



T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**MEME KANSERİNDE
LİZOFOSFATİDİK ASİDİN ÖNEMİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Sibel KULOĞLU GENÇ

Antalya, 2013



T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

MEME KANSERİNDE LİZOFOSFATİDİK ASİDİN ÖNEMİ

UZMANLIK TEZİ

Dr. Sibel KULOĞLU GENÇ

Tez Danışmanı: Prof.Dr. Saadet GÜMÜŞLÜ

“Kaynakça gösterilerek tezinden yararlanılabilir ”

Antalya, 2013

Bu çalışma Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından 2010.04.0103.03Proje No ile desteklemiştir.

TEŞEKKÜR

Uzmanlık tez projemin planlanması, projelendirilmesi, yürütülmesi ve sonuçların değerlendirilmesi aşamalarında değerli yardımlarını esirgemeyen proje yürütücüsü ve akademik danışmanım Sayın Prof.Dr. Saadet GÜMÜŞLÜ'ye ve Anabilim Dalımızın diğer öğretim üyelerine teşekkür ederim.

Projeye katkılarından dolayı Prof.Dr. H. Elif PEŐTERELİ, Prof.Dr. Mustafa ÖZDOĞAN, Prof.Dr. Ömer ÖZKAN, Prof.Dr. Taner ÇOLAK ve immünohistokimyasal analize yardımcı olan Dr. Mualla ÖZCAN'a teşekkür ederim.

Hayatımın her anında olduğu gibi, bu zorlu süreçte de beni her konuda destekleyen annem Gönül KULOĞLU ve babam Abdullah KULOĞLU'ya, hayatımı güzelleştiren sevgili eşim Dr. Şakir GENÇ'e ve neşe kaynağım minik kızım Gülce'ye teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
Simgeler ve Kısaltmalar Dizini	v
Şekiller Dizini	vi
Çizelgeler Dizini	viii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Meme Kanseri	3
2.1.1. Memenin anatomisi	3
2.1.2. Meme kanseri için risk faktörleri	4
2.1.3. Meme kanserinin patolojisi	6
2.1.4. Meme kanseri için tümör nod metastaz evrelemesi	12
2.1.5. Meme kanserinin epidemiyolojisi	14
2.1.6. Meme kanserinde prognostik faktörler	15
2.1.7. Meme kanserinin genetiği	16
2.1.8. Meme kanserinde tümör belirteçleri	21
2.1.9. Meme kanserinin tedavisi	24
2.2. Autotaxin	27
2.2.1. Autotaxin'in sentezi	28
2.2.2. Autotaxin'in yapısı	29
2.2.3. Autotaxin'in substratları	31
2.2.4. Autotaxin'in patofizyolojik rolü	32
2.3. Lizofosfatidik Asit	35
2.3.1. Lizofosfatidik asidin kimyasal yapısı	36
2.3.2. Lizofosfatidik asit sentezi	37
2.3.3. Lizofosfatidik asidin yıkılması	38
2.3.4. Lizofosfatidik asidin etki mekanizması	40
2.3.5. Lizofosfatidik asidin hücrenel etkileri	43
2.3.6. Lizofosfatidik asit ve kanser ilişkisi	44

3. GEREÇLER VE YÖNTEMLER	47
3.1. Gereçler	47
3.1.1. Grupların belirlenmesi	47
3.1.2. Örneklerin elde edilmesi	47
3.1.2.1. Kan örneklerinin alınması	47
3.1.2.2. Doku örneklerinin elde edilmesi	48
3.2. Yöntemler	48
3.2.1. Kan örneklerinde ölçülen parametreler	48
3.2.1.1. Serumda biyokimyasal parametrelerin ölçülmesi	48
3.2.1.2. Tam kanda hematolojik parametrelerin ölçülmesi	49
3.2.1.3. Serum autotaxin (ATX) düzeyinin ölçülmesi	49
3.2.1.4. Serum lizofosfatidik asit (LPA) düzeyinin ölçülmesi	53
3.2.2. Dokuda yapılan deneyler	56
3.2.2.1. Dokuların patolojik değerlendirilmesi	56
3.2.2.2. Lizofosfatidik asit reseptör 1 (EDG2) ve 2 (EDG4)'nin immünohistokimyasal analizi	57
3.3. İstatistiksel Analiz	59
4. BULGULAR	60
5. TARTIŞMA	77
6. SONUÇLAR	89
7. ÖZET	91
8. ABSTRACT	92
9. KAYNAKLAR	93

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AC	Adenilil siklaz
ATM	Mutant ataksi-telenjektazi
ATP	Adenozin trifosfat
ATX	Autotaxin
CA 15-3	Karbonhidrat antijen 15-3
CA 27.29	Karbonhidrat antijen 27.29
CA 549	Karbonhidrat antijen 549
CA 72-4	Karbonhidrat antijen 72-4
cAMP	Siklik adenozin monofosfat
CEA	Karsino embriyonik antijen
DAG	Diaçil gliserol
DCIS	Duktal karsinoma in situ
Edg	Endotelyal hücre diferansiasyon gen
EGF	Epidermal büyüme faktörü
EGFR	Epidermal büyüme faktörü reseptörü
ENPP2	Ekto nükleotid pirofosfataz 2
FISH	Florosan in situ hibridizasyon
GBM	Glioblastoma multiforme
GPCR	G proteini ile eşlenik reseptör
GTP	Guanozin trifosfat
HRT	Hormon replasman tedavisi
IP3	İnozitol 3,4,5 trifosfat
LCIS	Lobuler karsinoma in situ
LDL	Düşük dansiteli lipoprotein
LFABP	Karaciğer yağ asiti bağlayan protein
LPA	Lizofosfatidik asit

LPAR	Lizofosfatidik asit reseptörü
LPC	Lizofosfatidil kolin
LysoPLD	Lizofosfolipaz D
MAPK	Mitojen aktive protein kinaz
MCA	Müsin benzeri karsinom ilişkili antijen
mRNA	Haberci ribonükleik asit
NPP2	Nükleotid pirofosfataz/fosfodiesteraz 2
NSCLC	Küçük hücreli dışı akciğer kanseri
OK	Oral kontraseptif
PA	Fosfatidik asit
PDE	Fosfodiesteraz
PDGF	Trombosit kaynaklı büyüme faktörü
PD-1α	Fosfodiesteraz I alpha
PDNP2	Fosfodiesteraz/nükleotid pirofosfataz 2
PIP2	Fosfatidilinozitol 4,5 bifosfat
PKC	Protein kinaz C
PLA1	Fosfolipaz A1
PLA2	Fosfolipaz A2
PLC	Fosfolipaz C
PTX	Pertussis Toxin
ROLL	Radyoaktif madde ile okkült lezyon lokalizasyon
RT	Radyoterapi
SMB	Somatomedin B
TNM	Tümör nod metastaz
TPA	Doku polipeptid antijen
WHO	Dünya Sağlık Örgütü

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Autotaxinin domain organizasyonu	29
2.2. Autotaxinin şerit görünümü	30
2.3. Autotaxin reaksiyonu	31
2.4. Autotaxin-Lizofosfatidik asit reseptör sinyalizasyonu	33
2.5. Hücre membranı ve lizofosfatidik asit	35
2.6. Lizofosfatidik asit	36
2.7. Fosfatidik asitten lizofosfatidik asit sentezi	37
2.8. Lizofosfolipidlerden lizofosfatidik asit (LPA) sentezi	38
2.9. Lizofosfatidik asitin fosfatazlarla yıkılması	39
2.10. Lizofosfatidik asidin lizofosfatidik asit açıl transferaz ile yıkılması	39
2.11. Lizofosfatidik asidin G proteini ile eşlenik sinyal iletim yolağı	42
3.1. Autotaxin (ATX) standartlarının hazırlanması	51
3.2. Autotaxin (ATX) standart grafiğı	52
3.3. Lizofosfatidik asit (LPA) standart grafiğı	55
4.1. Kontrol, erken ve ileri evre meme kanseri hastalarının lipit değerleri	63
4.2. Kontrol, erken ve ileri evre meme kanseri hastalarının autotaxin (ATX) konsantrasyonları	64
4.3. Kontrol, erken ve ileri evre meme kanseri hastalarının lizofosfatidik asit (LPA) konsantrasyonları	65
4.4. Kontrol grubunda LPA1 reseptörünün immünohistokimyasal analizi, boyanma şiddeti +3, x200	72
4.5. Kontrol grubunda LPA2 reseptörünün immünohistokimyasal analizi, boyanma şiddeti +3, x100	72
4.6. Erken evre hasta grubunda LPA1 reseptörünün immünohistokimyasal analizi, boyanma şiddeti +1, x400	73
4.7. Erken evre hasta grubunda LPA2 reseptörünün immünohistokimyasal analizi, boyanma şiddeti +3, x200	73
4.8. İleri evre hasta grubunda LPA2 reseptörünün immünohistokimyasal analizi, boyanma şiddeti +1, x400	74
4.9. İleri evre hasta grubunda LPA2 reseptörünün immünohistokimyasal analizi, boyanma şiddeti +3, x200	74

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.10. İleri evre hasta grubunda LPA1 reseptörünün immünohistokimyasal analizi, boyanma şiddeti +1, x400	75
4.11. İleri evre hasta grubunda LPA1 reseptörünün immünohistokimyasal analizi, boyanma şiddeti +2, x200	75
4.12. İleri evre hasta grubunda LPA2 reseptörünün immünohistokimyasal analizi, boyanma şiddeti +1, x200	76
4.13. İleri evre hasta grubunda LPA2 reseptörünün immünohistokimyasal analizi, boyanma şiddeti +3, x200	76

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Cizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Tümör nod metastaz evrelemesi	12
3.1. Meme kanserinin modifiye Bloom-Richardson sistemine göre histolojik gradelemesi	56
4.1. Kontrol, erken ve ileri evre meme kanseri hastalarının demografik verileri	61
4.2. Kontrol, erken ve ileri evre meme kanseri hastalarının demografik verilerinin karşılaştırması	61
4.3. Kontrol, erken ve ileri evre meme kanseri hastalarının biyokimyasal parametreleri	62
4.4. Kontrol, erken ve ileri evre meme kanseri hastalarının biyokimyasal verilerinin karşılaştırılması	62
4.5. Kontrol, erken ve ileri evre meme kanseri hastalarının hematolojik parametreleri	63
4.6. Kontrol, erken ve ileri evre meme kanseri hastalarının lipit profilleri	63
4.7. Erken evre ve ileri evre meme kanseri hastalarının serum tümör belirteçleri	64
4.8. Kontrol, erken ve ileri evre meme kanseri hastalarının autotaxin (ATX) değerleri	64
4.9. Kontrol, erken ve ileri evre meme kanseri hastalarının serum autotaxin (ATX) düzeylerinin ikili karşılaştırması	65
4.10. Kontrol, erken ve ileri evre meme kanseri hastalarının lizofosfatidik asit (LPA) değerleri	65
4.11. Kontrol, erken ve ileri evre meme kanseri hastalarının serum lizofosfatidik asit (LPA) düzeylerinin ikili karşılaştırması	66
4.12. Kontrol ve hasta grupları (erken + ileri evre) için yapılan lojistik regresyon analizi sonuçları	66
4.13. Erken ve ileri evre hasta grupları için yapılan lojistik regresyon analizi sonuçları	67

<u>Cizelge</u>	<u>Sayfa</u>
4.14. Kontrol ve erken evre hasta grupları için yapılan lojistik regresyon analizi sonuçları	67
4.15. Kontrol ve ileri evre hasta grupları için yapılan lojistik regresyon analizi sonuçları	67
4.16. Kontrol ve hasta gruplarında yapılan korelasyon analizi sonuçları	68
4.17. Erken ve İleri meme kanseri hasta gruplarının patolojik tanıları	68
4.18. Erken ve ileri evre meme kanseri hastalarının patolojik değerlendirmesi	70
4.19. Lizofosfatidik asit reseptör 1 (EDG2) ve 2 (EDG4)'nin immünohistokimyasal analizi sonuçları	71

1. GİRİŞ

Meme kanseri kadınlarda en sık görülen kanserdir ve kanserden ölümlerin akciğer kanserinden sonraki ikinci en sık nedenidir. Birinci derece akrabada meme kanseri aile öyküsü, erken menarş (<12 yaş), geç menopoz (>55 yaş), nulliparite veya geç ilk gebelik (>35 yaş), fibrokistik hastalık özgeçmiş, oral kontraseptif kullanımı, postmenopozal dönemde östrojen takviye tedavisi uygulanması ve 30 yaşından önce radyasyon almak meme kanseri için risk faktörleridir. Özgeçmişinde in-situ veya invaziv meme kanseri bulunan kadınlar diğer bir yüksek risk grubunu oluştururlar. Mastektomi sonrası diğer memede kanser oluşma riski yılda %0.5-1.0'dir. Meme kanseri duktus ya da lobulus epitelinden kaynaklanmasına göre duktal ve lobuler olarak ikiye ayrılır. Ayrıca dokudaki yayılımına göre in-situ ve invaziv kanser olarak da sınıflandırılabilir. İn-situ kanser, invaziv kanserin öncüsü olarak kabul edilir. En sık görülen histolojik tip infiltratif duktal kanserdir (1,2).

Autotaxin (ATX) 125 kDa molekül ağırlığında bir glikoproteindir. Autotaxin, tümör hücresi motilite uyarıcı faktör olarak A2058 melanoma hücre dizisinden izole edilmiştir. Autotaxin ekto-nükleotid pirofosfataz/fosfodiesteraz (ENPP) ailesinden ENPP2'dir. Lizofosfatidil kolin (LPC)'den, biyoaktif fosfolipid mediatör lizofosfatidik asit (LPA) üretimini katalizleyen lizofosfolipaz D (LysoPLD) ile özdeş olduğu bildirilmiştir (3). Autotaxin'in, LPA üretimi yoluyla tümör progresyonunu, tümör hücresinin motilitesini ve anjiyogenezi stimüle ettiği gösterilmiştir (4,5).

Lizofosfatidik asit ve ATX'in neoplastik ve non-neoplastik hücrelerde, hücre motilitesini özellikle LPA1 reseptörü üzerinden Rac1 aktivasyonu ile stimüle ettiği gösterilmiştir (6).

Autotaxin üretiminin ya da aktivitesinin inhibe edilmesiyle, LPC'in LPA reseptörleri üzerinden gösterdiği meme ve melanoma hücre dizilerinde hücre migrasyonunu indükleyici etkisinin bloke olduğu gösterilmiştir (7).

Çeşitli meme kanseri hücre dizilerinde, autotaxin ekspresyonu ile meme kanser hücrelerinin agresifliği arasında ilişki gözlenmiştir. Normal duktal epitel hücreleri anti-ATX antikoruna ile hiç veya çok az pozitif cevap verirken, birkaç

istisna dışında meme kanseri hücrelerinin güçlü pozitif cevap verdiği gösterilmiştir. Bu bilgi, ATX ekspresyonunun normal epitelin tümörojenik potansiyeliyle veya kanser hücrelerinin agresifliği ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir (8).

Lizofosfatidik asit, multifonksiyonel fosfolipid mediatördür. Çeşitli hayvan hücrelerinde proliferasyonu indüklemesi ilgi çekici bir durumdur. Lizofosfatidik asit, fosfolipid şekillenmesi sırasında ardışık intrasellüler reaksiyonlarla üretilir ve ekstrasellüler alana salınır. Bununla birlikte, özelleşmiş bir mekanizma olarak sekretuar lysoPLD tarafından ekstrasellüler LPA üretimi olduğu da bilinmektedir (9).

Lizofosfatidik asidin etkileri geniş doku dağılımı gösteren LPA reseptörleri ve bunların eşleştiği üç farklı G proteini ($G\alpha_q/11$, G_i/o , $G_{12/13}$) üzerinden gerçekleşir. Lizofosfatidik asidin G proteini ile eşlenik altı tane reseptörü vardır. İlk üçü endotelyal hücre diferansiyasyon gen (EDG, endothelial cell differentiation gene) ailesine aitken, diğer reseptörler non-EDG'dir (10).

Lizofosfatidik asidin çeşitli hücre tiplerinde in vitro migrasyonu stimüle ettiği gösterilmiştir. Lizofosfatidik asit sinyalizasyonun kanser hücre migrasyonundaki rolü, LPA için major biyosentetik enzim olan ve daha önceden neoplastik invazyon ve metastazla ilişkili olduğu saptanan autotaxin'in tanımlanmasıyla kabul edilmiştir (3).

Literatür taraması sırasında autotaxin ve lizofosfatidik asit düzeylerinin meme kanseri tanılı hastaların serumlarında ölçüldüğü herhangi bir çalışmaya rastlanamamıştır. Ayrıca, meme dokusunda lizofosfatidik asit reseptörlerinin (LPA1/EDG2 ve LPA2/EDG4) ekspresyonunu gösteren çalışma da bulunamamıştır. Bu nedenlerden dolayı, çalışmamızda normal ve meme kanseri dokusunda LPA1 ve LPA2 reseptörlerinin ekspresyonu ile serum autotaxin ve lizofosfatidik asit düzeyleri arasındaki ilişkiden yola çıkarak meme kanserinde lizofosfatidik asidin öneminin araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Meme Kanseri

2.1.1. Memenin anatomisi

Meme, göğüs ön duvarındaki regio pektoraliste bulunan bir çift organdır. Musculus pectoralis major ve çevresini saran diğer kaslarla bağlantılı olan süperfisyel fasya içinde yerleşmiştir. Yukarıda ikinci kosta, aşağıda altıncı kosta, medialde sternumun lateral kenarı ve lateralde orta aksiler çizgi arasında uzanmaktadır. Erişkin kadınlarda aksillaya doğru uzanan bir kuyruğu (Spence kuyruğu) bulunmaktadır (11,12).

Meme dokusunun komponentleri; meme bezi, bağ dokusu ve bağlı bulunduğu deridir. Meme bezi, sayıları 15-20 arasında değişen sekretuvar lobülden oluşur. Bu lobüller, ductus lactiferi olarak adlandırılan kanallar ile papilla mammaria'ya açılırlar. Papilla mammaria, areola mammae denilen pigmente olmuş bir deri bölgesi ile çevrilidir. Lobüllerin ve kanalların çevresi bağ dokusu ile çevrelenmiştir. Bazı bölgelerde, bağ dokusunun kalınlaşması ile dermis tabakasının devamı şeklinde liggamentum suspensoria mammaria'lar oluşur. Meme kanseri, bu ligamentlerde gerilme yaparak derinin çukurlaşmasına sebep olur (11,12).

Arteriyel beslenme: Lateralde; a. axillaris, a. thoracica superior, a. thoracoacromialis, a. thoracica lateralis ve a. subscapularis ile, medialde; a. thoracica interna ile ve II. ve IV. interkostal arterler aracılığı ile beslenir.

Venöz drenaj: Arterlerine paralel olarak v. axillaris, vv. thoracicae internae ve vv. intercostales anteriores'lere direne olur.

İnnervasyonu: Nn. Intercostales II ve VI'nin dalları olan r. cutaneus anterior pectoralis ve r. cutaneus lateralis pectoralis ile sağlanır.

Lenfatik drenaj: %75'i nodi lymphoidei axillares'e drene olurken, geri kalanı nodi parasternales'e ve nodi intercostales'e direne olur (11,12).

2.1.2. Meme kanseri için risk faktörleri

Meme kanseri gelişmesi riskini artıran birçok faktör bulunmaktadır. Meme kanseri 30 yaş altı kadınlarda son derece seyrek görülürken, 50 yaş üzeri kadınlarda sıklığı artmaktadır. Bu durum, artan yaş ile meme kanseri riskinin de arttığını göstermektedir (13,14).

Meme dokusu, over kaynaklı hormonların kontrolü altında gelişmekte ve bunu izleyen reproduktif dönemde aylık menstrüel periyotlarda proliferasyon olmaktadır. Bu nedenle uzun süre bu hormonlara maruz kalmak meme kanseri riskini de artırmaktadır. Erken yaşta menarşın (12 yaş öncesi) ve ileri yaşta menopozun (55 yaş sonrası) artmış meme kanseri riski ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Kırk beş yaşından önce bilateral oofektomi uygulanan hastaların, elli beş yaşında doğal olarak menopoza giren kadınlara göre meme kanseri riskinin yaklaşık olarak yarı yarıya azaldığı gösterilmiştir (13,14).

Hiç doğum yapmamış kadınlar, bir ya da daha fazla sayıda doğum yapmış kadınlara göre daha yüksek meme kanseri riski taşımaktadır. Özellikle otuz beş yaşından önce gerçekleşen gebeliklerin, meme kanseri riskini azalttığı gösterilmiştir. Emzirme de meme kanseri riskini azaltmaktadır. 30 ülkede yapılan 50 çalışmanın analizinde 12 ay emzirmenin, meme kanseri riskini %4 azalttığı gösterilmiştir. Gebelik süresince, laktasyona hazırlık için meme bezinin epitel hücreleri farklılaşır ve hücre siklusu süresi uzar. Hücrenin G1 fazında daha uzun süre vakit harcaması DNA tamirine de izin verir. Bu mekanizma ile gebelik ve laktasyonun meme kanseri riskinde azalma yarattığı düşünülmektedir (13,14).

Oral kontraseptifler (OK), içinde belli dozlarda estrogen ve progestin bulunan preparatlardır. OK içindeki estrogenler etinil estradiol veya mestranol cinsidir. Günümüzde çoğunlukla etinil estradiol kullanılmaktadır. OK içindeki progestagenler ise ya estran ya da gonan grubuna aittir. OK kullanımı ile meme kanseri arasındaki ilişkinin varlığı uzun süreli tartışmalara neden olmuştur. Konu halen de tartışmalıdır. Birçok epidemiyolojik çalışma, OK kullananlar ile kullanmayanlar arasında meme kanseri oranları açısından bir farkın olmadığını yönündedir. Bazı otörler erken premenopozal meme kanserinde artış olduğunu ileri sürerlerken, bazı otörler de bunun tam tersine premenopozal dönemde meme kanserinde bir artışın olmadığını iddia etmektedirler. Ancak ilginç bir bulgu

olarak 40 yaşından önce meme kanseri olan kadınların daha uzun süreli OK kullandıkları tespit edilmiştir. Özellikle ilk gebeliğini doğumla tamamlamadan uzun süreli OK kullanmanın premenopozal meme kanserini arttırdığı ileri sürülmüştür. 20 yaşından önce OK kullanmaya başlayan kadınlarda %20 oranında meme kanseri riskinde artış bulunmuştur. OK kestikten sonra 10 yıl geçmiş ise pratik olarak meme kanseri riski yoktur. Sonuç olarak halen OK kullanımı veya son zamanlarda OK kullanımı ile daha lokalize premenopozal meme kanserleri görülmektedir. Daha önce OK kullanımı metastatik meme kanseri riskini azaltmaktadır. OK kullanımı, aile anamnezi olan ve benign mastopatisi olan kadınlarda meme kanseri riskini daha da arttırmaz. OK kullanırken aile öyküsü, alkol alımı, emzirme gibi diğer meme kanseri risk faktörleri göz önünde bulundurulmalıdır (13,14).

Postmenopozal kadınların semptomları için kullanılan hormon replasman tedavisinin (HRT) meme kanseri yapıp yapmadığı halen tartışılmaya devam etmektedir. Ancak postmenopozal bir kadında semptomların tedavisi için hala en geçerli yolun HRT olduğu ve HRT'nin kişiselleştirilmesi gerektiği belirtilmiştir. HRT'nin mümkün olan en kısa süre ve en az doz kullanılması üzerinde durulmuştur. Çalışmaların çoğu 5 yıl ve üzerinde kullanımda postmenopozal kadınlarda meme kanseri riskini arttırdığını belirtmişlerdir. Dahası meme kanseri risk oranlarının HRT'nin süresinin artması ile daha da arttığı iddia edilmiştir. Daha sonra yapılan bir çalışmada meme kanseri riskindeki artışın invazif meme kanserinde olduğu, insitu meme kanserinde olmadığı gösterilmiştir. Diğer bir deyişle HRT var olan bir meme kanserinin gelişimini uyarmakta, ama yoktan bir kanser oluşumuna sebebiyet vermemektedir (13,14).

Diyetsel faktörler: Diyetle yüksek miktarda yağ alımı meme kanseri riskini artırmaktadır. Diyetteki sature yağların, monoansature yağlar ile değiştirilmesinin bu riski azaltacağı düşünülmektedir. Yüksek lif içeren diyet ile beslenmenin meme kanseri riskini azalttığı hipotezi bulunmaktadır. A vitamininde bulunan retinolün in vitro olarak meme kanseri hücrelerinin büyümesini inhibe ettiği gösterilmiştir. Rodentlerde, bir diğer antioksidan vitamin olan E vitamini, meme kanseri gelişimini inhibe etmiştir. Alkol tüketimi ile meme kanseri riski arasında pozitif ilişki gösterilmiştir. Premenopozal dönemde vücut ağırlığı ile meme kanseri riski

arasında ilişki gözlenmezken, postmenopozal dönemde vücut ağırlığı artışı ile meme kanseri gelişme riski de artmaktadır. Düzenli fiziksel aktivitenin de meme kanserine karşı koruyucu olduğu hipotezi bulunmaktadır. Geniş prospektif bir çalışmada, aktif ya da pasif sigara içmek ile meme kanseri riski arasında ilişki bulunamamıştır (13,14).

2.1.3. Meme kanserinin patolojisi

Meme malign tümörlerinin önemli bölümü adenokarsinomlardır. Skuamöz hücreli karsinom, phyllodes tümör, sarkom ve lenfoma gibi adenokarsinom dışı diğer malign tümörler ise %5'den az bir grubu oluşturmaktadır (15,16).

Meme kanserinin morfolojik incelenmesinde iki ana tanımlama vardır:

1. Tümörün dokunun epitelyal komponentine sınırlı olması (in situ karsinom) ya da stromayı invaze etmesi (invaziv karsinom).
2. Tümörün duktal ya da lobuler kaynaklı olması.

İn situ karsinomda malign epitelyal hücreler bazal membranla çevrili duktus ve asinuslar içinde sınırlı iken, invaziv karsinomda neoplastik hücreler bazal membranı aşarak stromaya invazyon göstermektedir. Bu nedenle invaziv karsinomlar, lenfatik ve kan damarlarını invaze ederek bölgesel lenf düğümlerine ve uzak organlara metastaz yapabilme kapasitesine sahiptir. İnvaziv karsinoma değişik oranlarda in situ komponent eşlik edebilmektedir. Bu iki komponentin morfolojik özellikleri her zaman birbiri ile paralellik göstermeyeceğinden invaziv komponentin tip tayini in situ komponentten bağımsız olarak yapılmalıdır (15,16).

Günümüzde meme karsinomlarının histolojik sınıflamasında en çok kullanılan Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından önerilen sınıflamadır.

Meme kanserinin histolojik sınıflaması (WHO sınıflaması) (17):

1. İn situ karsinom
 - a. İn situ duktal karsinom
 - b. İn situ lobuler karsinom
2. İnvaziv karsinom
 - a. İnvaziv duktal karsinom
 - b. İnvaziv lobuler karsinom

- c. Tubuler karsinom
- ç. İnvaziv kribriform karsinom
- d. Medüller karsinom
- e. Müsinöz karsinom
- f. İnvaziv papiller karsinom
- g. İnvaziv mikropapiller karsinom
- h. Apokrin karsinom
- ı. Sekretuar (juvenil) karsinom
- i. Adenoid kistik karsinom
- j. Metaplastik karsinom
- k. Nöroendokrin karsinom
- l. İnflamatuar karsinom

2.1.3.1. İn situ karsinom

2.1.3.1.1. Duktal karsinoma in situ (DCIS): Duktus sistemi içinde sınırlı kalmış, invazyon göstermeyen malign epitelyal hücre proliferasyonunu ifade etmektedir. Mammografinin tarama amaçlı kullanımından önce DCIS meme karsinomlarının ancak %0,8-5'ini oluştururken, bugün sıklığı %15-20'lere ulaşmıştır. DCIS'da bilateralite %6,2-22; multisentrisite ise %64-80 gibi değişken oranlarda bildirilmektedir. Duktal karsinoma in situ'nun, papiller, komedokarsinom, solid, cribriform, mikropapiller, kistik hipersekreteruar gibi bir çok morfolojik varyantı bulunmaktadır. DCIS'lar, komedokarsinomlar dışında kural olarak makroskopik spesifik bir görünüm oluşturmazlar. Komedokarsinomda tümör, normal parankim arasında kalın duvarlı kanallardan kümeler oluşturmaktadır. Kanallar sıkıştığı zaman nekrotik tümör dokusu bu kanallardan ekstude olur. DCIS'larda birçok mikroskopik patern tanımlanmıştır. Bunların arasında komedokarsinom intraluminal nekrozu ve sitolojik atipisi ile en kolay tanınabilen varyanttır. DCIS'nun non-nekrotik varyantları mikropapiller, kribriform ve stratifiye spindle hücreli paternde olanlardır (15,16).

2.1.3.1.2. Lobuler Karsinoma İn Situ (LCIS): Lobuler neoplazi olarak da bilinir. Lobüler neoplazi, tüm biopsilerin yaklaşık %1 'ini oluşturan nadir bir lezyondur. Genellikle makroskopik bir lezyon oluşturmayıp, başka bir nedenle

eksize edilen meme biopsilerinde tanı alırlar. Aynı şekilde mammografik olarak da özel bir görüntüleri yoktur. Lobüler neoplazi, terminal duktal lobuler unit içinde proliferasyon olarak bu üniteyi dolduran ya da distorsiyona uğratan uniform hücrelerden oluşmaktadır. Hücreler, küçük boyutlu olup, düzgün yuvarlak nüveleri ve dar bir sitoplazmaları vardır. Nükleol belirsiz ya da küçüktür. Bazen intrasitoplazmik lümen varlığı görülebilir. Lobüler neoplazi fibroadenom, radial skar ve sklerozan adenozis gibi bazı benign meme lezyonlarının içinde de görülebilmektedir. İn situ lobüler karsinomun en önemli ayırıcı tanısı intraduktal karsinomun lobüler tutulumu ile yapılmalıdır. İn situ lobüler karsinom duktuslara yayılırken genelde pagetoid bir görünüm sergiler ve lobulosentriktir. İntraduktal karsinomun özellikle küçük hücrelerden oluşan solid tipi in situ lobüler karsinom ile karışabilmektedir. İntraduktal karsinomların büyük hücrelerden oluşan tiplerinde nüve sitoplazma oranı, hücre boyutu, mitoz, nekroz gibi özellikler dikkate alınarak ayırım yapmak daha kolaydır (15,16).

2.1.3.2. İnvaziv karsinom

2.1.3.2.1. İnvaziv duktal karsinom (spesifik olmayan tip): İnvaziv meme karsinomlarının en sık görülen tipidir (%70-80) ve diğer alt tiplerden herhangi birine ait spesifik özellikleri taşımayan geniş bir grubu oluşturmaktadır. Makroskopik olarak olguların çoğu sert kıvamlı ve düzensiz sınırlıdır. Kesit yüzeyi sarımsı-gri renkte ve kumlu görünümde olup çevre meme dokusuna doğru yıldızlı uzantılar göstermektedir. Kitlenin santral bölümünde elastotik stromanın oluşturduğu beyaz renkli noktavi odaklar veya çizgiler bulunabilir. Özellikle büyük boyutlu tümörlerde nekroz, kanama ve kistik dejenerasyon görülebilir. Bu tümörlerin mikroskopik özellikleri oldukça değişkenlik göstermektedir. İyi diferansiye tümörler minimal hücresel atipi gösteren tubuler yapılardan oluşmakta ve bu nedenle sklerozan adenozis, radial skar gibi benign psödoinfiltratif lezyonlar ile ayırıcı tanı güçlüğü oluşturabilmektedir. Bu tür invaziv duktal karsinomlar tipik olarak östrojen ve progesteron reseptörü pozitif olup HER-2/neu (c-erbB-2) overekspresyonu göstermezler. Az diferansiye invaziv duktal karsinomlar ise, büyük-pleomorfik hücrelerden oluşan irili ufaklı kitleler şeklindedir ve hormon reseptör ekspresyonu daha az, buna karşın HER-2/neu

overekspresyonu daha fazladır. İnvaziv duktal karsinomların çoğu bu iki grup arasında kalan orta derecede diferansiye formlardır (15,16).

2.1.3.2.2. İnvaziv lobuler karsinom: Tüm invaziv meme karsinomlarının %5-15'ini oluşturmaktadır ve hormon replasman tedavisi alan kadınlarda daha sık görülmektedir. Diğer tip invaziv meme karsinomlarına göre daha yüksek oranda bilateral ve multifokal olurlar. Makroskopik olarak sert kıvamlı düzensiz sınırlı kitle oluşturabildikleri gibi, bazen de belirgin bir kitle olmaksızın sınırları belirsiz bir indürasyon şeklinde görülebilirler. İnvaziv lobuler karsinomun klasik tipinde kohezyon yetenekleri az olan küçük, dar sitoplazmalı uniform hücreler tek sıralı hücre dizileri oluşturmakta ve normal duktuslar çevresinde targetoid tarzda konsantrik dizilim göstermektedir. Solid tip invaziv lobuler karsinomda yukarıda tanımlanan tipik lobuler karsinom hücreleri diffuz üreyiş gösterirken, alveolar tipte ise 20 veya daha fazla hücreden oluşan yuvarlak hücre kümeleri oluşturmaktadır. Tubulolobuler varyant invaziv lobuler karsinomun iyi diferansiye formudur ve klasik invaziv lobuler karsinom alanları yanı sıra mikrotubuler yapılar da içermektedir. Pleomofik tip invaziv lobuler karsinomda klasik infiltrasyon paternini oluşturan hücreler iri ve pleomorftir (15,16).

2.1.3.2.3. Tubuler karsinom: Meme karsinomlarının %2'sini oluşturmaktadır. %10-56'sı aynı memede multifokal, %9-38'i bilateraldir. Makroskopik olarak düzensiz sınırlı, çevreye doğru yıldızlı uzantıları olan sert kıvamlı kitle oluşturur ve çoğunun çapı 1 cm'nin altındadır. Histopatolojik incelemede sellüler stroma içinde küçük, uniform hücrelerin oluşturduğu tubul yapıları görülür ve bu nedenle sklerozan adenozis ve radial skar gibi benign lezyonlar ile ayırıcı tanı güçlüğü oluşturabilir. Ancak tubuler karsinomdaki bu tubuler yapılar myoepitelyal hücre içermediğinden ayırıcı tanı güçlüğü çekilen olgularda myoepitelyal belirleyiciler (smooth muscle actin gibi) ile yapılacak immunhistokimyasal boyama ile benign sklerozan lezyonlardan ayırt edilmeleri mümkündür (15,16).

2.1.3.2.4. İnvaziv kribriform karsinom: İnvaziv karsinomların nadir görülen bir tipi olup tubuler karsinom gibi çok iyi prognoza sahiptir. Tümöral kitle 1-3 cm çapında, sert kıvamlı, düzensiz sınırlıdır ve çevreye doğru yıldızlı uzantıları vardır. Mikroskopik incelemede hafif ya da orta derecede pleomorfizm gösteren hücrelerin oluşturduğu kribriform yapılar görülür. Olguların %80'inde kribriform

paternde in situ duktal karsinom tümöre eşlik etmektedir. Genellikle östrojen ve progesteron reseptörü pozitif, HER-2/neu negatiftir (15,16).

2.1.3.2.5. Medüller karsinom: Meme karsinomlarının %1-5'ini oluşturur. Medüller karsinom daha çok 50 yaş altındaki kadınlarda ve BRCA1 genini taşıyanlarda görülür. İyi sınırlı, yumuşak kıvamlı kitle oluşturur ve bu nedenle klinik ve radyolojik olarak fibroadenom gibi benign meme lezyonu olarak yorumlanabilir. Medüller karsinom tanısı için iri, veziküler ve pleomorfik nükleuslu, belirgin nükleollü tümör hücrelerinin oluşturduğu sinsisyal büyüme paterninin tümörün %75'inden fazlasını oluşturması gereklidir. Tümörde desmoplazi, glandüler yapılanma ve in situ karsinom yoktur veya minimaldir. Tümör içinde ve çevresinde yoğun lenfoplazmositer hücre infiltrasyonu izlenir ve tümör çevre meme dokusu ile ekspansif bir sınır oluşturur. Yüksek nükleer grade, artmış mitotik aktivite ve hormon reseptör ekspresyonunun yokluğuna karşın medüller karsinom invaziv duktal karsinoma göre biraz daha iyi prognoza sahiptir. HER-2/neu overekspresyonu genellikle yoktur (15,16).

2.1.3.2.6. Müsinöz (kolloidal) karsinom: Az görülen bir tip olup meme karsinomlarının %1-6'sını oluşturur. Daha çok ileri yaş kadınlarda görülür ve prognozu iyidir. Makroskopik olarak yumuşak kıvamlı ve iyi sınırlıdır, kesit yüzeyi parlak ve jelatinöz görünümündedir. İyi sınırlı olmaları nedeni ile klinik, radyolojik ve makroskopik olarak benign meme lezyonlarını taklit edebilirler. Histopatolojik incelemede geniş ekstrasellüler müsin gölleri içinde yüzen uniform hücrelerden oluşan küçük hücre adaları ve glandüler yapılar görülür. Hormon reseptörleri genellikle pozitif, HER-2/neu negatiftir (15,16).

2.1.3.2.7. İnvaziv papiller karsinom: İnvaziv meme karsinomlarının nadir görülen bir tipidir. Makroskopik olarak genellikle iyi sınırlıdır. Fibrovasküler kılıf olan papiller yapıların varlığı karakteristik mikroskopik özelliğidir. Prognozu genellikle iyidir (15,16).

