TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

NEOADJUVAN KEMOTERAPİ ALMIŞ MEME KANSERLİ HASTALARDA SERBEST VE MİTOKONDRİYAL DNA DEĞİŞİKLİKLERİ İLE DOLAŞIMDAKİ TÜMÖR HÜCRELERİ VE EPİTELYAL MEZENKİMAL GEÇİŞ İLİŞKİSİ

BETÜL ÇELİK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK

DANIŞMAN
PROF. DR. MUSTAFA AKKİPRİK

İSTANBUL- 2023

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

NEOADJUVAN KEMOTERAPİ ALMIŞ MEME KANSERLİ HASTALARDA SERBEST VE MİTOKONDRİYAL DNA DEĞİŞİKLİKLERİ İLE DOLAŞIMDAKİ TÜMÖR HÜCRELERİ VE EPİTELYAL MEZENKİMAL GEÇİŞ İLİŞKİSİ

BETÜL ÇELİK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK

DANIŞMAN
PROF. DR. MUSTAFA AKKİPRİK

İSTANBUL- 2023

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışması ile elde edilmemiş bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Betül ÇELİK

İmza

TEŞEKKÜR

Öncelikle, yüksek lisans eğitimimin her aşamasında bana yol gösteren, değerli bilgi ve tecrübelerini paylaşan, her daim beni cesaretlendiren, öğrenciliğim süresince gösterdiği sabır, ilgi ve alakadan dolayı sayın danışman hocam Prof. Dr. Mustafa Akkiprik'e,

Akademik tecrübeleri ve manevi desteği ile eğitim sürecime değer katan, özellikle laboratuvar çalışmalarımda kıymetli bilgi ve yardımını esirgemeyen, her türlü kolaylığı sağlayan, kendi zor zamanlarında bile bana destek olan, ilgi, alaka ve anlayışı nedeniyle çok değerli Dr. Öğr. Üyesi İrem Peker Eyüboğlu'na,

Marmara Üniversitesi'ne başladığım günden itibaren kıymetli bilgilerinden istifade ettiğim, maddi manevi bana destek olan, yol gösteren, bana yeni bakış açıları kazandıran çok kıymetli Duygu Bircan Kadıoğlu'na,

Bilimsel desteğinin yanı sıra her anlamda yardımı, emekleri, neşesi ve manevi desteğinden dolayı sevgili Gökçe Güllü Amuran'a,

Özlemle anacağım, tüm yüksek lisans hayatım boyunca bana sevgi ve saygıyla yaklaşan, bana yaşattıkları tecrübeler için bölümdeki hocalarıma ve arkadaşlarıma,

Ve hayatım boyunca her zaman bana destek olup güvenen, bu süreçte daha çok sevgi, ilgi ve alaka gösteren çok kıymetli canım annem ve babama, eğitim hayatımın her türlü zorluğuna ortak olan sevgili aileme sonsuz teşekkür ederim.

Bu tez, Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından TYL-2022-10552 numaralı proje ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY .....

BEYAN .....

TEŞEKKÜR i

KISALTMALAR ve SİMGELER iv

ŞEKİL LİSTESİ ix

TABLO LİSTESİ x

1. ÖZET 1

2. SUMMARY 2

3. GİRİŞ ve AMAÇ 3

4. GENEL BİLGİLER 8

4.1. Meme Kanseri 8

4.1.1. Epidemiyoloji 10

4.1.1.1. Demografi, insidans ve mortalite 10

4.1.1.1. Risk faktörleri 11

4.1.2. Meme Kanseri Alt Tipleri 12

4.1.3. Tarama, Teşhis ve Tedavi 13

4.1.3.1. Tarama 14

4.1.3.2. Teşhis 15

4.1.3.3. Tedavi 15

4.2. Sıvı Biyopsi 16

4.2.1. CTC 18

4.2.2. Dolaşımdaki hücresiz DNA (ccfDNA) 20

4.2.2.1 ccfDNA'nın kökeni 21

4.2.2.2. ccfDNA'nın fiziksel özellikleri 22

4.2.2.3. ccfDNA'nın kullanım alanları 24

4.2.2.4. Onkolojide ccfDNA 25

4.2.2.4.1. Klinik onkolojide ccfDNA'nın faydası 26

4.2.2.4.1.1. Teşhis açısından ccfDNA 27

4.2.2.5. ccfDNA miktarının belirlenmesi 27

4.2.2.5.1. ALU tekrar dizileri 30

4.2.2.5.2. ccfDNA Bütünlüğü 32

4.2.2.6. ccfDNA'nın Temizlenmesi (Klirensi) 33

4.2.3. Dolaşımdaki mitokondriyal DNA (mtDNA) ... 34
4.2.3.1. Onkolojide mtDNA ... 36
4.2.3.2. mtDNA kopya sayısı (mtDNAcn) ... 39
4.2.3.3. mtDNA kopya sayısı hesaplanması ... 41
4.2.3.3.1. mtND1 ve mtND4 ... 41
4.3. Epitelyal Mezenkimal Geçiş (EMT) ... 42
4.3.1. Tümör ilerlemesinde EMT'nin rolü ... 44
5. GEREÇ ve YÖNTEM ... 46
5.1. Kullanılan Cihaz ve Kimyasallar ... 46
5.2. Çalışma Grubunun Belirlenmesi ... 47
5.3. Plazmadan DNA İzolasyonu ... 47
5.4. Eş Zamanlı PZR (RT-PZR) Yöntemiyle ccfDNA seviyesi ve mtDNA kopya sayısı hesaplanması ... 48
5.5. Mutlak ccfDNA Ölçümü ... 51
5.6. ccfDNA ve mtDNA Bütünlük Ölçümü ... 51
5.7. İstatiksel Analiz ... 52
6. BULGULAR ... 53
6.1. Tedavi Öncesi ve Sonrası ccfDNA Miktarı ve Bütünlük İndeksi ... 54
6.2. Tedavi Öncesi ve Sonrası mtDNA Miktarı ve Bütünlük İndeksi ... 57
6.3. Tedavi Öncesi ve Sonrası ccfDNA, mtDNA, CTC, EMT ve ALDH1 Sonuçları ... 61
6.4. ccfDNA seviyesi, mtDNAcn, tedaviye yanıt ve metastaz ilişkisi ... 64
7. TARTIŞMA ... 66
8. KAYNAKLAR ... 80
9. EKLER ... Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
Ek 1: Etik Kurul Onayı ... **Hata! Yer işareti tanımlanmamış.**
10. ÖZGEÇMİŞ ... Hata! Yer işareti tanımlanmamış.

KISALTMALAR ve SİMGELER

A: Adenin

ADH1: Aldehit dehidrogenaz 1

α-katenin: Alfa-katenin

ALU: Arthrobacterluteus

ATP: Adenozin trifosfat

ATPaz: Adenozin trifosfataz

bp: Baz çifti

BRCA1/2: Meme kanseri 1 /2

CA: Kanser Antijeni

CD45: Lökosit ortak antijeni

CEA: Karsinoembriyonik antijen

cfDNA: Cell-free DNA

ccfDNA: Circulating cell-free DNA

cm: santimetre

CNA: Copy Number Alterations

COX1: Sitokrom oksidaz 1

CR: Complete response

CSC: Circulating Stem Cell

Ct: Cycle Treshold

CTC: Circulating Tumor Cell

ctDNA: Circulating tumor DNA

CT: Bilgisayarlı tomografi

CytB: Sitokrom B

Dr: Doktor

DCIS: Duktal karsinoma in situ

Δ: Delta

DNA: Deoksiribonükleik asit

DNaz: Deoksiribonükleaz

E: Epitel

EGF: Epidermal Growth Factor

EMT: Epitelyal mezenkimal geçiş

EMT-TF: EMT- Transkripsiyon faktörü

EpCAM: Epitelyal hücre adezyon molekülü

ER: Östrojen Reseptörü

ETZ: Elektron taşıma zinciri

EV: Ekstraselüler vezikül

FDA: Gıda ve ilaç idaresi

γ-katenin: Gama katenin

HCC: Hepatoselüler karsinom

HER2: İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2

ILC: İnvaziv Lobüler Karsinom

kb: Kilobaz

LCIS: Lobüler karsinoma in situ

LINE1: Uzun serpiştirilmiş nükleer element 1

LT: Liziz Tüpü

M: Mezenkimal

MBC: Metastatik meme kanseri

MET: Mezenkimal epitelyal geçiş

µl: Mikrolitre

ml: Mililitre

M.Ö.: Milattan Önce

MR: Manyetik Rezonans

mtDNA: Mitokondriyal DNA

mtDNAcn: mtDNA kopya sayısı

MUC1: Mucin 1

M.Ü.: Marmara Üniversitesi

NACT/NAC: Neoadjuvan kemoterapi

NADH: Nikotinamid adenin dinükleotit hidrit

NCR: Non-coding region

ND: NADH Dehidrojenaz

nDNA: Nükleer DNA

ng: Nanogram

NGS: Yeni nesil dizileme

N-kadherin: Nöronal kaderin

nm: Nanometre

OXPHOS: Oksidatif fosforilasyon

PALB-2: Partner and Localizer of BRCA2

PD: Progressive response

PDGF: Platelet kaynaklı büyüme faktörü

pH: Potansiyel Hidrojen

PI3Kα: Fosfatidilinositol 3-kinaz alfa

PR: Partial response

PR: Progestron Reseptörü

Prof.: Profesör

PZR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu

qPZR: Kantitatif PZR

RNA: Ribonükleikasit

ROS: Reaktif oksijen türleri

rRNA: Ribozomal RNA

RT-PZR: Gerçek (Eş) zamanlı PZR

SINE: Kısa serpiştirilmiş nükleer element

SNV: Tek nükleotid varyantı

SPSS: The Statistical Package fort he Social Sciences

TFAM: Mitokondriyal transkripsiyon faktör A

TGFβ: Transforming growth factor beta

TNBC: Üçlü negatif meme kanseri

TP53: Tümör protein 53

TWIST1: Twist Family BHLH Transcription Factor 1

WHO: Dünya sağlık örgütü

WT: Yıkama tüpü

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

US-CNB: Ultrasound-Guided Core Needle Biopsy)

UV: Ultraviyole

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1: Meme yapısı 9

Şekil 2: Gen ekspresyon modellerine göre sınıflandırma 13

Şekil 3: Sıvı biyopsi 17

Şekil 4: Sıvı biyopsi uygulamaları 18

Şekil 5: ccfDNA salınım mekanizmaları 22

Şekil 6: Dolaşımda tespit edilebilen tümörlerde ccfDNA kaynakları, tümör evrimi ve genetik değişim türleri 26

Şekil 7: ccfDNA düzeylerini etkileyen kaynaklar, ccfDNA konsantrasyonu ve varyasyonu 29

Şekil 8: İnsan genomundaki tekrarlayan element ailelerinin dağılımı 30

Şekil 9: ALU elementi yapısı 31

Şekil 10: ccfDNA temizlenmesinde görevli organlar 33

Şekil 11: Mitokondriyal genom yapısı 35

Şekil 12: mtDNA kopya sayısı değişiklikleri 38

Şekil 13: mtDNA kopya sayısı 39

Şekil 14: Farklı kan kaynaklı hücrelerde mtDNA kopya sayısı 40

Şekil 15: Meme kanserinde EMT/MET plastisitesi 44

TABLO LİSTESİ

Tablo 1: Meme kanserinin histolojik sınıflandırılması 13
Tablo 2: Çalışmada kullanılan primer dizileri..... 50
Tablo 3: RT-PZR içeriği 51
Tablo 4: RT-PZR program akışı 51
Tablo 5: Meme kanserli hastaların klinik özellikleri 53
Tablo 6: Tedavi öncesi ve sonrası ALU247, ALU115 ve ALU247/115 sonuçları... 54
Tablo 7: Kontrol grubu ALU247, ALU115 ve ALU247/115 sonuçları 55
Tablo 8: NACT öncesi-sonrası ortalama ccfDNA sonuçları 56
Tablo 9: Tedavi öncesi Ct, mtDNAcn, ND1/ND4 ve ND4/ND1 sonuçları..... 57
Tablo 10: Tedavi sonrası Ct, mtDNAcn, ND1/ND4 ve ND4/ND1 sonuçları..... 58
Tablo 11: Kontrol grubu Ct, mtDNAcn, ND1/ND4 ve ND4/ND1 sonuçları 59
Tablo 12: Gruplar arası mtDNAcn, delesyon seviyesi ve bütünlük indeksi ortalamaları 60
Tablo 13: NACT öncesi-sonrası Wilcoxon işaretli sıralar test sonucu 61
Tablo 14: NACT öncesi ve sonrası biyobelirteç sonuçları 62
Tablo 15: Ortalama CTC, EMT ve ALDH1 değerleri 64
Tablo 16: NACT sonrası ccfDNA ve mtDNAcn değişimi, tedavi yanıtı ve metastaz durumu 65

1. ÖZET

Neoadjuvan kemoterapi almış meme kanserli hastalarda serbest ve mitokondriyal DNA değişiklikleri ile dolaşımdaki tümör hücreleri ve epitelyal mezenkimal geçiş ilişkisi

Öğrencinin Adı, Soyadı : Betül ÇELİK
Danışmanın Adı, Soyadı : Mustafa AKKİPRİK
Programın Adı : Tıbbi Biyoloji ve Genetik

Amaç: İnvaziv olmayan bir yöntemle kan biyobelirteçlerinin kullanılması tedavi seçimi için kritik öneme sahiptir. Bu çalışmada, meme kanserli hastalarda NACT öncesi ve sonrası alınan periferik kan örneklerinde plazma ccfDNA, mtDNA kopya sayısı (mtDNAcn) ve bütünlüğündeki değişiklikleri tespit etmek, daha önce aynı hastalardan elde edilen CTC verileri ile karşılaştırıp, bu biyobelirteçlerin EMT ile ilişkisini incelemek amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Hasta ve kontrol grubunun plazmalarından DNA izolasyonu yapılmıştır. ND1, ND4, ALU115, ALU247 ve GAPDH seviyeleri qPCR kullanılarak tespit edilmiştir. ccfDNA, mtDNA kopya sayısı ve bütünlüğündeki değişiklikleri hesaplanmıştır.

Bulgular: Aynı hasta grubunun tedavi öncesi ve sonrası sonuçları karşılaştırıldığında ccfDNA seviyesi tedavi sonrası daha düşükken mtDNA kopya sayısı daha yüksektir. Bu sonuçlar istatiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Tedavi sonrası hastalarda ccfDNA ve mtDNA bütünlüğünde artış olmasına rağmen bu farklılıklar istatiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Bütün gruplar incelendiğinde, ALU115 ve ALU247 seviyeleri kontrole kıyasla hastalarda daha yüksektir. Tedavi sonrası hastaların ccfDNA bütünlüğü kontrollere göre daha düşüktür ve istatiksel olarak anlamlıdır. Tedavi sonrası hastalarda ccfDNA seviyerinde anlamlı artış ve mtDNA kopya sayısında anlamlı azalma belirlenmiştir. Ayrıca, tedavi sonrası hastalarda ccfDNA bütünlüğü ve mtDNA bütünlüğünde azalma olmasına rağmen bu farklılıklar istatiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. ccfDNA seviyesi, mtDNA kopya sayısı, CTC ve EMT arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır.

Sonuç: ALU247, ALU115, mtDNAcn, mtDNA ve ccfDNA integritesi, meme kanserinin erken teşhisi için ideal biyobelirteçlerdir. Dolayısıyla tümörün erken aşamasında kanser taraması için plazma CTC'leriyle birlikte kullanılabilirler. Bu parametrelerin klinik faydasını belirlemek için çok sayıda sıralı örnek ve uzun takip süresi kullanılarak büyük ölçekli prospektif çalışmalar önerilmektedir.

Anahtar kelimeler: Meme kanseri, ccfDNA, mtDNA, neoadjuvan tedavi, EMT

2. SUMMARY

Free and mitochondrial DNA changes and their relation with circulating tumor cells and epithelial-mesenchymal transition in breast cancer patients receiving who neoadjuvant chemotherapy

Student Name, Surname: Betül ÇELİK
Supervisor Name: Prof. Dr. Mustafa AKKİPRİK
Program Name: Medical Biology and Genetics

Objective: Using of blood biomarkers with non-invasive method is critical for treatment selection. In this study, we were aimed to detect changes in plasma ccfDNA, mtDNA copy number (mtDNAcn) and integrity in peripheral blood samples before and after NACT in patients with breast cancer, compare them with CTC data obtained from the same patients, and examine relationship with EMT.

Material and Methods: DNA was extracted from the plasmas of patient and control grup. ND1, ND4, ALU115, ALU247 and GAPDH levels were detected by qPCR. Changes in ccfDNA, mtDNAcn and integrity were calculated.

Results: When the results of the same patient group before and after treatment are compared, ccfDNA level was lower after treatment, while mtDNAcn was higher. These results were found to significant. There wasn't significance increase in ccfDNA and mtDNA integrity in patients after treatment.

When all groups were examined, ALU115 and ALU247 levels were higher in patients compared to controls. After treatment, patients were significantly lower ccfDNA integrity than controls. A significant increase in ccfDNA levels and a significant decrease in mtDNAcn were determined in patients after treatment. Furthermore, there wasn't significantly a decrease integrity in patients after treatment. No significant correlation was found between ccfDNA level, mtDNAcn, CTC and EMT.

Conclusion: ALU247, ALU115, mtDNAcn and integrity are ideal biomarkers for early detection of breast cancer. Therefore, they can be used with plasma CTCs for cancer screening at early stage of tumor. Large-scale prospective studies using large numbers of sequential samples and long follow-up are recommended to determine clinical utility of these parameters.

Keywords: Breast cancer, ccfDNA, mtDNA, neoadjuvant therapy, EMT

3. GİRİŞ ve AMAÇ

Meme kanseri dünya çapında kadınlarda en sık görülen kanserdir ve kadınlar arasında kansere bağlı ölümlerin ikinci en yaygın nedenidir (Al-Bashaireh ve ark., 2021). Normal hücrelerin kontrolsüz olarak kendini yenilemesi, büyümesi, transformasyonu ve metastaza yol açan çoklu moleküler değişiklikler kansere neden olmaktadır (Theil ve ark., 2020).

Metastatik meme kanseri endokrin, sitotoksik veya biyolojik tedavilerin seri uygulanması yoluyla tedavi edilebilir. Kanserin erken teşhisi ve metastazın doğru tanımlanması meme kanseri tedavisindeki iyileşme, meme kanserli kadınların hayatta kalma oranlarını önemli ölçüde artırmıştır. Kansere bağlı ölümlerin çoğu (yaklaşık %90), birincil kanserden ziyade metastatik hastalık tarafından indüklenir. Her kanser hastasında kanserin erken tespiti ve ardından invaziv olmayan tümör profili oluşturma ve izleme adımları gerçekleştirilmelidir. Etkisiz tedavilerin sürdürülmesinden kaçınmak, gereksiz yan etkileri önlemek ve yeni terapötiklerin yararını belirlemek için tedavi yanıtının izlenmesi esastır (Dawson ve ark., 2013; Al-Bashaireh ve ark., 2021; Theil ve ark., 2020).

Biyopsi kullanılarak bir tümörün teşhisi ve sınıflandırılması çok önemlidir. Ancak metastazın olduğu yer bazen biyopsiye engel olmaktadır (Gambardella ve ark., 2022). Son birkaç yılda elde edilen bulgular, DNA, mRNA ve mikroRNA gibi periferik kanda dolaşan nükleik asitlerin meme kanseri teşhisinde, prognozunda ve antikanser tedavisine yanıtın izlenmesinde potansiyel kullanımının altını çizmiştir (Hamam ve ark., 2017).

Meme kanserinin altında yatan genetik mekanizmalar hakkındaki genişleyen bilgimiz, artık hastaları daha iyi sınıflandırmak için bir çerçeve sunmaktadır. Dolaşan tümör DNA'sının analizi, bu bilgiyi klinik alana entegre etmek için eşsiz bir fırsatı temsil eder. Tümör dokusu örneklerinin alınması önemli olmaya devam edecek olsa da, bu tür materyaller tümör heterojenliğini yakalayamayacağından biyopsi örneklerinin kullanımı sınırlıdır; ek olarak, tekrarlanan biyopsi pratik değildir.

Ayrıca, tedavi sırasında hassas ve spesifik seri örnekleme yapılmasına izin veren "sıvı biyopsi" uygulaması önemli bir alternatif yöntemdir (Dawson ve ark., 2013).

Sıvı biyopsi olarak nitelendirdiğimiz dolaşımdaki tümör hücreleri (CTC'ler), hücre dışı serbest DNA'lar (cfDNA'lar) ve mitokondriyal DNA (mtDNA) seviyelerindeki değişiklikler plazma ve serumda kanser biyobelirteçleri olarak büyük ilgi görmüştür.

Plazma ve serumun yanı sıra; idrar, tükürük, beyin omurilik sıvısı ve anne sütü gibi vücut sıvılarındaki moleküler biyobelirteçleri saptamak için minimal invaziv bir araçtır. Bu araç, bireysel bir kanser hastasında tümör dinamiklerinin gerçek zamanlı takibi için bir pencere sağlar. Bir doku biyopsisi elde etmek, tanının temel dayanağı olmaya devam etsede, sıvı biyopsi, çeşitli avantajları nedeniyle sınırlayıcı katı biyopsi yaklaşımlarına bir alternatif olarak görünmektedir: tümör ilerlemesinin takibi, tedaviye yanıt, metastaz ve hastalık nüksü için sıralı örneklemeye izin verir (Junqueira-Neto ve ark, 2019).

Metastatik potansiyel kazanabilen tümör hücreleri, kan dolaşımı veya lenfatik sistem yoluyla birincil tümörden uzaklaşır. Dolaşan tümör hücrelerinin sayımı umut verici bir biyobelirteç olarak ortaya çıkmıştır (Dawson ve ark., 2013). Hem metastatik hem de erken evre meme kanserinde CTC'lerin varlığı, kötü prognozun bağımsız bir prognostik belirteci olarak kabul edilir. Periferik kanda sayıca miktarları az olmasına rağmen, genellikle tanımlanabilir oldukları tümöre özgü genetik imzalara sahiptirler ve izolasyonları için çeşitli yöntemler geliştirilmiştir (Katopodis ve ark., 2021). CTC'lerin heterojen olduğu ve metastazlara neden olan hücre popülasyonunu içerdikleri öne sürülmüştür (Papadaki ve ark., 2014). CTC'ler, tedavi yanıtlarının gerçek zamanlı izlenmesi için metastatik hastalığa kapsamlı bir pencere olarak hizmet edebilir (Theil ve ark., 2020). Bu nedenle, tek hücre düzeyinde CTC'lerin daha fazla karakterizasyonu ve diğer sıvı biyopsi markerları ile ilişkisi, bireysel biyolojik rollerini anlamak için son derece önemli olacaktır.

cfDNA, insan dolaşım sisteminde ilk keşfedildiğinde önemsiz gibi görünse de, araştırmacılar sağlıklı ve hastalıklı bireylerde cfDNA'nın özellikleri arasındaki farklılıkları gözlemlediğinde klinik önemi anlaşılmıştır (Bronkhorst ve ark., 2019). Onkolojik hastalarda, cfDNA'nın büyük kısmı, tümör hücrelerinin apoptozu veya

nekrozu yoluyla salınır (Szilágyi ve ark., 2020). cfDNA'lar kanserin erken teşhisi, tedavi için sağlıklı ve risk altındaki hasta gruplarını taramanın yanı sıra; evreleme ve prognoz, tümör lokalizasyonu, başlangıç terapi belirlemesi, lokal yada sistemik tedavi yanıtının izlenmesi, kazanılmış direnç mekanizmalarının tanımlanması, nüksün izlenmesi dahil olmak üzere onkolojide çoklu endikasyonlar için biyobelirteçtir (Bronkhorst ve ark., 2019).

Kanserde cfDNA sadece tümör hücrelerinden kaynaklanmaz. Tümör mikro çevresindeki hücrelerin yanı sıra vücudun çeşitli bölgelerindeki diğer kanser dışı hücrelerden (örneğin endotelyal ve bağışıklık hücreleri) de kaynaklanır. Tek bir kan örneğinde bulunan cfDNA profili, çevresel faktörler altında farklı mekanizmalar, doku ve organlardan çeşitli hücreler tarafından salınan hem "wild tip" hem de genetik ve epigenetik olarak değiştirilmiş DNA parçalarının bir karışımını içerir. Görünüşe göre tüm hücreler, hücreye özgü DNA'yı hücre dışı ortama sürekli olarak salma yeteneğine sahiptir. Buradaki önemli bir nokta, tümör mikro çevre hücrelerinde ve diğer sağlıklı hücrelerde cfDNA konsantrasyonu ile tümör kaynaklı DNA konsantrasyonunun bireyler arasında önemli ölçüde farklılık göstermesidir.

Mitokondri, enerji üretiminde, hücre proliferasyonunda ve apoptozda merkezi bir rol oynayan ökaryotik hücre organelidir. Meme karsinogenezinde önemli bir rol oynayan hücre içi reaktif oksijen türlerinin (ROS) ana kaynağı ve hedefidir (Tyagarajan ve ark., 2013). Kanser hastalarının tanısal ve prognostik değerini artırmaya yönelik son gelişmeler, kendine özgü ve benzersiz özellikleri nedeniyle dolaşımdaki mitokondri genomunu da hedef almıştır. Dolaşan mitokondri DNA'sının kısa uzunluğa, nispeten basit moleküler yapıya ve yüksek kopya sayısına sahip olduğu bilinmektedir. mtDNA kopya sayısı hücre tipine göre farklılık gösterse de, aynı birey içindeki farklı hücre tiplerinde mtDNA'nın kopya sayısı arasında iyi bir korelasyon olduğu gözlemlenmiştir. Bu özellikler, sıvı biyopsi işleviyle birlikte çeşitli katı tümör formlarının teşhisi için kolay erişilebilir, invaziv olmayan biyobelirteç olmasını sağlar. Periferik kandaki mtDNA kopya sayısı ve meme kanseri riski arasındaki tutarsız ilişki ile birlikte, meme kanserinin kendisinin periferik kanda gözlenen mtDNA düzeylerini değiştirebileceğini ve ileriye dönük çalışma tasarımlarına olan ihtiyacı vurgulamaktadır.

Günümüzde meme kanseri tedavisi cerrahi, radyoterapi ve sistemik tedavi ile multimodalite yaklaşımını içermektedir. Neoadjuvan kemoterapi (NACT), ileri evredeki hastalar için ideal tedavi yöntemi olmuştur. Meme koruyucu cerrahi mümkün değilse neoadjuvan tedavi yöntemi kullanılabilir. Lokal ileri meme kanserli hastalar için bir bakım standardı haline gelmiştir. NACT, tümör yanıtının gerçek zamanlı izlenmesi ve ilaç etkinliğinin değerlendirilmesi için benzersiz bir fırsat sağlar. İkinci olarak, tümörlerin evresini azaltabilir ve böylece meme koruyucu cerrahi şansını artırabilir (Magbanua ve ark., 2021). Yakın zamanda bildirilen bir meta-analizde, NACT öncesi CTC pozitifliği daha büyük bir tümör boyutu ile ilişkilendirilmiştir. Tedaviden sonra CTC'lerin kaybolması yanıt ve duyarlılık ile ilişkilendirilmiştir. Bu nedenle, tedavi öncesi CTC'ler, tedavinin etkileriyle fenotiplerini farklılaştırabilir ve değiştirebilir veya uyku halinde geçebilir, kendi kendine birincil tümör bölgesine dönebilir veya nüks gelişimi için başka bir yere yayılmış olabilirler (Akkiprik ve ark., 2020).

Gerek sağlıklı hücrelerin canlılığın devamı için gerek kanser hücrelerinin izlenebilmesi ve yukarıda bahsedilen kritik önemine rağmen, bugüne kadar yapılan çalışmalarda mitokondriyal kopysa sayısı değişiklikleri ile ilgili yeterli çalışma bulunmamaktadır. Şu zamana kadar olan çalışmalarda çelişkili sonuçlar sunulduğu tespit edilmiştir. Bu çalışma ile mtDNA'nın, hem meme kanserinde kopya sayısı değişikliği, hem diğer biyolojik belirteçlerle karşılaştırılabiliyor olması hem de EMT ile ilişkisine yönelik katkı sağlayacaktır.

Hastalığın erken evrede teşhisi, tedavinin gerçek zamanlı izlenmesi ve yönlendirilmesi, sağkalımı uzatmak, semptomları hafifletmek ve hastalığın ilerlemesini geciktirmek klinik onkolojide önemli noktalardır. Bu çalışma ile neoadjuvan kemoterapi öncesi ve sonrası plazma ccfDNA ve mtDNA seviyelerindeki değişiklerin incelenmesi ile seçilen tedavinin etkinliği, söz konusu biyolojik belirteçlerin bunu kliniğe yansıtabilme gücü, klinik önem arz edecektir.

İncelenen araştırmalarda, başta metastaz üzerindeki önemli işlevleri olmak üzere insan kanserlerinde yer aldıkları konum ile ccfDNA ve mtDNA; çoklu belirteçler ve dolaşımdaki tümör hücrelernin epidermal-mezenkimal geçiş ile ilişkisinin

incelenmesine yönelik bir araştırma olmaması hastalık teşhisi, seyri ve tedavisi için klinik çalışmalara bir katkısı olacaktır.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Meme Kanseri

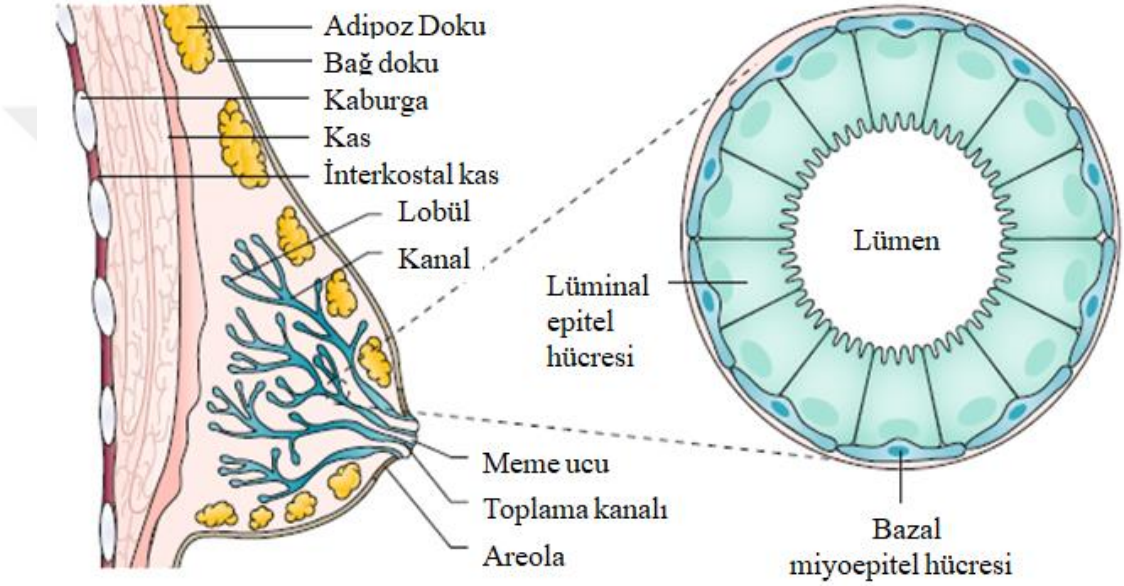
Kanser, dünya genelinde sıklıkla karşılaşılan, tedavi edilmediği takdirde ölümle sonuçlanabilecek hücrelerin kontrolsüz büyümesi ve yayılması ile karakterize bir hastalık grubudur (Society, 2022). Kanser, tarih boyunca bilinen bir terimdir. M.Ö. 400'lü yıllarda Hipokrat kanseri ilk olarak, vücutta değişik şişlik, ağrı ve kızarıklık meydana getiren hastalığa; yengeç ısırığındaki ağrıya benzetildiği için yunanca yengeç anlamına gelen 'karkinos' terimi ile tanımlamıştır. Yunanca'da kütle ya da yük anlamına gelen onkos sözcüğü de zaman zaman kanseri açıklamada kullanılan bir terimdir. Kanser de vücudun taşımak zorunda kaldığı bir yük olduğunun düşünülmesinden ötürü kullanılan bu terim daha sonraları onkoloji olarak bildiğimiz disipline de adını vermiştir (Mukherjee, 2010). Sonra ki dönemlerde Romalı tıp doktoru Celsus, Latince yengeç anlamına gelen 'cancer' terimini kullanmıştır (Tetikoğlu, 2020).

Genel anlamda kanser, bazı hücrelerin kontrollü olarak gerçekleştirilen hücre bölünmesi sürecinden çıkarak kontrolsüz büyüme ve köken aldıkları dokulardan başka yerlere göç ederek invaze olmaları ve böylece dokularda işleyişi bozmasıyla tanımlanan bir hastalıktır (Tetikoğlu, 2020). Büyüme ve ölüm gibi süreçleri normal hücreler belli sinyaller ile gerçekleştirirken, kanser hücreleri bu sinyallerden kaçarak kontrolsüz olarak çoğalır.

