

**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI**

MEME KANSERİNİN GEN EKSPRESYON PROFİLİ

UZMANLIK TEZİ

DR. ZEKİ GÜRLER

TEZ DANIŞMANI

PROF.DR. ORHAN BAYRAM

ANKARA

EYLÜL 2011

**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI**

MEME KANSERİNİN GEN EKSPRESYON PROFİLİ

UZMANLIK TEZİ

DR. ZEKİ GÜRLER

TEZ DANIŞMANI

PROF.DR. ORHAN BAYRAM

Bu tez Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından SBE-01/2010-137 proje numarası ile desteklenmiştir.

ANKARA

EYLÜL 2011

TEŞEKKÜR

Cerrahi eğitimim ve tez ile ilgili çalışmalarım sırasında yakın ilgi ve sabırlarını benden esirgemeyerek; bilgi ve tecrübelerini hoşgörü ile aktaran sayın;

Prof.Dr.Orhan Bayram'a

Genel Cerrahi eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan tüm değerli öğretim üyelerine

Asistanlığım süresince birlikte günler ve geceler geçirdiğim asistan arkadaşlarıma

Tez için büyük çalışma ve katkıları olan sayın Doç.Dr.Ümit Bağrıaçık ve tüm ekibine

Bana koşulsuz olarak destek olan ve hep bana güç veren eşim; Dilek Gürler'e

Bu günlere gelmemde büyük pay sahibi olan aileme

Teşekkürlerimi Sunarım.

KISALTMALAR

PCR: Polymerase Chain Reaction

BRCA: Breast Cancer

ER: Östrojen Reseptörü

PR: Progesteron Reseptörü

AJCC: American Joint Committee on Cancer

UICC: International Union Against Cancer

ACS: American Collage of Surgeon

EBCTG: Early Breast Cancer Trialist Collaborative Group

NIH: National Institutes of Health

İHK: İmmün histokimya

PCR: Polymerase Chain Reaction

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	I
KISALTMALAR	II
İÇİNDEKİLER	III
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1. Meme Kanseri Tarihçesi	3
2.2.Meme Anatomisi	6
2.2.1.Memenin Arterleri ve Venleri	11
2.2.2. Memenin Sinirleri	14
2.2.3. Memenin Lenfatik Sistemi ve aksiler lenf nodülleri	15
2.2.4. Meme Fizyolojisi	18
2.3. Meme Kanseri Hakkında Genel Bilgiler	19
2.3.1. Meme Kanseri Risk Faktörleri	20
2.3.1.1.Yaş	20
2.3.1.2. Cinsiyet	20
2.3.1.3. Aile Öyküsü	21
2.3.1.4.Hormonal Durum	22
2.3.1.5. Meme Hastalığı Öyküsü	23
2.3.2. Meme Kanserinde Prognostik ve Prediktif Faktörler	23
2.3.2.1.Tümörün Histopatolojik Özellikleri	23
2.3.2.2. Aksiller Lenf Nodları	24

2.3.2.3. Lenfovasküler İnvazyon	24
2.3.2.4. Tümör Grade'i	25
2.3.2.5. Tümörün Histolojik Tipi	25
2.3.2.6. Östrojen Progesteron Reseptör Varlığı	25
2.3.2.7. ERBB2 Overekspresyonu	26
2.3.3. Meme Kanseri Evreleme	26
2.3.3.1. TNM Sınıflaması	27
2.3.4. Meme Kanseri Tedavisine Genel Bakış	30
2.3.4.1. Sistemik Adjuvan Hormonoterapi	31
2.3.4.2. Sistemik Adjuvan Kemoterapi Seçimi	32
2.3.4.2.1. Erken Meme Kanseri Araştırmacıları İşbirliği	33
Grubunun Adjuvan Kemoterapi İncelemesi	
2.3.5. Gen Ekspresyonu ile Klasik Prognostik Faktörlerin	35
Karşılaştırılması	
2.3.6. Gen Ekspresyon Profili	38
2.3.6.1. TWIST 1	39
2.3.6.2. E-CADHERIN (CDH1)	40
2.3.6.3. IGF 1	40
2.3.6.4. TP53 ve TP73	41
2.3.6.5. BCL-2 (B Hücreli Lenfoma-2) ve BAD	41
2.3.6.6. APC (Adenomatous polyposis coli)	42
2.3.6.7. AKT1	43
2.3.6.8. RARB	43
2.3.6.9. IL-6	44

2.3.6.10. GSTP 1	45
2.3.6.11. JUN	45
2.3.6.12.NME1	46
2.3.6.13. MUC 1	46
2.3.6.14. CDKN2A (p16 INK4)	47
2.3.6.15. CDKN1A (P21CIP1/WAF1)	48
2.3.6.16. CDH 13 (T-cadherin)	48
2.3.6.17. SFN (14-3-3s)	49
3.GEREÇ VE YÖNTEM	51
3.1. Hücre Kültürü İçin Kullanılan Malzeme Listesi	51
3.1.1. Kimyasal Maddeler	51
3.1.2. Sarf Malzemeleri	52
3.1.3. Cihazlar	53
3.1.4. Primer Hücre Kültürü Elde Edilmesi	54
3.2. RNA İzolasyonu	56
3.2.1. RNA Miktarının Belirlenmesi	58
3.2.2. RNA'nın Jelde Görüntülenmesi	58
3.2.2.1. FA Jel Tamponunun Hazırlanışı	58
3.2.2.2. FA Jel Yürütme Tamponunun Hazırlanışı	59
3.2.2.3. FA Jelinin Hazırlanışı	59
3.2.2.4. RNA Yükleme Tamponu	59
3.2.2.5. Jele yükleme	60

3.2.2. RT² Profiler™ PCR Array System	60
3.2.2.1. cDNA Elde Edilmesi	60
3.2.2.2. İlk Sıra cDNA Sentez Reaksiyonu	61
3.2.2.3. Deneysel Kokteyl Hazırlama	62
4.BULGULAR	63
4.1. Hastaların Karşılaştırmalı Gen Ekspresyon Profilleri	65
5. TARTIŞMA	74
5.1. Apoptozis	74
5.2. Kaspazlar	76
6.SONUÇ	80
7.KAYNAKLAR	81
8.ÖZET	92
9.SUMMARY	93
10.EKLER	94
10.1. TABLO VE ŞEKİL LİSTESİ	94
10.2. RESİM LİSTESİ	95
11. ÖZGEÇMİŞ	97

1.GİRİŞ

Meme kanseri dünyada kadınlar arasında en sık görülen malign tümördür. Yine kadınlarda görülen tüm kanserlerin yaklaşık %30'unu oluşturmaktadır.(3)

Avrupa'da yılda 180 bin, Amerika Birleşik Devletleri(A.B.D.)'nde yılda 184 bin yeni olgu saptanmaktadır (4).

Meme kanseri 30 yaşından önce nadiren görülür.30 yaşından sonra görülme hızı giderek artar. Her kadının tüm yaşantısı boyunca bu kansere yakalanma olasılığı 1/10'dur.(1,2)

Kadınlarda kansere bağlı ölümlerin %18'i meme kanseri nedeniyle oluşmakta ve meme kanserine bağlı ölümler; akciğer ve kolorektal kanserlerden sonra üçüncü sırayı almaktadır (5).

Meme kanserinin tanısından itibaren sistemik bir hastalık olarak algılanmaya başlanması ile "neo-adjuvan" ve "adjuvan" sistemik tedaviler aktif olarak kullanılmaya başlanmış ve bu tedavilerin hangi hastalara uygulanacağı sorusu önem kazanmıştır.(6)

Sağkalımla ilgili prognostik faktörler belirlenerek, bunların klinik gözlem ve tedavilere yansımaları ayrıntılı olarak ortaya konmuştur.(7)

Lenf nodu negatif meme kanserleriyle ilgili yapılan klinik çalışmalar;

Bu hastaların % 90'lık kısmının da adjuvan kemoterapiye aday olduğunu göstermektedir. Ancak bu hastaların %70'inde sadece lokoregional cerrahi tedavi ile kür sağlanmaktadır. Bu çalışmalara göre lenf nodu negatif vakaların sadece %30'una verilmesi beklenen sistemik kemoterapi için hasta seçimi;

St.Galen ya da US National Institutes of Health konsensus kriterlerine göre %85-90 oranında endikasyon bulabilmektedir.(8)

Daha çok oranda gereksiz kemoterapi uygulanmasının veya daha az oranda görülse de kemoterapi uygulanmadığı için metastaz oluşmasının nedeni halen günümüzde adjuvan tedavilerin endikasyon kriterlerine temel teşkil eden klinikopatolojik prognostik faktörlerin sensitivite ve spesifitesindeki düşüklüktür.

Son zamanlarda mikro-array yöntemi ile meme kanserlerinde her bir vakanın ekspresyon gen profili çıkarılarak kimliklendirilmesinde metastaz yönünden % 80 civarında sensitivite ve spesifite bildirilmektedir. (9,10,11,12,15)

Kliniğimizdeki meme kanseri hastalarından hazırlanan hücre kültürleri gerekli aşamalardan geçirildikten sonra PCR Array gen tarama kiti kullanılarak hastaların gen ekspresyon profilleri çıkarıldı. Çıkarılan sonuçlarla meme kanseri için yeni prediktif faktörlerin rutin kullanıma girebileceği ve tedavinin kişiselleştirilmesi için önemli bir adım olduğu görüldü.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Meme Kanseri Tarihçesi

Meme hastalıklarına ilişkin en eski bilgi ; cerrahi müdahale yapılmış olan 48 hastanın anlatıldığı Mısır papirüsüdür. Meme kanserinin kayıt altına alınmış en eski örneklerinden biri olan ve 45 hastanın kayıtlarını içeren bu yazıda, üzerinde elle dokunulabilen tümörler bulunan memenin, tedavi imkanının olmadığı anlatılmaktadır.(16)

Meme kanseri ameliyatı ile ilgili ilk açıklamaları yapan;

Bizanslı derlemeci Aetius'dur. Aetius, memenin yarısından biraz büyük ve uç kısmına yakın tümörlerin, cerrahi müdahaleye en uygun tümörler olduğunu belirtmiştir.

Aetius operasyonu şöyle tariflemiştir:

Hasta sırtüstü yatırılır. Sonra memenin kanserli bölgesi üzerinde kalan sağlam bölümüne bir yarık açılır ve kanama durana kadar dağlanır. Sonra yeni bir yarık daha açılır, yine memenin derinlerine kadar inilir ve değişik bölümleri dağlanır.

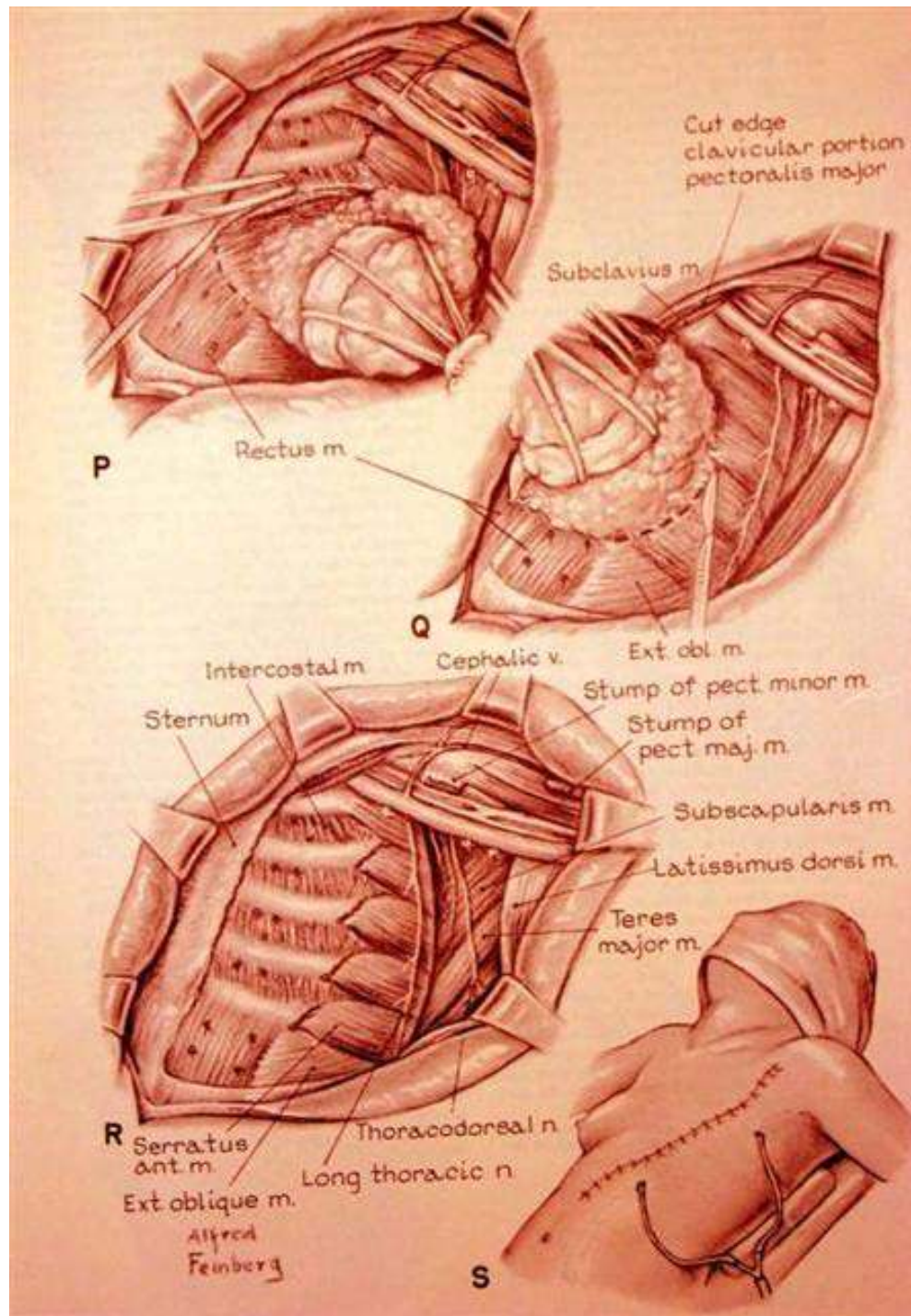
Kanamamanın durmasını sağlamak için kesi sonrası dağlama işlemi hızla yapılır. Bu yolla aşırı kanama tehlikesi engellenmiş olur.

Kesme işlemi tamamlandığında kesilmiş tüm bölümler bir kez daha bütünü ile kuruyana kadar dağlanır. Yapılan ilk dağlamalar aşırı kanamayı engellemek için, geriye kalanlar ise hastalığın tüm kalıntılarını kökünden kazımak içindir.

Bu meme kanseri ameliyatı, yüz yılların standart ameliyatı olmuştur.

Alman cerrah Wilhelm Fabry (1560-1634), meme kanserinin meme içinde pıhtılaşan ve sertleşen bir damla süttten kaynaklandığına inanıyordu.

İlk başarılı Lumpektomi ameliyatını yapan Paris'te yaşayan Hollanda'lı doktor Adrian Helvetius (1661-1741) dur.



Resim 1. Halsted'in Radikal Mastektomisi

John Hopkins Üniversitesi'nden William Halsted tarafından XIX. Yüzyılın sonlarında geliştirilen radikal mastektomi, meme kanseri ameliyatlarının standart yöntemi olmuştur. Bu metot da rutin olarak tüm meme, lenf bezleri, pektoralis major ve minor kasları, interkostal kasların yüzeyel fasyaları ile birlikte blok halinde çıkarılmaktadır.

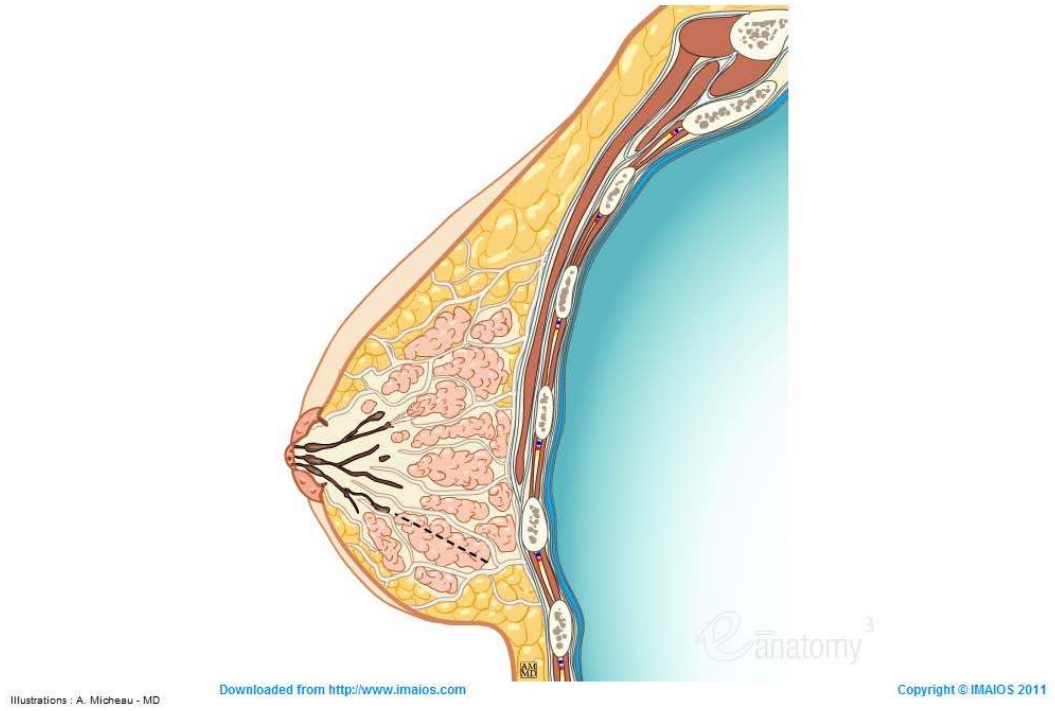
Bu yöntem daha sonraki altmış yıl Dr.Haagensen'in yaptığı modifikasyonla ağırlığını korumuştur. Yirminci yüzyılın ortalarından sonra radikal mastektomi, yerini daha ılımlı cerrahilere bırakmıştır.

2.2.Meme Anatomisi

Erişkin bir kadında meme glandı, genellikle ön göğüs duvarının yüzeyel pektoral fasyasının yüzeyel ve derin tabakaları arasında bulunur (17).

Memeler 2. ile 6-7.kostalar arasında yer alırlar. İçte sternumun kenarından dışta ön ve orta aksiller çizgiye kadar uzanırlar.

Memenin gerçek sınırları ise yukarıda klavikula, medialde sternum ortası lateralde latissimus dorsi kasının ön kenarı ve aşağıda arkus kostaryuma kadar uzanabilir. Meme dokusu değişik derecelerde olmak üzere aksillaya doğru da uzanım gösterir.(memenin aksiler kuyruğu) (18)



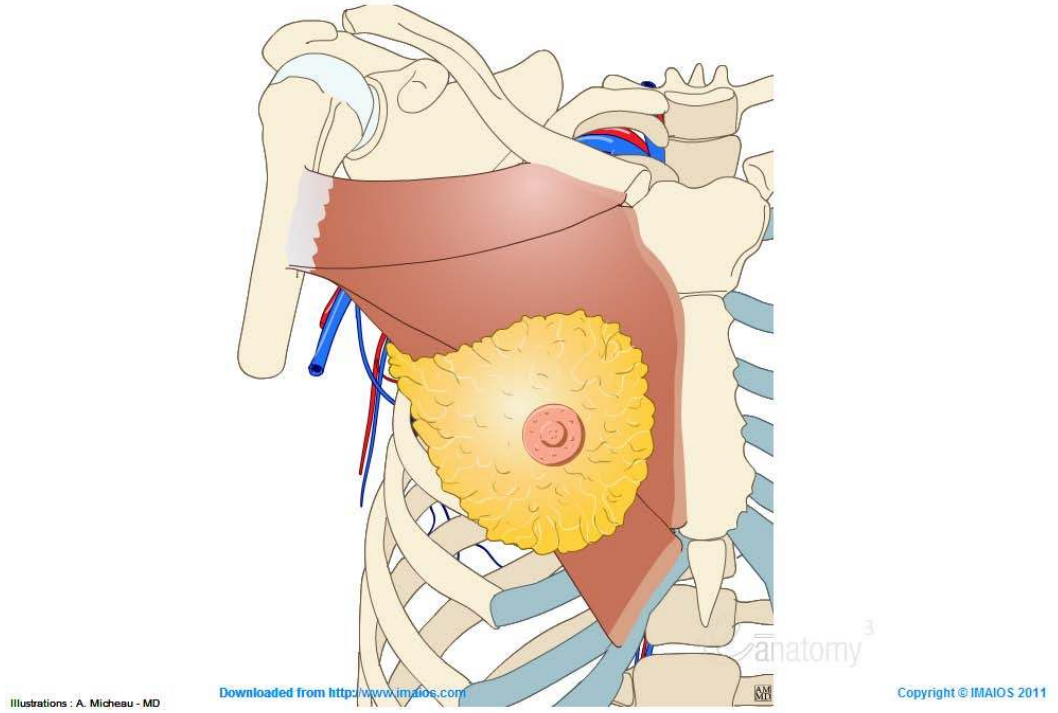
<http://www.imaios.com> Anatomy of the thoracic cage and the breast: illustrations

16 Aralık 2010 Perşembe Antoine Micheau, Denis Hoa

Resim 2. Memenin glandüler yapısı

Memenin üst-dış kadranı diğer kadrana nazaran çok daha fazla glandüler elaman içerdiği için bu kadranda selim ve habis meme tümörleri daha sık görülür.

