



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MEME KANSERİNİN ERKEN PROGNOZUNDA PROTEOMİK
YAKLAŞIM**

ELİF DİŞ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. ŞERMİN TETİK

2019-İSTANBUL

TEZ ONAYI

Kurum : Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Programın seviyesi : Yüksek Lisans
Anabilim Dalı : Biyokimya (Eczacılık)
Tez Sahibi : Elif DİŞ
Tez Başlığı : Meme Kanserinin Erken Prognozunda Proteomik Yaklaşım
Sınav Yeri : Eczacılık/Biyokimya Anabilim Dalı Haydarpaşa Kampüsü
Sınav Tarihi : 27/06/2019

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman (Unvan, Adı, Soyadı)

Prof.Dr. ŞerminTETİK

Kurumu

Marmara Üniversitesi
Eczacılık Biyokimya A.B.D.

İmza



Sınav Jüri Üyeleri (Unvan, Adı, Soyadı)

Prof. Dr. Nusret ERDOĞAN

İstinye Üniversitesi

Prof.Dr. Ebru ALTURFAN

Marmara Üniversitesi



Yukarıdaki jüri kararı Enstitü Yönetim Kurulu'nun ..3.1./Temmuz/2019.. tarih ve ..57.. sayılı kararı ile onaylanmıştır.



Prof. Dr. Feyza ARICIOĞLU

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

-Sınav evrakları 3 iş günü içinde ıslak imzalı tek kopya halinde Enstitüye teslim edilmelidir.

-Bu form bilgisayar ortamında doldurulacaktır

BEYAN

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

Öğrencinin Adı, Soyadı: Elif DİŞ

İmza:



TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimimin her aşamasında bana her türlü konuda destek olan, tez çalışmamda beni yönlendirip bilgi ve tecrübesiyle bana yol gösteren tez danışmanım, kıymetli hocam Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilimdalı Öğretim üyesi Prof.Dr. Şermin TETİK'e;

Tez çalışmam sırasında serum ve dokuların temininde bana yardımcı olan ve çalışmalarım sırasında desteklerini ve bilgi birikimlerini esirgemeyen; İstinye Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı başkanı Prof.Dr. Nusret ERDOĞAN'a, Gaziosmanpaşa Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Patoloji Kliniği eğitim görevlisi Doç.Dr. Elife KIMILOĞLU'na ve Gaziosmanpaşa Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nden Genel Cerrahi Uzmanı Op.Dr. Serkan İLGÜN'e ;

Deneylerimi gerçekleştirmemde bana yardımcı olan emeklerini ve bilgilerini esirgemeyen Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilimdalı Öğretim üyesi Dr.Öğr.Üyesi Halil AKSOY'a, Biruni Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu Öğretim üyesi Dr.Öğr.Üyesi Enver ÇIRACI'ya, Bezmialem Vakıf Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu Tıbbi Hizmetler ve Teknikler Bölümü Öğretim üyesi Dr.Öğr.Üyesi İlyas Samet ERGÜN'e, Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Dr.Öğr.Üyesi Ali ŞEN'e, Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilimdalı Öğretim üyesi Arş.Gör. Turgut ŞEKERLER'e ve Gaziosmanpaşa Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Patoloji Laboratuvarından Abdussamet ULUTAŞ'a ;

Tezimin yazım aşamasında yardımlarıyla her daim desteğini esirgemeyen sevgili kuzenim Yük.Kim.Neşe ULAR'a ve bu süreçte bana her türlü desteği veren, bugünlere gelmemde çok fazla emekleri olan annem Seyhan DİŞ'e ve babam Mehmet DİŞ'e ve tüm aileme ve sevgili arkadaşlarıma içtenlikle teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

KISALTMALAR	x
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	xiv
TABLoların LİSTESİ	xvii
1.ÖZET	1
2.SUMMARY	2
3. GİRİŞ ve AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER	6
4.1. Meme Anatomisi	6
4.2. Meme Kanseri	8
4.3. Meme Kanserinin Epidemiyolojisi.....	8
4.4. Meme Kanserinin Etiyolojisi ve Risk Faktörleri.....	10
4.4.1. Yaş ve cinsiyet.....	13
4.4.2. Coğrafi konum	14
4.4.3. Kişisel ve aile öyküsü	14
4.4.4. Kalıtım	14
4.4.4.1. BRCA1 ve BRCA2 gen mutasyonları	15
4.4.5. Meme lezyonları varlığı.....	15
4.4.6. Irk.....	16
4.4.7. Kilo artışı	16
4.4.8. Kimyasal maddeler ve alkol	16
4.4.9. Radyasyon.....	17
4.4.10. Üreme ve hormonal faktörler.....	17

4.4.11. Emzirme.....	18
4.4.12. Oksidatif stres	19
4.5. Meme Kanserinde Prognostik Parametreler	19
4.5.1. Meme kanserinde prognostik faktörler	19
4.5.2. Klinik faktörler	20
4.5.2.1. Yaş	20
4.5.2.2. Irk.....	21
4.5.3. Patolojik faktörler	21
4.5.3.1. Birincil tümör boyutu.....	21
4.5.3.2. Aksiller lenf nodu tutulumu	22
4.5.3.3. Evre.....	22
4.5.3.3.1. Tümör (T)	23
4.5.3.3.2. Nodül (N).....	26
4.5.3.3.3. Metastaz (M).....	28
4.5.4. Patolojik faktörlerin değerlendirilmesi	28
4.5.5. Tümör morfolojisi.....	35
4.5.6. Histolojik Grade.....	35
4.5.7. Hormon reseptörleri.....	36
4.5.8.1. HER2	36
4.6. Proliferatif Faktörler	36
4.6.1. Ki67	36
4.7. Meme Kanseri Biyomarker'ları.....	37
4.7.1. Biyomarker tanımı ve türleri.....	37
4.7.2. İdeal bir tümör marker'ının özellikleri	39
4.7.3. Mevcut çalışılmış meme kanseri biyomarker'ları	39
4.7.4.1. Protein karbonilleri	42

4.8. Klinikte Kullanılan Meme Kanseri Biyomarkerları	44
4.8.1. MUC-1, CA 15-3, CA 27-29	44
4.8.2. CEA	45
4.8.3. HER-2 /neu (cerbB2)	45
4.8.4. Östrojen reseptör (ER) ve progesteron reseptör (PR).....	46
4.8.5. p53	47
4.8.6. Katepsin-D	47
4.9. Prognostik Değeri Olan Diğer Meme Kanseri Biyomarker'ları.....	47
4.9.1. Yağ asidi bağlayıcı protein 4 (FABP4).....	47
4.9.2. Ki67	48
4.9.3. Hormon duyarlı lipaz (HSL).....	49
4.10. Biyomarker Araştırma Yöntemleri.....	50
4.10.1. Biyomarker araştırmalarında kullanılan genomik yaklaşımlar.....	51
4.10.2. Biyomarker araştırmalarında kullanılan proteomik yaklaşımlar	53
4.10.2.1. Proteomik yaklaşımları destekleyen kromatografik yöntemler	55
4.10.2.1.1. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC)	55
4.10.2.1.2. Enzim bağlı immünosorbent deneyi (ELISA)	56
4.10.2.1.3. İmmünohistokimya (İHK)	56
4.10.2.1.3.1. Antijen kazanımı.....	57
4.10.2.1.3.2. Primer antikor	57
4.10.2.1.3.3. Boyama sonuçlarının puanlanması	58
5. GEREÇ ve YÖNTEM.....	59
5.1. Gereçler	59
5.1.1. Kullanılan kimyasal ve sarf malzemeler.....	59
5.1.2. Kullanılan cihazlar	60
5.2. Yöntemler.....	60

5.2.1. Serum eldesi.....	61
5.2.2. Serumda ELISA ile FABP4 konsantrasyonunun belirlenmesi	61
5.2.2.2. Reaktiflerin Hazırlanışı.....	62
5.2.2.3. Deneyin yapılışı	62
5.2.2.4. Sonuçların hesaplanması.....	63
5.2.3. Serumda ELISA ile HSL konsantrasyonunun belirlenmesi	64
5.2.3.1. Kit içeriği	64
5.2.3.2. Reaktif hazırlama	65
5.2.3.3. Deneyin yapılışı	65
5.2.3.4. Sonuçların hesaplanması.....	66
5.2.4. Serumda ELISA ile Ki67 konsantrasyonunun belirlenmesi	67
5.2.4.2. Reaktiflerin hazırlanması	67
5.2.4.3. Deneyin yapılışı	68
5.2.4.4. Sonuçların hesaplanması.....	69
5.2.5. Dokuda immünohistokimyasal (İHK) yöntem ile FABP4 protein miktar tayini	70
5.2.5.1. Doku örneklerinin toplanması	70
5.2.5.2. Doku deparafinizasyonu	70
5.2.5.3. Antijen geri kazanımı (Antijen retrieval).....	71
5.2.5.4. Peroksidaz block uygulaması.....	71
5.2.5.5. Primer antikor uygulaması.....	71
5.2.5.6. Kromojen uygulaması.....	72
5.2.5.7. Rehidratasyon ve kapama	72
5.2.5.8. İHK boyaması yapılan dokuların FABP4 yaygınlığı ve FABP4 şiddetinin değerlendirilmesi:.....	73
5.2.6. Erken prognozda biyomarker belirlenmesi için kullanılan kromatografik analizler.....	73

5.2.6.1. HPLC ile protein karbonil tayini	73
5.2.6.1.1. Protein karbonil ölçümünde kullanılan çözeltilerin hazırlanması	73
5.2.6.1.2. Deneyin yapılışı	74
5.2.6.3. HPLC ile FABP4, Ki67 ve HSL'nin yüzde değişim alanlarının belirlenmesi.....	76
5.2.6.3.1 Deneyin yapılışı	76
5.2.7. İstatistiksel analiz.....	77
6. BULGULAR.....	78
7. TARTIŞMA ve SONUÇ	95
8. KAYNAKLAR	102
EKLER.....	114

KISALTMALAR

μ L	Mikrolitre
115D8	İnsan süt yağı globül membranlarına karşı yükseltilmiş antikor
8-OHdG	8 hidroksi 2 deoksiguanozin
8-OxodG	8-okso-2-deoksiguanozin
AMP	Adenozin monofosfat
BCA	Meme karbonik anhidraz
BCI	Meme kanseri indeksi
BRCA	Meme karsinom geni
CA	Karsinom antijeni
CA 15-3	Karsinom antijeni 15-3
CA 27-29	Karsinom antijeni 27-29
cAMP	Siklik Adenozin monofosfat
Cc	Korelasyon katsayısı
CEA	Karsinoembriyonik antijen
CK	Sitokeratinler
CK1	Sitokeratin 1
COX-2	Siklooksijenaz 2
DDT	Dikloro difenil trikloroetan
DF3	Metastatik insan meme karsinomasının membranla zenginleştirilmiş bir kısmına karşı yükseltilmiş

antikor

DFS	Hastaliksız sağkalım
DMBA	Dimetil benzantrasen
DNA	Deoksiribonükleik asit
DNP	2,4-dinitrofenil
DNPH	2,4- dinitrofenilhidrazin
DNPH	Dinitrofenilhidrazin
DSE	Dietilstilbestrol
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
eFABP4	Eksojen yağ asidi bağlayıcı protein 4
ELISA	Enzim bağlı immunosorbent deneyi
ER -	Östrojen reseptör negatif
ER +	Östrojen reseptör pozitif
FABP4	Yağ asidi bağlayıcı protein 4
FFA	Serbest yağ asidi
FISH	Floresan in situ hibridizasyon
HER-2 / cerbB2	İnsan büyüme faktörü reseptörü 2
hK14	Kalikrein 14
HPLC	Yüksek performanslı likit kromatografi
HPR1	Heparanaz 1
HR	Hormon reseptörleri
HRP	Yabanturpu peroksidaz
HSL	Hormon duyarlı lipaz

HSP	Isı şok proteinleri (Heat shock protein)
IARC	Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı
IGF	İnsülin büyüme faktörü
İHK	İmmünohistokimya
kDA	KiloDalton
LIBCSP	Long Island meme Kanseri Çalışma Projesi
M	Metastaz
MDA	Malondialdehit
mL	Mililitre
MMP	Matriks metaloproteinazlar
MS	Kütle spektrometre
MUC1	Müsin antijen 1
Mw	Moleküler ağırlık
N	Nodül
NAF	Meme aspire sıvısı
Ng	Nanogram
NHANES	Ulusal Sağlık ve Beslenme İnceleme Anketi
Nm	Nanometre
OS	Genel sağkalım
p	Anlamlılık
PBDE	Polibromlu difenil eter
PBS	Fosfat tamponlu salin
PEM	Polimorfik epitelyal müsin
PFC	Perflorlu bileşikler

PKA	Proteinkinaz
PR -	Progesteron reseptör negatif
PR +	Progesteron reseptör pozitif
ROS	Reaktif oksijen türleri
RT	Alıkonma süresi
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SNP	Tek nükleotid polimorfizmi
T	Tümör
TBARS	Tiyobarbitürik asit reaktif maddeler
TDLU	Terminal Kanal Lobüler Birimler
TFA	Trifloroasetik asit
TP53/p53	Tümör protein 53
TPM	Tropomiyozin
Vegf	Vasküler endotelyal büyüme faktörleri
VKİ	Vücut kitle indeksi

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

- Şekil 1 : Meme anatomisi (<http://www.turkcerrahi.com/makaleler/meme/meme-anatomisi/>, Erişim tarihi: 6 Şubat 2019) 6
- Şekil 2: Meme yapısında bulunan; lop, lobül, acinüs yapıları (<http://www.turkcerrahi.com/makaleler/meme/meme-anatomisi/>, Erişim tarihi: 6 Şubat 2019). 7
- Şekil 3: Normal hücrelerin kanser hücresine ve metastazik hücrelere dönüşüm basamakları (Bateman, 2002). 8
- Şekil 4: 2018 yılında kadın ve erkeklerde görülen yeni vakalarda kanserlerin dağılım yüzdesi (<http://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/20-Breast-fact-sheet.pdf>, Erişim tarihi: 6 Şubat 2019). 9
- Şekil 5: Meme kanserinde 2018, tahmini yaş standardize edilmiş insidans ve mortalite oranlarının en yüksek olduğu ülkeler (her yaştan hasta). 10
- Şekil 6: in situ duktal karsinom (<https://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/breast-cancer/stages-types-grades/types/ductal-carcinoma-in-situ-dcis> Erişim tarihi: 12 Aralık 2018). 23
- Şekil 7: T1 tümör evresi (<https://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/breast-cancer/stages-types-grades/tnm-staging> Erişim tarihi: 12 Aralık 2018). 24
- Şekil 8: T2 tümör evresi (<https://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/breast-cancer/stages-types-grades/tnm-staging> Erişim tarihi: 12 Aralık 2018). 25
- Şekil 9: T3 tümör evresi (<https://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/breast-cancer/stages-types-grades/tnm-staging> Erişim tarihi: 12 Aralık 2018). 25
- Şekil 10: N3c nodül evresi (<https://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/breast-cancer/stages-types-grades/tnm-staging> Erişim tarihi: 12 Aralık 2018). 28
- Şekil 11: Evre 1A (a), Evre 1B (b) (<https://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/breast-cancer/stages-types-grades/tnm-staging> Erişim tarihi: 12 Aralık 2018). 29

Şekil 12: Evre 2A (a) Evre 2A (b) (https://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/breast-cancer/stages-types-grades/number-stages/stage-2 Erişim tarihi: 12 Aralık 2018).	30
Şekil 13: Şekil 13: Evre 2B (a), Evre 2B (b), Evre 2B (c) (https://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/breast-cancer/stages-types-grades/number-stages/stage-2 Erişim tarihi: 12 Aralık 2018).	31
Şekil 14: Evre 3A (a), Evre 3A (b), Evre 3A (c) (https://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/breast-cancer/stages-types-grades/number-stages/stage-2 Erişim tarihi: 12 Aralık 2018).	32
Şekil 15: Tümörün göğsün derisine yayıldığı evre 3B (a), tümörün göğüs duvarına yayıldığı evre 3B (b) (https://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/breast-cancer/stages-types-grades/number-stages/stage-3 Erişim tarihi: 12 Aralık 2018).	33
Şekil 16: Evre 3C' nin aşamaları (a, b, c) (https://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/breast-cancer/stages-types-grades/number-stages/stage-3 Erişim tarihi: 12 Aralık 2018).	34
Şekil 17: FABP4 standart eğri grafiği.....	64
Şekil 18: HSL standart eğri grafiği.	66
Şekil 19: Elisa Ki67 standart eğri grafiği.	69
Şekil 20: Kontrol grubuna ait kör kromatogramı.....	75
Şekil 21: Hasta grubuna ait kör kromatogramı.	75
Şekil 22: Standart protein karışımının kromatogramı.	77
Şekil 23: Hasta ve kontrol gruplarındaki serum FABP4 konsantrasyon değerleri ng / mL olarak belirlendi ($p < 0,0001$).....	80
Şekil 24: ELISA sonucu elde edilen hasta ve kontrol gruplarındaki HSL konsantrasyon değerleri ng / mL olarak belirlendi ($p > 0,0584$).	80
Şekil 25: ELISA sonucu elde edilen hasta ve kontrol gruplarındaki Ki67 konsantrasyon değeri ng / mL olarak belirlendi ($p < 0,0001$).	81
Şekil 26: FABP4 doku boyamasında hasta dokularda çeşitli değişkenlerle, FABP4 boyanma şiddeti ile Ki67 proliferasyonu anlamlılık ve korelasyon değerlerinin karşılaştırılması.	82

Şekil 27: İnvaziv duktal karsinomlu dokuda FABP4 antikor ile zayıf şiddetli sitoplazmik boyanma.	85
Şekil 28: Şekil 28: İnvaziv duktal karsinomlu dokuda FABP4 antikor ile orta şiddette sitoplazmik boyanma.	85
Şekil 29: Şekil 29: İnvaziv duktal karsinomlu dokuda FABP4 antikor ile kuvvetli sitoplazmik boyanma.	86
Şekil 30: Meme kanserli dokuda yüksek Ki67 proliferasyonu	86
Şekil 31: Meme kanserli dokuda düşük Ki67 proliferasyonu	87
Şekil 32 Meme kanserli dokuda ER+ boyanma	87
Şekil 33 Meme kanserli dokua ER- boyanma.....	88
Şekil 34 Meme kanserli dokuda PR+ boyanma	88
Şekil 35 Meme kanserli dokuda PR- boyanma	89
Şekil 36 Meme kanserli dokuda cerbB2 + boyanma	89
Şekil 37 Meme kanserli dokuda cerbB2 - boyanma	90
Şekil 38: HPLC sonucu elde edilen hasta ve kontrol serum örneklerindeki protein karbonil miktarı (mol karbonil/ mol protein).....	91
Şekil 39: Kontrol ve hasta serum örneklerindeki FABP4 protein yüzde area'ların karşılaştırılması (p> 0,05).	92
Şekil 40: Kontrol ve hasta serum örneklerindeki HSL protein yüzde area'ların karşılaştırılması (p<0,0001).	93
Şekil 41: Kontrol ve hasta serum örneklerindeki Ki67 protein % area'ların karşılaştırılması (p> 0,05).	93

TABLO LİSTESİ

Tablo 1: Meme kanserinde çalışılmış biyomarker'lar ve bu biyomarker'ların tespit yöntemleri (Sarvaiya, 2006).	40
Tablo 2: Meme kanserinde çalışılmış bazı genomik biyomarker'lar (Falato, 2018).	51
Tablo 3: Protein karbonil ölçümü için yapılan derivatizasyon işlemleri	74
Tablo 4: Hasta ve kontrol grubunun demografik verileri.....	78
Tablo 5: Meme Kanserli Hastaların Klinopatolojik Özellikleri Yüzdesi.....	78
Tablo 6 : Hasta ve kontrol serumlarında HPLC'de belirlenen RT değerleri ve bu RT'lerdeki piklerin % area'ları	90

Meme kanserinin erken prognozunda proteomik yaklaşım

Öğrencinin Adı: Elif DİŞ

Danışmanı: Prof.Dr. Şermin TETİK

Anabilim Dalı: Eczacılık/ Biyokimya Anabilim Dalı

1.ÖZET

Amaç: Çalışmayla, örneklerde belirlenen proteinlerin ekspresyon farklılıklarının değerlendirilmesi; meme kanserinin teşhisi, prognozu ya da kişiye özel ilaç ve tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesi ve literatüre katkı sağlanması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: 40 sağlıklı kadının serum örneğiyle, 46 meme kanserli kadının serum ve dokuları alındı. Serumda ELISA ile FABP4, HSL ve Ki67 ekspresyon miktarları karşılaştırıldı. Ayrıca HPLC ile hasta ve kontrol serumlarında FABP4, HSL ve Ki67 modifikasyonları belirlendi. İmmünohistokimyasal yöntemle FABP4 boyaması yapıldı ve dokuların FABP4 boyanma şiddetinin, Ki67 proliferasyonu ve patolojik özelliklerle korelasyonu belirlendi.

Bulgular: ELISA çalışmamızda hasta serumlarında FABP4 ve Ki67 konsantrasyonu anlamlı ($P<0.0001$) şekilde daha fazla bulunurken, HSL konsantrasyonu düşük bulundu ancak istatistiksel olarak anlamlılık bulunmadı ($p>0,05$). Serum örneklerinin HPLC ile karşılaştırılmasındaysa; HSL, FABP4 ve Ki67'nin hastalarda modifiye oldukları görüldü. Sadece HSL proteininin modifikasyonu anlamlı bulundu. İhk çalışmasında yaşla tümör evresi, ER, PR ve tümör çapı; Ki67 proliferasyonu ile histolojik grade, nükleer grade ve PR; lenf nodu metastazıyla tümör evresi ve tümör çapı; FABP4 boyanma şiddetiyle ER; ER ile PR arasında anlamlılık gözlemlendi.

Sonuçlar: Meme kanserli hasta serumlarında FABP4, Ki67, HSL ekspresyonlarındaki değişim ile dokulardaki FABP4 ve Ki67 ekspresyonlarının patolojik özelliklerle arasındaki korelasyon meme kanseri için birer biyomarker olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca protein karbonil miktarları meme kanserli kadınlarda daha fazladır. Bu durumun meme kanserinin tanı ve prognozunda rol oynayabileceği düşünülmektedir.

Anahtar Sözcükler: Biyomarker, proteomik, HPLC, FABP4, HSL

Proteomic approaches for early prognosis of breast cancer

Name of the Student: Elif DİŞ

Supervisor: Prof. Dr. Şermin TETİK

Department: Department of Biochemistry

2.SUMMARY

Purpose: The aim of the study was to evaluate the expression differences of the proteins determined in samples, to improve the diagnosis, prognosis or personalized drug and treatment approaches of breast cancer and contribute to the literature.

Material and Methods: Forty healthy women, forty-six breast cancer women serum and tissue samples were collected. FABP4, HSL and Ki67 expressions were compared via ELISA test in serum. FABP4, HSL and Ki67 modifications were determined by HPLC. The tissue was stained FABP4 with IHC and correlation was determined of FABP4 stained intensity with pathological properties.

Results: In ELISA, the concentrations of FABP4 and Ki67 were significantly ($P < 0.0001$) higher, whereas HSL concentration was lower in patients ($p > 0,05$). There was no significant difference. In comparison of serum with HPLC; it was observed that HSL, FABP4 and Ki67 were modified in patients. Only modification of HSL was found to be significant. In IHC method; between tumor stage and diameter, ER, PR with age; between histological and nuclear grade, PR with Ki67 proliferation; between tumor size and stage with lymph node metastasis; between ER and FABP4 staining intensity; between ER and PR were observed significance.

Conclusions: The correlation between the expression of FABP4, Ki67, HSL in breast cancer patient serum and the expression of FABP4 and Ki67 in tissues suggest that biomarkers maybe a breast cancer. In addition, protein carbonyl amounts are higher in women with breast cancer. This condition plays a role in the diagnosis and prognosis of breast cancer.

Key words: Biomarker, proteomic, HPLC, FABP4, HSL

3. GİRİŞ ve AMAÇ

Meme kanseri dünyada ve ülkemizde kadınları etkileyen, kadınlarda ölüme en çok neden olan kanser türlerinden bir tanesidir

(<https://www.who.int/cancer/prevention/diagnosis-screening/breast-cancer/en/> Erişim tarihi: 6 Şubat 2019).

Meme kanserinin erken teşhisi ve önlenmesi çok önemlidir. Çünkü primer tümör diğer organlara metastaz yaptığı için birçok hasta ileri hastalıklara yenik düşmektedir. Meme tümörlerini tespit etmek için kullanılan güncel yöntemler öncelikle mamografi üzerine kuruludur. Ancak mamografinin de çeşitli kısıtlamaları vardır. Küçük lezyonlar sıklıkla gözden kaçırılır ve özellikle yoğun meme dokusu olan genç kadınlarda görülmeyebilir (Qi, 2008).

Biyomarker, bir hastalığın fizyolojik durumunu veya gelişimini gösteren moleküler yapıdır. Kan, doku veya vücut sıvılarında takibi yapılabilen proteinler, enzimler, reseptörler, hormonlar ve lipitler biyomarker adayları arasında bulunmaktadır (Srinivas ve ark., 2001).

Biyomarker'lar, teşhis, tedavi, izleme ve prognoz için kritik öneme sahip araçlardır. Biyomarker'ların kanser diağnoz, prognoz veya tedavisinde etkili bir şekilde kullanılabilmesi için, kansere spesifik olması ve bu tür biyomarker'ların sadece kanserli doku ve hücrelerde benzersiz bir şekilde ifade edilmesi gerekmektedir. Biyomarker'ların hastalığın sonucu ile güçlü bir ilişkisi olması beklenmektedir. Terapinin seviyesine göre değişen belirli bir biyomarkerın varlığı tedavinin ilerlemesini belirlemek için bir gösterge olarak kullanılmaktadır (Fabian,2007; Kelly ve ark., 2001; <http://www.cancer.gov/cancertopics/types/breast> Erişim tarihi: 10 Haziran 2017).

Son yapılan çalışmalarla, biyomarker keşfinde genomik ekspresyon profillemesinin kanser sınıflaması ve prognostikleme için güvenilir bir yöntem olduğu hipotezi desteklenmektedir. Bununla birlikte, genler herhangi bir katalitik veya sinyal kabiliyetine sahip değildir. Bu nedenle, genetik biyomarker bilgisi tek

başına tümör varlığı ya da tedaviye cevabı tahmin edemez. Proteomik yaklaşım, kanser biyolojisinin kapsamlı gösterimi için esastır (Qi, 2008).

Meme kanserli hastaların serum ve plazmalarında bazı protein seviyelerinde yükselmeler gözlenmektedir. Bu proteinlerin takibi ile hastalığın aktifliği, tekrarlama durumu, metastazı, prognoz ve terapötik cevabı arasında ilişki kurulmaktadır (Lopez, 2015).

Meme kanserli hücrelerin proliferasyon hızı Ki67 proteininin immünohistokimyasal olarak boyanmasıyla ölçülmektedir. Fonksiyonunun bilinmemesine rağmen Ki67, hücre döngüsü sırasında proliferasyon hücrelerinden eksprese edilmektedir. Ki67 indeksi özellikle klinik karar vericilikte önemli bulunmaktadır. Tümörler arasındaki yüksek tekrarlama riski ayırıcı olarak Ki67 indeksi ile kullanılabilir. Çeşitli çalışmalarda Ki67 ekspresyonundaki değişiklikler rapor edilmiştir (Pathmanathan ve Balleine, 2013).

FABP4 adipositlerden salınır ve dolaşımda bol miktarda bulunur. Çeşitli çalışmalarda, adipoz doku kökenli hormonlar aracılığıyla tümör gelişimi ve farklılaşmasının etkilendiği gösterilmiştir. Yüksek serum FABP4 düzeylerinin obezite, meme kanseri gelişimi ve prognozu ile ilişkili olduğu Hancke ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada gösterilmiştir (Hancke ve ark., 2009).

Yoon Jin Cha ve arkadaşları 2017'de 584 meme kanserli hastanın doku mikroyarray ve immünohistokimyasal analizinde; tüm meme kanseri tiplerinde hormon duyarlı lipaz (HSL), perilipin A ve yağ asidi bağlama proteinlerinin (FABP4) yüksek miktarlarda eksprese edildiğini bildirmişlerdir (Cha ve ark., 2017).

Meme kanserinin erken prognozunda kullanılacak aday serum protein biyomarkerlerinin araştırılması ve kliniğe sunulması son derece önem taşımaktadır. Bu çalışmada proteomik çalışma sonucunda güvenilir, hassas ve doğruluk oranı yüksek bir serum protein biyomarker çalışması yapılması amaçlandı. Çalışma sonucu belirlenen protein ekspresyon farklılıklarının; öncelikle hastalığın teşhisine, hastalığa yönelik ilaç ve tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesine, hatta farmakoproteomik yaklaşımla kişiye özel tedavi geliştirilmesine katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

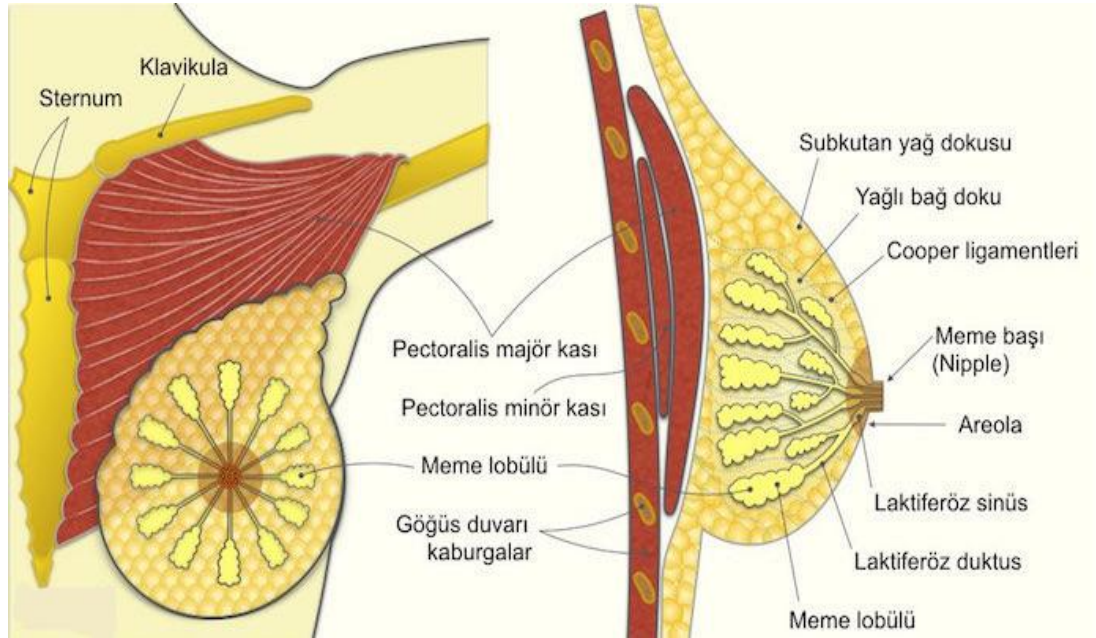
Şimdiye kadar rapor edilen biyomarkerların büyük bir kısmı, hastalığın ilerlemesi, hastalığın tekrarlaması ya da çok ilerlemiş evrede olan hastaların saptanması amacıyla kullanılması tavsiye edilmektedir. Ancak; bu amaçlarla kullanımı için dahi yeterli tahmin gücü olan tek bir biyomarker şimdiye kadar rapor edilmemiştir, bu anlamda literatürde ciddi bir boşluk vardır. Yeni belirteçlerin bulunması hem hastalığın daha erken safhada teşhisinde hem de tedavisinin olumlu ya da olumsuz sonuçlarının izlenmesinde yardımcı olacaktır. Bu amaç ile; serum protein bazlı bu çalışma projesinde HSL, Ki67, FAB4 protein modifikasyonlarının HPLC ile izlenmesi, aynı proteinlerin ekspresyonlarındaki değişimlerin ELISA yöntemi ile korele edilmesi ve immünohistokimyasal metod ile meme dokusundaki FABP4 ekspresyonunun izlenmesi amaçlanmıştır. Günümüzde, ülkemizde klinikte kanserli meme dokusunda histolojik olarak izlenen tek bir marker bulunmaktadır (Ki67). Araştırmamızda proteomik yaklaşımla, meme kanserli hastaların serum ve dokularında yeni biyomarker taraması yapılarak (HPLC ile ilk kez), literature sunulmuş olacaktır.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Meme Anatomisi

Kadınlarda, meme toraksın ön duvarında, iki ile altıncı kaburga kemiklerinin arasında bulunur. Ergin ancak süt üretme döneminde olmayan kadınlarda meme yaklaşık 150 ile 200 gr ağırlığındadır.

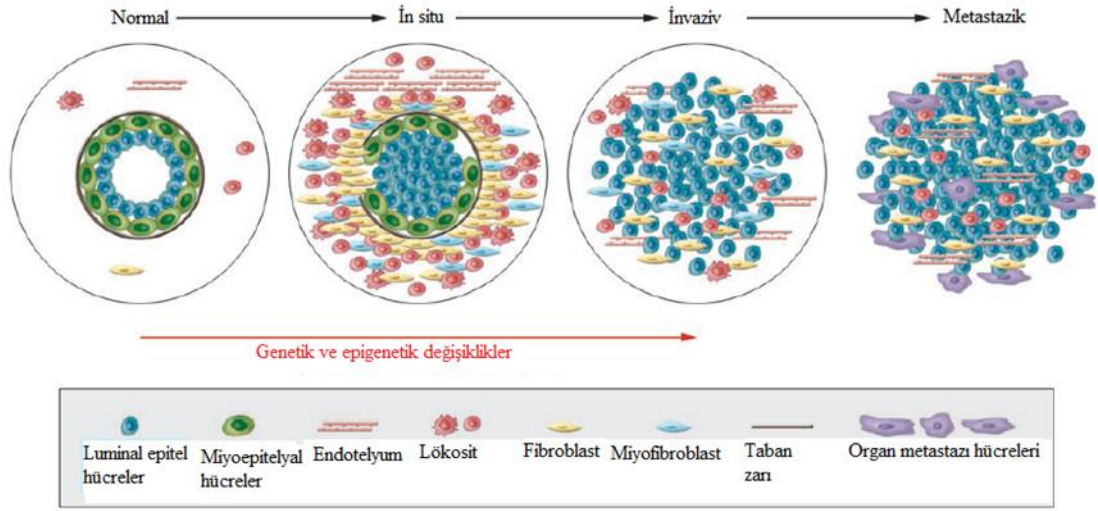
Yetişkin kadınlarda bir memede 15 ile 25 adet arası meme lobu bulunurken her lopta da 20 ile 40 arası lobül ve her lobülde de 10 ile 100 arası alveol vardır. Alveollerde süt yapımında görevli acinüs hücreler bulunur (Şekil 1 ve Şekil 2). Kanalların çevresinde miyoepitelyal hücreler bulunur (<http://www.turkcerrahi.com/makaleler/meme/meme-anatomisi/>, Erişim tarihi: 6 Şubat 2019).



Şekil 1 : Meme anatomisi (<http://www.turkcerrahi.com/makaleler/meme/meme-anatomisi/>, Erişim tarihi: 6 Şubat 2019)

4.2. Meme Kanseri

Meme kanseri; meme dokusunda, az farklılaşmış veya tamamen farklılaşmış hücrelerin malign değişiminden kaynaklanan heterojen bir hastalıktır. Bu heterojenite de meme kanserinde kendine özgü moleküler alt tipler, tedavi yanıtı, hastalık nüksü ve genel sonuçlar oluşmaktadır (Zeidan, 2013) (Şekil 3).

