status of breast cancer cells. *Oncogene*, 22(2), 256–265. <http://doi.org/10.1038/sj.onc.1206113>
228. Chen, L., Cook, L.S., Tang, M.T., Porter, P.L., Hill, D.A. (2016) Body mass index and risk of luminal, HER2-overexpressing, and triple negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.*, 157(3):545-54. doi: 10.1007/s10549-016-3825-9.
229. Currie, M.J., Beardsley, B.E., Harris, G.C., Gunningham, S.P., Dachs, G.U., et al. (2013), Immunohistochemical analysis of cancer stem cell markers in invasive breast carcinoma and associated ductal carcinoma in situ: relationships with markers of tumor hypoxia and microvasculature. *Hum Pathol.*, 44(3):402-11. doi: 10.1016/j.humpath.2012.06.004. Epub 2012 Oct 1.
230. Bi, X., Wu, C., Han, M., & Cai, J. (2012). Correlations of ALDH1 expression with molecular subtypes and ABCG2 in breast cancer. *Gland Surgery*, 1(1), 12–19. <http://doi.org/10.3978/j.issn.2227-684X.2012.03.04>
231. Inwald, E. C., Klinkhammer-Schalke, M., Hofstädter, F., Zeman, F., Koller, M., et al. (2013). Ki-67 is a prognostic parameter in breast cancer patients: results of

- a large population-based cohort of a cancer registry. *Breast Cancer Research and Treatment*, 139(2), 539–552. <http://doi.org/10.1007/s10549-013-2560-8>
232. Di Bonito, M., Collina, F., Cantile, M., Camerlingo, R., Cerrone, M., et al. (2012) Aberrant Expression of Cancer Stem Cells Marker Prominin-1 in Low-Grade Tubulobular Breast Carcinoma: A Correlative Study between qRT-PCR, Flow-Cytometric and Immunohistochemistry Analysis. *Journal of Breast Cancer*, 15(1), 15–23. <http://doi.org/10.4048/jbc.2012.15.1.15>
 233. Wang, J. P., Hu, W. M., Wang, K. S., Yu, J., Luo, B. H., et al. (2013). Expression of C-X-C chemokine receptor types 1/2 in patients with gastric carcinoma: Clinicopathological correlations and significance. *Oncology Letters*, 5(2), 574–582. <http://doi.org/10.3892/ol.2012.1043>
 234. Schmid, M. C., Varner, J. A. (2010). Myeloid Cells in the Tumor Microenvironment: Modulation of Tumor Angiogenesis and Tumor Inflammation. *Journal of Oncology*, 2010, 201026. <http://doi.org/10.1155/2010/201026>
 235. Hollmén, M., Roudnicky, F., Karaman, S., Detmar M. (2015) Characterization of macrophage - cancer cell crosstalk in estrogen receptor positive and triple-negative breast cancer. *Scientific Reports* 5, Article number: 9188 (2015) doi:10.1038/srep09188
 236. Voss, M. J., Möller, M. F., Powe, D. G., Niggemann, B., Zänker, K. S., et al. (2011). Luminal and basal-like breast cancer cells show increased migration induced by hypoxia, mediated by an autocrine mechanism. *BMC Cancer*, 11, 158. <http://doi.org/10.1186/1471-2407-11-158>
 237. Ferrari-Amorotti, G., Chiodoni, C., Shen, F., Cattelani, S., Soliera, A. R., et al. (2014). Suppression of Invasion and Metastasis of Triple-Negative Breast Cancer Lines by Pharmacological or Genetic Inhibition of Slug Activity. *Neoplasia* (New York, N.Y.), 16(12), 1047–1058. <http://doi.org/10.1016/j.neo.2014.10.006>
 238. Rody, A., Karn, T., Liedtke, C., Pusztai, L., Ruckhaeberle, E., et al. (2011). A clinically relevant gene signature in triple negative and basal-like breast cancer. *Breast Cancer Research: BCR*, 13(5), R97. <http://doi.org/10.1186/bcr3035>

8. EKLER

EK-1. Tez Çalışması ile İlgili Etik Kurul İzni



T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

Sayı : 16969557 - 359

ARAŞTIRMA PROJESİ DEĞERLENDİRME RAPORU

Toplantı Tarihi : 18.03.2015 ÇARŞAMBA
Toplantı No : 2015/06
Proje No : GO 15/174 (Değerlendirme Tarihi: 04.03.2015)
Karar No : GO 15/174 - 05

Üniversitemiz Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof.Dr. Sevdâ MÜFTÜOĞLU'nun sorumlu araştırmacısı olduğu, Doç.Dr. Enver VARDAR, Dr. Erdem ÇOMUT, Dr. Çağlar SARIGÜL ve Arş.Gör. Selçuk KORKMAZ ile birlikte çalışacakları Dr. Can İLGİN'in tezi olan GO 15/174 kayıt numaralı ve "*Meme Kanserinin Farklı Moleküler Alt Tiplerinin Kök Hücre İşaretçisi, Sitokin Reseptörü ve Tümörle İlişkili Makrofaj İşaretçisi Dağılımı Açısından Değerlendirilmesi*" başlıklı proje önerisi araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş olup, etik açıdan uygun bulunmuştur.