M.Ö. 27. yüzyılda yaşayan Mısırlı hekim İmhotep'e ait olan ders kitabı niteliğindeki bir papirüs incelendiğinde, açıklanan vakalardan birinde şöyle bir tavsiyede bulunmuştur: "Memede kabarık kitlelerin bulunduğu bir vakayı incelerken, bu kitlelerin memenin her tarafına yayılmış olduğunu fark ederseniz; elinizi memenin üzerine koyduğunuzda serinse ve dokunduğunuzda herhangi bir ateş emaresi yoksa, şişlikler pütürsüz, kuru oldukları ve herhangi bir akıntıya yol açmadıkları halde dokununca tümsekleri hissedebiliyorsanız, onunla ilgili olarak demelisiniz ki: 'Üstesinden gelmek zorunda olduğum şey, şişmiş kitlelerdir… Memede yer alan kabarık tümörler, memedeki büyük, geniş ve sert şişliklerin varlığını gösterir. Bunlara dokunmak, bir sargı yumağına dokunmak gibidir. Onları olgunlaşmamış hemat meyvesiyle de karşılaştırmak mümkündür; sert ve soğuk gelir elinize.' " Papirüste yer alan bütün vakaların tedaviyle ilgili

kısa bir değerlendirmesi bulunurken, kanser için “Tedavisi yok” şeklinde tek bir cümleye yer verilmiş (Mukherjee, 2010).

Meme kanseri, memenin glandüler dokusundaki kanalların veya lobüllerinin epitel hücrelerinde ortaya çıkar (Şekil 1). Başlangıçta kanserli büyüme, genellikle hiç bir belirtiye neden olmadığı gibi yayılma (metastaz) için minimum potansiyele sahip olduğu kanal veya lobül ile sınırlıdır (http://www.who.int, Erişim tarihi:18 Ekim 2022).



Şekil 1: Meme yapısı (Harbeck ve ark., 2019'den değiştirilerek kullanılmıştır.)

Zamanla, bu başlangıç evresindeki kanserler ilerleyebilir ve çevreleyen meme dokusunu istila edebilir (invaziv meme kanseri), ardından yakındaki lenf düğümlerine (bölgesel metastaz) veya vücuttaki diğer organlara yayılabilir (uzak metastaz) (http://www.who.int, Erişim tarihi:18 Ekim 2022). Kansere bağlı ölümlerin %90’ı metastazdan kaynaklanmaktadır (Tetikoğlu, 2020; Theil ve ark., 2020). Sağlık bakanlığı verilerine göre Türkiye'deki en ölümcül ve en sık görülen kadın kanser türüdür (Zihni ve ark., 2022).

4.1.1. Epidemiyoloji

4.1.1.1. Demografi, insidans ve mortalite

Dünya sağlık örgütü (WHO) verilerine göre, 2018 yılında dünya genelinde 9 555 027 kişi, ki bu rakamın yaklaşık %22,4'ünü ülkemizin de içinde bulunduğu Avrupa bölgesindeki ölümler oluşturmaktadır, kanser sebebiyle hayatını kaybetmiştir. 2020 verilerinde ise kardiyovasküler hastalıklardan (17,9 milyon ölüm) sonra ikinci en sık ölüm sebebinin kanser olduğu bildirilmiştir (http://www.who.int, Erişim tarihi: 18 Ekim 2022).

Kanser tipleri cinsiyete göre farklı sıklıklarda görülmesine rağmen meme kanseri kadınlarda en sık rastlanan (Al-Bashaireh ve ark., 2021; Rothé ve ark., 2014; Theil ve ark., 2020; Waks ve Winer, 2019) ve akciğer kanserinden sonra en yüksek mortaliteye sahip kanser türüdür.

İnsidans dünya çapında farklılık gösterir, yüksek gelirli bölgelerde (Kuzey Amerika) daha düşük gelirli bölgelerden (Orta Afrika ve Doğu Asya) daha yüksek insidans vardır (Harbeck ve ark., 2019). Buna karşın meme kanserinden ölüm oranlarının gelişmiş ülkelerde daha düşük olması tarama ve tedavideki gelişmelerin önemine dikkat çekmektedir (İnce-Ergüç ve Orhan Gürer, 2019).

2018'de dünya çapında 2 milyondan fazla yeni vaka ile kadın onkoloji birimlerinin en tepesinde yer almıştır (Panagopoulou ve ark., 2021). Dünya genelinde meme kanseri teşhisi konan 2,3 milyon kadın ve 685 000 ölüm vardır. 2020'nin sonu itibariyle, son 5 yılda meme kanseri teşhisi konan 7,8 milyon kadın hayatta kalmıştır ve bu da onu dünyanın en yaygın kanseri haline getirmiştir (https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/breast-cancer, Erişim tarihi: 21 Ekim 2022).

Ülkemizde ise görülme sıklığı açısından %10,6'lık bir oranı ile ikinci sırada yer alırken, %4,7'lik bir oran ile kanser ölümleri (116 710 kişi) arasında dördüncü sırada yer alır (http://www.who.int, Erişim tarihi: 18 Ekim 2022).

4.1.1.1. Risk faktörleri

Kadın cinsiyet, en güçlü meme kanseri risk faktörüdür (Society, 2022). Meme kanserlerinin yaklaşık %0,5-1'i erkeklerde görülür. Yaş artışı ile birlikte hücrelerde anormal değişiklikler olma ihtimalinin artması, cinsiyet kadar önemli bir risk faktörüdür. Meme kanserli kadınların yaş aralığı 55-65'dir (https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/breast-cancer, Erişim tarihi: 21 Ekim 2022).

Ailede meme kanseri öyküsü meme kanseri riskini artırır, ancak meme kanseri teşhisi konan kadınların çoğunun bilinen bir aile öyküsü yoktur. Bilinen bir aile öyküsünün olmaması, mutlaka bir kadının düşük risk altında olduğu anlamına gelmez.

Bazı kalıtsal "yüksek penetrasyonlu" gen mutasyonları meme kanseri riskini büyük ölçüde artırır, en baskın olanı BRCA1, BRCA2 ve PALB-2 genlerindeki mutasyonlardır (https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/breast-cancer, Erişim tarihi: 21 Ekim 2022).

Riski artıran değiştirilemeyen diğer faktörler arasında; 30 yaşından önce göğse yüksek doz radyasyon alımı; uzun bir adet öyküsü (erken başlayan ve/veya geç biten adet dönemleri); çocuk sahibi olmamak veya 30 yaşından sonra çocuk sahibi olmak bunlar arasında sayılabilir (Society, 2022).

Dünya çapında meme kanserlerinin ~%20'sinin obezite, fiziksel hareketsizlik ve alkol kullanımı gibi değiştirilebilir risk faktörlerine atfedilebileceği ve sağlıklı bir yaşam tarzını teşvik ederek hastalık yükünü azaltma potansiyeli sunduğu tahmin edilmektedir (Harbeck ve ark., 2019).

Ne yazık ki, potansiyel olarak değiştirilebilir risk faktörlerinin tümü kontrol altına alınabilse bile, bu meme kanseri gelişme riskini en fazla %30 oranında azaltacaktır (https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/breast-cancer, Erişim tarihi: 21 Ekim 2022).

4.1.2. Meme Kanseri Alt Tipleri

Meme tümörleri; morfolojik, klinik, hormon reseptör düzeyi ve tedaviye yanıtlarına göre farklı özelliklere sahip tümörlerdir. Histolojik ve gen ekspresyon modellerine göre farklı alt gruplara ayrılır.

Histolojik olarak, preinvaziv ve invaziv olmak üzere iki gruba ayrılır. Preinvaziv grup; duktal karsinoma in situ (DCIS) ve lobüler karsinoma in situ (LCIS)'den, invaziv grup ise invaziv duktal karsinom (NST) ve lobüler karsinom (ILC)'dan oluşur (Harbeck ve ark., 2019) (Tablo 1).

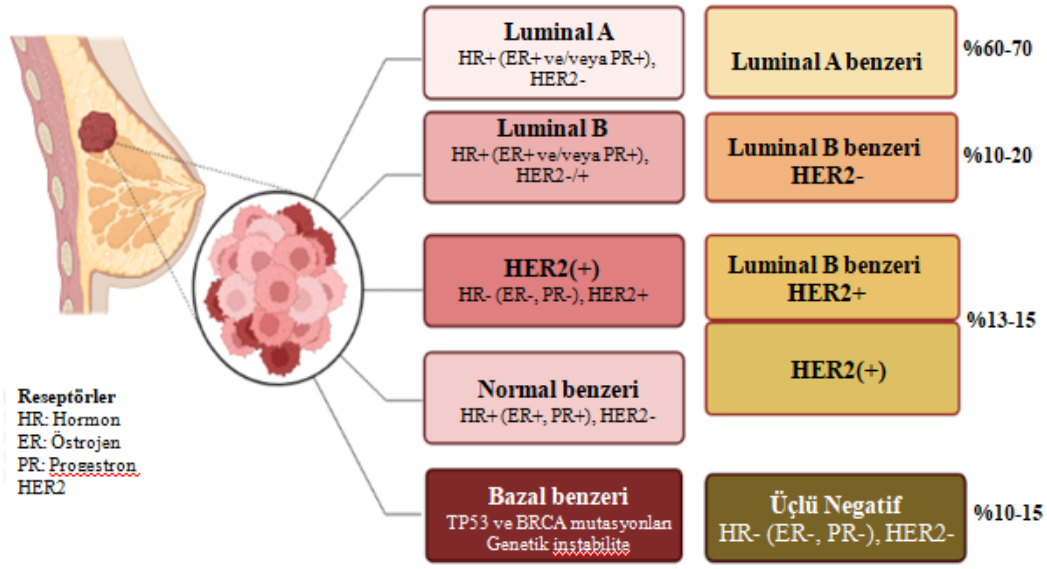
En yaygın meme kanseri histolojisi, invaziv duktal karsinomdur (hastaların %50-75'i), ardından invaziv lobüler karsinom (hastaların %5-15'i), duktal/lobüler karsinomlar ve diğer nadir histolojiler meme kanserinin geri kalanını oluşturur (Waks ve Winer, 2019).

Gen ekspresyon paternlerine göre, Luminal A, Luminal B, HER2(+), bazal benzeri ve normal meme benzeri olarak 5 tipe ayrılmaktadır (Harbeck ve ark., 2019) (Şekil 2). Östrojen reseptörü taşıyan karsinomlar luminal tiple ilişkili olup, antiöstrojen tedaviden yüksek oranda yarar görmektedir. Luminal A, diğer tümör tiplerine göre büyüme hızları yavaştır ve daha az agresiftirler. Hormon reseptör ekspresyonu bulunması tedavide hedef olabileceğinden tüm alt tipler arasında en iyi prognoza sahip tiptir (İnce-Ergüç ve Orhan Gürer, 2019). En kötü prognozlu grup ise östrojen reseptör ekspresyonu olmayan HER2(+) ve bazal benzeri meme karsinomlarıdır. HER2 ekspresyonu yüksek olan bu tipte hormon reseptörleri eksprese edilmemektedir. Bu tip kanserler bazal benzeri kanserler gibi agresif büyüme ve yayılma özelliği gösterirler. Kısa vadede prognozu luminal kanserlere göre daha kötü fakat üçlü negatif kanserlere göre daha iyidir (İnce-Ergüç ve Orhan Gürer, 2019).

Üçlü negatif meme kanseri, ER-, PR-, HER2- olan bu tümörler agresif ve invaziv özelliktedir. Hormonal tedaviye yanıt vermedikleri ve hedeflenen bir tedavi yaklaşımı bulunmadığı için kötü bir prognoza sahiptirler (İnce-Ergüç & Orhan Gürer, 2019). Evre I üçlü negatif tümörler için 5 yıllık meme kanserine özgü sağkalım oranı %85 iken hormon reseptörü pozitif ve HER2 pozitif için %94 ila %99'dur (Waks ve Winer, 2019).

Tablo 1: Meme kanserinin histolojik sınıflandırılması

Histolojik Sınıflandırma	
Preinvaziv	**İnvaziv**
Duktal karsinoma İn situ • Kanallar boyunca yayılır • Kanal mimarisini bozar • İnvaziv kanserle ilerleyebilir • Tek taraflı (Unilateral)	**İnvaziv duktal karsinoma** • DCIS'den gelişir • Lenfatik ve kan yoluyla metastaz yapar
Lobüler karsinoma in situ • Kanal mimarisini bozmaz • Bilateral olabilir • Öncülden ziyade risk faktörüdür	**Lobüler karsinom** • Tercihen iç organlar aracılığıyla metastaz yapar



Şekil 2: Gen ekspresyon modellerine göre sınıflandırma (Harbeck ve ark., 2019'den değiştirilerek kullanılmıştır.)

4.1.3. Tarama, Teşhis ve Tedavi

Meme kanseri, değişken ilerleme gösteren heterojen bir hastalıktır, ilaç direnci ve metastaz ise hayatta kalma oranlarını büyük ölçüde azaltır. Mevcut tanı/izleme yöntemleri mamografi, ultrason, tru-cut biyopsi ve MRI/CT taramasını içerir. Bu tekniklerin çeşitli dezavantajları vardır (Örneğin, tüm hastalar için uygun değildir,

düşük duyarlılık ve özgüllük, invaziv ve pahalı olması) (Panagopoulou ve ark., 2021).

4.1.3.1. Tarama

Mamografi, erken meme kanserini tespit etmede ve mortaliteyi azaltmada etkili olduğu kanıtlanmış tek tarama aracıdır. Ancak mamografi ve ultrason destekli çekirdek iğne biyopsisi (US-CNB) sınırlamaları artmıştır (Peled ve ark., 2020). Mamografi ile popülasyon taraması, etkili tedaviyi sağlamak için hastalığı erken bir aşamada tespit etmeyi amaçlayan bir stratejidir. Mamografi taramasının etkinliği yaşa bağlıdır ve en çok 50-69 yaş arasındaki kadınlarda etkindir ve bu aralığın dışında kalanlarda daha az yarar sağladığı belirtilmiştir (Harbeck ve ark., 2019).

Tomosentez, kontrastlı mamografi ve gama görüntüleme gibi gelişmekte olan teknolojiler, mamografiye eklendiğinde gözlemsel çalışmalarda kanser tespit oranlarını geliştirdiğini göstermiştirdir. Şu anda, bu yeni teknolojilerin yalnızca mamografi ile elde edilen tarama faydasını artırdığına dair ikna edici bir kanıt yoktur (Harbeck ve ark., 2019).

Tümör boyutu, lenf nodu ve hastanın nüks riski sınıflandırmak için özellikle östrojen reseptörü (ER), progestron reseptörü (PR), Her2/neu ve Ki67 için çeşitli immünolojik belirteçler kullanılır (Lehner ve ark., 2013). Tedavi izleme veya erken nüks tespiti için sıklıkla kullanılan geleneksel serum tümör belirteçleri; kanser antijeni 15-3 (CA 15-3) ve karsinoembriyonik antijen (CEA) kullanılmaktadır. Bu belirteçlerin kullanılmasıyla ilgili başlıca sorunlar, özellikle erken veya lokalize hastalıkta duyarlılık ve özgüllük eksikliğidir (Tan ve ark., 2018). Neoadjuvan kemoterapi alan hastalarda tedavi yanıtının erken tahminindeki faydaları hala belirsizdir (Lehner ve ark., 2013).

Teşhis konulan hastalarda çok sayıda biyopsi, tedavi yanıtının değerlendirilmesi ve hastalık nüksünün erken tespiti için daha verimli takipini sağlayan yöntemelere ihtiyaç vardır. Bunun yanı sıra, yanlış negatif biyopsilerin olumsuz sonuçlarını azaltmak için tembel ve yaşamı tehdit eden hastalık arasında kritik bir ayrım yapılmasını sağlayacak yeni belirteçlere acilen ihtiyaç vardır (Peled ve ark., 2020).

4.1.3.2. Teşhis

Meme kanseri teşhisi klinik muayene, görüntüleme (genellikle mamografi ve/veya ultrasonografi) ve iğne biyopsisinden oluşan üçlü bir teste dayanır.

Ultrasonografi, genç kadınlarda ilk görüntüleme yöntemi olarak lokalize semptomları değerlendirmek, ekran tarafından saptanan anormallikleri tanımlamak ve karakterize etmek için neredeyse evrensel olarak kullanılmaktadır (Harbeck ve ark., 2019).

Kanser hastalarının kanındaki yüksek dolaşımdaki hücresiz DNA (cfDNA) seviyeleri ilk olarak Leon ve ark. 1977 yılında gösterdi. Bu çalışma, kanserde moleküler bir belirteç olarak dolaşımdaki nükleik asitlerin klinik potansiyelini ilk keşfeden çalışma olduğu için tanısal tıpta bir kilometre taşıydı. Kolay plazma ve serum DNA erişilebilirliği, tespit ve takip bakımına yönelik invaziv olmayan yaklaşımlar gibi çekici metodolojilere yol açmıştır. Birçok çalışma, Leon ve arkadaşlarının, BC hastaları da dahil olmak üzere, malignitesi olan hastalarda yüksek cfDNA seviyeleri bulduğu ilk gözlemini doğruladı (Peled ve ark., 2020).

4.1.3.3. Tedavi

Meme kanseri tedavisi hem lokal hem de sistemik hastalık grubunda yer aldığı için tedavisi de cerrahi, radyoterapi ve kan yoluyla tüm vücudu etkileyen kemoterapiden oluşan multimodalite yaklaşımı içermektedir. Tedavi ile oluşan komplikasyonlara karşı hastaya kaliteli yaşam sunmak amaçlanır.

Adjuvan kemoterapi, cerrahi tedaviden sonra kanser hücrelerini yok etmek amacıyla uygulanan sitotoksik kemoterapi olarak tanımlanmaktadır (Mutlu ve ark., 2013). Neoadjuvan kemoterapi (NACT), sistemik tedaviyle birlikte tümör küçülmesini sağlayarak cerrahi sonuçların iyileşmesi sağlanır. Lokal olarak ileri evre (evre III hastalığı, T3 veya T4 lezyon olanlar) meme kanseri hastaları, neoadjuvan tedavi için ideal bireylerdir (Chopra ve Davies, 2019). Bu hastalar genellikle meme koruyucu cerrahi için aday değildir. Erken evre meme kanseri (evre 1 veya 2) olan hastalar, meme koruyucu cerrahi mümkün değilse neoadjuvan tedavi için uygun olabilir (Akkiprik ve ark., 2020). NACT, ilaç etkinliğinin değerlendirilmesi için fırsat sağlar. Tümörün evresini azaltabilir ve böylece koruyucu cerrahi şansını artırabilir (Ma ve ark., 2020; Magbanua ve ark., 2021).

Erken evrede meme kanseri nispeten tedavi edilebilirken, metastaz sıklıkla hastanın ölümüyle sona erer. Uygun tedaviye karar vermek kolay bir adım olmasa da, tümörün moleküler alt tipini göz önünde bulundurmak gerekir (Theil ve ark., 2020).

Metastatik olmayan meme kanseri için sistemik tedavi alt tipe göre, hormon reseptörü pozitif tümörleri olan hastalar endokrin tedavisi alır ve bir kısım da kemoterapi alır; HER2 pozitif tümörleri olan hastalar, kemoterapi ile birlikte HER2 hedefli antikor veya küçük moleküllü inhibitör tedavisi alır; ve üçlü negatif tümörleri olan hastalar sadece kemoterapi alırlar (Waks ve Winer, 2019).

Metastatik olmayan meme kanserli tüm hastalar için lokal tedavi, lumpektomi yapılırsa postoperatif radyasyon dikkate alınarak cerrahi rezeksiyondan oluşur. Bazı sistemik tedaviler ise ameliyattan önce giderek artan bir şekilde verilmektedir. Metastatik meme kanseri, yaşamı uzatma ve semptomları hafifletmeye yönelik olarak alt tipine göre tedavi edilir (Waks ve Winer, 2019).

Anti-tümör tedavileri hastalar için uzun ve kapsamlıdır. Kanserin erken tespiti ve invaziv olmayan tümör profili oluşturmak için biyobelirteçlere yönelik karşılanmamış klinik bir ihtiyaç vardır.

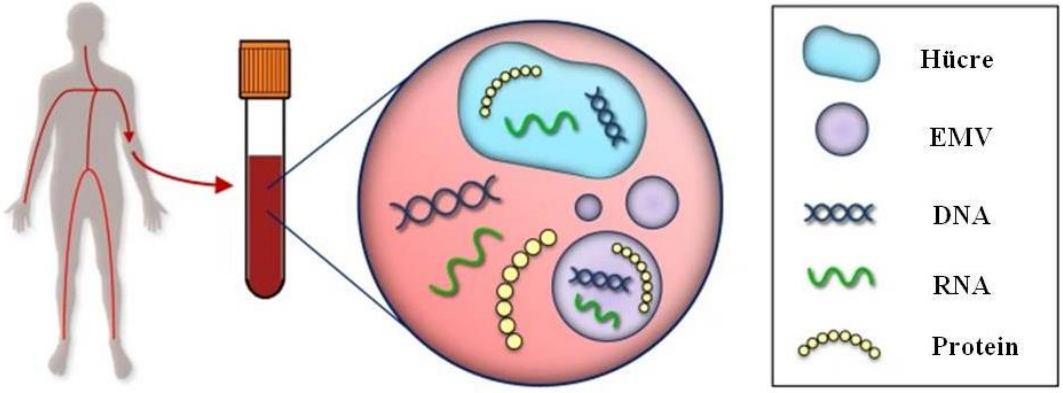
İyileşmedeki ilerlemenin gerçek zamanlı izlenmesi, terapötik yanıtı değerlendirmek için yararlı bir araç olabilir. Dolaşımdaki tümör hücreleri (CTC'ler) ve hücresiz DNAlar gibi biyolojik kaynaklar bu fırsatı sunabilir.

4.2. Sıvı Biyopsi

Bugüne kadar, doku biyopsi örnekleri tümörleri karakterize etmek için yaygın olarak kullanılmaktadır. Dokular, hastalığın histolojik tanımına izin vermesine, tümörün genetik profilinin ayrıntılarını ortaya çıkarabilmesine, hastalığın ilerlemesinin tahmin edilmesine olanak sağlasa da, uygulamalar doku mevcudiyeti, örnekleme sıklığı ve bunların genetik heterojenliği ile sınırlıdır (Huang ve ark., 2019).

Sıvı/likit biyopsi, periferik kan, idrar, tükürük, safra, beyin omurilik sıvısı ve anne sütü gibi vücut sıvılarındaki moleküler biyobelirteçleri saptamak için minimal invaziv bir tespit aracıdır (Barbany ve ark., 2019; Huang ve ark., 2019; Junqueira-

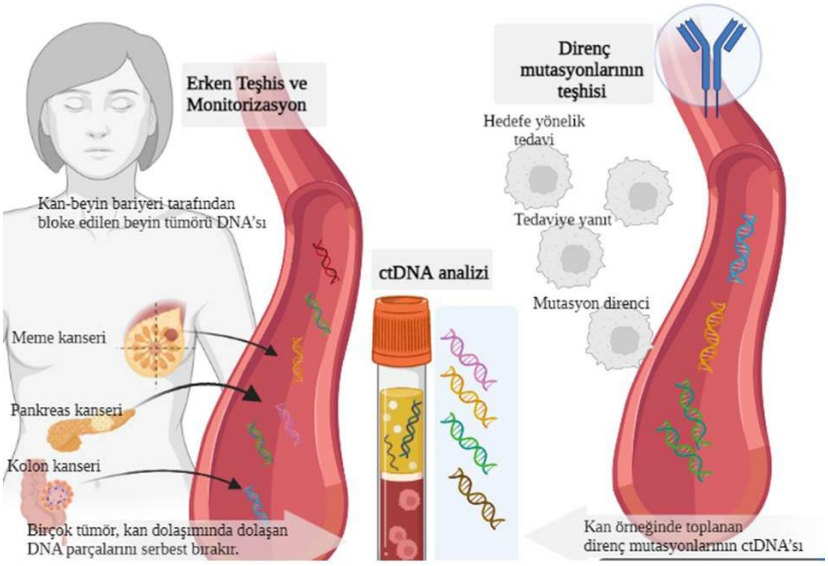
Neto ve ark., 2019; Panagopoulou ve ark., 2021; Ponti ve ark., 2019; Stewart ve Tsui, 2018) (Şekil 3).



Şekil 3: Sıvı biyopsi İnsan kanı, çeşitli hastalıklar için biyobelirteç olarak kullanılabilen hücreler, EV'ler, hücresiz nükleik asit ve protein içerir. (Pös ve ark., 2018'den değiştirilerek kullanılmıştır.)

Sıvı biyopsi, cerrahi biyopsiye tamamlayıcı veya alternatif bir yöntem olarak ortaya çıkmıştır. Onkolojide, dolaşımdaki hücresiz DNA (ccfDNA), dolaşımdaki tümör hücreleri (CTC'ler) veya hücre dışı veziküller (EV'ler) ve trombositler gibi, tümörden kaçan ve dolaşımı zenginleştiren bir biyolojik materyal kaynağıdır (Junqueira-Neto ve ark., 2019; Panagopoulou ve ark., 2021). Bir doku biyopsisi ("altın standart" yöntem (Lin ve ark., 2020; Szilágyi ve ark., 2020)) elde etmek, tanının temel dayanağı olmaya devam etse de, sıvı biyopsi, çeşitli avantajları nedeniyle sınırlayıcı katı biyopsi yaklaşımlarına bir alternatif olarak görülmektedir (Junqueira-Neto ve ark., 2019; Peled ve ark., 2020; Ponti ve ark., 2019).

Tek bir tümör bölgesinden alınan geleneksel doku biyopsisi ile karşılaştırıldığında, sıvı biyopsinin avantajları; minimal invazif olması, kolay elde edilebilir olması, hastalık teşhisi, çoklu örnekleme kapasitesi ile tümör dinamiklerinin izlenmesi, tedaviye yanıt, metastaz ve hastalık nüksünün gerçek zamanlı izlenmesini sağlaması, terapötik hedeflerin ve direnç mekanizmalarının tanımlanması, hem birincil hem de metastatik lezyonların genetik profilini yansıtması ve tümör heterojenliği sorunlarını gidermek olarak sıralanabilir (Huang ve ark., 2019; Junqueira-Neto ve ark., 2019; Panagopoulou ve ark., 2021; Peled ve ark., 2020) (Şekil 4).



Şekil 4: Sıvı biyopsi uygulamaları (Bettegowda ve ark., 2014'den değiştirilerek kulanılmıştır.)

Bir kanser hastasının periferik kanı, diğer hücre materyallerinin yanı sıra, CTC'ler, dolaşımdaki hücresiz nükleik asitler, tümör kaynaklı hücre dışı veziküller birincil tümör ve metastatik bölgelerden türetilen hücre ürünlerini analiz etmek için kullanılır (Junqueira-Neto ve ark., 2019).

4.2.1. CTC

CTC'ler, kan dolaşımına girmek için birincil veya metastatik tümörlerden ayrılan hücrelerdir (Banys-Paluchowski ve ark., 2022; Bettegowda ve ark., 2014; Delmonico ve ark., 2020; Theil ve ark., 2020). Avustralyalı araştırmacı Thomas Ashworth ilk olarak 1869'da göğüs ve karın ön duvarı üzerinde yer alan deri altı tümörleri olan bir hastanın kanında CTC'lerin varlığını bildirmiştir (Delmonico ve ark., 2020).

Bugüne kadar birçok "CTC" tanımı mevcuttur. Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından onaylanan CellSearch tanımı standart olarak kabul edilir ve bir CTC'nin, lökosit spesifik antijen CD45 için negatif iken, epitelyal protein EpCAM'i ve sitokerati 8, 18 ve/veya 19'u eksprese eden 4 µm'den daha büyük dolaşımdaki çekirdekli bir hücre olarak ifade edilir. EpCAM, MUC1 ve HER2 ekspresyon düzeyine göre meme kanserinin prognozunu belirlemede kullanılabilecek belirteçler arasındadırlar

(Banys-Paluchowski ve ark., 2022; Bettegowda ve ark., 2014; Panagopoulou ve ark., 2021; Theil ve ark., 2020; Ye ve ark., 2019).

Kandaki konsantrasyonları çok düşüktür, 1 g ağırlığındaki küçük bir tümör durumunda, tahmini olarak günde $3x10^6$ tümör hücresi kan dolaşımına girer (Banys-Paluchowski ve ark., 2022). Hastaların kan örneklerinden CTC izolasyonu zorlu bir süreç olmuştur; bu nedenle, onları tanımlamak ve izole etmek için hassas ve spesifik yöntemler geliştirmek adına çalışmalar mevcuttur (Gilbey ve ark., 2004; Theil ve ark., 2020). En önemli zorluk ise, kanser evresi ne kadar erkense, CTC'lerin o kadar az olmasıdır buna rağmen, sıklıkla tanımlanabilecekleri tümöre özgü antijenik ve/veya genetik imzalara sahiptirler. Böylece, agresif bir fenotipe sahip CTC'ler, moleküler düzeyde karakterize edilebilir (Akkiprik ve ark., 2020).

Kan dolaşımındaki CTC'lerin yarılanma ömrü kısadır (1–2,4 saat) ve primer tümör rezeksiyonundan aylar veya yıllar sonra hasta kanında CTC'lerin saptanması tümörün nüksettiğini veya metastazını gösterir (Banys-Paluchowski ve ark., 2022). Bu yüzden tedavi yanıtının gerçek zamanlı izlenmesi için metastatik hastalığa kapsamlı bir pencere işlevi görebilir (Theil ve ark., 2020).

Dolaşıma salınan CTC'lerin sadece %0,01'den daha azı hayatta kalarak metastaz üretir (Ye ve ark., 2019; Chimonidou ve ark., 2013). Fakat her CTC'nin metastatik yeteneği yoktur. Metastatik vakalarda CTC saptama oranı oldukça yüksek olmakla birlikte, hem metastatik olmayan hem de metastatik meme kanseri vakalarında CTC'lerin prognostik potansiyeli gösterilmiştir (Gilbey ve ark., 2004).

Meme kanseri hastalarında CTC'lerin miktarı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir ve ortalama olarak bu hastaların başlangıçta 7,5 mL kan başına beş veya daha yüksek (CellSearch sistemi tarafından ölçülür) CTC'ye sahip olduğu bildirilmiştir. Araştırmacılar ayrıca, CTC seviyeleri 7,5 ml'de 5'in altında olan hastaların, CTC seviyeleri bu seviyenin üzerinde olan hastalara kıyasla daha yüksek progresyonsuz sağkalım ve genel sağkalım olduğunu belirtmişlerdir (Alimirzaie ve ark., 2019; Banys-Paluchowski ve ark., 2022; Dawson ve ark., 2013).

Son araştırmalar, meme tümörlerinden CTC'lerin yayılmasının epitelyal mezenkimal geçişi (EMT) gerektirdiğini göstermektedir. Bu geçiş, epitel hücrelerinin epitel

morfolojisini, polaritesini ve EpCAM gibi belirteçleri kaybetmesine ve mezenkimal fenotipik özellikler kazanmasına neden olarak metastazı başlatmalarına neden olur.

Düşük seviyelerde CTC'lerin kandan izolasyonu zor olsa da, kanser hastalarında prognozu tahmin etmede bir araç olarak yararlı olduğu kanıtlanmıştır ve bu nedenle daha fazla araştırmaya tabi tutulmalıdır (Alimirzaie ve ark., 2019; Banys-Paluchowski ve ark., 2022; Gilbey ve ark., 2004).

ctDNA'nın aslında CTC'lerden gelmesi mümkün olsa da, CTC'lerin veya ctDNA'nın dolaşıma salınma mekanizması belirsizdir. CTC'nin kanser teşhisinde kullanılması çok erken bir aşamadadır ve CTC tespit yöntemleri ve kanser teşhisinde kullanımı konusunda daha fazla araştırma yapılmalıdır (Bettegowda ve ark., 2014).