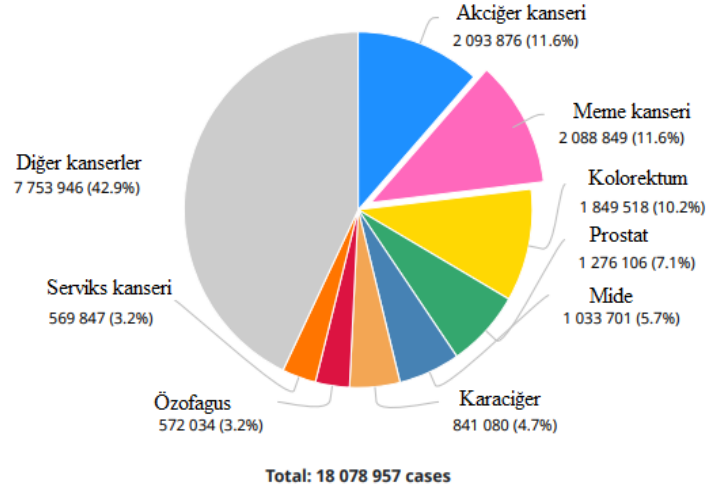


Şekil 3: Normal hücrelerin kanser hücresine ve metastazik hücrelere dönüşüm basamakları (Bateman, 2002).

4.3. Meme Kanserinin Epidemiyolojisi

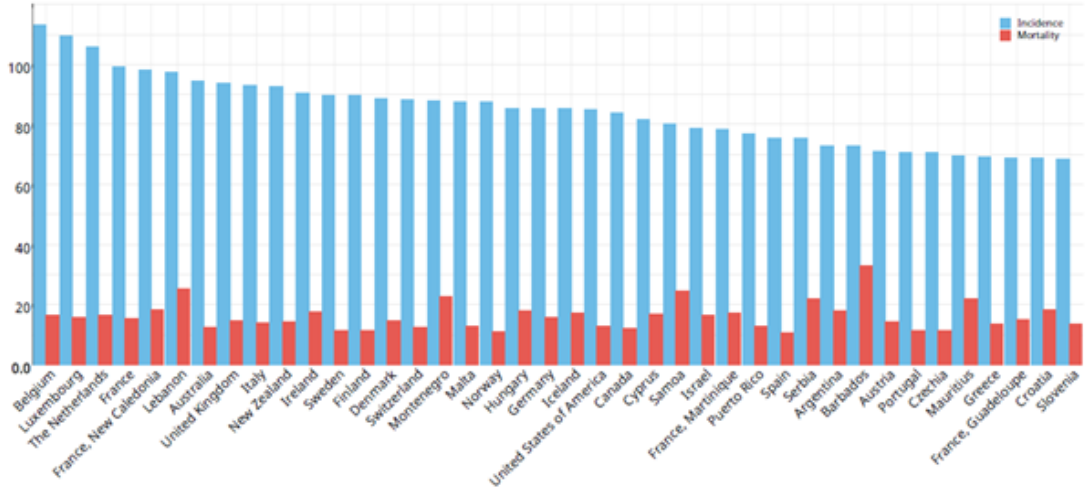
Meme kanseri dünyada ve ülkemizde kadınları etkileyen, tanı ve tedavide yeni gelişmelerin artmasına rağmen, hala kadınlarda ölüme en çok neden olan kanser türlerinden bir tanesidir (Şekil 4). Her yıl 2,1 milyon kadını etkilemektedir. 2018'de 627 000 kadının meme kanserinden öldüğü tahmin edilmektedir ki bu, kadınlar arasındaki tüm kanser ölümlerinin yaklaşık %15'ini oluşturmaktadır. Meme kanseri görülme oranları daha gelişmiş ülkelerdeki kadınlar arasında daha yüksek olmakla birlikte, küresel olarak hemen hemen her ülkede görülme oranları zaman içerisinde artmaktadır (<https://www.who.int/cancer/prevention/diagnosis-screening/breast-cancer/en/> Erişim tarihi: 6 Şubat 2019).

Sağlık bakanlığının hazırlamış olduğu Ulusal Kanser Kontrol Planı'na göre; ülkemizde meme kanseri insidansı 100 binde 40,7 olup, her yıl yaklaşık 15 000 kadın meme kanserine yakalanmaktadır. Türkiye Kanser İstatistiği 2017 verilerine göre, kanser tanısı alan her 4 kadından biri meme kanseridir ve bu oranın gün geçtikçe artacağı düşünülmektedir.



Şekil 4: 2018 yılında kadın ve erkeklerde görülen yeni vakalarda kanserlerin dağılım yüzdesi (<http://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/20-Breast-fact-sheet.pdf>, Erişim tarihi: 6 Şubat 2019).

Meme kanseri insidansı ve mortalitesi dünya üzerinde ülkeden ülkeye farklılık göstermektedir. Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC) istatistiklerine göre 2018 yılı meme kanseri için tahmini kümülatif insidans ve ölüm riskinin en fazla görüldüğü 25 ülke Şekil 5'te gösterilmektedir.



Şekil 5: Meme kanserinde 2018, tahmini yaş standardize edilmiş insidans ve mortalite oranlarının en yüksek olduğu ülkeler (her yaşta hasta).

IARC istatistiklerine göre 2018 yılı meme kanserinin ülkemiz için yaşa göre standardize edilmiş insidans oranı 100 000’de 45,6 ve ölüm oranı ise 100 000’de 10,5 iken tahmini 2018 yılı meme kanseri insidansı 22 345, mortalitesi ise 5 452 olduğu belirtilmiştir.

4.4. Meme Kanserinin Etiyolojisi ve Risk Faktörleri

Neredeyse tüm meme adenokarsinomları terminal kanal lobüler birimlerinin (TDLU) lümenini kaplayan normal meme glandüler epitelinden kaynaklanıyor gibi görünmektedir. Normal TDLU epitel hücrelerinin tipik olarak kansere ve invaziv karsinoma doğru ilerlemesi uzun bir gelişim dönemini takip eder. Bu nedenle normal epitel; malign transformasyona başladığında, hiperplazi olarak bilinen aşırı proliferasyonun ilk aşamasına girmekte ve bunu takiben anormal özellikler gösteren hücrelerin ortaya çıkması gerçekleşmektedir (atipik duktal veya lobüler hiperplazi). in situ karsinom olarak bilinen daha sonraki bir aşamada, hücreler etraftaki parankimayı bazal membrandan istila etme kabiliyeti hariç tam bir malign fenotip kazanmaktadır. Bununla birlikte, son evre karsinomasında hücreler bazal zardan ayrılır ve invaziv bir karsinoma dönüşür. Normal TDLU epitelinden kansere geçiş,

kanserli hastaların biyopsilerinde, kanser hücrelerinin ve çevresindeki karsinomun in situ ya da hiperplazi düzeylerindeki benzerliklerine göre karakterize edilmiştir (Adeyinka ve ark.,2002; Verlinden ve ark.,2004; Alfred ve ark.,2001).

Bununla birlikte, karsinomaya ilerleme, tarif edildiği kadar basit değildir. Bu sürecin karmaşıklığını göstermek için, klinik kanıtlar malign öncesi lezyonların bile olduğunu göstermiştir. Klinik kanıtlar, invaziv karsinomaya en yakın premalign lezyonların bile, doğal evrimleri incelendiğinde her zaman kansere dönüşmeyebileceğini göstermiştir. İnvazyona ilerleyebilecek in situ duktal karsinom olgularının yüzdesini belirlemek neredeyse imkansız olsa da,% 50-60'ın altında olduğu hesaplanmıştır (Erbas ve ark., 2006). Bu nedenle, atipik hiperplazi ve in situ karsinomunun, meme kanseri için zorunlu olmayan öncüler olduğu düşünülmektedir. Meme kanseri normal meme epiteline ortaya çıktığından, normal olarak meme bezi proliferasyonuna yol açan uyaranlar diğer yandan meme kanseri hücrelerinin büyümesini de arttırmaktadır. Meme bezi epiteli proliferasyonu hormonlara belirgin bir bağımlılık göstermektedir. Bu şekilde, kadın memesinin glandüler birimleri, adet döngüsü boyunca siklik bir büyüme ve atrofi, hamilelik ve emzirme döneminde en belirgin hiperplazi; menopoza sonra ise gerileme göstermektedir. Birden fazla hormona bağlı olmasına rağmen, bu değişikliklerin en önemli düzenleyicisi hücrel östrojen reseptörü ile etkileşimi olan östradiol'dür (Ribate, 2007).

Değiştirilebilir risk faktörlerini tespit etmedeki zorlukların bir kısmı, riske olan katkılarının hali hazırda mevcut olan diğer risk faktörlerine göre değişmesi olabilir. Çünkü bunların etkileri yaşam boyu ya da belirli meme kanseri alt tipleri için risk faktörlerinin özgülüğü nedeniyle değişmektedir (Brennan, 2016). Ancak araştırmalar, belirli risk faktörlerinin kanser gelişimini artırabileceğini göstermektedir. Meme kanseri için en çok çalışılan veya şüphelenilen risk faktörleri;

- Yaşın ileri olması,
- cinsiyet,
- ailede meme, over kanseri veya diğer herediter meme ve over sendromları ile ilişkili kanser öyküsü,
- bilinen gen mutasyonu,
- beyaz ırk,

- uzun boy,
- artmış östrojen seviyesi,
- erken menarş,
- geç menapoz,
- menapoz sonrası hormon tedavisi,
- oral kontraseptif kullanımı,
- doğum,
- insulin büyüme faktörü-1 artışı,
- biyopsi sonucunda özellikle atipili meme lezyonları ve in situ karsinoma olması,
- ilk doğum zamanı,
- emzirmeme,
- kilo (postmenapozdaki ve vücut kitle indeksi (VKİ) ≥ 30 kg/m² olanlarda risk artar),
- alkol alımı,
- sigara kullanımı,
- 10-30 yaş arasında göğüs bölgesine yüksek doz radyasyon tedavisi uygulanması,
- azalmış fiziksel aktivite,
- az sebze tüketme artmış meme kanseri riski ile ilişkilendirilebilecek değişkenler arasında sayılmaktadır (Brennan, 2016).

Risk değerlendirmesinin amacı, yüksek riskli kadınlar ile ortalama riskli kadınları ayırmaktır. Birçok risk değerlendirme modeli mevcuttur. Herediter meme kanseri işareti olanlarda Meme kanseri geni (BRCA) 1 veya 2 gen mutasyonu saptanması, aynı akrabada hem over hem meme kanseri görülmesi, birinci derece akrabada senkron bilateral meme kanseri olması, erkekte meme kanseri olması ve 40 yaş altında birinci dereceden en az bir akrabada meme kanseri görülmesi gibi risk faktörleri bulunmaktadır. Non-herediter meme kanseri riski değerlendirebilmek için başlıca Gail ve Claus modellerinden bahsedilmektedir. İki testin de hitap ettiği nüfus farklı olduğundan ilk vizitte hangisinin kullanılacağı detaylı bir anamnez ile belirlenmelidir (Evans ve Howell, 2007).

Gail Modeli: Yalnızca 35 yaş üstü kadınlarda, kuvvetli aile öyküsü olanlarda kullanılabilirken, daha önce invaziv ya da non-invaziv meme kanseri tanısı almış kişilerde kullanılmamaktadır. Sorguladığı değişkenler; ırk, birinci derece akrabalarından meme kanseri öyküsü olanların sayısı, menarş yaşı, ilk doğum yaşı, yapılmış meme biyopsisi sayısı ve atipik hiperplazi varlığıdır (Evans ve Howell, 2007).

Claus Modeli: Meme kanserinde genetik yatkınlığı işaret eder, yüksek geçişli genlerin prevalanslarını baz almaktadır. Kuvvetli aile öyküsü olan ama mutasyon saptanmamış kişilerde kullanılmaktadır. Sadece aile öyküsünü detaylı inceler, diğer değişkenleri göz ardı etmektedir. Sorguladığı değişkenler; yaş, meme kanseri olan birinci ve ikinci derece akraba sayısı ve bu akrabaların tanı yaşıdır (Evans ve Howell, 2007).

Meme kanseri riskini artırma veya azaltma ile ilişkilendirilen önemli risk faktörü bulunmaktadır.

4.4.1. Yaş ve cinsiyet

Cinsiyet ve yaş, meme kanseri için en güçlü risk faktörlerinden iki tanesidir. Meme kanseri riski yaşla birlikte artar ve menopoza kadar her 10 yılda bir iki katına çıkmaktadır (Brennan, 2016). Meme kanserlerinin neredeyse % 80'i 50 yaşın üzerindeki kadınlarda teşhis edilmektedir (Subramani ve Lakshmanaswamy, 2017).

Meme kanseri kadınlarda erkeklere göre yaklaşık 100 kat daha yaygındır (Siegel ve ark., 2016). Kadınlar ve erkekler arasındaki meme kanseri riskindeki farklılıkların hem yapısal hem de hormonal olabileceği düşünülmektedir. Aşırı östrojen maruziyeti meme kanseri için bilinen bir risk faktörüdür. Yüksek östrojen düzeyleri, meme kanseri riskini iki katına çıkarır ve her östrojenin iki katına çıkması durumu riski % 10-20 artırmaktadır (Yager ve Davidson, 2006; Endegeonus ve ark., 2013).

Östrojenin, hem kanser büyümesini başlatabilen hem de arttırabilen nadir kimyasallardan biri olduğuna inanılmaktadır. Östrojen redoks döngüsüne maruz kalır, süperoksit radikalleri ve Deoksiribonükleik asit (DNA) biyomoleküllerine zarar

verebilecek potansiyel olarak hidroksil radikalleri oluşturmakta ve oksidatif strese yol açmaktadır (Wyllie ve Liehr, 1997; Bolton ve Thatcher, 2008).

4.4.2. Coğrafi konum

Yaşa göre düzeltilmiş meme kanseri insidansı ve mortalite oranları ülkeler arasında önemli farklılıklar göstermektedir. Batı ülkelerinde kadınlar da, Uzak Doğu ülkelerinde ki kadınlara kıyasla daha fazla meme kanseri görülmektedir. İlginçtir ki, göçmenler bir ya da iki kuşak içinde göç ettikleri ev sahibi ülkeninkine benzer meme kanseri oranlarına sahiptir. Bu, çevresel faktörlerin meme kanseri gelişimindeki önemini vurgulamaktadır (McPherson ve ark., 2000; Andreeva ve ark.,2007).

4.4.3. Kişisel ve aile öyküsü

Göğüslerinden birinde kanser teşhisi konan bir kadında, kontralateral göğüste veya aynı göğsün bir başka bölgesinde, ilki ile ilgisi olmayan yeni bir meme kanseri gelişme riski 3-4 kat daha fazladır. Bir kadının annesi, kız kardeşi ve ya kızına meme kanseri teşhisi konulmuşsa, kadın hastalığın gelişimi için daha yüksek bir risk altındadır. 2003'te Hollanda'da yapılan bir çalışma da 30-50 yaş aralığındaki 1 milyon kadının, tahmini üçte birinin birinci veya ikinci derece akrabalarında aile meme kanseri öyküsü bulunduğu ve bunların % 80'inin ikinci derece akrabalar olduğu gösterilmektedir (Viehweg ve ark., 2006; Schwab ve ark., 2015).

4.4.4. Kalıtım

Cinsiyet ve yaştan sonra, meme kanseri için en güçlü risk faktörleri kalıtımdır. Kalıtsal meme kanseri çalışmaları, meme kanseri riskini önemli ölçüde artıran birkaç gen tanımlamıştır. Bu kalıtsal genler, nadir görülürler ve tüm meme kanseri vakalarının sadece % 5-10'undan sorumlu tutulmaktadır (Nathanson ve ark., 2001). Bu genler meme kanserine yol açan spesifik yolları anlamada önemlidir ve sporadik meme kanserinde önemli olabilmektedir. Genel olarak kalıtsal meme kanseri ile ilişkili genler, DNA onarımı ve genomik bütünlüğün korunmasına ortak katılımda bulunmaktadır (Narod ve ark., 2000).

4.4.4.1. BRCA1 ve BRCA2 gen mutasyonları

Kalıtısal meme kanseri ile ilişkili genlerden BRCA1 ve BRCA2'deki mutasyonlar, yaşam boyu meme kanseri riskini % 80'e kadar arttırarak kalıtsal meme kanserlerinin yaklaşık % 40-50'sinden sorumlu tutulmaktadır (Narod ve ark., 2000). BRCA1 ve BRCA2, homolog rekombinasyon ve çift sarmal kırma onarımında yer almaktadır. BRCA1 aynı zamanda hücre döngüsü kontrol noktası kontrolü, kromatin yeniden düzenlemesi, transkripsiyon düzenleme, protein çoğalması ve antioksidan düzenleme ile de ilgilidir (Narod ve ark., 2000; Gorini ve ark., 2013; Narod ve Foulkes, 2004). in vitro çalışmalar, BRCA1 ve BRCA2'nin, transkripte edilen stand üzerindeki 8-Oks0-2'-deoksiguanozin (8-OxodG) lezyonlarının transkripsiyonla birleştirilmiş onarımı ve nükleotid eksizyon onarımında yer aldığını ve BRCA1 ve BRCA2 eksikliği olan hücrelerde biriken 8-OxodG lezyonlarının yüksek seviyelerde olduğu gösterilmiştir. BRCA1 ve BRCA2'nin her iki kopyasındaki kayıp, embriyonik olarak öldürücü olmaktadır (Hakem ve ark., 1996). BRCA1 ve BRCA2 aleli bulundurma ile sadece bir tanesini bulundurma durumu arasında meme ve yumurtalık kanseri riskinin artması dışında bariz bir fenotipik fark görülmemiştir (Narod, 2000). BRCA1 ve BRCA2 mutasyon taşıyıcılarındaki hemen hemen tüm tümörler, işleyen BRCA1 ve BRCA2 alelini kaybetmiş ve ayrıca çoğu, tümör protein 53 (TP53 / p53) ve ya başka hücre döngüsü kontrol noktası kontrol genlerinde mutasyona sahip olduğu bilinmektedir. Bu ek mutasyonlar, BRCA1 / 2 ile ilgili kanserojenez için kritik görünmektedir (Schuyer ve Berns, 1999).

p53 mutasyonları, BRCA1 / 2 meme kanserlerinde sporadik olanlardan iki ila üç kat daha sık görülmektedir. Ek olarak, bu apoptozdan kaçınma ve BRCA1 / 2 defektlerine rağmen proliferasyonun devam etmesi meme ve yumurtalık hücreleri ile sınırlı görünmektedir (Schuyer ve Berns, 1999).

4.4.5. Meme lezyonları varlığı

Dijital mamografi ve vakum destekli biyopsi sistemlerinin ortaya çıkmasıyla meme lezyonları yüksek frekansta tespit edilmektedir. Atipik hiperplazi (lobüler

veya duktal) veya lobüler karsinomun daha önceki meme biyopsisi sonucu bir kadının meme kanseri riskini 4-5 kat arttırır. Memede belirsiz malign potansiyel lezyonları, gelecekte invaziv meme kanserinin olası gelişimi ile ilişkilidir (Subramani ve Lakshmanaswamy, 2017).

4.4.6. Irk

Kafkasyalı kadınlar; Afrikalı-Amerikalı, Asyalı, İspanyol ve Kızılderili kadınlara göre daha fazla meme kanseri riski taşımaktadır. Çeşitli ırklardaki meme kanserine yönelik epidemiyolojik ve klinik veriler toplanıp rapor edildikçe, riskteki bu fark yavaşça yok olmaktadır (Brennan, 2017; Bandera ve ark., 2015).

4.4.7. Kilo artışı

Obez ve premenopozal kadınlarda meme kanseri riskinin düşük olduğuna inanılmakta, ancak bu durum henüz kanıtlanmamıştır. Öte yandan, obez postmenopozal kadınların meme kanseri geliştirme riski daha fazla görülmektedir. Menopoz sonrası kadınlarda trunkal obezite özellikle artmış risk ile ilişkilendirilmiştir. Obez postmenopozal kadınların, Östrojen reseptör pozitif (ER +) meme kanseri gelişme riskinin % 70 daha yüksek olduğunu tespit eden dört bağımsız çalışma bulunmaktadır. Yetişkinlik döneminde olağandışı vücut ağırlığı artışı, menopoz öncesi ve sonrasında meme kanseri riskini önemli ölçüde arttırmaktadır (Brennan, 2017).

4.4.8. Kimyasal maddeler ve alkol

NHANES (Ulusal Sağlık ve Beslenme İnceleme Anketi) verilerinin, hamile kadınların % 99-100'ünün poliklorlu bifeniller, organoklorlu pestisitler, perflorlu bileşikler (PFC'ler), fenoller, polibromlu difenil eterler (PBDE'ler), ftalatlar, polisiklik aromatik hidrokarbonlar ve perklorat gibi kimyasal maddelere maruz kaldığını göstermiştir (Woodruff ve ark., 2004). Sıçanlarda, kanserojen Dimetil benzantrasene (DMBA) (tütün dumanında bulunan bir polisiklik aromatik hidrokarbon) maruz kalma, meme terminal uç tomurcuklarının alveol tomurcuklarına

ayrılmadan önce maruz kalma meydana geldiğinde 2 kat daha fazla tümör ürettiği görülmüştür (Colditz ve Frazier, 1995). İnsan çalışmalarında, dikloro difenil trikloroethana (DDT) maruz kalmanın premenopozal meme kanseri riskini yalnızca 14 yaşından önce maruz kalan kadınlarda arttırdığı bulunmuştur (Sorlie ve ark., 2001). Sentetik bir östrojen olan Dietilstilbestrole (DES) maruz kalma durumunda 3 kat daha fazla meme kanseri riski ortaya çıkmaktadır (Palmer ve ark., 2006). Atom bombası mağdurları ile yapılan çalışmada, 20 yaşından önce maruz kalan kadınların 13 kat artmış nispi riskle en yüksek meme kanseri riskine sahipken, 35 yaşın üzerindeki kadınların 2 kat meme kanseri riskine sahip olduğunu bulunmuştur. (Brennan, 2016).

Alkol tüketimi, artan meme kanseri riski ile ilişkilidir. Günde bir alkollü içki tüketen kadınların, içmeyenlere kıyasla biraz daha fazla meme kanseri riski bulunmaktadır. Haftada üç ila beş içki içen genç kızlar, aynı yaştaki kızlara göre daha sık meme lezyonları geliştirmektedirler. 53 çalışmadan elde edilen verilerin meta analizinde, günde bir kez tüketilen bir alkollü içeceğin, % 7 oranında meme kanseri riskini arttırdığı, günde iki ila üç kez alkol içen kadınlarda % 20 oranında meme kanseri riskinde artış tespit edilmiştir (Hamajima ve ark., 2002; Allen ve ark., 2009).

4.4.9. Radyasyon

Aşırı radyasyona maruz kalan kadınlar daha yüksek risk altındadır. Bir kadın ne kadar genç yaşta aşırı radyasyona maruz kalırsa, yaşam boyu meme kanseri geliştirme riski o kadar yüksek olmaktadır. Genç yaşta Hodgkin hastalığı olan ve radyasyon tedavisi alan kadınlarda, sonraki yaşlarda Hodgkin hastalığı olan ve radyasyon tedavisi alan kadınlara kıyasla meme kanseri geliştirme riski yaklaşık 7 kat daha fazla bulunmaktadır (İbrahim ve ark., 2012).

4.4.10. Üreme ve hormonal faktörler

1700'lerin başından beri üreme faktörlerinin meme kanseri insidansında rol oynadığı bilinmektedir. Nullipar kadınlarda, 50 yaşından sonra teşhis edilen meme

kanseri olasılığı yaklaşık % 20-70 oranında artmıştır. Meme kanseri teşhisinde daha erken yaşta olmak üzere, parite sayısı riski arttırıyor gibi görünmektedir çünkü gebelik hormonları kanser öncesi lezyonların büyümesini teşvik etmektedir. 20 yaşından önce tam süreli bir hamilelik olması, 30 yaşında gerçekleşen ilk canlı doğumla karşılaştırıldığında meme kanseri riskini yarı yarıya azaltır (Kelsey ve ark., 1993; Russo ve ark., 1994). İlk doğumu 35 yaşında veya daha büyük olan kadınlar, nullipar kadınlardan daha fazla meme kanseri riski altındadır. Hiçbir zaman tam bir hamilelik geçirmemiş kadınlarda ve 35 yaşından sonra ilk kez tam bir hamilelik geçirmiş olan kadınlarda meme kanseri riski daha yüksektir. 20 yaşından önce ilk tam hamilelik geçiren kadınların meme kanseri geliştirme riski % 50 azalmaktadır (Subramani ve Lakshmanaswamy, 2017).

İlk menarşi 15 yaş ve üstü olan kadınlar, menarşta 12 yaşın altındaki kadınlardan % 20 oranında daha az meme kanseri olasılığına sahiptir. Bunun nedeni, menarşın daha erken yaşta olması, memeyi daha fazla aylık hormon dalgalanmalarına maruz bırakmasındandır (Brennan, 2016).

Benzer şekilde menopozda geç bir yaş (> 55), 45 yaşından önce doğal menopoza ulaşanlara göre riskte iki kat artışa neden olmaktadır. Çalışmalar, 20-40 yaş arasında aylık adet döngüleri kısa süren kadınlarda meme kanseri riskinin fazla olduğu görülmüştür. Adet döngüsü kısa olan kadınlar, yaşamları boyunca daha fazla adet döngüsü yaşayacak, diğer tüm faktörleri sabit tutabilecek ve östrojen ve progesteron seviyelerinin, meme dokusunun mitotik aktivitesi ile birlikte en üst seviyeye geldiği adet döngüsünün luteal aşamasında daha fazla zaman geçirecektir (Brennan, 2016).

4.4.11. Emzirme

Emzirme, meme kanseri için değiştirilebilir bir risk faktörü olarak tanımlanmıştır. Epidemiyolojik veriler emzirmenin meme kanseri riskini azalttığını göstermektedir. Büyük bir metaanaliz, her 12 aylık emzirme için meme kanseri riskinin % 4,3 oranında azaldığını göstermiştir. Ancak, risk azaltma çok küçüktür ve temel olarak menopoz öncesi kadınlar ile ilişkili bulunmuştur. Emzirmenin neden olduğu risk azalmasının nedeni anlaşılmamıştır. Emzirmenin yumurtlamayı bastırmasından dolayı bir kadının yaşamı boyunca yaşadığı adet döngüsünün

sayısındaki azalma ile de ilgili olabileceği düşünülmektedir (Subramani ve Lakshmanaswamy, 2017).

4.4.12. Oksidatif stres

Tüm organizmalar ve hücreler, mitokondri yoluyla ve iyonlaştırıcı radyasyon yoluyla reaktif oksijen türleri (ROS) üretimi dahil olmak üzere endojen veya eksojen ROS'a sürekli olarak maruz bırakılmaktadır. Antioksidanlar tarafından denge kurulamazsa, reaktif oksijen türlerinin hücrel makromoleküllerde oksidatif hasara yol açtığı ve sonunda hastalıkların gelişmesine yol açabileceği bilinmektedir. ROS makromoleküller ile reaksiyona girerek ve bunları değiştirerek veya tahrip ederek hücrel makromoleküllere (örneğin, nükleik asitler, proteinler ve lipitler) zarar verebilir; lipid zincirlerinin kırılması, proteinlerin bölgeye özgü amino asit modifikasyonu, enzim inaktivasyonu, DNA'nın iplik kopması ve modifikasyonları gibi çeşitli şekillerde gerçekleşebilir (Danielsen, 2015).

Oksidatif stres, obezite, yaşlanma, Behçet hastalığı, kanser, Alzheimer ve Parkinson gibi nörodejeneratif hastalıklar dahil olmak üzere bir dizi tıbbi durumla ilişkilidir (Beal, 2002; Tetik ve ark., 2011).

4.5. Meme Kanserinde Prognostik Parametreler

Prognostik bir faktör, hastalar için sonucu tahmin edebilen değerlendirilebilir bir faktör olarak tanımlanabilirken, tedavi etkisinin öngörücü bir olasılığını yansıtmaktadır.

4.5.1. Meme kanserinde prognostik faktörler

Erken meme kanserinde prognostik faktörler şu şekilde gruplandırılabilir;

Klinik faktörler: yaş; ırk.

Patolojik faktörler: primer tümör büyüklüğü; aksiller lenf nodu tutulumu; aşama; tümör morfolojisi; histolojik sınıf; peritümöral lenf-vasküler istilası; hormon reseptörleri (HR) ve HER2 (İnsan büyüme faktörü reseptörü 2) aşırı ekspresyonu.

Proliferasyon faktörleri: Ki67, HSL, FABP4

Genomik faktörler: PAM50; 21-gen Nüks Skoru; 70 gen imzası; EndoPredict; Genomik Sınıf İndeksi; Meme Kanseri İndeksi (BCI)

Proteomik faktörler: MUC-1 (müsin antijen 1) , CA 15-3 (kanseri antijeni 15-3), CA 27-29 (kanseri antijeni 27-29), Katepsin-D, FABP4 (yağ asidi bağlayıcı protein-4), Ki67, HSL (hormon duyarlı lipaz), CEA (karsinoembriyonik antijen), (Falato, 2018).

4.5.2. Klinik faktörler

4.5.2.1. Yaş

65 yaş ve üstü ile 35 yaş ve altı hastalar kötü prognoza sahiptir ((Falato, 2018). Tanı sırasında 35 yaş veya daha küçük yaştaki hastalar, tümör evresi, histopatolojik özellikler ve içsel bir agresif biyolojiye işaret eden tedaviler uygulandıktan sonra bile, mutlak 5 yıllık sağkalım süresine (35 ila 69 yaş arası kadınlar için yüzde 74,7 karşı yüzde 83,8 ila 88,3) sahiptir (Fredholm ve ark., 2009; Anders ve ark., 2008).

Meme kanseri teşhisi konmuş 65 yaş üstü kadınlarda, esasen daha sonraki teşhis aşamalarından, komorbiditeler ve daha az agresif tedavilerden dolayı ölüm oranları yüksektir. Özellikle HER2-pozitif tümörlerde yaş, hem tedavi edilmemiş ve hem trastuzumab alan kadınlarda prognozla anlamlı bir şekilde ilişkili bir faktör değildir. Yaklaşık 17 500 hasta üzerinde yapılan bir analiz sonucunda, 40 yaş altı lümen A veya B meme kanseri teşhisi konan kadınların ancak HER2-pozitif tümörleri olmayanların yaşlı kadınlara göre daha yüksek ölüm riski olduğunu ortaya çıkarılmıştır (Falato, 2018).

4.5.2.2. Irk

Göğüs malignitesi, siyahi kadınlarda ABD' deki beyaz kadınlara oranla daha fazla görülmektedir. Bununla birlikte, meme kanserinden ölüm oranlarında genel bir düşüşe rağmen, siyah kadınlarda ölüm oranı hala daha yüksektir ve siyah kadınlarda görülme sıklığı oranları göz önüne alındığında, en azından önümüzdeki birkaç yıl boyunca meme kanserinde ırksal eşitsizliklerin devam etmesi beklenmektedir (DeSantis ve ark., 2016).

Irk eşitsizlikleri, kısmen sosyo-ekonomik faktörlere (sağlık bakım sistemine erişim ve taramaya erişim, tedavinin başlamasında gecikme) ve kısmen de Afrikalı-Amerikalı kadınlar arasında biyolojik olarak agresif bazal benzeri tümörlerin görülme sıklığına bağlanmaktadır. İsveç'te 1961 ile 2007 yılları arasında ülke çapında yürütülen araştırmada, meme kanseri görülme sıklığının zamanla artmasına rağmen, yerli İsveçliler ile karşılaştırıldığında göçmenler (özellikle Asya ve Latin-Amerika'dan gelenler) arasında daha düşük olduğu ortaya konuldu. Küresel olarak, ölüm oranı hem yerli İsveçliler hem de göçmenler için azalırken, son yıllarda meme kanseri tanısı alan göçmenler arasında % 20 daha fazla vaka ölümü tanımlanmıştır. Bu durum daha yüksek sosyo-ekonomik düzey daha yüksek insidans ve daha düşük ölüm oranı ile ilişkilendirilmiştir. Bu eşitsizlik, tarama programlarına katılma ve reçete edilen tedavilere uyma olasılıkları daha düşük olan kadınlar üzerindeki müdahaleleri hedeflemenin önemini vurgulamaktadır (Beiki ve ark., 2012).

4.5.3. Patolojik faktörler

4.5.3.1. Birincil tümör boyutu

Birincil tümör boyutu, birincil tümörün en büyük çapı olarak tanımlanmaktadır. 5 yıllık sağ kalım, <2 cm tümörler için % 91 iken, tümör çapı >5 cm olanlar için %63'tür (Carter ve ark., 1989). Tümör büyüklüğü aksiller lenf nodlarında metastaz gelişme riski ile ilişkilidir ancak iki faktör birbirinden prognostik olarak bağımsızdır. ER negatif tümörlerde tümör boyutu ile nodal tutulum ve ölüm riski arasındaki korelasyon zayıf bulunmuştur (Foulkes ve ark., 2009).

4.5.3.2. Aksiller lenf nodu tutulumu

Aksiller lenf nodu tutulumu ve metastatik lenf nodu sayısı güçlü ve bağımsız bir prognostik faktördür. Memede yerleşim gösteren tümörlere karşı bölgesel lenf bezlerine yayılan tümörlerde 5 yıllık sağ kalım oranı tümör büyüklüğünden bağımsız olarak sırasıyla %99 ve %85'tir (Carter ve ark., 1989; Siegel ve ark., 2017). Ek olarak, incelenen aksiller nodlarda mikro-metastaz varlığı, metastaz olmaması ile karşılaştırıldığında daha kötü prognoz ile ilişkilidir, lenf nodu negatif hastalar ve izole tümör hücreli hastalar arasında sağ kalımda herhangi bir fark görülmemiştir (Andersson ve ark., 2010; de Boer ve ark., 2010). Lenf nodunda başlangıçta metastaz olmadığı düşünülen ancak retrospektif olarak gizli metastazlar tanımlanması sağ kalım üzerinde olumsuz bir etkiye sahiptir (de Boer ve ark., 2010; Weaver ve ark., 2011).

4.5.3.3. Evre

Güçlü bir prognostik faktördür. Meme kanseri için en yaygın kullanılan evreleme sistemi TNM sistemidir. Bu sistem, kanserleri üç ana noktaya dayanarak aşamalara ayrılmaktadır:

T, tümörün boyutunu açıklar.

N, lenf nodlarında herhangi bir kanser hücresi olup olmadığını açıklar.

M, kanserin vücudun farklı bir bölgesine yayılıp yayılmadığını açıklar.

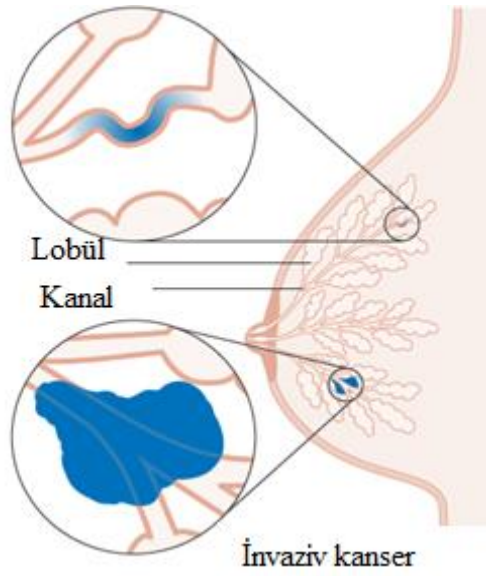
TNM sistemi iki kurum tarafından düzenli olarak güncellenir, Amerikan Kanser Ortak Komitesi (AJCC) ve Uluslararası Kanser Kontrol Birliği (UICC). Primer tümör (T), lenf nodu ilişkisi (N) ve metastazlar (M) hakkındaki bilgi klinik, radyolojik ve patolojik inceleme ile toplanır, tümöre ayrı ayrı T, N ve M bileşenlerine göre bir derece verilebilir (<https://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/breast-cancer/stages-types-grades/tnm-staging> Erişim tarihi: 12 Aralık 2018).

4.5.3.3.1. Tümör (T)

Tümör, tümörün boyutunu (kanser alanını) açıklamaktadır

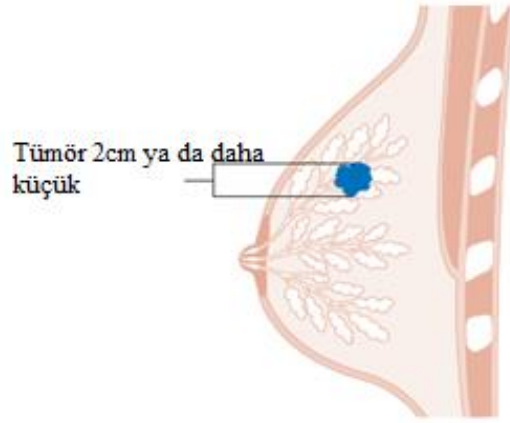
TX, tümör boyutunun değerlendirilemediği anlamına gelmektedir

Tis in situ duktal karsinomu (DCIS) ifade etmektedir (Şekil 6).