- | | |
|---|---|
| 1. Prof. Dr. Nurtan Akarsu (Başkan) | 9. Prof. Dr. Rahime Nohutçu (Üye) |
| 2. Prof. Dr. Nüket Örnek Buken (Üye) | İZİNLİ
10. Prof. Dr. R. Köksal Özgül (Üye) |
| 3. Prof. Dr. M. Yılmaz Sara (Üye) | 11. Prof. Dr. Ayşe Lale Doğan (Üye) |
| KATILMADI | İZİNLİ |
| 4. Prof. Dr. Sevdâ F. Müftüoğlu (Üye) | 12. Doç. Dr. S. Kutay Demirkan (Üye) |
| 5. Prof. Dr. Cenk Sökmenşüer (Üye) | İZİNLİ |
| 6. Prof. Dr. Volga Bayrakçı Tunay (Üye) | 13. Prof. Dr. Leyla Dinç (Üye) |
| 7. Prof. Dr. Ali Düzova (Üye) | 14. Prof. Dr. Hatice Doğan Buzoğlu (Üye) |
| 8. Yrd. Doç. Dr. H. Hüsrev Turnagöl (Üye) | 15. Av. Meltem Onurlu (Üye) |

9. ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı, Soyad: Can Ilgın
 Doğum yeri ve tarihi: İstanbul, 19.05.1986
 Uyruğu : Türkiye Cumhuriyeti
 İletişim Adresi: Yücetepe Mahallesi, Emekli Subay Evleri, 85.Cadde, 47A
 Blok, 12/8, Çankaya, Ankara
 Telefonu: +905416083521

II- Eğitim

2012-2017 Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Doktora Programı
 2005-2011 Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi'nden lisans derecesiyle mezuniyet
 1997-2005 İstanbul (Erkek) Lisesi'nden lise diploması

III- Mesleki Deneyim

2012-2017 Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Araştırma Görevlisi
 2011-2012 Tekirdağ Devlet Hastanesi Acil Servisi'nde Pratisyen Hekim

IV- Bilimsel Faaliyetler

Yayınlar (Makale ve kitaplar):

2016 Radiological, stereological, and microscopic evaluation of the quality of canal fillings in oval-shaped root canals prepared with

- self-adjusting file. Uzunoglu E, Ilgın C, Yuruker S, Görduysus M. Scanning. 2016 Sep;38(5):427-433. doi: 10.1002/sca.21289. PMID: 26701128
- 2016 Efficacy of Combined Use of Different Nickel-Titanium Files on Removing Root Canal Filling Materials. Yürüker S, Görduysus M, Küçükkaya S, Uzunoğlu E, Ilgın C, Gülen O, Tuncel B, Görduysus MÖ. J Endod. 2016 Mar;42(3):487-92. doi: 10.1016/j.joen.2015.11.019. PMID: 26778268
- 2016 Histoloji Laboratuvar Yardımcı Kitabı, 4.Baskı, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı , Copyright©, 2016 Hacettepe Üniversitesi. ISBN: 978-975-491-426-9 (Yardımcı yazar)
- 2015 Histology Laboratory Guide Book Second Edition, Hacettepe University Faculty of Medicine Department of Histology and Embryology, Copyright©,2015 by Hacettepe University ISBN: 978-975-491-413-9, Co-author

Projeler:

- 2015- Timpanoskleroz Hastalarına Ait Orta Kulak Mukoza Örneklerinde Morfolojik Bulguların Değerlendirilmesi. Araştırmacılar: Arş.Gör.Dr.Can Ilgın, Uzm.Dr.Volkan Güngör, Prof. Dr. Fevziye Figen Kaymaz
- 2013- Nazal Septum Deviasyonu ve Tek Taraflı Konka Hipertrofisi Nedeniyle Opere Olan Olgularda Konka Rezeksiyon Materyalinde Apoptozis İncelemesi Proje Yöneticisi: Prof. Dr.Taner Yılmaz,

Projeye katılanlar: Prof.Dr.Sevda Müftüoğlu, Arş.Gör.Dr. Onur Ergün, Arş.Gör.Dr.Can Ilgın.

Kongre, sempozyum ve eğitimler:

2016	1st International Cell Death Research Congress (4-7 Mayıs 2016)
2016	THED XIII.Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi (30 Nisan-3 Mayıs 2016)
2014	Hacettepe Üniversitesi Kök Hücre Günü (19 Kasım 2014)
2014	Hacettepe Writing Workshop (1-2 Ekim 2014)
2014	Biyoistatistiksel Çözümleme Kursu (27-30 Mayıs 2014)
2014	THED XII.Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi (27-30 Mayıs)
2014	Deney hayvanları kullanım sertifikası (18.02.2014)