2.1.3.2.8. İnvaziv mikropapiller karsinom: Pür formu invaziv meme karsinomlarının %1-2'sini oluşturur. Daha fazla sıklıkta mikst tipte invaziv karsinomlarda, özellikle invaziv duktal karsinoma eşlik eden ikinci bir komponent şeklindedir. Histopatolojik incelemede lenfatik benzeri boşluklar içinde yer alan

küçük papiller yapılar görülmektedir. Bu tümörlerde lenfatik invazyon, lenf nodu metastazı ve multifokalite sık olduğundan prognozları kötüdür (15,16).

2.1.3.2.9. Apokrin karsinom: Nadir görülen tümör grubudur. Tümör hücreleri iri, genifl eozinofilik granüler sitoplazmalı, belirgin nukleollü olup tubuler yapılar ve kordonlar oluşturmakta ya da solid üreyiş göstermektedir. Olguların çoğunda “gross cystic disease fluid protein-15 (GCDFP-15)” pozitifdir. Ancak apokrin karsinom dışındaki diğer malign meme tümörlerinde de GCDFP-15 pozitifliği görülebilir. Prognozu aynı grade ve evredeki invaziv duktal karsinomlar ile aynıdır. Östrojen ve progesteron reseptörleri genellikle negatif, buna karşın androjen reseptörleri pozitifdir. Olguların yarısında HER-2/neu overekspresyonu vardır (15,16).

2.1.3.2.10. Sekretuar (juvenil) karsinom: Nadirdir ve genellikle 30 yaş altındaki kadınlarda görülür. Genellikle iyi sınırlı kitle oluştururlar. Mikroskopik olarak, sitoplazmasında PAS pozitif eozinofilik materyal bulunan vakuollü sitoplazmalı hücrelerin oluşturduğu tubuloalveoler, papiller ve solid yapılardan oluşmaktadır. Prognozu oldukça iyidir (15,16).

2.1.3.2.11. Adenoid kistik karsinom: Tüm meme kanserli hastaların %0.1’inden daha azını oluşturmaktadır. Adenoid kistik karsinom morfolojik olarak proliferatif bezler (adenoid kısım) ve stromal elemanların (psödoglandüler kısım) bileşiminden oluşmaktadır. Prognozu iyi olan bu tümörler çoğunlukla lenf nodu metastaz yapmazlar (15,16).

2.1.3.2.12. Metaplastik karsinom: Adenokarsinom ile birlikte sarkoma benzer işsi hücreli alanlar, skuamöz diferansiasyon, kondroid ve osseöz diferansiasyon alanları içeren tümör grubudur. Bazen pür skuamöz hücreli karsinom şeklinde de görülebilir. Nadir bir tümör olup prognozu kötüdür (15,16).

2.1.3.2.13. Nöroendokrin karsinom: Meme karsinomlarının %2-5’ini oluşturur. Genellikle ileri yaş kadınlarda görülür. Bu grup tümörler gastrointestinal sistem ve akciğerdeki nöroendokrin tümörlere benzer morfolojik özellikler gösterirler. Tümör hücrelerinin %50’sinden fazlası nöroendokrin belirleyicileri eksprese etmektedir (15,16).

2.1.3.2.14. İnflamatuvar karsinom: İnvaziv meme karsinomlarının özel bir klinik prezentasyonudur. Yaygın dermal lenfatik invazyon sonucunda lenfatik

drenaj bozulur ve deride ödem yanısıra eritem, indurasyon, hassasiyet ve portakal kabuğu görünümü vardır. inflamatuvar bir durumu taklit etmesi nedeniyle bu isim verilmiştir. Mikroskopik olarak herhangi bir inflamatuvar tablo yoktur. Altta yatan invaziv karsinom genellikle yüksek grade'li invaziv duktal karsinomdur (15, 16).

2.1.4. Meme kanseri için tümör nod metastaz (TNM) evrelemesi

Tümör evreleme sistemleri kanserin yayılımı ve ciddiyeti hakkında belli standartlara göre bilgi edinilmesini sağlar. Tümör nod metastaz (TNM) evreleme sistemi'nde tümörleri sınıflamak için kullanılan kriterler; tümör boyutu (T), aksiller lenf nodlarına yayılım (N) ve uzak bölgelere yayılımdır (M). Daha önceden tanımlanmış kriterlere göre bu üç özellik belirlenip kombine edilerek, tümör için son TNM evresi hesaplanır. Tümör evresi, meme kanserli hastalarda tedaviye yön veren önemli bir prognostik faktördür. Yeni teknikler geliştikçe kanser evrelemesinde doğruluk artar ve hastalığın genişliği daha doğru olarak belirlenebilir (18).

Çizelge 2.1. Tümör nod metastaz evrelemesi (18).

Evre	T	N	M
0	Tis	N0	M0
IA	T1	N0	M0
IB	T0	N1	M0
	T1	N1	
IIA	T0	N1	M0
	T1	N1	
	T2	N0	
IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	
IIIA	T0	N2	M0
	T1	N2	
	T2	N2	
	T3	N1	
	T3	N2	
IIBB	T4	N0-2	M0
IIIC	Herhangi bir T	N3	M0
IV	Herhangi bir T	Herhangi bir N	M1

Çizelge 2.1.'de gösterilen ve tümör nod metastaz evrelemesinde kullanılan simgelerin açıklaması aşağıdaki gibidir:

T : Primer tümör boyutu

TX : Primer tümör değerlendirilemiyor

T0 : Primer tümör kanıtı yok

Tis : Karsinoma in situ

T1 : Tümörün en büyük çapı 20mm'den küçük

T2 : Tümörün en büyük çapı 20 – 50 mm arasında

T3 : Tümörün en büyük çapı 50mm'den büyük

T4 : Tümör çapına bakılmaksızın cilt ya da göğüs duvarı tutulumu olması

N : Rejyonel lenf nodu tutulumu

Klinik sınıflandırma (N)

NX : Rejyonel lenf nodları değerlendirilemedi

N0 : Rejyonel lenf nodu tutulumu yok

N1 : İpsilateral aksiler lenf nodlarına hareketli metastaz

N2 : İpsilateral aksiler lenf nodlarına sabit metastaz ya da internal mammaryan lenf nodlarına metastaz

N3 : İpsilateral infraklaviküler lenf nodlarına metastaz

Patolojik sınıflandırma (pN)

pNX : Rejyonel lenf nodları değerlendirilemedi

pN0 : Rejyonel lenf nodu tutulumu yok

pN1 : 1-3 ipsilateral aksiller lenf noduna metastaz ve/veya klinik olarak gözlenmeksizin ipsilateral internal mammaryan lenf nodlarına mikrometastaz

pN2 : 4-9 ipsilateral aksiller lenf noduna metastaz ya da aksiler lenf nodu metastazı olmaksızın klinik olarak ipsilateral internal mammaryan lenf nodlarına metastaz

pN3 : 10 ve üzeri ipsilateral aksiler lenf nodu metastazı ya da aksiller lenf nodu metastazı varlığında klinik olarak internal mammaryan lenf nodu metastazı ya da infraklaviküler lenf nodu metastazı ya da ipsilateral supraklaviküler lenf nodu metastazı

M : Uzak metastaz

M0 : Klinik ve radyolojik olarak uzak metastaz yok

M1 : Klinik ve radyolojik olarak uzak metastaz var (18).

2.1.5. Meme kanserinin epidemiyolojisi

Meme kanseri, tüm dünyada kadınlar için önemli bir halk sağlığı sorunudur. Meme kanseri, kadınlarda en sık görülen kanser türüdür ve kansere bağlı ölümlerin ikinci en sık sebebidir. Dünya Sağlık Örgütü'nün bir bölümü olan 'International Agency for Research on Cancer'in verilerine göre 2008 yılında dünyada 12.662.554 vaka kanser tanısı almıştır. Bunların 6.044.710 kadındır ve 1.384.155'si meme kanseridir. Meme kanseri, kadınlarda invaziv kanserlerin %22.9'unu ve tüm kanserlerin %16'sını oluşturmaktadır. Yine 2008 yılında kadınlar arasında 3.345.176 kansere bağlı ölüm gerçekleşmiştir ve bu ölümlerin 458.503'i meme kanserine bağlıdır. Kansere bağlı ölümlerin kadınlarda %13.7'si ve tüm toplumda %6.0'sı meme kanserine bağlıdır (19).

Meme kanseri insidansı dünyada bölgelere göre göre değişiklik göstermektedir. Gelişmiş ülkelerde daha sık, az gelişmiş ülkelerde daha nadir görülmektedir. Bölgelere göre meme kanseri insidansı şöyledir: 100.000 kadın için; Doğu Asya'da 18; Güney-Orta Asya'da 22; Sahra-altı Afrika'da 22; Güney-Doğu Asya'da 26; Kuzey Afrika ve Batı Asya'da 28; Güney ve Orta Amerika'da 42; Doğu Avrupa'da 49; Güney Avrupa'da 56; Kuzey Avrupa'da 73, Okyanusya'da 74; Batı Avrupa'da 78 ve Kuzey Amerika'da 90 (19).

T.C. Sağlık Bakanlığı'nın 2008 yılında yayınladığı Sağlık İstatistikleri Yıllığı'na göre Türkiye'de kadınlarda kanser insidansı 2004 yılında 236,3/100.000, 2005 yılında 246,5/100.000 ve 2006 yılında 256,4/100.000 olarak bildirilmiştir. Bu sonuçlar kanser insidansının bir artış eğilimi içinde olduğunu göstermektedir. 2006 yılında kadınlar arasında kanser insidansı 256,4/100.000 iken meme kanseri insidansı ise 37,6/100.000'dir. Türkiye'de de tüm dünyada olduğu gibi meme kanseri kadınlarda en sık görülen kanser türüdür. 2008 yılında hastane ölümlerinin dağılımına bakıldığında, genel popülasyonda kansere bağlı ölümler %15,3 ile, kardiyovasküler nedenlere bağlı ölümlerden sonra ikinci sırayı almaktadır (20).

2.1.6. Meme kanserinde prognostik faktörler

Lenf nodlarının durumu, tümör çapı, histolojik tip ve histolojik grade meme karsinomu için bilinen en önemli prognostik parametrelerdir. Bunun yanı sıra steroid hormon reseptörleri (östrojen ve progesteron reseptörü), onkogenler (HER-2/neu), tümör supresör genler (p53), proliferasyon belirleyicileri (Ki-67), anjiogenez ve proteazlar da meme karsinomu prognozu üzerine etkilidir (21).

2.1.6.1. Lenf nodu metastazı: En önemli prognostik parametredir. Aksiller lenf nodları negatif hastalarda 10 yıllık yaşam %75 iken, nod-pozitif hastalarda bu oran %25-30'a düşmektedir. Metastatik lenf nodlarının seviyesi, sayısı ve büyüklüğü, perinodal yağ dokusuna invazyon durumu da prognoz açısından önemlidir. Lenf nodundaki metastaz alanının boyutu 0.2-2 mm ise "mikrometastaz", daha küçük boyutta ise "izole tümör hücreleri-submikro-metastaz" olarak değerlendirilmektedir. Lenf nodundaki mikrometastazların klinik önemi tartışmalı olmakla birlikte, hastalısız ve toplam sağkalımda az da olsa anlamlı bir azalmaya neden olduklarını gösteren çalışmalar mevcuttur (21).

2.1.6.2. Tümör boyutu: Bağımsız bir prognostik parametredir. Tümör boyutu arttıkça aksiller lenf nodu metastazı artmakta ve sağkalım oranı düşmektedir. Evrelemede patoloğ tarafından ölçülen tümör çapı göz önüne alınmalıdır. Yaygın in situ komponent içeren tümörlerde, ayrı olarak seçilebiliyor ise, mikroskopik olarak lam üzerinde yapılacak ölçüm ile invaziv tümör alanının çapının ayrı olarak verilmesi ve evrelemenin invaziv alanın çapına göre yapılması gereklidir (21).

2.1.6.3. Tümörün histolojik tipi: Tubuler karsinom, invaziv kribriform karsinom, sekretuar karsinom ve invaziv lobuler karsinomun tubulolobuler varyantının prognozu iyidir. Buna karşın metaplastik karsinom, invaziv lobuler karsinomun pleomorfik ve solid tiplerinin, invaziv mikropapiller karsinomun ve inflamatuvar karsinomun prognozu kötüdür. Medüller karsinomun prognozu tartışmalı olmakla birlikte, invaziv duktal karsinoma göre daha iyi prognoz gösterdiği birçok araştırmacı tarafından kabul edilmektedir (21).

2.1.6.4. Histolojik grade: Günümüzde morfolojik tipine bakılmaksızın invaziv karsinomların tümünün grade'lenmesi önerilmektedir ve en çok kullanılan grade'leme sistemi modifiye Bloom-Richardson sistemidir. Bu grade'leme sisteminde tümör hücrelerinin nükleer özellikleri, oluşturdukları tubulus

yapılarının oranı ve mitoz sayısı ayrı ayrı skorlanarak elde edilen toplam skora göre grade belirlenmektedir. 10 yıllık sağkalım oranı grade I tümörler için %85, grade II için %60, grade III için %15'dir (21).

2.1.6.5. Lenfovasküler invazyon: Tümör çevresindeki lenfatik ve kan damarlarının lümeninde tümör hücrelerinin görülmesi durumunda lenf nodu metastazı olasılığı yüksektir. Lenf nodu metastazı görülme de lenfovasküler invazyon varlığı kötü prognostik parametredir (21).

2.1.6.6. Östrojen ve progesteron reseptörleri: Günümüzde, meme karsinomlarında immunhistokimyasal yöntemle hormon reseptörlerinin araştırılması tedavinin belirlenebilmesi için yapılan rutin bir uygulamadır. Primer ve metastatik meme karsinomlarında %45-65 oranında östrojen reseptörü pozitifliği vardır. Reseptör pozitif tümörler hormonal tedaviye daha iyi cevap vermekte ve daha iyi prognoz göstermektedir. Ancak uzun süreli izlemde nüks ve metastaz açısından reseptör pozitifliğinin öneminin olmadığı gösterilmiştir. Tümörde östrojen reseptörü yanısıra progesteron reseptörünün de pozitif olması hormonal tedaviye cevabı arttırmaktadır. Östrojen reseptörü ekspresyonu ile meme karsinomunun histolojik tipi ve grade arasında anlamlı bir ilişki vardır. Grade arttıkça ekspresyon azalmaktadır (21).

2.1.6.7. HER-2/neu: Epidermal growth faktör reseptör ailesinden bir protoonkogendir. Meme karsinomlarının %10-30'unda FISH (fluorescent in situ hybridization) ile saptanan HER-2/neu gen amplifikasyonu ve immunhistokimyasal yöntemle saptanan protein overekspresyonu vardır. HER-2/neu overekspresyonu kötü prognostik parametredir ve genellikle histolojik grade'i yüksek, lenf nodu metastazı olan ve hormon reseptörleri negatif tümörlerde görülmektedir (21).

2.1.7. Meme kanserinin genetiği

Meme kanseri, diğer maligniteler gibi hücre büyümesi ve gelişimine katılan önemli hücresel yolları etkileyen genetik değişimler ile çok adımlı bir dizi işlem sonucu ortaya çıkar. Genetik değişimler, normal işlevlere sahip proto-onkogenlerin belli özel değişimleri ile oluşan onkogenler ile ilişkili bulunmuştur. Proto-onkogenler normal hücre büyümesi ve farklılaşması için önemli olan bazı

proteinlere ait kodlar içerirler. Eğer bir mutasyon sonucu proto-onkogenin yapısı değişirse oluşan hasar, genin dolayısı ile gen ürününün yapısının değişmesine neden olur ve çeşitli yollarla hücre bölünmesinin kontrolü ortadan kalkar ve malignite ortaya çıkar. Kansere oluşumunda, onkogenlerden başka önemli ikinci bir gen grubu da tümör-baskılayıcı genlerdir. Bu iki gen grubu kanserogeneizde birbiriyle zıt etkilidir. Onkogenler malign transformasyona neden olurken tümör baskılayıcı genler, hücre büyümesinde işlev gören genleri kontrol ederek tümör oluşumunu engellerler. Eğer bu tümör baskılayıcı genlerde bir hasar olursa büyüme kontrolü ortadan kalkacağından kanser ortaya çıkar (22,23).

Meme kanserinin ortaya çıkışına, ilerlemesine ve metastazına katılan bir çok faktörün varlığı bilinmektedir. Çok adımlı tümöröenez hipotezinin benzeri bir model meme kanserleri için de düşünülebilir. Bu modele göre onkogenlerdeki değişimler daha sıklıkla tümör invazyonu veya metastaz ile ilişkili olabilirler. Meme kanserinin gelişiminde yüksek riske sahip hastalarda bağlantı analizlerine dayanan çalışmalar onkogenlerin ailesel meme kanserlerinde primer lezyonlarda yeri olmadığı, fakat tümör baskılayıcı genlerdeki resesif değişimlerin primer lezyon oluşumuna katıldığını gösteren çalışmalar vardır. Meme için ayırıcı özellikler taşıyan onkogenler vardır. Hem normal hem de kanserli meme dokularında çoğunlukla saptanan bu özel onkogenler ras, myc ve cerbB-2 (veya HER2/neu) olarak sıralanabilir (22,23).

CerbB-2 (HER2/Neu): HER-2/Neu, diğer adı ile cerbB-2 veya p185 olarak isimlendirilen bu onkogen 17. kromozomda q12'ye yerleşmiştir ve protein ürünü hücre bölünmesi ve farklılaşmasına katılır. Gen amplifikasyonu ve aşırı ekspresyon nedeniyle kanser patogenezeine katılan bu onkogen, meme kanserleri için önemli bir prognostik belirteç olarak kabul edilmektedir. CerbB-2 onkoproteini, plazma membranına yerleşmiş EGFR'ne benzer bir membran reseptördür. CerbB-2, meme kanseri araştırmalarında ve tedavisinde en yoğun çalışılan onkogenlerden biridir. HER2 ve diğer üyeler (HER1, HER3 veya HER4) arasındaki liganda bağlı bir heterodimerizasyon cerbB-2 sinyal yolunu aktifler. CerbB-2 geninin amplifikasyonu veya proteinin aşırı ekspresyonu meme kanserlerindeki neoplastik hücrelerin %10-40'ında gösterilmiştir. Bu onkogenin kopya sayılarının yüksek bulunması, tümör şiddeti ile doğru orantılı olarak

saptanmıştır. Erken dönem meme kanserinde cerbB-2 gen amplifikasyonu kötü prognoz ile yakın ilişkili bulunmuştur. Çok sayıdaki çalışma ile cerbB-2 amplifikasyonunun diğer kötü prognostik faktörlerin varlığı, tedaviye düşük cevap ve lenf nodu pozitif meme kanserlerinde hastaların yaşam süreleriyle ilişkili olduğu, tek başına bir prognostik faktör olabileceği desteklenmiştir. CerbB-2 ekspresyonu ile ilgili verilerin çoğu lenf nodu pozitif hastalardan elde edilmesine rağmen uzun süreli takip sonrasında lenf nodu negatif hastalarda da cerbB-2 amplifikasyonu olanların daha kötü prognoza sahip oldukları gözlenir. İnvazif meme kanserlerinin alt tipleri arasında sadece invazif duktal karsinomlarda cerbB-2 amplifikasyonu gösterilmiştir. Genellikle invazif lobular karsinomlarda cerbB-2 aktivasyonu görülmez. İn situ lobuler karsinomlarda da aşırı üretime rastlanmamıştır. Buna karşılık in situ duktal karsinomların alt tipi olan komedo tipte cerbB2 aşırı üretiminin prevalansı %90'in üzerindedir. Bu tipteki karsinomlarda bu proteinin çok miktardaki üretimi ile gen amplifikasyonu arasında bağlantı olduğu ve gen amplifikasyonunun meme kanserinin komedo tipi için erken bir genetik bulgu olduğu gösterilmiştir (22,23).

Ras: Ras proteinleri 21 kD'dur (p21) ve G proteinleri ailesinden olup guanotin nükleosidlerini bağlama yeteneğindedir. Sinyal iletiminde önemli bir aracı moleküldür. Genellikle plazma membranındaki büyüme faktörü reseptörlerinin sitoplazmik parçalarına yakın bölgeye yerleşirler ve GTP ile aktiflenir ve protein kinazlar ile ilişkiye girerek mitozun aktifleşmesinde rol alırlar. Ras'ın onkogenik özellik kazanması nokta mutasyonu veya gen ekspresyonunun artışı ile olur. Mutasyonların ve amplifikasyonun nadiren gözlenmesi ras gen aktivasyonunun diğer mutasyon mekanizmaları tarafından etkilendiğini gösterir. Meme kanserlerinde ras onkogenlerinde en sık rastlanan mutasyon aşırı ekspresyondur. H-ras'ın artmış ekspresyonu lenf nodu metastazlarında ve ileri histolojik dereceye sahip tümörlerde görülmüştür. Selim fibrokistik, fibroadenom ve karsinomlu kişilerde yapılan çalışmada c-myc, H-ras, K-ras ve N-ras ekspresyon seviyelerinin selim meme dokularından çok karsinomlarda daha yüksek oldukları bildirilmiştir. H-ras1 allel kaybının histolojik grade-III tümörlerde, östrojen ve/veya progesteron reseptör kaybı ve kötü klinik gelişime sahip hastalar ile önemli derecede ilişkili olduğu

gösterilmiştir. Böylece H-ras1 lokusunun genotipik analizi meme kanser riski taşıyan hastaların tayininde prognostik bir değer olabileceği ileri sürülmüştür. p21 in seviyelerinin, hormona cevap veren meme kanser vakalarının her birinde yüksek bulunmasına rağmen hormon ile ilişkisiz tümör vakalarında da saptanmıştır. Ras'ın yüksek seviyeleri hiperplastik lezyonlar ile karşılaştırıldığında invazif meme karsinomlarında daha yüksek bulunmuştur. Postmenoposal hastalarda yüksek seviyelerde p21 ekspresyonuna eğilim vardır. H-ras gen mutasyonları nadir olmakla birlikte meme kanserinde %70'lik bir risk nedenidir (22,23).

c-Myc: c-myc geni kromozom 8q24'e yerleşmiştir. c-myc proteini hücre proliferasyonu, hücre farklılaşması ve apoptoz ile ilişkili genlerin transkripsiyonlarını düzenleyen bir fosfoproteindir. c-myc'in gen amplifikasyonu ise hücre döngüsünün bozulmasına neden olur ve p53'e bağlı yoldan hücrenin apoptoza gönderilmesinde rol oynar. c-myc geninin aşırı üretimi veya gen yapısındaki değişiklikler meme kanserine neden olmaktadır. Karsinomların %32'sinde myc proto-onkogeninin 2-15 kat amplifiye olduğu invazif duktal karsinomlarda ise myc geninin yapısal değişiklikler taşıdığı gösterilmiştir. Bazen kötü prognoz ve agresif klinik gidişe neden olan tümörlerde myc amplifikasyonu gösterilmiştir. Ancak myc'in tümörün histolojik tipi ve derecesi ile ayrıca östrojen reseptör statüsü ile ilişkisi gösterilmemiştir. Myc ekspresyonu tek başına meme karsinogenezi için yeterli olabilir. Hatta myc'in hormona yanıt vermeme veya kemoterapiye dirençten sorumlu olduğu ileri sürülür. İleri yaşlı kadınlarda meme kanseri ile c-myc proto-onkogeni arasında yakın bir ilişki bulunmuştur. c-myc gen amplifikasyonu meme kanserindeki en sık rastlanan genetik değişikliklerden biridir. Meme kanserlerinin 1/3'i bu genetik değişikliği taşır (22, 23).

Meme kanseri gelişiminde etkili tümör baskılayıcı genler ise başlıca p53 ve ATM'dir.

P 53: P53 geni 17. kromozomun p13-1 bandına yerleşmiştir ve molekül ağırlığı 53 kD olan nuklear bir proteini kodlar. UV ışık, karsinojenler ve sitostatiklerin DNA'da oluşturdukları hasarı ortadan kaldırmak üzere aktifleşir. Hasar düzeltilemez ise hücre apoptoza yönlendirilir. P53 geninin her iki alleldeki kaybı (heterozigotluk kaybı) veya nokta mutasyonları çeşitli tümörlerde ve meme

kanserlerinde gösterilmiştir. Meme kanserlerinde aşırı p53 protein üretimi kötü prognoz için bir indikatördür. Dokuda mutant p53 pozitifliğinin tespiti %80-90 oranında meme kanserlerini doğrular. Teşhis sırasında lenf nodu metastazına sahip olanlar kadar genelde tüm hastalarda kısa yaşam süresi ve hastalığın gözlenmediği aralıklar ile p53 ekspresyonu arasında prognostik bir anlamlılık bulunmuştur. Meme kanserlerinin %20-30'unda p53 inaktivasyonu gözlenir. P53 mutasyonlarının tespiti in situ'dan invazif karsinomaya geçiş için bir marker olarak kullanılabilir. İn situ duktal karsinomlar da p53 mutasyonu gözlenmediği, buna karşılık meme karsinogenezinin erken devrelerinde p53'ün mutasyona uğradığı bildirilmiştir (22,23).

ATM geni (Mutant ataxia-telangiectasia): ATM resesif olarak kalıtılır. Kromozom 11'de yerleşmiştir. ATM geni çok uzun ve komplekstir, çok sayıda çeşitli ve mutasyonlar gözlenir. İki mutant allel hastalık gelişimine neden olur. Bir mutant allel taşıyanlarda ise meme kanseri riskinin çok yüksek olduğu gösterilmiştir. ATM taşıyıcıları oldukça yaygındır. 1/200 ila 1/100 kadında bu mutasyon orta derecede artmış genetik risk olarak kalıtılır. Toplumdaki meme kanserinin %2-7'sinden bu gen sorumludur (22,23).

2.1.7.1. Ailesel meme kanseri ve ilişkili genler

Meme kanserinin büyük çoğunluğu sporadik vakalar olmasına rağmen yaklaşık %5-10 oranında kalıtsal nedenli ailesel meme kanseri ortaya çıkmaktadır. Meme kanseri oluşumuna birçok gen karışır ancak kalıtsal meme kanserlerinden sorumlu olarak, özellikle genom devamlılığının koruyuculuğunda iş gören proteinleri üreten bazı genlerin germ hücrelerindeki mutasyonları gösterilmiştir. Kalıtsal meme kanserinde nadir gözlenen yüksek penetransa sahip meme kanserine yatkınlık genleri olarak BRCA1 ve BRCA2 genleri bulunmuştur. Bu genlerdeki germ hücre soyu mutasyonlarını içeren kadınların yaşamlarının bir döneminde meme kanseri geliştirme riski %50-80 arasında değişmektedir. BRCA1 ve BRCA2 genlerindeki germ soyu mutasyonları, yüksek penetransa sahip ve hastalık için yüksek risk oluşturan faktörler olarak birçok çalışmada gösterilmiştir. Bu iki kansere yatkınlık genlerinin germ hücrelerindeki mutasyonları ovaryum kanserlerinde %10, meme kanserlerinde %7 oranında

dominant olarak kalıtım gösterir. Halen ailesel meme kanseri için en şiddetli etkiye sahip mutasyonları taşıyan bu iki gen, meme kanseri risk tespitinde mutasyon analizlerinin yapılmasında ön sırada yer almaktadır (22,23).

BRCA1 ve BRCA2 genleri: BRCA1 geni, kromozom 17q21'e, BRCA2 ise kromozom 13q12'e yerleşik bir gendir. BRCA1 geni 1863 amino asitlik, BRCA2 geni ise 3418 aminoasitlik bir proteini kodlar. Her iki protein de hücrenin diğer bazı proteinleri ile bağlanarak işlev görür. BRCA1 ve BRCA2 proteinlerinin hücre proliferasyonunun kontrolünde tümör baskılayıcı proteinler ile, DNA hasarına ve tamirine katılan proteinler ile, transkripsiyonun düzenlenmesinde rol alan proteinler ile, hücre siklusunun kontrol noktalarının önemli proteinleri ile ve DNA'da rekombinasyonda iş gören proteinler ile yakın ilişkileri gösterilmiştir. BRCA1 ve BRCA2'deki mutasyonlar ve BRCA proteinlerinin inaktivasyonu tümör baskılayıcı proteinlerin ve diğer "genom koruyucu" rolü olan proteinlerinde inaktivasyonuna neden olarak hücreyi tümör oluşumuna götürürler (22,23).

2.1.8. Meme kanserinde tümör belirteçleri

Tümör belirteçleri, tümör mevcudiyetinde var olan herhangi bir biyolojik sinyaldir. Tümöre eşlik eden antijenler, enzimler, onkofetal antijenler, hücre yüzey antijenleri, hormonlar marker olarak kullanılabilir. Tümör belirteçleri hücre ve hormonal olarak sınıflandırılabilirler. İdeal tümör belirteci, sağlıklı bireylerde ve selim hastalığı olanlarda belirlenmemelidir, birkaç kanser hücresi varlığında bile belirlenmelidir, organa spesifik olmalıdır, tümör kitlesinin boyutu, tümörün evresi ve prognoz ile korelasyon göstermelidir. Hiç bir kanser türünde ve özellikle meme kanserinde böyle bir belirteç yoktur. Tümör belirteçleri, tarama, lokalizasyonu belirleme, prognoz göstergesi, tedaviye cevabı izleme ve nüksleri belirleme amaçlı kullanılabilir (24).

2.1.8.1. Meme kanserinde enzim belirteçler

Aril sülfataz B (25), kreatin kinaz BB (26), asetil kolin esteraz (27), siyalil transferaz (28) ve telomeraz (29) meme kanserinde araştırılan enzim belirteçlerdir. Bu enzimler sadece meme kanserine spesifik olmayıp, kolon ve akciğer kanserlerinde de artarlar. Metastazın özellikle de kemik metastazının

belirlenmesinde alkalen fosfatazın total ya da spesifik izoenzimlerinin ölçümünün yararlı olabileceği gösterilmiştir (30).

2.1.8.2. Meme kanserinde hormon belirteçler

İnsan plasental laktojeni ve paratiroid hormon ilişkili peptid meme kanserinde kullanılan hormon belirteçlerdir. Bu hormonların meme dışı dokularda (akciğer, gonadlar) oluşan kanser türlerinde de seviyeleri değişir (31,32). Meme dokusunun neoplastik progresyonunda insan büyüme hormonunun ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir (33).

2.1.8.3. Meme kanserinde onkofetal antijenler

Karsino Embriyonik Antijen (CEA) ve Doku Polipeptid Antijen (TPA) meme kanserinde kullanılan onkofetal antijenlerdir.

CEA: Meme (%40 artar) dışında; kolorektal, gastrointestinal (%50 artar) ve akciğer kanserlerinde de (%45 artar) göstergedir. Molekül ağırlığının %45-55'i karbohidrat olan glikoproteindir. CEA düzeylerinin siroz, pulmoner amfizem, selim meme hastalığı, rektal polip gibi selim hastalıklarda da arttığı unutulmamalıdır. Diğer doku kanserleri ve bu hastalıklara bağlı yanlış pozitif sonuçlar, CEA oluşturmayan tümörler nedeni ile yanlış negatif sonuçlar elde edilebildiğinden tarama amaçlı kullanılamaz (34).

TPA: Sitokeratin 8, 18, 19 içeren sitokeratin kompleksidir. Keratinler, hücreye internal stabilite sağlayan sitoskeletonun önemli bileşeni olan ara filaman proteinlerinin bir grubudur. Yaklaşık 45.000 kDa ağırlığında bir moleküldür. Epitelyal hücrelerle ilgilidir. İnflamatuvar hastalıklarda değeri yükselebilir. Serumda artan değerleri; tedavi süresince, hastalığın seyrini izlemede CEA ve CA 15-3'ten daha hızlı azalır. Tümör kitlesinden ziyade proliferasyonu yansıtır. Progresyonun çok duyarlı bir göstergesi olduğu kabul edilir (34).

2.1.8.4. Meme kanserinde karbohidrat içeren belirteçler

Bunlar ya tümör hücresi yüzeyindeki antijenlerdir veya tümör hücresinden salınırlar. Musin türü veya kan grubu antijenleri türüdürler. Tümör belirteçlerinin yeni jenerasyonudurlar. Enzim ve hormonlardan daha spesifiktirler. Karbohidrat

antijenleri CA olarak kısaltılırlar. Müsin türleri; CA 15-3, CA 549, CA 27.29, MCA(mucin-like carcinoma associated antigen)'dir. Kan grubu antijen türü ise CA 72-4'tür. Bunlara karşı antikorlar geliştirilmiştir (35,36).

CA 15-3: Diğer isimleri; kanser antijen 15-3, karbohidrat antijen 15-3, polimorfik epitelyal musin, MUC 1'dir. Serum plazma, serebrosinal sıvı, plevral eksüda ve asid mayiinde ölçülebilir. Referans aralığı ölçüm yöntemine ve serum veya plazmada ölçüme göre değişir. Meme kanserinin selim ve habis oluşuna, evresine, metastaz durumuna göre duyarlılık %16-91 arasında değişir. Bu nedenlerle erken tanı - tedavi, teşhis, tarama ve evre belirleme amaçlı kullanımı tavsiye edilmez. Relapsı, nüksü, metastazı belirlemede kullanılır. Tedaviye cevabı izlemede de sadece CA15-3 kullanımı önerilmemekle beraber, yüksek CA15-3 seviyesinin tedavinin yetersizliğinin göstergesi olduğu kabul edilmektedir (35,36).

CA 549: Asidik bir glikoproteindir. 400 ve 512 kDa ağırlığında iki tipi vardır. Metastazı olan meme kanserli hastaların izlenmesinde kullanılır. Sensitivite ve spesifite düşüklüğü nedeni ile tarama ve teşhiste kullanılmaz. Diğer müsin marker'larda olduğu gibi farklı marker'lar ile birlikte kullanılmalıdır (35,36).

CA 27.29: Breast carcinoma associated antijen, cancer antijen 27.29 isimleri ile de bilinir. Meme kanseri nükslerini belirlemede kullanılır. MUC geni tarafından kodlanan ve meme kanserinde ortaya çıkan musin proteini çekirdeğinde spesifik antikorlar ile tanımlanabilen antijendir. Serumda ölçülür. Evre II veya III meme kanserli olgularda nüksü belirlemek için yararlı olan CA 27.29, tarama ve rutin izlemede önerilmemektedir (35,36).

MCA: Metastatik meme kanserli hastalarda, hastalığın seyrini izlemede kullanılır. Serum, serebrosipinal sıvı, plevral eksüda ve asid mayiinde ölçülebilir. MUC -1 antijen ailesi (musin marker)'ne aittir. Yüksek mol ağırlıklı bir glikoproteindir.

CA 72-4: TAG -72 olarak da bilinir. Meme kanseri dışında, over ve gastrointestinal sistem kanserlerinin de belirteçidir. Primer meme karsinomlu hastalarda seri ölçümlerle hesaplanan TAG -72 klerensi tümör kalıntıları hesaplanmasında kullanılabilir. Çünkü tümörün çıkarılmasını takiben 4 kU/L'ye inmesi için gereken süre ortalama 23 gündür (35,36).

2.1.8.5. Meme kanserinde tümör belirteci olarak reseptörler

Östrojen ve progesteron reseptörleri meme kanserinde çok önemli prognostik ve prediktif bilgi verirler. Meme kanseri hücrelerinin proliferasyonu büyük oranda östrojene bağlıdır. Riskli gruplarda anti östrojenlerin koruyucu etkisi gösterilmiştir. Postmenapozda östrojen reseptör seviyeleri daha yüksektir. Östrojen ve progesteron reseptörleri meme kanserinin hormonal tedavisinde belirteç olarak kullanılmaktadır. Reseptörler negatif ise kemoterapi ve benzeri tedaviler uygulanır. Reseptör pozitif olanlar ise hormon ile tedavi edilirler (37).

2.1.9. Meme kanserinin tedavisi

Meme kanseri halen dünyadaki en yaygın kanserlerden biridir ve tedavisinde cerrahi, radyoterapi, kemoterapi ve hormonoterapi kullanılmaktadır. Cerrahi tedavi, tedavinin temel taşını oluşturmaktadır. Son 20 yılda erken evre meme kanserinin tedavisinde oldukça büyük değişiklikler olmuştur. Modifiye radikal mastektominin yerini meme koruyucu cerrahi almıştır. Yirmi yıldan fazla takip süresi olan çalışmalar sonucunda meme koruyucu cerrahinin mastektomiye eşdeğer sağkalım sağladığı gösterilmiştir. Ayrıca, sentinel lenf düğümü biyopsisinin kullanımı ile birlikte aksiller küraj sayısındaki azalma cerrahinin morbiditesinde azalmayla sonuçlanmıştır (38).

