



TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
MARMARA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MEME KANSERLİ OLGULARDA  
TROMBOSİT GLİKOPROTEİN IIB/IIIA  
(GPIIB/IIIA) RESEPTÖRÜNÜN İZOLASYONU VE  
GENETİK POLİMORFİZMİ**

İlyas Samet ERGÜN  
DOKTORA TEZİ

BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN  
Doç. Dr. Şermin TETİK

İSTANBUL-2012





TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
MARMARA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MEME KANSERLİ OLGULARDA  
TROMBOSİT GLİKOPROTEİN IIB/IIIA  
(GPIIB/IIIA) RESEPTÖRÜNÜN İZOLASYONU VE  
GENETİK POLİMORFİZMİ**

İlyas Samet ERGÜN  
DOKTORA TEZİ

BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN  
Doç. Dr. Şermin TETİK

İSTANBUL-2012

## TEZ ONAYI

Kurum : Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
Programın seviyesi : Doktora  
Anabilim Dalı : Biyokimya  
Tez Sahibi : İlyas Samet ERGÜN  
Tez Başlığı : Meme Kanseri Olgularında Trombosit Glikoprotein IIB/IIIA  
Reseptörünün İzolasyonu ve Genetik Polimorfizmi  
Sınav Yeri : Marmara Üni Eczacılık Fakültesi Dekanlık Toplantı Salonu  
Sınav Tarihi : 18.06.2012

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

**Danışman (Unvan, Adı, Soyadı)**

Doç Dr Şermin Tetik

**Kurumu**

Marmara Üni Eczacılık Fakültesi

**İmza**



**Sınav Jüri Üyeleri (Unvan, Adı, Soyadı)**

Prof Dr Turay Yardımcı

Prof Dr Ayşen Yarat

Uluslararası Kıbrıs Üni.

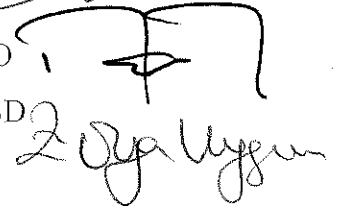
Marmara Üni. Diş Hekimliği Fak

Prof Dr Nusret Erdoğan

Marmara Üni Sağlık Hizmetleri MYO

Prof Dr Oya Uyguner

İstanbul Üni. İst. Tıp Fak Tıb.Gen.ABD



Yukarıdaki jüri kararı Enstitü Yönetim Kurulu'nun 12/07/2012 tarih ve .11. sayılı kararı ile onaylanmıştır.



Prof. Dr. Feyza ARICIOĞLU

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

## **II. BEYAN FORMU**

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

Tarih

İlyas Samet Ergün

İmza

### III. ÖNSÖZ-TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim sırasında bilgi, deneyimlerini aktaran, emeklerini esirgemeyen hatalarımı anlayışla düzelten tez danışmanım Doç. Dr. Şermin Tetik ve ideallerimi gerçekleştirebilmem için ufkumu açan Prof. Dr. Turay Yardımcı'ya;

Anabilim dalı başkanımız Prof. Dr. Fikriye Uras'a, genetik çalışmalarımızda yardımlarını ve güleryüzünü esirgemeyen Doç. Dr. Oya Uyguner'e;

Her zaman yanımda oldukları için klinik şefim Prof. Dr. Nusret Erdoğan ve şef muavinim Uzm. Dr. Ayşenur Akyıldız'a, şahsımda biyokimyanın temellerini atan Prof. Dr. Nesrin Emekli ve Prof. Dr. Ayşen Yarat'a, desteklerini gördüğüm mesai arkadaşlarıma;

Bugüne kadar maddi manevi desteklerini esirgemeyen beni yüreklendiren sevgili babam, annem, kardeşim Sedef, Mustafa babam, Neriman anneme;

Beni her konuda destekleyen, sabır ve azim konusunda örnek aldığım eşim Elif ve canım kızım Azra'ya

Teşekkür ve sevgilerimle...

İlyas Samet Ergün

Haziran 2012

## **IV. İÇİNDEKİLER**

<b>I. TEZ ONAYI FORMU</b>	<b>i</b>
<b>II. BEYAN FORMU</b>	<b>ii</b>
<b>III. ÖNSÖZ-TEŞEKKÜR</b>	<b>iii</b>
<b>IV. İÇİNDEKİLER</b>	<b>iv</b>
<b>V. KISALTMA VE SİMGELER</b>	<b>ix</b>
<b>VI. ŞEKİL, RESİM VE TABLOLAR LİSTESİ</b>	<b>xi</b>
<b>1. ÖZET</b>	<b>1</b>
<b>2. SUMMARY</b>	<b>2</b>
<b>3. GİRİŞ VE AMAÇ</b>	<b>3</b>
<b>4. GENEL BİLGİLER</b>	<b>4</b>
<b>4.1. Kanserin Tanımı</b>	<b>4</b>
<b>4.2 Kanser Nedenleri</b>	<b>4</b>
<b>4.3 Kanser ve Genetik</b>	<b>4</b>
<b>4.4 Meme Kanseri</b>	<b>5</b>
<b>4.4.1 Epidemiyoloji ve insidansı</b>	<b>5</b>
<b>4.4.2 Etyoloji</b>	<b>6</b>
<b>4.4.2.1. Hormonal etkiler</b>	<b>7</b>
<b>4.4.2.2. Çevresel faktörler ve yaşam tarzı</b>	<b>8</b>
<b>4.4.2.3. Genetik değişiklikler</b>	<b>10</b>
<b>4.4.3 Meme kanserinde prognostik parametreler</b>	<b>12</b>
<b>4.4.3.1. Hasta yaşı</b>	<b>12</b>

<b>4.4.3.2. Lenf nodu metastazı</b>	<b>12</b>
<b>4.4.3.3. Stromal invazyon</b>	<b>12</b>
<b>4.4.3.4. Tümör çapı</b>	<b>12</b>
<b>4.4.3.5. Tümör tipi</b>	<b>12</b>
<b>4.4.3.6. Grade</b>	<b>12</b>
<b>4.4.3.7. Evre</b>	<b>13</b>
<b>4.4.3.8. Vasküler invazyon</b>	<b>16</b>
<b>4.4.3.9. Stromal reaksiyon</b>	<b>17</b>
<b>4.4.3.10. Tümör nekrozu</b>	<b>17</b>
<b>4.4.3.11. Cilt ve meme başı invazyonu</b>	<b>17</b>
<b>4.4.3.12. Bilateralite</b>	<b>17</b>
<b>4.4.3.13. Hormon reseptörleri</b>	<b>17</b>
<b>4.4.3.14. Hücre proliferasyonu</b>	<b>17</b>
<b>4.4.3.15. Katepsin D</b>	<b>17</b>
<b>4.4.3.16. p53</b>	<b>18</b>
<b>4.4.3.17. B-cell lymphoma 2 (bcl-2)</b>	<b>18</b>
<b>4.4.3.18. CerbB-2(Her2 /Neu)</b>	<b>18</b>
<b>4.4.3.19. EGFR (HER 1)</b>	<b>19</b>
<b>4.4.3.20. BRCA1 ve BRCA2</b>	<b>19</b>
<b>4.4.4 Meme kanseri patogenezi</b>	<b>20</b>
<b>4.4.5 Kanserde invazyon ve metastaz yeteneği</b>	<b>21</b>
<b>4.4.5.1. Ekstrasellüler matriksin invazyonu</b>	<b>21</b>

<b>4.4.5.2. Tümör hücrelerinin vasküler yayılımı ve yerleşimi</b>	<b>23</b>
<b>4.5 Adezyon Molekülleri</b>	<b>24</b>
<b>4.5.1 İntegrinler</b>	<b>24</b>
<b>4.5.2 İntegrinlerle ilgili patolojiler</b>	<b>27</b>
<b>4.6 Trombositler</b>	<b>30</b>
<b>4.6.1 Trombosit morfolojisi</b>	<b>30</b>
<b>4.6.2 Trombosit aktivasyonu</b>	<b>31</b>
<b>4.6.2.1. Trombosit adezyonu</b>	<b>31</b>
<b>4.6.2.2. Trombosit agregasyonu</b>	<b>32</b>
<b>4.6.2.3. Trombosit Sekresyonu</b>	<b>33</b>
<b>4.6.3 Trombosit aktivasyonunun biyokimyasal mekanizması</b>	<b>33</b>
<b>4.6.4 Trombosit Membran Glikoproteinleri</b>	<b>36</b>
<b>4.6.4.1. GP IIb/IIIa (CD41/CD61) fibrinojen reseptörü</b>	<b>37</b>
<b>4.6.4.2. P-Selektin (CD 62, GMP-140, PADGEM)</b>	<b>38</b>
<b>4.7 Polimorfizmler</b>	<b>40</b>
<b>4.7.1 Meme kanseri ve glikoprotein genlerindeki çeşitli TNP'ler</b>	<b>41</b>
<b>4.8 ITGA2B Geni c.2621T&gt;G Polimorfizmi</b>	<b>43</b>
<b>4.8.1 ITGA2B c.2621T&gt;G (rs5911) gen polimorfizmi sıklığı</b>	<b>44</b>
<b>5. GEREÇ ve YÖNTEM</b>	<b>47</b>
<b>5.1 Kullanılan Araç ve Gereçler</b>	<b>47</b>
<b>5.2 Kullanılan Kimyasal Maddeler</b>	<b>48</b>
<b>5.3 Kullanılan Tampon Çözeltiler</b>	<b>49</b>
<b>5.4 DNA İzolasyonunda Kullanılan Kimyasallar</b>	<b>49</b>

<b>5.5 Polimeraz Zincir Reaksiyonunda Kullanılan Çözeltiler</b>	<b>49</b>
5.5.1 Nükleotid karışımı (dNTP)	49
5.5.2 Primer stok çözeltisi	50
<b>5.6 Agaroz Jel Elektrofrezinde Kullanılan Çözeltiler</b>	<b>50</b>
5.6.1 50 bp'lik DNA ladder marker	50
5.6.2 % 2 Agaroz jel çözeltisi	50
5.6.3 Yükleme tamponu ( 450 ml)	50
5.6.4 1X Yükleme tamponu	50
<b>5.7 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR / PZR)</b>	<b>50</b>
5.7.1 Kullanılan primerler	51
5.7.2 ITGA2B geni için kullanılan PCR karışımı	52
5.7.3 ITGA2B geni için kullanılan PCR program	52
5.7.4 Kullanılan kesim karışımı	53
<b>5.8. Agaroz Jel Elektrofrez</b>	<b>53</b>
<b>5.9 Restriksiyon Enzimi Kesim Bölgesi</b>	<b>53</b>
<b>5.10 DNA İzolasyonu</b>	<b>54</b>
<b>5.11 Moleküler Analiz</b>	<b>55</b>
<b>5.12 Elektrofrez İşlemi</b>	<b>56</b>
<b>5.13 Restriksiyon Enzimi Parça Uzunluk Polimorfizmi (RFLP) İşlemi</b>	<b>56</b>
<b>5.14 Verilerin Değerlendirilmesi</b>	<b>57</b>
<b>5.15 İstatistiksel Analiz</b>	<b>57</b>
<b>6. BULGULAR</b>	<b>58</b>
<b>7. TARTIŞMA</b>	<b>61</b>

<b>8. KAYNAKLAR</b>	<b>64</b>
<b>9. ÖZGEÇMİŞ</b>	<b>71</b>

## V. KISALTMA VE SİMGELER

□	: Alfa
β	: Beta
bcl-2	: 8.4.3.17. B-cell lymphoma 2
bp	: Baz çifti
BRCA1	: Breast cancer 1
BRCA2	: Breast cancer 2
CCR7	: C-C chemokine receptor type 7
CD	: Cluster of Differentiation (Hücre yüzey antijeni)
DCIS	: Duktal karsinoma insitu (İnsitu duktal karsinoma)
DNA	: Deoksiribo nükleik asit
ER	: Östrojen
EGFR	: Epidermal growth factor receptor (Epidermal büyüme faktör reseptörü)
FISH	: Floresan insitu hibridizasyon
GF 1	: Growth factor 1 (Büyüme faktörü 1)
GF 2	: Growth factor 2 (Büyüme faktörü 2)
GP IIb/IIIa	: Glikoprotein IIb/IIIa
GP IIb	: Glikoprotein IIb
GP IIIa	: Glikoprotein IIIa
HER 1	: Human epidermal growth factor receptor 1
HER 2	: Human epidermal growth factor receptor 2
HER 3	: Human epidermal growth factor receptor 3
HER 4	: Human epidermal growth factor receptor 4
ITGA2B	: İntegrin alfa zincir 2b
ITGB3	: İntegrin beta zincir beta 3
kD	: Kilodalton
LCIS	: Lobuler karsinoma insitu

MMP	: Matriks metalloproteaz
PCNA	: Proliferating Cell Nuclear Antigen
PCR (PZR)	: Polimeraz zincir reaksiyonu
PI A1	: Trombosit alloantijen 1
PI A2	: Trombosit alloantijen 2
PR	: Progesteron
RFLP	: Restriction fragment length polymorphism
RGD	: Arginin-glisin-asparagin
TNP	: Tek nükleotid polimorfizmi
TXA2	: Trombaxan A2
VLA	: Very Late Activation
vWF :	: Von Willebrand faktörü

## VI. ŞEKİL, RESİM VE TABLOLAR LİSTESİ

### Tablo Listesi

Tablo 1: Trombosit Membran Glikoproteinleri

Tablo 2: DNA İzolasyonunda Kullanılan Kit İçeriği

Tablo 3: Hasta ve kontrol grubunun demografik verileri

Tablo 4: Hasta grubunun haplotip dağılımı, yaş ve meme kanserine ait prognostik parametreleri gösteren tablo.

Tablo 5: Hasta grubu tümör çapları genotip dağılımı

Şekil 4: Hasta grubu genotiplere göre tumor çap büyüklükleri

Tablo 6: Hasta grubu genotiplere göre lenfovasküler invazyon durumu

Tablo 7: Hasta grubu genotiplere göre lenf nodu metastazı durumu

Tablo 8: Hasta grubu genotiplere göre ER poz./neg. durumu

Tablo 9: Hasta grubu genotiplere göre PR poz./neg. durumu

Tablo 10: Hasta grubu genotiplere göre histolojik grade durumu

Tablo 11: Hasta grubu genotiplere göre nükleer grade durumu

Tablo 12: Kanserli olguların ve kontrol grubunun genotipleri

## **Şekil Listesi**

Şekil 1: Türkiye’de kadınlarda en sık görülen 10 kanser türü (T.C Sağlık Bakanlığı İstatistikleri)

Şekil 2: İntegrinlerin yapısı

Şekil 3: GP IIb/IIIa yapısı

Şekil 4: Yaşa göre tümör çapı büyüklüğü

Şekil 5: Hasta grubu genotiplere göre tumor çap büyüklükleri

## 1. ÖZET

Meme kanseri kadın kanserlerinin dörtte birinin fazlasından sorumlu olan mortalite oranı yüksek bir malignitedir. Adeziv molekülleri kodlayan genlerdeki polimorfizmler meme kanseri gelişiminde, kanser prognozunda (invazyon, metastaz v.b) önemli rol oynamaktadırlar. Glikoprotein IIb'yi kodlayan 17. kromozomun uzun kolunda lokalize ITGA2B geni üzerinde bugüne kadar 344 adet tek nükleotidlik polimorfizm saptanmıştır. Bu çalışma meme kanseri riski ve prognozu ile ITGA2B geni rs 5911 polimorfizmi arasındaki ilişkiyi araştırmak üzere planlanmıştır. Deney grubu klinik ve histopatolojik olarak meme kanseri tanısı almış kadın hastalardan, kontrol grubu ise sağlıklı bireylerden oluşmuştur. Her iki grubun kanlarından DNA izole edildikten sonra PCR ve RFLP metotları kullanılarak genotip varyasyonları tespit edilmiştir. Hastaların östrojen ve progesteron resöptör varlığı immunhistokimyasal metotlar kullanılarak tespit edilmiştir. Hasta grubunun kanser prognozuna ait değerlerine patoloji raporlarından ulaşılmıştır. Hasta grubunun genotip dağılımı % 30 TT (normal), % 53.3 TG (heterozigot polimorfik), % 16.6 GG (homozigot polimorfik) kontrol grubunun genotip dağılımı ise % 33.3 TT, % 60 TG, % 6.7 GG şeklinde gözlenmiştir. Araştırmamızın sonucunda ITGA2B geninde kontrol grubu ile meme kanserli hasta grupları arasında anlamlı bir fark saptanmadı. GG genotipinin genç hastalarda daha yüksek oranda bulunduğu gözlenmiştir. İstatistiksel çalışmamız sonucu GG genotipini taşımanın meme kanserli hastalarda prognostik parametrelerden olan histolojik evre ve nükleer evrenin yüksek olma riskini arttırdığı gözlemlendi. Tümör çapı, östrojen reseptörü pozitif/negatifliği, progesteron reseptörü pozitif/negatifliği, lenfovasküler invazyon ve lenf nodu metastazıyla ilgili istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç görülmedi.

### **Anahtar sözcükler:**

Glikoprotein IIb, Meme kanseri, Polimorfizm

## **2. SUMMARY**

### **Isolation and Polymorphism of Platelet Glycoprotein IIb/IIIa Receptor In Breast Cancer Cases**

Breast cancer is one of the most common maligning tumours all over the world, and it accounts for about 30% of all cancer in women. Platelet adhesive receptors play a key role in adhesive interactions necessary for tumoral invasion and metastasis. Several polymorphisms affect these molecules. There is no study on the relationship between ITGA2B rs 5911 (c.2621T>G) polymorphism and breast cancer prognostic parameters in Turkish patients with breast cancer. The aim of the study is to determine if there is polymorphism rs5911 ITGA2B gene in Turkish patients with breast cancer and to investigate the correlation between conventional clinicopathological features and gene polymorphism. Our study includes 30 patients and 24 healthy controls. After DNA purification we studied genetic determination of the ITGA2B rs 5911 polymorphism with PCR, RFLP and agarose gel electrophoresis. Then we correlated the prognostic parameters and ITGA2B polymorphism results. There is 30 female patients with breast cancer. Control consists of 24 female patients. There are % 30 TT, % 53.3 TG, % 16.6GG genotype for patients and % 33.3 TT, % 60 TG, % 6.7 GG genotype for controls. We found that there is a correlation between young age and GG ( homolog polymorphic) genotype.

#### **Key words:**

Glycoprotein IIb/IIIa, Breast cancer, Polymorphism

### 3. Giriş ve Amaç

Meme kanseri, kadınlar arasında en sık görülen malignite olup, meme dokusunda, normal hücre davranışını düzenleyen mekanizmaların bozulması ve buna bağlı olarak hücrelerin kontrolsüz çoğalması ve yayılması sonucu oluşan bir hastalıktır. Son yıllarda meme kanseri riski ve prognostik parametreleri ile GIIb/IIIa reseptörünü kodlayan ITGA2B geni arasındaki ilişki gösterilmiş ancak ITGA2B geni c.2621T>G polimorfizmini araştıran bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu çalışmada, Türk meme kanserli kadın hastalar ITGA2B geninin 26. ekzonundaki c.2621T>G (rs5911) polimorfizmi açısından taranarak, polimorfik dağılışın hastaların klinikopatolojik bulgularıyla olası ilişkisi araştırıldı.

Genetik faktörlerin ve polimorfizmlerin meme kanserinde önemli olduğunun bildirilmesine karşın (Ruhi 2010), meme kanserinde ITGA2B rs 5911 polimorfizmi ile yapılmış bir çalışma bulunmaktadır. Hipotezimizde adeziv molekülleri etkileyen bu polimorfizmlerden birinin meme kanserinde bir rolünün olup olmadığı sorgulandı. Hücrelerin adezyon mekanizmalarında ve tümoral progresyonda rol alan trombositlerin asıl adezyon molekülleri olan integrinlerle ilgili veriler hipotezimizi desteklemektedir (Ayala, Corral, Gonz´alez-Conejero, S´anchez, Moraleda and Vicente 2003) (Güç 2004) (Wang-Gohrke and Chang-Claude 2005).

Bu çalışma meme kanserinde ITGA2B rs 5911 gen polimorfizminin rolünü araştıran ilk çalışmadır. Bu çalışmanın amacı, Türk meme kanserli kadın hasta popülasyonunda trombosit membran integrinlerinden Glikoprotein IIb/IIIa kompleksinin alt birimi olan Glikoprotein IIb'yi kodlayan ITGA2B geni ile ve metastaz, invazyon gibi tümör gelişim ve yayılım sürecindeki prognostik parametreler arasındaki muhtemel ilişkiyi araştırmaktır. Bu çalışmada, ITGA2B geninin polimorfizmi için genotip dağılımlarını ve allel frekansını araştırmak ve bu polimorfizmler ile meme kanseri ve prognostik parametreler arasındaki ilişkiyi ortaya koymak amaçlanmıştır.

Kadınlarda en sık görülen kanserlerden biri olan meme kanserinde, ITGA2B genindeki polimorfizmlerin meme kanseri gelişme riskiyle ilişkili olduğuna dair çalışmalar mevcuttur. ITGA2B geninin 26. eksonundaki sözü geçen tek nükleotid polimorfizmiyle meme kanseri riski ve prognozu ile ilgili çalışma bulunmasa da, çeşitli polimorfizmlerle büyük epidemiyolojik çalışmalar yapılmıştır. Türk popülasyonunda böyle bir çalışma mevcut değildir.

## **4. GENEL BİLGİLER**

### **4.1 Kanserin Tanımı**

Kanser, normal hücrelerin hemostaz mekanizmalarının kontrolünden çıkıp kontrolsüz ve spontan olarak çoğalabilen ve komşu dokulara invazyon yapabilen hücre şekillerine dönüşmeleridir. Neoplastik büyüme, malign hücre populasyonunun kontrolsüz yayılım gösterdiği otonom bir proses olarak tanımlanmaktadır. Pek çok kanser hücresi, kanser tipine bağlı olarak moleküler ve biyokimyasal özelliklere sahiptir. Bu özellikler, büyüme sinyallerine karşı kendi kendine yetmesi, büyümeyi inhibe eden sinyallere duyarsızlık, apoptozdan kaçınması, sınırsız replikasyon potansiyeli, anjiyogenezin sürdürülmesi, doku invazyonu ve metastazı kapsamaktadır (Hanahan and Weinberg 2000).

### **4.2 Kanser Nedenleri**

Çeşitli karsinojenler nükleotid değişikliklerine neden olur ve normal hücreler atipi kazanır ve kanser hücresine dönüşür. Bu hücreler, sınırsız mitoz yeteneği, metastaz yapabilme ve immün sistemin savunma yapmasını engelleme gibi yeni kazanılmış bazı özelliklere sahiptir. Kanser oluşumu başlıca dört durumla ilgilidir: karsinojen miktarı, karsinojen etkisinde kalma süresi, genetik yatkınlık ve uyarıcı etkenlerin varlığı (<http://www.anticancer.net/resan/basis.html>. Erişim tarihi: 12.01.2007).

### **4.3 Kanser ve Genetik**

Neoplazi gelişme riskinden sorumlu tutulan yüzlerce genetik kusur bulunmaktadır. Çocukluk çağı kanserlerinin %30'dan fazlası genetik yatkınlığı olan bireylerde izlenmekteyken, erişkinlerde bu oran %5–10 kadardır. Hastalığıdaki genetik geçiş oranı düşük gibi görünmesine karşın, daha önemli bir etken olduğu belirtilen çevresel

karsinogenlerin etkileri ise kişilerdeki genetik varyasyonlar nedeniyle artmış ya da azalmış olarak ortaya çıkmaktadır. Kalıtsal olarak kansere yatkınlığı arttıran genler sıklıkla hücre büyüme ve diferansiyasyonunun kontrolünde, DNA onarımında ve genomik bütünlüğün sağlanmasında kilit rol oynamaktadırlar (Bae and Brown 2001).

#### **4.4 Meme Kanseri**

Meme kanseri, meme dokusunda, normal hücre davranışını düzenleyen mekanizmaların bozulması ve buna bağlı olarak hücrelerin kontrolsüz çoğalması ve yayılması sonucu oluşan bir hastalıktır (<http://www.cancer.gov/cancertopics/types/breast>. Erişim: 21.01.2007).