4.2.2. Dolaşımdaki hücresiz DNA (ccfDNA)

Hücrelerden kan, lenf, safra, süt, idrar, tükürük, mukus süspansiyonu, omurilik sıvısı gibi biyolojik sıvılara salınan DNAlar, dolaşımdaki hücresiz DNA (ccfDNA) olarak adlandırılmaktadır. Çift veya tek sarmallıdır (Panagopoulou ve ark., 2021).

ccfDNA molekülleri 1948'de, iki Fransız araştırmacı tarafından, Mandel ve Metais, sağlıklı ve hasta insan dolaşım sisteminde keşfedildi (Aucamp ve ark., 2018; Barbany ve ark., 2019; Bronkhorst ve ark., 2019; Duvvuri ve Lood, 2019; Gezer ve ark., 2022; Meddeb ve ark., 2019; Panagopoulou ve ark., 2021; Ponti ve ark., 2019; Pös ve ark., 2018; Stewart ve Tsui, 2018; Kamel ve ark., 2016). İlk başta önemsiz gibi görünsede, araştırmacılar sağlıklı ve hasta bireylerde ccfDNA'nın özellikleri arasındaki farklılıkları gözlemlediğinde klinik önemi anlaşılmıştır. Artan ccfDNA konsantrasyonları ilk olarak otoimmün hastalığı ve lösemisi olan hastalar için rapor edilmiştir (Bronkhorst ve ark., 2019; Duvvuri ve Lood, 2019). 1977'de Leon ve arkadaşları kanser hastalarında ccfDNA'nın konsantrasyonunun sağlıklı bireylerden yüksek olduğunu öne sürdü (Hao ve ark., 2014). Sonraki yıllarda çok sayıda çalışma kanser kaynaklı ccfDNA'nın serum veya plazma düzeyinin daha yüksek olduğunu doğruladı (Chimonidou ve ark., 2013; Huang ve ark., 2019; Xue ve ark., 2009; Zhou ve ark., 2016). Kanserin invazif olmayan erken teşhisi ve tedavisi için hem sağlıklı hem de risk altındaki asemptomatik hasta gruplarını tarama olasılığının yanı sıra, cfDNA analizi; (i) evreleme ve prognoz, (ii) tümör lokalizasyonu, (iii) başlangıç

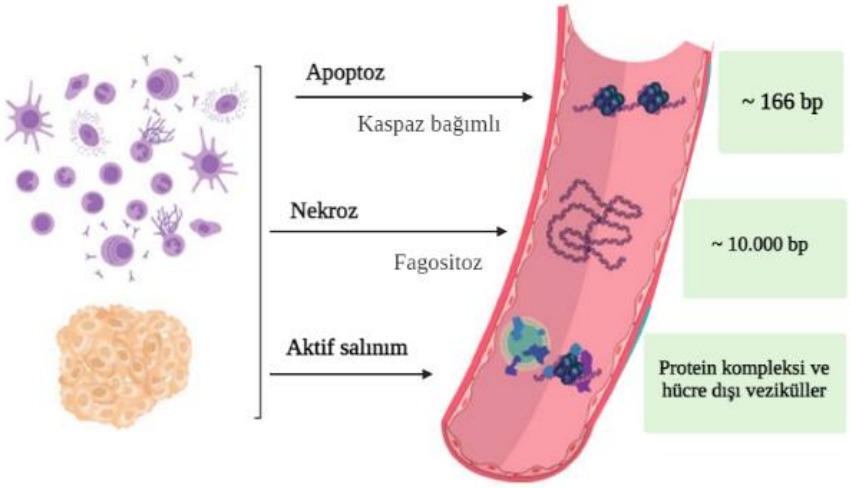
tedavi sınıflandırması, (iv) tanımlanmış bir tanıya sahip hastalarda lokal veya sistemik tedaviye yanıtın izlenmesi, (Wang ve ark., 2016) (v) birincil tedavinin tamamlanmasını takiben minimal rezidüel hastalık ve nüksün izlenmesi, (vi) mutasyonlar ve metilasyon gibi tümöre özgü DNA değişikliklerinin tespiti (Chimonidou ve ark., 2013) ve (vii) kazanılmış ilaç direnç mekanizmalarının tanımlanması gibi onkolojide çoklu endikasyonlar için vekil bir belirteç olarak umut vaat etmektedir (Bronkhorst ve ark., 2019; Huang ve ark., 2019; Zhou ve ark., 2016).

4.2.2.1 ccfDNA'nın kökeni

Sağlıklı bireylerde cfDNA'nın %60-90'ı hematopoietik hücrelerden kaynaklanır, toplam kan plazma/serum ccfDNA miktarının %2-18'i karaciğer tarafından sağlanırken diğer birçok organ ve doku tarafından da oluşturulur. ccfDNA'nın dolaşıma katılmasını sağlayan birçok mekanizma vardır (Barbany ve ark., 2019; Panagopoulou ve ark., 2021; Ponti ve ark., 2019; Pös ve ark., 2018; Rahat ve ark., 2020; Stewart ve Tsui, 2018).

İnsan vücudu sıvılarında cfDNA, nükleer genomun fragmanları, mitokondriyal genom ve mikrobiyal genomlar dahil olmak üzere birçok şekilde dolaşımda bulunur (Barbany ve ark., 2019; Burnham ve ark., 2016; Panagopoulou ve ark., 2021; Szilágyi ve ark., 2020). ccfDNA'nın oluşumunu açıklayabilecek üç olası kaynak vardır: apoptoz, nekroz, ve aktif hücresel salınımdır (Şekil 5) (Aucamp ve ark., 2018; Bronkhorst ve ark., 2019; Coco ve ark., 2017; Duvvuri and Lood, 2019; Eskander ve ark., 2022; Panagopoulou ve ark., 2021; Pös ve ark., 2018; Rahat ve ark., 2020; Stewart ve Tsui, 2018; Xue ve ark., 2009; Zhou ve ark., 2016).

Sağlıklı bireylerde ccfDNA'nın ana kaynağının hematopoietik hücrelerin apoptozu olduğu ve diğer dokuların katkısının minimal olduğu belirlenmiştir. Onkolojik hastalarda, ccfDNA'nın büyük bir kısmı, tümör hücrelerinin apoptozu ve nekrozu ile oluşturulur, ancak nekrotik hücrelerden DNA salınımı sadece fagositoz yoluyla gerçekleşir (Pös ve ark., 2018; Szilágyi ve ark., 2020).



Şekil 5: ccfDNA salınım mekanizmaları (Barbany ve ark., 2019'dan değiştirilerek kullanılmıştır.)

4.2.2.2. ccfDNA'nın fiziksel özellikleri

ccfDNA, 166 bp boyutuna kadar oldukça parçalanmış bir moleküldür ve elektroferogramlarda yaklaşık 300 bp ve 450 bp boyutunda gözlemlenebilen başka tepe noktaları vardır (Pös ve ark., 2018). Volik ve arkadaşları, toplam cfDNA'nın %90'ının düşük moleküler ağırlık bandında bulunduğunu bildirmiştir (Volik ve rk., 2016).

Kalsiyum bağımlı endonükleazlar tarafından 180-200 bp'lik çift sarmallı DNA fragmanlarına DNA'nın nükleozomlar arası parçalanması, apoptozun biyokimyasal özelliğidir (Kamel ve ark., 2016). Parçalanmış DNA, jel elektroforeze tabi tutulduğunda bir merdiven modeli olarak saptanabilir (Duvvuri ve Lood, 2019). ccfDNA'nın boyutlandırılması da genellikle bu apoptotik parçalanmayı temsil eder. Apoptoz tarafından üretilen DNA'nın çoğunluğu, bir nükleozomun etrafına sarılmış 147 bp DNA'ya ve iki nükleozom çekirdeğini birbirine bağlayan Histon H1 üzerindeki DNA uzantısına karşılık gelen ~166 bp'lik bir boyuta sahiptir (Bronkhorst ve ark., 2019; Burnham ve ark., 2016; Katopodis ve ark., 2021; Stewart ve Tsui, 2018). Kaspaz bağımlı nükleaz etkisine bağlı olarak apoptoz, kromozomal DNA'nın 160-180 bp veya mono- (~166 bp), di- (~332 bp), tri- (~498 bp) veya poli-nükleozomları temsil eden daha uzun DNA fragmanları da üretebilir (Barbany ve

ark., 2019; Bronkhorst ve ark., 2019; Panagopoulou ve ark., 2021; Ungerer ve ark., 2020).

Apoptozun aksine, kanser hastalarında ~10.000 bp'den büyük ccfDNA fragmanları sıklıkla gözlenir, bu da nekrozdan kaynaklandığını gösterir (Bronkhorst ve ark., 2019; Stewart ve Tsui, 2018). Nekroz, kromatinin spesifik olmayan sindirimi ile sonuçlanır, böylece birçok kilo baz çiftinin yüksek moleküler ağırlıklı DNA'sının salınmasını sağlar (Aucamp ve ark., 2018; Duvvuri ve Lood, 2019). Apoptozdan daha hızlı gerçekleşir, ancak nekrotik hücrelerin uzaklaştırılması daha yavaştır (Bronkhorst ve ark., 2019).

Hücresel yıkımın aksine, ccfDNA'nın önemli bir bölümünün aktif hücresel salgılardan elde edildiği gösterilmiştir. Yakın zamanda yapılan in vitro hücre kültürü çalışmaları, kültür ortamında apoptoz, nekroz veya DNA replikasyonu süreçleri ile korelasyon göstermeyen seviyelerde cfDNA'nın varlığını göstermiştir (Wang ve ark., 2017). Ayrıca, bu ccfDNA fragmanları, tipik olarak apoptoz veya nekroz ile ilişkili olmayan bir boyut olan 1000-3000 bp aralığındadır. Bu, ccfDNA'nın aktif salınımı için daha fazla kanıt sağlar. ccfDNA'nın aktif salınımında rol oynayan kesin mekanizmalar belirsizliğini koruyor olsa da, ccfDNA'nın genomik kararsızlığın bir sonucu olarak salınması olasıdır (Bronkhorst ve ark., 2019).

Aktif veya düzenlenmiş salıvermenin başka bir formu, eksozomlar gibi hücre dışı veziküllerle bağlantılı DNA parçalarını içerir. Bu veziküllerin boyutları 30 ile 100 nm boyutundadır ve 150 ile 6000 bp arasında değişen ccfDNA fragmanları taşır. Büyük bir ccfDNA fraksiyonunun apoptozdan kaynaklandığı gösterilmiş olmasına rağmen, ccfDNA'nın çoklu mekanizmalarla dolaşıma salındığı açık hale gelmektedir. Ayrıca, bu mekanizmaların her biri, neredeyse her bireye özgü olan çok çeşitli biyolojik ve çevresel faktörler tarafından düzenlenir. Değişkenler arasında yaş, cinsiyet, etnik köken, vücut kitle indeksi, organ sağlığı, sigara kullanımı, fiziksel aktivite, diyet, glikoz seviyeleri, oksidatif stres, ilaç durumu, enfeksiyonlar, menstrüasyon ve hamilelik sayılabilir (Bronkhorst et al., 2019).

Kapiller elektroforez ile fragman boyutu dağılımı değerlendirilmiş ve meme kanseri hastalarının plazmasında yukarıda tanımlanan tüm fragman tiplerinin (160 bp, 2000 bp ve 10.000 bp) varlığı gösterilmiştir (Panagopoulou ve ark., 2021).

Farklı çalışmalarda, wild tip ccfDNA'ya kıyasla tümör kaynaklı ccfDNA'nın daha küçük fragman boyutlarında (90 bp kadar kısa) olduğu gösterilmiştir (Bronkhorst et al., 2019).

4.2.2.3. ccfDNA'nın kullanım alanları

1997'de maternal plazmada dolaşan fetal DNA'nın tespit edilmesi invaziv olmayan doğum öncesi genetik teşhisin temellerini atmıştır (Lo ve ark., 1997). 2011'de yeni nesil dizilemenin (NGS) kullanıma sunulmasından sonra mümkün hale gelen, anne kanından izole edilen hücresiz fetal DNA'dan anöploidi saptama olasılığı yüksek düzeyde ilgi görmüştür. Trizomileri, subkromozomal sapmaları ve hatta monogenik bozuklukları tespit etmek mümkün hale gelmiştir (Szilágyi ve ark., 2020).

Kandan izole edilen ccfDNA, onkoloji ve doğum öncesi testlerde ticari ve klinik uygulamada zaten rutin olarak kullanılmasının yanında, diyabet, kardiyovasküler hastalıklar, organ nakli, otoimmün hastalıklar, sepsis, travma, nörolojik, mitokondriyal hastalıklar ve spor yönetimi dahil olmak üzere çeşitli alanlarda uygulamaları bulunmaktadır (Meddeb ve ark., 2019; Rahat ve ark., 2020).

Artan cfDNA seviyeleri sadece tümörlü hastalarda değil, aynı zamanda yoğun egzersiz sonrasında, akut veya kronik hastalıkları olan yaşlı hastalarda ve inflamasyonu veya travması olan kişilerde de gözlenir (Kustanovich ve ark., 2019; Park ve ark., 2012).

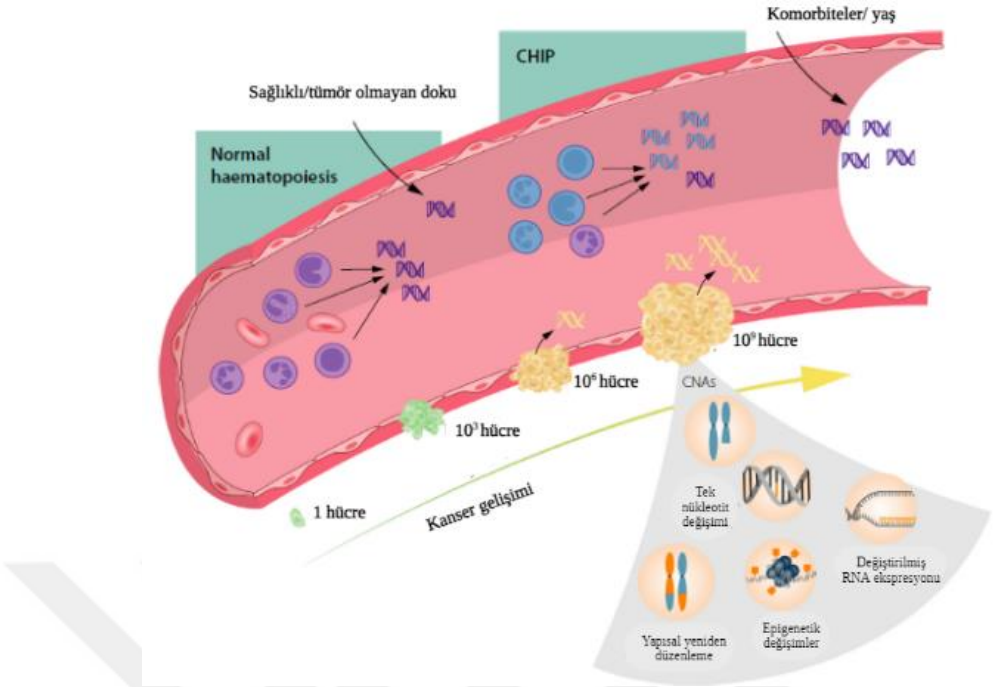
Kanser çalışmalarından farklı olarak organ nakli çalışmalarında da önemli bir yere sahiptir. Donöre özgü nükleer genomik ccfDNA, katı organ nakli hastalarının dolaşımında bulunur ve bu durum nakil reddinin bir göstergesidir. Son çalışmalar, donöre özgü ccfDNA'nın (ccfdDNA) oranının kalp ve akciğer transplantasyonunda akut reddi öngördüğünü göstermiştir (Burnham ve ark., 2016).

4.2.2.4. Onkolojide ccfDNA

Kanser hastalarının serumunda ccfDNA konsantrasyonunun sağlıklı bireylere göre önemli ölçüde daha yüksek olduğunun ilk belirlenmesinden bu yana, ccfDNA konsantrasyonu çeşitli kanser türlerine sahip hastalarda araştırılmıştır.

Kanser belirteci olan ccfDNA, dolaşımdaki tümör DNA'sı olarak adlandırılır ve kandaki toplam ccfDNA'nın sadece bir kısmını temsil eder (Ponti ve ark., 2019). Erken evre kanser hastalarında ctDNA fraksiyonu %0,1'den düşük olabilir (Huang ve ark., 2019). Kanserli hastalarda toplam ccfDNA'nın %10 ile %90'ı arasında değiştiği tahmin edilmektedir. ctDNA, tümör hücrelerinden, metastatik bölgelerden ve CTC'lerden dolaşıma salınır. Tümör biyopsilerine kıyasla genetik analiz için daha az invaziv, daha kolay erişilebilir bir DNA kaynağı sağlar (Şekil 6) (Coco ve ark., 2017; Katopodis ve ark., 2021; Panagopoulou ve ark., 2021).

Kan dışındaki sıvılardan ctDNA analizinin avantajı da, tümör kaynağı ile doğrudan temas halinde olan bir vücut sıvısından hedeflenen bilgilerin toplanmasıdır (örneğin, merkezi sinir sistemi neoplazmı için beyin omurilik sıvısının kullanımı) (Ponti ve ark., 2019).



Şekil 6: Dolaşımda tespit edilebilen tümörlerde ccfDNA kaynakları, tümör evrimi ve genetik değişim türleri Tümörler (sarı), kardeş hücrelere göre büyüme avantajları elde eden ve daha sonra zaman içinde genetik değişiklikler biriktiren bir hücreden gelişir. Tümör hücrelerinden salınan cfDNA, tümör genomu (sarı cfDNA fragmanları) ile aynı genetik değişimleri taşıyacaktır. Sağ alt panel: Kanser hücrelerinde bulunan farklı genetik anormalliklerin temsili (i) kromozomların parçalarının veya tamamının kazanımları veya kayıpları, kopya numarası değişiklikleri (CNA'lar); (ii) translokasyonlar gibi kromozomların yapısal yeniden düzenlemeleri; (iii) belirli genlerdeki tek nükleotit varyantları (SNV'ler) veya nokta mutasyonları; (iv) metilasyondaki değişiklikler gibi epigenetik değişiklikler; (v) mikro-RNA'lar olarak adlandırılan küçük kodlamayan RNA'lardaki değişiklikler nedeniyle değiştirilmiş RNA ekspresyonu. Üst panel soldan sağa: Normal hematopoietik hücreler cfDNA'yı dolaşıma salar. Bir lökosit, büyüme avantajı olan bir mutasyon kazanırsa, bu hücre, daha sonra bir hematolojik kansere (yani, belirsiz potansiyelin klonal hematopoezi, CHIP) yol açabilen veya bir beyaz kan hücresi klonuna yol açacaktır. Ardından, cfDNA'nın bir alt kümesi, bu CHIP hücrelerinden (açık mavi ile gösterilen) spesifik genetik değişiklikleri taşıyacaktır. Ek olarak, yaş ve kronik enflamatuar hastalık gibi komorbiditeler, tümör kaynaklı fragmanları seyrelterek normal ccfDNA seviyelerini artırabilir. (Barbany ve ark., 2019'dan değiştirilerek kullanılmıştır.)

4.2.2.4.1. Klinik onkolojide ccfDNA'nın faydası

ccfDNA analizi, tümör biyopsilerinin yerini almasada, ancak tümörlerin ve metastazların mutasyonel görünümü hakkında klinik olarak ilgili önemli bilgiler ve ek bilgiler sağlayabilirler. Biyopsi yapılmasının mümkün olmadığı veya tekrarlanan biyopsilerin gerekli olduğu durumlarda ccfDNA analizleri çok büyük fayda sağlar (Stewart ve Tsui, 2018).

Genel olarak, ctDNA'nın diğer tümör belirteçlerinden daha iyi bir prognoz belirleyicisi olduğu gösterilmiştir. Bu ilişki özellikle tedavi görmüş hastalarda

belirgindir. Tedaviyi takiben daha yüksek ccfDNA seviyeleri, genellikle düşük sağkalım oranları ve terapi direnci ile ilişkilidir. Tersine, tedaviyi takiben düşük ccfDNA seviyeleri, genellikle, geleneksel saptama yöntemlerinden daha önce saptanıp, tedaviye olumlu bir yanıta karşılık gelir (Bronkhorst ve ark., 2019).

4.2.2.4.1.1. Teşhis açısından ccfDNA

Serum kanser antijen 125 (CA125) seviyesi, tümör takipi sırasında nüksü saptamak için bir biyobelirteç olarak kullanılmasına rağmen, CA125'in taramadaki rolü tartışmalıdır. Çünkü evre I yumurtalık kanseri vakalarının sadece %50'sinde CA125 yükselmiştir. Ek olarak, yüksek bir CA125 seviyesi sıklıkla iyi huylu jinekolojik hastalıklar ve jinekolojik olmayan malignitelerle ilişkilendirilerek önemli bir yanlış pozitif oranına neden olur (Bettegowda ve ark., 2014; No ve ark, 2012).

Meme ve yumurtalık kanseri geliştirme riski önemli ölçüde artan germ hattı BRCA mutasyonu taşıyan sağlıklı kadınların, kontrol grubuna kıyasla yüksek ccfDNA seviyelerine sahip olduğu belirlenmiştir (Peled ve ark., 2020).

Erken evre katı tümörlerin küçük boyutlu olması normal anatomik ve biyokimyasal varyasyondan non-invaziv bir şekilde ayırt etmeyi zorlaştırır. Son araştırmalar, ccfDNA analizindeki teknolojik ilerlemelerin bu zorlukların üstesinden gelebileceğini ve muhtemelen kanserin erken, hassas ve doğru teşhisini hızlandırabileceğini düşündürmektedir. Çok sayıda çalışma, kanserle ilişkili mutasyonların (i) erken evre hastalıkta (ii) semptomların varlığından önce ve (iii) kanserden 2 yıl öncesine kadar ccfDNA'da saptanabilme olasılığını göstermiştir (Bronkhorst ve ark., 2019).

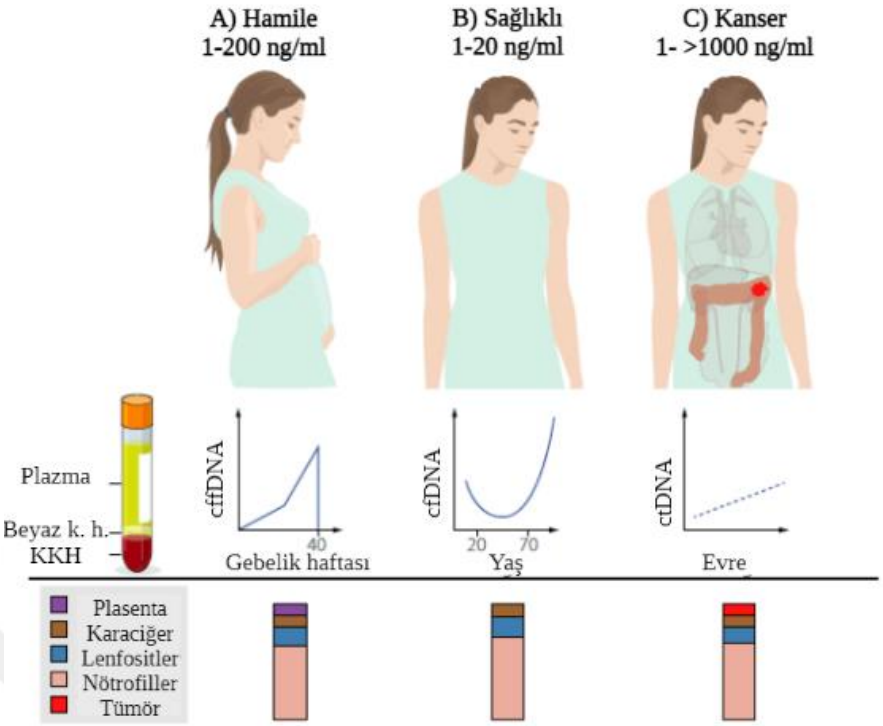
4.2.2.5. ccfDNA miktarının belirlenmesi

Son zamanlarda, bazı çalışmalar, dolaşımdaki cfDNA'nın kantitatif analizinin, tümör ilerlemesini değerlendirmek ve meme kanseri de dahil olmak üzere çeşitli kanser türlerinde prognozu, tanıyı ve tedaviye yanıtı tahmin etmek için kullanılabilecek, bir biyobelirteç olduğunu bildirmektedir (Zhou ve ark., 2016).

Sağlıklı bireylerin kanındaki cfDNA konsantrasyonu son derece değişkendir. Barbany ve arkadaşlarının raporuna göre, genellikle 1 ile 10 ng/ml arasında değiştiği

ve ortalama 6 ng/ml plazma 2000 haploid genom eşdeğerine karşılık geldiği belirtilmiştir (Barbany ve ark., 2019). Diğer verilere göre ise ortalama 30 ng/ml, 0-100 ng/ml kan (Kustanovich ve ark., 2019) ve <10 ile > 1500 ng/ml olduğu tespit edilmiştir (Kamel ve ark., 2016). Hamile kadınlarda 200 ng/ml kadar olabilir, seviyelerin yaşa göre değiştiği, hem genç bireylerde (<20 yaş) hem de yaşlılarda (>70 yaş) biraz daha yüksek olduğu gösterilmiştir (Şekil 7). Çok yaşlılar (90 yaşın üstü) üzerinde yapılan bir çalışmada, medyan cfDNA kan seviyesinin 707 ng/mL olduğu ve erkeklerde anlamlı olarak daha yüksek bir medyan belirlenmiştir (Barbany ve ark., 2019).

Kanser hastaları genellikle plazmada >1000 ng/ml'ye kadar, ortalama 180 ng/ml olmak üzere daha yüksek toplam cfDNA kan seviyelerine sahiptir (Barbany ve ark., 2019). Evre IV veya ilerlemiş tümörler, erken evre kanserlerde sadece 10 kopya ile karşılaştırıldığında, 5 mL plazma başına 100-1000 kopya ctDNA'ya sahiptir. Metastatik hastalığı olan hastalarda da ek artışlar görülür (Stewart ve Tsui, 2018). Bu gözlemler, tümör hücrelerinin plazmadaki cfDNA'ya önemli ölçüde katkıda bulunduğu varsayımına yol açar.



Şekil 7: ccfDNA düzeylerini etkileyen kaynaklar, ccfDNA konsantrasyonu ve varyasyonu Plazmadaki hücresiz DNA'nın %60-90'ı lökositlerden (çoğunlukla nötrofillerden ve aynı zamanda lenfositlerden) elde edilir. Küçük bir kısmı (%10'dan az) karaciğerden elde edilir. Kalan vücut hücreleri, cfDNA'nın çok küçük bir yüzdesine katkıda bulunur. (A) Hamile bir kadın mililitre plazma başına 1–200 ng ccfDNA'ya sahiptir, bunun yaklaşık %10'u gebeliğin 10–12. haftasından itibaren fetal fraksiyona (mor) karşılık gelir ve bu seviyeler ikinci trimesterde yavaşça yükselerek üçüncü trimesterde toplam cfDNA fraksiyonunun yaklaşık %40'ını oluşturur. Doğumdan sonra, cfDNA seviyeleri hızla düşer. (B) Sağlıklı popülasyonda cfDNA seviyeleri ortalama 1–20 ng/ml plazmadır. Daha genç bireylerin cfDNA seviyeleri yaşlılara göre daha yüksektir ve çok yaşlılar (>90 yaş) 700 ng/mL seviyelerine sahip olabilir. (C) Kanserli bireylerde, ctDNA fraksiyonu (kırmızı) <%0,1 ile >%70 arasında değişir ve tümör yükü ve/veya kanser evresi ile artma eğilimindedir. (cffDNA = hücresiz fetal DNA, cfDNA = hücresiz DNA. ctDNA = hücresiz tümör DNA'sı.) (Barbany ve ark., 2019'dan değiştirilerek kullanılmıştır.)

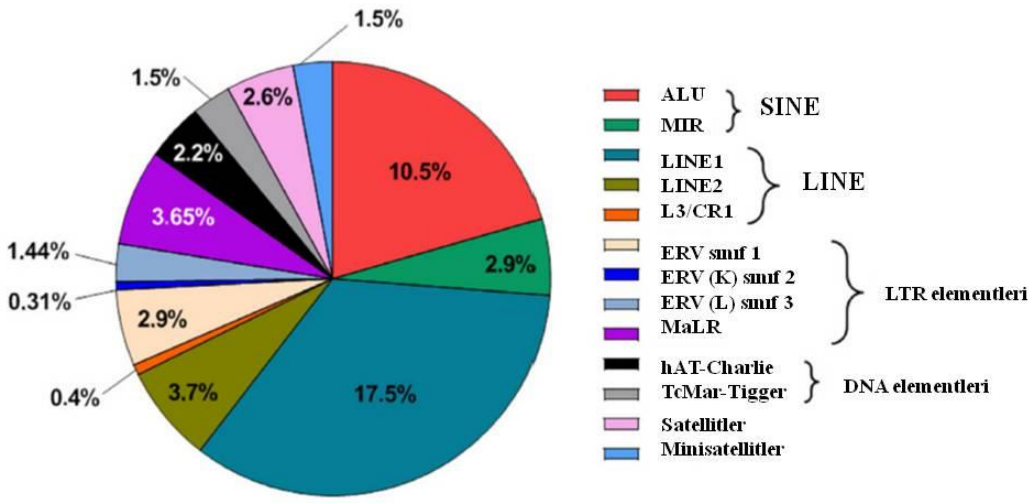
Belirtildiği gibi, sağlıklı bireylerin plazmasında/serumunda küçük miktarlarda ccfDNA saptanır, ancak konsantrasyonu, kanser veya diğer patolojik durumlarda belirgin şekilde artar. Ayrıca, kanser hastalarında sıklıkla bozulan DNAaz aktivitesinin ccfDNA konsantrasyonları ile korele olduğundan bahsedilmiştir. Karaciğer, dalak ve böbrekteki temizlenme oranları ve nükleazların bozulması miktarı etkileyen ek faktörlerdir (Panagopoulou ve ark., 2021).

Doğrudan saflaştırılmamış plazmada veya DNA izolasyonundan sonra kanda toplam ccfDNA düzeyi ölçümleri için çeşitli teknikler önerilmiştir. Meme kanserinde

şimdiye kadar ccfDNA ölçümü için kullanılan tekniklerden biri olan kantitatif polimeraz zincir reaksiyonunda (qPCR), ALU ve LINE1 en çok kullanılan tekrar elementleri olmuştur. Her iki yöntem de, sağlıklı bireylerle ilişkili olarak meme kanserinde daha yüksek ccfDNA seviyelerinin olduğunu tekrar tekrar doğrulamıştır (Huang ve ark., 2019; Panagopoulou ve ark., 2021; Ponti ve ark., 2019).

4.2.2.5.1. ALU tekrar dizileri

İnsan genomunun %50-65'inden fazlası tekrar eden DNA'dan oluşur. (Jiang ve ark., 2019) Genomik dağılımlarına göre, tekrar eden DNA elemanları iki gruba ayrılabilir: tandem (ardışık) tekrarlar ve interspersed (serpiştirilmiş) tekrarlar. Tandem tekrarlar insan genomunun %6'sını oluştururken, yaklaşık %45'inin LINE-1 ve ALU dahil olmak üzere serpiştirilmiş tekrarlar oluşturur (Şekil 8) (Gezer ve ark., 2022; Park ve ark., 2021).



Şekil 8: İnsan genomundaki tekrarlayan element ailelerinin dağılımı (Gezer ve ark., 2022'den değiştirilerek kullanılmıştır.)

Serpiştirilmiş tekrarlar, retrotransposable elementler olarak kabul edilir. Çoğalabilir ve kendilerini yeni genomik bölgelere yerleştirebilirler. *Arthrobacter luteus* (ALU) aileleri, kısa serpiştirilmiş nükleer elementler (SINE'ler) olarak adlandırılan retroelement sınıfına aittirler (Gezer ve ark., 2022). İnsan genomunun %10'undan fazlası, yaklaşık 1,4 milyon kopya sayısı ile en çok bulunan ALU, otonom olmayan yer değiştirebilir elementlerdir (Park ve ark., 2020). Tipik bir ALU elementi yaklaşık

300 bp uzunluğundadır ve A bakımından zengin bir bölge ve 3’ uçlarda bir poli A kuyruğundan oluşan dimerik bir yapıya sahiptir (Şekil 9) (Hussein ve ark., 2019; Jiang ve ark., 2019; Umetani ve ark., 2006).

Tekrar eden DNA, insan genomunun %50-65’inden fazlasını oluşturduğundan, cfDNA fragmanlarının büyük bölümünü de oluşturması beklenir. Yeni nesil dizileme kullanılarak yapılan çalışmalar bunu doğrulamıştır. Tekrarlayan elementlerden ALU dizileri, istatistiksel anlamlılık ile daha yüksek bir cfDNA oranını oluşturur.



Şekil 9: ALU elementi yapısı Alu, genellikle A kuyruğu olarak adlandırılan uzun bir A çizgisiyle biter ve aynı zamanda, farklılaşmış bir dimer yapısının iki yarısını ayıran daha küçük A açısından zengin bölgeye (AA ile gösterilir) sahiptir. Alu elementleri, bir RNA polimeraz III promotörünün (kutu A ve B) iç bileşenlerine sahiptir, ancak bunlar, RNA polimeraz III için bir sonlandırıcıyı kodlamazlar. Transkripsiyonu sonlandırmak için Alu elementinin akış aşağısındaki çeşitli mesafelerde bulunan T nükleotidlerini kullanırlar. Tipik bir Alu transkripti genomik Alu'nun altında gösterilmiştir ve A-kuyruğu da dahil olmak üzere tüm Alu'yu kapsadığını ve her lokus için benzersiz olan 3' bir bölgeye sahip olduğunu gösterir (Deininger, 2011).