T1 ve 3 cm'den küçük T2 tümörü olan pek çok kadın meme koruyucu cerrahi için uygun adaydır. Daha büyük tümörü olan seçilmiş hastalara meme/tümör oranı göz önüne alınarak meme koruyucu cerrahi uygulanabilir. Ama genel olarak prensip 5cm üzerindeki tümörlere meme koruyucu cerrahi uygulamamak yönündedir. Fikirbirliği sağlanan konulardan bir tanesi cerrahi sonrasında mikroskopik sınırların temiz olmasıdır. Temiz cerrahi sınırın ne kadar olması gerektiği ise tartışma konusudur. On milimetrelilik temiz cerrahi sınır ideal olarak kabul edilirken, 1 mm'lik cerrahi sınır da yeterli sayılmaktadır. Palpabl olmayan tümörlerde gelenekselleşen yöntem tel ile işaretleme ve geniş lokal eksizyondur. Ancak, son zamanlarda yaygınlaşan bir diğer yöntem de ROLL (radyoaktif madde ile okkült lezyon lokalizasyon) tekniğidir. Her iki durumda amaç lezyonun temiz cerrahi sınırlar ile bütün olarak çıkarılması, doğru alanın çıkarıldığıının teyit edilmesidir. Birbirinden uzak yerleşimli ve çok odaklı tümörler

genel olarak meme koruyucu cerrahi için sorun oluşturmakta ve tercih mastektomi olmaktadır. Meme koruyucu cerrahi ile tedavi edilen erken evre meme kanserinde 5 yıl sonra %5 ve 10 yıl sonra %10 nüks ihtimali vardır. Nükslerin %95'i aynı memede ve tümör yatağında olmaktadır. 6 yıldan sonra memenin diğer taraflarındaki nüks oranında artış olmaktadır. Memenin diğer yerlerindeki tümörlerin yeni primer olarak değerlendirilmesi uygundur. Meme koruyucu cerrahi sonrasındaki nüks veya ikinci tümörlerde standart tedavi mastektomidir. Ancak bazı hastalarda ikinci kez meme koruyucu cerrahi uygulanabilir. Küçük, noninvaziv veya düşük grade'li nüks tümörlerde meme büyüklüğü uygunsa mastektomi yapılmayabilir (38).

Erken evre meme kanserli hastalarda teşhis esnasında mikrometastatik olarak yayılmış olan tümör hücrelerinin olabileceğinin gösterilmesi ve primer lokal cerrahi ve radyoterapiye sistemik kemoterapi ve hormonal tedavilerin eklenmesinin nüks riskini azalttığı ve sağkalımı uzattığının gösterilmesi meme kanserinde adjuvan sistemik tedavilerin temelini oluşturmuştur. Erken evre meme kanserinde adjuvan kemoterapi meme kanseri nüksünü ve meme kanserinden ölüm riskini etkin bir biçimde azaltmaktadır. Aksiler lenf bezi tutulumu olan erken evre meme kanseri hastalarına, özel bir kontrendikasyon olmadığı durumlarda adjuvan sistemik tedavi verilmelidir. Lenf nodu pozitifliği olmayan hastalarda ise tümör çapı en önemli faktör olmakla birlikte, hastanın yaşı, tümörün histolojik tipi, hormon reseptör durumu, tümörün grade'i, her-2 neu durumu gibi diğer prognostik faktörler göz önüne alınarak karar verilebilir. Lenf nodu tutulumu olmadığı için daha iyi bir prognoza sahip olan bu grup hastalarda bile cerrahi ve radyoterapi sonrası %30-50'lere varan nüks oranlarının olduğu ve ilk jenerasyon olarak uygulanan adjuvan kemoterapi rejimleri ile nüks oranlarının yaklaşık üçte bir oranında azaldığı görülmüştür. Son 30 yılda yapılan kontrollü çalışmalarda lenf nodu pozitif saptanmış meme kanserli hastalarda adjuvan sistemik kemoterapi ve hormonal tedavinin yararı gösterilmiştir. Hormon reseptörü negatif olan olgularda kemoterapi standart adjuvan tedavidir. Genç hastaların adjuvan kemoterapiden elde edeceği yarar daha fazla olmakla birlikte 69 yaşına kadar hastalarda anlamlı bir nüks ve ölüm riski azalması sağlanmıştır. Evre III meme kanserinde preoperatif dönemde uygulanacak neoadjuvan

kemoterapi tümörde “downstaging”i sağlayarak cerrahi müdahaleyi kolaylaştırmaktadır. Operabl lokal ileri meme kanserinde amaç meme koruyucu cerrahi oranını arttırarak mastektomiye azaltmak, böylece meme korunmasını sağlamaktır. Bu evredeki olgularda uygulanan neoadjuvan kemoterapinin sağkalıma katkısı yoktur. Inoperabl olgularda ise rezeksiyonu mümkün olmayan memeyi rezektabl hale getirmek temel hedefdir (38).

Radyoterapi (RT) meme kanserinin tedavisinde cerrahi ve sistemik tedavi ile birlikte tedavinin önemli bir modelini oluşturmaktadır. Hastalığın evresine bağlı olarak radyoterapi bölgesel yineleme riskini azaltır, sağkalımı artırır ve semptom palyasyonu sağlar. Erken eve meme kanserinde meme koruyucu cerrahi sonrası RT, tedavinin mutlak bir komponenti kabul edilmektedir. Daha ileri evre olgularda adjuvan RT'nin lokal yineleme riskini azalttığı ve aksilla metastazı yapmış olgularda sağkalımı artırdığı gösterilmiştir. Lokal ileri hastalıkta ise neoadjuvan sistemik tedavi sonrası lokal kontrolün sağlanması için modifiye radikal mastektomi ile birlikte RT'ye mutlak ihtiyaç duyulur. Tüm bunların dışında özellikle kemik ve beyin metastazlarında hastanın yakınmalarının azaltılmasında RT önemli bir araçtır. Yine lokal-bölgesel yinelemelerde RT den yararlanılmaktadır. Meme koruyucu cerrahi sonrası standart olarak tüm meme ışınlanması gerekmektedir. Mastektomi sonrası ise aksiller lenf bezi tutulumu varlığında ya da aksilla tutulumu olmayan olgularda daha başka olumsuz faktörlerin varlığında ışınlama yapılmaktadır. Randomize çalışmalar, mastektomi ile meme koruyucu cerrahi ardından RT uygulanan olgular arasında hastaliksız sağkalım ve genel sağkalım açısından fark olmadığını göstermiştir (38).

Meme kanserinde en sık görülen uzak metastazlar sırasıyla kemik, akciğer, beyin, karaciğer ve sürrenal bez metastazlarıdır. Nadir olarak gastrointestinal sistem metastazlarına da rastlanmaktadır. 15-20 yıl öncesine kadar uzak metastazlarda cerrahi tedavi hiç düşünülmez veya çok özel durumlarda uygulanmakta iken, günümüzde metastazektomi işlemleri daha çok uygulama alanı bulmaktadır. Akciğer, beyin, sürrenal gland ve karaciğerdeki meme kanseri metastazlarının bir bölümünün, bazı kriterlere uymak koşuluyla, cerrahi olarak çıkarılması mortalite ve morbiditeyi etkilemektedir. Ancak, radyoterapinin çok etkili olduğu kemik metastazları bu kavramın dışında tutulmalıdır (38).

2.2. Autotaxin

Autotaxin (ATX), plazma lizofosfolipaz D (LysoPLD) ile özdeş sekretuar bir enzimdir. Autotaxin, ektonükleotid pirofosfataz/fosfodiesteraz ailesinin bir üyesidir. Autotaxin LysoPLD, ektonükleotid pirofosfataz/fosfodiesteraz 2 (ENPP2), nükleotid pirofosfataz/fosfodiesteraz 2 (NPP2), fosfodiesteraz/nükleotid pirofosfataz 2 (PDNP2) ve fosfodiesteraz I alpha (PD-I α) olarak da isimlendirilmektedir. Enzim komisyonu autotaxin'e EC 3.1.4.39 numarasını vermiştir. EC numarası enzimlerin katalizledikleri kimyasal reaksiyona bağlı bir numaralandırma sistemidir. Bu numaralardan 3 hidrolazları, 1 ester bağı kırıcı enzimleri, 4 fosforik diester hidrolazları ve 39 alkilgliserofosfoetanolin fosfodiesterazı gösterir. (39).

Ektonükleotid pirofosfataz/fosfodiesteraz (ENPP) ailesi omurgalılarda bulunan ektoenzimlerden oluşur. Bu ektoenzimler, lizofosfolipidler ve nükleotidler gibi çeşitli hücre dışı bileşiklerin pirofosfat veya fosfodiester bağlarını hidrolize ederler. Memelilerde ENPP ailesinin yedi üyesi tanımlanmıştır ve bunlar domain yapılarına göre iki alt gruba ayrılmıştır. Autotaxin sekretuar bir glikoproteindir. Ektonükleotid pirofosfataz/fosfodiesteraz ailesinin diğer üyeleri ise transmembran ya da glikozilfosfatidilinozitol-bağlı proteinlerdir. Ektonükleotid pirofosfataz/fosfodiesteraz 1-3 iki N-terminal somatomedin B (SMB)-like domain, katalitik domain ve nükleaz-like domain içerirken, ENPP4-7 katalitik domain içerir ve SMB-like ve nükleaz-like domainlerden yoksundur. ENPP ailesinin tüm üyeleri alkalik fosfataz süperailisine ait benzer 'katalitik domain'e sahip olsalar da, farklı substrat spesifitelerine bağlı olarak çok çeşitli fizyolojik süreçlerde yer alırlar. Özellikle ATX, ENPP ailesinin lysoPLD aktivitesi gösteren tek üyesidir (39).

Autotaxin 1992'de 'tumor cell motility stimulating factor' olarak A2058 melanoma hücre süpernatantından izole edildiğinde, LysoPLD aktivitesine sahip olduğu bilinmemekteydi. Daha sonra 2002'de ATX'in lizofosfatidil kolini potent biyoaktif fosfolipid mediatör lizofosfatidik aside çeviren LysoPLD ile özdeş olduğu bulunmuştur (39).

Autotaxin, albumine bağlı ya da membran kaynaklı lizofosfatidil kolinden lizofosfatidik asit (LPA) ve kolin üreten sekretuar lysoPLD'dir. Lizofosfatidik

asit, G proteini ile eşlenik spesifik reseptörleri üzerinden etki ederek, hücre sağkalımı, proliferasyonu, diferansiyasyonu ve migrasyonu gibi çeşitli hücresel cevapları uyarır. Bu nedenle ATX, vasküler ve nöral gelişim ve lenfosit hareketleri gibi bir çok fizyolojik sürecin yanı sıra nöropatik ağrı, yara iyileşmesi ve kanser gibi bir çok patolojik süreçte de rol oynamaktadır (40).

Normal olmayan ATX ekspresyonu meme kanseri, böbrek kanseri, hodgkin lenfoma, hepatoselüler karsinoma, foliküler lenfoma, glioblastoma ve fibrosis gibi çeşitli insan hastalıklarıyla ilişkili bulunmuştur. Bu nedenle, ATX çekici bir terapötik hedef durumuna gelmiş ve selektif potent ATX inhibitörü geliştirme umudu ile çalışmalar yapılmaya başlanmıştır (40).

2.2.1. Autotaxin'in sentezi

Autotaxin'in molekül ağırlığı 125 kDa'dur. Autotaxin, insanda 8. kromozomun 8q24.1 lokusunda bulunan ENPP2 geni tarafından kodlanır. ENPP2 geni 27 eksondan oluşur. Alternatif eklemeler sonucu üç değişik ATX izoformu oluşur. Autotaxin (ATXt) teratokarsinom izoformudur. Autotaxin yaygın olarak ekspresyon edilir ve 863 amino asitten oluşmaktadır. Autotaxin (ATXm) melanoma izoformudur. Autotaxin katalitik domainde 52 amino asitlik insersiyon içerir ve 915 amino asitten oluşur. Brain specific isoform (PD-1alpha) NUC domainden önce 25 amino asitlik insersiyona sahiptir ve 888 amino asitten oluşur. Autotaxin'i kodlayan genin ekspresyonu Hoxa13, NFAT-1 ve oncogenic v-Jun gibi çeşitli transkripsiyon faktörleri ile kontrol altındadır. Autotaxin ekspresyonunu FGF, EGF, BMP2 ve Wnt-1 indüklerken, TGF- β ve bazı sitokinler (IL-1, IL-4, IFN) inhibe ederler (41).

Autotaxin preproenzim olarak sentezlenir. Sinyal peptidinden yarıklanmayı izleyerek Furin tip proteaz ile işlenir ve klasik sekretuar yol ile glikozile protein olarak ekstraselüler alana sekrete edilir. Üç bölgede N-glikozile olur (N52, N410, N524). Mutagenез çalışmaları N524 glikozilasyonun ATX'in aktivitesi için kesinlikle gerekli olduğunu göstermiştir (41).

Autotaxin yaygın olarak ekspresyon edilir ve plazmada da bulunur. Plazmadaki ATX'in başlıca kaynakları lenfatik endotelial venüller ve adipoz doku gibi görünmektedir. Ektonükleotid pirofosfataz/fosfodiesteraz 2'nin adipoz spesifik

delesyonunda plazma LPA düzeyi düşmektedir. Autotaxin geniş doku dağılımı gösterir. Yüksek mRNA düzeyleri beyin, over, akciğer, barsak ve böbrekte saptanmıştır. Erişkin beyinde oligodendrositlerde ve koroid plexus sekretuar epitelinde yüksek ATX düzeyleri bulunmuştur. Ayrıca, leptomeningeal hücrelerde ve kraniyal sinir sisteminin vasküler hücrelerinde exprese edilir (41).

2.2.2. Autotaxin'in yapısı

Autotaxin, iki N-terminal somatomedin B (SMB)-like domain, santral katalitik fosfodiester (PDE) domain ve C-terminal nükleaz (NUC)-like domain içerir. Autotaxin'in kristal yapısının çözümlenmesi katalitik domain'in bir tarafta SMB-like domain ile, bir tarafta NUC-like domain ile komşu olduğunu ortaya koymuştur. Katalitik ve NUC-like domainler lyso PLD aktivitesi için kritik olan N-bağlı glikan ve disülfid bağı ile stabilize olmaktadır. Katalitik domain, kement benzeri konformasyon ile NUC-like domain'e bağlanır (Şekil 2.1.) (39).

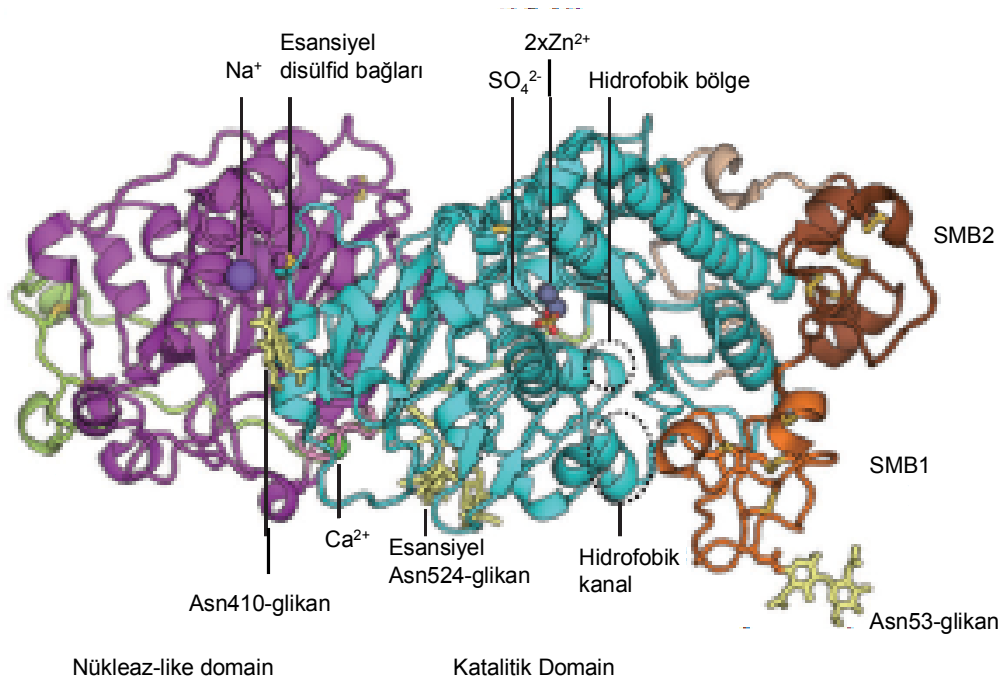
Sinyal sekansı	SMB1	SMB2		Katalitik Domain		Nükleaz-like Domain
----------------	------	------	--	------------------	--	---------------------

Şekil 2.1. Autotaxinin domain organizasyonu (39)

(SMB1: Somatomedin B-like domain 1, SMB2: Somatomedin B-like domain 2).

Ayrı ayrı incelenecek olursa, domainlerin kristal strüktürü bilindiği gibi katlantılar içermektedir. SMB-like domain, dört adet intramoleküler disülfid bağı tarafından stabilize edilmiş bir disülfid düğümü şeklindedir (Şekil 2.2.). Katalitik domain, korunmuş aspartat (Asp171, Asp311 ve Asp358) ve histidin (His315, His359 ve His474) rezidüleriyle koordine iki adet çinko iyonu ile birlikte alkalin fosfataz süperailisi katlantısı içerir. Katalitik treonin rezidüsü (Thr209) iki çinko iyonuna yakın olarak yerleşmiştir. Bu katalitik bölgeler ENPP ailesinde oldukça korunmuştur ve ATX'in lysoPLD aktivitesi için esansiyeldir. NUC-like domain bakteriyel nonspesifik endonükleazlar ile yapısal olarak benzerdir. Autotaxin'de NUC-like domainin katalitik bölgeleri Ile640 ve Lys705'dir. Lizofosfolipaz D aktivitesi için gerekli olan C-terminal Lys848 amino asiti ile Glu826 ve Asp832 aminoasitleri arasında tuz köprüleri bulunmaktadır. NUC-like domain katalitik domain ile etkileşime katkıda bulunmak için kalsiyum ve sodyum iyonlarını

bağlar. EF hand-like motifteki Asp735 kalsiyumu bağlar ve katalitik domaindeki Lys430 ile etkileşir. İnsanda EF hand-like motif mutasyonu lysoPLD aktivitesinde azalma ile sonuçlanır. Sodyum iyonu, domainler arası disülfid bağının oluşması için esansiyel olan Cys801'i barındıran dönüş konformasyonunu stabilize eder. Bu gözlemler lysoPLD aktivitesi için katalitik ve NUC-like domainler arasındaki etkileşimin fonksiyonel önemini vurgulamaktadır. Ayrıca, katalitik domain'de 'hidrofobik bölge' olarak adlandırılan bölgeye LPA'in açıl zinciri yerleşir ki bu bölge diğer ENPP'larda bulunmaz. Bu durum, ATX'in diğer ENPP ailesi üyelerinden farklı olarak lysoLPD aktivitesi göstermesini açıklamaktadır (39).



Şekil 2.2. Autotaxinin şerit görünümü (39).

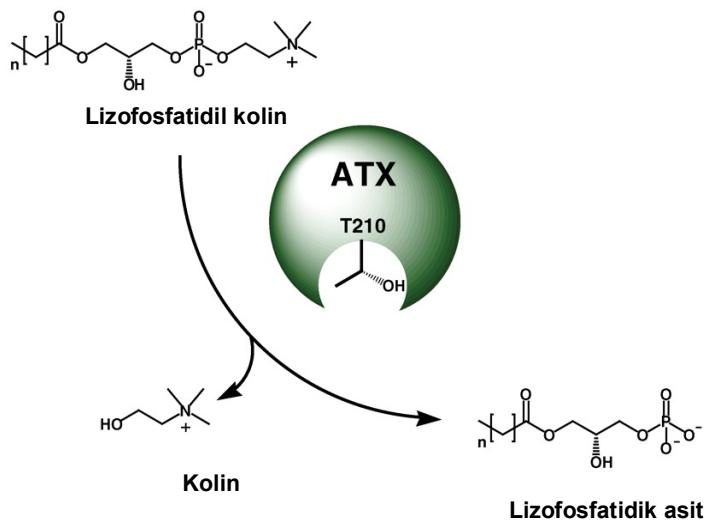
(SMB1-like domain turuncu, SMB2-like domain kahverengi, katalitik domain mavi, NUC-like domain mor, L1 bej, L2 açık yeşil ve EF hand-like motif pembe ile gösterilmiştir.) (SMB1: Somatomedin B-like domain 1, SMB2: Somatomedin B-like domain 2, SO_4^{2-} : Sülfat iyonu, Zn^{2+} : Çinko iyonu, Ca^{2+} : Kalsiyum iyonu)

Autotaxin'in bir başka ilgi çekici yapısal özelliği de SMB-like domain ile katalitik domain arasında 'hidrofobik kanal' bulunmasıdır. Hidrofobik kanal, aktif bölge ile hidrofobik bölge arasında T-junction şeklinde bir yol oluşturur. Hidrofobik kanal, ATX'in eşsiz bir yapısal özelliğidir. Hidrofobik kanalın oklüze olduğu ATX mutantlarında LysoPLD aktivitesi bir miktar azalmış olmakla

birlikte, gözlenmeye devam etmesi hidrofobik kanalın lysoPLD aktivitesi için gerekli olmadığını göstermektedir. Hem hidrofobik bölge mutantlarının, hem de hidrofobik kanal mutantlarının hücre motilitesini stimüle edici aktivitesi bozulmuştur. Autotaxin, hücre motilitesini stimüle edici etkisini LPA üretimi üzerinden gösterdiği için, hidrofobik kanal mutantlarında LPA üretimi devam ettiği halde, etkisinin azalması hidrofobik kanalın LPA'ın hedef reseptöre taşınmasında etkili olduğunu düşündürmektedir (39).

2.2.3. Autotaxin'in substratları

Autotaxin, lizofosfolipidlere karşı LysoPLD aktivitesi gösterir. Diaçil fosfolipidler ATX tarafından hidroliz edilemezler. Autotaxin daha önce karakterize edilen fosfolipazlar ile de homoloji göstermemektedir. Klasik fosfolipazların katalitik merkezinde bulunan HKD motifi (HxK(x)₄D(x)₆SxN sekansı, x herhangi bir amino asit olabilir, fosfolipazların katalitik aktivitesi için gereklidir) ATX'de bulunmamaktadır. Örneğin iki açıl zinciri taşıyan fosfatidilkolini hidrolize edemez. Autotaxin, lizo- formdaki fosfolipidlere selektiftir. Bu özelliği ATX'i diğer fosfolipazlardan ayırmaktadır. Autotaxin lizofosfatidil kolin, lizofosfatidil etanolamin ve lizofosfatidil serin gibi lizofosfolipidleri hidrolize eder. Lizofosfatidil kolin'den ATX etkisi ile lizofosfatidik asit ve kolin oluşumu Şekil 2.3.'de gösterilmiştir (42, 43).



Şekil 2.3. Autotaxin reaksiyonu (44) (ATX: Autotaxin).

Autotaxin, aynı zamanda sfingozilfosforilkolin'e etki ederek sfingozin-1-fosfat oluşturabilir (42, 43).

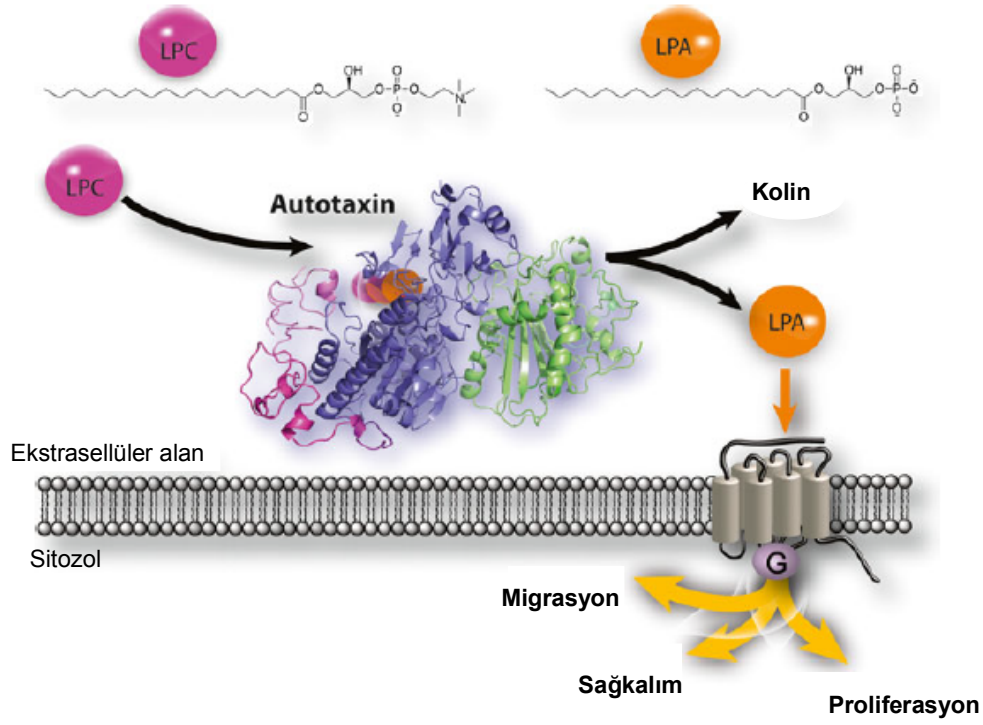
Autotaxin diğer NPP ailesi üyelerine benzer şekilde ATP ve ADP gibi nükleotidleri hidrolize ederek nükleotid 5'-monofosfat oluşturabilmektedir. Bununla birlikte, Autotaxin hücre motilitesini stimüle edici etkisini katalitik aktivitesi ile sağlamaktadır. Katalitik bölgedeki treonin rezidüsünün alanin rezidüsü ile yer değiştirdiği NPP ailesinin diğer üyeleri hücre motilitesini stimüle edememektedirler. Autotaxin'in nükleotid substratları adenzin-5'-trifosfat (ATP), diadenozin polifosfatlar, üridin difosfat glukoz (UDP-glukoz), nikotinamid adenin dinükleotid (NAD+) ve 3'-fosfoadenozin-5'-fosfosülfat'tır. Bu nükleotid substratların ATX aracılı hidrolizinin fizyolojik önemi hala açıklanamamıştır (42,43).

Autotaxin'in LPC için Km değeri 250 µM iken, nükleotid substratlar için Km değeri 14.1 mM'dır. Bu durum ATX'in LPC'e karşı afinitesinin nükleotidlerden daha yüksek olduğunu ve ATX'in etkilerini lysoPLD aktivitesi ile LPC'den LPA üreterek gerçekleştirdiğini göstermektedir. Dolaşımda LPC birkaç yüz mikromolar konsantrasyonda bulunur. Tüm bu bilgiler, güçlü bir şekilde LPC'in ATX için fizyolojik substrat olarak hizmet ettiğini göstermektedir (42,43).

Autotaxin'in major substratı lizofosfatidil kolin'dir. Lizofosfatidil kolin'den ATX etkisi ile lizofosfatidik asit oluşur. Dolaşımda meydana gelen bu reaksiyon ekstraselüler LPA üretiminin başlıca yolağıdır. Bu yolak periferik dokulara devamlı olarak LPA sağlamaktadır. Autotaxin etkilerini LPA üretimi üzerinden gerçekleştirmektedir (42,43).

2.2.4. Autotaxin'in patofizyolojik rolü

Autotaxin'in hücre motilitesini stimüle ettiği gösterilmiştir. Treonin rezidüsü (thr210) alanin ile yer değiştirilerek oluşturulan mutant ATX, katalitik olarak inaktiftir ve LPA sentezleyemez. İnaktif mutant ATX hücre motilitesini stimüle edememektedir (45). Lizofosfatidik asit 1 reseptörü knock-out farelerden üretilen fibroblastlar da ATX'e migratuvar cevap gösterememektedirler (46). Bu nedenlerle ATX'in hücre motilitesini stimüle edici etkisini LPA üretimi ile LPA1 reseptörü üzerinden gerçekleştirdiği gösterilmiştir (Şekil 2.4.) (47).



Şekil 2.4. Autotaxin-lizofosfatidik asit reseptör sinyalizasyonu (59).

(LPC: Lizofosfatidil kolin, LPA: Lizofosfatidik asit)

Autotaxin kan damarı oluşumunda rol almaktadır. Autotaxin knock-out fareler uygun kan damarlanmaları oluşmadığı için embriyonik 10.5'inci günde ölmektedirler (48,49).

Lenf nodlarındaki lenfosit trafiğinde de ATX önemli bir rol üstlenmiştir. ATX lenfositleri yakalayan endotelial hücrelerde yüksek oranda ekspres edilmektedir. Kemokinler tarafından aktive edilen lenfositler, membranlarında bulunan integrinleri ile endotelial hücrelerden sekrete edilen ATX'i bağlarlar. Lokal olarak ATX ile üretilen LPA'nın T lenfositlerde kemokinetik etkiler oluşturduğu gösterilmiştir. Ayrıca, LPA'nın lenfositlerde morfolojik değişiklikler oluşturduğu ve lenfositlerin endotelial hücrelere adhezyonunu artırdığı gösterilmiştir. Bu sonuçlar, ATX'in LPA üzerinden lenfoid organlara lenfosit girişini uyardığı fikrini desteklemektedir (50, 51).

Autotaxin düzeyi çeşitli hastalıkların oluşturduğu bir çok patofizyolojik durumdan etkileniyor gibi görünmektedir. Kronik karaciğer hastalarında serum ATX konsantrasyon ve aktivitesinin arttığı gösterilmiştir (52). Buna zıt olarak, prostat kanseri hastalarında serum ATX konsantrasyonu postoperatif azalma

eğilimindedir (53). Nefroz hastalarının serum ATX düzeylerinde değişiklik saptanmamış olmakla birlikte, idrarlarında ATX saptanmıştır (54). ATX over kanseri, dermoid kist ve müsinöz kistadenomlu hastaların peritoneal sıvılarında yüksek olarak ölçülmüştür (55).

Lizofosfatidik asit demiyelinizasyon, nöropatik ağrı ve ağrı ile ilişkili proteinlerin ekspresyon değişikliklerini indüklemektedir (56). Autotaxin hetero knock-out farelerde vahşi tip farelere göre sinir yaralanmasının indüklediği nöropatik ağrının %50 daha fazla iyileştiği gösterilmiştir (57). Lizofosfatidil kolin'in nöropatik ağrıyı indüklediği yıllardır bilinmektedir. Lizofosfatidil kolin'in indüklediği nöropatik ağrı ATX hetero knock-out farelerde kısmen azalmıştır (58).

Pre-adipositler ATX ve LPA sentezlemezken, adipositler hem ATX hem de LPA sentezleyebilmektedirler. Adiposit koşullu medyumdan ATX pürifiye edilebilmiştir. Bu durum ATX'in adiposit üretim sürecinde pozitif veya negatif bir düzenleyici olarak rol oynadığını, obezite ve diyabet ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir (59, 60).

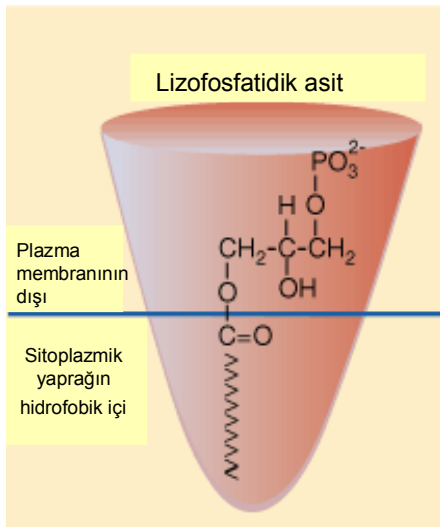
Autotaxinin meme kanseri (61), böbrek kanseri (62), hogkin lenfoma (63), glioblastoma (64) ve hepatoselüler karsinom (65) gibi malign tümörlerde overeksprese olması tümör hücrelerinin invazyon ve metastaz sürecinde rolü olduğunu düşündürmektedir. Autotaxin'in, LPA üzerinden LPAR1 bağımlı olarak insan kanser hücrelerinde migrasyonu indüklediği gösterilmiştir. İnsan kanser hücrelerinin LPA bağımlı motilite yeteneği ile LPA1 reseptör ekspresyonu arasında korelasyon gösterilmiştir (46). Autotaxin'in ve LPA reseptörlerinin meme epitelinde transgenik ekspresyonunun, geç başlangıçlı, östrojen reseptörü pozitif, invazif ve metastatik meme kanseri sıklığını artırmak için yeterli olduğu gösterilmiştir (66).

Autotaxin'in over-ekspresyonu ras (67), jun (68), rhoC (69), myc (70) ve fyn (71) gibi onkogenler ve wnt-1 (72) veya integrinler (73) gibi proto-onkogenler tarafından indüklenebilmektedir.

Tüm bu çalışmalar, ATX antagonistlerini ve LPA reseptör inhibitörlerini anti-kanser ilaç araştırmalarında hedef haline getirmiştir (74).

2.3. Lizofosfatidik Asit

Lizofosfatidik asit (LPA) en küçük ve yapısal olarak en basit gliserofosfolipiddir. Molekül ağırlığı 430 - 480 Dalton'dur. Bir gliserol, bir fosfat baş grubu ve bir yağ asidi içerir. Fosfat baş grubunun hidrofilik, yağ asidi kuyruğunun lipofilik olması lizofosfatidik aside amfipatik özellik kazandırır. Lizofosfatidik asit amfipatik özelliği ile hücre membranının çift tabakalı yapısına katılmaktadır (Şekil 2.5.). Bunun yanı sıra, günümüzde birçok biyolojik fonksiyonda rol oynadığı kanıtlanmıştır (75).

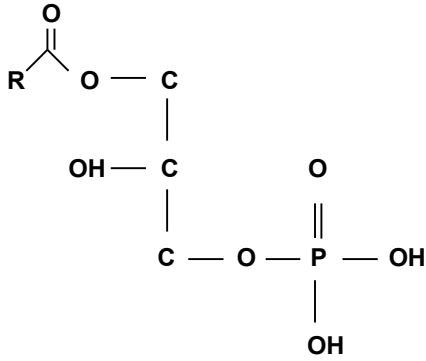


Şekil 2.5. Hücre membranı ve lizofosfatidik asit (76).

Önceleri sadece ökaryotik ve prokaryotik hücrelerde lipid biyosentezinde bir prekürsör olduğu düşünülen LPA'nın, bugün birçok hücrenel etkileri olduğu bilinmektedir. Lizofosfatidik asit için spesifik heptahelikal reseptörlerin tanımlanmasıyla hormon ve büyüme faktörü benzeri etkileri de aydınlatılmıştır. Lizofosfatidik asit, G proteini ile eşlenik reseptörler (GPCR) üzerinden etkilerini gösteren prototipik bir lipid mediyatördür. Lizofosfatidik asit, hücrede morfolojik ve proliferatif etkileri indüklemektedir. Lizofosfatidik asit nörogenez, myelinizasyon, angiogenez, yara iyileşmesi ve kanserogenez gibi önemli birçok biyolojik süreçte rol oynamaktadır. Ayrıca, membran fosfolipidlerinin sentezinde görev alır. Tüm hücreler az miktarda da olsa LPA içerir ve serumda da anlamlı miktarda LPA bulunmaktadır (77).

2.3.1. Lizofosfatidik asidin kimyasal yapısı

Lizofosfatidik asit biyokimyada mono-açıl-glisero-3-fosfat şeklinde ifade edilir (Şekil 2.6.). Gliserol üzerine yağ asidi zinciri, birinci veya ikinci pozisyonlardan bağlanabilir. Ayrıca, yağ asidi zinciri çeşitli kimyasal bağlarla gliserole bağlanabilir. Birinci pozisyonda açıl, alkil ve alkenil bağları oluşturulabilirken, ikinci pozisyonda açıl bağı oluşturulabilmektedir. Yağ açıl zinciri değişebileceği için LPA birçok farklı moleküler biçimde bulunabilmektedir. Eğer aksi belirtilmemişse, LPA denilince sözü edilen açıl bağı, 18 karbonlu, tek çift bağı doymamış yağ asidi (oleik asit) zinciri taşıyan formdur. Bu forma oleil-LPA veya 18:1 LPA da denmektedir. Bu form serbest hidroksil ve fosfata sahip olduğu için suda daha iyi çözünür. İnsan serumunda 18:1 LPA'nın yanısıra, 16:0, 18:0, 18:2 ve 20:4 LPA'ler de saptanmıştır (78).



Şekil 2.6. Lizofosfatidik asit (1-açıl-2-hidroksi-sn-glisero-3-fosfat) (LPA).

Lizofosfatidik asit ekstrasellüler olarak salivada, foliküler sıvı ve seminal plazma gibi biyolojik sıvılarda ve serumda mikromolar konsantrasyonlarda bulunmaktadır. İlginç olarak plazmada, serum düzeylerinden çok daha düşük düzeylerde ölçülmüştür. Bu nedenle serumdaki ekstrasellüler LPA'nın bir kısmının kan koagülasyonunun sonucu olarak trombositler tarafından üretildiği düşünülmektedir (79).

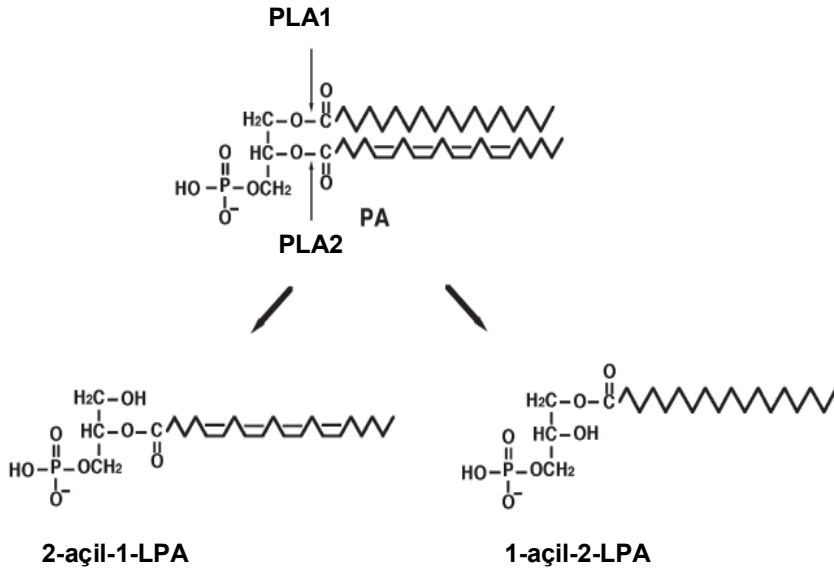
Sağlıklı kadınların serum LPA konsantrasyonu $1.57 \pm 0.56 \mu\text{M}$, sağlıklı erkeklerde ise $0.85 \pm 0.22 \mu\text{M}$ olarak saptanmıştır. Kadınlarda serum LPA düzeyi

erkeklerden daha yüksektir. Gebelik durumunda serum LPA düzeyi daha da yükselmektedir (80).

Lizofosfatidik asit kanda albumine bağlı olarak taşınır. Albümin mol başına 3 mol LPA bağlayabilmektedir. Hücre içinde ise LPA karaciğer yağ asiti bağlayan protein (Liver Fatty Acid Binding Protein, LFABP)'e bağlı olarak taşınmaktadır. LFABP molekül başına iki LPA bağlayıcı bölge içermektedir. 1979'da intrasellüler aktin bağlayıcı protein olarak keşfedilen gelsolinin sekretuar formu olan ve plazmada bulunan gelsolin de monomerik ve filamentöz aktinin yanısıra, LPA'yi de bağlamaktadır (81).

2.3.2. Lizofosfatidik asidin sentezi

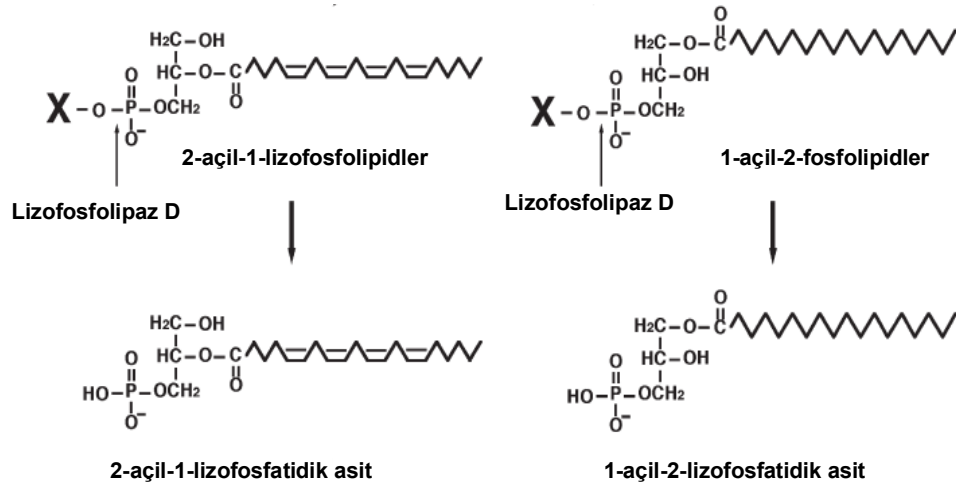
Lizofosfatidik asidin hücre içindeki başlıca sentez yolağı fosfatidik asit (PA) üzerinden gerçekleşmektedir. Gliserofosfolipid metabolizması sırasında fosfolipaz D ya da diaçilgliserol kinaz ile sentezlenen fosfatidik asidin 1. pozisyonundan fosfolipaz A1 (PLA1) enzimiyle ya da 2. pozisyonundan fosfolipaz A2 (PLA2) enzimiyle hidrolizi LPA sentezlenmesine yol açmaktadır (Şekil 2.7.) (82, 83).



Şekil 2.7. Fosfatidik asitten lizofosfatidik asit sentezi (83).

(PLA1: Fosfolipaz A1, PLA2: Fosfolipaz A2, PA: Fosfatidik asit, LPA: Lizofosfatidik asit)

Ekstrasellüler lizofosfatidik asit üretimi lizofosfolipidler üzerinden gerçekleşmektedir (Şekil 2.8.). Lizofosfolipidlerin Lyso PLD ile karboksilik ester bağlarının hidrolizi sonucu LPA sentezlenmektedir. Lizofosfolipaz D, başka bir deyişle lipid fosfodiesteraz olarak fonksiyon göstermektedir. Lizofosfatidik asidin LysoPLD aracılı üretimi enzim ve substratının her ikisini de hücre dışında bulunması nedeniyle eşsizdir. Bu yolak periferik dokulara devamlı LPA sağlar (82, 83).



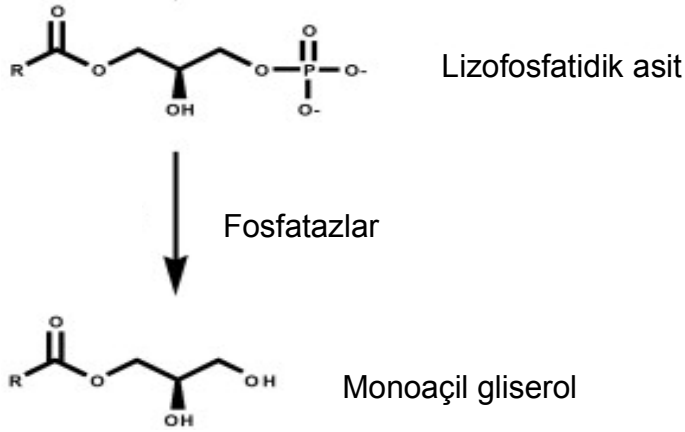
Şekil 2.8. Lizofosfolipidlerden lizofosfatidik asit (LPA) sentezi (83).

Kompleks lipidlerin sentez yolağındaki ara basamaklarda da LPA sentezlenebilir. Gliserol-3-fosfatın uzun zincirli bir yağ asiti ile esterifikasyonu sonucu LPA sentezi gerçekleşebilmektedir. Bu reaksiyon gliserofosfat açil transferaz ile katalizlenirken, yağ açil grubu açil-KoA'dan transfer edilir (82, 83).

2.3.3. Lizofosfatidik asidin yıkılması

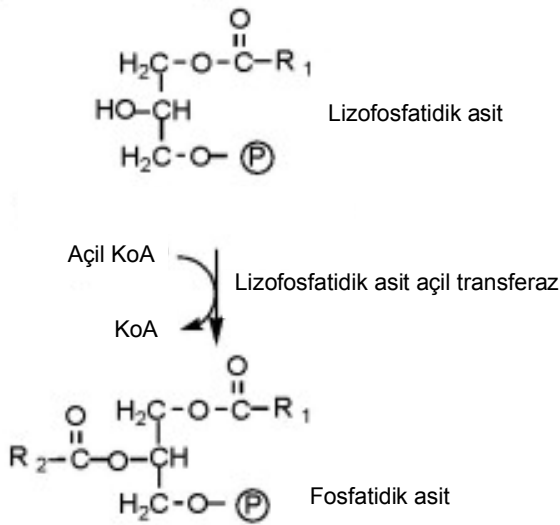
Lizofosfatidik asit, üç şekilde yıkılabilmektedir.

1. Lizofosfatidik asit ekstrasellüler olarak lipid fosfat fosfohidrolaz ile defosforile olarak monoaçil gliserole dönüşebilmektedir (Şekil 2.9.) (83).



Şekil 2.9. Lizofosfatidik asidin fosfatazlarla yıkılması (41).

2. Lizofosfatidik asit 1-açilgliserol-3-fosfat açil transferaz enzimi ile fosfatidik asit (PA) oluşturarak da yıkılabilmektedir (Şekil 2.10.). Bu enzime lizofosfatidik asit açil transferaz da denilmektedir. Bu enzim PA oluşturmak için açil-KoA'daki açil grubunu LPA'ye transfer eder (83).



Şekil 2.10. Lizofosfatidik asidin lizofosfatidik asit açil transferaz ile yıkılması (84).

3. Lizofosfatidik asidin yıkımında bir başka yol da, lizofosfolipaz ile hidroliz edilerek açil grubunun uzaklaştırılması ve gliserol-3-fosfat oluşumudur (83).

2.3.4. Lizofosfatidik asidin etki mekanizması

Lizofosfatidik asit etkilerini G proteinleri ile eşlenik, geniş doku dağılımı gösteren LPA reseptörleri üzerinden göstermektedir. Lizofosfatidik asit sinyalinin başlama basamağı olarak heterotrimerik G protein tipleri olan Gq, Gi ve G12/13 kabul edilmiştir. Lizofosfatidik asidin G proteini ile eşlenik altı tane reseptörü vardır. İlk üç reseptör EDG (endothelial cell differentiation gene) ailesine aitken, diğer reseptörler non-EDG'dir (85).

Lizofosfatidik asit reseptörleri:

- Lizofosfatidik asit 1 reseptörü: LPA1 (EDG-2)
- Lizofosfatidik asit 2 reseptörü: LPA2 (EDG-4)
- Lizofosfatidik asit 3 reseptörü: LPA3 (EDG-7)
- Lizofosfatidik asit 4 reseptörü: LPA4 (p2y9/GPR23)
- Lizofosfatidik asit 5 reseptörü: LPA5 (GPR92)
- Lizofosfatidik asit 6 reseptörü: LPA6 (p2y5)

Lizofosfatidik asit 1 reseptörü ilk tanımlanan yüksek afiniteli LPA reseptörüdür. İnsanlarda LPA1 reseptörünün kromozomal lokusu 9q31.3'dür. Lizofosfatidik asit 1 reseptörü, 41 kDa molekül ağırlığında ve 364 amino asitten oluşan bir proteindir. Lizofosfatidik asit 2 reseptörü ise, 39 kDa molekül ağırlığında ve 348 amino asitten oluşan bir proteindir. Lizofosfatidik asit 2 reseptörünün amino asitlerinin %60'ı LPA1 reseptörü ile aynıdır. Lizofosfatidik asit 2 reseptörünün kromozomal lokusu 19p12'dir. Lizofosfatidik asit 3 reseptörü 40 kDa molekül ağırlığındadır ve kromozomal lokusu 1p22.3-p31.1'dir. Lizofosfatidik asit 3 reseptörünün amino asit sekansının %50'si LPA1 ve LPA2 reseptörleri ile aynıdır. İlk üç LPA reseptörü klasik LPA reseptörleridir ve daha yüksek afinitelidirler. Diğer LPA reseptörleri ise yapısal olarak ilk üç reseptörden farklıdır ve P2Y pürinerjik reseptörleri ile ilişkilidirler. Lizofosfatidik asit 4 reseptörü X kromozomunun q13-q21.1 bölgesinde yerleşmiştir, 370 amino asitten oluşur ve 42 kDa molekül ağırlığındadır. Lizofosfatidik asit 5 reseptörü, LPA4 reseptörü ile %35 homoloji gösterir. 372 amino asitten oluşan LPA5'in molekül ağırlığı 41 kDa ve kromozomal lokusu 12p13.31'dir. Lizofosfatidik asit 6 reseptörü ise en son tanımlanan düşük afiniteli bir LPA reseptörüdür. Lizofosfatidik asit 6 reseptörü 344 amino asitten oluşur ve 13. kromozomda

lokalizedir. Lizofosfatidik asit 6 reseptörünün saç uzaması ile ilişkili olduğu ve otozomal resesif hipotrikozis hastalığında mutasyona uğradığı bildirilmiştir. Yeni tanımlanan LPA reseptörleri p2y10 ve GPR87 üzerinde çalışmalara devam edilmektedir (85).

Lizofosfatidik asit 1 reseptörü $G_{ai/o}$, $G_{aq/11}$ ve $G_{\alpha 12/13}$ ile eşleniktir. Lizofosfatidik asit 2 reseptörü $G_{ai/o}$, $G_{\alpha 11/q}$ ve $G_{\alpha 12/13}$ eşleniktir. Lizofosfatidik asit 3 reseptörü $G_{ai/o}$ ve G_{aq} ile eşlenik iken $G_{\alpha 12/13}$ ile eşlenemez. Klasik LPA reseptörleri G_{as} ile eşlenmezler. Lizofosfatidik asit 4 reseptörü $G_{\alpha 12/13}$, $G_{aq/11}$, $G_{ai/o}$ ve G_{as} ile eşlenebilir. Lizofosfatidik asit 5 reseptörü ise $G_{\alpha 12/13}$ ve G_{aq} ile eşlenir (85,86).

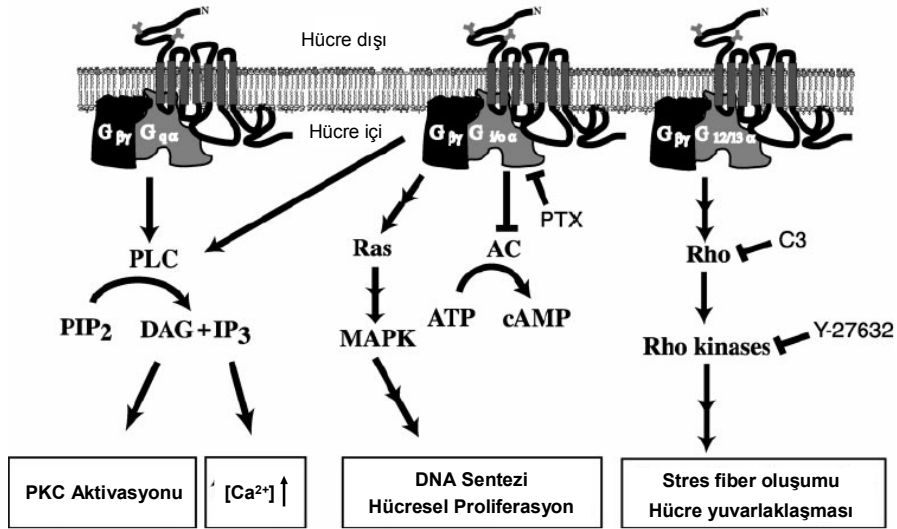
G_q 'nun aktivasyonu fosfolipaz C'yi stimüle eder. Fosfolipaz C'nin stimülasyonu diaçil gliserol (DAG) ve inozitol 3,4,5-trifosfat (IP3) oluşumuyla sonuçlanır. Protein kinaz C aktive olur ve intrasellüler kalsiyum mobilizasyonu gerçekleşir. Lizofosfatidik asidin indüklediği kalsiyum mobilizasyonu hem PTX-sensitif G_i hem de fosfolipaz C'yi aktive eden PTX-insensitif G_q aracılığıyla gerçekleşebilir (Şekil 2.11.) (86).

Pertussis toxin (PTX) duyarlı – G_i , mitogen-activated protein kinase (MAPK) aktivitesini güçlendirir ve hücrede intrasellüler siklik adenozin monofosfat (cAMP) seviyelerini azaltır. Lizofosfatidik asidin proliferatif etkileri G_i proteini üzerinden gerçekleşen MAPK aktivitesine bağlıdır. G proteini ile eşlenik reseptör (GPCR) ile MAPK arasındaki ilişki birçok çalışmada tanımlanmıştır. G_i 'nin $\beta\gamma$ dimerik subünitinin MAPK'ın aktivasyonundan sorumlu olduğu düşünülmektedir. α subünit ise adenilil siklaz inhibisyonuna aracılık eder (86).

$G_{12/13}$ 'ün aktivasyonu aktin aracılı sitoskeletal yeniden yapılanmayı başlatan small GTPase Rho'yu mobilize eder. Lizofosfatidik asit, Rho'yu $G_{\alpha 12/13}$ aracılı yolla aktive eder. Rho (Ras-related small GTPase), LPA'in aktin stres fiber formasyonu, fokal adhezyon komplekslerinin birleştirilmesi ve nöron retraksiyonu gibi etkilerinde aracılıdır. Ayrıca, Rho'nun LPA'in gen transkripsiyonu ve pH regülasyonu üzerindeki etkilerinde önemli rolü vardır. Heterotrimerik G proteini ve Rho arasındaki bağlantı tanımlanmıştır. $G_{\alpha 13}$ ile Rho arasında adaptasyon sağlayan protein Lsc/p115RhoGEF'dir. Aktive $G_{\alpha 13}$,

GTPase aktive edici faktör olan ve aynı zamanda guanidine nükleotid exchange faktör olan Lsc/p115RhoGEF'i direk olarak bağlar ve Rho etkinleşir (86).

Hücre proliferasyonunun LPA ile indüksiyonu Gi ve G12/13 yolaklarının koordinasyonuna ihtiyaç duyar (85-88). Yapılan çalışmalar, LPA'in epidermal büyüme faktörü (EGF) ve trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) reseptörlerinin tirozin fosforilasyonunu indüklediğini göstermiştir. Mitojen aktive protein kinaz, LPA tarafından indirekt olarak peptid büyüme faktör reseptörleri üzerinden de aktive edilebilir. Lizofosfatidik asit aracılı hücresel cevapların en azından bir bölümü epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) ile ilişkilidir. Epidermal büyüme faktörü reseptörü intrinsik protein tirozin kinaz aktivitesine sahip reseptörler ailesindedir. Epidermal büyüme faktörü reseptörünün tirozin kinaz aktivitesi, G-proteini ile eşlenik reseptörde tirozin fosforilasyonundan kaynaklanır. Bununla birlikte, src protein tirozin kinazlar gibi hücresel kinazlar da EGFR tirozin fosforilasyonunda artış yapabilir (87).



Şekil 2.11. Lizofosfatidik asidin G proteini ile eşlenik sinyal iletim yolağı (87).

(PLC: Fosfolipaz C, PIP2: Fosfatidilinozitol 4,5 bifosfat, DAG: Diaçil gliserol, IP3: İnozitol 3,4,5 trifosfat, MAPK: Mitojen aktive protein kinaz, AC: Adenil siklaz, ATP: Adenozin trifosfat, cAMP: Siklik adenozin monofosfat, PKC: Protein kinaz C, PTX: Pertussis toksin)

2.3.5. Lizofosfatidik asidin hücresel etkileri

Yakın zamana kadar LPA fosfolipid biyosentezinde bir ara ürün olarak bilinmekteyken, günümüzde birçok fizyolojik ve patofizyolojik yolakta mediyatör olarak rol aldığı gösterilmiştir. Lizofosfatidik asit birçok hücre tipinde çok çeşitli hücresel faaliyetleri aktive etmektedir. Membran fosfolipidlerinin de novo sentezinde rol oynamaktadır. Lizofosfatidik asit ile ilgili çalışmalar her geçen gün artmaktadır (88).

Lizofosfatidik asit yara iyileşmesinde stimulatör olarak rol oynar. Mezenkimal ve epitelyal hücrelerde proliferasyon ve migrasyonu stimüle eder. Çeşitli proinflamatuar sitokinlerin üretimini artırır. Miyofibroblast kontraksiyonunu başlatan fibronektin bağlanmasını artırır. Erken evre kutanöz yara iyileşmesinde topikal olarak uygulandığında re-epitelizasyonu artırmaktadır (89). İntestinal kolitli rat modeline rektal olarak uygulandığında, intestinal epiteliyal yara iyileşmesini stimüle ettiği gösterilmiştir (90). Tükürükte düzeyleri yükseldiğinde üst digestif organlarda re-epitelizasyonu arttırabileceği düşünülmektedir (91).

Lizofosfatidik asidin okside LDL ve atherosklerotik lezyonların biyoaktif bir bileşeni olduğunun bulunmasıyla atherosklerozda LPA'nın rol oynadığı desteklenmiştir (92). Plaklarda bulunan LPA platelet aktivasyonunu başlatmaktadır (93). Ayrıca, rat arter modelinde LPA vasküler düz kas hücrelerinin dediferansiyasyonunu stimüle etmekte ve neointima formasyonunu başlatmaktadır (94).

Lizofosfatidik asit adipogenezin kontrolü ve obeziteyle de ilişkilidir. Lizofosfatidik asit adiposit koşullu medyumda gözlenmiştir ve trigliserit düzeylerinde azalmaya karşılık preadipositlerin proliferasyonunu stimüle ettiği ve böylece adiposit matürasyonunu inhibe ettiği gözlenmiştir (95). Pre-adiposit/matür adiposit oranındaki artış kardiyovasküler hastalıklar ve tip 2 diyabetin bilinen risk faktörü olan obezite ile ilişkili olabilir (96).

Lizofosfatidik asit in vitro olarak vasküler endotelial hücrelerin migrasyon ve proliferasyonunu indükler. Henüz kesin olmamakla birlikte LPA'in in vivo olarak anjiogenik cevabı indükleyebildiği belirlenmiştir. Ekstrasellüler LPA'in ana kaynağı olan LysoPLD'den yoksun farelerde çeşitli vasküler defektler

gözlenmekle birlikte, LPA'i, VEGF, FGF, TGFbeta ve angiopietin gibi bir anjiogenik faktör olarak tanımlamak için erkendir (97).

Lizofosfatidik asit nöronal ve glial hücrelerde çarpıcı morfolojik etkiler göstermektedir. Nörit retraksiyonu gelişmesinde potent indükleyicidir (98). Serebral korteksin ex vivo LPA maruziyeti normalde fare beyinde bulunmayan girusa benzeyen katlanmaların oluşmasına yol açarken, LPA1/LPA2 double-null farelerde giruslar bulunmaz (99). Glioma kaynaklı hücre dizilerinde ve astrositlerde LPA stellasyon tersinmesine neden olur (100). İntratekal LPA uygulamasıyla nöropatik ağrının başlamasında LPA sinyalizasyonun rolü yakın zamanlarda gösterilmiştir. LPA uygulanması dorsal çıkıntılarda demiyelinizasyon eşliğinde ağrıya uzamış sensivite oluşturur. Uzun dönem etkileri LPA'in schwann hücrelerinin miyelinizasyonuna direkt etkisine dayandırılmaktadır (101).

Sağlıklı kadın bireylerde, ekstrasellüler LPA'nın ana kaynağı olan serum lysoPLD aktivitesi sağlıklı erkek bireylerden daha yüksek bulunmuştur. Sağlıklı gebelerde üçüncü trimesterde ve preterm eylem riski bulunan gebelerde serum lysoPLD düzeylerinin yükseldiği gösterilmiştir. Bu durum doğum indüksiyonunda rolü olabileceğini düşündürmektedir (80). Evre IV over karsinomlu olguların serum lysoPLD düzeyleri, sağlıklı kontrol grubundan ve erken evre over kanserli olgulardan daha yüksek bulunmuştur. Tüm bunlar lysoPLD ve ürünü olan LPA'nın kadın reproduktif biyolojisi ile ilişkisi olabileceğini düşündürmektedir (102).

2.3.6. Lizofosfatidik asit ve kanser ilişkisi

Kanserde LPA'in klinik önemi hala araştırılmakla birlikte, LPA sinyalizasyonunun kanserin progresyonunda protümörojenik bir rolü olduğunu gösteren bir çok çalışma bulunmaktadır. Kanser ve LPA ilişkisi, ilk olarak 1964 yılında LPA'in öncüsü olan lizofosfatidil kolin'in over kanseri hastalarının serumlarında anlamlı olarak yüksek bulunmasıyla araştırılmaya başlanmıştır. Daha sonra kanser hücreleri için motilite stimüle edici faktör olarak ATX'in tanımlanmasıyla bir sonraki adım atılmıştır. İlginç olarak, bu tanımlama sırasında ATX'in enzimatik fonksiyonu bilinmemekteydi. Bu süreçte LPA'in rolü, 2002

yılıda ATX'in LysoPLD aktivitesine sahip olduğunun tanımlanmasına kadar keşfedilememiştir (102).

Lizofosfatidik asidin *in vitro* olarak akciğer kanseri hücrelerinin invazivliğini artırdığının gözlenmesiyle, özellikle kanser agresifliğini artırdığı yönündeki araştırmalar başlamıştır. Bu zamandan beri over kanseri ve diğer jinekolojik kanserlerde LPA sinyalizasyonu vurgulanmıştır. Lizofosfatidik asitin over kanseri hücrelerinin proliferasyonunu artırdığı gösterilmiştir ve over kanseri aktive edici faktör olarak over kanserli hastaların malign asit sıvısında tanımlanmıştır (102).

Lizofosfatidik asit, *in vitro* olarak bir çok hücre tipinde hücrel migrasyonu stimüle eder. Fizyolojik ve patolojik koşullarda hücrel migrasyonda potansiyel rol oynar. Lizofosfatidik asit sinyalizasyonunun kanser hücre migrasyonundaki rolü ATX'in tanımlanmasıyla desteklenmiştir. Autotaxin, 'tumor cell motility stimulating factor' olarak melanoma hücre süpernatantından izole edilmiştir. Autotaxin'in lizofosfatidilkolini potent biyoaktif fosfolipid mediatör lizofosfatidik asite çeviren lizofosfolipaz D ile özdeş olduğu saptanmıştır. Autotaxin tarafından LPA'nın otokrin veya parakrin üretiminin artması tümör hücre motilitesine katkıda bulunur. Lizofosfatidik asit ve ATX, lizofosfatidik asit 1 reseptörü yoluyla hücre motilitesini stimüle eden aktivite gösterirler. Birçok kanser hücresinde ve fibroblastlarda Lizofosfatidik asidin indüklediği hücre migrasyonunda dört LPA reseptörü arasından LPA1 reseptörü önemli rol oynar. Lizofosfatidik asidin indüklediği migratuar cevap, LPA1 reseptörünün kantitatif RT-PCR ile ölçülen mRNA ekspresyonu ile paralellik gösterir. Lizofosfatidik asit 1 reseptörünün gene-targeting teknikle ya da reseptör selektif antagonistlerle inaktive edilmesi migratuar cevabın kaybıyla sonuçlanır. Bu hücrelerde ATX ile indüklenen migratuar cevap da kaybolmuştur (103).

Autotaxin ekspresyonu küçük hücreli dışı akciğer kanseri (NSCLC), meme kanseri, renal hücreli kanser, hepatoselüler karsinom ve tiroid karsinomu gibi çeşitli kanserlerde gösterilmiştir. Lizofosfatidik asit reseptörlerinin normal olmayan ekspresyonu over, kolorektal, prostat ve gastrik kanser gibi çeşitli insan malignansilerinde gösterilmiştir. Lizofosfatidik asit sinyalizasyonu ve tümör progresyonu arasındaki ilişki fare modellerinde görülmüştür (104).

İnvaziv GBM (glioblastoma multiforme) hücrelerinde ATX'in up regüle olduğu gözlenmiştir. Bu durum LPA1 reseptörü üzerinden rac aktivasyonu ile glioma invazyon ve motilitesinin artışına neden olmaktadır (105).

B-hücre neoplazilerinde, özellikle de foliküler lenfomada, serum ATX antijen düzeyleri sağlıklı kontrolden yüksek bulunmuştur. Ayrıca foliküler lenfomada serum ATX antijen düzeyleri ile tümör yükü ve klinik seyir paralellik göstermektedir (106).

Çeşitli meme kanseri hücre dizilerinde, autotaxin ekspresyonu ile meme kanser hücrelerinin agresifliği arasında ilişki gözlenmiştir. Bu bilgi, autotaxin ekspresyonunun normal epitelin tümörojenik potansiyeliyle veya kanser hücrelerinin agresifliği ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir (107).

MDA-MB-231 meme karsinoma hücrelerinde, LPA1 reseptörünün indüklenebilir overekspresyonu subkutanöz xenograft gelişimini artırır ve osteolitik kemik metastazını ilerletirken, LPA1 reseptörünün bulunmayışı ya da farmakolojik inhibisyonu metastaz progresyonunu anlamlı olarak azaltmaktadır (108).

Meme kanseri hücrelerinin başlıca LPA1 ve LPA2 reseptörlerini eksprese ettiği ve ATX aktivitesi ile oluşan LPA'in bu reseptörler üzerinden etki ederek migrasyonu stimüle edici etkisini oluşturduğu gösterilmiştir. Bu reseptörlerin blokajı ile ya da ATX aktivitesinin veya üretiminin inhibisyonu ile hücre migrasyonunun bloke edilebileceği gösterilmiştir (109). Ayrıca, LPA'nin meme kanseri tedavisinde kullanılan taxol'u bağlandığı yerden uzaklaştırarak, taxolun oluşturduğu mitotik arestten hücreleri kurtardığı ve böylece kemorezistansa yol açtığı gösterilmiştir (110).

3. GEREÇLER VE YÖNTEMLER

3.1. GEREÇLER

3.1.1. Grupların belirlenmesi

Bu çalışmada hasta ve kontrol grubu olmak üzere iki grup oluşturuldu.

1. Hasta Grubu: Hasta grubu Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Genel Cerrahi ve Tıbbi Onkoloji Kliniklerine 2009-2012 yılları arasında başvuran ve meme kanseri tanısı alan kadın hastalardan oluşturuldu. Hasta grubu da kendi içinde erken evre ve ileri evre olmak üzere iki gruba ayrıldı. Hem erken evre hasta grubu, hem de ileri evre hasta grubu yeni meme kanseri tanısı almış ve herhangi bir tedavi uygulanmamış kişilerden oluşturuldu.

1.1. Erken Evre Hasta Grubu: Erken evre hasta grubu memeye sınırlı hastalığı bulunan, klinik ve patolojik olarak lenf nodu metastazı olmayan meme kanseri hastalarından oluştu.

1.2. İleri Evre Hasta Grubu: İleri evre hasta grubu, hastalığı memeye sınırlı kalmayıp lenf nodu metastazı da bulunan hastalardan oluştu. Bu gruptaki hastaların lenf nodu metastazları olduğu patolojik olarak tespit edildi.

2. Kontrol Grubu: Kontrol grubu, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Plastik ve Rekonstrüktif Cerrahi Kliniğine 2009-2012 yılları arasında başvuran, herhangi bir sağlık problemi olmayan ve kozmetik nedenlerle meme küçültme operasyonu uygulanan kadınlardan oluştu. Kontrol grubundaki hastaların meme kanseri olmadığı patolojik olarak teyit edildi.

3.1.2. Örneklerin elde edilmesi

3.1.2.1. Kan örneklerinin alınması

Erken ve ileri evre hasta gruplarına ait kan örnekleri, yeni meme kanseri tanısı almış hastalardan, hastalar medikal ve cerrahi tedavilerini almadan önce alındı. Kontrol grubuna ait kan örnekleri de cerrahi müdahale uygulanmadan önce alındı. Kontrol ve hasta gruplarının kan örnekleri, 12 saat açlığı takiben antekubital venden enjektör yardımıyla sarı kapaklı jelli biyokimya tüplerine alındılar. Alınan kan örnekleri pıhtılaşmanın gerçekleşmesi için 30 dakika oda

ısısında bekletildi. Daha sonra tüm numuneler 4000 rpm’de 5 dakika santrifüj edildiler. Serumlar ayrılarak uygun tüplere küçük kısımlar halinde bölündüler ve deneyler yapılincaya kadar -80°C’de saklandılar.

3.1.2.2. Doku örneklerinin elde edilmesi

Genel Cerrahi ve Plastik ve Rekonstrüktif Cerrahi Birimlerinde ameliyat sırasında çıkarılan meme dokusu formalin ile fikse edildi. Formalin ile fikse edilmiş dokular, Patoloji laboratuvarında makroskopik değerlendirmeleri yapıldıktan sonra parafine gömüldüler. Parafine gömülü doku bloklarından 5 mikron kalınlığında kesitler alındı. Alınan kesitler hematoksilin-eozin (H-E) ile boyanarak ışık mikroskopunda değerlendirildi. Kontrol grubuna ait örneklerde malignite olmadığı patolojik olarak teyit edildi. Hasta gruplarına ait örneklerin patolojik değerlendirmesi yapıldı. Hasta gruplarının tümör tipleri ve evreleri patolojik olarak belirlendi. Dokular immünohistokimya deneyinde kullanılmak üzere çalışma tarihine kadar parafine gömülü olarak saklandılar.

3.2. Yöntemler

3.2.1. Kan örneklerinde ölçülen parametreler

3.2.1.1. Serumda biyokimyasal parametrelerin ölçülmesi

Glukoz heksokinaz yöntemi ile fotometrik olarak ölçüldü [Roche/Hitachi cobas 8000 cihazında, Roche Glucose HK Gen.3 kiti (Kat No: 05168791 190)].

BUN üreaz yöntemi ile fotometrik olarak ölçüldü [Roche/Hitachi cobas 8000 cihazında, Roche Urea/BUN kiti (Kat. No: 05171873 190)].

Kreatinin jaffe yöntemi ile kolorimetrik olarak ölçüldü [Roche/Hitachi cobas 8000 cihazında, Roche Creatinin Jaffe Gen.2 kiti (Kat No: 04810716 190)].

ALT [Roche Alanine Aminotransferase acc. to IFCC without pyridoxal phosphate activation kiti (Kat. No: 05850797 190)] ve AST [Roche Aspartate Aminotransferase acc. to IFCC without pyridoksal phosphate activation kiti (Kat. No: 05850819 190)] IFCC’nin önerilerine uygun olarak NADH yükseltgenmesi reaksiyonu ile spektrofotometrik olarak ölçüldü (Roche/Hitachi Cobas 8000 cihazında).

GGT kolorimetrik enzim testi ile ölçüldü [Roche/Hitachi cobas 8000 cihazında, Roche Gama Glutamyltransferase ver.2 kiti (Kat. No: 05168775 190)].

LDH, LDH varlığında NAD'den NADH oluşum reaksiyonu ile fotometrik olarak ölçüldü [Roche/Hitachi cobas 8000 cihazında, Roche Lactate Dehydrogenase acc. to IFCC ver.2 kiti (Kat. No: 05169330 190)].

Sodyum, potasyum ve klor ölçümü iyon seçici elektrod (ISE) yöntemi ile yapıldı (Roche/Hitachi cobas 8000 cihazında, Roche ISE indirect Na, K, Cl for Gen.2 kiti).

Kalsiyum, o-krezolftalein kompleks yöntemi ile fotometrik olarak ölçüldü [Roche/Hitachi cobas 8000 cihazında, Roche Calcium kiti (Kat. No: 20763128 322)].

Total kolesterol [Roche Kolesterol Gen.2 kiti (Kat No: 05168538 190)], HDL [Roche HDL-Kolesterol plus 3rd generation kiti (Kat. No: 05168805 190)], LDL [Roche LDL-Kolesterol plus 2nd generation kiti (Kat No: 05171369 190)], ve trigliserit [Roche Triglycerides kiti (Kat. No: 05171407 190)] Roche/Hitachi Cobas 8000 cihazında enzimatik kolorimetrik yöntemle ölçüldü. VLDL ise trigliserit/5 formülü ile hesaplandı.

CA 15-3 [Roche Cancer Antigen 15-3 kiti (Kat No: 03045838 122)] ve CEA [Roche carcinoembryonic antigen kiti (Kat. No: 04491777 190)] Roche/Hitachi E170 cihazında elektro kemilüminesans immün ölçüm yöntemiyle ölçüldü.

3.2.1.2. Tam kanda hematolojik parametrelerin ölçülmesi

Hemoglobin, hematokrit, lökosit, eritrosit ve trombosit Siemens Advia 2120i cihazında ölçüldü.

3.2.1.3. Serum autotaxin (ATX) düzeyinin ölçülmesi

Serum autotaxin düzeyinin ölçülmesi için Enzyme-linked Immunosorbent Assay Kit (Usen Life Science Inc., Katalog no: E92323Hu) kullanıldı. Bu kit insan serum, plazma ve biyolojik sıvılarında sandviç enzim immün ölçüm tekniği ile ATX'in kantitatif ölçümü için geliştirilmiştir.

Prensip

Kit ile temin edilen plate önceden ATX antikoruna ile kaplanmıştır. Standartlar ve numuneler kuyucuklara eklenir. Standart ve numunelerdeki ATX solid faza sabitlenmiş antikor ile bağlanır. Sonra biyotin konjuge-ATX poliklonal antikor eklenir. Biyotin konjuge-ATX poliklonal antikor, solid faza sabitlenmiş antikora bağlı olan ATX'in farklı bir epitopuna bağlanır ve sandviç oluşur. Sonra avidin konjuge horseradish peroksidaz (HRP) eklenir ve inkübe edilir. Biyotin konjuge-ATX poliklonal antikordaki biyotin ile avidin konjuge HRP'daki avidin bağlanır. Antikor-ATX-antikor kompleksi HRP enzimi ile işaretlenmiş olur. Sonra kuyucuklara TMB (tetra metil benzidin) substrat solüsyonu eklenir. Horseradish peroksidaz enzimi, TMB substratını oksitler. Reaksiyon sülfürik asit eklenmesiyle sonlandırılır. Renk değişikliği spektrofotometrik olarak 450 nm'de ölçülür. Numunelerin ATX konsantrasyonu standart grafiğinden hesaplanır.

Kit Komponentleri

1. 96 kuyucuklu önceden antikor ile kaplanmış plate
2. Plate bantı
3. Standart
4. Standart dilüenti
5. Deteksiyon reaktifi A
6. Deteksiyon reaktifi B
7. Ölçüm dilüenti A
8. Ölçüm dilüenti B
9. TMB substratı
10. Stop solüsyonu
11. Yıkama tamponu

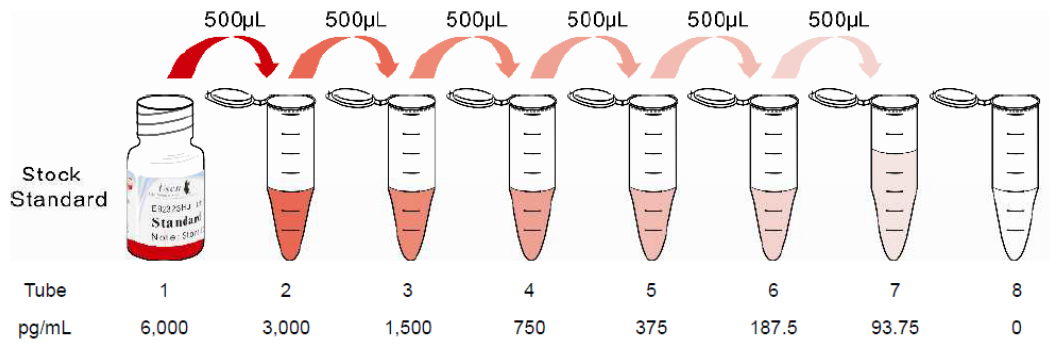
Ayırıklar

- a) 6 mL konsantre (2x) ölçüm dilüenti A, 6 mL distile su ile dilüe edildi ve 12 mL dilüent A hazırlandı.
- b) 6 mL konsantre (2x) ölçüm dilüenti B, 6 mL distile su ile dilüe edildi ve 12 mL dilüent B hazırlandı.

- c) Kullanmadan önce stok deteksiyon reaktifi A ve B santrifüj edildi. Stok deteksiyon reaktifi A ve B 1:100'lük çalışma konsantrasyonuna ölçüm dilüenti A ve B ile dilüe edildi.
- d) 600 mL 1x yıkama solüsyonu hazırlamak için, 20 mL konsantre yıkama solüsyonu (30x) 580 mL distile su ile dilüe edildi.

Standart Hazırlanması

Stok standart (6000 pg/mL) 1.0 mL standart dilüenti ile çözüldü, 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi ve yavaşça köpük oluşturmadan karıştırıldı. Çalışma standartlarını hazırlamak için 0.5 mL standart dilüenti içeren 6 tane tüp hazırlandı. Standart solüsyonu kullanılarak Şekil 3.1.'e göre uygun dilüsyonlar yapılarak çalışma standartları (3000 pg/mL, 1500 pg/mL, 750 pg/mL, 375 pg/mL, 187.5 pg/mL ve 93.75 pg/mL) hazırlandı. Hazırlanan çalışma standartları (3000 pg/mL, 1500 pg/mL, 750 pg/mL, 375 pg/mL, 187.5 pg/mL ve 93.75 pg/mL) kullanılarak yöntem (sayfa 54) kısmında belirtildiği gibi çalışıldı ve standart grafiği çizildi.



Şekil 3.1. Autotaxin (ATX) standartlarının hazırlanması.

Numune Hazırlanması

Serum numuneleri 0.02 mol/L PBS (pH: 7.0-7.2) ile 4000 kat dilüe edildi.

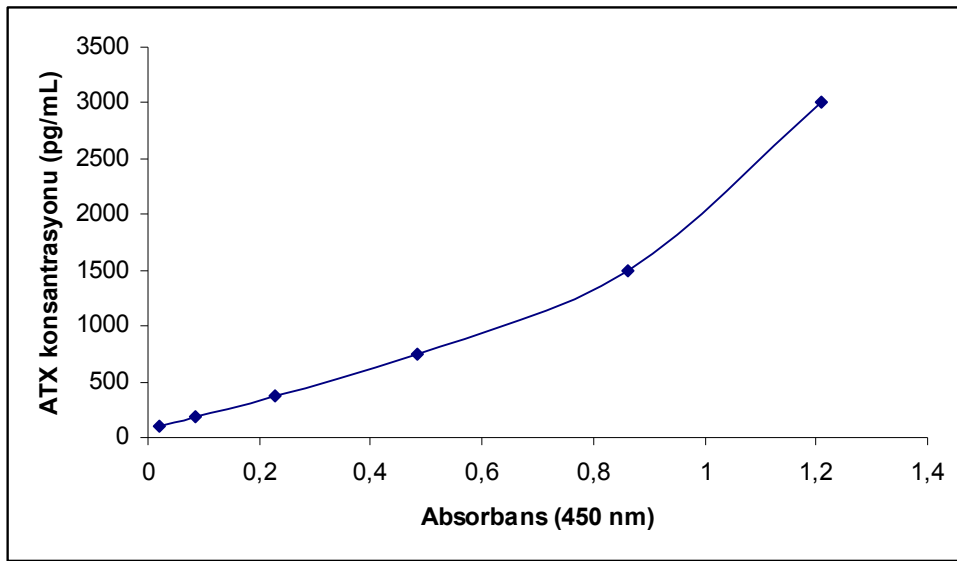
Yöntem

1. Standartlar, kör ve numuneler için kuyucuklar belirlendi. Kuyucuklara 100'er µL standart, kör ve numune eklendi. Bantla kapatıldı. 37°C'de 2 saat inkübe edildi.
2. Kuyucuklardaki sıvılar uzaklaştırıldı.

3. Kuyucuklara 100 µL deteksiyon reaktifi A eklendi. Bantla kapatıldı ve 1 saat 37°C’de inkübe edildi.
4. Kuyucuklardaki solüsyon aspire edildi ve kuyucuklar 350 µL 1x yıkama solüsyonu ile 3 kez yıkandı. Plate ters çevrilip kurutma kağıdında kurutuldu.
5. Kuyucuklara 100 µL deteksiyon reaktifi B eklendi. Bant ile kapatıldı. 30 dakika 37°C’de inkübe edildi.
6. 350 µL 1x yıkama solüsyonu ile 5 kez yıkandı.
7. Her kuyucuğa 90 µL substrat solüsyonu eklendi. Bant ile kapatıldı. 20 dakika karanlıkta 37°C’de inkübe edildi.
8. Her bir kuyucuğa 50 µL stop solüsyonu eklendi ve karıştırıldı. Plate’ten su damlacıkları ve parmak izleri temizlendi. Hava kabarcıkları uzaklaştırıldı. Hemen 450 nm’de okuma yapıldı.

Hesaplama

GraphPad Prism 5 programı kullanılarak Y eksenine ATX konsantrasyonu, X eksenine absorbans değerleri yazılarak standart grafiği (Şekil 3.2.) çizildi. Standart grafiğinden yararlanılarak numunelerin ATX konsantrasyonları hesaplandı. Numuneler dilüe edildiği için, standart grafiğinden elde edilen ATX konsantrasyonları dilüsyon faktörü ile çarpıldı.



Şekil 3.2. Autotaxin (ATX) standart grafiği.

3.2.1.4. Serum lizofosfatidik asit (LPA) düzeyinin ölçülmesi

Serum LPA düzeyinin ölçülmesinde Lysophosphatidic Acid Assay Kit II (Echelon Biosciences Inc. Katolog no: K-2800S) kullanıldı. Bu kit 96 kuyucuklu platede yarışmalı ELISA yöntemini kullanarak serum LPA miktarının tayini için tasarlanmış bir kittir.

Prensip

Kit ile temin edilen plate önceden anti-LPA antikoru ile kaplanmıştır. Numuneler dilüe edildikten sonra biyotinli anti-LPA antikoru ile kombinlenir. Numune-antikor karışımı kuyucuklara pipetlenir ve inkübe edilir. Antikor-LPA-biyotinli antikor kompleksi oluşur. Sonra streptavidin HRP konjugatı eklenir ve inkübe edilir. Biyotinli antikor HRP enzimi ile bağlanır ve işaretlenir. Substrat solüsyonu eklenir. Horseradish peroksidaz substratı oksitler ve renk değişikliği gözlenir. Reaksiyon stop solüsyonu ile durdurulur ve 450 nm'de absorbans okuması yapılır. Lizofosfatidik asit standart grafiği oluşturulur. Numunelerin LPA konsantrasyonu grafik yardımıyla hesaplanır.

Kit Komponentleri

1. Biotinli Anti-LPA antikoru
2. Lizofosfatidik asit standardı
3. Lizofosfatidik asit deteksiyon plate'i
4. Streptavidin HRP
5. Sample diluent
6. 10X PBS-T tampon
7. TMB substrat
8. Sülfürik asit
9. Microtiter plate bantı

Ayırıcılar

1. 10X PBS-T tamponunu (20mL) 180 mL deiyonize su ile dilüe ederek PBST (yıkama tamponu ve Streptavidin-HRP dilüenti) hazırlandı.
2. Biotinli Anti-LPA Antikoru şişesine 7 mL PBST eklenerek çalışma konsantrasyonunda biyotinli anti-LPA antikoru hazırlandı.
3. 60 µL streptavidin HRP 12 mL PBST ile dilüe edildi ve çalışma konsantrasyonunda (1:200 dilüsyon) streptavidin HRP hazırlandı.

Standart Hazırlanması

1000 μM LPA stok standart solüsyonunu hazırlamak için, LPA stok standardı 50 μL PBST ile çözüldü, vortexlendi ve 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Hazırlanan 1000 μM LPA stok standart solüsyonu kullanılarak 200 μM , 40 μM , 8 μM , 1.6 μM , 0.32 μM ve 0.064 μM 'lık LPA çalışma standartları hazırlandı.

200 μM çalışma standardını hazırlamak için, 20 μL stok standardı alınıp üzerine 80 μL PBST eklendi ve karıştırıldı.

40 μM çalışma standardını hazırlamak için, 20 μL 200 μM LPA standardı alınıp üzerine 80 μL PBST eklendi ve karıştırıldı.

8 μM çalışma standardını hazırlamak için, 20 μL 40 μM LPA standardı alınıp üzerine 80 μL PBST eklendi ve karıştırıldı.

1.6 μM çalışma standardını hazırlamak için, 20 μL 8 μM LPA standardı alınıp üzerine 80 μL PBST eklendi ve karıştırıldı.

0.32 μM çalışma standardını hazırlamak için, 20 μL 1.6 μM LPA standardı alınıp üzerine 80 μL PBST eklendi ve karıştırıldı.

0.064 μM çalışma standardını hazırlamak için, 20 μL 0.32 μM LPA standardı alınıp üzerine 80 μL PBST eklendi ve karıştırıldı.

Yöntem

1. 1.5 mL polipropilen tüpler kullanılarak LPA standartları ve numuneler daha önce hazırlanan biotinli anti-LPA antikoruyla kombinlendi ve sample diluent ile dilüe edildiler:

- a. Her bir tüpe 135 μL anti-LPA antibody koyuldu. Negatif kontrol için 135 μL 1X PBST koyuldu.
- b. Tüplere 15 μL LPA standartları ve numuneler koyuldu. Pozitif ve negatif kontroller için 15 μL 1X PBST koyuldu.
- c. Her bir tüpe 150 μL sample diluent eklendi. Numuneler arasındaki çapraz kontaminasyonu engellemek için pipet ucunun numunelerle temas ettirilmemesine dikkat edildi.
- d. Her tüp 1-2 saniye vortexlenerek karıştırıldı.

2. LPA Deteksiyon Plate (K-2807S) plastik torbasından çıkarıldı. Standartlar, kontroller ve numuneler LPA deteksiyon plate'e 100'er μL transfer edildiler. Plate bant ile kapatılarak oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi.

3. İnkübasyondan sonra standartlar, kontroller ve numuneler plate'den uzaklaştırıldı. Kuyucuklar 200 μL 1X PBST ile üç kez yıkandı. Bir sonraki basamağa geçmeden önce yıkama tamponunun tümü uzaklaştırıldı.

4. Plate'teki her bir kuyucuğa 100 μL streptavidin HRP eklendi. Plate bant ile kapatıldı ve oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi.

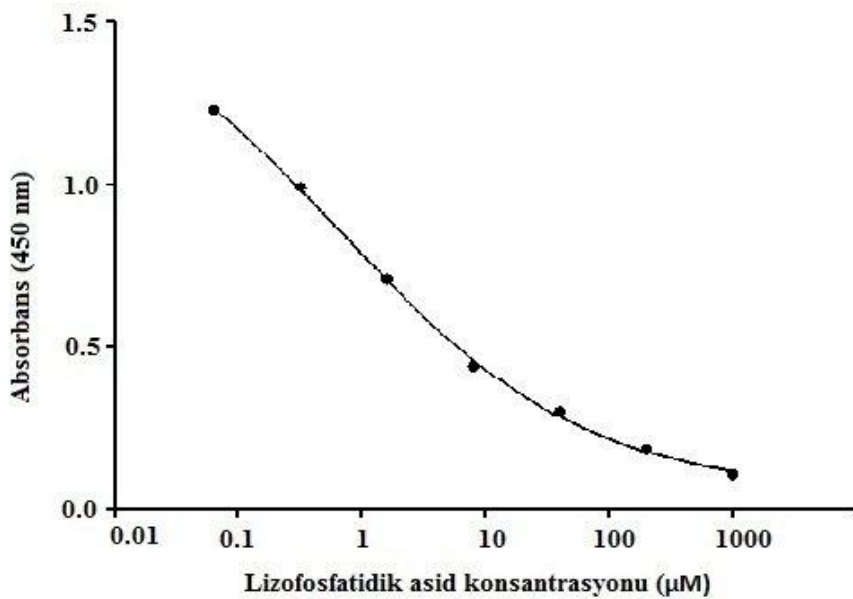
5. İnkübasyondan sonra streptavidin HRP solüsyonu plate'den uzaklaştırıldı. Her kuyucuk 200 μL 1X PBST ile 3 kez yıkandı.

6. Her kuyucuğa 100 μL TMB substrat eklendi. Plate'in üzeri kapatılmadan karanlıkta oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi.

7. Reaksiyonu durdurmak için kuyucuklara 50 μL H_2SO_4 eklendi. Absorbans okumaları 450 nm'de yapıldı.

Hesaplama

LPA standart grafiği (Şekil 3.3.) GraphPad Prism 5 programı ile non-lineer regresyon analizi uygulanarak log-log formatında X ekseninde LPA konsantrasyonu, Y ekseninde absorbans olacak şekilde çizildi. Standart grafiğinden yararlanılarak numunelerin absorbans değerlerinden konsantrasyonları hesaplandı.



Şekil 3.3. Lizofosfatidik asit (LPA) standart grafiği.

3.2.2. Dokuda yapılan deneyler

3.2.2.1. Dokuların patolojik değerlendirmesi

Parafin bloklardan 5 mikron kalınlıkta alınan kesitler deparafinizasyon ve hidrasyon işlemleri sonrası hematoksilin-eozin (HE) ile boyandı. Kesitler ışık mikroskopunda incelenerek WHO'nun 2003 yılında önerdiği sisteme göre patolojik sınıflandırma yapıldı (111).

Histolojik gradeleme modifiye Bloom-Richardson sistemine göre yapıldı (112). Bu gradeleme sisteminde tümör hücrelerinin nükleer özellikleri, oluşturdukları tubulus yapılarının oranı ve mitoz sayısı ayrı ayrı skorlanarak elde edilen toplam skora göre grade belirlenmektedir

Çizelge 3.1. Meme kanserinin modifiye Bloom-Richardson sistemine göre histolojik gradelemesi (112).

Tübül formasyonu 1 puan 2 puan 3 puan	Tümörün %75'inde fazlasında tübül formasyonu Tümörde %10-75 arasında tübül formasyonu Tümörün %10'dan azında tübül formasyonu
Nükleer pleomorfizm 1 puan 2 puan 3 puan	Küçük, regüler uniform hücreler Orta derecede boyut artışı ve değişkenlik Belirgin değişkenlik
Mitoz sayısı 1 puan 2 puan 3 puan	0-5 mitoz / 10 BBA 6-10 mitoz / 10 BBA >11 mitoz / 10 BBA
Grade I II III	3,4,5 puan 6,7 puan 8,9 puan

(BBA: Büyük büyütme alanı)

(Grade 1: iyi diferensiyasyon, grade 2: orta diferensiyasyon, grade 3: kötü diferensiyasyon)

Östrojen reseptörü, progesteron reseptörü ve c-erb B2'nin immünohistokimyasal boyamaları için erken evre ve ileri evre gruplarındaki hastaların dokularından birer parafin blok seçildi. Seçilen parafin bloklardan lizini lam üzerine 4-5 mikron kalınlığında kesitler alındı. Östrojen reseptörü için Monoklonal Rabbit Anti-human Estrogen Receptor α (Dako, Kat. No: M3643, dilüsyon: 1/10), progesteron reseptörü için Mouse Monoklonal Antibody Progesterone Receptor (Novocastra, Kat. No: NCL-L-PGR-312, dilüsyon: 1/200) ve c-erb B2 için Rabbit Anti-human c-erb B2 Monoklonal antibody (Spring Bioscience, Kat. No: M3039, dilüsyon: 1/100) antikoları kullanıldı. İmmünohistokimyasal boyama işlemi Ventana BenchMark XT otomatik immünohistokimya cihazında yapıldı. Östrojen reseptörü ve progesteron reseptörü için nükleer boyanma, CerbB-2 için membranöz boyanma paternleri dikkate alındı. Değerlendirmede östrojen reseptörü ve progesteron reseptörü için boyanması %1'den az olanlar negatif, %1'den fazla olanlar pozitif olarak değerlendirildi. c-erb B2 için tümör hücrelerinin en az %30'unda tüm sitoplazmik membranı çevreleyen uniform tarzda immün boyanma 3+ olarak değerlendirildi.

3.2.2.2. Lizofosfatidik asit reseptör 1 (EDG2) VE 2 (EDG4)'nin immünohistokimyasal analizi

Lizofosfatidik asit reseptör 1 (EDG2) ve 2 (EDG4)'nin immünohistokimyasal analizinde, LPA1 reseptörü için Rabbit Anti-EDG2/LPA1 Polyclonal Antibody-Unconjugated (Bioss inc., katalog no: bs-2880R) ve LPA2 reseptörü için Rabbit Anti-EDG4/LPA2 Polyclonal Antibody-Unconjugated (Bioss inc., Katalog no: bs-2881R) antikoları kullanıldı.

Her olgu için seçilen parafin bloğa aşağıda ayrıntıları ile anlatılan immünohistokimyasal boyama işlemi uygulandı.

1. Her bir olguya ait uygun parafin bloktan 5 mikronluk kesitler pozitif şarjlı lama alındı. Alınan kesitler 1 gece 50 °C de bekletildi.

2. İki seri ksilolde 10'ar dakika, %100 alkolde 5 dakika, %85'lik alkolde 5 dakika ve %75'lik alkolde 5 dakika bekletilerek deparafinizasyon işlemi yapıldı.
3. Kesitler, distile suda yıkandı.
4. Kesitler, 90°'ye kadar ısıtılmış uygun antijen retrieval solüsyonda önce 20 dakika sonra iki defa 5'er dakika süre ile kaynatıldı.
5. Kesitler kaynatma işleminden sonra 30 dakika soğutulmaya bırakıldı.
6. Distile su ve PBS solüsyonunda yıkama yapıldı.
7. Hidrojen peroksit (H₂O₂) solüsyonunda 10 dakika bekletilerek endojen peroksit blokajı yapıldı.
8. Süre sonunda distile su ve PBS solüsyonu ile yıkama yapıldı.
9. Kullanılacak olan primer antikorlar uygun dilüsyon oranlarında dilüe edildi.
10. Uygun oranlarda dilüe edilen primer antikorlar, kesitler üzerine damlatıldı. Nemli ortamda 1 saat inkübasyon yapıldı.
11. Süre sonunda kesitler üzerine sekonder antitibi damlatıldı ve 10 dakika bekletildi.
12. Süre sonunda distile su ve PBS ile yıkama yapıldı.
13. Kesitler üzerine HRP (Streptavidin Peroksidaz) damlatılarak 10 dakika bekletildi.
14. Süre sonunda distile su ve PBS ile yıkama yapıldı
15. Kesitler üzerine diamin benzidine (DAB) solüsyonu damlatılarak 2 dakika bekletildi.
16. Süre sonunda distile su ve PBS ile yıkama yapıldı
17. Kesitler şale içine alınarak hematoksilen solüsyonunda 2 dakika bekletildi.
18. Süre sonunda çeşme suyunda yıkama yapıldı.
19. %80 alkolde 5 dakika, %96 alkolde 5 dakika, %100 alkolde 5 dakika ve iki seri ksilolde 5'er dakika bekletilerek dehidratasyon işlemi yapıldı.
20. Kesitler entellan ile kapatılarak ışık mikroskobunda analiz edilerek her bir antikoru skorlanması yapıldı.

3.3. İstatistiksel Analizler

Veri analizleri SPSS (Statistical Package for Social Sciences for Windows) 18.0 paket programı kullanılarak yapıldı. Kategorik değişkenler arası ilişkilerde beklenen değeri 5'den küçük olan 2x2 tablolarda Fisher'in Kesin Testi, diğer durumlarda Pearson ki-kare testi kullanıldı. Grupların ölçümleri arasındaki farklılıkların tespitinde kullanılacak istatistiksel testlerin seçiminde normallik testleri yapıldı. Örnek sayısı 50'den küçük olan grupların parametrelerinin normal dağılımı için Shapiro Wilks testi, 50 ve daha büyük örnek sayısına sahip grupların normallik testine Kolmogorov Smirnov testiyle bakıldı. Normal dağılıma uyan üç grubun ölçüm farkları ANOVA testi, ANOVA testi sonucu anlamlı çıkan durumlarda ikili karşılaştırmalarda post hoc testlerden Tukey testi kullanıldı. Üç gruptan en az biri normal dağılıma uymadığında Kruskal Wallis testi yapıldı. Anlamlı çıkan durumda ikili karşılaştırmalar için Mann Whitney U testi yapıldı. İkili karşılaştırmalarda Bonferroni düzeltmeli alfa değeri kullanıldı. Buna göre, alfa değeri ikili karşılaştırma sayısı olan 3'e bölündü ve 0,016 olarak alındı, p değeri bu değerle karşılaştırıldı. İki grup karşılaştırmalarında normal dağılıma uygun bulunan durumda student t testi, uygun bulunmadığı durumda Mann Whitney U testi kullanıldı. Ölçümler arasındaki korelasyonların analizinde Spearman testi yapıldı. Tanımlayıcı istatistikler kategorik değişkenler için sayısal değer ve yüzde, nümerik değişkenler için ortalama \pm SEM olarak verildi. p değerlerinin 0,05'den küçük olması istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

Bu çalışmada kontrol, erken evre ve ileri evre olmak üzere üç grup oluşturuldu. Kontrol grubunda 35, erken evre grubunda 56 ve ileri evre grubunda 52 kadın bulunmaktadır.

Kontrol grubunun yaş ortalaması 41.09 ± 1.97 yıl (ort \pm SEM), erken evre hasta grubunun yaş ortalaması 51.71 ± 1.48 yıl (ort \pm SEM) ve ileri evre hasta grubunun yaş ortalaması 51.60 ± 1.57 yıl (ort \pm SEM) olarak bulundu (Çizelge 4.1). Erken evre hasta grubunun yaş ortalaması kontrol grubunun yaş ortalamasından anlamlı olarak yüksek bulundu ($p < 0.0001$). İleri evre hasta grubunun yaş ortalaması kontrol grubunun yaş ortalamasından anlamlı olarak yüksek bulundu ($p < 0.0001$) (Çizelge 4.2).

Çalışmaya katılan kadınların boy ortalamaları kontrol grubunda 1.62 ± 0.01 m (ort \pm SEM), erken evre hasta grubunda 1.60 ± 0.01 m (ort \pm SEM) ve ileri evre hasta grubunda 1.60 ± 0.01 m (ort \pm SEM) olarak hesaplandı (Çizelge 4.1).

Çalışmaya katılan kadınların kilo ortalamaları kontrol grubunda 68.25 ± 3.08 kg (ort \pm SEM), erken evre hasta grubunda 75.98 ± 1.81 kg (ort \pm SEM) ve ileri evre hasta grubunda 74.38 ± 1.82 kg (ort \pm SEM) olarak hesaplandı (Çizelge 4.1).

Çalışmaya katılan kadınların vücut-kitle indeksleri (BMI) kontrol grubunda 25.89 ± 1.06 kg/m² (ort \pm SEM), erken evre hasta grubunda 29.46 ± 0.72 kg/m² (ort \pm SEM) ve ileri evre hasta grubunda 28.96 ± 0.71 kg/m² (ort \pm SEM) olarak hesaplandı (Çizelge 4.1). Erken evre hasta grubunun BMI'i kontrol grubundan anlamlı olarak yüksek bulundu ($p < 0.05$) (Çizelge 4.2).

Çalışmaya katılan kadınların reproduktif durumlarının değerlendirilmesinde kontrol grubundaki kadınların 27'sinin (%77.1) premenopozal, 8'inin (%22.9) postmenopozal dönemde olduğu belirlendi. Erken evre hasta grubundaki kadınların 28'inin (%50) premenopozal, 28'inin (%50) postmenopozal dönemde olduğu belirlendi. İleri evre hasta grubundaki kadınların 26'sının (%50) premenopozal ve 26'sının (%50) postmenopozal dönemde olduğu belirlendi (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. Kontrol, erken ve ileri evre meme kanseri hastalarının demografik verileri.

	Kontrol (n=35)	Erken Evre (n=56)	İleri Evre (n=52)
Yaş (yıl)			
Ort ± SEM	41.09 ± 1.97	51.71 ± 1.48	51.60 ± 1.57
Median (min-max)	41 (22-65)	52 (28-72)	52.5 (29-75)
Boy (m)	1.62 ± 0.01	1.60 ± 0.01	1.60 ± 0.01
Kilo (kg)	68.25 ± 3.08	75.98 ± 1.81	74.38 ± 1.82
BMI (kg/m²)	25.89 ± 1.06	29.46 ± 0.72	28.96 ± 0.71
Menopoz Durumu			
Premenopoz	27 (%77.1)	28 (%50)	26 (%50)
Postmenopoz	8 (%22.9)	28 (%50)	26 (%50)

(Değerler ort ± SEM olarak verilmiştir)

Çizelge 4.2. Kontrol, erken ve ileri evre meme kanseri hastalarının demografik verilerinin karşılaştırması.

	Erken - Kontrol	İleri - Kontrol	İleri - Erken
Yaş	0.000	0.000	0.99
BMI	0.038	0.91	0.87

(Bu çizelgedeki veriler p değerlerini göstermektedir.)

Çalışmaya katılan kadınların biyokimyasal parametreleri Çizelge 4.3’de gösterildi. Grupların biyokimyasal parametrelerinin karşılaştırması sonucunda glukoz, GGT ve kalsiyum değerleri anlamlı olarak farklı bulundu. Glukoz konsantrasyonları erken ($p<0.01$) ve ileri ($p<0.0001$) evre hasta gruplarında, kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu. GGT düzeyleri ileri evre hasta grubunda, kontrol ($p<0.05$) ve erken evre hasta ($p<0.05$) gruplarına göre anlamlı olarak yüksek bulundu. Kalsiyum düzeyleri erken ($p<0.01$) ve ileri ($p<0.01$) evre hasta gruplarında, kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu Diğer biyokimyasal parametrelerde gruplar arasında anlamlı farklılık

saptanmadı. Grupların biyokimyasal parametrelerine ilişkin p değerleri Çizelge 4.4’de gösterildi.

Çizelge 4.3. Kontrol, erken ve ileri evre meme kanseri hastalarının biyokimyasal parametreleri.

	Kontrol (n=35)	Erken Evre (n=56)	İleri Evre (n=52)
Glukoz (mg/dL)	92.68 ± 3.57	105.51 ± 3.27	112.92 ± 4.91
BUN (mg/dL)	11.93 ± 0.54	13.35 ± 0.71	12.51 ± 0.58
Kreatinin (mg/dL)	0.68 ± 0.02	0.72 ± 0.02	0.72 ± 0.02
ALT (U/L)	19.32 ± 1.74	20.27 ± 1.29	21.06 ± 1.49
AST (U/L)	20.00 ± 1.15	20.39 ± 0.71	21.60 ± 1.38
GGT (U/L)	18.00 ± 2.24	20.32 ± 1.62	27,00 ± 2.89
LDH (U/L)	395.20 ± 57.69	287.74 ± 17.07	278.79 ± 22.49
Na (mEq/L)	141.22 ± 0.37	142.13 ± 0.25	141.66 ± 0.34
K (mEq/L)	4.53 ± 0.06	4.65 ± 0.07	4.60 ± 0.05
Cl (mEq/L)	104.56 ± 0.53	104,08 ± 0.40	103.72 ± 0.48
Ca (mg/dL)	9.40 ± 0.12	9.81 ± 0.09	9.68 ± 0.06

(Değerler ort ± SEM olarak verilmiştir)

Çizelge 4.4. Kontrol, erken ve ileri evre meme kanseri hastalarının biyokimyasal verilerinin karşılaştırılması.

	Erken - Kontrol	İleri - Kontrol	İleri - Erken
Glukoz	0.001	0.000	0.234
GGT	0.349	0.015	0.028
Kalsiyum	0.008	0.009	0.374

(Bu çizelgedeki veriler p değerlerini göstermektedir.)

Çalışmaya katılan kadınların hematolojik parametreleri Çizelge 4.5’de gösterildi. Hematolojik parametreler incelendiğinde, gruplar arasında anlamlı farklılık olmadığı görüldü.

Çizelge 4.5. Kontrol, erken ve ileri evre meme kanseri hastalarının hematolojik parametreleri.

	Kontrol (n=35)	Erken Evre (n=56)	İleri Evre (n=52)
Hemoglobin (g/dL)	12.84 ± 0.23	12.51 ± 0.16	12.27 ± 0.17
Hematokrit (%)	38.25 ± 0.63	37.67 ± 0.49	37.40 ± 0.49
Lokosit (bin/mm ³)	8.38 ± 0.41	7.67 ± 0.29	7.25 ± 0.37
Eritrosit (milyon/mm ³)	4.56 ± 0.06	4.45 ± 0.05	4.4 ± 0.06
Trombosit (bin/mm ³)	279.46 ± 9.23	316.07 ± 12.93	327.31 ± 16.13

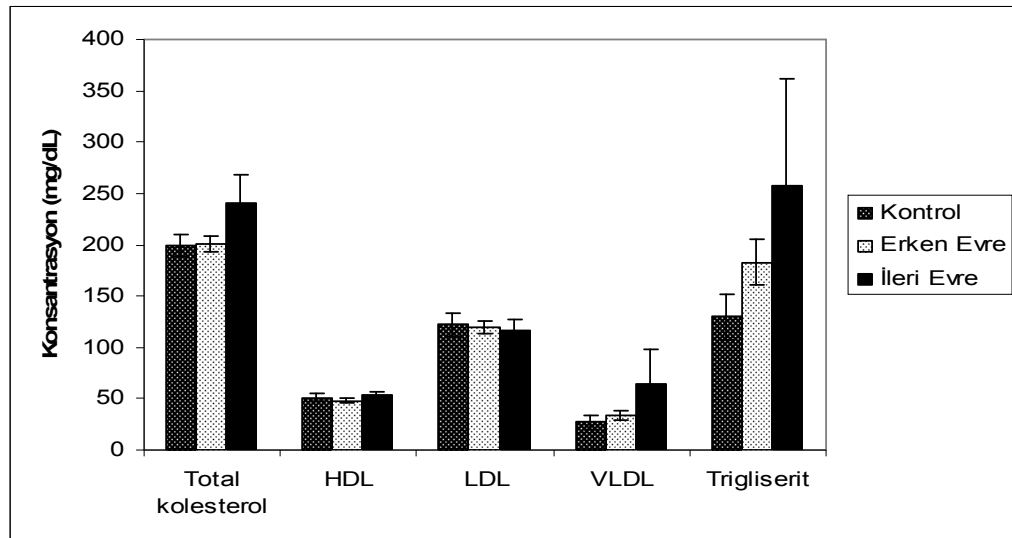
(Değerler ort ± SEM olarak verilmiştir)

Çalışmaya katılan kadınların lipit değerleri Çizelge 4.6 ve Şekil 4.1'de gösterildi. Grupların lipit profilleri arasında anlamlı farklılık saptanmadı.

Çizelge 4.6. Kontrol, erken ve ileri evre meme kanseri hastalarının lipit profilleri.

	Kontrol (n=35)	Erken Evre (n=56)	İleri Evre (n=52)
Total kolesterol (mg/dL)	199.20 ± 10.34	201.63 ± 7.49	240.00 ± 27.69
HDL (mg/dL)	51.00 ± 3.70	48.75 ± 2.62	53.00 ± 3.61
LDL (mg/dL)	122.45 ± 11.24	120.73 ± 5.93	117.88 ± 9.62
VLDL (mg/dL)	27.84 ± 7.25	34.27 ± 4.39	64.28 ± 34.61
Trigliserit (mg/dL)	130.38 ± 22.31	183.08 ± 22.39	258.76 ± 103.96

(Değerler ort ± SEM olarak verilmiştir)



Şekil 4.1. Kontrol, erken ve ileri evre meme kanseri hastalarının lipit değerleri.

Serum tümör belirteçlerinin ölçümü sadece hasta gruplarında yapıldı. Serum CEA düzeyi erken evre hasta grubunda 2.12 ± 0.27 ng/mL, ileri evre hasta grubunda 2.50 ± 0.34 ng/mL olarak bulundu. Serum CA 15-3 düzeyi ise erken evre hasta grubunda 21.00 ± 1.77 IU/mL ve ileri evre hasta grubunda 27.75 ± 2.83 IU/mL olarak bulundu. Serum tümör belirteçleri bakımından gruplar arasında anlamlı farklılık saptanmadı (Çizelge 4.7).

Çizelge 4.7. Erken evre ve ileri evre meme kanseri hastalarının serum tümör belirteçleri.

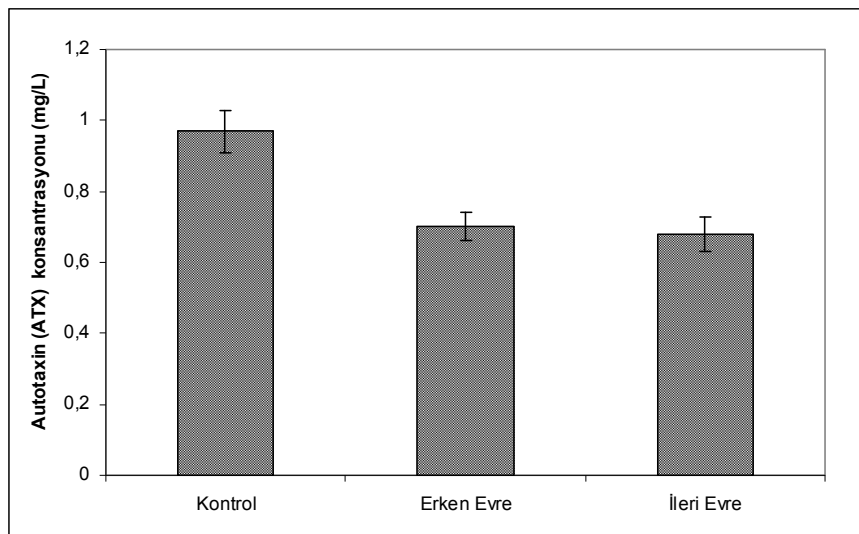
	Erken Evre	İleri Evre
CEA (ng/mL)	2.12 ± 0.27	2.50 ± 0.34
CA 15-3 (IU/mL)	21.00 ± 1.77	27.75 ± 2.83

(Değerler ort \pm SEM olarak verilmiştir.)

Serum ATX düzeyleri kontrol grubunda 0.97 ± 0.06 mg/L, erken evre hasta grubunda 0.70 ± 0.04 mg/L ve ileri evre hasta grubunda ise 0.68 ± 0.05 olarak bulundu (Çizelge 4.8) (Şekil 4.2).

Çizelge 4.8. Kontrol, erken ve ileri evre meme kanseri hastalarının autotaxin (ATX) değerleri.

	Kontrol (n=35)	Erken Evre (n=56)	İleri Evre (n=52)
ATX (mg/L)	0.97 ± 0.06	0.70 ± 0.04	0.68 ± 0.05



Şekil 4.2. Kontrol, erken ve ileri evre meme kanseri hastalarının autotaxin (ATX) konsantrasyonları.

Gruplar arası ikili karşılaştırmada serum ATX düzeyi erken evre hasta grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük saptandı ($p<0.0001$). Serum ATX düzeyi ileri evre hasta grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük saptandı ($p<0.01$). Serum ATX düzeyi bakımından erken ve ileri evre hasta grupları arasında anlamlı farklılık bulunmadı ($p>0.05$) (Çizelge 4.9).

Çizelge 4.9. Kontrol, erken ve ileri evre meme kanseri hastalarının serum autotaxin (ATX) düzeylerinin ikili karşılaştırması.

	Erken - Kontrol	İleri - Kontrol	İleri - Erken
ATX	0.000	0.001	0.742

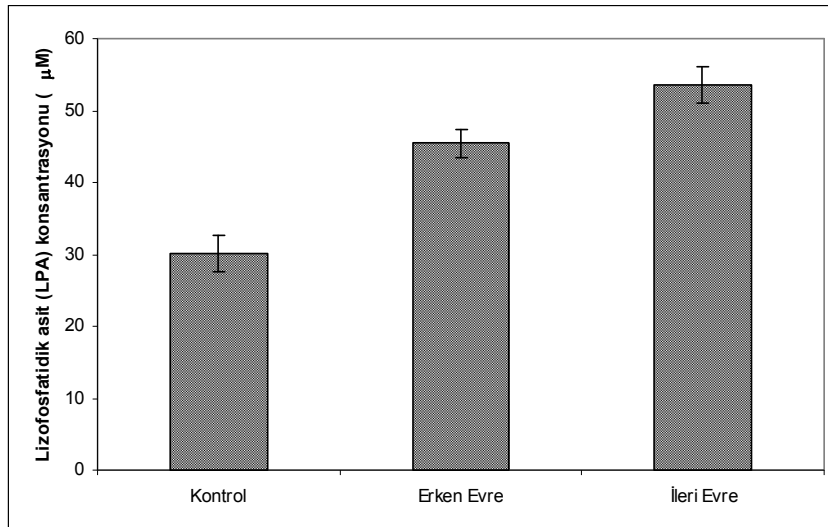
(Bu çizelgedeki veriler p değerlerini göstermektedir.)

Serum LPA düzeyleri kontrol grubunda $30.11 \pm 2.49 \mu\text{M}$, erken evre hasta grubunda $45.42 \pm 2.04 \mu\text{M}$ ve ileri evre hasta grubunda ise $53.58 \pm 2.49 \mu\text{M}$ olarak bulundu (Çizelge 4.10) (Şekil 4.3).

Çizelge 4.10. Kontrol, erken ve ileri evre meme kanseri hastalarının lizofosfatidik asit (LPA) değerleri.

	Kontrol (n=35)	Erken (n=56)	İleri Evre (n=52)
LPA (μM)	30.11 ± 2.49	45.42 ± 2.04	53.58 ± 2.49

(Değerler ort \pm SEM olarak verilmiştir)



Şekil 4.3. Kontrol, erken ve ileri evre meme kanseri hastalarının lizofosfatidik asit (LPA) konsantrasyonları.

Serum LPA düzeyi erken evre hasta grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek saptandı ($p<0.0001$). Serum LPA düzeyi ileri evre hasta grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek saptandı ($p<0.0001$). Serum LPA düzeyi ileri evre hasta grubunda, erken evre hasta grubuna göre anlamlı olarak yüksek saptandı ($p<0.05$) (Çizelge 4.11).

Çizelge 4.11. Kontrol, erken ve ileri evre meme kanseri hastalarının serum lizofosfatidik asit (LPA) düzeylerinin ikili karşılaştırması.

	Erken - Kontrol	İleri - Kontrol	İleri - Erken
LPA	0.000	0.000	0.017

(Bu çizelgedeki veriler p değerlerini göstermektedir.)

Meme kanseri için bağımsız risk faktörleri olarak düşünülen ATX ve LPA için lojistik regresyon analizi yapıldı. Analiz sonucunda, kontrol grubundan hasta grubunu (erken ve ileri evre hasta grupları birleştirilerek oluşturulan grubu) ayırt etmede LPA'nın anlamlı ölçüde bağımsız bir risk faktörü olduğu bulundu [$p=0.000$, OR=1.098, CI %95 (1.048-1.149)]. Kontrol grubundan hasta grubunu ayırt etmede ATX anlamlı gibi görünse de güven aralığının geniş olması nedeniyle yeterli bulunmadı [$p=0.001$, OR=0.035, CI %95 (0.005-0.254)] (Çizelge 4.12).

Çizelge 4.12. Kontrol ve hasta grupları (erken + ileri evre) için yapılan lojistik regresyon analizi sonuçları.

	p	OR	CI %95
ATX	0.001	0.035	0.005 - 0.254
LPA	0.000	1.098	1.048 - 1.149

Autotaxin, erken ve ileri evre [$p=0.896$, OR=1.109, CI %95 (0.234 - 5.251)] hasta gruplarını ayırt etmede yeterli değilken, LPA'in erken ve ileri evre [$p=0.013$, OR=1.038, %95 CI (1.008-1.070)] hasta gruplarını ayırt edebileceği bulundu (Çizelge 4.13).

Çizelge 4.13. Erken ve ileri evre hasta grupları için yapılan lojistik regresyon analizi sonuçları.

	p	OR	CI %95
ATX	0.896	1.109	0.234 - 5.251
LPA	0.013	1.038	1.008 - 1.070

Kontrol ve erken evre hasta gruplarını ayırt etmede ATX [$p=0.003$, $OR=0.045$, $CI \%95 (0.006 - 0.345)$] ve LPA'nın [$p=0.002$, $OR=1.079$, $CI \%95 (1.029 - 1.132)$] erken evre için risk faktörü olabileceği bulundu (Çizelge 4.14).

Çizelge 4.14. Kontrol ve erken evre hasta grupları için yapılan lojistik regresyon analizi sonuçları.

	p	OR	CI %95
ATX	0.003	0.045	0.006 - 0.345
LPA	0.002	1.079	1.029 - 1.132

Kontrol ve ileri evre hasta gruplarını ayırt etmede ATX [$p=0.01$, $OR=0.030$, $CI \%95 (0.002 - 0.433)$] ve LPA'nın [$p=0.000$, $OR=1.104$, $CI \%95 (1.047 - 1.163)$] ileri evre için risk faktörü olabileceği bulundu (Çizelge 4.15).

Çizelge 4.15. Kontrol ve ileri evre hasta grupları için yapılan lojistik regresyon analizi sonuçları.

	p	OR	CI %95
ATX	0.01	0.030	0.002 - 0.433
LPA	0.000	1.104	1.047 - 1.163

Yapılan spearman korelasyon analizi sonucunda, kontrol grubunda serum LPA düzeyi ile kilo ($p=0.017$, $r=0.585$), GGT ($p=0.04$, $r=0.57$) ve kalsiyum düzeyleri ($p=0.003$, $r=0.747$) arasında ve serum ATX düzeyi ile LDH düzeyi ($p=0.037$, $r=0.90$) ve HDL kolesterol düzeyi ($p=0.037$, $r=0.90$) arasında pozitif korelasyon saptandı (Çizelge 4.16).

Erken ve ileri evre hasta grupları birleştirilerek oluşturulan hasta grubunda ise, serum LPA düzeyi ile HDL kolesterol düzeyi arasında ($p=0.04$, $r=0.343$) pozitif korelasyon saptandı. Serum ATX düzeyi ile kreatinin düzeyi ($p=0.03$,

r=0.303) ve eritrosit sayısı (p=0.018, r=0.238) arasında pozitif, ve ürik asit seviyesi (p=0.136, r= - 0.234) arasında negatif korelasyon saptandı (Çizelge 4.16).

İleri evre hasta grubunda LPA düzeyi ile VLDL kolesterol düzeyi (p=0.038, r=0.661) ve trigliserit düzeyi (p=0.006, r=0.624) arasında pozitif korelasyon saptandı (Çizelge 4.16).

Çizelge 4.16. Kontrol ve hasta gruplarında yapılan korelasyon analizi sonuçları.

	LPA	ATX
Kontrol grubu	Kilo (p=0.017, r=0.585) GGT (p=0.04, r=0.57) Kalsiyum (p=0.003, r=0.747)	LDH (p=0.037, r= 0.90) HDL (p=0.037, r= 0.90)
Erken + ileri evre hasta grubu	HDL (p=0.04, r=0.343)	Kreatinin (p=0.003, r= 0.303) Eritrosit (p=0.018, r= 0.238) Ürik asit (p=0.136, r= -0.234)
İleri evre hasta grubu	VLDL (p=0.038, r=0.661) Trigliserit (p=0.006, r=0.624)	-

Patolojik değerlendirme sonucunda erken evre ve ileri evre hasta gruplarındaki kadınların aldığı histopatolojik tanılar Çizelge 4.17’de gösterildi. Kontrol grubundaki kadınların patolojik değerlendirmelerinde tamamında (%100) benign meme dokusu ile uyumlu bulgular saptandı.

Çizelge 4.17. Erken ve ileri evre meme kanseri hasta gruplarının patolojik tanıları.

	Erken evre	İleri evre
İntraduktal karsinom	18	-
İnvaziv duktal karsinom	31	41
İnvaziv papiller karsinom	2	2
Berrak hücreli karsinom	2	4
İnvaziv lobüler karsinom	1	2
Bazal benzeri karsinom	1	1
Malign myoepitelyal karsinom	1	-
Apokrin karsinom	-	2
Toplam	56	52

Çalışmada yapılan tümör nod metastaz (TNM) evrelemesi sonucu erken evre grubunun %60.7'si (n=34) evre I, %33.9'u (n=19) evre IIA, %5.4'ü (n=3) evre IIB, ileri evre grubunun %15.4'ü (n=8) evre IIA, %40.4'ü (n=21) evre IIB, %30.8'i (n=16) evre IIIA, %1.9'u (n=1) evre IIIB ve %11.5'i (n=6) evre IIIC olarak saptandı (Çizelge 4.18).

Çalışmada yapılan patolojik gradeleme sonucu erken evre grubunun %21.4'ü (n=12) grade I, %42.8'i (n=24) grade II, %35.8'i (n= 20) grade III, ileri evre grubunun %9.6'sı (n=5) grade I, %55.8'i (n=29) grade II ve %34.6'sı (n=18) grade III olarak saptandı (Çizelge 4.18). Yapılan analizde erken ve ileri evre hasta gruplarında gradeler arasında anlamlı fark bulunamadı ($p=0.19$, $\chi^2=3.316$).

Tümör çaplarının patolojik değerlendirmesinde erken evre grubundaki hastaların %60.7'si (n=34) T1, %33.9'u (n=19) T2 ve %5.4'ü (n=3) T3, ileri evre hasta grubunun %26.9'u (n=14) T1, %61.6'sı (n=32) T2, %9.6'sı (n=5) T3 ve %1.9'u (n=1) T4 olarak saptandı (Çizelge 4.18). Yapılan analizde erken evre hasta grubunda daha çok T1 görülürken, ileri evre hasta grubunda daha çok T2 görüldüğü saptandı ($p=0.0008$, $\chi^2=11,208$).

Lenf nodu metastazının patolojik değerlendirmesi sonucunda erken evre hasta grubunun lenf nodu metastazı bulunmayan hastalardan oluştuğu görüldü. İleri evre hasta grubunda ise hastaların %59.6'sı (n=31) N1, %28.9'u (n=15) N2 ve %11.5'i (n=6) N3 olarak saptandı (Çizelge 4.18).

Erken evre ve ileri evre hasta grubunun patolojik değerlendirmelerinin analizi sonucunda, östrojen reseptörü erken evre hasta grubunun %80.3'ünde (n=45) pozitif, %19.7'sinde (n=11) negatif, ileri evre hasta grubunun %76.9'unda (n=40) pozitif, %23.1'inde (n=12) negatif olarak bulundu. Progesteron reseptörü erken evre hasta grubunun %69.6'sında (n=39) pozitif, %30.4'ünde (n=17) negatif, ileri evre hasta grubunun %65.4'ünde (n=34) pozitif, %34.6'sında (n=18) negatif olarak bulundu. c-erbB2'nin erken evre hasta grubunun %57.1'inde (n=32) pozitif, %42.9'unda (n=24) negatif, ileri evre hasta grubunun %61.5'inde (n=32) pozitif, %38.5'inde (n=20) negatif olduğu görüldü (Çizelge 4.18). yapılan analizde erken ve ileri evre hasta grupları arasında östrojen reseptörü ($p=0.66$, $\chi^2=0,19$), progesteron reseptörü ($p=0.64$, $\chi^2=0.223$) ve c-erb B2 ($p=0.64$, $\chi^2=0.216$) arasında anlamlı ilişki bulunamadı.

Çizelge 4.18. Erken ve ileri evre meme kanseri hastalarının patolojik değerlendirmesi.

	Erken Evre (n=56)	İleri Evre (n=52)
Evre		
I	34 (%60.7)	-
IIA	19 (%33.9)	8 (%15.4)
IIB	3 (%5.4)	21 (%40.4)
IIIA	-	16 (%30.8)
IIIB	-	1 (%1.9)
IIIC	-	6 (%11.5)
Grade		
I	12 (%21.4)	5 (%9.6)
II	24 (%42.8)	29 (%55.8)
III	20 (%35.8)	18 (%34.6)
Tümör Boyutu		
T1	34 (%60.7)	14 (%26.9)
T2	19 (%33.9)	32 (%61.6)
T3	3 (%5.4)	5 (%9.6)
T4	-	1 (%1.9)
Lenf Nodu		
N0	56 (%100)	-
N1	-	31 (%59.6)
N2	-	15 (%28.9)
N3	-	6 (%11.5)
Östrojen Reseptörü		
Pozitif	45 (%80.3)	40 (%76.9)
Negatif	11 (%19.7)	12 (%23.1)
Progesteron Reseptörü		
Pozitif	39 (%69.6)	34 (%65.4)
Negatif	17 (%30.4)	18 (%34.6)
c-erb B2 (HER 2/Neu)		
Pozitif	32 (%57.1)	32 (%61.5)
Negatif	24 (%42.9)	20 (%38.5)

Lizofosfatidik asit reseptörlerinin immünohistokimyasal analizi, parafine gömülü olarak yeterli miktarda doku numunesi bulunan kontrol grubundan 29, erken evre grubundan 47 ve ileri evre grubundan 42 hastaya uygulandı. Kontrol grubunda LPA1 reseptörü 29 kişinin (%100) tümünde 3+ boyanırken, LPA2 reseptörü 5 kişide (%17.2) 2+, 24 kişide (%82.8) 3+ boyandı. Erken evre grubunda LPA1 reseptörü 1 (%2.1) hastada 1+, 6 hastada (%12.8) 2+ ve 40 hastada (%85.1) 3+ boyanırken, LPA2 reseptörü 4 hastada (%8.5) 1+, 10 hastada (%21.3) 2+ ve 33 hastada (%70.2) 3+ boyandı. İleri evre grubunda LPA1

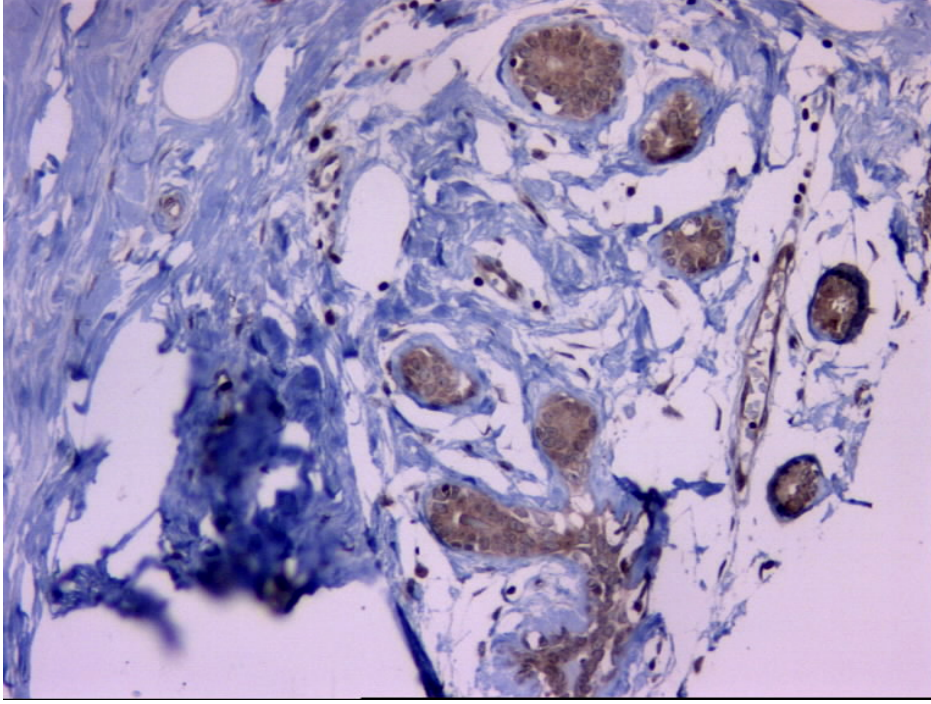
reseptörü 1 hastada (%2.4) 1+, 5 hastada (%11.9) 2+ ve 36 hastada (%85.7) 3+ boyanırken, LPA2 reseptörü 8 hastada (%19.1) 1+, 13 hastada (%30.9) 2+ ve 21 hastada (%50) 3+ boyandı (Çizelge 4.19).

Çizelge 4.19. Lizofosfatidik asit reseptör 1 (EDG2) ve 2 (EDG4)'nin immünohistokimyasal analizi sonuçları.

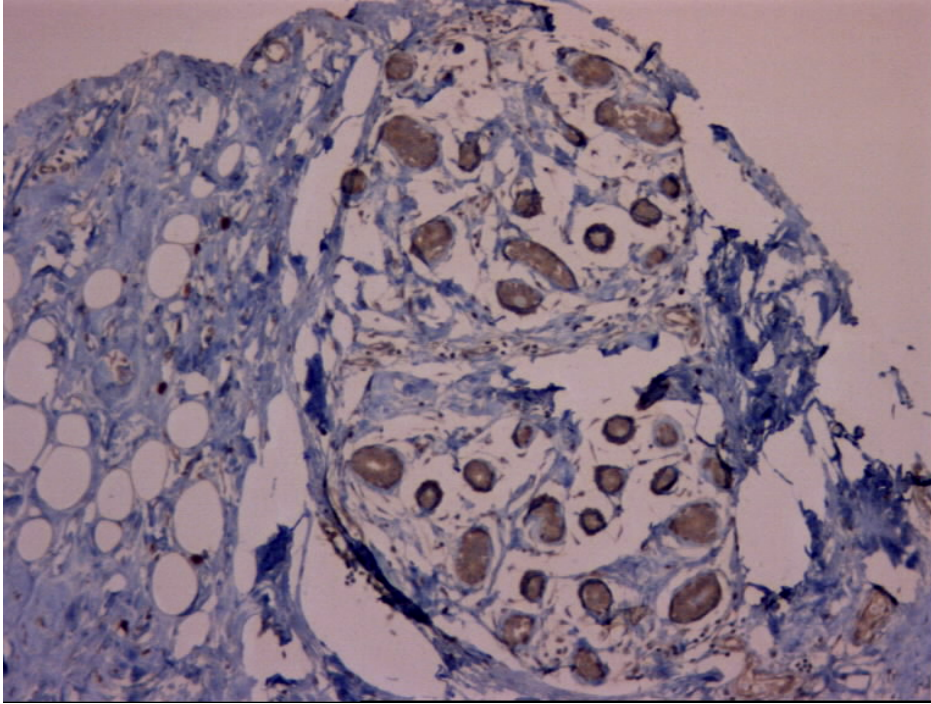
	Kontrol (n=29)	Erken Evre (n=47)	İleri Evre (n=42)
LPA1 reseptörü			
1+	-	1 (%2.1)	1 (%2.4)
2+	-	6 (%12.8)	5 (%11.9)
3+	29 (%100)	40 (%85.1)	36 (%85.7)
LPA2 reseptörü			
1+	-	4 (%8.5)	8 (%19.1)
2+	5 (%17.2)	10 (%21.3)	13 (%30.9)
3+	24 (%82.8)	33 (%70.2)	21 (%50)

Lizofosfatidik asit reseptörlerinin immünohistokimyasal analizinde LPA1 reseptörü kontrol grubunda 29 kişide (%100) +3, erken evre hasta grubunda 1 kişide (%2.1) +1, 6 kişide (%12.8) +2, 40 kişide (%85.1) +3 ve ileri evre hasta grubunda ise 1 kişide (%2.4) +1, 5 kişide (%11.9) +2, 36 kişide (%85.7) +3 şiddetinde boyandı. LPA2 reseptörü ise kontrol grubunda 5 kişide (%17.2) +2, 24 kişide (%82.8) +3, erken evre hasta grubunda 4 kişide (%8.5) +1, 10 kişide (%21.3) +2, 33 kişide (%70.2) +3 ve ileri evre hasta grubunda ise 8 kişide (%19.1) +1, 13 kişide (%30.9) +2, 21 kişide (%50) +3 şiddetinde boyandı (Çizelge 4.19).

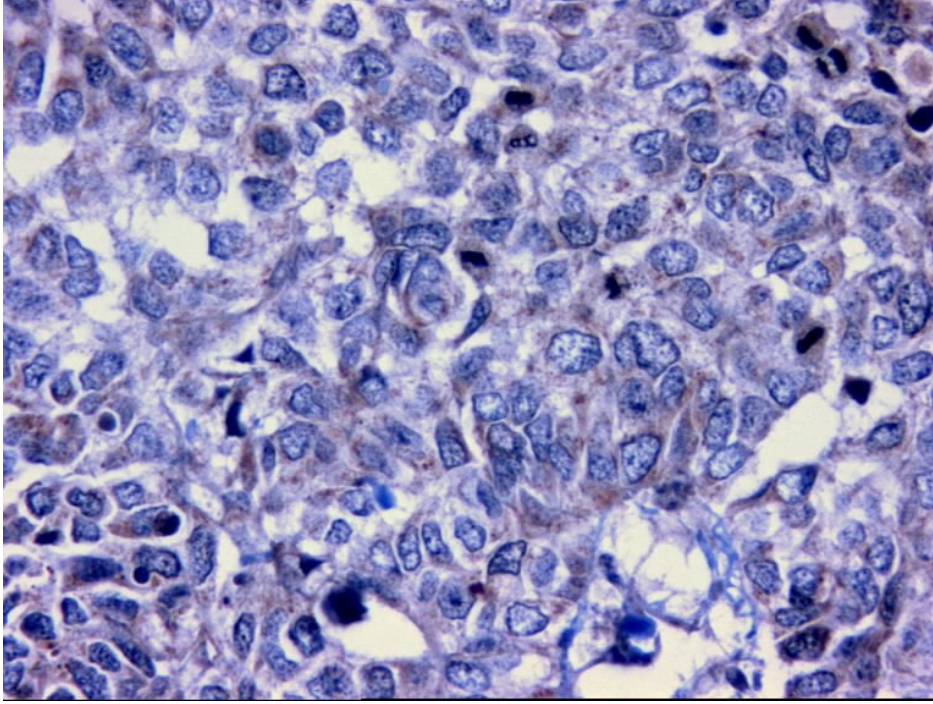
Yapılan analizde LPA1 reseptörünün immünohistokimyasal boyanma şiddetinde kontrol ve erken evre ve ileri evre hasta grupları birleştirilerek oluşturulan hasta grubu arasında anlamlı farklılık saptanmadı ($p=0.063$, $\chi^2=4.051$). İmmün-histokimyasal olarak LPA2 reseptörü kontrol grubunda daha çok 3+ şiddetinde boyanırken, erken evre ve ileri evre hasta grupları birleştirilerek oluşturulan hasta grubunda daha az 3+ şiddetinde ve daha çok 1+ şiddetinde boyandığı görüldü ($p=0.03$, $\chi^2=5.035$).



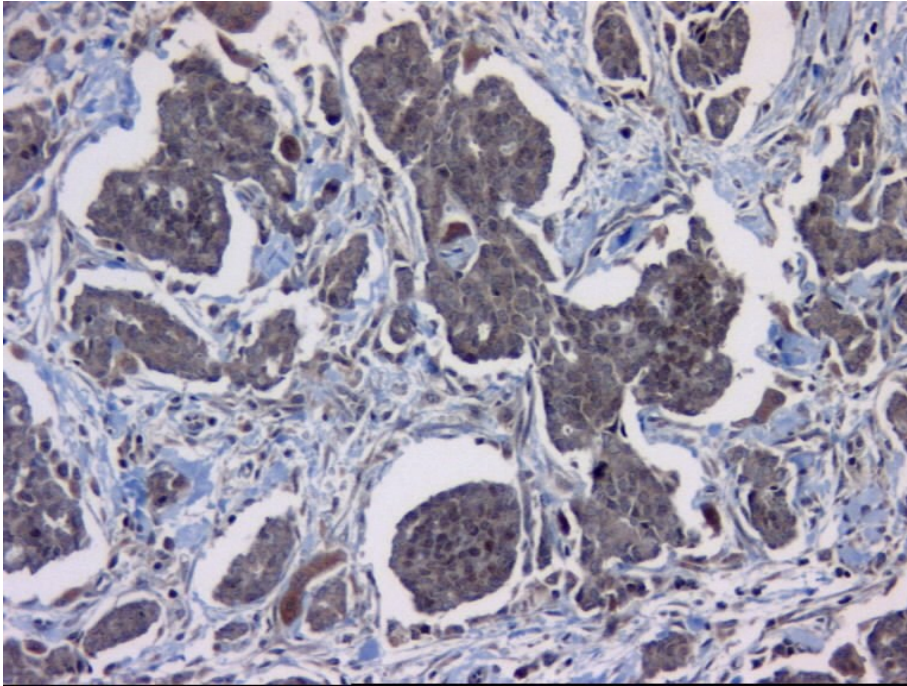
Şekil 4.4. Kontrol grubunda LPA1 reseptörünün immünohistokimyasal analizi, boyanma şiddeti +3, x200.



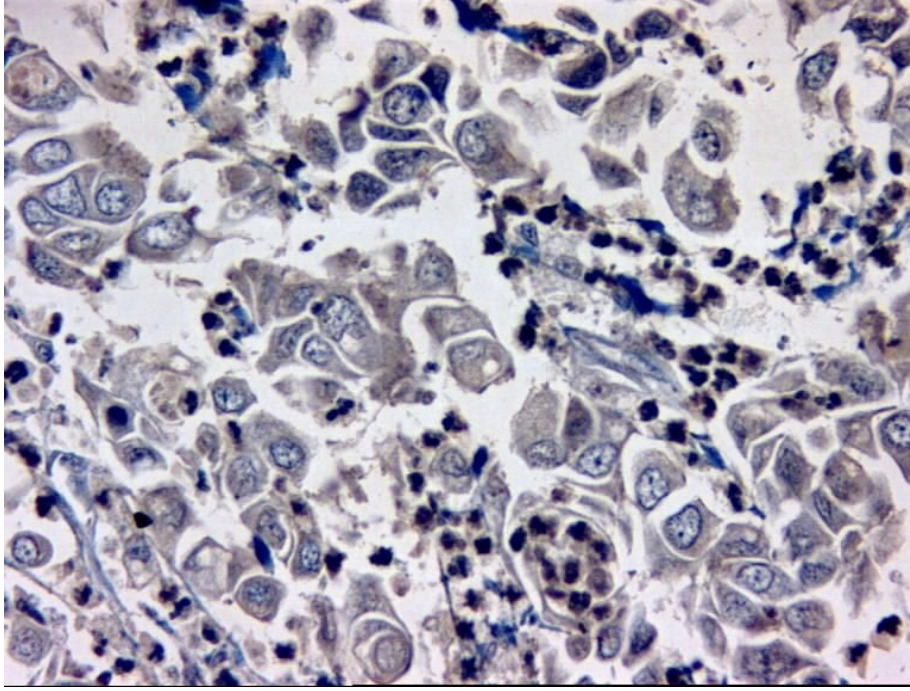
Şekil 4.5. Kontrol grubunda LPA2 reseptörünün immünohistokimyasal analizi, boyanma şiddeti +3, x100.



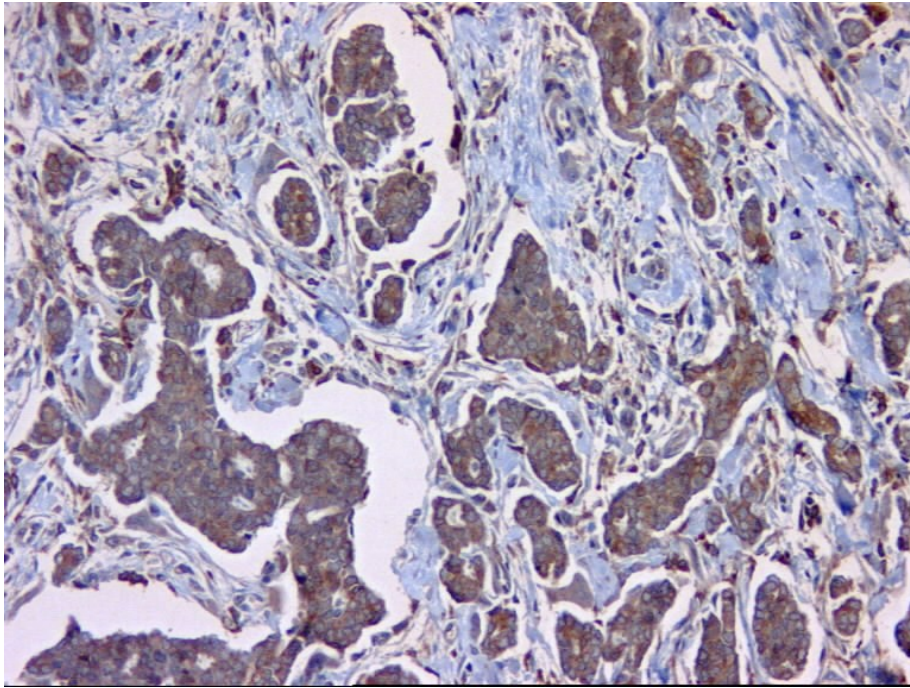
Şekil 4.6. Erken evre hasta grubunda LPA1 reseptörünün immünohistokimyasal analizi, boyanma şiddeti +1, x400.



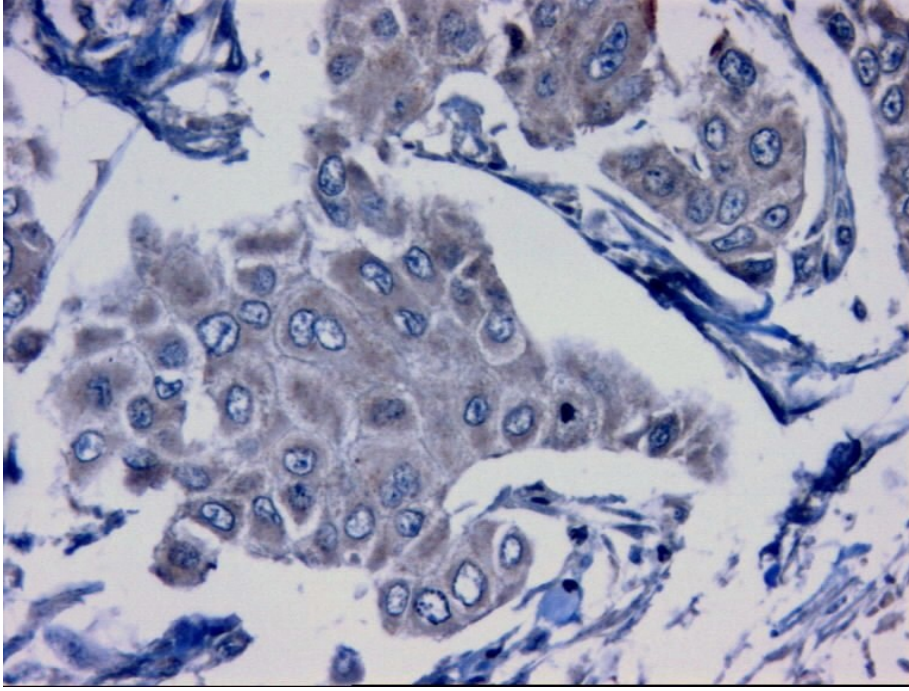
Şekil 4.7. Erken evre hasta grubunda LPA1 reseptörünün immünohistokimyasal analizi, boyanma şiddeti +3, x200.



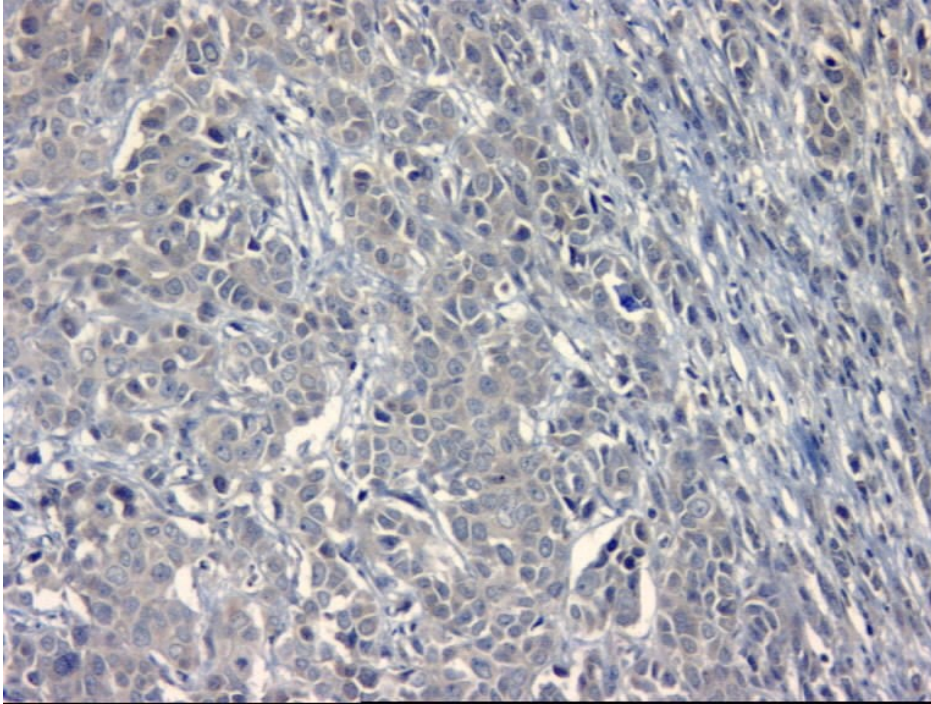
Şekil 4.8. Erken evre hasta grubunda LPA2 reseptörünün immünohistokimyasal analizi, boyanma şiddeti +1, x400.



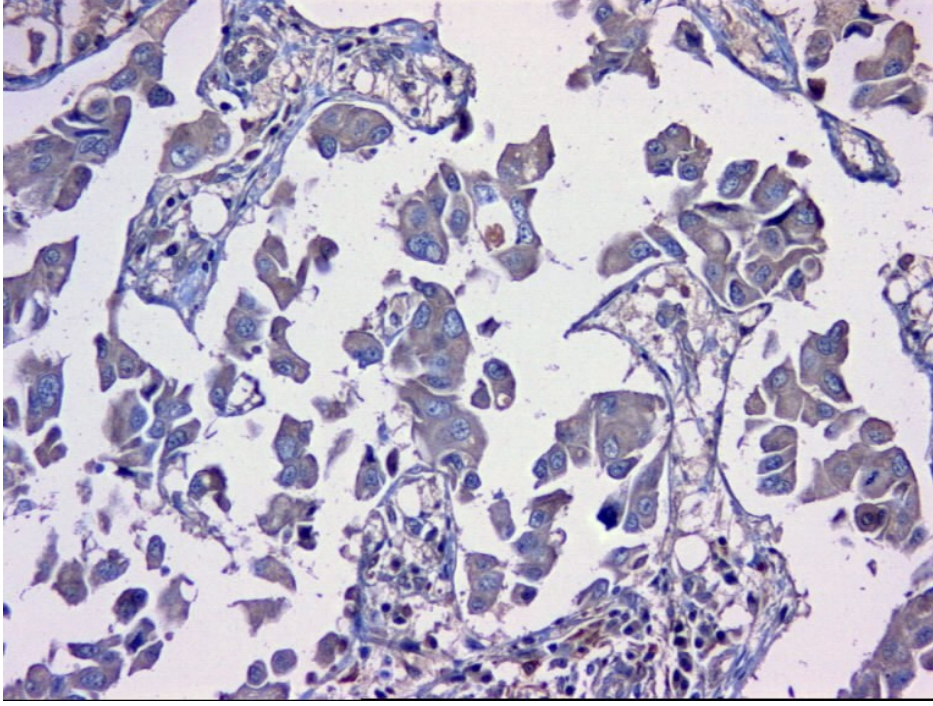
Şekil 4.9. Erken evre hasta grubunda LPA2 reseptörünün immünohistokimyasal analizi, boyanma şiddeti +3, x200.



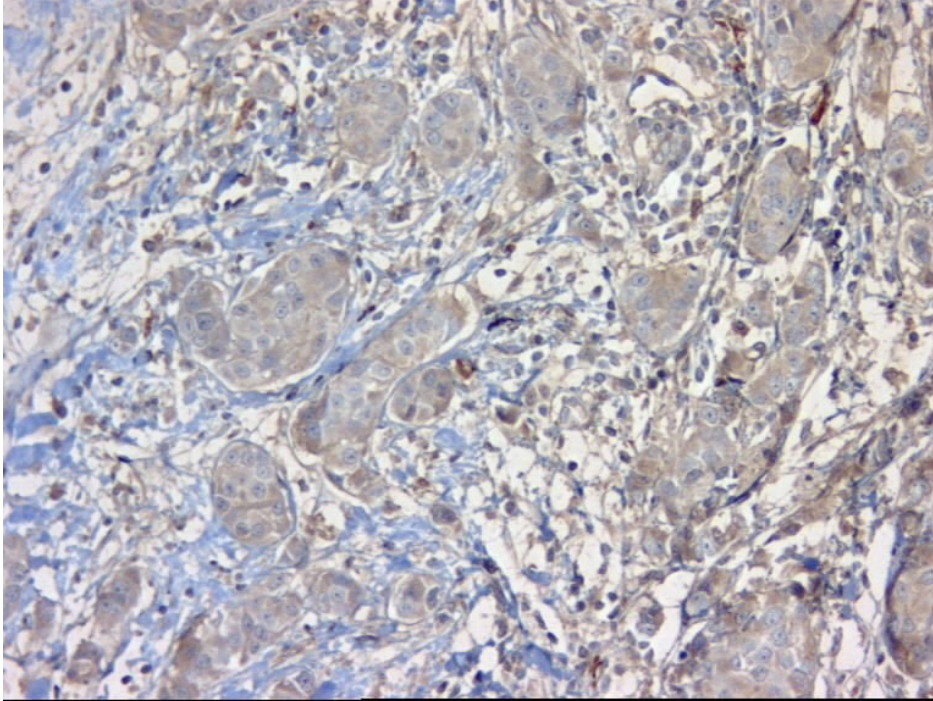
Şekil 4.10. İleri evre hasta grubunda LPA1 reseptörünün immünohistokimyasal analizi, boyanma şiddeti +1, x400.



Şekil 4.11. İleri evre hasta grubunda LPA1 reseptörünün immünohistokimyasal analizi, boyanma şiddeti +2, x200.



Şekil 4.12. İleri evre hasta grubunda LPA2 reseptörünün immünohistokimyasal analizi, boyanma şiddeti +1, x200.



Şekil 4.13. İleri evre hasta grubunda LPA2 reseptörünün immünohistokimyasal analizi, boyanma şiddeti +3, x200.

5. TARTIŞMA

Meme kanseri tüm dünyada kadınlarda en sık görülen kanserdir ve sıklığı her geçen yıl artmaktadır. Kadınlarda kanserden ölümlerin akciğer kanserinden sonraki ikinci en sık nedeni meme kanseridir (113). Gelişmiş ülkelerde meme kanserinin sıklığı giderek artmaktayken, meme kanserine bağlı ölüm oranı ise azalma eğilimindedir. Bu azalma eğiliminin, meme kanseri tarama çalışmaları ile erken tanı olanağının artmasına ve tedavide sağlanan gelişmelere bağlı olduğu düşünülmektedir (114).

Meme kanseri gelişme riskini artıran birçok faktör bulunmaktadır. Bunların başlıcaları ileri yaş, uzun süre endojen östrojen etkisine maruz kalma, önceden var olan proliferatif meme hastalığı ve aile öyküsüdür. Diyet, sigara, vücut ağırlığı ve fiziksel aktivite etyolojide rol oynadığı düşünülen diğer faktörlerdir. Menstrüel siklusun erken başlaması, geç menopoz, nulliparite, geç çocuk sahibi olma ve laktasyon dönemlerinin kısa sürmesi gibi durumlar östrojenik etki süresini artırdığı için meme kanseri gelişim riskini de artırmaktadır (115).

Amerika Birleşik Devletlerinde 2005-2009 yılları arasında hastaların meme kanseri tanısı alma median yaşı 61'dir. Aynı çalışmaya göre 2005-2009 yılları arasında 20 yaş altına meme kanseri tanısı koyulmazken, meme kanseri tanısı koyulan hastaların %1.8'i 20-34 yaş grubunda, %9.9'u 35-44 yaş grubunda, %22.5'i 45-54 yaş grubunda, %24.8'i 55-64 yaş grubunda, %20.2'si 65-74 yaş grubunda, %15.1'i 75-84 yaş grubunda ve %5.7'si 85 yaş ve üzerindedir (116). Bizim çalışmamızda ise medyan yaş kontrol grubunda 41, erken evre hasta grubunda 52 ve ileri evre hasta grubunda 52.5 olarak bulunmuştur. Erken ve ileri evre hasta gruplarının yaş ortalamaları, kontrol grubunun yaş ortalamasından anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Literatür ile uyumlu olarak ilerleyen yaş ile birlikte meme kanseri gelişme riskinin de arttığı saptanmıştır.

Lahmann ve arkadaşları (117) yaptıkları çalışmada premenopozal dönemdeki kadınlarda boy, kilo ve BMI ile meme kanseri gelişme riski arasında bir ilişki bulamazken, hormon kullanmayan postmenopozal dönemdeki kadınlarda boy ($p<0.001$), kilo ($p<0.0001$) ve BMI ($p=0.002$) artışı ile meme kanseri riskinin de arttığını saptamışlardır. Bizim çalışmamızda boy ve kilo ile meme kanseri

gelişme riski arasında bir ilişki bulunamazken, BMI kontrol grubunda $25.89 \pm 1.06 \text{ kg/m}^2$, erken evre hasta grubunda $29.46 \pm 0.72 \text{ kg/m}^2$ ve ileri evre hasta grubunda $28.96 \pm 0.71 \text{ kg/m}^2$ olarak hesaplanmıştır. Erken evre hasta grubunun BMI'yi kontrol grubundan anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p < 0.05$). Bu bulgu bize BMI artışı ile meme kanseri gelişme riski arasında pozitif bir ilişki olabileceğini düşündürmektedir. Lahmann ve arkadaşlarının (117) yaptıkları çalışmada, çalışmaya dahil edilen meme kanseri hastalarının %41.6'sı premenopozal, %58.4'ü postmenopozal dönemdedir. Çalışmamızda ise kontrol grubundaki kadınların 27'si (%77.1) premenopozal, 8'i (%22.9) postmenopozal, erken evre hasta grubundaki kadınların 28'i (%50) premenopozal, 28'i (%50) postmenopozal ve ileri evre hasta grubundaki kadınların 26'sı (%50) premenopozal ve 26'sı (%50) postmenopozal dönemdedir. Gruplar arasında menopoz durumu bakımından anlamlı bir farklılık saptanmamıştır.

Glukoz metabolizması bozukluklarının çeşitli kanser türlerinin gelişiminde ve prognozunda bağımsız bir risk faktörü olduğu gösterilmiştir (118). 20 çalışmanın meta-analizi sonucunda glukoz metabolizmasını etkileyen başlıca hastalık olan diyabet hastalığında meme kanseri riskinin %20 arttığı gösterilmiştir (119). Çalışmamızda da glukoz konsantrasyonları erken ($p < 0.01$) ve ileri ($p < 0.0001$) evre hasta gruplarında, kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur.

Gama glutamil transferaz (GGT), glutatyon transportunda görev aldığı için oksidatif strese karşı hücrelerin korunmasında rol oynar. GGT tümör progresyonunda anahtar bir rol üstlenen oksidatif stresin güvenilir bir belirteçidir (120). İsveç toplumunda yapılan bir çalışmada, toplum taraması yapılan kişilerde normal GGT değerleri ile karşılaştırıldığında yüksek GGT değerlerinin artmış kanser riski ile ilişkili olduğu bulunmuştur (121). Yüksek GGT değerlerine glukoz değerlerinin yüksekliği de eşlik ediyorsa özellikle prostat, meme ve karaciğer kanseri riskinin daha da arttığı gösterilmiştir (121). Çalışmamızda ileri evre hasta grubunda GGT düzeyleri kontrol ($p < 0.05$) ve erken evre hasta ($p < 0.05$) gruplarına göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur.

Meme kanserinin de içinde olduğu bazı kanser türlerinde kemik metastazı gelişmeksizin, serum kalsiyum düzeylerinin yükseldiği gösterilmiştir. Bu

yüksekliğin hümorale mekanizma ile kanser dokusundan parathormon ilişkili peptid salgılanmasıyla oluştuğu düşünülmektedir (122). Bizim çalışmamızda da kalsiyum düzeyleri erken ($p<0.01$) ve ileri ($p<0.01$) evre hasta gruplarında, kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Fakat parat hormon ilişkili peptid düzeyleri çalışılmamıştır.

Amin ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada serum kreatinin, ürik asit, ALT, AST ve LDH değerlerini 20 sağlıklı gönüllüden oluşan kontrol grubu ve 40 yeni tanı almış meme kanseri hastasında karşılaştırmışlar ve anlamlı değişiklik saptamamışlardır (123). Bizim çalışmamızda da serum BUN, kreatinin, ALT, AST ve LDH değerleri için gruplar arasında anlamlı farklılık saptanmamıştır.

Bir çalışmada 120 yeni tanı almış meme kanseri hastasının ve 60 sağlıklı gönüllünün serum lipid profilleri karşılaştırılmış ve meme kanseri hastalarının total kolesterol ve LDL kolesterol düzeylerinin kontrol grubundan anlamlı olarak daha yüksek olduğu bulunmuş, HDL kolesterol ve VLDL kolesterol düzeylerinde anlamlı değişiklik saptanmamıştır (124). Bizim çalışmamızda ise grupların lipid profilleri arasında anlamlı farklılık saptanmamıştır.

Birçok kanser türünde serum tümör belirteçleri hastalığın yönetiminde önemli bir rol oynamaktadır. Meme kanserinde ise, hastalığın yönetiminde serum tümör belirteçlerinin rolü daha azdır. Meme kanserinde en sık kullanılan serum tümör belirteçleri CA 15-3 ve karsino embriyonik antijen (CEA)'dir. Daha seyrek olarak kullanılan diğer meme kanseri belirteçleri ise CA 27.29, doku polipeptid antijen (TPA), doku polipeptid spesifik antijen (TPS) ve HER-2'nin ekstraselüler domainidir. Meme kanserinde serum tümör belirteçlerinin potansiyel kullanım alanları erken tanı, prognozun belirlenmesi, spesifik tedavilere cevap veya direncin tahmin edilmesi, primer cerrahi tedaviden sonra izlem ve ileri evre hastalarda tedavinin takibidir. Ancak, erken evre hastalık için duyarlılığın düşük olması ve özgüllüğün olmaması gibi nedenler serum tümör belirteçlerinin tarama amaçlı kullanımını sınırlamaktadır. Günümüzde meme kanseri taramasında mamografi birincil yöntemdir (125). CA 15-3'ün meme kanseri hastalarının sadece %31'inde ve CEA'nın meme kanseri hastalarının sadece %26'sında yükseldiği gösterilmiş ve bu nedenle CA 15-3 ve CEA'nın meme kanseri tanısında kullanılmak için yeterli sensitiviteye sahip olmadığı bulunmuştur (126).

Kurebayashi ve arkadaşları (127) yaptıkları bir çalışmada CA 15-3 düzeylerini metastazı olmayan meme kanseri hastalarında 11.4 ± 5.9 U/ml, metastazı olan meme kanseri hastalarında ise 273.0 ± 1022.8 U/ml olarak ölçmüşlerdir. Yine aynı çalışmada CEA düzeylerini metastazı olmayan hastalarda 2.7 ± 7.1 ng/ml ve metastazı olan hastalarda ise 103.7 ± 607.8 ng/ml olarak ölçmüşlerdir (127). Çalışmamızda serum CEA düzeyi erken evre hasta grubunda 2.12 ± 0.27 ng/mL, ileri evre hasta grubunda 2.50 ± 0.34 ng/mL olarak bulunmuştur. Serum CA 15-3 düzeyi ise erken evre hasta grubunda 21.00 ± 1.77 IU/mL ve ileri evre hasta grubunda 27.75 ± 2.83 IU/mL olarak bulunmuştur. Bizim çalışmamızda da literatür ile uyumlu olarak serum tümör belirteçleri bakımından erken ve ileri evre hasta grupları arasında anlamlı farklılık saptanmamıştır.

Autotaxin ve lizofosfatidik asidin fizyolojik ve patolojik durumdaki rolünü daha iyi anlayabilmek için biyolojik örneklerdeki miktarını tespit etmek gereklidir. Nakamura ve arkadaşları (128) 30 erkek ve 30 kadın sağlıklı gönüllüler ile yaptıkları bir çalışmada, serum autotaxin aktivitesini kadınlarda (3.84 ± 0.62 nmol/mL/min) erkeklerden (3.24 ± 0.54 nmol/mL/min) daha yüksek olarak bulmuşlardır.

Nakamura ve arkadaşları (129) kantitatif enzim immün ölçüm yöntemini kullanarak sağlıklı bireylerde (n=120, 46 kadın ve 74 erkek) serum ATX antijen konsantrasyonunu $0.468-1.134$ mg/L olarak ölçmüşlerdir. Sağlıklı kadınlarda (n=46) serum ATX konsantrasyonunu ($0.625-1.323$ mg/L) sağlıklı erkeklerden (n=74) ($0.438-0.914$ mg/L) anlamlı olarak daha yüksek bulmuşlardır ($p < 0.001$).

Masuda ve arkadaşları (130) serum ATX antijen düzeyini anti-human ATX monoklonal antikorları kullanarak otomatize immün ölçüm analizöründe ölçmüşlerdir. Bu araştırmacılar 120 sağlıklı gönüllüde (74 erkek ve 46 kadın) yapılan ölçümde serum ATX antijen düzeyini 0.731 ± 0.176 mg/L (mean \pm SD) olarak bulmuşlardır. Sağlıklı kadınlarda (n=46) serum ATX antijen düzeyini (0.852 ± 0.184 mg/L) sağlıklı erkeklerden (n=74) (0.656 ± 0.121 mg/L) anlamlı olarak daha yüksek bulmuşlardır ($p < 0.001$). Aynı çalışmada çeşitli hematolojik malignansisi bulunan 161 hastada serum ATX antijen ölçümü yapmışlar ve foliküler lenfoma (1.471 ± 0.693 mg/L), kronik lenfositik lösemi (1.037 ± 0.355 mg/L), diffüz büyük B hücreli lenfoma (0.936 ± 0.387 mg/L) ve hodgkin

lenfomalı (0.952 ± 0.273 mg/L) hastalarda sağlıklı kişilerden (0.731 ± 0.176 mg/L) anlamlı olarak daha yüksek bulmuşlardır. Ayrıca, enzimatik siklik metod kullanarak kolorimetrik plazma LPA ölçümü yapmışlar. Plazma LPA düzeylerinin serum ATX antijen düzeyleri ile pozitif olarak korele olduğunu bulmuşlardır.

Nakai ve arkadaşları (131) gastrointestinal sistem kanserlerinde enzimatik fotometrik yöntem ile serum ATX aktivitesini ve siklik enzimatik kolorimetrik yöntem ile plazma LPA düzeyini ölçmüşler ve pankreatik kanser hastalarında (n=103) serum ATX aktivitesini (yaklaşık olarak 4 nmol/mL/dak.) benign pankreatik hastalığı (yaklaşık olarak 3 nmol/mL/dak.) bulunanlara (n=73) göre anlamlı olarak yüksek saptamışlardır. Diğer gastrointestinal kanserlerde ise bir farklılık saptamamışlardır. Ayrıca, pankreatik kanser hastalarında serum ATX aktivitesi ile plazma LPA düzeyleri arasında pozitif olarak lineer korelasyon gözlemişlerdir

Bizim çalışmamızda sandviç enzim immün ölçüm tekniği ile yaptığımız ölçüm sonucunda serum ATX düzeyleri kontrol grubunda 0.97 ± 0.06 mg/L, erken evre hasta grubunda 0.70 ± 0.04 mg/L ve ileri evre hasta grubunda ise 0.68 ± 0.05 mg/L olarak bulunmuştur. Gruplar arası ikili karşılaştırmada serum ATX düzeyi erken evre ($p < 0.0001$) ve ileri evre ($p < 0.01$) hasta gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu. Erken ve ileri evre hasta grupları arasında anlamlı farklılık bulunmamıştır ($p > 0.05$).

Baker ve arkadaşları (132) LPA miktarınının direkt kantitatif analizi için stabil-izotop dilüsyon likid kromatografi-kütle spektrometri yöntemini geliştirmişlerdir. Bu yöntem ile EDTA'lı plazmada total LPA ölçmüşler ve sağlıklı erkeklerde (n=5) 0.61 ± 0.14 μ M ve kadınlarda (n=5) 0.74 ± 0.17 μ M olarak bulmuşlardır. Yine aynı yöntem ile serumda total LPA ölçmüşler ve sağlıklı erkeklerde 0.85 ± 0.22 μ M ve kadınlarda 1.57 ± 0.56 μ M olarak bulmuşlardır.

Kishimoto ve arkadaşları (133) enzimatik siklik metod kullanarak yaptıkları kolorimetrik ölçümde serum LPA konsantrasyonunu sağlıklı erkeklerde (n=15) 0.41 ± 0.14 μ mol/L ve sağlıklı kadınlarda (n=5) 0.41 ± 0.12 μ mol/L olarak bulmuşlardır. Aynı popülasyonda yine enzimatik siklik metod kullanılarak yapılan

kolorimetrik ölçümlerde EDTA'lı plazmada LPA konsantrasyonunu erkeklerde $0.08 \pm 0.02 \mu\text{mol/L}$ ve kadınlarda $0.09 \pm 0.02 \mu\text{mol/L}$ olarak bulmuşlardır.

Hosogaya ve arkadaşları (134) ise yine enzimatik siklik yöntemi kullanarak yaptıkları serum LPA konsantrasyonu ölçümünde sağlıklı kadınlarda ($n = 47$) $0.103 \pm 0.032 \mu\text{mol/L}$ ve sağlıklı erkeklerde ($n = 99$) $0.077 \pm 0.026 \mu\text{mol/L}$ olarak bulmuşlardır.

Xu ve arkadaşları (135) gaz kromatografisi ile yaptıkları ölçümlerde plazma LPA düzeyini sağlıklı gönüllülerde ($n=48$) $0.6 \pm 0.19 \mu\text{mol/L}$ (mean \pm SEM), stage I over kanserli hastalarda ($n=10$) $5.9 \pm 2.99 \mu\text{mol/L}$ (mean \pm SEM), stage II, III ve IV over kanserli hastalarda ($n=24$) $8.1 \pm 1.87 \mu\text{mol/L}$ (mean \pm SEM), rekürren over kanserli hastalarda $11.5 \pm 3.16 \mu\text{mol/L}$ (mean \pm SEM), endometrium kanserli hastalarda ($n=15$) $16.9 \pm 5.29 \mu\text{mol/L}$ (mean \pm SEM), serviks kanserli hastalarda ($n=6$) $21.9 \pm 8.97 \mu\text{mol/L}$ (mean \pm SEM) ve meme kanserli hastalarda ($n=11$) $0.1 \pm 0.03 \mu\text{mol/L}$ (mean \pm SEM) olarak saptamışlardır. Aynı araştırmacılar plazma LPA düzeyini over, endometrium ve serviks kanserli hastalarda sağlıklı gönüllülerden anlamlı olarak yüksek bulmuşlardır ($p<0.001$).

Bizim çalışmamızda yarışmalı ELISA yöntemi kullanılarak yapılan ölçüm sonucunda serum LPA düzeyleri kontrol grubunda $30.11 \pm 2.49 \mu\text{M}$, erken evre hasta grubunda $45.42 \pm 2.04 \mu\text{M}$ ve ileri evre hasta grubunda $53.58 \pm 2.49 \mu\text{M}$ olarak bulunmuştur. Serum LPA düzeyi erken evre ($p<0.0001$) ve ileri evre ($p<0.0001$) hasta gruplarında kontrol grubuna göre ve ileri evre hasta grubunda erken evre hasta grubuna göre ($p<0.05$) anlamlı olarak yüksek saptanmıştır.

Çalışmamızda kontrol grubu için bulduğumuz ATX ve LPA düzeyleri literatürdeki sağlıklı kadınlar için bildirilen düzeyler ile uyumludur. Bazı araştırmacılar tarafından serum LPA ve ATX konsantrasyonlarının çeşitli kanser türlerinde artış gösterdiği bildirilmiştir (130,131,135). Literatür ile uyumlu olarak bizim çalışmamızda da, erken ve ileri evre meme kanseri hastalarının serum LPA düzeyleri kontrol grubundan anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Ancak, serum ATX düzeyleri erken ve ileri evre hasta gruplarında kontrol grubundan daha düşük olarak saptanmıştır. Erken ve ileri evre hasta gruplarında enzim konsantrasyonu azalırken ürünü olan LPA'nın konsantrasyonunun artması bize aktif enzim miktarında artış olabileceğini göstermektedir. Fakat enzim aktivitesi

yerine, enzim konsantrasyonu ölçtüğümüz için bu artışı gösteremedik. Lizofosfatidik asidin hasta gruplarında artması, serumda başlıca sentez yolu olarak bilinen ATX yolağından başka yollarla da LPA üretiminin olabileceğini düşündürmektedir. Ekstrasellüler LPA üretimi başlıca lizofosfolipidlerin Lyso PLD ile hidrolizi yoluyla gerçekleşmektedir. Lizofosfatidik asit hücre içinde başlıca fosfatidik asidin 1. pozisyonundan fosfolipaz A1 (PLA1) enzimiyle ya da 2. pozisyonundan fosfolipaz A2 (PLA2) enzimiyle hidrolizi ile sentezlenmektedir. Gliserol-3-fosfatın uzun zincirli bir yağ asiti ile esterifikasyonu sonucunda da LPA sentezi gerçekleşebilmektedir.

ATX için yapılan lojistik regresyon analizi sonucunda, kontrol grubundan hasta grubunu (erken ve ileri evre hasta grupları birleştirilerek oluşturulan hasta grubu) ayırt etmede [p=0.001, OR=0.035, CI %95 (0.005-0.254)], kontrol grubundan erken evre hasta grubunu ayırt etmede [p=0.003, OR=0.045, CI %95 (0.006 - 0.345)] ve kontrol grubundan ileri evre hasta grubunu ayırt etmede [p=0.01, OR=0.030, CI %95 (0.002 - 0.433)] ATX anlamlı gibi görünmekle birlikte güven aralığı geniş olarak bulunmuştur. Autotaxin, erken ve ileri evre [p=0.896, OR=1.109, CI %95 (0.234 - 5.251)] hasta gruplarını ayırt etmede yeterli bulunmamıştır.

LPA için yapılan lojistik regresyon analizi sonucunda ise kontrol grubundan hasta grubunu (erken ve ileri evre hasta grupları birleştirilerek oluşturulan hasta grubu) ayırt etmede LPA'nın anlamlı ölçüde bağımsız bir risk faktörü olduğu bulunmuştur [p=0.000, OR=1.098, CI %95 (1.048-1.149)]. Kontrol ve erken evre hasta gruplarını ayırt etmede LPA'nın [p=0.002, OR=1.079, CI %95 (1.029 - 1.132)] erken evre için risk faktörü olabileceği bulunmuştur. Kontrol ve ileri evre hasta gruplarını ayırt etmede LPA'nın [p=0.000, OR=1.104, CI %95 (1.047 - 1.163)], ileri evre için risk faktörü olabileceği bulunmuştur. LPA'in erken ve ileri evre [p=0.013, OR=1.038, %95 CI (1.008-1.070)] hasta gruplarını ayırt etmede kullanılabilen bulunmuştur.

Yapılan lojistik regresyon analizleri değerlendirildiğinde, LPA'nın hem hastaları sağlıklı bireylerden ayırt edebildiği, hem de hastalık düzeyi ile korelasyon gösterdiği saptanmıştır. Bu durumda LPA'nın hem tanıda hem de hastalığın takibinde kullanılabilir olduğu düşünülmektedir. ATX ise sağlıklılardan

hastaları ayırt edebiliyor gibi görünmekle birlikte güven aralığı geniş olarak bulunmuştur. Ayrıca ATX hastalarda, hastalığın düzeyi ile korelasyon göstermemektedir.

Meme malign tümörlerinin önemli bölümü adenokarsinomlardır. Skuamöz hücreli karsinom, phyllodes tümör, sarkom ve lenfoma gibi adenokarsinom dışı diğer malign tümörler ise %5'den az bir grubu oluşturmaktadır. Günümüzde mamografinin yaygınlaşması ile intraduktal karsinom sıklığı %15- 20'lere çıkmıştır. İnvaziv karsinomlar ise meme kanserlerinin %80-85'ini oluşturmaktadır. İnvaziv karsinomlar içinde en sık görülen tip %70-80 ile invaziv duktal karsinomdur. Bunu %5-15 görülme sıklığı ile invaziv lobuler karsinom izler (136). Bizim çalışmamızda da literatür ile uyumlu olarak her iki hasta grubunda da en sık görülen invaziv duktal karsinomdur. Erken evre grubunda bunu intraduktal karsinom izlerken, ileri evre grubunda berrak hücreli karsinom takip etmektedir.

Literatürde meme kanserinin tanı anındaki evresine baktığımızda hastaların %62'sinin lokalize, %32'sinin bölgesel lenf nodu metastazlı, %5'inin uzak metastazlı ve %2'sinin de evrelendirilememiş olduğu görülmüştür (137). Bizim çalışmamızda ise, erken evre grubunu oluşturan hastaların tümü lokalize, ileri evre grubunu oluşturan hastaların tümü ise bölgesel lenf nodu metastazlı olan hastalardan oluşmuştur. Uzak metastazlı olan hasta bulunmamaktadır.

Bloom ve arkadaşları (138) 1409 meme kanseri hastasında yaptıkları çalışmada hastaların %26'sını grade I, %45'ini grade II ve %29'unu grade III olarak bulmuşlardır. Ayrıca yaptıkları 15 yıllık izlemde yüksek gradeli tümörlerin kötü prognoz ile ilişkili olduğunu göstermişlerdir. Bizim çalışmamızda erken ve ileri evre hasta gruplarında gradelerin dağılımları arasında anlamlı fark bulunamamıştır ($p=0.19$, $\chi^2=3.316$).

Meme karsinomu için bilinen en önemli prognostik parametreler tümör boyutu, lenf nodu metastazı, tümörün histolojik tipi ve histolojik grade'i, lenfovasküler invazyon, östrojen ve progesteron reseptörlerinin varlığı ve onkogenlerin (HER-2/neu) ve tümör supresör genlerin (p53) ekspresyon paternleridir (139).

Normal meme dokusunda östrojen reseptörü pozitif hücreler nonproliferatif hücrelerdir. Östrojen reseptörü pozitif hücrelerin oranı normal memede genel olarak düşükken (%10-20), düşük gradeli duktal karsinoma in situ'da (DCIS) artış olmaktadır. Yüksek grade'li DCIS'da östrojen reseptörü ekspresyonu düşüş göstermektedir ve invaziv meme karsinomlarında ise grade arttıkça östrojen reseptörü eksprese eden tümörlerin oranı azalmaktadır. Tüm meme kanserlerinin %70-80'i östrojen reseptörü eksprese etmektedir (140). Bizim çalışmamızda östrojen reseptörü erken evre hasta grubunun %80.3'ünde (n=45) pozitif, %19.7'sinde (n=11) negatif, ileri evre hasta grubunun %76.9'unda (n=40) pozitif, %23.1'inde (n=12) negatif olarak bulunmuştur.

Normal meme dokusunda luminal epitelyal hücrelerin nükleuslarında %15-30 arasında değişen progesteron reseptörü ekspresyonu görülmektedir. İnvaziv meme kanserlerinin %60'ı progesteron reseptörü eksprese etmektedir. Bu tümörler östrojen reseptörü eksprese eden tümörler gibi hormonoterapiye iyi yanıt veren iyi prognozlu tümörlerdir (141). Bizim çalışmamızda progesteron reseptörü erken evre hasta grubunun %69.6'sında (n=39) pozitif, %30.4'ünde (n=17) negatif, ileri evre hasta grubunun %65.4'ünde (n=34) pozitif, %34.6'sında (n=18) negatif olarak bulunmuştur.

c-erb B2 amplifikasyonu ve overekspresyonu meme kanserinde %25-30 oranında görülür. Meme kanserlerinde c-erb B2 overekspresyonunun yüksek histolojik grade'le ilişkili olduğu ve aksiller lenf nodu metastazı varlığında kötü prognoz göstergesi olduğu bilinmektedir (142). Bizim çalışmamızda c-erb B2 erken evre hasta grubunun %57.1'inde (n=32) pozitif, %42.9'unda (n=24) negatif, ileri evre hasta grubunun %61.5'inde (n=32) pozitif, %38.5'inde (n=20) negatif olarak bulunmuştur.

Popnikolov ve arkadaşlarının (143) meme kanseri tanılı hastaların eksizyonel biyopsi ve mastektomi materyallerinden elde ettikleri dokularda yaptıkları çalışmada immüblot ve immünhistokimya analizlerinde ATX ve LPA3 reseptörünün meme kanserli dokuda normal meme dokusundan daha fazla eksprese olduğu gözlenmiştir. Ayrıca LPA3 reseptör ekspresyonunun tümör diferansiyasyonu azaldıkça arttığı ve LPA3 reseptörü pozitif hastalarda lenf nodu tutulumunun daha sık olduğu gösterilmiştir.

Shida ve arkadaşları (144) yaptıkları bir çalışmada, kolorektal karsinom tanısı almış 26 olguda ve normal kolon mukozasına sahip 16 olguda real time RT-PCR yöntemi ile LPA1 ve LPA2 mRNA seviyelerine bakmışlar. LPA1 mRNA seviyesini kanser dokusunda normal dokuya göre daha düşük (0.3 kat, $p < 0.05$), tersine LPA2 mRNA seviyesini ise karsinom vakalarında normal dokuya göre belirgin derecede yüksek (3 kat, $p < 0.05$) tespit etmişlerdir. Normal kolon epitelinin LPA1 ve LPA2 reseptörlerini benzer düzeylerde eksprese ettiklerini, kolorektal kanser dokusunda ise LPA2/LPA1 ekspresyon oranınının 18 kat arttığını göstermişlerdir. Ardından LPA2 antikoru ile yaptıkları immünohistokimyasal analizde normal kolorektal dokuya göre kanser dokusunda daha yoğun boyanma izlenmiş.

Kitayama ve arkadaşları (145) yaptıkları çalışmada, 25 meme kanseri hastasından elde ettikleri invaziv duktal karsinom dokusu ile 6 normal meme dokusunu real time RT-PCR ile karşılaştırmışlar. Kontrole göre oranlandığında normal (1438.5 ± 425.5) ve meme kanserli (1675.3 ± 299.8) dokularda LPA1 reseptör ekspresyonlarında anlamlı bir farklılık gözlememişlerdir. Ancak LPA2 reseptör ekspresyonunu kontrole göre oranlandığında kanserli dokuda (3479.0 ± 426.6) normal dokudan (1287.3 ± 466.8) anlamlı olarak yüksek saptamışlardır ($p < 0.05$). ayrıca LPA3 reseptörünün de hem normal hem de meme kanserli dokuda zayıf olarak eksprese olduğunu göstermişlerdir.

Hama ve arkadaşları (146) MSF hücrelerinde yaptıkları deneylerde LPA'in hücre motilitesini stimüle edici etkisi için LPA1 reseptörünün esansiyel olduğunu göstermişlerdir. Autotaxin'in de hücre motilitesini stimüle edici etkisini LPA sentezi aracılığıyla gösterdiğini saptamışlardır. Yine aynı çalışmada, kantitatif real time RT-PCR ile çeşitli kanser hücre dizilerinde LPA reseptörlerinin ekspresyon paternlerini incelemişlerdir. Buna göre MDA-MB-231 (breast cancer), PC-3 (prostate cancer), A-2058 (melanoma), A549 (lung cancer), ACHN (renal cancer), SF295 (glioblastoma) ve SF539 (glioblastoma) hücre dizileri LPA1 reseptörünü endojen olarak eksprese etmektedir ve bu hücrelerde LPA hücre migrasyonunu stimüle etmektedir.

Yang ve arkadaşları (147) yaptıkları çalışmada, 6 meme kanseri hastasından elde ettikleri dokuların immunohistokimyasal olarak ve RT-PCR ile normal meme

dokusundan daha fazla ATX eksprese ettiğini göstermişlerdir. Daha sonra çeşitli meme kanseri hücrelerin ATX ekspresyonlarını karşılaştıran araştırmacılar MDA-MB-435S hücrelerinin en fazla ATX eksprese eden meme kanseri hücresi olduğunu, MDA-MB-231, HBL-100 ve MCF7 hücrelerinin ATX eksprese etmediğini göstermişlerdir. Ayrıca, MCF7 hücrelerinin pcDNATX ile transfekte edildiğinde invazyon kabiliyeti kazandığını göstermişlerdir. Meme kanseri hücrelerinin ATX ekspresyonları ile invazyon yeteneklerinin yakından ilişkili olduğunu göstermişlerdir.

Bizim çalışmamızda lizofosfatidik asit reseptörlerinin immünohistokimyasal analizinde LPA1 reseptörünün immünohistokimyasal boyanma şiddetinde kontrol ve erken evre ve ileri evre hasta grupları birleştirilerek oluşturulan hasta grubu arasında anlamlı farklılık saptanmamıştır ($p=0.063$, $\chi^2=4.051$). İmmün histokimyasal olarak LPA2 reseptörünün ise kontrol grubunda daha çok 3+ şiddetinde boyanırken, erken evre ve ileri evre hasta grupları birleştirilerek oluşturulan hasta grubunda daha az 3+ şiddetinde ve daha çok 1+ şiddetinde boyandığı görülmüştür ($p=0.03$, $\chi^2=5.035$).

Lizofosfatidik asit reseptörlerinin immünohistokimyasal boyanma şiddetinde erken ve ileri evre hasta gruplarında kontrol grubuna göre artış olmaması, LPA'nın karsinogenez üzerindeki etkilerinin artan serum LPA düzeyinin mevcut reseptörler üzerinden hücre içi sinyal yolağını uyarması ile meydana geldiğini düşündürmektedir. Ayrıca, bu çalışmada LPA reseptörlerinden sadece LPA1 ve LPA2 reseptörleri çalışılmıştır. Diğer LPA reseptörleri üzerinden de sinyal iletimi gerçekleştirilebilmektedir.

Bu çalışmanın sonucunda sağlıklı kişilerin, erken ve ileri evre meme kanseri olan hastaların serumlarında LPA ve ATX düzeyleri belirlenerek literatüre kazandırılmıştır. Kontrol ve hasta gruplarından elde edilen veriler incelendiğinde, LPA değerlerinin kontrol ve hasta gruplarını ayırt edebilmesi tanıda kullanılabilir olduğunu göstermektedir. Ayrıca, LPA'nın hastalığın evresi ile korelasyon göstermesi takipte kullanılabileceğini ve hastalığın prognozu ile ilişkili olduğunu düşündürmektedir.

Bu çalışmada, normal ve meme kanseri dokularında LPA reseptörlerinden LPA1 ve LPA2'nin ekspresyonları araştırılmıştır. Hem normal meme dokusunda

hem de meme kanseri dokusunda LPA1 ve LPA2 reseptörlerinin eksprese olduğu gösterilmiştir.

Erken tanı ve gelişmiş tedavi yöntemlerinin rolü tam olarak tespit edilemese de, meme kanseri mortalitesinde anlamlı bir gelişme gözlenmektedir. Meme kanserinde alınan kötü sonuçlarda tedaviye direnç ve metastaz oluşumu iki kritik noktadır. Bu nedenle, meme kanseri mortalitesini düşürmek için yeni terapötik hedefler belirlemek gerekmektedir. Çalışmamızda da gösterdiğimiz gibi, meme kanserinin oluşumuna ve ilerlemesine katkıda bulunan faktörlerden birisi de ATX-LPA sinyalizasyon aksıdır. Günümüzde ATX-LPA sinyalizasyon aksını engellemek için ATX inhibisyonu ya da LPA reseptör blokajı yapan herhangi bir kemoterapötik bulunmamaktadır. Tedavide ATX inhibitörlerinin ya da LPA reseptör blokerlerinin kullanımı güncel araştırma konuları arasındadır.

Bu çalışmanın sonuçlarına göre erken ve ileri evre meme kanseri hastalarının serum LPA düzeyleri kontrol grubundan anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Serum ATX düzeyleri erken ve ileri evre hasta gruplarında kontrol grubundan daha düşük olarak saptanmıştır. Serum LPA düzeyinin hastalık düzeyi ile korelasyon gösterdiği bulunmuştur. LPA1 ve LPA2 reseptörlerinin hem normal meme dokusunda hem de meme kanseri dokusunda eksprese olduğu immünohistokimyasal olarak gösterilmiştir. Ekstraselüler LPA tümör oluşumu, büyümesi, invazyonu ve metastazı üzerine olan etkilerini G proteinleri ile eşlenik reseptörleri üzerinden gerçekleştirmektedir. Dolaşımda ATX etkisi ile oluşan LPA, hücre yüzeyindeki spesifik reseptörüne bağlanarak hücre içi sinyal yollarını aktifleyebilmektedir.

Sonuç olarak, ülkemizde ilk kez sağlıklı ve meme kanseri olan bireylerde LPA ve ATX düzeyleri belirlenmiş ve bu değerler literatüre kazandırılmıştır. Meme kanseri tanısında ve takibinde özellikle LPA'nın bir markır olabileceği belirlenmiştir. Bu çalışmada kontrol grubunda 35, erken evre hasta grubunda 56 ve ileri evre hasta grubunda 52 kadın bulunmaktadır. Sağlıklı ve meme kanseri olan hasta sayıları artırılarak daha geniş kapsamlı moleküler düzeyde çalışmalara ihtiyaç vardır.

6. SONUÇLAR

1. Bu çalışmada erken evre hasta grubunun BMI'yi kontrol grubundan anlamlı olarak yüksek bulunmuştur.
2. Glukoz konsantrasyonları erken ve ileri evre hasta gruplarında, kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur.
3. İleri evre hasta grubunda GGT düzeyleri kontrol ve erken evre hasta gruplarına göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur.
4. Kalsiyum düzeyleri erken ve ileri evre hasta gruplarında, kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur.
5. Serum tümör belirteçleri bakımından erken ve ileri evre hasta grupları arasında anlamlı farklılık saptanmamıştır.
6. Serum ATX düzeyi erken evre ve ileri evre hasta gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur. Erken ve ileri evre hasta grupları arasında anlamlı farklılık bulunmamıştır.
7. Serum LPA düzeyi erken evre ve ileri evre hasta gruplarında kontrol grubuna göre, ve ileri evre hasta grubunda erken evre hasta grubuna göre anlamlı olarak yüksek saptanmıştır.
8. Bu çalışmanın sonucunda sağlıklı kişilerin, erken ve ileri evre meme kanseri olan hastaların serumlarında LPA ve ATX düzeyleri belirlenerek literatüre kazandırılmıştır.
9. Lojistik regresyon analizine göre, kontrol grubundan hasta grubunu (erken ve ileri evre hasta grupları birleştirilerek oluşturulan hasta grubu) ayırt etmede LPA'nın anlamlı ölçüde bağımsız bir risk faktörü olduğu bulunmuştur.
10. Kontrol grubundan hasta grubunu ayırt etmede ATX anlamlı gibi görünmekle birlikte güven aralığı geniş olarak bulunmuştur.
11. Kontrol ve erken evre hasta gruplarını ayırt etmede LPA'nın erken evre için risk faktörü olabileceği bulunmuştur.

12. Kontrol ve ileri evre hasta gruplarını ayırt etmede LPA'nın ileri evre için risk faktörü olabileceği bulunmuştur.
13. Autotaxin, erken ve ileri evre hasta gruplarını ayırt etmede yeterli değilken, LPA'nın erken ve ileri evre hasta gruplarını ayırt etmede kullanılabileceği bulunmuştur.
14. Hem normal meme dokusunda hem de meme kanseri dokusunda LPA1 ve LPA2 reseptörlerinin immünohistokimyasal olarak daha çok +3 şiddetinde boyandığı gösterilmiştir.

7. ÖZET

MEME KANSERİNDE LİZOFOSFATİDİK ASİDİN ÖNEMİ

Meme kanseri kadınlarda en sık görülen kanserdir ve kanserden ölümlerin akciğer kanserinden sonraki ikinci en sık nedenidir. Autotaxin lizofosfatidil kolin (LPC)'den, biyoaktif fosfolipid mediatör lizofosfatidik asit (LPA) üretimini katalizleyen lizofosfolipaz D (LysoPLD) ile özdeşir. Autotaxin'in, LPA üretimi yoluyla tümör progresyonunu, tümör hücrelerinin motilitesini ve anjiyogenezi stimüle ettiği gösterilmiştir. Lizofosfatidik asit, multifonksiyonel fosfolipid mediatördür. Lizofosfatidik asit etkilerini, geniş doku dağılımı gösteren G proteini ile eşlenik LPA reseptörleri üzerinden gerçekleştirir. Bu çalışmanın amacı, serum LPA ve ATX düzeyleri ile normal ve meme kanseri dokularındaki LPA reseptör ekspresyonlarını değerlendirerek, meme kanserinde LPA'nın önemini araştırmaktır. Çalışmamızda hasta ve kontrol grubu olmak üzere iki grup oluşturuldu. Hasta grubu da kendi içinde erken evre hasta grubu ve ileri evre hasta grubu olmak üzere iki gruba ayrıldı. Kontrol ve hasta gruplarını oluşturan bireylerden tedavi öncesi alınan serum örneklerinde autotaxin ve lizofosfatidik asit düzeyleri ölçüldü. Meme kanseri ve normal meme dokularında lizofosfatidik asit reseptörlerinin (LPA1 ve LPA2) ekspresyonları immünohistokimya ile gösterildi. Erken evre ve ileri evre hasta gruplarının ATX düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu. Erken ve ileri evre hasta gruplarının LPA düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu. İleri evre hasta grubunun LPA düzeyi erken evre hasta grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu. Lojistik regresyon analizi sonucunda, kontrol grubundan hasta grubunu (erken ve ileri evre hasta grupları birleştirilerek oluşturulan hasta grubunu) ayırt etmede, LPA'nın bağımsız bir risk faktörü olduğu bulunmuştur. LPA düzeyi ile hastalığın evresi arasında korelasyon olduğu bulunmuştur. LPA normal ve meme kanserli dokularda etkilerini LPA1 ve LPA2 reseptörleri üzerinden göstermektedir. Sonuç olarak, bu çalışmanın sonuçları LPA'nın meme kanseri tanı ve takibinde bir markır olarak kullanılabileceğini önermektedir.

Anahtar sözcükler: Lizofosfatidik asit, autotaxin, meme kanseri, erken evre meme kanseri, ileri evre meme kanseri.

8. ABSTRACT

THE IMPORTANCE OF LYSOPHOSPHATIDIC ACID IN BREAST CANCER

Breast cancer is the most common cancer in women and the second most common cause of cancer deaths after lung cancer. Autotaxin is identical to lysophospholipase D which catalyzes the bioactive phospholipid mediator lysophosphatidic acid production from lysophosphatidyl choline. Autotaxin has been shown to stimulate tumor progression, tumor cell motility and angiogenesis through the production of lysophosphatidic acid (LPA). Lysophosphatidic acid is a multifunctional phospholipid mediator. Lysophosphatidic acid acts through G protein coupled LPA receptors with a wide tissue distribution. The aim of this study was to investigate the importance of LPA in breast cancer by considering the relationship between serum autotaxin and lysophosphatidic acid levels, and the expression of LPA1 and LPA2 receptors in normal and breast cancer tissues. In this study, two groups formed: patients and control. Patients were divided into two groups according to disease staging: patients with early stage breast cancer and patients with advanced stage breast cancer. Autotaxin and LPA levels were measured in serum samples of control and patient groups individuals before the treatment. Lysophosphatidic acid receptors (LPA1 and LPA2) expression in breast cancer and normal tissues was shown by immunohistochemistry. Autotaxin level in both patient groups were significantly lower than the control group. Levels of LPA in patients with early stage and advanced stage breast cancer were significantly higher than the control group. Levels of LPA in patients with advanced stage breast cancer were significantly higher than in patients with early stage breast cancer. As a result of logistic regression analysis, to distinguish the patient groups (early stage and advanced stage breast cancer patients) from the control group, LPA was found to be an independent risk factor. LPA level was found to be correlated with stage of disease. LPA acts through LPA1 and LPA2 receptors in normal and breast cancer tissues. In conclusion, results of the present study suggest that LPA can be used as a marker for breast cancer diagnosis and follow-up.

Key words: Lysophosphatidic acid, autotaxin, breast cancer, early stage breast cancer, advanced stage breast cancer.

9. KAYNAKLAR

1. Giuliana AE, Breast, Way LW, Doherty GM, Current Surgical Diagnosis & Treatment, Lange Medical Books Series, 11th Edition, New York 2003; 319-39.
2. Vogel VG, Meme Hastalıkları, Beers MH, Porter RS, Jones TV, Kaplan JL, Berwits M. The Merck Manual Tanı Tedavi El Kitabı, Yüce Yayınları, 18. Baskı, İstanbul 2008; 2108-18.
3. Lee HY, Clair T, Mulvaney PT, Woodhouse EC, Aznavoorian, Lioatta LA, Stracke ML. Stimulation of Tumor cell Motility Linked to Phosphodiesterase Catalytic Site of Autotaxin, The Journal of Biological Chemistry 1996; 271(40): 24408-12.
4. Nam SW, Clair T, Kim YS, McMarlin A, Schiffmann E, Liotta LA, Stracke ML. Autotaxin (NPP-2), a metastasis-enhancing motogen, is an angiogenic factor, Cancer Research 2001; 61(18): 6938-44.
5. Umezu-Goto M, Kishi Y, Taira A, Hama K, Dohmae N, Takio K, et al. Autotaxin has lysophospholipase D activity leading to tumor cell growth and motility by lysophosphatidic acid production, J Cell Biol 2002; 158(2): 227-33.
6. Hama K, Aoki J, Fukaya M, Kishi Y, Sakai T, Suzuki R, et al. Lysophosphatidic acid and autotaxin stimulate cell motility of neoplastic and non-neoplastic cells through LPA1, The Journal of Biological Chemistry, 2004; 279(17): 17634-39.
7. Gaetano CG, Samadi N, Tomsig JL, Macdonald TL, Lynch KR, Brindley DN. Inhibition of autotaxin production or activity blocks lysophosphatidylcholine-induced migration of human breast cancer and melanoma cells, Molecular Carcinogenesis 2009; 48(9): 801-9.
8. Yang SY, Lee J, Park CG, Kim S, Hong S, Chung HC, et al. Expression of autotaxin (NPP-2) is closely linked to invasiveness of breast cancer cells, Clinical & Experimental Metastasis 2002; 19: 603-8.
9. Aoki J. Mechanism of lysophosphatidic acid production, Seminars in Cell & Development Biology 2004; 15(5): 477-89.
10. Anliker B, Chun J. Cell surface receptors in lysophospholipid signaling, Seminars in Cell & Developmental Biology 2004; 15(5): 457-65.
11. Drake RL, Vogl AW, Mitchell AWM. Gray's Anatomy for Student, Second Edition, Canada 2010; 137-9.
12. Moore KL, Agur AMR, Essential Clinical Anatomy, Lippincott Williams&Wilkins, third edition, Philadelphia 2007; 56-60.
13. Willet WC, Rockhill B, Hankinson SE, Hunter D, Colditz GA. Nongenetic Factors in the Causation of Breast Cancer, Haris JR, Lippman ME, Morrow M, Osborne CK, Diseases of the Breast, Lippincott Williams&Wilkins, Third Edition, Philadelphia 2004; 223-76.

14. Vogel VG, Epidemiology of Breast Cancer, Bland KI, Copeland EM, The Breast: Comprehensive management of benign and malignant Diseases Saunders. Vol 1, Missouri, 2004; 341-54.
15. Rosai J, Ackerman LV. Breast, Rosai J, Ackerman LV, Rosai and Ackerman's Surgical Pathology, Mosby, Ninth edition, Edinburg, 2004; 2: 1764-876.
16. Lester SC, The Breast, Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Aster JS, Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease, Eighth edition, Philadelphia, Saunders 2010; 1065-95.
17. Tavassoli FA, Devilee P, Pathology&Genetics Tumors of the Breast and Female Genital Organs, World Health Organization: Classification of Tumors No:4, Oxford University Press, Oxford 2003.
18. Edge SB, Byrd DR, Compton CC, AJCC (American Joint Committee on Cancer) Cancer Staging Manual, Springer-Verlag, 7th edition 2010; 347.
19. World Health Organization, International agency for research on Cancer, World Cancer Report 2008.
20. TC Sağlık Bakanlığı, Sağlık İstatistikleri Yıllığı 2008.
21. Burstein HJ, Haris JR, Morrow M, Malignant Tumors of the Breast, DeVita VT, Lawrence TS, Rosenberg SA, Cancer Principles & Practice of Oncology, Lippincott Williams, 8th edition, 2008; 2: 1632-4.
22. Domchek SM, Weber BL, Inherited Genetic Factors and Breast Cancer, Haris JR, Lippman ME, Morrow M, Osborne CK, Diseases of the Breast, Lippincott Williams, Third Edition 2004; 277-301.
23. Lynch HT, Marcus JN, Lynch JF, Snyder CL, Rubenstein WS, Breast Cancer Genetics, Bland KI, Copeland EM, The Breast: Comprehensive management of benign and malignant Diseases, Third Edition, Missouri, Saunders, 2004; 1: 375-412.
24. Henry NL, Hayes DF. Uses and Abuses of Tumor Markers in the Diagnosis, Monitoring, and Treatment of Primary and Metastatic Breast Cancer, The Oncologist 2006; 11: 541-52.
25. Reed MJ, Purohit A, Woo LW, Newman SP, Potter BV. Steroid Sulfatase: Molecular Biology, Regulation, and Inhibition, Endocrine Reviews 2005; 26(2): 171-202.
26. Wang F, Samudio I, Safe S. Transcriptional Activation of Rat Creatine Kinase B by 17 β -Estradiol in MCF-7 Cells Involves an Estrogen Responsive Element and GC-Rich Sites, Journal of Cellular Biochemistry 2002; 84: 156-72.
27. Bernardi CC, Ribeiro Ede S, Cavalli IJ, Chautard-Freire-Maia EA, Souza RL. Amplification And Deletion Of The ACHE And BCHE Cholinesterase Genes in Sporadic Breast Cancer, Cancer Genetics and Cytogenetics 2010; 197(2): 158-65.

28. Chandrasekaran EV, Xue J, Neelamegham S, Matta KL. The pattern of glycosyl- and sulfotransferase activities in cancer cell lines: a predictor of individual cancer-associated distinct carbohydrate structures for the structural identification of signature glycans. *Carbohydrate Research* 2006; 341(8): 983-94.
29. Hoos A, Hepp Hh, Kaul S, Ahlert T, Bastert G, Wallwiener D. Telomerase Activity Correlates With Tumor Aggressiveness And Reflects Therapy Effect In Breast Cancer, *International Journal of Cancer* 1998; 79: 8–12.
30. Ritzke C, Stieber P, Untch M. Alkaline phosphatase isoenzymes in detection and follow up of breast cancer metastases, *Anticancer Research* 1998; 18(2B): 1243–9.
31. Horne CH, Reid IN, Milne GD. Prognostic significance of inappropriate production of pregnancy proteins by breast cancers, *Lancet* 1976; 2(7980): 279-82.
32. Guise TA, Yin JJ, Taylor SD, Kumagai Y, Dallas M, Boyce BF, et al. Evidence for a causal role of parathyroid hormone-related protein in the pathogenesis of human breast cancer-mediated osteolysis, *Journal of Clinical Investigation* 1996; 98(7): 1544-9.
33. Raccurt M, Lobie PE, Moudilou E, Garcia-Caballero T, Frappart L, Morel G, Mertani HC. High stromal and epithelial human gh gene expression is associated with proliferative disorders of the mammary gland, *Journal of Endocrinology* 2002; 175(2): 307-18.
34. Duffy MJ. Serum Tumor Markers in Breast Cancer: Are They of Clinical Value?, *Clinical Chemistry* 2006; 52: 3/345–51.
35. Segal-Eiras A, Croce MV. Breast cancer associated mucin: a review, *Allergologia Immunopathologia* 1997; 25(4): 176-81.
36. Park BW, Oh JW, Kim JH, Park SH, Kim KS, Lee KS. Preoperative CA 15-3 and CEA serum levels as predictor for breast cancer outcomes, *Annals of Oncology* 2008; 19(4): 675-81.
37. Duffy MJ. Predictive Markers in Breast and Other Cancers: A Review, *Clinical Chemistry* 2005; 51(3): 494-503.
38. Burstein HJ, Haris JR, Morrow M, Malignant Tumors of the Breast, DeVita VT, Lawrence TS, Rosenberg SA, *Cancer Principles & Practice of Oncology*, Lippincott Williams, 8th edition 2008; 2: 1632-4.
39. Nishimashu H, Ishitani R, Aoki J, Nureki O. A 3D view of autotaxin, *Trends in Pharmacological Science* 2012; 33(3): 138-45.
40. Yuelling LM, Fuss B. Autotaxin (ATX): a multi-functional and multi-modular protein possessing enzymatic lysoPLD activity and matricellular properties 2008; 1781(9): 525-30.
41. Van Meeteren LA, Moolenaar WH. Regulation and biological activities of the autotaxin–LPA axis, *Progress in Lipid Research* 2007; 46: 145–60.

42. Nakagana K, Hama K, Aoki J. Autotaxin- an LPA producing enzyme with diverse functions, *Journal of Biochemistry* 2010; 148(1): 13-24.
43. Albers HMHG, Huib Ovaa H. Chemical Evolution of Autotaxin Inhibitors, *Chemical Reviews* 2012; 112: 2593–603.
44. Albers HM, Dong A, van Meeteren LA, Egan DA, Sunkara M, van Tilburg EW, et al. Boronic acid-based inhibitor of autotaxin reveals rapid turnover of LPA in the circulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107(16): 7257-62.
45. Lee HY, Clair T, Mulvaney PT, Woodhouse EC, Aznavoorian S, Liotta LA, Stracke ML. Stimulation of tumor cell motility linked to phosphodiesterase catalytic site of autotaxin. *J Biol Chem* 1996; 271: 24408-12.
46. Hama K, Aoki J, Fukaya M, Kishi Y, Sakai T, Suzuki R, et al. Lysophosphatidic acid and autotaxin stimulate cell motility of neoplastic and non-neoplastic cells through LPA1. *J Biol Chem* 2004; 279: 17634-9.
47. Okudaira S, Yukiura H, Junken Aoki J. Biological roles of lysophosphatidic acid signaling through its production by autotaxin. *Biochimie* 2010; 92: 698-706.
M. Tanaka, S. Okudaira, Y. Kishi, R. Ohkawa, S. Iseki, M. Ota, S. Noji, Y. Yatomi,
48. Aoki J, Arai H. Autotaxin stabilizes blood vessels and is required for embryonic vasculature by producing lysophosphatidic acid. *J Biol Chem* 2006; 281: 25822-30.
49. van Meeteren LA, Ruurs P, Stortelers C, Bouwman P, van Rooijen MA, Pradere JP, et al. Autotaxin, a secreted lysophospholipase D, is essential for blood vessel formation during development. *Mol Cell Biol* 2006; 26: 5015-22.
50. Nakasaki T, Tanaka T, Okudaira S, Hirosawa M, Umemoto E, Otani K, et al. Involvement of the lysophosphatidic acid-generating enzyme autotaxin in lymphocyte-endothelial cell interactions. *Am J Pathol* 2008; 173: 1566-76.
51. Kanda H, Newton R, Klein R, Morita Y, Gunn MD, Rosen SD. Autotaxin, an ectoenzyme that produces lysophosphatidic acid, promotes the entry of lymphocytes into secondary lymphoid organs. *Nat Immunol* 2008; 9: 415-23.
52. Watanabe N, Ikeda H, Nakamura K, Ohkawa R, Kume Y, Aoki J, et al. Both plasma lysophosphatidic acid and serum autotaxin levels are increased in chronic hepatitis C. *J Clin Gastroenterol* 2007; 41: 616-23.
53. Nakamura K, Takeuchi T, Ohkawa R, Okubo S, Yokota H, Tozuka M, et al. Serum lysophospholipase D/autotaxin may be a new nutritional assessment marker: study on prostate cancer patients. *Ann Clin Biochem* 2007; 44: 549-56.
54. Nakamura K, Nangaku M, Ohkawa R, Okubo S, Yokota H, Ikeda H, et al. Analysis of serum and urinary lysophospholipase D/autotaxin in nephrotic syndrome. *Clin Chem Lab Med* 2008; 46: 150-1.

55. Tokumura A, Kume T, Fukuzawa K, Tahara T, Tasaka K, Aoki J, et al. Peritoneal fluids from patients with certain gynecologic tumor contain elevated levels of bioactive lysophospholipase D activity. *Life Sci* 2007; 80: 1641-9.
56. Inoue M, Rashid MH, Fujita R, Contos JJ, Chun J, Ueda H. Initiation of neuropathic pain requires lysophosphatidic acid receptor signaling. *Nat Med* 2004; 10: 712-8.
57. Inoue M, Ma L, Aoki J, Chun J, Ueda H. Autotaxin, a synthetic enzyme of lysophosphatidic acid (LPA), mediates the induction of nerve-injured neuropathic pain. *Mol Pain* 2008; 4: 6.
58. Inoue M, Xie W, Matsushita Y, Chun J, Aoki J, Ueda H. Lysophosphatidylcholine induces neuropathic pain through an action of autotaxin to generate lysophosphatidic acid. *Neuroscience* 2008; 152: 296-8.
59. Gesta S, Simon MF, Rey A, Sibrac D, Girard A, Lafontan M, Valet P, Saulnier-Blache JS. Secretion of a lysophospholipase D activity by adipocytes: involvement in lysophosphatidic acid synthesis, *J Lipid Res* 2002; 43: 904-10.
60. Boucher J, Quilliot D, Praderes JP, Simon MF, Gres S, Guigne C, et al. Potential involvement of adipocyte insulin resistance in obesity-associated up-regulation of adipocyte lysophospholipase D/autotaxin expression, *Diabetologia* 2005; 48: 569-77.
61. Yang SY, Lee J, Park CG, Kim S, Hong S, Chung HC, Min SK, et al. Expression of autotaxin (NPP-2) is closely linked to invasiveness of breast cancer cells. *Clin Exp Metastasis* 2002; 19: 603-8.
62. Stassar MJ, Devit G, Brosius M, Rinnab L, Prang J, Schradin T, et al. Identification of human renal cell carcinoma associated genes by suppression subtractive hybridization. *Br J Cancer* 2001; 85: 1372-82.
63. Baumforth KR, Flavell JR, Reynolds GM, Davies G, Pettit TR, Wei W, et al. Induction of autotaxin by the Epstein-Barr virus promotes the growth and survival of Hodgkin lymphoma cells. *Blood* 2005; 106: 2138-46.
64. Zhang G, Zhao Z, Xu S, Ni L, Wang X. Expression of autotaxin mRNA in human hepatocellular carcinoma. *Chin Med J (Engl)* 1999; 112: 330-2.
65. Kishi Y, Okudaira S, Tanaka M, Hama K, Shida D, Kitayama J, et al. Autotaxin is overexpressed in glioblastoma multiforme and contributes to cell motility of glioblastoma by converting lysophosphatidylcholine to lysophosphatidic acid. *J Biol Chem* 2006; 281: 17492-500.
66. Liu S, Umezū-Goto M, Murph M, Lu Y, Liu W, Zhang F, et al. Expression of autotaxin and lysophosphatidic acid receptors increases mammary tumorigenesis, invasion, and metastases. *Cancer Cell* 2009; 15: 539-50.

67. Nam SW, Clair T, Campo CK, Lee HY, Liotta LA, Stracke ML. Autotaxin (ATX), a potent tumor motogen, augments invasive and metastatic potential of ras-transformed cells, *Oncogene* 2000; 19: 241–7.
68. Black EJ, Clair T, Delrow J, Neiman P, Gillespie DA. Microarray analysis identifies autotaxin, a tumour cell motility and angiogenic factor with lysophospholipase D activity, as a specific target of cell transformation by v-Jun, *Oncogene* 2004; 23: 2357–66.
69. Wang W, Wu F, Fang F, Tao Y, Yang L. Inhibition of invasion and metastasis of hepatocellular carcinoma cells via targeting RhoC in vitro and in vivo, *Clin Cancer Res* 2008; 14: 6804–12.
70. Taghavi P, Verhoeven E, Jacobs JJ, Lambooi JP, Stortelers C, Tanger E, et al. In vitro genetic screen identifies a cooperative role for LPA signaling and c-Myc in cell transformation, *Oncogene* 2008; 27: 6806–16.
71. Huang RY, Wang SM, Hsieh CY, Wu JC. Lysophosphatidic acid induces ovarian cancer cell dispersal by activating Fyn kinase associated with p120-catenin, *Int J Cancer* 2008; 123: 801–9.
72. Kenny PA, Enver T, Ashworth. Receptor and secreted targets of Wnt-1/beta-catenin signalling in mouse mammary epithelial cells, *BMC Cancer* 2005; 5: 3.
73. Chen M, O'Connor KL. Integrin alpha6beta4 promotes expression of autotaxin/ENPP2 autocrine motility factor in breast carcinoma cells, *Oncogene* 2005; 24: 5125–30.
74. Boutin JA, Ferry G. Autotaxin, *Cellular and Molecular Life Sciences* 2009; 66: 3009-21.
75. Tokumura A. Physiological and pathophysiological roles of lysophosphatidic acids produced by secretory lysophospholipase D in body fluids. *Biochimica et Biophysica Acta* 2002; 1582: 18–25.
76. Scales SJ, Scheller RH. Cell Biology: Lipid membranes shape up, *Nature* 1999; 401: 123-4.
77. Moolenaar WH, van Meeteren LA, Giepmans BNG. The ins and outs of lysophosphatidic acid signaling, *BioEssays* 2004; 26(8): 870-81.
78. Xie Y, Gibbs TC, Meier KE. Lysophosphatidic acid as an autocrine and paracrine mediator, *Biochimica et Biophysica Acta* 2002; 1582(1-3): 270-81.
79. Tokumura A, Yamano S, Aono T, Fukuzawa K. Lysophosphatidic acids produced by lysophospholipase D in mammalian serum and body fluid, *Annals of the New York Academy of Science* 2000; 905: 347-50.
80. Pagès C, Simon MF, Valet P, Saulnier-Blache JS. Lysophosphatidic acid synthesis and release, *Prostaglandins Other Lipid Mediators* 2001; 64(1-4): 1-10.

81. Aoki J. Mechanism of lysophosphatidic acid production, *Seminars in Cell & Development Biology* 2004; 15(5): 477-89.
82. Aoki J, Inoue A, Okudaira S. Two Pathways for Lysophosphatidic acid Production, *Biochimica et Biophysica Acta* 2008; 1781: 513-8.
83. Tigyi G, Parrill AL. Molecular mechanisms of lysophosphatidic acid action, *Progress in Lipid Research* 2003; 42: 498-526.
84. Geiger O, González-Silva N, López-Lara IM, Sohlenkamp C. Amino acid-containing membrane lipids in bacteria, *Progress in Lipid Research* 2010; 49: 46–60.
85. Choi JW, Herr DR, Noguchi K, Yung YC, Lee CW, Mutoh T, et al. LPA receptors: subtypes and biological actions. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2010; 50: 157-86.
86. Anliker B, Chun J. Cell surface receptors in lysophospholipid signaling. *Semin Cell Dev Biol* 2004; 15(5): 457-65.
87. An S, Goetzl EJ, Lee H. Signaling mechanisms and molecular characteristics of G protein-coupled receptors for lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate. *J Cell Biochem Suppl* 1998; 30-31: 147-57.
88. Contos JJ, Ishii I, Chun J. Lysophosphatidic acid receptors. *Mol Pharmacol* 2000; 58(6): 1188-96.
89. Balazs L, Okolicany J, Ferrebee M, Tolley B, Tigyi G. Topical application of the phospholipid growth factor lysophosphatidic acid promotes wound healing in vivo, *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2001; 280: 466–72.
90. Sturm A, Dignass AU. Modulation of gastrointestinal wound repair and inflammation by phospholipids. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1582: 282–8.
91. Sugiura T, Nakane S, Kishimoto S, Waku K, Yoshioka Y, Tokumura A. Lysophosphatidic acid, a growth factor-like lipid, in the saliva. *J Lipid Res* 2002; 43: 2049–55.
92. Siess W, Tigyi G. Thrombogenic and atherogenic activities of lysophosphatidic acid. *J Cell Biochem* 2004; 92: 1086–94.
93. Haseruck N, Erl W, Pandey D, Tigyi G, Ohlmann P, Ravanat C, et al. The plaque lipid lysophosphatidic acid stimulates platelet activation and platelet-monocyte aggregate formation in whole blood: involvement of P2Y1 and P2Y12 receptors. *Blood* 2004; 103: 2585.
94. Zhang C, Baker DL, Yasuda S, Makarova N, Balazs L, Johnson LR, et al. Lysophosphatidic acid induces neointima formation through PPAR α activation. *J Exp Med* 2004; 199: 763–74.
95. Ferry G, Tellier E, Try A, Gres S, Naime I, Simon MF, et al. Autotaxin is released from adipocytes, catalyzes lysophosphatidic acid synthesis, and activates

- preadipocyte proliferation Up-regulated expression with adipocyte differentiation and obesity. *J Biol Chem* 2003; 278: 18162–9.
96. Pages G, Girard A, Jeanneton O, Barbe P, Wolf C, Lafontan M, et al. LPA as a paracrine mediator of adipocyte growth and function. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 905: 159–64.
 97. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003; 9: 669–76.
 98. Jalink K, Eichholtz T, Postma FR, van Corven EJ, Moolenaar WH. Lysophosphatidic acid induces neuronal shape changes via a novel, receptor-mediated signaling pathway: similarity to thrombin action. *Cell Growth Differ* 1993; 4: 247–55.
 99. Kingsbury MA, Rehen SK, Contos JJ, Higgins CM, Chun J. Non-proliferative effects of lysophosphatidic acid enhance cortical growth and folding. *Nat Neurosci* 2003; 6: 1292–9.
 100. Ramakers GJ, Moolenaar WH. Regulation of astrocyte morphology by RhoA and lysophosphatidic acid. *Exp Cell Res* 1998; 245: 252–62.
 101. Inoue M, Rashid MH, Fujita R, Contos JJ, Chun J, Ueda H. Initiation of neuropathic pain requires lysophosphatidic acid receptor signaling. *Nat Med* 2004; 10: 712–8.
 102. Tokumura A, Kume T, Fukuzawa K, Tahara M, Tasaka K, Aoki J, et al. Peritoneal fluids from patients with certain gynecologic tumor contain elevated levels of bioactive lysophospholipase D activity. *Life Sci* 2007; 80(18): 1641–9.
 103. Hama K, Aoki J, Fukaya M, Kishi Y, Sakai T, Suzuki R, et al. Lysophosphatidic Acid and Autotaxin Stimulate Cell Motility of Neoplastic and Non-neoplastic Cells through LPA1, *Journal of Biological Chemistry* 2004; 279(17): 17634–9.
 104. Umezu-Goto M, Tanyi J, Lahad J, Liu S, Yu S, Lapushin R, et al. Lysophosphatidic acid production and action: validated targets in cancer?, *Journal of Cellular Biochemistry* 2004; 92: 1115–40.
 105. Kishi Y, Okudaira S, Tanaka M, Hama K, Shida D, Kitayama J, et al. Autotaxin Is Overexpressed in Glioblastoma Multiforme and Contributes to Cell Motility of Glioblastoma by Converting Lysophosphatidylcholine to Lysophosphatidic Acid, *The Journal Of Biological Chemistry* 2006; 281(25): 17492–500.
 106. Masuda A, Nakamura K, Izutsu K, Igarashi K, Ohkawa R, Jona M, et al. Serum autotaxin measurement in haematological malignancies: a promising marker for follicular lymphoma, *British Journal of Haematology* 2008; 143: 60–70.
 107. Liu S, Umezu-Goto M, Murph M, Lu Y, Liu W, Zhang F, et al. Expression of Autotaxin and Lysophosphatidic Acid Receptors Increases Mammary Tumorigenesis, Invasion, and Metastases, *Cancer Cell* 2009; 15: 539–50.

108. Yang SY, Lee J, Park CG, Kim S, Hong S, Chung HC, et al. Expression of autotaxin (NPP-2) is closely linked to invasiveness of breast cancer cells, *Clinical & Experimental Metastasis* 2002; 19: 603–8.
109. Gaetano CG, Samadi N, Tomsig JL, Macdonald TL, Lynch KR, Brindley DN. Inhibition of autotaxin production or activity blocks lysophosphatidylcholine-induced migration of human breast cancer and melanoma cells, *Molecular Carcinogenesis* 2009; 48(9): 801-9.
110. Samadi N, Bekele RT, Goping IS, Schang LM, Brindley DN. Lysophosphatidate induces chemo-resistance by releasing breast cancer cells from taxol-induced mitotic arrest, *PLoS One* 2011; 6(5): 20608.
111. Tavasolli FA, Devilee P. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of the Breast and Female Genital Organs. Lyon, IARC Press 2003; 9-113.
112. 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.
113. Boyle P, Levin B. World Cancer Report 2008: IARC Nonserial Publication 2008.
114. Berry DA, Cronin KA, Plevritis SK, Fryback DG, Clarke L, Zelen M. Effect of screening and adjuvant therapy on mortality from breast cancer. *N Engl J Med* 2005; 353(17): 1784-92.
115. Lester SC. The Breast. In: Kumar V, Abbas AK, Fausto N ed. Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease. Philadelphia: 7th ed. Elsevier Saunders 2005; 1119-54.
116. Howlader N, Noone AM, Krapcho M, Neyman N, Aminou R, Altekruse SF, et al (eds). SEER Cancer Statistics Review, 1975-2009 (Vintage 2009 Populations), National Cancer Institute. Bethesda, MD, http://seer.cancer.gov/csr/1975_2009_pops09/ based on November 2011 SEER data submission, posted to the SEER web site, 2012.
117. Lahmann PH, Hoffmann K, Allen N, van Gils CH, Khaw KT, Tehard B, et al. Body size and breast cancer risk: findings from the European Prospective Investigation into Cancer And Nutrition (EPIC), *Int J Cancer* 2004; 20; 111(5): 762-71.
118. Vigneri P, Frasca F, Sciacca L, Pandini G, Vigneri R. Diabetes and cancer. *Endocr Relat Cancer* 2009; 16: 1103–23.
119. Larsson SC, Mantzoros CS, Wolk A. Diabetes mellitus and risk of breast cancer: a meta-analysis. *Int J Cancer* 2007; 121: 856–62.
120. Pompella A, Corti A, Paolicchi A, Giommarelli C, Zunino F. Gamma-glutamyltransferase, redox regulation and cancer drug resistance. *Curr Opin Pharmacol* 2007; 7: 360–6.

121. Van Hemelrijck M, Jassem W, Walldius G, Fentiman IS, Hammar N, Lambe M, et al. Gamma-glutamyltransferase and risk of cancer in a cohort of 545,460 persons - the Swedish AMORIS study. *Eur J Cancer* 2011; 47(13): 2033-41.
122. Usoro NI, Omabbe MC, Usoro CA, Nsonwu A. Calcium, inorganic phosphates, alkaline and acid phosphatase activities in breast cancer patients in Calabar, Nigeria, *Afr Health Sci* 2010; 10(1): 9-13.
123. Amin KA, Mohamed BM, El-Wakil MA, Ibrahim SO. Impact of breast cancer and combination chemotherapy on oxidative stress, hepatic and cardiac markers. *J Breast Cancer* 2012; 15(3): 306-12.
124. Abdelsalam KE, Hassan IK, Sadig IA. The role of developing breast cancer in alteration of serum lipid profile. *J Res Med Sci* 2012; 17(6): 562-5.
125. Duffy MJ. Serum Tumor Markers in Breast Cancer: Are They of Clinical Value?, *Clinical Chemistry* 2006; 52: 3; 345-51.
126. Safi F, Kohler I, Röttinger E, Beger HG. The value of the tumour marker CA15.3 in diagnosing and monitoring breast cancer. *Cancer* 1991; 68: 574-82.
127. Kurebayashi J, Nomura T, Hirono M, Okubo S, Udagawa K, Shiiki S, et al. Combined measurement of serum sialyl Lewis X with serum CA15-3 in breast cancer patients. *Jpn J Clin Oncol* 2006; 36(3): 150-3.
128. Nakamura K, Ohkawa R, Okubo S, Tozuka M, Okada M, Aoki S, et al. Measurement of lysophospholipase D/autotaxin activity in human serum samples. *Clin Biochem* 2007; 40(3-4): 274-7.
129. Nakamura K, Igarashi K, Ide K, Ohkawa R, Okubo S, Yokota H, et al. Validation of an autotaxin enzyme immunoassay in human serum samples and its application to hypoalbuminemia differentiation. *Clin Chim Acta* 2008; 388(1-2): 51-8.
130. Masuda A, Nakamura K, Izutsu K, Igarashi K, Ohkawa R, Jona M, et al. Serum autotaxin measurement in haematological malignancies: a promising marker for follicular lymphoma, *Br J Haematol* 2008; 143(1): 60-70.
131. Nakai Y, Ikeda H, Nakamura K, Kume Y, Fujishiro M, Sasahira N, et al. Specific increase in serum autotaxin activity in patients with pancreatic cancer. *Clin Biochem* 2011; 44(8-9): 576-81.
132. Baker DL, Desiderio DM, Miller DD, Tolley B, Tigyí GJ. Direct Quantitative Analysis of Lysophosphatidic Acid Molecular Species by Stable Isotope Dilution Electrospray Ionization Liquid Chromatography±Mass Spectrometry, *Analytical Biochemistry* 2001; 292: 287-95.
133. Kishimoto T, Matsuoka T, Imamura S, Mizuno K. A novel colorimetric assay for the determination of lysophosphatidic acid in plasma using an enzymatic cycling method, *Clin Chim Acta* 2003; 333(1): 59-67.

134. Hosogaya S, Yatomi Y, Nakamura K, Ohkawa R, Okubo S, Yokota H, et al. Measurement of plasma lysophosphatidic acid concentration in healthy subjects: strong correlation with lysophospholipase D activity, *Ann Clin Biochem* 2008; 45(Pt 4): 364-8.
135. Xu Y, Shen Z, Wiper DW, Wu M, Morton RE, Elson P, et al. Lysophosphatidic acid as a potential biomarker for ovarian and other gynecologic cancers, *JAMA* 1998; 280(8): 719-23.
136. Rosai J. *Rosai and Ackerman's Surgical Pathology*, Mosby, Ninth edition, Edinburg 2004; 1764-876.
137. Howlader N, Noone AM, Krapcho M, Garshell J, Neyman N, Altekruse SF, et al (eds). *SEER Cancer Statistics Review, 1975-2010*, National Cancer Institute. Bethesda, MD, http://seer.cancer.gov/csr/1975_2010/, based on November 2012 SEER data submission, posted to the SEER web site, April 2013.
138. Bloom HJG, Richardson WW. Histological grading and prognosis in breast cancer, *Br J Cancer* 1957; 11(3): 359-77.
139. Burstein HJ, Haris JR, Morrow M, *Malignant Tumors of the Breast*, DeVita VT, Lawrence TS, Rosenberg SA, *Cancer Principles & Practice of Oncology*, Lippincott Williams, 8th edition 2008; 2: 1632-4.
140. Speirs V, Walker RA. New perspectives into the biological and clinical relevance of oestrogen receptors in the human breast. *J Pathol* 2007; 211: 499-506.
141. Anderson E. The role of oestrogen and progesterone receptors in human mammary development and tumorigenesis, *Breast Cancer Res* 2002; 4: 197-201.
142. Hanna W. Testing for HER2 status, *Oncology* 2001; 61: 22-30.
143. Popnikolov NK, Dalwadi BH, Thomas JD, Johannes GJ, Imagawa WT. Association of autotaxin and lysophosphatidic acid receptor 3 with aggressiveness of human breast carcinoma, *Tumour Biol* 2012; 33(6): 2237-43.
144. Shida D, Watanabe T, Aoki J, Hama K, Kitayama J, Sonoda H, et al. Aberrant expression of lysophosphatidic acid (LPA) receptors in human colorectal cancer. *Lab Invest* 2004; 84(10): 1352-62.
145. Kitayama J, Shida D, Sako A, Ishikawa M, Hama K, Aoki J, et al. Over-expression of lysophosphatidic acid receptor-2 in human invasive ductal carcinoma, *Breast Cancer Res* 2004; 6(6): R640-6.
146. Hama K, Aoki J, Fukaya M, Kishi Y, Sakai T, Suzuki R, et al. Lysophosphatidic acid and autotaxin stimulate cell motility of neoplastic and non-neoplastic cells through LPA1, *J Biol Chem* 2004; 279(17): 17634-9.
147. Yang SY, Lee J, Park CG, Kim S, Hong S. Expression of autotaxin (NPP-2) is closely linked to invasiveness of breast cancer cells, *Clin Exp Metastasis* 2002; 19: 603-8.