

T.C.
BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI



**PCR-RFLP YÖNTEMİ İLE MEME KANSERİ OLGULARINA AİT
PARAFİN BLOK DOKU KESİTLERİNDE HER-2/NEU GEN
POLİMORFİZMİNİN BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyolog Ezgi Sezgin

Ankara, 2009

T.C.
BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI



**PCR-RFLP YÖNTEMİ İLE MEME KANSERİ OLGULARINA AİT
PARAFİN BLOK DOKU KESİTLERİNDE HER-2/NEU GEN
POLİMORFİZMİNİN BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bu çalışma, Başkent Üniversitesi Araştırma Fonunca KA08/166
numaralı proje olarak desteklenmiştir

Biyolog Ezgi Sezgin

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Feride İ. Şahin

Ankara, 2009

T.C
BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Tıbbi Biyoloji Dalında Yüksek Lisans Programı çerçevesinde yürütölmüş olan bu çalışma, aşğıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi:08/06/2009

“PCR-RFLP Yöntemi ile Meme Kanseri Olgularına Ait Parafin Blok Doku Kesitlerinde
HER-2/Neu gen Polimorfizminin Belirlenmesi”

TEZ DANIŞMANI: Prof.Dr.Feride İffet Şahin

TEZ JÜRİSİ ÜYELERİ

Prof.Dr.Feride İffet Şahin

Doç.Dr.Fatma Belgin Ataç

Doç.Dr.Mahmut Can Yağmurdur

ONAY:Bu tez Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görölmüş ve Yönetim Kurulu’nun 12/06 /2009 tarih SAGE / 2009 / 056 sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof.Dr.Rengin Erdal
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimime başladığım ilk günden itibaren bana güvenen ve desteğini esirgemeyen Anabilim Dalı Başkanımız ve aynı zamanda tez danışmanım olan çok değerli hocam Prof. Dr. Feride İ. Şahin'e;

Eğitimimdeki katkılarından dolayı hocalarım Doç. Dr. F. Belgin Ataç, Doç. Dr. Zerrin Yılmaz ve Yrd. Doç. Dr. Erkan Yurtcu'ya;

Tezimin oluşmasındaki önemli katkılarından dolayı Doç. Dr. Mahmut C. Yağmurdur ve Yrd. Doç. Dr. Canan Yazıcı'ya;

Eğitimimin her aşamasında bana destek olan, sıkıntılı anlarımızda dahi hoşnutluk yaratmaya çalışan ve her biri benim için çok değerli olan Uzm. Kimyager Esra Başyigit, Dr. Tuğçe Bulakbaşı Balcı, Dr. Özge Özer ve daha ismini sayamadığım ancak çok güzel anıları paylaştığım "Hastane" ve "Kampüs" ekibine;

Hayatımın her döneminde yanımda olup, maddi ve manevi her sıkıntıda yardımına koşan ve bugünlere gelmemdeki fedakarlıklarından ötürü, canımdan çok sevdiğim aileme;

...Ve son olarak da akademik hayata ilk adımımı atmamda bana destek olan, her zaman yanımda olduğunu hissettiren ve bundan sonra da yanımda olmasını istediğim nişanlım Serkan Kasapoğlu'na teşekkürü bir borç bilirim.

Ezgi SEZGİN

1. ÖZET

Meme kanseri kadınlarda en sık görülen kanserdir ve kanser nedenli ölümler arasında akciğer kanserinden sonra ikinci sırada gelmektedir. Meme kanseri hücre büyümesi ve gelişmesine katılan önemli hücresel yolları etkileyen genetik değişimler ile çok adımlı işlemler sonucu ortaya çıkmaktadır. Rutin uygulamada meme kanserinde pratikte kullanılan en güçlü prognostik faktörler: Lenf nodu metastazı, tümör çapı, histolojik grade ve histolojik tiptir. Steroid hormon reseptör durumu ve moleküler belirteçler diğer önemli prognostik faktörlerdir. HER-2/neu kromozom 17q21'de lokalize olmuş bir proto-onkogen olup tirozin kinaz aktivitesine sahip bir transmembran glikoproteini (p185) kodlamaktadır. Bu protein epidermal büyüme faktör reseptör ailesinin bir üyesidir. HER-2/neu amplifikasyonu ve/veya aşırı ifadenmesi kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir. HER-2/neu geninin 655. kodonundaki transmembran parçayı kodlayan bölgesindeki tek nükleotid polimorfizmi (SNP) adeninin guanine dönüşümü (A→G, Ile→Val) sonucunda oluşmaktadır. HER-2/neu geninin 655. kodonundaki bu SNP'nin (rs1136201), ya izolösin (Ile:ATC) ya da valin (Val:GTC) kodladığı tanımlanmıştır. Yapılan çalışmalarda Ile/Val SNP'nin artmış meme kanseri riski ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. Ancak, pek çok çalışmada bu ilişkinin tartışmalı olduğu gösterilmiştir.

Biz bu çalışmada HER-2/neu kodon 655 polimorfizmini 58 meme kanseri hastasından ve kontrol grubuna dahil edilen 55 bireyden elde edilen parafin blok doku kesitlerinde analiz ettik ve polimorfik allellerin meme kanseri ile ilişkisini değerlendirdik. DNA izolasyonunu takiben PCR-RFLP (Polimeraz Zincir Reaksiyonu-Restriksiyon Fragmenti Uzunluk Polimorfizmi) yöntemi uygulandı. Çalışılan 58 hasta ve 55 kontrol grubu bireyinde polimorfik Val alleli sıklığı %12.1 ve %17.3 olarak saptandı. Çalışmanın sonuçları değerlendirildiğinde HER-2/neu kodon 655 polimorfizmi ile meme kanseri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir birliktelik görülmedi.

Anahtar kelimeler: Meme kanseri, HER-2/neu, PCR-RFLP, Tek nükleotid polimorfizmi

2. ABSTRACT

Breast cancer is the most common type of cancer in women being the second common cause of cancer related deaths. Breast cancer occurs as a result of multistep carcinogenesis affecting important cellular pathways acting role in cellular growth and development. The most important prognostic factors in routine practice are lymph node metastasis, tumor size, histological grade and type. Steroid hormone receptor status and molecular markers are other important prognostic factor. HER-2/neu is a proto-oncogene encoding a transmembrane glycoprotein (p185) with a tyrosine kinase activity, HER-2/neu amplification and/or overexpression has been related with poor prognosis, at chromosome region 17q21. This protein is a member of the epidermal growth factor receptor family. Amplification and/or overexpression of HER-2/neu has been reported to be associated with poor prognosis. One single-nucleotide polymorphism (SNP) at codon 655 indicates a guanine-to-adenine substitution (Ile655Val) in the transmembrane domain-coding region of the HER-2/neu gene. This single nucleotide polymorphism (SNP) of HER-2/neu gene at codon 655 (rs1136201), encoding either isoleucine (Ile: ATC) or valine (Val: GTC), has been identified. It has been reported that this Ile/Val SNP is associated with increased risk of breast cancer. However, several studies have shown that this association is controversial.

In this study, we analyzed the HER2 codon 655 polymorphisms in paraffin block sections from 58 breast cancer patients and 55 control subjects and evaluated the association of the polymorphic alleles with breast cancer. PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism) method was carried out, following DNA isolation. The frequency of the polymorphic Val allele was detected 12.1% in the patients and 17.3% in the control subjects. When the results of the study were evaluated, no statistically significant correlation was found between Her-2/neu codon 655 polymorphism and breast cancer.

Key words: Breast cancer, HER-2/neu, PCR-RFLP, Single nucleotide polymorphism

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
1. ÖZET.....	v
2. ABSTRACT.....	vi
3. KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ.....	ix
4. ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xii
5. TABLOLAR DİZİNİ.....	xiii
6. GİRİŞ	1
7. GENEL BİLGİLER.....	3
7.1. Meme Kanseri Epidemiyolojisi.....	3
7.2. Meme Kanseri Patogenezinde Rol Oynayan Prognostik Faktörler.....	5
7.2.1. Meme Kanseri Patogenezinde Rol Oynayan Onkogenler.....	9
7.2.2. Meme Kanseri Patogenezinde Rol Oynayan Tümör Baskılayıcı Genler.....	10
7.3. Tedavide Moleküler Yaklaşımlar.....	11
7.4. Epidermal Büyüme Faktör Reseptör (EGFR) Ailesi.....	12
7.5. İnsan Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü 2 (HER-2/neu).....	16
7.6. Meme Kanseri ve HER-2/neu Polimorfizmi.....	17
8. GEREÇ VE YÖNTEM.....	20
8.1. Gereçler.....	20
8.1.1. Kullanılan Cihazlar.....	20
8.1.2. Kullanılan Kimyasallar.....	21
8.1.3. Kullanılan Tamponlar ve çözeltiler.....	22

8.2. Yöntem.....	24
8.2.1. Parafin Blok Doku Kesitlerinden DNA İzolasyonu.....	24
8.2.2. PCR	26
8.2.3. RFLP.....	27
8.2.4. PCR Ürünlerinin Görüntülenmesi ve Değerlendirilmesi.....	27
8.2.5. İstatistiksel Analiz.....	28
9. BULGULAR.....	29
10. TARTIŞMA.....	41
11. SONUÇLAR.....	49
12. KAYNAKLAR.....	50

3. KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ

A	Adenin
a.a.	Aminoasit
AR	Amphiregulin
ATM	Mutant Ataksi-Telanjektazi
b.ç.	Baz çifti
BRCA1	Breast cancer 1, early onset
BRCA2	Breast Cancer 2, early onset
BTC	Betacellulin
C	Karboksi
CDK	Siklin Bağımlı Kinaz
CDKI	Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitörü
cm	Santimetre
CMM	Chemical Cleavage of Mismatch
dATP	Deoksi adenzin trifosfat
DCIS	Duktal Karsinoma in situ
dCTP	Deoksi sitidin trifosfat
DGGE	Denaturing Gradient Gel Electrophoresis
dGTP	Deoksi guanin trifosfat
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
dTTP	Deoksi timidin trifosfat
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksi Nükleozid Trifosfat
EDTA	Etilendiamin tetraasetikasit
EGF	Epidermal Büyüme Faktörü
EGFR	Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü
EPR	Epiregulin
ER	Östrojen Reseptörü
g	Gram
G	Guanin
GDP	Guanozin Difosfat
GF	Büyüme Faktörü

GFR	Büyüme Faktörü Reseptörü
Glu	Glutamat
GTP	Guanozin Trifosfat
HER-2/neu	İnsan Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü-2
HER-3	İnsan Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü-3
HER-4	İnsan Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü-4
HB-EGF	Heparine-bağlanan epidermal büyüme faktörü
IHC	İmmünohistokimya
Ile	İzolösin
kb	Kilobaz
kDa	Kilodalton
ml	Mililitre
mg	Miligram
mM	Milimolar
MgCl₂	Magnezyum klorür
mRNA	Mesajcı Ribonükleik asit
N	Amino
ng	Nanogram
nM	Nanomol
NRG	Neregulin
NSABP	National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project
p53	protein 53
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PR	Progesteron Reseptörü
PTB	Fosfotirozin bağlanma bölgesi
PAGE	Poliakrilamid Jel Elektroforezi
RFLP	Restriksiyon fragmenti uzunluk polimorfizmi
rpm	Revolutions per minute
SBR	Scarff-Bloom-Richardson
SH2	Src homoloji 2
SNP	Tek nükleotid değişimi
SPSS	Statistical Package for Social Sciences

SSCP	Single Strand Conformation Polymorphism
Taq	Thermus aquaticus
TBE	Tris-Borik asit-EDTA
TGF-α	Transforme edici büyüme faktörü-alfa
TM	Transmembran
TEMED	NNNN-Tetrametil Etilendiamin
U	Ünite
UV	Ultraviyole
Val	Valin
w	ağırlık
μg	Mikrogram
μl	Mikrolitre
μm	Mikrometre
°C	Santigrad derece

4. ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa No
Şekil 7.1. EGFR ailesi ve özgül ligandları.....	14
Şekil 9.1. Hasta ve kontrol grubuna ait HER-2/neu geni PCR ürününün High Resolution Agaroz jel görüntüsü.....	34
Şekil 9.2. Hasta grubuna ait 145 b.ç.'lik HER-2/neu geni PCR ürününün RFLP analiz PAGE görüntüsü.....	34
Şekil 9.3. Hasta ve kontrol grubuna ait 145 b.ç.'lik HER-2/neu geni PCR ürününün RFLP analiz PAGE görüntüsü.....	35
Şekil 9.4. Kontrol grubuna ait 145 b.ç.'lik HER-2/neu geni PCR ürününün RFLP analiz PAGE görüntüsü.....	35

5. TABLOLAR DİZİNİ

	Sayfa No
Tablo 7.1. Meme kanserinin histolojik sınıflaması.....	6
Tablo 9.1. Olgulara ilişkin demografik ve klinik özellikler.....	29
Tablo 9.2. Olgulara ait tümörlerin genel özellikleri.....	30
Tablo 9.3. ER ve PR analizi yapılan 45 olgudaki dağılım	31
Tablo 9.4. Cerrahi tedavinin çeşidine göre olgu sayısı ve yüzdesi.....	32
Tablo 9.5. Hormon tedavisi ve kemoterapiye göre olgu sayısı ve yüzdesi.....	32
Tablo 9.6. Kontrol grubunun demografik ve klinik özellikleri.....	33
Tablo 9.7. Meme kanserli hasta ve kontrol grubunda HER-2/neu genotip ve allel sıklıklarının dağılımı.....	36
Tablo 9.8. Yaşa göre HER-2/neu genotip ve allel sıklıklarının dağılımı.....	37
Tablo 9.9. Menopozal duruma göre HER-2/neu genotip ve allel sıklıklarının dağılımı.....	38
Tablo 9.10. Aile öyküsüne göre HER-2/neu genotip ve allel sıklıklarının dağılımı.....	38
Tablo 9.11. Aksiller lenf nodu metastazına göre HER-2/neu genotip ve allel sıklıklarının dağılımı.....	39
Tablo 9.12. Polimorfik bulunan olgulardaki histolojik tip dağılımı.....	40

6. GİRİŞ

Meme kanseri, hücre büyümesi ve gelişmesine katılan önemli hücresel yolları etkileyen genetik değişimler ile çok adımlı işlemler sonucu ortaya çıkmaktadır (1). Meme kanseri, kadınlarda en sık görülen kanserdir ve tüm kanser olgularının %13.5'ini oluşturmaktadır (2). Lenf nodu metastazı, tümör çapı, histolojik grade ve histolojik tip en önemli prognostik faktörler olup, bunların yanı sıra steroid hormon reseptörleri ve moleküler belirteçlerin de prognoz üzerine etkisi bulunmaktadır (3, 4).

Kanser oluşumunda rol oynayan iki temel gen grubu: onkogenler ve tümör baskılayıcı genlerdir. Onkogenler çoğunlukla proto-onkogen adı verilen normal hücresel genlerin mutant allelleridir (5). Onkogenlerin fonksiyon-kazandıran mutasyon özelliği ve tümör baskılayıcı genlerin fonksiyon-kayıbı malign fenotip oluşumuna neden olmaktadır. (1, 5).

Pek çok proto-onkogen, büyüme faktörü, büyüme faktörü reseptörü ya da hücre içi sinyal iletiminde görevli proteinleri kodlamaktadır (6). Epidermal büyüme faktörü reseptör (EGFR) ailesi, tirozin kinaz aktivitesine sahip bir transmembran protein ailesidir (7). Epidermal büyüme faktörü (EGF) ve EGFR' nin meme ve çeşitli karsinom tiplerinin progresyonu ve patogenezinde merkezi bir role sahip olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (8).

HER-2/neu, bir proto-onkogen olup, kromozom 17q21 bölgesinde lokalize olmuştur ve 185 kDa'luk (p185) bir transmembran glikoproteini kodlamaktadır (9). HER-2/neu geninin 655. kodonundaki transmembran kodlayan bölgesindeki tek nükleotid polimorfizmi (SNP) adeninin guanine dönüşümü (A/G, Ile/Val) sonucunda oluşmaktadır (10). Yapılan bazı çalışmalarda Ile/Val SNP'nin artmış meme kanseri riski ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. Buna karşın pek çok çalışmada da bu ilişkinin tartışmalı olduğu gösterilmiştir (9, 11).

Bu bilgiler ışığında çalışmamızda meme kanseri tanısı almış hastalarda HER-2/neu polimorfizmini belirlemek ve polimorfizmin hastalığın prognozu üzerine olası etkilerini araştırmak amaçlanmıştır.