Şekil 6: in situ duktal karsinom (<https://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/breast-cancer/stages-types-grades/types/ductal-carcinoma-in-situ-dcis> Erişim tarihi: 12 Aralık 2018).

T1, tümörün büyüklüğünün 2 cm civarında ya da daha az olduğu anlamına gelmektedir (Şekil 7).

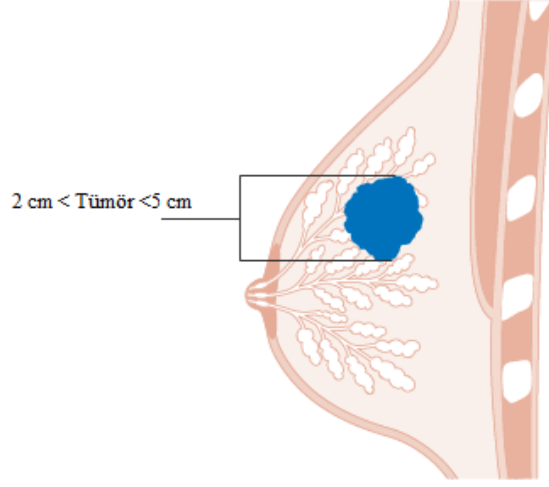


Şekil 7: T1 tümör evresi (<https://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/breast-cancer/stages-types-grades/tnm-staging> Erişim tarihi: 12 Aralık 2018).

T1 ayrıca 4 gruba ayrılır:

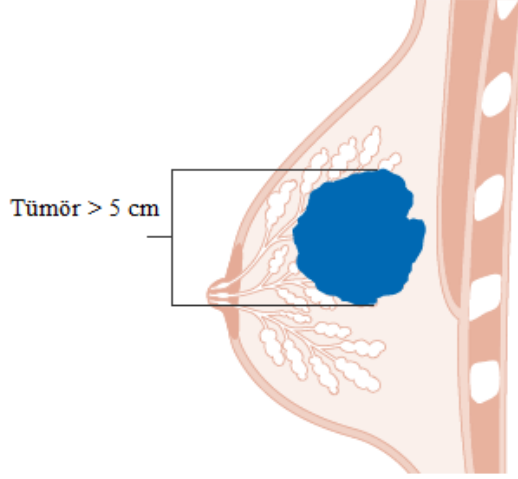
- T1mi, tümörün 0.1 cm veya daha az olduğu anlamına gelmektedir
- T1a, tümörün 0.1 cm'den daha fazla fakat 0.5 cm'den daha fazla olmadığı anlamına gelmektedir
- T1b, tümörün 0,5 cm'den daha fazla fakat 1 cm'den daha fazla olmadığı anlamına gelmektedir
- T1c, tümörün 1 cm'den fazla fakat 2 cm'den fazla olmadığı anlamına gelmektedir.

T2, tümörün 2 santimetreden daha fazla fakat 5 santimetreden daha fazla olmadığı anlamına gelmektedir.



Şekil 8: T2 tümör evresi (<https://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/breast-cancer/stages-types-grades/tnm-staging> Erişim tarihi: 12 Aralık 2018).

T3, tümörün genelinde 5 santimetreden büyük olduğu anlamına gelir.



Şekil 9: T3 tümör evresi (<https://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/breast-cancer/stages-types-grades/tnm-staging> Erişim tarihi: 12 Aralık 2018).

T4, 4 gruba ayrılır:

- T4a, tümörün göğüs duvarına yayıldığı anlamına gelmektedir (akciğerleri çevreleyen ve koruyan yapılar)
- T4b, tümörün cilde yayıldığı ve memenin şişebileceği anlamına gelmektedir
- T4c, tümörün hem cilde hem de göğüs duvarına yayıldığı anlamına gelmektedir
- T4d, enflamatuvar karsinom anlamına gelir; bu, üstteki cildin kırmızı, şiş ve ağrılı olduğu bir kanserdir.

4.5.3.3.2. Nodül (N)

Nodül (N), kanserin lenf bezlerine yayılıp yayılmadığını açıklar.

NX, lenf nodüllerinin değerlendirilemediği anlamına gelmektedir (örneğin, daha önce çıkarılmışlarsa).

N0, yakındaki herhangi bir düğümde kanser hücresi olmadığı anlamına gelmektedir

İzole edilmiş tümör hücreleri, bir lenf düğümünün bir alanındaki 0.2 mm'den daha küçük kanser hücreleri kümeleri veya tek bir tümör hücresi ya da 200'den az hücreden oluşan kümelerdir. Sadece izole edilmiş tümör hücrelerini içeren lenf düğümleri, pozitif lenf düğümleri olarak sayılmamaktadır.

N1, kanser hücrelerinin koltuk altındaki lenf düğümlerinde bulunduğunu, ancak düğümlerin çevre dokulara yapışmadığını göstermektedir.

pN1mi, bir veya daha fazla lenf nodunun, 0.2 mm'den büyük mikrometastaz adı verilen kanser hücrelerinin alanlarını içerdiği anlamına gelmektedir. Veya düğümler 200'den fazla kanser hücresi içerir ancak 2 mm'den az büyüklüktedir.

pN1a, kanser hücrelerinin 1 ila 3 lenf düğümüne yayıldığı (metastaz yaptığı) ve en az birinin 2 mm'den büyük olduğu anlamına gelmektedir.

pN1b, sentinel düğümü biyopsisi ile bulunan göğüs kemiğinin (iç meme düğümleri) arkasındaki lenf düğümlerinde kanser hücreleri olduğunu, ancak alanların hissetmek için çok küçük olduğu anlamına gelmektedir.

pN1c, koltukaltı içinde 1 ila 3 lenf düğümünde ve göğüs kemiğinin arkasındaki lenf düğümlerinde kanser hücreleri olduğunu, ancak hissetmek için çok küçük oldukları anlamına gelmektedir.

N2, 2 gruba ayrılır:

N2a, koltuk altındaki lenf düğümlerinde birbirlerine ve diğer yapılara yapışmış kanser hücreleri olduğu anlamına gelmektedir.

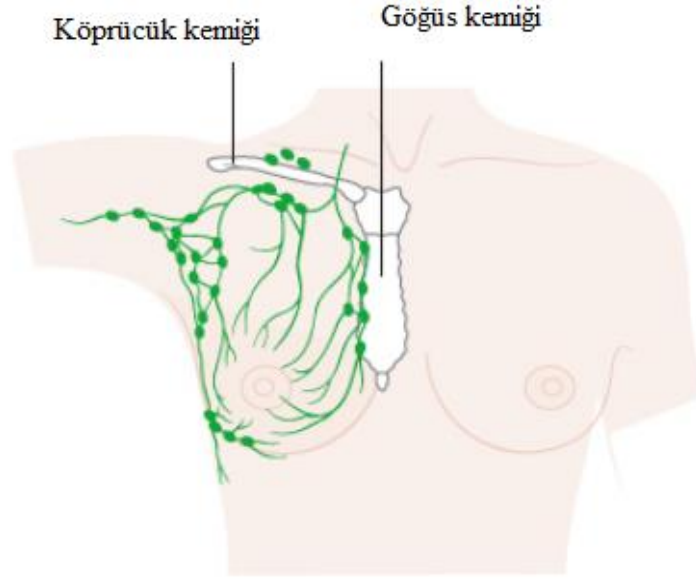
N2b, bir taramada doktor tarafından görülen veya hissedilen meme kemiğinin arkasındaki lenf düğümlerinde (iç meme düğümleri) kanser hücreleri olduğu anlamına gelmektedir. Koltuk altındaki lenf bezlerinde kanser kanıtı yoktur.

N3, 3 gruba ayrılır:

N3a, köprücük kemiğinin altındaki lenf düğümlerinde kanser hücreleri olduğu anlamına gelmektedir.

N3b, koltuk altı ve göğüs kemiğinin arkasındaki lenf düğümlerinde kanser hücreleri olduğunu göstermektedir.

N3c, köprücük kemiğinin üzerindeki lenf düğümlerinde kanser hücreleri olduğu anlamına gelmektedir (Şekil 10).



Şekil 10: N3c nodül evresi (<https://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/breast-cancer/stages-types-grades/tnm-staging> Erişim tarihi: 12 Aralık 2018).

4.5.3.3.3. Metastaz (M)

Metastaz (M), kanserin vücudun farklı bir bölgesine yayılıp yayılmadığını açıklar.

M0, kanserin yayıldığına dair bir işaret olmadığı anlamına gelir.

cMo (i +), fizik muayene, tarama veya röntgende kanser belirtisi olmadığı anlamına gelir. Ancak kanser hücreleri kanda, kemik iliğinde veya meme kanserinden uzakta lenf düğümlerinde bulunur - hücreler laboratuvar testlerinde bulunur

M1, kanserin vücudun başka bir bölümüne yayıldığı anlamına gelir.

4.5.4. Patolojik faktörlerin değerlendirilmesi

Patolojik faktörlerin değerlendirilmesi kanser tipini ve çevredeki dokulara yayılıp yayılmadığını göstermektedir.

Evre1

Evre 1 meme kanseri, kanserin küçük olması ve sadece meme dokusunda olması veya memeye yakın lenf düğümlerinde bulunabileceği anlamına gelmektedir. Erken evre meme kanseridir.

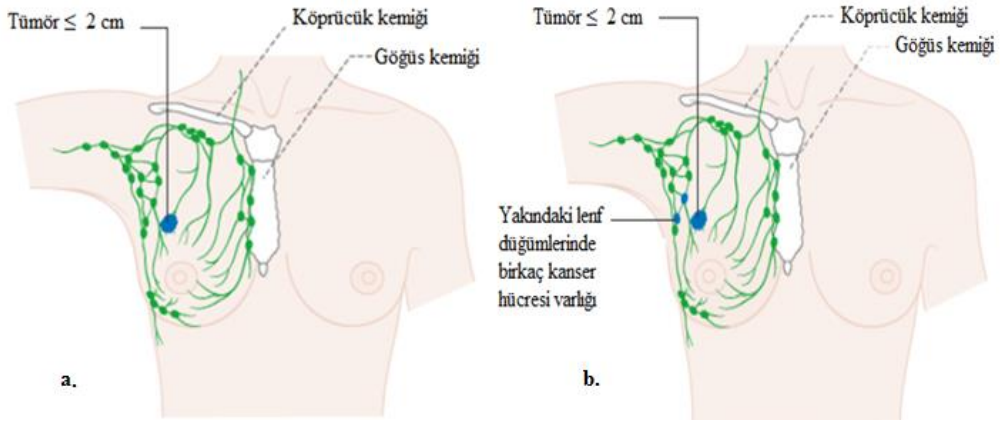
Evre 1 meme kanseri 2 gruba ayrılır:

Evre 1A

Evre 1A, tümörün 2 santimetre (cm) veya daha küçük olduğu ve göğüs dışına yayılmadığı anlamına gelmektedir (Şekil 11.a).

Evre 1B

Evre 1B, memede tümör bulunmadığı ancak meme kanseri hücrelerinin göğse yakın olan lenf düğümlerinin küçük alanlarında bulunduğu veya meme tümörü 2 cm ya da daha küçüktür ve meme kanseri hücrelerinin göğse yakın olan lenf düğümlerinin küçük alanlarında bulunduğu anlamına gelmektedir (Şekil 11 (b)).



Şekil 11: Evre 1A (a), Evre 1B (b) (<https://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/breast-cancer/stages-types-grades/tnm-staging> Erişim tarihi: 12 Aralık 2018).

TNM evreleme sisteminde; Evre 1A: T1 N0 M0, Evre 1B: T0 N1mi M0, T1 N1mi M0 ile aynı anlama gelmektedir.

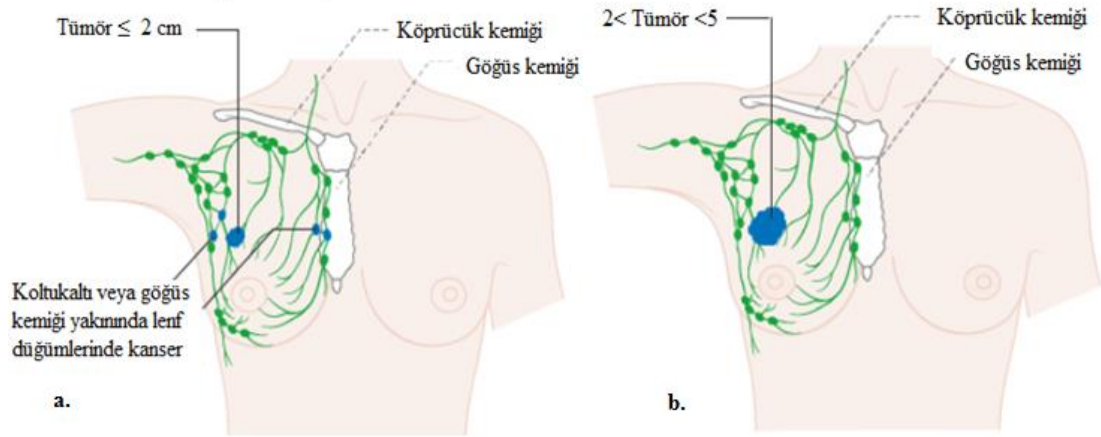
Evre 2

Erken evre meme kanseridir. Evre 2 meme kanseri, kanserin memede veya yakındaki lenf düğümlerinde veya her ikisinde olduğu anlamına gelir. Evre 2 meme kanseri, evre 2A ve 2B olmak üzere ikiye ayrılmaktadır.

Evre 2A

Evre 2A, aşağıda belirtilen durumlardan biri anlamına gelmektedir.

- Meme içerisinde 2 santimetre (cm) veya daha küçük tümör bulunur veya bir tümör yoktur ve kanser hücreleri, koltuk altındaki 1 ila 3 lenf düğümünde veya göğüs kemiğinin yanındaki lenf düğümlerinde bulunur (Şekil 12.a).
- Tümör 2 cm'den büyük fakat 5 cm'den büyük değil ve lenf bezlerinde tümör yoktur (Şekil 12.b).

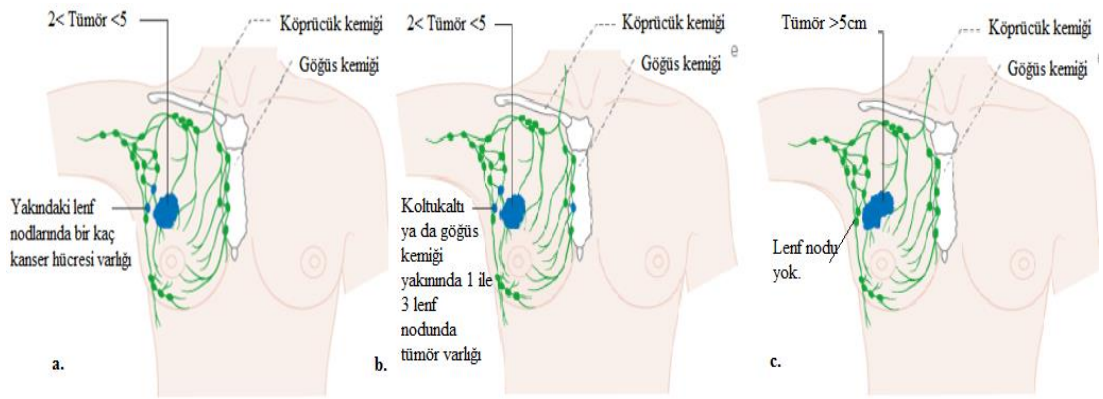


Şekil 12: Evre 2A (a) Evre 2A (b) (<https://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/breast-cancer/stages-types-grades/number-stages/stage-2> Erişim tarihi: 12 Aralık 2018).

Evre2B

Evre 2B, aşağıdaki durumlardan biri anlamına gelmektedir.

- Tümör 2 cm'den büyük fakat 5 cm'den büyük değil ve lenf düğümlerinde kanser hücrelerinin küçük olduğu alanlar bulunmaktadır (Şekil 13.a).
- Tümör 2 cm'den büyük ancak 5 cm'den büyük değil ve kanser koltuk altındaki 1 ila 3 lenf düğümüne veya göğüs kemiği yakınındaki lenf düğümlerine yayıldı (Şekil 13.b).
- Tümör 5 cm'den büyük ve lenf bezlerine yayılım gözlenmemektedir (Şekil 13.c).



Şekil 13: Şekil 13: Evre 2B (a), Evre 2B (b), Evre 2B (c) (<https://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/breast-cancer/stages-types-grades/number-stages/stage-2> Erişim tarihi: 12 Aralık 2018).

TNM evreleme sisteminde Evre 2A: T0 N1 M0, T1 N1 M0, T2 N0 M0 ile aynıdır.

TNM evreleme sisteminde Evre 2B: T2 N1 M0, T3 N0 M0 ile aynıdır.

Evre 3

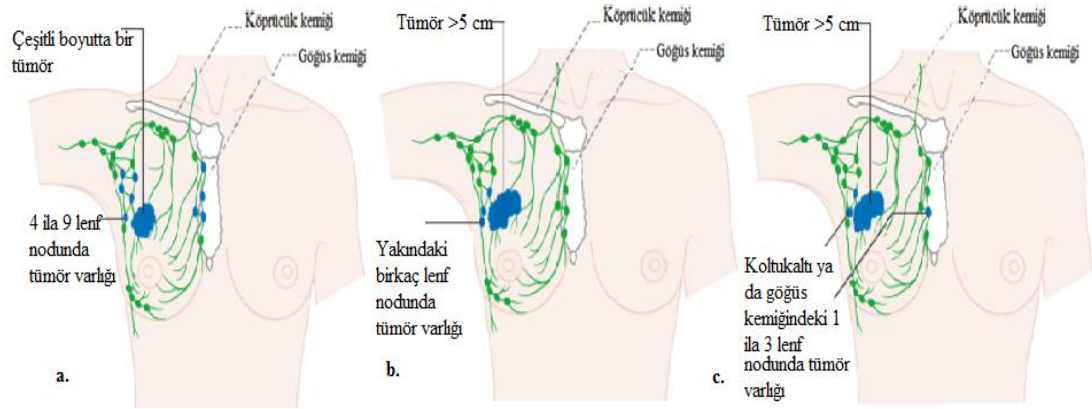
Evre 3, kanserin memeden, memeye yakın olan lenf bezlerine veya göğsün derisine veya göğüs duvarına yayıldığı anlamına gelmektedir. Ayrıca ileri evre meme kanseri olarak da adlandırılmaktadır.

Evre 3 meme kanseri 3 gruba ayrılmaktadır.

Evre 3A

Evre 3A, aşağıdaki durumlardan biri anlamına gelmektedir.

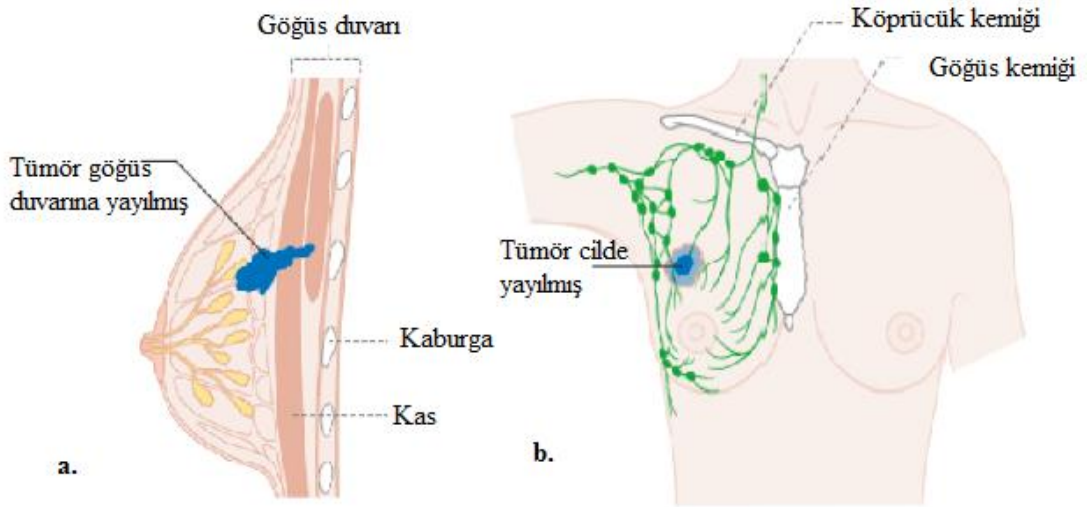
- Memede tümör görülmez veya tümör herhangi bir büyüklükte olabilir ve kanser kolun altındaki 4 ila 9 lenf bezinde veya göğüs kemiğinin yanındaki lenf bezlerinde bulunur (Şekil 14.a).
- Tümör 5 cm'den büyük ve meme kanseri hücrelerinin lenf bezlerinde küçük kümeleri bulunuyor (Şekil 14.b).
- Tümör 5 cm'den daha fazladır ve koltuk altındaki 3 lenf düğümüne veya göğüs kemiği yakınındaki lenf düğümlerine yayılmıştır (Şekil 14.c).



Şekil 14: Evre 3A (a), Evre 3A (b), Evre 3A (c) (<https://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/breast-cancer/stages-types-grades/number-stages/stage-2> Erişim tarihi: 12 Aralık 2018).

Evre 3B

Evre 3B, tümörün göğsün derisine (Şekil 15.a) veya göğüs duvarına yayıldığı anlamına gelmektedir (Şekil 15.b). Göğüs duvarı; kaburga, kas, cilt veya bağ dokusu gibi ciğerleri çevreleyen ve koruyan yapılar anlamına gelir. Kanser cildin parçalanmasına (ülser) veya şişmeye neden olmaktadır. Kanser koltukaltı içinde 9 lenf bezine veya göğüs kemiği yakınındaki lenf bezlerine yayılmıştır.

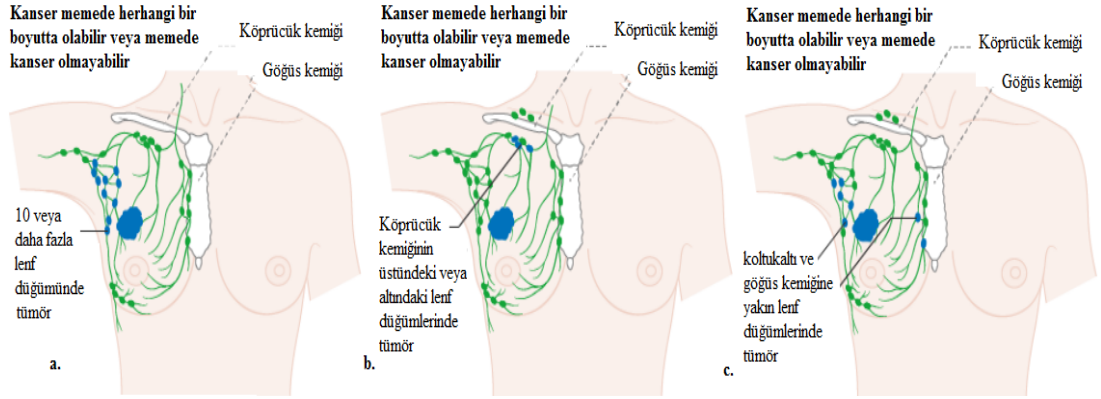


Şekil 15: Tümörün göğsün derisine yayıldığı evre 3B (a), tümörün göğüs duvarına yayıldığı evre 3B (b) (<https://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/breast-cancer/stages-types-grades/number-stages/stage-3> Erişim tarihi: 12 Aralık 2018).

Evre 3C

Evre 3C, tümörün herhangi bir boyutta olabileceği veya herhangi bir tümör olamayabileceği anlamına gelmektedir. Ancak kanser göğsün derisinde şişmeye veya ülsera neden oluyor ve göğüs duvarına yayılmıştır. Ayrıca, aşağıdaki yapılardan birine veya daha fazlasına

- Koltuk altında 10 veya daha fazla lenf noduna (Şekil 16.a),
- Köprücük kemiğinin üstündeki veya altındaki lenf nodlarına (Şekil 16.b)
- Koltukaltı ve göğüs kemiği yakınında lenf nodlarına (Şekil 16.c) yayılmıştır.



Şekil 16: Evre 3C' nin aşamaları (a, b, c) (<https://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/breast-cancer/stages-types-grades/number-stages/stage-3> Erişim tarihi: 12 Aralık 2018).

TNM evreleme sisteminde evre 3A meme kanseri: T0 N2 M0, T1 N2 M0, T2 N2 M0, T3 N1 M0, T3 N2 M0 ile aynıdır.

TNM evreleme sisteminde evre 3B meme kanseri: T4 N0 M0, T4 N1 M0, T4 N2 M0 ile aynıdır.

TNM evreleme sisteminde evre 3C meme kanseri, herhangi bir T N3 M0 ile aynıdır.

Evre 4

Evre 4 meme kanseri, kanserin vücudun diğer bölgelerine yayıldığı anlamına gelir. Ayrıca ikincil meme kanseri veya metastatik meme kanseri olarak da adlandırılır. 4. evrede meme kanseri; tümör herhangi bir boyutta olabilir, lenf nodları kanser hücreleri içerebilir veya içermeyebilir, kanser kemik, akciğer, karaciğer veya beyin gibi vücudun diğer bölgelerine yayılmıştır.

TNM evreleme sisteminde evre 4; herhangi bir T, herhangi bir N ve M1 ile aynıdır (<https://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/breast-cancer/stages-types-grades/tnm-staging> Erişim tarihi: 12 Aralık 2018).

4.5.5. Tümör morfolojisi

Lobüler karsinom, tanıdan sonraki ilk 6 yıldaki duktal karsinom ile karşılaştırıldığında daha düşük bir nüks riski ile ilişkilidir. Ancak altı yıl sonra önemli ölçüde daha yüksek risk oluşturmaktadır (Pestalozzi ve ark., 2008). Tübüler, papiller, müsin, medüller ve adenoid kistik karsinomlar daha iyi prognoz gösterirken, mikro papiller ve metaplastik karsinomlar daha kısa sağkalım ile ilişkilendirilmektedir (Falato, 2018).

4.5.6. Histolojik Grade

Histolojik Grade, belirli bir tümör evresinde risk tabakalaşmasını sağlayan prognostik bir belirteçtir (Fitzgibbons ve ark., 1999). En yaygın kullanılan derecelendirme sistemi Ayrıca Elston ve Ellis sınıflandırma olarak da adlandırılan Nottingham histolojik derecelendirmedir, bu Bloom-Richardson Grade sisteminin gelişmiş halini temsil etmektedir. Bu sınıflandırmada tümör farklılaşma derecesini (tübül oluşumu ve nükleer pleomorfizma) ve proliferatif aktivite (mitotik indeks) özelliklerinin her birine bir puan verilir ve daha sonra bir final puanı oluşturularak ve değerlendirme yapılır. Final skoruna dayanarak, tümörler grup 1'in en iyi prognozlu iyi ayırt edilmiş kanserlere karşılık geldiği ve grup 3'ün en az olumlu sonucu olan ayırt edilemeyen kansere karşılık geldiği üç gruba ayrılır (Elston ve Ellis, 1991; Frkovic-Grazio ve Bracko, 2002).

4.5.7. Vasküler İnvazyon

Geleneksel olarak, özellikle yüksek dereceli tümörlerde kötü prognostik bir faktör olduğu düşünüldüğünde, daha yeni kanıtlara göre, diğer prognostik faktörlerle anlamlı şekilde ilişkilidir ve klinik faydası belirlenmelidir (Ejlertsen ve ark., 2010; Viale ve ark., 2009).

4.5.7. Hormon reseptörleri

ER ve PR'nin prognostik önemi, uzun yıllardır tartışma konusudur. Son zamanlarda, 24 yıllık bir takiple dört klinik çalışmaya katılan 4000 hasta üzerinde yapılan bir analiz, ER-pozitif tümörlerin, ER-negatif tümörlere kıyasla, ilk 5 yıldaki yıllık nüks riskinin daha düşük olduğunu açıklamıştır. (% 9.9 a karşın %11.5; p: 0.01). 5 yılın ötesinde, ER-pozitif kanserlerde lenf düğümü durumuna bakılmaksızın birincil tanıdan 10 yıl sonra tehlikeler daha yüksektir ve oldukça stabil kalır (Colleoni ve ark., 2016).

PR, nüks ve genel sağkalım için iyi bilinen bir prognostik faktördür ve Luminal A tümörlerinin, meme kanserinin alt tiplerinin tanımlanması ve IHC tanısının konmasında prognostik önemi vardır. Ayrıca, geriye dönük bir kohortta PR nüks sonrası sağkalımda prognostiktir (Yamashita ve ark., 2006).

4.5.8.1. HER2

HER2 aşırı ekspresyonu aksiller lenf nodu tutulumu ne olursa olsun kötü prognoz ile ilişkilidir. HER2 negatif lenf düğümleri ile çapı 1cm'den küçük tümörlerde negatif prognostik etkilerini korur (Falato, 2018).

4.6. Proliferatif Faktörler

4.6.1. Ki67

Ki67'nin prognostik değeri kapsamlı olarak araştırılmıştır. İki büyük meta-analiz, Ki67'yi erken meme kanserinde aksiller lenf nodu durumuna bakılmaksızın prognostik bir faktör olarak kabul etmiştir. Klinik çalışmaların retrospektif bir analizi, Ki67'i hastalıksız sağ kalımın prognostik bir belirteci olarak tanımlarken, 5 çalışmadan sadece 1'i genel sağkalım ile bağımsız ilişkisi olduğunu ileri sürmüştür. Adjuvan ve neo adjuvan ortamındaki prediktif bir faktör olarak Ki67, farklı çalışmaların çelişkili sonuçlarıyla daha tartışmalıdır (Falato, 2018).

Nitekim, bazı analizler Ki67'nin taksanlardan elde edilecek faydayı tahmin edebileceğini göstermiştir (Falato, 2018).

Diğer çalışmalarda Ki67'nin kemoterapiye cevabı önceden tahmin edebileceğini ancak spesifik olarak taksanlara karşı tahmin edemeyeceği ortaya çıktı. Ancak Ki67, antrasiklinlere karşı birinci kuşak kemoterapi ya da ilk kuşak kemoterapi artı endokrin terapi ile tek başına endokrin terapi karşısında yanıtı öngörmemektedir. Neoadjuvan endokrin tedavisi sırasında Ki67'deki değişim, tedavi yararının bir işareti olarak kullanılabilir. Özellikle, iki haftalık hormonal tedaviden sonra Ki67'deki erken değişimin, klinik ve patolojik yanıt ile ve uzun vadeli sonuçları öngördüğü ve önemli ölçüde korele olduğu gösterilmiştir. Metastatik kanserde primer tümör dokudan veya lokal olarak nüks eden tümörden salınan yüksek Ki67, nüks sonrası hayatta kalma süresinin kısalması ve aromataz inhibitörleri ile birinci basamak tedaviye cevap verilmesi ile ilişkilendirilmiştir. Ki67'nin erken meme kanserinde prognostik bir belirteç olarak klinik geçerliliği yaygın olarak gösterilmiş ve hormon reseptörlerinin dengesizliği ve eşleşmiş primer tümör ile metastaz arasındaki HER2 ekspresyonunun iyi bilindiği, Ki67'nin metastatik ortamdaki prognostik etkileri ve Ki67 indeksindeki hastalık ilerlemesi sırasında varyasyon paterni iyi tanımlanmamıştır (Falato, 2018).

4.7. Meme Kanseri Biyomarker'ları

4.7.1. Biyomarker tanımı ve türleri

Bir biyomarker, DNA, RNA, protein, metabolitler gibi biyomoleküllerin kimyasal modifikasyonlarını analiz ederek organizmada normal veya anormal bir biyolojik durumu tanımlayan ve ölçülen bir yapı olabileceği gibi apoptoz, anjiyogenez ve ya proliferasyon gibi durumlarda olabilir (Hayes ve ark., 1996). Bununla birlikte, Dünya Sağlık Örgütü'nün tanımı “Bir biyomarker, vücutta ve ya ürünlerinde ölçülebilen herhangi bir madde, yapı veya işlemdir, hastalığın görülme sıklığını etkiler veya tahmin eder.” şeklindedir.(Laserre, 2008; WHO 2001). Markerlar kanser varlığında koşullara cevaben tümörün kendisi veya diğer dokular tarafından üretilir. Bu tür biyomarkerlar çeşitli vücut sıvılarında (serum, plazma, tükürük, idrar, balgam ve diğer vücut salgıları...) , dokularda ve hücre hatlarında bulunabilir (Kulasingam, 2008).

Bir kanser biyomarkerı belirli bir dokuda kanser gelişme riskini, tümör hacmini, kanserin ilerlemesini tahmin etmek, tedaviye yanıtı değerlendirmek, izleme yoluyla nüksü değerlendirmek, klinik karar vermede rehberlik gibi bilgiler sağlar. Kanser biyomarkerları kullanımlarına bağlı olarak prognostik markerlar, prediktif markerlar ve diagnostik markerlar olarak kategorilere ayrılabilir.

Prognostik biyomarkerlar, belirli bir tümörün seyrini öngörenlerdir. Düzeyleri kötü prognozlu hastaları iyi prognozlu olanlardan ayırabilir. Prognostik biyobelirteçlerin varlığı veya yokluğu, hastanın tedavi seçeneklerini belirlemek için yararlıdır, ancak yanıtı tahmin etmemektedir (Mehta ve ark., 2010). Oncotype DX, bir dizi Meme Kanseri gen ifade imzası, prognostik bir biyobelirteç için iyi bir örnektir. Cerrahi olarak çıkarıldıktan sonra primer tümörün nüks oranını tahmin etmek için kullanılır. Ayrıca hangi hastaların cerrahi rezeksiyon sonrası adjuvan kemoterapiden yarar göreceğini ve hangilerinin olmayacağını da belirleyebilir (Charles, 2008). Başka bir Meme Kanseri prognostik biyobelirteç, BRCA1'in yüksek ekspresyonunun tedavi edilmeyen hastalarda zayıf prognoz ile bağlantılı olduğu BRCA1'dir (Mehta ve ark., 2010).

Prediktif (tahmini) biyomarkerlar, hastanın belirli bir tedaviye yanıtını öngören biyobelirteçlerdir. Örneğin; Östrojen reseptörünü eksprese eden meme kanseri primer tümörleri tamoksifene cevap verir, ancak mutlaka HER2 reseptörü pozitif olan hastalara fayda sağlayacak olan trastuzumab'a cevap vermez (Mehta ve ark., 2010).

Diagnostik (teşhis) biyomarkerlar, bir bireyin belirli bir kanser türüne sahip olup olmadığını belirlemek için kullanılır. Bu tür belirteçlerin yüksek özgüllük ve duyarlılığa sahip olması beklenir. Örneğin, idrarda Bence-Jones proteininin varlığı, multipl miyelomun en güçlü teşhis göstergelerinden biridir (Kulasingam, 2008; Goessens ve ark., 2015).

Bir dizi farklı tip ve formda tümör markerları vardır. Hormon, enzim, izoenzim, karbonhidrat epitopları, onkojen ürünler, hücreye özgü veya onkofetal antijen ve reseptörler gibi farklı fonksiyonel gruplar ya da genetik mutasyonlar,

amplifikasyonlar, translokasyonlar ve mikro-dizilim profillerdeki değişiklikler tümör markerlarının formlarıdır (Kulasingam, 2008).

4.7.2. İdeal bir tümör marker'ının özellikleri

İdeal bir tümör markerı, analitik duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek, güvenilir ve uygun maliyetli bir tahlil kullanılarak kolay bir şekilde ölçülmelidir (Etzioni ve ark., 2003). Özellikle, ideal bir tümör markerı tümör hücreleri tarafından üretilmeli ve dolaşıma girmeli, sağlıklı ya da iyi huylu hastaların serumunda düşük seviyelerde bulunmalı ve kanserde (tercihen bir kanser tipinde) belirgin şekilde artmalıdır. Ayrıca, erken veya prelinik evrelerde saptanabilir (veya normalden daha yüksek) miktarlarda ideal bir tümör markerı bulunmalı ve tümör markerının kantitatif seviyeleri tümör büyüklüğünü yansıtmalıdır (Kulasingam, 2008).