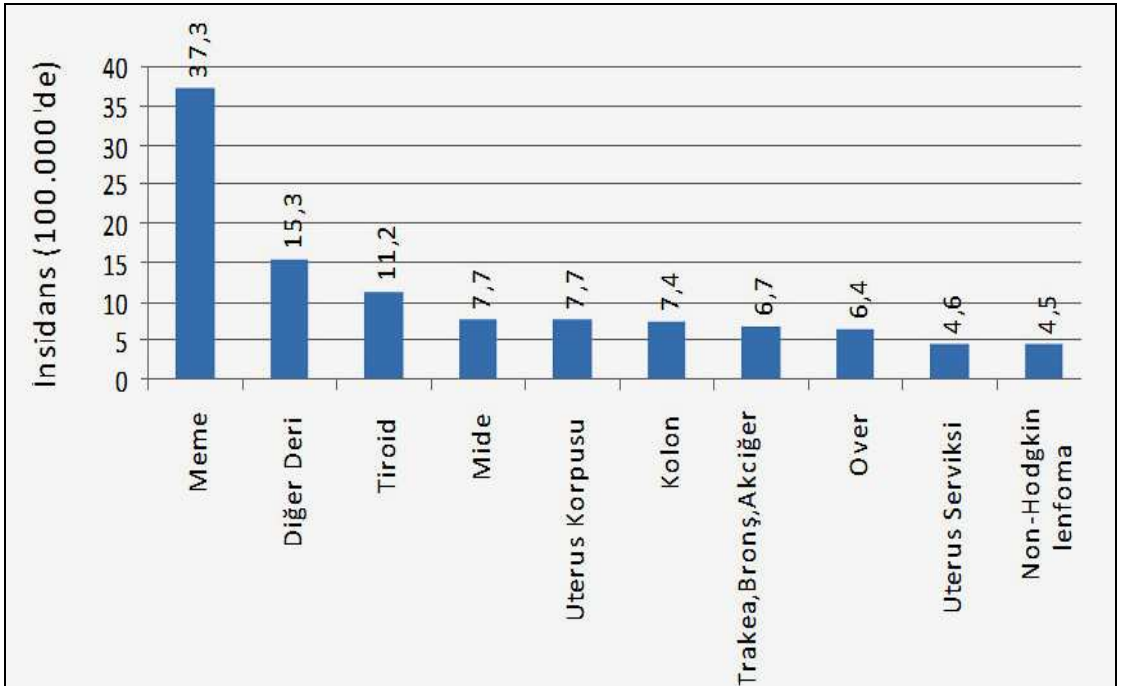
##### **4.4.1 Epidemiyoloji ve insidansı**

Meme kanseri, kadınlar arasında en sık görülen malignite olup, Sağlık Bakanlığı verilerine göre kadınlarda görülen tüm kanserlerin yaklaşık %30'unu oluşturmaktadır (Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı İstatistikleri 1999). Avrupa'da yılda 180 000, Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) yılda 184 000 yeni olgu saptanmaktadır. Meme kanseri sıklığı dünya üzerinde ülkeden ülkeye farklılık göstermektedir. Hawaii, Kaliforniya, Kanada yılda yüz binde 80-90 görülme sıklığı ile ilk sıralarda yer alırken, aynı değer Japonya'da sadece yüz binde 12-15 arasındadır. 1970 yılından bu yana Japonya, Singapur ve Çin'de ekonomideki batı tarzı gelişim, yaşam alışkanlıkları ve doğurganlığın batıya benzemesi nedeniyle meme kanseri görülme oranındaki fark giderek küçülmektedir (Topuz, Aydın ve Dinçer 2003).

Avrupa ülkelerinde ise görülme sıklığı kuzey ülkelerinden güneye ve batı ülkelerinden doğuya doğru gittikçe azalmaktadır. Görülme sıklığında en büyük artış Kanada, ABD, İspanya ve İsveç'te ortaya çıkmıştır (Topuz ve ark 2003). Geçen yıllarda ABD'de yapılan bir çalışmada 2010 yılında 207 090 kadının meme kanseri tanısı alacağı, 39 840 kadının bu hastalıktan dolayı öleceği tahmin edilmiştir (Jemal, Siegel and Xu 2010). Bu rakamlara rağmen son iki yıl içerisinde meme kanseri ile ilişkili

ölümler azalmıştır (Berry, Inoue and Shen 2006). İnsitu duktal karsinoma (DCIS) 1983'te başlatılan mamografi taramalarından sonra, 1973'te 100 000'de 2.4 iken 1992 yılında 100 000'de 15.8'e çıkmıştır. ABD'de 1995 yılında saptanan meme kanserlerinin %14,4'ünü DCIS oluşturmaktadır (Tavassoli and Deville 2003). Bunun sebebi rutin tarama yöntemleri sayesinde erken tanı ile çok disiplinli tedavi yaklaşımıdır. Türkiye'de 1999 yılında 8879 olan meme kanserli kadın sayısı, 2003 yılında 12 772'ye yükselmiştir (Haydaroğlu, Dubova, Özşaran, Bölükbaşı, Yılmaz, Kapkaç, Özdedeli 2005). Ayrıca ülkemizde 2006 yılı meme kanseri insidansı yüz binde 37,6'dır (Mollahaliloğlu, Kostak, Eryılmaz 2010).

Şekil 1: Türkiye'de kadınlarda en sık görülen 10 kanser türü (T.C Sağlık Bakanlığı İstatistikleri)



Tüm kadın kanserlerinin dörtte birinin fazlasından sorumlu olan meme kanseri 1985'e kadar mortalite sıralamasında birinci iken geçen yıllarda akciğer kanseri ve kolorektal kanserin altına düşmüştür (Jordan 1988). Bu düşüşün temel nedeni olguların erken evrede saptanması ve cerrahi sonrası uygulanan adjuvan tedavi protokollerindeki

ilerlemelerdir. Bu gelişmelerin en ilgi çekici olanlarından biri 1973 yılında klinik kullanıma sunulan tamoksifen'dir.

1950'lerden 1980'lerin başlarına kadar meme kanseri riski hem gelişmiş hem de gelişmekte olan ülkelerde artmaya devam etmiş, daha sonra tanı ve tedavideki ilerlemeler sonucunda gelişmiş ülkelerdeki insidans ve mortalitesi azalmaya başlamıştır (Tavassoli et al 2003).

Kadınlarda kansere bağlı ölümlerin %18'i meme kanseri nedeniyle oluşmakta ve meme kanserine bağlı ölümler, akciğer kanseri ve kolorektal kanserlerden sonra üçüncü sırayı almaktadır (Haydaroğlu ve ark 2005). Görülme sıklığında olduğu gibi mortalite de yaşa bağlı olarak artmakta ve 80 yaşındaki 100 000 kadından 155'i meme kanserinden ölmektedir. Kadınlarda kansere bağlı ölüm nedenleri ile yaş grupları arasındaki ilişki araştırıldığında ise 15 yaş altında lösemilerin, 55-74 yaşlar arasında akciğer kanserinin, 74 yaş üstünde kolorektal kanserlerin, 40-44 yaş arasında ise meme kanserinin 1. sırada yer aldığı görülmektedir.

Kadınlar arasında en sık görülen malignite olan meme kanserinin erken tanısı için toplumun bilinçlendirilmesi ve tarama programlarına katılımı gereklidir. Toplumun hastalık belirtilerine karşı bilinçli olması ve sağlık kuruluşlarına başvuruda zaman kaybetmemesinin erken tanı oranlarını arttıracığı beklenmektedir.

#### **4.4.2 Etyoloji**

Meme kanseri biyolojik ve klinik açıdan heterojen özellikler göstermektedir. Meme kanserinde oluşan kontrolsüz hücre çoğalması genellikle genomik instabilite belirtileri ve belirli epitelyal özelliklerin ortadan kalkması gibi değişiklikler sergilemektedir. Bu yüzden kanser gelişimine neden olan moleküler mekanizmaların ve her hastanın tümörünün özelliklerinin belirlenmesi ve buna en uygun tedavi yönteminin uygulanması büyük önem taşımaktadır. Deney hayvanlarında ve in vitro meme tümörleri üzerinde yapılan çalışmalar, meme kanseri gelişiminde belli başlı üç etkinin önemli rol oynayabileceğini ortaya koymuştur (Kuzey 2007).

#### 4.4.2.1 Hormonal etkiler

Meme kanseri oluşumu ile ilgili bilinen hormonal risk faktörlerinin, memenin ER ve muhtemelen progesteronlara kümülatif maruz kalması ile ilgili olduğu sanılmaktadır (Welsch 1985) (Robinson and Jordan 1987). Normal meme epiteli östrojen (ER) ve progesteron (PR) reseptörlerine sahiptir. ER ve PR reseptörleri duktal ve lobuler hücrelerde luminal bölgede yer almaktadır ve 25 yılı aşkın süredir hormonal tedaviye cevap yeteneğini değerlendirmek amacıyla uygulanmaktadır.

Meme tümörlerinin % 60-70'i ER (+) olduğu halde ancak bunların yarısı ile üçte ikisi hormonal tedaviye yanıt verir. Buna karşılık ER (-) hastaların da bir bölümü hormon tedavisinden yararlanırlar. Endokrin tedaviye yanıt açısından önemli rol oynayan PR ekspresyonu, ER hormonu ve reseptörünün etkileşimi ile regüle edilmektedir. Hormona bağımlı meme kanserlerinde ER ve PR'nün aktivasyonu normale göre daha fazladır. Normal insan meme epitelinde PR'nün ER'ne bağımlı olup olmadığına ve luminal hücrelerde bu iki reseptörün birlikte bulunup bulunmadığı netleşmemiştir. %70 PR pozitif %25-30 PR negatif tümörlerinde hormon tedavisine cevap verir (Dickson and Lippman 2001). Negatif ER değerlerine lenf nodu tutulum pozitif olan hastalarda daha çok rastlanması ER negatifliğinin kötü prognozda daha değerli bir gösterge olduğunu düşündürmektedir. PR reseptörü ER reseptörü ile korele bir davranış sergilemektedir. Yapılan çalışmalarda proliferasyon belirleyicilerin, kötü tümör diferansiyasyonu, ER, PR negatifliği ve kötü sağkalımla ilişkili olduğu bilinmektedir. Yüksek proliferasyon kapasiteli tümörler kemoterapiye iyi cevap verir ve bu açıdan prediktif özellik taşır. Rutin pratikte proliferasyon belirleyicilerinin standardizasyonunda sorun olması nedeni ile tayini önerilmemektedir (Cianfrocca and Goldstein 2004).

Büyüme promotorları (transforme edici büyüme faktörü, epidermal büyüme faktörü, trombositlerden türetilen büyüme faktörü, fibroblast büyüme faktörü) ve büyüme faktör inhibitörleri meme kanser hücreleri tarafından salgılanır ve bunlar tümör progresyonunun otokrin mekanizmasında görev alırlar.

Bu büyüme faktörlerinin oluşumu ER bağımlıdır ve dolaşan hormonlar, kanser hücrelerince salgılanan hormon reseptörleri ve tümör hücreleri tarafından oluşturulan otokrin büyüme faktörleri arasındaki etkileşimlerin meme kanser progresyonunda görev aldığını düşündürmektedir (Dickson et al 2001).

Epidemiyolojik çalışmalar seks steroidlerinin (ER, PR ve androjenlerin) meme kanserinin gelişmesinde önemli rol aldığını göstermektedir. Meme kanseri riski, ovaryal östrojen ve progesteron sentezinin kesildiği ve ovaryal androjen sentezinin kademeli olarak arttığı, menopoz öncesi dönemde menopoz sonrası döneme göre çok daha hızlı bir artış gösterir. Yapılan hayvan çalışmaları östrojenin meme dokusunda hücre proliferasyonu artırdığı ve apoptozu inhibe ettiği gösterilmiştir. Azalmış seks hormonu bağlayan globuline rağmen, artmış testosteron ve androstenodion seviyesi olanlarda, ayrıca seks hormonu bağlayan globuline bağlanmamış serbest östron, östrodiol ve biyolojik olarak kullanılabilen östrodiol seviyesi yüksek postmenopozal kadınlarda artmış risk oluşturmaktadır (Vogel and Georgiade 1981).

#### **4.4.2.2 Çevresel faktörler ve yaşam tarzı**

ABD ve batı ülkelerinde meme kanseri insidansının 4-7 kat fazla oluşu, bu ülkelere dışarıdan göç edenlerde de birkaç jenerasyon sonrasında kanser oranının artması yaşam alışkanlıkları ve beslenme özelliklerinin etyolojide rol oynadığı düşüncesini desteklemiştir. Yapılan çalışmalar meme kanserinin fiziksel egzersizin az olduğu ancak yüksek kalorili, hayvansal yağlar ve proteinlerden zengin olan batılı yaşam tarzı ile arttığı gösterilmiştir. Yüksek oranda meyve ve sebze alımı meme kanseri riskini azaltır. Yüksek vücut kitlesi, postmenopozal hastalarda kanser gelişme riskini artırır. Benzer olarak hayvansal yağların yüksek alımı, kırmızı et tüketimi de kanser gelişim riskini artırır (Vogel et al 1981).

Alkol tüketimi meme kanseri riskini artırır. Ancak sigaranın anti-östrojenik etki ile kanser gelişim riskini azalttığı da düşünülmektedir. Meme kanseri riski sıklıkla erken menarj, nulliparite ve/veya geç yaşta az sayıda çocuk doğuran kadınlarda, infertil

hastalarda, geç yaşta menopoza girmiş kadınlarda artmıştır. Ayrıca laktasyonun meme kanserinde koruyucu bir faktör olduğu bulunmuştur (Wohlfahrt and Melby 2004).

Otuz yıldır yapılan 100'den fazla çalışma yüksek vücut ağırlığının postmenopozal hastalarda meme kanseri riskini artırdığını göstermiştir. Vücut ağırlığı, reproduktif, yaşam tarzı risk faktörleri ve fiziksel aktiviteden bağımsız bir risk faktörüdür. Vücut-kitle indeksi  $24\text{kg/m}^2$ 'nin üstünde olan postmenopozal kadınlarda insidans oranı artmıştır. Fiziksel aktivite ve meme kanseri arasındaki ilişki menopozdan bağımsızdır. Fiziksel olarak aktif kadınlarda bu oran %20-40 oranında azalmaktadır (Tavasolli and Devilee 2003).

İki tip hormonal komponentin meme kanseri artışıyla ilgisi bulunmuştur: oral kontraseptifler ve menapozda kullanılan hormon replasman tedavisi. Her iki ilacın kullanımında da uzun süre ve tekrarlayan kullanımlarda çok az rölatif artmış bir risk mevcuttur. Kendisinde daha önce endometrium ya da over kanseri olan hastalarda meme kanseri riski 2 kat artmıştır. Meme kanserli hastalarda karşı memede meme kanseri gelişme riski yılda (%1-20) arasındadır (Topuz ve ark 2003).

Meme kanseri sıklığı yaşla belirgin ve sürekli şekilde artmaktadır. Bütün meme kanserli hastaların %75'ine postmenopozal dönemde tanı konmaktadır. Meme kanseri 30 yaşından önce nadir olup, bu yaşı takip eden reproduktif yıllarda ivmelenme gösterir. Meme kanseri gelişme riski 25 yaşında 1/19 608, 55 yaşında 1/33, 75 yaşında 1/11, 80 yaşında 1/8'dir (Box and Russel 2004).

Radyasyona maruz kalanlarda DNA hasarına bağlı olarak 10-15 yıllık bir süre içerisinde meme kanseri riskinde % 20-30'a varan artışlardan bahsedilmektedir (Rosen 2001). Otuz yaşından önce iyonizan radyasyona maruz kalmak meme kanseri riskini artırmaktadır. Kırk yaşından sonra iyonizan radyasyona maruz kalanlarda meme kanseri riskinde artma gözlenmemiştir. Bu nedenle 30 yaşın üzerindeki kadınlarda mamografi meme kanseri riskini artırmamaktadır. Atom bombasına maruz kalmış kadınlarda meme kanseri riski 3 kat artmıştır. Lenfoma nedeniyle radyoterapi alan kadınlarda da özellikle 10. yıldan sonra meme kanseri sıklığı artmaktadır (Topuz ve ark 2003). Virüslerle ilgili araştırmalar 1936 yılından bu yana sürdürülmekle birlikte kesinlik kazanmamıştır.

#### 4.4.2.3 Genetik değişiklikler

Meme kanserlerinin %5-10'u kalıtsaldır. Özellikleri en iyi belirlenmiş genetik risk faktörleri BRCA1 ve BRCA2'deki gen mutasyonlarıdır. 17 ve 13. kromozomlarda yer alan BRCA1 ve BRCA2 genleri, Li-Fraumeni sendromunda p53 tümör supresör gen defekti, Cowden sendromunda 10q'daki bir lokus kaybı ve ataksia telenjiektazi, gen defekti, otozomal geçişli famiyal olguların büyük kısmından sorumludur.

Bu genler tümör supresyonu ya da DNA tamirinde görevlidirler (Rosai 2004). BRCA1 ve BRCA2 mutasyonları varlığında gelişen tümörler, sporadik meme kanserlerinden daha kötü diferansiye tümörler olup prognozlarının kötü olduğu bilinmektedir. Bunların dışında P53, PTEN, ATM gen mutasyonları artmış kanser ve meme kanseri riskinden sorumludur (Phillips, Andrulis and Goodwin 2001). Bu gen mutasyonunu taşıyanlarda meme kanseri ortalama 45 yaşında gelişmektedir. Otuzbeş yaşın altında meme kanseri gelişen hastalarda bu mutasyonlar daha sık görülür. BRCA1 taşıyıcılarında ömür boyu meme kanseri gelişme riski %40–80, over kanseri gelişme riski %40'dır. BRCA1 gen mutasyonu ile ilişkili meme kanserleri sıklıkla hormon reseptör ve HER 2 negatiftir. İnvaziv duktal karsinom tipindedirler. Yüksek mitotik oran, yüksek tümör gradı ve yüksek oranda p53 mutasyonu özelliklerine sahiptirler. BRCA2 gen mutasyonlu hastalarda ömür boyu meme kanseri gelişme riski %40–70, over kanseri gelişme riski %20'dir. Erkek meme kanserleri sıklıkla BRCA2 gen mutasyonu ile ilişkilidir. Bu mutasyonla ilişkili meme kanserleri sporadik meme kanserlerine benzer oranda östrojen reseptörü pozitifdir. BRCA2 gen mutasyonu aynı zamanda endometrium, prostat, pankreas ve mide kanseri gelişme riski de artmıştır. Ataksia telenjiektazi, Li-Fraumeni, Peutz-Jeghers ve Cowden sendromlarında da meme kanseri gelişme riski artmıştır (Topuz ve ark 2003).

Diğer kanserlerde olduğu gibi meme kanserinde de mutasyonlar onkojen ekspresyonunda artmaya ve tümör supresör genlerin fonksiyonlarında kayıplara yol açmaktadır. Bu genlerin en karakteristiklerinden biri epidermal büyüme faktör reseptör ailesinden cerbB-2'dir. 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. Ancak gen amplifikasyonu ve aşırı ekspresyon nedeniyle kanser patojenezine katılan bu onkogen, meme kanserleri için önemli bir prognostik belirteç olarak kabul edilmektedir. CerbB-2 onkoproteini plazma membranına yerleşmiş epidermal büyüme faktör reseptörüne (EGFR) benzer bir membran reseptördür (Yamamoto, Ikawa, Akiyama, Semba, Nomura, Miyajima, Saito and Toyoshima 1986). Erken dönem meme kanserinde cerbB-2 gen amplifikasyonu kötü prognoz ile yakın ilişkili bulunmuştur. İnvazif meme kanserlerinin alt tipleri arasında sadece invaziv duktal karsinomlarda cerbB-2 amplifikasyonu gösterilmiştir.

Genellikle invaziv lobuler karsinomlarda cerbB-2 aktivasyonu görülmez. İn situ lobuler karsinomlarda da aşırı üretime rastlanmamıştır. Buna karşılık in situ duktal karsinomların alt tipi olan komedo tipte cerbB-2 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 (Liu, Thor, Hem, Barcos, Ljung and Benz 1992).

P53 geni 17. kromozomun p13-1 bandına yerleşmiş, moleküler ağırlığı 53 kD olan nuklear bir proteini kodlayan tümör baskılayıcı gendir. 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 (35,36). Meme kanserlerinde aşırı p53 protein üretimi kötü prognoz için bir indikatördür. Dokuda mutant p53 pozitifliğinin tespiti %80-90 oranında meme kanserlerini doğrular. Meme kanserlerinde yapılan çalışmalar, p53 ekspresyonu ile yüksek tümör derecesi, yüksek proliferasyon indeksi, aneuploidi ayrıca ER ve PR yokluğu arasında yakın ilişki olduğu fikrinde birleşilmiştir. Bu parametreler kısa ömür ile ilişkili olduğundan p53 pozitifliği kötü prognoz ile de yakın ilişkilidir (Sirvent, Fortuno Mar, Olona and Orti 2001). İnsan meme kanserlerinde en çok değişikliğe uğrayan gen p53 olup siklin bağımlı kinazların inhibitörlerini aktive ederek hücre siklus progresyonunu inhibe eder. Proliferasyon belirleyicileri arasında kabul edilmektedir.

### **4.4.3 Meme kanserinde prognostik parametreler**

#### **4.4.3.1 Hasta yaşı**

50 yaş üzeri ve 35 yaş altı hastaların kötü prognoza sahip olduğu bulunmuştur (Haber, Gattuso, Spitz and David 2002).

#### **4.4.3.2 Lenf nodu metastazı**

Mastektomi ile tedavi edilen invaziv karsinomlu hastalarda, pozitif aksiller lenf nodu en önemli prognostik faktördür. Hastaliksız yaşam süresi, rekürrens, rekürrens hızı ve tedaviye yanıtı pozitif aksiller lenf nodu sayısı ile orantılıdır (Topuz ve ark 2003). Ayrıca lenf nodu metastazında ektranodal yayılımın varlığı da kötü bir prognostik faktördür (Haber et al 2002).

#### **4.4.3.3 Stromal invazyon**

Morfolojik parametreler içinde en önemli prognostik belirleyicidir (Haber et al 2002).

#### **4.4.3.4 Tümör çapı**

Evreleme sisteminde kullanılan bağımsız bir prognostik faktördür. Primer tümörün çapı, nodal metastaz insidensi ve survi ile iyi korelasyon gösterir (Tavasolli et al 2003).

#### **4.4.3.5 Tümör tipi**

Klasik duktal ve lobüler karsinom arasında anlamlı prognostik bir farklılık yoktur. Tubüler karsinom, kribriform karsinom, müsinöz karsinom, papiller karsinom ve adenoid kistik karsinomda prognoz daha iyi, taşlı yüzük hücreli karsinom ve karsinosarkom da prognoz oldukça kötüdür (Tavasolli et al 2003).

#### **4.4.3.6 Grade**

İnvaziv duktal karsinom ve diğer tüm invaziv tümörler, tübül/gland formasyonu, nükleer pleomorfizm, mitotik sayıya göre "grade"lendirilir (Tavasolli et al 2003). Ancak yapılan bazı çalışmalar yukarıdaki histolojik gradelemenin yanında nükleer bir gradeleme sisteminde yapılması gerektiğini, nükleer gradelemenin histolojik gradeleme dışında prognostik bir faktör olduğunu savunmuşlardır. Ayrıca duktal karsinom dışındaki meme karsinomlarında histolojik grade kullanılamaz, daha çok nükleer gradeleme sistemi kullanılır (Tavasolli 1999).

#### **4.4.3.7 Evre**

Çok güçlü bir prognostik faktördür. Meme kanserinin evrelendirilmesi hastalığın anatomik yaygınlığını değerlendirmek ve tedavinin tipini belirlemek için gereklidir. Evrelemede tümörün boyutu (T), lenf nodu metastazının olup olmaması (N) ve uzak metastazın olup olmamasını (M) esas alan TNM evreleme sistemi kullanılmaktadır (Tavasolli 1999).

##### **A. Meme karsinomunda TNM sınıflaması (WHO 2003)**

T- Primer tümör

Tx Saptanamayan tümör.

T0 Primer tümöre ait bulgu yok.

Tis Karsinoma in situ.

Tis(DCIS) Duktal karsinoma in situ.

Tis(LCIS) Lobüler karsinoma in situ.

Tis(Paget) Tümör olmaksızın meme başının Paget hastalığı.

Not: Tümörlü Paget hastalığı tümörün boyutuna göre sınıflandırılır.

T1 Tümör en büyük boyutunda 2cm veya daha az.

T1mic Mikroinvazyon en büyük boyutunda 0,1cm veya daha az.

T1a Tümör en büyük boyutunda 0,1cm'den büyük, 0,5cm'den küçük ölçüde.

T1b Tümör en büyük boyutunda 0,5cm'den büyük, 1cm'den küçük ölçüde.

T1c Tümör en büyük boyutunda 1cm'den büyük, 2cm'den küçük ölçüde.

T2 Tümör en büyük boyutunda 2cm'den büyük, 5cm'den küçük ölçüde.

T3 Tümör en büyük boyutunda 5cm'den büyük ölçüde.

T4 Tümörün boyutuna bakmaksızın göğüs duvarına veya deriye direkt yayılımın bulunması.

T4a Göğüs duvarına yayılım.

T4b Ödem (portakal kabuğu görünümü) veya meme derisinde ülserasyon veya aynı taraf memede satellit deri nodülleri.

T4c Yukarıda belirtilen 4a ve 4b'nin birlikte görülmesi.

T4d İnflamatuvar karsinom.

N- Bölgesel Lenf Nodları

Nx Bölgesel lenf nodları elde edilemiyor (örn: daha önce çıkartılmış).

N0 Bölgesel lenf nodu metastazı yok.

N1 Aynı taraf fikse olmayan lenf nodları metastazı.

N2 Aynı tarafın fikse lenf nodlarında metastaz veya aksiller lenf nodlarının metastazı olmadığı durumlarda aynı taraf internal mamaryal lenf nodlarında klinik olarak belirgin metastaz.