7. GENEL BİLGİLER

7.1. Meme Kanseri Epidemiyolojisi

Meme kanseri, kadınlarda gerek gelişmiş gerekse gelişmekte olan ülkelerde en sık görülen kanserdir. Kadınlarda kanser nedenli ölümler arasında akciğer kanserinden sonra ikinci sırada gelmektedir. American Cancer Society 2008 tahmini verilerine göre, ABD'deki olgu sayısı 182.460 olup, meme kanserinden ölen kadın sayısı 40.480 olarak bildirilmiştir (12). 2006 yılı verilerine göre Avrupa'da 429.900 meme kanseri tanısı konulmuş olgu bildirilmiş ve bunlardan 131.900'i meme kanserinden ölmüştür. Meme kanseri tüm kanser olgularının %13.5'ini oluşturmaktadır. Avrupa'da yeni kanser olgularının toplam sayısının 2004'den beri 300.000 kadar arttığı bildirilmiştir (2).

Amerikalı bir kadında doğumundan, 39 yaşına kadar meme kanseri gelişme olasılığı %0.48; 40-59 yaş arası, %3.86; 60-69 yaş arası, %3.51 ve 70 yaşından sonra %6.95'dir. Tüm yaşamı boyunca ise bu olasılık %12.28'dir (12).

Türkiye'de 1999 yılında 8.879 olan meme kanserli kadın sayısı, 2003 yılında 12.772'ye yükselmiştir. Ayrıca ülkemizde tüm kanserlerin %24.1'ini meme kanserlerinin oluşturduğu belirtilmektedir (13). Hastalık gelişme riski, yaş ile doğrudan ilişkili olup, yaş arttıkça hastalık görülme sıklığı giderek artmaktadır. Meme kanseri 30 yaşından önce nadir olup, bu yaşı takip eden reproduktif yıllarda hızlı bir tırmanış gösterir; menopoz dönemindeki hafif bir azalmayı takiben de menopoz sonrası yıllarda yavaş eğimle sürekli devam eden bir artış ortaya çıkar. Bu nedenle 85 yaşındaki her 8 kadından birinde meme kanseri gelişebileceği beklenmektedir (14).

Meme kanserinin halen yeni bilgilerin ortaya çıktığı ve gelişmelerin yaşandığı oldukça geniş bir alan olduğu ifade edilmektedir. Bununla birlikte meme kanserinin hangi nedene bağlı olarak ortaya çıktığı tam olarak bilinmemekte, tüm dünyada yapılan araştırmalar sonucunda bazı özelliklere sahip olan kadınlarda meme kanseri görülme riskinin daha yüksek olduğu

belirtilmektedir. Birçok risk faktörü ile ilişkili olan meme kanserinin, risk faktörlerinin azalmasına ve artmasına göre, görülme sıklığı da farklılık göstermektedir. Kadınlarda meme kanseri görülme riskini yükselten bu faktörlerden bazıları şöyledir:

Yaş: Meme kanserine yakalanmada etkili olan risk faktörleri incelendiğinde ileri yaşa sahip olmanın önemli bir risk faktörü olarak ele alındığı görülmektedir. Meme kanseri tanısı konan kadınlar üzerinde yapılan çalışmalarda, %70'inin yaşının 50 yaş ve üzerinde olduğu ifade edilmekte ve yaşı 50 yaş ve üzerinde olan kadınların meme kanseri görülme sıklığının, yaşı 50 yaşın altında olan kadınlara nazaran 4 kat daha fazla olduğunun altı çizilmektedir (15).

Menarş ve menopoz yaşı: Menstruasyon dönemi erken yaşta başlayan yada ilerleyen yaşlarda menopoza giren kadınlarda meme kanseri gelişimi riski artmaktadır.

İlk doğurganlık yaşı: Hiç çocuk doğurmayan ve ilk doğumunu ilerleyen yaşlarda yapan kadınlarda meme kanseri görülme sıklığı artmaktadır. İlk çocuğunu 30 yaşından sonra doğuran kadınlarda meme kanseri görülme oranı 20 yaşından önce doğuranlara göre 2 kat daha fazladır (16).

Aile öyküsü: Aile bireyleri arasında meme kanserine yakalanmış kimse bulunmasının, kadınların meme kanserine yakalanma olasılığını yükselttiği ifade edilmektedir. Özellikle kız kardeşi veya annesi meme kanserine yakalanan bir kadının, meme kanserine yakalanma riski, diğer kadınlara nazaran 2 ila 5 kat oranında daha fazladır (15).

7.2. Meme Kanseri Patogenezinde Rol Oynayan Prognostik Faktörler

Lenf nodu metastazı, tümör çapı, histolojik grade ve histolojik tip klinikte rutin olarak kullanılan prognostik parametrelerdir (3). Buna ek olarak steroid hormon reseptörleri (östrojen ve progesteron reseptörü), moleküler belirteçler (her-2/neu, p53, c-myc, ras) meme kanseri prognozu üzerine etkilidir (4).

Aksiller Lenf Nodu Metastazı

Erken evre meme kanserlerinde aksiller lenf nodu negatif ya da pozitif olsun en önemli prognostik faktördür. Lenf nodu sayısı ile uzak metastaz yinelemesi arasında doğrudan bir ilişki bulunmaktadır. National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project (NSABP) verilerine göre 4 nodal grup bulunmaktadır: negatif nod, 1-3 pozitif nod, 4-9 pozitif nod ve 10 ya da daha fazla pozitif nod. Aksiller lenf nodu negatif olan hastalarda 5 yıllık sağ kalım %82.8 iken, lenf nodu 13'den fazla olan hastalarda sağ kalım %28.4'e düşmektedir (17).

Tümör Çapı

Aksiller lenf nodu varlığı ve sayısı ile korelasyon gösteren bağımsız bir prognostik faktördür. <1 cm tümörü olan hastalarda 5 yıllık sağ kalım oranı %99 iken, 1-3 cm arası tümörlerde %89 ve 3-5 cm arası tümörlerde ise %86'dır (17).

Tümör Grade

Tümörlerin grade'lenmesinde çoğunlukla Scarff-Bloom-Richardson (SBR) sistemi kullanılır. Tümör hücrelerinin nükleer özellikleri, oluşturdıkları tubulus yapılarının oranı ve mitoz sayısı 1'den 3'e kadar skorlanarak elde edilen skora göre grade elde edilir. Toplam skor 3-5 arasında ise grade 1, 6 ya da 7 ise grade 2 ve 8 ya da 9 ise grade 3 tümör olarak belirlenir (18).

Histolojik Tip

Günümüzde meme karsinomlarının histolojik sınıflamasında en çok Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'nün öngördüğü sınıflama kullanılmaktadır (19).

Tablo 7.1. Meme kanserinin histolojik sınıflaması (DSÖ sınıflaması)

1. İn situ karsinom • İn situ duktal karsinom • İn situ lobüler karsinom
2. İnvaziv karsinom • İnvaziv duktal karsinom • İnvaziv lobüler karsinom • Tubular karsinom • İnvaziv kribriform karsinom • Medüller karsinom • Müsinöz karsinom • İnvaziv papiller karsinom • İnvaziv mikropapiller karsinom • Apokrin karsinom • Sekretuar (juvenil) karsinom • Adenoid kistik karsinom • Metaplastik karsinom • Nöroendokrin karsinom • İnflamatuar karsinom

Histolojik olarak meme karsinomları in situ ve invaziv karsinomlar olmak üzere iki ana gruba ayrılmaktadırlar. İn situ karsinomda malign epitelyal hücreler bazal membranla çevrili duktus ve asinuslar içinde sınırlı iken, invaziv (infiltratif) karsinomda neoplastik hücreler bazal membranı aşarak stromaya invazyon göstermektedir. Bu nedenle invaziv karsinomlar, lenfatik ve kan damarlarını invaze ederek bölgesel lenf düğümlerine ve uzak organlara metastaz yapabilme kapasitesine sahiptir.

İnvaziv duktal karsinom, invaziv meme karsinomlarının en sık görülen tipidir (%70-80). Herhangi bir özel tip morfoloji göstermeyen tüm invaziv karsinomlar bu gruba alınır (19).

İnvaziv lobular karsinom, tüm invaziv meme karsinomlarının %5-15'ini oluşturmaktadır ve hormon replasman tedavisi alan kadınlarda daha sık görülür (19).

Prognozu İyi Olan Meme Karsinomları:

Tubuler karsinom: Meme karsinomlarının %2'sini oluşturmaktadır. Ancak günümüzde mamografinin tarama amaçlı kullanımı ve yeni tekniklere bağlı olarak, 1cm'den küçük tümörlerin %10'unun tubuler karsinom olduğu gösterilmiştir.

İnvaziv kribriform karsinom: İnvaziv karsinomlarının nadir görülen bir tipidir.

Müsinöz karsinom: Az görülen bir tip olup meme karsinomlarının %1-6'sını oluşturur. Daha çok ileri yaş kadınlarda görülür.

Her üç tipte de östrojen ve progesteron hormonu pozitif, HER-2/neu negatiftir (19).

Sekretuar karsinom: İlk olarak ortalama 9 yaş kız çocuklarında tanımlanmıştır daha sonra tüm erişkin yaşlarda bildirilmiştir (20).

Prognozu Kötü Olan Meme Karsinomları:

Metaplastik karsinom: Nadir görülen bir tiptir. İnvaziv duktal karsinomdan farklı olarak büyük tümör boyutu, çok sayıda aksiler lenf nodu, yüksek tümör grade'i gösterip, hormon reseptörleri negatiftir (21).

İnflamatuar karsinom: İnflamatuar bir durumu taklit etmesiyle bu adı almıştır. Altta yatan invaziv karsinom genellikle yüksek grade'li invaziv duktal karsinomdur (19).

Taşlı Yüzük Hücreli Karsinom: Dünya Sağlık Örgütü tarafından ayrı bir grup olarak sınıflanmamıştır. Sıklıkla lobuler karsinoma eşlik edebilir (22).

Steroid Hormon Reseptörleri

Günümüzde immünohistokimya (IHC) steroid reseptör durumunun belirlenmesinde kullanılan standart yöntemdir. Östrojen reseptörleri (ER) ve progesteron reseptörleri (PR), uygun endokrin tedavinin belirlenmesinde

kullanılmaktadır (23). Steroid reseptörler arasında ER ve PR özellikle dikkati çekmiştir çünkü bu reseptörlerin protein seviyeleri meme tümörü lezyonlarında normal dokulardakinin aksine artış göstermektedir (24). Lagiou ve ark. (2009)'nın belirttiğine göre Khan ve ark. yüksek reseptör ifadenmesinin normal meme epitelinde, kanser riskini arttırabileceğini ileri sürmüştür (25).

ER, meme kanserinde muhtemel olarak kullanılan en güçlü prediktif faktördür. Reseptör pozitif tümörler, hormonal tedaviye daha iyi cevap vermekte ve daha iyi prognoz göstermektedir. Östrojen reseptörünün, ER α ve ER β olmak üzere 2 tipi bulunmaktadır. ER α , tüm meme kanserlerinin %70'inde ifadenmekte olmasına rağmen prediktif değeri ideal değildir. ER pozitif metastatik meme kanserlerinin yaklaşık olarak 1/3'ü hormonal tedaviye cevap vermemektedir.(23).

Moleküler Belirteçler

Meme kanseri ve diğer kanserler hücre büyümesi ve gelişmesine katılan önemli hücresel yolları etkileyen genetik değişimler ile çok adımlı işlemler sonucu ortaya çıkar. Çoğu genetik değişimler, sadece kanserli dokudaki kanser hücrelerinde gözlenirken, daha az sıklıkla da olsa germ hücrelerindeki genetik değişimlerle ortaya çıkan kanserler kalıtsal özellik taşırlar. Genomda gerçekleşen bu kalıtsal ve kalıtsal olmayan değişimlerden onkogen adı verilen genler sorumludur (1). Gen ekspresyonunu hızlandıran ya da kodladıkları proteinlerde kontrolsüz aktivite artışına neden olan genetik değişikliklerin sonucunda anormal hücre çoğalmasına neden olmaktadır (26).

Onkogenler, normal işleve sahip proto-onkogenlerden çeşitli mekanizmalarla oluşmaktadırlar. Proto-onkogende meydana gelen nokta mutasyonu, gen amplifikasyonu ve kromozomal translokasyonlar proto-onkogenin aktivasyonunu etkileyen mekanizmalardır. Kanser oluşumundan sorumlu bir diğer gen grubu da tümör baskılayıcı genlerdir (1, 5). Onkogenlerin aksine normal koşullarda hücre çoğalmasını ve tümör gelişimini baskılamaktadırlar (26). Onkogenler hücresel seviyede dominant etkiye

sahiptir, aktive edildiklerinde veya ekspresyonları arttığında, tek bir mutant allel bir hücreyi normalden malign fenotipe dönüştürmeye yetebilir. Tümör baskılayıcı genlerdeki mutasyonlar çekinik karakterdedir. Tek bir normal allel normal hücre fenotipinin oluşması için yeterlidir (5). Proto-onkogenlerin ve tümör baskılayıcı genlerin seri mutasyonları farklı mekanizmalar aracılığıyla malign fenotipin oluşumuna katkıda bulunur (27).

7.2.1. Meme Kanseri Patogenezinde Rol Oynayan Onkogenler

Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü (EGFR):

Tirozin kinaz aktivitesine sahip bir transmembran protein ailesi olan EGFR ailesi; EGFR (ERBB1), HER-2/neu (ERBB2), HER-3 (ERBB3) ve HER-4 (ERBB4) olmak üzere 4 üyeden oluşur. Ligandı olan peptid büyüme faktörleri gelip bağlandığında reseptör homo ya da heterodimerizasyonu gerçekleşir ve bunu tirozin kinaz bölgelerindeki otofosforilasyon izler. EGFR'nin otofosforilasyonu diğer hücre içi substratların fosforilasyonuna yol açar (7). Bu aktivasyon sonucunda nükleusta bulunan transkripsiyon faktörleri uyarılır (28). EGF ve EGFR' nin meme ve çeşitli karsinom tiplerinin progresyonu ve patogenezinde merkezi bir role sahip olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (6). Meme karsinomlarının %16-36'sında EGFR aşırı ifadelenmiştir (7, 29).

HER-2/neu:

HER-2/neu, bir proto-onkogen olup, kromozom 17q21'de lokalize olmuştur ve sinyal iletiminde görevli 185 kDa'luk (p185) bir transmembran proteini kodlamaktadır (9). HER-2/neu proteini, normal hücre proliferasyonunda önemli bir role sahiptir. Bu proto-onkogen EGFR'ye homoloji göstermektedir (30). HER-2/neu diğer aile üyeleriyle (EGFR, HER-3, HER-4) liganda bağlı heterodimerizasyon gerçekleştirebilir ve böylece HER-2 sinyal yolağını aktif hale getirebilmektedir (31). HER-2/neu amplifikasyonu, invaziv duktal meme karsinomlarının %25-30'unu kapsamaktadır. HER-2/neu proteininin aşırı ifadelenmesi ya da genin amplifikasyonu meme kanserlerinde kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir (30).

Ras:

Ras bir proto-onkogen üründür. Aktif GTP-bağlı halde ya da inaktif GDP-bağlı durumda bulunmaktadır. Plazma membranından, nükleusa sinyal iletiminde önemli bir aracı moleküldür. Ras mutasyonları malign transformasyona öncülük eder. Çeşitli kanserlerde ras mutasyonları saptanmıştır. Pankreas kanserlerinin %90'ında, kolon, tiroid ve meme kanserlerinin %50'sinde görülmektedir (32).

c-Myc:

c-Myc proto-onkogeni kromozom 8q24.1'e yerleşmiştir. Hücre proliferasyonu ve apoptoziste görevli genlerin transkripsiyonunu düzenler. c-Myc geni meme tümörlerinin %15-25'inde aşırı ifadelenmekte ve kötü prognoz ile ilişkilendirilmektedir. c-Myc amplifikasyonu hala belirsiz olsa da, invaziv meme karsinomlarında bağımsız bir prognostik faktördür (1, 33).

Siklinler, Siklin Bağımlı Kinazlar ve İnhibitörleri:

Siklinler, siklin bağımlı kinazlar (CDK) ve inhibitörleri (CDKI) hücre döngüsünü doğrudan kontrol eden proteinlerdir. Meme kanserlerinde siklin D1 ve siklin E'nin aşırı ifadelendiği saptanmış ve prognostik faktör olabileceği ileri sürülmüştür (34).

7.2.2. Meme Kanseri Patogenezinde Rol Oynayan Tümör Baskılayıcı Genler**p53:**

p53 geni kromozom 17p'de yerleşmiştir ve bu genin ürünü nüklear bir fosfoproteindir. p53 bir transkripsiyon faktörü olup diziye özgü olarak DNA'ya bağlanma özelliği göstermektedir. P53 proteininin malign hücreleri apoptosize yönlendirdiği gösterilmiştir. Meme kanserlerinde, p53 genindeki bozukluklar kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir (35).