4.7.3. Mevcut çalışılmış meme kanseri biyomarker'ları

Proteomik çalışmalar, HER2, MMP-2 (Matrix Metallo Proteinaz-2 immüno-reaktif protein), östrojen ve progesteron reseptörlerinin yokluğu ve Ki-67 antijeninin yüksek ifadesi, Osteopontin (OPN), urikinaz tipi Plazmonojen Aktivatörü ve İnhibitörleri (PAI-1 ve 2) ve Katepsinler (B ve L) de meme kanseri için prognostik biyobelirteçler olarak gösterilmiştir. Bu proteinler, hücre döngüsünün birkaç kilit noktada düzenlenmesinde rol oynar. Ek olarak, IGF-1 reseptörü, Raf, MEK kinazları ve PI3-kinaz içeren sinyal proteinleriyle doğrudan veya dolaylı olarak ilişkili görünmektedirler (Safaei ve ark., 2013).

Çeşitli çalışmalar meme kanserinde 14-3 3 proteininin alt regülasyonunu rapor etmiş ve bunun bir tümör baskılayıcı olarak rol oynadığını göstermiştir. Protein 14-3-3, meme kanserinin erken tespit belirteciydi (Safaei ve ark., 2013).

Başka bir çalışmada, serum örnekleri hastalarının ve kontrollerinin; proapolipoprotein A-I, transferrin ve hemoglobinin yukarı regüle edildiğini ve apolipoprotein A-I, apolipoprotein C-III ve haptoglobin a2'nin aşağı doğru regüle olduğunu ortaya koydu (Safaei ve ark., 2013).

Meme kanserinde çalışılmış bazı biyomarker'lar ve biyomarker tespit yöntemleri Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1: Meme kanserinde çalışılmış biyomarker'lar ve bu biyomarker'ların tespit yöntemleri (Sarvaiya, 2006).

Biomarkerlar	Sınıf / Fonksiyon	Tanı Yöntemi
Isı şok proteinleri (HSP27, HSP60, HSP90)	Hücre Döngüsü Düzenleyicileri	Yayınlanan haritalarla eşleştirme
Vasküler endotelyal büyüme faktörleri (Vegf) ve Heparanase1 (HPR1)	Anjiyogenez faktörü	protein assay/IHK
Östrojen Reseptör(ER), Progesteron reseptör (PR), Androjen Reseptör	Steroid hormon reseptörleri	IHK bağlanma testi
Cathepsin D	Östrojen reseptör yolu	Antikor/ İmmünoassay
İnsülin benzeri büyüme faktörü (IGF)	İnsülin ve insülin benzeri büyüme faktörleri	
Epidermal büyüme faktörü 2 (HER2)	Membran reseptörü ve sinyal iletimi	IHK / FISH
Karsinoembriyonik antijen (CEA)	Sinyal iletiminin düzenlenmesi	
Karsinom antijeni 15.3 (CA15.3)	Hücre yüzeyi antijeni	Monoklonal antikor
14-3-3 sigma	Moleküler şaperon	2D jel elektroforez, kütle spektrometre
Bcl-2	Apoptoz	IHK
Siklin D	Hücre döngüsü düzenleyicileri	IHK
E-kadherin	Hücre yüzeyi reseptörü	IHK / Metilasyon-PCR
BRCA 1	Hücre çoğalmasını ve farklılaşmasını kontrol eden yolları düzenleme	

Tablo 1: Meme kanserinde çalışılmış biyomarker'lar ve bu biyomarker'ların tespit yöntemleri (Devam).

BRCA 2	Hücre çoğalmasını ve farklılaşmasını kontrol eden yolları düzenleme	
S100 kalsiyum bağlayıcı protein	Hücre İskeleti ve Hücre adhezyonu	2DE array
Meme tipi apomüsin (MUC-1)	Membran reseptörü ve sinyal iletimi	
Matriks metaloproteinaz 2 (MMP-2)	Hücreyel uyarılabilir enzimler	IHK
Siklooksijenaz 2 (COX-2)	hücreyel uyarılabilir enzimler	
Sitokeratinler 8, 18, 19, 5 (CK8, CK18, CK19, CK5)	Hücre İskeleti ve hücre adhezyonu	Antikor/Kütle spektrometre
Ki-67	Proliferasyon	IHK
p53	Nükleer protein	IHK
Kalretikulin	Moleküler şaperon	
Meme karbonik anhidraz (BCA)	Metabolik enzim	Antikor
Nükleer matriks proteinleri	Çekirdek iskelet elemanları	Subselüler fraksiyonasyon
Tropomiyozin 1,2, 3 (TPM1, TPM2, TPM3)	Hücre iskeleti	Komigrasyon
İnozin-5 monofosfat dehidrojenaz	Enzim	Komigrasyon antikor
Tümör nekroz faktör	Anjiyogenezele ilgili	
Aldolaz A	Glikoz metabolizması	

4.7.4. Oksidatif stres biyomarkerları

Reaktif oksijen türleri (ROS) normal hücreyel metabolizma sırasında, çeşitli çevresel faktörlerin etkisiyle ve aynı zamanda patolojik süreçlerde üretilir. ROS, DNA, lipid ve protein hasarından sorumludur ve kanser dahil birçok insan hastalığının gelişiminde ve ilerlemesinde önemli bir rol oynamaktadır. Protein oksidasyonu, protein omurgasının oksidasyonu, protein-protein çapraz bağlı türevlerin oluşumu veya amino asit yan zincirlerinin oksidasyonu nedeniyle peptit bağı ayrılması yoluyla yapısal değişikliklere ve fonksiyon kaybına neden olmaktadır.

Protein yan zincirlerinin oksidasyonu esas olarak karbonil oluşumuna yol açan prolin, arginin, lisin ve treonin kalıntılarında oluşmaktadır (Dalla-Donne ve ark., 2003).

Son yıllarda lipidlerin, proteinlerin ve DNA'nın oksidasyonu ile ilgili birçok farklı biyolojik oksidatif stres markerı geliştirilmiştir ve bazıları Tablo 1.1'de gösterilmektedir. Örnekler arasında malondialdehit (MDA, bir lipid peroksidasyon son ürünü), protein karbonilleri (proteinlerin oksidatif hasar ürünü) ve 8-hidroksi-2'-deoksiguanozini (8-OHdG) (DNA hasarı) ölçen tiyobarbitürik asit reaktif maddeler (TBARS) deneyi bulunmaktadır. Bununla birlikte, bu belirteçlerin çoğuyla ilgili zayıflıklar vardır. Örneğin, TBARS testi MDA'yı ölçer, ancak lipid peroksidasyonundan başka MDA kaynakları olduğu için test spesifik değildir (Del Rio ve ark. 2005). Bu tahlil ayrıca dokunun kaynatılmasını içerir ve bu nedenle potansiyel olarak yanlış pozitifler ortaya çıkarmaktadır. DNA oksidasyonu için bir marker olarak 8-OHdG'nin dezavantajları da vardır. DNA oksidasyona duyarlıdır ve laboratuvar teknikleri, 8-OHdG'yi bir marker olarak uygularken potansiyel olarak yanlış pozitiflere neden olan geçiş metal iyonları ve ortamdaki oksijen konsantrasyonları ile DNA'nın oksidasyonunu indüklemeye meyillidir (Valavanidis ve diğerleri, 2009). Proteinlerin biyolojik belirteçler olarak modifikasyonlarının kullanılması, proteinlerin oldukça kararlı olması ve bunun sonucunda oksidatif yapay ürünlere neden olma riski genellikle düşük olduğu için faydalı görülmektedir. Ayrıca, plazma, serum, hücre ve dokularda bulunan proteinlerin bolluğu genellikle DNA, RNA ve lipidlerden daha yüksektir (Danielsen, 2015).

4.7.4.1. Protein karbonilleri

Karboniller, bir oksijen atomuna çift bağlı olan bir karbon atomundan oluşan fonksiyonel bir gruptur. Bu, aldehitlerin, ketonların, karboksilik asitlerin, esterlerin ve amitlerin hepsinin karbonil grupları olduğu anlamına gelmektedir.

Proteinler içindeki bazı amino asitlerin oksidasyonu, proteinlerin yapısal fonksiyonlarını değiştirerek veya katalitik aktivite kaybına neden olarak protein karbonillerinin oluşmasına neden olmaktadır (Dalle-Donne ve ark., 2003). Protein karbonilleri, yaşlanmanın bir belirteci olarak bağlanmıştır ve yaşam ömrünün son üç

ayında protein karbonil içeriğinin şiddetli bir şekilde arttığı, ortalama olarak her üç protein molekülünden birinin protein karbonil modifikasyonuna sahip olduğu bir seviyeye ulaştığı gösterilmiştir (Stadtman, 1998).

Oksidasyon sırasında oluşan karbonil grupları kimyasal olarak kararlıdır; bu, numune depolama sırasında hem tespit hem de stabilite açısından faydalı bulunmaktadır. Protein karbonil seviyeleri, protein oksidasyonunun en sık kullanılan biyomarker'larıdır ve yaşlanma, Alzheimer hastalığı, diyabet, enflamatuar , bağırsak hastalıkları, artrit, kanser gibi çeşitli hastalıklarında birikimleri gözlenmiştir.

Protein karbonilleri, aldehit ve ketonlarla bağlantılı karbonillere bağlanan, ancak ester, amid ve karboksilik asitler gibi karbonillerle bağlanmayan 2,4-dinitrofenilhidrazin (DNPH) ile işaretlenmektedir. Aldehitler ve ketonlar DNPH ile türetilir, bu da kararlı 2,4-dinitrofenil (DNP) hidrazon ürününün oluşumuna yol açmaktadır (Alamdari ve diğ., 2005). Miktar tayini için DNP'ye bağlanan antikolar geliştirilmiştir (Danielsen, 2015). Long Island Meme Kanseri Çalışması Projesi'ne (LIBCSP) katılan kadınlar arasında plazmadaki protein karbonil seviyeleri ölçülerek oksidatif stres ile meme kanseri riski arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır. Kontroller arasında plazma protein karbonil düzeylerinin yaş, ortalama yaşam boyu fiziksel aktivite, meyve ve sebze alımı, alkol tüketimi, sigara içimi, VKİ ve menopoz durumu, oksidatif stresi etkileyen faktörler ile korelasyonunu belirlemişlerdir (Dalle-Donne ve ark., 2003).

Gladstone Jr IM ve arkadaşları, HPLC ile spektrofotometrik DNPH ile akut solunum sıkıntısı sendromunda oksidatif stres belirteçleri olarak protein karbonil tayini çalışmışlardır. Oksidatif olarak değiştirilmiş protein miktarının pulmoner antioksidan savunmaların kantitatif bir değerlendirmesini sağlayabileceğini öne sürmüşlerdir (Gladstone ve Levine 1994).

4.8. Klinikte Kullanılan Meme Kanseri Biyomarkerları

4.8.1. MUC-1, CA 15-3, CA 27-29

CA 15-3 ve CA 27-29, MUC-1'in serum seviyelerini ölçmektedir. İki test arasındaki en büyük fark, kullanılan monoklonal antikorlar, esas olarak kullanılan farklı immünoaktiflerdir. CA 15-3, MUC-1'i test etmek için en yaygın kullanılan testtir ve altın standart olarak kabul edilmektedir. Monoklonal antikor insan süt yağı globül membranlarına karşı yükseltilmiş (115D8) ve metastatik insan meme karsinomasının membranla zenginleştirilmiş bir kısmına karşı yükseltilmiş (DF3) kullanan bir sandviç yakalama testinden oluşmaktadır.

Öte yandan, CA 27.29, monoklonal antikor B27.29'nin bir alıcı veya bir izleyici olarak kullanıldığı katı faz rekabetçi bir immünoassay kullanılarak ölçülmektedir. Bu antikor, DF3 ile aynı epitopyu tanır, ancak B27.29'un bağlanması, glukidik kalıntıların varlığından etkilenmemektedir. Her iki durumda da testler serum MUC-1 seviyelerini ölçer. MUC-1, polarize epitel hücrelerinin apikal yüzeyinde bulunan geniş bir glikoprotein olan polimorfik bir epitelyal müsindir (PEM).

Normal olarak, MUC-1, sütte çözünebilir biçimde veya süt yağı kürecikleri üzerine bağlı halde süt kanallarında ve asinlerde eksprese edilir. Bununla birlikte kanserde, normal hücre polarizasyonu ve doku mimarisinin bozulmasıyla, MUC-1 kan dolaşımına dökülür ve dolayısıyla seviyeleri bu immünoassay testler ile ölçülmektedir. MUC-1, büyüme faktörleri için membran reseptörlerini aktive edebilen, E-kadherin aracılı hücre yapışmasını azaltan, böylece hücre göçünü arttırabilen ve oksidatif strese hücrel apoptotik tepkisini azaltabilen yüksek moleküler ağırlıklı (250-1000 kDa) bir proteindir.

CA 15-3 testi için, evre 1, evre 2 ve evre 3 'te olan hastalarda testin tanı duyarlılığı sırasıyla % 10,% 20 ve% 40 şeklindedir. Erken evre için hassasiyet eksikliğinin yanı sıra, sağlıklı bireylerin % 5'inde yüksek bulunduğundan, CA 15-3 'ün meme kanseri için özgülüğü düşüktür. Ayrıca, iyi huylu meme patolojisi, kronik karaciğer rahatsızlıkları ve immünojenik rahatsızlıklar dahil olmak üzere, neoplastik olmayan bazı durumlarda artan CA 15-3 seviyeleri gözlenmektedir. Şu anda CA 15-3, hastalık belirtisi olmayan ameliyat sonrası hastalarda sürveyans için ve ileri

hastalıkta tedaviyi izlemek için kullanılmaktadır. Bazı çalışmalar, cerrahi öncesi CA 15-3 seviyesinin, hem hastalısız sağkalım (DFS) hem de genel sağkalımın (OS), bu belirteç için değeri yüksek olan hastalarda daha kısa olması ile prognostik bir faktör olduğunu göstermiştir. Buna rağmen, CA 15-3'ün bağımsız bir prognostik faktör olduğu ve bu nedenle şu anda bu rolü yerine getirmek için klinikte kullanılmadığı bilinmektedir. Uzak metastaz varlığında, farklı çalışmalarda CA 15-3'ün klinik duyarlılığı anatomik bölgeye bağlı olarak %50-90 arasında değişmektedir. Bazı araştırmalar ayrıca hastaların yaklaşık üçte ikisinin nüksetmeden önce veya tekrarlama sırasında CA 15-3 yükselmeleri gösterdiğini ve 2-9 ay arasında değişen bir uzaklık süresi olduğunu göstermiştir. CA 15-3, endokrin terapisine veya sitotoksik tedaviye yanıtın izlenmesinde yararlıdır (Kulasingam, 2008).

4.8.2. CEA

CEA, 150-300 kDa'lık bir kütleyle sahip, 640 amino asitlik, tek zincirli bir glikoproteindir. İmmünooglobulin ailesinin bir parçası olan bir adezyon molekülüdür. Bu nedenle, CEA hücrel matriks tanımada rol oynamaktadır. CEA, bir radyoizotop veya radyoaktif olmayan (enzim veya kemilüminesan) etiketi kullanan ticari olarak temin edilebilen immünolojik testlerle ölçülmektedir. CEA klinikte, ameliyat sonrası meme kanseri kanıtı bulunmayan hastalarda sürveyans için kullanılmaktadır. Genel olarak CEA, CA 15-3 / BR 27.29'dan daha az duyarlı görünmektedir. Ayrıca CEA, özellikle CA 15-3 / BR 2729 yükselmemişse, ileri hastalıkta tedaviyi izlemek için klinikte de kullanılmaktadır. CEA'nın prognozu öngörme yeteneği çelişkilidir. Metastatik hastalığı olan hastalarda CEA seviyelerinin % 50-60'ında yükselmesine karşın CA 15-3 düzeylerinde yükselme oranı %75-90 arasındadır (Kulasingam, 2008).

4.8.3. HER-2 /neu (cerbB2)

Bir onkoprotein olan HER-2 (epidermal büyüme faktörü reseptörü -2), c-erbB-2 olarak da bilinen bir büyüme faktörü reseptörüdür (transmembran glikoproteini).

HER 2, proto-onkojen amplifikasyonunun bir sonucu olarak meme kanserlerinde aşırı eksprese edilmektedir (Kulasingam, 2008).

Meme kanserinin ne kadar agresif olduğunu belirlemek için prognostik belirteç olarak da kullanılabilir. Tedavi seçeneklerinin belirlenmesi ve tümörün özelliklerinin anlaşılmasına yardımcı olur. HER2-pozitif olan tümörler daha fazla büyüme eğilimindedir ve bu anormallik ile endokrin tedavisine ve diğer bazı standart kemoteraplere karşı direnç gösterir. HER2-pozitif meme kanserli insanlar prognozu kötü olma eğilimindedir, ancak bu tümör karakteristiktir ve hedeflenen tedavi olarak da bilinen HER2-pozitif kansere özgü tedaviyi almalarına aday olur (Pegram ve ark., 2000).

4.8.4. Östrojen reseptör (ER) ve progesteron reseptör (PR)

Hem menopoz öncesi hem de sonrası kadınlarda, ER ve PR steroid reseptörü seviyeleri, hem erken hem de ileri meme kanserinde hormon tedavisine yanıtı tahmin etmek için ve meme kanserinde prognozu değerlendirmek için diğer faktörlerle kombinasyon halinde kullanılmaktadır (Israyelyan, 2003; Haris ve ark.,2007). ER pozitif hastaların, en az 5 yıl adjuvan tamoksifen tedavisinden sonra ER negatif hastalardan tekrarlayan hastalık geliştirme olasılığı 7 kat daha az olduğu tespit edilmiştir.

Normal meme epitel hücrelerinin sadece yaklaşık % 10'u östrojen reseptörü proteinlerini eksprese ederken, invaziv meme kanserlerinin %50-85'inde immünohistolojik olarak saptanabilmektedir. Son 30 yıl boyunca östrojen reseptörü (ER) pozitifliğinin, endokrin manipülasyonlarına cevap verme olasılığının daha yüksek olduğu anlamına geldiği ve böylece adjuvan tedavilerin seçimi için güvenilir olduğu tespit edilmiştir.

İntraductal karsinomların yaklaşık % 80'inin immünohistokimyasal olarak ER eksprese ettiği bulunmuştur (Perin ve ark. 1996; Cornfield ve ark. 2004). DCIS ER + olan ve TMX ile tedavi edilen kadınlarda gelecekteki meme kanseri olaylarında yaklaşık % 60 oranında bir risk azalması olduğunu göstermektedir (Allred ve ark., 2002).

4.8.5. p53

p53, tümörlerin yüzde 50'sinden fazlasında mutasyona uğramış veya değişime uğramış bir tümör baskılayıcı gendir. p53'ü bir tümör marker olarak incelemek araştırmacıların tümörlerin nasıl oluştuğunu anlamalarına yardımcı olmaktadır. Ancak kanser hastalarında p53 seviyelerini ölçmenin sağkalım veya yaşam kalitesindeki farklılıkları öngörmediği gösterilmiştir (Israyelyan 2003).

4.8.6. Katepsin-D

Bu lizozomal enzimin yüksek seviyeleri meme kanserine işaret eder. Primer veya metastatik meme kanserli hastalar için tedavi kararları vermek ve özellikle hastalığı teşhis etmek için katepsin-D seviyelerinin kullanılmasını önermek için yeterli bilgi yoktur, ancak çalışmalar yükselmiş katepsin-D meme kanseri hastalarında genel sağkalımın azaldığını göstermektedir (Israyelyan 2003).

4.9. Prognostik Değeri Olan Diğer Meme Kanseri Biyomarker'ları

4.9.1. Yağ asidi bağlayıcı protein 4 (FABP4)

FABP'ler, yağ asitlerinin alımında, hücre içinde depolanmasında, gen ifadesinin düzenlenmesinde, hücre çoğalmasında ve farklılaşmasında rol oynamaktadırlar (Cui ve ark., 2019). Bu ailenin bir üyesi olan FABP4, uzun zincirli yağ asitlerini ve çeşitli diğer hidrofobik ligandları taşıyan düşük molekül ağırlıklı bir hücre içi lipit taşıma proteindir (Guaita-Esteruelas ve ark., 2017). FABP4; adipositler, makrofajlar ve tümör hücreleri tarafından eksprese edilmektedirler (Cui ve ark., 2019).

FABP'lerin meme kanserindeki olası işlevi ile ilgili olarak, eksojen FABP4'ün Koroner arterden insan düz kas hücrelerinin hücre proliferasyonunu ve göçünü kontrol ettiği tarif edilmiştir. Ekzojen FABP4, meme kanseri hücrelerinin hücre proliferasyonunu aktive eder ve MCF7 hücrelerinde FABP5 ve CD36 ekspresyonunu indükler. Ayrıca, insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2'nin (HER2) aşırı ekspresyonu, FABP4 seviyelerini artırır ve FABP4 ekspresyonu, HER2-pozitif

meme tümörlerinde yüksektir (Gao ve ark., 2019). Bu durum FABP4'ün patofizyolojide rol oynayabileceğini ortaya koymaktadır (Guaita-Esteruelas ve ark., 2017).

FABP4'ün bazı malignitelerin önlenmesi ya da tedavisi için iyi bir marker olabileceği varsayılmaktadır (Cui ve ark., 2019).

Tümör hücreleri enerji üretiminde metabolik bir kayma karakterize edilir.Çeşitli metabolik yollardan lipid metabolizması meme kanserinin patogeneziyle yakından ilişkilidir. FABP4, lipid taşınımı ve alımında rol oynar, ikisi de lipid metabolizmasının kilit bir özelliğidir ve meme kanseri patogenezi ile yakından ilişkili oldukları düşünülmektedir. Bu durumlar göz önüne alındığında FABP4 ile ilişkili klinikopatolojik ve prognostik faktörlerin tanımlanması ve FABP4'ün meme kanserli hastalarda prognostik önemi hala tartışılmakta ve çalışılmaktadır (Cui ve ark., 2019).

4.9.2. Ki67

Ki67, polimeraz 1'e bağlı ribozomal RNA sentezinin erken aşamalarında yer alan histon olmayan bir nükleer korteks proteinidir. İlk olarak 1983 yılında Hodgkin lenfoma hücre hattında tanımlanmıştır. Molekül, Kiel Üniversitesi'nden dolayı Ki ve onu tespit edebilen antikörün klon sayısından dolayı 67 olarak adlandırılmıştır. Ki67, hücre döngüsünün G1, S, G2 ve M fazı sırasında hücre çekirdeğinde eksprese edilir. Ki67, nükleolusun yoğun fibril bileşenlerinde lokalize bulunmaktadır. Mitoz sırasında, yoğunlaştırılmış kromozomların çevrelerinde bulunur. Ki67'nin ekspresyonu, hücre döngüsü boyunca değişerek mitoz sırasında en yüksek seviyeye ulaşır. Ki67'nin işlevi tam olarak açıklanmamasına rağmen, hücre bölünmesi ve ribozomal RNA sentezindeki rolü olduğuna dair kanıtlar bulunmaktadır (Penault-Llorca ve Radosevic-Robin 2017). Bu nedenle, Ki67'nin nükleer ekspresyonu, immünohistokimya ile tümör proliferasyonunu değerlendirmek için kullanılmaktadır (Denkert ve ark., 2015). İmmünohistokimya ile değerlendirilen Ki67, tümör proliferasyonunu değerlendirmek, farklı tümör alt tiplerini sınıflandırmak, farklı tedavilerin yararını tahmin etmek ve erken meme kanseri için geleneksel prognostik markörlerle birlikte adjuvan kemoterapinin kullanımına karar vermeye yardımcı

olmak için giderek daha fazla kullanılmaktadır (Gao ve ark., 2019). Son 32 yılda Ki67, meme kanserinde ve diğer tümörlerde prognostik ya da prediktif bir marker olarak kapsamlı bir şekilde değerlendirilmiştir (Denkert ve ark., 2015).

4.9.3. Hormon duyarlı lipaz (HSL)

Hormon duyarlı lipaz (HSL), yağ dokusu lipolizinde hız sınırlayıcı aşamayı katalize ederek, yani triaçilgliserollerin diaçilgliserollere hidrolizi ve diaçilgliserollerin de monoaçilgliserollere hidrolizi ile enerji homeostazının kontrolünde kritik bir role sahiptir. Lipoliz sırasında salınan serbest yağ asitleri fazla enerji harcayan dokularda kullanılmaktadır (Remaury ve ark., 1995; Kraemer ve Shen, 2002). Katekolaminler, adrenokortikotropik hormon ve glukagon gibi hormonların bu hücre içi nötr lipazın aktivitesini uyarma kabiliyetinden dolayı bu enzime hormon duyarlı lipaz ismi verilmiştir. HSL'nin hormonal aktivasyonu, HSL'yi fosforile eden siklik adenzin monofosfata (cAMP) bağımlı protein kinaz (PKA) ile gerçekleşmektedir (Kraemer ve Shen, 2002). HSL, tek bir serin kalıntısının cAMP'ye bağlı fosforilasyonu yoluyla çeşitli hormonlar ve nörotransmitterler tarafından aktive edilen nöral ve hormonal kontrol altındadır (Remaury ve ark., 1995).

Yağ dokusundan serbest yağ asitlerinin (FFA) salınmasından sorumlu olan enzim olarak, HSL çoğu doku için ana enerji kaynağının sağlanmasında önemli bir rol oynamaktadır. Ekspresyonu yağ dokusunda en yüksek olmasına rağmen, HSL ayrıca adrenal bez, yumurtalık, testis, plasenta, iskelet kası, kalp kası, meme bezleri ve makrofajlardan da az bir oranda eksprese edilmektedir. Bu dokuların bazılarında, HSL kolesterol esterlerine ve triasilgliserollere karşı aynı katalitik aktiviteye sahip olduğundan kolesterol esteraz olarak işlev görmektedir (Kraemer ve Shen, 2002).

HSL hiçbir insan hücre hattından eksprese edilmemiştir. Bu konu ile ilgili çalışmalar ve marker olarak önemi ile ilgili çalışmalar devam etmektedir (Remaury ve ark., 1995).

4.10. Biyomarker Araştırma Yöntemleri

Meme kanserinin erken teşhisi ve önlenmesi çok önemlidir çünkü primer tümör diğer organlara metastaz yaptığı için birçok hasta ileri hastalıklara yenik düşmektedir. İyi huylu ya da kötü huylu meme tümörlerini tespit etmek için kullanılan güncel yöntemler öncelikle mamografi üzerine kuruludur. Ancak mamografinin de tanı anında meme kanserlerinin sadece % 63'ünün lokalize olması gibi kendine özgü kısıtlamaları bulunmaktadır. Küçük lezyonlar sıklıkla gözden kaçırılır ve özellikle yoğun meme dokusu olan genç kadınlarda görülmemektedir. Mamografide saptanan bir meme tümörünün en az birkaç milimetre büyüklüğünde olması gerekmektedir. Ne yazık ki, bu büyüklükte bir tümör zaten birkaç yüz milyon hücre içermektedir. Hücresel açıdan bakıldığında, tek bir hücrenin bütün bir tümörün gelişimine yol açabileceği göz önüne alındığında, bir tümör mamografi ile tespit edildiğinde zaten geç bir aşamada bulunmaktadır. Ayrıca mamografi yüksek oranda yanlış pozitif sonuçlarda vermektedir (Qi, 2008).

Biyomarker'lar; teşhis, tedavi, izleme ve prognoz için kritik öneme sahip araçlardır. Biyomarker'lar, bir hastalık sürecinde fizyolojik durumun ve aynı zamanda değişimin göstergesi olan biyolojik moleküllerdir. Bir biyomarker'ın değeri, hastalığın erken bir endikasyonunu sağlama ve hastalığın ilerlemesini izleme yeteneğinde yatmaktadır (Qi, 2008).

Son yapılan çalışmalar, biyomarker keşfinde genomik ekspresyon profillemesinin kanser sınıflaması ve prognostiklemesi için güvenilir bir yöntem olduğu hipotezini desteklemektedir. Bununla birlikte, genler herhangi bir katalitik veya sinyal kabiliyetine sahip değildir; bunun yerine etkilerini aktif proteinlere çevirerek uygulamaktadırlar. Bu nedenle, genetik biyomarker bilgisi tek başına tümör varlığı ya da tedaviye cevabı tahmin edememektedir. Protein ekspresyon profillerini kansere bağlayan proteomik proje, kanser biyolojisinin kapsamlı gösterimi için esastır. Proteinler, bireysel olarak işlev göstermek yerine spesifik yolaklar yoluyla etkilerini gösterdikleri için tümör oluşumunda yer alan spesifik protein yolaklarını hedefleme, şu anda kansere karşı savaşta, gerçek bir umut sunmaktadır (Qi, 2008).

4.10.1. Biyomarker araştırmalarında kullanılan genomik yaklaşımlar

Bütün biyolojik aktivitelerin, DNA ve RNA'larla kontrol edildiği bilinmektedir. Kanserojenez, DNA'daki veya bazen RNA yapılarındaki değişikliklerle başlatılmaktadır. Bu nedenle, normal hücrelerin işlevsellik derecelerindeki anormallikler, bu genetik materyallerdeki değişiklikler ile genetik göstergeler olarak izlenmektedir. Genomik teknolojiye göre, genetik materyallerin belirlenmesi ve izlenmesi; biyolojik olaylara, patojenik olaylara ve terapötik veya diğer müdahalelere verilen tepkilerin göstergeleridir (İmran ve ark., 2011).

Onkogenezi destekleyen genetik değişiklikler; nokta mutasyonları, gen delesyonları, translokasyonlar veya amplifikasyonlar olarak düşünölmektedir. Her ne kadar genetik açıdan insanlar birbirine çok benzer olsalar da, DNA'da bireyler arasında tek nükleotid polimorfizmleri (SNP) adı verilen tek baz değişimleri bulunmaktadır. Son zamanlarda, bu tür SNP'lerin, özellikle 8-okso-guanin içeren genomik DNA'nın oksidasyonu ile ortaya çıktığı ve bunun, insandaki en büyük genomik çeşitlilik kaynaklarından biri olduğu öne sürölmüştür (Ohno ve diğerleri 2006). Bu genomik değişikliklerin ötesinde, DNA'ya uygulanan epigenomik modifikasyonlar, çevresel etkiler; gen ekspresyonunu ve gen ürünlerini patolojik işlemlerin ilerlemesini başlatan, hızlandıran veya geciktiren şekillerde değiştirmektedir (Qi, 2008).

Meme kanserinde çalışılmış genomik marker'lar, çalışma metodu ve bu marker çıktılarının klinik uygulamadaki yeri Tablo 2'de gösterilmiştir.

Tablo 2: Meme kanserinde çalışılmış bazı genomik biyomarker'lar (Falato, 2018)

Çalışma	Gen Sayısı	Yöntem	Çalışılan Örnekler	Klinik Uygulama
PAM50	55	qRT-PCR/ mikroarray / nCounter	189 ER +/-, LN +/- tümör örneği ve 29 malign olmayan meme tümörü doku örneği	Menopoz sonrası kadınlar ile ER +, LN +/- evre 1 veya 2 hastalığıolan kadınlarda prognoz

Tablo 2. Meme kanserinde çalışılmış bazı genomik biyomarker'lar (Devam)

21-gene signature	21	qRT-PCR	Üç randomize testten 447 ER +/-, LN +/- tümör örnekleri	ER +, LN tümörlü hastalarda nüks riski
70-gene signature	70	Mikroarray	78 ER +/-, LN +/- tümör örneği, tümör boyutu<5cm 55 yaşından küçük hastalardan	ER +/-, LN - tümörlerde, uzak nüks bağımsız sağkalım tahmini
Meme Kanseri İndeksi	7	qRT-PCR	Daha önce tamoksifen ile tedavi edilen hastalardan 60 ER + tümör örneği	ER +/-, LN - tümörlerde, uzak nüks bağımsız sağkalım tahmini Genişletilmiş adjuvandan fayda tahmini
Endo Predict	11	qRT-PCR	Tamoksifen ile tedavi edilen hastalardan 964 ER +, LN +/- tümör örneği	ER +, LN +/- tümörlerde 10 yılda nüks riski. Endokrin tedavisinden sonra 5-10 yıllık nüks riski
Genomik Sınıf İndeksi	97	Mikroarray	64 ER +, histolojik derecesi 1-3 olan tümör örnekleri	Histolojik dereceye göre prognoz ve risk sınıflandırması

Meme kanserinde yapılan genomik çalışmalarda; Tomita ve arkadaşları, cfp-DNA'daki genetik ve epigenetik modifikasyonları ölçerek meme kanserinin derecesini keşfetmiş ve meme kanserinden sorumlu olan genlerde mutasyon olduğunu bildirmişlerdir. Iorio ve arkadaşları, meme kanseri dokusunda normal dokuya göre farklı olarak ifade edilen 29p-RNA'ları tanımlamışlardır. HER2 / neu, erken meme kanserinin tespiti için çok önemli bir proto-onkogendir ve klinik biyobelirteç olarak trastuzumab tedavisinin gelişiminde kullanılmaktadır. Dmitrovsky ve arkadaşları kanserin moleküler hedefli tedavisi için kullanılabilecek olan yeni miRNA dizilerini içeren biyolojik belirteçleri açıklamışlardır. Slamon ve arkadaşları, HER2 / neu'nun meme kanserinde aşırı eksprese olduğunu ve dolayısıyla

meme kanserinin tespiti için potansiyel bir biyolojik belirteç olduğunu gözlemlemişlerdir. Li ve arkadaşları, mutasyonlar, metilasyon, translokasyon, viral genlerin mevcudiyeti veya alel dengesizliği dahil olmak üzere, tüm genom değişikliklerinin kapsamlı bir çalışmasını gerçekleştirmişlerdir. Bu gözlemlere dayanarak, çalışmacılar tüm değişikliklerin primer meme tümörlerinin çoğunda mevcut olduğu ve aynı zamanda meme kanseri hastası plazmasında da buldukları sonucuna varmışlardır. Hamann ve arkadaşları meme kanserinin erken teşhisi için iki tümör baskılayıcı geni BRCA1 ve BRCA2'yi tanımlamışlardır. Borgono ve arkadaşları, meme kanseri için potansiyel genetik biyomarker olarak kallikrein geni 14'ü (hK14) keşfetmişlerdir (İmran ve ark., 2011).

4.10.2. Biyomarker araştırmalarında kullanılan proteomik yaklaşımlar

Proteom, bir canlıda, bir doku ya da hücrede bulunan proteinlerin bütünü ve ya genom tarafından şifrelenen bütün proteinleri ifade etmektedir. Proteom, dokuda ve hücre çeşitlerinde bu yapıların görevlerinden dolayı farklılık göstermektedir. Proteom; çevresel faktörlere, yaşa, cinsiyete, hastalıklara ya da hücre döngüsü, apoptoz gibi fizyolojik faktörlere bağılı olarak değişiklik göstermektedir. Bundan dolayı genomları aynı olan canlılarda farklı proteom yapısı gözlenmektedir. Çünkü nükleotid dizilimiyle belirlenen tek boyutlu genomuğın aksine, proteinlerle ifade edilen bilgi yalnızca aminoasit dizilimi ile sınırlı olmamaktadır. Proteinler, oluştuktan sonra organizmada birçok düzenlemeye ve değişime tabi tutulmaktadırlar. Posttranslasyonel modifikasyonlar, mRNA'da gerçekleşen ekleme-çıkarma olayları ve füzyonlar proteomun dinamik yapısına katkıda bulunmaktadır. Bu durum özgün protein moleküllerinin oluşumunu açıklamaktadır.