N2a Birbirlerine veya diğer yapılara fikse olan aksiller lenf nodlarında metastaz.

N2b Klinik olarak tesbit edilebilen aynı taraf internal mamaryal lenf nodlarında metastaz, klinik olarak aksiller lenf nodları tespit edilemiyor.

N3 Aynı taraf infraklaviküler lenf nodları aksiller lenf nodu metastazı olarak veya olmaksızın metastazlı; veya klinik olarak aynı taraf aksiller lenf nodları ve internal

mamaryal lenf nodları metastazlı; veya aynı taraf supraklaviküler lenf nodlarında aksiller ve internal mamaryal lenf nodu tutulumu olarak veya olmaksızın metastazlı.

N3a İnfraklaviküler lenf nodu(ları) metastazı.

N3b İnternal mamaryal ve aksiller lenf nodu metastazları.

N3c Supraklaviküler lenf nodu(ları) metastazı.

M- Uzak Metastaz.

Mx Uzak metastaz değerlendirilemiyor.

M0 Uzak metastaz yok.

M1 Uzak metastaz var.

## **B. PTNM patolojik sınıflama**

pT- Primer Tümör

Primer kanserin patolojik sınıflaması için rezeksiyon sınırlarında makroskopik olarak tümör hücresi görülmemelidir. Cerrahi sınırlarda sadece mikroskopik boyutlarda tümör varsa bu olgu pT olarak sınıflanabilir.

pN- Bölgesel lenf nodları

pNx Bölgesel lenf nodları değerlendirilemedi (daha önce çıkartılmış veya hiç çıkartılmamış).

pN0 Bölgesel lenf nodu metastazı yok.

pN1mi Mikrometastazlar (hepsi 0,2mm'den büyük fakat hiçbiri en büyük boyutunda 2mm'den büyük değil)

pN1 Aynı taraf 1-3 aksiller lenf nodunda metastaz ve/veya klinik olarak tespit edilemeyen, ancak sentinel lenf nodu araştırılmasında internal mamaryal lenf nodlarında mikroskopik metastaz.

pN1a En azından bir tanesi en geniş boyutunda 2mm'den büyük, 1-3 aksiller lenf bezinde metastaz.

pN1b Klinik olarak tespit edilemeyen ancak sentinel lenf nodu biopsisi ile tespit edilen internal mamaryal lenf nodlarında mikroskobik metastaz.

pN1c 1-3 aksiller lenf nodunda metastaz ve klinik olarak tespit edilemeyen ancak sentinel lenf nodu incelemesinde tespit edilen internal mamaryal lenf nodlarında mikroskobik metastaz.

pN2 Aynı taraf aksiller lenf nodlarında 4-9 metastaz ve/veya aynı taraf aksiller lenf nodu metastazı olmaksızın, aynı taraf internal mamaryal lenf nodlarında klinik olarak tespit edilmiş.

pN2a 4-9 aksiller lenf nodu metastazı, en az bir tanesinde çap 2mm'den büyük.

pN2b Aksiller lenf nodu metastazı olmaksızın klinik olarak tespit edilebilen internal mamaryal lenf nodlarında metastaz.

pN3 Aynı taraf aksiller lenf nodlarında 10 veya daha fazla lenf nodu, veya infraklaviküler lenf nodlarında metastaz, veya klinik olarak tespit edilmiş aynı taraf internal mamaryal lenf nodu metastazı ve bununla birlikte bir veya daha fazla aksiller lenf nodu metastazı, veya 3'den daha fazla aksiller lenf nodu metastazı ve bununla birlikte klinik olarak tespit edilememiş ancak internal mamaryal lenf nodlarında metastaz, veya ipsilateral supraklaviküler lenf nodlarında metastaz.

pN3a Aksiller lenf nodlarında 10 veya daha fazla metastaz (en az bir tanesi 2mm'den büyük) veya infraklaviküler lenf nodlarında metastaz.

pN3b Klinik olarak tespit edilmiş internal mamaryal lenf nodu metastazı ve bununla birlikte bir veya daha fazla aksiller lenf nodu pozitifliği, veya 3'den fazla aksiller lenf nodunda metastaz ve klinik olarak tespit edilmemiş ancak sentinel lenf nodu biopsisi ile tespit edilmiş internal mamaryal lenf nodunda metastaz.

pN3c Supraklaviküler lenf nodlarında metastaz.

pM- Uzak metastaz.

pM kategorileri diğer M kategorileri ile aynıdır (Tavasolli et al 2003).

#### **4.4.3.8 Vasküler invazyon**

Tümör hücrelerinin vasküler boşluklarında görülmesi lenf bezi metastazı ile kuvvetli ilişkilidir. Vasküler invazyon erken lokal rekürrens ve uzak metastazın önemli bir belirleyicisidir (Tavasolli 1999).

#### **4.4.3.9 Stromal reaksiyon**

İltihabi hücre infiltrasyonu olmayan tiplerin (medüller karsinom hariç) daha iyi prognoz gösterdiği bulunmuştur.

#### **4.4.3.10 Tümör nekrozu**

Kötü prognoza işaret eder.

#### **4.4.3.11 Cilt ve meme başı invazyonu**

Kötü prognoza işaret eder.

#### **4.4.3.12 Bilateralite**

Duktal ve lobüler karsinomlar arasında multisentrite (çok odak) ve bilateralite (iki memede birden görülmesi) konusunda farklılıklar vardır.

#### **4.4.3.13 Hormon reseptörleri**

Hormon reseptörlerinin pozitifliği hormon tedavisi ve kemoterapiye cevap ile ilişkili olduğundan meme kanserlerinde tedavinin düzenlenmesi için ER ve PR reseptörlerinin belirlenmesi günümüzde standart bir çalışmadır. ER pozitif hastalarda tedaviye yanıt oranı %70 iken reseptör negatif hastalarda bu oran %5'dir. Her iki reseptörü de pozitif olan hastalarda tedaviye yanıt çok daha iyidir (Wohlfahrt et al 2004). ER ve benzeri

ligandlar etkilerini hücre içine sızarak ve çekirdekteki ÖR'ne bağlanarak yapmaktadır. Bu bağlanma ile dimerize olan reseptör DNA üzerindeki hedef noktalara bağlanmaktadır (Damjanov and Linder 1996).

#### **4.4.3.14 Hücre proliferasyonu**

Yüksek proliferasyon hızına sahip tümörler daha kötü prognozludur. Hücre proliferasyonu mitoz sayımı, immunhistokimyasal olarak Ki-67, PCNA, Katepsin D, p53, bcl-2, HER 2, EGFR ekspresyonu analizi ve flow sitometri gibi yöntemlerle belirlenir.

#### **4.4.3.15 Katepsin D**

Asidik lizozomal bir proteazdır. Meme kanser hücrelerinin proliferasyonu ve tümör invazyonunda rol oynayan prognozla ilişkili bir enzimdir (Tavasolli et al 2003).

#### **4.4.3.16 p53**

17. Kromozomun kısa kolunda yer alan bir tümör supressör genidir. Hücre siklusunda özellikle DNA hasarında hücrenin G1 fazından S fazına geçişin denetlenmesinde görevi vardır. p53 geninde mutasyon gelişmesi bu fonksiyonun durmasına yol açar.Yapılan bir çok çalışmada meme kanserlerindeki 17 P'nin kaybı ile malign histolojik özellikler arasında yakın ilişki gösterilmiştir. P53 ekspresyonu gösteren meme kanserlerinde; yüksek histolojik grade, yüksek proliferasyon indeksi, aneploidi, ER ve PR yokluğu arasında korelasyon mevcuttur. Meme kanserlerinin %20-30'unda p53 inaktivasyonu gözlenmiştir (Tavasolli 1999).

#### 4.4.3.17 bcl-2

Mitokondri, endoplazmik retikulum ve nükleus membranında yerleşik bir proteindir. Hücrelerin apoptoza gidişinde rolleri vardır. bcl-2'nin meme tümör dokularında varlığını gösteren bir çok çalışma mevcuttur. Genelde bcl-2 ekspresyonu ER varlığı ile korelasyon gösterirken EGFR ve p53 ekspresyonu ile zıt korelasyon gösterirler (Tavasolli 1999).

#### 4.4.3.18 CerbB-2(Her2 /Neu)

p185 olarak isimlendirilen bu onkogen 17. kromozomda q122ye yerleşmiştir ve protein ürünü hücre bölünmesi ve farklılaşmasına katılır. Ancak gen yapısında bir değişiklik meydana geldiğinde veya amplifikasyonu ve aşırı ekspresyonu nedeniyle kanser patogenezinin katılan bu onkogen meme kanserleri için önemli bir prognostik marker olarak kabul edilmektedir. HER 2 onkoproteini plazma membranına yerleşen epidermal büyüme faktörüne benzer bir transmembran reseptör proteinidir. Bu onkogen EGFR ailesinin ikinci üyesidir. Meme karsinomlarının %15-25'unda FISH ile saptanan HER 2 amplifikasyonu ve immunhistokimyasal yöntemle saptanan protein overekspresyonu vardır (Hoadley, Weigman, Fan, Sawyer, He, Troester, Sartor, Rieger-House, Bernard, Carey and Perou 2007).

Her2 overekspresyonu kötü prognostik parametredir ve genellikle histolojik grade'i yüksek, lenf nodu metastazı olan ve hormon reseptörleri negatif tümörlerde görülmektedir (Morris, Naidu, Topham, Guiles, Xu, McCue, Schwartz, Park, Rosenberg, Brill and Mitchell 2007). HER 2 genini aşırı ekspresyonu veya amplifikasyonu meme kanserlerindeki transforme hücrelerin %10-40'ında gösterilmiştir. Bu onkogenin kopya sayılarının yüksek bulunuşu, tümörün grade'i ile doğru orantılı olarak saptanmıştır. HER 2 geninin amplifikasyonuna sahip hastalarda ve metastazı bulunan meme kanserli hastalarda kullanılan ve de ilk oluşturulan biyolojik düzenleyici Trastuzumab (Herceptin)'dir. Bu ilaç HER 2 proteinine yüksek bağlanma kapasitesine sahip, insana göre

geliştirilmiş rekombinant monoklonal antikordur ve HER 2'yi aşırı üreten meme kanser hücrelerinin büyümesini baskılar (Hoadley et al 2007).

#### **4.4.3.19 EGFR (HER 1)**

Hücre memebren reseptörü olan EGFR ailesi HER 1,HER 2,HER 3,HER 4'den oluşur. Her üçü de yapısal homoloji gösterirler. EGFR;170 kD'luk bir transmembran glikoproteinidir ve sitoplazmik parçası tirozin kinaz aktivitesi gösterir. Ligandları EGF, Heregulin ve Kripto-1'dir. EGFR gen amplifikasyonunun kötü prognozla ilişkili olduğu birçok karsinomda gösterilmiştir. Kanser hücrelerinde gen amplifikasyonunun gözlenmesi onun onkogen olduğunun göstergesidir. Hormona bağımlı ve bağımsız meme kanserleri üzerinde yapılan birçok çalışmada ER (-) olan tümör gruplarının ER (+) gruplardan anlamlı olarak EGFR ekspresyonu daha yüksek oranda izlenmiştir (Savage, Leung and Todd 2007).

#### **4.4.3.20 BRCA1 ve BRCA2**

Bu genler DNA hasarının tamirinde rol oynayan proteinleri kodlar. Bu genlerin eksikliğinde ortaya çıkan DNA hasar birikimleri kansere yol açar. Meme karsinomlarının %10'unda BRCA gen mutasyonları saptanmıştır.BRCA1 17. kromozomun q21 bölgesinde lokalizedir. BRCA2 geni ise 13.kromozomun q12-13 bölgesindedir (Arnes, Begin, Stefansson, Brunet, Nielsen and Foulkes 2007). Meme kanseri olan kadınların %5-10 'unda BRCA1 ve BRCA2 mutasyonlarının olduğu tahmin ediliyor. BRCA1 ve BRCA2 mutasyonları, Yahudi kökenli kadınlarda daha yaygın olup bu mutasyonları taşıyan kadınlarda, yaşam boyu meme kanseri oluşma riski %40-85 arasında değişiyor. Meme kanseri hikayesi olan taşıyıcıların kontralateral hastalık riski, yılda %5 kadar yüksektir. BRCA2 mutasyonları taşıyan erkekler de yüksek meme kanseri riski taşıyorlar. Her iki gendeki mutasyonlar aynı zamanda yüksek over kanseri riskine de yol açar. Ek olarak, mutasyon taşıyıcıları diğer kanserler için de yüksek risk taşıyor olabilirler (Arnes 2007).

#### 4.4.4 Meme kanseri patogenezi

Karsinogenezin temelinde ölümcül olmayan genetik bir hasar vardır. Somatik hücrelerin genomunda ortaya çıkan mutasyon sonucu tek bir öncü hücrenin klonal artımı ile tümöral kitle gelişmeye başlar. Fenotipik ve genotipik olarak çok basamaklı bu olayın yol açtığı değişimler, tümör hücrelerinin hızlı ve sınırsız çoğalmasına ve çevre dokuya yayılmasına neden olur (Hanahan and Weinberg 2000). Bu sırada gelişen ek mutasyonlar sonucu birbirlerinden farklı özellikli hücreler ortaya çıkar ve tümörün heterojenitesi oluşur. Ayrıca bu hücreler özgün mikroçevreden bağımsız olarak yaşamını devam ettirme ve metastaz yapma özelliğine sahiptirler.

Protoonkogenlerin ve tümör baskılayıcı genlerin seri mutasyonları farklı mekanizmalar aracılığı ile malign fenotipin oluşumuna katkıda bulunur (McCormick 1999). Normal bir hücre siklusunda presentetik faz G1, DNA sentez fazı S, premitotik faz M fazıdır. Hücre büyümesinde büyüme faktörü normal büyüme kontrol yoluyla ilişkili genlerin salınımını etkileyerek hücre proliferasyonuna yol açar. Büyüme kontrol yoluyla ilişkili genler protoonkogenlerdir. Bu genlerin salınımı normal büyüme ve rejenerasyon boyunca sıkı kontrol altındadır. Bu tür protoonkogenlerin yapısında oluşacak değişiklik kanserin karakteristiği olan kontrolsüz hücre büyümesini sağlayan onkogenlere dönüşümü sağlar. Gerek normal hücre siklusu için gerekse kanser oluşum basamaklarında önemli olan üç sistem vardır.

- A. Hücre yüzey reseptörleri
- B. Sinyal iletim sistemi
- C. Transkripsiyon faktörleri

Sonuçta büyüme faktörleri reseptörlerine bağlanır ve onları aktive eder, uyarı iletiminde görevli proteinler fosforile olur, kinazlar serisi aracılığı ile sinyal nükleusa iletilir, transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu DNA sentezi başlar ve hücre S fazına girer (Powsen, Raina and Nash 2002). Normalde tümör gelişimini inhibe eden tümör supresör genler; kimyasal maddeler, radyasyon ve bazı virüslerin etkisiyle genetik hasar ya da mutasyonlara uğrayabilir. Bu hasar kalıtsal olarak gen dizilerinde de bulunabilir ve en çok hücre siklusunu düzenleyen genlerde olur.

- Büyümeyi sağlayıcı genlerin (protoonkogenler) aktivasyonu
- Büyümeyi inhibe edici genlerin (tümör baskılayıcı) inaktivasyonu
- Programlanmış hücre ölümünü kontrol eden genlerin (apoptoz) inaktivasyonu

Organizmada çoğalmayı ve diferansiasyonu kontrol eden protoonkogenlerin anormal ekspresyonu, karsinogenezde rol oynar. Protoonkogenlerin, onkojenlere dönüşümü nokta mutasyonu, gen amplifikasyonu ve kromozomlarda yeniden düzenlemelerle oluşabilir. Nokta mutasyonunda, miktarı normal hiperaktif bir protein üretilir. Gen amplifikasyonunda ise, normal protein aşırı miktarda üretilir. Kromozomlarda yeniden düzenlemede, normal proteinin fazla üretimi veya füzyon proteininin oluştuğu görülür.

Karsinogenezde etkili olan onkogenler beş gruptur;

1. Büyüme faktörleri
2. Büyüme faktörlerinin reseptörleri
3. Sinyal iletici proteinler
4. Nükleus düzenleyiciler
5. Siklinler

Bunların normal protoonkogenlerden farkı; düzenleyicilerinin olmaması ve üretimlerinin büyüme faktörleri veya diğer dış uyarılara bağımlı olmamasıdır.

#### **4.4.5 Kanserde invazyon ve metastaz yeteneği**

Metastaz iki ana aşamada incelenir.

##### **4.4.5.1 Ekstrasellüler matriksin invazyonu**

Ekstrasellüler matriks, kollajen, glikoprotein ve proteoglikanlardan oluşur. Karsinom hücreleri, önce alttaki bazal membranı aşamalı, interstisyel bağ dokuyu

geçmeli, dolaşım sistemine ulaşmalı ve vasküler duvarı penetre etmelidir. Bu aşamalar tümör embolisi damar dışına çıktığında da tekrarlanır. Ekstrasellüler matriks invazyonu aktif bir olay olup 4 aşamada gerçekleşir.

- Tümör hücrelerinin birbirinden ayrılması
- Tümör hücrelerinin matriks komponentlerine tutunması
- Ekstrasellüler matriksin yıkımı
- Tümör hücrelerinin göçü

İlk aşama tümör hücrelerinin gevşemesidir. E-kaderinler, intersellüler yapıştırıcı gibi rol oynarlar. Plazmik kısımları b-katenine dokunur. E-kaderinlerin yanısıra, E-kaderin aracılı homotipik adezyon molekülleri b-katenin yolu ile antigrowth sinyalleri ileterek te birarada dururlar. Serbest b-katenin ise büyümeyi uyaran genlerin transkripsiyonunu aktive eder. E-kaderin fonksiyonu hemen tüm epitelyal tümörlerde, ya E-kaderin geninin inaktivasyonu ya da b-katenin geninin aktivasyonu yolu ile kaybolur. Diğer hücre adezyon moleküllerinin ekspresyonundaki değişimler de invazyona katkıda bulunur.

İkinci aşama, tümör hücrelerinin özellikle laminin ve fibronektine olmak üzere, ekstrasellüler matrikse tutunmaları ile karakterlidir. Normal epitel hücrelerinin bazal yüzeylerinde laminin için reseptör içerirler. Karsinom hücreleri ise çok daha fazla miktarlarda ve hücrenin her tarafında laminin reseptörleri taşırlar.örneğin, meme kanserinde hücrenin içerdiği laminin miktarı ile lenf bezi metastazı arasında korelasyon saptanmıştır. Ayrıca, integrin ekspresyonunda değişme de invazyonu gösterir. Karsinom hücrelerindeki normal ekstrasellüler matrikse tutunan integrinlerin kaybı ve yerine proteazlarla parçalanmış, ekstrasellüler matrikse tutunabilen integrinlerin oluşması invazyon kapasitesini arttırmaktadır.

Üçüncü aşama, bazal membran ve interstisyel bağ dokunun lokal yıkımı ile karakterlidir. Tümör hücreleri ya kendileri proteolitik enzim salgılar ya da fibroblastlar gibi host hücrelerini uyarırlar. Jelatinazlar, kollajenazlar, stromelizinler gibi metalloproteinazlar bu olaykatılıdır. Tip 4 kollajenazın ekspresyonu benign tümörlerde

düşük düzeylerde iken, malign tümörlerde aşırı düzeylerde eksprese edilir. Ayrıca, metalloproteinaz inhibitörleri ekspresyonu da malign tümörlerde düşüktür. Katepsin-D, meme karsinomunda aşırı düzeylerde eksprese edilir. Günümüzde tümör tedavisinde proteinaz inhibitörleri denenmektedir.

Son aşama, lokomasyon (hareket) aşamasıdır. Tümör hücreleri yıkıma uğramış bazal membran ile matrikste ilerler. Migrasyon (göç), tümör hücrelerinden köken alan otokrin mortalite faktörleri gibi sitokinler aracılığı ile olabilir. Ayrıca, kollajen ve laminin gibi matriks komponentlerinin parçalanması ile oluşan ürünler ve insülin benzeri GF1 ve 2 gibi bazı GF'ler tümör hücreleri için kemotaktik etki gösterir. Stromal hücreler de benzer şekilde parakrin etki gösterebilirler.

#### **4.4.5.2 Tümör hücrelerinin vasküler yayılımı ve yerleşimi**

Tümör hücreleri vasküler sistem içinde (damar içinde) iken immün sistem hücrelerine karşı savunmasızdır. Bazı tümör hücreleri agregatlar oluşturarak embolilere yol açar ve başta trombositler olmak üzere lökositlere yapışarak immün sistemin antitümör etkilerinden korunmaya çalışırlar. Ancak, dolaşımdaki tümör hücrelerinin çoğu tek başına dolaşır. Tümör hücreleri damar dışına çıkarken (ekstaravazasyon) vasküler endotele adezyon gösterirler ve sonrasında invazyondaki aşamalar tekrarlanır.

Ekstravazasyon ve metastazın organ dağılımı, genellikle primer tümörün lokalizasyonuna ve vasküler-lenfatik drenajına bağlıdır. Ancak, birçok olguda doğal drenaj yolları metastazlarındağılımını açıklayamaz. Akciğer kanserleri gibi bazı tümörler özellikle adrenal bezleri tutarken, prostat kanserleri kemik-vertebraları tercih eder. Bu organ tercihi tümör hücrelerinin eksprese ettiği adezyon molekülleri ligandlarının hedef organ endotelinde bulunuyor olmasından kaynaklanabilir. Diğer bir etken faktör de kemokinler ve reseptörleridir. Meme kanseri hücreleri kemokin reseptör genleri olan CXCR4 ve CCR7 'yi eksprese ederler. Bu reseptörler için ligand ise meme kanseri hücrelerinin metastaz yaptığı organlarda eksprese edilmektedir. Buna göre kemokin

reseptör blokajının metastaz riskini azalttığı düşünülmektedir (Wittekind and Neid 2005).

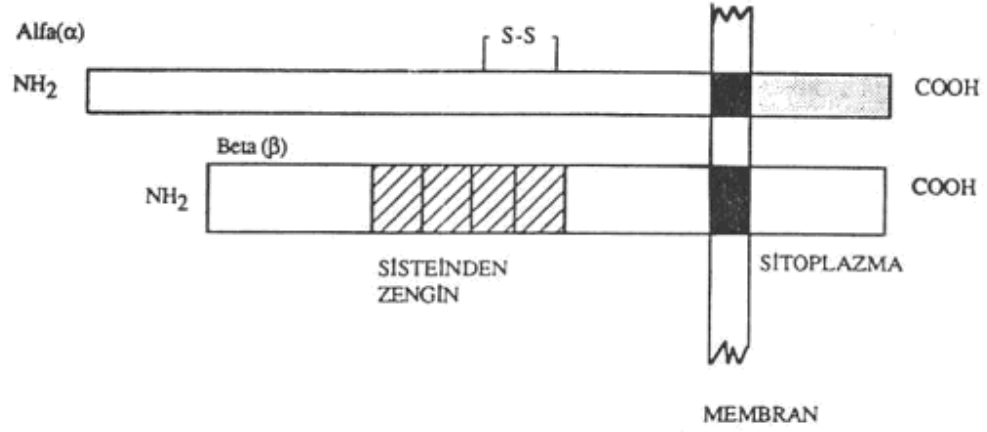
#### **4.5 Adezyon Molekülleri**

Çok hücreli bir organizmada canlılık faaliyetlerinin yerine getirilebilmesi, yaşamsal görevlerin farklı hücrelere paylaşılması, senkronize olarak aynı amaca yönelik olması ve hemostazın korunmasıyla olasıdır. Gen Ontoloji Konsorsiyumu hücre adezyonunu hücrelerin ekstraselüler matrikse veya diğer hücrelere adezyon molekülleriyle bağlanması olarak açıklar. Bu ifade göz önünde bulundurulduğunda adezyon moleküllerine moleküler yapıştırıcılar demek yanlış olmaz. 1980'lerden bugüne kadar moleküler biyoloji alanındaki en önemli gelişmelerinden biri, hücre ile matrix arasındaki ilişkiyi sağlayan adezyon molekülleri olarak tanımlanmaktadır. Çünkü adezyon moleküllerinin, embriyogenez, morfojeniz, inflamatuvar cevap hemostaz doku devamlılığı ve diferansiasyon, tümör oluşumu, kanser gelişimi, metastaz ve apoptoz gibi geniş bir yelpazede çok önemli rollere sahip oldukları gösterilmiştir (Yoji et al 1992). Şimdiye kadar tanımlanmış beş adezyon molekülü ailesinin hemen hepsi, kanser hücre metastazının çeşitli basamaklarında birbirini izler şekilde rol almaktadır (Andrew et al 1993). Adezyon molekülü aileleri integrinler, kadherinler, selektinler, proteoglikanlar ve immünglobulin süperailinden oluşur.