ATM (Mutant Ataksi-Telanjektazi):

Kromozom 11'de yerleşmiştir. Meme kanserlerinin %2-7'sinde bu gen sorumludur (36).

Ailesel Meme Kanseri ve Yatkınlık Genleri

Bir kadının meme kanseri geliştirme riski birinci-derece yakınları arasında etkilenmiş bireyin varlığında 3 kata kadar, birden fazla birinci-derece yakınlarında etkilenen bireylerin varlığında ise 10 kata kadar artmaktadır. Meme kanseri olan birinci-derece yakının 40 yaşında veya daha gençken tanı alması durumunda bu ailevi risk daha da artmaktadır (5).

Meme kanserlerinin büyük çoğunluğu sporadik vakalar olmasına rağmen yaklaşık %5-10 oranında kalıtsal nedenli ailesel meme kanseri ortaya çıkmaktadır. Ailesel meme kanseri saptanan olguların çoğunda hastalık BRCA1 ve BRCA2 adı verilen tümör baskılayıcı genlerde meydana gelen mutasyonlardan kaynaklanır. Erken başlangıç gösteren ailevi meme kanserli olguların genetik bağlantı çalışmaları ile kromozom 17q21'de BRCA1'in ve kromozom 13'ün uzun kolunda lokalize BRCA2'nin mutasyonlarının keşfi sağlanmıştır. BRCA1 ve BRCA2 genlerindeki germ soyu mutasyonlar, yüksek risk oluşturan faktörler olarak birçok çalışmada gösterilmiştir. Bu iki kansere yatkınlık geninin mutasyonlarını taşıyan kadınlar %60-80 ihtimalle hayatı boyunca meme kanseri olma riskine sahiptir (37).

7.3. Tedavide Moleküler Yaklaşımlar

Son yıllarda, meme kanserine öncülük eden moleküler değişikliklerin daha iyi anlaşılması, yeni moleküler hedeflerin tanımlanması ve hedeflenmiş tedavilerin gelişmesiyle sonuçlanmıştır (38). Her 4 meme tümörünün 1'inde, HER-2/neu proteininin aşırı ifadelenmesi ve/veya genin amplifikasyonu söz konusu olduğundan HER-2/neu'ya karşı tedaviler geliştirilmiştir (39). Trastuzumab, HER-2/neu proteinine yüksek bağlanma kapasitesine sahip, hümanize bir rekombinant monoklonal antikordur. Trastuzumab, HER-2/neu proteinini aşırı ifadeleyen hücre yüzeyindeki HER-2/neu reseptörüne bağlanır,

sinyal iletimini ve tümör hücresinin ploliferasyonunu inhibe eder (38, 39). Trastuzumab gibi monoklonal bir antikor olan pertuzumab, ligand bağlanması sonucu HER-2/neu ve diğer reseptör ailesi üyeleri arasında oluşan dimerizasyonu inhibe etmektedir (38). Trastuzumab ve pertuzumab HER-2/neu reseptörünün hücre dışı bölgesine bağlanırken, düşük moleküler ağırlıklı EGFR ve HER-2/neu ikili tirozin kinaz inhibitörü olan lapatinib, hücre içi reseptör kinaz bölgesini ATP'yi taklit edip bloke ederek, reseptörün otofosforilasyonu ve sinyal iletimini inhibe eder (38,39).

7.4. Epidermal Büyüme Faktör Reseptör (EGFR) Ailesi

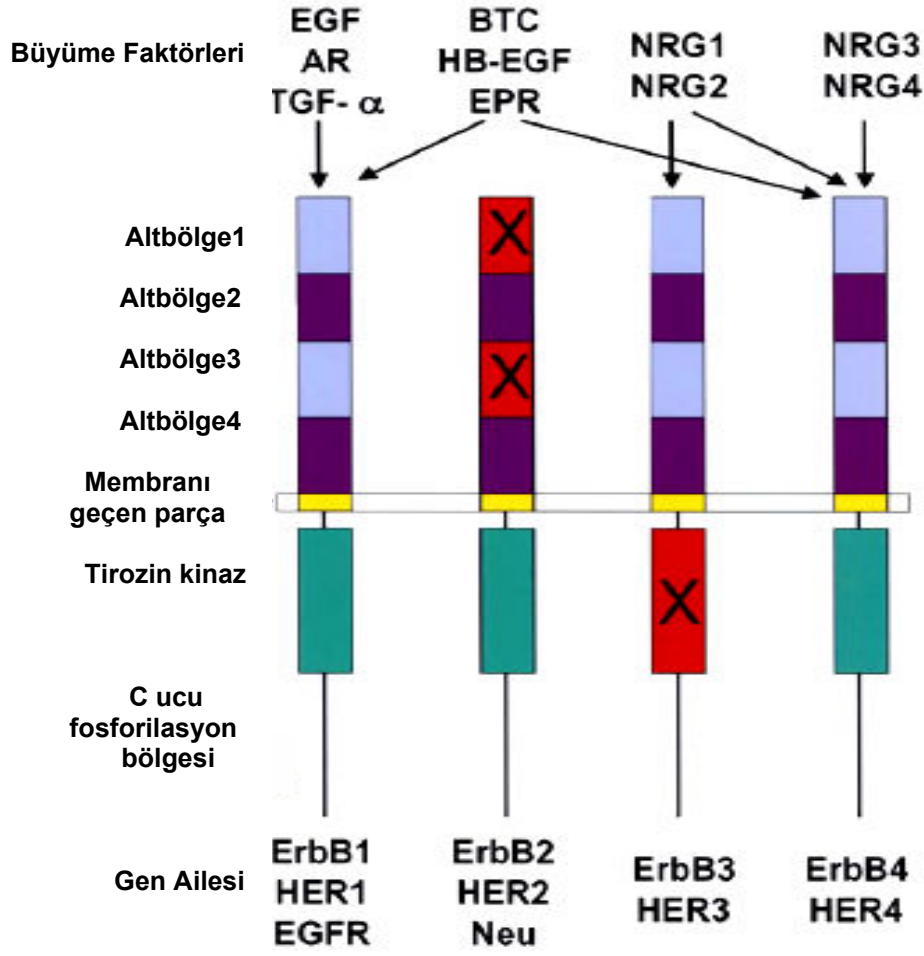
Sinyal iletiminde meydana gelen değişimler hücrenin çoğalma ve /veya yaşama işlevlerinin kontrolünü ortadan kaldırır. Böylelikle, onkogenik sinyal iletimi tümör gelişimi ile invazyon/metastaz sürecinde etkin rol oynamaktadır. Kanseri oluşturmaktan sorumlu 2 gen proto-onkogen ve tümör baskılayıcı genlerdir. Onkogenler, hatalı sinyal ileten proteinlerdir. Sürekli hücre bölünmesi sinyali vererek tümör oluşumuna yol açarlar. Tümör baskılayıcı genler ise normal koşullarda hücre bölünmesini inhibe eden proteinleri kodlar. Bu iki genin herhangi birinde ortaya çıkan mutasyon normal hücrelerin kanser hücrelerine dönüşmesine neden olur (27).

Pek çok proto-onkogen, büyüme faktörü, büyüme faktörü reseptörü ya da hücre içi sinyal iletiminde görevli proteinleri kodlamaktadır (6). Büyüme faktörleri (GF) ve büyüme faktör reseptörleri (GFR), büyüme ve farklılaşmanın normal işleyişinde önemli bir fizyolojik role sahiptir. Bu modele göre, büyüme faktörü reseptöre bağlanır, bu bağlanma dimerizasyona öncülük eder ve karşılıklı fosforilasyonla reseptör aktif hale gelir. Aktif hale geçen reseptör, nükleusta bulunan transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonunu başlatacak olan bir seri sitoplazmik proteininin fosforilasyonunu sağlar. Aktive olan transkripsiyon faktörleri, mRNA sentezinde ve mRNA'nın translasyonu sonucu, hücre büyümesi ve hücre farklılaşmasında görevli proteinlerin sentezinde artışa neden olmaktadır. Sinyal yolağında meydana gelebilecek herhangi bir bozukluk, anormal hücre büyümesi ve gelişmesine neden olabilmektedir (40).

İnsan kanserlerinin patogeneğinde büyüme faktörü (GF) ve büyüme faktörü reseptörlerinin (GFR) farklı kanser hücrelerinin otonom büyümesini sağladığı uzun zaman önce gösterilmiştir (6).

EGFR ve peptid GF ailesi, farklı karsinom tiplerinin patogeneğinde merkezi bir role sahiptir (6). EGFR ilk keşfedilen reseptör tirozin kinazdır. EGFR ailesi yapsal olarak benzer 4 üyeden oluşmaktadır: EGFR, HER-2/neu, HER-3 ve HER-4. Her bir reseptör tip 1 transmembran proteinidir (6, 40, 41). Bu ailenin tüm proteinleri, sistince zengin hücre dışı ligand bağlanma bölgesi, hidrofobik transmembran bölge ve sitoplazmik tirozin kinaz bölgelerine sahiptir. Tirozin kinaz bölgeleri oldukça korunmuş olmasına karşın HER-3'ün tirozin kinaz bölgesi inaktiftir (6).

Bu proteinlerin herhangi birinin aşırı ifadenmesi ilerlemiş meme kanseri patogeneziyle bağlantılı olup, endokrin tedaviye karşı zayıf cevap ve kötü prognozla ilişkilendirilmiştir (8). EGFR ailesi için bazı özgül ligandlar tanımlanmıştır. Bunlar temel olarak 3 gruba ayrılmıştır. Birinci grup, EGF, Transforme edici büyüme faktörü-alfa (TGF- α) ve amphiregulindir (AR), spesifik olarak EGFR'ye bağlanmaktadır. İkinci grup, Betacellulin (BTC), Heparine-bağlanan epidermal büyüme faktörü (HB-EGF) ve epiregulin (EPR) olup, hem EGFR'ye hem de HER-4'e bağlanabilmektedir. Son grup ise neregulinleri (NRG) içermektedir ve kendi içinde ikiye ayrılmaktadır. NRG-1 ve NRG-2 hem HER-3 hem de HER-4'e bağlanırken; NRG-3 ve NRG-4 yalnızca HER-4'e bağlanabilmektedir (6). HER-2/neu'nun ise tanımlanmış bir ligandı bulunmamaktadır (8, 40, 41).



Şekil 7.1. EGFR ailesi ve özgül ligandları. Roskoski Jr. (28)'den alınmıştır.

Çoğu reseptör tirozin kinazın sinyal iletiminde, ilk basamak ligand tarafından uyarılan reseptör dimerizasyonudur. EGFR reseptörünün hücre dışı ligandı reseptöre gelip bağlandığında, reseptör homo ya da heterodimerizasyon formunu alır. Dimerize olan polipeptid zincirlerinin birbirlerini karşılıklı fosforillemesi reseptörün otofosforilasyonuna neden olur (8, 38, 42, 43). Bu fosforillenme ile sitoplazmik tirozin kinaz bölgeleri aktive olarak, hücre içi sinyalleri aktif reseptörden aşağı yöndeki moleküllere iletecek proteinler için bağlanma bölgesi oluşturmaktadır. Tirozin kinaz bölgeleriyle aşağı yöndeki proteinlerin bağlanması, Src Homoloji 2 (SH2) olarak adlandırılan ve fosfotirozin bağlanma bölgesi (PTB) içeren moleküller aracılığıyla gerçekleşir (6).

Reseptör tirozin kinaz aktivitesi hem normal hücre büyümesi hem de malign transformasyon ile ilişkili olup, tümör oluşumu ve gelişiminde, hücre proliferasyonunda ve apoptozisin inhibisyonunda önemli rol oynar (6).

Her bir ErbB reseptörünün hücre dışı bölgesi 4 altbölgeye sahiptir (I-IV). Altbölge I ve III (L1 ve L2 olarak da isimlendirilir) beta helikal bir katlanıma sahiptir ve bu ligandın bağlanabilmesi için oldukça önemlidir. Doğrudan reseptör-reseptör ilişkisi, altbölge II'deki dimerizasyon kolu ile düzenlenmektedir. EGFR'nin hücre dışı ligand bağlanma bölgesine EGF bağlandığında, EGFR dimerizasyon kolu reseptörden dışarıya çıkarak diğer reseptör ailesi üyeleriyle etkileşime girer ve dimer formunu almaya öncülük eder (6).

HER-2/neu'nun hücre dışı bölgesinin yapısı diğer aile üyelerinden farklıdır. HER-2/neu'nun dimerizasyon kolu, ligand bağlanmasıyla aktive olmuş bölgeye benzer bir konformasyona sahiptir (6, 28). Bu konformasyonda L1 ve L2 bölgeleri oldukça sıkı bir konumdadır ve bu ilişki ligand bağlanmasını mümkün kılmamaktadır. Bu durum HER-2/neu'nun neden ligandı olmadığını açıklamaktadır (6). HER-2/neu'nun bilinen bir ligandı bulunmadığından bir ko-reseptör gibi görev yaparak, diğer EGFR aile üyeleriyle heterodimer oluşturmaktadır (42, 43). Tüm protein kinazlar 2 bölgeye ayrılmaktadır: N ve C terminal. C kolu, bir başka protein kinazın N kolu ile etkileşime girerek, reseptör aktivasyonunu gerçekleştirir (41). HER-3'e ligandlar yüksek afinite ile bağlanmasına rağmen, kinaz bölgesindeki nokta mutasyonundan dolayı enzimatik olarak inaktiftir (41, 42). Bu nedenle HER-3 sinyal yollarını aktive edebilmek için HER-2/neu ile heterodimerizasyon yapmaya gerek duyar. HER-3 kinazının C kolu, HER-2/neu'nun N kolu ile etkileşime girerek kendi aktivasyonunu başlatır (41). HER-3'ün ifadelendiği meme, mesane ve diğer tümörlerde HER-2/neu'nun da ifadelendiği gösterilmiştir. Holbro ve ark. inaktif olmuş HER-2/neu'nun, HER-3'ün fosforilasyonunda azalmaya neden olduğunu göstermiştir (43).

Klinik verilere göre, EGFR ve HER-2/neu heterodimerinin de çeşitli kanserlerdeki rolü ispatlanmıştır (43). İn vitro çalışmalar, farklı reseptör dimerlerini çeşitli meme kanser hücre serilerinde malign fenotip ile ilişkilendirmiştir. EGFR-HER-2/neu, EGFR-HER-3 ve HER-2/neu-HER-3 kombinasyonları in vivo çalışmalarda da malign davranış ile ilişkilendirilmiştir. Kapsamlı literatür bilgilerine göre, EGFR ve HER-2/neu ko-ekspresyonunun, meme biyopsilerinde ve bazı klinik çalışmalarda daha agresif hastalıklar, kötü klinik gidiş ve yüksek tekrarılma riski ile korelasyon gösterdiği ispatlanmıştır (8). EGFR ve ligandları sıklıkla insan karsinomlarında ifadelanmaktadır. Bu proteinlerin çoğunun solid neoplazilerde aşırı ifadelendiği gösterilmiştir (6).

7.5. İnsan Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü 2 (HER-2/neu)

HER-2/neu, EGFR ailesinin bir üyesi olup kromozom 17q11.2-q12'de lokalizasyon göstermektedir. 38kb büyüklüğünde ve 27 ekzon kodlayan bir gendir. HER-2/neu, tirozin kinaz aktivitesine sahip 1.255 a.a.'lık bir transmembran glikoproteini (185 kDa, 185p) kodlamaktadır (9). Bu protein EGFR ile çarpıcı bir homoloji göstermektedir (6,30). Her-2/neu normal meme dokusunun büyüme ve gelişmesinde düzenleyici role sahiptir (8). ERBB2 veya c-erbB2 olarak bilinen HER-2/neu'nun amplifikasyonu, meme tümörlerinde en sık rastlanılan onkogen aktivasyonu olup, adenokarsinom türleri içerisinde en yaygın görülen türdür (44). HER-2/neu amplifikasyonu ya da aşırı ifadelenmesi meme kanserlerinin yaklaşık %25'inde görülmektedir ve kötü prognoz, endokrin tedaviye cevap vermeme ve metastatik fenotip ile ilişkilendirilmiştir (45).

HER-2/neu, diğer EGFR ailesi üyelerinden farklı olarak tanımlanmış bir liganda sahip değildir. Fonksiyonunu heterodimerize olduğu diğer aile üyeleri ile göstermektedir. Ligandının bulunmamasına rağmen reseptörün onkojenik formları sürekli dimerize olup, büyüme faktörü olmaksızın aktif halde kalarak hücrel transformasyona neden olabilmektedir (46). Onkojenik transformasyonda HER ailesinin üyeleri arasında homo ya da heterodimerizasyon dikkate alınmıştır. Özellikle HER ailesi üyeleri içerisinde EGFR ve HER-2/neu çok sayıda tümörün metastazı ve prognozuyla

ilişkilendirilmiştir. Transforme fenotip üzerine EGF'nin etkisi, EGFR ve HER-2/neu'nun NIH3T3 fibroblastlarında birlikte ifadelenmeleriyle gösterilmiştir (44).

HER-2/neu'nun transmembran (TM) bölgesi, dimerizasyon ve aktivasyonda aktif rolü oynamaktadır. Rat homologu olan neu'nun TM bölgesindeki nokta mutasyonu (Val-664-Glu), protein tirozin kinaz aktivitesini indüklemekte ve onkojenik transformasyona neden olmaktadır. Val-664 rezidüsü, TM segmentinin N terminalinde bulunan konsensus dizisi içerisinde bulunmaktadır ve bunun TM heliks dimerizasyonuna neden olduğu bilinmektedir (46).

7.6. Meme Kanseri ve HER-2/neu Polimorfizmi

2001 yılında insan genom projesinin tamamlanmasıyla iki insan genomu karşılaştırıldığında genomları arasında %99.9 benzerlik olduğu kanıtlanmıştır. Geriye kalan % 0.1'lik fark, tek nükleotit polimorfizmi (SNP) olarak bilinen ve bireysel genotip ve fenotipik değişikliklerin sorumlusudur (47, 48). Toplumda %1'den daha yüksek sıklıkta bulunan genetik çeşitlilik tipi ya da gen seçenekleri polimorfizm olarak tanımlanır (49).

İnsan genomunda en çok bulunan genetik çeşitlilik tipi, tek nükleotit polimorfizmleridir (48). İnsan genomunda her bin nükleotitde bir SNP bulunmaktadır (47). Polimorfizmlere mutasyonlardan daha sık rastlanır. Genetik polimorfizmler, tıpta bazı hastalıklara karşı duyarlılıkta kişisel farklılıkları belirlememizi sağlar. Bazı gen polimorfizmleri bir hastalık riskini arttırırken bazıları azaltabilmekte, bazı polimorfik alleller ise yalnızca çevresel bir faktörün etkisi altındayken riski etkileyebilmektedir (48).

Polimorfizm analizi, geleneksel olarak polimeraz zincir reaksiyonu bağlantılı restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi (PCR-RFLP) yöntemi ile yapılmaktadır. Bu yöntem, polimorfizmi ortaya çıkaran baz değişiminin bir restriksiyon enzimi için yeni bir kesim yeri ortaya çıkarması veya mevcut olan bir kesim yerini ortadan kaldırmasına bağlı olarak, polimeraz zincir reaksiyonu

ile çoğaltılan fragmentin enzim kesimi sonucunda normal durum ile polimorfik allel arasında uzunluk farklarının (veya polimorfizminin) izlenmesi esasına dayanır (50). Bu yöntemin dışında SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism), DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis), CCM (Chemical Cleavage of Mismatch), DNA dizi analizi ve DNA çipleri kullanılan diğer yöntemler arasındadır (47). Genomda binlerce aday polimorfik genin bulunması ve genomunda bu farklılıkları taşıyan kişilerin kanser gelişimine olan duyarlılıklarını etkileyebilecek olması pek çok araştırmacıyı bu çalışma alanına sürüklemektedir (48).

Rat homologu olan Val-664-Glu nokta mutasyonu insanda tanımlanmış olmasa da ortak bir genetik varyant, insan HER-2/neu'nun transmembran bölgesinin 655. kodonunda tanımlanmıştır (51). HER-2/neu geninin 655. kodonundaki transmembran kodlayan bölgesindeki tek nükleotid polimorfizmi (SNP) adeninin guanine dönüşümü (A/G, Ile/Val) sonucunda oluşmaktadır (10). Transmembran bölgesindeki bu a.a. değişimi sonucunda ya izolösin (Ile: ATC) ya da valin (Val: GTC) kodlanmaktadır ve HER-2/neu Val allelinin meme kanseri ile ilişkili olabileceği önerilmiştir (52).

İlk olarak rapor edilen Ile/Val tek nükleotid değişiminin artmış meme kanseri riski ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Xie ve ark. (52) 700 Çinli kadında yaptıkları çalışmada nadir allelleri (Val) taşıyan kadınlarda artmış bir risk olduğunu bildirmişlerdir. Buna rağmen, daha sonradan yapılan çalışmalarda bu ilişkinin çelişkili olduğu bildirilmiştir (9,11). Bu aykırı sonuçlara gerekçe olarak meme kanseri ile 655. kodon polimorfizmi arasındaki ilişkinin etnik gruplar arasında önemli farklılığının olabileceği öngörülmüştür (53).

Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda Asya'dan yalnızca, Çin ve Japon populasyonlarında Ile/Val polimorfizminin meme kanseri ile ilişkisi gösterilmiştir (53). HER-2/neu I655V polimorfizmi ile meme kanseri arasındaki ilişkiyi değerlendiren 6 çalışmada, 2'si bu ilişkiyi pozitif olarak geriye kalan 4'ü bu ilişkiyi negatif olarak bildirmiştir. Örneklerin karakterlerinin farklı olması bu

Çalışmaların yorumlanmasını zorlaştırmıştır. İlginç olan, pozitif ilişki bulunan 2 çalışmada, hastalık tanısı alan kadınların 45 yaşından küçük veya birinci derece akrabalarında kanser öyküsü bulunmasıdır (54). Meme kanseri gelişimi riski ile, Ile/Val SNP'i arasındaki pozitif korelasyonun hastalığın derecesi ile ilişkili olabileceği rapor edilse de, İngiliz ve Alman populasyonlarında bu SNP'nin meme kanseri ile ilişkisi bulunamamıştır (11).

Biz bu alışmamızda HER-2/neu polimorfizmini, PCR-RFLP yöntemi ile belirleyip, bu polimorfizmin meme kanseri ile ilişkisinin olup olmadığını araştırmayı planladık. nceki çalışmalardan farklı olarak klinik ve demografik özellikleri de birlikte değerlendirmeyi hedefledik.

8.GEREÇ VE YÖNTEM

8.1. Gereçler

8.1.1. Kullanılan Cihazlar:

1. Santrifüj Cihazı (Eppendorf)
2. Minisantrifüj (Costar)
3. Su Banyosu (Medingen W12)
4. Vorteks cihazı (Snijders)
5. Hassas terazi (Precisa 125A)
6. Termal Cycler (Applied Biosystems 2720)
7. Mikrodalga fırın (Arçelik)
8. Yatay elektroforez cihazı (Consort E815)
9. UV transillüminatör (Herolab)
10. Kamera (Polaroid GelCam)
11. Manyetik karıştırıcı (SBS)
12. Mikropipetler (1-10µl, 10-100 µl, 100-1000 µl skalasında) (Eppendorf)
13. Mikropipet uçları (1-10µl, 10-100 µl, 100-1000 µl skalasında) (Greiner bio-one)
14. 1.5 - 2.0 ml kapaklı eppendorf tüpü (Greiner bio-one)
15. 0.2 µl ince cidarlı steril PCR tüpleri (Greiner bio-one)
16. Buzdolabı (Arçelik)
17. Derin dondurucu (Arçelik)
18. Yatay jel elektroforez tankı (Consort E815)
19. Dikey jel elektroforez tankı (Biorad)
20. Güç kaynağı (Consort)

21. 0,22 µm çapında filtre (Sartorius)
22. Spektrofotometre (Eppendorf)
23. Spektrofotometre küveti (Eppendorf)

8.1.2. Kullanılan Kimyasallar:

1. DNA izolasyon kiti (Macherey-Nagel Nucleospin Tissue)
2. Primer sentezleri (AlphaDNA)
3. Hot Star Taq DNA polimeraz (Qiagen)
4. PCR tamponu (Qiagen)
5. MgCl₂ (Qiagen)
6. dNTP (10X)= Her bir deoksiribonkleotidden (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) 10 mM (Fermentas)
7. BsmA I Restriksiyon Endonükleaz (Fermentas)
8. Agaroz (Sigma)
9. High Resolution Agaroz (Sigma)
10. Etidyum Bromür (EtBr)
11. 50 baz çifti (b..) moleküler ağırlık belirteci (Fermentas)
12. Ksilen (Merck)
13. Etanol (Merck)
14. Acrylamide (Sigma)
15. Bisacrylamide (Sigma)
16. TEMED (Sigma)
17. Amonyum persülfat (Sigma)
18. Sigmacote (Sigma)

8.1.3. Kullanılan Tamponlar ve çözeltiler

Elektroforez çözeltileri ve tamponları

Agaroz:

%2'lik:

2 g agaroz

100 ml 0.5X TBE içinde mikrodalga fırında kaynatılarak eritildi

High Resolution Agaroz:

%2'lik:

2 gr high resolution agaroz

100 ml 0.5X TBE içinde mikrodalga fırında kaynatılarak eritildi

Poliakrilamid (%30):

Akrilamid 29 g

Poliakrilamid 1 g

Distile su (toplam hacim 100 ml) hazırlandıktan sonra 0.22 µm
çapında filtre ile süzüldü

Amonyum persülfat:

%10' luk çözelti hazırlamak üzere 0.028 g amonyum persülfat

280µl distile suda çözüldü

%12lik Poliakrilamid hazırlanışı:

16 ml %30'luk poliakrilamid

4 ml 5 X TBE

0.280 ml %10 amonyum persülfat

35 µl TEMED

Distile su ile 40 ml'ye tamamlandı

TBE tamponu (10X) = 108 g Tris baz

55 g Borik asit

9.3 g EDTA

Toplam hacim distile su ile 1 000 ml'ye tamamlandı

TBE tamponu (0.5X) = 50 ml 10X TBE tamponu

Toplam hacim distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı

Yükleme tamponu = %0.25 akridin turuncusu

%40 (w/v) süktroz

Etidyum bromür = 10 mg/ml olacak şekilde distile suda çözöldü

8.2. Yöntem

1994-2001 yılları arasında mastektomi/aksiller diseksiyon uygulanmış meme karsinomu olgularına ait 58 adet parafin blok doku kesiti ve normal meme dokusuna sahip bireylere ait 55 adet parafin blok doku kesiti kullanılarak çalışmamız yürütüldü.

Çalışmaya alınan hasta ve kontrol grubundaki bireylere ait parafin blok doku kesitleri Patoloji Anabilim dalında hazırlandı. Her olgudan 20 µm kalınlıkta en az bir adet kesit alındı ve Anabilim Dalımız Moleküler Biyoloji ve Genetik laboratuvarına gönderildi.

8.2.1. Parafin Blok Doku Kesitlerinden DNA İzolasyonu

Meme parafin blok doku kesitlerinden hazırlanan 20 µm kalınlıktaki örnek kesitlerden parafin dokusuna özel DNA izolasyon kiti (Macherey-Nagel Nucleospin Tissue) kullanılarak DNA eldesi gerçekleştirildi.

Deparafinizasyon:

1. 1.5 ml'lik ependorf tüpü içindeki her bir örneğe 1ml ksilen konulup vorteks ile karıştırılarak oda sıcaklığında 30 dakika bekletildi. Süre sonunda ksilen içerisindeki örnek karıştırılarak deparafinizasyon işleminin tamamlanıp tamamlanmadığı kontrol edildi. Parafinin tümüyle uzaklaştırılamadığı durumlarda ksilende bekletme işlemi 30-45 dakika daha uzatılarak parafinin dokudan tümüyle uzaklaşması sağlandı.
2. Örnekler 13000 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi tüpün dibinde oluşan çökeltiye zarar verilmeden oluşan süpernatant uzaklaştırıldı ve yıkama işlemi başlatıldı.
3. Tüplere 1 ml %96 etanol eklendi ve altüst ederek karıştırıldı. 13000 rpm'de 3 dakika santrifüj edilip üst faz atıldı.

4. Etanolle yıkama işlemi tekrar edildi ve santrifüjden sonra etanol mümkün olduğunca uzaklaştırıldı. Etanol etanol tamamen uçuncaya kadar (yaklaşık 25 dakika) tüpler 37°C'de kapakları açık bir şekilde kurutuldu.

Proteinaz K İnkübasyonu

Etanolün uzaklaştırılmasından sonra prelizis aşamasına geçildi.

1. Bu amaçla tüplere 180 µl T1 tamponu ve 25 µl proteinaz K (30mg/1.5ml Proteinaz buffer) eklenerek vortekslendi.
2. Örnekler 1-3 saat 56°C su banyosunda inkübe edildi. İnkübasyon esnasında örnekler arada bir vortekslendi.
3. Süre sonunda örnekler karıştırılarak 200 µl B3 tamponu eklendi kuvvetli bir şekilde vorteks yapılarak 10 dakika 70°C su banyosunda inkübasyona bırakıldı.
4. İnkübasyon işlemi tamamlandıktan sonra örneklere 210 µl %96 etanol eklenerek kuvvetlice karıştırıldı.
5. Her bir örnek için 2 ml' lik toplama tüpü hazırlanarak kolonlar toplama tüplerine yerleştirildi. Örnekler kolona transfer edildi. 1 dakika 13000 rpm'de santrifüj edilerek süzülen çökelti atıldı ve kolonlar boş toplama tüplerine alındı.
6. Ardından yıkama işlemine geçildi. 500 µl BW tamponu kolona eklenerek 1 dakika 13000 rpm'de santrifüj edildi, süzüntü atılarak kolon boş toplama tüpüne alındı.

7. Kolona 600 µl B5 tamponu konularak 1 dakika 13000 rpm’de santrifüj edildi ve süzülen kısım atıldı. Etanolü tamamen uzaklaştırmak için 1 dakika 13000 rpm’de santrifüj edildi.
8. Kolon 1.5 ml’lik mikrosantrifüj tüpüne alınarak 100 µl daha önceden 70°C’ lik su banyosunda bekletilmiş elution tampon BE eklendi ve 1 dakika oda ısısında inkübe edildi. İnkübasyon sonunda kolon 1 dakika 13000 rpm’de santrifüj edildi ve bu şekilde parafine gömülmüş meme biyopsi örneklerinden DNA eldesi işlemi tamamlandı.

8.2.2. PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

HER-2/neu geni, izolasyon sonucu elde edilen DNA örneklerinden HER-2/neu genine özgü primerler kullanılarak in house PCR yöntemi ile çoğaltıldı.

PCR Bileşenleri:

PCR tamponu: 1 X

Q tamponu: 0.5 X

MgCl₂: 3 mM

Primer Forward: 0.2 nM

Primer Reverse: 0.2 nM

dNTP: 0.4 mM

Hot Star Taq Polimeraz: 1 U

DNA örneği: 50 ng

Son hacim steril distile su ile 50 µl’ye tamamlandı.

HER-2/neu genine özgü primerler:

Forward: 5'-CCAGCCCTCTGACGTCCAT-3'

Reverse: 5'-TCCGTTTCCTGCAGCAGTCTCCGCA-3'

PCR koşulları;

95°C 15 dakika

94°C 1 dakika

58°C 1 dakika

72°C 1 dakika

72°C 10 dakika

} 35 döngü

8.2.3. RFLP (Restriksiyon Fragmenti Uzunluk Polimorfizmi)

PCR sonrası amplifikasyon bandı görülen DNA örnekleri restriksiyon endonükleazı ile kesildi. Bunun için 5-15 µl amplifikasyon ürünü üzerine 5 U Bsm AI restriksiyon enzimi ve 1X tampon eklendikten sonra enzim kesimi için 37°C' de gece boyu (>16 saat) su banyosunda inkübe edildi.

8.2.4. PCR Ürünlerinin Görüntülenmesi ve Değerlendirilmesi

Elde edilen PCR ürünleri %2'lik agaroz jel elektroforezi (90 voltta 1 saat), enzim kesimleri %2'lik High Resolution agaroz jel elektroforezi (90 voltta 2 saat) ve %12'lik poliakrilamid jel elektroforezinde (270 voltta 3 saat) yürütülerek jeller UV transillüminatörde görüntülendi. Fotoğrafı çekildi. HER-2/neu geni 655. kodon tek nükleotid (Ile→Val, A→G) polimorfizmi PCR ve RFLP yöntemi kullanılarak belirlendi. Gene özgü primerler kullanılarak 145 b.ç. uzunluğunda PCR ürünü çoğaltıldı. Bsm AI restriksiyon enzimi ile yapılan enzim kesimi sonucunda jel görüntüleme sistemi kullanılarak genotipler belirlendi. 119 ve 26 b.ç.'lik PCR ürünleri Ile/Ile (AA) genotipi, 119, 89 ve 30 b.ç.'lik PCR ürünleri

Ile/Val (AG) genotipi ve 89 ve 30 b.ç.'lik PCR ürünleri Val/Val (GG) genotipi olarak belirlendi.

8.2.5. İstatistiksel Analiz

Verilerin analizi SPSS 11.5 (Statistical Package for Social Sciences, SPSS Inc., Chicago, IL, United States) paket programında yapıldı. Tanımlayıcı istatistikler sürekli veriler için ortalama $\pm$ standart sapma, kategorik veriler içinse gözlem sayısı (n) ve (%) olarak ifade edildi. Veri seti Fisher'in Exact Olasılık testi ile analiz edildi. Meme kanseri üzerinde etkili olabileceği düşünülen polimorfizme ilişkin %95 güven aralıkları ve anlamlılık düzeyleri hesaplandı. $p < 0.05$ için sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. 46 yaşın altında saptanan meme kanseri erken yaşta başlayan meme kanseri olarak tanımlanmakta olup, klinik takipte önem taşıdığından değerlendirme 46 yaş ve altı ile 46 yaş üstü olarak yapıldı (55).

9. BULGULAR

Demografik ve Klinik Bulgular:

Çalışmamızda raporları ve dosyaları taranan, patolojik olarak meme kanseri tanısı almış, yaşları 38 ile 94 arasında değişen toplam 58 kadın olgu ve yaşları 15 ile 81 arasında değişen 55 kadın kontrol bireyine ait parafin doku blok kesitleri çalışma kapsamına alındı. Çalışmaya dahil edilen olguların demografik ve klinik özellikleri Tablo 9.1.'de görülmektedir.

Tablo 9.1. Olgulara ilişkin demografik ve klinik özellikler

Medyan yaş (Aralık) 62.5 ±13.2 (38-94)	Olgu sayısı (n)	Yüzdesi (%)
Yaş ≤46	5	8.6
Yaş >46	53	91.4
Menopoz durumu		
Premenopoz	16	27.6
Postmenopoz	36	62.1
Bilinmeyen	6	10.3
Aile Öyküsü		
Pozitif	8	13.8
Negatif	44	75.9
Bilinmeyen	6	10.3
Toplam	58	100

Medyan yaş 62.5 (aralık 38-94) olup, olgularımızın 5 tanesi (%8.6) 46 yaş ve altında, 53 tanesi (%91.4) 46 yaş üzerinde idi. Olguların 16'sı (%27.6) premenopozal, 36'sı (%62.1) postmenopozal olarak belirlendi. Olguların 8'inde (%13.8) pozitif aile öyküsü, 44'ünde (%75.9) negatif aile öyküsü vardı.

Çalışılan 58 olguda tümöre ait genel özellikler Tablo 9.2.'de görülmektedir.

Tablo 9.2. Olgulara ait tümörlerin genel özellikleri

OLGU NO	TÜMÖR BOYUTU	TÜMÖR YERLEŞİMİ	LOKAL NÜKS	UZAK METASTAZ	AKSİLLER LENF NODU	HİSTOLOJİK TİP
1	4x2 cm	Sağ meme	-	-	+	İnvaziv Duktal Karsinom
2	6 cm	Sol meme	+	-	+	İnvaziv Duktal Karsinom
3	1,8x0,8 cm	Sol meme	-	-	-	İnvaziv Duktal Karsinom
4	3,7 cm	Sağ meme	+	+	+	İnvaziv Duktal Karsinom
5	1,5x1 cm	Sağ meme	-	+	-	İnvaziv Duktal Karsinom
6	1x0,8 cm	Sağ meme	-	-	-	İnvaziv Duktal Karsinom
7	1,5x1,5 cm	Sol meme	-	-	-	İnvaziv Medüller Karsinom
8	Bilinmiyor	Sol meme	Bilinmiyor	Bilinmiyor	Bilinmiyor	İnvaziv Duktal Karsinom
9	2 cm	Sağ meme	-	-	-	İntraduktal Karsinom
10	1x0,5 cm	Sol meme	-	-	+	İnvaziv Müsinöz Karsinom
11	1,2x0,6 cm	Sol meme	-	-	+	Taşlı Yüzük Hücreli Karsinom
12	1,3x1 cm	Sağ meme	+	+	+	İnvaziv Duktal Karsinom
13	0,8x0,6 cm	Sol meme	-	-	-	İnvaziv Lobüler Karsinom
14	0,5 cm	Sol meme	-	-	-	İnvaziv Duktal Karsinom
15	3x2,5 cm	Sol meme	-	-	+	İnvaziv Duktal Karsinom
16	1x0,7 cm	Sağ meme	-	-	-	İnvaziv Lobüler Karsinom
17	1,2x2 cm	Sol meme	-	-	-	İnvaziv Duktal Karsinom
18	Bilinmiyor	Sol meme	Bilinmiyor	Bilinmiyor	Bilinmiyor	İnvaziv Duktal Karsinom
19	1,5x1,2 cm	Sağ meme	-	-	-	İnvaziv Müsinöz Karsinom
20	1x0,4cm	Sol meme	-	-	-	İnvaziv Duktal Karsinom
21	5,2x2,7 cm	Sağ meme	+	-	+	İnvaziv Duktal Karsinom
22	2,5x2 cm	Sağ meme	-	-	+	İnvaziv Duktal Karsinom
23	1,7x0,5 cm	Sağ meme	-	-	+	İnvaziv Lobüler Karsinom
24	0,7x0,8 cm	Sağ meme	-	-	-	İnvaziv Duktal Karsinom
25	2 cm	Sol meme	Bilinmiyor	Bilinmiyor	Bilinmiyor	İntraduktal Karsinom
26	1x5 cm	Sağ meme	-	-	-	İnvaziv Duktal Karsinom
27	Bilinmiyor	Sol meme	Bilinmiyor	Bilinmiyor	Bilinmiyor	İnvaziv Duktal Karsinom
28	1,3x0,4 cm	Sol meme	-	-	-	İnvaziv Duktal Karsinom
29	1,6x0,5 cm	Sağ meme	-	-	-	İnvaziv Lobüler Karsinom
30	2x1,5 cm	Sol meme	-	-	+	İnvaziv Duktal Karsinom
31	1,1x0,9 cm	Sağ meme	-	-	-	İnvaziv Duktal Karsinom
32	0,7x0,5 cm	Sağ meme	Bilinmiyor	Bilinmiyor	Bilinmiyor	İnvaziv Duktal Karsinom
33	2x1 cm	Sol meme	+	-	+	İnvaziv Duktal Karsinom
34	1,5x1 cm	Sol meme	-	-	+	İnvaziv Duktal Karsinom
35	0,3 cm	Sol meme	-	-	+	İnvaziv Duktal Karsinom
36	1,5x0,7 cm	Sağ meme	-	-	-	İnvaziv Duktal Karsinom
37	3,5x0,8 cm	Sağ meme	-	-	-	İnvaziv Duktal Karsinom
38	1,7x1,3 cm	Sağ meme	Bilinmiyor	Bilinmiyor	-	Mikst Karsinom
39	2,5x1,5 cm	Sağ meme	-	-	-	İnvaziv Duktal Karsinom
40	1,7 cm	Sol meme	-	-	+	İnvaziv Duktal Karsinom
41	4x3 cm	Sol meme	-	-	-	İntraduktal Karsinom
42	0,8 cm	Sol meme	-	-	-	İnvaziv Duktal Karsinom
43	3x2,5 cm	Sol meme	-	-	+	Mikst Karsinom
44	2x1,5 cm	Sol meme	-	-	+	İnvaziv Duktal Karsinom
45	2,5x1,5 cm	Sağ meme	-	-	-	İnvaziv Duktal Karsinom
46	2x1,5 cm	Sağ meme	-	+	+	İnvaziv Lobüler Karsinom
47	3x3 cm	Sol meme	-	-	-	İnvaziv Duktal Karsinom
48	2x1,5 cm	Sol meme	-	-	-	İnvaziv Duktal Karsinom
49	1,7 cm	Sol meme	-	-	-	İnvaziv Duktal Karsinom
50	1,5 cm	Sağ meme	-	-	-	İnvaziv Duktal Karsinom
51	1,2 cm	Sol meme	-	-	-	İnvaziv Duktal Karsinom
52	2 cm	Sağ meme	-	-	-	İnvaziv Duktal Karsinom
53	1,5 cm	Sağ meme	-	-	+	İnvaziv Duktal Karsinom
54	5	Sol meme	-	+	-	İnvaziv Duktal Karsinom
55	2,5	Sağ meme	-	-	-	İnvaziv Duktal Karsinom
56	1,3	Sol meme	-	-	-	İnvaziv Duktal Karsinom
57	2	Sağ meme	-	-	-	İnvaziv Duktal Karsinom
58	2,5	Sol meme	-	-	-	İnvaziv Duktal Karsinom

Olgularımızda tümör çapı 0.3-6 cm arasında değişmekte idi. 31 olguda (%53.4) tümör sol, 27 olguda (%46.6) sağ meme yerleşimli olarak belirlendi.

Lokal nüksün olguların 5'inde (%8.6), uzak metastazın da olguların 5'inde (%8.6) geliştiği belirlendi.

Olguların 19'unda (%32.8) aksiller lenf nodu metastazı olduğu belirlendi.

En sık tümör histolojisi, 44 olguda (%75.8) saptanan invaziv duktal karsinom olarak gözlendi. 5 olguda (%8.8) invaziv lobüler karsinom, 3 olguda (%5.2) intraduktal karsinom (DCIS-Duktal Karsinoma in situ), 2 olguda (%3.4) invaziv müsinöz karsinom, 2 olguda (%3.4) mikst karsinom, 1 olguda (%1.7) invaziv medüller karsinom ve 1 olguda (%1.7) taşlı yüzük hücreli karsinom saptandı.

Östrojen ve progesteron reseptörünün 45 olguda analiz edildiği belirlendi. Östrojen reseptörü, 31 olguda (%68.9) pozitif, 14 olguda (%31.1) negatif bulunmuştu. Progesteron reseptörü, 27 olguda (%60) pozitif, 18 olguda (%40) negatif olarak belirlenmişti (Tablo 9.3.).

Tablo 9.3. ER ve PR analizi yapılan 45 olgudaki dağılım

ER ve PR Durumu	Olgu sayısı (n)	Yüzdesi (%)
<i>ER Pozitif</i>	31	68.9
<i>ER Negatif</i>	14	31.1
Toplam	45	100
<i>PR Pozitif</i>	27	60
<i>PR Negatif</i>	18	40
Toplam	45	100

İmmünohistokimyasal yöntemle c-erbB2'nin 14 olguda analiz edildiği belirlendi. 14 olgunun 12'si negatif, 2'si pozitif olarak rapor edilmişti.

Cerrahi müdahale olarak, olguların 29 (%50) tanesine parsiyel mastektomi ve aksilla diseksiyonu, 8 (%13.8) tanesine simple mastektomi, 3 (%5.2) tanesine simple mastektomi ve aksilla diseksiyonu ve 10 (%17.2) tanesine radikal mastektomi ve aksilla diseksiyonu uygulandığı belirlendi (Tablo 9.4.).

Tablo 9.4. Cerrahi tedavinin çeşidine göre olgu sayısı ve yüzdesi

Cerrahi Tedavi	Olgu sayısı (n)	Yüzdesi (%)
<i>Parsiyel Mastektomi+Aksilla Diseksiyonu</i>	29	50
<i>Simple Mastektomi</i>	8	13.8
<i>Simple Mastektomi+Aksilla Diseksiyonu</i>	3	5.2
<i>Radikal Mastektomi+Aksilla Diseksiyonu</i>	10	17.2
<i>Bilinmeyen</i>	8	13.8
Toplam	58	100

Hormon tedavisi 6 olguya (%10.3) uygulanmıştı, 46 olguya (%79.3) hormon tedavisi uygulanmamıştı. Kemoterapi, 29 olguya (%50) uygulanırken, 23 olguya (%39.7) uygulanmamıştı. 6 olgu için uygulanan tedavi yöntemlerine ilişkin bilgiye ulaşılamadı (Tablo 9.5.).

Tablo 9.5. Hormon tedavisi ve kemoterapiye göre olgu sayısı ve yüzdesi

Hormon Tedavisi	Olgu sayısı (n)	Yüzdesi (%)
<i>Alan</i>	6	10.3
<i>Almayan</i>	46	79.3
<i>Bilinmeyen</i>	6	10.3
Kemoterapi		
<i>Alan</i>	29	50
<i>Almayan</i>	23	39.7
<i>Bilinmeyen</i>	6	10.3
Toplam	58	100

Kontrol grubuna dahil edilen 55 bireyin yaşları 15-81 arasında değişmekte idi, kontrol grubunun demografik ve klinik özellikleri Tablo 9.6.'da görülmektedir.

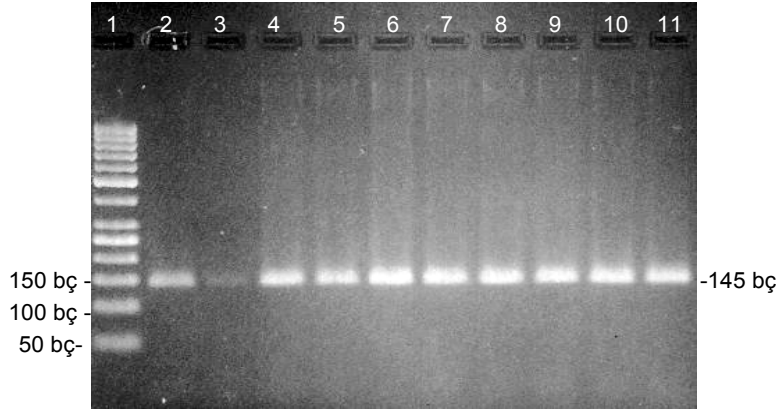
Tablo 9.6. Kontrol grubunun demografik ve klinik özellikleri

Medyan yaş (Aralık) 44.7 ±14.9 (15-81)	Olgu sayısı (n)	Yüzdesi (%)
Yaş ≤ 46	24	43.6
Yaş >46	31	56.4
Histopatolojik tanı		
Fibrokistik değişiklik	45	81.8
Fibroadenom	10	18.2
Toplam	55	100

Medyan yaş 44.7 (aralık 15-81) olup, 46 yaş ve altında 24 (%43.6) ve 46 yaşından büyük 31 (%56.4) birey olduğu belirlendi. Bireylerin 45'ine (%81.8) histopatolojik incelemede fibrokistik değişiklik, 10'una (%18.2) fibroadenom tanısı konulduğu belirlendi.

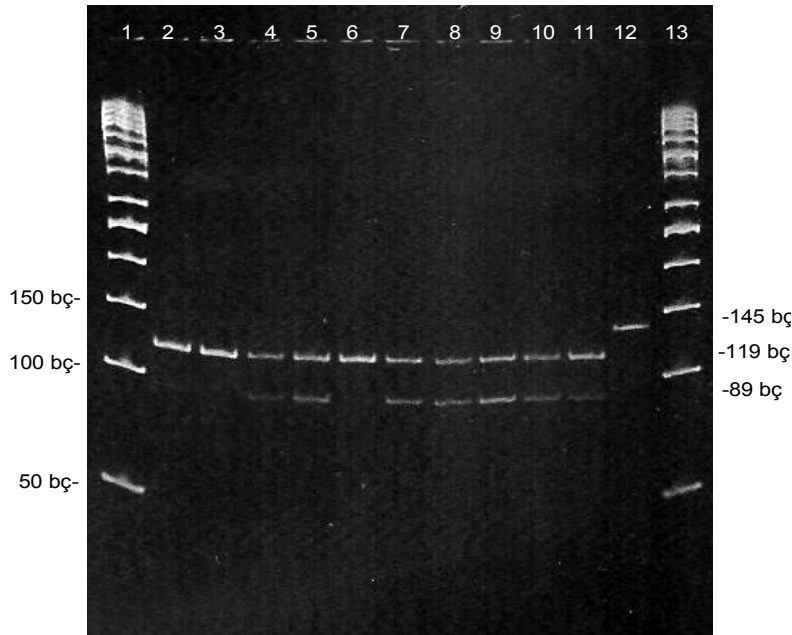
PCR-RFLP Analiz Bulguları:

HER-2/neu genine özgü primerler ile belirtilen koşullarda gerçekleştirilen PCR'yi takiben yapılan RFLP sonucunda elde edilen ürünler PAGE'de yürütüldü. Elektroforez sonrası çekilen jel fotoğrafının incelenmesi sonucunda HER-2/neu gen ürünü 145 b.ç. uzunluğunda, Ile/Ile yabanıl tip genotipine (AA) sahip bireylerde 119 b.ç. ve 26 b.ç., Ile/Val (AG) genotipine sahip bireylerde 119 b.ç., 89 b.ç. ve 30 b.ç., Val/Val genotipli (GG) bireylerde ise 89 b.ç. ve 30 b.ç. uzunluğunda ürünler gözlemlendi. Elde edilen jel fotoğrafları Şekil 9.1-9.4'de görülmektedir.



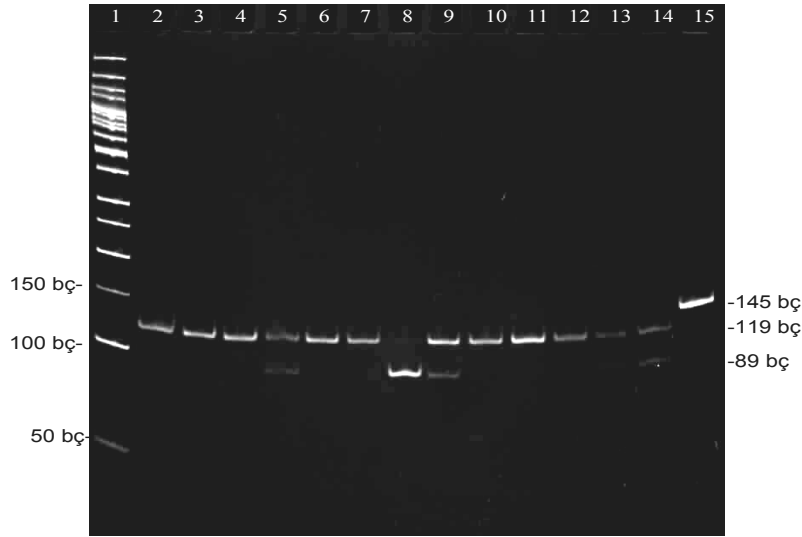
Şekil 9.1. Hasta ve kontrol grubuna ait HER-2/neu geni PCR ürününün High Resolution Agaroz jel görüntüsü

1. kuyu: 50 b.ç. DNA molekül ağırlık belirteci
2-11. kuyular: 145 b.ç.'lik HER-2/neu geni PCR ürünü



Şekil 9.2. Hasta grubuna ait 145 b.ç.'lik HER-2/neu geni PCR ürününün RFLP analiz PAGE görüntüsü

- 1,13. kuyular: 50 b.ç. DNA molekül ağırlık belirteci
2,3,6. kuyular: Ile/Ile yabanıl tip genotipine sahip olgular
4,5,7-11. kuyular: Ile/Val genotipine sahip olgular
12. kuyu: Enzim kesimi yapılmayan PCR ürünü



Şekil 9.3. Hasta ve kontrol grubuna ait 145 b.ç.'lik HER-2/neu geni PCR ürününün RFLP analiz PAGE görüntüsü

- 1.kuyu: 50 b.ç. DNA molekül ağırlık belirteci
- 2-4,6,7.kuyular: Ile/Ile yabanıl tip genotipine sahip olgular
- 5. kuyu: Ile/Val genotipine sahip olgu
- 8. kuyu: Val/Val genotipine sahip kontrol bireyi
- 9, 14. kuyular: Ile/Val genotipine sahip kontrol bireyi
- 10-13. kuyular: Ile/Ile yabanıl tip genotipine sahip kontrol bireyleri
- 15. kuyu: Enzim kesimi yapılmayan PCR ürünü



Sekil 9.4. Kontrol grubuna ait 145 b.ç.'lik HER-2/neu geni PCR ürününün RFLP analiz PAGE görüntüsü

- 1. kuyu: 50 b.ç. DNA molekül ağırlık belirteci
- 2-6. kuyular: Ile/Val genotipine sahip bireyler
- 7-14. kuyular: Ile/Ile yabanıl tip genotipine sahip bireyler
- 15. kuyu: Enzim kesimi yapılmayan PCR ürünü

Olgulara uygulanan PCR-RFLP yöntemi sonrası genotip bulguları değerlendirildiğinde 58 olgunun 14'ünde (%24.1), 55 kontrol bireyinin 18'inde (%32.7) HER-2/neu Ile655Val polimorfizmi olduğu saptandı. Ile/Ile genotipi olgulardan 44 tanesinde (%75.9), Ile/Val genotipi olgulardan 14 tanesinde (%24.1) saptanırken, Val/Val genotipine olgularda hiç rastlanmadı. Kontrol grubunda Ile/Ile genotipi 37 (%67.3), Ile/Val genotipi 17 bireyde (%30.9) saptanırken Val/Val genotipi 1 (%1.8) bireyde saptandı. Allel frekansları Ile alleli için hasta grubunda %87.9, kontrol grubunda %82.7 ve Val alleli için ise hasta grubunda %12.1, kontrol grubunda %17.3 olarak belirlendi. Hasta ve kontrol grubunda HER-2/neu genotip ve allel sıklıkları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı (p:0.332; 0.346). Elde edilen sonuçlar Tablo 9.7.'de görülmektedir.

Tablo 9.7. Meme kanserli hasta ve kontrol grubunda HER-2/neu genotip ve allel sıklıklarının dağılımı

HER-2/neu Kodon 655	HER-2/neu Genotipleri (%)			p*	Allel Sayısı	HER-2/neu Allelleri (%)		p*
	Ile/Ile (AA)	Ile/Val (AG)	Val/Val (GG)			Ile (A)	Val (G)	
Hasta Grubu	44 (%75.9)	14 (%24.1)	-	0.332	116	102 (%87.9)	14 (%12.1)	0.346
Kontrol Grubu	37 (%67.3)	17 (%30.9)	1 (%1.8)		110	91 (%82.7)	19 (%17.3)	

* p<0.05 değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi

Hasta ve kontrol grubu yaşa göre karşılaştırıldığında, hasta grubunda 46 yaş ve altı 5 olgu içerisinde 1'inde (%20) Ile/Val genotipi saptanırken, kontrol grubundaki 23 bireyden Ile/Val genotipine sahip 7 (%30.4), Val/Val genotipine sahip 1 (%4.4) birey saptandı. 46 yaşından büyük kadınlar içerisinde hasta ve kontrol grubunda sırasıyla Ile/Val genotipinde 13 (%24.5) olgu ve 10 (%31.2) birey saptandı. 46 yaş ve altındaki hasta ve kontrol grubunda Ile allel sıklığı sırasıyla %99, %80.4; Val allel sıklığı %10, %19.6 olarak, 46 yaşından büyük hasta ve kontrol grubunda Ile allel sıklığı %87.7, %84.4; Val allel sıklığı %12.3, %15.6 olarak belirlendi. 46 yaş ve altı kadınlarda; hasta grubu ile kontrol

grubunun HER-2/neu genotip ve allel sıklığı dağılımı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı (p:0.708; 0.670). 46 yaşından büyük kadınlarda da; hasta grubu ile kontrol grubunun HER-2/neu genotip ve allel sıklığı dağılımı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı (p:0.615; 0.644) (Tablo 9.8.).

Tablo 9.8. Yaşa göre HER-2/neu genotip ve allel sıklıklarının dağılımı

Yaş	Olgu sayısı (%)		p*	HER-2/neu Allelleri				p*	
				Hasta		Kontrol			
≤ 46	Hasta	Kontrol	0.708	Ile (%)	Val (%)	Ile (%)	Val (%)	0.670	
Ile/Ile	4 (80)	15 (65.2)		0.615	93 (87.7)	13 (12.3)	54 (84.4)		10 (15.6)
Ile/Val	1 (20)	7 (30.4)							
Val/Val	-	1 (4.4)							
> 46									
Ile/Ile	40 (75.5)	22 (68.8)	0.615	93 (87.7)	13 (12.3)	54 (84.4)	10 (15.6)	0.644	
Ile/Val	13 (24.5)	10 (31.2)							
Val/Val	-	-							
Toplam	58 (100)	55 (100)		116		110			

* p<0.05 değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi

Premenopozal ve postmenopozal durum karşılaştırıldığında, premenopozal meme kanseri saptanan olguların 3'ü (%18.7) Ile/Val genotipine sahipken, postmenopozal meme kanseri saptanan olguların 11'inin (%30.6) Ile/Val genotipine sahip olduğu belirlendi. Premenopozal ve postmenopozal grupta Ile allelinin sıklığı sırasıyla %90.6, %84.7; Val allelinin sıklığı %9.4, %15.3 olarak belirlendi. Premenopozal kadınlar ile postmenopozal kadınların HER-2/neu genotip ve allel sıklığı dağılımı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı (p:0.506; 0.546) (Tablo 9.9.).

Tablo 9.9. Menopozal duruma göre HER-2/neu genotip ve allel sıklıklarının dağılımı

Premenopozal Kadınlar	Olgu sayısı (n)	Yüzdesi (%)	p*	HER-2/neu Allelleri		p*	
				Ile (%)	Val (%)		
Ile/Ile	13	81.3	0.506	29 (90.6)	3 (9.4)	0.542	
Ile/Val	3	18.7					
Val/Val	-	-					
Postmenopozal Kadınlar							
Ile/Ile	25	69.4		61 (84.7)	11 (15.3)		
Ile/Val	11	30.6					
Val/Val	-	-					
Bilinmeyen	6						
Toplam	58	100					

* p<0.05 değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi

Pozitif aile öyküsüne sahip 8 olgunun hepsi de (%100) Ile/Ile genotipine sahipken, Ile/Val genotipine sahip olgu saptanmadı. Pozitif aile öyküsü bulunmayan 30 olgu (%68.2) Ile/Ile genotipine sahipken, 14 olgunun (%31.8) Ile/Val genotipine sahip olduğu belirlendi. Pozitif aile öyküsü bulunan olgularda Ile allelinin sıklığı %100 iken Val alleleline hiç rastlanmadı. Negatif aile öyküsü bulunan olgularda Ile ve Val allellerinin sıklığı sırasıyla %84.1, %15.9 olarak belirlendi. Pozitif aile öyküsü bulunan olgular ile negatif aile öyküsü bulunan olguların HER-2/neu genotip ve allel sıklığı dağılımı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı (p:0.090; 0.120) (Tablo 9.10.).

Tablo 9.10. Aile öyküsüne göre HER-2/neu genotip ve allel sıklıklarının dağılımı

	Olgu sayısı (n)	Yüzdesi (%)	p*	HER2 Allelleri		p*
Pozitif aile öyküsü			0.090	Ile (%)	Val (%)	0.120
Ile/Ile	8	100		16 (100)	-	
Ile/Val	-	-				
Val/Val	-	-				
Negatif aile öyküsü						
Ile/Ile	30	68.2		74 (84.1)	14 (15.9)	
Ile/Val	14	31.8				
Val/Val	-	-				
Bilinmeyen	6					
Toplam	58	100				

*p<0.05 değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi

Aksiller lenf nodu metastazı bulunan olguların 13'ünde (%68.4) Ile/Ile genotipi, 6'sında (%31.6) Ile/Val genotipi saptandı. Aksiller lenf nodu metastazı bulunmayan olgular içerisinde 26'sının (%76.5) Ile/Ile genotipine, 8'inin (%23.5) Ile/Val genotipine sahip olduğu belirlendi. Aksiller lenf nodu metastazı bulunan olgularda Ile ve Val allellerinin sıklığı sırasıyla %84.2, %15.8; aksiler lenf nodu metastazı negatif olgularda Ile ve Val allellerinin sıklığı %88.2, %11.8 olarak belirlendi. Aksiler lenf nodu metastazı pozitif olgular ile negatif olguların HER-2/neu genotip ve allel sıklığı dağılımı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı (p:0.535; 0.563) (Tablo 9.11.).

Tablo 9.11. Aksiller lenf nodu metastazına göre HER-2/neu genotip ve allel sıklıklarının dağılımı

	Olgu sayısı (n)	Yüzdesi (%)	p*	HER-2/neu Allelleri		p*
Aksiller Lenf Nodu Metastazı Pozitif			0.535	Ile (%)	Val (%)	0.563
Ile/Ile	13	68.4				
Ile/Val	6	31.6		32 (84.2)	6 (15.8)	
Val/Val	-	-				
Aksiller Lenf Nodu Metastazı Negatif						
Ile/Ile	26	76.5				
Ile/Val	8	23.5		60 (88.2)	8 (11.8)	
Val/Val	-	-				
Bilinmeyen	5					
Toplam	58	100				

* p<0.05 değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi

Uzak metastazı bulunan 5 olgunun 2'sinin (%40) Ile/Val genotipine sahip olduğu belirlendi. Lokal nüksü bulunan 5 olgudan Ile/Val genotipine sahip 3 olgu (%60) saptandı.

58 meme kanseri olgusundan Ile/Val genotipi saptanan 14 olgunun histolojik tip dağılımına bakıldığında, %85.7 sıklıkla invaziv duktal karsinom olduğu belirlendi (Tablo 9.12.).

Tablo 9.12. Polimorfik bulunan olgulardaki histolojik tip dağılımı

Histolojik Tip	Polimorfik Olgu sayısı (n)	Yüzdesi (%)
<i>İnvaziv Duktal Karsinom</i>	12	85.7
<i>İnvaziv Lobüler Karsinom</i>	1	7.1
<i>İntraduktal Karsinom (DCIS)</i>	1	7.1
Toplam	14	100

İnvaziv duktal karsinom tanısı alan 44 olgudaki 88 allelde Ile allelinin sıklığı %86.4, Val allelinin sıklığı %13.6 olarak saptandı.

10. TARTIŞMA

Meme kanserinin halen yeni bilgilerin ortaya çıktığı ve gelişmelerin yaşandığı oldukça geniş bir alan olduğu ifade edilmektedir. Bununla birlikte meme kanserinin hangi nedene bağlı olarak ortaya çıktığı tam olarak bilinmemekte, tüm dünyada yapılan araştırmalar sonucunda bazı özelliklere sahip olan kadınlarda meme kanseri görülme riskinin daha yüksek olduğu belirtilmektedir. Birçok risk faktörü ile ilişkili olan meme kanserinin, risk faktörlerinin azalmasına ve artmasına göre, görülme sıklığı da farklılık göstermektedir (17). Yaş, menarş ve menopoz yaşı, ilk doğum yaşı, etnik farklılık ve aile öyküsü risk faktörleri arasında yer almaktadır (17, 56). Göksel ve ark. meme ile ilgili şikayetle gelen 40 yıllık bir periyotta elde edilen 13,443 hasta içerisinde bilateral meme karsinomu bulunan 43 olgu ile yaptıkları çalışmalarında, ilk kanser tanısını premenopozal yaş (≤ 46 ; grup 1) ve postmenopozal yaşta (>46 ; grup 2) alan grup olarak olguları değerlendirmişlerdir. Premenopozal kadınların laktasyon dönemleri daha uzundur ve uzayan laktasyon dönemi bu yaş grubu için bir risk faktörü olabilir, ancak yapılan çalışmalarda bu durumun çelişkili olduğu ve daha fazla araştırma yapmaya gereksinim olduğu bildirilmiştir (55).

Meme kanserinde tanıdan sonraki doğal seyir hastalar arasında farklılıklar göstermektedir. Aynı tümör çapına sahip olan ve takip edilen hastalardan bazılarında tümör nüksü çok kısa sürede ortaya çıkmakta iken diğerleri sağlıklı olarak yaşamaya devam etmektedir. Bundan dolayı meme kanseri olan hastalardaki bu klinik ve biyolojik davranış farklılıklarını ve hastalığın hızla gelişebileceği yüksek risk grubunu belirlemek için aksiller lenf nodu metastazı, tümör çapı, histolojik grade ve histolojik tip gibi prognostik faktörler kullanılmaktadır (22).

İnsan genom projesinin sonuçları değerlendirildiğinde insan genomunda milyonlarca SNP keşfedilmiştir. Pek çok çalışmada meme kanseri için aday olan genlerdeki polimorfizmler bildirilmiştir (56). Kırk altı çalışmada 18 farklı

gendeki polimorfizme bakılmıştır. Bu polimorfizmlerden sadece 3 tanesi meme kanseri ile ilişkilendirilmiştir (57).

Çalışmamızda, meme kanseri patogeneğinde rol oynayabileceği düşünülen HER-2/neu geninin transmembran bölgesindeki I655V polimorfizmini meme kanseri tanısı almış olgulara ait parafin blok doku kesitlerinde belirledik ve polimorfizmin hastalığın prognozu üzerine olası etkilerini araştırdık

Çalışmamızda Ile/Val genotipi hasta grubunun %24.1, kontrol grubunun %30.9'unda, Val/Val genotipi sadece kontrol grubunun %1.8'inde saptandı. Ile ve Val allel frekansı hasta grubunda %87.9 ve 12.1; kontrol grubunda %82.7 ve %17.3 olarak saptandı. Bulgularımız aynı zamanda olgulara ait demografik ve klinik özelliklerle de birlikte değerlendirildi.

Meme kanserinde yaş önemli bir risk faktörü olarak değerlendirilmektedir (13). Sporadik meme kanserinin görülme sıklığı ilerleyen yaşla birlikte artmaktadır (16). Buna karşın Türkiye genç bir nüfusa sahip olup, kadın nüfusunun %47.3'ü 0-19 yaş, %45.6'sı 20-54 yaş grubundadır (13). Ailesel meme kanserlerinde, ailesinde 40 yaşının altında meme kanseri tanısı almış birinci derece akrabası bulunan kadınlarda, meme kanseri riski 2 kattan fazla artmaktadır (16). Kırk altı yaşın altında saptanan meme kanseri erken yaşta başlayan meme kanseri olarak tanımlanmaktadır ve klinik takipte önem taşımaktadır (55).

Meme kanseri tanısı alan 5 olgumuz 46 yaşından küçük idi. Bu olgulardan 1 tanesinde (%20) Val allelini saptadık. Kontrol grubunda ise 46 yaş ve altındaki birey sayısı 23 olup, 7 bireyde (%30.4) Ile/Val, 1 bireyde (%4.4) Val/Val genotipi saptandı. Ile allelinin sıklığı hasta grubunda %90, kontrol grubunda %10; Val allelinin sıklığı hasta grubunda %80.4, kontrol grubunda %19.6 olarak saptandı. 46 yaş ve altı kadınlarda; hasta grubu ile kontrol grubunun HER-2/neu genotip dağılımı ve allel sıklığı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı (p:0.708, p: 0.670). Kamali-Sarvestani ve ark.

(53) çalışmalarında hasta grubunu 45 yaşa göre değerlendirdiklerinde 45 yaş ve altındaki olguların %10.7'si Ile/Val, %0.52'si Val/Val genotipinde; 45 yaşından büyük olguların %18.9'u Ile/Val genotipinde saptanırken Val/Val genotipine rastlamamışlardır ve meme kanseri gelişimi riski ile bu polimorfizm arasında bir ilişki bulmadıklarını bildirmişlerdir. Benzer bir sonuç Wang-Gohrke ve Chang-Claude (58) tarafından bildirilmiş olup 45 yaş ve altındaki hasta grubu ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulmamışlardır. Artmış meme kanseri riski ile HER-2/neu gen polimorfizmi arasındaki ilişki ilk olarak Xie ve ark. (52) tarafından bildirilmiştir. Han Çinliler adı verilen oldukça homojen bir toplumdaki 700 Çinli kadınla yaptıkları çalışma sonucunda Val allel frekansını hasta grubunda %15.8, kontrol grubunda %11.1 olarak belirlemişler ve 45 yaş ve öncesi tanı alan kadınlarda Val alleli sıklığının 45 yaş sonrası tanı alan kadınlardan daha fazla olduğunu saptamışlardır. Literatürdeki diğer bir çalışmada Lee ve ark. (10) 45 yaş ve altı kadınlarda Val taşıyıcılarının meme kanseri riskinde 2.24 kat artış olduğu bildirilmiştir. Çalışmamızda meme kanserli olgularda 46 yaş ve altındaki olgu sayısı az olduğundan bir kısıtlılık olarak değerlendirildi. Geniş grup çalışmalarında allel dağılımında değişiklik olabileceği düşünüldü.

İleri menopoz yaşı kadınlarda meme kanseri riskini arttıran bir faktör olarak değerlendirilmektedir. Postmenopozal kadınlarda görülen meme kanseri riski premenopozal kadınlara göre yaklaşık 2 kat daha fazladır (16). Çalışmamızda premenopozal olgulardan 3'ü (%18.7) Ile/Val genotipinde, postmenopozal olgulardan 11'i (%30.6) Ile/Val genotipinde saptandı. Premenopozal ve postmenopozal grupta Ile allelinin sıklığı sırasıyla %90.6, %84.7; Val allelinin sıklığı %9.4, %15.3 olarak belirlendi. Premenopozal olgular ile postmenopozal olguların HER-2/neu genotip ve allel sıklığı dağılımı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı (p:0.506; 0.546). Elde ettiğimiz sonuç literatür bilgileriyle uygunluk göstermektedir. Qu ve ark. (51) rapor ettikleri çalışmalarında 2 aşamalı bir populasyon çalışması yapmışlardır. 1. aşamadaki çalışmalarında Val/Val genotipine sahip premenopozal kadınlarda önemsiz bir risk artışı olduğunu, 2. aşamada bu pozitif ilişkinin

tekrarlanmadığını ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulmadıklarını bildirmişlerdir. Millikan ve ark. (59) çalışmalarında benzer bir sonuçla premenopozal ve postmenopozal duruma göre genotip dağılımına bakıldığında anlamlı bir fark gözlememişlerdir.

Ailesel meme kanserlerinde, ailesinde 40 yaşının altında meme kanseri tanısı almış birinci derece akrabası bulunan kadınlarda, meme kanseri riski 2 kattan fazla artmaktadır (16). Çalışmamızda pozitif aile öyküsü bulunan olgularda Ile allelinin sıklığı %100 iken Val alleleline hiç rastlanmadı. Negatif aile öyküsü bulunan olgularda Ile ve Val allellerinin sıklığı sırasıyla %84.1, %15.3 olarak belirlendi. Pozitif aile öyküsü bulunan olgular ile negatif aile öyküsü bulunan olguların HER-2/neu genotip ve allel sıklığı dağılımı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı (p:0.090; 0.120). Çalışmamızda yer alan kadınların büyük çoğunluğunda ailesel meme kanseri öyküsü bulunmaması nedeniyle meme kanseri gelişmesi açısından düşük risk grubunda yer aldıkları söylenebilir. Wang-Gohrke ve Chang-Claude (58) 615 olgu ve 1078 kontrol bireyi ile yaptıkları çalışmalarında HER-2/neu I655V polimorfizmi ile meme kanseri arasında bir ilişki bulmamalarına karşın, pozitif aile öyküsü bulunan olgularda Val allelini istatistiksel olarak anlamlı bulmuşlardır. Wang-Gohrke ve Chang-Claude (58) pozitif aile öyküsüne sahip Val alleli taşıyıcılarında meme kanseri riskinin 2 kat, Montgomery ve ark. (54) 3 kat arttığını bildirmişlerdir. Benzer bir şekilde Millkan ve ark. (59) da hem 45 yaşından küçük hem de aile öyküsü bulunan kadınlarda meme kanseri riskinin 2 kat arttığını bildirmişlerdir. Sonuçlarımızın literatür bilgilerinden farklı olması örnek sayımızın az olmasından kaynaklanıyor olabileceğini akla getirmektedir.

Olguların 5 tanesinde (%8.6) uzak metastaz geliştiği belirlendi. Uzak metastaz saptanan 5 olgudan 2 tanesinin (%40) Ile/Val genotipine sahip olduğu belirlendi. Elde ettiğimiz sonuçların aksine, Nelson ve ark. (60) uzak metastaz gelişen olgularda Ile/Val genotipini hasta grubunda %37.8, kontrol grubunda %36.5; Val/Val genotipini hasta grubunda %4.7, kontrol grubunda %7.1 olarak saptamışlardır. Bölgesel ya da uzak metastazı bulunan Val/Val

genotipine sahip olgularda meme kanseri riskinde %37 oranında bir azalma olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmamız sonucunda uzak metastaz gelişimi ile Val alleli arasında bir ilişki olabileceğini düşündük. Bu ilişki daha geniş örneklerle yapılan çalışmalarla doğrulanmalıdır.

Çalışmamızda olguların 5 tanesinde (%8.6) lokal nüks geliştiği belirlendi. 5 olgudan 3 tanesinde (%60) Ile/Val genotipi belirlendi. Elde edilen sonuç değerlendirildiğinde lokal nüks gelişimi ile Val alleli arasında bir ilişki olabileceğini düşündük. Olgu sayısının artırılması ile istatistiksel değerlendirme yapmak mümkün olacaktır.

Meme kanserinde aksiller lenf nodu metastazının bulunup bulunmadığını saptamak, hem operatif strateji ve cerrahi dışı tedavi yönetimini, hem de sağ kalım beklentisini belirgin olarak etkiler (61). Çalışmamızda aksiller lenf nodu metastazı pozitif olan 19 olgudan 6 (%31.6) tanesinde, aksiller lenf nodu metastazı negatif olan 34 olgudan 8 tanesinde (%23.5) Val alleli saptadık. Aksiller lenf nodu metastazı pozitif olgular ile negatif olguların HER-2/neu genotip ve allel sıklığı dağılımı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p=0.535$; 0.563). Bizim çalışmamızın aksine Naidu ve ark. (62) polimorfik HER-2/neu allelinin nodal metastaz ile ilişkili olduğunu belirlemişlerdir. İnvaziv duktal karsinom tanısı almış 230 olgu ile yaptıkları çalışmalarında Ile/Val+Val/Val genotipleri ile lenf nodu metastazı arasında anlamlı bir ilişki olduğunu bildirmişlerdir. Lenf nodu metastazı pozitif olgularda Ile/Val+Val/Val genotipi oranını %53.8, lenf nodu metastazı negatif olgularda %40 olarak saptamışlardır.

İnvaziv duktal karsinom, invaziv meme karsinomlarının en sık görülen tipidir (%70-80) (19). Meme kanseri tanısı alan 58 olgunun 44 tanesinde (%75.8) ve HER-2/neu Ile655Val polimorfizmi saptanan 14 Ile/Val genotipindeki olgunun 12 tanesinde (%85.7) invaziv duktal karsinom histolojik tipi belirlendi. Çalışmamızda invaziv duktal karsinomlu olguların daha sık gözlenmesi literatür çalışmalarına uygunluk gösterdi.

Çalışmamızda Türk toplumunda meme kanseri riski ile HER-2/neu polimorfizmi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmadı. Türk toplumunu değerlendiren Akışık ve ark. (63) rapor ettikleri çalışmada analizler sonucunda varyant allel (GTC) ve yabanıl tip (ATC) allel sıklıklarını hasta ve kontrol grubunda sırasıyla %9.9, %10.3 ve %90, %89.6 olarak belirlemişlerdir. Yaptıkları çalışmada hasta ve kontrol grubu arasında genotip ve allel frekansları açısından anlamlı bir fark bulmamışlardır. Keshava ve ark. (64) 269 beyaz Amerikalı, 97 zenci Amerikalı ve 105 Latin kadınla yaptıkları çalışma sonucunda her üç grupta da Val alleli ile meme kanseri arasında bir ilişki bulamamışlardır. Elde ettiğimiz sonuçların aksine Lee ve ark. (10) hasta grubunda 424, kontrol grubunda 319 Tayvanlı kadın ile yaptıkları çalışmada Val alleli sıklığını hasta grubunda %10.1, kontrol grubunda %7.2 olarak belirlemiş ve Val allelini meme kanseri ile ilişkilendirmişlerdir. Elde edilen sonuçların tutarsız olması Val allelinin farklı etnik gruplarda farklı frekanslarda görülmesi ile açıklanabilir.

Tao ve ark. 2009'da rapor ettikleri çalışmalarında 2000-2008 yılları arasında bu polimorfizm ile ilgili yapılan çalışmaları karşılaştırmışlardır. Çalışmaları Asya, Avrupa ve Beyaz ırka göre; 45 yaş ve altı meme kanseri tanısı almış olgulara göre ve aile öyküsüne göre sınıflandırmışlardır. Meta-analizler sonucunda, HER-2/neu kodon 655 Val allelinin meme kanserinin artmış riski ile zayıf bir ilişkisi olduğunu ve HER-2 kodon 655'deki SNP'nin Asyalı kadınlar için ya da 45 yaş ve altındaki kadınlarda meme kanseri riski için bir belirteç olarak kullanabilirliğinin olası olabileceğini öne sürmüşlerdir (9). Bizim çalışmamız ise bu verileri desteklememektedir.

HER-2/neu gen polimorfizmi ile meme kanseri arasındaki ilişkinin dışında bu polimorfizmin mide, mesane ve prostat kanserleri ile olan ilişkisini içeren çalışmalar da bulunmaktadır. Wang ve ark. (65) bu polimorfizmin artmış mesane kanseri riski ile ilişkili olmadığını saptarken, Yokomizo ve ark. (66) yayınladıkları çalışmalarında, HER-2/neu Val655 allelinin prostat kanseri riskinde azalma ile olan ilişkisini göstermişlerdir. Mide kanseri üzerine yapılan

ve biri Türk popülasyonunda gerçekleştirilen 2 çalışmada da HER-2/neu kodon 655 SNP'nin mide kanseri gelişimi ile ilişkili olabileceği bildirilmiştir. Her iki çalışmanın sonucunda da bu polimorfizmin kötü prognoz ile ilişkilendirilebileceği ve prognostik bir parametre olarak kullanılabileceği ileri sürülmüştür (11, 67).

ERBB2 veya c-erbB2 olarak bilinen HER-2/neu'nun amplifikasyonu, meme tümörlerinde en sık rastlanılan onkogen aktivasyonu olup, adenokarsinom türleri içerisinde en yaygın görülen türdür. HER-2/neu amplifikasyonu ya da aşırı ifadenmesi meme kanserlerinin yaklaşık %25'inde görülmektedir ve kötü prognoz, endokrin tedaviye cevap vermeme ve metastatik fenotip ile ilişkilendirilmiştir (44). İmmünohistokimyasal yöntemle c-erbB2'nin 14 olguda analiz edildiği belirlendi. 14 olgunun 12'si negatif, 2'si pozitif olarak rapor edilmişti. Pozitif olarak rapor edilen 2 olgu da Ile/Ile genotipinde saptandı. Bulgularımıza göre bu polimorfizm ile HER-2/neu amplifikasyonu arasında ilişki olmadığı düşünüldü. Aynı bulgular daha önceki çalışmalarda da bildirilmiştir. Millikan ve ark. Val/Val genotipli kadınlar ile HER-2/neu proteininin aşırı ifadenmesi arasında bir ilişki olmadığını göstermiştir (59). Millikan ve ark.'nın aksine Xie ve ark. floresan in-situ hibridizasyon (FISH) yöntemi ile baktıkları HER-2/neu amplifikasyonunu Ile/Ile, Ile/Val ve Val/Val genotiplerinde sırasıyla %32.3, %42.9 ve %53.8 olarak saptamışlardır (68).

Bu çalışmada HER-2/neu Ile655Val polimorfizmi ile olguların klinik ve demografik özellikleri ve tümörün genel özellikleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir birliktelik bulunmadı. Çalışmamızın sonucunda pozitif ilişki bulunan çalışmaların aksine Val alleli ile meme kanseri riski arasında bir ilişki gözlenmedi. Kontrol grubunda Val/Val genotipinde saptadığımız birey 46 yaşından küçük idi. Bu bireyde Val alleli varlığının erken yaşta başlayan meme kanseri gelişimine neden olabileceği varsayımında bulunmak mümkün değildir. Bulgularımız ışığında HER-2/neu Ile655Val polimorfizminin meme kanserli olgularda yeterli bir klinik ve prognostik takip belirteci olmadığı açıktır.

HER-2/neu Ile655Val polimorfizmini değerlendiren çalışmaların genelinde elde edilen çelişkili sonuçların sebebinin, etnik gruplar arasındaki farklılıklar olabileceğini akla getirmektedir. Bu çalışmada elde ettiğimiz sonuçlar olgu sayısının azlığına bağlı da olabilir. Daha geniş hasta ve kontrol grubu ile yapılan çalışmalar ile HER-2/neu gen polimorfizminin meme kanseri patogenezindeki ve kliniğindeki rolü daha çok aydınlanacaktır.

11. SONUÇ

- Çalışmamızın sonuçları değerlendirildiğinde meme kanseri patogeneğinde HER-2/neu Ile655Val polimorfizminin temel genetik mekanizma olmadığını düşündük.
- Yaş, menopoz durumu, aile öyküsü, aksiller lenf nodu metastazı ile HER-2/neu Ile655Val plimorfizmi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir birliktelik görülmemiştir.
- HER-2/neu Ile655Val polimorfizminin hastalığın prognozunun takibinde prognostik bir belirteç olarak kullanılmasının gerekli olmadığı sonucuna vardık.
- Çalışmamızda olgu sayısının azlığı kısıtlılık kabul edilerek daha büyük hasta gruplarında HER-2/neu gen polimorfizminin değerlendirmesi önerilmektedir.

12. KAYNAKLAR

- 1- OSBORNE, C, WILSON, P, TRIPATHY, D. (2004). Oncogenes and tumorsupressor genes in breast cancer: Potential diagnostic and therapeutic applications. *Oncologist*. **9**(4):361-77.
- 2- FERLAY, J., AUTIER, P., BONIOL, M., HEANUE, M., COLOMBET, M., BOYLE, P. (2007). Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. *Annals of Oncology*. **18**(3):581-592.
- 3- RAKHA, E.A., EL-SAYED, M.E., LEE, A. H., ELSTON, C. W., GRAINGE, M. J., HODI, Z., BLAMEY R. W., ELLIS, I. O. (2008). Prognostic Significance of Nottingham Histologic Grade in Invasive Breast Carcinoma. *Journal of Clinical Oncology*. **26**(19):3153-3158.
- 4- DENLEY, H., PINDER, S. E., ELSTON, C.W., LEE, A.H., ELLIS, I.O. (2001). Preoperative assessment of prognostic factors in breast cancer. *J. Clin. Pathol*. **54**(1):20-24.
- 5- NUSSBAUM, R.L., MCINNES, R.R., WILLARD, H.F. (2005). Thompson & Thompson Tibbi Genetik 6. baskı. s.:313-325.
- 6- NORMANNO, N., DE LUCA, A., BIANCO, C., STRIZZI, L., MANCINO, M., MAIELLO, M.R., CAROTENUTO, A., DE FEO, G., CAPONIGRO, F., SALOMON, D.S. (2006). Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. *Gene*. **366**(1):2-16.
- 7- BHARGAVA, R., GERALD, W.L., LI, A.R., PAN, Q., LAL, P., LADANYI, M., CHEN, B. (2005). EGFR gene amplification in breast cancer: correlation with epidermal growth factor receptor mRNA and protein expression and HER-2 status and absence of EGFR-activating mutations. *Modern Pathology*. **18**(8):1027-1033.

- 8- HUDELIST, G., SINGER, C. F., MANAVI, M., PISCHINGER, K., KUBISTA, E., CZERWENKA, K. (2003). Co-expression of ErbB-family members in human breast cancer: Her-2/neu is the preferred dimerization candidate in nodal-positive tumors. *Breast Cancer Research and Treatment*. **80**(3):353-361.
- 9- TAO, W., WANG, C., HAN, R., JIANG, H. (2009). HER2 codon 655 polymorphism and breast cancer risk: a meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat*. **114**(2):371-6.
- 10- LEE, S.C., HOU, M.F., HSIEH, P.C., WU, S.H., ANN HOU, L., MA, H., TSAI, S.M., TSAI, L.Y. (2008). A case–control study of the HER2 Ile655Val polymorphism and risk of breast cancer in Taiwan. *Clinical Biochemistry*. **41**(3):121-125.
- 11- KURAOKA, K., MATSUMURA, S., HAMAI, Y., NAKACHI, K., IMAI, K., MATSUSAKI, K., OUE, N., ITO, R., NAKAYAMA, H., YASUI, W. (2003). A single nucleotide polymorphism in the transmembrane domain coding region of Her-2 is associated with development and malignant phenotype of gastric cancer. *Int. J. Cancer*. **107**(4):593-596.
- 12- Cancer Facts & Figures 2008, American Cancer Society, Surveillance Research, (2008).
Erişim: [<http://www.cancer.org/downloads/STT/2008CAFFfinalsecured.pdf>].
- 13- ASLAN, F.E., GÜRKAN, A. (2007). Kadınlarda Meme Kanseri Risk Düzeyi. *Meme Sağlığı Dergisi*. **3**(2):63-68.
- 14- TOPUZ, E. (1997). Meme Kanseri. Biyoloji, Tanı, Evreleme,Tedavi. İstanbul Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Yayınları, 3, İstanbul.

- 15- SOMUNOĞLU, S. (2007). Meme Kanserinde Risk Faktörleri. *Fırat Sağlık Hizmetleri Dergisi*. **2**(5).
- 16- MCPHERSON, K. , STEEL, C.M. , DIXON, J.M. (2000). Breast cancer-epidemiology, risk factors, and genetics. *BMJ* . **321**(7261):624-628.
- 17- CIANFROCCA, M., GOLDSTEIN, L.J. (2004). Prognostic and Predictive Factors in Early-Stage Breast Cancer. *The Oncologist*. **9**(6):606-616.
- 18- IGNATIADIS, M., SOTIRIOU, C. (2008). Understanding the Molecular Basis of Histologic Grade. *Pathobiology*. **75**(2):104-111.
- 19- İLHAN, Ş. (2006). Meme Karsinomu Patolojisi. İ. Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri, Meme Kanseri Sempozyum Dizisi No: **54**,65 -71.
- 20- VIENI, S., CABIBI, D., CIPOLLA, C., FRICANO, S., GRACEFFA, G., LATTERI, M.A. (2006). Secretory breast carcinoma with metastatic sentinel lymph node. *World Journal of Surgical Oncology* . **4**:88.
- 21- OSAKO, T., HORII, R., OGIYA, A., IJIMA, K., IWASE, T., AKIYAMA, F. (2009). Histogenesis of metaplastic breast carcinoma and axillary nodal metastases. *Pathology International* . **59**(2):116-120.
- 22- ÇALIKAPAN, M. (2004). Meme Kanserinde Prognostik Faktörlerin Hastanemiz Olgu Serisindeki Sağkalıma Etkisi. Uzmanlık tezi.
- 23- PAYNE, S.J., BOWEN, R.L., JONES, J.L., WELLS, C.A. (2008). Predictive markers in breast cancer-the present. *Histopathology*. **52**(1):82-90.

- 24- SOMMER, S., FUQUA, S.A. (2001). Estrogen receptor and breast cancer. *Cancer Biology*. **11**(5):339-352.
- 25- KHAN, S.A., ROGERS, M.A., KHURANA, K.K., MEGUID, M.M., NUMANN, P.J. (1998). Estrogen receptor expression in benign breast epithelium and breast cancer risk. *J Natl Cancer Inst*. **90**(1):37-42.
- 26- COOPER, G.M. (2004). The Cell: A Molecular Aproach. Third Edition. p.:657.
- 27- DOĞAN, A.L., GÜÇ, D. (2004). Sinyal iletimi mekanizmaları ve kanser. *Hacettepe Tıp Dergisi*. **35**:34-42.
- 28- ROSKOSKI, R. JR. (2004). The ErbB/HER receptor protein-tyrosine kinases and cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **319**(1):1-11.
- 29- PARK, K., HAN, S., SHIN, E., KIM, H.J., KIM, J.Y. (2007). EGFR gene and protein expression in breast cancers. *Eur J Surg Oncol*. **33**(8):956-960.
- 30- SAHIN, F.I., YILMAZ, Z., YAGMURDUR, M.C., ATAC, F.B., OZDEMIR, B.H., KARAKAYALI, H., DEMIRHAN, B., HABERAL, M. (2006). Clinical Findings and HER-2/*neu* Gene Amplification Status of Breast Carcinoma Patients. *Pathology Oncology Research*. **12**(4):211-215.
- 31- BRENNAN, P. J., KUMOGAI, T., BEREZOV, A., MURALI, R., GRENE, M.I. (2000). HER2/Neu: mechanisms of dimerization/oligomerization. *Oncogene*. **19**(53):6093-6101.
- 32- VON LINTIG, F.C., DREILINGER, A.D., VARKI, N.M., WALLACE, A.M., CASTEEL, D.E., BOSS, G.R. (2000). Ras activation in human breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*. **62**(1):51-62.

- 33- RODRIGUEZ-PINILLA, S.M., JONES, R.L., LAMBROS, M.B., ARRIOLA, E., SAVAGE, K., JAMES, M., PINDER, S.E., REIS-FILHO, J.S. (2007). MYC amplification in breast cancer: a chromogenic in situ hybridisation study. *J. Clin. Pathol.* **60**(9):1017-1023.
- 34- SWEENEY, K.J., SWARBRICK, A., SUTHERLAND, R. L., MUSGROVE, E.A. (1998). Lack of relationship between CDK activity and G1 cyclin expression in breast cancer cells. *Oncogene*. **16**(22):2865-2878.
- 35- SJOGREN, S., INGANAS, M., NORBERG, T., LINDGREN, A., NORDGREN, H., HOLMBERG, L., BERGH, J. (1996). The p53 Gene in Breast Cancer: Prognostic Value of Complementary DNA Sequencing Versus Immunohistochemistry. *J Natl Cancer Inst.* **88**(3-4):173-82.
- 36- AHMED, M., RAHMAN, N. (2006). ATM and breast cancer susceptibility. *Oncogene*. **25**(43):5906-11.
- 37- TENG, L.S., ZHENG, Y., WANG, H.H. (2008). BRCA1/2 associated hereditary breast cancer. *J Zhejiang Univ Sci B.* **9**(2):85-9.
- 38- DI COSIMO, S., BASELGA, J. (2008). Targeted therapies in breast cancer: where are we now? *Eur J Cancer*. **44**(18):2781-90.
- 39- BARTH, J., JACKISCH, C., UNTCH, M. (2009). Antibodies and Tyrosine Kinase Inhibitors in Breast Cancer Therapies. *Breast Care*. **4**:46–50.
- 40- RAJKUMAR, T. (2001). Growth factors and growth factor receptors in cancer. *Current Science*. **81**(5):535-541.
- 41- LINGGI, B., CARPENTER, G. (2006). ErbB receptors: new insights on mechanisms and biology. *Trends Cell Biol.* **16**(12):649-656.

- 42- HARARI, D., YARDEN, Y. (2000). Molecular mechanisms underlying ErbB2/HER2 action in breast cancer. *Oncogene* . **19**(53):6102-6114.
- 43- HOLBRO, T., BEERLI R.R., MAURER, F., KOZICZAK, M., BARBAS, C. F. 3rd, HYNES, N.E. (2003). The ErbB2/ErbB3 heterodimer functions as an oncogenic unit: ErbB2 requires ErbB3 to drive breast tumor cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **100**(15):8933-8938.
- 44- HUANG, W.Y., NEWMAN, B., MILLIKAN, R.C., CONWAY, K., HULKA, B.S., SCHELL, M.J., LIU, E.T. (2000). Risk of Breast Cancer According to the Status of HER-2/*neu* Oncogene Amplification. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. **9**(1):65-71.
- 45- BENUSIGLIO; P.R., LESUEUR, F., LUCCARINI, C., CONROY, D.M., SHAH, M., EASTON, D.F., DAY, N.E., DUNNING, A.M., PHAROAH, P.D., PONDER, B.A. (2005). Common *ERBB2* polymorphisms and risk of breast cancer in a white British population: a case-control study. *Breast Cancer Research*. **7**(2):R204-209.
- 46- FLEISHMAN, S.J., SCHLESSINGER, J., BEN-TAL, N. (2002). A putative molecular-activation switch in the transmembrane domain of erbB2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **99**(25):15937-15940.
- 47- KWOK, P.Y., CHEN, X. (2003). Detection of Single Nucleotide Polymorphisms. *Curr. Issues Mol. Biol*. **5**(2):43-60.
- 48- EKMEKÇİ, A., KONAÇ, E., ÖNEN, H.İ. (2008). Gen Polimorfizmi ve Kansere Yatkınlık. *Marmara Medical Journal* . **21**(3):282-295.
- 49- HEINRICHS, S., LOOK, A.T. (2007). Identification of structural aberrations in cancer by SNP array analysis. *Genome Biology*. **8**(7):219.

- 50- DELİGEZER, U., AKIŞIK, E.E., DALAY, N. (2004). Gen Polimorfizm Analizinde LightCycler Floresan PCR Tekniğinin Kullanılması: Myeloid Lösemili Çocuk ve Yetifkin Hastalarda MTHFR C677T Gen Polimorfizm Dağılımının Belirlenmesi. *Türk Onkoloji Dergisi*. **19**(4):134-139.
- 51- QU , S., CAI, Q., GAO, Y.T., LU, W., CAI, H., SU, Y., WANG, S.E., SHU, X.O., ZHENG, W. (2008). ERBB2 genetic polymorphism and breast cancer risk in Chinese women: a population-based case-control study. *Breast Cancer Res Treat*. **110**(1):169-176.
- 52- XIE, D., SHU, X.O., DENG, Z., WEN, W.Q., CREEK, K.E., DAI, Q., GAO, Y.T., JIN, F., ZHENG, W. (2000). Population-Based, Case–Control Study of HER2 Genetic Polymorphism and Breast Cancer Risk. *J Natl Cancer Inst*. **92**(5):412-7.
- 53- KAMALI-SARVESTANI, E., TALEI, A.R., MERAT, A. (2004). Ile to Val polymorphism at codon 655 of HER-2 gene and breast cancer risk in Iranian women. *Cancer Letters*. **215**(1):83-7.
- 54- MONTGOMERY, K.G., GERTIG, D.M., BAXTER, S.W., MILNE, R.L., DITE, G.S., MCCREDIE, M.R., GILES, G.G., SOUTHEY, M.C., HOPPER, J.L., CAMPBELL, I.G. (2003). The *HER2* I655V Polymorphism and Risk of Breast Cancer in Women < Age 40 Years. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. **12**(10):1109-11.
- 55- GOKSEL, H.A., YAGMURDUR, M.C., KARAKAYALI, H., MORAY, G., DEMIRHAN, B., ISIKLAR, I., BILGIN, N., HABERAL, M. (2004). Management of bilateral breast carcinoma: long-term results. *Int Surg*. **89**(3):166-71.
- 56- TAMIMI, R.M. (2006). Single nucleotide polymorphisms and breast cancer: not yet a success story. *Breast Cancer Research*. **8**(4):108.

- 57- DUNNING, A.M., HEALEY, C.S., PHAROAH, P.D., TEARE, M.D., PONDER, B.A., EASTON, D.F. (1999). A Systematic Review Of Genetic Polymorphisms and Breast Cancer Risk. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. **8**(10):843-854.
- 58- WANG-GOHRKE, S., CHANG-CLAUDE, J. (2001). Re: Population-Based, Case–Control Study of HER2 Genetic Polymorphism and Breast Cancer Risk. *Journal of the National Cancer Institute*. **93**(21): 1657-9.
- 59- MILLIKAN, R., EATON, A., WORLEY, K., BISCOCHO, L., HODGSON, E., HUANG, W.Y., GERADTS, J., IACOCCA, M., COWAN, D., CONWAY, K., DRESSLER, L. (2003). *HER2* codon 655 polymorphism and risk of breast cancer in African Americans and whites. *Breast Cancer Res Treat*. **79**(3):355-364.
- 60- NELSON, S.E., GOULD, M.N., HAMPTON, J.M., TRENTAM-DIETZ, A. (2005). A case-control study of the *HER2* Ile655Val polymorphism in relation to risk of invasive breast cancer. *Breast Cancer Res*. **7**(3):357-64.
- 61- CAN, M.F., GÖRGÜLÜ, S., YAĞCI, G., AÇIKEL, C.H., UZAR, A.İ., PEKER, Y., KOZAK, O., GÜNHAN, Ö., TUFAN, T. (2007). Aksiller Lenf Nodu Negatif Meme Kanseri Hastalarında Çıkarılan Lenf Nodu Sayısının Prognostik Önemi. *Fırat Tıp Dergisi* . **12**(2):102-106.
- 62- NAIDU, R., YIP, C.H., TAIB, N.A. (2008). Polymorphisms of *HER2* Ile655Val and cyclin D1 (*CCND1*) G870A are not associated with breast cancer risk but polymorphic allele of *HER2* is associated with nodal metastases. *Neoplasma*. **55**(2):87-95.

- 63- AKISIK, E., DALAY, N. (2004). Estrogen receptor codon 594 and HER2 codon 655 polymorphisms and breast cancer risk. *Experimental and Molecular Pathology*. **76**(3):260-3.
- 64- KESHAHA, C., MCCANLIES, E.C., KESHAHA,N., WOLFF, M.S., WESTON A. (2001). Distribution of HER2(V655) genotypes in breast cancer cases and controls in the United States. *Cancer Letters*. **173**(1):37-41.
- 65- WANG, L., HABUCHI, T., TAKAHASHI, T., KAMOTO, T., ZUO, T., MITSUMORI, K., TSUCHIYA, N., SATO, K., OGAWA, O., KATO, T. (2002). No association between HER-2 gene polymorphism at codon 655 and a risk of bladder cancer. *Int. J. Cancer*. **97**(6):787-90.
- 66- YOKOMIZO, A., KOGA, H., KINUKAWA, N., TSUKAMOTO, T., HIRAO, Y., AKAZA, H., MORI, M., NAITO, S. (2005). Association of HER-2 Polymorphism With Japanese Sporadic Prostate Cancer Susceptibility. *The Prostate*. **62**(1):49-53.
- 67- SATIROGLU-TUFAN, N.L., BIR, F., CALLI-DEMIRKAN, N. (2006). Investigation of HER-2 codon 655 single nucleotide polymorphism frequency and c-ErbB-2 protein expression alterations in gastric cancer patients. *World J Gastroenterol*. **12**(20):3283-7.
- 68- ZHENG, W., KATAOKA, N., XIE, D., YOUNG, S.R. (2001). RESPONSE: Re: Population-Based, Case–Control Study of HER2 Genetic Polymorphism and Breast Cancer Risk. *Journal of the National Cancer Institute*. **93**(7):558-559.