Vücutta patolojik bir durum oluşumu proteinlerde meydana gelen değişikliklerle doğrudan bağlantılıdır. Bu değişikliklerin ve sebeplerinin anlaşılmasında proteomik tekniklerden yararlanılmaktadır. Proteomik yaklaşımlar; ekspresyon proteomiği, fonksiyonel proteomik ve yapısal proteomik gibi gruplarda incelenmektedir. Ekspresyon proteomik; hücrelerde ve ya dokuda eksprese edilen proteinlerin belirlenerek hastalıkların erken teşhis ve tedavisinde yararlanılacak biyomarkerların tespit edilmesini sağlamaktadır. Yapısal proteomik; proteinlerin üç

boyutlu yapılarını inceleyerek, proteinlerin hücre içerisindeki lokasyonlarını belirlemektedir. Fonksiyonel proteomik; protein ve protein veya protein ve DNA/RNA etkileşimlerini analiz ederek proteinlerin fonksiyonlarını belirlemektedir. Hızla gelişen teknoloji, dokudaki biyolojik sıvılarda proteomun belirlenmesini sağlamakta, protein sebepli tanısal ve prognostik markerların ve yeni tedavi yöntemlerinin belirlenmesine katkı sağlamaktadır. Her organizmanın proteomu spesifik olduğundan, patolojik bir olay sonucu proteomda meydana gelen değişikliklerin incelenmesi, kişiye özgü tedavilerin geliştirilmesini sağlamaktadır (Gezici, 2017).

Proteomik teknolojisinde temel olarak iki yaklaşım söz konusudur:

- “Keşif odaklı” proteomik, hem bilinen hem de bilinmeyen proteinleri sağlamaktadır
- ”Sistem odaklı” proteomik, bir protein alt kümesinin (örneğin protein ailesi) biyolojik fonksiyonlarını, protein-protein veya protein-DNA / RNA etkileşimlerini ve fosforilasyon, sülfatlama veya glikosilasyon gibi protein transasyon sonrası modifikasyonlarını karakterize ederek doğrudan analiz edilmektedir (Qi, 2008).

Proteomikte biyomarkerların izlenmesi, ayrılması ve tanımlanmasında ince tabaka kromatografisi, kolon kromatografisi (iyon değişim kromatografisi, afinite kromatografisi, jel filtrasyon kromatografisi), bir ve iki boyutlu sıvı kromatografisi (1D ve 2D LC- Liquid Chromatography) yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC-High Performance Liquid Chromatography), ultra performanslı sıvı kromatografisi (UPLC-ultra-performance liquid chromatography) gibi kromatografik yöntemler, bir boyutlu poliakrilamid jel elektroforezi (1D-PAGE), iki boyutlu poliakrilamid jel elektroforezi (2D-PAGE) ve diferansiyel jel elektroforezi (DIGE) gibi çeşitli jel sistemleri, immünohistokimya (IHC), enzim bağlı immünosorbent deneyi (ELISA), flüoresans in situ hibridizasyon (FİSH), matris ile ilişkili lazer desorpsiyonu / iyonlaşma zaman aşımı kütle spektrometresi (MALDI-TOF MS) ve yüzey arttırılmış lazer desorpsiyonu / iyonlaşma uçuş süresi kütle spektrometresi (SELDI-TOF-MS) gibi yöntemler kullanılmaktadır (Gezici, 2017; İmran ve ark., 2011).

4.10.2.1. Proteomik yaklaşımları destekleyen kromatografik yöntemler

Kromatografi, bir karışımda bulunan maddelerin biri hareketli, diğeri sabit iki faz yardımı ile ayrılması işlemidir. Ayırmayı istediğimiz karışım, sabit fazın başlangıcına konmaktadır ve hareketli faz ile ileri doğru ilerletilmektedir. Karışımın içeriğindeki maddeler, fiziksel ve kimyasal özelliklerine göre sabit fazın birbirinden farklı kısımlarında tutulmaktadır ve bu yüzden farklı hızlarda hareket ederek birbirinden ayrılmaktadırlar. Temel işleyiş mantığı aynı olmakla beraber çeşitli kromatografi yöntemleri bulunmaktadır. Kolon kromatografisinde, proteinler porlar bulunan katı bir yüzeyden geçerken; yüklerine, kimyasal gruplara afinite gösterme özelliklerine ya da büyüklüklerine göre yüzeyle farklı etkileşimler göstererek ayırma tabi tutulmaktadır. Bir boyutlu sıvı kromatografisinde; proteinler kütleleri, izoelektrik noktası ya da hidrofobik özelliklerinden birine göre ayrılırken; iki boyutlu sıvı kromatografisinde; proteinler ilk olarak izoelektrik noktasına göre, ikinci olarak ise hidrofobik özelliklerine göre ayrılmaktadır. Yüksek performanslı sıvı kromatografisindeyse, proteinler önce yüksek basınca maruz kalarak kolondan hızla geçirilirken ayırım sağlanmaktadır. Bu yöntem, diğer yöntemlere göre daha fazla ayırma gücüyle, duyarlılığa sahiptir. Proteom incelemelerinde sıvı kromatografi yöntemleri, jel elektroforezi yöntemleri kütle spektrofotometreyle kombineli kullanılarak; proteinlerdeki modifikasyonların belirlenmesine yardımcı olmaktadır (Gezici, 2017).

4.10.2.1.1. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC)

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) yüksek çözünürlük ve güçlü bir ayırma sağlamaktadır. HPLC ayırımı; yük, polarite, boyut veya belirli afiniteler gibi kimyasal özelliklerinden dolayı ayrılmayı sağlamak için proteinler ve peptidler (ve diğer moleküller üzerinde) üzerinde gerçekleştirilmektedir. Analitik sütun, enjeksiyondan sonra proteini, peptidi ya da diğer metabolitleri bağlayan sabit bir faz ile doludur. Numune yüklendiğinde denge durağan faza bağlanma yönelimindedir. Konsantrasyonu (tuz, organik çözücü veya pH tamponu) artan bir çözücü veya tampon olan mobil faz, dengeyi yavaşça durağan faza bağlanmadan uzaklaştırır ve

moleküller kolona bağlanmak yerine mobil fazla hareket etmeye başlatmaktadır. Zamanla, farklı moleküller kolondan çekilir ve ayrı fraksiyonlarda toplanır ve böylece ayırım gerçekleştirilmektedir. Numunedeki proteinleri veya peptidleri tanımlamak için, toplanan fraksiyonlar MS tarafından analiz edilebilmektedir (Grassl, 2007).

4.10.2.2. Enzim bağlı immünosorbent deneyi (ELISA)

İnsan serumunda verilen bir antikorun, antijenin veya hormonun seviyelerini tespit etmek için kullanılmakta ve düşük antikor seviyelerini tespit etmek için son derece hassas yöntemler arasında bulunmaktadır. ELİSA yöntemi antijen-antikor ilişkisinin, antikora bağlanmış bir enzim aktivitesinin izlemesi ile araştırılması temeline dayanmaktadır. ELİSA ile antikor tayin etmek için, önceden üzerinde bilinen antijen emdirilmiş olan mikroplate'ler kullanılmaktadır. İçerisinde antikor araştırılacak olan numune mikroplate uygun ölçülerde eklenmekte ve inkübe edilip yıkanmaktadır. Daha sonra enzim ile işaretlenmiş anti-immüoglobülin eklenmektedir. İnkübe edildikten sonra enzimin aktivitesi spesifik bir substrat eklenerek oluşan rengin yoğunluğu, bir spektrofotometre ile okunmaktadır. Bilinen antijeni sabit tutarak ve test edilecek numune seyreltilerek standart bir kontrole kıyasla belirli bir numunedeki antikor miktarını gösteren, optik yoğunluk okumaları azalan bir eğri üretilmektedir (Zabriskie, 2009).

4.10.2.3. İmmünohistokimya (İHK)

İmmünohistokimya (İHK), bir dokuda bir protein ekspresyonunu belirlemek için kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemle, hücrelerde nükleer, sitoplazmik veya membran da antijenin yerleşimi hakkında bilgi vermektedir. Ayrıca stromal ve ya normal hücreler dahil hücrelerde protein seviyesi ile ilgili bilgiler vermektedir. İHK, iyi sonuçların alınabileceği oldukça basit bir yöntemdir. Kısaca, uygun preparasyondan sonra, doku bölümleri, ilgilenilen antijene yönelik bir birincil antikorla ve daha sonra birincil antikora karşı yönlendirilmiş ikincil bir antikorla inkübe edilmektedir. İkincil antikor, daha sonra optik olarak görselleştirilecek uygun

bir kromojene maruz kalan bir enzime (dolaylı İHK) konjuge edilmektedir. Birincil antikorun doğrudan enzime konjuge olması durumunda, İHK doğrudan olarak adlandırılır, bu dolaylı İHK'den daha basittir bir yöntemdir. İHK'nin en az üç yönü vardır (De Petris, 2010).

4.10.2.3.1. Antijen kazanımı

Bu prosedür, birincil antikor ile bağlanma için antijenleri en iyi şekilde ortaya çıkarmak amacıyla, deparafinasyondan sonra dokuda gerçekleştirilmektedir. Formalin fiksasyonu antijen ile diğer proteinler arasında çapraz bağlara neden olabilmektedir. Antijen kazanımı için temelde iki yöntem bulunmaktadır. Biri, genellikle mikrodalga ile sitrat (pH 6) veya etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) (pH 9) gibi bir tamponun yardımı ile ısıtmaya dayanmaktadır. İkinci yöntem, pronaz E veya proteinaz K gibi proteazlara dayanan enzimatik yola dayanmaktadır. Kullanılacak en uygun antijen geri kazanma yöntemi, antijene göre daha çok antikora bağlı olsa da, enzimatik antijen geri kazanımı küçük parçaların bozulmasına neden olabilmektedir (De Petris, 2010).

4.10.2.3.2. Primer antikor

Belirli bir antijen için bir antikorun mevcudiyeti, büyük hasta kohortlarında erken proteomik bulguları doğrulamak için zorunlu adımlardan bir tanesi olarak düşünülmektedir. Bazı antijenler için bir dizi farklı antikor bulunmaktadır. Bir antikor seçmek için ilk seçim kriteri, üreticilerin İHK için kullanılmasını tavsiye ettiği gerçeğine dayanmaktadır. Ek olarak, bir monoklonal antikorun bir poliklonal antikordan daha iyi olduğu da bilinmektedir.

Bir primer antikor kapsamlı bir şekilde test edilmiş olsa da, hem pozitif hem de negatif kontrolleri kullanarak her zaman kendi bağlanma spesifikliğini kontrol edilmesinde fayda görülmektedir. Pozitif kontrol olarak, aynı boyama sürecinde o proteini ifade ettiği bilinen bir dokunun da boyanması kontrol için iyi olabilmektedir (De Petris, 2010).

4.10.2.3.3. Boyama sonuçlarının puanlanması

İHK nitel bir yöntemdir ve bu nedenle tek başına biyomarker değerlendirmesi için en uygun yöntem olarak görülmemektedir. Nükleer p53, p21 ve ERCC1 gibi bazı antijenler için, pozitif ekspresyon için %1, %5 veya %10'luk bir hücrede pozitif bir sınır oluşturmak ve hücrelerin sayısını saymak mümkündür. Bununla birlikte, çok sayıda sitoplazmatik veya membran antijenleri için, sadece pozitif hücrelere dayanan değerlendirme yeterli olmamaktadır. Bazı proteinler, hücrelerin çoğunda, çeşitli tümör numuneleri arasında değişen bir boyama yoğunluğuyla eksprese edilmektedir. Dahası, aynı numune içerisinde bile protein seviyeleri bazı hücrelerde diğerlerine göre daha yüksek olabilmektedir. Patologlar bu nedenle sadece boyanan hücre sayısını dikkate almayı ve boyanma yoğunluğunu göz ardı etmeyi tercih etmektedirler. Çünkü ikincisi deneysel koşullara ve kromojene maruz kalmaya bağlı değişmektedir. Bir uzlaşma çözümü bulmak için, hücre sayısına ve boyama yoğunluğuna dayalı bir puanlama sistemi geliştirilebilmektedir. Genellikle, pozitif hücrelerin yüzdesine sayısal bir puan atanmaktadır. Ya da sırasıyla negatif, zayıf, orta ya da güçlü ise, boyama yoğunluğuna aşamalı olarak 0 ile 3 arasında bir puan verilmektedir. Nihai sonuç, hücre yüzdesi puanlarının yoğunluğuyla çarpılmasıyla elde edilir ve 0 ile 12 arasında bir puana denk gelmektedir. Bu sistem, İHK'yi yarı kantitatif bir yöntemle dönüştürmektedir. Bu sistemin riski, hücrelerin %75'inden fazlasının zayıf bir şekilde boyanması veya hücrelerin %25 ile %50'sinin orta yoğunlukta boyanması aynı 4 puanına sahip olacaktır. Sonuçları protein fonksiyonuna göre yorumlamak önemlidir. Örneğin, bir proteinin klinik bir sonuçla ilişkilendirilebilmesi için hücrelerin %75'inden fazlasında güçlü bir şekilde eksprese edilmesi gerekip gerekmediğini tahmin edilmelidir (De Petris, 2010).

5. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu yüksek lisans tezi için 14 Nisan 2017 tarihinde Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kuruluna başvurulmuş, 05 Mayıs 2017 tarih ve 09.2017.368 protokol numarasıyla onay alınmıştır.

Bu çalışmaya Gaziosmanpaşa Taksim Eğitim Ve Araştırma Hastanesi Cerrahi Servisi'ne müracaat eden, klinik, ince iğne aspirasyon biyopsisi veya tru-cut biyopsisi sonucu meme kanseri tanısı almış, antiagregan kullanmayan 46 kadın hasta dahil edilmiştir. Hasta grubunun yaş ortalaması 50'dir (± 12). Bu hastaların takibi aynı klinikte görev yapmakta olan Op. Dr. Serkan İLGÜN tarafından yapılmıştır. Çalışmamızın kontrol grubunu 40 sağlıklı kadın oluşturmaktadır.

Tüm hastaların demografik özellikleri, biyokimya ve patoloji sonuçları kaydedilmiştir.

5.1. Gereçler

5.1.1. Kullanılan kimyasal ve sarf malzemeler

FABP4 poliklonal antikor (ABclonal)
İmmünohistokimya doku boyama kiti (BioVision)
İnsan Ki-67 protein ELISA kiti (ABclonal)
İnsan FABP4 ELISA kiti (Elabscience)
İnsan HSL ELISA kiti (ABclonal)
Protein Standart Karışımı (HIC) (186007953)
HPLC kolonu (ZORBAX Stablebond-C18, 3.5 μm , 4.6 x 75 mm)
Ksilen (Tekkim)
%100'lük etanol (Tekkim)
%96'lık etanol (Tekkim)
%80'lik etanol (Tekkim)
Sitrat tamponu (Bio-optica)
Fosfat tamponlu salin (PBS) çözelti (Bio-optica)

Hidrofobik kalem (PAP Pen)
Sodyum fosfat tamponu (Sigma Aldrich)
Sodyum dodesil sülfat (SDS) (Merck)
Dinitrofenilhidrazin (DNPH) (Sigma Aldrich)
Trifloroasetik asit (TFA) (Merck Millipore)
Tris tampon (Merck Millipore)

5.1.2. Kullanılan cihazlar

Otomatik pipetler (Thermo Scientific, Socorex 26111514)
-80 Soğutucu (Sanyo MDF-U3286S)
-20 Soğutucu ((Beko- B9426NM, Uğur UCF 410 SSL)
ELISA Reader (Rayto)
ELISA Washer (Rayto)
Klinik santrifüj (Heraeus Labofuge 200, Hettich Universal / K2S, Elektro.mag)
Vortex (Maximix II)
Etüv (Heraeus)
HPLC (Agilent 1100 Series)
Dedektör (Agilent 1100 Series G1315B DAD)
Kolon (ZORBAX StableBond-C18; Waters Protein-Pak 125)
Etüv (Nüve- EN400)
Mikrodalga (Beko- MD1610)
Mikroskop
Distile su cihazı (Millipore S.A.S- Synergy Uv)
Pozitif Şarjlı Lam (Objektträger)

5.2. Yöntemler

Bu çalışmada ELISA, HPLC ve İmmünohistokimya (İHK) metodları kullanılmıştır.

5.2.1. Serum eldesi

Çalışmaya dahil edilen 46 kadın hasta ve 40 sağlıklı kadının kan örnekleri (5mL) vakutainer serum separatör jel içeren tüp ve antikoagülan olarak sitrat içeren (1:9) tüp içine alındı. Tüpler oda sıcaklığında tutularak kan alımının ilk 1 saati içinde 2400 rpm'de 20 dakika santrifüjlendi. Örnekler analiz edilinceye kadar Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Araştırma ve Geliştirme laboratuvarında – 80 °C'de ve -20 °C'de saklandı.

5.2.2. Serumda ELISA ile FABP4 konsantrasyonunun belirlenmesi

ELISA ile FABP4 konsantrasyon tayini Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya A.B.D. araştırma laboratuvarında gerçekleştirildi. Bu çalışmadaki bağımsız değişkenlerimiz hasta serum örnekleri ve kontrol grubu serum örnekleriyken, bağımlı değişkenimiz serum örneklerindeki FABP4 konsantrasyonu olarak belirlendi.

Serumda yağ asidi bağlayıcı protein 4 (FABP4) konsantrasyonunu belirlemek için Elabscience Human FABP4 ELISA kiti (katalog no: E-EL-H0285) kullanıldı.

5.2.2.1. Kit içeriği

96 kuyucuklu mikropate

Referans standartlar

Konsantre biyotinlenmiş tespit antikoru (100x)

Konsantre HRP konjugatı (100x)

Standart ve örnek seyreltici

Biotinlenmiş tespit antikoru seyreltici

HRP konjugat seyreltici

Konsantre yıkama tamponu (25x)

Substrat reaktifi

Stop solüsyonu

5.2.2.2. Reaktiflerin Hazırlanışı

1. Kullanmadan önce tüm reaktifleri oda sıcaklığına getirildi.
2. **Yıkama tamponu:** 30 mL konsantre yıkama tamponu 720 mL distile su ile seyreltilip 750 mL yıkama tamponu hazırlandı.
3. **Standart çalışma solüsyonu:** Standart 1 dakika boyunca 10000xg'de santrifüjlendi. Standart üzerine 1 mL standart ve numune seyreltici eklenip 10 dakika boyunca ara sıra yavaşça ters çevrilerek seyreltme yapıldı. Tamamen çözündükten sonra bir pipetle iyice karıştırıldı. Bu işlem sonucu 25 ng/mL'lik bir çalışma çözeltisi elde edildi. Sonra 7 tane eppendorf tüp alındı ve her tüpe 500 µL referans standart&örnek seyreltici eklendi. İlk tüpe 25 ng/mL çalışma solüsyonundan 500 µL eklendi ve 12.5 ng/mL çalışma solüsyonu elde edildi. 2.tüpte oluşan solüsyonun 500 µL' sini yeni tüpe eklendi ve 6,25 ng/mL çalışma solüsyonu elde edildi. Bu şekilde hep bir önceki tüpten alınan 500 µL bir sonraki tüpe eklenerek; 25, 12,5, 6.25, 3.13, 1.57, 0.79, 0.39, 0 ng/mL şeklinde bir dilüsyon gradyanı elde edildi.
4. **Biyotinlenmiş tespit antikor çalışma çözeltisi:** Biyotinlenmiş tespit antikorunu kullanmadan önce santrifüjlendi. 90 µL biyotinlenmiş tespit antikorunu, 8910 µL biyotinlenmiş tespit antikor dilüenti ile seyreltildi.
5. **Konsantre HRP konjugat çalışma solüsyonu:** 90 µL konsantre HRP konjugatı 8910 µL HRP konjugat dilüenti ile seyreltildi.

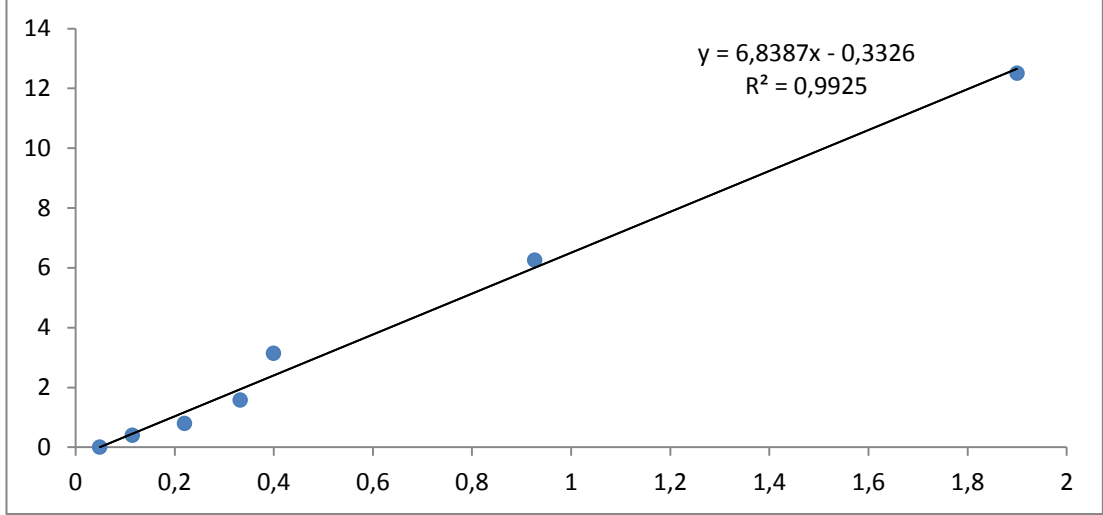
5.2.2.3. Deneyin Yapılışı

1. FABP4 konsantrasyon tayinine kit içindeki reaktifler prosedüre uygun şekilde hazırlanarak başlandı.
2. Kullanmadan önce reaktiflerin ve serum örneklerinin oda ısısına gelmesi beklendi.
3. Mikro plakanın ilk iki sütununa standart çalışma solüsyonundan, yan yana birer kuyucuğa iki kopya halinde olacak şekilde 100 µL eklendi. Diğer kuyucuklara, yan yana birer kuyucuğa iki kopya halinde olacak şekilde 100 µL numuneler eklendi.
4. Mikroplate, kit içinde verilen mikroplate kapağı ile örtülüp 37 °C'de 90 dakika boyunca inkübe edildi.

5. İnkübasyondan sonra kuyucuklarda kalan sıvı uzaklaştırıldı ve her kuyucuğa 100 µL biyotinile edilmiş tespit antikor çalışma çözeltisi eklendi. Mikroplate, kit içerisinden çıkan mikroplate kapağı ile kapatılarak yavaşça bir iki kere masaya vurularak karışması sağlandıktan sonra 37 °C'de 1 saat boyunca inkübe edildi.
6. Kuyucuklar içinde kalan sıvı uzaklaştırıldı ve her bir kuyucuğa 350 µL yıkama solüsyonu eklenip mikroplate yıkayıcı ile 3 defa yıkandı.
7. Yıkamadan sonra her bir kuyucuğa 100 µL HRP konjugat çalışma çözeltisi eklendi ve mikroplate kapatici ile örtülüp 37 ° C'de 30 dakika inkübe edildi.
8. Kuyucuklarda kalan sıvı uzaklaştırıldıktan sonra her bir kuyucuğa 350 µL yıkama solüsyonu eklenip mikroplate yıkayıcı ile 5 defa yıkandı.
9. Her bir kuyucuğa 90 µL substrat reaktifi eklenip mikroplate kapatici ile örtüldükten sonra 37 °C'de 20 dakika mavi renk oluşuncaya kadar inkübe edildi.
10. Her bir kuyucuğa 50 µL stop solüsyonu eklenerek reaksiyon sonlandırıldı bu basamakta renk maviden sarıya döndü. Renk şiddetine bağlı konsantrasyon değerleri 450 nm' de bir mikro plaka okuyucu ile her bir kuyucuğun optik dansitesi takip edilerek belirlendi.

5.2.2.4. Sonuçların hesaplanması

Yapılan çalışma sonucu elde edilen absorbans değerlerinden kalibrasyon standart eğri grafiği çizilmiş ve Şekil 17'de gösterilmiştir.



Şekil 17: FABP4 standart eğri grafiği

Kalibrasyon standart eğri grafiği formülü kullanılarak, hasta ve kontrol serum örneklerinin absorbans değerleri üzerinden konsantrasyonları hesaplandı.

5.2.3. Serumda ELISA ile HSL konsantrasyonunun belirlenmesi

ELISA ile HSL konsantrasyon tayini Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya A.B.D. araştırma laboratuvarında gerçekleştirildi. Bu çalışmadaki bağımsız değişkenlerimiz hasta serum örnekleri ve kontrol grubu serum örnekleriyken, bağımlı değişkenimiz serum örneklerindeki HSL konsantrasyonudur. Serumda insan hormon duyarlı lipaz proteini konsantrasyonunu belirlemek için Abclonal insan HSL ELISA kiti (katalog no: EHH0288) kullanıldı.

5.2.3.1. Kit içeriği

96 kuyucuklu wellplate

Standart A (0 ng/mL)

Standart B (0.5 ng/mL)

Standart C (1.0 ng/mL)

Standart D (2.5 ng/mL)

Standart E (5.0 ng/mL)

Standart F (10 ng/mL)

Substrat A

Substrat B

Durdurucu solüsyon

Enzim solüsyonu

Denge solüsyonu

Yıkama solüsyonu(25x)

5.2.3.2. Reaktif hazırlama

1. Tüm kit bileşenlerinin ve örneklerin oda sıcaklığına gelmesi için, oda sıcaklığında iki saat bekletildi.
2. 40 mL konsantre yıkama çözeltisi 960 mL distile su ile seyreltildi.

5.2.3.3. Deneyin yapılışı

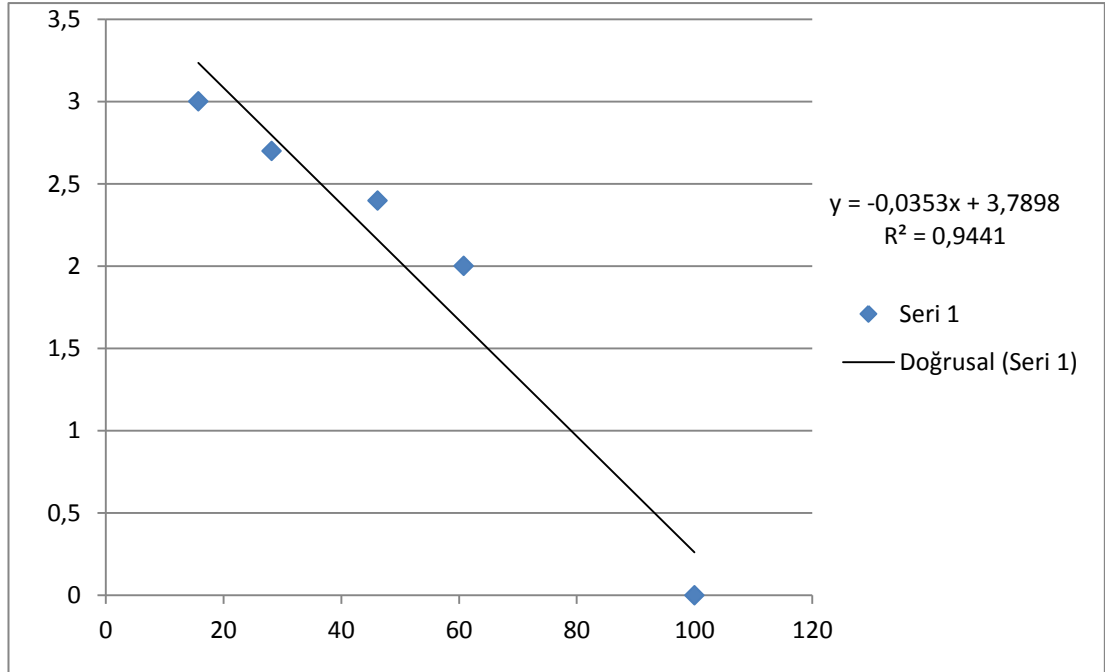
1. HSL konsantrasyon tayinine kit içindeki reaktifler prosedüre uygun şekilde hazırlanarak başlandı.
2. Kullanmadan önce reaktiflerin ve serum örneklerinin oda ısısına gelmesi beklendi.
3. Mikro plakanın ilk iki sütununa standart çalışma solüsyonları, yan yana birer kuyucuğa iki kopya halinde olacak şekilde 100 µL eklendi. Diğer kuyucuklara, yan yana birer kuyucuğa iki kopya halinde olacak şekilde 100 µL numuneler eklendi. Kuyucuklardan bir tanesine yalnızca distile su eklendi. (blank)
4. Numune ve standartların eklendiği her bir kuyucuğa 50 µL enzim solüsyonundan eklenip, plaka sert bir yüzeye birkaç kere vurularak karışması sağlandıktan sonra plaka kapatıcı ile kapatılıp 37 °C'de 60 dakika inkübe edildi. (Distile su eklenen kuyucuğa enzim solüsyonu eklenmedi.)
5. Her bir kuyucuğa seyreltilmiş yıkama solüsyonundan 350 µL eklenip 5 defa yıkandı.

6. Her bir kuyucuğa 50 µL Substrat A ve ardından 50 µL substrat B eklendi. Substratlar ışığa duyarlı olduğundan ışık geçirmeyen bir plaka kapatıcıyla örtülüp oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi.

7. Her bir kuyucuğa 50 µL stop solüsyonu eklenerek reaksiyon sonlandırıldı 450 nm'de bir mikro plaka okuyucu ile her bir kuyucuğun optik dansitesi belirlendi.

5.2.3.4. Sonuçların hesaplanması

Yapılan çalışma sonucu elde edilen absorbans değerlerinden kalibrasyon standart eğri grafiği çizilmiş ve Şekil 18'de gösterilmiştir.



Şekil 18: HSL standart eğri grafiği.

Kalibrasyon standart eğri grafiği formülü kullanılarak, hasta ve kontrol serum örneklerinin absorbans değerleri üzerinden konsantrasyonları hesaplandı.

5.2.4. Serumda ELISA ile Ki67 konsantrasyonunun belirlenmesi

ELISA ile Ki67 konsantrasyon tayini Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya A.B.D. araştırma laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmadaki bağımsız değişkenlerimiz hasta serum örnekleri ve kontrol grubu serum örnekleriyken, bağımlı değişkenimiz serum örneklerindeki Ki67 konsantrasyonudur. Serumda Ki67 protein (Ki67p) konsantrasyonunu belirlemek için Abclonal insan Ki67p ELISA kiti (katalog no: RK01723) kullanıldı.

5.2.4.1. Kit içeriği

96'lı mikrolate

Standart

Tespit reaktifi A

Tespit reaktifi B

TMB substrate

Yıkama tamponu (30x)

Standart dilüenti

Reaktif A dilüenti

Reaktif B dilüenti

Durdurucu solüsyon

5.2.4.2. Reaktiflerin hazırlanması

1. Tüm kit bileşenlerinin ve örneklerin oda sıcaklığına gelmesi için, oda sıcaklığında iki saat bekletildi.

2. Standart çalışma solüsyonu Standart, 1 mL standart dilüenti ile 10 dakika boyunca ara sıra yavaşça ters çevrilerek seyreltme yapıldı. Standartın stok çözeltideki konsantrasyonu 50 ng/mL'dir. Sonra 7 tane eppendorf tüp alındı ve her tüpe 500 µL standart dilüenti eklendi. İlk tüpe 50 ng/mL çalışma solüsyonundan 500 µL eklendi ve 25 ng/mL çalışma solüsyonu elde edildi. 2.tüpte oluşan solüsyonun 500 µL' sini yeni tüpe eklendi ve 12.5 ng/mL çalışma solüsyonu elde edildi. Bu şekilde hep bir

önceki tüpten alınan 500 µL bir sonraki tüpe eklenerek; 50, 25, 12,5, 6.25, 3.12, 1.56, 0.78, 0 ng/mL şeklinde bir dilüsyon gradyanı elde edildi.

3. Tespit reaktifi A ve tespit reaktifi B Tespit reaktifi A ve B çalışmadan önce vortexle karıştırıldı. 120 µL Tespit reaktifi A ve B, 12 mL tespit reaktifi A dilüenti ve tespit reaktifi B dilüenti ile seyreltildi.

4. Yıkama solüsyonu 600 mL yıkama solüsyonu (1x) hazırlamak için; 20 mL yıkama çözeltisi (30x), 580 mL distile su ile seyreltildi.

5.2.4.3. Deneyin yapılışı

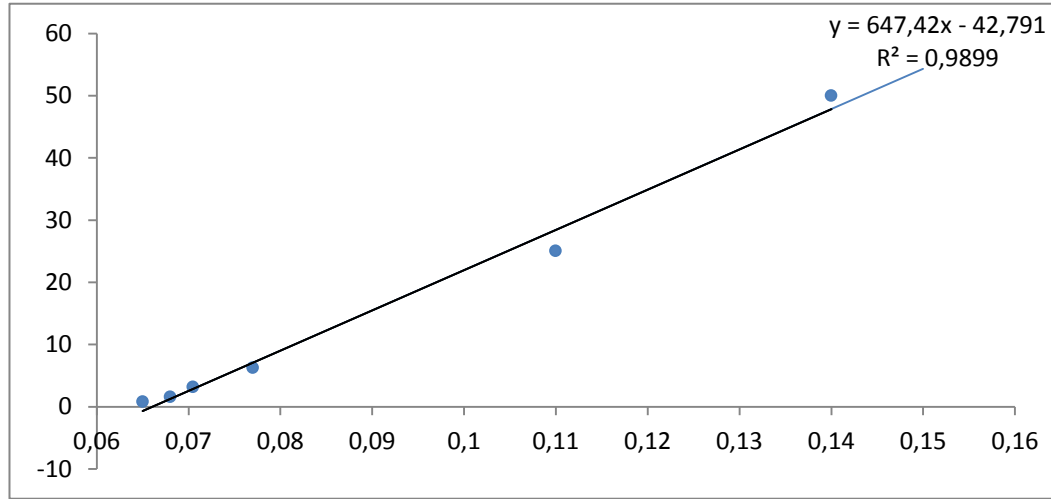
1. Ki67p konsantrasyon tayinine kit içindeki reaktifler prosedüre uygun şekilde hazırlanarak başlandı.
2. Kullanmadan önce reaktiflerin ve serum örneklerinin oda ısısına gelmesi beklendi.
3. Mikro plakanın ilk iki sütununa hazırlanan standart solüsyonları, yan yana birer kuyucuğa iki kopya halinde olacak şekilde 100 µL eklendi. Diğer kuyucuklara, yan yana birer kuyucuğa iki kopya halinde olacak şekilde 100 µL numuneler eklendi. Bir kuyucuğa blank eklendi ve plaka kapatıcı ile örtülüp 37 °C'de 1 saat boyunca inkübe edildi.
4. İnkübasyondan sonra mikroplateki sıvı ters çevirilerek uzaklaştırıldı.
5. Her bir kuyucuğa 100 µL tespit reaktifi A çalışma çözeltisi eklendi. Karışmasını sağlamak için plaka birkaç defa sert bir yüzeye hafifçe vuruldu ve plaka kapatıcı ile örtülüp 37 °C'de 1 saat inkübe edildi.
6. Plakada kalan sıvı uzaklaştırıldıktan sonra otomatik yıkayıcı kullanarak, her kuyucuk 350 µL yıkama çözeltisi(1x) ile 3 kez yıkandı.
7. Her kuyucuğa 100 µL tespit reaktifi B çalışma çözeltisi eklendi. Karışmasını sağlamak için plaka birkaç defa sert bir yüzeye hafifçe vuruldu ve plaka kapatıcı ile kapattıktan sonra 37 °C'de 30 dakika inkübe edildi.
8. Mikroplate kalan sıvı ters çevirilerek uzaklaştırıldıktan sonra otomatik yıkayıcı kullanılarak, her kuyucuk 350 µL yıkama çözeltisi(1x) ile 5 kez yıkama işlemi yapıldı.

9. Her bir kuyucuğa 90 µL substrat çözeltisi eklendi. Karışmasını sağlamak için plaka birkaç defa sert bir yüzeye hafifçe vuruldu ve plaka kapatici ile örtülüp, 37°C’de 20 dakika inkübe edildi. Substrat çözeltisi ilavesiyle renk maviye döndü.