##### **4.5.1 İntegrinler**

Hücrelerin ekstraselüler matrikse bağlanması integrinler denen geniş bir glikoprotein ailesiyle olur. İntegrinler, heterodimer transmembran glikoproteinlerdir. Aktif ya da inaktif halde bulunabilen integrinlerin, birbirine kovalent olmayan bağlarla bağlı alfa ( $\alpha$ ) ve beta ( $\beta$ ) alt birimleri vardır (Shimizu, Rose and Ginsber 1999) .

Şekil 2: İntegrinlerin yapısı



Molekülün işlevini gerçekleştirebilmesi için her iki alt birim de gereklidir, ancak bağlanma özgüllüğünün  $\alpha$  alt birimi ile ilişkili olduğu düşünülmektedir.  $\alpha$  ve 8  $\beta$  altbirimi kombinasyonu ile oluşan 24 farklı integrin reseptörü bulunmaktadır (Brakebusch, Bouvard, Stanchi, Sakai and Fassler 2002). Bazı altbirimler farklı partnerle kombine olarak integrin reseptörlerin yapısal kompleksliğine katkı sağlarlar.  $\alpha$  ünitesi 1000 ile 1200 amino asit içerir ve bazıları amino terminalinde “I” domain denen bir bölge içerir.  $\beta$  alt birimi ise  $\alpha$  alt birimine göre daha küçük olup, 700-800 amino asit uzunluğundadır.  $\beta 4$  birimi haricindeki diğer alt birimlerin sitoplazmik kısımları yaklaşık 30-50 amino asit uzunluğunda olup kısadır. Fakat  $\beta 4$  biriminin uzunluğu yaklaşık 1000 amino asit uzunluğundadır. İntegrinler, yapılarında buldukları  $\beta$  alt birimlerine göre  $\beta 1$ ,  $\beta 2$ ,  $\beta 3$ ,  $\beta 7$  ve  $\beta 8$  integrinler olarak adlandırılırlar.  $\beta 1$  yapısında olan integrinlere “Very Late Activation (VLA)” adı verilir. Bu ismi aktive olmuş T lenfositlerin yüzeyinde 2-4 hafta gibi uzun bir süre sonunda eksprese olmaları nedeniyle alırlar.  $\beta 1$  integrinler özellikle lökositlerin endotel hücrelerine ve hücre-dışı matrikse bağlanmasında görev alırlar.  $\beta 2$  grubu integrinler üç homolog heterodimerden oluşur; kompleman reseptör tip 3 (CR3;CD11b/18), CR4 (CD11c/18) ve lökosit fonksiyonları ile ilişkili molekül-1 “Leukocyte Function Associated Antigen- 1 (LFA-1; CD11a/18)” (Petty and Todd 1996).

İntegrinler ekstraselüler matriks proteinleri (fibronektin, laminin, kollajen, vibronektin gibi) için esas reseptörlerdir ve bu nedenle hücrenin ekstraselüler matrikse bağlanmasında ana araçlardır. İntegrinler pek çok ekstraselüler matriks proteini ile bağlanabilir. Farklı integrinler aynı liganda bağlanabilir. Örneğin  $\alpha3\beta1$ ,  $\alpha4\beta1$ ,  $\alpha8\beta1$ ,  $\alpha5\beta3$ ,  $\alpha5\beta5$ ,  $\alpha5\beta6$ ,  $\alpha4\beta7$ ,  $\alpha5\beta7$ ,  $\alpha5\beta8$  integrinleri fibronektine bağlanabilir. Bununla beraber aynı ekstraselüler liganda bağlanan integrinlerin farklı sinyal ürettikleri ve farklı işlev gördükleri bilinmektedir. Örneğin  $\alpha V\beta1$  fibronektine bağlandığında hücre göçünü engellediği halde (Giancotti and Ruoslahti 1990),  $\alpha5\beta6$  bu olayı hızlandırmaktadır. Öte taraftan iç içe geçmiş ligand bağlama yeteneklerinden dolayı sinyal iletiminde atalet önlebilmektedir. İntegrinlerin yapıları ve fonksiyonları iki-değerli katyonlara bağımlıdır ( $Ca^{+2}$ ,  $Mg^{+2}$ ).

İntegrinler arginin-glisin-asparagin (RGD) aminoasit dizilerine sahip moleküllere bağlanma özelliği gösterir. Bu diziler hücre-dışı matriks glikoproteinlerinde, bazı hücrelerin yüzeyinde ve bazı kompleman proteinlerinde bulunur. Sitoplazmik kısımları ile vinkulin, talin, aktin, alpha-aktinin, tropomiyozin gibi hücre içi iskelet yapıları ile etkileşirler (Aydıntuğ 1995). Dolaşımdaki lökositlerin damar endoteline tutunup yapıştıktan sonra, inflamatuvar reaksiyonun bulunduğu alana göç etmelerinde rol alırlar (Malik and Lo 1996). Hücre dışı sinyaller aracılığı ile haberleşmeyi sağlarlar (Etzioni 1996). İntegrin adı, bu moleküllerin hücre-dışı matriks ve hücre iskeleti ile ilgili aktivitelere aracılık etmesinden (integre etmesi) kaynaklanır. Embriyolojik gelişim, hemostazis, tromboz, yara iyileşmesi, immün ve immün-olmayan savunma mekanizmaları gibi birçok fizyolojik olayda hücre-hücre ve hücre-matriks adezyonuna katılırlar. Kardiyovasküler sistemde hücre-hücre ilişkisi dinamik bir durumdur ve hassas bir düzenleme gerektirir. Fibrinojen (2 mg/ml) varlığına rağmen trombositler agregasyon olmaz, kan akımına rağmen lökositler inflamasyon alanına gidebilir. Bütün bu olaylarda integrin grubu hücre yüzey molekülleri rol oynar.

İntegrinler, insan vücudunda bulunan hemen tüm hücrelerde eksprese olurlar. Aktif hale geçen bir hücre sitoplazmasından sinyal iletildiğinde, integrinlerin hücre-dışında kalan kısmı şekil değişimi göstererek kendi ligandına olan afinitesini artırır. Bu işleme

içeriden-dışa (inside-out) sinyal iletimi denir. Bu işlem adezyon molekülleri arasında bir tek integrinlerde görülür. İntegrinlerin ligandına bağlanması ile bu kez dışardan-içeriye (outside-in) sinyal mekanizması çalışır; bu da hücre içerisinde apoptozisten proliferasyona kadar birçok işlevde etkili olur (Frenette, Denisa and Wagner 1996).

İntegrinler, liganlarının aviditesi yönünden düşük ve yüksek afiniteli durumda olabilirler. İntegrinler farklı yollardan aktive edilebilirler. TCR kompleksi veya protein kinazı C (PKC) aktive eden forbol esterler aracılığıyla içeriden dışarıya doğru sinyal iletimi sağlanabilir (24). CD2, CD44 veya CD43'e karşı monoklonal antikorlar da C11/CD18 aktivasyonuna neden olurlar.  $Mg^{+2}$  ve  $Mn^{+2}$  ve bazı integrin bağlayan antikorlar da (MEM83, KIM127, KIM18) hücre içi sinyali olmaksızın integrin aktivasyonu yapabilirler (Kotovvori, Pessa-Morikawa, Kotovvori, Nortamo and Gahmber 1999).

Neoplastik hücrelerin davranışı, hücrelerin birbirleriyle ve çevrelerindeki ekstraselüler matriksle ilişkilerini düzenleyen integrin hücre yüzey reseptörlerinden kuvvetlice etkilenmektedirler (Parise, Lee and Juliano 2000).

İntegrinler endotelde, epitel hücrelerinde, trombositlerde, lökositlerde ve tümör hücrelerinde bulunur ve genellikle katyon bağımlı adezyon olayını oluştururlar. İntegrinlerin çoğu adezyonu, ekstraselüler matriksin (ESM) adeziv glikoproteinlerinden olan tripeptit RGD bölgesine bağlanarak oluştururlar. İntegrin molekülünün hücre içindeki intrasitoplazmik kısmı, a-aktinin, vinculin, talin gibi iletili proteinlerden oluşan hücre içi iskeleti ile ilişkilidir. Transmembran kısımdan sonra gelen hücre dışı bölüm ise ekstraselüler matriksi ya da diğer hücreyi bağlar (Bierer 1993). İntegrinlerin önemli bir diğer yapısal özelliği de potansiyel transmembran kimyasal uyarı oluşturmalarıdır. İntegrinler  $Ca^{+2}$  kanalı gibi davranabilir ve  $Na^+/H^+$  antitaşiyıcılığı ile hücre içi pH'yı yükseltebilirler. Pek çok integrin reseptöründe değişme tümör hücre invazyonuna metastaza yol açabilir. Örneğin, fibronektine bağlanan integrinlerden, «Very late antigen-5» (VLA5,  $\alpha 5\beta 1$ ,) malign hücrelerde kaybolma eğilimindedir. Oysa metastatik melanoma hücrelerinde fibronektine ve vasküler-selüler adezyon molekülü-l'e (VCAM-1) bağlanan integrin olan VLA4 ( $\alpha 4\beta 1$ ) farklı dağılımlar göstermektedir. Laminin ve

kollajene bağlanan VLA2 ( $\alpha 2\beta 1$ ) ve vitronektin, fibrinojen ve trombospondine bağlanan bir  $\alpha V\beta 3$  integrininin bazı tümör tiplerinde artmışken, bazılarında da azalmış olduğu gösterilmiştir. Ayrıca deneysel ve spontan rabdomyosarkom metastazlarında hücre içinde  $\alpha 2$  alt birimine ait cDNA artmış olarak saptanmıştır. Çeşitli integrin reseptörlerinin sıkı tümör hücresi ve subendotelyal matrix ilişkisinin tümör metastazı üzerindeki rolü iyi bilinmektedir (Honn et al 1992).

#### 4.5.2 İntegrinlerle ilgili patolojiler

Lökositlerin dokulara yönelmesinde adezyon moleküllerinin önemi, insanlarda rastlanan hastalıklarla daha iyi anlaşılabilir. Lökosit adezyon eksikliği tip-1 sendromunda  $\beta 2$  integrin eksikliği veya mutasyonu sonucunda azalan polimorfonükleer ve monosit ekstravanazyon söz konusudur. Sıklıkla hayatı tehdit eden tekrarlayan infeksiyonlarla karşımıza çıkar (Werle-Haller and Imhof 2003). Bu hastaların lökositlerinde adezyon bozulmuş, fagositoz ve kemotaksi anomalileri ortaya çıkmıştır.

Glanzmann trombastenisi otozomal resesif geçiş karakteri gösterir. Trombositlerdeki  $\alpha IIb\beta 3$  intergrinlerde nokta mutasyonu veya delesyonu vardır. Trombosit fonksiyonlarında bozukluk ve uzamış kanama zamanı ile sonuçlanır (D'Andrea, Colazzio,Vecchione 2002).

Bir başka integrinle ilişkili hastalık epidermolisis bullosadır. Otozomal resesif geçişgösterir.  $\alpha 6$  veya  $\beta 4$  integrin alt ünitelerinin fonksiyonel heterodimer olarak ekspresyonundaki hata, bazal membran ile bazal keratinosit katmanı arasındaki mekanik bağlantının bozulmasına ve hastalığın ortaya çıkmasına neden olur (Pulkkinen and Uitto 1999).

Konjenital muskülerdistrofi kas zayıflığı ile ortaya çıkan otozomal resesif geçiş gösteren ve diğer musküler distrofilerle ilişkili bir hastalıktır. Kasa özgül  $\alpha 7$  integrin alt biriminde mutasyon taramalarında bozukluk saptanmıştır (Hayashi, Chou, Engvall 2008). İntegrinlerin buradaki karakteristik rolü tam olarak bilinmemekle beraber

ekstrasellüler çevre bağlantılarındaki rolü nedeniyle patolojik önemi olduğu ileri sürülmektedir.

Son olarak tümörlerin progresyonunda integrinlerin azalıp çoğalmasının önemi çeşitli raporlarla bildirilmiştir. İntegrin kanser ilişkisi yakın zamana kadar adezyon ve migrasyonla sınırlıydı ve integrin alt birimlerinde oluşan genetik bozuklukların kanser ile ilişkisi yakın zamana kadar bilinmiyordu. Kısa süre önce, Evans ve ark. (Evans, Perkins, Henry, Stephens, Robinson and Watt 2003)  $\beta 1$ -integrin alt biriminde ortaya çıkan heterozigot mutasyonların dilin skuamöz hücreli kanserinin oluşmasında etkili olduğunu göstermişlerdir.

Yine, integrinlerin  $\beta 1$  alt biriminin, multipl miyelomalarda ortaya çıkan hücre adezyon aracılı ilaç direncinde önemli rolü olduğu son bir kaç yılın dikkat çeken konuları arasında yer almaktadır.

Trombospondin (TSP) megakaryositlerde, monositlerde, kapiller endotelinde, memelilerin epitelinde ve trombositlerin alpha granülleri içinde bulunan, molekül ağırlığı 450 000 dalton olan adeziv bir glikoproteindir. Herhangi bir uyarıya bağlı olarak trombositlerin agregasyonuna neden olur. TSP hematopoetik progenitör hücrelerin de arasında bulunduğu birçok farklı, malign ve benign hücrenin adezyonunu, hareketini ve büyümesini sağlar, çevre dokunun malign hücrelerle invazyonunu stimüle ederek tümöral gelişime yardımcı olur. Bu özellikleri ile önemli bir tümöral büyüme ve metastaz faktörü olarak ilgi çekmektedir. TSP'nin in vivo ortamda bazı tümörlerin büyümesini ve metastazını baskıladığı ve anjiogenezi inhibe ettiği gösterilmiştir. Ancak bu etki tümöral hücre tipine göre değişmektedir. TSP bazı hücre tipleri üzerinde ise, stimüle edici olarak etki göstermekte ve tümör gelişimini hızlandırmaktadır (Roberts 1996).

Yüzey adezyon moleküllerinin ekspresyonundaki azalma nedeniyle kanser hücrelerinin tutunma yeteneği normal hücrelere kıyasla daha düşüktür. Adezyon moleküllerinin ekspresyonundaki azalmaya bağlı olarak kanser hücrelerinin diğer hücreler ve doku bileşenleri ile etkileşime girmesi zorunluluğu ortadan kalkar bu durum kanser hücrelerine metastaz yeteneği kazandırır. Tümör hücrelerinin çoğu hücre dışı

matrikse veya komşu hücelere tutunamadıkları için normal hücelerden daha yuvarlaktır.

$\beta 3$  integrinler,  $\alpha V\beta 3$  ve  $\alpha IIb\beta 3$  yapısal olarak sırasıyla anjiyojenik endotel hüceleri ve trombositler tarafından eksprese edilirler. Over tümörleri, meme tümörleri ve melanomlarda ki artmış  $\alpha V\beta 3$  ve  $\alpha IIb\beta 3$  ekspresyonları invaziv tümör progresyonu ile ilişkilidir. Fare modellerinde,  $\beta 3$  alt biriminin indüklenen ekspresyonu melanom hücelerinin metastatik potansiyelini artırır.  $\alpha V\beta 3$  ve  $\alpha IIb\beta 3$  inhibisyonu tümör anjiyogenezini kesintiye uğratarak tümör büyümesi ve metastazı azaltır (Felding-Habermann, Fransvea, O'Toole, Manzuk, Faha and Hensler 2002).

$\beta 3$  integrin alt biriminde çeşitli polimorfizmler tanımlanmıştır. En sık gözlemlenen polimorfizm kodon 33 de ortaya çıkar ve "wild-type" aminoasit lösinin yerine prolinin geçmesiyle sonuçlanır (Leu33Pro). Allel sıklığı 33Leu için yaklaşık % 85 ve 33Pro için % 15'tir. Trombositlerde bu polimorfizm fibrinojenin  $\alpha IIb\beta 3$ 'e bağlanmasını artırır ve trombin oluşumunu artırarak kanama zamanını düşürücü yani trombositlerin agregasyon kabiliyetini yükselterek trombaxan ile diğer agonistlerinin uyarılmasıyla anormal bir yanıt olarak sonuçlanır. Bu polimorfizm  $\beta 3$  integrinleri eksprese eden hücelerin fonksiyonlarını değiştirici etki gösterebilir (Bennett, Catella-Lawson, Rut, Vilaire, Qi and Kapoor 2001) (Andrioli, Minuz, Solero, Pincelli, Ortolani and Lussignoli 2000) (Undas, Brummel, Musial, Mann and Szczeklik 2001).

Kanser hücelerinde ki hücre yüzey integrinlerinin aşırı ekspresyonu invaziv özelliklerin gelişimi, değişmiş hücre göçü ve ekstraselüler matriks adhezyonu arasında ilişki bulunmaktadır. Dahası, artan integrin ekspresyonu, anjiyojenik non-neoplastik vasküler endotel hücelerinde belirtildiği gibi tümör için gerekli vasküler kaynağı temin eder (Hood and Cheresch 2002) (Thompson, Li, Maragoudakis 2000). Kanserlerde  $\beta 3$  integrinlerin bu şekilde ki potansiyel davranışları  $\beta 3$  integrinlere karşı fonksiyon engelleyici antikolar veya küçük sentetik peptidler ile yapılan klinik çalışmaların yolunu açtı. Leu33Pro polimorfizmini homozigot olarak taşıyan bireylerde taşımayanlara göre trombosit reaktivitesi ve agregasyon yeteneği artmıştır (Tucker

2002). Biyolojik ve patolojik özelliklerinden dolayı integrinler görüntüleme ve tedavi araştırmalarının yoğun bir şekilde hedefi olmuşlardır.

#### **4.6 Trombositler**

Kanın şekilli elemanlarından biri olan trombositler, yuvarlak ya da oval şekilli 1-4 mikrometre çapında, ortalama ömürleri 7-10 gün olan ekirdeksiz hücrelerdir. Periferik kanda normal değerleri milimetre küpte yaklaşık 150 000-300 000'dir. Trombositler kemik iliğinde kök hücrelerden gelişir. Trombositler sağlam endotelle çevrili vasküler sistem içerisinde birbirleriyle ve diğer hücrelerle etkileşime girmeden dolaşırlar. Bir uyararla uyarılmaları durumunda non-adeziv durumdan hızlıca adeziv duruma geçerler (Guyton and Hall 2001) (Hoffman et al 2000).

Trombositler hemostatik sistemde anahtar rol oynarlar. Hemostaz dört aşamada geerleşir. Bu aşamalar trombosit adezyonu, aktivasyon, primer agregasyon, sekresyon ve sekonder agregasyondur (McKenzie 1988). Trombositlerin damar endotel hücreleri gibi hücre dışı matriks elemanlarına adezyonu büyük ölçüde hücre yüzey reseptörleri ile açığa çıkan subendotelyal kollajen arasında bir köprü görevi gören von Willebrand faktör (vWF) arasında gelişir (Rao 1988). Trombositlerin aktivasyonunda ilk karakteristik olay şekil değişikliğidir.

##### **4.6.1 Trombosit morfolojisi**

Kemik iliğinde üretilen megakaryositlerin sitoplazmik fragmentleri olan trombositler çekirdek içermedikleri halde kan hücrelerinden biri olarak sınıflandırılmaktadır (Authi 1997). Diskoid yapılu bu hücreler mm<sup>3</sup>'te 140 000-440 000 arasında değişen miktarlarda dolaşımda yer alırlar. Wrigte-Giemsa ile periferik kan yayma preparatlarında boyanmış trombositler pürüzlü bir membran ile çevrili granüler yapılu küçük hücreler olarak görülmekte ve bu hücrelerin %70 kadarı dolaşımda geriye kalan %30 kadarı ise dalakta bulunmaktadır. Büyüklükleri (MPV) yaklaşık olarak 2-4 mikrometre olan trombositlerin genç olanları ise daha büyük MPV'ye sahip olma

eğilimindedirle ancak stres, trombopoez veya bazı spesifik trombosit fonksiyon defektlerinde de MPV'leri artmaktadır (Gawaz 2001).

Trombositler ADP, trombin gibi agonistlerle aktifleşmesi sonucu şekil değişimi ile yalancı kolları olan bir yapıya dönüşürler bu yolda normalde yaklaşık 8 mikrometre olan yüzey alanları  $13 \mu\text{m}^2$ 'ye kadar genişler (Gawaz 2001). Trombositlerin fizyolojik yaşam süreleri dolaşımda 7-10 gündür ve kemik iliği tarafından her gün dolaşımdaki miktarın %20 kadarı dolaşıma verilmektedir. Yaşamlarının sonuna gelmiş trombositler karaciğer ve dalakta yer alan retikuloendotelial sistem tarafından yıkılır (Hardisty 1969). Trombositlerin ultrastrüktürel yapısı 4 morfolojik yapıya ayrılır ve her bir yapının özel bir fonksiyonu vardır.

a- Periferel Bölge

b- Yapısal Bölge

c- Organel Bölgesi

d- Membran Sistemi

#### **4.6.2 Trombosit Aktivasyonu**

Trombositlerin aktivasyonu 3 ana aşamada gerçekleşir. Bu aşamalar adezyon, agregasyon ve sekresyondur.

##### **4.6.2.1 Trombosit Adezyonu**

Hemostazda oluşan ilk adımlar trombosit adezyonu, damar duvarının hasarı ve subendotelial matriksin lokal cevabı ile başlatılır. Hasarlı bölgenin trombositlerle kaplanması, integrin adı verilen spesifik trombosit membran glikoproteinleri aracılığı ile olur. Endotel bütünlüğü bozulduğu zaman trombositler subendotelial yapılara (kollagen, fibronektin, laminin, fibrinojen) adhezyon reseptörleri ile bağlanırlar. Kan akımının yavaş olduğu bölgelerde GP Ia/IIa, GP IV reseptörü ile kollagene direkt adhezyon gösterirler. Arteriyollerde ve mikrosirkülasyonda olduğu gibi kan akımının hızlı olduğu

bölgelerde trombositlerin subendotelial bölgedeki adhezif proteinlere bağlanabilmesi için yine bu bölgedeki vWF'üne ve buna özgü bir reseptör olan trombosit glikoprotein GP-Ib/IX kompleksine gereksinim vardır. Trombosit glikoprotein GP Ib-V-IX kompleksi arteriyel hasar sonrası normal yara iyileşmesi durumunda trombositlerin adhezif protein vWF'e yapışmasına aracılık ederler.

Bazı adhezyon proteinleri subendotelial matriks yapısında bulunmaları haricinde trombosit sekresyon granüllerinde ve/veya plazmada da bulunurlar. Mesela vWF ve fibronektin her üç lokalizasyonda bulunurlarken, trombospondin yalnızca trombosit granüllerinde görülür. Adhezyona aracılık eden GP Ib-V-IX sistemi için trombosit aktivasyonuna ihtiyaç yoktur. Trombospondin ve kalsiyum da adhezyonda rol oynar (Rand Leung and Packham 2003). Özetle trombositlerin subendotelial matriks komponentlerine adhezyonunda vWF, subendotelial yüzey ile trombosit membranındaki GP Ib arasında bir köprü görevi görür. Fibronektin, kollajen, vitronektin, trombospondin gibi matriks adhezyon moleküllerine adhezyon da spesifik trombosit membran glikoproteinleri aracılığı ile olmaktadır (Hickerson and Bode 2002).

#### **4.6.2.2 Trombosit Agregasyonu**

Trombositin agregasyonu için öncelikle aktivasyonu gereklidir. Trombosit agregasyonu, adhezyondan sonra bölgeye gelen trombositlerin hemostatik tıkaç oluşturmaları için fibrin bağları ile birbirlerine birleşmeleridir. Aktivasyon için ise ADP, kollajen, epinefrin, trombin, vazopressin, araşidonik asit gibi çeşitli agonistler ile trombositlerin uyarılması, beraberinde  $Ca^{+2}$ ,  $Mg^{+2}$  gibi iyonların, fibrinojen, vWF gibi spesifik plazma proteinlerinin ve trombosit CD41/CD61 reseptörünün mevcut olması gerekir. Aktivasyonu stimüle eden maddeler, kalsiyumun intrasellüler mobilizasyonunu ve trombositlerin degranülasyonunu stimüle etmek için, çeşitli reseptörler ve diaçilgliserol fosfat ve inositol trifosfat gibi sekonder aracılar yoluyla hareket ederler. Bundan sonra, trombosit yüzeyinde protein bağlanma kısımları ortaya çıkar. Fibrinojen veya vWF, trombosit membran proteinlerinden CD41/CD61'e bağlanır ve komşu trombositlerle bağ oluşturarak trombositlerin agregasyonuna neden olur. Fibrinojen,

fibrin oluşturması ve trombosit agregasyonunu desteklemesi dolayısıyla trombus oluşumunda iki ayrı role sahiptir. CD41/CD61 reseptörünün latent durumdan, fibrinojen bağlayabilecek aktif duruma geçmesi bütün agonistlerle olan trombosit aktivasyonunun ortak bir sonucudur. Ortamdaki divalan iyonlar uzaklaştırılınca, fibrinojenin artık trombositlere bağlanamadığı izlenir. Dimerik bir protein olan fibrinojenin komşu iki trombositin CD41/CD61 reseptörleri arasında köprü oluşturmak suretiyle trombosit agregasyonunu sağladığı düşünölmektedir. Fibrinojen ile CD41/CD61 bağlanması başlangıçta dönüşümlü bir reaksiyondur. Divalan iyonların ya da agonistlerin ortadan kalkması ile fibrinojen reseptöründen ayrılabilir. Uygun şartlar altında fibrinojen ile CD41/CD61 arasındaki bağlanma stabilize olarak dönüşümsüz hale gelir (Yardımcı, Yaman ve Ulutin 1995).

#### **4.6.2.3 Trombosit Sekresyonu**

Trombositler adhezyon ve agregasyonla birlikte granöl içeriklerini kanaliküler sistem ile ortama salarlar ve ilk olarak yoğun granüller boşaltılır, sonra  $\alpha$ -granöl içerikleri ortama salınırlar. Hücrenin bu esnada çapı artar ama bütönlüğü bozulmaz ve fonksiyonlarına devam edebilir. Trombin ve kollajen başta olmak üzere, çok sayıda madde sekresyonu başlatabilir. Sekresyon sırasında, salınan maddeler agregasyonun artmasına neden olurlar. Bu olaylar yara iyileşmesine, prokoagölan aktivitenin oluşmasına ve hasarlı bölgede trombin oluşumuna yol açarlar. Oluşan trombosit agregatları arasında fibrin meydana gelmesi ve daha ileri safhalarda, fibroblastların içe karışması ile pıhtı sabitleşir. Trombosit fonksiyonlarının normalden daha aktif şekilde oluşması, aterosklerozda olduğu gibi, hiperadhezyon, hiperagregasyon ve hipersekresyona neden olur (Yardımcı ve ark 1995).

#### **4.6.3 Trombosit aktivasyonunun biyokimyasal mekanizması**

Trombositlerin fizyolojik olarak aktivasyon veya inhibisyonu aktive edici veya inhibe edici bir hücre dışı uyarının trombosit yüzeyindeki spesifik reseptörüne bağlanması ile başlar. Trombosit aktivasyonunun üç aşamada gerçekteştiği kabul edilir:

**1)Uyarı:** Trombositleri aktive eden daha önce de basedilen birçok madde vardır. Genellikle agonistlerin ortaya çıkmasına yol açarak trombosit aktivasyonuna neden olan bir olay vardır. Agonistlerin trombositlere bağlanması bu hücrenin aktivasyonunu başlatır. Trombosit aktivasyonunu başlatan agonistler ayrıca zayıf ve güçlü agonistler olarak da sınıflandırılabilirler.

**Güçlü agonistler;**

- ◆ Trombin
- ◆ Kollajen
- ◆ Prostaglandin
- ◆ Endoperoksidler
- ◆ Tromboksan A2
- ◆ Trombosit aktive edici faktör (PAF)

Bu agonistler agregasyonun engellendiği şartlarda dahi granül sekresyonunu uyarabilirler.

**Zayıf agonistler ise;**

- ◆ ADP
- ◆ Epinefrin
- ◆ Vazopressin
- ◆ Serotonin

Granül sekresyonunu uyaramazlar. Bunlar, ancak trombosit agregasyonunu uyarabilirler. **Salınım reaksiyonu veya prostaglandin üretimini indükleyici maddeler:**

- ◆ **Enfeksiyöz ajanlar ve ürünleri:** Virüsler, bakteriler, tüberkülin, endotoksin, antijen-antikor kompleksleri ve bazı bakteri toksinleri.

◆ **Proteinler:**Sığır faktör VIII, C-reaktif protein, DNA, ferritin, immünglobulinler, PAF, polimerize fibrin monomerleri.

◆ **Enzimler:** Tripsin, fosfolipazlar, papain, plazmin, komplemanın bazı komponentleri, alkalen fosfataz.

◆ **Diğerleri:** Hiperglisemi, hipoglisemi, asetil kolin, araşidonat, tromboksan A2, kollajen ve çeşitli mikrofibriller, konkavalin A, yağ asitleri, iyonoforlar, lektinler, polilizin ve diğer katyonik polipeptidler, amniyotik sıvı metilen mavisi, nötrofil miyeloperoksidaz, fitohemaglutininler, ristosetin, yılan serumları, terapötik ultrasonikasyon, ultraviyole ışığı, nonkonjuge bilirubin, ürik asit kristalleri.

**2) Uyarı iletimi:** Hücre içindeki ikincil mesajcıların uyarıyı iletmeleriyle oluşur.

**3) Cevap:** Trombosit iskelet yapısının değişmesi (trombositin şekil değiştirmesi), trombositlerin fibrinojen aracılığı ile yapışıp küme oluşturmaları ve granül ekzositozu şeklinde olur (Nickels, Seyfert, Wenzel, Menger and Vollmar 2003).

### **Uyarıya Trombositin Yanıtı**

Trombositlerin aktive edici uyarılara yanıtı reverzibl ve irreverzibl trombosit yanıtı olmak üzere iki şekilde gerçekleşebilir:

**a) Geridönüşümlü yanıt:** Adhezyon, şekil değişikliği ve primer agregasyonu içerir. Trombositlerin endotel hücreleri arasındaki boşlukları kapatması,  $\alpha$  granüllerden büyüme faktörlerinin salınımı ve subendotelyumdaki küçük defektlerin onarımı gibi fizyolojik işlevler geridönüşümlü trombosit yanıtı ile gerçekleşir (Bergmeier, Schulte, Brockhoff, Bier, Zirngibl, Nieswandt 2002).

**b) Geridönüşümsüz yanıt:** Salınım reaksiyonunu ve sekonder agregasyonu içerir. Trombositlerin hemostatik işlevleri bu yanıt ile gerçekleşir. Trombosit salınım reaksiyonu, araşidonik asitten endoperoksidler, TXA2 gibi metabolitlerin oluşumunu yoğun ve  $\alpha$  granüller ile lizozom içeriklerinin salınımını içerir. Büyük trombosit agregatlarının oluşumu için bu salınım reaksiyonu gereklidir. Yoğun ve  $\alpha$  granül içeriklerinin salınımı ile ilişkili iki mekanizma tanımlanmıştır.

İlk mekanizma trombositlerin sekretuar granüllerin merkezileşmesi ve açık kanaliküler sistem aracılığı ile içeriklerini trombosit yüzeyindeki kanal ağızları yoluyla dışarı vermeleridir. Diğer mekanizma ise, sekretuar granüllerin membran ile ilişkili multiveziküler yapıların oluşumuna katılmak üzere perifere doğru yer değiştirmeleri ve sonra bu multiveziküler yapıların eriyerek içeriklerini çevreye salmalarındır (Nickels et al 2003). Anti-CD 62,  $\alpha$ -granül membran proteini GMP-140'a karşı geliştirilmiştir. İstirahat halindeki trombositlerin yüzeyinde GMP-140 saptanamaz. Trombin ile aktivasyondan sonra GMP-140 trombosit plazma membranına doğru yer değiştirir. Böylece anti-CD 62 sadece aktive trombositlerin yüzeyine bağlanır. PAC-1, GPIIb/IIIa kompleksi üzerindeki fibrinojen bağlanmasına yönelik bir antikordur. İstirahatteki trombositlerde bu fibrinojen bağlanma bölgesi yüzeyde açığa çıkmaz. Trombin uyarımı GP IIB/IIIa kompleksinde yapısal bir değişikliğe neden olur. Sonuçta fibrinojen bağlanma bölgesi açığa çıkar, bu nedenle PAC-1 sadece aktive trombositlerin yüzeyine bağlanır.

Trombositler, fiziksel ya da kimyasal uyarılarla uyarıldığında birçok biyokimyasal ve morfolojik değişiklikler olmaktadır. Trombositler istirahat halinde disk şeklindeki aktivasyon sonucu yapışkan psödopodlu, dendritik şekle dönüşürler (Nickels et al 2003). Bu reaksiyonlar zinciri trombosit aktivasyonu olarak adlandırılır. Aktivasyonla birliktaki yüzey değişimleri, aktive trombositlerden salınan antijenlere yönelmiş monoklonal antikolar kullanılarak ortaya konulmaktadır (Gurney, Lip and Blann 2002).

#### **4.6.4 Trombosit Membran Glikoproteinleri**

Trombositlerde reseptör fonksiyonu gören çeşitli membran glikoproteinleri tanımlanmıştır. Trombosit membranı 3 ayrı major glikoproteinden ibarettir. Bunlar sırasıyla GP I, GP II ve GP III'dür. Glikoprotein I bölgesinde GP Ia, Ib ve Ic; Glikoprotein II bölgesinde GP IIa, IIb ve Glikoprotein III bölümünde ise GP IIIa ve GP IIIb bulunur. Bunların yanında membranda GP IV ve GP V'de yer alır (Lalko, Deppe, Ulatowski, Lutgen, Hart and Patton 2003). Glikoprotein Ia (GP Ia), trombositlerin kollajen tarafından aktivasyonunda işlev görür. Glikoprotein Ib (GP Ib), trombosit

membranında en çok bulunan siyaloglikoprotein olup, primer fonksiyonu immobilize vWF aracılığı ile trombositlerin vasküler subendotelyuma adhezyonuna aracılık etmektir. Disülfid bağlarla bağlı  $\alpha$  ve  $\beta$  subünitlerinden oluşur (Gurney et al 2002). GP Ib, aynı zamanda trombinin de bağlar. Siyalik asitten çok zengindir ve membran yüzeyindeki negatif yükün büyük kısmını oluşturur. GP V, trombin için bir substrat görevi görür ve aynı zamanda GP Ib ile ilişkilidir (Lee, Foerster, Lukens, Paraskevas, Greer and Rodgers 1999).

Tablo 1: Trombosit Membran Glikoproteinleri

<b>Glikoprotein (GP)</b>	<b>Ligand</b>	<b>İşlev</b>
GP Ia/IIa	Kollajen	Adhezyon
GP Ic/IIa	Fn	Adhezyon
GMP – 140		Trombosit-lökosit etkileşimi
GP IIb/IIIa	Fb, WF, Vn, Fn	Agregasyon, Adhezyon
Vitronektin reseptör	Vn, vWF, Fn	Adhezyon
GP Ib/IX	vWF	trombin Adhezyon
GP V	Trombin	Substrat
GP IV	TSP, kollajen	Adhezyon

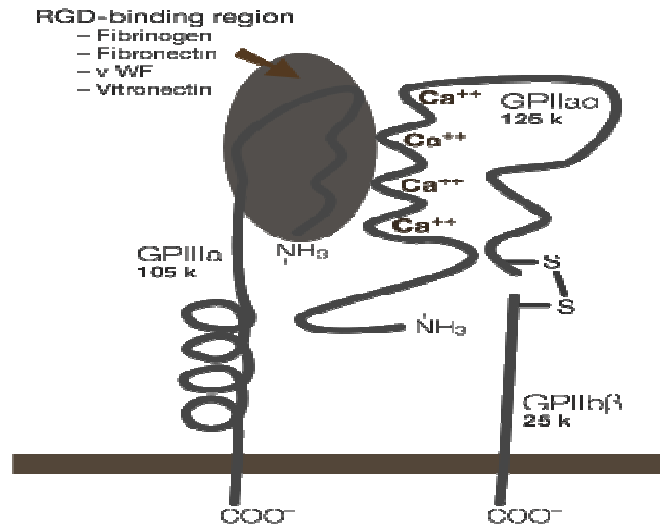
Fb: Fibrinojen Fn: Fibronektin Vn: Vitronektin  
TSP: Trombospondin vWF: von Willebrand Faktör  $\beta$ :Beta grupları

#### 4.6.4.1 GP IIb/IIIa (CD41/CD61) Fibrinojen Reseptörü

GP IIb/IIIa reseptörü, iki membran glikoproteininden oluşan ve trombosit membranı üzerinde en fazla bulunan integrindir. Total trombosit proteinlerinin % 1-3'ünü oluşturmaktadır. CD41/CD61'in  $\alpha$  ve  $\beta$  subüniteleri non-kovalent olarak birbirine bağlıdır. CD41/CD61 istirahatteki trombositlerin yüzeyinde kalsiyuma bağlı bir kompleks oluştururlar. CD41/CD61 kompleksinin yaklaşık % 70'i trombosit yüzeyinde rastgele bir dağılımda bulunurken, geri kalanı ise yüzeye bağlantılı kanaliküler sistem membranı ve sitoplazmik  $\alpha$  granül membranında bulunmaktadır. Tüm CD41/CD61 kompleksleri trombosit aktivasyonundan sonra membran yüzeyinde eksprese olurlar. Bu kompleks aktive trombositlerde fibrinojen, fibronectin, vitronektin ve vWF'ü bağlayabilmektedir. Plazma fibrinojeninin olmadığı durumlarda, fibrinojen yerine vWF'ün GP IIb/IIIa (CD41/CD61)'ya bağlanarak alternatif agregasyon mekanizmasını işlettiği gösterilmiştir (Lalko et al 2003).

Hücreler yüzeylerinde bulunan glikoprotein yapısındaki çeşitli reseptörler sayesinde diğer hücrelerle etkileşirler. Bu glikoproteinler antijenik yapıda olup aynı zamanda hücrenin kimliğini taşırlar. Hücre yüzeyindeki bu yapılar, günümüzde farklılaşma kümeleri (CD: Cluster of Differentiation) terimiyle adlandırılmaktadırlar.

Şekil 3: GP IIb/IIIa yapısı



Her CD hücre yüzeyinde bulunan farklı bir antijenik yapıyı temsil etmektedir. Trombositlerin membran yüzeyinde bulunan glikoproteinler reseptörleri oluşturmaktayken, yine bu alanda yer alan fosfolipidler pıhtılaşma faktörlerini oluştururlar (Demirel 1999). Sadece trombositte bulunanlar ise şunlardır: CD41, CD42 a, b, c, d, CD51, CD61, CD62, CD63, CD107 a, b (140). Bunlardan CD42 a, b, c vWF reseptörüdür. CD42 a, b, c'nin hasarlanmış damar duvarında subendotelyumda açığa çıkan vWF'e bağlanması adhezyon için gereklidir. CD42 a, b, c, eksikliğinde Bernard-Soulier sendromu ortaya çıkar. CD51 ile CD61 vitronektin reseptörünü, CD61 ile CD41 fibrinojen reseptörünü, CD36 kollajen, trombospondin ve P. falsiparum reseptörünü oluşturur. CD9 sinyal iletiminde rol almaktadır. CD62 (P-Selektin), CD63 in vitro trombosit aktivasyon göstergesidir. P selektin  $\alpha$  granül sekresyonunu yansıtır. CD61 (İntegrin, GP IIIa) ise in vivo trombosit aktivasyon göstergesi olarak da kullanılmaktadır (Michelson, Barnard, Krueger, Frelinger and Furman 2000). CD63, 50 kd olup aktive trombositlerde monosit ve makrofajlarda da ekspre edilmektedir. CD63'ün 4 adet hidrofobik transmembran bölgesi vardır. VLA-3 ve VLA- 6 integrinleri ile etkileşerek trombosit adhezyonuna katkıda bulunmaktadır (Rand, Leung and Packham 2003).

Trombosit membranında reseptör görevi gören, trombosit adhezyonu, agregasyonu, sekresyonu ve aktivasyonunda önemli rol alan çeşitli yapılar tanımlanmıştır. Bunlar arasında integrinler, selektinler ve membran yapısındaki fosfatidil serini tanıyan anneksin V sayılabilir.

#### **4.6.4.2 P-Selektin (CD 62, GMP-140, PADGEM)**

P-selektin; GMP-140, PADGEM (Platelet activation dependent granule external membrane protein) ya da CD 62 olarak da adlandırılmaktadır. 140 kD molekül ağırlıklı bir  $\alpha$  granül membran proteindir. P-selektin, ayrıca kemik iliğinde, megakaryositlerde, damar duvarını çevreleyen endotel hücrelerinin Weibel-Palade cisimciklerinde bulunur. Yapısı, nötrofillerin inflamasyon bölgesindeki endotele adhezyonuna aracılık eden bir endotel hücre reseptörü olan ELAM-1'e son derece benzerlik göstermektedir.

P-Selektin istirahatteki trombositlerin yüzeyinde saptanmaz. Yalnızca trombosit aktivasyonu ve  $\alpha$  granül salınım reaksiyonundan sonra trombosit membran yüzeyinde belirdiği gösterilmiştir. P-selektinin yüzeyel ekspresyonu  $\alpha$ -granül içeriği ile orantılıdır. Bir kez salındıktan sonra tekrar içeriye alınmaz ve geri dönüşüzdür. Böylece P-selektin sadece aktive trombositlerin yüzeyine bağlanır. Bu özellikleri nedeni ile P-selektinin trombosit aktivasyonunu gösteren güvenilir bir belirleyici olarak kullanılması önerilmektedir. Dolaşımdaki aktive olmuş degranüle trombositler yüzeylerindeki P-selektini hızla kaybederler, ancak kan dolaşımında bulunmaya ve fonksiyonel özelliklerine devam ederler. Bu özellikleri nedeni ile P-Selektinin herhangi bir uyarı sonrası ölçülmesi in vitro aktivasyon potansiyelini göstermektedir (Grünwald and Griesshammer 2004).

Endotel hücrelerindeki P-selektin; en yoğun olarak küçük ven ve venüllerde lokalizasyon gösterirken, küçük arterlerde, arteriollerde ve çok daha nadiren de kapillerlerde yama tarzında dağılım gösterebilmektedir. P-selektin, trombositlerde olduğu gibi endotel hücrelerinde de 'Weibel Palade cisimcikleri'nde granüller halinde depolanır. Bu cisimcikler, aynı zamanda vWF'ün yüksek molekül ağırlıklı multimerlerini çeşitli endotel hücre agonistleri tarafından salınana dek depolamaktadırlar. Yine aynen trombositlerde olduğu gibi, P-selektine karşı geliştirilmiş monoklonal antikorların, endotel hücrelerinin erken aktivasyonunu göstermede yararlı bir işaret olarak kullanılabilmesi belirtilmektedir. P-selektinin uyarılmış trombositlerde ve endotel hücrelerinde hızlı bir şekilde salgı granül membranından yüzey membranına göçü nedeniyle, P-selektinin inflamasyon ya da vasküler hasar gibi hücrelerin büyük çoğunluğunun aktive olduğu bölgelerde önemli bir reseptör olarak fonksiyon gördüğü düşünülmektedir (Michelson and Furman 1999).

P-selektin, aktive olmuş trombositler ve endotel hücrelerinin yüzeyinde bulunan, lökosit migrasyonunda, lökosit ve trombosit ilişkilerinin düzenlenmesinde ve lökositlerin pıhtı bölgesinde toplanmasında görev yapan bir adhezyon molekülüdür. Çalışmalar P-selektinin, lökositlerin gerek aktive trombositlere ve gerekse aktive endotel hücrelerine hızlı bir şekilde bağlanarak doku zedelenmesine karşı hemostatik ve

inflamatuvar yanıt arasındaki iletişimi kolaylaştırmada önemli rol oynadığını göstermektedir.

Yapılan çalışmalarda aktive trombositlerin monositlere, nötrofillere ve lenfositlere bağlandığı gösterilmiştir. Bu etkileşim, eriyebilir P-selektin proteini ve P selektine karşı geliştirilmiş monoklonal antikorlarla bloke edilebilmektedir (Grünewald and Griesshammer 2004). P-selektin düzeyi; hemolitik üremik sendrom, Diyabet, sigara, kanser ve aterosklerozda artar. Trombotik trombositopenik purpurada ise daha çok eriyebilir Pselektin seviyesi artmıştır (Lalko et al 2003).

Trombositler hemostazda önemli rol oynayan ve damar endotelinin doğruluğunu sürdüren çekirdeksiz hücrelerdir. Trombosit glikoproteinlerinin ekstraselüler matriks proteinleriyle olan etkileşimi bu rolde kritik önem taşımaktadır. İntegrin ailesinin bir üyesi olan GpIIb/IIIa, yapısal olarak fibrinojen gibi adeziv proteinlerle ilişkili trombosit adezyon reseptörüdür. Ligand bağlamak için bir agoniste ihtiyaç duyar ve yapısında konformasyonel bir değişikliğe uğrar. Bu modifikasyona ek olarak, trombosit  $\alpha$ -granüllerinden ve yüzey bağlantılı açık kanaliküler sistemden GpIIb/IIIa havuzuna katkı sağlanarak, ligand-bağlama fonksiyonu ve yüzey ekspresyonu artar. Trombositlere fibrinojen bağlanması trombosit agregasyonu için önemlidir. Trombosit agregasyonu normal hemostas için temeldir ve trombozda da rol oynamaktadır (Tetik S, Uras F, Ekşioğlu-Demiralp E 2008).

#### **4.7 Polimorfizmler**

Canlılar aleminde tüm türlerin farklılaşmasından ve bir türün üyeleri arasındaki farklılıklardan genetik çeşitlilik sorumludur. Genlerde, genetik çeşitliliğe yol açan bu değişikliklerden biri polimorfizmdir. Tek nükleotit polimorfizmleri, genomik DNA'nın bir popülasyonun normal bireyleri arasında farklılık gösterdiği tek baz-çifti değişiklikleridir. Gen polimorfizmleri popülasyonda yaygın görülür, etnik ve coğrafi farklılıklar gösterirler. Birçok durumda, hücre metabolizması için önemli olan yollarda (DNA tamiri, hücre döngüsü kontrolü, sinyal iletimi vb.) rol alan genlerin

kritik pozisyonlarında yer alırlar. Bazı durumda genin kodladığı proteinin fonksiyonu ya da enzim aktivitesi bu değişikliklerden önemli ölçüde etkilenebilir. Hücre metabolizması için kritik önem taşıyan proteinlerin fonksiyonun bozulması çeşitli hastalıklara yol açmakta veya bazı hastalıklar için riski artırmaktadır. Tek baz değişimleri ile ilişkili olarak ortaya çıkan hastalıklara örnek olarak trombofili verilebilir. Birçok gen polimorfizmi, kanser riski ile ilişkilendirilmiştir.

Genomda çoğunluğu tek nükleotit düzeyinde olmak üzere (insanda on milyon kadar) ikili, üçlü nükleotit tekrar sayılarında değişiklikler ve daha azı kromozom düzeyinde bazı yapısal düzenlemeler şeklinde genetik polimorfizmler vardır. Genetik hastalıklar DNA'daki bir değişiklik sonucu genin RNA ya da protein ürününün niteliğinin ya da niceliğinin (bazen her ikisinin) değişmesi sonucu oluşan hastalıklardır. İnsan genom proje araştırmalarıyla tüm genomdaki genlerin ve nükleotit dizilerinin belirlenmesinden sonra, genlerin ifade edilme düzeyleri ve ifade edilen gen ürünlerinin yapı ve işlevindeki farklılıklarını belirleme çalışmaları hız kazanmıştır.

Gen ekspresyonunun düzenlenmesi üzerinde etkili fonksiyonel polimorfizm, bireyler arasındaki duyarlılığa ve hastalık şiddeti farklılıklarına katkıda bulunabilir. Polimorfizm etkisini tek başına ya da diğer polimorfizmlerle kombine olarak gösterebilir.

Somatik mutasyon teorisine göre kanser, birden fazla genetik ve epigenetik faktörün etkisiyle çok aşamalı olarak ve kalıtsal ya da sonradan kazanılmış mutasyonların somatik hücrelerde birikmesiyle ortaya çıkan bir somatik genetik hastalıktır (Ekmekçi ve ark 2008).

Tek nüleotid polimorfizmlerinin (TNP), insan neslinde kansere olan yatkınlığı öngörmede, kanserin prognozunun belirlenmesinde ve tedavi seçiminde etkili olup olmadığı son yıllarda yoğun araştırmalara konu olmuştur.

#### 4.7.1 Meme kanseri ve glikoprotein genlerindeki çeşitli TNP'ler

2000'li yılların başlarına kadar meme kanseri riski ve prognozuyla ilgili olarak integrinleri kodlayan genlerdeki polimorfizmler hakkında az sayıda çalışma yapılmış ancak yakın zamanda bu çalışmaların sayısı artmıştır. Karsinogenez veya steroid metabolizmasında görevli çeşitli genlerde görülen bazı polimorfizmlerin meme kanseri riski veya prognozuyla ilgili olduğu bilinmektedir. Nitekim meme kanseri ile ilişkili genlerdeki polimorfizmlerin, hastalığa yatkınlık, erken tanı, prognoz ve tedaviye cevap gibi kritik konularla ilişkili olduğu da çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (Kong, Liu, Liu, Song, Wang and Liu 2010) (Czarnecka, Klemba, Krawczyk, Zdrozny, Arnold, Bartnik and Petros 2010).

Pek çok genin polimorfizmi ile meme kanseri riski arasındaki ilişkiyle ilgili olarak çalışmalar yapılmıştır. Glutathione S-transferaz (GSTs) gen ailesi, COMT, Sitokrom p450 genleri ve Beta-2-Adrenerjik Reseptör gen (ADRB2) bunlardan bazılarıdır (Dalay 2004) (Mutluhan, Akbas, Erdogan, Soylemez, Senli, Polat, Helvaci ve Seyrek 2008).

Feigelson ve ark. sitokrom P450c17 $\alpha$  enzimini kodlayan CYP17 genindeki polimorfizmin meme kanseri riskini arttırdığını saptamışlardır (Feigelson ve ark 1997).

Brendle ve ark. ITGB4 genindeki rs743554 TNP'sinin meme kanseri prognozunda potansiyel bir role sahip olabileceğini ve daha agresif tümöre sahip olan hastalarda kötü surveyle ilişkili olabileceğini söylemişlerdir (Brendle, Lei, Brandt, Johansson, Enquist, Henriksson, Hemminki, Lenner and Försti 2008).

$\alpha$ V $\beta$ 3,  $\alpha$ 6 $\beta$ 1 ve  $\alpha$ 6 $\beta$ 4 gibi belli integrinlerin De Novo ekspresyon ve up-regulasyonları melanoma, prostat ve meme karsinomlarında çeşitli kanser hücrelerinin artan motilite ve metastatik fenotipinden sorumludur.  $\alpha$ 2 $\beta$ 1 gibi diğer integrinlerin ekspresyonlarındaki azalma primer meme kanseri hücrelerinde invazyon ve metastaz eğilimindeki artmayla koreledir (Ayala et al 2003). Tümör hücreleri proliferasyon, migrasyon için integrinleri kullanırlar (Guo et al 2004) (Taddei et al 2003). Esas adeziv reseptörleri olan integrin  $\alpha$ 2 $\beta$ 1, integrin  $\alpha$ 2 $\beta$ 3 ve glikoprotein Ib $\alpha$  meme kanseri hücreleri tarafından da salgılanmaktadır. Bu reseptörler tümör hücre-indükleyici trombosit

agregasyonunda ve tümör invazyonu ve metastazındaki adezyon etkileşimlerinde kilit rol oynamaktadır. Çeşitli polimorfizmler bu molekülleri etkileyerek onların seviye, yapı ve fonksiyonlarında değişikliğe neden olmaktadır. Bu polimorfizmlerden ikisi integrin  $\alpha 2$  de (C807T ve G1648A), biri integrin  $\beta 3$  de (T1565C), biri GPIb $\alpha$  da (VNTR) daha önceden tanımlanmış ve kardiyovasküler hastalıklarla ilişkili olduğu gösterilmiştir (Bray 2000) (Di Castelnuovo, Gaetano, Donati, Iacoviello 2001).

Bazı çalışmalarda birbirine zıt sonuçlar elde edilmiştir. Bir çalışmada ITGA2 genindeki iki polimorfizm (Phe253Phe, Glu534Lys) ile meme kanseri riski arasında ilişki bulunurken, diğer bir çalışmada bu ilişki saptanamamıştır (Bray 2000). Yapılan iki çalışmada söz konusu tek nükleotid polimorfizmlerinin tümör evre ve dereceleri üzerindeki etkisi zıt bulunmuştur. Bugüne kadar en çok çalışma İntegrin genlerinden ITGB3 deki Leu33Pro tek nükleotid polimorfizmi üzerine yapılmıştır. Meme kanserli hastalarda yapılan iki çalışmada Pro alleli ile lenf nodu tutulumu arasında ilişki saptanırken diğer daha küçük bir çalışmada bununla çelişkili olarak Leu alleli ile lenf nodu tutulumu arasında ilişki saptanmıştır (Langsenlehner et al 2006) (Wang-Gohrke et al 2005).

Diaz ve ark.  $\alpha 6\beta 4$  reseptörünün ITGB4 tarafından kodlanan  $\beta 4$  alt biriminin ekspresyonundaki artışı büyük tümör çapı ve high-grade tümörlerle ilişkili bulmuşlardır. (Diaz et al 2005).

Langsenlehner ve ark. yaptıkları çalışmada ITGA2 1648-AA genotipini artmış meme kanseri riski ile ilişkili bulmuşlardır. Benzer olarak ITGA2 807C\_1648G haplotipini ('wildtype') taşıyanların meme kanser riski açısından taşımayanlara göre daha düşük risk altında olduklarını söylemişlerdir (Langsenlehner et al 2006). ITGA2 geni normal meme epitelinde meme kanserinin down regülasyonunda önemli rol oynayan integrin  $\alpha 2\beta 1$ 'i kodlamaktadır (Zutter et al 1990). Zutter ve ark. integrin  $\alpha 2\beta 1$ 'in zayıf diferansiye meme karsinomu hücrelerinden re-ekspresyonunun malign fenotipin diferansiye epitelyum fenotipe dönüştüğünü ve bu hücrelerde in vivo tümörejenitenin azaldığını kaydetmişlerdir (Zutter et al 1990).

#### 4.8 ITGA2B Geni c.2621T>G Polimorfizmi

Gen sembolü: ITGA2B (integrin, alpha 2b (platelet glycoprotein IIb of IIb/IIIa complex, antigen CD41)

Genomik koordinat: Chr 17: 39808591; Chr 17: 39808590-39808592

Kodon değişimi: ATC – AGC

Amino asid değişimi: Isoleucine – serin

Kodon numarası: 843

Genomik-sekans:

*tgccccccaggtggactgggggctgccca**T**ccccagcccctccccattcaccggccca*

Database TNP numarası (dbSNP): rs5911

HGVS nomenklatür: NM\_000419.3: c.2631T>G; NP\_000410.2: p.1874S

Varyant sınıfı: Hastalık ilişkili polimorfizm (reduced post-stroke mortalite, Carter 1999) (<http://portal.biobase-international.com/hgmd/pro/mut/.php> Erişim Tarihi:15 Mart 2012)

ITGA2B Gen Dizisi:

5'-----  
*GCTGGGTGGAAGAAAGACCTGGGAAGGCGGCCCCAGACCAACCACCGGGGCACCT  
CTGTGGGCTGGGGTTCGGGGGAGACCTGGGCCTGACCACTCCTTTGCCCCCCCAGGTG  
GACTGGGGGCTGCCATCCCAGCCCCTCCCCATTACCCGGCCCATCACAAGCGGGA  
TCGCAGACAGATCTCCTGCCAGAGCCGAGCAGCCCTCGAGGCTTCAGGATCCAGTTCT  
CGTAGTGAGCAGG*  
-----3'

##### 4.8.1 ITGA2B c.2621T>G (rs5911) Gen Polimorfizmi Sıklığı

Bu polimorfizmin sıklığı ile ilişkili olarak veritabanına kayıtlı 16 çalışma bulunmaktadır. Yapılan en kapsamlı çalışmada İspanyol popülasyonuna ait 2522 kişi taranmıştır. Bu çalışmanın sonucuna göre; TT genotipi sıklığı 0.377, TC genotipi sıklığı

0.492, GG genotipi sıklığı 0.131 olarak kaydedilmiştir. Veritabanındaki verilere göre diğer çalışmalarla birlikte dünya üzerinde toplam 4954 kişi bu polimorfizm açısından taranmıştır. Türkiye’de bu gen polimorfizm sıklığı ile ilgili yapılmış bir çalışma ulaşılabilen yerli ve yabancı literatürlerde yer almamaktadır (<http://portal.biobase-international.com/hgmd/pro/mut/.php> Erişim Tarihi:15 Mart 2012).

## 5. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu doktora tezi için 03.09.2008 tarihinde Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yerel Etik Komitesine başvurulmuş ve onay alınmıştır.

Bu çalışmaya Taksim Eğitim Ve Araştırma Hastanesi Cerrahi Servisi'ne müracaat eden, ince iğne aspirasyon biyopsisi veya meme cerrahisi sonucu klinikopatolojik bulgular neticesinde meme kanseri tanısı almış 30 kadın hasta ve 24 sağlıklı gönüllü birey dahil edilmiştir.

Kontrol grubu oluşturulurken kanser, diyabet, hipertansiyon gibi herhangi bir kronik hastalığı olmayan, tamamen sağlıklı bireyler çalışma grubuna dahil edilmiştir. Hasta grubunun yaş aralığı 31-83'dir. Hasta ve gönüllü bireylerden, uygun bilgilendirme işleminden sonra, EDTA'lı tüplere 5'er ml kan örnekleri alınmıştır. DNA izolasyonu periferik dolaşımdaki lökositlerden, DNA izolasyon kiti ile yapılmıştır. Elde edilen DNA'lar analiz edilinceye kadar -20 °C'de saklanmıştır. ITGA2B gen genotiplemesinin yapılması için uygun gen bölgesi PCR ile çoğaltılıp, uygun restriksiyon enzimi ile kesilmiştir. Daha sonra elektroforezde yürütülüp elde edilen veriler istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

Tüm hastaların demografik özellikleri, biyokimya ve patoloji sonuçları kaydedilmiş, hasta ve kontrol grubunun ITGA2B geni tek nükleotid polimorfizmi araştırılmıştır.

### 5.1 Kullanılan Araç ve Gereçler

- Klinik santrifüj (Hettich Universal /32R)
- Eppendorf santrifüj (Centrifuge 5415 R)
- pH metre (Orion Research, ionanalyzer/Model 47A)
- Spektrofotometre (Shimadzu UV-120-02)

- Ultrasantrifüj (Sigma 3K30, Germany)
- Colon (1x7cm, Pharmacia)
- Vakum pompası (KNF)
- Peristaltik pompa (Pharmacia)
- Vortex (LMS mixer UZUS10 VTX-3000L)
- Magnetik karıştırıcı-ısıtıcı (FALC)
- Kantitatif terazi (Scaltec SPB 42)
- Elektroforez güç kaynağı (EC250-90)
- Etüv (Memmert)
- Etüv (Electromag)
- Otomatik pipetler (Eppendorf)
- PCR (Mygene series Peltier Thermal Cyclers Model MG96G)
- UV görüntüleme sistemi (DNR Bioimaging systems Mini Bis Pro)
- Otoimmunstainer (Ventana Benchmark XT)
- Işık Mikroskobu (Olympus)
- Rotary mikrotom (Thermo Shandon Finesse)
- Düşük profil Mikrotom Bıçağı (Thermo Shandon)
- Pozitif Şarızlı Lam (Menzel)
- Penset (Thermo Shandon)
- Lamel (Menzel)
- Su banyosu (Sitogen)
- -20 derin dondurucu
- +4 soğutucu (Arçelik)

- Steril eldiven (Beybi)
- Fotoğraf makinesi (Huawei)

## **5.2 Kullanılan Kimyasal Maddeler**

- DNA Mini Kit (İnvitrogen PureLink Genomic, Katalog no: K 1820–00)
- Agaroz (Sigma)
- Etanol (Sigma)
- Etidyum Bromür
- dATP (Intron Biotechnology, Inc., Cat. No: 25021)
- dGTP (Intron Biotechnology, Inc., Cat. No: 25021)
- dCTP (Intron Biotechnology, Inc., Cat. No: 25021)
- dTTP (Intron Biotechnology, Inc., Cat. No: 25021)
- Tris-Borate-Edta Buffer (Sigma)
- Magnezyum Klorür (Intron Biotechnology, Inc., Cat. No: 25021)
- Taq DNA Polimeraz (Intron Biotechnology, Inc., Cat. No: 25021)
- PCR Buffer (Magnezyumsuz) (Intron Biotechnology, Inc., Cat. No: 25021)
- Yükleme Tamponu (Intron Biotechnology, Inc., Cat. No: 25021)
- Kesim Enzimi Bcc I (BioLabs, New England)
- Kesim Enzim BSA (BioLabs, New England)
- Kesim Enzim Buffer (BioLabs, New England)
- Primer Forward (Invitrogen, order date: 29/04/2011)
- Primer Reward (Invitrogen, order date: 29/04/2011)
- AEC Basic Detection Kit (Ventana, Tucson)

- Su bazlı kapama balzamu (Merck)
- Sekonder antikor ER (Thermo, Labvision)
- Sekonder antikor PR (Thermo, Labvision)
- H-GlyArg-Gly-Ser-Pro-OH (Chalbiochem)
- Tyrode's buffer
- CNBr-Activated Sepharose (Pharmacia)
- Fetal calf serum (FCS)
- Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)
- Phosphate buffered saline (PBS) (Sigma)

### 5.3 DNA İzolasyonunda Kullanılan Kimyasallar

DNA izolasyonu için Invitrogen PureLink Genomic DNA Mini Kit kullanılmıştır. Kit içeriği şekil 1'de verilmiştir. Çizelgede verilen kit içeriği kullanma kılavuzunda verilen bilgiler doğrultusunda aşağıdaki şekilde kullanıma hazırlanmıştır;

Tablo 2: DNA İzolasyonunda Kullanılan Kit İçeriği

PureLink Genomic Lysis/Binding Buffer	2 ml
PureLink Genomic Digestion Buffer	1.8 ml
PureLink Genomic Wash Buffer I	2 ml
PureLink Genomic Wash Buffer II	1.5 ml
PureLink Genomic Elution Buffer	2 ml
(10 mM Tris-HCl, pH 9.0, 0.1 mM EDTA)	0.4 ml
RNase A (20 mg/ml) in 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA	0.4 ml
Proteinase K (20 mg/ml) in storage buffer	0.2 ml
PureLink Spin Columns with Collection Tubes	10
PureLink Collection Tubes (2.0 ml)	20

## **5.4 Polimeraz Zincir Reaksiyonunda Kullanılan Çözeltiler**

### **5.4.1 Nükleotid Karışımı (dNTP)**

Nükleotid karışımı, herbirinin derişimi 100 mM olan dört ayrı nükleotid trifosfat (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) ana stoğundan ve herbiri için son derişim 2,5 mM olacak şekilde hazırlandı.

### **5.4.2 Primer Stok Çözeltisi**

Çalışma için Invitrogen firmasında sentezletilen liyofilize primerler üzerine 100 µl ultrapure su eklenerek çalışma stoğu hazırlandı. Çalışma çözeltisi için ise her primerin derişimi 10 pmol/µl olacak şekilde hazırlandı. Polimeraz Zincir Reaksiyonunda kullanılan bütün primerler –20 °C’de saklandı.

## **5.5 Agaroz Jel Elektroforezinde Kullanılan Çözeltiler**

### **5.5.1 Agaroz Jel Çözeltisinin hazırlanması**

% 2’lik çözelti için, 1,2 gr Agaroz, 60 ml 0.5xTEB içinde kaynatılarak üzerine çeker ocak altında 3 µl Etidyum Bromür (10 mg/ml) (DNA görüntülenmesi için) ilave edilmiştir. Donması için (şeffaf rengini kaybetmesi) birkaç dakika çeker ocak altında bekletilmiştir. %2,75’lik çözelti için ise 1,65 gr Agaroz ile diğer tüm basamaklar gerçekleştirildi.

### **5.5.2 Yürütme tamponunun hazırlanması**

22,5 mL 10x EDTA’dan alınıp 450 mL’ye distile su ile tamamlanmıştır. Bu biçimde 5X lik bir karışım hazırlanmıştır. Agaroz jeli içeren elektroforez tankına dökülmüştür.

### 5.5.3 Kuyucukların doldurulması

Parafin film üzerine otomatik pipet ile yaklaşık 1 cm aralarla damla damla yükleme tampon konmuştur. Önce 6 µL PCR örneği alınır aynı pipet ucuna loading dye damlalarından biri alınıp karıştırılarak ikinci kuyucuktan başlanılarak kondu. Öndeki ilk iki kuyucuğa 0,5'er µL 100 bp DNA merdiven markörü yine birer yükleme tamponu damlası ile karıştırılarak kondu. Tüm örnekler ayrı ayrı yükleme tamponu ile karıştırılıp kuyucuklara konduktan sonra 30 dakika 150 volt ile elektroforez cihazında yürütülmüştür. Elde edilen bantlar UV altında incelendi.

### 5.6 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR / PZR)

Spesifik bir DNA parçasının kopyalarının primerler tarafından yönlendirilerek, enzimatik olarak sentezlenmesi şeklinde tanımlanan ve in vitro bir yöntem olan Polimeraz Zincir Reaksiyonu; DNA replikasyonunun özelliklerini kullanmaya dayanan bir tekniktir ve çift iplikli bir DNA molekülünde hedef dizilere özgü iki oligonükleotid primer, kalıp DNA molekülü yüksek sıcaklık derecelerinde denatüre edildikten sonra, tek iplikli DNA molekülleri üzerinde kendilerine tamamlayıcı olan bölgelerle melezlenir.

Primerlerin spesifik olarak hedef dizilere bağlanması düşük sıcaklık derecelerinde gerçekleşir. DNA polimeraz enzimi, uygun tampon ve dört değişik deoksiribonükleozit trifosfat (dNTP) varlığında primerin 3' hidroksil ucundan uzamasını sağlar. Böylece kalıp DNA ipliğine tamamlayıcı olan yeni DNA molekülü sentezlenmiş olur.

Bir PZR döngüsü; denatürasyon, primerlerin bağlanması (annealing) ve sentez olarak adlandırılan üç aşamadan oluşur. Ardarda tekrarlanan denatürasyon, primer bağlanması ve sentez evreleriyle DNA fragmentleri üssel olarak artar. Bu üssel artışın nedeni, bir döngü sonucu sentezlenen ürünün, ardışık döngüde diğer primer için kalıp görevi yapmasıdır. Böylece her PZR döngüsü, DNA molekülü üzerinde istenilen bölgenin iki katına çıkmasıyla sonuçlanır.

PZR boyunca biriken ürünlerin boyu; iki primerin boyu ve hedef DNA bölgeleri arasındaki mesafelerin toplamı kadardır. Potansiyel olarak her döngünün %100 verimle gerçekleştiği varsayılırsa, örneğin 20 döngü sonucunda 220 kat ürün meydana gelir.

PZR'nin temel bileşenleri; kalıp olarak kullanılan DNA molekülü, DNA polimeraz enzimi, primerler, dNTP karışımı, tampon ve MgCl<sub>2</sub>'dür.

### 5.7 Kullanılan Primerler

ITGA2B - F1 ( İleri Primer):

Sekans ( 5' – 3' ) GCT GGG TGG AAG AAA GAC CT

ITGA2B - R2 ( Geri Primer ):

Sekans ( 5' – 3' ) CTG CTC ACT ACG AGA ACT GGA

### 5.8 ITGA2B Geni İçin Kullanılan PCR Karışımı

PCR reaksiyonu		
Stok reaktif	Bir PCR reaksiyonu için kullanılan hacim, µl	Bir PCR reaksiyonundaki son konsantrasyon
10X PCR tamponu	2,0	1 X
2.5 mM dNTP	1,6	0.2 mM
10 µM İleri primer	1,0	0,5 µM
10 µM Geri primer	1,0	0,5 µM
5 U/µl Taq Polimeraz Enzimi	0,25	0,06 U/µl
dH <sub>2</sub> O	13,15	
Toplam	19,0	

### 5.9 ITGA2B Geni İçin Kullanılan PCR Programı

Segment 1 (Hold)	95 °C	10	dk
Segment 2(Cycle)	94 °C	20	sn
	62 °C	30	sn
	72 °C	40	sn
Segment 3 (Hold)	72 °C	5	Sn
Segment 4 (Hold)	4 °C	Sonsuz	(99dk00s)

Toplam süre: 5850 saniye (97,5 dakika)

### 5.10 Kullanılan Kesim Karışımı

*BccI* için (50 µl) ;

Restriksiyon Enzim Kesim Reaksiyonu		
Stok reaktif	Bir tüpte kullanılan hacim, µl	Bir tüpteki son konsantrasyon
10 X NE Tamponu	5,0	1X
100X BSA	0,5	1X
10 U/µl <i>BccI</i> enzimi	0,25	0,05 U/µl
dH <sub>2</sub> O	34,25	
Toplam	40,0	

### 5.11 Agaroz Jel Elektroforezi

DNA'nın elektroforetik analizinin temeli, bu molekülün elektriksel bir alanda, jel üzerindeki göçüne dayanır. Bu göç hızı, molekül büyüklüğüne ve yapısına, jelde

kullanılan maddenin konsantrasyonuna, iyonik kuvvete ve uygulanan akıma bağlı olarak değişmektedir.

Agaroz; kırmızı bir alg türü olan *Agar agar*'dan izole edilen doğrusal bir polisakkarittir. Agaroz sıcak suda çözünür ve soğutulduğu zaman polimerde karşılıklı hidrojen bağlarının oluşumu ile jel yapısı oluşur, bu oluşum geri dönüşümlüdür.

DNA'nın agaroz jelde görünür hale gelebilmesi etidyum bromürün DNA bağları arasında bağlanarak 300 veya 360 nm'de ışığı absorblaması sonucu fluoresan etki göstermesi ile olur.

## 5.12 Restriksiyon Enzimi Kesim Bölgesi

*BccI* Restriksiyon Enzimi tanıma bölgesi:

5'...*C C A T C* (N)<sub>4</sub> ...3'

3'...*G G T A G* (N)<sub>5</sub> ...5'

Aşağıdaki dizide primerler ve enzim tanıma bölgesi gösterilmiştir:

**F** CAACCCCTCTCAAGGTAAGA **GCTGGGTGGAAGAAAGACCT** GGGGAAGGCGGCCCCAGACCAA **ITGA2B**  
CCACCGGGGCACCTCTGTGGGCTGGGGTTCGGGGGAGACCTGGGCCTGACCACTCCTTTG  
CCCCCCCAGGTGGACTGGGGGCTGC **CCAT** CCCCAGCCCCTCCCCATTACCCGGC **CCAT**  
**CACAAGCGGGATCGCAGACAGATCTTCCTGCCAGAGCCCCGAGCAGCCCTCGAGGCTTCAG**  
**R** GA **TCCAGTTCTCGTAGTGAGCAG** GCTCTCTGGTCTCTGGCCCCGGCCTCCCCGGGACCCAC **ITGA2B**

## 5.13 DNA İzolasyonu

### Prensip

PureLink Genomic DNA Mini Kit (İnvitrogen, Katalog no: K 1820-00) kullanılarak kan örneklerinden DNA saflaştırılmıştır. Bu saflaştırmanın temelinde DNA'nın kaotropik silika membrana bağlanması yatar. DNA'lar silika membrana bağlanırken, hemoglobin, hücresel artıklar ve diğer proteinler, yıkama solüsyonu ile uzaklaştırılmaktadır. Elüsyon sonucu elde edilen DNA'lar 20-50 kb boyutundadır.

### Uygulama

Steril bir ependorf tüpüne 200 µl tam kan alındı ve üzerine 20 µl RNaz A, 20 µl proteinaz K eklendi. Ependorf tüplerinin ağzı kapatılıp 1 dakika vortekslendi ve 2 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından karışıma 200 µl Genomic lysis binding buffer eklendi ve önceden hazırlanmış sıcak su banyosunda 55 °C'de 10 dakika inkübasyona bırakıldı. 10 dakika sonra karışımın koyu renge dönüştüğü gözlemlendi. İnkübasyonun ardından üzerine 200 µl %96-100 etanol eklenip iyice karıştırıldı.

Ortalama 640 µl olan lizat bir spin kolona aktarılıp oda ısısında 1 dakika 10 000 g'de santrifüj edildikten sonra toplama tüpü değiştirildi ve spin kolon temiz bir toplama tüpüne kondu. Spin kolona 500 µl yıkama tamponu 1 (önceden %96-100 etanol ile hazırlanmış) eklenip oda ısısında 1 dakika 10 000 g' de santrifüj edildi. Toplama tüpü tekrar değiştirilip spin 500 µl yıkama tamponu 2 (önceden %96-100 etanol ile hazırlanmış) eklenip oda ısısında 3 dakika maksimum hızda santrifüj edildi. Alttaki toplama tüpü atılarak yeni bir temiz toplama tüpüne konan spin kolon üzerine 100 µl elüsyon tamponu kondu. Oda ısısında 1 dakika inkübe edildi. Ardından oda ısısında 1,5 dakika maksimum hızda santrifüj edildi. Bu işlem bir kez daha tekrarlandı ve sonra filtre tüpü atıldı. Elüsyon tamponu DNA'nın filtreden çözünmesini sağladığından hedef DNA da tampon ile birlikte ependorf tüpüne alınmış oldu. Her elüsyon aşaması %60-70 oranında DNA'yı spin kolondan ayırmaktadır. Toplam elüsyon tampon miktarını ikiye

bölerek elüsyon aşamasını iki kere tekrarlamak suretiyle bu oranın en az %90'a çıkarılması sağlanmış oldu. Toplama tüpündeki saflaştırılmış DNA -20 °C'de saklandı.

### **İzole DNA'nın Özelliği;**

PureLink Genomic DNA Mini Kit (İnvitrogen, Katalog no: K 1820–00) kullanılarak izole edilen izole DNA 20–50 kb boyutundadır ve PCR ile enzim kesimi için uygundur. Elde edilen izole DNA UV ışık altında 260 nm'de absorbans vermektedir.

## **5.14 Moleküler Analiz**

### **Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Uygulaması**

ITGA2B gen amplifikasyonu, Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR, Polymerase Chain Reaction) yöntemiyle *F Sekans ( 5' – 3' ) GCT GGG TGG AAG AAA GAC CT* ve *R Sekans ( 5' – 3' ) CTG CTC ACT ACG AGA ACT GGA* primerleri kullanılarak yapıldı. PCR ortamı her bir örnek için; final hacim 1 µl genomik DNA, 2 µl dNTP (2,5 mM) karışımı, 2 µl primer forward (10 pmol), 2 µl primer reward (10 pmol), 0,75 µl MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 10x PCR tamponu ve 0,20 µl Taq polimeraz olacak şekilde hazırlandı .