Laktasyonda olmayan bir memenin ağırlığı 150-200 gram, laktasyonda ise 400-500 gram kadardır (17). Memenin çapları ve sınırları kadından kadına değişebileceği gibi aynı kadında; gebelik, emzirme, şişmanlama, zayıflama ve yaşlılık nedeniyle farklılık gösterebilir.



<http://www.imaios.com> Anatomy of the thoracic cage and the breast: illustrations

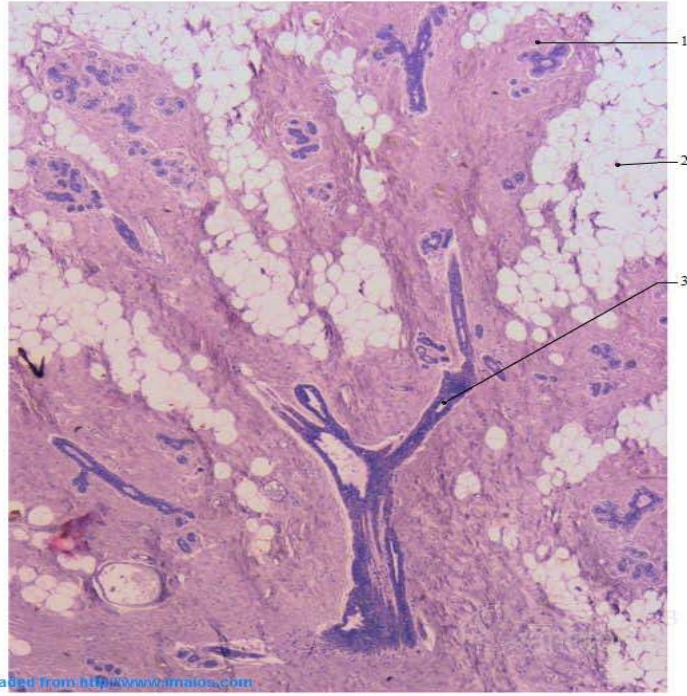
16 Aralık 2010 Perşembe Antoine Micheau, Denis Hoa

Resim 3. Memenin sınırları

Meme dokusu; Epiteliyal parankim, bunların muskuler ve fibröz destek elementleri ile değişken miktarda yağ, kan damarları, sinirler ve lenfatiklerden oluşur.(19)

Epiteliyal parankim, her biri ayrı bir kanal ile meme başına açılan 20 veya daha fazla lobdan ibarettir. (20) 10 ile 100 arasındaki sayıda alveolun kanalcığı birleşerek bir lobül oluşturur.

Bu lobüllerden 20-40 tanesinin kanalı birleşerek giderek büyür ve bir meme lobunu oluşturur. Sayıları 20 civarında olan süt boşaltıcı kanalları areola altında genişleyerek süt sinüslerini oluşturur. Bu süt sinüslerini örten epitelyum çok katlı yassı epiteldir. (21-22)



Illustrations : A. Micheau - MD

Downloaded from <http://www.imaios.com>

Copyright © IMAIOS 2011

<http://www.imaios.com> Anatomy of the thoracic cage and the breast: illustrations

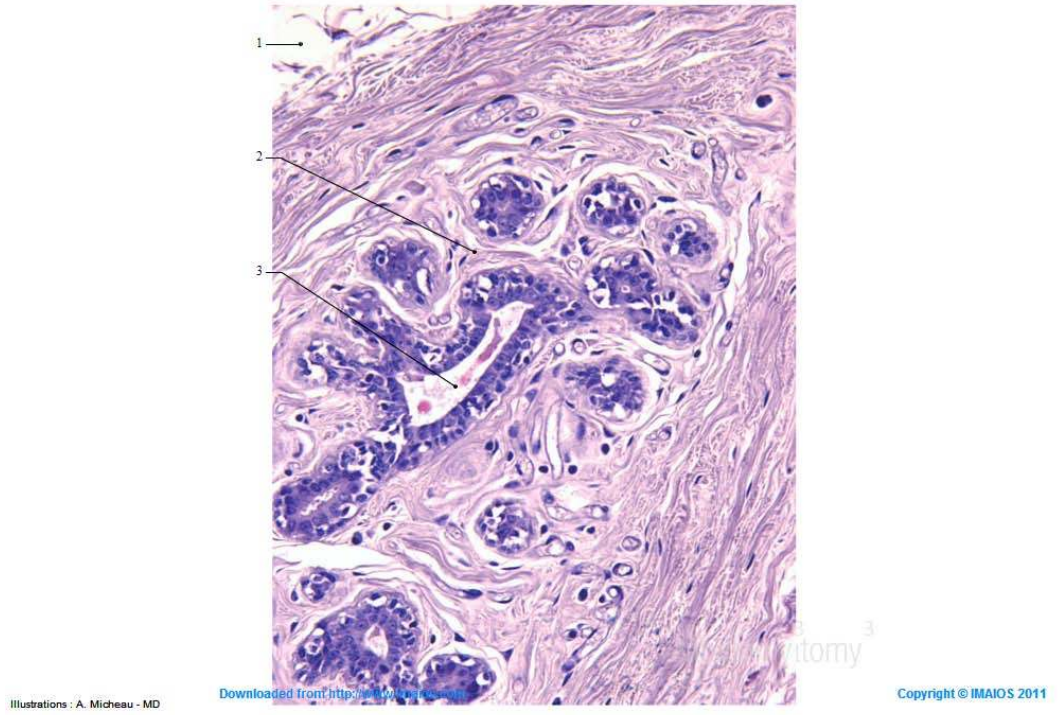
16 Aralık 2010 Perşembe Antoine Micheau, Denis Hoa

1. Meme Glandı

2. Yağ Dokusu

3. Laktiferöz Duktus

Resim 4. Meme Dokusu Histolojik Kesit



<http://www.imaios.com> Anatomy of the thoracic cage and the breast: illustrations

16 Aralık 2010 Perşembe Antoine Micheau, Denis Hoa

1.Yağ Dokusu

2.Meme Glandı

3.Laktiferöz Duktus

Resim 5. Meme Dokusu Histolojik Kesit

2.2.1.Memenin Arterleri ve Venleri

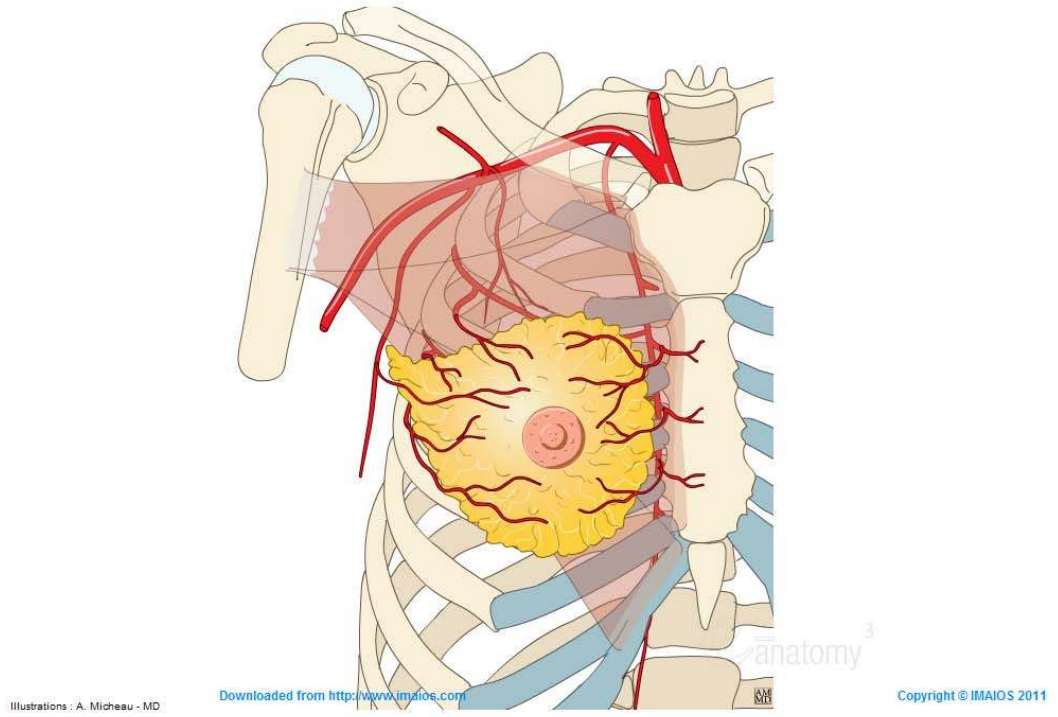
Memenin ana kan damarları

- 1.İnternal mamaryan arterin perforan dalları
- 2.Posterior interkostal arterlerin lateral dalları;
- 3.Aksiller arterden gelen dallardır.

Yüksek torasik, lateral torasik ve torakoakromial arterin pektoral dalları;

İkinci, üçüncü ve dördüncü anterior interkostal perforanlar ve internal mammaryan arterin dalları medial meme arterleri olarak memede dallanır.(24-25)

Lateral torasik arter, serratus anteriora, pektoralis major ve minöre ayrıca subskapularis kaslarına dallar verir. Memenin lateral damarları bu arterden kaynaklanır . (26)



<http://www.imaios.com> Anatomy of the thoracic cage and the breast: illustrations

16 Aralık 2010 Perşembe Antoine Micheau, Denis Hoa

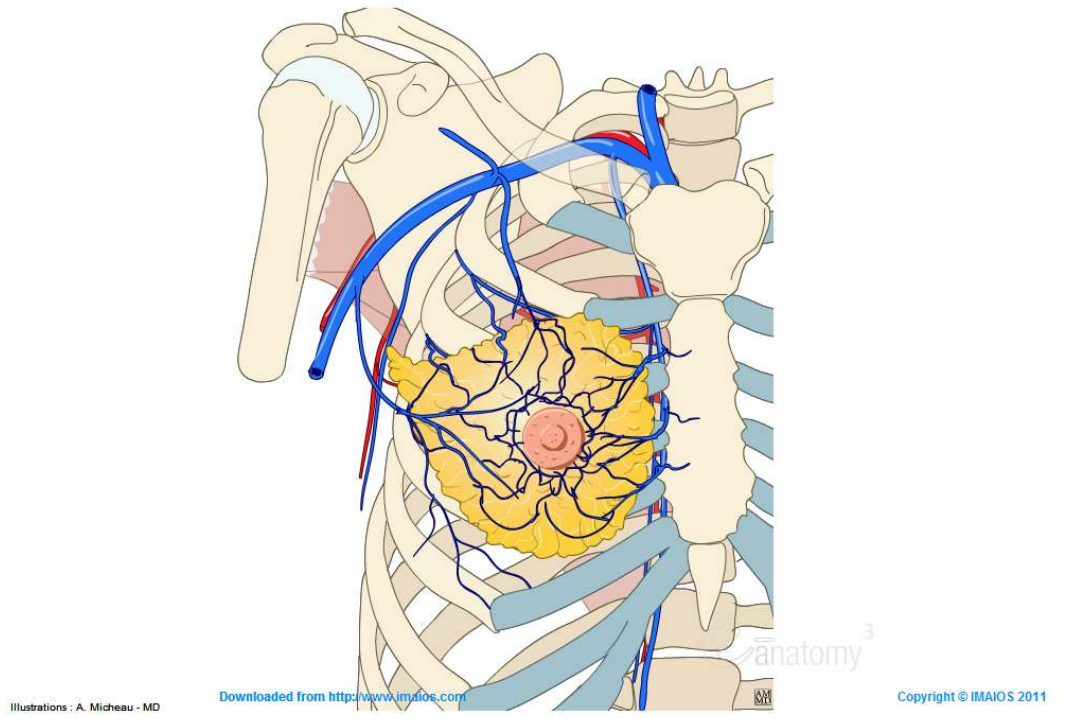
Resim 6. Memenin Arterleri

Meme ve göğüs duvarının venleri de arterlerin seyrini izler ve venöz drenaj primer olarak aksillaya doğrudur.

3 ana ven grubu;

1. İnternal torasik venin perforan dalları
2. Posterior interkostal venlerin perforan dalları
3. Aksiller venin küçük dalları

Vertebrayı saran ve kafatasının tabanından sakruma doğru uzanan Batson vertebral venöz pleksusu, meme kanserinin vertebra, kafa kemikleri, pelvik kemikler ve merkezi sinir sistemi metastazları için bir yol olabilir.(20)



<http://www.imaios.com> Anatomy of the thoracic cage and the breast: illustrations

16 Aralık 2010 Perşembe Antoine Micheau, Denis Hoa

Resim 7. Memenin Venleri

2.2.2. Memenin Sinirleri:

Memenin ve anterolateral göğüs duvarının duyusal inervasyonu üçten altıya kadar olan interkostal sinirlerin lateral kutanöz dalları tarafından sağlanır.

Bu dallar interkostal boşluğa serratus anterior kasının lifleri arasından geçerek girer. İnterkostobrakial sinir, ikinci interkostal sinirin lateral kutanöz dalıdır ve aksillanın diseksiyonu sırasında görülebilir. İnterkostobrakial sinirin kesilmesi üst kolun medial yüzünde duyu kaybına neden olur. (29)



Illustrations : A. Micheau - MD

Downloaded from <http://www.imaios.com>

Copyright © IMAIOS 2011

<http://www.imaios.com> Anatomy of the thoracic cage and the breast: illustrations

16 Aralık 2010 Perşembe Antoine Micheau, Denis Hoa

Resim 8. Memenin Sinirleri

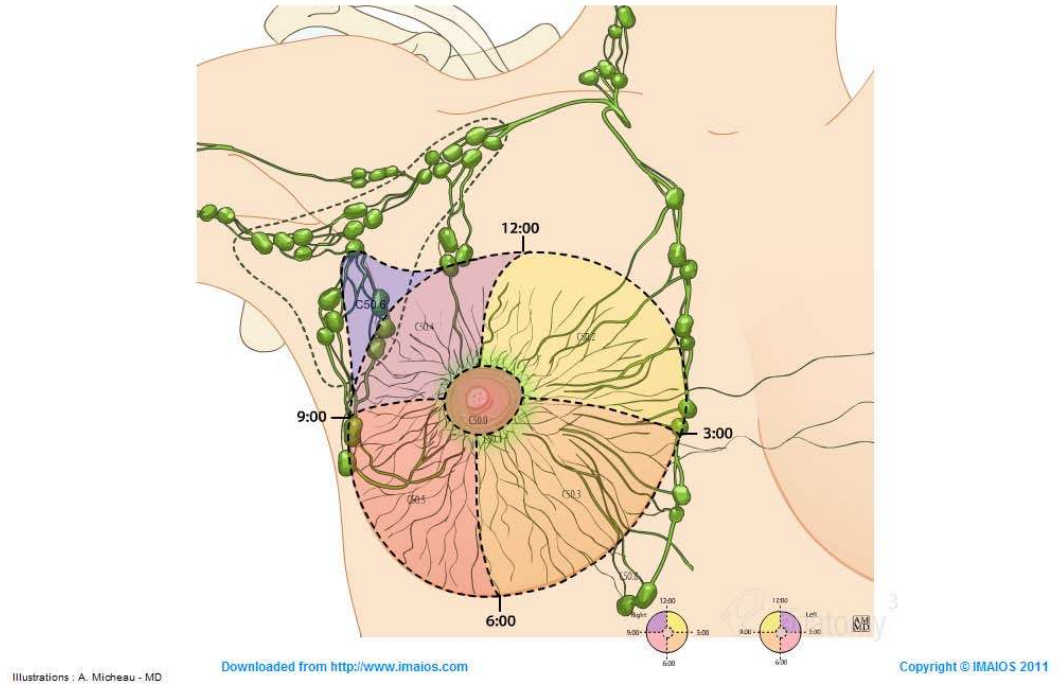
2.2.3. Memenin Lenfatik Sistemi ve aksiler lenf nodülleri:

1.Yüzeyel lenfatikler (Deri lenfatikleri)

2. Derin lenfatikler (Parankimal lenfatikler)

Aksiler lenf nodları memeden gelen lenf akımının en önemli çıkış bölgesini oluşturur. Aksiller lenfatik sistem bir bütün oluşturmasına karşın, tarifi kolaylaştırmak ve meme kanserinin yayılma derecesini belirlemek amacıyla lenf nodları altı gruba ayrılarak incelenebilir (24).

Genellikle aksiller lenf nodlarının sayısı 20 ila 40 arasında değişir.(17)



<http://www.imaios.com> Anatomy of the thoracic cage and the breast: illustrations

16 Aralık 2010 Perşembe Antoine Micheau, Denis Hoa

Resim 9. Memenin Lenfatikleri ve Aksiler Lenf Nodları

1. 4-6 lenf nodu içeren, aksiller venin medial ya da posteriorunda (post.)
uzanarak , üst ekstremitelerden gelen lenf direnajının büyük kısmını alan aksiller
ven grubu (lateral) (29)

2. 5-6 lenf nodunu kapsayan ve lateral torasik damarlara komşu,
pektoralis minör kaslarının alt sınırı boyunca uzanıp memenin lateral yüzünden
gelen lenf direnajının büyük kısmını alan eksternal mammaryan grup
(anterior ya da pektoral grup) (24)

3. 5-7 adet lenf nodu içeren subskapular damarlara komşu skapulanın
lateral sınırındaki aksilla posterior duvarı boyunca uzanıp, esas olarak alt posterior
boyundan , post. gövde ve post. omuzdan gelen lenf drenajını alan skapular grup
(posterior ya da subskapular)

4. 3-4 adet lenf nodu kapsayan ve pektoralis minör kasının hemen
posteriorunda uzanan aksillanın yağlarına gömülü olup aksiler ven, dış meme ve
skapula lenf nodu gruplarından ve doğrudan memeden gelen lenf direnajını alan
santral grup (24)

5. 6-12 adet lenf nodu içeren ve pektoralis minör kaslarının üst sınırının
posterior ve superiorunda uzanıp tüm diğer aksiler lenf nodu gruplarından gelen
lenf direnajını alan subklaviküler grup (apikal) (29)

6. 1-4 adet lenf nodu içeren pektoralis majör ve pektoralis minör kaslarının arasında yer alarak doğrudan memeden gelen lenf direnajını alan interpektoral grup (Rotter) (24-26-29)

Lenf nodu grupları pektoralis minör kasıyla olan ilişkilerine göre Düzeylere ayrılırlar.

1.Düze Lenf Nodları: Pektoralis minör kasının lateralinde, yukarıda Aksiler ven, lateralde latissimus dorsi kası ile sınırlanan alanda yerleşen ve aksilla lenf nodlarının büyük çoğunluğunu oluşturan gruptur. Aksiller ven, eksternal mammaryan ve skapular grupları kapsar.(24-29)

2.Düze Lenf Nodülleri: Pektoralis minör kasının arkasında yerleşen nispeten az sayıdaki lenf nodlarıdır . Santral ve interpektoral grupları kapsar.

3.Düze Lenf Nodülleri: Pektoralis minör kasının medialinde yerleşen ve aksiler venin klavikula altına girdiği yere kadar yayılan lenf nodlarıdır. Subklaviküler grubu kapsar.

Aksiller lenf nodları genellikle memenin lenf drenajının %75'inden fazlasını alır. Geri kalanı ise esas olarak memenin medial yüzünden köken alarak internal mamaryan arterin perforan dallarına eşlik eden lenf damarları boyunca ilerleyerek parasternal(internal mammaryan) lenf nodu grubuna direne olurlar.

2.2.4. Meme Fizyolojisi

Memenin gelişimi ve fonksiyonu; östrojen,progesteron,prolaktin,oksitosin, tiroid hormonu, kortizol ve büyüme hormonunun da arasında bulunduğu çeşitli hormonal uyarılarla başlar.

Östrojen'in meme üzerine etkisi sitoplazma ve çekirdekdeki resöptörlere bağlandıktan sonra görülür. Östrojen reseptörlerinin sentezini hem östrojen hem de progesteron uyarır.(26)

Progesteron; Prolaktin ile sinerjik etki gösterir. Epitel hücrelerinin diferansiasyonunda, lobülüs ve asinüs gelişiminde etkilidir. Laktasyonu inhibe eder. (27)

Prolaktin; hipofizde yapılır. Hamileliğin son döneminde doğumdan hemen sonra yükselir ve doğum sonrası dönemde yüksek kalır. Progesteronla birlikte lobülüs ve asinüs gelişmesini uyarır. Süt sekresyonunu ve süt proteinlerinin sentezini kontrol eder.(27)

Gebelik sırasında dolaşımdaki, over ve plasenta kaynaklı, östrojenler ve progestinlerde belirgin artışlar mevcuttur. Bu durum duktal ve lobüler epitel proliferasyonu oldukça memelerin genişlemesine ve aksesuar areolar bezlerin belirgin hale gelmesine neden olur.