10. İnkübasyondan sonra her bir kuyucuğa 50 µL stop solüsyonu eklendi. Karışmasını sağlamak için plaka birkaç defa sert bir yüzeye hafifçe vuruldu. Durdurma çözeltisinin eklenmesiyle renk maviden sarıya döndü. 450 nm’ye ayarlanmış bir mikro plaka okuyucu ile her bir kuyucuğun optik yoğunluğu belirlendi.

5.2.4.4. Sonuçların hesaplanması

Yapılan çalışma sonucu elde edilen absorbans değerlerinden kalibrasyon standart eğri grafiği çizilmiş ve Şekil 19’da gösterilmiştir.



Şekil 19: Elisa Ki67 standart eğri grafiği.

Kalibrasyon standart eğri grafiği formülü kullanılarak, hasta ve kontrol serum örneklerinin absorbans değerleri üzerinden konsantrasyonları hesaplanmıştır.

5.2.5. Dokuda immünohistokimyasal (İHK) yöntem ile FABP4 protein miktar tayini

5.2.5.1. Doku örneklerinin toplanması

Gaziosmanpaşa Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi Genel Cerrahi servisine başvuran ve klinik, ince iğne aspirasyon biyopsisi veya tru-cut biyopsisi sonucu meme kanseri tanısı almış 46 kadın hastadan biyopsi sonucunda alınan dokular parafin içine sabitlendi. Doku örnekleri çalışılıncaya kadar parafinize şekilde Gaziosmanpaşa Taksim Eğitim ve Araştırma hastanesinde saklandı. Çalışmadan 2 gün önce parafine gömülü dokular Gaziosmanpaşa Taksim Eğitim ve Araştırma hastanesi patoloji laboratuvarında, mikrotom ile uygun büyüklükte kesilerek lamlara geçirildi. Hastalara ait dokuların Ki67 proliferasyonu, ER, PR ve cerbB2 ifadesi gibi klinopatolojik özellikleri Gaziosmanpaşa Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi Patoloji laboratuvarında rutin olarak bakılmaktadır.

Doku örneklerinin deparafinizasyonu ve FABP4 ile immünohistokimyasal boyaması patoloji laboratuvarında gerçekleştirildi.

5.2.5.2. Doku deparafinizasyonu

1. Parafinize haldeki doku örnekleri 70 °C'deki etüvde 45 dakika inkübe edildi.
2. İnkübasyondan sonra doku kesitleri üç ayrı şaledeki ksilen kaplarında 10'ar dakika bekletildi. Bekletme sırasında ara sıra doku örnekleri ksilen içerisine dikey hareketlerle batırılıp çıkarıldı.
3. Ksilenden geçirilen doku örnekleri ksilenden çıkarıldıktan sonra önce %100'lük etanol içerisinde 4 dakika bekletildi. Bekletme sırasında ara sıra doku örnekleri etanol içerisine dikey hareketlerle batırılıp çıkarıldı.
4. %100'lük etanol içerisinden alınan doku örnekleri %96'lık etanol içerisinde 4 dakika bekletildi. Bekletme sırasında ara sıra doku örnekleri etanol içerisine dikey hareketlerle batırılıp çıkarıldı.
5. %96'lık etanol içerisinden alınan doku örnekleri %80'lik etanol içerisinde 4 dakika bekletildi. Bekletme sırasında ara sıra doku örnekleri etanol içerisine dikey hareketlerle batırılıp çıkarıldı.

6. %80'lik etanol içerisinde alınan doku örnekleri distile su içerisinde alınarak 5 dakika bekletildi.

5.2.5.3. Antijen geri kazanımı (Antijen retrieval)

1. Doku örnekleri distile sudan alınıp %10'luk hazırlanan sitrat tamponu (40 mL sitrat+ 360 mL distile su) içine koyulup mikrodalgada önce son güç ayarında 5 dakika, ardından orta güç ayarında 2 tekrar olacak şekilde 5'er dakika inkübe edildi. (Her 5 dakikadan sonra kaptaki sitrat tampon çözeltisi miktarı kontrol edilip azalmışsa üzerine yeniden eklendi.)

2. Mikrodalgadan alınan doku kesitleri sitrat çözeltisi içerisinde çıkarılmadan oda sıcaklığında 20 dakika soğutuldu.

3. Soğutulan doku kesitleri, hazırlanan %10'luk PBS çözelti (50 mL PBS+450 mL distile su) içerisinde 5 dakika boyunca ara sıra dikey hareketlerle nazikçe batırılıp çıkarılarak yıkandı.

5.2.5.4. Peroksidaz block uygulaması

1.Yıkama işleminden sonra dokuların etrafı hidrofobik kalem ile çevrelendi ve çevrelenen her doku kesitine pastör pipeti ile uygun miktarlarda peroksidaz block damlatılıp 7,5 dakika nemli ortamda, oda sıcaklığında inkübe edildi.

2.Peroksidaz block uygulamasından sonra doku kesitleri distile su ile 3 kez yıkandı. Ardından PBS çözelti içerisinde 4 kez ara sıra dikey hareketlerle nazikçe batırılıp çıkarılarak yıkandı.

5.2.5.5. Primer antikor uygulaması

1. PBS ile yıkanan doku kesitleri üzerine dokuları kaplayacak şekilde üzerlerine pastör pipet ile hazırlanan primer antikor (FABP4) damlatıldı ve 1 gün boyunca +4°C'de inkübe edildi.

Primer antikorun hazırlanması:

ABclonal marka FABP4 poliklonal antikor (katalog no: A0232), BioVision marka İHK kit içerisinde sağlanan primer antikor seyreltme tamponu ile 1:100 olacak şekilde dilüe edildi (70 µL FABP4 antikor+ 6930 µL primer antikor seyreltme tamponu).

5.2.5.6. Kromojen uygulaması

1. Antikor uygulamasından sonra doku kesitleri PBS ile 5 defa yıkandı.
2. Oda sıcaklığında 25 dakika HRP polimer ile inkübe edildi.
3. Doku kesitleri PBS ile 6 defa yıkandıktan sonra distile su ile de 3 defa yıkandı.
4. Doku kesitleri üzerine birkaç damla DAB reaktifi eklendi ve oda sıcaklığında 8 dakika inkübe edildi. PBS ile 6 defa yıkandı ve ardından distile su ile durulandı.
5. Hematoksilen ile karşıt boyama yapıldı. Doku kesitlerinin üzerine birkaç damla hematoksilen damlatılıp 45 saniye inkübe edildikten sonra distile su ile doku kesitleri yıkandı.

DAB kromojenin hazırlanması:

Bir test tüpü içine 1 mL Reaktif BS ve 50 µL Reaktif C eklendi ve pipetle iyice karışması sağlandı.

5.2.5.7. Rehidratasyon ve kapama

1. Distile sudan alınan doku kesitleri %80'lik etanol içerisinde 4 dakika bekletildi. Bekletme sırasında ara sıra doku örnekleri etanol içerisine dikey hareketlerle batırılıp çıkarıldı.
2. %80'lik etanol içerisinden alınan doku örnekleri %96'lık etanol içerisinde 4 dakika bekletildi. Bekletme sırasında ara sıra doku örnekleri etanol içerisine dikey hareketlerle batırılıp çıkarıldı.
3. %96'lık etanol içerisinden alınan doku örnekleri %100'lük etanol içerisinde 4 dakika bekletildi. Bekletme sırasında ara sıra doku örnekleri etanol içerisine dikey hareketlerle batırılıp çıkarıldı.

4. 100'lük etanol içerisinde alınan doku kesitleri üç ayrı şaledeki ksilen kaplarında 10'ar dakika bekletildi. Bekletme sırasında ara sıra doku örnekleri ksilen içerisine dikey hareketlerle batırılıp çıkarıldı.

5. Biraz kuruması beklenildikten sonra lamaların üzerine balsam damlatılarak lamel ile kapama yapıldı.

5.2.5.8. İHK boyaması yapılan dokuların FABP4 yaygınlığı ve FABP4 şiddetinin değerlendirilmesi:

İHK yöntemle boyaması yapılan dokuların FABP4 boyanma yaygınlığı ve FABP4 boyanma şiddetinin değerlendirilmesi; İstanbul Gaziosmanpaşa Taksim Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi tıbbi patoloji anabilim dalında Doç.Dr. Elife KIMILIOĞLU tarafından yapılmıştır.

5.2.6. Erken prognozda biyomarker belirlenmesi için kullanılan kromatografik analizler

5.2.6.1. HPLC ile protein karbonil tayini

HPLC ile serum örneklerinde protein karbonil tayini çalışması 5-6 Kasım 2018 tarihinde Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Ar-Ge laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

Oksidatif stresin biyomarkerlarından biri olan protein karbonilin ölçümü Griffiths tarafından geliştirilmiş olan HPLC metodunun modifiye edilmiş şekli ile yapılmıştır.

5.2.6.1.1. Protein karbonil ölçümünde kullanılan çözeltilerin hazırlanması

1. 20 mM 2,4 dinitrofenilhidrazin (DNPH) ve %10 trifloroasetik asit içeren çözelti (derivatizasyon çözeltisi):

0,5 mL TFA bir miktar distile suya ilave edildi. 19,84 mg 2,4 DNPH bu çözeltide çözüldü. Son hacim distile su ile 5 mL'ye tamamlandı.

2. %10'luk TFA çözeltisi (derivatizasyon blank çözeltisi):

5 ml TFA alınarak hacim distile su ile 50 mL'ye tamamlandı.

3. 2M Tris baz çözeltisi (nötralizasyon çözeltisi):

24,22 g Tris tartıldı ve son hacim 100 mL'ye distile su ile tamamlanarak çözüldü.

4. %12'lik sodyum dodesil sülfat (SDS):

12 g SDS tartılarak, distile su ile son hacim 100 mL olacak şekilde tamamlandı.

5. %1 SDS içeren 200mM pH:6,5 sodyum fosfat tamponu (mobil faz):

143,256 g Na₂HPO₄ tartılıp bir miktar distile su ile çözüldü. 20 g SDS ilave edilerek SDS'inde çözülmesi sağlandı. pH:6,5 olacak şekilde son hacim 2 litreye tamamlandı.

5.2.6.1.2. Deneyin yapılışı

1. Protein karbonil tayinine, reaktifler uygun şekilde hazırlanarak başlandı.
2. Meme kanserli hasta serumlarında, kontrol serumlarında ve körde derivatizasyon işlemi tabloda gösterildiği gibi yapıldı (Tablo 3).

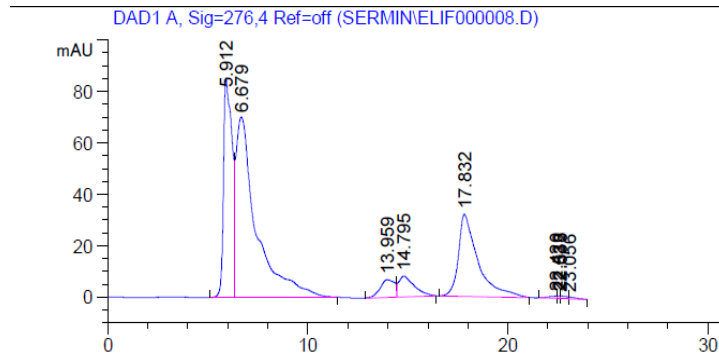
Tablo 3: Protein karbonil ölçümü için yapılan derivatizasyon işlemleri

Reaktifler ve yapılan işlem	Hasta serumu	Kontrol serumu	Kör
Örnek	40	40	40
DNPH	100	100	-
TFA	-	-	80
%12 SDS	40	40	40

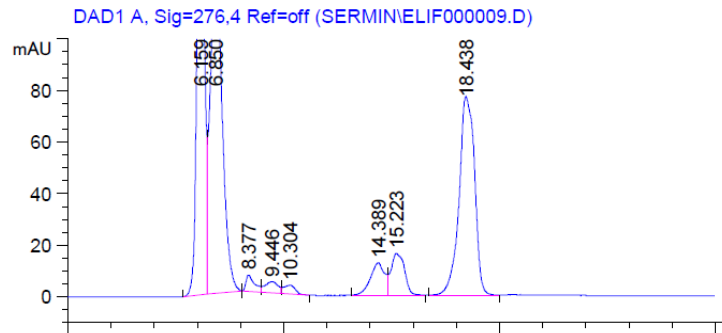
3. Tablodaki derivatizasyon işlemleri yapıldıktan sonra oluşan örnekler 10 dakika vortekslendi.

4. Vortex işleminden sonra tüm örnekler 60 µL Tris tampon eklendi ve tekrar 10 dakika vortekslenerek enjeksiyona hazır hale getirildi.

5. Hazırlanan örnekler 50 µL olarak HPLC sistemine enjekte edilmiştir. HPLC sisteminde mobil fazın akış hızı 0.8 mL'ye, sıcaklık 25 °C'ye, ayarlanıp Agilent 1100 markalı Waters Protein-Pak 125 (katalog no: 84601), 7,8 mm iç çaplı 300 mm uzunluklu HPLC kolon kullanılarak 276 nm ve 360 nm olmak üzere iki farklı dalga boyunda okuma yapılarak çalışıldı. Hasta kan örneklerine ve kontrol grubu kan örneklerine ait kör kromatogramları şekilde gösterildiği gibidir (Şekil 20 ve Şekil 21).



Şekil 20: Kontrol grubuna ait kör kromatogramı



Şekil 21: Hasta grubuna ait kör kromatogramı.

Hasta ve kontrol gruplarına ait kromatogram sonuçlarından, farklılık gözlenen area'lar seçildi ve protein karbonil miktarını hesaplamak için;

$$\text{Protein karbonil} = \frac{50.000 \times 360 \text{ nm deki area}}{22.000 \times (270 \text{ nm deki area} - (360 \text{ nm deki area} \times 0,4))}$$

(mol karbonil/ mol protein)

eşitliği kullanıldı (Augustyniah ve ark., 2015).

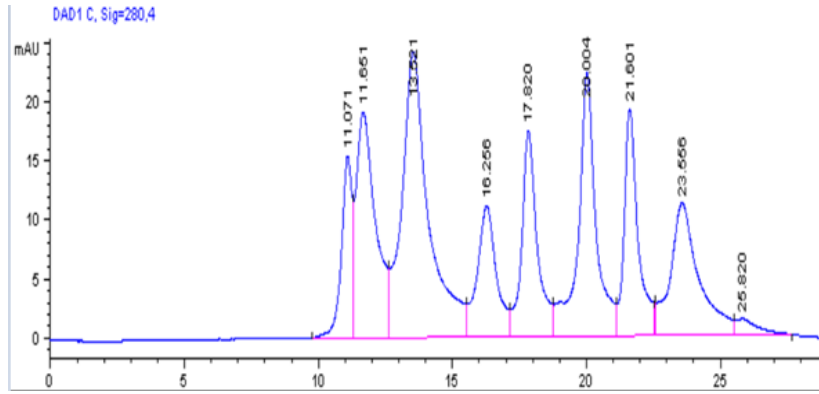
5.2.6.3. HPLC ile FABP4, Ki67 ve HSL'nin yüzde değişim alanlarının belirlenmesi

HPLC ile hasta ve kontrol serum örneklerinde FABP4, Ki67 ve HSL'nin yüzde değişim alanlarının belirlenmesi, Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Ar-Ge laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

5.2.6.3.1 Deneyin yapılışı

Örnekler ve protein standart karışım 50 µL olarak HPLC sistemine enjekte edildi. HPLC sisteminde mobil fazın (izokratik PBS) akış hızı 0,5 mL/dak 'ya, sıcaklık 30 °C'ye, ayarlandı ve Agilent markalı HPLC'de, ZORBAX StableBond-C18, 3.5 µm, 4.6 x 75 mm kolon kullanılarak 280 nm'de okuma yapılarak çalışıldı.

Protein standart karışımında bulunan proteinlerin, moleküler ağırlıkları (mw) ile HPLC'deki alıkonma süreleri (RT) belirlendi (Şekil 22).



Şekil 22: Standart protein karışımının kromatogramı.

Standart karışımında bulunan proteinler; aprotinin (mw: 6,511 kDa, RT: 23,556), RNAaz A (mw: 13,7 kDa RT: 21,601), karbonik anhidraz (mw: 29 kDa RT: 20), ovalbümin (mw: 43, RT: 17,82), aldolaz (158 kDa RT: 16,256), ferritin (mw: 440 kDa, RT: 13,521), tiroglobulin (mw: 669 kDa, RT: 11,651), blue dextran (mw: 2000, RT:11,071)'dir.

Protein standart karışım kromatogramından (Şekil 22) yararlanarak hasta ve kontrol serumlarında bulunan; moleküler ağırlığını bildiğimiz FABP4 (mw: 14,719 kDa), Ki67 (mw: 358,694 kDa) ve HSL (mw: 116,598 kDa) proteinlerin geleceği RT tahmin edildi. Tahmin edilen bu RT'deki protein yüzde alanlar hasta ve kontrol serumlarında karşılaştırıldı.

5.2.7. İstatistiksel analiz

Çalışmada, sürekli değişkenler için tanımlayıcı istatistik olarak ortalama ve standart sapma değerleri hesaplandı. ELISA ve HPLC çalışmalarında istatistiksel analizlerde, tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve bunu takiben Tukey'in çoklu karşılaştırma testleri GraphPad Prism 5 kullanarak analiz edildi. Doku çalışmasında tüm istatistiksel analizlerde SPSS Statistics Subscription programı kullanıldı. . P <0.05, p <0.01, p <0.001 düzeylerindeki ortalamalar arasındaki fark anlamlı kabul edildi.

6. BULGULAR

Çalışmada hasta grubunu 46, kontrol grubunu 40 olgu oluşturdu. Olguların cinsiyetleri ve yaş verileri sayısal olarak Tablo 4'te gösterildi. Kontrol grubuna sağlıklı bireyler dahil edildi.

Tablo 4: Hasta ve kontrol grubunun demografik verileri

	N (Sayı)	Minimum Yaş	Maksimum Yaş	Ortalama Yaş	Standart Sapma	Erkek	Kadın
Hasta (Meme Kanseri)	46	29	87	50,30	12,3	0	20
Kontrol	40	28	60	45,40	10	0	20

Çalışmaya dahil edilen 46 meme kanseri hastasının klinopatolojik özellikleri Tablo 5'te gösterilmektedir.

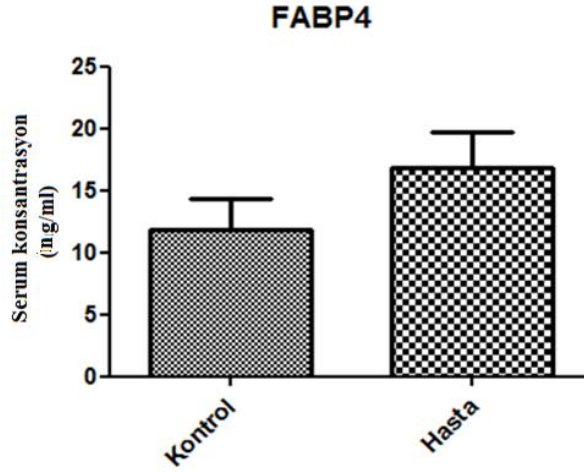
Tablo 5: Meme Kanserli Hastaların Klinopatolojik Özellikleri Yüzdesi

	Hasta Sayısı	Yüzde
Cinsiyet		
Kadın	46	100
Yaş:		
>50	20	43,4
<50	26	56,6
Tümör Büyüklüğü		
T0	2	4,3
T1	26	56,6
T2	18	39,1

Tablo 5: Meme Kanseri Hastalarının Klinikopatolojik Özellikleri Yüzdesi (Devam)

Lenf Nodu Metastazı		
M0	22	47,83
M1	24	52,17
Östrojen Reseptör (ER)		
ER+	42	91,3
ER-	4	8,7
Progesteron Reseptör (PR)		
PR+	34	73,9
PR-	12	26,1
CerbB2 Geni Değerlendirmesi		
CerbB2 + (0-1-2)	30	65,2
CerbB2- (2-3)	16	34,8

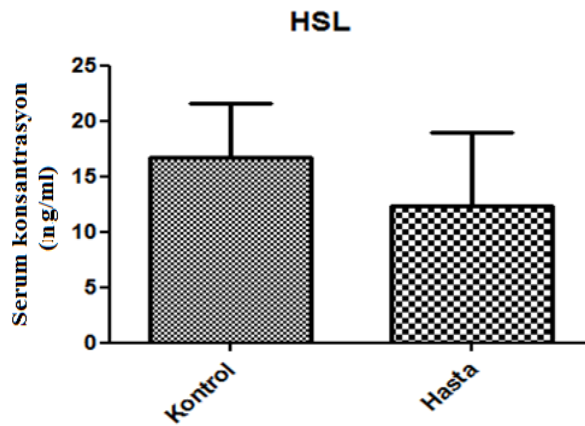
ELİSA çalışması sonucu hastalara ait serum örneklerinde, kontrol serumlarına göre FABP4 konsantrasyonu anlamlı ($P<0.0001$) bir şekilde daha fazla gözlemlendi. Şekil 23’de hasta ve kontrol grubuna ait FABP4’ün serum konsantrasyon miktarları gösterilmiştir.



Şekil 23: Hasta ve kontrol gruplarındaki serum FABP4 konsantrasyon değerleri ng / mL olarak belirlendi ($p < 0,0001$).

Hasta serum örneklerin yapılan ELİSA testi standart eğri grafiğine göre ortalama FABP4 konsantrasyonu $16,80 \pm 2,93$ ng/mL olarak hesaplanırken, kontrol grubu serum örneklerinde FABP4 konsantrasyonu $11,79 \pm 2,58$ ng/mL olarak bulundu.

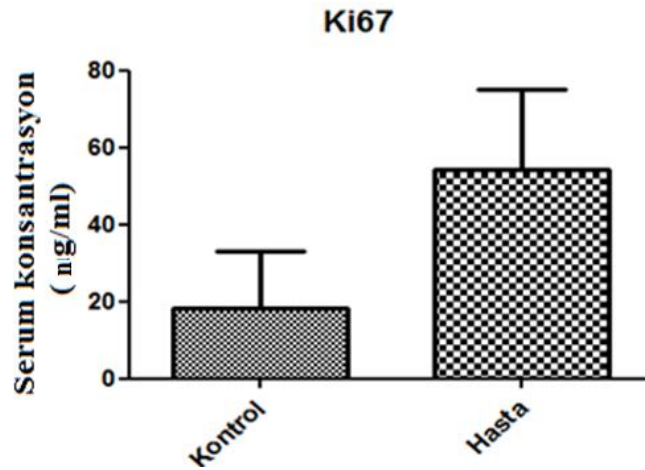
ELISA çalışması sonucu hastaların serumları ile kontrol serumları karşılaştırıldığında, azalan bir HSL konsantrasyonu gözlemlendi ancak HSL konsantrasyonundaki azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($P > 0,0584$) (Şekil 24).



Şekil 24: ELISA sonucu elde edilen hasta ve kontrol gruplarındaki HSL konsantrasyon değerleri ng / mL olarak belirlendi ($p > 0,0584$).

Hasta serum örneklerin yapılan ELİSA testi standart eğri grafiğine göre ortalama HSL konsantrasyonu $12,28 \pm 6,70$ ng/mL olarak hesaplanırken, kontrol grubu serum örneklerinde HSL konsantrasyonu $16,74 \pm 4,85$ ng/mL olarak bulundu.

ELISA çalışması sonucu hastalara ait serum örnekleri ile kontrol serumlarının Ki67 konsantrasyonu karşılaştırıldığında anlamlı ($P < 0.0001$) bir şekilde daha fazla gözlemlendi (Şekil 25).

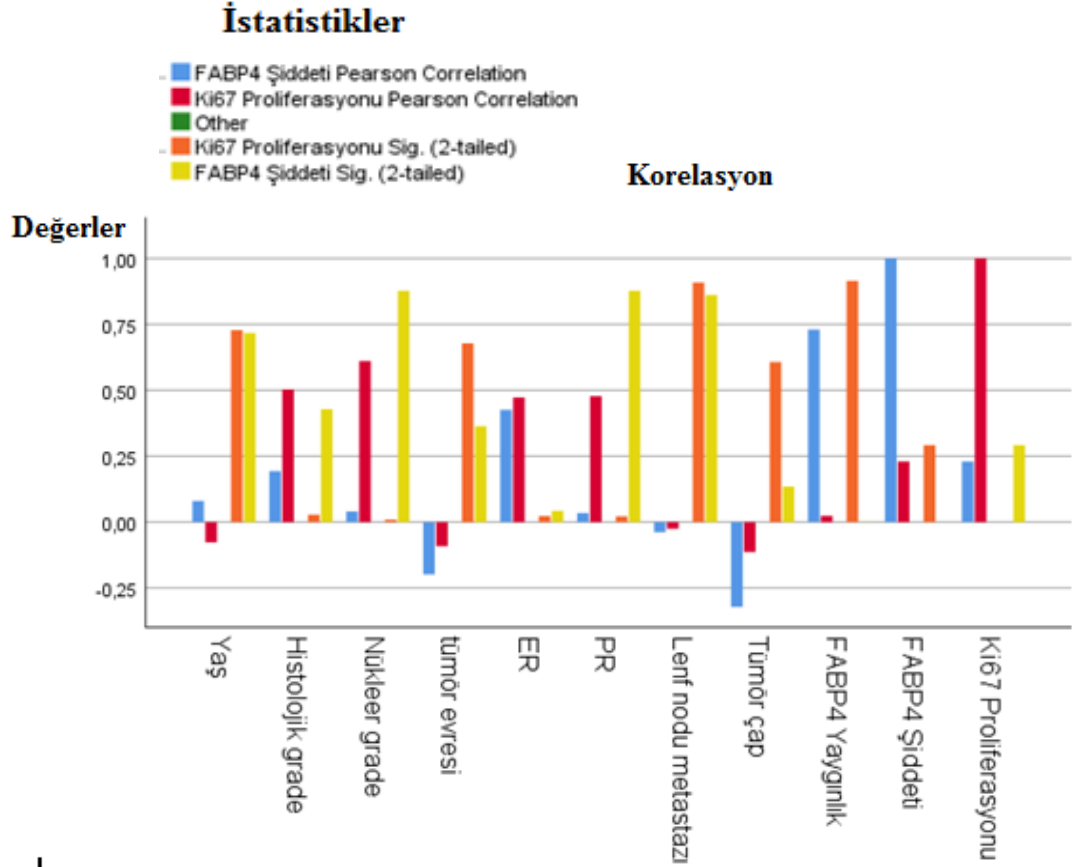


Şekil 25: ELISA sonucu elde edilen hasta ve kontrol gruplarındaki Ki67 konsantrasyon değeri ng / mL olarak belirlendi ($p < 0,0001$).

Hasta serum örneklerin yapılan ELİSA testi standart eğri grafiğine göre ortalama Ki67 konsantrasyonu $54,14 \pm 20,87$ ng/mL olarak hesaplanırken, kontrol grubu serum örneklerinde Ki67 konsantrasyonu $18,29 \pm 14,92$ ng/mL olarak bulundu.

Dokuda immünohistokimyasal (İHK) yöntem ile FABP4 miktar tayini çalışmasında yaş, histolojik grade, nükleer grade, tümör evresi, ER, PR, lenf nodu metastazı, tümör çapı, FABP4 boyanma yaygınlığı, FABP4 şiddeti ve Ki67 proliferasyonu değişkenleri birbirleriyle karşılaştırıldı ve korelasyon yapılarak anlamlılık düzeyleri belirlendi.

FABP4 şiddeti ve Ki67 proliferasyonunun çeşitli değişkenler ile arasındaki anlamlılık ve korelasyon değerleri Şekil 26'da gösterilmiştir.



Şekil 26: FABP4 doku boyamasında hasta dokularında çeşitli değişkenlerle, FABP4 boyanma şiddeti ile Ki67 proliferasyonu anlamlılık ve korelasyon değerlerinin karşılaştırılması.

Meme kanserli hasta dokularında Ki67 proliferasyonu ve histolojik grade karşılaştırıldığında, Ki67 proliferasyonunun artmasının histolojik grade'i arttırdığı görüldü ($p=0,043$; $cc=0,411$).

Meme kanserli hasta dokularında Ki67 proliferasyonu ve nükleer grade karşılaştırıldığında, Ki67 proliferasyonunun artmasının nükleer grade'i de arttırdığı görüldü ($p=0,005$; $cc=0,747$).

Meme kanserli hasta dokularında Ki67 proliferasyonu ve ER karşılaştırıldığında, Ki67 proliferasyonunun arttığında ER ifadesinin anlamlı bir şekilde azaldığı görüldü ($p=0,015$; $cc=-0,580$).

Ki67 proliferasyonu ile cerbB2 ifadesi karşılaştırıldığında Ki67 proliferasyonunun artmasının, cerbB2 ifadesini arttırdığı görüldü ($p=0,22$; $cc=0,551$).

Ki67 proliferasyonu ile tümör evresi arasında ($p=0,641$), Ki67 proliferasyonu ile PR ifadesi arasında ($p=0,076$), Ki67 proliferasyonu ile lenf nodu metastazı arasında ($p=0,066$), Ki67 proliferasyonu ile tümör çapı arasında ($p=0,788$), Ki67 proliferasyonu ile FABP4 boyanma şiddeti arasında ($p=0,510$) anlamlılık bulunmadı.

Meme kanserli hasta dokularında FABP4 boyanma şiddeti ile ER karşılaştırıldığında FABP4 boyanma şiddetinin arttığı dokularda ER ifadesinin azalmış olduğu gözlemlendi ($p=0,010$; $cc=-0,609$).

FABP4 ile histolojik grade arasında ($p=0,467$), FABP4 ile nükleer grade arasında ($p=0,765$), FABP4 ile tümör evresi arasında ($p=0,437$), FABP4 ile PR ifadesi arasında ($p=0,767$), FABP4 ile lenf nodu metastazı arasında ($p=0,819$), FABP4 ile tümör çapı arasında ($p=0,168$) anlamlılık bulunmadı.

Meme kanserli hasta dokularında cerbB2 ifadesi ile ER ifadesi karşılaştırıldığında, cerbB2 ifadesi arttığında ER ifadesinin anlamlı bir şekilde azaldığı yani aralarında negatif bir korelasyonun olduğu görüldü ($p=0,004$; $cc=-0,658$). Meme kanserli hasta dokularında cerbB2 ifadesi ile FABP4 boyanma şiddeti ($p=0,189$), cerbB2 ile PR ifadesi arasında ($p=0,174$), cerbB2 ile histolojik grade arasında ($p=0,552$), cerbB2 ile nükleer grade arasında ($p=0,418$), cerbB2 ile yaş arasında ($p=0,249$), cerbB2 ile tümör çapı arasında ($p=0,734$) ve cerbB2 ile metastaz arasında ($p=0,901$) anlamlı bir farklılık bulunmadı.

Çalışma sonucu meme kanserli hasta dokularında yaş ve tümör evresi karşılaştırıldığında, yaş arttıkça tümör evresinde arttığı aralarında kuvvetli bir anlamlılık ve korelasyon bulunduğu görüldü ($P=0,004$; Korelasyon katsayısı (cc)= $0,511$).

Meme kanserli hasta dokularında yaş ve ER değerleri karşılaştırıldığında, yaşın artmasına bağlı olarak ER ifadesinin azaldığı görüldü ($p= 0,022$; $cc= -0,411$ (negatif korelasyon)).

Meme kanserli hasta dokularında yaş ve PR karşılaştırıldığında, yaş arttıkça PR ifadesinin azaldığı, aralarında sınırdaki bir anlamlılık ile negatif korelasyon görüldü ($P= 0,050$; $CC= -0,351$).

Meme kanserli hasta dokularında yaş ve tümör çapı karşılaştırıldığında, yaş arttıkça tümör çapının da arttığı görüldü ($P= 0,028$; $CC= 0,332$). Yaş ile histolojik grade arasında ($p=0,464$), yaş ile nükleer grade arasında ($p=0,680$), yaş ile lenf nodu metastazı arasında ($p=0,689$), yaş ile FABP4 boyanma şiddeti arasında ($p=0,652$), yaş ile Ki67 proliferasyonu arasında ($p=0,746$) anlamlılık bulunmadı.

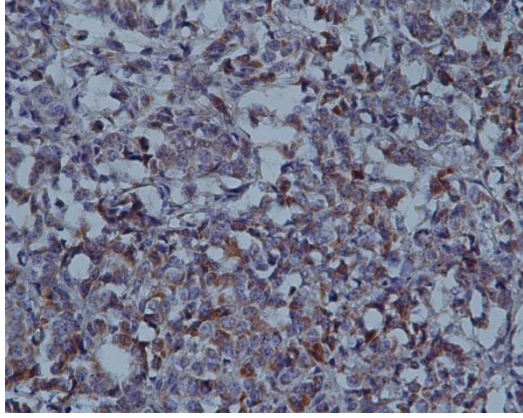
Meme kanserli hasta dokularında tümör çapı ve tümör evresi karşılaştırıldığında, tümör çapı arttıkça tümör evresinin de arttığı görüldü ($p<0,0001$; $cc= -0,744$). Tümör çapı ile histolojik grade arasında ($p=0,819$), tümör çapı ile nükleer grade arasında ($p=0,855$), tümör çapı ile ER ifadesi arasında ($p=0,102$), tümör çapı ile PR ifadesi arasında ($p=0,420$) ve tümör çapı ile metastaz arasında ($p=0,242$) anlamlılık bulunmadı.

Meme kanserli hasta dokularında ER ve PR karşılaştırıldığında, ER ifadesinin artmasının PR ifadesini de artırdığı, aralarında kuvvetli bir anlamlılık ve pozitif korelasyon olduğu görüldü ($p= 0,015$; $cc= 0,519$). ER ifadesi ile nükleer grade arasında ($p=0,313$), ER ifadesi ile lenf nodu metastazı arasında ($p=0,950$) anlamlılık bulunmadı.

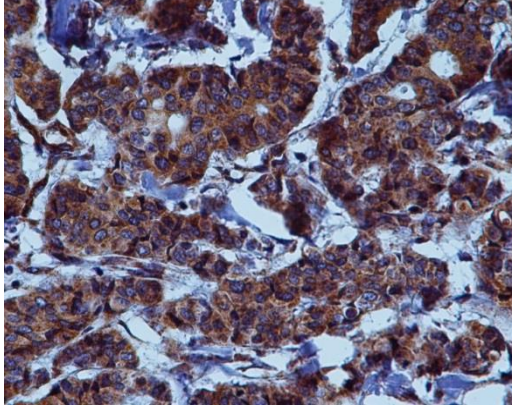
Meme kanserli hastalara ait dokulardaki FABP4 ekspresyonu ile hastalara ait serum FABP4 ekspresyon düzeyleri karşılaştırıldığında aralarında anlamlı bir farklılık gözlenmedi ($p=0,90$).

Meme kanserli hastalara ait dokulardaki Ki67 ekspresyonu ile hastalara ait serum Ki67 ekspresyon düzeyleri karşılaştırıldığında aralarında anlamlı bir farklılık gözlenmedi ($p=0,66$).

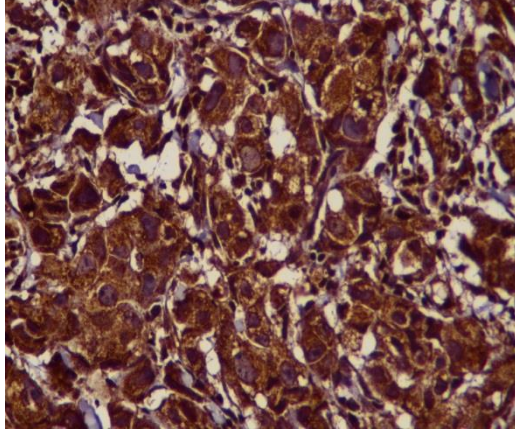
Dokuda immünohistokimyasal (İHK) yöntem ile FABP4 miktar tayini çalışmasında 46 kanserli dokudan 12 tanesinde zayıf şiddette (Şekil 27), 20 tanesinde orta şiddette (Şekil 28), 12 tanesinde kuvvetli (Şekil 29) ve 2 tanesinde ise negatif boyanma gözlemlendi.



Şekil 27: İnvaziv duktal karsinomlu dokuda FABP4 antikor ile zayıf şiddetli sitoplazmik boyanma.