Amplifikasyon, otomatik bir thermal cycler kullanılarak gerçekleştirildi. PCR koşulları laboratuvar koşullarımıza uygun olarak modifiye edilerek şu şekilde sağlandı:

<b>95 oC 10 dakika</b>	<b>1 Döngü</b>	<b>İlk Denatürasyon</b>
94 oC 20 saniye	35 Döngü	Denatürasyon
62 oC 30 saniye		Primer Bağlanma-Annealing
72 oC 5 dakika		Uzama-Extension
72 oC 7 dakika	1 Döngü	Son Uzama-Final Extension

PCR ürünleri RFLP ve elektroforez işlemlerinde kullanılmak üzere -20 °C'de saklandı.

### **5.15 Elektroforez İşlemi**

PCR işlemi sonrasında, ITGA2B geninin amplifiye olup olmadığını kontrol etmek ve amplifiye olan gen bölgesinin uzunluğunu belirlemek için agaroz jel elektroforez işlemi uygulandı. PCR işlemi sonunda amplifiye edilen gen bölgesinin uzunluğu 244 baz çifti (bp) olduğundan RFLP yapılmadan önce gözlenmesi gereken tek bir bant görüntüledi.

PCR ürünlerini (amplikon) belirlemek için % 2,5'luk agaroz jel hazırlandı. Hazırlanan agaroz jel taraklarını eritmeyecek ısıya düşmesini sağlamak için, manyetik karıştırıcıda uygun ısıya düşene kadar karıştırıldı. Karıştırma esnasında jel içerisine final konsantrasyonu 0,5 µg/ml olacak şekilde EtBr eklendi. Jel uygun ısıya düşünce jel kalıbına döküldü ve jel tarakları yerleştirilerek katılaşması beklendi. Yaklaşık 1-2 saat sonunda jel tamamen katılaştıktan sonra jele gömülü taraklar çıkarıldı ve jeller elektroforez tankına yerleştirildi. Elektroforez tankının içine yerleştirilen jelin üst kısmı tamamen tampon ile örtülünceye kadar elektroforez tankı yürütme tamponu ile dolduruldu. PCR örneklerinin üzerine 1/6 oranında 6X boya yükleme solüsyonu eklendi ve iyice karışması sağlanan örneklerin her biri otomatik pipet yardımıyla kuyucuklara yüklendi. Elde edilen bandın uzunluğunu tespit etmek amacıyla 12 µl 100 bp'lik marker (100 bp DNA Ladder) kullanıldı. Örneklerle 120 voltluk akım uygulanarak 30 dakika yürütüldü. Elde edilen DNA bantları jel görüntüleme sistemi yardımıyla görüntüledi. Gözlenen bantların moleküler uzunluğu, DNA standartı ile karşılaştırılarak yaklaşık olarak belirlendi. Elde edilen görüntü kaydedilerek saklandı.

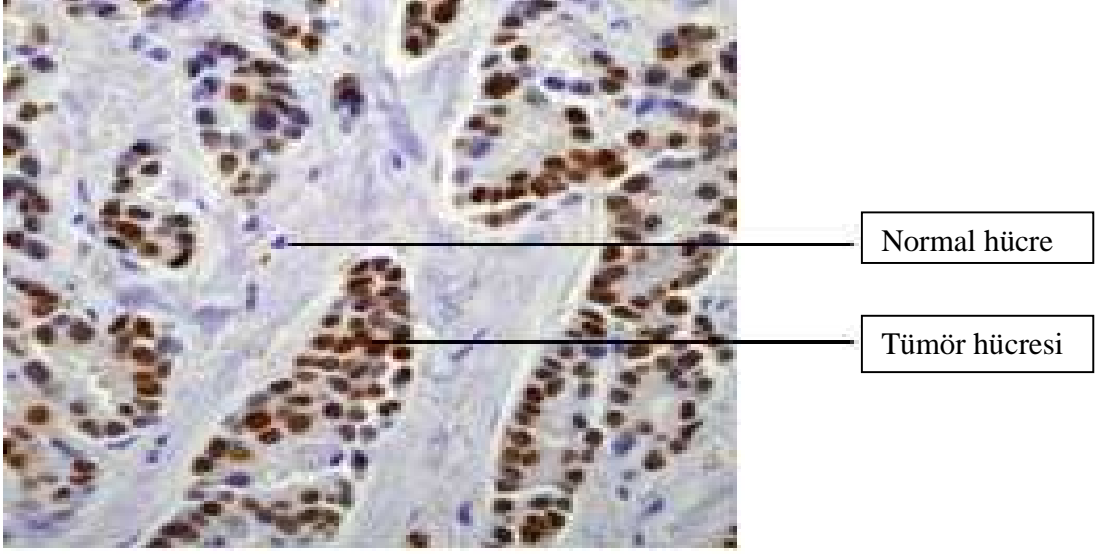
### **5.16 Restriksiyon Enzimi Parça Uzunluk Polimorfizmi (RFLP) İşlemi**

Restriksiyon enzimi (BccI) mikrolitrede 2,5 ünite olacak şekilde hesaplanmıştır. 10x NE tamponu, kesim reaksiyonunun gerçekleşeceği toplam 50 mikrolitre de 1X olacak biçimde kullanılmıştır. Öncelikle, 40 µL reaksiyon karışımı hazırlanıp üzerine 10 µl PCR örneği ilave edilerek, toplam 50 µl lik hacimde kesim işlemi gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon gece boyu 37°C'da bekletilmiş, ardından 65°C'da 20 dakika tutularak

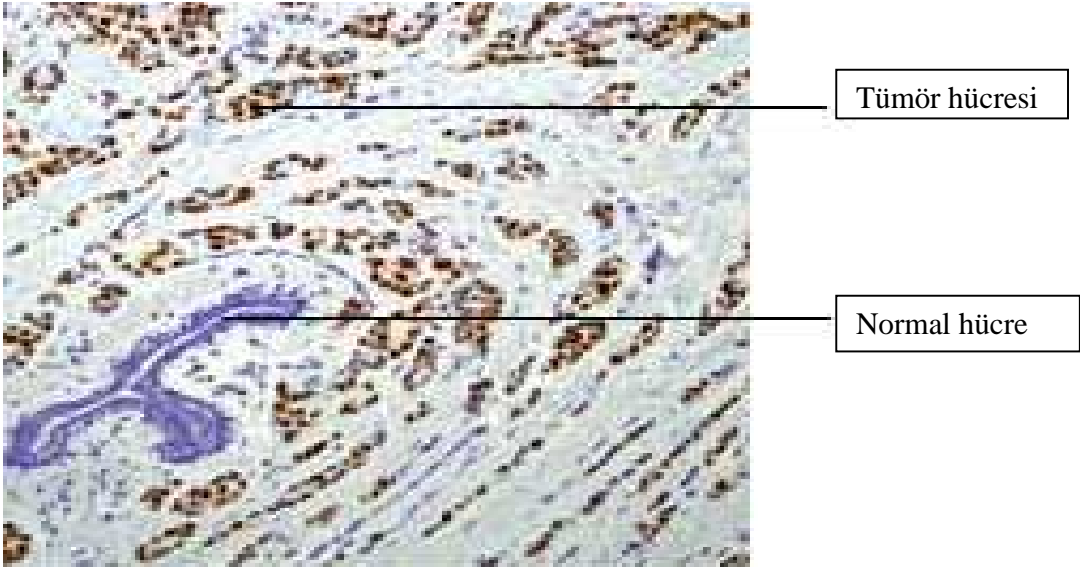
restriksiyon enzimi dezaktive edilmiştir.. Elde edilen ürün 100 bp merdiven markör eşliğinde agaroz jelde yürütülmüş ve UV ışığı altında görüntülenen bantlar değerlendirilmiştir.

### **5.17 İmmunhistokimyasal Boyama**

Olgulara ait hematoksilen eozin (HE) boyalı preparatlar ısı mikroskopunda incelendi ve değerlendirildi. Her olgu için uygun parafin bloklar seçildi. Parafin bloklardan immünohistokimyasal çalışma için pozitif şarızlı lamlar üzerine rotary mikrotom cihazı ile 4 mikrometre kalınlığında kesitler alındı. Parafin bloklardan alınan kesitler 60 °C'lik etüvde bir gece boyunca bekletildi. Otoimmunstainerda boyanmak üzere slaytlar üzerine ER ve PR antikorlarına ait protokol barkodları yapıştırıldı. Slaytlar Ventana AEC Basic Detection ticari kiti kullanılarak Ventana Benchmark XT model otoimmunstainerda boyandı. Cihazdan alınan slaytlar 50 °C'lik sabunlu suda yıkandı. 60 °C'lik etüvde 15 dakika inkübe edilen slaytlar su bazlı kapama balzamu ile kapandı. Mikroskopik değerlendirme yapıldı.



Resim 1: İmmunhistokimyasal boyamada ER pozitifliği



Resim 2: İmmunhistokimyasal boyamada PR pozitifliği

## 5.18 Glikoprotein IIb/IIIa İzolasyonu

### 5.18.1 Trombosit ekstraktının hazırlanması

Üç ünite izole trombosit 1 mM CaCl<sub>2</sub> içeren Tyrode tamponuyla üç kez yıkandı. 800 g'lik santrifüjün ardından, pelet (5 ml), 10 mM fosfat, 150 mM NaCl, 1mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub> phosphate-buffered saline (PBS) ve PMSF içeren soğuk karışım ile süspansiyon edildi. Süspansiyon 4<sup>o</sup>C'de 15 dakika inkübe edildikten sonra 4<sup>o</sup>C'de 20 dakika 30,000 g'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası ham trombosit ekstraktı süpernatant içerisinde kaldı.

### 5.18.2 Afinite matriksin hazırlanması

- a. 3.5 g of CNBr-Activated Sepharoz 15 dakika 1 mM HCl ile yıkandı.
- b. 100 mg GRGDSP-peptid ,50 ml 0.1 M NaHCO<sub>3</sub>+ 0.5 M NaCl tamponu (pH 8.3) içinde çözüldü, ve geceboyu 4<sup>o</sup>C'de inkübe edildi.
- c. a and b materyalleri ek olarak 4<sup>o</sup>C'de 1 gece daha inkübe edildi.
- d. Süspansiyon 0.1 M NaHCO<sub>3</sub>+0.5 M NaCl tamponu (pH 8.3) ile yıkandı.
- e. Süspansiyon üzerine 50 ml 0.1 M Tris-HCl (pH 8) eklendi ve oda ısısında 2 saat inkübe edildi.
- f. Süspansiyon aşağıda belirtilen üç farklı tampon çözeltiyle yıkandı;
  1. 0.5 M NaCl+0.1 M NaCHCOO pH 4,5
  2. 0.5 M NaCl+ 0.1 M Tris-HCl pH 8,5
  3. 0.5 M NaCl+0.1 M NaCH<sub>3</sub>COO pH 4,5

PBS ve PMSF karışımı affinite matriksine konularak,bu karışım ham trombosit özütü ile 4<sup>o</sup>C'de gece boyu inkübe edildi.

### 5.18.3 GpIIb/IIIa izolasyonu

Gece boyu süren inkübasyondan sonra afinite materyali kolona toplanarak 4 °C'de 50 ml denge tamponuyla yıkandı. Bu şekilde proteinler matrikse bağlanmış oldu. Akış hızı 0.96 ml/dakika olan fraksiyonlar toplandı. Protein konsantrasyonları Lowry metodu ile tespit edildi.

SDS-PAGE elektroforezi % 15 (w/v) gliserol içeren % 10'luk poliakrilamid jelde çalışıldı. Yürütme tamponu için % 10'luk SDS ve 1.5 M Tris-HCl (pH 8.8) kullanıldı. Örnekler 0.4 ml β-merkaptoetanol kullanılarak hazırlandı. Protein bandları Coomassie Brilliant Blue ile boyanarak görüntülendi. Moleküler ağırlık markörleri olarak; miyosin, (205 kDa); β-galaktosidaz, (116 kDa); fosforilaz b, (97 kDa); bovine serum albumin, (66 kDa); ovalbumin, (45 kDa); ve karbonik anhidraz kullanıldı (29 kDa).

### 5.19 Verilerin Değerlendirilmesi

Çalışılan *ITGA2B* geninin NCBI veri bankasına göre 344 adet tek nükleotidlik polimorfizmi bulunmaktadır. Çalışmamızda rs5911 referans numaralı polimorfizm incelenmiştir.

Bu polimorfizmin nükleik asit olarak nomenklatürü c.2621T>G (NM\_000419.3), amino asit düzeyindeki nomenklatürü p.Ile874Ser (NP\_000410.2) olarak adlandırılmaktadır. Bu polimorfizm 30 eksonlu *ITGA2B* geninin 26 ıncı eksonunda ve integrin alfa-IIb ağır zincir formunun üzerinde yer almaktadır.

ITGA2B-F1 ve ITGA2B-R2 primer çifti 244 baz çiftlik bir bölgeyi çoğaltmaktadır. BccI enzimi ise bu bandı genotipe göre farklı noktalardan kesmektedir. Kesim sonrasında; 31, 78, 135 baz çiftlik bantların elde edilmesinormal homozigot T/T genotipini, 78,166 baz çiftlik bantların elde edilmesipolimorfik homozigot G/G genotipini, 31, 78, 135, 166 baz çiftlik bantların elde edilmesi ise polimorfik heterozigot T/G genotipini göstermektedir.

## **5.20 İstatistiksel Analiz**

Verilerin istatistiksel olarak değerlendirilmesi SPSS 16.0 (Chicago, IL) kullanılarak yapılmıştır. Sürekli değişkenler ortalama  $\pm$  standart sapma (SD) olarak ifade edilirken kategorik değişkenler yüzde dilimi olarak verilmiştir. Farklı genetik polimorfizmler ile histolojik verilerin ve prognostik parametrelerin karşılaştırılması Chi-square testi ve Pearson correlation testi kullanılarak yapılmıştır. P değerinin 0.05 in altında olması istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

## 6. BULGULAR

Tablo 3: Hasta ve kontrol grubunun demografik verileri

	N (Sayı)	Minimum yaş	Maksimum yaş	Ortalama yaş	Standart sapma	Erkek	Kadın
<b>Hasta (Meme Kanseri)</b>	30	31	83	59,5	14.16	0	30
<b>Kontrol</b>	24	32	59	51.38	7.03	0	24

Çalışmada hasta grubunu 30, kontrol grubunu 24 olgu oluşturmaktadır. Olguların cinsiyetleri sayı olarak tablodadır. Hasta ve kontrol grubu sigara içmeyen bireylerden oluşmuştur. Kontrol grubuna sağlıklı bireyler dahil edilmiştir. Hastalardan 28 tanesi patolojik olarak invaziv duktal karsinom, 2 tanesi invaziv miks karsinom tanısı almıştır.

Tablo 4: Hasta grubunun haplotip dağılımı, yaş ve meme kanserine ait prognostik parametreleri gösteren tablo.

	Genotip	Yaş	Histolojik Grade	Nükleer Grade	Tümör Çapı	Lenfovasküler İnvazyon	Lenf Nodu Metastazı	ER	PR
1	GG	51	III	III	1,3 cm	YOK	VAR	+	+
2	TT	61	II	II	3 cm	VAR	VAR	+	+
3	GG	49	III	III	4,5 cm	VAR	VAR	+	+
4	TG	80	II	II	1.5 cm	YOK	YOK	+	+

<b>5</b>	TT	52	II	II	3,4 cm	YOK	YOK	-	-
<b>6</b>	TG	62	II	III	2,8 cm	YOK	YOK	+	+
<b>7</b>	TT	69	II	II	3,2 cm	VAR	VAR	+	+
<b>8</b>	GG	42	III	III	5,5 cm	VAR	VAR	+	+
<b>9</b>	GG	53	III	III	2,5 cm	VAR	VAR	+	+
<b>10</b>	TT	75	II	III	2,4 cm	VAR	YOK	+	+
<b>11</b>	TG	44	II	II	2 cm	VAR	VAR	+	+
<b>12</b>	TG	49	III	III	4 cm	VAR	VAR	+	+
<b>13</b>	TT	39	II	III	4,5 cm	VAR	VAR	+	+
<b>14</b>	TG	81	II	III	2 cm	VAR	VAR	+	+
<b>15</b>	TT	83	II	II	4 cm	VAR	VAR	+	+
<b>16</b>	TT	48	II	II	4 cm	YOK	YOK	+	+
<b>17</b>	TT	68	II	II	3,5 cm	YOK	YOK	+	+
<b>18</b>	TG	42	II	II	4,5 cm	VAR	YOK	+	-
<b>19</b>	TT	72	II	II	2 cm	YOK	YOK	+	+
<b>20</b>	TG	74	II	III	4 cm	VAR	YOK	-	-
<b>21</b>	GG	31	III	III	4 cm	YOK	YOK	-	-
<b>22</b>	TG	75	II	II	4,5 cm	YOK	YOK	+	+
<b>23</b>	TG	55	III	III	2,8 cm	YOK	VAR	-	+
<b>24</b>	TG	58	II	III	2 cm	YOK	YOK	+	+
<b>25</b>	TG	63	II	III	3,5 cm	VAR	VAR	+	+

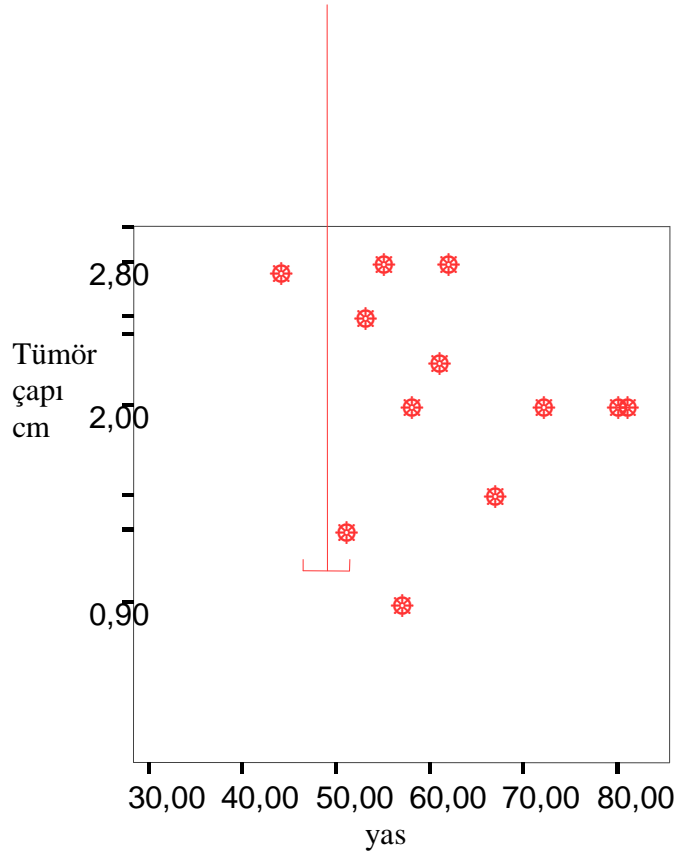
26	TG	61	II	III	1,5 cm	YOK	YOK	+	+
27	TG	44	III	III	3,5 cm	VAR	VAR	-	+
28	TG	80	II	III	2,5 cm	VAR	VAR	-	+
29	TG	57	II	II	0,9 cm	YOK	YOK	+	+
30	TG	67	II	III	1,5 cm	YOK	YOK	+	+

HİS.GRADE: Histolojik grade, NÜK.GRADE: Nükleer grade, LENFOVAS. İNV: Lenfovasküler invazyon, L.N. MET: Lenf nodu metastazı, ER: Östrojen reseptör, PR: Progesteron reseptör.

Hasta grubuna ait ortalama tumor çapı  $3,0433 \pm 1,17640$  cm'dir (min:0,9 max:5,5).

Tümör çapı ile yaş arasında bir ilişkiye rastlanmamıştır.

Şekil 4: Yaşa göre tümör çapı büyüklüğü

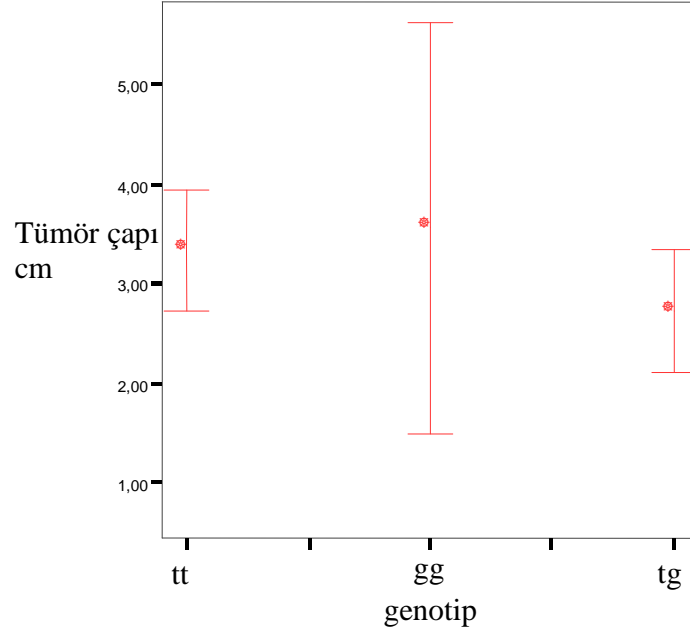


Tablo 5: Hasta grubu tümör çapları genotip dağılımı

		<u>genotip</u>			<u>Toplam</u>
		<b>tt</b>	<b>gg</b>	<b>tg</b>	
<b>Tumor çapı</b>	<b>0,90</b>	0	0	1	1
	<b>1,30</b>	0	1	0	1
	<b>1,50</b>	0	0	3	3
	<b>2,00</b>	1	0	3	4
	<b>2,40</b>	1	0	0	1
	<b>2,50</b>	0	1	1	2
	<b>2,80</b>	0	0	2	2
	<b>3,00</b>	1	0	0	1
	<b>3,20</b>	1	0	0	1
	<b>3,40</b>	1	0	0	1
	<b>3,50</b>	1	0	2	3
	<b>4,00</b>	2	1	2	5
	<b>4,50</b>	1	1	2	4
	<b>5,50</b>	0	1	0	1
<b>Toplam</b>		9	5	16	30

Tümör çapı ile genotip durumu incelendiğinde aralarında istatistiksel olarak bir fark yok ( $p=0,322$ ). En küçük tumor çapına sahip hasta tg polimorfizmi gösterirken, en büyük tumor çapına sahip hasta gg polimorfizmi taşımaktadır.

Şekil 5: Hasta grubu genotiplere göre tümör çap büyüklükleri



Normal ya da polimorfik genotipe sahip olmak tümör çapını arttırmamaktadır.

Tablo 6: Hasta grubu genotiplere göre lenfovasküler invazyon durumu

Lenfovasküler invazyon	<u>genotip</u>			<u>Toplam</u>
	tt	gg	tg	tt
Yok	4	2	8	14
Var	5	3	8	16
<b>Toplam</b>	9	5	16	30

Lenfovasküler invazyon ile genotip durumu incelendiğinde istatistiksel olarak bir fark yok ( $p=0,915$ ). Homozigot polimorfik (gg) veya heterozigot polimorfik (tg) olmak lenf nodu metastazı riskini arttırmıyor.

Tablo 7: Hasta grubu genotiplere göre lenf nodu metastazı durumu

<b>Lenf nodu metastazı</b>	<b><u>genotip</u></b>			<b><u>Toplam</u></b>
	<b>tt</b>	<b>gg</b>	<b>tg</b>	<b>tt</b>
<b>Yok</b>	5	1	9	15
<b>Var</b>	4	4	7	15
<b>Toplam</b>	9	5	16	30

Lenf nodu metastazı ile genotip durumu incelendiğinde istatistiksel olarak bir fark yok ( $p=0,339$ ). Homozigot polimorfik (gg) veya heterozigot polimorfik (tg) olmak lenf nodu metastazı riskini arttırmıyor.

Tablo 8: Hasta grubu genotiplere göre ER poz./neg. durumu

<b>ER</b>	<b><u>genotip</u></b>			<b><u>Toplam</u></b>
	<b>tt</b>	<b>gg</b>	<b>tg</b>	<b>tt</b>
<b>Neg.</b>	1	1	4	6
<b>Poz.</b>	8	4	12	24
<b>Toplam</b>	9	5	16	30

Östrojen reseptör varlığı/yokluğu ile genotip durumu incelendiğinde istatistiksel olarak bir fark yok ( $p=0,707$ ).

Tablo 9: Hasta grubu genotiplere gore PR poz./neg. durumu

<b>PR</b>	<b>genotip</b>			<b>Toplam</b>
	<b>tt</b>	<b>gg</b>	<b>tg</b>	<b>tt</b>
<b>Neg.</b>	1	1	2	4
<b>Poz.</b>	8	4	14	26
<b>Toplam</b>	9	5	16	30

Progesteron reseptör varlığı/yokluğu ile genotip durumu incelendiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki yok ( $p=0,887$ ).

Tablo 10: Hasta grubu genotiplere gore histolojik grade durumu

<b>Histolojik grade</b>	<b>genotip</b>			<b>Total</b>
	<b>tt</b>	<b>gg</b>	<b>tg</b>	<b>tt</b>
<b>II</b>	9	0	13	22
<b>III</b>	0	5	3	8
<b>Total</b>	9	5	16	30

Homozigot polimorfik (gg) olmak histolojik grade III tümör için istatistiksel olarak önemli bir risk faktörü ( $p=0.000$ ). gg genotipli bireylerin hepsi histolojik grade III tümöre sahiptirler.

Tablo 11: Hasta grubu genotiplere göre nükleer grade durumu

Nükleer grade	genotip			Total
	tt	gg	tg	
II	7	0	5	12
III	2	5	11	18
<b>Total</b>	9	5	16	30

Homozigot polimorfik (gg) olmak nükleer grade III tümör için istatistiksel olarak önemli bir risk faktörü ( $p=0.010$ ). gg genotipli bireylerin hepsi nükleer grade III tümöre sahiptirler.

Tablo 12: Kanserli olguların ve kontrol grubunun genotipleri

Genotip	Olgular	Kontroller
<b>T/T</b>	(%30)	(%33,3)
<b>T/G</b>	(%53,3)	(%60)
<b>G/G</b>	(%16,6)	(%6,7)

Olgu ve kontrol grupları arasında genotip dağılımı açısından bir fark yok.

## 7. TARTIŞMA

Memenin luminal hücrelerinden eksprese edilen İntegrin alpha2beta1 normal meme dokusunun ve epitelinin morfogenezinde önemli rol oynayan majör bir integrindir. Meme kanserlerinde integrin alpha2 ekspresyonunun down-regülasyonu metastatik davranış ve adeziv özelliklerin kaybolmasıyla bağlantılıdır. High grade karsinomlarda aksillar lenf nodu metastazıyla ilişkili olarak alpha2 ekspresyonunda anlamlı bir düşüş saptanmıştır.

İntegrin alpha2beta3 meme kanserinde ve diğer neoplazmlarda da salgılanmaktadır. Tümör biyolojisinde özellikle metastaz formasyonundaki bu rolü; trombosit aracılı tümör hücre adezyonu ve metastatik kaskatla ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. Glikoprotein Ibalpha tümör hücre aracılı trombosit agregasyonunda yer almaktadır. Glikoprotein Ibalphanın meme kanserinde ekspresyonundaki değişimler high stage ve aksillar lenf nodu ya da uzak organ metastazıyla ilişkilidir.

Eldeki verilere göre saptanan polimorfik genetik çeşitlilikler adeziv moleküllerinin fonksiyonunu ya da ekspresyonunu etkileyerek meme karsinomlarının biyolojik agresyon ve risk gelişimini değiştirebilir. Bu durum ITGA2 ekspresyonunun kanser gelişimi ve ITGA2 genotipiyle meme kanseri riski arasındaki ilişkiyi açıklayabilir.

Son yapılan çalışmalar yeni moleküler markerların biyolojik davranışları ile tedaviye yanıtlarını tanımlamaya çalışmıştır, Her2neu overekspresyonu bunun en güzel örneğidir. Tümör biyolojisinde özellikle metastaz formasyonunda trombositlerin sürece katılımı önceden kabul edilmiştir. Tümör hücre indükten trombosit agregasyonu integrinalphaIIbeta3 aracılığıyla metastaz kaskadında tümör hücrelerinin endotele yapışması, ekstrasvazyon ve angiogenez şiddetli etkilere neden olmaktadır. Ayrıca bazı trombosit reseptörleri özellikleri integrin alpha2beta1, alpha2beta3 ve glikoprotein Ibalpha epitel hücreleri tarafından eksprese edilirken tümör hücrelerinden salınımları motilite, invazyon ve hücresele diferansiyasyonla ilişkilidir.

Çalışmamızda ITGA2B geni c.2621T>G polimorfizmi açısından kanserli hastalarda lenf nodu metastazı, lenfovasküler invazyon ve tümör çapıyla ilişki saptanmamıştır. Buna rağmen beta3 integrin T/T genotip taşıyıcılarında meme kanseri riski daha yüksektir. Genotip 1565T/T aksiler lenf nodu metastazı ve 2 cm den büyük tümör çapıyla ilişki bulunmuştur.

Bazı çalışmalarda birbirine zıt sonuçlar elde edilmiştir. Bir çalışmada ITGA2 genindeki iki polimorfizm (Phe253Phe, Glu534Lys) ile meme kanseri riski arasında ilişki bulunurken, diğer bir çalışmada bu ilişki saptanamamıştır (Bray 2000). Yapılan iki çalışmada söz konusu tek nükleotid polimorfizmlerinin tümör evre ve dereceleri üzerindeki etkisi zıt bulunmuştur.

Bizim araştırmamızda gg genotipine sahip olmanın kanserli hastalarda histolojik, nükleer evre ve dereceleri üzerinde istatistiksel olarak arttırıcı etkisini saptadık. Bugüne kadar en çok çalışma İntegrin genlerinden ITGB3 deki Leu33Pro tek nükleotid polimorfizmi üzerine yapılmıştır. Meme kanserli hastalarda yapılan iki çalışmada Pro alleli ile lenf nodu tutulumu arasında ilişki saptanırken diğer daha küçük bir çalışmada bununla çelişkili olarak Leu alleli ile lenf nodu tutulumu arasında ilişki saptanmıştır (Langsenlehner et al 2006) (Wang-Gohrke et al 2005).

Bu biyolojik değişiklikler integrinlerin ekspresyonu ile meme kanseri histolojik evre ve aksiler lenf nodu metastazı arasındaki klinik ve patolojik korelasyon ile açıklanabilir. Genetik polimorfizmler bireylerarası çeşitlilik ve farklılıktan sorumludurlar. Böylece son günlerde bunların yaygın ve kompleks hastalıkların gelişiminde asıl genetik unsur olduğu düşünülmektedir. Bu bağlamda integrin alpha2beta1, alpha2beta3 ve glikoprotein Ibalpha ve diğer trombosit proteinlerini etkileyen polimorfizmler tromboembolik hastalıklarda risk faktörü olarak düşünülmektedir.

Ayala ve ark. glikoprotein Ibalpha polimorfizmi ile meme kanseri arasında bir ilişki bulamamışlardır. Ayala ve ark. İntegrin alpha2 nin C807T ve G1648A polimorfizmleri açısından meme kanserli hastalar ve kontroller arasında istatistiksel açıdan anlamlı farklılıklar görememişlerdir.

Biz de araştırmamızda ITGA2B geni c.2621T>G polimorfizmi açısından meme kanserli hastalar ve kontroller arasında istatistiksel açıdan anlamlı farklılıklar göremedik.

## 8. KAYNAKLAR

1. Andrew JH. (1993). Circulating adhesion molecules in disease. *Immunology Today*, 14:506-512.
2. Andrioli G, Minuz P, Solero P, Pincelli S, Ortolani R, Lussignoli S. (2000). Defective platelet response to arachidonic acid and thromboxane A(2) in subjects with PIA2 polymorphism of beta(3) subunit (glycoprotein IIIa). *Br J Haematol*, 110:911–8.
3. Arnes JE, Egan AJ, Southey MC. (1998). The histologic phenotypes of breast carcinoma occurring before 40 years in women with and without BRCA1 or BRCA2 germline mutations:a population based study. *Cancer*, 83:2335-2345.
4. Arnes JB, Begin LR, Stefansson I, Brunet JS, Nielsen TO, Foulkes WD. (2009). Expression of epidermal growth factor receptor in relation to BRCA1 status, basal like markers and prognosis in breast cancer. *J. Clin Pathol*, 62:139–146.
5. Authin KS. (1997). Platelets and Their Factors. Eds:Walter U, Authi K.S. *Springer Verlag*, Berlin, p.3-19.
6. Ayala F. (2003). Genetic polymorphisms of platelet adhesive molecules: association with breast cancer risk and clinical presentation. *Breast Cancer Res. Treat*, 80:145–154.
7. Aydınтуğ AO. (1995). Hücre adezyon molekülleri ve immün system. *MN Klinik Bilimler*, 1:16-21.
8. Bae AE, Brown SJ. (2001). Etiology of cancer: cancer genetics. In: *Cancer Principles & Practice of Oncology*. Eds: DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA, 6<sup>th</sup>ed, *Lippincott Williams&Williams*, Philadelphia, PA, p.207-217.

9. Bergmeier W, Schulte V, Brockhoff G, Bier U, Zirngibl H, Nieswandt B. (2002). Flow cytometric detection of activated Mouse integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 with a novel monoclonal antibody. *Cytometry*, 48:80-86.
10. Berry DA, Inoue L, Shen Y. (2006). Modelling the impact of treatment and scening on U.S. breast cancer mortality: a Bayesian approach. *J Natl Cancer Inst Monogr*, 36:30-36.
11. Bierer BE. (1993). T cell control of the immune response. In: *Hematology of infancy and childhood*. Eds: Nathan D.G, Oski F.A, W.B. Saunders company, Philadelphia, 2:997-1000.
12. Box BA, Russel CA. Breast Cancer. (2004). In: *Manual of clinical oncology*. Eds: Casciato OA, 5<sup>th</sup>ed, Phidelphia, *Lippincott Willams and Wilkins*, p.233-253.
13. Brakebusch C, Bouvard D, Stanchi F, Sakai T, Fassler R. (2002). Integrins in invasive growth. *J Clin Invest*, 109:999-1006.
14. Bray PF. (2000). Platelet glycoprotein polymorphisms as risk factors for thrombosis. *Curr Opin Hematol*, 7:284–289.
15. Cianfrocca M, Goldstein JL. (2004). Prognostic and predictive marker of early stage breast cancer. *The Oncologist*, 9:606-616.
16. Czarnecka AM, Klemba A, Krawczyk T, Zdrozny M, Arnold RS, Bartnik E, Petros JA. (2010). Mitochondrial NADH-dehydrogenase polymorphisms as sporadic breast cancer risk factor. *Oncol Rep*, 23:531-535.
17. Dalay N. (2004). Meme kanserinde molekuler mekanizmalar. *Molekuler Kanser sempozyumu Özet kitapçığı*, İzmir, s.62-63.
18. Damjanov I, Linder J. (1996). *Anderson's Pathology*, 10th ed. St Louis, Mosby, p.2354-2381.
19. Demirel GY. (1999). Flow cytometry yöntemiyle apoptozis ölçümü. Yılmaz MT, Deniz G, *Flow cytometry ve tipta kullanımı*, Bio med yayıncılık, İstanbul, s.67-77.

20. Diaz LK et al. (2005). Beta4 integrin subunit gene expression correlates with tumor size and nuclear grade in early breast cancer. *Mod. Pathol*, 18:1165–1175.
21. Dickson RB, Lippman ME. (2001). Molecular basis of breast cancer. In: *Molecular Basis of Cancer*. Eds: Mendelson J, Howley PM, Israel MA, Liotta LA, Philadelphia, Saunders, p.313-342.
22. Etzioni A. (1992). Recurrent severe infections caused by a novel Leucocyte adhesion deficiency. *New England J. Med*, 327:1789-1792.
23. Etzioni A. (1996). Adhesion molecules their role in health and disease. *Ped Res*, 39:191-198.
24. Evans RD, Perkins VC, Henry A, Stephens PE, Robinson MK, Watt FM. (2003). A tumor associated  $\beta 1$  integrin mutation that abrogates epithelial differentiation control. *J Cell Biol*, 169:589-596.
25. Feigelson HS, Coetzee GA, Kolonel LN, Ross RK, Henderson BE. (1997). A Polymorphism in the CYP17 Gene Increases the Risk of Breast Cancer<sup>1</sup>. *Cancer Research*, 57:1063-1065.
26. Felding-Habermann B, O'Toole TE, Smith JW, Fransvea E, Ruggeri ZM, Ginsberg MH. (2001). Integrin activation controls metastasis in human breast cancer. *Proc Natl Acad Sci, U S A*, 98:1853–1860.
27. Felding-Habermann B, Fransvea E, O'Toole TE, Manzuk L, Faha B, Hensler M. (2002). Involvement of tumor cell integrin alpha v beta 3 in hematogenous metastasis of human melanoma cells. *Clin Exp Metastasis*, 19:427–436.
28. Frenette PS, Denisa D, Wagner DD. (1996). Adhesion molecules. *N Engl J Med*, 334:1527-1529.
29. Gawaz M. (2001). Physiology, pathophysiology, membrane receptors, antiplatelet principles and therapy for atherothrombotic disease. *Blood Platelets*.
30. George JN, Shattil SJ. (1991). The clinical importance of acquired abnormalities of platelet function. *N Engl J Med*, 324:27-38.

31. Giancotti FG, Ruoslahti E. (1990). Elevated levels of the alpha 5 beta 1 fibronectin receptor suppress the transformed phenotype of Chinese hamster ovary cells. *Cell*, 60:849-859.
32. Grünewald M, Griesshammer M. (2004). P-Selectin modulation in haemostasis: one size fits all? *Trends Mol Med*, 10(1):9-12.
33. Guo W et al. (2004). Integrin signalling during tumour progression. *Nat.Rev. Mol. Cell Biol*, 5:816–826.
34. Gurney D, Lip GYH, Blann AD. (2002). A reliable plasma marker of platelet activation does it exist? *Am J Hematol*, 70(2):134-144.
35. Guyton AC, Hall JE. (2001). Textbook of Medical Physiology. 10. baskı, Nobel Tıp Kitabevi, Ankara, s.419-429.
36. Hanahan D, Weinberg RA. (2000). The hall marks of cancer. *Cell*, 100:57-70.
37. Hardisty RM. (1969). The role of platelets in haemostasis. *Br. J. Haematol*, 17:299-309.
38. Haydaroğlu A, Dubova S, Özşaran Z, Bölükbaşı Y, Yılmaz R, Kapkaç M, Özdedeli. (2005). Ege Üniversitesinde 3897 Meme Kanseri Olgusunun Değerlendirilmesi. *The Journal of Breast Health*, 1(1):6–11.
39. Hickerson DH, Bode AP. (2002). Flow cytometry of platelets for clinical analysis. *Hematol Oncol Clin North Am*, 16(2):421-454.
40. Hoadley KA, Weigman VJ, Fan C, Sawyer LR, He X, Troester MA, Sartor CI, Rieger-House T, Bernard PS, Carey LA, Perou CM. (2007). EGFR associated expression profiles vary with breast tumor subtype. *BMC Genomics*, 8:258.
41. Hoffman R, Benz EJ, Shattil SJ, Furie B, Cohen HJ, Silberstein LE, McGlave P. (2000). Hematology Basic Principles and Practice. 3rd edition, Churchill Livingstone, London, p.1741-1752.
42. Hoffman R, Benz EJ, Shattil SJ. (1991). Hematology Basic Principles and Practice, Churchill Livingstone, London, p.1157.

43. Honn KV Tang DG. (1992). Adhesion molecules and tumor cell interactions with endothelium and subendothelial matrix. *Cancer and Metastasis Rev*, 11:353-375.
44. Hood JD, Cheresch DA. (2002). Role of integrins in cell invasion and migration. *Nat Rev Cancer*, 2:91-100.
45. Jemal A, Siegel R, Xu J. (2010). Cancer statistics. *CA Cancer J Clin*, 60(5):277-300.
46. Jordan VC. (1988). The development of tamoxifen for breast cancer therapy: A tribute to the late Arthur Walpole. *Breast Cancer Res Treat*, 11:197-209.
47. Kong F, Liu J, Liu Y, Song B, Wang H, Liu W. (2010). Association of interleukin-10 gene polymorphisms with breast cancer in a Chinese population. *J Exp Clin Cancer Res*, 29:72-79.
48. Kotovvori A, Pessa-Morikawa T, Kotovvori P, Nortamo P, Gahmber CG. (1999). ICAM-2 and a peptide from its binding domain are efficient activators of leukocyte adhesion and integrin affinity. *J Immunol*, 162:6613-6620.
49. Kuzey GM. (2007). Meme kısım 22: Temel Patoloji. Güneş Kitabevi, 705-744.
50. Liu E, Thor A, Hem, Barcos M, Ljung BM, Benz C. (1992). The Her 2 (cerb B2) oncogene is frequently amplified in in situ carcinomas of the breast. *Oncogene* 7:1027-1032.
51. Malik AB, Lo SK. (1996). Vascular endothelial adhesion molecules and tissue inflammation, *Pharmacol Rev*, 48,213-219.
52. McCormick F. (1999). Signalling networks that cause cancer. *Trends Cell Biol*, 12: 53-56.
53. McKenzie SB. (1988). Textbook of Hematology. 2<sup>nd</sup>ed., Lea and Febiger, Philadelphia, p.363-379.
54. Michelson AD, Furman MI, Goldschmidt-Clermont P, Mascelli MA, Hendrix C, Coleman L, et al. (2000). Platelet GP IIIa P1A polymorphisms display different sensitivities to agonists. *Circulation*, 101:1013-1018.

55. Mollahaliloğlu S, Kostak M, Eryılmaz Z. (2010). T.C. Sağlık Bakanlığı Sağlık İstatistiği Yıllığı 2008. Bakanlık yayın no: 790.
56. Morris GJ, Naidu S, Topham AK, Guiles F, Xu Y, McCue P, Schwartz GF, Park PK, Rosenberg AL, Brill K, Mitchell EP. (2007). Differences in breast carcinoma characteristics in newly diagnosed African-American and Caucasian patients: a single-institution compilation compared with the National Cancer Institute's Surveillance, Epidemiology, and End Results database. *Cancer*, 110:876–884.
57. Nickels RM, Seyfert UT, Wenzel E, Menger MD, Vollmar B. (2003). A simple and reproducible method to reliably assess platelet activation. *Thromb Res*, 110:53-56.
58. Parise LV, Lee J, Juliano RL. (2000). New aspects of integrin signaling in cancer. *Semin Cancer Biol*, 10:407–414.
59. Petty HR, Todd III RF. (1996). Integrins as promiscuous signal transduction devices. *Immunol Today*, 17:209-211.
60. Phillips KA, Andrulis IL, Goodwin PJ. (2001). Current perspectives on BRCA1 and BRCA2 associated breast cancers. *Intern Med J*, 31:349.
61. Powsen T, Raina M, Nash P. (2002). Interaction domains: From simple binding events to complex cellular behavior. *FEBS Letters*, 513:2-10.
62. Pulkkinen L, Uitto J. (1999). Mutation analysis and molecular genetics of epidermolysis bullosa, *Matrix Biol*, 18(1):29-42.
63. Rand ML, Leung R, Packham MA. (2003). Platelet function assays. *Transfus Apheresis Sci*, 28(3):307-317.
64. Rao AK. (1998). Congenital disorders of platelet function: disorders of signal transduction and secretion. *Am.J.Med.Sci*, 2:69-76.
65. Roberts DD. (1996). Regulation of tumor growth and metastasis by thrombospondin-1. *Faseb J*, 10:1183-1191.

66. Robinson SP, Jordan VC. (1987). Reversal of the antitumor effects of tamoxifen by progesteron in the 7,12-dimethylbenzanthracene-induced rat mammary carcinoma model. *Cancer Res*, 15;47(20):5386-5390.
67. Rosai J. (2004). Breast, Chapter 20. In: Ackerman's Surgical Pathology. Eds: Rosai J, Mosby L, 9<sup>th</sup>ed, 1763-1839.
68. Rosen PP. (2001). Rosen's Breast Pathology, Chapter 1, 12, 14, 34, Lippincott Williams and Wilkins, 2<sup>nd</sup>ed.:1-22, 253-256, 325-364, 627-652.
69. Savage K, Leung S, Todd SK et al. (2007). Distribution and significance of Caveolin 2 expression in normal breast and invasive breast cancer: an immunofluorescence and immunohistochemical analysis. *Breast Cancer Res. Treat.*
70. Sirvent JJ, Fortuno Mar A, Olona M, Orti A. (2001). Prognostic value of p53 protein expression and clinicopathological factors in infiltrating ductal carcinoma of the breast. A study of 192 patients. *Histol Histopathol*, 16(1):99-106.
71. Shimizu Y, Rose DM, Ginsber MH. (1999) Integrins in the immune system. *Advance Immunol*, 72:325-381.
72. Taddei I. (2003). Integrins in mammary gland development and differentiation of mammary epithelium. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia*, 8:383-394.
73. Tavasolli FA, Devilee P. (2003). World Health Organization Classification of Tumours.Pathology and Genetics of the Breast and Female Genital Organs, Lyon, *IARC Press*, 9-113.
74. Tavasolli FA. (1999). Pathology of Breast. 2<sup>nd</sup>ed.Connecticut, Appelton and Lange.
75. Tavasoli FA. (1999). Pathology of The Breast, Chapter 1, 2, 9,10. Appleton and Lange, 2<sup>nd</sup>ed, 1-24, 27-59, 401-467, 481-555.
76. Tetik S, Uras F, Ekşioğlu, Demiralp E, et al. (2008) Low-density lipoprotein specifically binds glycoprotein IIb/IIIa: a flow cytometric method for ligand-receptor interaction. *Clin Appl Thromb Hemost*, 14(2):210-219.

77. Thompson WD, Li WW, Maragoudakis M. (2000). The clinical manipulation of angiogenesis: pathology, side-effects, surprises, and opportunities with novel human therapies. *J Pathol*, 190:330–337.
78. Topuz E, Aydiner A, Dinçer M. (2003). Meme Kanseri. Nobel Tıp Kitabevi.
79. Tucker GC. (2002). Inhibitors of integrins. *Curr Opin Pharmacol*, 2:394–402.
80. Undas A, Brummel K, Musial J, Mann KG, Szczeklik A. (2001). PI(A2) polymorphism of beta(3) integrins is associated with enhanced thrombin generation and impaired antithrombotic action of aspirin at the site of microvascular injury. *Circulation*, 104:2666–2672.
81. Vogel PM, Georgiade NG, et al. (1981). The correlation of histologic changes in human breast with the menstrual cycle. *Am J Pathol*, 104:23-24.
82. Wang-Gohrke, S. et al. (2005). Re: integrin beta3 Leu33Pro homozygosity and risk of cancer. *J. Natl Cancer Inst*, 97:778–779; author reply 779–80.
83. Welsch CW. (1985). Host Factors Affecting the Growth of Carcinogen-Induced Rat Mammary Carcinomas: A review and tribute to Charles Brenton Huggins. *Cancer Res*, 45(8):3415-3443.
84. Werle-Haller B, Imhof BA. (2003). Integrin-dependent pathologies. *J Pathol*, 200:481-487.
95. WHO Classification of tumours. (2003). Tumours of the Breast and Female Genital Tract. Eds: Tavassoli F, Deville P, IARC Press, 5:19.
86. Wittekind C, Neid M. (2005). Cancer, Invasion and Metastasis. *Oncology*, 69(1):14-16.
87. Yamamoto T, Ikawa S, Akiyama T, Semba K, Nomura N, Miyajima N, Saito T, Toyoshima K. (1986). Similarity of protein encoded by the human cerbB2 gene to epidermal growth factor receptor. *Nature* 319:230-234.

88. Yardımcı T, Yaman A, Ulutin ON. (1995). Characterization of platelet gamma glutamyl transferase and its alteration in cases of atherosclerosis. *Elin App Thromb Hemostas*, 1:103-113.
89. Yoji S et al. (1992). Lymphocyte interactions with endothelial cells. *Immunology Today*, 12:106-111.
90. Zutter MM, Mazoujian G, Santoro SA. (1990). Decreased expression of integrin adhesive protein receptors in adenocarcinoma of the breast. *Am J Pathol*, 137: 863–870.



MARMARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ  
GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMA

Sayı :B.30.2.MAR.0.01.02/AEK/ 241  
Konu :

Sayın : Doç.Dr. Şermin TETİK

MAR-YÇ-2008-0185 protokol nolu “ Meme kanserli olgularda Trombosit Glikoprotein IIb/IIIa (GPIIb/IIIa) reseptörünün izolasyonu ve Genetik polimorfizmi ” isimli projeniz Fakültemiz Araştırma Etik Kurulu tarafından incelenerek onaylanmıştır.

Prof. Dr Haner DİRESKENELİ  
Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırma  
Kurul Başkanı

## 9. ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

<b>Adı</b>	İlyas Samet	<b>Soyadı</b>	Ergün
<b>Doğum Yeri</b>	İzmit	<b>Doğum Tarihi</b>	17.04.1980
<b>Uyruğu</b>	T.C	<b>TC Kimlik No</b>	12734750762
<b>E-mail</b>	<a href="mailto:sametergun@hotmail.com">sametergun@hotmail.com</a>	<b>Tel</b>	532 6559109

### Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
<b>Lisans</b>	Marmara Üniversitesi	2004
<b>Lise</b>	Kocaeli Anadolu Lisesi	1997

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Biyolog	S.B Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi	5 (2007 - )
2.	Biyolog	Okyanus Eğitim Kurumları	3 (2004 - )

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

Yabancı Dil Sınav Notu *								
KPDS	ÜDS	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE
	55							
				<b>Sayısal</b>	<b>Eşit Ağırlık</b>		<b>Sözel</b>	
<b>ALES Puanı</b>				85.048	85.719		70.781	