Plasentanin doğumdan sonra atılmasıyla dolaşımdaki progesteron ve östrojen düzeyleri düşer ve bu da prolaktinin laktojenik etkisinin tam olarak ortaya çıkmasını sağlar.(28)

Menapozla birlikte overlerden östrojen ve progesteron salgılanmasında azalma olur, meme duktus ve alveollerinde involüsyon başlar. Çevredeki fibröz bağ dokusunun yoğunluğu artar ve meme dokularının yerini adipoz dokular alır.(28)

2.3. Meme Kanseri Hakkında Genel Bilgiler

Meme kanseri dünyada kadınlar arasında en sık görülen malign tümördür.

Yine kadınlarda görülen tüm kanserlerin yaklaşık %30'unu oluşturmaktadır.(3)

Avrupa'da yılda 180 bin, Amerika Birleşik Devletleri(A.B.D.)'nde yılda 184 bin yeni olgu saptanmaktadır (4).

Meme kanseri 30 yaşından önce nadiren görülür. 30 yaşından sonra görülme hızı giderek artar. Her kadının tüm yaşantısı boyunca bu kansere yakalanma olasılığı 1/10'dur.(1,2)

Kadınlarda kansere bağlı ölümlerin %18'i meme kanseri nedeniyle oluşmakta ve meme kanserine bağlı ölümler; akciğer ve kolorektal kanserlerden sonra üçüncü sırayı almaktadır (5).

2.3.1. Meme Kanseri Risk Faktörleri

2.3.1.1.Yaş

Meme kanserinin ortalama görülme yaşı 65 olmakla birlikte, insidansı 30 yaşından sonra artar. İnsidans 40 yaşta 93’de 1’e, 50 yaşta 50’de 1’e, 60 yaşında 24’de 1’e 70 yaşında 14’de 1’e 80 yaşında 10’da 1’e yükselir. (31,32)

2.3.1.2. Cinsiyet

Meme kanseri gerek meme dokusunun gelişimi gerekse hormonal etkiler nedeniyle kadınlarda çok daha sık görülür. Erkeklerde meme kanseri görülmesi sıklığı kadınların 1/100 ’ üdür. (29,31)

Doğumda memenin epiteliyal komponenti meme başının altında az sayıda rudimenter kanaldan oluşur ve prepubertal yıllarda bu kanallar yavaş yavaş büyüme gösterir. Erkeklerde meme gelişimi bu fazda dururken, kadınlarda cinsiyet hormonlarının etkisiyle meme gelişimi pubertede hızlanmaktadır.

Doğum kontrol ilaçları ve hormon replasman tedavisi kullanımı da kadınlarda meme kanserinin daha sık görülmesine katkıda bulunabilir.

2.3.1.3. Aile Öyküsü

Yapılan çalışmalardan elde edilen veriler aile öyküsü ve meme kanseri riski arasında şu ilişkileri ortaya koymuştur:

1. Birinci derece akrabalarda (anne, kız kardeş ve kız çocuğu) meme kanseri olması, riski 2-3 kat artırmaktadır.
2. Uzak akrabalarda (teyze, büyükanne) meme kanseri görülmesi, riski fazla arttırmamaktadır.
3. Birinci derece akrabada ortaya çıkan meme kanseri premenopozal dönemde veya bilateral olduğunda, meme kanseri gelişme riski daha fazla artmaktadır.

Birden fazla bireyin etkilendiği ailelerde, özellikle bilateral ve erken yaş kanserlerde, meme kanseri gelişme riski %50'ye kadar yükselmektedir.

Bu ailelerde meme kanseri genellikle genetik kökenli olarak ortaya çıkmaktadır.

Yine yapılan bir çalışmada ailesinde meme kanseri öyküsü olup, doğum yapmış postmenopozal kadınlarda meme kanseri gelişme riski, aile öyküsü olmayıp doğum yapmamış 70 yaş üzeri kadınlardan daha fazla bulunmuştur.

İki kuşak boyunca birinci derece akrabalarında meme kanseri öyküsü olmaksızın meme kanseri gelişen hastalar sporadik meme kanseri hastalarıdır.

Birinci veya ikinci derece akrabalarında birden fazla kişide meme kanseri olan, ancak herediter meme kanseri tanımına uyacak şekilde diğer kanserlerle birlikte görülmeyen meme kanserleri ailesel meme kanseri olarak tanımlanır.

Ailede meme kanseri ile birlikte kanser (over ve kolon kanseri) öyküsü olan, otozomal dominant geçiş gösteren meme kanseri hastaları bu gruba dahil edilmektedir. Bu tanıyı destekleyecek diğer faktörler, meme kanserinin premenapozal erken yaşta ortaya çıkması ve bilateral olmasıdır.

Ailesel meme kanseri sendromlarının %40'ında 17. kromozomun uzun kolu üzerinde bulunan BRCA 1 geni tanımlanmıştır.(34)

Ayrıca kromozom 13'de tespit edilen ikinci bir sorumlu gen daha mevcuttur ve BRCA 2 olarak adlandırılmıştır ailesel meme kanserlerinin %30'unda saptanmaktadır.

BRCA 1 ile ilişkili kanserlerin histopatolojisi BRCA 2 ile ilişkili kanserlere göre daha kötüdür. Yüksek grade, hormon reseptör negatifliği ve artmış S faz fraksiyonu ile karakterize tümörler içerir. (34)

2.3.1.4.Hormonal Durum

Kadınların hayatları süresince östrojene maruz kaldıkları süre onların meme kanseri olma risklerini artırır. 12 yaşından önce menarş, ilk canlı doğumun 30 yaşından sonra yapılmış olması, doğurmamış olmak, menapozun 55 yaşından sonraya kalması risk artışını beraberinde getirir.(34)

Marchbanks'ın popülasyona dayalı vaka kontrol çalışmasında 35-60 yaş arası kadınlarda halen oral kontraseptif kullananlarda veya geçmişte kullananlarda meme kanseri görülme riskinin artmadığı saptanmıştır. (35)

HRT için ise menapozal semptomları düzeltmek amacıyla 5 yıldan az süre ile öst. , prog. kombinasyonlarının kullanılması önerilmektedir.(34)

2.3.1.5. Meme Hastalığı Öyküsü

Meme kanseri olan kadınlarda diğer memede kanser gelişme riski 3-4 kat artmaktadır. Riskteki bu artış aile öyküsü varlığından kaynaklanan riske göre daha yüksektir.(36)

Ayrıca; 30 yaşından önce göğse uygulanan radyasyon, önceki biyopside atipi veya kanser saptanması da riski arttırır.

2.3.2. Meme Kanseri Prognostik ve Prediktif Faktörler

2.3.2.1. Tümörün Histopatolojik Özellikleri

Prognoz ile tümör çapı arasında aksiller lenf nodlarının durumundan bağımsız olarak bir ilişki vardır. Ayrıca primer tümörün çapı ile doğru orantılı olarak aksiller lenf nodu tutulumu olasılığı da artmaktadır.(37)

Tümör çapı 1 cm'nin altında olan lenf nodu tutulumu negatif hastalarda 10 yıllık sağkalım oranları %90 veya daha iyidir. Oysa çapı 2-4 cm arasındaki tümörlerde bu oran yaklaşık %55 tir (39).

2.3.2.2. Aksiller Lenf Nodları

İnvaziv kanserli hastalarda tutulan aksiller lenf nodu sayısı sağ kalımdaki en önemli prognostik faktördür. 10 yıllık sağ kalım oranı aksiller lenf nodu tutulumu negatif olgularda %65 iken 4 ya da daha fazla lenf nodu tutulumu olan olgularda bu oran %15 tir. (38)

Ayrıca level 3'te çapı 2 cm'den daha büyük metastatik lenf nodunun olması prognozu daha kötü hale getirmektedir.

Aksillanın evrelendirmesindeki hataları en aza indirmek için en az 10 lenf nodunun örneklenmesi gerekir. Pozitif aksiller lenf nodlarının anatomik düzeyi bağımsız bir prognostik gösterge olarak görülmemektedir (40).

Metastatik lenf nodu sayısındaki artış hastalık nedeniyle olan ölüm riskini arttırmaktadır.(41,42)

2 mm'nin altındaki lenf nodu metastazları mikrometastaz olarak tanımlanır. (40)

2.3.2.3.Lenfovasküler İnvazyon

İnvaziv karsinom içindeki ya da komşuluğundaki damarlar ve lenfatikler tümör hücreleri tarafından invaze edilebilir. İnvaziv karsinom çevresinde vasküler invazyon varlığı erken lokal rekürens ve uzak metastazı öngören değerli bir bulgudur.

2.3.2.4. Tümör Grade'i

Grade, hücresel diferansiasyon derecesi, hastalığın gidişini belirleyen güçlü bir faktör olarak kabul edilmektedir.(45)

Meme kanserlerinin grade seçiminde en sık kullanılan sistem tubul formasyonu, nükleer derece ve mitoz oranını kullanan Fisher sistemidir.

2.3.2.5. Tümörün Histolojik Tipi

Meme kanserini üç ana histopatolojik kategoriye ayırarak incelemek uygundur; Noninvazif epitaliyal karsinomlar, invazif epitelial karsinomlar, mikst konnektif ve epitelial karsinomlar

Meme kanserli hastalarda en sık rastlanan histolojik tip infiltratif duktal karsinomdur. Özel histolojik tipe sahip meme tümörlerinin (tübüler, medüller, lobüler, papiller, müsinöz) prognozu duktal karsinoma oranla daha iyidir.

2.3.2.6. Östrojen Progesteron Reseptör Varlığı

Reseptör pozitifliği hastanın biraz daha iyi bir prognoza sahip olduğunun göstergesidir. Reseptör pozitifliğinin araştırılması tedaviye yanıt açısından önemlidir.

Verilecek antiöstrojen tedaviye yanıt reseptörlerin pozitif olduğu hastalarda en yüksek orandadır. (%80)

2.3.2.7.ERBB2 Overekspresyonu

Membran bağlantılı bu proteinin overekspresyonu genellikle gen amplifikasyonu sonucu meydana gelir. Bu nedenle overekspresyon immünohistokimyasal yöntemler (dokuda proteinin tespiti) veya floresan in situ hibridizasyon (genlerin sayısının tespiti) ile saptanır. Overekspresyon kötü prognoz ile birlikte.

2.3.3. Meme Kanseri Evreleme

Meme kanseri tedavisi geçmişte tamamen klinik evrelemeye dayandırılmıştır, ancak özellikle cerrahi dışı tedavinin belirlenmesinde günümüzde , patolojik evreleme ön plandadır.

Klinik evrelemeye örnek olarak Manchester sınıflaması yapılmıştır.

Evre I	Memede sınırlı kalmış tümör
Evre II	Tümör memede sınırlı kalmış, ancak palpabl ve mobil lenf nodları mevcut
Evre III	Meme dışına yayılım gösteren tümör
Evre IIIa	Deri tutulumu ya da büyük bir alanda fiksasyon veya deri ülserasyonu varlığı
Evre IIIb	Kasa veya fasiaya tümör fiksasyonu, +/- mobil lenf nodu
Evre IV	Tümör meme dışına uzanmış ve göğüs duvarına tam fiksasyon mevcut, supraklaviküler lenf nodu yada karşı memede lenf nodu varlığı, satellit nodüller veya uzak metastaz varlığı

Tablo 1. Manchester Sınıflaması

2.3.3.1. TNM Sınıflaması

Primer meme kanserinde en sık kullanılan evreleme sistemi International Union Against Cancer (UICC) ve American Joint Committee on Cancer (AJCC) tarafından tasarlanan sınıflamalardır.

Burada önemli olan evreleme sistemlerinin heterojen bir hastalığı ve erken malignensiden fatal metastazlara giden klinik tabloları sunmasıdır.

2002 yılında AJCC TNM sınıflamasını yeniden düzenledi. Bu sistem Primer Tümör (T), bölgesel lenf nodlarının durumu (N) ve uzak metastazların varlığını tanımlama üzerine kuruludur.(34)

Meme Kanseri İçin Amerikan Birleşik Komitesinin Kanser Evreleme Sistemi

(p) T (Primer Tümör)

Tis	Karsinoma in situ (lobüler veya duktal)
T1	Tümör ≤ 2 cm
T1a	Tümör $\geq 0.1, \leq 0.5$ cm
T1b	Tümör > 0.5 cm, ≤ 1 cm
T1c	Tümör > 1 cm, ≤ 2 cm
T2	Tümör > 2 cm, ≤ 5 cm
T3	Tümör > 5 cm
T4	Göğüs duvarı veya cilde yayılım gösteren herhangi bir büyüklükteki tumor
T4a	Göğüs duvarına yayılım gösteren tümör (pektoralleri tutmaz)
T4b	Tümör cilde yayılmıştır. Ülserasyon, ödem ve satelit nódüller vardır.
T4c	T4a ve T4b birlikte.
T4d	İnflamatuvar karsinoma

(p) N (Lenf Nodları)

N0	Rejyonel/Bölgesel lenf nodu tutulumu yok, özel çalışmaya gerek yok
N0(i-)	Rejyonel lenf nodu tutulumu yok, Negatif İHK (immunhistokimya)
N0(i+)	Histolojik olarak lenf nodu tutulumu yok, Pozitif İHK
N0(mol-)	Histolojik olarak lenf nodu tutulumu yok, Negatif PCR
N0(mol+)	Histolojik olarak lenf nodu tutulumu yok, Pozitif PCR
N1	1-3 aksiller ve/veya biyopsi ile internal mamaryan lenf noduna metastaz
N1(mic)	Mikrometastaz (>0.2 mm ancak >2.0 değildir)
N1a	1-3 Aksiller lenf noduna metastaz
N1b	Sentinel biyopsi ile internal mamaryan lenf nodlarında metastaz
N1c	Biyopsi ile 1-3 aksiller ve internal mamaryan lenf nodunda Metastaz
N2	Klinik olarak 4-9 aksiller lenf nodunda veya aksiller metastaz olmadan internal mamaryan lenf nodunda metastaz
N2a	4-9 aksiller lenf noduna metastaz, en azından bir tanesi >2.0 mm
N2b	Klinik olarak belirgin internal mamaryan lenf nodu tutulumu, aksiller tutulum negative
N3	≥ 10 aksiller lenf nodu tutulumu veya aksiller ve internal mamaryan lenf nodu tutulumu birlikteliği
N3a	≥ 10 aksiller nod tutulumu (>2.0 mm) veya infraklavikular lenf nodu tutulumu
N3b	Klinik olarak pozitif internal mamaryan lenf nodu ve ≥ 1 aksiller nod tutulumu veya biyopsi ile >3 aksiller lenf nodu ve pozitif internal mamaryan lenf nodu
N3c	Aynı taraf supraklavikular lenf nodu tutulumu

M (Metastaz)

M0	Uzak metastaz yok
M1	Uzak metastaz

Tablo 2. TNM Sınıflaması

EVRE 0	T _{is} , N0, M0
EVRE I	T1, N0, M0
EVRE IIA	T0, N1, M0 T1, N1, M0 T2, N0, M0
EVRE IIB	T2, N1, M0 T3, N0, M0
EVRE IIIA	T0, N2, M0 T1, N2, M0 T2, N2, M0 T3, N1, M0 T3, N2, M0
EVRE IIIB	T4, herhangi bir N, M0 Herhangi bir T, N3, M0
EVRE IV	Herhangi bir T, herhangi bir N, M1

Tablo 3. Amerikan Birleşik Komitesi Kanser Evre Gruplaması

2.3.4. Meme Kanseri Tedavisine Genel Bakış

Meme kanseri tanısı konduktan sonra, meme kanseri hastasına önerilecek tedavi tipi hastalığın evresiyle belirlenir. (29)

Meme kanserlerinin erken evreleri için cerrahi uygulamalar, kür için bir şans sağlar. Son yüzyıl boyunca meme kanserlerinde cerrahi yaklaşım, tümörlerin klinik tablosu gibi dramatik değişikliklere uğramıştır.

1894’ de, Halsted sonradan radikal mastektomi olarak isimlendirilen, 50 hastalık serisini ‘tam operasyon’ ile tedavi ettiğini bildirmiştir. Sonraki 75 yılda radikal mastektomi ABD’de opere edilen tüm meme maligniteleri için kullanılmıştır.

Halsted’in ilk vaka çalışmaları incelendiğinde vakaların 2/3’ünün lokal ileri evre olduğu ve % 60 vakada lenf nodu metastazı varlığı saptanmıştır. (31)

Amerikan Cerrahlar Kolejinin (ACS) 1980 araştırmaları incelendiğinde evre 1 ve evre 2 olanlar hastaların %85’ini oluşturmuştur. Pozitif aksiler lenf nodlu vakaların sıklığı %40 olarak görülmüş ve 1970’lerde cerrahi tedavi için ölçülen tümör boyutu 2 cm veya daha az saptanmıştır. (34)

Tedavi başarısızlığının nedeninin %90 sistemik veya visseral nükslerle alakalı olması, cerrahları radikal mastektomiye alternatif bulmaya sevk etmiştir.

Böylece tedavide sistemik kemoterapi kullanımı detaylanarak ve bireysel hasta seçimlerine önem verilerek kullanılmaya başlanmıştır.(34)

1982’de ACS operabl meme kanseri olgularında cerrahi uygulamaları araştırdı ve ilk yıllardaki uygulamaların sonuçları ile karşılaştırdı. Cerrahi uygulamadaki değişiklik 1970’lerin ortalarında, radikal mastektomiden modifiye radikal mastektomiye ani geçişin olması ile meydana geldi. Bu araştırmada memeleri koruyan prosedürler olguların sadece %7,2’sine yapılmıştı.

Günümüzde meme koruyucu girişimlerin oranları yaklaşık %40-60 civarındadır. Ayrıca artık birçok cerrah aksiler diseksiyon gereksinimi hakkında daha seçici davranmaktadır. Sentinel nod biyopsisinin kullanımı, negatif lenf nodlu kadınlar için rutin aksiler diseksiyonun yerini almaya başlamıştır.

2.3.4.1.Sistemik Adjuvan Hormonoterapi

Hormon reseptör durumuna göre hormonoterapi tedavisi planlanır. Eldeki doku yetersizse postmenapozal bayanlarda reseptörler pozitif kabul edilmelidir.

Östrojen reseptörü negatif progesteron reseptörü pozitif olan hasta grubunun küçük bir kısmı da tedaviden fayda görür. (7)

Östrojen ve progesteron reseptörü pozitif ise bu hormonların varlığı tümörün uyarımına neden olur. Hormonların eliminasyonu amacıyla;

Tamoksifen ile reseptör blokajı , overlerin rezeksiyonu veya ablasyonu, sitotoksik kemoterapi ile over hücre hasarı yapılabilir ancak rutin olarak kullanılan tamoksifendir.

Yaş, menapoz durumu, aksiler lenf nodu profili, tümör boyutu ne olursa olsun östrojen progesteron reseptörü pozitif olan hastalara hormonal terapi önerilmelidir. (29)

Bu tedavi, tümör rekürrens sıklığının azalmasında, ikincil primer meme tümörü oluşma riskinin azalmasında ve 15 yıllık yaşama süresinin artmasında etkilidir.(7)

Tamoksifen kullanımı için önerilen süre 5 yıldır.

2.3.4.2. Sistemik Adjuvan Kemoterapi Seçimi

Meme kanserinde primer cerrahi tedaviden sonra olası mikro metastazları engellemek ve nüksü önlemek için yapılan sitotoksik tedavidir.

Operabl meme kanseri için sistemik adjuvan terapinin yararı orta derecededir ve ölüm veya rekürrens olasılığını % 20-30 oranında azaltabilmektedir. (46)

Adjuvan kemoterapi ile ilişkili olarak 69 çalışmadaki 30 bin kadının verileri bir araya getirilerek çıkartılan sonuçlarda; Tedavi alanlarda almayanlara göre rekürrenste istatiksel olarak anlamlı, %23,5 azalma ve herhangi bir nedenden dolayı olan ölüm için ise %15,3 azalma olduğu gösterildi.

Nod pozitif hastalarda nod negatif hastalara göre kesin yarar daha büyüktür. Bununla beraber yıllık rekürrens olasılığında azalma benzerdir. Nod negatif hastalar için %28-34, nod pozitif hastalar için % 33-42 idi.(46)

EBCTCG'nin (Early Breast Cancer Trialists Collaborative Group)

1998 yılındaki genel analizinde farklı hasta grupları için adjuvan kemoterapi sonuçlarının temelleri ortaya konmuştur.(47)

2.3.4.2.1. Erken Meme Kanseri Araştırmacıları İşbirliği Grubunun Adjuvan Kemoterapi İncelemesi

1. Her ne kadar rekürrens ve ölüm için mutlak farklar küçük olsa da, nod pozitif ve nod negatif hastalar için fayda benzerdir.
2. Genç hastalar bir miktar daha fazla faydalansa da tüm yaş grupları kemoterapiden fayda görür. (70 yaşına kadar)
3. Üç aydan altı aya kadar uygulanan adjuvan tedavilerin sonuçları daha uzun süreli tedavilerin sonuçları ile benzerdir.
4. Antrasiklin içeren rejimler biraz daha etkindir.
5. Genç kadınlarda hem östrojen reseptörü pozitif hem de östrojen reseptörü negatif hastalar fayda görürken, daha yaşlı kadınlarda östrojen reseptörü negatif kanserler daha fazla fayda görürler.

Adjuvan kemoterapi 1990 yılından sonra standart tedavi haline gelmiştir.(48)

4-6 körlük tedavi optimal yararı sağlarken tedavinin uzatılması toksisiteyi arttırır ancak ek yarar sağlamaz.

Bu toksik tedavinin sağkalıma etkisi ispatlansa da hangi hasta grubuna verilmemesi gerektiği ile ilgili çok sınırlı bilgiler mevcuttur.(7)

Mevcut bilgiler ışığında kabul edilen; Lenf nodu metastazı bulunan hastalara tümör boyutu ne olursa olsun sitotoksik kemoterapi verilir.

Primer meme kanseri boyutu 1 cm'den büyük olan kanserlere sitotoksik kemoterapi verilmektedir. Ancak bu bilgiler genelleştirilmiştir ve hastaların tedavisinde kişisel yaklaşımlar gerekir.

Hasta yaşı 35'den büyük, 1,1 cm. ile 2 cm. arasındaki tümörlerde lenf nodu negatif, östrojen progesteron reseptörü pozitif ve grade 1-2 ise nüks açısından orta risk grubu olarak kabul edilir.(48)

1 cm'den küçük ve nod negatif olan hastaların hastalıksız sağkalım oranları % 92'dir. (41)

NSABP'nin B20 ve B21 nolu çalışmalarına göre;

Düşük risk grubunda sadece tamoksifen ile tedavi edilen hastaların 10 yıllık rekürrensiz sağkalımı tamoksifen ile %95, tamoksifen+kemoterapi ile %96 olarak bulunmuştur. Orta risk grubunda ise; oranlar %89 ve %90'dır. (73)

FAKTÖR	DÜŞÜK RİSK	ORTA RİSK	YÜKSEK RİSK
Tümör Büyükülüğü	< 1 cm.	1,1-2 cm.	>2 cm.
ER. Statüsü	(+)	(+)	(-)
Grade	1	1-2	2-3
Yaş			≤ 35
Lenf Nodu	-	-	+

Tablo 4. Meme Kanseriinde Nükse Yatkın Risk Grupları

2.3.5.Gen Ekspresyonu ile Klasik Prognostik Faktörlerin

Karşılaştırılması

Profesyonel kullanıcılara fikir verebilmesi ve kemoterapi hormonoterapi tedavilerinden görebileceği faydaları orantısal olarak hesaplaması açısından yardımcı olabilecek internet siteleri mevcuttur. (www.adjuvantonline.com)

Bu sitede mevcut tüm prognostik faktörler kullanılarak kemoterapi ve hormonoterapiden hastanın göreceği fayda orantısal olarak hesaplanmaktadır.

Girilmesi gereken veriler arasında; hastanın yaşı, diğer komorbid hastalıkları, Östrojen reseptör durumu, tümör grade'i, tümör boyutu, pozitif lenf nodu varlığı, pozitifse sayısı bulunmaktadır.

Tüm bu verilerin girilmesi sonucunda ayrı ayrı kemoterapi ve hormonoterapiden hastanın ne kadar fayda göreceği hesaplanmaktadır.

Bu sistem mevcut prognostik faktörleri kullanmaktadır.

Örnek olarak; Östrojen reseptörü pozitif, 1,1 - 2 cm aralığında 35 yaşın üzerindeki hastalarda nüks olasılığı %17,9 olarak hesaplanmakta kemoterapinin yararı % 6,2 kombine terapi ise %10,7 yararlı olarak hesaplanmaktadır. Burada kullanılan değişkenler St. Gallen ve NIH tarafından kabul edilen prognostik faktörlerdir.

2000 ile 2009 yılları arasında gen ekspresyon profilleri ve mevcut klinik prognostik faktörler ile ilgili yapılan çalışmalarda gen ekspresyon profillemesi geleneksel metodlara göre çok daha fazla lenf nodu negatif hastayı düşük riskli olarak sınıflandırmıştır.(50)

Gen ekspresyon profili ile belirlenen düşük riskli hastalar St. Gallen ve NIH kriterlerine göre belirlenen hastalara göre daha yüksek bir hastaliksız sağkalım olasılığına sahiptir.(51)

Gen profillemeye ile belirlenen yüksek riskli hastalarda St. Gallen ve NIH kriterlerine göre belirlenen hastalara göre daha fazla uzak metastaz saptanmıştır.(52)

NIH kriterlerine göre belirlenen yüksek riskli grup bir çok iyi prognostik faktör içeren hastayı da kapsamaktadır. Tam tersi olarak düşük riskli grupta kötü prognostik faktörler mevcuttur.

Aynı alt gruplar St.Gallen kriterlerine göre belirlenen düşük ve yüksek gruplarda da görülmüştür. St Gallen ve NIH grupları yanlış sınıflandırılmış (gen ekspresyon profili ile daha iyi belirlenebilecek) hastalar içerdiğinden bu hastalar ya fazla tedavi ya da daha az tedavi görmüş olacaktadırlar.(53)

Bu sonuçlara göre kullanılan kriterler belirgin olarak yetersizdir ve hastaları yanlış şekilde sınıflandırmaktadır. (52-53)

2.3.6.Gen Ekspresyon Profili

Biz bu çalışmada 12 hastanın hücre kültürlerini hazırladık ve bu kültürlerin bir milyon hücreyi geçmesinin ardından gen ekspresyon profillerini çıkardık.

Kullanılan kitlerin özelliklerine bağlı olarak bu kültürlerden 84 farklı gen ürünü elde edildi. Bu gen ürünleri işlevlerine göre 11 farklı grupta sınıflanmıştır.

Bu gruplar;

1.Tümör sınıflandırma belirteçleri

2.Sinyal iletimi yapan gen grubu

3.Epitelial mezenkimal geçiş gen grubu

4.Anjiogenez gen grubu

5.Adezyon gen grubu

6.Proteoliz gen grubu

7.Apopitozis gen grubu

8.Hücre siklusu gen grubu

9.DNA hasarı gen grubu

10.Ksenobiyotik taşınımı gen grubu

11.Transkripsiyon faktörleri gen grubu

Bu çalışmada apoptozis gen grubu kullanılarak istatistiksel değerlendirmeler yapıldı. Apoptozis grubunda 19 adet gen profili mevcuttur.

TWIST1, CDH1 (E-CADHERIN), IGF1, TP53, TP73

BCL2, BAD, APC, AKT1, RARB, IL6 , GSTP1

JUN, MUC1, NME1 (NM23A), CDKN2A (P16 INK4),

CDKN1A (p21 CIP1/WAF1), CDH13 (T-CADHERIN)

SFN (14-3-3s)

2.3.6.1. TWIST 1

bHLH (basic-helix-loop-helix) protein ailesinin üyesi olan bir transkripsiyon faktörüdür. Twist1 proteini memelilerde mezenkimal hücre serisinin farklılaşmasını inhibe eder. Farelerde ilk bulunduğu zaman miyogenez ve osteogenezi engellemesi nedeniyle gen transkripsiyon represörü olarak tanımlanmıştır.

Twist1 ; hücreleri Myc- ve p53- bağımlı apoptozisden koruyan bir proto-onkogendir. Twist1 insan kanserlerinde sıklıkla aktive olur. P53 ve Rb tümör baskılayıcı genleri inhibe eder, aynı zamanda epitelyal-mezenkimal geçişini tetikler.(54)

2.3.6.2. CDH1 (E-CADHERIN):

Tümörde hücre invazyonunu ve metastazı baskılayan kalsiyum bağımlı bir hücre adezyon molekülüdür. E-cadherin'in çeşitli genetik ve epigenetik değişiklikler sonucu azaltılması özellikle göğüs ve gastrik karsinomlarda malign tümör oluşumunu tetikler.

E-cadherin geni genellikle DNA metilasyonu nedeniyle vücutta azalır. Over kanseri, meme kanseri, mide kanseri, tiroid kanseri ve endometrium kanserinde CDH1 gen mutasyonları tespit edilmiştir.(55)

2.3.6.3. IGF 1

IGF' ler çeşitli fonksiyonlara sahip mitogenik hormonlardır.

IGF-1 (Insulin like growth factor 1) birçok hücre çeşidinde büyüme ve farklılaşmayı düzenleyen cevapların oluşmasını tetikler. IGF-1 reseptörünün over ekspresyonu hücrelerinin tümörleşme potansiyelini arttırırken apoptozisten korunmalarını sağlar.

IGF 1 birçok hücrede apoptozis mekanizmasını inhibe eder. Bu hücreler arasında hiperosmotik stres altındaki nöroblastoma hücreleri, IL-3 hücre serileri ve kültüre edilmiş preovulatuvar folliküller bulunur. (56)

2.3.6.4. TP53 ve TP73

İlk defa 1979 yılında DNA tümör virüslerinin proteinleri ile interaksyonu sonucu bulunan ve üzerinde yoğun çalışmaların yapıldığı bir tümör supresör genidir.

Bu gen hücre siklus arresti ve hücre stresi veya genotoksik zarar sonucu oluşan apoptozis ile ilgili genlerin ekspresyonunu düzenler. Anormal hücre proliferasyonu sonucu p53 aktivasyonu major tümör supresör mekanizmasını oluşturur. TP53 fonksiyonundaki bozukluklar kontrolsüz hücre büyümesi yani kanser hücrelerinin oluşması ile sonuçlanır.

Yakın zamanda bulunan TP53 ilişkili genler de (TP63 ve TP73) benzer tümör baskılayıcı fonksiyonlar sergilemiştir. TP73, TP53 ile hem genomik hem de protein seviyesinde önemli homoloji gösterir. TP73 geninin over ekspresyonu p53 genine yanıt veren genleri aktiveleştirir ve p53 gibi apoptozisi indükler. (57)

2.3.6.5. BCL-2 (B Hücreli Lenfoma-2) ve BAD

18. kromozomunun q kolunda yer almaktadır (18q21.3).

Bcl-2 programlanmış hücre ölümünü bloke eder. B hücre serisi Bcl-2 genini aşırı salgılayan transgenik fareler üzerine yapılan çalışmalar hücrelerin yaşam süresinin uzadığını ve yüksek dereceli lenfomaların oluştuğunu göstermiştir. Bcl-2 eksik farelerde ise lenfositler apoptozise gitmiştir.

Bcl2 ailesi birbirine zıt etkileri olan iki gruptan oluşur. Bu gruplardan biri pro-apoptotik (apoptozisi indükleyici) diğeri ise anti-apoptotik (apoptozisi baskılayıcı) etkidir.

Anti-apoptotik BCL2 ailesi üyelerinin en iyi bilinenleri: BCL2, BCL-X1, MCL-1 pro-apoptotik olanları ise: BAX, BCL-Xs, BAD, BIM, BAK, BID'dir.

BAD (Bcl-2- ilişkili ölüm promoter) Bcl-2 gen ailesinin apoptozisin başlamasında görevli pro-apoptotik bir üyesidir. Aktivasyon sonrası anti-apoptotik proteinlerle heterodimer oluşturarak apoptozisi durdurmalarını engeller.(58)

2.3.6.6. APC (Adenomatous polyposis coli)

APC geni kromozom 5'in uzun kolunda (q) 21 ile 22'inci pozisyonlar arasında lokalize olmuştur. APC geni kontrolsüz hücre çoğalmasını engelleyen tümör süprösör genlerinden biridir.

APC geninde görülen mutasyon kolorektal kanser ile sonuçlanabilir. İnsanlarda kolon kanserinin en erken belirteçlerinden biri APC genindeki somatik ve genetik mutasyonlardan kaynaklı düzensiz polip oluşumudur.

Germline APC mutasyonuna sahip kişilerde yüzlerce benign kolorektal tümör görülebilir ve bunların bir kısmı kansere sebep olabilir. Kolorektal mukozada ilk apoptotik kontrol APC tarafından düzenlenir. APC ekspresyonu spesifik olarak apoptozisi indükler. Bu etkisini meme kanseri üzerinde de gösterebildiği kanıtlanmıştır.(59)

2.3.6.7. AKT1

Bir Serin/Treonin kinaz olan AKT veya diğeri ismiyle PKB (protein kinaz B), karbonhidrat metabolizması, protein ve lipid sentezi gibi hücrenin metabolizmasını etkileyen bir çok hücre işlerinde görev alır.

Farklı hücrelerde büyüme faktörü bağımlı, hücre hayatta kalımını direkt ya da dolaylı kontrol eder.

AKT 1 apoptozisi inhibe eder. Bunu direkt olarak pro-apoptotik bir protein olan BAD' i fosforile edip fonksiyonsuz hale getirerek yapabilir.

AKT, NFK β gibi transkripsiyon faktörlerini aktive ederek hücrelerin apoptozisden korunmasını dolaylı olarak da sağlar. (60)

2.3.6.8. RARB

Retinoidler (A Vitamini) hücre proliferasyonu, farklılaşması ve gelişimi gibi çeşitli hücre işlerini düzenler. Retinoidler çeşitli kanser türleri için kemoterapötik ajan olarak kullanılır (kolon kanseri gibi).

Retinoidlerin biyolojik etkileri retinik asit reseptörleri (RAR)- α , β , γ ve retinoid X reseptörleri ile etkileşimleri sonucu ortaya çıkar. RAR β epitelin normal homeostazının korunmasında görevlidir. Retinoidler antiproliferatif ve proapoptotik özellikleri ile meme kanserine karşı etkindir. (61)

2.3.6.9. IL-6

Interlökin 6 (IL-6) geni tarafından kodlanan IL 6 proteini hem pro-inflamatuvar hem de anti-inflamatuvar olarak fonksiyon gösteren bir sitokindir.

T hücreleri ve makrofajlar tarafından immün cevap oluşması için sekrete edilir. (enfeksiyon sırasında ve travma sonrası, özellikle yanık ve inflamasyona sebep olan doku hasarı)

IL-6'nın anti-inflamatuvar etkisi TNF α , IL-1 üzerindeki engelleyici ve

IL-1a ve IL-10 üzerindeki aktifleştiriciliği ile ortaya çıkar.

IL-6 sadece hücre farklılaşması ve büyümesi üzerinde değil birçok hücrede apoptozisin düzenlenmesinde etkindir. Yapılan çalışmalar IL-6'nın insan hepatoma hücrelerini, basal hücre karsinoma hücrelerini ve servikal kanser hücrelerini çeşitli etkenler tarafından uyarılan apoptozisten koruduğunu göstermiştir. IL-6 epitelyal tipindeki kanser hücrelerinin temel yaşam faktörüdür.

IL-6'nın anti-apoptotik etkisi Bcl-2 ailesi genlerinin sentez ürünlerini arttırmasıyla açıklanmıştır. IL-6 miyeloma hücre apoptozisini engeller ve BCL-xL geninin sentez ürünlerini arttırır. (62)

2.3.6.10. GSTP 1

Glutathione S-transferase P, insanda GSTP1 geni tarafından kodlanan bir enzimdir. Glutasyon S-transferaz enzimleri (GSTs), hücrelerde sitotoksik ve genotoksik elektrofillerin ve serbest radikallerin detoksifikasyon reaksiyonlarını katalizleyerek hücreleri sitotoksik ve karsinojenik ajanların sebep olduğu hasarlardan korurlar.

Buna bağlı olarak, GST enzimlerinin düşük oranda ifadesi veya yokluğu nedeni ile detoksifikasyon reaksiyonlarındaki azalmanın kansere yatkınlıkta artışa neden olduğu bildirilmektedir.

Glutasyon S-transferaz p1 (GSTP1), akciğer dokusunda en fazla bulunan enzim olup çok çeşitli karsinojenik maddeyi metabolize eder. Yapılan çalışmalarda, GSTP1 gen seviyesi normal dokularla kıyaslandığında özofagus, mide, meme, kolon, prostat, akciğer tümörlerinde yüksek miktarlarda bulunmuştur.(63)

2.3.6.11. JUN

c-Jun, Fos protein ailesiyle birlikte AP-1 transkripsiyonel kompleksini oluşturan temel öğelerden biridir. C-Jun ilk olarak avian sarkoma virüsü ASV17'de bulunan v-jun onkogenine olan homolojisi ile tanımlanmıştır.

junB ve junD olmak üzere iki tane c-jun ilişkili gen izole edilmiştir. Yapılan çalışmalar c-jun ekspresyonunun hücre proliferasyonunu kontrol ettiğini göstermiştir.

Çeşitli stres uyaranlarına (UV, hidrojen peroksit, TNF α gibi) maruz kalan hücrelerde şiddetli ve uzun zamanlı c-jun indüklenmesi görülür, apoptozis tetiklenir. C-Jun aktivitesi hücre proliferasyonu, farklılaşması, hücresel transformasyon ve apoptozisde etkilidir.(64)

2.3.6.12.NME1

NME1 geni metastazı suprese eden (baskılayan) genlerden biridir. Nukleosit difosfat kinaz A enzimi insanlarda NME 1 geni tarafından kodlanır. Bu gendeki mutasyonlar agresif noroblastomalarda tespit edilmistir.

Yüksek metastaz potensiyeline sahip hücrelerde NME1 geninin mRNA ekspresyonu düşük saptanmıştır. Akciğer kanseri, yumurtalık kanseri, meme kanseri ve karaciğer kanserinde NME1 gen ekspresyonu ve tümörün metastatik potensiyeli arasında ters korelasyon görülmüştür. (65)

2.3.6.13. MUC 1

Mucin 1 veya polimorfik epitelyal musin (PEM) insanlarda MUC1 geni tarafından kodlanır. Organizmadaki epitel yüzeyleri, patojenlerden mukus sayesinde korunur. Optimal korunma için mukusun miktar, bileşim ve fonksiyonunun regülasyonu son derece önemlidir. Hücre yüzeyindeki mukus, glikozile proteinler olan musinler tarafından oluşturulur.

MUC1, musinler arasında ilk bulunan ve üzerinde en çok çalışılan musin tipidir.

MUC1; meme dokusu, tükürük bezi, ösafagus, mide, pankreas, karaciğer, duodenum, akciğer, böbrek, mesane, prostat, uterus, ve testis gibi birçok organ ve doku epitel hücrelerinde eksprese edilir .

MUC1 aşırı ekspresyonu kolon, meme, over, akciğer ve pankreas kanseri ile ilişkilidir.

MUC1'in ekstrasellüler bölgesinin aşırı glikolizasyonu hidrofobik olan kemoterapötik ilaçların kanser hücrelerine girmesini engeller. Ayrıca, MUC1 immün hücrelerin kanser hücreleri üzerinde bulunan reseptörleri ile olan interaksiyonunu engelleyip, anti tümör immün cevabı inhibe eder.

Yapılan çalışmalar MUC1'in sitoplazmik bölgesinin p53'e bağlandığını göstermiştir. Bu birleşme p53-aracılı apoptozisin inhibe olmasına neden olur. Ayrıca, MUC1 Bcl-xL ekspresyonunu arttırarak apoptozisi engeller.(66)

2.3.6.14. CDKN2A (p16 INK4)

Siklin bağımlı kinaz inhibitör 2A (CDKN2A, p16) diğer adıyla multiple (çoklu) tümör süpresör 1 (MTS-1), insanda CDKN2A geni ile kodlanan bir tümör supresör proteinidir.

Siklin-bağımlı kinaz 4 ve 6 (CDK4 ve CDK6) inhibitörüdür. P16, hücre siklusunun düzenlenmesinde önemli bir role sahiptir: hücre büyümesini inhibe eder. Gendeki mutasyon, çeşitli kanser türlerinin oluşumunu tetikler. Özellikle, pankreas kanseri, glioma ve melanomalarda bu genin mutasyonları görülmüştür.

CDKN2A'nın mutasyonel formu, meme ve meme kanseri dokularında görülür ve meme kanserine yatkınlığı arttırdığı gösterilmiştir. (67)

2.3.6.15. CDKN1A (P21CIP1/WAF1)

p21/WAF1 (Siklin-bağımlı kinaz inhibitör 1) insanlarda 6. kromozom üzerinde bulunan CDKN1A geni tarafından kodlanan bir proteindir. Bu genin ekspresyonu, sıkı bir şekilde tümör supresor protein olan p53 tarafından kontrol edilir.

İnsan meme kanserlerinde p53 geni siklin bağımlı kinaz inhibitorlerini aktive ederek hücre siklusunun dönüşümünü inhibe eder. p21, GTPaz aktivatörü olup hücre morfogenezi, hücre motilitesi, hücre canlılığı, anjiogenez ve mitoz gibi pek çok hücresel fonksiyonda görev alır.

p21/WAF1, p53 tarafından indüklenmiş apoptozisde görev alır. (68,72)

2.3.6.16. CDH 13 (T-cadherin)

Kaderinler (kalsiyum bağımlı adezyon) tip-1 transmembran proteinleridir. Hücre adezyonunda, doku içinde hücrelerin birbirine bağlı olmasını sağlayarak önemli rol oynarlar. Fonksiyon gösterebilmek için kalsiyuma bağımlılık gösterirler.

Kaderin süper ailesi; Kaderinler, protokaderinler, desmogleinler ve desmokolinler gibi proteinleri içerir. Hepsinin ortak noktası hücre dışı kalsiyum bağlama bölgelerinin olmasıdır.

Kaderin ailesinin farklı üyeleri farklı lokasyonlarda bulunurlar. CDH1-E-kaderin epithelial dokularda, CDH2-N-kaderin nöronlarda, CDH13-T-kaderin barsak epitelinde bulunur.

CDH13 geninin kodladığı protein beş adet hücre dışı tekrarlayan kaderin ünitesinden, bir adet transmembran bölgesinden ve bir adet sitoplazmik kuyruktan oluşan kalsiyum bağımlı hücre-hücre adezyon glikoproteinidir.

E-kaderin tüm epiteliyal yüzeylerde eksprese olurken T-kaderin bazal ya da alt epiteliyal katmanlarda (prostat, barsak ve meme epiteliyal hücreleri) eksprese olur. T-kaderinin tümör hücrelerindeki eksikliğinin metastaz ve invazyon oluşumunu tetiklediği gösterilmiştir.(69)

2.3.6.17. SFN (14-3-3s)

14-3-3 sigma proteini , insanda SFN geni tarafından kodlanan bir proteindir.

14-3-3 proteinleri kanser biyolojisinde bir çok hücresel olayı düzenler. İnsanda yedi tane 14-3-3 geni bulunur ve bunlardan bir tanesi 14-3-3 sigma'dır. Bu gen kanser ile direkt ilişkilendirilmiştir.

Tümör supresör olarak fonksiyon gösteren bu molekülün inaktivasyonu sonucu tümör oluşumu gözlenir.

14-3-3 sigma geninin eksikliğinde kanser hücreleri konvensiyonel anti-kanser ajanlarına karşı hassaslaşır. Bu nedenle bu genin inhibisyonu terapötik amaçlı kullanılabilir.

Yapılan çalışmalar pro-apoptotik protein ve 14-3-3 proteinlerinin birlikteliğinin sonucunda apoptozisin inhibe edildiğini göstermiştir. (71)

3.GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma 01/2010-137 proje koduyla etik kurul onayı almıştır ve Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmektedir.

3.1. Hücre Kültürü İçin Kullanılan Malzeme Listesi

3.1.1.Kimyasal Maddeler

1. DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium 1X) (GIBCO)
2. PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline 1X) (GIBCO)
3. Trypsin (%2.5, 10X) (GIBCO)
4. Trypsin-EDTA (%0.25) (GIBCO)
5. Penicillin-Streptomycin (GIBCO)
6. L-Glutamine 100X (GIBCO)
7. MEM Non-essential aminoacid 100X (GIBCO)
8. Sodium pyruvate 100 mM (GIBCO)
9. 2-Mercaptoethanol 1000X (GIBCO)
10. Fetal Bovine Serum (GIBCO)
11. Collagenase (SIGMA)
12. Dimethyl Sulphoxide (SIGMA)
13. Trypan Blue Stain (GIBCO)
14. RNA İzolasyon Kiti – RNasy

15. Human Breast Cancer PCR Array Kiti (SABiosciences PAHS-131A)
16. RNase-free DNase (Qiagen)
17. 3-[N-morpholino]propanesulfonic acid (MOPS) (free acid)
18. Sodium acetate
19. EDTA
20. Sodium hydroxide
21. Formaldehyde (12.3 M, % 37)
22. RNase-free water
23. Saturated aqueous bromophenol

3.1.2. Sarf Malzemeleri

1. Hücre kültür plate (6 well) (FALCON)
2. Santrifüj tüpleri (15 ml ve 50 ml) (GREINER)
3. Hücre dondurma tüpleri (TRP)
4. Cell strainer (FALCON)
5. Hücre kültür flaskları (25 cm² ve 75 cm²) (TRP)
6. Hücre kültür petrisi (60-15 mm) (GREINER)
7. Steril pasteur pipeti (GREINER)
8. Disposable steril pipet (GREINER)
9. Steril filtreli mikro pipet uçları (10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl)
(GREINER)
10. Otomatik mikropipetler (Gilson ya da SOCOREX)

11. Enjektör (1 ml, 5 ml, 10 ml)
12. Bistüri
13. UV Plate
14. Thoma lam (Marienfeld)

3.1.3. Cihazlar

1. Santrifüj (Beckman Coulter)
2. Mikro santrifüj (Eppendorf)
3. Class II LaminAir(Holten)
4. Işık mikroskobu (Leica)
5. Inverted mikroskop (Leica)
6. Florasan mikroskop (Leica)
7. İnkübatör (%5 CO2) (Sanyo)
8. Sıvı azot sistemi (CBS)
9. Buzdolabı (+4) (Indesit)
10. Buzdolabı (-86) (Sanyo)
11. Vortex (Heidolph)
12. Su banyosu (GFL)
13. Thermal Cyclor (Eppendorf)
14. Light Cyclor 480(Roche)
15. Synergy HT (BioTek)

3.1.4. Primer Hücre Kültürü Elde Edilmesi

Hücre Kültürü elde edilebilmesi için kullanılan malzemeler;

Tyrpsin (%2.5, 10X) (GIBCO), Hücre kültür plate(6 well) (FALCON)

Cell strainer (FALCON), Hücre kültür petrisi (60-15 mm) (GREINER)

Santrifüj tüpleri (15 ml ve 50 ml) (GREINER)

Steril pasteur pipeti (GREINER), Tyrpsin-EDTA (%0.25) (GIBCO)

Collagenase (SIGMA), Santrifüj (Beckman Coulter)

Hücre Kültürünün hazırlanabilmesi için kullanılan yöntem ise;

Cerrahi operasyon sonrası gelen tümör parçası bir hücre kültür petrisi içerisinde bistüri yardımı ile çok küçük parçalara ayrılır.

Bu küçük tümör parçaları 3 ml. Tyrpsin (%2.5, 10X) (GIBCO) ve Collagenase (SIGMA) ile yaklaşık 45-60 dk 37°C'de %5 CO₂ içeren etüvde bekletilir.

Süre sonunda tümör parçaları ezilir ve steril hücre filtrelerinden geçirilir.
(Cell strainer (FALCON))

Elde edilen hücre süspansiyonu 50 ml'lik santrifüj tüpüne aktarılır ve 5dk 1200 rpm'de santrifüj edilir.

Süpernatant atılır.

Pellet 1 ml besi yeri ile (DMEM %20 FBS) resuspend edilir.

Elde edilen hücre süspansiyonu 5 ml besi yeri (DMEM %20 FBS) içerisinde 6 kuyucuklu hücre kültür plağının bir kuyucuğuna aktarılır.

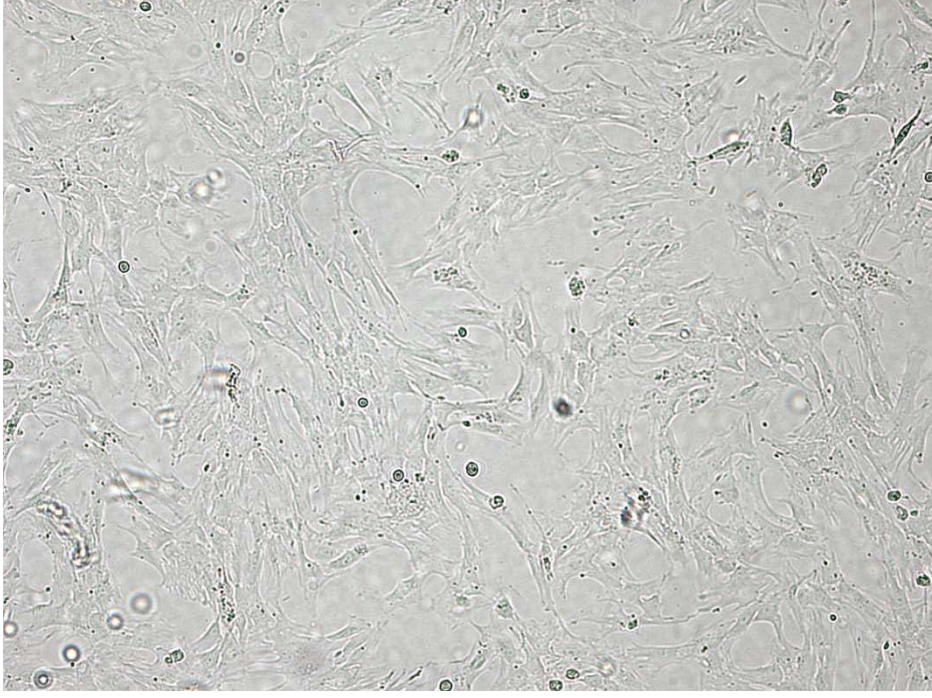
37°C'de %5 CO₂ içeren etüvde inkübe edilir ve hücre çoğalması gözlemlenir.

Elde edilen primer hücre serisinden pasaj yapılarak hücreler çoğaltılır.

Yeterli miktarda hücre elde edildikten sonra, hücreler çalışmada kullanılana kadar % 5 Dimethyl Sulphoxide (SIGMA) içeren FBS (Fetal Bovine Serum (GIBCO)) içerisine aktararak hücre dondurma tüplerinde sıvı azotta dondurulur.



Resim 10. Hücre Kültürü Mikroskopik Resim



Resim 11. Hücre Kültürü Mikroskopik Resim

3.2. RNA İzolasyonu

QIAGEN RNeasy Mini Kit (50) CAT NO: 74104

QIAGEN RNase-Free DNase Set (50) CAT NO: 79254 QIAGEN RNeasy

Mini Protocol For

“Isolation of Total RNA from Animal Cells” protokolünden Spin Column yöntemiyle RNA izolasyonu yapılır.

1. Hücreler tripsinize edilir.
2. Hücreler 350µl **RLT Buffer*** ile resuspend edilir.
3. Örnek homojenize edilir (10 sn. vorteks veya 10 kez şırıngadan geçirilerek).
4. Homojenize olmuş lizata 350 µl % 70 lik alkol ilave edilir. Pipet ile karıştırılır.
5. 700 µl örnek 2 ml'lik collection tube yerleştirilmiş RNeasy mini column içerisine konur. 15 sn. ≥ 8000 g (≥ 10.000 RPM) santrifüj edilir.
6. Aynı collection tube içerisinde bulunan RNeasy column içerisine 350 µl **RW1** buffer ilave edilir. 15 sn ≥ 8000 g (≥ 10.000 RPM) santrifüj edilir.
7. Genomik DNA kontaminasyonunu engellemek için DNase (QIAGEN RNase-Free DNase Set Cat. No.: 79254) ile inkübe edilir.
 - 10 µl **DNase I** stok solüsyonuna 70µl RDD Buffer ilave edilir, yavaşça pipetlenir, tüp duvarında olası enzim kaybını önlemek adına gerekirse mini spin yapılır.
 - **DNase I** inkübasyon karışımı (80µl) direkt olarak RNeasy spin column membranının merkezine konur, 20–30°C'de 15 dk inkübasyona bırakılır.
 - RNeasy column içerisine 350 µl **RW1 Buffer** ilave edilir. 15 sn ≥ 8000 g (≥ 10.000 RPM) santrifüj edilir.
8. RNeasy column yeni bir 2 ml'lik collection tube'e yerleştirilir. 500µl **RPE Buffer*** ilave edilir. 15 sn ≥ 8000 g (≥ 10.000 RPM) santrifüj edilir.

9. Aynı collection tube içerisinde bulunan RNeasy column içerisine 500µl **RPE Buffer** ilave edilir. 2 dakika ≥ 8000 g (≥ 10.000 RPM) santrifüj edilir.
 10. RNeasy column steril bir 1.5 ml'lik collection tube'e yerleştirilerek 1 dk maksimum hızda boş bir şekilde santrifüj edilir.
 11. RNeasy column steril bir 1.5 ml'lik collection tube içerisinde yerleştirilir. 30-50 µl RNase-free su ilave edilir. 1 dakika ≥ 8000 g (≥ 10.000 RPM) santrifüj edilir.
- **RLT Buffer Hazırlanışı:** 1 ml RLT buffer içerisine 10 µl - Mercaptoethanol ilave edilir.
- **RPE Buffer Hazırlama:** 4:1 oranında Absolute Ethanol

(%96-100): RPE Buffer karışımı hazırlanır.

3.2.1. RNA Miktarının Belirlenmesi

10 mM Tris·Cl pH 7.5 hazırlanır. 1/50 dilüsyon olacak şekilde RNA bu buffer ile seyreltilir. 260- 280 nm dalga boyunda okutulur.

Formül: $44 \times A_{260} \times \text{dilution factor (50)}$

Bu formül ile mililitredeki RNA miktarı hesaplanır.

3.2.2. RNA'nın Jelde Görüntülenmesi

3.2.2.1. FA Jel Tamponunun Hazırlanışı

- 200 mM 3-[N-morpholino]propanesulfonic acid (MOPS) (free acid)

- 50 mM sodium acetate
- 10 mM EDTA

NaOH ile pH 7.0'a getirilir.

3.2.2.2. FA Jel Yürütme Tamponunun Hazırlanışı

- 100 ml 10x FA Jel Tamponu
- 20 ml % 37'lik (12.3 M) formaldehit
- 880 ml RNase-free su

3.2.2.3. FA Jelinin Hazırlanışı

RNA'daki 18 S ve 28 S rRNA bantlarının görülmesi amacıyla hazırlanan % 1.2'lik agaroz jelde (10 x 14 x 0.7 cm ebatlarında) RNA'lar yürütülür.

- 1.2 g agarose
- 10 ml 10x FA gel buffer
- RNase-free su ile çözelti 100 ml'ye tamamlanır.

Jel agaroz içinde homojen bir şekilde çözünene kadar kaynatılır, sıcaklığı su banyosunda 65°C'ye düşünce 1.8 ml of % 37 (12.3 M) formaldehit ve 10 mg/ml ethidium bromürden 1 µl ilave edilip karıştırılarak jel kasetine dökülür.

3.2.2.4. RNA Yükleme Tamponu

- 16 µl saturated sıvı bromofenol mavisi solüsyonu
- 80 µl 500 mM EDTA, pH 8.0

- 720 µl 37% (12.3 M) formaldehit
- 2 ml 100% gliserol
- 3.084 ml formamid
- 4 ml 10 x FA jel tamponu
- 10 ml RNase-free su

3.2.2.5. Jele yükleme

- 3 µl RNA
- 10 µl 5x RNA yükleme tamponu
- 7 µl RNase free su

100 Volt'ta 1 saat yürütülür.

3.2.2. RT² Profiler™ PCR Array System

- Kullanılan kitler:**
1. RT² First Strand Kit: C-03/330401
 2. SABiosciences RT2 qPCR Master Mix
 3. 96'luk gene plate (PCR Array)

3.2.2.1. cDNA Elde Edilmesi

Genomik DNA kontaminasyonunu engellemek için;

Total RNA 25.0 ng to 5.0 µg

5X gDNA Elimination Buffer 2.0 µl

H2O ile 10.0 µl'e tamamlanır.

- İçerik pipetlenir, ardından mini spin yapılır.
- Termal cycler'da 42°C'de 5 dk inkübe edilir.
- En az 1dk buz üstünde bekletilir.

Not: Kullanılan RNA miktarı 1 µg veya 1,5 µg'dır. Kit 1 µg öneriyor.

3.2.2.2. İlk Sıra cDNA Sentez Reaksiyonu

10 dk. sonunda hazırlanan RT Kokteyl karışıma ilave edilir.

BC3 (5X RT Buffer3) 4 µl

P2 (Primer&External Control Mix) 1 µl

RE3 (RT Enzim Miks) 2 µl

H2O 3 µl

Toplam Hacim 10 µl

Karışım dikkatlice pipetlenir.

42°C 15 dakikanın ardından 95°C'de 5 dk.

91 µl dH2O 20 µl'lik cDNA'e ilave edilir. İyice karıştırılır.

Biten ilk sıra cDNA bir sonraki aşamaya kadar buzda saklanır, ya da 1 gece -20°C 'de bekletilebilir.

3.2.2.3. Deneysel Kokteyl Hazırlama

2X SABiosciences RT2 qPCR Master Miks	1350 µl
İlk Sıra cDNA	102 µl
dH2O	1248 µl
Toplam Hacim	2700 µl

PCR Array kuyucuklarının her birine 25 µl deneysel kokteyl ilave edilir ve plate cihaza (Roche LightCycler 480) yüklenir. Cihazda uygulanan program:

	Cycles	Duration	Temperature
Roche***: LightCycler 480	1	10 minutes ¹	95°C
	45	15 seconds	95°C
		1 minute ²	60°C

95 C°'de 10 dakikalık adım HotStart DNA polymerase'ı aktive etmek için gereklidir. Bütün kuyulardan döngülerin annealing aşamasında SYBR yeşil floresan saptanarak kaydedilir.

Meme tümörlerinden örnek alınan 12 hastadan yukarıda anlatılan yöntemlerle hücre kültürleri hazırlandı ve donduruldu. Gerekli malzemelerin temininin ardından bu hastaların gen profillerinin çıkarılabilmesi için dondurulmuş olan hücre kültürleri yeniden aktive edilerek hücre sayılarının 1 milyonun üzerine çıkması beklendi. Uygun miktarda RNA elde edilebilmesi için hücre sayısının artması beklendi.

Ancak hastalardan 1 tanesinin hücre kültüründe yeterli hücre sayısına ulaşamadığı için hasta çalışmaya alınamadı. Geriye kalan 11 hastanın yeterli hücre sayısına ulaşmasının ardından gen ekspresyon profilleri çıkarıldı.

4.BULGULAR

Lenf nodu negatif olan ve Grade'i 2 olan 3 hasta kontrol grubu olarak kabul edildi ve diğer 8 hasta ile tek tek karşılaştırılarak apoptozis ile ilgili olan 19 genin artış ve azalışları incelendi. Tüm hastaların genel özellikleri ve klasik prognostik faktörleri tablolarla açıklanmıştır.

<i>Kontrol Grubu</i>	<i>Yaş</i>	<i>Tümör Büyüklüğü</i>	<i>Histolojik Tip</i>	<i>Grade</i>	<i>Lenf Nodu Durumu</i>	<i>E.R.</i>	<i>P.R.</i>	<i>ERBB2</i>
Hasta 1	35	6,2 cm.	İnv.duktal karsinom	2	Met.yok	(+)	(+)	(-)
Hasta 2	63	2 cm.	İnv.duktal karsinom	2	Met.yok	(+)	(+)	(-)
Hasta 3	44	2 cm.	İnv.duktal karsinom	2	Met.yok	(+)	(+)	(-)

Tablo 5. Kontrol Grubu Hastalarının Klasik Prognostik Özellikleri

İnv; invaziv, Met. ; metastaz ,

E.R. ; Östrojen Reseptörü , P.R. ; Progesteron Reseptörü

Kontrol grubu olarak kabul edilen hastaların gen ekspresyon profilleri çıkarıldı ve deney grubu içerisindeki her hastayla ayrı ayrı karşılaştırıldı.

<i>Deney Grubu</i>	<i>Yaş</i>	<i>Tümör Büyüklüğü</i>	<i>Histolojik Tip</i>	<i>Grade</i>	<i>Lenf Nodu Durumu</i>	<i>E.R.</i>	<i>P.R.</i>	<i>ERBB2</i>
Hasta 1	62	3 cm.	İnv.duktal karsinom	3	3 lenf nodu met.	(-)	(-)	(-)
Hasta 2	63	2,2 cm.	İnv.duktal karsinom	3	11 lenf nodu met.	(-)	(-)	(-)
Hasta 3	43	2,5 cm.	İnv.duktal karsinom	3	13 lenf nodu met.	(+)	(+)	(+)
Hasta 4	49	4 cm.	İnv.duktal karsinom	3	26 lenf nodu met.	(-)	(-)	(+)
Hasta 5	51	7 cm.	İnv.duktal karsinom	3	3 lenf nodu met.	(+)	(+)	(+)
Hasta 6	37	2,5 cm.	İnv.duktal karsinom	3	2 lenf nodu met.	(-)	(-)	(-)
Hasta 7	52	5 cm.	İnv.duktal karsinom	3	7 lenf nodu met.	(+)	(-)	(+)
Hasta 8	31	8,3 cm.	İnv.duktal karsinom	3	24 lenf nodu met.	(-)	(-)	(-)

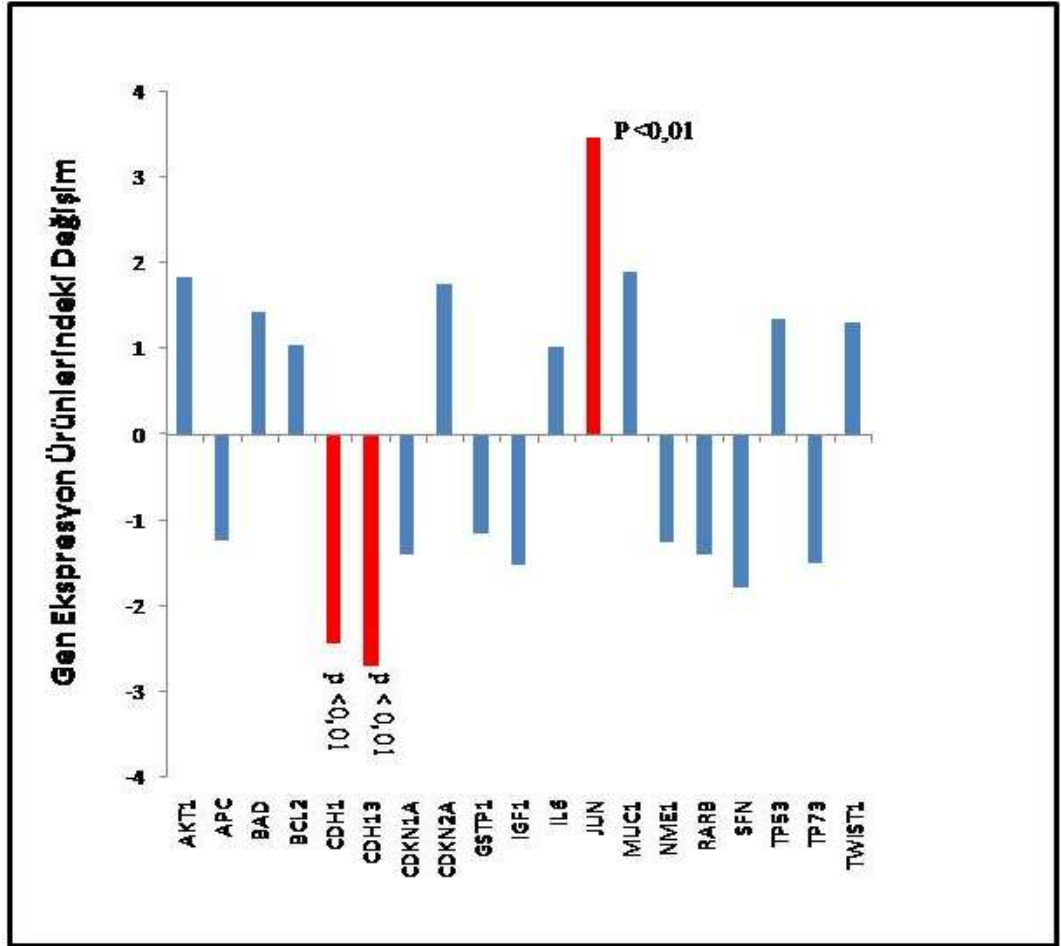
Tablo 6. Deney Grubu Hastalarının Klasik Prognostik Özellikleri

İnv; invaziv, Met. ; metastaz ,

E.R. ; Östrojen Reseptörü , P.R. ; Progesteron Reseptörü

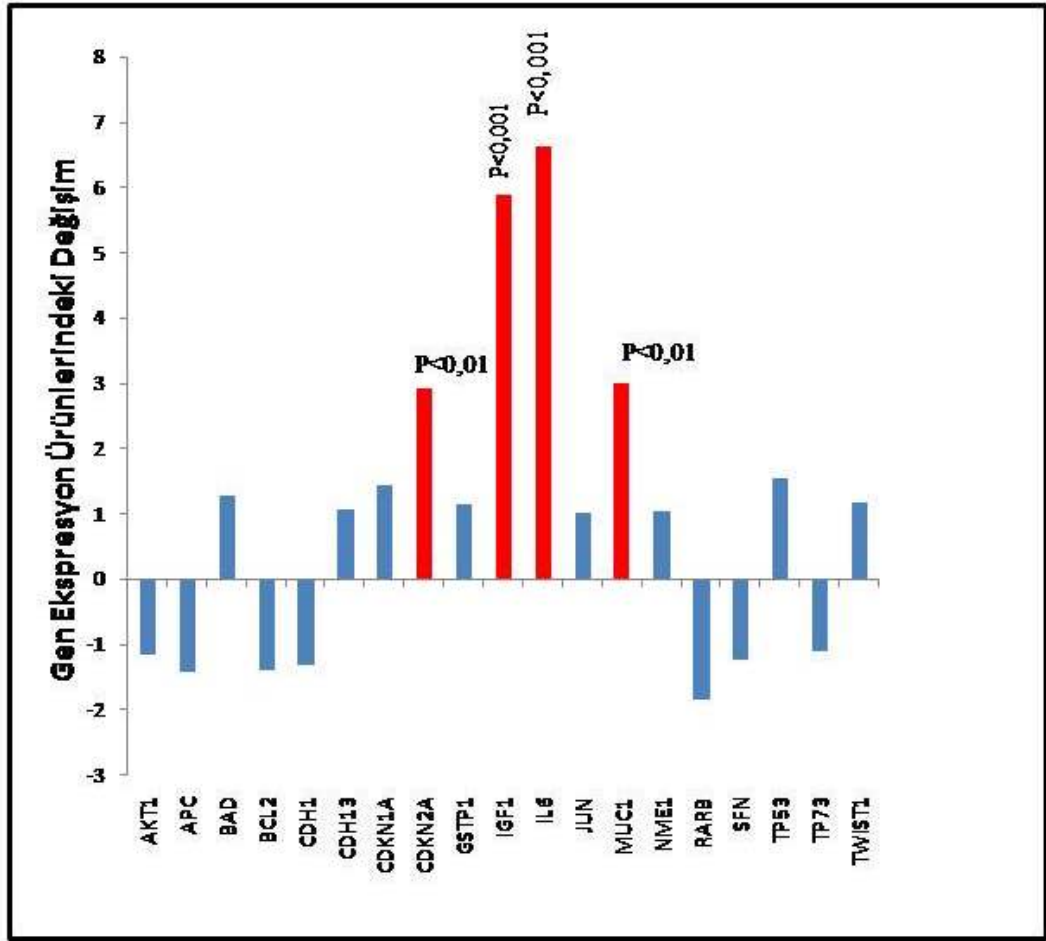
4.1. Hastaların Karşılaştırmalı Gen Ekspresyon Profilleri

İstatistik analizleri “Student t-testi” kullanılarak, önem derecesi $p < 0.05$, $p < 0.01$ veya $p < 0.001$ aralığında yapıldı. Gen ekspresyonundaki değişim $\Delta\Delta C_t$ metodu (eşikdeğer) kullanılarak $2^{-\Delta\Delta C_t}$ formülü ile hesaplanmıştır.



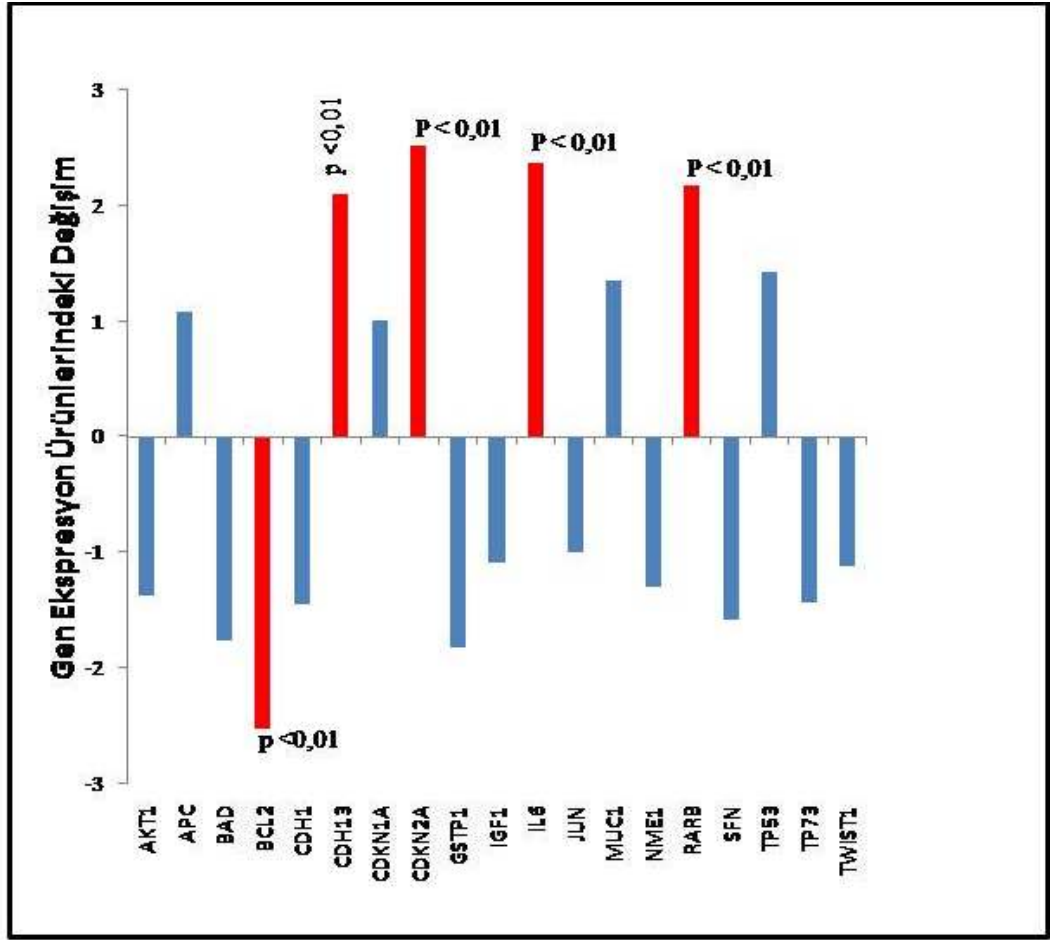
Şekil 1. Hasta 1 ile Kontrol Grubu karşılaştırılarak elde edilmiştir

$p < 0,01$ değeri anlamlıdır. Bu hastada CDH 1 ,CDH 3, JUN değerleri anlamlıdır.



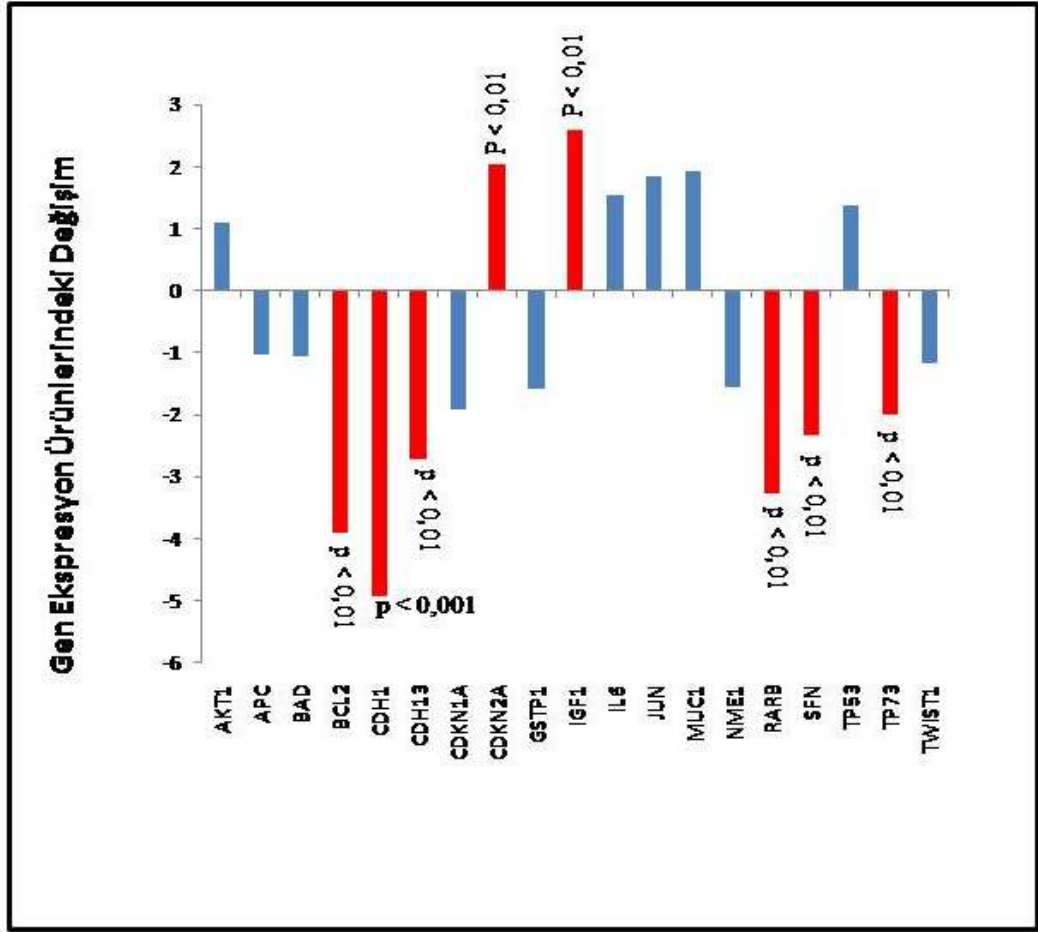
Şekil 2. Hasta 2 ile Kontrol Grubu karşılaştırılarak elde edilmiştir

CDKN2A ve MUC 1 için $p < 0,01$, IGF 1 ve IL6 için $p < 0,001$ değeri anlamlıdır.



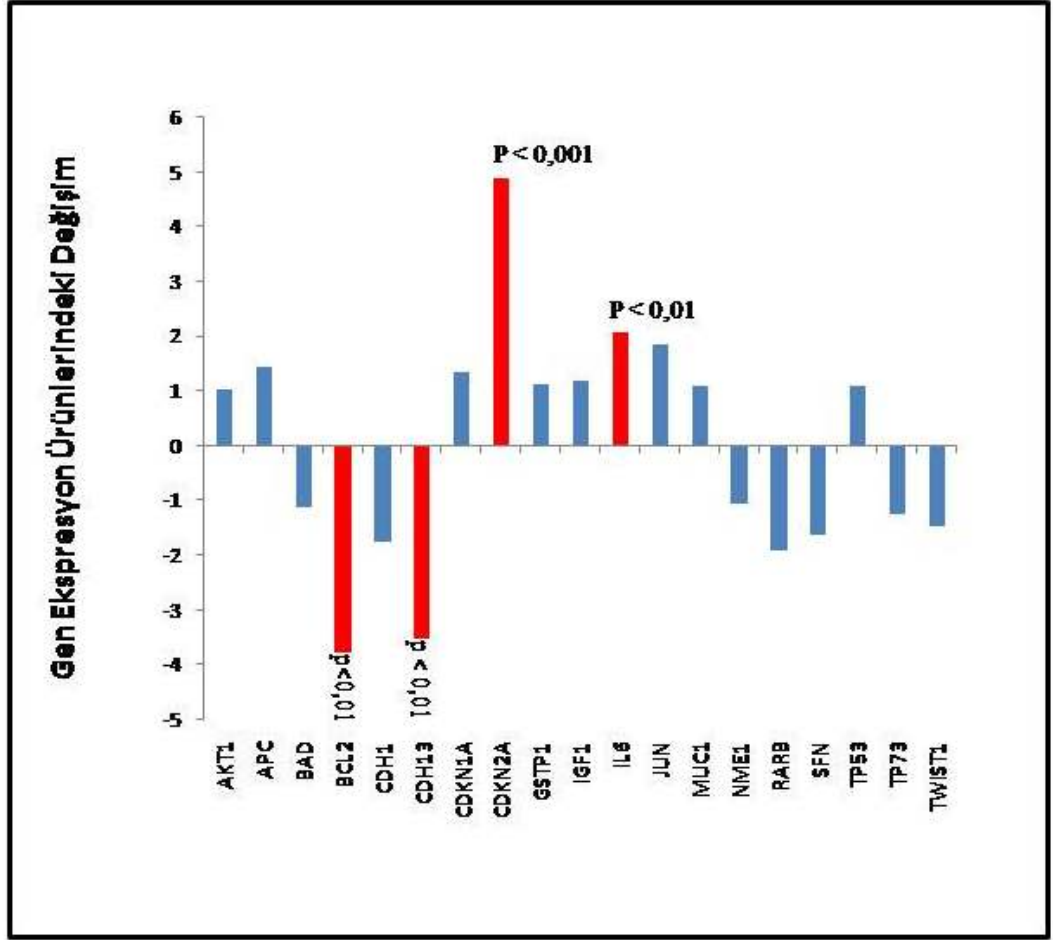
Şekil 3. Hasta 3 ile Kontrol Grubu karşılaştırılarak elde edilmiştir

BCL 2, CDH1-3, CDKN2A, IL6, RARB için $p < 0,01$ anlamlıdır.



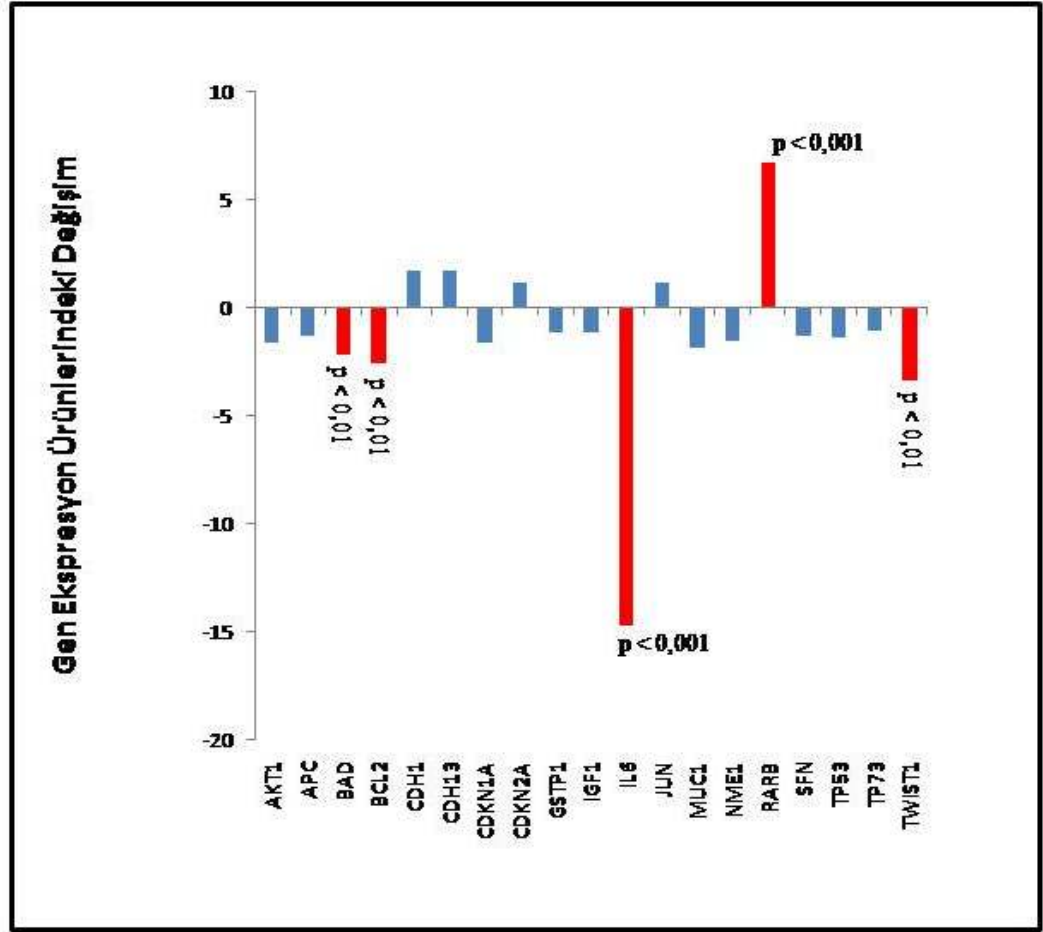
Şekil 4. Hasta 4 ile Kontrol Grubu karşılaştırılarak elde edilmiştir

CDH1 için $p < 0,001$, BCL2, CDH1-3, CDKN2A,IGF1,RARB,
SFN,TP73 için $p < 0,01$ anlamlıdır.



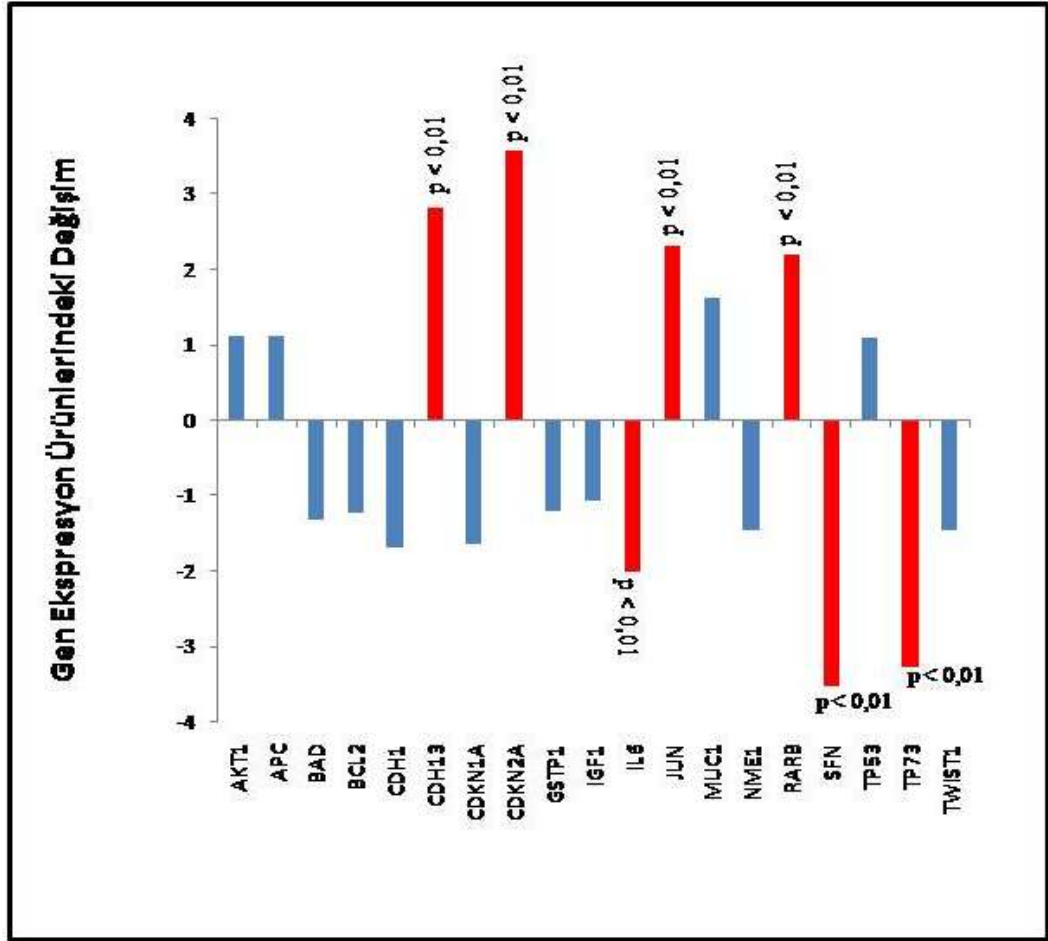
Şekil 5. Hasta 5 ile Kontrol Grubu karşılaştırılarak elde edilmiştir

BCL2, CDH1-3, IL6 için $p < 0,01$, CDKN2A için $p < 0,001$ anlamlıdır.



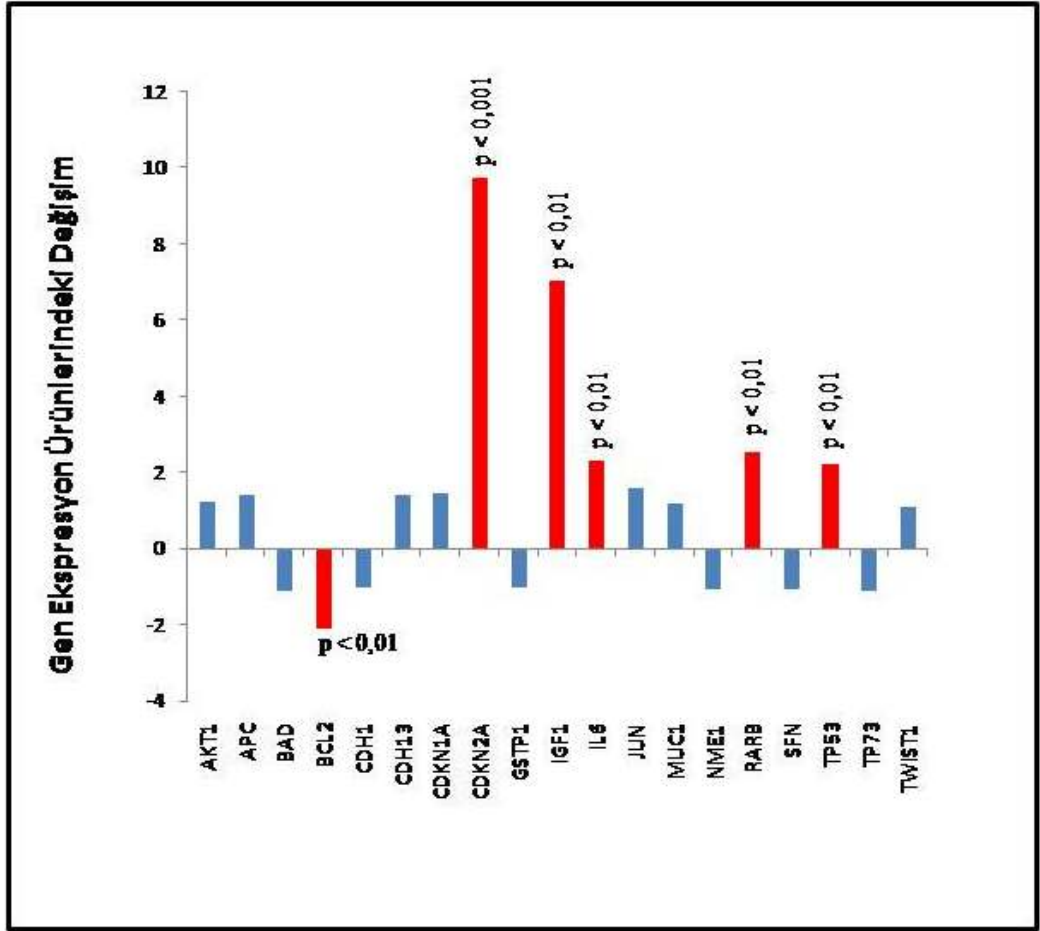
Şekil 6. Hasta 6 ile Kontrol Grubu karşılaştırılarak elde edilmiştir

BAD , BCL2, TWIST1 için $p < 0,01$, IL6 ve RARB için $p < 0,001$ anlamlıdır.



Şekil 7. Hasta 7 ile Kontrol Grubu karşılaştırılarak elde edilmiştir

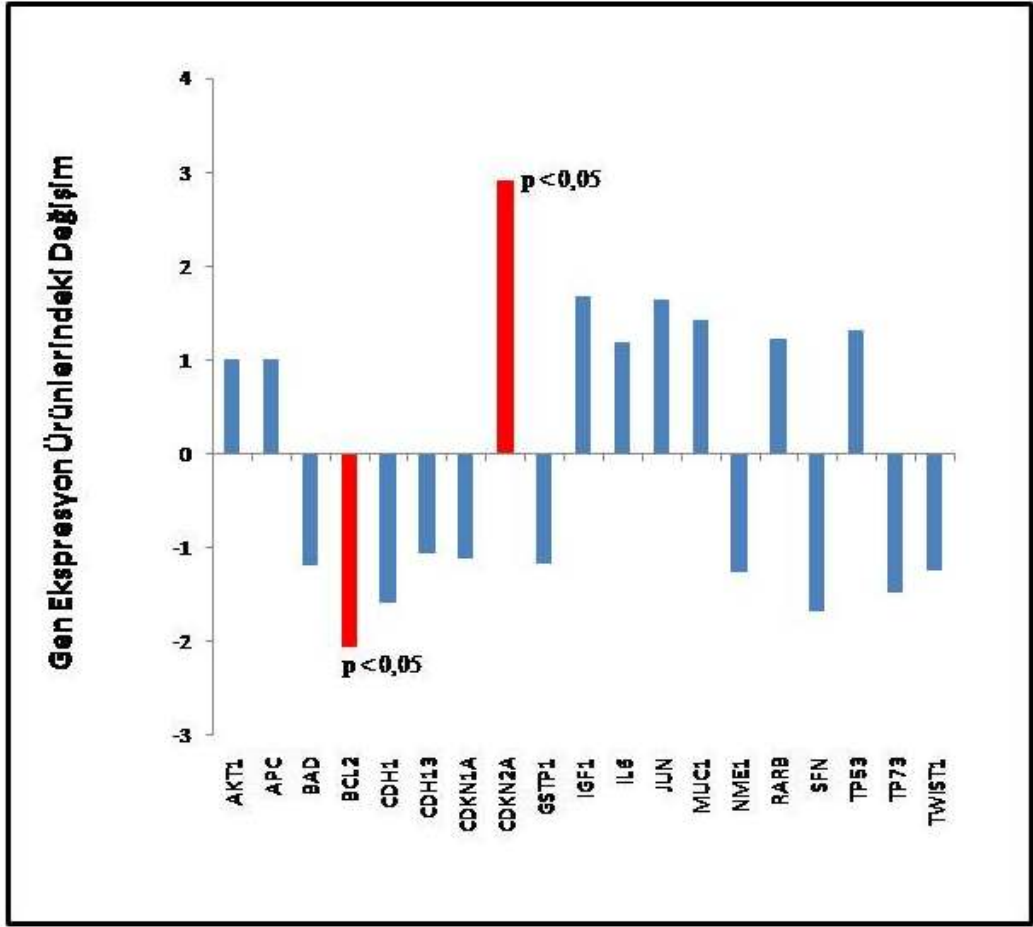
CDH1-3 , CDKN2A, IL 6, JUN, RARB, SFN, TP73 için $p < 0,01$ anlamlıdır.



Şekil 8. Hasta 8 ile Kontrol Grubu karşılaştırılarak elde edilmiştir

BCL 2 , IGF 1 , IL 6 , RARB , TP 53 için $p < 0,01$, CDKN2A için

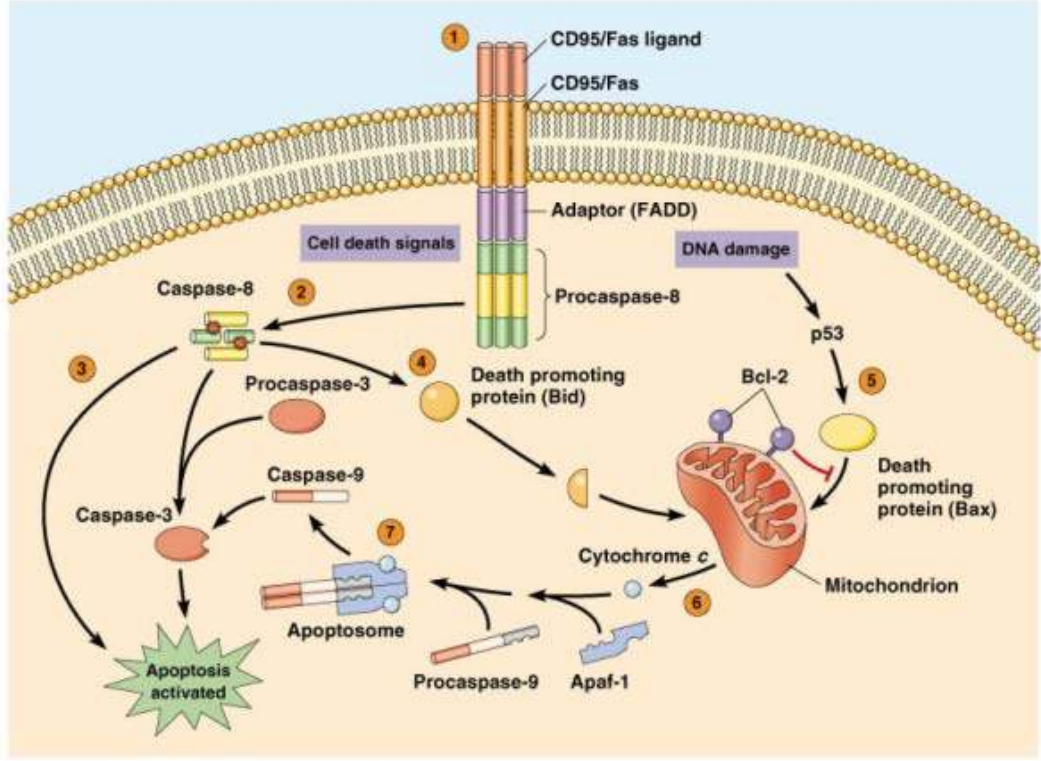
$p < 0,001$ anlamlıdır.



Şekil 9. Tüm hastalar ile Kontrol Grubu karşılaştırılarak elde edilmiştir

BCL2 ve CDKN2A tüm hastaların kontrol grubu ile karşılaştırılmasında $p < 0,05$ için anlamlıdır.

5.TARTIŞMA



Resim 12. Apoptozis

5.1.Apoptozis

Doku homeostazını devam ettirmek için hücre çoğalması uygun bir hücre ölümü işlemi ile dengelenmek zorundadır. Fizyolojik hücre ölümü genetik bir program yoludur ve apoptozis olarak adlandırılır.

Apoptozisi yöneten moleküler sistem 3 kısma ayrılabilir;

Bir uyarı ile apoptozisin başlaması, pro ve antiapoptotik faktörler tarafından düzenlenme (regülasyon) ve hücre ölüm yollarının aktivasyonudur.

Apoptozis işlemini bir çok uyarı aktiveştirir. İyonize radyasyonun oluşturduğu DNA hasarı, büyüme faktörleri ve besin kısıtlaması, metabolizma ya da hücre döngüsü düzensizlikleri, oksidatif stres ve kemoterapotik maddeler bu uyarılardandır. (74)

T hücre modeliyle yapılan detaylı çalışmalar apoptozisin başlaması için gerekli olan reseptör aktivasyonundan sonraki olayları tamamen açıklamıştır.

Ölümü başlatacak olan ligandın reseptöre bağlanmasıyla reseptörün hücre içi bölgesinin değişimi gerçekleşir. Protein yapısının bu değişimi stoplazmik adaptör proteinlerin bağlanmasına olanak sağlar. Bu reseptör adaptör protein kompleksleri Fas'la aktiveşen ölüm bölgesi aracılığı ile (FADD), apoptozisin gerçekleştiği kısımla ilgili proteazların aktivasyonunu katalize eder.

Hücre içi uyarı sensörleri arasında TP 53 tümör baskılayıcı gen vardır.

DNA hasarının tamamlanması P53'ün fonksiyonel aktivasyonunu sağlar ve DNA onarımına olanak vermek için hücre döngüsünü G1 fazında durdurur; buna karşın onarılamayacak hasar hücreyi apoptozis yoluyla ölüme sevk eder.

Apoptozis aktivasyonu ile ilgili bir çok farklı uyarılar ve uyarı sensörlerine rağmen bu yolların hepsi ortak bir sonuç olarak kaspaz serisini aktive eder.

5.2. Kaspazlar

Sistein aspartat proteazlar olarak da bilinirler. Memelilerde her biri apoptotik hücre ölümünü yönlendiren, korunmuş, biyokimyasal yolla yakından ilişkili, 10 kaspaz bilinmektedir.

Kaspaz aktivasyonunun genel net etkisi, hücre döğüsünün ilerlemesini durdurmak, homeostaz ve onarım sistemlerini çalışamaz hale getirmek, hücreyi onu çevreleyen doku yapısından ayırmak, yapısal bileşenleri parçalara ayırmak ve ölen hücreyi makrofajlar ve çevreleyen hücreler tarafından yok edilmek üzere işaretlemektir.

TNM sistemi; yaklaşık 60 yıl önce tümör biyolojisine ilişkin bilgilerin, tanı ve tedavi seçenekleri doğrultusunda, kanser vakalarını sınıflandırmanın en iyi yolu olarak kullanılmaya başlanmıştı. (75)

Ancak meme kanserinin yönetimi, gelişen teknoloji ve bilgi artışı, yaygın tarama programlarının uygulanması, adjuvan kemoterapi ve hormonoterapinin kullanılmasıyla değişiklik ihtiyacı oluşmuştur.

Tümörün biyolojisi TNM sisteminden çok daha karmaşıktır. Günümüzde, tümörlerin anatomik varlıkları ile biyolojik davranışını tahmin etmenin doğru bir yol olmadığı kesin olarak anlaşılmıştır. (76) Ancak tedaviye karar verme sürecinde TNM sisteminin kullanımına devam edilmektedir.

Prognostik faktörlerin, dahil edilmediği anatomik evrelemenin, hastanın prognozunu göstermede yetersiz kalmasıyla TNM son güncellemesinde, mikro metastaz ve izole tümör hücrelerinin tanımı yapılarak sistemin prognozu tahmin etme yeteneği geliştirilmeye çalışıldı. (77)

Histolojik tip, grade, östrojen (ER) ve progesteron(PR) reseptörü gibi tümörün özellikleri, hastalığın seyrini ve sistemik tedaviye yanıt verme olasılığını etkiler.(78)

Tedaviye karar verme sürecinde, sağkalım ve metastatik hastalığın gelişim öngörüsünün başarısını yükseltmek amacıyla Nottingham Prognostik İndeks (79) ,

Adjuvant Online (AO) ve St. Gallen kriterleri gibi indeksler yaygın olarak kullanılır.

Ancak bunlar da tedavinin yönlendirilmesinde yetersizdir ve daha kesin sınıflamalar gereklidir.

Günümüzde tümörlerin farklı klinik seyirlerinin genellikle kanserler arasındaki moleküler farklılıklardan kaynaklandığı, kanserin ayrıntılı moleküler analizi ile prognoz tahmininin güçleneceği, bireye özgü tedavi modellerinin geliştirileceği kabul edilmektedir. (80)

Standartlaştırılan yöntemlerle elde edilen; tümörün moleküler kimliği, prognozu ve kişiye özel tedavi öngörüsünü sağlayabilen doğrulanmış moleküler göstergeler yakın gelecekte tümörün yönetimini tamamen değiştirecektir.

Tümörün anatomik dağılımının yanında, farklı prognostik ve prediktif bilgilerin dahil olabileceği, kişiye özel ayrıntıların yok olmayacağı bir yapılanmanın oluşturulması gelecekteki temel hedeftir. (81)

Çalışmamızda her meme tümörünün farklı karakterde olmasının ve farklı davranış biçimleri sergilemesinin temelinde yatan kanserin genetik karakterinden bir kısım olan apopitozis incelendi.

İncelenen literatür bilgilerinde meme kanserinin gen ekspresyonu ile ilgili yayınlar 2002 yılından itibaren bildirilmeye başlanmıştır.

2004 yılında New England Journal of Medicine da ve 2005 ve 2006'da Journal of Clinical Oncology dergilerindeki yayınlarda 21 gen ekspresyon profili, kullanımda olan prognostik faktörlerle; kemoterapi verilecek hasta seçimi ve tedavi sonrası sonuç tahmini açısından karşılaştırılmış.

Açıklanan sonuçlarda gen ekspresyon profili nod negatif hastalara kemoterapi seçimi açısından çok daha yüksek yüzdelerle başarılı bulunmuştur.

Ancak 21 gen kullanılan bu testteki genler farklı gruplardan (sinyal iletim grubu, angiogenez grubu, tümör sınıflandırma belirteçleri gibi) seçilerek kötü prognoz belirteçleri ile iyi prognoz belirteçleri karşılaştırılarak puanlama yapılmıştır.

Literatür bilgileri içerisinde apopitozis genlerinin meme kanseri karakteri üzerine etkileri ile ilgili çalışma bulunamadı.

Çalışmamızda, grade 2 lenf nodu negatif 3 hasta kontrol grubu olarak kabul edilmiş ve grade 3 lenf nodu metastazı olan hastalarla tek tek karşılaştırılmıştır.

Belirlenen istatistik değerleri, meme kanserinin genetik yapısının ve davranış biçiminin her hastada farklı olduğu gerçeğine uygun biçimde farklılık göstermekteydi.

Bu farklılıklar kötü prognoz göstergeleri olan gen ürünlerinin daha fazla olarak anlamlı değişiklikler göstermesinin yanında, iyi yönde değişimleri de içermekteydi.

Örneğin: İlk hastada (şekil 1) CDH1 ve CDH13 azalışı ile JUN artışı anlamlıydı ve bu değişimler bu hasta için tümörün agresif seyri ile paraleldi.

Yani anlamlı parametrelerin tamamı tümörün agresif seyirli olacağını göstermekteydi.

Başka bir örnek verildiğinde ise 6 numaralı hastada kötü prognostik faktör olarak değerlendirilen IL 6 artışının aksine bu parametre istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde belirgin düşüktü.

Gen ekspresyon ürünleri; rutin kullanımda olan prognostik faktörler gibi, iyi ve kötü prognoza sebep olacak ürünlerin saptanması sonrası yapılacak kişiye özel tedavi yorumu ve seçimini sağlayacak ve kullanılabilecek çok daha fazla parametre elde etmemize yarayacaktır.

6.SONUÇ

Hastaların tamamı ele alınarak yapılan karşılaştırmada CDKN2A’da artış ($p < 0,05$ olmak üzere 2,9153) ve BCL2’de azalma ($p < 0,05$ olmak üzere - 2,0605) saptanmıştır.

CDKN2A’nın artışı kötü prognostik faktördür. BCL2 antiapoptotik etkilidir. Bu etkisini lenfositler üzerinde göstererek tümör hücreleri ile savaşan lenfositlerin daha uzun yaşamasını sağlar miktarının az olması kötü prognostik faktördür.

Tüm hastalar karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı 2 gen ürünü bulunmuştur ve bu gen ürünleri ilerleyen süreçte prediktif faktör olarak kullanılabilir.

Yine de her hastanın tek tek karşılaştırılması sonucunda çok daha çeşitli gen ürünlerinde anlamlı farklar saptanmış olması gen ekspresyon profilinin kişiye özel olarak çeşitleneceğinin göstergesidir ve bu durum meme kanserinin doğasına uygundur.

Son olarak; meme kanserinin tedavisine karar verirken kullanılacak yeni prediktif faktörler gen ekspresyon ürünleridir ve yakın gelecekte rutin kullanıma girerek tedavinin kişiye özel olarak daha yüksek spesifite ve sensitivite ile seçilmesini sağlayacaktır.

7.KAYNAKLAR

- 1.Goldhirsch A,Glick JH,Gelber RD,Senn HJ,Meeting highlights: International Consensus Panel on the Treatment of Primary Breast Cancer.J Natl Cancer Inst.1998;90:1601-8
- 2.Greenlee RT,Murray T,Bolden S,Wingo PA.Cancer statistics,2000.CA Cancer J Clin 2000;50:7-33
3. Winchester DP, Osteen RT, Menck HR. The National Cancer Data Base report on breast carcinoma characteristics and outcome in relation to age. Cancer 1996;78:1838–43.
- 4.Greenlee RT, Murray T, Bolden S, et al. Cancer Statistics, 2000. CA Cancer J Clin. 2000;50: 34-60.
- 5.Silvenberg E, Lubera J. Cancer Statistics 1987. CA Cancer J Clin. 1987; 37: 2-19.
- 6.Rosen PP et al. Immunohistochemical detection of HER-2/neu in patients with axillary lymph node negative breast carcinoma cancer. BMJ. 1995; 75: 1320-6.
- 7.Sikorak K, et al. Genes, dreams and cancer. BMJ. 1994;308: 1217-21.8.
National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement: Adjuvant Therapy for Breast Cancer, November 1–3, 2000

9. Liu, E. T. & Sotiriou, C. (2002) *Breast Cancer Res.* 4, 141–144.
10. Sorlie, T., Perou, C. M., Tibshirani, R., Aas, T., Geisler, S., Johnsen, et al. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 10869–10874.
11. Van't Veer, L. J., Dai, H., van de Vijver, M. J., He, Y. D., Hart, A. A., Mao, et al. (2002) *Nature* 415, 530–536.
12. Gruvberger, S., Ringner, M., Chen, Y., Panavally, S., Saal, L. H., Borg, A., et al P. S. (2001) *Cancer Res.* 61, 5979–5984.
13. West, M., Blanchette, C., Dressman, H., Huang, E., Ishida, S., Spang, R., et al (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 11462–11467.
14. Van de Vijver, M. J., He, Y. D., van't Veer, L. J., Dai, H., Hart, A. A., Voskuil,
15. D. W., Schreiber, G. J., Peterse, J. L., Roberts, C., Marton, M. J., et al. (2002) *N. Engl. J. Med.* 347, 1999–2009.
16. Kalaycı G, Acarlı K, Demirkol K, Ertekin C. Meme hastalıkları ve tarihçe. In: Kalaycı G. Genel Cerrahi Cilt 1. Nobel, 2002: 534-5.
17. Spratt JS, Tabin GR. Gross anatomy of the breast. In: Donegan WL, Spratt JS, eds. *Cancer of the breast*, 4th edition. Philadelphia. London: W.B.Saunders, 1995: 22-42.
18. Cooper sir AP. *The anatomy and disease of the breast*. Philadelphia: Lea and Blanchard, 1999: 1845.

19. Anson BJ, Wright RR: Blood supply of the mammary gland. *Surg Gynec Obst* 69;468, 1993
20. Batson OV. The role of the vertebral veins in metastatic process of the breast cancer. *Ann Int Med.* 1942: 16-38.
21. Miller MR, Kasahara M. Cutaneous innervation of the human breasts. *Anat Rec.* 1959;135: 153-67.
22. Halsell JT, et al. Lymphatic drainage of the breast demonstrated by vital dye staining and radiography. *Ann Surg.* 1963; 162: 221-6.
23. Hultborn KA, Lørsen KG, Ragnhult I. The lymph drainage from the breast to axillary and parasternal lymph nodes studied with the aid of colloidal Au 198. *Acta Radiologica (Stockholm).* 1955; 43: 52-4.
24. Rouviere H. *Anatomic des lymphatiques de l'homme.* Paris: Mason, 1932: 16-22
25. Kirby IB, Coppeland EM. Breast. In: Seymour IS, Shires GT, Spencer FC, Husser WC. *Principles of surgery*, vol 1, 6th edition. New York: Mc Graw Hill, 1994: 531-93.
26. Kirby IB, Coppeland EM. Breast. Physiologic considerations in normal, benign and neoplastic states. In: Thomas AM, CoEd. Brian JR. *Physiologic basis of modern surgical care.* USA: Mosby, 1998: 1019-56.

27. Rosenbloom AL. Breast physiology: Normal and abnormal development and function. In: Kirby IB, Coppeland EM. The breast. Comprehensive management of benign and malignant disease, Vol 1, second edition. USA: W.B.Saunders,1988: 38-50.
28. Romrell LJ, Bland KI: Anatomy of the breast, axilla, chest wall, and related metastatic sites in Bland KI, Coppeland EM III (eds) : The breast : Comprehensive Management of Benign Malignant Diseases. Philadelphia: WB Saunders, 1998, p19
29. Brunicki FC, Andersen DK, Billiar TR, Dunn DL, Hunter JG, Matthews JB, Schwartz's Principles of Surgery, 9th Edition chapter 17, 2009: 550-600
30. Haagensen CD. The normal physiology of the breast. In: Haagensen CD. Disease of the breast, Chapter 2, third edition. Philadelphia: W.B.Saunders, 1986: 47-55.
31. Iglehart JD, Kaelin CM. Diseases of the Breast. Townsend, Beauchamp, Evers, Mattox (eds): Sabiston Textbook of Surgery W.B. Saunders Company, Philadelphia s.555-590, 2001
32. Garfinkel L, Boring CC, Heath CW Jr: Changing trends: An overview of breast cancer incidence and mortality. Cancer 74: 222-227, 1994
33. Csaba G, Paul I T, Ira JB. Lymphatic invasion, tumor size, and age are independent predictors of axillary lymph node metastases in women with T1 breast cancers. Ann Surg 230: 692-696, 1999

34. Courtney M.T., Mark E., Daniel B., Kenneth L.M. Sabiston Textbook of Surgery
17.th Edition s.880-900
35. Lu Y, Ma H, Malone KE, Norman SA, Sullivan-Halley J, Marchbanks
PA Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2011 Jul; 20(7):1391-7. Epub 2011 May 6.
36. Bartow SA, Pathak DR. Prevalence of benign, atypical, and
malignant breast lesions in populations of different risk for breast cancer.
60:2751, 1987
37. Silverstein MJ, Gierson ED, Waisman JR. Axillary lymph node dissection for
T1a breast carcinoma. Cancer 73:664-667, 1994
38. Silverstein MJ, Gierson ED, Waisman JR. Predicting axillary lymph node
positivity in patients with invasive carcinoma of the breast by using a
combination of T category and palpability. J Am Coll Surg 180:700-704, 1995
39. Sener SF, Lee LH. Staging of Breast Cancer. In: Singletary SE, Robb GL.
Advanced Therapy of Breast Disease. Philadelphia: BC Decker Inc, 2000: 113-9.
40. Barth RJ, Danforth DN, Venson DJ. Level of axillary involvement of lymph
node metastases from breast cancer is not an independent predictor of
survival. Arch Surg 126:574-577, 1991
41. Fisher B, Bauer M, Wickerham DL. Other NSABP investigators : Relation of
number of positive axillary nodes to the prognosis of patients with primary breast
cancer. An NSABP update. Cancer 52:1551-1557, 1983

42. Osborne CK. Prognostic factors in breast cancer. *Principles Pract Oncol* 4:1-11, 1990
43. Mathiew M C, Friedman S. Topographic criteria in the diagnosis of tumor emboli in intramammary lymphatics. *Cancer* 66:972-977, 1990
44. Nime F, Rosen PP, Thaler H. Prognostic significance of tumor emboli in intramammary lymphatics in patients with mammary carcinoma. *Am J Surg Pathol* 1:25-30, 1997
45. Carter CL, Allen C, Henson DE. Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24,740 breast cancer cases. *Cancer* 63:181-187, 1989
46. Vinay K, Ramzi C., Stanley L.R. Robbins Basic Pathology 7 th. Edition, 714-719
47. Winer EP, Hudis C, Burstein HJ, et al: American Society of Clinical Oncology Technology assessment on the use of aromatase inhibitors as adjuvant therapy for women with hormone receptor-positive breast cancer: Status report 2002. *J Clin Oncol* 20:3317-3327, 2002
48. Early Breast Cancer Trialists Collaborative Group: Systemic treatment of early breast cancer by hormonal, cytotoxic, or immune therapy: 133 randomised trials involving 31,000 recurrences and 24,000 deaths among 75,000 women. *Lancet* 339:1-15, 1992

49. Hortobagyi GN. High-dose chemotherapy for primary breast cancer: facts versus anecdotes. *J Clin Oncol* 1999;17(11 Suppl):25-9
50. Isaacs C, Stearns V, Hayes DF. New prognostic factors for breast cancer recurrence. *Semin Oncol* 2001;28:53-67.
51. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000;406:747-52.
52. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:10869-74.
53. Hedenfalk I, Duggan D, Chen Y, et al. Gene-expression profiles in hereditary breast cancer. *N Engl J Med* 2001;344:539-48.
54. van't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 2002;415:530-6.
55. Hector L. F., Jose' C., Jose' R. R.-Medina and Carmen L. C. Nucleic Acids Research, Redundant or separate entities?—roles of Twist1 and Twist2 as molecular switches during gene transcription 2011, Vol. 39, No. 4 1177–1186
56. Geert B., Karl-F.B., Heinz H., and Frans V.R. Mutations of the Human E-Cadherin (CDH1) Gene, *Human Mutation* 12:226.237 (1998)
57. Marcelina P., Derek L. Insulin-like Growth Factor-1 inhibition of apoptosis is Associated with increased expression of the bcl-xL gene product *Endocrinology*, Vol. 138, No. 3, pg. 1355-1358 (1997)

58. Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. p53 mutations in human cancers. *Science* 1991; 253: 49–53.
59. Stanley C. BCL-2 Gene Family and the Regulation of Programmed Cell Death, *Cancer Res* 1999;59:1693s-1700s
60. Apoptosis and APC in colorectal tumorigenesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 93, pp. 7950-7954, July 1996
61. Patricia D. S., Humberto B. J., Lindsay E. R. ve Catherine J. F. Mechanisms of omega-3 fatty acid-induced growth inhibition in MDA-MB-231 human breast cancer cells, *Breast Cancer Research and Treatment* (2005) 92: 187–195
62. Gudas L. J., Sporn M. B. and Roberts A. B. (1994) Cellular biology and biochemistry of the retinoids. In: *The Retinoids: Biology, Chemistry and Medicine*, pp. 443–520, Sporn M. B., Roberts A. B. and Goodman D. S. (eds), Raven Press, New York
63. Ming T.L., Chiung Y.J., King J.C., Wei J.C., Min K.L. Carcinogenesis vol. 22, no. 12, pp. 1947-1953, 2001 *Endocrinology*, Vol. 138, No. 3, pg. 1355-1358 (1997)
64. Yoshida S, Todoroki T, Ichikawa Y, Hanai S, Suzuki H, Hori M, et al. Mutations of p16Ink4A/CDKN2 and p15Ink4B/MTS2 genes in biliary tract cancers. *Cancer Res* 1995;55:2756–60.
65. Kevin R., Anthony L., Evelio P.A., Daniel N. Jun-D: A third member of the Jun gene family *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 86, pp. 1500-1503, March 1989

66. Yih-Shou H., Yao-Ling L.,c, Shun-Fa Y., Jia-Sin Y.,Wei C., Shuo-Chueh C.
Lung Cancer (2007) 58, 191—195
67. Ligtenberg, M.J., Kruijsaar, L., Buijs, F., van Meijer, M., Litvinov, S.V.,
Hilkens, J. (1992). Cell-associated episialin is a complex containing two proteins
derived from a common precursor. J. Biol. Chem. 267, 6171–6177.
68. Elena V. Sviderskaya, Vanessa C. Gray-Schopfer, Simon P. Hill, Nico P.
Smit, Tracy J. Evans-Whipp, Jane Bond p16/Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor
2A Deficiency in Human Melanocyte Senescence, Apoptosis, and
Immortalization: Possible Implications for Melanoma Progression; Journal of the
National Cancer Institute, Vol. 95, No. 10, May 21, 2003
69. Myriam G., Corrado C., Xiantao W., Prem S., Maurizio C., Nikki J.H.
p21Waf1/Cip1 protects against p53-mediated apoptosis of human melanoma
cells; Oncogene (1997) 14, 929 ± 935
70. Joana P., Andrea A., João T.O., Carmen J., Fernanda M., Fernando C. S.
P-Cadherin Overexpression Is an Indicator of Clinical Outcome in Invasive Breast
Carcinomas and Is Associated with CDH3 Promoter Hypomethylation Clin
Cancer Res 2005;11:5869-5877
71. Veeck J., Niederacher D., H An, Klopocki E., Wiesmann F, Betz B.
Aberrant methylation of the Wnt antagonist SFRP1 in breast cancer is associated
with unfavourable prognosis The Journal of Biological Chemistry , Vol. 279,
No. 4, Issue of January 23, pp. 2832–2840, 2004

72. Zeng, Y. ,Piwnica W., H. DNA damage and replication checkpoints in fission yeast require nuclear exclusion of the Cdc25 phosphatase via 14-3-3 binding. *Mol. Cell. Biol.* 19, 7410–7419 (1999)
73. Debniak T., Gorski B., Huzarski, Byrski T., Cybulski C., Mackiewicz A., Gozdecka G.S. ,A common variant of CDKN2A (p16) predisposes to breast Cancer *J Med Genet* 2005;42:763–765
74. Bast RC Jr, Ravdin P, Hayes DF, et al: 2000 update of recommendations for the use of tumor markers in breast and colorectal cancer: Clinical practice guidelines of the American Society of Clinical Oncology. *J Clin Oncol* 19:1865-1878, 2001
75. Goldie A.S., Fearon KC, Ross J.A. et.al.; Interleukin-1 receptor antagonist circulates in experimental inflammation and in human disease. *Blood* 79:2196-2200 , 1992
76. Veronesia U, Vialeb G, Rotmensza N, Goldhirscha A Rethinking TNM: Breast cancer TNM classification for treatment decision-making and research *The Breast* 2006;15: 3–8.
77. Baratelli MG “Rethinking” the modifications of TNM classification of breast cancer, proposed by Veronesi et al. *The Breast* 2007;16:109.
78. Singletary SE, Connolly JL. Breast cancer staging: working with the sixth edition of the AJCC Cancer Staging Manual. *CA Cancer J Clin.* 2006;56:37-47.

79. Puzstai L, Mazouni C, Anderson K, Wu Y, Symmans WF. Molecular Classification of Breast Cancer: Limitations and Potential. *The Oncologist* 2006;11:868–77.
80. Galea MH, Blamey RW, Elston CE, Ellis IO. The Nottingham Prognostic Index in primary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 1992;22:207-19.
81. Ross JS, Hatzis C, Symmans WF, Puzstai L, Hortobagyi GN. Commercialized Multigene Predictors of Clinical Outcome for Breast Cancer. *Oncologist* 2008;13:477-93.
82. Gospodarowicz MK, O’Sullivan B, Koh ES. Prognostic factors: principles and applications, in Gospodarowicz MK, O’Sullivan B, Sobin LH (eds). *Prognostic Factors in Cancer*. 3rd ed. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons; 2006:23–38.

8.ÖZET

Lenf nodu negatif meme kanserleriyle ilgili yapılan klinik çalışmalar;

Bu hastaların % 90'lık kısmının da adjuvan kemoterapiye aday olduğunu göstermektedir. Ancak bu hastaların %70'inde sadece lokoregional cerrahi tedavi ile kür sağlanmaktadır.Bu çalışmalara göre lenf nodu negatif vakaların sadece %30'una verilmesi beklenen sistemik kemoterapi için hasta seçimi ,

St.Galen ya da US National Institutes of Health konsensus kriterlerine göre %85-90 oranında endikasyon bulabilmektedir.

Daha çok oranda gereksiz kemoterapi uygulanmasının veya daha az oranda görülse de kemoterapi uygulanmadığı için metastaz oluşmasının nedeni halen günümüzde adjuvan tedavilerin endikasyon kriterlerine temel teşkil eden klinikopatolojik prognostik faktörlerin sensitivite ve spesifitesindeki düşüklüktür.

Son zamanlarda mikro-array yöntemi ile meme kanserlerinde her bir vakanın ekspresyon gen profili çıkarılarak kimliklendirilmesinde metastaz yönünden % 80 civarında sensitivite ve spesifite bildirilmektedir.

Kliniğimizdeki meme kanseri hastalarından hazırlanan hücre kültürleri gerekli aşamalardan geçirildikten sonra PCR Array gen tarama kiti kullanılarak hastaların gen ekspresyon profilleri çıkarıldı. Çıkarılan sonuçlarla meme kanseri için yeni prediktif faktörlerin rutin kullanıma girebileceği ve tedavinin kişiselleştirilmesi için önemli bir adım olduğu görüldü.

9.SUMMARY

Clinical studies on lymph node negative breast cancer;

Shows that %90 of these patients are candidates for adjuvant chemotherapy. However in %70 of these patients lokoregional surgery can cure. According to these studies the patient choice for the systemic chemotherapy which is given only to %30,

Can find indications with %85-90 according to St. Galen or US National Institutes of Health consensus.

The application of excess chemotherapy or eventhough it is rare the formation of metastasis because of the lack of chemotherapy is because of the deficit in the sensitivity and specifity in the clinicopathologic prognostic factors which are the indication criterias for adjuvant treatments.

Using the micro-array method in the identification through gene profile expression of each case in breast cancer, around %80 sensitivity and specifity is reported in the sense of metastasis.

In our clinic, the cell cultures of breast cancer patients were processed; and the gene expression profiles of the patients were created using the PCR Array gene scan kit. With the results it is observed as a good step for the routine usage of new predictive factors and personalization of the treatment in breast cancer.

10.EKLER

10.1. TABLO VE ŞEKİL LİSTESİ

Tablolar

Tablo 1	Manchester Sınıflaması	27
Tablo 2	TNM Sınıflaması	28
Tablo 3	Amerikan Birleşik Komitesi Kanseri Evre Gruplaması	29
Tablo 4	Meme Kanseri Nüks Yatkın Risk Grupları	35
Tablo 5	Kontrol Grubu Hastalarının Klasik Prognostik Özellikleri	63
Tablo 6	Deney Grubu Hastalarının Klasik Prognostik Özellikleri	64

Şekiller

Şekil 1	Hasta 1 ile kontrol grubu karşılaştırması	65
Şekil 2	Hasta 2 ile kontrol grubu karşılaştırması	66
Şekil 3	Hasta 3 ile kontrol grubu karşılaştırması	67

Şekil 4	Hasta 4 ile kontrol grubu karşılaştırması	68
Şekil 5	Hasta 5 ile kontrol grubu karşılaştırması	69
Şekil 6	Hasta 6 ile kontrol grubu karşılaştırması	70
Şekil 7	Hasta 7 ile kontrol grubu karşılaştırması	71
Şekil 8	Hasta 8 ile kontrol grubu karşılaştırması	72
Şekil 9	Tüm Hastalar ile Kontrol Grubu Karşılaştırılması	73

10.2. RESİM LİSTESİ

Resim 1	Halsted'in Radikal Mastektomisi	5
Resim 2	Memenin glanduler yapısı	7
Resim 3	Memenin sınırları	8
Resim 4	Meme Dokusu Histolojik Kesit	9
Resim 5	Meme Dokusu Histolojik Kesit	10
Resim 6	Memenin Arterleri	12
Resim 7	Memenin Venleri	13
Resim 8	Memenin Sinirleri	14
Resim 9	Memenin Lenfatikleri ve Aksiler	15
		95

Resim 10	Hücre Kültürü Mikroskopik Resim	56
	Lenf Nodları	
Resim 11	Hücre Kültürü Mikroskopik Resim	57
Resim 12	Apoptozis	74

11.ÖZGEÇMİŞ

Adı Zeki

Soyadı Gürler

Doğum Yeri ve Tarihi Adana, 1980

Eğitimi

Mezuniyet Sonrası Tıbbi Eğitim

(2006 - 2011) Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Uzmanlık
Eğitimi

Tıp Fakültesi

(1998- 2004) Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi

Ortaöğretim

(1994-1997) Selçuklu Lisesi /ADANA

(1991-1994) Gazi Ortaokulu /ADANA

İlköğretim

(1986-1991) İsmet İnönü İlkokulu/ ADANA

Yabancı Dili

İngilizce