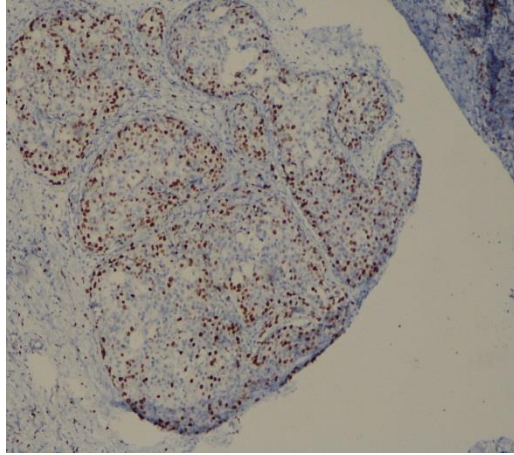


Şekil 28: Şekil 28: İnvaziv duktal karsinomlu dokuda FABP4 antikor ile orta şiddette sitoplazmik boyanma.

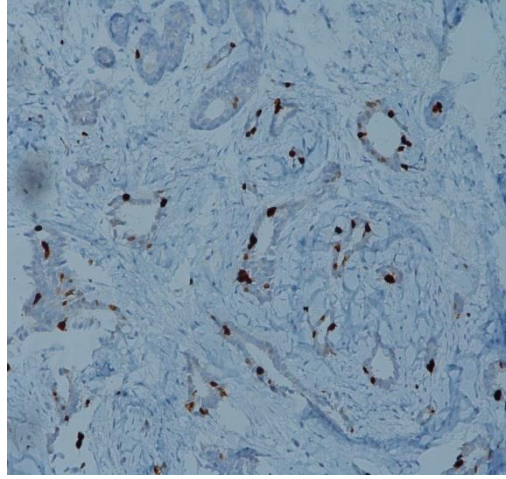


Şekil 29: Şekil 29: İnvaziv duktal karsinomlu dokuda FABP4 antikor ile kuvvetli sitoplazmik boyanma.

Dokuda immünohistokimyasal (İHK) yöntem ile Gaziosmanpaşa Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nde rutin olarak bakılan Ki67 proliferasyonu % $24,59 \pm 15,12$ 'dir. Hastalara ait örnek bir yüksek Ki67 proliferasyonu (Şekil 30) ve düşük Ki67 proliferasyonu (Şekil 31) verilmiştir.

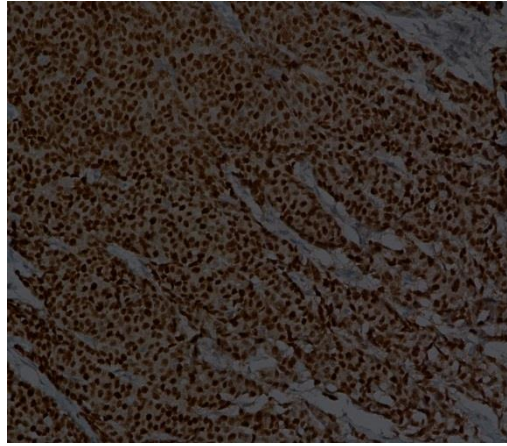


Şekil 30: Meme kanserli dokuda yüksek Ki67 proliferasyonu

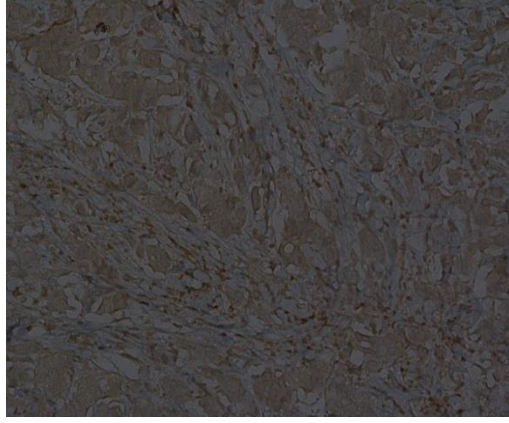


Şekil 31: Meme kanserli dokuda düşük Ki67 proliferasyonu

Dokuda immünohistokimyasal (İHK) yöntem ile Gaziosmanpaşa Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nde rutin olarak bakılan ER ifadesi pozitiflik ve negatiflik durumuna göre hastaların % 91,3'si ER+ iken %8,7'si ER- 'tir. Hastalara ait örnek bir ER+ (Şekil 32) ve ER- (Şekil 33) boyanma verilmiştir.

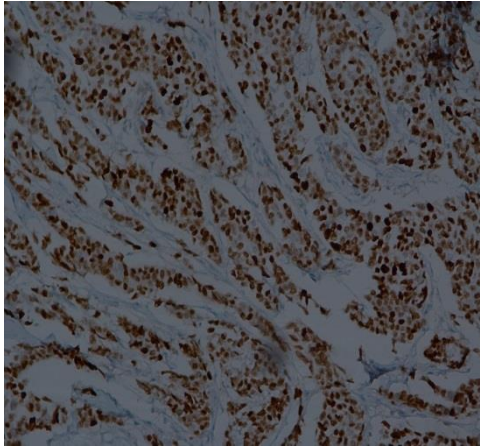


Şekil 32 Meme kanserli dokuda ER+ boyanma

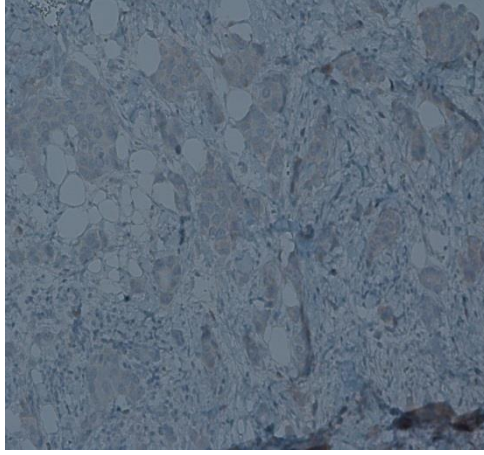


Şekil 33 Meme kanserli dokua ER- boyanma

Dokuda immünohistokimyasal (İHK) yöntem ile Gaziosmanpaşa Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nde rutin olarak bakılan PR ifadesi pozitiflik ve negatiflik durumuna göre hastaların % 73,9'u PR+ iken %26,1'i PR- 'tir. Hastalara ait örnek bir PR+ (Şekil 34) ve PR- (Şekil 35) boyanma verilmiştir.

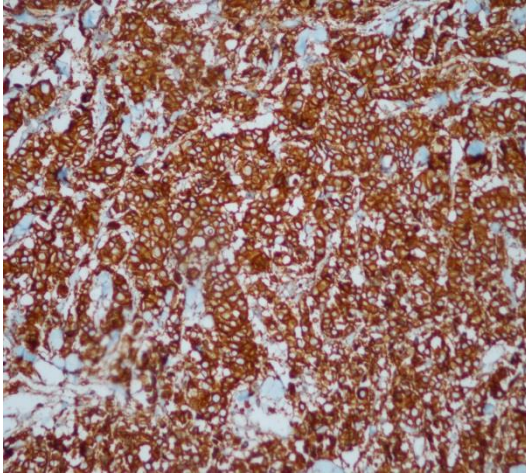


Şekil 34 Meme kanserli dokuda PR+ boyanma

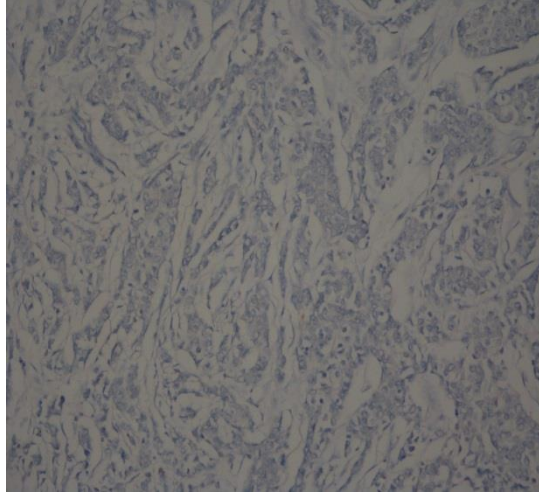


Şekil 35 Meme kanserli dokuda PR- boyanma

Dokuda immünohistokimyasal (IHK) yöntem ile Gaziosmanpaşa Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nde rutin olarak bakılan cerbB2 ifadesi pozitif ve negatiflik bakımından hastaların %22,22'si cerbB2 + iken % 77,78'i cerbB2 – 'tir. Hastalara ait örnek bir cerbB2+ (Şekil 36) ve cerbB2- (Şekil 37) boyanma verilmiştir.



Şekil 36 Meme kanserli dokuda cerbB2 + boyanma



Şekil 37 Meme kanserli dokuda cerbB2 - boyanma

Hasta ve kontrol serumlarında HPLC ile 280 nm ve 360 nm’de ölçülen RT değerleri ve bu RT’lerdeki piklerin % area’ları Tablo 6’ da gösterilmiştir.

Tablo 6 : Hasta ve kontrol serumlarında HPLC’de belirlenen RT değerleri ve bu RT’lerdeki piklerin % area’ları

	Hasta Serumlarında		Kontrol Serumlarında	
	RT	% Area	RT	% Area
280 nm	6,59 ± 0,09	41,73 ± 4,86	6,57 ± 0,09	48,31 ± 14,82
360 nm	6,59 ± 0,37	8,79 ± 4,11	6,60 ± 0,10	1,23 ± 1,04

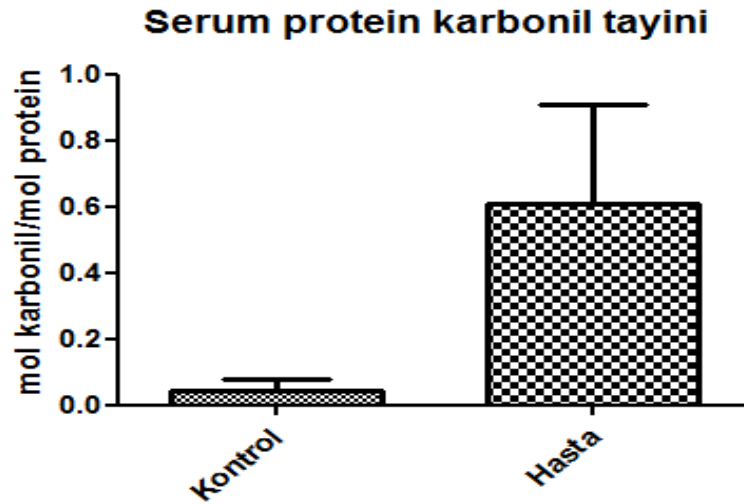
Hasta serum örneklerinde, HPLC ile protein karbonil miktarının hesaplanmasında; elde edilen HPLC kromatogramları kullanılarak, 280 nm’de ölçülen RT: 6,59 ± 0,09’da elde edilen piklerin % area’ları 41,73 ± 4,86 olarak

belirlendi. Protein karboil miktarı tayininde 360 nm'de ölçülen RT: $6,59 \pm 0,37$ 'de elde edilen piklerin % area'ları $8,79 \pm 4,11$ olarak belirlendi.

Kontrol serum örneklerinde elde edilen HPLC kromatogramları kullanılarak; 280 nm'de RT: $6,57 \pm 0,09$ 'da elde edilen piklerin % area'ları $48,31 \pm 14,82$ olarak belirlendi. Protein karbonil miktarı tayininde 360 nm'de ölçülen RT: $6,60 \pm 0,10$ 'da elde edilen piklerin % area'ları $1,23 \pm 1,04$ olarak bulundu.

Pik % area'ları kullanılarak protein karbonil miktarı hesaplama eşitliği ile hasta ve kontrol gruplarındaki protein karbonil miktarları belirlendi. Hasta serumlarındaki protein karbonil miktarı $0,61 \pm 0,3$ mol karbonil/mol protein olarak hesaplanırken, kontrol serumlarındaki protein karbonil miktarı $0,04 \pm 0,03$ mol karbonil/mol protein olarak bulundu.

Elde edilen bu bilgiler doğrultusunda yapılan istatistiksel çalışma sonucu; HPLC çalışması sonucu hastalara ait serum örneklerinde, kontrol serumlarına göre protein karbonil miktarı anlamlı ($P < 0.0001$) bir şekilde daha fazla gözlemlendi (Şekil 38).

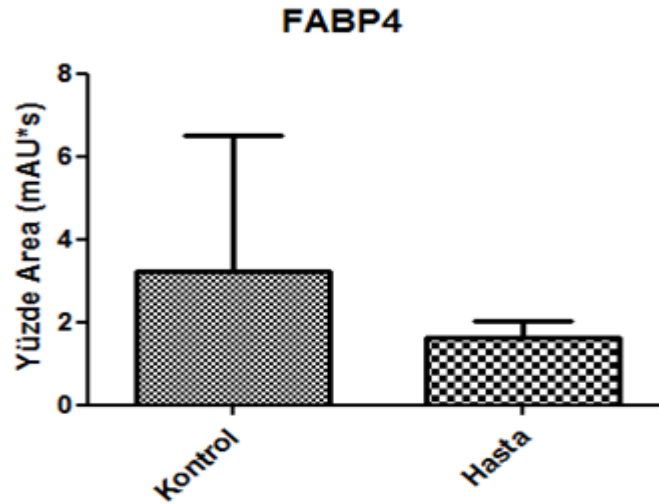


Şekil 38: HPLC sonucu elde edilen hasta ve kontrol serum örneklerindeki protein karbonil miktarı (mol karbonil/ mol protein).

HPLC yöntemi ile biyomarker olarak seçilen FABP4, Ki67 ve HSL'nin yüzde değişim alanları ile bu proteinlerin meme kanserine bağlı modifikasyonları belirlendi. Protein standart karışımı ile standart eğri grafiği çizildi; sonra modifiye proteinlerin RT'leri ve % area'ları tespit edilerek modifikasyonları belirlendi. HPLC'de proteinlerin RT'leri; FABP4 için hasta serumlarında RT: $17,51 \pm 0,01$, kontrol serumlarında RT: $17,46 \pm 0,46$ olarak; HSL için hasta serumlarında RT: $14,46 \pm 0,01$, kontrol serumlarında RT: $14,74 \pm 0,03$ olarak; Ki67 hasta serumlarında RT: $6,94 \pm 0,01$, kontrol serumlarında RT: $6,57 \pm 0,09$ olarak belirlendi.

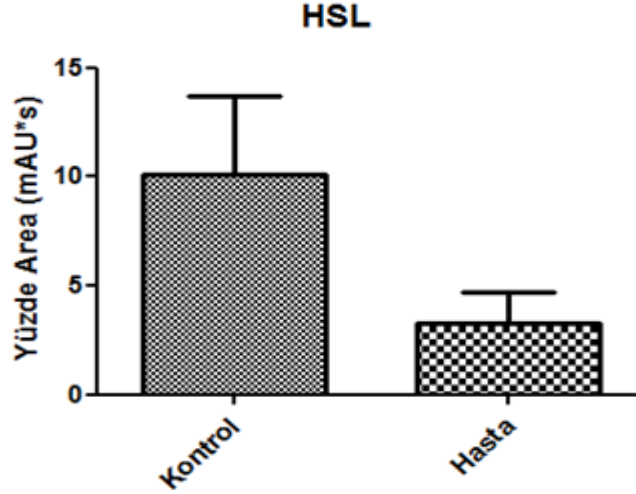
Bu RT'lerdeki protein yüzde areaları; FABP4 için hasta serumlarında $1,61 \pm 0,44$ olarak, kontrol grubu serumlarında $3,24 \pm 3,26$ olarak; Ki67 için hasta serumlarında $41,18 \pm 4,14$ olarak, kontrol grubu serumlarında $48,30 \pm 14,82$ olarak; HSL için hasta serumlarında $3,31 \pm 1,40$ olarak, kontrol grubu serumlarında $10,09 \pm 3,63$ olarak belirlendi.

Hasta ve kontrol serum örneklerinde FABP4 yüzde areaları karşılaştırıldığında, kontrol grubuna göre hasta serum örneklerinde % area'nın anlamlı bir değişikliğe sahip olmadığı belirlendi ($p > 0,05$) (Şekil 39).



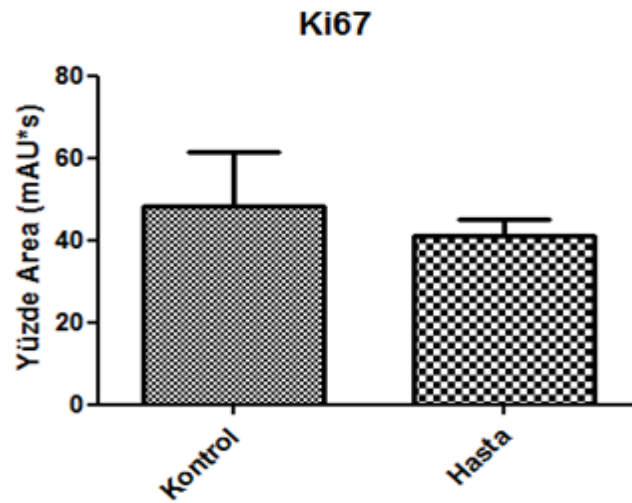
Şekil 39: Kontrol ve hasta serum örneklerindeki FABP4 protein yüzde area'ların karşılaştırılması ($p > 0,05$).

Hasta ve kontrol serum örneklerinde HSL % area'ları karşılaştırıldığında, kontrole göre, hasta serum örneklerinde % area'nın anlamlı bir şekilde azalmış olduğu görüldü ($p < 0,0001$) (Şekil 40).



Şekil 40: Kontrol ve hasta serum örneklerindeki HSL protein yüzde area'ların karşılaştırılması ($p < 0,0001$).

Hasta ve kontrol serumlarındaki Ki67 % area değerlendirmesi Şekil 41'de verilmiştir.



Şekil 41: Kontrol ve hasta serum örneklerindeki Ki67 protein % area'ların karşılaştırılması ($p > 0,05$).

Hasta ve kontrol serum örneklerinde Ki67 % areaları karşılaştırıldığında, kontrol grubuna göre, hasta serum örneklerinde yüzde area'nın anlamlı bir değişikliğe sahip olmadığı belirlendi ($p > 0,05$).

7. TARTIŞMA ve SONUÇ

Meme kanserinin erken evrelerinde tespiti, başarılı bir klinik tedavi için çok önemlidir. Ancak meme kanseri, sağlıklı kontrollerden doğru ve güvenilir şekilde ayıran biyomarker'lardan yoksundur. Şu anda, meme kanseri için mevcut onaylanmış plazma / serum biyomarker'lar mevcut değildir. Sadece birkaç biyomarker (HER-2 / neu, ER ve PR) tanı ve prognoz için yarar sağlamaktadır. Bu nedenle, meme kanseri için yeni biyomarker'lara büyük ihtiyaç bulunmaktadır. Serum biyomarker'ları için umut vaat eden çalışmalardan biri de proteomik yaklaşımdır. Bugüne kadar tanımlanmış olan protein biyomarker'ları, meme kanserinin erken teşhisi için tek tek faydaya sahip olmakla birlikte, gerekli duyarlılığa / özgüllüğe sahip olmadıkları için, bir protein biyomarker paneli yapılmasının literatüre katkı sağlayacağı düşünülmektedir (Misk ve Kim, 2011).

Çalışmamızda, meme kanserinin erken prognozu için protein olarak; FABP4, HSL ve Ki67 'nin meme kanserli hasta ve kontrol serumlarındaki konsantrasyon değerleri ELISA ile belirlendi. Elde edilen bilgilerin korelasyonu için hasta serumlarında HPLC ile HSL, Ki67, FABP4'te meydana gelen modifikasyonlar sağlıklı kontrol serumları ile karşılaştırıldı ve kanserli meme dokusunda immünohistokimyasal yöntemle FABP4 ve Ki67 ekspresyon değişimleri izlendi.

Kanserde, bazı adipokinlerin (yağ doku tarafından salgılanan sitokinler) rolü belirlenmiştir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar adipokinlerin meme kanseri gelişimi ve ilerlemesine katkıda bulunabileceğini göstermiştir. Bazı çalışmalarda FABP4 kanser hücresi büyümesi ve metastazı ile ilişkilendirilmiştir. Bu verilere rağmen, FABP4'ün meme kanserindeki rolü hakkında çok az şey bilinmektedir (Guaita ve ark., 2017).

Çalışmamızda FABP4'ün meme kanseri prognozu, tümör oluşumu, tümör evresine olan katkısı ve metastaza etkisi incelendi.

Yapmış olduğumuz ELISA çalışması sonucunda hastalara ait serum örneklerinde, kontrole göre FABP4 konsantrasyonu anlamlı yüksek bulundu ($P<0.0001$). Bu nedenle meme kanserli kişilerde FABP4'ün daha fazla eksprese edildiği düşünülmektedir. İmmünohistokimyasal FABP4 boyaması sonucunda, FABP4 boyama şiddetinin fazla olduğu dokularda ER ifadesinin anlamlı bir şekilde azaldığı aralarında negatif bir korelasyon olduğu gözlemlendi.

Putti ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya göre östrojen reseptörü (ER) negatif meme kanserleri, prognozu kötü olan bir grup tümördür ve ER-pozitif tümörlere kıyasla daha az kanser önleme ve tedavi stratejileri mevcuttur (Putti ve ark., 2005).

Putti ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya göre ER-negatif tümörler, ER-pozitif meme kanserine kıyasla daha yüksek bir p53, CerbB2 ve epidermal büyüme faktörü reseptörü ekspresyonu göstermektedir (Putti ve ark., 2005). Bizim yaptığımız çalışmada da ER- tümörlerde artmış bir cerbB2 ifadesi görülmüştür.

Kim ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada FABP4 pozitifliğinin ER negatifliği ile anlamlı olarak korele olduğunu ileri sürmüşlerdir ($p = 0.018$). Kim ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya göre FABP4 pozitifliği üçlü negatif meme kanseri hastalarında daha kısa hastalısız sağkalım ve genel sağkalım ile ilişkili bulunmuştur (Kim ve ark., 2014).

Kim ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada FABP4 ekspresyonu , HER2 tümörlerde en yüksek gözlenmektedir. Çalışmamızda FABP4 boyanma şiddeti ile HER2 ifadesi arasında anlamlı bir korelasyon görülmedi ($p=0,189$) (Kim ve ark., 2014).

Guaita ve arkadaşlarının yaptığı çalışma ve başka çalışmalar ile bazı metabolik hastalıkları olan kişilerde dolaşımda artmış FABP4 seviyeleri tanımlanmıştır. Guaita ve arkadaşları FABP4'ün hücre proliferasyonunu arttırdığını ancak MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde hücre göçüne neden olmadığını bulmuşlardır. Ayrıca Guaita ve arkadaşları çalışmalarında, FABP4 meme kanseri dokusunda anjiyojenezi indükleyebileceğini; FABP4'ün diğer çalışmalar tersi bir durum sunmuş olsalar bile, meme kanseri dokusunda aşırı ifade edilebileceğini; memeyi çevreleyen yağ

dokusundan gelen eFABP4'ün (eksojen FABP4), kanser ilerlemesinde merkezi bir role sahip olduğunu öne sürmüşlerdir (Guaita ve ark., 2017).

Tüm bu bilgiler ışığında çalışmamızda çalışmamızda FABP4'ün; ELISA metodunda gözlenen artmış seviyeleri ve doku boyaması sonucunda ER ile negatif bir korelasyon göstermesi meme kanseri prognozunda kullanılabilecek aday biyomarker'lardan biri olabileceğini düşündürmektedir.

Hasta ve kontrol serumlarında HSL konsantrasyonu ELISA ile belirlendi. Hasta HSL düzeyleri kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($P>0,0584$). Ayrıca HPLC metodu ile hasta ve kontrol grubundaki HSL modifikasyonu karşılaştırılmasında, kontrol grubunda % area 10,09 hasta serum örneklerinde % area 3,31 bulundu ve HSL % area'sının kontrole göre anlamlı bir şekilde azaldığı görüldü ($p<0,0001$). Hastalarda HSL serum seviyesindeki kontrole göre azalma ve HSL yapısındaki değişimler meme kanserinin erken teşhisinde fayda sağlayabileceği düşündürmektedir. FABP-4 ve HSL proteinlerinin teşhis marker'ları olarak kullanılabilmesi için farklı çalışmalar ile bu sonuçların desteklenmesi gerektiği görüşünderiz.

Kim ve arkadaşları Western blot yöntemi ile farklı meme kanseri hücre hatları arasında lipid metabolizmasına bağlı proteinlerin ekspresyonunu ortaya çıkarmışlardır. Spesifik olarak, HSL, MDA-MB-453 hücrelerinde (HER2 alt tipi) yüksek oranda eksprese edilmiş; FABP4 ise MCF-7 hücrelerinde (luminal alt tipi) ve MDA-MB-453 hücrelerinde eksprese olmuş, MDA-MB-435S, MDA-MB-231 ve MDA-MB-468 (üçlü negatif meme kanseri tipi) hücrelerindeki daha yüksek olduğunu bildirilmiştir (Kim ve ark., 2019).

Olaniyan ve Seun ise, HSL gen polimorfizminin meme kanseri gelişiminde bir risk faktörü olup olmadığını araştırmışlar ve sonucunda HSL gen polimorfizminin, hem test hem de kontrol grubundaki farklı alel yüzdesi baz alındığında, meme kanseri deneklerinde bir risk faktörü olarak görülmediğini ileri sürmüşlerdir (Olaniyan ve Seun 2016).

İmmünohistokimya çalışmamızda meme kanserli hasta dokularında artmış Ki67 proliferasyonunun cerbB2 ifadesini, histolojik grade'i, nükleer grade'i de artırdığı

görülürken ER ifadesini azalttığı gözlemlendi. Bu dört histopatolojik parametre ile Ki67 proliferasyonu arasında anlamlı bir bağlantı bulunduğu tespit edildi. Ayrıca hasta ve kontrol grupları ELISA ile ölçülen serum Ki67 konsantrasyonu sonuçlarında da hasta serumlarında anlamlı bir şekilde Ki67 konsantrasyonları daha yüksek gözlemlendi. HPLC metodu ile hasta ve kontrol grubundaki Ki67 modifikasyonu karşılaştırıldığında, hasta serum örneklerinde % area'nın kontrole göre azalmış olduğu görüldü. Ancak bu durum istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p > 0.05$).

St Gallen'de, ASCO tavsiyelerinde ve Alman Disiplinler arası S3 Meme Kanseri Teşhisi, Tedavisi ve İzlenmesi İçin Rehber İlkeler Ki-67'i rutin bir parametre olarak tanıtmamış olmalarına rağmen, Ki67 klinik rutinde kullanılmaktadır (Inwald ve ark., 2013).

Yine Inwald ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada Ki-67'nin primer meme kanserli hastalardaki tümörlerin büyük bir kısmında proliferasyon edildiği bildirilmiştir. Çalışma Ki-67'nin histopatolojik parametrelerle ilişkili olduğunu göstermiştir. Daha büyük tümör evreleri ve artmış nodal durum, yüksek Ki-67 proliferasyonu ile ilişkili bulunmuştur. Araştırmacılar klasik histopatolojik parametrelerin derecelendirilmesi ve Ki-67 proliferasyonu arasında güçlü bir ilişki tespit etmişlerdir. Bu korelasyon çeşitli eski çalışmalarda da kanıtlanmıştır. Sonuç olarak, bu çalışma yüksek Ki-67'nin hastaliksız sağ kalım ve genel sağkalım için prognostik bir parametre olduğunu doğrulamaktadır (Inwald ve ark., 2013).

Ki-67'nin aksine, histolojik derecelendirmenin prognozda kullanılması uzun süredir tedavi kararlarında en sık kullanılan parametrelerden biridir ve derecelendirmenin çeşitli tümörlerde çoğalmanın yanı sıra farklılaşmayı da açıkladığı düşünülmektedir (Inwald ve ark., 2013).

Biz çalışmamızda Ki67 artışı ile nükleer ve histolojik grade, cerbB2 artışı ve ER- 'lik ile ilişkisini gösterdik; Ki67'nin FABP4, PR ve tümör çapı ilişkisinde anlamlılık tespit etmedik. Bu bulgular Ki67'nin prognostik ve tedavi amaçlı kullanımının standardize edilmeye ihtiyacı olduğunu göstermektedir.

Grade artışı kötü prognoz ile ilişkilendirilmektedir.(Frkovic-Grazio ve Bracko, 2002). Ki67 ekspresyonu kötü prognostik bir belirteç olduğu için, kötü prognozlu tümör tiplerinde yüksektir (Haroon ve ark., 2013).

Haroon ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada Ki67 ile tümör derecesi, PR, Her2neu(cebB2) pozitifliği arasında anlamlı ilişki bulundu. Meme kanseri saldırganlığı, Ki67 pozitif kanser hücrelerinin yüzdesiyle doğrudan ilişkili görünmektedir. Çünkü Ki67'nin immünohistokimyasal ekspresyonunun farklılaşma derecesi, lenf nodu metastazı ve PR ekspresyonu ve Her2neu pozitifliği ile ilişkili olduğu gözlenmiştir. Histolojik dereceler, kesin olarak tümörleri sonuçları açısından düşük ve yüksek risk gruplarına (derece 1 ve derece 3) ayırır. Bununla birlikte, meme kanserlerinin yaklaşık% 40-50'si daha az iyi tanımlanmış bir risk ile 2. derece olarak sınıflandırılır. 2. derece popülasyonda Ki-67 endeksinin kullanılması, onları alt sınıflandırmada özellikle faydalı olabilir. Bir diğer önemli konu, hangi hastaların 'yüksek Ki-67' olarak sınıflandırıldığını ve bu nedenle daha kötü prognoza sahip olduğunu belirler ve bu hastalar genellikle daha agresif tedavi alırlar(Haroon ve ark., 2013).

Zhaoyun ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ER- ve PR- olan hastalarda, Ki67 proliferasyonunun daha yüksek olduğunu belirtmişlerdir (Zhaoyun ve ark.,2017). Bizim çalışmamızda da Ki67 proliferasyonu ER ile negatif korelasyon göstermektedir.

Çalışmamızda meme kanserli hasta serumları ile sağlıklı kontrol serumlarında HPLC ile protein karbonil miktarı karşılaştırılması yapıldı. Hasta serumlarındaki protein karbonil miktarı 0,61 kontrol serumları protein karbonil miktarı 0,04'e göre anlamlı bir şekilde arttığı gözlemlendi ($p < 0.0001$). Bu durum şunu ifade etmektedir ki meme kanserli hastalar artmış oksidatif stres altındadır ve bundan dolayı da serum örneklerinde bir oksidatif stres biomarker'ı olan protein karbonil miktarları sağlıklı kişilere göre oldukça fazla miktarlarda bulunmuştur.

Proteinler içindeki bazı amino asitlerin hastalık şiddetine bağlı olarak oksidasyonu, protein karbonillerinin oluşmasına neden olarak proteinlerin yapısal fonksiyonlarını değişmesine veya katalitik aktivite kaybına sebep olmaktadır (Dalle-Donne ve ark., 2003). Oksidasyon sırasında karbonil gruplar oluşmaktadır ve protein karbonil seviyeleri, protein oksidasyonunun en güvenilir biyomarker'larından biridir

ve yaşlanma, Alzheimer hastalığı, diyabet, enflamatuvar , bağırsak hastalıkları, artrit, kanser de dahil olmak üzere çeşitli hastalıklarda birikimleri gözlenmektedir.

Rossner ve arkadaşları, plazma protein karbonil düzeyleri ile meme kanseri riski arasında pozitif bir ilişki bulmuşlardır. Çalışmalarında iki oksidatif stres biyomarker'ında (idrar 15F2t-izoprostanlar ve protein karbonilleri) gözlemledikleri yükselmeyi, artan meme kanseri riski ile ve oksidatif stresin kanser etiolojisinde rol oynayabileceği hipotezi ile ilişkilendirmişlerdir (Rossner ve ark., 2007). Protein karbonillerinin plazma seviyeleri, meme kanseri riski ile anlamlı bir pozitif ilişki ve ileri seviyedeki meme kanseri ile güçlü bir korelasyon sağlaması ve yapılmış araştırmalarda plazma, doku ve insan hücre dizilerindeki protein karbonil seviyelerinin tümörün ilerlemesi ile ilişkili olabileceği ileri sürülmüştür (Mannello ve ark., 2009).

Mannello ve arkadaşlarının yapmış olduğu meme aspire sıvısı (NAF) protein karbonil konsantrasyonları çalışmasında, tümör evresi ve NAF protein karbonil konsantrasyonu arasında bir korelasyon gösterilmemiş, ancak kansere doğru ilerleyen malign öncesi meme hastalıkları olan kadınlarda elde ettikleri bulgular plazma, doku ve hücre dizilerinde yapılan çalışma raporları ile benzerlik göstermiştir (Mannello ve ark., 2009).

Sonuç olarak; T1 ve T2 evresindeki meme kanserli olgularda, serumda FABP4 ve Ki67 değerlerinin anlamlı yüksek, HSL konsantrasyonunun düşük bulunması; serum analizleri ile bu biyomarkerların prognozda kullanılabileceğini öngörmekteyiz. Çalışmamızda protein karbonil miktarının, meme kanserli kadınların serumlarında kontrole göre anlamlı yüksek bulunması meme kanserinin prognozunda güvenilir bir biyomarker olduğunu ileri sürmekteyiz. Tabiki protein karbonil miktarının serumdaki artmış değeri, farklı hastalıklar için de mümkün olduğundan meme kanserine spesifik bir biyomarker olarak düşünülmemektedir.

Serum protein FABP4, Ki67 ve HSL modifikasyonlarının saflaştırılmış proteinler ile hasta serum proteinlerinin HPLC'de karşılaştırılarak izlenmesi tarafımızca önerilmektedir. Çünkü serum ELISA analizlerinde FABP4 ve Ki67 kontrole göre anlamlı yüksekken, HSL kontrole göre düşük bulundu. Ancak HPLC

analizinde tüm parametrelerin modifikasyonları kontrole göre düşük bulundu. Bu proteinlerin modifikasyonlarının ileri analizler ile doğrulanmasını önermekteyiz.

Doku FABP4 çalışmasında, FABP4'ün boyanma şiddetine bağlı olarak parametrelerle karşılaştırılmasındaki tartışmalı sonuç, doku FABP4 boyamasının büyük hasta gruplarıyla çalışılmasını önermekteyiz. Ayrıca hasta popülasyonuna T3 evreli hastalarında dahil edilmesinin tümör gelişimi ile FABP4 ilişkisini göstermesi açısından uygun olacağını düşündürmektedir.

8. KAYNAKLAR

Adami HO, Malke B, Holmberg L, Persson I, Stone B. The relation between survival and age at diagnosis in breast cancer. *N Engl J Med.* 1986;315:559-63.

Adeyinka A, Emberley E, Niu Y, Snell L, Murphy LC, Sowter H, Wykoff CC, Harris AL, Watson PH. Analysis of gene expression in ductal carcinoma in situ of the breast. *Clin Cancer Res.* 2002;8(12):3788-3795.

Allen NE, Beral V, Casabonne D, Kan SW, Reeves GK, Brown A, Green J. Moderate alcohol intake and cancer incidence in women. *J Natl Cancer Inst.* 2009;101(5):296–305.

Allred DC, Mohsin SK, Fuqua SA. Histological and biological evolution of human premalignant breast disease. *Endocr Relat Cancer.* 2001;8(1):47-61.

Anders CK, Hsu DS, Broadwater G, Acharya CR, Foekens JA, Zhang Y, Wang Y, Marcom PK, Marks JR, Febbo PG, Nevins JR, Potti A, Blackwell KL. Young age at diagnosis correlates with worse prognosis and defines a subset of breast cancers with shared patterns of gene expression. *J Clin Oncol.* 2008;26(20):3324-30.

Andersson Y, Frisell J, Sylvan M, de Boniface J, Bergkvist L. Breast cancer survival in relation to the metastatic tumor burden in axillary lymph nodes. *J Clin Oncol.* 2010;28(17):2868-73.

Andreeva VA, Unger JB, Pentz MA. Breast cancer among immigrants: a systematic review and new research directions. *J Immigr Minor Health.* 2007;9(4):307–322.