Gecikmiş nükleik asit klirensine neden olan ölü tümör hücrelerinin sayısının artması nedeniyle, Alu DNA fragmanları farklı uzunluklardaki vücut sıvılarında ölçülebilir miktarda bulunur. Daha kısa fragmanlar (<200bp) normal apoptotik hücrelerden türetilirken, daha uzun fragmanlar tümör nekrotik hücrelerinden elde edilir. Bu nedenle, gerçek zamanlı kantitatif PZR (RT-PZR) ile amplifiye edilen daha kısa fragmanlar, toplam Alu DNA miktarını temsil eder ve uzun fragmanlar, apoptotik olmayan hücrelerden salınan DNA miktarını temsil eder (Arko-boham ve ark., 2019; Deligezer ve ark., 2008; Jiang ve ark., 2019; Lehner ve ark., 2013; Umetani ve ark., 2006).

ALU ccfDNA seviyeleri, meme kanserli hastalarda başlangıç seviyelerine kıyasla üçüncü kemoterapi döngüsünden sonra önemli ölçüde azalmıştır (Gezer ve ark., 2022).

4.2.2.5.2. ccfDNA Bütünlüğü

ccfDNA bütünlüğünün analizi, cfDNA'nın genetik veya epigenetik durumundan bağımsız bir faktördür ve teorik olarak tüm tümörlerin temsilcisidir. ccfDNA bütünlüğü, plazma veya serumdaki daha uzun DNA fragmanlarının konsantrasyonunun daha kısa fragmanlara oranı olarak hesaplanır (Condappa ve ark., 2020; Eskander ve ark., 2022). DNA bütünlüğü ölçümü, plazma ccfDNA'nın klinik kullanımından daha fazla yararlanmanın birçok yolundan biridir (Gezer ve ark., 2022; Katopodis ve ark., 2021).

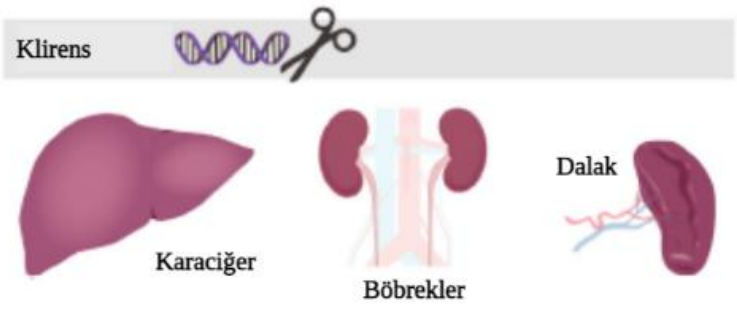
ccfDNA tespiti için farklı uzunluktaki primerler kullanılmaktadır. Bu primerler arasında kullanılan ALU 247 ve ALU 115 en yaygın çifttir. Bazı araştırmalar, deneysel sonuçları optimize etmek için Alu83, Alu81 veya Alu244'ü kullanmıştır. Nüks riskini ölçmek ve ameliyattan sonra olası rezidüel tümörü belirlemek için alternatif bir moleküler analiz olarak kabul edilir (Jiang ve ark., 2019).

"DNA bütünlük indeksini" daha uzun ve daha küçük parçaların oranı olarak somutlaştırmak için farklı formül önerilmiştir: Umetani ve arkadaşları hastaların serumundaki ALU247 ve ALU115'in direkt qPCR sonucu elde edilen konsantrasyonlarının oranını hesaplarken, Wang ve arkadaşları hasta plazmasındaki DNA bütünlüğünün ölçülmesi için delta-Ct değerlerine dayalı bir formül kullanmıştır. Her iki yazar da kontrollere kıyasla yumurtalık, meme ve kolorektal kanserli hastaların serum ve plazmasında daha yüksek DNA bütünlükleri bildirmiştir (Lehner ve ark., 2013a; Lehner ve ark, 2013c, 2013b; Nandi ve ark., 2020; Umetani ve ark., 2006).

ALU247/ALU115 oranı, yüksek dereceli hastalığı olan meme kanserli hastalarda sağlıklı kontroller ile karşılaştırıldığında daha yüksek olduğu bulunmuştur (Hao ve ark., 2014). Daha sonra, meme kanseri, akciğer, kolorektal, prostat, endometriyal, mesane, yumurtalık, tiroid ve hepatoselüler karsinom (HCC) dahil çok sayıda çalışma cfDNA bütünlüğünü değerlendirmek için ALU ve/veya LINE-1 elementlerini kullanmıştır. Tekrarlayan ccfDNA bütünlüğünün, primer ve metastatik meme kanserinde sağkalım için bağımsız bir prognostik belirteç olduğu gösterilmiştir (Gezer ve ark., 2022; Panagopoulou ve ark., 2021; Rahat ve ark., 2020).

4.2.2.6. ccfDNA'nın Temizlenmesi (Klirensi)

ccfDNA'nın kandan temizlendiği mekanizmalar tam olarak anlaşılmamış olmasına rağmen, hücre dışına çıktıktan sonra, muhtemelen karaciğer ve dalak tarafından alınıp (Şekil 10), makrofajların yardımıyla nükleazlar, DNaz I ve DNaz I tip 3 (DNaz I L3) aktivitesi, tarafından sürekli olarak parçalanır ve böbrek sistemi yoluyla idrarla atılır (Bronkhorst ve ark., 2019; Delmonico ve ark., 2020; Ungerer ve ark., 2020).



Şekil 10: ccfDNA temizlenmesinde görevli organlar (Barbany ve ark., 2019'dan değiştirilerek kullanılmıştır.)

Dolaşımdaki cfDNA'nın yarı ömrünün 16 dakika ile 2,5 saat arasında olduğu tahmin edilmektedir (Bronkhorst ve ark., 2019; Panagopoulou ve ark., 2021; Rahat ve ark., 2020; Ungerer ve ark., 2020). Bu nedenle genellikle yüksek oranda hasar görür ve bozulur. Buna rağmen, ccfDNA'nın hızlı devri, genetik ve genomik değişikliklerin gerçek zamanlı takibi için faydalı olabilir (Stewart ve Tsui, 2018).

ccfDNA'nın hücre yüzeyi reseptörlerine bağlanması pH ve sıcaklığa bağlıdır ve çeşitli maddeler tarafından inhibe edilebilir. Bu nedenle, farklı hücreler tarafından ccfDNA alım hızı, klirens oranını da etkileyebilir (Bronkhorst ve ark., 2019).

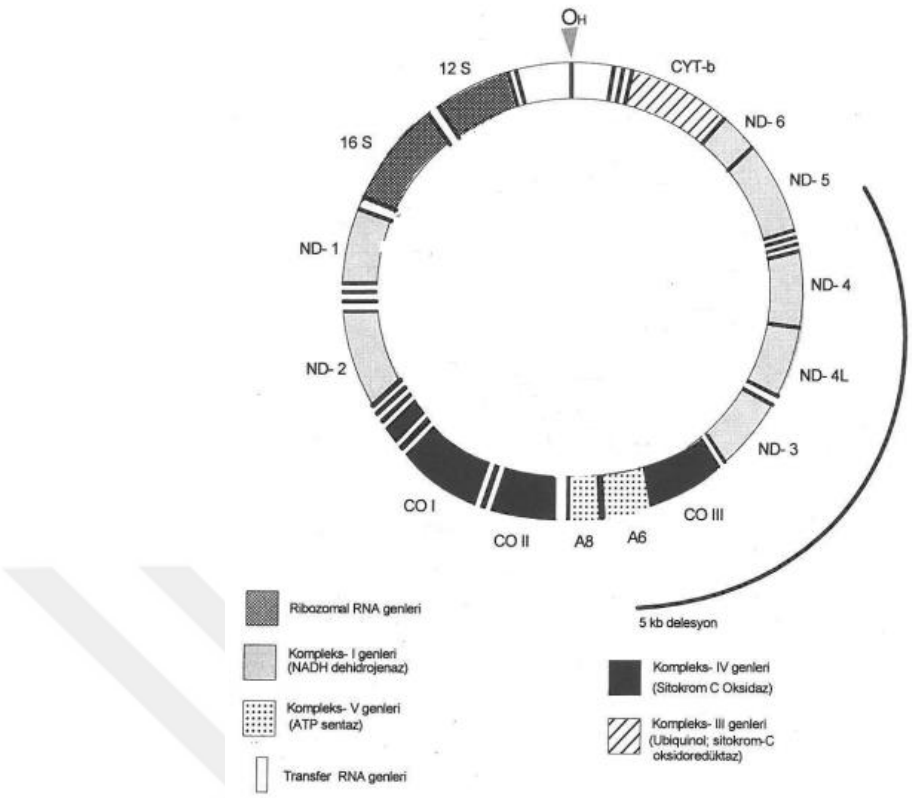
Dolaşan cfDNA'nın yüksek seviyelerinin üretilmesinde bir diğer önemli bileşen, bozulmuş temizleme mekanizmalarıdır. Apoptotik hücrelerin varlığı, yüksek düzeyde etkili temizleme mekanizmaları nedeniyle, yüksek hücresel dönüşüme sahip dokularda bile kısa ömürlüdür. Apoptotik hücre materyalinin uygun şekilde tanınması, temizlenmesi ve bozunması, kontrolsüz inflamasyona ve nihai otoimmüniteye karşı koruyucu bir ortam sağlamak için gereklidir. Fagositoz yoluyla uzaklaştırılmayan apoptotik hücreler (fagositler tarafından alımın bozulması veya

aşırı hücre ölümü nedeniyle) zamanla hücre materyalini sızdırır, bu da iltihaplanma, kendi antijenlerine maruz kalma ve toleransta bozulma ile sonuçlanır (Duvvuri ve Lood, 2019).

4.2.3. Dolaşımdaki mitokondriyal DNA (mtDNA)

Mitokondri, hemen hemen tüm ökaryotik hücrelerde bulunan çift zarlı organeldir ve oksidatif fosforilasyon (OXPHOS) ile ATP üretimi, apoptoz, serbest radikallerin üretimi dahil olmak üzere çok çeşitli hücresel süreçleri düzenler (Filograna ve ark., 2021; Li ve ark., 2021; Weerts ve ark., 2019; Yu, 2011).

İnsan mtDNA'sı ~16,5 kb'lik, intronsuz, çift zincirli (ağır ve hafif), halkasal bir moleküldür ve 37 gen kodlamaktadır. İç zarın içinde dört elektron taşıma zinciri (ETZ) kompleksi vardır. Kompleks II hariç her ETZ kompleksi, mitokondriyal genom tarafından kodlanan genlere sahipken, ETZ alt birimlerinin geri kalanı çekirdek tarafından kodlanır. Mitokondriyal solunum zinciri, 13 mtDNA kodlu proteinden oluşurken, 2 mitokondriyal ribozomal RNA (12S ve 16S rRNA) ve mitokondriyal translasyon için de 22 mitokondriyal taşıyıcı RNA'ları kodlar. Kompleks I, yedi nikotinamid adenin dinükleotit hidrit (NADH) dehidrojenaz alt birimi içerir: NADH dehidrojenaz 1 (ND1), NADH dehidrojenaz 2 (ND2), NADH dehidrojenaz 3 (ND3), NADH dehidrojenaz 4 (ND4), NADH dehidrojenaz 4L (ND4L), NADH dehidrojenaz 5 (ND5) ve NADH dehidrogenaz 6 (ND6); kompleks III, sitokrom B içerir (CYB); kompleks IV üç alt birim içerir: sitokrom oksidaz alt birim I (COX I), sitokrom oksidaz alt birim II (COX II) ve sitokrom oksidaz alt birim III (COX III), kompleks V ise ATPaz 6 ve ATPaz 8 içerir (Şekil 11) (Afrifa ve ark., 2019; Amor ve Hammadeh, 2022; Filograna ve ark., 2021; Kopinski ve ark., 2021; Rai ve ark., 2021; Rygiel ve ark., 2015; Sharma ve Sampath, 2019; Soltesz ve Nagy, 2020; Weerts ve ark., 2019; Yu, 2011; K. Zhou ve ark., 2020).



Şekil 11: Mitokondriyal genom yapısı (Öztaş ve Yakan, 1999)

Mitokondriyal solunum zinciri kompleks I, elektronların solunum zincirine ana giriş noktasıdır ve genel solunumda hız sınırlayıcı adımdır ve ROS üretiminin ana bölgesidir. Bu nedenle, enerji metabolizmasında kritik bir rol oynar. Ayrıca, hücre tipine göre mitokondrilerin yeri ve sayısı değişir. Kompleks I işlevindeki bir değişiklik, mitokondriyal işlev bozukluğuna bağlı olarak hastalığın ortaya çıkması ve gelişmesiyle ilişkilidir (Amor ve Hammadeh, 2022; Sharma ve Sampath, 2019).

Mitokondriyal matrikste, mtDNA molekülleri tek başına değildir, mitokondriyal nükleoidler olarak bilinen DNA-protein yapıları halinde paketlenirler. Mitokondriyal nükleoidlerin ~100 nm çapa sahip olduğunu ve çoğunlukla tek bir mtDNA kopyası içerdiği belirlenmiştir. Nükleoidlerin en bol bulunan yapısal bileşeni, mitokondriyal transkripsiyon faktörü A (TFAM)'dır. mtDNA'ya bağlandıklarında, genomun replikasyon ve transkripsiyon süreçlerine geçişini düzenler (Filograna ve ark., 2021).

mtDNA, koruyucu histon proteinlerinin eksikliği, DNA onarımının sınırlı olması ve reaktif oksijen türlerine fiziksel yakınlığından dolayı nDNA'ya göre daha fazla mutasyona (10-200 kat) yatkındır (Z. Jiang ve ark., 2020; Xu ve ark., 2021; Yu, 2011; K. Zhou ve ark., 2020). Nükleer DNA'nın aksine, mtDNA replikasyonu hücre döngüsünden bağımsızdır (Sharma ve Sampath, 2019; Yu, 2011). mtDNA'daki oksidatif hasar, zar potansiyelinin kaybına, ATP sentezinin azalmasına ve hücre ölümüne yol açabilir (Potenza ve ark., 2011).

mtDNA, mitokondri dışında, sitoplazmaya veya kan dolaşımına salınabilir (Picard). mtDNA'nın nükleer DNA'ya göre nispeten daha kısa uzunluğu, basit organizasyonu ve daha yüksek kopya sayısı nedeniyle, serum ve plazma gibi düşük miktarda toplam DNA içeren sıvı numunelerde tespit edilmesi kolaydır. Bu nedenle, son on yılda cf-mtDNA, çok yararlı, invazif olmayan bir kanser teşhis biyobelirteci olarak ortaya çıkmıştır.

mtDNA'nın fiziksel özellikleri, nükleer DNA kaynaklı ccfDNA kadar kapsamlı bir şekilde incelenmemiştir. İnsan plazmasındaki mtDNA'nın çoğunluğu, çapı en az 0,45 μm olan parçacıklarla ilişkili görünmektedir ve bunun bir kısmı, en az 30 baz çiftine kadar parçalanmıştır. Parçalanmamışsa, mtDNA'nın dairesel yapısı onu enzimatik bölünmeye karşı daha az duyarlı ve dolayısıyla dolaşım içinde daha kararlı hale getirebilir. Hem çekirdekten gelen DNA hem de mtDNA için toplam ccfDNA miktarı, sağlıklı bireylerle karşılaştırıldığında kanser hastalarında sıklıkla artar (Weerts ve ark., 2018).

4.2.3.1. Onkolojide mtDNA

mtDNA kopya sayısı varyasyonları, mtDNA yeniden düzenlemeleri, delesyonlar ve nokta mutasyonları gibi mitokondriyal DNA değişiklikleri çeşitli kanserlerde rapor edilmiştir ve bunların risk faktörleri veya erken teşhis belirteçleri olarak kullanımları araştırılmıştır. Ancak bu tür değişikliklerin hastalığın ilerlemesindeki rolü hala net değildir (Rai ve ark, 2021b; Yu, 2011).

Mitokondriyal metabolizma ile kanser arasında bir ilişkinin varlığı ilk kez 1920'lerin başlarında Otto Warburg tarafından, kanser hücrelerinin enerji ihtiyaçlarını neredeyse sadece aerobik glikoliz yoluyla karşılayabildikleri gözlemine dayanarak

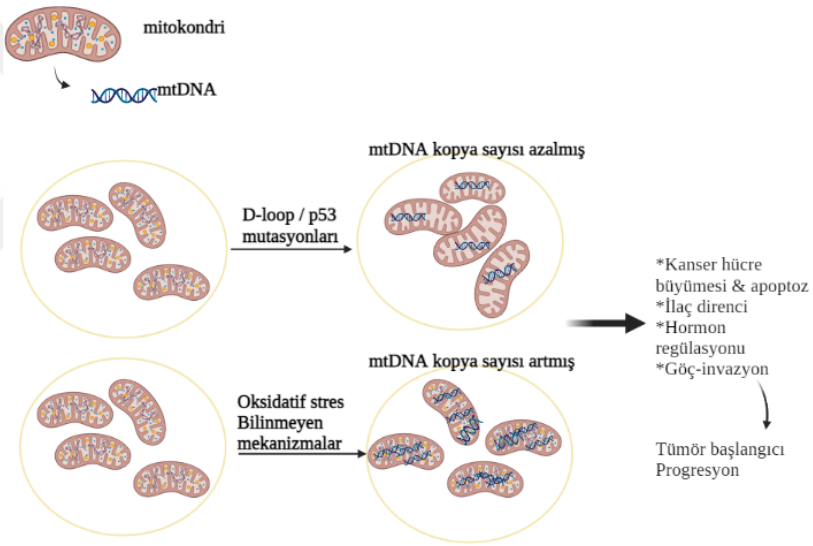
önerildi (Shen ve ark., 2021). Warburg, mitokondriyal solunumdaki bir bozukluğun tümör oluşumunu tetikleyebileceğini öne sürmüştür. Oksijenin yeterli olduğu koşullarda bile tümör hücrelerinin aerobik oksidasyon kullanmak yerine glikozu laktik aside dönüştürmeye daha meyilli olduğunu gözlemleyen Warburg, bunun mitokondriyal fonksiyonun zayıflamasından kaynaklandığını düşünmüştür. Bu fenomen "Warburg etkisi" olarak adlandırılır (Filograna ve ark., 2021; Nguyen ve ark, 2020; Sharma ve Sampath, 2019).

Buna göre ATP, glikoliz tarafından hızlı bir şekilde üretilir ve kanser hücresinin hayatta kalmasını, ilaç direncini ve tümör metastazını destekler. Buna karşılık, OXPHOS glikoz başına 36 ATP üretebilir. Kanser hücrelerinde yüksek glikoliz kullanımı nedeniyle, OXPHOS birkaç kanser türünde down regüle edilir ve birkaç çalışma OXPHOS'un bazı kanserlerde de up regüle edildiğini bulmuştur. Bu bulgular, OXPHOS'un kanser ilerlemesinde ikili rol oynadığını göstermektedir. Mitokondriyal homeostazdaki bir dengesizlik, aşırı reaktif oksijen türleri üretimine neden olur ve bu da DNA hasarına, apoptoza, yaşlanmaya ve kanserin ilerlemesine yol açar (Lin ve ark., 2022; Shen ve ark., 2021).

Teşhis amacıyla, kandaki mtDNA seviyelerinin kanser riski için bir belirteç olabileceği fikrini takip ederek, mtDNA kopya sayısı ile hastalık başlangıcı arasında bir korelasyon bulmaya yönelik birçok çalışma bulunmaktadır. Literatürde kandaki yüksek mtDNA düzeylerinin, papiller tiroit, baş ve boyun kanseri, kolorektal kanserler, yumurtalık kanseri, akciğer kanseri ve prostat kanserinin gelişme riskindeki artışla korele olduğunu belirtirken bazı çalışmalar ise, kemik, böbrek, karaciğer, mide ve meme kanserinde mtDNA içeriğinin çevre dokuya kıyasla tümör dokularında azaldığı bildirilmiştir. Ancak kolorektal karsinom ve meme kanseri geliştirme riski, periferik kanda hem daha yüksek hem de daha düşük mtDNA miktarı ile ilişkilendirilmiştir (Filograna ve ark., 2021; Guha ve ark., 2018; Lee ve ark., 2005; Nguyen ve ark., 2020; Rai ve ark., 2021b; Weerts ve ark., 2018; Weerts ve ark., 2016; Xu ve ark., 2021). Dolayısıyla, halen literatürde kullanılan moleküler yöntemlere, metadolojiye, örnek grubu ve sayısına bağlı olarak elde edilen veriler arasında tutarsızlıklar bulunmaktadır. Bu tür tutarsızlıkların ana nedeni, mtDNA kopya sayısının mitokondriyal fonksiyonlar üzerindeki etkisi araştırılırken aynı

bireylerde bile dokuya özgü değişikliklerin anlaşılmamasıdır (Rai ve ark., 2021). Hem artmış hem de azalmış mtDNA düzeylerinin hastalığın ciddiyeti ile ilişkili olduğunu göstermektedir. Sonuç olarak literatürde, mtDNA kopya sayısındaki değişimlerin kanser türüyle ilişkili olduğu öne sürülmektedir.

Kanser olgularında mtDNA kopya sayısının hücresel ve çevresel faktörlere bağlı olarak değişim gösterebileceği öne sürülmektedir (Guha ve ark., 2018). Örneğin, mutasyonun/varyasyonun olduğu mitokondriyal genom bölgesiyle ilgili yapılan çalışmalar mtDNA D-loop bölgesi mutasyonlarının mtDNA kopya sayısının azalmasına katkıda bulunabileceğini göstermektedir (Şekil 12). Öte yandan kanserlerde mtDNA içeriğindeki artışın, oksidatif stresin artmasıyla ilişkili olabileceği gösterilmiştir (Chatterjee ve ark, 2011; Tekin, 2021).



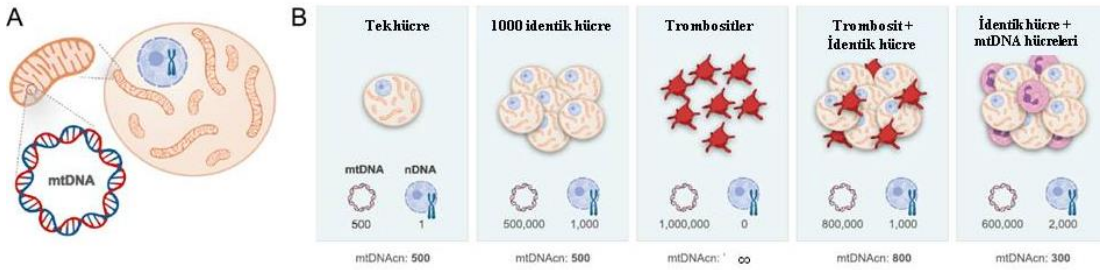
Şekil 12: mtDNA kopya sayısı değişiklikleri Kopya sayısı değişikliklerinin nasıl meydana geldiğini ve kanser gelişimine katkıda bulunan potansiyel mekanizmaları gösteren şematik diyagram. (Yu ve ark., 2011'den değiştirilerek kullanılmıştır.)

Meme kanseri ile ilgili olarak, mtDNA içeriğinin fenotip, prognoz ve ilaç yanıtı üzerindeki etkisi çeşitli çalışmalarda araştırılmıştır. Yapılan araştırmalarda, tüm meme kanseri hastalarının yarısından fazlasının belirgin şekilde azalmış mtDNA kopya sayısına sahip olduğunu göstermektedir (Guha ve ark., 2018; Tseng ve ark., 2006; Xia ve ark., 2014).

Meme kanserinde düşük mtDNA içeriğinin daha agresif bir fenotip ve değiştirilmiş tedavi yanıtları sağlayabileceğine dair göstergeler vardır (Nguyen ve ark., 2020). *İn vitro* modellerde mtDNA'nın tükenmesi, epitelyal-mezenkimal geçişte (EMT) yer alan birkaç genin mRNA ve protein ekspresyon seviyelerini etkiler (Guha ve ark., 2018). Mezenkimal fenotipe geçişin, kanserin yayılmasına katkıda bulunan temel bir mekanizma olacağı ileri sürülmüştür. Sonuç olarak, mezenkimal fenotip için bir belirteç olarak düşük mtDNA içeriği, potansiyel olarak tümör agresifliğini tanımlar (Weerts ve ark., 2016).

4.2.3.2. mtDNA kopya sayısı (mtDNAcn)

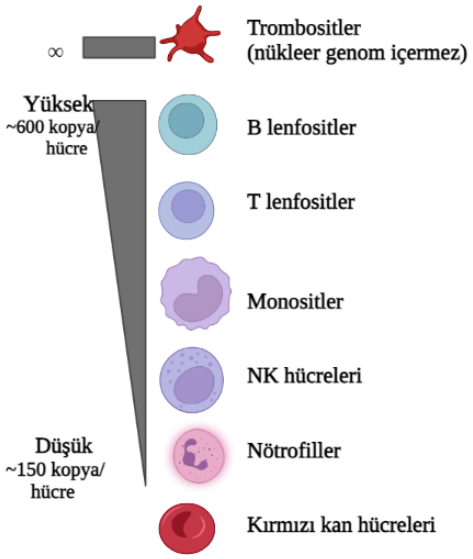
mtDNA'nın özelliği, tek bir mitokondride birden çok kopyasının bulunabilmesi ve birden çok mitokondrinin tek bir hücrede bulunabilmesidir. Hücre başına mtDNA moleküllerinin sayısı (mtDNA içeriği), doku tipleri arasında oldukça değişkendir (Şekil 13) (Filograna ve ark., 2021; Guha ve ark., 2018; Li ve ark., 2021; Picard, 2021; Weerts ve ark., 2019).



Şekil 13: mtDNA kopya sayısı (A) Çekirdeği (mavi) ve çeşitli boyut ve şekillerde sitoplazmik mitokondri içeren hücre şeması. (B) Mitokondriyal biyolojinin DNA tabanlı bir ölçüsü, mitokondriyal DNA kopya sayısıdır (mtDNAcn): çekirdekli hücre başına mitokondriyal genomun kopya sayısı. Farklı senaryolar için temsil edilen mtDNA kopya sayıları. (Picard, 2021'den değiştirilerek kullanılmıştır.)

Genel olarak, mtDNA içeriği, bir hücrenin enerji talebine bağlıdır; örneğin, iskelet kası ve karaciğer hücreleri (yüksek enerji talebi) binlerce mtDNA molekülü barındırırken, kan lenfositleri (düşük enerji talebi) yüzlerce mtDNA molekülü içerir. Bu hücre tipine özgü mtDNA içeriğinin, fizyolojik koşullar altında oldukça kararlı olduğu varsayılır, ancak eksojen toksinler veya viral enfeksiyon gibi stresle değişebilir (Li ve ark., 2021; Weerts ve ark., 2019).

Dokular arasında, mitokondriyal kopya sayısı kalpte ~4–6×10^3, iskelet kaslarında ~1000-3000 kopya, akciğer, karaciğer ve böbrekte 0,5–2×10^3, kan lökositlerinde 500-1000 kopyaya kadar değişir. Beyin gibi spesifik organlarda bile, farklı kortikal ve kortikal altı bölgelerdeki mtDNAcn 2-3 kata kadar değişir. B hücreleri ve hafıza T lenfositleri yüksek mtDNAcn'ye (hücre başına 450-60 kopya) sahipken, nötrofillerde mtDNAcn 100-200'dür. Bir çalışmada ise spermde ~5–50 kopya ve olgun oositlerde ~10^6 kopya olduğu bildirilmiştir (Şekil 14) (Filograna ve ark., 2021; Li ve ark., 2021; Picard, 2021).



Şekil 14: Farklı kan kaynaklı hücrelerde mtDNA kopya sayısı (Picard, 2021'den değiştirilerek kullanılmıştır.)

Belirli bir doku için "tipik" mtDNAcn değerlerinin belirlenmesindeki en önemli zorluklardan biri, bireyler arasındaki doğal değişkenliktir. İnsan lökosit mtDNAcn'si bireyler arasında tipik olarak ~2-3 kat değişir, yoğun atletik antrenman lökosit mtDNAcn'yi 5 kat artırabilir (Filograna ve ark., 2021).

TFAM, mtDNA'yı nükleoidlere paketlemedeki kilit rolüyle tutarlı olarak, mtDNA kopya sayısının da ana düzenleyicisidir. TFAM'nin bozulması, mtDNA seviyelerinde ~%50 azalmaya neden olurken, orta düzeyde bir TFAM aşırı ekspresyonu, mtDNA miktarını ~% 50-100 artırır (Filograna ark., 2021).

Kanda ölçülen mtDNA içeriği; metabolik hastalıklar, diyabet, obezite, nörodejeneratif hastalıklar ve kanser dahil olmak üzere çeşitli hastalıklar için bir risk faktörü olabilir. Mitokondriyal genom, oksidatif stresin neden olduğu DNA hasarına ve mutasyonlara yatkındır. mtDNA mutasyonları, mitokondriyal işlev bozukluğu ile başa çıkmak için olası bir telafi edici mekanizma olarak artan mtDNA kopya sayısı ile ilişkilidir (Campa ve ark., 2018).

Sonuç olarak, mutlak mtDNAcn, organizmanın genel bir özelliği değildir ve analiz edilen doku ve hücre tipine bağlıdır (Li ve ark., 2021). Benzer şekilde, plazma mitokondriyal kopya sayısındaki değişiklikler, katı tümörler, kas-iskelet sistemi, otoimmün ve bulaşıcı hastalıklarda bireysel riski değerlendirmek için prognostik değere sahiptir.

4.2.3.3. mtDNA kopya sayısı hesaplanması

Her ne kadar mtDNA kopya sayısı hücre tipine göre farklılık göstersede, aynı bireydeki farklı hücre tiplerindeki mtDNA kopya sayıları arasında iyi bir korelasyon olduğu gözlemlenmiştir. Bu nedenle, kandaki mtDNA kopya sayısının ölçülmesi, ortalama mitokondri sayısını tahmin etmek için güvenilir ve invazif olmayan bir yöntem olarak önerilmiştir (Campa ve ark., 2018).

En az 13 mitokondriyal gen ve D-Loop içeren kodlayıcı olmayan kontrol bölgesi (NCR), mtDNAcn belirlemesi için kullanılmıştır. Bunların arasında NADPH dehidrojenaz alt birimi 1 (ND1), sitokrom B ve sitokrom oksidaz I (COXI) en yaygın olarak kullanılanlardır (Li ve ark., 2021).

Bu proteinlerin bozulmuş işlevselliği, solunum zincirinde elektron taşınmasını yavaşlatır, radikal türlerin üretimini arttırır ve OXPHOS'tan glikolize metabolik geçişi destekler (Sepulveda-Villegas ve ark., 2020).

4.2.3.3.1. mtND1 ve mtND4

Mitokondriyal olarak kodlanmış NADH dehidrojenaz alt birimi 1 (mt-ND1), solunum kompleksi I'in yedi alt biriminden birini kodlar ve oksidatif fosforilasyonun (OXPHOS) elektron taşıma zincirinin ilk adımında yer alır (Campa ve ark., 2018).

ND4 alt birimleri genellikle kompleks I'de eksiktir ve mtDNA hasarının yaygın bir göstergesidir. mtDNA halkası boyunca delesyonlar için sıcak nokta konumları vardır ve bunların %90'ı nikotinamid adenin dinükleotit dehidrojenaz 4 (ND4) dizisinin delesyonudur. En sık görülen delesyon, birincil mitokondriyal hastalıklara neden olan ancak aynı zamanda kanser, kas atrofisi ve nörodejenerasyon gibi yaşa bağlı hastalık duyarlılığı ile ilişkili olan "ortak delesyon" olarak adlandırılan 4977 bp'lik bir silinmedir. Ortak delesyon, tüm tRNA genlerinin ve ND4 dahil 7 solunum kompleksi alt birim geninin kaybıyla ilişkilidir. Kanser gibi hastalıklarda 4977 bp ortak delesyon, oksidatif stres ile ilişkilidir ve canlı bir mitokondri popülasyonunu yansıtır, ancak zayıf mtDNA bütünlüğüne sahiptir (Campa ve ark., 2018; Jiang ve ark., 2020).

Buna karşılık, ND1 alt birimlerinin kaybı, solunum kompleksi I ve mitokondrinin kendisi üzerinde çok daha zararlı bir etkiye sahiptir; elektron taşıma bileşenlerinde bir değişikliğe neden olabilir ve normal elektron akışına zarar vererek süperoksidaz radikal oluşumunun artmasına ve çeşitli kanser hücrelerinde oksidatif stresin artmasına neden olabilir. Buna yönelik canlı mitokondri de ND1 silmelerini nadir hale getirir (tek delesyonlu vakaların %94'ünde ve çoklu mtDNA delesyonlu vakaların %100'ünde kalan genomda bulunur) (He ve ark., 2002).

Bu nedenle nadiren silinen ND1 kopya sayısı, toplam mtDNA kopya sayısı için uygun bir belirteçtir ve ND4/ND1 oranı, bozulmamış mtDNA'nın oranını değerlendirmek için kullanılabilir; daha yüksek bir değer, daha düşük bir ND4 gen silinmesi derecesini gösterir. mtDNA delesyonlarını ölçmek için de, delesyonun sıklıkla meydana geldiği ve mtDNA hasarının bir belirteci olan mitokondriyal gen ND4 kullanılmaktadır (Campa ve ark., 2018; Jiang ve ark., 2020; Rygiel ve ark., 2015; Xu ve ark., 2021).

4.3. Epitelyal Mezenkimal Geçiş (EMT)

EMT, daha önce tamamen epitelden (E) tamamen mezenkimal (M) fenotiplere ikili bir geçiş olarak kabul edilmiştir. Genellikle epitelyal belirteç E-cadherin'in kaybı ve mezenkimal belirteç vimentinin ekspresyonunun kazanılmasıyla tanımlanır. Bununla birlikte, son araştırmalar, EMT'nin, epitelyal ve mezenkimal hücreler arasında farklı

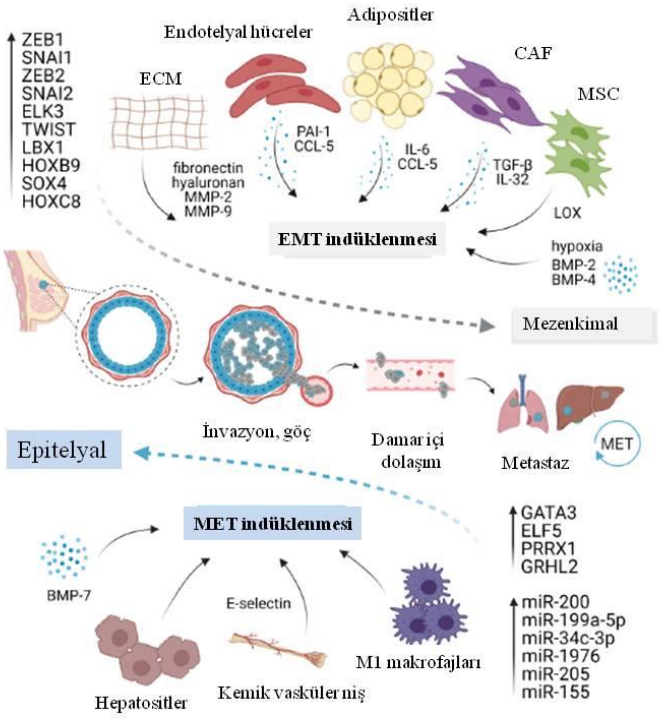
seviyelerde epitelyal ve mezenkimal belirteçleri eksprese eden, ara morfolojik, transkripsiyonel ve epigenetik özellikler sergileyen birkaç hücresel durumla karakterize edilen kademeli bir şekilde meydana geldiğini göstermektedir. Epitelyal ve tamamen mezenkimal durumlar arasındaki bu durumlar; kısmi, eksik veya hibrit EMT durumları olarak anılmıştır. Hücrelerin bu tür ara fenotipleri benimseme ve çeşitli ara durumlar arasında hızla hareket etme yeteneğini tanımlamak için "epitelyal-mezenkimal plastisite" teriminin kullanılması önerilir (Şekil 15) (Kvokačková ve ark., 2021; Pastushenko ve Blanpain, 2019; Taki ve ark., 2021).

Klasik EMT, epitel hücrelerinin hücre-hücre adezyonunu kaybettiği ve mezenkimal özellikler kazandığı hücresel bir süreç olsa da, EMT sırasında hücre proliferasyonu, apoptoz, ve immün baskılama dahil olmak üzere EMT ile ilişkili çeşitli değişiklikler meydana gelir (Pastushenko ve Blanpain, 2019). Bu EMT ile ilişkili değişiklikler çoğunlukla, EMT'nin yürütülmesinde önemli roller oynayan Akt2 ve TWIST1 dahil olmak üzere EMT transkripsiyon faktörleri (EMT-TF) tarafından tetiklenir ve düzenlenir (Taki ve ark., 2021).

Hücre dışı sinyaller (TGFβ, EGF, PDGF, VEGF, WNT ve Notch), dış ajanlar (UV ışığı veya alkol) ve tümör mikroçevresindeki hipoksi gibi patolojik durumlar EMT-TF'leri aktive edebilir. EMT-TF'ler, klasik EMT'de açıklandığı gibi hücre-hücre adezyonunu, hücre göçünü ve hücre dışı bozulmayı düzenler; üstelik, bu TF'ler aynı zamanda hücre proliferasyonu, apoptoz, gövde ve immünosupresyon gibi diğer hücresel fonksiyonlarda yer alır; bu, EMT-TF'lerin kanser başlangıcında, metastazda ve terapi direncinde pleiotropik, tek bir genin birden fazla fenotipik özelliği etkilemesi, roller oynadığını ve hem epitelyal hem de epitelyal olmayan tümörlerde kötü prognoz ile ilişkili olduğunu gösterir (Taki ve ark., 2021).

EMT programının kanserdeki rolü tartışmalıdır. Tümör mikroçevresi, kanserle ilişkili fibroblastlardan, endotelyal hücrelerden ve çeşitli tipte bağışıklık hücrelerinden oluşur. Primer tümörün başlaması, ilerlemesi ve metastazında EMT ve mezenkimal-epitelyal geçiş (MET) gibi geçiş durumlarında kanser hücresi kimliği ve plastisitesi gereklidir. EMT, MET ve kısmi durumun fonksiyonel rolleri, tümörün tipine, yayılma durumuna ve metastatik kolonizasyon derecesine göre değişebilir. Bağışıklık hücreleri de dahil olmak üzere hücrelerin çoğu, tümörün ilerlemesi için EMT'yi

düzenlemek üzere sitokinler ve kemokinler salgılar. EMT'ye tabi tutulan tümör hücreleri, tümör mikroçevresinin immünosupresif durumunu baskılamak için immünosüpresif sitokinler veya kemokinler de üretebilir, bu da kanser gelişimine katkıda bulunur (Bakir ve ark., 2020; Taki ve ark., 2021).



Şekil 15: Meme kanserinde EMT/MET plastisitesi EMT, tümör mikroçevresinde bulunan farklı stromal hücreler, ECM elemanları ve hipoksi tarafından salgılanan proinflamatuar sitokinler ve moleküller tarafından indüklenir. Makrofajlar veya hepatositler gibi farklı hücre tipleri MET'i aktive edebilir. Her program, belirli bir dizi transkripsiyon faktörü ve/veya karşılık gelen miRNA'lar aracılığıyla yürütülür. EMT ve mezenkimal fenotipin (gri) aktivasyonu, kanser hücrelerine göç etme, istila etme, damar içine girme, dolaşımda hayatta kalma ve uzak bölgelerde damar dışına çıkma yeteneği verir. İkincil organlarda, mezenkimal hücreler MET aracılığıyla epitel durumuna (mavi) geri dönerek makrometastaz oluşturma yeteneğini yeniden kazanır. CAF: kanserle ilişkili fibroblastlar; MSC: mezenkimal stromal hücreler; ECM: hücre dışı matris; MMP: matris metalloproteinaz; LOX: lisil-oksidaz. (Kvokačková ve ark., 2021'den değiştirilerek kullanılmıştır.)

4.3.1. Tümör ilerlemesinde EMT'nin rolü

Kanser, hücrelerin E-kadherin, α-katenin ve γ-katenin gibi epitelyal belirteçleri kaybetmesine neden olurken fibronektin, vimentin ve N-kadherin gibi mezenkimal belirteçler kazanmasına yol açar. Kanser hücreleri, EMT indüksiyonu açısından bir "eşik noktasını" geçerlerse epitelyal olmaya geri dönemeyebilirler ve sıklıkla kombine epitelyal ve mezenkimal özelliklere sahip bir hibrit veya kısmi EMT fenotipinde bulunabilir. Kısmi EMT fenotipine sahip bireysel hücreler, EMT'yi tam

olarak tamamlamaz ve hem epitelyal belirteçleri hem de mezenkimal belirteçleri eksprese ederler. Bu değişiklikler, epitelyal kanser hücrelerinin daha fazla invazivlik ve metastatik yetenekler kazanmasını sağlar (Elzamly ve ark., 2018; Kvokačková ve ark., 2021).

EMT biyobelirteçlerinden biri olan TWIST, temel bir helix-loop-helix transkripsiyon faktörüdür. Primer tümörlerde TWIST ekspresyonu ile meme kanserinde nüks riski ve kötü sağkalım arasında pozitif bir ilişki gösterilmiştir. Ayrıca, yakın zamanda TWIST eksprese eden CTC'lerin meme kanserli hastalarda sıklıkla gözlemlendiğini bildirilmiştir, bu da kanser hücrelerinin damar istilası, dolaşım ve metastatik bölgelere göç sırasında EMT'ye maruz kalabileceğini göstermektedir (Papadaki ve ark., 2014).

Son çalışmalar, meme kanserinde CSC'ler ve EMT arasında doğrudan bir bağlantı olduğunu göstermiştir, bu da EMT'nin kök hücre benzeri özelliklere sahip kanser hücreleri ürettiğini düşündürmektedir. Kök hücre ve EMT belirteçlerinin mRNA ekspresyon seviyesinde birlikte ekspresyonu, meme kanseri hastalarının CTC'lerinde gösterilmiştir (Papadaki ve ark., 2014).

5. GEREÇ ve YÖNTEM

5.1. Kullanılan Cihaz ve Kimyasallar

Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Laboratuvarında kullanılacak mevcut olanaklar ve kimyasallar aşağıda listelenmiştir;

- LightCycler 480, Roche (Almanya)
- Nanodrop ND-1000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)
- Buzdolabı, Arçelik (Türkiye)
- Derin Dondurucu -20 ºC, Philco (Türkiye)
- Derin Dondurucu -80 ºC, Thermo 702 (A.B.D.)
- Mikrosantrifüj, IEC Micro-MB (ABD)
- Mikrosantrifüj, Heraeus Biofuge® B (Almanya)
- Otoklav, All American (ABD)
- Otomatik Mikropipetler, Gilson (Fransa)
- Spektrofotometre, Ultraspec 3300 pro Biochrom Ltd. (İngiltere)
- Vorteks, Elektro-Mag (Türkiye)
- Vorteks, IKA (A.B.D)
- Thermo-Isısal Döngü Cihazı (A.B.D)
- LightCycler 480 SYBR Green I Master kit, ABM (Kanada)
- LightCycler 480 Multiwell Plaka 96 4-TİTUDE (Almanya)
- HP PZR Template Preparation Kit ROCHE (Almanya)
- 200 ul DNase, RNase, Pyrogen Free Pipet Ucu, 1000 ad/pk AXYGEN
- 50 mL, DNase, RNase, Pyrogen Free, Falkon Tüp, 25 ad/pk AXYGEN
- 0.2 mL, DNase, RNase, Pyrogen Free, PZR Tüpü, 1000 ad/pk AXYGEN
- 0,1-10 ul RT-10F Liftoffcvr Filreli Pipet Ucu, 96×10 ad/pk, RAININ
- 10-100 ul RT-100F Liftoffcvr Filreli Pipet Ucu, 96×10 ad/pk, RAININ
- 100-1000 ul RT-1000F Liftoffcvr Filreli Pipet Ucu, 96×10 ad/pk, RAININ
- 2 mL DNase, RNase, Pyrogen Free Mikrotüp, 500 ad/kt AXYGEN
- QIAmp DNA Mini Kit (50), QIAGEN (Almanya)

5.2. Çalışma Grubunun Belirlenmesi

Bu çalışma daha önce tamamlanmış olan ve yürütücülüğünü Prof. Dr. Mustafa Akkiprik'in yaptığı bir TÜBİTAK 1001 projesi (115S272) (M.Ü. Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurul protokol kodu: 09.2019.283) kapsamında toplanan 36 hastanın kan örnekleri kullanılarak yapılmış olup, retrospektif bir çalışma olarak planlanmıştır. Elde edilen kan örnekleri santrifüjlenerek plazma olarak -80 derecede saklanmıştır. Saklanan bu plazma örnekleri çalışmaya dahil edilmiştir. Tez çalışmasının etik açıdan uygunluğu, Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nca incelenmiş ve oy birliğiyle onaylanmıştır (Etik kurul protokol kodu: 09.2022.246).

5.3. Plazmadan DNA İzolasyonu

Üreticinin talimatlarına göre bir QIAamp DSP Virus Spin Kit (Qiagen, Hilden, Almanya) kullanılarak DNA izolasyonu gerçekleştirildi. DNA izolasyonu için sırasıyla aşağıdaki adımlar uygulandı;

1. 25 µl QIAGEN Proteazı (QP) bir lizis tüpüne (LT) alındı ve üzerine 200 µl plazma eklendi.
2. Plazma üzerine 200 µl AL tamponu eklendi. (28 µg/ml taşıyıcı RNA içerir). ≥15 sn. boyunca vorteks ile karıştırıldı. Etkin liziz sağlamak için numune ve AL tamponu homojen bir çözelti verecek şekilde iyice karıştırılmasına dikkat edildi.
3. Bir ısıtma bloğunda 56°C ± 3°C'de 15 dakika inkübe edildi.
4. Kapağın iç kısmındaki damlaları gidermek için lizis tüpü kısaca santrifüjlendi.
5. Numuneye 250 µl etanol (%96-100) eklendi ve ≥15 sn. boyunca vorteks ile iyice karıştırıldı. Lizatı etanol ile oda sıcaklığında (15–25°C) 5 dakika ± 30 sn. inkübe edildi.
6. Kapağın iç kısmındaki damlaları gidermek için tüp kısa süre santrifüjlendi.
7. Adım 7'deki lizatın tamamı QIAamp MinElute kolonuna dikkatlice alındı. >1 dakika boyunca yaklaşık 6000xg'de santrifüjlendi. QIAamp MinElute kolonu 2 ml'lik temiz bir yıkama tüpüne (WT) yerleştirildi ve filtratı içeren yıkama tüpü atıldı.

8. Kolon dikkatlice açıldı ve kenarı ıslatmadan 500 µl Buffer AW1 eklendi ve yaklaşık 6000 x g'de ≥1 dakika santrifüjlendi. Kolon 2 ml'lik temiz bir yıkama tüpüne yerleştirildi ve filtreden geçmiş sıvıyı içeren yıkama tüpü atıldı.
9. Tekrardan kenarını ıslatmadan 500 µl Buffer AW2 eklendi ve >1 dakika boyunca yaklaşık 6000 x g'de santrifüjlendi. QIAamp MinElute kolonu 2 ml'lik temiz bir yıkama tüpüne yerleştirildi ve filtreden geçmiş sıvıyı içeren yıkama tüpü atıldı.
10. 500 µl etanol (%96-100) eklendi. >1 dakika boyunca yaklaşık 6000 x g'de santrifüjlendi. Filtreden geçmiş sıvıyı içeren yıkama tüpü atıldı.
11. Kolon temiz 2 ml'lik bir yıkama tüpüne yerleştirildi. Membranı tamamen kurutmak için 3 dakika ± 30 s boyunca tam hızda (yaklaşık 20.000 x g) santrifüjlendi.
12. Yeni bir 2 ml yıkama tüpüne kolon yerleştirildi ve membranı tamamen kurutmak için 56°C ± 3°C'de 3 dakika ± 30 sn. inkübe edildi.
13. Son olarak kolon bir elüsyon tüpüne (ET) yerleştirildi ve yıkama tüpü atıldı. Membran merkezine 20–150 µl Tampon AVE uygulandı. Oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi. > 1 dakika boyunca tam hızda (yaklaşık 20.000 x g) santrifüjlendi.
14. Tüpün içinde kalan materyal tüm çalışmalar için uygun hale getirilmiş izole DNA'dır ve diğer deneylerde kullanılana kadar -20 ºC'de saklanmıştır.

5.4. Eş Zamanlı PZR (RT-PZR) Yöntemiyle ccfDNA seviyesi ve mtDNA kopya sayısı hesaplanması

Kantitatif RT-PZR, gen düzeyi ölçümünde rutin olarak kullanılır. Uygulaması kolay, kesin sonuçlar veren ve hassasiyeti yüksek bir uygulamadır. Amplifikasyon ve analiz eş zamanlı yürütülür. Diğer kantitatif metodlarla karşılaştırıldığında verim daha yüksektir. Temel olarak amplifikasyonun ürünlerini aynı zamanda sayısal değerlere dönüştürerek ölçme ve devam eden PCR reaksiyonunu ekranda izleyerek reaksiyon gidişatını izlemeye dayanmaktadır.

Bu amaçla floresan renk veren boya ya da problar kullanılır ve bunları saptayabilen thermal cycler olarak adlandırılan ısı döngü aygıtları kullanılır. En sık kullanılan

boya çeşidi SYBR Green I'dir ve çift iplikli DNA molekülüne bağlanır. Uzama aşamasında primerin bağlanıp, hedef DNA'nın çift sarmal hale gelmesiyle DNA'ya bağlanan SYBR Green miktarı artış gösterir ve buna bağlı olarak yayılan floresan miktarı da artar. SYBR Green boyasından alınan ışımanın eşik değeri aştığı noktaya Ct değeri adı verilmektedir.

Diğer yandan floresan boya hedeflenen bölge dışında bir primer dimerine yada yanlış bağlanma ürününe özgül olmayan şekilde bağlanabilir. Bu nedenle oluşan ürünün hedef DNA çoğaltımı mı yoksa primer dimeri sonucu mu oluştuğunu anlamak gerekirse özgül primerin seçimini yapmak önemlidir. Bunun için erime eğrisi "melting curve" analizi uygulanır.

Bu çalışmada DNA örneklerinden dolaşımdaki hücresiz DNA ve mtDNA ve nDNA'nın eş zamanlı ölçümü için bu işlem gerçekleştirilmiştir. BlasTaq 2X SYBR Green Master Mix (abm Good) kullanılarak ALU115, ALU247, mt-ND1, mt-ND4 ve GAPDH'ye özgü primerler ile RT-PZR yapılmıştır.

ccfDNA seviyeleri, RT-PZR sonucu elde edilen Ct değerleri ile Bölüm 5.5'de anlatıldığı şekilde hesaplanır.

Buna karşılık mtDNA kopya sayısı ise, hedef ve referans gene ait çoğaltılan DNA'ların miktar değerlendirmesi kantifikasyon yöntemi kullanılarak farklılık oranları nicel olarak ortaya konarak hesaplanır. Bu yönteme delta Ct adı verilmektedir. Hedef genin eşik değeri (Ct), referans genin Ct değerine göre normalize edilir. Gen ekspresyon düzeyleri $2^{-\Delta Ct}$ formülü kullanılarak hesaplandı ve relatif kantifikasyon değerleri belirlendi (Quiros ve ark., 2018).

Bölüm 4.2.3.3.1'de bahsettiğimiz gibi, ND1 alt birimlerinin kaybı, mitokondrinin kendisi üzerinde çok daha zararlı bir etkiye sahip olduğundan canlı mitokondride ND1 delesyonunu nadir hale getirir. Delesyonun sıklıkla meydana geldiği ND4 ise mitokondriyal hasarla ilişkilendirilmiştir.

Bu bilgilere dayanarak mtDNA kopya sayısı, delesyon seviyesi ve bütünlük indeksi delta Ct metodu ile şu şekilde hesaplanmıştır;

mtDNA kopya sayısı (ND1) : $2^{-\Delta Ct}$

: $2^{-(CtND1 - CtGAPDH)}$

mtDNA delesyon seviyesi (ND1/ND4) : $2^{-\Delta Ct}$

: $2^{-(CtND1 - CtND4)}$

Tablo 2: Çalışmada kullanılan primer dizileri

GAPDH	F	5-CCCCACACACATGCACTTACC-3
	R	5-CCTAGTCCCAGGGCTTTGATT-3
MT-ND1 (Sharma ve ark.,2021)	F	5-ATGGCCAACCTCCTACTCCT-3
	R	5-GGGCCTTTGCGTAGTTGTAT-3
MT-ND4 (genome.ucsc.edu)	F	5-GATGAGGCAACCAGCCAGAA-3
	R	5-GTAGGGGAAGGGAGCCTACT-3
ALU 115 (Hao ve ark., 2014; Vizza ve ark., 2018)	F	5-CCTGAGGTCAGGAGTTCGAG-3
	R	5-CCCGAGTAGCTGGGATTACA-3
ALU 247 (Hao ve ark., 2014; Vizza ve ark., 2018)	F	5-GTGGCTCACGCCTGTAATC-3
	R	5-CAGGCTGGAGTGCAGTGG-3

PZR reaksiyonuna eklenecek DNA miktarı, ön denemelerle optimize edilerek her reaksiyonda 1 µl DNA kullanılmasına karar verildi. PZR reaksiyon karışımı Tablo 3'te göre hazırlandı. Çalışmada 96 kuyulu plakalar kullanıldı. Deneyler gerçek zamanlı PZR cihazında (LightCycler 480, Roche) gerçekleştirildi. Gerçek zamanlı PZR cihazında girilen program Tablo 4'te verilmiştir.

Tablo 3: RT-PZR içeriği

	Reaksiyon için gerekli son konsantrasyon	Kuyu başına gereken miktar
Distile su		8 µL
Primer F (10 µM)	0,25 µM	0,5 µL
Primer R (10 µM)	0,25 µM	0,5 µL
Master mix (2x)	1X	10 µL
Genomik DNA		1µL
		Son Hacim: 20 µL

Tablo 4: RT-PZR program akışı

	Döngü Sayısı	Sıcaklık	Süre
Denatürasyon	1	95 ºC	3 dk
Amplifikasyon	50	95 ºC	15 sn.
Primer Bağlanması		60 ºC	1 dk
Uzatma		95 ºC	-
Erime Eğrisi	1	95 ºC 40 ºC 90 ºC	1 dk 20 sn. -
Soğutma	1	4 ºC	

5.5. Mutlak ccfDNA Ölçümü

Her numunedeki mutlak eşdeğer cfDNA miktarı, sağlıklı bir donör gönüllünün periferik kanından elde edilen genomik DNA'nın seri dilüsyonları (10, 1, 0,1, 0,01, 0,001) ile oluşturulan bir kalibrasyon eğrisi kullanılarak belirlendi. Her reaksiyonda bir negatif kontrol kullanıldı. Oluşturulan kalibrasyon eğrisinin denklemi kullanılarak, PZR sonucu elde edilen ALU değerleri ng/µL cinsinden hesaplandı.

5.6. ccfDNA ve mtDNA Bütünlük Ölçümü

İntegrite indeksi olarak adlandırılan ccfDNA bütünlüğünün derecesi, uzun ve kısa ccfDNA fragmanları arasındaki orana dayanmaktadır ve son zamanlarda yüksek duyarlılığı nedeniyle umut verici bir spesifik onkolojik biyobelirteç olarak önerilmiştir. Son yıllarda, Alu eş zamanlı PZR, DNA bütünlüğünü tespit etmek için kullanılan en yaygın yöntemdir (Vizza ve ark., 2018).

Bu çalışmada cfDNA bütünlüğü, 2 primer seti (ALU247-ALU115) kullanılarak PZR sonucu elde edilen mutlak ccfDNA miktarlarının oranı olarak hesaplandı;

ccf-DNA bütünlük indeksi = ALU247 (ng/µL) / ALU115 (ng/µL)

ND4/ND1 oranı, bütün haldeki ccf-mtDNA oranını değerlendirmek için kullanılabilir. (Jiang ve ark., 2020) Bu çalışmada, mtDNA bütünlüğü, ND1 ve ND4 primer setinin $2^{-\Delta Ct}$ formülü sonucu elde edilen miktarları oranlanarak hesaplandı. ND4/ND1 oranının aldığı daha yüksek bir değer, daha düşük bir ND4 gen delesyonunun derecesini belirtir (Jiang ve ark., 2020).

mtDNA bütünlük indeksi (ND4/ND1) : $2^{-\Delta Ct}$

: $2^{-(CtND4 - CtND1)}$

yada : $2^{-(CtND4-CtGAPDH)} / 2^{-(CtND1-CtGAPDH)}$

5.7. İstatiksel Analiz

İstatistiksel testler parametrik testler ve parametrik olmayan (non-parametrik) testler olmak üzere kabaca iki tipe ayrılır. Normal dağılıma uyan verileri parametrik testler, normal dağılıma uymayan verileri ise non-parametrik testler ile analiz edilmiştir.

Bu çalışmada, neoadjuvan kemoterapi almış hastaların tedavi öncesi, tedavi sonrası ve kontrol grubu arasında; ccfDNA seviyesi, ccfDNA bütünlüğü, mtDNA kopya sayısı ve mtDNA bütünlüğü açısından incelemek için SPSS17.0 programı kullanılmıştır ve istatistiksel değerlendirmelerde aksi belirtilmedikçe, anlamlılık düzeyi $p<0,05$ olarak kabul edilmiştir.

Öncelikle bizim verilerimiz normal dağılıma uymadığı için non-parametrik bir test olan Wilcoxon İşaretli Sıralar Testi uygulanmıştır. Buna göre aynı veri kaynağından elde edilmiş olan iki ölçüm sonuçları arasında farklılık olup olmadığını test eder. İkinci olarak, elimizdeki tüm verileri değerlendirmek için yine non-parametrik bir test olan Mann-Whitney U Testi yapılmıştır. Bu teste göre iki bağımsız grup arasındaki farkın anlamlı olup olmadığı test edildi.

6. BULGULAR

Bu çalışmada, neoadjuvan kemoterapi alan lokal ileri meme kanserli, tedavi öncesi 34 kadın, tedavi sonrası 30 kadın hastadan ve kontrol grubu olarak yaş uyumlu 21 kadın sağlıklı gönüllüden kan örneklerinden plazma elde edildi. Hastaların yaş ortalaması 50,35'dir (32-80). 50 yaşın üzerinde olan hasta sayısı 16'dır.

34 meme kanserli hastanın 26'sı (%76,4) invaziv duktal karsinoma sahipken diğer hataların histolojik özelliği Tablo X'de belirtilmiştir. Aynı şekilde ER, PR, HER2 ve hastalarla ilgili diğer parametreler Tablo 5'te belirtilmiştir. Tabloda belirtilen sayılar, 34 hastadan sadece klinik verilerine ulaşılabilen kişi sayısını göstermektedir.

Tablo 5: Meme kanserli hastaların klinik özellikleri

Parametreler	Kişi Sayısı	Parametreler	Kişi Sayısı
Yaş		**Node**	
>50	17	Pozitif	28
<50	16	Negatif	5
Menapoz		**ER**	
Pre	17	ER(+)	23
Post	16	ER(-)	10
Grade			
G0	22	**PR**	
G1	2	PR(+)	13
G2	6	PR(-)	20
G3	3		
Moleküler Alt Tip			
Luminal A	7	**HER2**	
Luminal B	16	HER2(+)	12
TNBC	5	HER2(-)	21
HER2 Enriched	5		
Histolojik Alt Tip			
İnvaziv Duktal Karsinom	26		
İnvaziv Lobüler Karsinom	2	**Lenfatik İnvazyon**	
İnvaziv Meme Karsinom	2	Var	13
İnvaziv Müsinöz Karsinom	1	Yok	6
Medüller Benzeri Karsinom	2		
Tümör Büyüklüğü			
T1	4	**Masküler İnvazyon**	
T2	19	Var	1
T3	5	Yok	18
T4	4		

6.1. Tedavi Öncesi ve Sonrası ccfDNA Miktarı ve Bütünlük İndeksi

Plazma örneklerinden elde edilen ccfDNA'lar ALU 247 ve ALU 115 primerleriyle RT-PZR yöntemi ile analiz edilmiştir. Her numunedeki mutlak eşdeğer ccfDNA miktarı, oluşturulan kalibrasyon eğrisi ve RT-PZR sonucu elde edilen Ct değerleri kullanılarak hesaplanmıştır.

ALU 115 bp primerlerinden elde edilen kantitatif değerler, toplam ccfDNA seviyesini (ng/uL) temsil ederken, daha uzun fragmanların daha kısa parçalara oranı (ALU247/ALU115) her numunede ccfDNA'nın bütünlüğünü gösterir (Tablo 6 ve 7).

Tablo 6: Tedavi öncesi ve sonrası ALU247, ALU115 ve ALU247/115 sonuçları

	Tedavi Öncesi			Tedavi Sonrası			
Örnek İsmi	**ALU247 ng/µL**	**ALU115 ng/µL**	**ccfDNA bütünlük indeksi**	**Örnek İsmi**	**ALU247 ng/µL**	**ALU115 ng/µL**	**ccfDNA bütünlük indeksi**
H1	0,28	0,49	0,57	**H1T1**			
H2				**H2T1**	0,46	0,72	0,64
H3				**H3T1**	0,56	0,69	0,81
H4	0,35	0,49	0,73	**H4T1**	1,21	1,46	0,83
H5	0,25	0,38	0,65	**H5T1**	0,45	0,81	0,55
H6	0,57	0,64	0,89				
H7	0,47	0,61	0,76	**H7T1**	0,71	0,84	0,85
H8	0,26	0,37	0,70	**H8T1**	0,47	0,86	0,54
H9	0,25	0,38	0,66	**H9T1**	0,63	1,09	0,58
H10	1,54	1,52	1,01	**H10T1**	0,97	1,17	0,83
H11	1,28	1,59	0,80	**H11T1**	0,78	1,26	0,62
H12	0,30	0,56	0,54	**H12T1**	1,84	2,47	0,75
H13	0,84	1,37	0,61	**H13T1**	1,09	1,66	0,66
H14	0,39	0,75	0,52	**H14T1**			
H15	0,25	0,66	0,38	**H15T1**	0,67	1,29	0,52
H16	0,50	0,76	0,65	**H16T1**	0,80	1,66	0,48
H17	0,39	0,76	0,52	**H17T1**	0,77	1,05	0,74
H18	0,38	0,86	0,45	**H18T1**	0,67	0,93	0,73
H19	0,68	0,69	0,99	**H19T1**	0,47	0,60	0,78
H20	0,42	0,76	0,55	**H15T1**			
H21	1,18	1,17	1,00	**H21T1**	1,64	1,21	1,35
H22	1,27	1,20	1,06	**H22T1**	1,54	1,47	1,05

Tablo 6: Tedavi öncesi ve sonrası ALU247, ALU115 ve ALU247/ALU115 sonuçları (devam)

	Tedavi Öncesi				Tedavi Sonrası		
Örnek İsmi	**ALU247 ng/µL**	**ALU115 ng/µL**	**ccfDNA bütünlük indeksi**	**Örnek İsmi**	**ALU247 ng/µL**	**ALU115 ng/µL**	**ccfDNA bütünlük indeksi**
H23	1,07	1,00	1,06	**H23T1**	0,55	0,72	0,77
H24	1,76	1,93	0,91	**H24T1**	0,65	1,01	0,64
H25	2,23	1,34	1,66	**H25T1**	0,94	1,39	0,68
H26	0,58	0,77	0,75	**H26T1**	0,67	1,01	0,66
H27	0,46	0,51	0,91	**H27T1**	0,65	0,76	0,86
H28	0,47	0,50	0,95	**H28T1**	1,06	1,07	0,99
H29	1,45	1,23	1,18				
H30	0,55	0,82	0,67	**H30T1**	1,21	1,21	1,00
H31	0,59	0,90	0,66	**H31T1**	1,72	1,69	1,02
H32	2,10	2,12	0,99	**H32T1**	1,09	1,58	0,69
H33	0,56	0,92	0,61	**H33T1**	0,90	1,33	0,67
H34	3,00	3,12	0,96	**H34T1**	2,75	3,46	0,79
H35	0,87	1,29	0,68	**H35T1**	1,67	2,29	0,73
H36	0,72	0,99	0,73				

Not: Tabloda boş bırakılan alanlar, hastaların ilgili verilerine ulaşılamadığının göstergesidir.

Tablo 7: Kontrol grubu ALU247, ALU115 ve ALU247/115 sonuçları

	Kontrol				Kontrol		
	ALU247 ng/µL	**ALU115 ng/µL**	**ccfDNA bütünlük indeksi**		**ALU247 ng/µL**	**ALU115 ng/µL**	**ccfDNA bütünlük indeksi**
K1	0,34	0,49	0,70	**K29**	0,30	0,30	0,99
K2	0,30	0,43	0,69	**K30**	0,40	0,41	0,96
K5	0,31	0,44	0,70	**K33**	0,68	1,25	0,55
K9	0,31	0,31	0,98	**K34**	0,42	0,55	0,77
K10	0,57	0,73	0,79	**K36**	0,60	0,53	1,12
K13	0,50	0,68	0,74	**K37**	0,35	0,33	1,05
K17	0,44	0,56	0,78	**K38**	0,49	0,46	1,07
K18	0,46	0,51	0,90	**K40**	0,37	0,38	0,98
K19	0,44	0,73	0,61	**K42**	0,68	0,80	0,85
K22	0,41	0,40	1,04				
K23	0,38	0,35	1,06				
K25	0,37	0,35	1,06				

Tablo 8'de görüldüğü gibi tedavi öncesi ortalama ALU değerleri tedavi sonrası artış gösterirken, ccfDNA bütünlük indeksi tedavi sonrası azalmıştır. Sağlıklı kontrollerin ALU değerleri Tablo 7'de verilmiştir ve tedavi öncesi ve sonrası değerlerden ortalama olarak daha düşük olduğunu Tablo 8'de görebiliriz.

Tablo 8: NACT öncesi-sonrası ortalama ccfDNA sonuçları

Parametre	Tedavi Öncesi Ort.	Tedavi Sonrası Ort.	p-değeri	Kontrol Ort.	T.Ö.-Kontrol p-değeri	T.S.-Kontrol p-değeri
ccfDNA miktarı	0,98	1,29	0,007	0,52	<0,001	<0,001
ccfDNA bütünlük indeksi	0,79	0,76	0,882	0,88	0,052	0,016

Tedavi öncesi ve tedavi sonrası gruplarına baktığımızda; tedavi öncesi hastaların ortalama 0,98 ng/µL olan ccfDNA seviyesi yaklaşık 1,3 kat artışla tedavi sonrası ortalama 1,29 ng/µL'ye yükselmiştir. Bu yükseliş istatiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p=0,007). Tedavi sonrası hastalarda ccfDNA bütünlüğü ortalama 0,79'dan 0,76'ya bir azalma görülmüştür ve bu farklılıklar istatiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p=0,882) (Tablo 8).

Elde ettiğimiz sonuçlara göre ALU115 ve ALU247 seviyeleri kontrole kıyasla hastalarda daha yüksek bulunmuştur. Tedavi öncesi ccfDNA seviyesi kontrol grubundan yüksek olması istatiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p<0,001). Ayrıca, tedavi öncesi cfDNA bütünlük indeksi ortalama 0,79 iken kontrol grubunun bütünlük indeksi ortalama 0,88'dir ve bu sonuçlar istatiksel olarak anlamlı değildir (p=0,052).

Son olarak tedavi sonrası ve kontrol grubu arasındaki farkı incelediğimizde; tedavi sonrası ccfDNA seviyesi yaklaşık 2,48 kat (p=<0,001) kontrol grubundan daha yüksek ve istatiksel olarak anlamlı bulunmuştur. ccfDNA bütünlük indeksi kontrol grubunda ortalama 0,88 iken tedavi sonrası grupta ortalama 0,76'dır, bu fark da yine istatiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p=0,016) (Tablo 8).

6.2. Tedavi Öncesi ve Sonrası mtDNA Miktarı ve Bütünlük İndeksi

Dolaşımdaki tümör DNA'sı, nükleer DNA ve mitokondriyal DNA'yı içerir. Mutlak mtDNA'yı ölçebilmek için RT-PZR sonucu Ct değerleri belirlenmiştir ve böylece nDNA ile mtDNA arasındaki normalize edilen değerler belirlenerek mtDNA kopya sayısındaki değişimler hesaplanmıştır.

Plazma mtDNA için ND1 ve ND4 genleri, nDNA için GAPDH geni için tasarlanmış spesifik primerler kullanılarak değerlendirilmiştir.

Bölüm 5.4 ve 5.6'da belirtildiği gibi mtDNA delesyon seviyesi; ND1/ND4 ve mtDNA kopya sayısı; $2^{-\Delta Ct}$ formülü ile hesaplanmıştır.

Her örnek için elde edilen tedavi öncesi (Tablo 9), tedavi sonrası (Tablo 10) ve kontrol grubu (Tablo 11) Ct değerleri ve hesaplanan $2^{-\Delta Ct}$ değerleri aşağıda verilmiştir.

Tablo 9: Tedavi öncesi Ct, mtDNAcn, ND1/ND4 ve ND4/ND1 sonuçları

Örnek İsmi	GAPDH	ND4	ND1	$2^{-\Delta Ct}$ (mtDNA kopya sayısı)	ND1/ND4 (delesyon seviyesi)	ND4/ND1 (mtDNA integritesi)
H1	29,83	17,93	17,35	**5712,87**	**1,49**	**0,67**
H4	29,73	21,91	21,38	**326,29**	**1,44**	**0,69**
H5	32,37	21,53	20,50	**3743,05**	**2,04**	**0,49**
H6	28,95	17,33	16,68	**4938,99**	**1,57**	**0,64**
H7	29,56	17,68	16,51	**8480,89**	**2,25**	**0,44**
H8	30,36	21,55	20,52	**916,51**	**2,04**	**0,49**
H9	28,43	22,38	20,62	**224,41**	**3,39**	**0,30**
H10	27,59	17,41	16,39	**2352,53**	**2,03**	**0,49**
H11	27,97	16,63	15,67	**5042,77**	**1,95**	**0,51**
H12	30,95	19,83	18,83	**4451,27**	**2,00**	**0,50**
H13	27,94	21,23	20,40	**186,11**	**1,78**	**0,56**
H14	29,76	17,65	16,97	**7082,29**	**1,60**	**0,62**
H15	29,43	17,36	17,94	**2876,30**	**0,67**	**1,49**
H16	28,75	21,23	19,99	**433,53**	**2,36**	**0,42**
H17	28,88	15,55	14,64	**19349,38**	**1,88**	**0,53**
H18	28,61	18,75	17,49	**2225,63**	**2,39**	**0,42**
H19	29,46	15,81	14,96	**23170,48**	**1,80**	**0,55**
H20	28,97	16,52	15,45	**11746,96**	**2,10**	**0,48**

Tablo 9: Tedavi öncesi Ct, mtDNAcn, ND1/ND4 ve ND4/ND1 sonuçları (devam)

Örnek İsmi	GAPDH	ND4	ND1	$2^{-\Delta Ct}$ (mtDNA kopya sayısı)	ND1/ND4 (delesyon seviyesi)	ND4/ND1 (mtDNA integritesi)
H21	31,11	15,25	15,50	**50012,46**	**0,84**	**1,19**
H22	26,70	20,35	18,80	**238,86**	**2,93**	**0,34**
H23	27,24	20,35	19,58	**202,25**	**1,71**	**0,59**
H24	31,27	15,97	15,53	**54728,32**	**1,36**	**0,74**
H25	26,48	13,80	12,94	**11910,94**	**1,82**	**0,55**
H26	26,92	15,81	14,69	**4803,93**	**2,17**	**0,46**
H27	28,33	23,48	22,70	**49,52**	**1,72**	**0,58**
H28	29,83	22,95	21,61	**298,17**	**2,53**	**0,40**
H29	27,48	20,96	20,77	**104,69**	**1,14**	**0,88**
H30	28,51	16,66	15,58	**7804,01**	**2,11**	**0,47**
H31	27,42	18,62	16,90	**1468,37**	**3,29**	**0,30**
H32	26,80	19,96	19,70	**137,19**	**1,20**	**0,84**
H33	28,50	19,32	18,54	**996,00**	**1,72**	**0,58**
H34	26,95	19,64	18,90	**265,03**	**1,67**	**0,60**
H35	26,94	22,32	21,47	**44,32**	**1,80**	**0,55**
H36	26,96	20,33	19,32	**199,47**	**2,01**	**0,50**

Tablo 10: Tedavi sonrası Ct, mtDNAcn, ND1/ND4 ve ND4/ND1 sonuçları

Örnek İsmi	GAPDH	ND4	ND1	$2^{-\Delta Ct}$ (mtDNA kopya sayısı)	ND1/ND4 (delesyon seviyesi)	ND4/ND1 (mtDNA integritesi)
H2T1	28,58	19,88	18,63	**989,12**	**2,38**	**0,42**
H3T1	28,45	24,57	22,90	**46,85**	**3,18**	**0,31**
H4T1	26,86	19,51	17,93	**487,75**	**2,99**	**0,33**
H5T1	28,39	16,59	15,67	**6746,86**	**1,89**	**0,53**
H7T1	28,49	19,61	18,47	**1038,29**	**2,20**	**0,45**
H8T1	27,93	19,53	18,62	**634,73**	**1,88**	**0,53**
H9T1	26,85	15,74	14,72	**4482,23**	**2,03**	**0,49**
H10T1	26,88	20,50	19,56	**159,79**	**1,92**	**0,52**
H11T1	28,97	19,31	17,95	**2076,59**	**2,57**	**0,39**
H12T1	27,66	20,33	19,73	**243,88**	**1,52**	**0,66**
H13T1	28,40	19,50	18,69	**837,53**	**1,75**	**0,57**
H15T1	27,39	22,77	21,82	**47,50**	**1,93**	**0,52**
H16T1	26,62	21,78	20,82	**55,72**	**1,95**	**0,51**
H17T1	29,23	21,42	20,50	**424,61**	**1,89**	**0,53**
H18T1	28,75	23,73	22,78	**62,68**	**1,93**	**0,52**

Tablo 10: Tedavi sonrası Ct, mtDNAcn, ND1/ND4 ve ND4/ND1 sonuçları (devam)

Örnek İsmi	GAPDH	ND4	ND1	$2^{-\Delta Ct}$ (mtDNA kopya sayısı)	ND1/ND4 (delesyon seviyesi)	ND4/ND1 (mtDNA integritesi)
H19T1	29,90	19,59	17,97	**3902,01**	**3,07**	**0,33**
H21T1	25,83	18,84	17,76	**268,73**	**2,11**	**0,47**
H22T1	26,57	19,98	18,95	**196,72**	**2,04**	**0,49**
H23T1	26,83	17,48	16,48	**1305,15**	**2,00**	**0,50**
H24T1	27,73	21,74	20,81	**121,10**	**1,91**	**0,52**
H25T1	27,52	19,45	18,52	**512,00**	**1,91**	**0,52**
H26T1	27,46	19,57	18,47	**508,46**	**2,14**	**0,47**
H27T1	27,28	19,41	18,27	**515,56**	**2,20**	**0,45**
H28T1	28,92	21,31	19,82	**548,75**	**2,81**	**0,36**
H30T1	27,33	20,69	19,68	**200,85**	**2,01**	**0,50**
H31T1	27,39	20,59	19,49	**238,86**	**2,14**	**0,47**
H32T1	26,64	19,75	19,46	**145,01**	**1,22**	**0,82**
H33T1	26,80	13,72	12,96	**14664,09**	**1,69**	**0,59**
H34T1	25,49	17,67	17,18	**317,37**	**1,40**	**0,71**
H35T1	24,80	19,42	18,55	**76,11**	**1,83**	**0,55**

Tablo 11: Kontrol grubu Ct, mtDNAcn, ND1/ND4 ve ND4/ND1 sonuçları

Örnek İsmi	GAPDH	ND4	ND1	$2^{-\Delta Ct}$ (mtDNA kopya sayısı)	ND1/ND4 (delesyon seviyesi)	ND4/ND1 (mtDNA integritesi)
K1	34,49	27,82	26,31	**290,02**	**2,85**	**0,35**
K2	34,90	28,69	27,60	**157,59**	**2,13**	**0,47**
K5	34,90	28,17	27,07	**227,54**	**2,14**	**0,47**
K9	31,73	27,03	26,43	**39,40**	**1,52**	**0,66**
K10	33,00	25,26	23,98	**519,15**	**2,43**	**0,41**
K13	32,86	26,51	24,98	**235,57**	**2,89**	**0,35**
K17	35,62	27,54	25,68	**982,29**	**3,63**	**0,28**
K18	34,54	27,57	27,34	**147,03**	**1,17**	**0,85**
K19	34,01	28,65	26,97	**131,60**	**3,20**	**0,31**
K22	31,99	25,94	24,67	**159,79**	**2,41**	**0,41**
K23	32,63	26,45	25,32	**158,68**	**2,19**	**0,46**
K25	29,18	25,87	24,9	**19,43**	**1,96**	**0,51**
K29	30,98	27,12	26,58	**21,11**	**1,45**	**0,69**
K30	33,77	26,82	25,83	**245,57**	**1,99**	**0,50**
K33	29,03	22,49	22,7	**80,45**	**0,86**	**1,16**
K34	34,04	26,78	25,92	**278,20**	**1,82**	**0,55**

Tablo 11: Kontrol grubu Ct, mtDNAcn, ND1/ND4 ve ND4/ND1 sonuçları (devam)

Örnek İsmi	GAPDH	ND4	ND1	$2^{-\Delta Ct}$ (mtDNA kopya sayısı)	ND1/ND4 (delesyon seviyesi)	ND4/ND1 (mtDNA integritesi)
K36	31,63	26,02	27,99	**12,47**	**0,26**	**3,92**
K37	32,55	26,81	25,89	**101,13**	**1,89**	**0,53**
K38	31,27	25,5	24,64	**99,04**	**1,82**	**0,55**
K40	29,14	25,95	25,55	**12,04**	**1,32**	**0,76**
K42	31,83	25,9	25,72	**69,07**	**1,13**	**0,88**

Tedavi öncesi ve tedavi sonrası gruplarına baktığımızda; tedavi öncesi hastaların mtDNA kopya sayısında ise istatiksel olarak anlamlı (ortalama 6956,58'den 1395,16'ya, p=0,014) bir azalma belirlenmiştir. Tedavi sonrası hastalarda mtDNA bütünlüğünde de ortalama 0,58'den 0,50'ye bir azalma görülmüştür ve bu farklık istatiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p=0,135). mtDNA delesyon seviyesindeki artış istatiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p=0,135) (Tablo 12).

Tablo 12: Gruplar arası mtDNAcn, delesyon seviyesi ve bütünlük indeksi ortalamaları

Parametre	Tedavi Öncesi Ort.	Tedavi Sonrası Ort.	p-değeri	Kontrol Ort.	T.Ö.-K p-değeri	T.S.-K p-değeri
mtDNA kopya sayısı	6956,58	1395,16	0,014	189,86	<0,001	0,002
mtDNA integritesi	0,58	0,50	0,135	0,72	0,690	0,528
mtDNA delesyon seviyesi	1,91	2,08	0,135	1,95	0,690	0,509

Elde ettiğimiz sonuçlara göre, tedavi öncesi mtDNA kopya sayısı (p<0,001) kontrol grubundan yüksek olması istatiksel olarak anlamlı bulunmuştur. İki grup arasında mtDNA bütünlük indeksine baktığımızda ise tedavi öncesi 0,58 iken kontrol grubunun 0,72'dir. Tedavi öncesi ve kontrol grubu mtDNA bütünlük indeksi ve delesyon seviyeleri istatiksel olarak anlamlı değildir (p=0,690).

Tedavi sonrası ve kontrol grubu arasındaki farkı incelediğimizde ise; tedavi sonrası mtDNA kopya sayısı yaklaşık 7,34 kat (p=0,002) kontrol grubundan daha yüksek

bulunmuştur. Bu sonuçlar istatiksel olarak anlamlıdır. Fakat mtDNA bütünlük indeksi ortalamaları kontrol grubunda 0,72 iken tedavi sonrası 0,50 dir ve bu fark istatiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p=0,528) (Tablo 12).

Elimizdeki 34 hastanın sadece 28'inin hem tedavi öncesi hem de tedavi sonrası verileri bulunmaktadır. Bu hasta grubunun tedavi öncesi ve sonrası sonuçlarına baktığımızda, tedavi sonrası ccfDNA seviyesi tedavi öncesine göre daha düşüktür ve istatiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p=0,007). Tedavi sonrası ccfDNA bütünlük indeksi tedavi öncesinden daha yüksektir ve bu sonuçlar istatiksel olarak anlamlı değildir (p=0,665). mtDNA kopya sayısının tedavi sonrası, tedavi öncesinden daha yüksek olması istatiksel olarak anlamlıdır (p=0,031). Tedavi sonrası mtDNA bütünlük indeksleri tedavi öncesinden daha yüksektir ve bu sonuçlar istatiksel olarak anlamlı değildir (sırasıyla ve p=0,820) (Tablo 13).

Tablo 13: NACT öncesi-sonrası Wilcoxon işaretli sıralar test sonucu

	ccfDNA Seviyesi	**ccfDNA İntegritesi**	**mtDNA Kopya Sayısı**	**mtDNA İntegritesi**
p-değeri	0,007	0,665	0,031	0,820

6.3. Tedavi Öncesi ve Sonrası ccfDNA, mtDNA, CTC, EMT ve ALDH1 Sonuçları

Meme kanserli hastalarda NACT öncesi ve sonrası alınan periferik kan örneklerinde plazma cfDNA ve mtDNA kopya sayısı ve bütünlüğündeki değişikliklerin CTC ve EMT ile ilşkisini incelemeyi amaçlanmıştır. Buna yönelik daha önce ekibimiz tarafından tamamlanan bir çalışmada aynı hastalardan elde edilen CTC, EMT ve ALDH1 sonuçları, bizim elde ettiğimiz ccfDNA seviyeleri ve mtDNA kopya sayılarıyla birlikte tablo 14'te verilmiştir.

Tablo 14: NACT öncesi ve sonrası biyobelirteç sonuçları

	ccfDNA (ng/µl)		mtDNAcn		CTC		EMT		ALDH1	
Örnek İsmi	**NACT Öncesi**	**NACT Sonrası**	**NACT Öncesi**	**NACT Sonrası**	**NACT Öncesi**	**NACT Sonrası**	**NACT Öncesi**	**NACT Sonrası**	**NACT Öncesi**	**NACT Sonrası**
H1	0,49		5712,87		N		N		N	
H2		0,72		989,12	P*	N	N	P#	P	N
H3		0,69		46,85	N	P*	N	N	N	N
H4	0,49	1,46	326,29	487,75	N	N	N	N	N	N
H5	0,38	0,81	3743,05	6746,86	N	N	N	N	N	N
H6	0,64		4938,99		N		N		P	
H7	0,61	0,84	8480,89	1038,29	N	N	N	P##	P	N
H8	0,37	0,86	916,51	634,73	N	N	N	N	N	N
H9	0,38	1,09	224,41	4482,23	N	N	N	N	N	N
H10	1,52	1,17	2352,53	159,79	N	N	N	N	P	N
H11	1,59	1,26	5042,77	2076,59	N	N	N	P#	N	N
H12	0,56	2,47	4451,27	243,88	P**	N	P#	P#	P	N
H13	1,37	1,66	186,11	837,53	N	N	N	N	N	N
H14	0,75		7082,29		N	N	P#	N	N	N
H15	0,66	1,29	2876,30	47,50	N	N	N	N	N	N
H16	0,76	1,66	433,53	55,72	N	N	N	N	N	N
H17	0,76	1,05	19349,38	424,61	P**	N	P#	N	P	N
H18	0,86	0,93	2225,63	62,68	N	N	N	N	N	N
H19	0,69	0,60	23170,48	3902,01	N	N	N	N	N	N
H20	0,76		11746,96		N	N	N	N	N	P
H21	1,17	1,21	50012,46	268,73	N	N	N	N	N	N
H22	1,20	1,47	238,86	196,72	N	N	N	N	N	N
H23	1,00	0,72	202,25	1305,15	N	N	N	N	N	N
H24	1,93	1,01	54728,32	121,10	N	N	N	P#	N	P
H25	1,34	1,39	11910,94	512,00	N	N	N	N	N	N
H26	0,77	1,01	4803,93	508,46	N	N	N	N	P	N
H27	0,51	0,76	49,52	515,56	N	P**	N	N	P	N
H28	0,50	1,07	298,17	548,75	P**	P***	N	N	N	N
H29	1,23		104,69		N	N	N	N	N	P
H30	0,82	1,21	7804,01	200,85	P*****	N	N	N	P	N
H31	0,90	1,69	1468,37	238,86	N	P***	N	N	N	N
H32	2,12	1,58	137,19	145,01	N	N	N	N	N	N
H33	0,92	1,33	996,00	14664,09	N	P*	N	N	N	N
H34	3,12	3,46	265,03	317,37	N	P****	N	N	N	N
H35	1,29	2,29	44,32		N	N	N	N	N	N
H36	0,99		199,47		P*		N		N	

Not: Tabloda boş bırakılan alanlar, hastaların ilgili verilerine ulaşılamadığının göstergesidir.
N: negative, P: pozitif
*MUC1, **EpCAM, ***EpCAM ve HER2, ****HER2, *****EpCAM ve MUC1
PI3Kα, ##TWIST1

NACT öncesi 36 hastanın 6'sında (%16,7), NACT sonrası 33 hastanın 6'sında (%18,2) CTC saptandı. Tedavi öncesi ve sonrasında sadece 1 hastada CTC pozitifliği saptanmıştır. NACT öncesi 36 hastanın 3'ünde (%8,3) EMT belirteç pozitifliği, 9'unda (%25) ALDH1 pozitifliği saptanmıştır.

NACT öncesi 6 CTC + hastasından 2'sinde hem EMT hem de kök hücre belirteç pozitifliği vardır ve 2 CTC + hastasında sadece ALDH1 pozitifliği vardır. Buna karşılık, NACT sonrası 33 örneğin EMT belirteçleri 5 hastada (%15,2) ve 3 hastada (%9,1) ALDH1 pozitiftir. Tedavi sonrası CTC pozitifliği olan 6 hastada EMT ve kök hücre belirteçleri negatiftir.

Özellikle, tedavi öncesi EpCAM ve MUC-1 pozitifliği gözlenirken tedavi sonrası HER2 ekspresyonu belirlenmiştir. EMT belirteçleri açısından özellikle PIK3α pozitifliği baskındır. NACT sonrası TWIST1 pozitifliği olan sadece 1 hasta gözlemlenmiştir. Kök hücre belirteçlerinden tedavi öncesi ALDH1 pozitiflik oranı %25 iken NACT sonrası %9,1'e düşmüştür.

Önceki çalışmadan elde edilen bu veriler ile bu çalışmadan elde ettiğimiz verileri karşılaştırdığımızda ise, tedavi öncesi hem CTC hem de ALDH1 pozitif olup, tedavi sonrası negatife dönen 3 hastanın (tablo 14'te gri renkli işaretlenmiş H12, H17, H30) ccfDNA seviyesi tedavi sonrası artmış, mtDNA kopya sayısı ise azalmıştır. Bu hastaların yalnızca birinde EMT markırı pozitifken tedavi sonrası yine pozitif olmuştur.

NACT öncesi ve sonrası CTC, EMT ve kök hücre belirteçlerinin ccfDNA seviyeleri ve mtDNA kopya sayısı arasında bir korelasyon bulunamamıştır. Sonuçlar istatiksel olarak anlamlı değildir ($p>0,05$) (Tablo 15).

Tablo 15: Ortalama CTC, EMT ve ALDH1 değerleri

	CTC		EMT		ALDH1		p değeri
	Pozitif	Negatif	Pozitif	Negatif	Pozitif	Negatif	
ccfDNA (ng/µL)	1,14	1,11	1,17	1,03	0,8	1,11	>0,05
mtDNAcn	4403,07	4420,55	4753,61	4570,65	5816,84	4184,27	

6.4. ccfDNA seviyesi, mtDNAcn, tedaviye yanıt ve metastaz ilişkisi

Tedavi takibi boyunca metastaz durumu incelendiğinde sadece H12, H17, H19, H29, H30 ve H34 numaralı hastaların pozitif, diğerleri ise negatif olarak bulunmuştur.

Aynı hasta grubunu önceki çalışma verileriyle karşılaştırdığımızda, hem metastaz durumu negatif olup hem patolojik ve klinik tam yanıt gösteren 6 hastanın (tablo 16'da koyu gri işaretli) sadece 1'inde (H22) NACT öncesi ve sonrası CTC, EMT ve ALDH1 belirteçleri de negatiftir. Bununla birlikte, tedavi sonrası ccfDNA seviyesi artarken, mtDNA kopya sayısı azalmıştır. Fakat istatiksel olarak anlamlı değildir.

Bu 6 hastanın 1'i (H26), NACT öncesi ve sonrası CTC ve EMT belirteçleri negatifken, ALDH1 tedavi öncesi pozitif, tedavi sonrası negatif olmuştur. Aynı şekilde, hastanın tedavi sonrası ccfDNA seviyesi artarken, mtDNA kopya sayısı azalmıştır. Bu durum kısmen tedaviye olumlu yanıtı gösterse de istatiksel olarak anlamlı bir sonuç elde edilememiştir.

ccfDNA seviyesi tedavi sonrası artmış, mtDNA kopya sayısı ise azalmış hastaları incelediğimizde, %21,4'ü (3 hasta) tedavi öncesi hem CTC hem de ALDH1 pozitif olup, tedavi sonrası negatif olmuştur (tablo 16'da açık gri renkli işaretlenmiş; H12, H17, H30) yalnızca birinde EMT markırı pozitifken tedavi sonrası pozitif olarak kalmıştır. Bu hastaların metastatik durumu pozitif bulunmuştur. H12, kemoterapi sonrası klinik açıdan progresiv, patolojik olarak ise kısmi yanıt vermiştir. H17 ve H30 ise klinik ve patolojik olarak kısmi yanıt vermiştir (Tablo 16).

Tablo 16: NACT sonrası ccfDNA ve mtDNAcn değişimi, tedavi yanıtı ve metastaz durumu

	ccfDNA (ng/µl)	mtDNA cn	CTC		EMT		ALDH1		Tedavi Yanıtı		Metastaz Durumu
Örnek İsmi	NACT Sonrası	NACT Sonrası	NACT Öncesi	NACT Sonrası	NACT Öncesi	NACT Sonrası	NACT Öncesi	NACT Sonrası	Patolojik	Klinik	
H1	-	-	N		N		N		PR	CR	N
H2	-	-	P	N	N	P	P	N	PR	PR	N
H3	-	-	N	P	N	N	N	N	PR	CR	N
H4	↑	↑	N	N	N	N	N	N	PR	PR	N
H5	↑	↑	N	N	N	N	N	N	CR	PR	N
H6	-	-	N		N		P		CR	PR	N
H7	↑	↓	N	N	N	P	P	N	CR	CR	N
H8	↑	↓	N	N	N	N	N	N	PR	PR	N
H9	↑	↑	N	N	N	N	N	N	CR	CR	N
H10	↓	↓	N	N	N	N	P	N	PR	PR	N
H11	↓	↓	N	N	N	P	N	N	PR	PR	N
H12	↑	↓	P	N	P	P	P	N	PR	PD	P
H13	↑	↑	N	N	N	N	N	N	PR	PR	N
H14	-	-	N	N	P	N	N	N	PR	PD	N
H15	↑	↓	N	N	N	N	N	N	PR	CR	N
H16	↑	↓	N	N	N	N	N	N	PR	PR	N
H17	↑	↓	P	N	P	N	P	N	PR	PR	P
H18	↑	↓	N	N	N	N	N	N	PR	PR	N
H19	↓	↓	N	N	N	N	N	N	PR	PD	P
H20	-	-	N	N	N	N	N	P	PR	PR	N
H21	↑	↓	N	N	N	N	N	N	PR	PR	N
H22	↑	↓	N	N	N	N	N	N	CR	CR	N
H23	↓	↑	N	N	N	N	N	N	CR	CR	N
H24	↓	↓	N	N	N	P	N	P	PR	PR	N
H25	↑	↓	N	N	N	N	N	N	PR	PR	N
H26	↑	↓	N	N	N	N	P	N	CR	CR	N
H27	↑	↑	N	P	N	N	P	N	PR	PR	N
H28	↑	↓	P	P	N	N	N	N	PR	PR	N
H29	-	-	N	N	N	N	N	P	CR	CR	P
H30	↑	↓	P	N	N	N	P	N	PR	PR	P
H31	↑	↓	N	P	N	N	N	N	PR	PR	N
H32	↓	↓	N	N	N	N	N	N	PR	PD	N
H33	↑	↑	N	P	N	N	N	N	CR	PR	N
H34	↑	↑	N	P	N	N	N	N	PR	PR	P
H35	↑	-	N	N	N	N	N	N	CR	CR	N
H36	-	-	P		N		N		-	-	N

Not: P: pozitif, N: negatif, PR: partial response, CR: complete response, PD: progressive disease, -: eksik veri

7. TARTIŞMA

Meme kanseri dünya çapında kadınlarda en sık görülen kanser türü olmasının yanı sıra doğası gereği etkili tedavi için birçok zorlukla karşılaşılabilir. Geleneksel bir yöntem olan doku biyopsi kanser tespiti için yeterince kapsamlı olmamakla birlikte tedavinin izlenmesi, hastalığın erken tespiti için de yeterli değildir. Bununla birlikte metastazın olduğu yer bazen biyopsiye engel olmaktadır. Klinik bir ihtiyaç olan invaziv olmayan yöntemlerle kanserin teşhisi ve takibi için biyobelirteçlere gereklilik söz konusudur (Al-Bashaireh ve ark., 2021; Harbeck ve ark., 2019).

Meme kanserinin çeşitli moleküler mimarisi bulunmaktadır. Kanser hücreleri, tümör teşhisi konmadan çok önce kan dolaşımına girebilir ve hareket halindedirler. Sıvı biyopsi olarak nitelendirdiğimiz dolaşımdaki tümör hücreleri (CTC'ler), hücresiz DNA'lar (cfDNA'lar) ve mitokondriyal DNA (mtDNA) seviyelerindeki değişiklikler plazma ve serumda kanser biyomarkerları olarak büyük ilgi görmüştür. Sıvı biyopsi kanser hastalarında invaziv olmayan yaklaşımlarla seri biyopsiyi mümkün kılar. Bu yöntemle, tümör oluşumu sırasında apoptoz, nekroz ve aktif salınımla dolaşıma salınan hücrelerin tespiti sağlanabilir. Böylece hastalık nüksü, tedavi süreci, ilaç yanıtları kolaylıkla takip edilebilir (Junqueira-Neto ve ark., 2019).

Dolaşımdaki tümör hücreleri (CTC'ler) tümör oluşumu, büyümesi yada herhangi bir zamanda salınabilir. Hem metastatik hem de erken evre meme kanserinde CTC'lerin varlığı, kötü prognozun bağımsız bir prognostik belirteci olarak kabul edilir (Katopodis ve ark., 2021).

Dolaşıma ccfDNA'ların salınımı hakkındaki bilgiler yoğun olarak araştırılmakla birlikte inflamasyon, otoimmünite, sigara kullanımı, hamilelik, egzersiz ve kalp disfonksiyonlarının dolaşımdaki cfDNA varlığına neden oldukları bilinmektedir. DNA fragmentlerinin ölen hücrelerden hücresel döngü ya da apoptoz ve nekroz gibi hücresel ölüm süreçleri sonucu dolaşıma aktarıldıkları literatürde bildirilmiştir. Dolaşımdaki cfDNA konsantrasyonunun tümör boyutu, hastalık evresi ve metastatik yük ile korelasyon gösterdiği bildirilmiştir (Bronkhorst ve ark., 2019).

Kanser hastalarının tanısal ve prognostik değerini artırmaya yönelik son gelişmeler, kendine özgü özellikleri nedeniyle dolaşımdaki mitokondri genomunu da hedef almıştır. Dolaşan mitokondri DNA'sının kısa uzunluğa, nispeten basit moleküler yapıya ve yüksek kopya sayısına sahip olduğu bilinmektedir. cf-mtDNA; otofaji, apoptoz, nekroz veya aktif taşıma süreçlerinden kaynaklanabilir. Bu özellikler, sıvı biyopsi işleviyle birlikte çeşitli katı tümör formlarının teşhisi için kolay erişilebilir, invaziv olmayan biyobelirteç olmasını sağlar.

Bu çalışmada, meme kanseri hastalarında neoadjuvan kemoterapiye yanıtı değerlendirmek için kan biyobelirteci olarak plazma ccfDNA ve mtDNA'nın önemini değerlendirdik. Plazma ccfDNA seviyesi, mtDNA kopya sayısı ve bütünlüğündeki değişiklikleri tespit ederek, daha önceki bir çalışmada aynı hastalardan elde edilen CTC moleküler analiz verileri ile ilişkilendirerek bu biyobelirteçlerin EMT ile ilişkisini ve bu hastalarda özellikle metastaz gelişiminin önceden tahmin edilebilmesini, dolayısıyla hastaların klinik seyrinin ön görülebilmesini sağlamayı amaçladık.

Daha önceki çalışmalarla uyumlu olarak, meme kanseri hastalarında plazma ccfDNA ve mtDNA seviyeleri, kontrollere kıyasla daha yüksektir (Tablo 9). Hem ALU 115'in (toplam dolaşımdaki cfDNA'yı temsil eden kısa fragman) hem de ALU 247'nin plazma seviyeleri, sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında meme kanseri hastalarında daha yüksektir. Bu, büyük ihtimalle hem apoptotik hücreler tarafından hem de vücut dokularının nekrotik aktiviteleri tarafından meme kanserli hastaların kan dolaşımına salınan parçalanmış DNA fragmanlarının artan miktarlarının bir sonucudur (Adusei ve ark., 2021). Sonuçlarımızla paralel olarak, meme ve prostat kanserli hastalarla yapılan bir çalışmada kontrollere kıyasla hastaların ALU 247 ve ALU115 seviyelerinin yüksek olduğu bulunmuştur. Bununla birlikte, ccfDNA bütünlük indeksinin prostat kanseri hastalarında kontrole göre daha yüksekken, meme kanseri hastalarında kontrollerine göre daha düşük olduğu belirlenmiştir (Arko-boham ve ark., 2019). Ek olarak, meme kanserli hastaların ALU 115 ve ALU 247 konsantrasyonu, evre II'de, evre III'e göre anlamlı olarak daha düşük olduğu belirlenmiştir (Arko-boham ve ark., 2019). Bir başka çalışmada, plazma CA15.3 ile karşılaştırıldığında meme kanseri hastalarında olası tanısal ve prognostik belirteçler

olarak plazma ccfDNA'sının ve DNA bütünlüğünün rolü araştırılmıştır. Sonuçlara göre, ALU 247, ALU 115 tekrarları ve ccfDNA bütünlüğünün yanı sıra CA15.3 konsantrasyonunun ortalama değerleri, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında kanserli hastalarda önemli ölçüde daha yüksektir. Evre II, III ve IV olan hastalarda ALU seviyelerinin ve ccfDNA bütünlük indeksinin istatiksel olarak anlamlı derecede yükseldiği görülmüştür (Hussein ve ark., 2019). CA15.3, MUC-1 geninin ürünüdür ve müsin ekspresyonu, çok sayıda adenokarsinomda up regüle edilir ve ardından kan dolaşımına karışır (Hussein ve ark., 2019). Buradan elde edilen sonuca göre CTC ve ccfDNA'nin meme kanseri için önemine bakıldığında, yüksek CA15.3 seviyesi, CA15.3'ü kodlayan MUC1 geninin aşırı ekspresyonuna bağlı olabilir ve tümör yükü ile ilişkili olabilir.

Aynı şekilde, meme ve akciğer kanserli hastalarda yapılan bir çalışmada farklı ALU primerleri kullanılmış olsa da, hastalarda sağlıklı bireylere göre daha yüksek cfDNA konsantrasyonu olduğu bildirilmiştir (Park ve ark., 2021). Kanser evreleri, tümör mutasyon yükü ve DNA klirens hızı dolaşıma salınan cfDNA miktarını etkiler. ALU DNA bütünlük indeksi, tümör hücresi ölümü miktarı ile bağıntılıdır, dolayısıyla DNA salınımını yansıtmayan mutlak ccfDNA konsantrasyonlarına göre avantajlı olduğu ileri sürülmüştür (Park ve ark., 2021). Hastalarda yüksek ccfDNA seviyeleri endometriyal kanserli hastalarla yapılan çalışma sonuçları ile de uyumludur. Histolojik olarak sınıflandırılan hastalarda ALU 155 ve ALU 247 seviyelerinde önemli bir artış gözlemlenmiştir. Fakat bizim sonuçlarımızdan farklı olarak DNA bütünlük indeksinde önemli bir artış gözlemlenmiştir (Vizza ve ark., 2018). Bu da ccfDNA'nın potansiyel prognostik biyobelirteç olarak rolünü öne sürüyor. Ayrıca, DNA bütünlük indeksinin farklı kanserler arasında ve ayrıca bireysel kanserler arasında değiştiğini gösterir.

Hem tedavi öncesi hem de tedavi sonrası sonuçları elimizde olan 28 hastanın, ccfDNA seviyeleri tedavi sonrası azalış göstermiştir ve bu sonuçlar istatiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Ayrıca anlamlı olmamakla birlikte ccfDNA bütünlüğü artmıştır (Tablo 13). Bu sonuçlar, Adusei ve arkadaşlarının meme kanserli hastalarda kemoterapi öncesi ve 3 kür tedavi sonrası serum ALU 247 ve ALU 115 seviyelerinin yanı sıra ccfDNA integritesini incelediği çalışmayla uyumludur. 3 kür kemoterapi

sonrası ALU seviyelerinin azaldığı ccfDNA bütünlüğünün ise arttığı gözlenmiştir (Adusei ve ark., 2021).

Kemoterapi, hücreleri (özellikle hızlı bölünen kanserli hücreleri) yok etmeyi, dikkatsizce nekrotik dokulardan kan dolaşımına hücresel DNA salınımını indüklemeyi ve sonuç olarak kandaki ccfDNA seviyelerini yükseltmeyi amaçlar (Swystun ve ark., 2011). Kemoterapi sonrası, kemoterapötik ajanın etkinliği değerlendirildiğinde, eğer hasta kemoterapötik ajana olumlu yanıt verdiyse, kayda değer sayıda kanserli hücreler yok edilmiş olur ve tümör boyutlarının küçülmüş olması beklenir. Aynı veri grubunun tedavi öncesi değerlerinden daha düşük tedavi sonrası değerleri elde edilmesi, Adusei ve ark.'nın da belirttiği gibi iki durum söz konusudur; (1) kanser hücrelerinin popülasyonunda ve aktivitelerinde bir azalma ve (2) güçlü bir şekilde etkili ccfDNA temizleme sistemi olduğunu düşündürür. İkincisi ile ilgili olarak, kemoterapi ajanının aktivitesinin bir devamı olarak dolaşımdaki ccfDNA'nın artan konsantrasyonu, muhtemelen ccfDNA temizleme sistemini kan dolaşımından salınan DNA'yı temizlemek için aktive etmiş olabilir ve böylece etkili bir şekilde kandaki ccfDNA konsantrasyonlarını azaltır. Bununla birlikte, kemoterapi ile kanser hücrelerinin aşırı tahribatı nedeniyle, kan dolaşımına daha fazla nekrotik DNA (daha uzun DNA fragmanları) salınmış olabilir. Sonuç olarak, nekrotik DNA'nın yüksek seviyeleri, klirens sistemini aşırı yükleyerek kanda daha uzun düzensiz DNA fragmanlarının birikmesine neden olarak DNA bütünlüğünü etkilemiş olabilir (Adusei et al., 2021).

Yine bir çalışmada sonuçlarımızla uyumlu olarak, meme kanserli hastaların neoadjuvan tedaviye yanıtı değerlendirilirken, ALU 115 seviyeleri 1. döngüden 6. döngüye kadar tam remisyon gösteren hastalarda düşüş gösterirken tedaviye yanıt vermeyen hastalarda artış gözlenmiştir. Bu sonuç istatiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0,033$). Tam remisyon gösteren hastaların ikinci döngü tedavi öncesi bir artış göstermesine rağmen tedavi öncesi ve 6 döngü sonrası sonuçlar karşılaştırıldığında ccfDNA seviyesi düştüğü görülmüştür. ALU 247 fragmanları için benzer eğilimler bulunmuştur. CEA ve CA 15-3'ün yanı sıra DNA bütünlük indeksi, terapi sonucu için bilgilendirici olmamıştır (Lehner ve ark., 2013a). Aynı şekilde başka bir çalışmada ALU ve LINE1 kullanılarak cfDNA değişkenlerinin, CTC

durumunun belirlenmesi ile birlikte kullanıldığında MBC hastalarında prognostik gücü iyileştirebileceğini ileri sürmüşlerdir. Yapılan Wilcoxon sıralar testine göre çalışmamızla uyumlu olarak, sistemik tedavinin ilk döngüsünden sonra ccfDNA seviyesi azalırken ccfDNA integritesi artmıştır. Tedaviler, dolaşımdaki tümör DNA dolaşımının yükünü hafifletebilir. Ek olarak çalışmada, cfDNA'nın ve CTC'lerin bilinen prognostik biyobelirteçleri ile ilişkisi de CellSearch tekniği ile karşılaştırılmıştır. ccfDNA değişkenleri ile CTC durumu birlikte değerlendirildiğinde daha doğru sonuçlar elde edildiği bildirilmiştir (Cheng ve ark., 2018).

Benzer şekilde, Zhu ve arkadaşları, primer kolorektal kanserli hastalardan ameliyat öncesi ve sonrası, 3 kür kemoterapi ve takip grupları arasında yaptığı çalışmada, ameliyat sonrası ALU 115 seviyeleri azalırken integrite artmıştır fakat istatiksel olarak anlamlı değildir. CTC belirteci ise ameliyat sonrası azalmıştır ve bu sonuç anlamlı bulunmuştur. Bizim ALU 115 seviyelerindeki azalma çalışmayla uyumlu olsa da istatiksel olarak da anlamlı bulunmuştur (Zhu ve ark., 2021). Kolorektal kanserli hastalarla yapılan başka bir çalışmada ise, ameliyattan sonra ALU115 ve ALU247/115'te ameliyat öncesi ile karşılaştırıldığında genel bir azalma eğilimi olduğunu göstermiştir, ancak ameliyat sonrası azalma oranı tüm vakalarda farklı olmuştur. Örneğin, 1-10 gün arasındaki ilk takipte bazı olgularda lineer veya keskin bir düşüş gözlenirken, diğer bazı olgularda hafif bir artış olmuştur. Bu hafif artış, cerrahi prosedür sırasında kalan tümör dokusu veya daha sonra ccfDNA'nın salınmasıyla postoperatif inflamasyon nedeniyle olabileceği öne sürülmüştür. Ameliyattan 20-120 gün sonra neredeyse tüm vakalarda belirgin bir azalma gözlenmiştir ve çalışmamızla uyumlu olduğu belirlenmiştir (Hao ve ark., 2014).

Elimizdeki tüm hastaları incelediğimizde ise, tedavi sonrası ccfDNA seviyeleri anlamlı olarak artarken, ccfDNA bütünlük indeksi azalmıştır ve istatiksel olarak anlamlı değildir. Hücrelerin ağır yıkımı ve buna eşlik eden plazma ccfDNA düzeylerinin yükselmesi ile tedavi öncesi-sonrası birey sayısının farklı olması bu durumu etkileyebilir. Benzer şekilde, Lehner ve ark. ALU115'in meme kanserinde kemoterapi sonrası grupta kemoterapi öncesi gruba göre biraz daha yüksek olduğunu, ancak anlamlı bir fark olmadığını bildirmiştir (Lehner ve ark., 2013b).

Kemoterapi, yaralı hücrelerden plazmaya DNA salınmasını uyarmanın yanı sıra, deoksiribonükleaz (DNAz) sentezini veya aktivitesini de bozarak plazmada ccfDNA birikimini teşvik edebilir. Kemoterapi ilaçları, DNA baz çiftleri arasında araya girerek kromatinin açılmasına yol açan ajanlardır. Bu yapısal değişiklikler, DNA replikasyonu ve transkripsiyonuna müdahale eder ve apoptoza yol açar. Buna yönelik yapılan bir çalışmada, sonuçlarımızla uyumlu olarak, kemoterapiden 24 saat sonra venöz tam kandan izole edilen ccfDNA'nın histonlarla ilişkisinin azaldığını; bu ilaçlara maruz kalındığında ccfDNA salımının arttığı belirlenmiştir (Swystun ve ark., 2011). Plazma ccfDNA seviyesinin belirteci olarak ALU 111'in kullanıldığı bir çalışmada, bir kür neoadjuvan kemoterapiden sonra yükselen cfDNA düzeylerinin, gelişmiş yanıtla ilişkili olduğu varsayılmıştır. Kemoterapiye yanıt veren hastalarda, ALU111-bp konsantrasyonu önemli ölçüde yükselmiştir. Ancak kemorezistansı olan hastalarda, ALU111-bp seviyesi sabit tutulmuştur (Ma ve ark., 2020).

Çok sayıda çalışma, elde ettiğimiz sonuçlardan farklı olarak sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında yumurtalık, meme ve kolorektal kanserli hastaların plazmasında daha yüksek ccfDNA bütünlükleri bildirmiştir (Umetani ve ark., 2006; Umetani ve ark., 2006). Meme kanserinde, serum DNA'sının artan bütünlüğü, daha kötü bir hastalık sonucu ve adjuvan kemoterapiye zayıf yanıt ile ilişkilendirilmiştir (Deligezer ve ark., 2008; Umetani ve ark., 2006).

Diğer kanser türleri üzerine yapılan, sonuçlarımızla uyumlu çalışmalardan birinde, torakotomi ve video yardımlı torakoskopik cerrahi arasında karşılaştırmanın yapıldığı akciğer kanserli hastalarda ameliyat sonrası CTC, ccfDNA düzeylerinin ve bütünlük indeksinin yükseldiğini göstermiştir. DNA bütünlük indeksinin yükselmesi, cerrahi hasarı takiben ccfDNA'nın daha uzun fragmanlarında bir artışı temsil eder, muhtemelen habis hücrelerden (ctDNA) gelen DNA'yı temsil eder. Meme kanseri gibi diğer maligniteler için tanısal potansiyelini gösteren önceki çalışmalarla da tutarlıdır (Katopodis ve ark., 2021). Metastatik kolorektal kanserli hastaların ALU 115, ALU247/ALU115, CEA ve CA19-9 seviyeleri kemoterapi öncesi kontrol grubundan daha yüksek olduğu istatiksel olarak anlamlı bulunmuştur ve tedavi sonrası tedaviye yanıt verenlerde bir azalma söz konusudur (Eskander ve ark., 2022). Yine çalışmamızla uyumlu olarak, bir başka kolorektal kanserli hastalarda yapılan

çalışmada da aynı sonuçlar elde edilmiştir (Salem ve ark., 2020). Yine Zhu ve arkadaşlarının, ALU247/115 seviyesinin ameliyat öncesi gruba göre kemoterapi sonrası grupta çalışmamızla uyumlu olarak önemli ölçüde daha düşük olduğunu, ALU115'in ise belirgin şekilde daha yüksek olduğunu göstermiştir. Ek olarak, CEA seviyeleride anlamlı olarak düşmüştür. Sadece kemoterapinin biyobelirteçler üzerindeki etkisine baktığımızda, sonuçlar ALU247/115 seviyesinin kemoterapi sonrası grupta anlamlı derecede düşük, ALU115'in ise anlamlı derecede yüksek olduğunu gösteriyor ki bu durum da yine elde ettiğimiz sonuçlarla tutarlıdır (Zhu ve ark., 2021).

mtDNA kopya sayısı ve mtDNA integrite açısından sonuçlarımızı değerlendirdiğimizde, kontrole kıyasla hasta gruplarında daha yüksek kopya sayısı olduğu ve tedavi öncesi en yüksek seviyede olduğu görülmüştür. Bu sonuçlar istatiksel olarak da anlamlıdır. mtDNA integritesi, kopya sayısının aksine kontrol grubunda daha yüksektir ve bu sonuçlar istatiksel olarak anlamlı değildir. mtDNA kopya sayısının çalışmamızla uyumlu olarak bazı çalışmalarda hasta grubunda daha yüksek (Mahmoud ve ark., 2016; Pasha ve ark, 2019) olduğu, bazı çalışmalarda ise düşük (Rai ve ark., 2021; Weerts ve ark., 2016) olduğu ile igili çelişkili sonuçlar vardır.

Sonuçlarımızla uyumlu olan bir çalışmada, meme kanserli hastaların plazma ve periferik kan örneklerinde en yüksek mtDNA kopya sayısını geç evre kanser hastalarında bulunmuştur. Sağlıklı bireylerde ve erken evre kanser hastalarında bunun tam tersi olduğu görülmüştür (Keseru ve ark., 2019). Benzer şekilde, meme kanseri, iyi huylu tümör ve kontrol grupları arasında yapılan çalışmada hücresiz mtDNA kopya sayısının meme kanserinde en yüksek, kontrol grubunda en düşük olduğu bulunmuştur (Safi ve Najib, 2020). Neoadjuvan sistemik tedavi almayan, lenf nodu negatif primer meme kanseri hastalarından oluşan bir çalışmada, 2 cm'den küçük tümörlerde, 2 cm'den büyük tümörlere kıyasla daha düşük mtDNA içeriği gözlenmiştir. Bu durum daha büyük tümörlerin muhtemelen daha fazla hücre bölünmesi geçirdiği ve potansiyel olarak ek replikasyon kaynaklı mtDNA hasarına neden olduğu, bu da uygun mitokondriyal işleyişi sürdürmek için ek telafi edici mtDNA molekülleri gerektirebileceği yönünde açıklanmıştır (Weerts ve ark., 2016).

Bir başka benzer çalışmada, sonuçlarımızla uyumlu olarak, erken evre meme kanseri hastaları, kemoterapinin başlamasından sonraki 12 haftalık çalışma süresi boyunca (T1: 70,1, T2: 52,5, T3: 60,7) mtDNA kopya sayısında istatistiksel olarak anlamlı değişiklikler göstermiştir. Kemoterapinin başlamasından sonraki 6 hafta içinde mtDNA içeriğinde bir azalma olduğu bildirilmiştir ve mtDNA içeriğinin kemoterapi süresince azalmaya devam edeceği varsayılmıştır. Hipotezin aksine, mtDNA içeriğinde T2'den T3'e bir artış gözlenmiştir. Bu durum olası bir iyileşme ve/veya telafi mekanizmasıyla ilişkilendirilmiştir (Toh ve ark., 2020).

Campa ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, mtDNA kopya sayıları için, vakalar ve kontroller arasında herhangi bir farklı ilişki gözlemlenmemiştir. Ancak mtDNA delesyon seviyesi ile mtDNA kopyası arasındaki oran analize dahil edildiğinde vakalar ve kontroller arasında, artan kopya sayısıyla riskte bir artış gözlemlenmiştir. Bu fark sadece ER+ meme kanseri için istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Campa ve ark., 2018).

Farklı kanser türleri ile yapılan çalışmalara baktığımızda, tiroid kanserli hastalarda plazma ND1 seviyesi normale kıyasla daha yüksek olduğu çalışmamızla uyumludur. Fakat ND4 miktarında bir fark olmadığı ve mtDNA bütünlüğünün (ND4/ND1), tiroid kanseri grubu ile normal kontrol grubu arasında önemli farklılıklar olduğunu göstermiştir. Bununla birlikte, malign tümörü olan hastalarda, tiroid nodülü olan hastalara ve ayrıca kontrol hastalarına kıyasla, plazma ND4/ND1 oranı önemli ölçüde artmıştır. Bu sonuç çalışmamızla uyuşmasa da, ND4 delesyonu, mtDNA hasarının bir belirteci olduğundan, artan ND4/ND1 oranı ile birlikte artan ND1, tiroid kanseri hastalarında sağlam mtDNA salınımının arttığını göstergesi olduğunu belirtmiştir. Bununla birlikte <1 cm olan tümörlerin mtDNA integritesi, >1 cm tümörlerden daha yüksek olduğu bildirilmiş (Jiang ve ark., 2020). Kolorektal kanserli hastaların incelendiği bir çalışmada, ccfDNA'daki ND1 içeriği incelenmiş ve hastalarının plazmasındaki ND1 içeriğinin sağlıklı bireylerinkinden daha fazla olduğu bulunmuştur. Bununla birlikte ameliyat öncesi ND1 seviyesinin beşinci kemoterapi sonrası önemli ölçüde azalması sonuçlarımızla tutarlıdır (Xu ve ark., 2021).

Mitokondriyal DNA miktarını analiz etmek için MTATP 8 geninin kullanıldığı bir çalışmada, meme kanseri hastalarından alınan tam kandaki mtDNA içeriğinin, daha ileri aşamalara kıyasla evre I meme kanseri örneklerinde önemli ölçüde azaldığı gösterilmiştir. Bu, meme kanseri hücrelerinin dolaşım sisteminde yüksek miktarda mtDNA tükettiğini göstermektedir. mtDNA tükenmesi, apoptozu önleyerek ve kanserle ilişkili proteinler üreterek kanser hücrelerinin ilerlemesini ve metastazını etkileyebilir. Kanserde mtDNA değişikliklerinin yüksek sıklığı ve bunların hastalık evresi I'deki mevcudiyeti muhtemelen kanserin erken teşhisi için klinik belirteçler olarak kullanılabilir (Xia ve ark., 2009).

Farklı bir çalışmada, normal pankreas dokusuna kıyasla pankreas kanserli hastaların tümör dokusunda mtDNA içeriğinin azaldığı belirtilmiştir. ND1 içeriğindeki kritik bir azalma, mitokondriyal işleyişi tehlikeye atabilir. Pankreas kanseri, son derece agresif biyolojisi ve hipoksik mikro ortamıyla bilinir. Hipoksik bir ortamın, tümör mtDNA içeriğini azaltabilmesinin olası bir durum olduğu belirtilmiştir (Tuchalska-Czuroń ve ark., 2019).

mtDNA kopya sayısı ile EMT arasındaki ilişkinin incelendiği in vitro çalışmada, mtDNA içeriğindeki bir azalma, ESRP1 protein seviyelerinin azalmasına neden olduğu, bunun aksine, SNAI1 mRNA ekspresyonu veya TGFβ protein ekspresyonu arttığı görülmüştür. Meme kanserinde mtDNA ve EMT özellikleri arasında gerçek bir ilişki eksikliği söz konusudur (Weerts ve ark., 2016).

Sonuç olarak, incelenen araştırmalarda, meme kanserinde neoadjuvan tedaviye yanıt olarak EMT, metastaz durumu ve plazma biyobelirteçleri arasındaki ilişkiyi inceleyen kapsamlı bir çalışma bulunmamaktadır. Kan plazmasından daha hızlı, basit, düşük maliyetli ve hassas olarak tümör DNA'sının izole edilebilmesi, kanserle ilişkisine yönelik bu zamana kadar çelişen sonuçların elde edilmesine rağmen, meme karsinogenezinde önemli bir rol oynayan ccfDNA'nın ve mtDNA'nın EMT ile ilişkisi üzerine yapılan çalışmaların azlığı bizi bu çalışmaya yönlendirmiştir.

Çalışmamızda biyobelirteç seviyelerindeki farklılıklar, farklı kan alma noktaları, numunenin önceden işlenmesi, saklanması, DNA izolasyon prosedürleri gibi çalışma aşamalarının yanı sıra bireylerin farklı tümor evresi, tümör büyüklüğü ve yaşa sahip

olması gibi klinik özelliklerden kaynaklanabilir. İncelediğimiz çalışmalarda bu etkenlerden dolayı farklı sonuçların elde edildiği gösterilmiştir (Arko-boham ve ark., 2019; Toh ve ark., 2020; Weerts ve ark., 2016).

Hem tedavi öncesi hem de tedavi sonrası sonuçları elimizde olan hastaların, ccfDNA seviyelerinin tedavi sonrası azaldığını gözlemledik. Bu durum, hastaların neoadjuvan tedaviye olumlu yanıt verdiğini, kanserli hücrelerin aktivitesinin azalıp, yok edildiğini ve hastaların güçlü bir şekilde etkili ccfDNA temizleme sistemi olduğunu düşündürür. Kemoterapi ajanının aktivitesinin bir devamı olarak dolaşımdaki ccfDNA'nın artan konsantrasyonu, muhtemelen ccfDNA temizleme sistemini kan dolaşımından salınan DNA'yı temizlemek için aktive etmiş olabilir ve böylece etkili bir şekilde kandaki ccfDNA konsantrasyonlarını azaltır. Ek olarak, hastadan kan alma zamanı da sonucu etkileyebilir. Tedavi sonrası ccfDNA seviyelerinin arttığını bulan bir çalışma, tedaviden 24 saat sonra hastadan örnek alınmıştır (Swystun ve ark., 2011). Bizim çalışmamızda ise, tedavi sonrası kan numuneleri 6 aylık tedaviden sonra, ameliyat öncesi alınmıştır.

Tüm hastaları incelediğimizde ise, tedavi sonrası ccfDNA seviyeleri anlamlı olarak artması ise (1) hücrelerin ağır yıkımı ve buna eşlik eden plazma ccfDNA düzeylerinin yükselmesi, (2) bazı hastaların tedavi öncesi, bazı hastaların tedavi sonrası verilerinin olmaması bu durumu etkileyebilir. Bununla birlikte, DNAse inhibitörünün tümör hücrelerinden salınmasının azalması olabilir. ccfDNA veya ctDNA seviyelerinin, tedavi öncesi seviyelerin altına düşüp düşmediğini belirlemek için tedavi sonrası daha uzun bir dönem boyunca alınan seri kan numuneleri artırılabilir.

Çok sayıda çalışma, meme kanserinde şu anda mevcut prognostik ve prediktif modellere katkıda bulunabilecek yeni biyobelirteçleri araştırırken, yalnızca birkaçı mtDNA'daki değişikliklerin bu amaç için kullanılıp kullanılamayacağını ele almıştır. Bununla birlikta çalışmamız hem ccfDNA hem mtDNA kopya sayısının ve bu belirteçlerin bütünlük indeksinin birlikte incelendiği ilk çalışmadır. Sonuçlarımıza göre artan kopya sayısıyla hastalık riskinde bir artış gözlemlenmiştir. Bu ilişki biyolojik olarak makuldür çünkü mtDNA kopya sayısındaki bir artış, artan oksidatif

stresi yansıtabilir ve bu da hasar seviyelerini artırabilir, iltihaplanmayı tetikleyebilir ve son olarak meme kanseri geliştirme riskini artırır.

Aynı hasta grubunun tedavi sonrası mtDNAcn'nin artışı, istatiksel olarak anlamlı olduğunu bulduk. Toh ve arkadaşları, mtDNA kopya sayısı, mtDNA'nın nDNA'ya oranı olarak ölçüldüğünden, kanser veya kemoterapiye bağlı trombositoz, mtDNA içeriğinin olduğundan fazla tahmin edilmesine yol açabileceğini ileri sürmüştür (Toh ve ark., 2020). Bu nedenle mtDNA'nın değişimi kanserin başlaması ve ilerlemesi için önemli olabilir ve kopya sayısındaki değişiklikler hastalık teşhisi ve izlenmesi için iyi bir biyobelirteç olabilir.

Tüm hastalar için yaptıımız Mann-Whitney U testinde ise en yüksek mtDNA kopya sayısı tedavi öncesi, en düşük ise kontrol grubunun olduğu belirlenmiştir. Tedavi sonrası kanser hücrelerinin parçalanıp dolaşımdaki DNA'nın temizlendiğinin göstergesidir. Diğer yandan, tedavi öncesi kopya sayısının yüksek olması, kanser ilerledikçe bozulan oksidatif sistemini elimine edebilmek, kanser hücrelerine enerji sağlayabilmek için hücrenin olağandan daha fazla mitokondri üretmesi ile açıklanabilir. Sonucumuzla paralel olarak bir çalışmada düşük mtDNA içeriği, meme kanseri tümör örneklerinde erken bir aşamada tanımlanmıştır ve bu, büyük olasılıkla oksidatif fosforilasyonu veya mitokondriyal enerji metabolizmasını bozarak mtDNA içeriğini düşürmüş olabileceğini düşündürür (Xia ve ark., 2009).

Bununla birlikte, kan örneklerinde mtDNA kopya sayısının ölçümü ile ilgili önceki çalışmalarda 50 yaş üstü hastalarda düşük kopya sayısı bildirilmiştir (Rai ve ark., 2021). Bizim hasta grubumuzun yaklaşık yarısı 50 yaş üstüyken diğer yarısı 50 yaş altıdır. Çalışmamızda elde ettiğimiz tedavi sonrası kopya sayısının düşüklüğü arasında uyumlu bir ilişki söz konusudur. İlerleyen evrelerde artan mtDNA kopya sayısı ve farklı kanser türleri arası kopya sayısı değişimleri mevcuttur. Bu durum kısmen kanser dokusundaki farklı hücre tiplerinin metabolik esnekliğini, genetik çeşitliliği, tümör saflığını ve mitokondrinin fonksiyonel durumunu açıklar.

Ek olarak, mtDNA bütünlük indeksinin kontrol grubunda istatiksel olarak anlamlı olmasa da yüksek olması, hastalarda parçalanmış DNA'nın ve bununla birlikte kopya sayısının fazlalığından dolayı integritenin düşük olması, meme kanserinde tedavi

takibi için bütünlük indeksinin kullanılabileceğine yönelik daha fazla çalışmanın yapılması için fikir sunabilir.

Burada ccfDNA ve mtDNA bütünlük indeksinin yüksek olması, daha az parçalanıp yüksek fragman boyutundaki DNA'ların yüksek olmasıdır.

Aynı hasta grubunun kullanıldığı önceki çalışmaya baktığımızda, meme kanseri alt tiplerine bağlı olarak, CTC oranı NACT öncesi %11 ile %54, NACT sonrası %7 ile %30 olarak bildirilmiştir. Tedaviden önce CTC'leri pozitif olan hastalarda, tedaviden sonra pozitif CTC'leri olan hastalara kıyasla erken metastaz geliştirme potansiyeli daha yüksektir. NACT öncesi pozitif CTC'leri olan hastalarda ayrıca ALDH1 pozitifliği vardır. Erken metastazı olan hastalarda mezenkimal belirteç PIK3α pozitifliğine pozitif kök hücre belirteçleri de eşlik etmektedir (Akkiprik ve ark., 2020). Bu sonuçların yeni çalışmamızla ilişkili olup olmadığını incelediğimizde, tedavi öncesi hem CTC hem de ALDH1 pozitif olup, tedavi sonrası negatife dönen 4 hastanın üçünde ccfDNA seviyesi tedavi sonrası artmış, mtDNA kopya sayısı ise azalmıştır. Bu hastaların yalnızca birinde EMT markırı pozitifken tedavi sonrası yine pozitif olmuştur. Bu durum, tedaviye yanıt olarak tümörlü hücrelerin parçalanıp dolaşıma ccfDNA salarak artışa neden olabileceği, hücrelerin yok edilmesinden ötürü mtDNA kopya sayısının azalması ve tümör belirteçlerinin negatif olması birbiriyle ilişkili olabileceğini düşündürür. Fakat bu ilişki istatiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır. Buna yönelik de daha büyük hasta grubuyla çalışmalar yapılabilir.

CTC pozitifliğinin ve özellikle CTC'lerin kök hücre ve mezenkimal karakterizasyonunun, erken uzak nüks için potansiyel bir tahmin sağlayabileceğini düşündürmektedir. NACT öncesi pozitif CTC'ler ile daha büyük bir tümör boyutu arasında pozitif bir korelasyon bildirilmiştir. Ayrıca tedavi sonrası aynı hasta grubunda CTC pozitifliğine rastlanmamıştır. Bu nedenle, tedavi öncesi CTC'ler, tedavinin etkileri ile fenotiplerini farklılaştırıp değiştirebilir, tekrar birincil tümör bölgesine dönebilir veya nüks gelişimi için izin verecekleri başka bir yere çoktan yayılmış olabilirler (Akkiprik ve ark., 2020). CTC ve tümör kök hücre markerlarının ccfDNA ve mtDNA ile ilişkisinin klinik önemini anlamanın, tedavi sırasında belirli noktalarda bu biyobelirteçlerin seri izlenmesini ve karakterizasyonunu gerektirir.

Bu sonuçlarla uyumlu olan bir çalışmada, erken evre üçlü negatif meme kanserli hastalarda NACT sonrası ctDNA ve CTC'lerin varlığının nüks ve klinik sonuçlarla bağımsız olarak ilişkili olup olmadığı araştırılmıştır. Nüks durumunu saptama hassasiyeti tek başına ctDNA ile %79'dan ve tek başına CTC ile %62'den birlikte kullanıldığında ise %90'a çıkmıştır. ctDNA pozitif ve CTC pozitif olan hastalar, ctDNA negatif ve CTC negatif olanlara kıyasla önemli ölçüde daha düşük bir hastalıksız sağkalım (DDFS) oranına sahiptir. 24 ayda, ctDNA pozitif ve CTC pozitif olan hastalar için DDFS olasılığı %52 iken, ctDNA negatif ve CTC negatif olan hastalar için %89 idi. (Radovich ve ark., 2020).

Metastatik ve tedaviye yanıt açısından incelediğimizde ise, önceki çalışmadaki belirteçlerin NACT öncesi ve sonrası negatif olup, aynı zamanda matastaz durmu da negatif olan hastalar tedaviye tam yanıt göstermiştir. Aynı zamanda, ccfDNA seviyeleri artarken, mtDNAcn artmıştır. Sonucumuzla uyumlu olarak benzer bir çalışmada, ikinci kemoterapi kürünün başlangıcından önce, ALU115 ve 247 seviyeleri her iki yanıt grubunda da (tam ve kısmi yanıt) tedavi öncesi seviyelere kıyasla daha yüksek bulunmuştur. Fakat sonuçlar istatiksel açıdan anlamlı değildir. DNA intgeritesi açısından herhangi bir ayrım bulamamışlardır. Kemoterapinin altıncı döngüsünün başlamasından önce, yani ameliyattan kısa bir süre önce, ALU115 ve 247'nin mutlak seviyeleri düşmüştür. 1 ile 6. kürleri arasındaki nispi değişiklikler her iki grupta da önemli ölçüde farklıdır. ALU 247 için de benzer sonuçlar elde edilmiştir (Lehner ve ark., 2013).

Benzer şekilde, NACT'den sonra CTC durumunun, patolojik CR'ye ulaşamayan hastaları düşük ve yüksek riskli gruplara ayırma potansiyeline sahip olduğunu göstermiştir. NACT'den sonra, patolojik CR'ye ulaşan tüm hastalar CTC negatiftir. pCR'ye ulaşamayanlar için, CTC-pozitif hastalarda önemli ölçüde artmış metastatik rekürrens riski tespit edilmiştir (Magbanua ve ark., 2021).

Papadaki ve arkadaşlarının elde ettiği sonuçlara göre, yüksek ALDH1 seviyesi ve TWIST fenotipleri, metastatik hastalıkla gösterilen pozitif korelasyonlarının yanı sıra, esas olarak aynı CTC'de birlikte ifade edilmiştir. Ayrıca kanser hücrelerinde EMT özellikleri arasındaki bağlantıyı desteklemektedir (Papadaki ve ark., 2014).

Bu çalışma, plazma ccfDNA miktarının, mtDNA kopya sayısının ve bütünlük indekslerinin hepsinin birlikte incelendiği ilk çalışmadır. Bununla birlikte, bu belirteçlerin CTC, kanser kök hücre markırları, tedavi yanıtı ve metastatik durum ilişkisinin incelenmesi açısından da literatürdeki ilk çalışmadır. Tüm bunların kemoterapiye yanıtla ilişkili olabileceği ve meme kanserinde kemoterapiye yanıtın izlenmesinde bir biyobelirteç olarak kullanılabileceği gösterilmiştir. Çalışmamızda veri grubunun az olması, tedavi öncesi ve sonrası sonuçların eksikliği, elde edilen sonuçların daha geniş kapsamlı hasta gruplarında doğrulanması gerekmektedir.

Ayrıca, incelenen parametreler arasında korelasyon olmaması, gruplar içindeki heterojenliğe ve/veya küçük örneklem büyüklüğüne bağlı olabilir. Sonuç olarak, dolaşımdaki plazma ALU247, ALU115 ve cfDNA bütünlüğü meme kanseri hastalarında önemli ölçüde yüksek olduğundan, ölçümlerinin kanser tanısında klinik faydası olabilir. Seçilen parametreler (plazma ALU247, ALU115, mtDNAcn, mtDNA ve ccfDNA bütünlüğü), meme kanserinin erken teşhisi için ideal biyobelirteçlerdir, dolayısıyla tümörün erken aşamasında kanser taraması için plazma CTCleri ile etkili bir şekilde kullanılabilirler. Ayrıca, hem ALU247 hem ALU115 hem de mtDNAcn meme kanseri için ameliyat öncesi prognostik belirteçler gibi görünmektedir. Bununla birlikte, bu parametrelerin klinik faydasını belirlemek için çok sayıda sıralı örnek ve uzun takip süresi kullanılarak büyük ölçekli prospektif çalışmalar önerilmektedir.

8. KAYNAKLAR

Adusei E, Ahenkorah J, Adu-Aryee NA, Adutwum-Ofosu KK, Tagoe EA, Koney NK-K, Nkansah E, Aryee NA, Blay RM, Hottor BA, Clegg-Lamptey J-N, Arko-Boham B. Reduced Serum Circulation of Cell-Free DNA Following Chemotherapy in Breast Cancer Patients. Medical Sciences. 2021; 9(2):37

Afrifa, J., Zhao, T., & Yu, J. Circulating mitochondria DNA, a non-invasive cancer diagnostic biomarker candidate. Mitochondrion. 2019;47:238–243

Akkiprik, M., Akkiprik M, Koca S, Uğurlu MÜ, Ekren R, Peker Eyüboğlu İ, Alan Ö, Erzik C, Güllü Amuran G, Telli TA, Güllüoğlu MB, Sezerman U, Yumuk PF. Response Assessment With Molecular Characterization of Circulating Tumor Cells and Plasma MicroRNA Profiling in Patients With Locally Advanced Breast Cancer During Neoadjuvant Chemotherapy. Clin Breast Cancer. 2020;20(4):332-343

Al-Bashaireh, A. M., Khraisat, O., Alnazly, E. K., & Aldiqs, M. Inflammatory Markers, Metabolic Profile, and Psychoneurological Symptoms in Women with Breast Cancer: A Literature Review. Cureus. 2021;13:11

Alimirzaie, S., Bagherzadeh, M., & Akbari, M. R. Liquid biopsy in breast cancer: A comprehensive review. Clinical Genetics. 2019;95:643–660.

Amor, H., & Hammadeh, M. E. A Systematic Review of the Impact of Mitochondrial Variations on Male Infertility. Genes. 2022;13(7):1182

Arko-Boham B, Aryee NA, Blay RM, Owusu EDA, Tagoe EA, Doris Shackie ES, Debrah AB, Adu-Aryee NA. Circulating cell-free DNA integrity as a diagnostic and prognostic marker for breast and prostate cancers. Cancer Genetics. 2019;235–236: 65–71.

Aucamp, J., Bronkhorst, A. J., Badenhorst, C. P. S., & Pretorius, P. J. The diverse origins of circulating cell-free DNA in the human body : a critical re-evaluation of the literature. Cambridge Philosophical Society. 2018;93:1649–1683.

Bakir, B., Chiarella, A. M., Pitarresi, J. R., & Rustgi, A. K. EMT, MET, plasticity and tumor metastasis. Trends in Cell Biology, 2020;30:764–776.

Banys-Paluchowski, M., Fehm, T. N., Grimm-glang, D., Rody, A., & Krawczyk, N. Liquid Biopsy in Metastatic Breast Cancer : Current Role of Circulating Tumor Cells and Circulating Tumor DNA. Oncology Research and Treatment. 2022;45: 4–10.

Barbany, G., Arthur, C., Lied, A., Nordenskj, M., Rosenquist, R., Tesi, B., & Wallander, K. Cell-free tumour DNA testing for early detection of cancer – a potential future tool. Journal of Interal Medicine. 2019;286:118–136.

Bettegowda, C., Sausen, M., Leary, R., Kinde, I., Wang, Y., Agrawal, N., … Diaz, L.

J. Detection of Circulating Tumor DNA in Early- and Late-Stage Human Malignancies. Sci Transl Med. 2014;6:224–24.

Bronkhorst, A. J., Ungerer, V., & Holdenrieder, S. The emerging role of cell-free DNA as a molecular marker for cancer management. *Biomolecular* Detection and Quantification. 2019;17:100087.

Burnham, P., Kim, M. S., Agbor-Enoh, S., Luikart, H., Valantine, H. A., Khush, K. K., & De Vlaminck, I. Single-stranded DNA library preparation uncovers the origin and diversity of ultrashort cell-free DNA in plasma. Scientific Reports. 2016;6:1–9

Campa, D., Barrdahl, M., Santoro, A., Severi, G., Baglietto, L., Omichessan, H., … Kaaks, R. Mitochondrial DNA copy number variation, leukocyte telomere length, and breast cancer risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study. Breast Cancer Research. 2018;20:29.

Chatterjee, A., Dasgupta, S., & Sidransky, D. Mitochondrial Subversion in Cancer. Cancer Prev Res. 2011;4: 638–654

Cheng, J., Holland, T., Markus, L., Surowy, H., Cuk, K., Schott, S., … Burwinkel, B. Circulating free DNA integrity and concentration as independent prognostic markers in metastatic breast cancer CI Confidence interval. Breast Cancer Research and Treatment. 2018;169:9–82.

Chimonidou, M., Strati, A., Malamos, N., Georgoulias, V., & Lianidou, E. S. SOX17 Promoter Methylation in Circulating Tumor Cells and Matched Cell-Free DNA Isolated from Plasma of Patients with Breast Cancer. Clinical Chemistry. 2013;59:270–279.

Chopra, S., & Davies, E. L. Breast cancer Key points. Medicine. 2019;11:1–6.

Coco, S., Alama, A., Vanni, I., Fontana, V., Genova, C., Bello, M. G. D., … Grossi, F. Circulating cell-free DNA and circulating tumor cells as prognostic and predictive biomarkers in advanced non-small cell lung cancer patients treated with first-line chemotherapy. International Journal of Molecular Sciences. 2017;18:1035

Condappa, A., McGrowder, D., Aiken, W., McLaughlin, W., & Gossell-Williams, M. Evaluation of Plasma Circulating Cell Free DNA Concentration and Integrity in Patients with Prostate Cancer in Jamaica: A Preliminary Study. Diseases. 2020;8:34

Dawson, S.-J., Tsui, D. W. Y., Murtaza, M., Biggs, H., Rueda, O. M., Chin, S.-F., … Rosenfeld, N. Analysis of Circulating Tumor DNA to Monitor Metastatic Breast Cancer. New England Journal of Medicine. 2013;368:1199–1209

Deininger, P. Alu elements: Know the SINEs. Genome Biology. 2011;12:1–12.

Deligezer, U., Eralp, Y., Akisik, E. Z., Akisik, E. E., Saip, P., Topuz, E., & Dalay, N. Effect of Adjuvant Chemotherapy on Integrity of Free Serum DNA in Patients

with Breast Cancer. 2008;179:175–179

Delmonico, L., Alves, G., & Bines, J. Cell free DNA biology and its involvement in breast carcinogenesis. Advances in Clinical Chemistry. 2020;97:171–223.

Duvvuri, B., & Lood, C. Cell-Free DNA as a Biomarker in Autoimmune Rheumatic Diseases. Frontiers in Immunology. 2019;10(502):1–21.

Elzamly S, Badri N, Padilla O, Dwivedi AK, Alvarado LA, Hamilton M, Diab N, Rock C, Elfar A, Teleb M, Sanchez L, Nahleh Z. Epithelial-Mesenchymal Transition Markers in Breast Cancer and Pathological Responseafter Neoadjuvant Chemotherapy. Breast Cancer (Auckl). 2018;12:1178223418788074

Eskander, N. S., Mansour, L., Abdelaal, A., Saad, E., & Mohamed, D. Circulating Cell Free DNA Integrity Index as a Biomarker for Response to Chemotherapy in Patients with Metastatic Colorectal Carcinoma. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention. 2022;23(1):339–348.

Filograna, R., Mennuni, M., Alsina, D., & Larsson, N. G. Mitochondrial DNA copy number in human disease: the more the better? FEBS Letters. 2021;595(8):976–1002

Gambardella, G., Viscido, G., Tumaini, B., Isacchi, A., Bosotti, R., & Bernardo, D. A single-cell analysis of breast cancer cell lines to study tumour heterogeneity and drug response. Nature Communications. 2022;13:1714

Gezer, U., Bronkhorst, A. J., & Holdenrieder, S. The Utility of Repetitive Cell-Free DNA in Cancer Liquid Biopsies. Diagnostics. 2022;12:1363.

Gilbey, A. M., Burnett, D., Coleman, R. E., & Holen, I. The detection of circulating breast cancer cells in blood. Journal of Clinical Pathology. 2004;57(9):903–911

Guha, M., Srinivasan, S., Raman, P., Jiang, Y., Kaufman, B. A., Taylor, D., Dong, D., Chakrabarti, R., Picard, M., Carstens, R.P., Kijima, Feldman, M., Avadhani, N. G. Aggressive triple negative breast cancers have unique molecular signature on the basis of mitochondrial genetic and functional defects. Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease. 2018;1864(4):1060–1071.

Hamam, R., Hamam, D., Alsaleh, K. A., Kassem, M., Zaher, W., Alfayez, M., Aldahmash, A., Alajez, N. M. Circulating microRNAs in breast cancer: novel diagnostic and prognostic biomarkers. Cell Death & Disease. 2017;8(9):e3045.

Hao, T. B., Shi, W., Shen, X. J., Qi, J., Wu, X. H., Wu, Y., Tang, Y.Y., Ju, S. Q. Circulating cell-free DNA in serum as a biomarker for diagnosis and prognostic prediction of colorectal cancer. British Journal of Cancer. 2014;111(8):1482–1489.

Harbeck, N., Penault-Llorca, F., Cortes, J., Gnant, M., Houssami, N., Poortmans, P., Ruddy, K., Tsang, J., Cardoso, F. Breast cancer. Nature Reviews Disease Primers. 2019;5

He L, Chinnery PF, Durham SE, Blakely EL, Wardell TM, Borthwick GM, Taylor RW, Turnbull DM. Detection and quantification of mitochondrial DNA deletions in individual cells by real-time PCR. Nucleic Acids Res. 2002;30(14):e68

Huang, C., Du, M., & Wang, L. Bioinformatics Analysis for Circulating Cell-Free DNA in Cancer. Cancer Medicine. 2019;11(805):1–15

Hussein, N. A., Mohamed, S. N., & Ahmed, M. A. Plasma ALU-247, ALU-115, and cfDNA Integrity as Diagnostic and Prognostic Biomarkers for Breast Cancer. Applied Biochemistry and Biotechnology. 2019;187(3):1028–1045

İnce-Ergüç, E., & Orhan Gürer, H. Östrojenle Indüklenen Meme Kanseri, Tedavi Yaklaşımları Ve Melatoninin Tedavideki Rolü. Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi. 2019;39(2):113–128

Jiang, Y., Zong, W., Ju, S., Jing, R., & Cui, M. Promising member of the short interspersed nuclear elements (Alu elements): mechanisms and clinical applications in human cancers. J Med Genet, 2019;56:639–645

Jiang, Z., Bahr, T., Zhou, C., Jin, T., Chen, H., Song, S., Ikeno, Y., Tian, H., Bai, Y. Diagnostic value of circulating cell-free mtDNA in patients with suspected thyroid cancer: ND4/ND1 ratio as a new potential plasma marker. Mitochondrion. 2020;55:145–153

Junqueira-Neto, S., Batista, I. A., Costa, J. L., & Melo, S. A. Liquid Biopsy Beyond Circulating Tumor Cells and Cell-Free DNA. Acta Cytologica. 2019;63:479–488

Kamel, A. M., Teama, S., Fawzy, A., & El Deftar, M. Plasma DNA integrity index as a potential molecular diagnostic marker for breast cancer. Tumor Biology. 2016;37(6):7565–7572

Katopodis, P., Anikin, V., Kishore, U., Carter, T., Hall, M., Asadi, N., Polychronis, A., Karteris, E. Circulating tumour cells and circulating cell-free DNA in patients with lung cancer: A comparison between thoracotomy and video-assisted thoracoscopic surgery. BMJ Open Respiratory Research. 2021;8(1):1–10

Keseru, J. S., Soltész, B., Lukacs, J., Mártona, É., Szilágyi-Bónizsa, M., Penyige, A., Póka, R., Nagy, B. Detection of cell-free, exosomal and whole blood mitochondrial DNA copy number in plasma or whole blood of patients with serous epithelial ovarian cancer. Journal of Biotechnology. 2019;298:76–81

Kopinski, P. K., Singh, L. N., Zhang, S., Lott, M. T., & Wallace, D. C. Mitochondrial DNA variation and cancer. Nature Reviews Cancer. 22021;1(7):431–445

Kustanovich, A., Schwartz, R., Peretz, T., & Grinshpun, A. Life and death of circulating cell-free DNA. Cancer Biology & Therapy. 2019;20(8):1057–1067

Kvokačková, B., Remšík, J., Jolly, M. K., & Souček, K. Phenotypic heterogeneity of triple-negative breast cancer mediated by epithelial–mesenchymal plasticity. Cancers. 2021;13:2188

Lehner, J., Stötzer, O. J., Fersching, D. M. I., Nagel, D., & Holdenrieder, S. Plasma DNA integrity indicates response to neoadjuvant chemotherapy in patients with locally confined breast cancer. 2013a;51(1):59–62

Lehner, J., Stötzer, O. J., Fersching, D., Nagel, D., & Holdenrieder, S. Circulating plasma DNA and DNA integrity in breast cancer patients undergoing neoadjuvant chemotherapy. Clinica Chimica Acta. 2013b;425:206–211

Lehner, J., Stötzer, O. J., Fersching, D., Nagel, D., & Holdenrieder, S. Clinica Chimica Acta Circulating plasma DNA and DNA integrity in breast cancer patients undergoing neoadjuvant chemotherapy. Clin Chim Acta. 2013c;425:206–211

Li, B., Kalinowski, P., Kim, B. R., Pauls, A. D., & Poburko, D. Emerging methods for and novel insights gained by absolute quantification of mitochondrial DNA copy number and its clinical applications. Pharmacology and Therapeutics. 2021;232

Lin, X., Haiyang, Z., Bo, Y., Hai, H., Ke, Z., Zou, K., & Wu, X. Plasma cell-free DNA for screening patients with benefit-assisted neoadjuvant chemotherapy for advanced gastric cancer. Science Asia. 2020;46:462–471.

Lin, Y. H., Lim, S. N., Chen, C. Y., Chi, H. C., Yeh, C. T., & Lin, W. R. Functional Role of Mitochondrial DNA in Cancer Progression. International Journal of Molecular Sciences. 2022;3:1–14

Lo, Y. M., Corbetta, N., Chamberlain, P. F., Rai, V., Sargent, I. L., Redman, C. W., & Wainscoat, J. S. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. Lancet. 1997;350:485–487

Ma, G., Wang, J., Huang, H., Han, X., Xu, J., Veeramootoo, J. S., Xia, T., Wang, S. Identification of the plasma total cfDNA level before and after chemotherapy as an indicator of the neoadjuvant chemotherapy response in locally advanced breast cancer. Cancer Medicine. 2020;9(7):2271–2282

Magbanua, M. J. M., Swigart, L. B., Wu, H. T., Hirst, G. L., Yau, C., Wolf, D. M., Tin, A., Salari, R., Shchegrova, S., Pawar, H., Delson, A.L., DeMichele, A., Liu, M.C., Chien, A.J., Tripathy, D., Asare, S., Lin, C.H.J., Billings, P., Aleshin, A., Sethi, H., ‘t Veer, L. J. Circulating tumor DNA in neoadjuvant-treated breast cancer reflects response and survival. Annals of Oncology. 2021;32(2):229–239

Mahmoud, E. H., Fawzy, A., Ahmad, O. K., & Ali, A. M. Plasma circulating cell-free nuclear and mitochondrial DNA as potential biomarkers in the peripheral blood of breast cancer patients. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention. 2016;16(18):8299–8305

Meddeb, R., Pisareva, E., & Thierry, A. R. Special Report Guidelines for the

Preanalytical Conditions for Analyzing Circulating Cell-Free DNA. Clinical Chemistry. 2019;65(5):623–633

Mutlu, H., Akça, Z., Berk, V., Erden, A., Aslan, T., & Uğur, H. (2013). Adjuvan Kemoradyoterapi Alan Meme Kanserli Hastalarda Tümör Lokalizasyonunun Akciğer Toksisitesine Etkisi The Impact of the Tumor Localization to the Lung Toxicity after Adjuvant Therapy of Breast Cancer. Konuralp Tıp Dergisi. 2013;5(2):33–35.

Nandi, K., Verma, R., Dawar, R., & Goswami, B. Cell free DNA: Revolution in molecular diagnostics - The journey so far. Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation. 2020;41(1):1–9

Nguyen, N. N. Y., Kim, S. S., & Jo, Y. H. Deregulated mitochondrial DNA in diseases. DNA and Cell Biology. 2020;39(8):1385–1400.

No, J. H., Kim, K., Park, K. H., & Kim, Y. Cell-free DNA Level as a Prognostic Biomarker for Epithelial Ovarian Cancer. Anticancer Research. 2012;32:3467–3472.

Öztaş, S., & Yakan, B. Mitokondriyal DNA VE Hastalıkları. Erciyes Medical Journal. 1999;21(1):63–71.

Panagopoulou, M., Esteller, M., & Chatzaki, E. Circulating Cell-Free DNA in Breast Cancer : Searching for Hidden Information towards Precision Medicine. Cancers. 2021;13(728):1–25

Papadaki, M., Agelaki, S., Kallergi, G., Zafeiriou, Z., Theodoropoulos, P., Georgoulias, V., & Mavroudis, D. Co-expression of putative stemness and epithelial-to-mesenchymal transition markers on single circulating tumour cells from patients with early and metastatic breast cancer. BMC Cancer. 2014;14(651)

Park, J., Kim, H. J. A., Choi, B. O. Y., Lee, H., Jang, H., Song, K. S., Noh, S-M., Kim, Y. S., Han, D.S., Kim, Y.S. Quantitative analysis of cell-free DNA in the plasma of gastric cancer patients. Oncology Letters. 2012;3:921–926

Park, M. K., Lee, J. C., Lee, J. W., & Hwang, S. J. Alu cell-free DNA concentration, Alu index, and LINE-1 hypomethylation as a cancer predictor. Clinical Biochemistry. 2021;94; 67–73

Pasha, H. A., Rezk, N. A., & Riad, M. A. Circulating Cell Free Nuclear DNA, Mitochondrial DNA and Global DNA Methylation: Potential Noninvasive Biomarkers for Breast Cancer Diagnosis. Cancer Investigation. 2019;37(9):432–439

Pastushenko, I., & Blanpain, C. EMT Transition States during Tumor Progression and Metastasis. Trends in Cell Biology. 2019;29(3):212–226

Peled, M., Agassi, R., Czeiger, D., Ariad, S., Riff, R., Rosenthal, M., … Douvdevani, A. Cell - free DNA concentration in patients with clinical or mammographic

suspicion of breast cancer. Scientific Reports. 2020;10(14601):1–9

Picard, M. Blood mitochondrial DNA copy number: What are we counting? Mitochondrion. 2021;60:1–11

Ponti, G., Manfredini, M., & Tomasi, A. Non-blood sources of cell-free DNA for cancer molecular profiling in clinical pathology and oncology. Critical Reviews in Oncology/Hematology. 2019;141:36–42

Pös, O., Biró, O., Szemes, T., & Nagy, B. Circulating cell-free nucleic acids: Characteristics and applications. European Journal of Human Genetics. 2018;26(7):937–945

Potenza, L., Calcabrini, C., De Bellis, R., Mancini, U., Polidori, E., Zeppa, S., Alloni, R., Cucchiarini, L., Dachà, M. Effect of surgical stress on nuclear and mitochondrial DNA from healthy sections of colon and rectum of patients with colorectal cancer. Journal of Biosciences. 2011;36(2):243–251

Quiros, P. M., Goyal, A., Jha, P., & Auwerx, J. Analysis of mtDNA/nDNA ratio in mice. Curr Protoc Mouse Biol. 2018;7(1):47–54

Radovich, M., Jiang, G., Hancock, B. A., Chitambar, C., Nanda, R., Falkson, C., … Schneider, B. P. Association of Circulating Tumor DNA and Circulating Tumor Cells After Neoadjuvant Chemotherapy With Disease Recurrence in Patients With Triple-Negative Breast Cancer Preplanned Secondary Analysis of the BRE12-158 Randomized Clinical Trial. JAMA Oncology. 2020;6:1410–1415

Rahat, B., Ali, T., Sapehia, D., Mahajan, A., & Kaur, J. Circulating Cell-Free Nucleic Acids as Epigenetic Biomarkers in Precision Medicine. Frontiers in Genetics. 2020;11(844):1–20

Rai, N. K., Panjwani, G., Ghosh, A. K., Haque, R., & Sharma, L. K. Analysis of mitochondrial DNA copy number variation in blood and tissue samples of metastatic breast cancer patients (A pilot study). Biochemistry and Biophysics Reports. 2021;26:100931

Rothé, F., Laes, J. F., Lambrechts, D., Smeets, D., Vincent, D., Maetens, M., … Ignatiadis, M. Plasma circulating tumor DNA as an alternative to metastatic biopsies for mutational analysis in breast cancer. Annals of Oncology. 2014;25(10):1959–1965

Rygiel, K. A., Grady, J. P., Taylor, R. W., Tuppen, H. A. L., & Turnbull, D. M. Triplex real-time PCR-an improved method to detect a wide spectrum of mitochondrial DNA deletions in single cells. Scientific Reports. 2015;5:1–12

Safi, M., & Najib, A. R. (2020). Evaluation of circulating cell-free nuclear and mitochondrial DNA levels in Syrian patients with breast tumor. Experimental and Therapeutic Medicine. 2021(1):1–7

Salem, R., Ahmed, R., Shaheen, K., Abdalmegeed, M., & Hassan, H. DNA integrity index as a potential molecular biomarker in colorectal cancer. Eqyptian Journal

of Medical Human Genetics. 2020;21(38)

Sepulveda-Villegas, M., Rojo, R., Garza-Hernandez, D., de la Rosa-Garza, M., & Treviño, V. A systematic review of genes affecting mitochondrial processes in cancer. Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease. 2020,1866(10):165846

Sharma, P., & Sampath, H. Mitochondrial DNA integrity: Role in health and disease. Cells. 2019;8(2)

Shen, L., Xia, M., Zhang, Y., Luo, H., Dong, D., & Sun, L. Mitochondrial integration and ovarian cancer chemotherapy resistance. Experimental Cell Research. 2021;401(2):20–25

Society. Cancer Facts & Figures 2022. American Cancer Society. 2022

Soltesz, B., & Nagy, B. Quantification of mtDNA in extracellular vesicles. Methods in Enzymology. 2020;645:119-140

Stewart, C. M., & Tsui, D. W. Y. Circulating cell-free DNA for non-invasive cancer management. Cancer Genetics. 2018;228–229:169–179

Swystun, L. L., Mukherjee, S., & Liaw, P. C. Breast cancer chemotherapy induces the release of cell-free DNA, a novel procoagulant stimulus. Journal of Thrombosis and Haemostasis. 2011;9:2313–2321

Szilágyi, M., Pös, O., Márton, É., Buglyó, G., Soltész, B., Keseru, J. S., Penyige, A., Szemes, T., Nagy, B. Circulating Cell-Free Nucleic Acids: Main Characteristics and Clinical Application. International Journal of Molecular Sciences. 2020;21(18):6827

Taki, M., Abiko, K., Ukita, M., Murakami, R., Yamanoi, K., Yamaguchi, K., Hamanishi, J., Baba, T., Matsumura, N., Mandai, M. Tumor Immune Microenvironment during Epithelial – Mesenchymal Transition. Clinical Cancer Research. 2021;27:4669–4679

Tan, G., Chu, C., Gui, X., Li, J., & Chen, Q. The prognostic value of circulating cell-free DNA in breast cancer. Medicine. 2018;97(13):e0197

Tekin, Ş. Türk Toplumunda Fonksiyonel ve Nonfonksiyonel Tiroit Nodülleri ile Papiller Tiroit Karsinomlarında Mitokondriyal DNA Kopya Sayısının Belirlenmesi. Tekirdağ N.K.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2021, Tekirdağ (Danışman: Prof. Dr. R Bircan)

Tetikoğlu, S. Arı zehrinin karaciğer ve metastatik meme kanseri hücrelerinde uzun vadede sitotoksik etkisinin incelenmesi. K.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2020, Trabzon (Danışman: Dr. Öğr. Üye. S Çelik Uzuner)

Theil, G., Fornara, P., & Bialek, J. Position of circulating tumor cells in the clinical routine in prostate cancer and breast cancer patients. Cancers. 2020;12(12):1–21

Toh, Y. L., Wong, E., Chae, J. W., Yap, N. Y., Yeo, A. H. L., Shwe, M., & Chan, A.

Association of mitochondrial DNA content and displacement loop region sequence variations with cancer-related fatigue in breast cancer survivors receiving chemotherapy. Mitochondrion. 2020;54:65–71

Tseng, L.-M., Yin, P. H., Chi, C. W., Hsu, C.-Y., Wu, C.-W., Lee, L.-M., … Lee, H. C. Mitochondrial DNA Mutations and Mitochondrial DNA DNA Depletion in Breast Cancer. Genes, Chromosomes and Cancer. 2006;39645:629–638

Tuchalska-Czuroń, J., Lenart, J., Augustyniak, J., & Durlik, M. Is mitochondrial DNA copy number a good prognostic marker in resectable pancreatic cancer? Pancreatology. 2019;19(1):73–79.

Umetani, N., Giuliano, A. E., Hiramatsu, S. H., Amersi, F., Nakagawa, T., Martino, S., & Hoon, D. S. B. Prediction of breast tumor progression by integrity of free circulating DNA in serum. Journal of Clinical Oncology. 2006;24(26):4270–4276.

Umetani, N., Kim, J., Hiramatsu, S., Reber, H. A., Hines, O. J., Bilchik, A. J., & Hoon, D. S. B. Increased Integrity of Free Circulating DNA in Sera of Patients with Colorectal or Periampullary Cancer : Direct Quantitative PCR for ALU Repeats. Clinical Chemistry. 2006;52(6):1062–1069

Ungerer, V., Bronkhorst, A. J., & Holdenrieder, S. Preanalytical variables that affect the outcome of cell-free DNA measurements. Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences. 2020;57(7):484–507

Vizza, E., Corrado, G., De Angeli, M., Carosi, M., Mancini, E., Baiocco, E., … Cicchillitti, L. Serum DNA integrity index as a potential molecular biomarker in endometrial cancer. Journal of Experimental and Clinical Cancer Research. 2018;37(1):1–9

Volik, S., Alcaide, M., Morin, R. D., & Collins, C. Cell-free DNA (cfDNA): Clinical Signi fi cance and Utility in Cancer Shaped By Emerging Technologies. Molecular Cancer Research. 2016;14(10):898–908

Waks, A. G., & Winer, E. P. Breast Cancer Treatment: A Review. JAMA - Journal of the American Medical Association. 2019;321(3):288–300

Wang, P., Bahreini, A., Gyanchandani, R., Lucas, P. C., Hartmaier, R. J., Watters, R. J., Jonnalagadda, A.R., Bittar, H.E.T., Berg, A., Hamilton, R.L., Kurland, F., Weiss, K.R., Mathew, A., Leone, J.P., Davidson, N.E., Nikiforova, M.N., Brıfsky, A.M., Ambros, T.F., Stern, A.M., Puhalla, S.L., Lee, A.V., Oesterreich, S. Sensitive detection of mono- and polyclonal ESR1 mutations in primary tumors, metastatic lesions, and cell-free DNA of breast cancer patients. Clinical Cancer Research. 2016;22(5):1130–1137

Wang, W., Kong, P., Ma, G., Li, L., Zhu, J., Xia, T., & Xie, H. Characterization of the release and biological significance of cell-free DNA from breast cancer cell lines. Oncotarget. 2017;8(26):43180–43191

Weerts, M. J.A., Timmermans, E. C., van de Stolpe, A., Vossen, R. H. A. M., Anvar,

S. Y., Foekens, J. A., Martens, J. W. M. Tumor-Specific Mitochondrial DNA Variants Are Rarely Detected in Cell-Free DNA. Neoplasia (United States). 2018;20(7):687–696

Weerts, Marjolein J.A., Sieuwerts, A. M., Smid, M., Look, M. P., Foekens, J. A., Sleijfer, S., & Martens, J. W. M. Mitochondrial DNA content in breast cancer: Impact on in vitro and in vivo phenotype and patient prognosis. Oncotarget. 2016;7(20), 29166–29176

Weerts, Marjolein J.A., Sleijfer, S., & Martens, J. W. M. The role of mitochondrial DNA in breast tumors. Drug Discovery. 2019;24(5):1202–1215

Xia, P., An, H. X., Dang, C. X., Radpour, R., Kohler, C., Fokas, E., Engenhart-Cabillic, R., Holzgreve, W., Zhong, X. Y. Decreased mitochondrial DNA content in blood samples of patients with stage I breast cancer. BMC Cancer. 2009;9:454

Xia, P., Wang, H. J., Geng, T. T., Xun, X. J., Zhou, W. J., Jin, T. B., & Chen, C. Mitochondrial DNA levels in blood and tissue samples from breast cancer patients of different stages. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention. 2014;15(3):1339–1344

Xu, Y., Zhou, J., Yuan, Q., Su, J., Li, Q., Lu, X., … Han, J. Quantitative detection of circulating MT-ND1 as a potential biomarker for colorectal cancer. Bosnian Journal of Basic Medical Sciences. 2021;21(5):577–586

Xue, X., Teare, M. D., Holen, I., Zhu, Y. M., & Woll, P. J. Clinica Chimica Acta Optimizing the yield and utility of circulating cell-free DNA from plasma and serum. Clinica Chimica Acta. 2009;404(2):100–104

Ye, Q., Ling, S., Zheng, S., & Xu, X. Liquid biopsy in hepatocellular carcinoma: circulating tumor cells and circulating tumor DNA. Molecular Cancer. 2019;18(1):114

Yu, M. Generation, function and diagnostic value of mitochondrial DNA copy number alterations in human cancers. Life Sciences. 2011;89:65–71

Zhou, K., Mo, Q., Guo, S., Liu, Y., Yin, C., Ji, X., Guo, X., Xing, J. A Novel Next-Generation Sequencing–Based Approach for Concurrent Detection of Mitochondrial DNA Copy Number and Mutation. Journal of Molecular Diagnostics. 2020;22(12):1408–1418

Zhou, Q., Li, W., Leng, B., Zheng, W., He, Z., Zuo, M., & Chen, A. Circulating Cell Free DNA as the Diagnostic Marker for Ovarian Cancer : A Systematic Review and Meta-Analysis. PLoS ONE. 2016;11(6):1–17

Zhu, F., Ma, J., Ru, D., Wu, N., Zhang, Y., Li, H., Liu, X., Li, L., Zhang, H., Xu, Y., Zhao, J., Fu, W. Plasma DNA Integrity as a Prognostic Biomarker for Colorectal Cancer Chemotherapy. Journal of Oncology. 2021

Zihni, İ., Erakın, M., Bodur, M. S., Karaca, İ., Acar, S., Çelik, G., … Çetin, R.

Metastatik Meme Kanseri Hastalarında Salvage Mastektomi. S.D.Ü. Sağlık Bilimleri Dergisi. 2022;13(1):140–145.