Augustyniak E, Adam A, Wojdyla K, Rogowska-Wrzesinska A, Willetts R, Korkmaz A, Atalay A, Weber D, Grune T, Borsa C, Gradinaru D, Chand Bollineni R, Fedorova M, Griffiths HR. Validation of protein carbonyl measurement: A multi-centre study. *RedoxBiology* 2015;4: 149-157

Bandera EV, Maskarinec G, Romieu I, John EM. Racial and ethnic disparities in the impact of obesity on breast cancer risk and survival: a global perspective. *Adv Nutr.* 2015;6(6):803–819.

Beal MF. Oxidatively modified proteins in aging and disease. *Free Radical Biology and Medicine.* 2002;32(9):797-803.

Beiki O, Hall P, Ekblom A, Moradi T. Breast cancer incidence and case fatality among 4.7 million women in relation to social and ethnic background: a population-based cohort study. *Breast Cancer Res.* 2012;14(1):R5.

Bolton JL, Thatcher GR. Potential mechanisms of estrogen quinone carcinogenesis. *Chemical research in toxicology.* 2008;21(1):93-101.

Brennan L.A. Biomarkers of oxidative stress as predictors of breast cancer risk in women and adolescent girls. University of Columbia, Mailman School of Public Health, Doctoral thesis, 2016, New York (Advisors: Prof. Dr. R Santella).

Brennan M. Breast cancer in ethnic minority groups in developed nations: case studies of the United Kingdom and Australia. *Maturitas.* 2017;99:16–19.

Carter CL, Allen C, Henson DE. Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24,740 breast cancer cases. *Cancer.* 1989;63:181-7.

Colditz GA, Frazier AL. Models of breast cancer show that risk is set by events of early life: prevention efforts must shift focus. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1995;4(5):567-71.

Colleoni M, Sun Z, Price KN, Karlsson P, Forbes JF, Thürlimann B, Gianni L, Castiglione M, Gelber RD, Coates AS, Goldhirsch A. Annual hazard rates of recurrence for breast cancer during 24 years of follow-up: results from the International breast cancer study group trials I to V. *J Clin Oncol.* 2016;34:927-35.

Cui Y, Song M, Kim SY. Prognostic significance of fatty acid binding protein-4 in the invasive ductal carcinoma of the breast. *Pathol Int.* 2019;69(2):68-75.

Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin Chim Acta.* 2003;329(1-2):23-38.

Danielsen T. Protein markers of oxidative stress damage: Applications to experimental research and effects of fatty acids. University of Oslo, Institute of Public Health, Master's thesis, 2015, Oslo (Advisors: Prof.Dr. Hylland K.; Dr. Hofer T.; Dr. Lindeman B.).

de Boer M, van Dijck JA, Bult P, Borm GF, Tjan-Heijnen VC. Breast cancer prognosis and occult lymph node metastases, isolated tumor cells, and micrometastases. *J Natl Cancer Inst.* 2010;102:410-25.

De Petris L. Discovery and validation of protein biomarkers for lung cancer. University of Karolinska, Department of Oncology and Pathology, Doctoral thesis, 2010, Stockholm (Advisors: Prof. Dr. Lehtiö J.; Prof. Dr.Lewensohn R.).

Del Rio D, Stewart AJ, Pellegrini N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2005;15(4):316-28.

Denkert C, Budczies J, von Minckwitz G, Wienert S, Loibl S, Klauschen F. Strategies for developing Ki67 as a useful biomarker in breast cancer. *Breast.* 2015;24(2):67-72.

DeSantis CE, Fedewa SA, Goding Sauer A, Kramer JL, Smith RA, Jemal A. Breast cancer statistics, 2015: Convergence of incidence rates between black and white women. *CA Cancer J Clin.* 2016;66:31-42.

Ejlertsen B, Jensen MB, Rank F, Rasmussen BB, Christiansen P, Kroman N, Kvistgaard ME, Overgaard M, Toftdahl DB, Mouridsen HT. Population-based study of peritumoral lymphovascular invasion and outcome among patients with operable breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2009;101:729-35.

Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology.* 1991;19:403-10.

Erbas B, Provenzano E, Armes J, Gertig D. The natural history of ductal carcinoma in situ of the breast: a review. *Breast Cancer Res Treat.* 2006;97(2):135-44.

Etzioni R, Urban N, Ramsey S, McIntosh M, Schwartz S, Reid B, Radich J, Anderson G, Hartwell L. The case for early detection. *Nat. Rev. Cancer.* 2003;3(4):243-252.

Evans DG, Howell A. Breast cancer risk-assessment models. *Breast Cancer Res.* 2007;9(5):213.

Fitzgibbons PL, Page DL, Weaver D, et al: Prognostic factors in breast cancer. *Arch Pathol Lab Med.* 2000;124(7):966-78.

Foulkes WD, Grainge MJ, Rakha EA, Green AR, Ellis IO. Tumor size is an unreliable predictor of prognosis in basal-like breast cancers and does not correlate closely with lymph node status. *Breast Cancer Res Treat.* 2009;117(1):199-204.

Fredholm H, Eaker S, Frisell J, Holmberg L, Fredriksson I, Lindman H. Breast cancer in young women: poor survival despite intensive treatment. *PLoS One*. 2009;4(11):e7695.

Frkovic-Grazio S, Bracko M: Long term prognostic value of Nottingham histological grade and its components in early (pT1N0M0) breast carcinoma. *J Clin Pathol*. 2002;55:88-92.

Gao W, Wu J, Chen X, Lin L, Fei X, Shen K, Huang O. Clinical validation of Ki67 by quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) in HR+/HER2- early breast cancer. *J Cancer*. 2019; 10(5):1110-1116.

Gladstone IM Jr, Levine RL. Oxidation of proteins in neonatal lungs. *Pediatrics*. 1994;93(5):764-8.

Goossens N, Nakagawa S, Sun X, Hoshida Y. Cancer biomarker discovery and validation. *Transl Cancer Res*. 2015;4(3):256-269.

Gorrini C, Baniasadi PS, Harris IS, Silvester J, Inoue S, Snow B, Joshi PA, Wakeham A, Molyneux SD, Martin B, Bouwman P, Cescon DW, Elia AJ, Winterton-Perks Z, Cruickshank J, Brenner D, Tseng A, Musgrave M, Berman HK, Khokha R, Jonkers J, Mak TW, Gauthier ML. BRCA1 interacts with Nrf2 to regulate antioxidant signaling and cell survival. *JEM Home*. 2013;210(8):1529-44.

Grassl J. Breast cancer serum proteomics: Sample processing and protein profiling by mass spectrometry. University of Swandsea, School of medicine, Doctoral theses, 2007, Swandsea (Advisors: Prof. Dr. Brenton G.).

Guaita-Esteruelas S, Saavedra-García P, Bosquet A, Borràs J, Girona J, Amiliano K, Rodríguez-Balada M, Heras M, Masana L, Gumà J. Adipose-derived fatty acid-binding proteins plasma concentrations are increased in breast cancer patients. *Oncologist*. 2017;22(11):1309-1315.

Hakem R, de la Pompa JL, Sirard C, Mo R, Woo M, Hakem A, Wakeham A, Potter J, Reitmair A, Billia F. The tumor suppressor gene *Brcal* is required for embryonic cellular proliferation in the mouse. *Cell*. 1996;85(7):1009-23.

Hamajima N, Hirose K, Tajima K, et al. Alcohol, tobacco and breast cancer collaborative reanalysis of individual data from 53 epidemiological studies, including 58,515 women with breast cancer and 95,067 women without the disease. *Br J Cancer*. 2002;87(11):1234–1245.

Haroon S, Hashmi AA, Khurshid A, Kanpurwala AM, Mujtuba S, Malik B, Faridi N. Ki67 index in breast cancer: correlation with other prognostic markers and potential in pakistani patients. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2013;14(7):4353-8.

Hayes DF, Bast RC, Desch CE, Fritsche H Jr, Kemeny NE, Jessup JM, Locker GY, Macdonald JS, Mennel RG, Norton L, Ravdin P, Taube S, Winn RJ. Tumor marker utility grading system: a framework to evaluate clinical utility of tumor markers. *J Natl Cancer Inst*. 1996;88(20):1456-66.

Ibrahim EM, Abouelkhair KM, Kazkaz GA, Elmasri OA, Al-Foheidi M. Risk of second breast cancer in female Hodgkin's lymphoma survivors: a meta-analysis. *BMC Cancer*. 2012;12:197-215.

Imran A, Zeid A, Kishwar S, Afzal H, Iqbal H. Role of chromatography for monitoring of breast cancer biomarkers. *Recent Patents on Biomarkers*. 2011;1:89-97.

Israyelyan AH. The development of molecular diagnostics for breast cancer. University of Louisiana State, Veterinary Medical Sciences - Pathobiological Sciences, Master's Theses, 2003, Baton Rouge (Advisor: Prof. Dr. Miller J.).

Kelsey JL, Gammon MD, John EM. Reproductive factors and breast cancer. *Epidemiologic reviews*. 1993;15(1):36-47.

Key TJ, Appleby PN, Reeves GK, Travis RC, Alberg AJ, Barricarte A, Berrino F, Krogh V, Sieri S, Brinton LA, Dorgan JF, Dossus L, Dowsett M, Eliassen AH, Fortner RT, Hankinson SE, Helzlsouer KJ, Hoff man-Bolton J, Comstock GW, Kaaks R, Kahle LL, Muti P, Overvad K, Peeters PH, Riboli E, Rinaldi S, Rollison DE, Stanczyk FZ, Trichopoulos D, Tworoger SS, Vineis P. Sex hormones and risk factor breast cancer in premenopausal women: a collaborative reanalysis of individual participant data from seven prospective studies. *The lancet oncology*. 2013;14(10):1009-19.

Kim S, Lee Y, Koo JS. Differential Expression of Lipid Metabolism-Related Proteins in Different Breast Cancer Subtypes. *PLoS ONE*. 2015; 10(3): e0119473.

Kraemer FB, Shen WJ. Hormone-sensitive lipase: control of intra cellular tri(di)acylglycerol and cholesteryl ester hydrolysis. *J Lipid Res*. 2002;43(10):1585-94.

Kulasingam V. Identification And Validation Of Candidate Breast Cancer Biomarkers: A Mass Spectrometric Approach. University of Toronto, Department of Laboratory Medicine and Pathobiology, Doctoral Theses, 2008, Toronto (Advisor: Prof. Dr. Diamandis E.).

LaMarca HL, Rosen JM. Minireview: hormones and mammary cell fate- What will I become when I grow up? *Endocrinology*. 2008;149(9):4317-4321.

Lassere MN. The Biomarker-Surrogacy Evaluation Schema: a review of the biomarker-surrogate literature and a proposal for a criterion-based, quantitative, multidimensional hierarchical levels of evidence schema for evaluating the status of biomarkers as surrogate endpoints. *Statistical Methods in Medical Research*. 2008;17(3):303-40.

Liu Z, Zhang C, Zhuo P, Hei K, Wang X, Yu Q, Huo Z, Wang F, Yu Z. Characteristic of ER+/PR- and Ki67 value with breast cancer. *Int J Clin Exp Med*. 2017;10(2):3533-3539.

McNally S, Martin F. Molecular regulators of pubertal mammary gland development. *Ann Med*. 2011;43(3):212-234.

McPherson K, Steel CM, Dixon JM. ABC of breast diseases. Breast cancer epidemiology, risk factors, and genetics. *BMJ*. 2000;321(7261):624–628.

Mehta S, Shelling A, Muthukaruppan A, Lasham A, Blenkiron C, Laking G, Print C. Predictive and prognostic molecular markers for cancer medicine. *Ther Adv Med Oncol*. 2010;2(2):125-48.

Narod SA, Brunet JS, Ghadirian P, Robson M, Heimdal K, Neuhausen SL, Stoppa Lyonnet D, Lerman C, Pasini B, de los Rios P, Weber B, Lynch H. Tamoxifen and risk of contralateral breast cancer in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: a case-control study. *The Lancet*. 2000;356(9245):1876-81.

Narod SA, Foulkes WD. BRCA1 and BRCA2: 1994 and beyond. *Nat Rev Cancer*. 2004;4(9):665-76.

Nathanson KL, Wooster R, Weber BL. Breast cancer genetics: what we know and what we need. *Nature medicine*. 2001;7(5):552-6.

Oakes SR, Hilton HN, Ormandy C. The alveolar switch: coordinating the proliferative cues and cell fate decisions that drive the formation of outcome. *Cell Stem Cell*. 2007;1(5):555-567.

Olaniyan MF, Seun BC. Lipid Profile and Hormone Sensitive Lipase [HSL] Gene Variant in Nigeria Women with Breast Cancer. *Int J of Allied Med Sci and Clin Research*. 2016;4(3):507-516.

Palmer JR, Wise LA, Hatch EE, Troisi R, Titus-Ernstoff L, Strohsnitter W, Kaufman R, Herbst AL, Noller KL, Hyer M, Hoover RN. Prenatal diethylstilbestrol exposure and risk of breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2006;15(8):1509-14.

Pegram MD, Konecny G, Slamon DJ. The molecular and cellular biology of HER2/neu gene amplification/overexpression and the clinical development of herceptin (trastuzumab) therapy for breast cancer. *Cancer Treat Res.* 2000;103:57-75.

Penault-Llorca F, Radosevic-Robin N. Ki67 assessment in breast cancer: an update. *Pathology.* 2017;49(2):166-171.

Pestalozzi BC, Zahrieh D, Mallon E, et al: Distinct clinical and prognostic features of infiltrating lobular carcinoma of the breast: combined results of 15 International Breast Cancer Study Group clinical trials. *J Clin Oncol.* 2008;26:3006-14.

Putti TC, El-Rehim DM, Rakha EA, Paish CE, Lee AH, Pinder SE, Ellis IO. Estrogen receptor-negative breast carcinomas: a review of morphology and immunophenotypical analysis. *Mod Pathol.* 2005;18(1):26-35.

Qi G. Biomarker discovery in early stage breast cancer using proteomics technologies. Indiana University, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Master's theses, 2008, Indianapolis (Advisor: Dr. Wang M.).

Remaury A, Laurell H, Grober J, Reynisdottir S, Dauzats M, Holm C, Langin D. Expression of hormone-sensitive lipase in the human colon adenocarcinoma cell line HT29. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995;207(1):175-82.

Ribate A.U. Description and pre-clinical validation of dynamic molecular determinants of sensitivity to aromatase inhibitors in breast cancer. University of Barcelona, Department of Clinical Sciences, PhD thesis, 2007, Barcelona (Advisor: Germà-Lluch JR.).

Russo J, Romero AL, Russo IH. Architectural pattern of the normal and cancerous breast under the influence of parity. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1994;3(3):219-24.

Safaei A, Rezaei-Tavirani M, Sobhi S, Akbari ME. Breast cancer biomarker discovery: proteomics and genomics approaches. *Iranian Journal of Cancer Prevention.* 2013;6:45-53.

Sarvaiya HA. Mass spectrometric characterization of the mcf7 cancer cell line: proteome profile and cancer biomarkers. University of State, Virginia Polytechnic Institute, Master's Theses, 2006, Blacksburg (Advisor: Prof. Dr. Lazar I.).

Schuyer M, Berns EM. Is TP53 dysfunction required for BRCA1-associated carcinogenesis? *Molecular and cellular endocrinology.* 1999;155(1):143-52.

Schwab FD, Kilic N, Huang DJ, Schmid SM, Vetter M, Schötzau A, Güth U. Personal or first-degree family breast cancer history: which has higher impact on tumor detection and tumor size in breast cancer. *Arch Gynecol Obstet.* 2015;291(6):1387–1394.

Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer Statistics. *CA Cancer J Clin.* 2017;67:7-30.

Sørli T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Thorsen T, Quist H, Matese JC, Brown PO, Botstein D, Lønning PE, Børresen-Dale AL. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001;98(19):10869–10874.

Subramani R, Lakshmanaswamy R. Pregnancy and breast cancer. *Progress in Molecular Biology and Translational Science,* 2017;151:81-111.

Tetik S, Ozaltun K, Ozakpinar OB, Disbudak M, Rizaner N, Yavuz S, Yardimci KT. in vivo effect of cholchicine, colchine and anti-agregating agent on protein oxidation in Behcet's diseases. *Cumhuriyet Med J* 2011; 33(4): 435-442.

Valavanidis A, Vlachogianni T, Fiotakis C. 8-hydroxy-2' -deoxyguanosine (8-OHdG): A critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis. *Journal of Environmental Science and Health*. 2009;27:120–139.

Verlinden I, Janssens J, Raus J, Michiels L. Microdissection and SAGE as a combined tool to reveal gene expression in ductal carcinoma in situ of the breast. *Mol Carcinog*. 2004; 41(4):197-206.

Viale G, Giobbie-Hurder A, Gusterson BA, Maiorano E, Mastropasqua MG, Sonzogni A, Mallon E, Colleoni M, Castiglione-Gertsch M, Regan MM, Price KN, Brown RW, Golouh R, Crivellari D, Karlsson P, Ohlschlegel C, Gelber RD, Goldhirsch A, Coates AS. Adverse prognostic value of peritumoral vascular invasion: is it abrogated by adequate endocrine adjuvant therapy? Results from two International Breast Cancer Study Group randomized trials of chemoendocrine adjuvant therapy for early breast cancer. *Ann Oncol*. 2010;21:245-54.

Viehweg P, Bernerth T, Heinig A, Kiechle M, Buchmann J, Koelbl H, Laniado M, Heywang-Köbrunner SH. MR-guided intervention in women at high hereditary risk of breast cancer due to both family and personal history of breast cancer. *Breast J*. 2006;12(6):549–558.

Weaver DL, Ashikaga T, Krag DN, Skelly JM, Anderson SJ, Harlow SP, Julian TB, Mamounas EP, Wolmark N. Effect of occult metastases on survival in node negative breast cancer. *N Engl J Med*. 2011;364:412-21.

Woodruff TJ, Zota AR, Schwartz JM. Environmental chemicals in pregnant women in the United States: NHANES 2003-2004. *Environmental health perspect*. 2011;119(6):878-85.

Wyllie S, Liehr JG. Release of iron from ferritin storage by redox cycling of stilbene and steroid estrogen metabolites: a mechanism of induction of free radical damage by estrogen. *Archives of biochemistry and biophysics*. 1997;346(2):180-6.

Yager JD, Davidson NE. Estrogen carcinogenesis in breast cancer. *The New England journal of medicine*. 2006;354(3):270-82.

Yamashita H, Yando Y, Nishio M, Zhang Z, Hamaguchi M, Mita K, Kobayashi S, Fujii Y, Iwase H. Immunohistochemical evaluation of hormone receptor status for predicting response to endocrine therapy in metastatic breast cancer. *Breast Cancer*. 2006;13:74-83.

Zabriskie JB. Immunological Techniques. In: Zabriskie JB, eds. *Essential Clinical Immunology*. 1st ed. New York: Cambridge University Press; 2009, p:21-32.

EKLER

EK 1



Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

BAŞVURU BİLGİLERİ	PROTOKOL KODU	09.2017.368
	PROJE ADI	Meme Kanserinin Erken Prognozunda Proteomik Yaklaşım
	SORUMLU ARAŞTIRICI ÜNVANI/ADI	Prof. Dr. Şermin TETİK

KARAR BİLGİLERİ	Tarih: 05.05.2017
Yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gereke, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve gerçekleştirilmesinde sakınca bulunmadığı için Kurulumuzca onaylanmasna oy birliği ile karar verilmiştir. Onay sonrasında yapılacak her türlü proje değişiklikleri (katılımcılar, başlık vb.) veya protokol değişikliklerinin Etik Kurula bildirilerek proje onayının yenilenmesi gerekmektedir.	

ÜYELER	Uzmanlık Dalı	Kurumu / EK Üyeliği	Onaylanan Proje ile İlişkisi		Toplantıya Katılım		İmza
Prof.Dr. Hacer DİRESKENELİ	Romatoloji	M.Ü Tıp Fakültesi/ Başkan	Var	Yok	<input checked="" type="checkbox"/> Evet	<input type="checkbox"/> Hayır	
Prof.Dr. Tulin ERGÜN	Dermatoloji	M.Ü Tıp Fakültesi/Başkan Yrd.	Var	Yok	<input checked="" type="checkbox"/> Evet	<input type="checkbox"/> Hayır	
Prof. Dr. Şefik GÖRKEY	Tıp Tarihi ve Etik	M.Ü Tıp Fakültesi/Üye	Var	Yok	<input checked="" type="checkbox"/> Evet	<input type="checkbox"/> Hayır	
Prof.Dr. Handan KAYA	Patoloji	M.Ü Tıp Fakültesi/Üye	Var	Yok	<input checked="" type="checkbox"/> Evet	<input type="checkbox"/> Hayır	
Prof.Dr. M.Bahadır GÜLLÜOĞLU	Genel Cerrahi	M.Ü Tıp Fakültesi/Üye	Var	Yok	<input checked="" type="checkbox"/> Evet	<input type="checkbox"/> Hayır	
Prof.Dr. Atilla KARAYILMAZ	Farmakoloji	M.Ü Tıp Fakültesi/Üye	Var	Yok	<input checked="" type="checkbox"/> Evet	<input type="checkbox"/> Hayır	
Prof.Dr. Senra SARDAS	Eczacı	M.Ü Eczacılık Fak./Üye	Var	Yok	<input checked="" type="checkbox"/> Evet	<input type="checkbox"/> Hayır	
Prof.Dr. Basak DOĞAN	Diş Hekimi	M.Ü Diş Hekimliği Fak./Üye	Var	Yok	<input checked="" type="checkbox"/> Evet	<input type="checkbox"/> Hayır	
Prof. Dr. Beste Melek ATASOY	Radasyon Onkolojisi	M.Ü Tıp Fakültesi/Üye	Var	Yok	<input checked="" type="checkbox"/> Evet	<input type="checkbox"/> Hayır	
Doç. Dr. Elib KARAKOÇ AYDINER	Cocuk Sağlığı ve Hastalıkları	M.Ü Tıp Fakültesi/Üye	Var	Yok	<input checked="" type="checkbox"/> Evet	<input type="checkbox"/> Hayır	
Doç.Dr. Meltem KORAY	Diş Hekimi	Istanbul Üniv. Diş Hekimliği Fak./Üye	Var	Yok	<input checked="" type="checkbox"/> Evet	<input type="checkbox"/> Hayır	
Doç. Dr. Gürkan SERT	Hukukçu	M.Ü Tıp Fakültesi/Üye	Var	Yok	<input checked="" type="checkbox"/> Evet	<input type="checkbox"/> Hayır	
Yrd.Doç.Dr: Figen DEMİR	Halk Sağlığı	Acibadem Üniv. Tıp Fak.	Var	Yok	<input checked="" type="checkbox"/> Evet	<input type="checkbox"/> Hayır	
Yrd.Doç.Dr. Pınar MEGA İBER	Biyofizik	M.Ü Tıp Fakültesi/Üye	Var	Yok	<input checked="" type="checkbox"/> Evet	<input type="checkbox"/> Hayır	
Gözde Asnur MİRZA	Sağlık Mensubu olmayan kişi	Serbest	Var	Yok	<input checked="" type="checkbox"/> Evet	<input type="checkbox"/> Hayır	

EK 2

HASTA BİLGİLENDİRME FORMU

Çalışma Adı: Meme Kanserinin Erken Prognozunda Proteomik Yaklaşım

Protokol No: Yüksek Lisans Tezi

Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, Sağlık Bilimleri Üniversitesi Gaziosmanpaşa Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi Genel Cerrahi Kliniği ile yürütülen yüksek lisans tez çalışması kapsamında yukarıda adı geçen çalışmaya davet edilmiş bulunuyorsunuz.

Meme kanserinin dünyadaki ölüm insidansı ve ülkemizdeki yüksek prevalansı araştırmacıların son yıllarda biyomarker çalışmalarına odaklanmasına yol açmıştır.

Meme kanserli hastaların serum ve plazmalarında bazı protein seviyelerinde yükselmeler gözlenmektedir. Bu proteinlerin takibi ile hastalığın aktifliği, tekrarlama durumu, metastazı, prognoz ve terapötik cevabı arasında ilişki kurulmaktadır.

Günümüzde hastalığın tanısında kullanılan markerlar arasında yanlış pozitiflik sunmaları veya tanı sonrası yaşam sürelerindeki düşüklük gibi parametreler nedeniyle yeni biyomarkere ihtiyaç duyulmaktadır.

Meme kanserinin erken tanısında kullanılacak aday serum protein biyomarkerlarının araştırılması ve kliniğe sunulması son derece önem taşımaktadır. Bu çalışmada proteomik araştırmaların sonucunda güvenilir, hassas ve doğruluk oranı yüksek bir serum protein biyomarker çalışması için metodoloji geliştirilmesi planlanmıştır.

Çalışmamız bir yıl sürecek olup, çalışmaya antiagregan ilaç kullanmayan 30 hasta ve hiçbir ilaç kullanmayan 15 sağlıklı gönüllü dahil edilecektir. Klinik tarama ve biyopsi sonucunda meme kanseri tanısı konduğu için siz bu çalışmaya dahil edildiniz ve doktorunuz tarafından önerilen tedaviye tabi tutulacaksınız. Çalışmamızda hastalığınızla ilişkili olarak sizden alınacak bir miktar kanda Ki67, HSL ve FABP4 protein seviyeleri ve meme kanserinin teşhisinde faydalı olabilecek biyomarkerların varlığını araştırmayı amaçladık. Gerekli görüldüğünde biyokimyasal

kan parametrelerine bakılacaktır. Bundan başka herhangi bir ek girişim talep edilmeyecektir. Sizden çalışmayla ilgili hiçbir ücret talebinde bulunulmayacaktır. Çalışmaya katılmanız halinde kişisel bilgileriniz bizde saklı tutulacak ve herhangi bir yerde açıklanmayacaktır. Çalışma ile ilgili danışmak istediğiniz bir konu olduğunda aşağıda telefon numarası yazılı bulunan araştırmacıyla temasa geçebilirsiniz:

Op.Dr.Serkan İlgün.....0533/2653865

Prof.Dr. Nusret Erdoğan.....0 212 / 9453121

Prof.Dr. Şermin Tetik..... 0 216 450 27 72

Bu çalışmaya herhangi bir etki ya da baskı altında kalmadan, gönüllü olarak katılmanızı istiyoruz. İsteddiğiniz her an bu çalışmadan çekilme hakkına sahipsiniz. İsminiz kesinlikle gizli tutulacaktır.

Hasta Adı Soyadı

Doktor Adı Soyadı

Tarih

Tarih

İmza

İmza

EK 3

HASTA ONAY FORMU

Çalışma Adı: Meme Kanserinin Erken Prognozunda Proteomik Yaklaşım

Protokol No: Yüksek Lisans Tezi

Hasta bilgilendirme formunda verilen tüm bilgileri okudum ve anladım. Doktorum tarafından önerilen tedavi süresince kişisel ve hastalığım konusundaki bilgilerin kullanılmasında bir sakınca görmüyorum. Gerektiğinde biyokimyasal kan parametrelerine seviyelerine bakılmasında bir sakınca görmüyorum. Bu çalışmaya hiç kimsenin etkisi altında kalmadan tamamen kendi rızamla gönüllü olarak katılmayı kabul ediyorum.

Hasta adı soyadı

İmza

Tarih

EK 4

SAĞLIKLI GÖNÜLLÜ BİLGİLENDİRME FORMU

Çalışma Adı: Meme Kanserinin Erken Prognozunda Proteomik Yaklaşım

Protokol No: Yüksek Lisans Tezi

Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı ve Sağlık Bilimleri Üniversitesi Gaziosmanpaşa Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi Genel Cerrahi Kliniği ile yürütülen kapsamlı proje kapsamında yukarıda adı geçen çalışmaya davet edilmiş bulunuyorsunuz.

Meme kanserinin dünyadaki ölüm insidansı ve ülkemizdeki yüksek prevalansı araştırmacıların son yıllarda biyomarker çalışmalarına odaklanmasına yol açmıştır.

Meme kanserli hastaların serum ve plazmalarında bazı protein seviyelerinde yükselmeler gözlenmektedir. Bu proteinlerin takibi ile hastalığın aktifliği, tekrarlama durumu, metastazı, prognoz ve terapötik cevabı arasında ilişki kurulmaktadır.

Günümüzde hastalığın tanısında kullanılan markerlar arasında yanlış pozitiflik sunmaları veya tanı sonrası yaşam sürelerindeki düşüklük gibi parametreler nedeniyle yeni biyomarkere ihtiyaç duyulmaktadır.

Meme kanserinin erken tanısında kullanılacak aday serum protein biyomarkerlarının araştırılması ve kliniğe sunulması son derece önem taşımaktadır. Bu çalışmada proteomik araştırmaların sonucunda güvenilir, hassas ve doğruluk oranı yüksek bir serum protein biyomarker çalışması için metodoloji geliştirilmesi planlanmıştır.

Siz bu çalışmaya sağlıklı olduğunuz için dahil edildiniz. Araştırma sırasında sizden alınacak bir miktar kanda Ki67, FABP4 ve HSL protein seviyeleri ve meme kanserinin teşhisinde faydalı olabilecek biyomarkerların varlığını araştırmayı amaçladık. Gerekli görüldüğünde biyokimyasal kan parametrelerine bakılacaktır. Bundan başka herhangi bir ek girişim talep edilmeyecektir. Sizden çalışmayla ilgili

hiçbir ücret talebinde bulunulmayacaktır. Çalışmaya katılmanız halinde kişisel bilgileriniz bizde saklı tutulacak ve herhangi bir yerde açıklanmayacaktır. Çalışma ile ilgili danışmak istediğiniz bir konu olduğunda aşağıda telefon numarası yazılı bulunan araştırmacılarla temasa geçebilirsiniz:

Op.Dr.Serkan İlgün.....0533/2653865

Prof.Dr. Nusret Erdoğan.....0 212 / 9453121

Doç.Dr. Şermin Tetik.....0 216 450 27 72

Bu çalışmaya herhangi bir etki yada baskı altında kalmadan, gönüllü olarak katılmanızı istiyoruz. İsteddiğiniz her an bu çalışmadan çekilme hakkına sahipsiniz. İsminiz kesinlikle gizli tutulacaktır.

Hasta Adı Soyadı

Doktor Adı Soyadı

Tarih

Tarih

İmza

İmza

EK 5

SAĞLIKLI GÖNÜLLÜ ONAY FORMU

Çalışma Adı: Meme Kanserinin Erken Prognozunda Proteomik Yaklaşım

Protokol No: Yüksek Lisans Tezi

Sağlıklı gönüllü bilgilendirme formunda verilen tüm bilgileri okudum ve anladım. Doktorum tarafından bana önerilen kan alımını onaylıyor ve kişisel bilgilerin kullanılmasında bir sakınca görmüyorum. Gerektiğinde biyokimyasal kan parametrelerine seviyelerine bakılmasında bir sakınca görmüyorum. Bu çalışmaya hiç kimsenin etkisi altında kalmadan tamamen kendi rızamla gönüllü olarak katılmayı kabul ediyorum.

Hasta adı soyadı

İmza

Tarih

EK 6: Diğer Bilimsel faaliyetler (yayın, kongre bildirisi vs.)

Diş E, İlgün S, Kımıloğlu E, Ergün S, Erdoğan N, ıracı E, Aksoy H, Tetik Ő.
Biomarker-based techniques for early diagnosis of breast cancer. 20th International
Meeting of the Danubian League against Thrombosis and Hemorrhagic Disorders,
13-16 Nisan 2019, ANTALYA (szlu sunum).

**20th
International
Meeting of the
Danubian League
against Thrombosis
and Hemorrhagic
Disorders**

**13th-16th April 2019
Antalya / TURKEY**

**20 x 16
synergy**



**16th
International
Hemophilia
Congress
of Turkey**

**14th-17th April 2019
Antalya / TURKEY**

Organized by



CONGRESS CO-CHAIR

Kaan Kavaklı
Bülent Zülfikar
Danijela Mikovic

DLTH 2019 CONGRESS ORGANIZATION AND SCIENTIFIC COMMITTEE

Muzaffer Demir
Bülent Antmen
Tunç Fişgin
Gülnehal Özdemir
Ergül Berber
Ayşegül Ünüvar
Turgut Ulutin
Şermin Tetik
Fikriye Uras

**DANUBIAN LEAGUE AGAINST THROMBOSIS AND HAEMORRHAGIC DISORDERS
COMMITTEE**

President	Violeta Dejanova Ilijevska, Macedonia
Secretary General	Danijela Mikovic, Serbia
Honorary Presidents	Aleksandar Lucic, Serbia
	Peter Kubisz, Slovakia
	Helmut Sinzinger, Austria

OP-018

Biomarker-Based Techniques for Early Diagnosis of Breast Cancer

Elif Diş¹, Serkan Ilgün², Elife Kımlıoğlu², Samet Ergün³, Nusret Erdoğan⁴, Enver Çıracı⁵, Halil Aksoy¹, Şermin Tetik¹

¹Marmara University, Faculty of Pharmacy, Department of Biochemistry, Haydarpaşa-Istanbul-Turkey

²University of Health Sciences Gaziosmanpaşa Taksim Education and Research Hospital, Department of Pathology, Istanbul-Turkey

³Beymülâlem Vakıf University, Health Care Vocational School, Department of Pathology Laboratory Techniques, Istanbul-Turkey

⁴İstanbul University, School of Medicine, Department of Pathology, Istanbul-Turkey

⁵Elazığ University, Vocational School of Health Services, Programme of Medical Laboratory Techniques, Zeytinburnu, Istanbul-Turkey

The aim of this study was to improve the early diagnosis of breast cancer and the identification of reliable biomarkers that indicate therapeutic response, and of therapies targeting modified protein. In this study, we have planned both to do biomarker identification in serum and tissue of patients with breast cancer and to identify correlations between immunohistochemical, immunoassay and High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) methods. To this end, in the tissues of patients with breast cancer; in order to perform histopathological diagnosis, we evaluated ER-positive/ER-negative, tumor size and lymph nodes metastasis (Table 1), followed by both expression/modification of fatty acid binding protein (FAB4) and Ki67 expression on tissue of patients with breast cancer via immunohistochemical methods. On the other hand we correlated the outcomes of serum protein expressions of FAB4, hormone sensitive lipase (HSL), and Ki67 by the ELISA method. We used HPLC to show protein carbonyl levels, which were obtained from serum protein modification of patients. Using a case-control study design, serum samples from 46 female patients with primary invasive breast cancer were compared with samples from 46 age- and sex-matched healthy controls.

This Project was supported by a grant awarded by the Scientific Research Committee of Marmara University, with number SAG-C-YLP-11 1017-0578.

Keywords: Biomarker, breast cancer, Ki67, FabP4, HSL, HPLC

Table 1. Clinico-pathologic Characteristics of Patients with Breast Cancer

	Patient Number	Percentage
Sex: Female	46	100
Age: >50, <50	20, 26	43.4, 56.6
Tumor size: T0, T1, T2	2, 26, 18	4.3, 56.6, 39.1
Lymph nodes metastasis: M0, M1	22, 22	50, 50
Oestrogene Receptor (ER): ER+, ER-	42, 4	91.3, 8.7
Progesteron Receptor (PR): PR+, PR-	34, 12	73.9, 26.1
Evaluation of CerbB2 Gene: CerbB2: Negative (0-1-2)	30	65.2
Evaluation of CerbB2 Gene: CerbB2: Positive (2-3)	16	34.8

173



April 13-16, 2019



ÖZGEÇMİŞ

Adı	Elif	Soyadı	Diş
Doğum Yeri	İSTANBUL	Doğum Tarihi	30/06/1990
Uyruğu	T.C.	Tel	0(536)9477090
E-mail	elifb199007@gmail.com		

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora/Uzmanlık		
Yüksek Lisans		
Lisans	Marmara Üniversitesi	2013
Lise	Ahmet Buhan Anadolu Lisesi	2006

İş Deneyimi

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
	Biyoloji Öğretmenliği	Hamidiya Kız A.İ.H.L	2014-2017
	Biyoloji Öğretmeni	Kağıthane Anadolu Lisesi	2018-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*
İngilizce	İyi	Orta	Orta

Yabancı Dil Sınav Notu #								
YDS	ÜDS	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	79,78331	79,26971	66,77300
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office programları	Çok İyi

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendiriniz.