



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

MEME KANSERİ PATOGENEZİNDE MHC SINIF-2
MOLEKÜLLERİNİN ROLÜ

Dr. FAİK DENİZ GÜN
UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN
Doç. Dr. GÜRBÜZ POLAT

MERSİN-2007



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

MEME KANSERİ PATOGENEZİNDE MHC SINIF-2
MOLEKÜLLERİNİN ROLÜ

Dr. FAİK DENİZ GÜN
UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN
Doç. Dr. GÜRBÜZ POLAT

Bu tez, BAP-TF TTB (FDG) 2005-4TU kodlu proje olarak Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi Tarafından desteklenmiştir.

MERSİN-2007

TEŐEKKÜR

Uzmanlık eğitimim ve tez çalışmam sırasında bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım değerli hocam Prof. Uğur Atik'e saygı ve Őukranlarımı sunarım. Ayrıca, tezime ilgili sorunların çözümünde bana yardımcı olup yol gösteren tez danışmanım Doç. Dr. Gürbüz Polat'a ilgi, hoşgörü, yakınlık ve her türlü Őartta vermiş olduğu iyi niyetli ve sınırsız destek için teőekkür ederim.

Biyokimya eğitiminin sağladığı olanaklardan en iyi şekilde yararlanmam için beni yönlendirip destekleyen Prof. Dr. Lülüfer Tamer, Doç. Dr. Gülçin Eskandari, Doç. Dr. Burak imen ve Yrd. Doç. Dr. Necati Muşlu'ya, güzel arkadaşlıkları ve yardımları için asistan arkadaşlarıma ve çalışmam boyunca desteğini esirgemeyen Bağnu Polat başta olmak üzere tüm Biyokimya Anabilim Dalı çalışanlarına teőekkür ederim.

Tezim ve çalışma grubunun planlanması sırasında beni yönlendiren Genel Cerrahi AD öğretim üyesi Doç. Dr. Tamer Akça'ya, hastaların patoloji sonuçlarını kullanabilmemi sağlayan Patoloji AD öğretim üyesi Doç. Dr. Ayşe Polat'a, çalışma grubunun oluşturulmasındaki yardımları için Genel Cerrahi AD asistanlarına, hastaların arşiv dosyaları için yardımcı olan arşiv personeline, patoloji sonuçları için yardımcı olan Patoloji AD çalışanlarına, istatistiksel analizleri yapmamda yardımcı olan Ar. Gör. Seval Kul'a teőekkür ederim.

Hayatımın her anında olduğu gibi asistanlık eğitimim ve tez çalışmalarım boyunca beni destek, güven ve sevgileri ile yüreklendiren aileme teőekkür ederim.

Eşim Ferdane'ye yardımları, sabrı ve sevgisi için teőekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖZET	5
İNGİLİZCE ÖZET.....	6
1. GİRİŞ VE AMAÇ	7
2. GENEL BİLGİLER.....	9
2.1. Majör Doku Uyuşum Kompleksi Yapısı.....	9
2.1.1. Sınıf I MHC Molekülleri.....	12
2.1.2. Sınıf II MHC Molekülleri.....	14
2.1.3. Sınıf III MHC Molekülleri.....	16
2.1.4. MHC'nin Gen Haritası.....	17
2.1.5. HLA Genlerinin Çeşitliliği	18
2.1.6. MHC Moleküllerinin Doku Dağılımı	19
2.1.7. Klasik Olmayan MHC ve Sınıf I Zinciri-Bağlantılı Moleküller ..	20
2.2. MHC Moleküllerinin Fonksiyonu ve Sentezi	21
2.2.1. Antijenler İçin T Hücre Yüzey Reseptörleri	22
2.2.2. Sınıf I MHC İle Sunulan Antijenlerin Hücre İçi İşlenmesi	23
2.2.3. Sınıf II MHC İle Antijen Sunumu	26
2.2.4. MHC Sınıf I'e Bağlanma	29
2.2.5. MHC Sınıf II'ye Bağlanma	31
2.2.6. T-Hücre Reseptörü, MHC Molekülü ve Antijenik Peptidin Birbiriyle Etkileşimi	33
2.3. MHC Moleküllerinin Tiplendirilmesi.....	37
2.3.1. Serolojik Olarak Sınıf I ve II Moleküllerin Gösterilmesi	39
2.3.2. Sınıf I- II Moleküllerin Hücresel Yöntemlerle Tayini.....	39
2.3.3. HLA Çeşitliliğinin DNA Temeline Dayanan Yöntemlerle Gösterilmesi.....	40
2.3.3.1. Sekansa Özgün Primerler Kullanılması	40

2.3.3.2. Sekansa Özgü Oligonukleotidler Kullanarak Hibridizasyon Yapılması.....	41
2.3.3.3. Sekans Spesifik Konformasyonel Polimorfizm veya Heterodupleks Analiz	42
2.3.3.4. Nükleik Asitlerin Dizi Analizi.....	42
2.4. MHC Moleküllerinin Hastalıklarla Olan İlişkisi	43
2.4.1. Bağlantı Dengesizliği ve Hastalıklara Yatkınlık.....	44
2.4.2. İmmunolojik Hastalıklarla Olan İlişki	46
2.5. Meme Kanseri.....	48
2.5.1. Meme Kanserinde Risk Faktörleri	48
2.5.2. Meme Tümörlerinin Histopatolojik Sınıflandırılması	54
2.5.2.1. Non-İnfiltratif Meme Maligniteleri.....	54
2.5.2.1.1. İntraduktal Karsinom	54
2.5.2.1.2. Lobüler Karsinoma İn Situ	54
2.5.2.2. İnfiltatif Meme Maligniteleri	54
2.5.2.2.1. İnvaziv Duktal Karsinom	55
2.5.2.2.2. İnvaziv Lobüler Karsinom	55
2.5.2.2.3. Meduller Karsinom.....	55
2.5.2.2.4. Kolloid Karsinom	55
2.5.2.2.5. Tubüler Karsinom	56
2.5.2.2.6. Adenoid Kistik Karsinom	56
2.5.2.2.7. İnfiltatif Papiller Karsinom	56
2.5.2.2.8. Paget Karsinomu	56
2.5.2.2.9. İnflamatuvar Karsinom.....	57
2.5.3. Meme Kanserinin Klinik Seyri	57
2.5.4. Meme Kanserinde Tanı	59
2.5.5. Meme Kanserinde Evreleme.....	60
2.5.6. Meme Kanserinde Bazı Prognostik Faktörler	62
2.6. Meme Kanserinin Moleküler Mekanizması.....	64
2.6.1. Meme Kanserinin Çok Basamaklı Gelişim Modeli	65
2.6.2. Meme Karsinogenezisinde Yer Alan Genler	66

3. GEREÇ ve YÖNTEMLER	69
3.1. Araç ve Gereç	70
3.2. Yöntemler	71
3.2.1. Sınıf II HLA Moleküllerinin Tiplendirilmesi	71
3.2.1.1. Tam Kandan Deoksiribonükleik Asit (DNA) Eldesi.....	71
3.2.1.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	72
3.2.1.3. HLA-DRB1 ve HLADQB1 Allel Tiplendirilmesi	73
3.2.1.4. DNA Amplifikasyon ve Hibridizasyon Prosedürleri....	74
3.2.1.4.1. DNA Amplifikasyon (PCR) Prosedürü.....	74
3.2.1.4.2. Hibridizasyon Prosedürü	75
3.3. İstatistiksel Yöntem.....	76
4. BULGULAR.....	77
4.1. Olguların Genel Özellikleri	77
4.2. Hasta ve Kontrol Grubunun HLA-DRB1 Analiz Sonuçları	79
4.3. Hasta ve Kontrol Grubunun HLA-DQB1 Analiz Sonuçları.....	84
5. TARTIŞMA	89
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	100
7. KAYNAKLAR	103
8. SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	108
9. ŞEKİLLER ve RESİMLER DİZİNİ	110
10. TABLOLAR DİZİNİ.....	111
11. EKLER.....	113

ÖZET

Meme kanseri dünyada kadınlar arasında en sık görülen malign tümör olup, kadınlarda görülen tüm kanserlerin yaklaşık %30'unu oluşturmaktadır. Genetik, hormonal, çevresel, mesleki ve infeksiyöz ajanlar bu hastalığın etiyojisine katkıda bulunabilirler.

Sınıf-2 Majör Doku Uyuşum Kompleksi (MHC; Major Histocompatibility Complex) ürünleri tümör antijenlerine karşı oluşan immün yanıtta önemli bir rol oynarlar.

Bu çalışmanın amacı; meme kanseri patogeneğinde rol oynayan MHC sınıf-2 moleküllerini saptamak ve bu moleküllerin hastalığın gelişimi veya hastalığa karşı olan direnç üzerindeki rollerini belirlemektir.

Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı tarafından takip edilen meme kanseri tanısı almış 69 birey hasta grubunu oluşturmaktadır. Kontrol grubu ise herhangi bir kanser, allerjik hastalık, diabet, romatolojik hastalık veya immünolojik hastalık öyküsü ve bulgusu bulunmayan 45 bireyden oluşmaktadır. Hastalardan alınan DNA örnekleri üzerinden sınıf-2 İnsan Lökosit Antijeni (HLA; Human Leukocytes Antigen) analizi gerçekleştirilmiştir.

Çalışma sonucunda HLA-DRB1*03 ve HLA-DQB1*02 allelleri ile meme kanseri oluşumu arasında ($p_1=0,019$; $p_2=0,019$); HLA-DQB1*02 alleli ile postmenopozal meme kanseri oluşumu ($p=0,022$) ve c-erb-B2 pozitifliği arasında ($p=0,038$) anlamlı negatif ilişkiler saptanmıştır. Ayrıca, HLA-DRB1*13 ve HLA-DQB1*06 allelleri ile meme kanserindeki progesteron reseptörü pozitifliği arasında anlamlı pozitif ilişkiler ($p_1=0,012$; $p_2=0,001$); HLA-DQB1*03 alleli ile meme kanserindeki progesteron reseptörü pozitifliği arasında ise anlamlı bir negatif ilişki saptanmıştır ($p=0,009$). HLA-DRB1*04 alleli ile meme kanserindeki c-erb-B2 pozitifliği arasında da anlamlı bir pozitif ilişki saptanmıştır ($p=0,036$). Sonuç olarak HLA-DRB1*03, HLA-DQB1*02, HLA-DRB1*13 ve HLA-DQB1*06 allelleri tümöre karşı koruyuculuk veya iyi prognoz ile ilişkili bulunurken; HLA-DQB1*03 ve HLA-DRB1*04 allelleri kötü prognoz ile ilişkili bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: Meme kanseri, MHC, HLA-DRB, HLA-DQ, HLA Sınıf-2.

ABSTRACT

The Role of MHC Class-2 Molecules in Breast Cancer Pathogenesis

Breast cancer is the most frequent malign tumour in women population and it constitutes %30 of all women cancers. Genetic, hormonal, environmental occupational and infection agents may contribute to this disease's etiology.

Class-2 Major Histocompatibility Complex (MHC) products have an important role in immune response against to tumour antigens.

The purposes of this study are; to find the MHC class-2 molecules which have a role in breast cancer pathogenesis and to estimate these molecule's roles in development of the disease or in resistance to the disease.

69 individuals who were diagnosed as breast cancer by Mersin University Medical Faculty Department of Surgery constituted patient group. The control group was consisted of 45 individuals who had no cancer, allergic disease, diabetes, romatologic and immunologic disease background. The patient's DNA samples were analysed for class-2 Human Leukocytes Antigens (HLA).

Negative relations were observed between breast cancer formation and HLA-DRB1*03 and HLA-DQB1*02 alleles ($p_1=0,019$; $p_2=0,019$). Also negative relations were observed between HLA-DQB1*02 and postmenopausal breast cancer formation ($p=0,022$) and C-erb-B2 existence ($p=0,038$). Positive relations were observed between progesterone receptor existence and HLA-DRB1*13 and HLA-DQB1*06 alleles ($p_1=0,012$; $p_2=0,001$). A negative relation was observed between progesterone receptor existence and HLA-DQB1*03 ($p=0,009$). A positive relation was observed between C-erb-B2 existence and HLA-DRB1*04 ($p=0,036$). In conclusion according to our study; HLA-DRB1*03, HLA-DQB1*02, HLA-DRB1*13 and HLA-DQB1*06 alleles offered a relation with protectiveness against to tumour or good prognosis. HLA-DQB1*03 ve HLA-DRB1*04 alleles offered a relation with bad prognosis.

Key Words: Breast Cancer, MHC, HLA-DRB, HLA-DQ, HLA class-2.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Meme kanseri dünyada kadınlar arasında en sık görülen malign tümördür. Avrupa'da yılda 180000, Amerika Birleşik Devletlerinde (A.B.D) de yılda 184000 yeni olgu saptanmaktadır^{1,2}. Kadınlarda kansere bağlı ölümlerin %18'i meme kanseri nedeniyle oluşmakta ve meme kanserine bağlı ölümler; akciğer ve kolorektal kanserlerden sonra üçüncü sırayı almaktadır. Türkiye'de kadınlar arasında en sık görülen 10 kanser tipi içerisinde meme kanseri birinci sırada yer almaktadır³.

Ülkemizde kadınlarda meme kanseri görülme sıklığı T.C. Sağlık Bakanlığı 1997 Sağlık istatistiklerine göre 1995'te %23,5 olarak ilk sırada yer almaktadır³.

Yakın zamanda meme kanserindeki malign değişimin oluşumuna katkıda bulunabilecek genetik faktörlerin rolüyle ilişkili pek çok veri elde edilmiştir. Kalıtsal ve ailesel meme kanserinde, BRCA1 ve BRCA2 genlerinde gerçekleşebilecek mutasyonların, delesyonların ve diğer genetik değişimlerin farklı ırk ve etnik gruplarda önemli bir genetik risk faktörü olduğu düşünülmüştür.

Bununla birlikte meme kanseri vakalarının büyük bir bölümü hiçbir ailesel meme veya over kanseri hikâyesi bulunmayan hastalarda da saptanmaktadır. Bu yüzden özellikle sporadik vakalar üzerinde genetik risk faktörü araştırmalarının yapılması önem kazanmıştır.

Onkojenez işlemi; tümörlerin genetik instabilitesine ve immünolojik çevreleriyle olan etkileşimlerine dayanmaktadır. Tümör gelişimi sırasında immün yanıtın önemi dikkate alındığında; yüksek polimorfik HLA genlerinin spesifik allellerini veya haplotiplerini kalıtan bireylerin bazı spesifik kanser tiplerine karşı duyarlı veya dirençli olabilecekleri düşünülmektedir.

Transplantasyondaki önemli rollerinin yanında, HLA sistemi, tümör antijenlerine karşı sitotoksik T lenfositlerinin oluşturulmasında ve yönlendirilmesinde kilit rol oynarlar. Bu yüzden bu mekanizmadaki bir değişiklik, immün yanıtın kaçmaya katkıda bulunabilir.

İnsanlardaki majör doku uyuşum kompleksi olan HLA; 6 ana polimorfik lokustan oluşan (A, B, C, DRB1, DQB1 ve DPB1) ve kromozom 6'nın kısa kolunda yer alan yüksek varyasyonlu bir genetik sistemdir. Son 10 yılda, HLA

allelleri DNA düzeyinde yüksek-çözünürlüklü olarak tanımlamak için moleküler tiplendirme teknikleri geliştirilmiştir ve lokuslara göre yüksek sayıda allel tanımlaması yapılmıştır. Lokuslarına göre 2006 yılında DPB1 için 121, DQB1 için 69, DRB1 için 429, A için 429, B için 751 ve C için 219 allel tanımlı bulunmaktadır⁴.

Kaynak taramalarında, HLA antijenleri ile meme kanseri arasındaki ilişkiyi gösteren sınırlı sayıda çalışmalar olduğu görülmüştür. Bu yüzden onkojenez işleminde HLA tarafından oynanan rolün daha iyi anlaşılması için; HLA polimorfizm genleri ile meme kanseri riski arasındaki ilişkinin farklı toplumlarda incelenmesi gerekir. Bu tarz araştırmalar, meme kanseri gelişiminde risk faktörü olarak kabul edilebilecek gizli allelleri saptamamıza izin verebilir.

Bu çalışmada, Mersin'deki meme kanserli hastalar ve etnik olarak eşleştirilmiş kontrol grubunda HLA-DQB1, DRB1 allelleri yukarıdaki nedenlerle analiz edilmiştir. Toplumumuzdaki meme kanserli hastaların MHC sınıf-2 tiplendirilmesinin yapılması; hangi allellerin meme kanseri patogenezinde rol oynayabileceğini ve hangi allellerin meme kanserine karşı koruyucu olabileceğini saptamamıza olanak verecektir. Böylece tüm dünyada yapılan çalışmalara ülkemizden de veri sağlanacaktır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Majör Doku Uyuşum Kompleksi Yapısı

Bağışıklık sisteminin kendinden olanı veya olmayanı tanıması için gerekli olan doku antijenlerini kodlayan gen bölgesi, Majör Doku Uyuşum Kompleksi (MHC; Major histocompatibility complex) olarak adlandırılır. İlk olarak kemirgenlerde tanımlanan bu bölgenin insandaki karşılığı, 6. kromozomun kısa kolunda yerleşmiştir. İlk olarak akyuvarlarda gösterilen bu genler, İnsan Lökosit Antijenleri (HLA; Human Leukocyte Antigens) bölgesi olarak da adlandırılır. Çok sayıda genin yer aldığı bu bölgede immün yanıtla ilgisi tanımlanmamış bazı genler de yer alır^{5,6,7,8,9}.

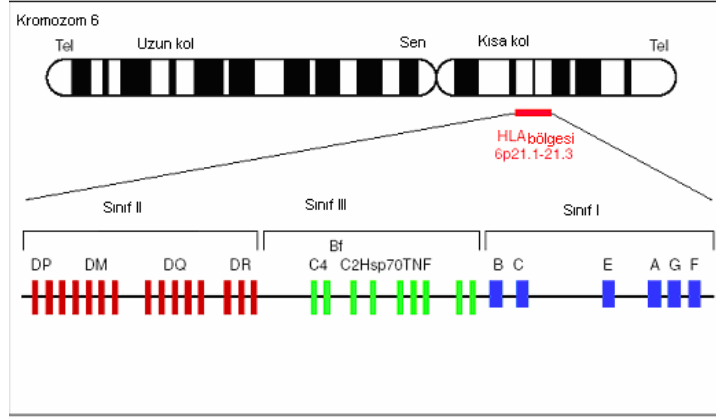
Landsteiner, 1931 yılında eritrosit antijenlerini saptamış, kan transfüzyonu için grup uyuşumunun gerekliliğinden ve doku/organ transplantasyonları için de doku antijenlerinin uyumundan söz etmiştir. Aynı yıllarda farelerde doku antijenlerinin varlığından bahsedilmiştir ve bunların gen bölgesine doku uyuşum kompleksi adı verilmiştir. Farede 17. kromozomdaki bu H-2 gen bölgesinin sentezini sağladığı doku antijenlerine de MHC antijenleri denilmiştir. Daha sonraki araştırmalarla MHC kompleksinin bütün memeli türlerinde bulunduğu gösterilmiştir¹⁰. 1958'de insanlarda doku antijenleri tespit edilmiş, yine aynı yıllarda çok sayıda transfüzyon uygulanmış lösemi hastalarının ve çok doğum yapmış kadınların serumlarında lökositlere karşı oluşmuş antikorlar saptanmıştır. Böylece bu antijenlere HLA ismi verilmiştir¹¹. HLA aynı tür içinde bireysel farklılık gösteren bir allo antijendir. Daha sonraki yıllarda bütün vücut hücrelerinde buldukları anlaşılmış ve doku nakillerinde de çok önemli rollerinin olduğu, transplantasyonun başarısını belirledikleri gösterilmiştir. Bu sisteme MHC antijenleri, sentezini sağlayan gen bölgesine de MHC kompleksi denmiştir. 1973'de belli bir doku tipine sahip insanların bazı hastalıklara daha yatkın olduğu saptanmıştır¹⁰.

Son 10 yıl içerisinde MHC molekülleri kristalize edilmiş, rekombinant deoksiribonükleik asit (DNA) yöntemleri kullanılarak MHC kompleksi genlerinin baz dizilimi ve bu genlerin sentezini sağladığı MHC antijenlerinin amino asit dizileri ortaya konulmuştur⁶.

MHC, kodlanan proteinlerin özelliklerine göre sınıf (class) I, II, III olarak alt bölgelere ayrılır. Sınıf I bölgesi, MHC'nin telomerik ucunda yer alır. HLA-A, -B, -C olarak da tanınan klasik transplantasyon antijenlerini ve HLA-E, -F, -G gibi klasik olmayan sınıf I antijenleri kodlayan gen lokuslarını, HLA-H, -J, -K, -L, -X gibi psödogenleri ve gen segmentlerini içerir. Sınıf II bölgesi ise sentromere yakın yerleşmiş olup; HLA-DRA, -DRB, -DQA, -DQB, -DPA, -DPB, -DNA, -DMA, -DOB lokuslarının yanı sıra çeşitli psödogenleri, Düşük Molekül Ağırlıklı Protein-1 (LMP1; Low Molecular Weight Protein), Düşük Molekül Ağırlıklı Protein-2 (LMP2), Antijen İşlenmesi İle İlişkili Taşıyıcı-1 (TAP1; Transporter Associated With Antigen Processing), Antijen İşlenmesi İle İlişkili Taşıyıcı-2 (TAP2) gibi antijen işlenmesinde rol alan genleri içerir. HLA DRB ile HLA B bölgeleri arasında Sınıf III genleri bulunur ve C4B, C4A, Bleferidin, C2, Isı Şok Proteini-70 (HSP-70), Tümör Nekroz Faktör-alfa (TNF- α), Tümör Nekroz Faktör-beta (TNF- β) bu bölgede kodlanan bazı genlerin ürünüdür^{5,6,7,8,9} (Şekil 1, tablo1). MHC sınıf III bölgesi immünolojik öneme sahiptir. Pek çok kompleman komponentinin yapısal genleri burada kodlanır. Glukokortikoidlerin biyosentezi için kritik bir enzim olan 21-Hidroksilaz genleri de burada kodlanır. Ayrıca insanda MHC sınıf III'ün distalinde ve MHC sınıf I'in proksimalinde yer alan bölgenin MHC sınıf IV olarak adlandırılması önerilmektedir⁷. Adı geçen lokusların bir kısmı, çok sayıda polimorfik allelin kodlanmasından sorumludur ki HLA tiplendirimi ile amaçlanan da bu allellerin ve kodladıkları antijenlerin belirlenmesidir⁵.

Bunlardan başka minör histokompatibilite antijenleri de (mHag) vardır. mHag aslında polimorfik proteinlerin peptidleridirler. HA-2, H-Y ve HA-1 bu peptidlerden birkaç tanesine örnek oluşturmaktadır. mHag'lerin önemli biyolojik işlevleri vardır. Transplantasyon sonrasında, tekrarlayan lösemilerde ve Graft versus Host hastalığında (GvHD; Graft versus Host disease) toleransı indüklemeye çalışırlar. Dokularda bu antijenlerin belirlenmesinin anlamı, organ aktarımı sonrası bazı sorunların ortaya çıkmaya başladığının habercisi olabileceğidir⁵.

İnsanda MHC antijenlerini kodlayan gen bölgesi 6. kromozomun kısa kolu üzerinde sentromere yakın bir bölgede ardışık bir DNA alanıdır (6p 21.3). Dört santimorgan (cM) büyüklüğünde bir bölge olup 203 gen immün sistemle ilgilidir^{5,6,7,8,9}.



Şekil 1: HLA Bölgesinin Gen Haritası⁵.

Tablo 1: HLA Bölgesindeki Genlerin Adları⁵.

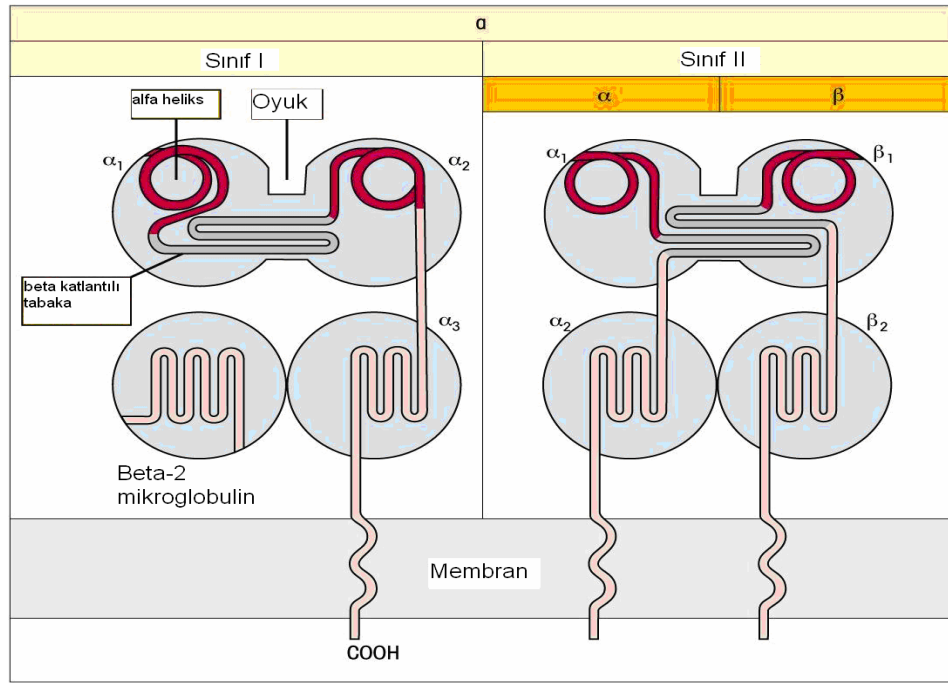
Adı	Eski Adı	Moleküler Özellikler
HLA-A	-	Class I α -zinciri
HLA-B	-	Class I α -zinciri
HLA-C	-	Class I α -zinciri
HLA-E	E, '6.2'	Class I gen
HLA-F	F, '5.4'	Class I gen
HLA-G	G, '6.0'	Class I gene
HLA-H	H, AR, '12.4'	Class I psödogen
HLA-J	cda12	Class I psödogen
HLA-K	HLA-70	Class I psödogen
HLA-L	HLA-92	Class I psödogen
HLA-N	HLA-30	Class I gen
HLA-S	HLA-17	Class I gen
HLA-X	HLA-X	Class I gen fragmanı
HLA-Z	HLA-Z1	HLA Class II bölgesi içinde Class I gen fragmanı
HLA-DRA	DR α	DR α - zinciri
HLA-DRB1	DR β 1, DR1B	DR1, DR2, DR3, DR4, DR5 gibi özellikleri belirleyen DR β 1-zinciri
HLA-DRB2	DR β II	DR β -benzeri sekanlar taşıyan bir psödogen
HLA-DRB3	DR β III, DR3B	DR52 and Dw24, Dw25, Dw26 yı belirleyen DR β 3 zinciri
HLA-DRB4	DR β IV, DR4B	DR53 ü belirleyen DR β 4-zinciri
HLA-DRB5	DR β III	DR51 i belirleyen DR β 5-zinciri
HLA-DRB6	DRB, DRB σ	DR1, DR2 ve DR10 haplotiplerinde bulunan DRB psödogeni.
HLA-DRB7	DRB ψ 1	DR4, DR7 ve DR9 haplotiplerinde bulunan DRB psödogeni
HLA-DRB8	DRB ψ 2	DR4, DR7 ve DR9 haplotiplerinde bulunan DRB psödogeni.
HLA-DRB9	M4.2 β exon	DRB psödogeni
HLA-DQA1	DQ α 1, DQ1A	DQ α - zinciri, eksprese edilir
HLA-DQB1	DQ β 1, DQ1B	DQ β - zinciri, eksprese edilir
HLA-DQA2	DX α , DQ2A	DQ α - zincirle ilişkili dizi, ekspresyon?
HLA-DQB2	DX β , DQ2B	DQ β - zincirle ilişkili dizi, ekspresyon?
HLA-DQB3	DVB, DQB3	DQ β - zincirle ilişkili dizi, ekspresyon?
HLA-DQA	DZ α , DQ α , DNA	DO α - zinciri
HLA-DQB	DQ β	DO β - zinciri
HLA-DMA	RING6	DM α - zinciri
HLA-DMB	RING7	DM β - zinciri
HLA-DPA1	DP α 1, DP1A	DP α - zinciri, eksprese edilir
HLA-DPB1	DP β 1, DP1B	DP β - zinciri, eksprese edilir
HLA-DPA2	DP α 2, DP2A	DP α - zincirle ilişkili psödogen
HLA-DPB2	DP β 2, DP2B	DP β - zincirle ilişkili psödogen
HLA-DPA3	DPA3	DP α - zincirle ilişkili psödogen
TAP1	ABCB2, RING4, Y3, PSF1	ABC (ATP Binding Cassette) transporter
TAP2	ABCB3, RING11, Y1, PSF2	ABC (ATP Binding Cassette) transporter
PSMB9	LMP2, RING12	Proteosomla ilişkili dizi
PSMB8	LMP7, RING10	Proteosomla ilişkili dizi
MICA	MICA, PERB11.1	Class I zincirle ilişkili gen
MICB	MICB, PERB11.2	Class I zincirle ilişkili gen
MICC	MICC, PERB11.3	Class I zincirle ilişkili psödogen
MICD	MICD, PERB11.4	Class I zincirle ilişkili psödogen
MICE	MICE, PERB11.5	Class I zincirle ilişkili psödogen

Moleküler biyolojideki hızlı gelişmeler, Restriksiyon Fragmanı Uzunluk Polimorfizimi (RFLP), Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR), DNA dizi analizi ve

diğer yöntemlerin geliştirilmesi, iki boyutlu jel elektroforezinin uygulamaya konması; genin tanımlanması ve haritalanmasına yardımcı olmuştur.

2.1.1. Sınıf I MHC Molekülleri

Sınıf I moleküller, 44 kDa'luk bir ağır polipeptit zinciri ve nonkovalent olarak bağlı bulunduğu bir 12 kDa'luk daha küçük bir polipeptit olan β_2 mikroglobulinden oluşurlar. Ağır zincirin en geniş parçası 3 globuler domain halinde organize olmuştur (α_1 , α_2 , α_3 ; şekil 2) ve hücre yüzeyinden dışa doğru çıkıntı yapar^{5,6,7,8,9}. Ağır alfa zinciri MHC bölgesinde kodlanırken; hafif zincir Beta 2 mikroglobulin (β_2m) ise MHC dışında 15. kromozomda kodlanır. Hidrofobik kısım, molekülü membran içine saplar ve kısa bir hidrofilik sekans, C-terminalini sitoplazma içine taşır^{5,6,7,9}.

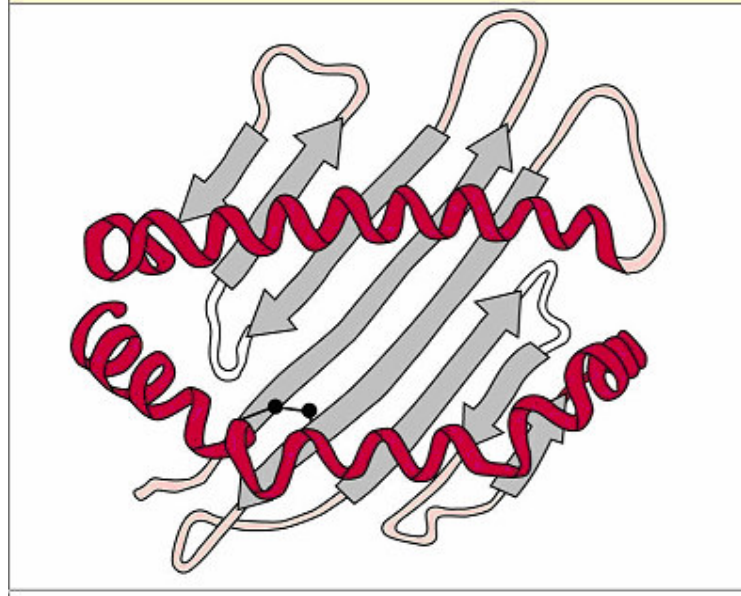


Şekil 2: Sınıf I ve Sınıf II MHC Moleküllerinin Yapısı⁶.

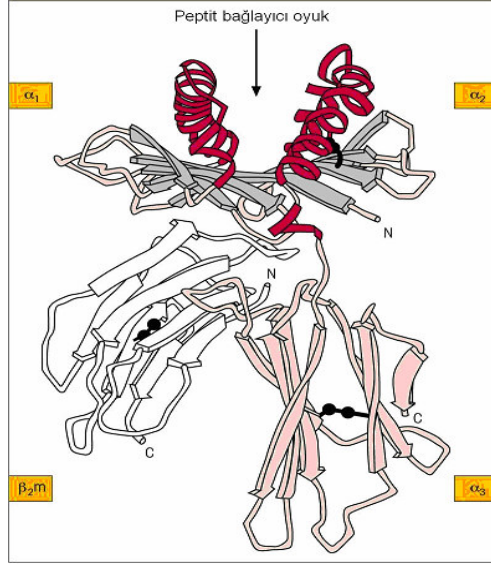
İnsan sınıf I molekülünün kristal yapısının X-ışını ile analizi, MHC fonksiyonunun anlaşılması açısından önemli bir olanak sağlamıştır⁶. Molekülün üç boyutlu yapısına bakıldığında membran dışında birbirine benzerlik (homoloji) gösteren bölgelerin karşılıklı gelmesi ile iki çift domain olduğu görülür. α_1 ve

$\alpha 2$ membran distalinde, $\alpha 3$ ve $\beta 2m$ de membran proksimalinde karşılıklı yer alır. Karşılıklı yerleşen $\alpha 1$ ve $\alpha 2$ zincirlerine ait 8-10 amino asit büyüklüğünde peptitlerin yerleşebileceği kovuğa benzer bir yapı oluştururlar. $\beta 2m$, molekülün üç boyutlu yapısının korunmasında rol almaktadır^{5,6,7,9}.

β_2 mikroglobulin ve $\alpha 3$ bölgesi, katlanma şekli bakımından klasik immünglobulin (Ig) domainine benzemektedir. Bununla beraber membrana daha distal pozisyonda bulunan $\alpha 1$ ve $\alpha 2$ domainleri, beta-katlantılı tabakalarla bir arada tutulan ilmekler tarafından oluşturulan zemin üzerinde 2 adet uzatılmış alfa-helikal yapı oluştururlar ve bunların tümü mükemmel bir oyuk oluşturur (Şekil 3 ve şekil 4)⁶.



Şekil 3: HLA Sınıf I Molekülünün Üst Yüzeyinin Şematik Görünümü⁶.



Şekil 4: HLA Sınıf I Molekülünün Yandan Şematik Görünümü⁶.

Bu domainlerin görüntüsü çok çarpıcıdır ve aynen barbekü üzerindeki iki sosise benzer. Oyuk, sınıf I proteini ile kokristalize olan bir lineer molekülle işgal edilmiştir⁶.

Sınıf I molekül genleri, kodlama yapan 8 ekson ve kodlama yapmayan 7 introndan oluşur. Polimorfik bir yapı gösteren $\alpha 1$ ve $\alpha 2$ bölgeleri, ekson 2-3 tarafından kodlanır. Altıncı kromozom üzerinde sınıf I molekülleri kodlayan genlerden önce sınıf I genleri düzenleyen genlerin kodlandığı bir bölge yer almaktadır. Bu kontrol bölgesi, farklı sınıf I genleri, hatta farklı alleller için bile farklı olabilir⁵.

2.1.2. Sınıf II MHC Molekülleri

Sınıf II MHC molekülleri; alfa ve beta polipeptit zincirlerinden oluşan ve sırasıyla 34kDa ve 29kDa ağırlığında olan transmembran glikoproteinlerdir. Sınıf I ile büyük ölçüde sekans homolojisine sahiplerdir. Yapısal çalışmalar, hücre membranına daha yakın olan alfa2 ve beta2 domainlerinin karakteristik Ig katlanmasına benzer bir yapı gösterdiklerini, bununla birlikte alfa1 ve beta1 domainlerinin sınıf I alfa1 ve alfa2'yi taklit ederek zemindeki beta-katlantılı tabaka tarafından oluşturulan zemin üzerinde 2 alfa-heliks tarafından oluşturulan oyuğun bir benzerini oluşturduğunu göstermiştir^{5,6,7,9} (Şekil2).

Alfa zinciri A, beta zinciri ise B genleri tarafından kodlanır. Bu nedenle sınıf II bölgesinde yer alan DR, DQ ve DP bölgeleri sırasıyla DRA ve DRB, DQA ve DQB, DPA ve DPB olarak ikiye ayrılırlar. DR bölgesinde alfa zinciri kodlayan tek gen varken, beta zinciri için 9 farklı bölge vardır. Bunların bir kısmı kodlama yapmayan genler olup; sadece DRB1, DRB3, DRB4, DRB5 kodlayıcı genlerdir ve farklı beta zincirlerini kodlarlar. DRB1, 1–18 arasında değişen büyük HLA DR antijenleri için kodlama yaparken; DRB3, DRB4, DRB5; DRB1 antijenlerine bağlı olarak eksprese edilen sırasıyla DR53, DR54, DR51 antijenleri için kodlama yaparlar. HLA DQ ve DP bölgelerinde DR'dekinden daha az sayıda alt bölge bulunur. DR bölgesinden farklı olarak DQ ve DP bölgelerinde alfa genleri de çeşitlilik gösterir⁵.

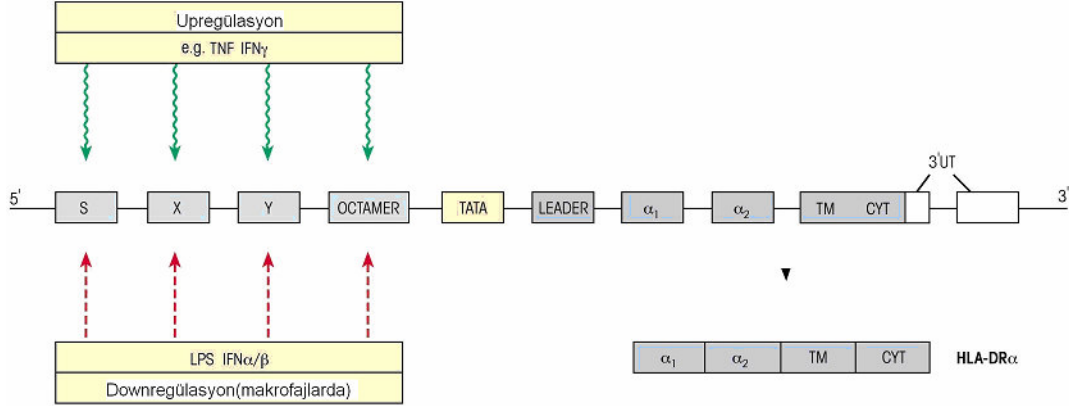
Sınıf II antijen ve genlerinin hepsinde ortak D harfinin bulunmasının nedeni bu antijenlerin varlığını gösteren serolojik yöntem dışında farklı bir yöntem olarak hücre kültürüne dayanan bir çeşit Karışık Lenfosit Kültürü (MLC; Mixed Lymphocyte Culture) reaksiyonu ile gösterilen HLA-A, B ve C den sonra gösterilen bir antijenin HLA-D olarak adlandırılmasından kaynaklanmaktadır⁸.

Daha ileriki tarihlerde alloreaktif antikorların yardımı ile de HLA-DR ve DQ antijenleri tanımlanabilmiştir. HLA-DP için bu yöntem geçerli olamamıştır. HLA-DQ'nun alfa ve beta zincirini sentezleyen genler HLA-DQA1 ve HLA - DQB1 olarak adlandırılır. A1 ve B1 genleri peptid bağlayan bölgeleri kodlarken A2 ve B2 bölgeleri ise immünglobulin benzer yapıda molekülleri kodlarlar. DRB genlerinin ancak %6 kadarı kodlama yapar ve ekson 1–6 olarak sıralanmışlardır. Ekson 1 sinyal peptidi için kodlama yaparken, ekson 2 polimorfik olan β 1 bölgesi, ekson 3 korunan β 2 bölgesi, ekson 4–6 ise transmembran ve sitoplazmik bölümler için kodlama yaparlar. Moleküler HLA DRB1 incelemelerinde genellikle ekson 2 incelenir⁸.

Terminolojik olarak HLA-DRB1*0401 gibi bir örnek verildiğinde anlatılmak istenen şudur: Moleküler tiplendirme sonucunda (* bunu göstermektedir) sınıf II nin R ailesinde beta1 zincir geninde 0401 allelik varyantı saptanmıştır. Bu allele karşılık gelen bir serolojik antijen HLA-DR 04'tür. Başka bir örnek olarak HLA-DRB1*0402 ise serolojik olarak yine aynı reaksiyonları verdiği için ancak moleküler tiplendirme ile diğer varyantlardan ayırt edilebilir. Saptanan allelin serolojik karşılığı olan numara ilk iki rakamı oluştururken bunu takip eden 2 basamakta moleküler tiplendirme ile ulaşılan yüksek çözünürlükteki allel tipi

verilir. Eğer düşük çözünürlükte bir analiz yapıldı ve 3. ve 4. basamak karşılıkları bilinmiyor ise bilinmiyor anlamına gelecek şekilde "XX" koyulacaktır, Ör: HLADRB1*04XX^{5,8}.

İnsan sınıf II molekülü HLA-DR'nin alfa zincirini kodlayan genlerin organizasyonu ve transkripsiyonlarını kontrol eden ana düzenleyici sekanslar şekil 5'de gösterilmektedir⁶.



Şekil 5: HLA-DR-α Zincirini Kodlayan Genler ve Düzenleyici Moleküller⁶.

2.1.3. Sınıf III MHC Molekülleri

Diğer genlerin bir grup varyantı, MHC kromozomu içinde sınıf III altında gruplanmaktadır. Bu bölgedeki moleküllerin çoğu direkt veya indirekt olarak immün savunma işlevleriyle ilişkili bulunmaktadır. Dikkate değer bir küme, kompleman komponentlerini kodlayan 4 geni içerir. Bunlardan ikisi C4 izotipleri C4a ve C4b, diğer ikisi C2 ve faktör B içindir. Sitokinler olan tümör nekroz faktör (TNF) ve lenfotoksin (LT alfa ve LT beta), sınıf III altında kodlanan 70kDa ısı-şok protein ailesinin üyeleridirler. Eğer bir MHC bölgesinin bittiği ve diğerinin başladığı nokta tam olarak saptanabilse (ki değil), klasik sınıf I veya II bölgeleri arasında yer alan genler sınıf III'ün bir parçası olarak sınıflandırılabilir. Örneğin, LMP ve TAP genleri sınıf II bölgesinde bulunan T hücre epitop peptitlerinin intrasellüler işlenmesi ve taşınmasıyla ilgili bulunabilir, fakat klasik sınıf II yapısına sahip değildir ve hücre yüzeyinde eksprese edilmezler⁶.

2.1.4. MHC'nin Gen Haritası

İnsan MHC'sinin tam gen dizisi, aralarında İngiliz, Japon ve ABD'lilerin bulunduğu bir grubun ortak çalışmaları sonucunda ortaya çıkarılmıştır. Tüm dizi, farklı MHC haplotiplerinin bir karışımını sunar ve 224 gen lokusu içerir. Bu genlerin 128 tanesi yani %57'si immün sistemle ilişki göstermektedir. Sınıf II ve sınıf I arasındaki bölge olan sınıf III 60 gen içermektedir⁶.

Her bölgenin detaylı bir haritası şekil 6, şekil 7 ve şekil 8'de gösterilmektedir.

İnsan	HLA Geni	MICB	MICA	B	C	E	A	G	F
	Gen Ürünü	MICB	MICA	HLA-B	HLA-C	HLA-E	HLA-A	HLA-G	HLA-F
Fare	H-2 GENE	TAPASIN	K	D	L	Q	T	M	
	Gen Ürünü	TAPASIN	H-2K	H-2D	H-2L	Q	T	H-2M	

Şekil 6: MHC Sınıf I Gen Haritası⁶.

İnsan	HLA Geni	TAPASIN	DPB	DPA	DOA	DMA	DMB	LMP2	TAP1	LMP7	TAP2	DOB	DQB	DQA	DRB	DRA
	Gen Ürünü	TAPASIN	DPβ	DPα	DOα	DMα	DMβ	Proteazom Kompleksi		Peptit Transporter		DOβ	DQβ	DQα	DRβ	DRα
Fare	H-2 Geni	Oa	Ma	Mb2	Mb1	LMP2	TAP2	LMP7	TAP1	Ob	Ab	Aa	Eb	Ea		
	Gen Ürünü	Oα	DMα	DMβ2	DMβ1	Proteozom Kompleksi		Peptit Transporter		H-20	β	Aβ	Aα	Eβ	Eα	

Şekil 7: MHC sınıf II Gen Haritası⁶.

İnsan	CYP21B	C4B	CYP21A	C4A	BF	C2	HSPA1B	HSPA1A	HSPA1L	LTB	TNF	LTA
Fare	CYP21A1	C4	CYP21A2	Sp	BF	C2	HSP70-1	HSP70-3	Hsc70f	LTB	TNF	LTA

Şekil 8: MHC Sınıf III Gen Haritası⁶.

Sınıf I molekülleri alt gruplara bölerek değerlendirmek daha yardımcı olacaktır. İlk olarak klasik sınıf I molekülleri (bazen sınıf Ia olarak değerlendirilebilir) HLA-A, -B ve -C olarak sınıflandırılabilir. Bunlar, antikolar kullanılarak serolojik olarak tanımlanmışlardır. Bazen sınıf Ib olarak tanımlanan diğer moleküller, ilişkili bir yapıya sahiptir veya MHC lokusu içinde kodlanırlar (klasik olmayan MHC molekülleri, HLA-E, -F, -G, HFE, MHC sınıf I Zinciri-Bağlantılı Molekül A ve B (MICA ve MICB) gibi) ya da genomda başka bir yerde (“sınıf I zinciri ilişkili” Farklılaşma Kümesi-1 (CD1) ailesini ve FcRn’i içeren) kodlanırlar. Klasik olmayan MHC genleri, klasik MHC genlerine göre daha az polimorfiktirler, genellikle daha az varyasyon gösterirler ve çoğu pseudogendir^{6,7}.

Tek bir kromozomda yer alan ve birbirine yakın lokuslarda bulunan allel kompleksleri bir haplotip olarak adlandırılır. HLA haplotipleri Sınıf I, II, III allellerinden oluşur. Bir bireyde bulunan iki haplotip, o bireyin HLA genotipini oluşturur. Haplotipler, Mendel kurallarına uygun olarak kalıtılır. Her hücrede ve anne baba kökenli kromozomlar üzerindeki genler tarafından kodlanan proteinler birlikte eksprese edilirler. Homolog kromozomlar arasında bir segment değişiminin olması ise rekombinasyon olarak tanımlanır; görülme sıklığı %1–3 olup; en sık HLA-A, HLA-DP bölgelerinde görülür. Her bölgede yer alan allellerin sayısı göz önüne alındığında: toplumlarda beklenen teorik değerden daha az sayıda haplotip bulunduğu görülür. Bu durum bazı allellerin birlikteliğinin rasgele olmadığını desteklemektedir. Bu durum Bağlantı Dengesizliği (Linkage Disequilibrium) olarak bilinir, bazı haplotiplerin korunma çabası ile açıklanmaktadır. Bu eğilim, en çok B-Cw, DRB1-DRB3/4/5, DRB1-DQB1 arasında olmak üzere HLA-B ile HLA-DQB arasındaki bölge boyunca görülmektedir. Arada yerleşmiş olan kompleman genlerini de kapsayan bazı haplotipler “genişletilmiş haplotipler” olarak adlandırılır. Hastalık ilişkisi çalışmalarında genişletilmiş haplotipler ile kurulan ilişkiler, allelik farklarla kurulan ilişkilere göre daha anlamlı bulunmaktadır. Haplotiplerin frekansında etnik farklılıkların önemi büyüktür⁵.

2.1.5. HLA Genlerinin Çeşitliliği

HLA genlerinde benzersiz bir genetik çeşitliliğin bulunduğu bilinmektedir. Bir kişinin sergilediği MHC genlerini etkileyen pek çok faktör vardır.

1) Çok sayıda farklı lokusun birlikte sergilendiği görülür; bunların sayısı haplotiplere göre farklılık gösterir. Sınıf I genlerde bu polimorfizimi çok sayıdaki psödogen ve fizyolojik rolleri henüz bilinmeyen klasik olmayan genler sağlar. Sınıf II genlerde ise DR alt bölgesindeki genlerin yapısı ve psödogenler etkili olur.

2) HLA genleri içinde farklı allellerin oluşmasına sebep olacak şekilde dizi farklılıkları vardır. Bu çeşitlilik, özellikle antijen sunulması sırasında T hücre reseptörü (TCR) ile ilişkiye giren zincirleri kodlayan genlerde dikkat çekicidir. (Sınıf I genler için ekson 2–3, sınıf II genler için ekson 2). Alleller arasındaki farklar, peptidin taşındığı kovuğun üç boyutlu yapısı üzerinde etkili olduğundan; taşınabilecek peptitlerin seçilmesinde de önem kazanmaktadır⁵.

İmmunglobulin sisteminden farklı olarak, varyasyon her bireyde bir multigenik sistem ile sağlanmaktadır. Sınıf I ve sınıf II genleri, insan genomundaki en polimorfik genlerdir ve bu genlerden bazıları için 200 allelik varyant tanımlanmıştır. Sınıf I HLA-A, -B ve -C molekülleri yüksek derecede polimorfiktirler. Sınıf II β zincirleri de (HLA-DR β en fazla, DP β ikinci, DQ β üçüncü) polimorfiktir ve β zincirlerinden daha az olmakla beraber –DP ve –DQ'nun α zincirleri de polimorfizm göstermektedir. HLA-DR α ve β 2m yapısal olarak varyasyon göstermez. Bu polimorfizimden sorumlu olan amino asit değişiklikleri, sınıf I'in α 1 ve α 2 domainlerine ve sınıf II'nin α 1 ve β 1 domainlerine sınırlıdır. Bu durum özellikle β - katlantılı tabakada ve merkezi kaviteyi sınırlayan α - helikslerin iç yüzeyinde ve ayrıca helikslerin üst yüzeyinde meydana gelir. MHC bölgelerindeki bu çoklu allelik formlar pek çok çeşit mekanizma tarafından sağlanabilir: Nokta mutasyonu, rekombinasyon, ve gen değişimi gibi⁶.

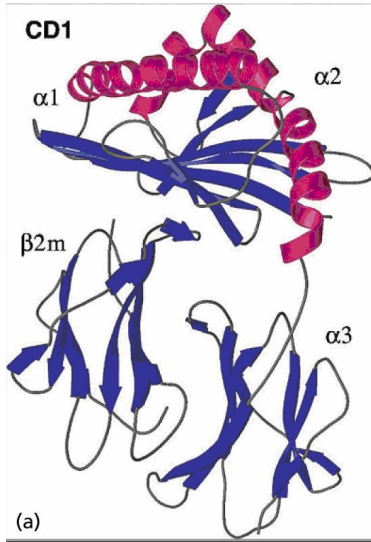
2.1.6. MHC Moleküllerinin Doku Dağılımı

Karakteristik olarak, tüm çekirdekli hücreler klasik sınıf I moleküllerini taşırlar. Lenfoid ve myeloid hücrelerde bol miktarda eksprese edilirlerken, daha az miktarda karaciğer, akciğer ve böbrekte, seyrek miktarda da beyin ve iskelet kasında eksprese edilirler. İnsanda plasental ekstrasvillöz sitotrofoblastların yüzeyinde HLA-A ve -B ekspresyonu yapılmadığı gözlenmiş ancak günümüzde bazı kanıtlar HLA-C ekspresyonunun yapılabildiğini düşündürmektedir. Ekstrasvillöz sitotrofoblastların ve diğer plasental dokuların HLA-G taşıdığı tam

olarak gösterilebilmiştir. HLA-G genellikle allodeterminantları bakımından eksiklik gösteren ve diğer vücut hücrelerinde gözlenmeyen bir moleküldür. Sadece timusteki meduller ve subkapsüller epitelde ve γ -interferonla aktivasyonu sonucunda kan monositlerinde gözlenir. HLA-G'nin plasentadaki rolü açık değildir, fakat klasik sınıf I moleküllerin yerine geçme fonksiyonunu yerine getirebilirler. Diğer taraftan sınıf II moleküller ekspresyonları açısından hayli sınırlıdır ve sadece B hücrelerinde, dendritik hücrelerde, makrofajlarda ve timik epitelde eksprese edilirler. Bununla birlikte γ -interferon gibi ajanlarla aktive edildiklerinde, kapiller endotel ve timus dışındaki pek çok dokudaki epitel hücreler sınıf II ekspresyonu yapmaya başlarlar ve sınıf I ekspresyon düzeyini de arttırırlar^{5,6,7,8,9}.

2.1.7. Klasik Olmayan MHC ve Sınıf I Zinciri-Bağlantılı Moleküller

Bu moleküller $\beta 2m$ 'i kullanan CD1 ailesini içerirler ve klasik sınıf I molekülleriyle benzer bir genel yapıya sahiptirler (şekil 9).



Şekil 9: CD1'in Moleküler Yapısı⁶.

Bununla birlikte MHC'ye göre farklı bir kromozomda, kromozom 1'de kodlanırlar. MHC emsallerine benzer olarak CD1; antijenlerin T hücrelerine sunumlarında rol alır, fakat antijen bağlayıcı oluk genellikle hidrofobik aminoasitler tarafından bir miktar kapatılmıştır ve sadece dar bir girişe uygun bir

açıklık barındırmaktadır. Peptit antijenleri bağlamak yerine, CD1 molekülleri genellikle lipit veya glikolipit sunumu yaparlar. İnsan hücrelerinde en az 4 farklı CD1 molekülü ekspresyonu yapılmaktadır. CD1a,b ve c; kortikal timositlerde, dendritik hücrelerde ve B-hücrelerinin alt gruplarında bulunurken; CD1d intestinal epitelde, hepatositlerde ve tüm lenfoid ve myeloid hücrelerde bulunurlar⁶.

İnsanda, HLA-E; HLA-A, -B, -C ve G moleküllerinin sinyal sekanslarından kaynaklanan 9 amino asitlik peptidi bağlar ve Doğal Öldürücü (NK) hücreler ile sitotoksik T hücrelerindeki CD94/NKG2 reseptörleri tarafından saptanır. Yine bazı sitotoksik T hücreleri üzerindeki $\alpha\beta$ TCR'ler tarafından da saptanır⁶.

MICA ve MICB klasik sınıf I ile aynı domain yapısına sahiptir ve göreceli olarak yüksek bir polimorfizm gösterirler. Epitelyal hücrelerde, gastrointestinal yolda ve timik kortekste bulunurlar ve NKG2D aktive edici molekül tarafından saptanırlar. Bu etkileşim için olan muhtemel bir rol, NK ve T-hücre antitümör yanıtlarının uyarılması olabilir⁶.

HLA-F'nin fonksiyonu net değildir. Daha önceden HLA-H olarak gösterilen HFE; peptit bağlayamayacak derecede dar bir oluk içerir ve immün savunmada bir rol oynamayabilir. Bununla birlikte transferrin reseptörüne bağlanır ve demir alımında rol alıyor olabilir. HFE'deki bir nokta mutasyon (C282Y) herediter hemokromatozlu hastaların %70-90'ında bulunmaktadır^{6,7}.

2.2. MHC Moleküllerinin Fonksiyonu ve Sentezi

Sınıf I ve Sınıf II MHC molekülleri, peptitler ile dayanıklı kompleksler oluşturarak onların T lenfositler tarafından tanınabilecek şekilde hücre yüzeyinde sergilenmesini sağlarlar⁶. TCR ile olan etkileşim hem peptide hem de MHC molekülüne bağlıdır. Bir kural olarak TCR; yalnız bir MHC molekülüne veya ilişkisiz bir peptitle kompleks oluşturmuş MHC molekülüne bağlanmaz⁷. Peptit-MHC kompleksi TCR repertuarını da belirler. Timustaki T lenfositlerin pozitif ve negatif seçiminde belirleyici olur. MHC molekülleri, bireyin oluşturacağı immün yanıtı:

- 1) Farklı antijenik peptitlerin sunulmasını sağlayarak,
- 2) T hücrelerindeki antijen tanıma mekanizmalarını etkileyerek kontrol etmektedir.

HLA allellerinin farklılıkları ve T hücrelerinde gerçekleşen yeniden gen düzenlemeleri sayesinde her bireye özgü benzersiz bir immün yanıt oluşmaktadır. Canlı türleri arasında antijen sunma kapasitesi en fazla olanlar, antijen sunan molekülleri en çeşitli olanlardır⁵.

MHC molekülleri hücre yüzey belirteçleri olarak aktivasyon gösterirler ve infekte hücrelerin sitotoksik ve yardımcı T hücrelerine sinyal iletimini sağlarlar. Bu rolün immün yanıt içindeki büyük önemi tartışmasızdır ve MHC bölgesindeki zengin polimorfizm, türlerin farklı mikroorganizmalara karşı maksimum koruma cevabı oluşturmasını sağlamaktadır. Bu duruma çarpıcı bir örnek olarak malarya verilebilir. Doğu Afrika'daki Plasmodium Falciparum türünün oluşturduğu ciddi malaryaya karşı oluşan direnç HLA-DRB1*0101 ile ilişkili görülürken, parazitin Batı Afrika türüne karşı görülen direnç ise HLA-DRB1*1302 ile ilişki göstermektedir^{6,7}.

2.2.1. Antijenler İçin T Hücre Yüzey Reseptörleri

Antijen spesifik T-hücre reseptörü; alfa ve beta olmak üzere iki disülfid-bağlantılı zincirden oluşan bir membran bağlı molekül olarak tanımlanabilir. Her zincir; iki Ig-benzeri domain şeklinde katlanırlar. Bu domainlerden biri (iç domain) göreceli olarak varyasyon göstermeyen bir yapıya sahip iken, diğeri (dış domain) yüksek derecede varyasyon gösterir. Dolayısıyla $\alpha\beta$ TCR, Ig Fab fragmanına benzer bir yapı gösterir. Bu iki değişken bölgenin her biri 3 hipervaryasyon gösteren bölgeye sahiptir ve MHC ligandı ile bağlantı sağlayan aminoasitleri bir araya getirir. Her iki zincir de antijen saptanması için gerekmektedir⁶.

T hücrelerinin çoğu alfa ve beta zincirinden oluşan reseptörleri (TCR2) eksprese ederler. Farklı bir reseptör grubu olan (TCR1) $\gamma\delta$ reseptörlerini taşır ve erken timik ontojenide güçlü bir şekilde transkribe edilir. Fakat yetişkinde esas olarak epitelyal doku ile ilişkili bulunmaktadır. İnsanlarda, $\gamma\delta$ hücreleri kandaki periferik T hücrelerinin %0,5-15'ini oluştururken, intestinal epitel ve deride büyük bir baskınlık gösterirler. Genelde, $\gamma\delta$ T-hücreleri, mikobakterilerin içeriği olan ve lipit ve glikolipit molekülleri ve ısı-şok proteinlerini içeren bazı mikrobiyal antijen tiplerinin tanınmasında görev alırlar⁶.

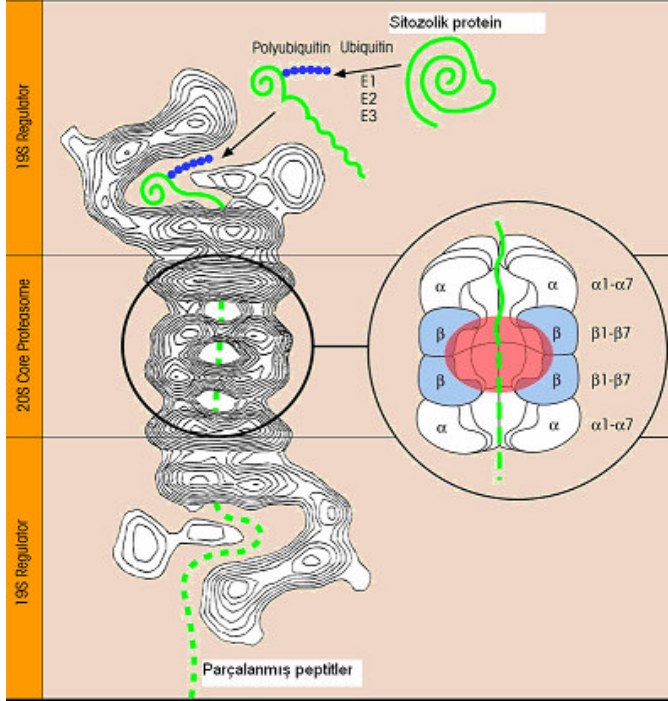
T-hücre reseptörleri, antijenleri MHC sınıf I veya II molekülleriyle ilişkili olan hücrelerin yüzeyinde saptarlar^{12,13}. Günümüze kadar yapılan çalışmalarda

gösterildiği üzere; bazı istisnalar dışında $\alpha\beta$ reseptörü taşıyan T-hücreleri, sadece antijen-sunucu hücreler T-hücrelerin kaynaklandığı konak ile aynı MHC haplotip ekspresyonu yaparsa yanıt verebilirler. T-hücre saptama olayı üzerindeki bu haplotip sınırlaması bize kesin olarak MHC moleküllerinin, antijen taşıyıcı hücreler ile ona uygun antijen-özgül T lenfosit arasındaki etkileşimde önemli bir role sahip olduğunu göstermektedir. Ayrıca genel olarak söylemek gerekirse; sitotoksik T hücreleri sınıf I MHC içeriğindeki antijenleri saptarken; makrofajlarla etkileşime giren T hücreleri, antijen sınıf II moleküllerle ilişkiyken yanıt oluşturabilirler^{12,13}.

T hücreleri; antijenlerden kaynaklanan lineer peptitleri saptarlar. T hücreleri MHC ve peptidin her ikisini de saptar. T-hücre epitopu olarak rol oynayan peptit; α -heliks ve β -katlantılı tabakalar tarafından oluşturulan olukta bulunmaktadır^{12,13}.

2.2.2. Sınıf I MHC İle Sunulan Antijenlerin Hücre İçi İşlenmesi

Sitozoldeki gizli proteolitik yapılar olan proteazomlar, proteinlerin rutin dönüşümünde (turnover) ve hücre sel yıkımında (degradasyon) yer alırlar. Antijen sunumu için tahsis edilen ve viral proteinleri içeren sitozolik proteinler bu yapıların yer aldığı bir yolak ile peptitlere parçalanırlar^{12,13} (şekil 10).



Şekil 10: Sitozolik Proteinlerin Proteazom Aracılığı İle Yıkımı¹².

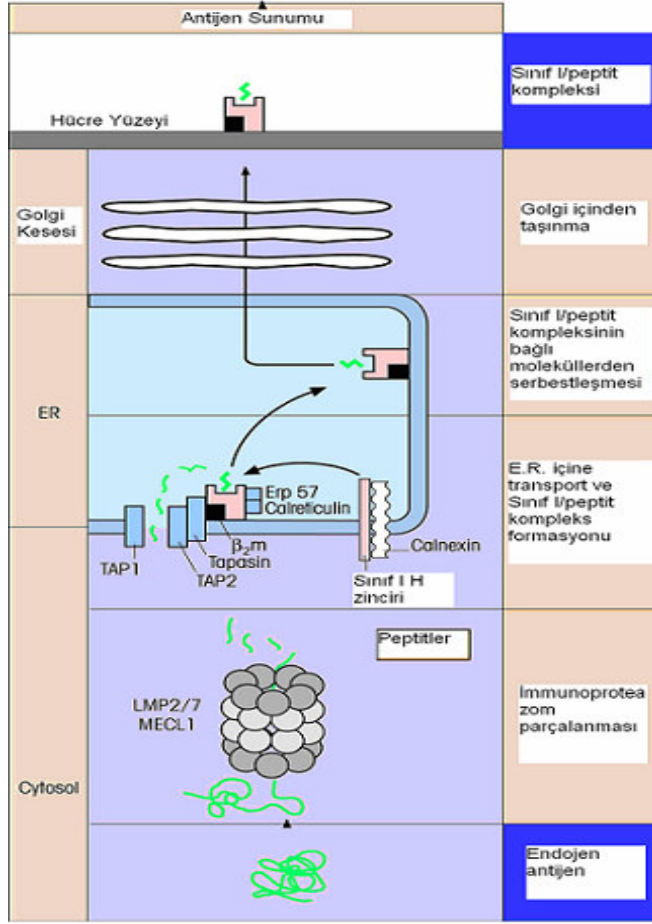
Bununla birlikte, lösin ve aspartil aminopeptitazları içeren diğer sitozolik proteazlar da bu antijen işlenmesi olayına katkıda bulunurlar. Sitozolda bulunan proteinlere ek olarak; membrana bağlı proteinlerin bir kısmı, endoplazmik retikulumdan (E.R.) sitozole SEC61 moleküler kompleksiyle geri taşınan sekretuar proteinler ve mitokondri kaynaklı proteinler de sınıf I sunumu için işleme girerler. İşlemden önce, proteinler ATP-bağımlı bir işlemle bazı ubiquitin moleküllerine kovalent olarak bağlanırlar. Poliubiquitinasyon, polipeptitleri proteazoma yönlendirir^{12.13.14}.

Proteazomlar tarafından üretilen peptitlerin sadece %10'u MHC sınıf I oyuğuna uygun olabilecek optimal uzunluğa sahiplerdir. Yaklaşık %70'i antijen sunumunda fonksiyon göstermek için çok küçüktür. Kalan %20'si ise sitozolik aminopeptitaz gibi kompleksler aracılığı ile daha ileri bir düzenlemeye ihtiyaç duyarlar. IFN γ sitokini 3 katalitik proteazomal alt ünitenin üretimini artırır. Bunlardan ikisi polimorfik düşük moleküler ağırlıklı proteinler LMP2 ve LMP7; diğeri ise nonpolimorfik LMP10'dur. Bu moleküller homolog katalitik alt ünitelerin (sırasıyla β 1, β 5, β 2) yerini almışlar ve proteazomu immünoproteazom haline gelecek şekilde düzenlemişlerdir. Bu düzenleme içinde peptit üretimini sınıf I

bağlaması için en uygun hale getirmek için parçalama spesifitesini modifiye etmek bulunur^{12,13}.

Proteazom ve immünoproteazom kaynaklı peptitler; antijen işlenmesi ile ilişkili taşıyıcılar (TAP1 ve TAP2) (transporters associated with antigen processing) aracılığı ile E.R. içine transloke edilirler. Bu işlem ısı-şok protein ailesinin de üyelerini içerir. Yeni sentezlenen sınıf I ağır zinciri E.R. içinde bir molekül şaperon olan ve katlanmaya, disülfid bağ biçimlenimine ve $\beta 2m$ ile birleşmeye yardım eden kalneksin tarafından tutulur^{12,13} (Şekil 11).

İnsanlarda kalneksin daha sonra kalretikulin ile yer değiştirir. E.R.-sınırlı protein olan Erp57; thiol redüktaz, sistein proteaz ve şaperon fonksiyonlarına sahiptir ve $\beta 2m$ ile beraber katlanan kalretikulin-kalneksin ve sınıf I ağır zinciri kompleksiyle bağlantılı hale gelir. Bu şaperonlara bağlı durumdaki boş sınıf I molekülü, tapasin aracılığı ile TAP1/2 ile bağlantılı hale gelir. Peptit yüklenmesini takiben, sınıf I molekülü çeşitli aksesuar molekülden ayrılır ve sonuçta stabil peptit-sınıf I ağır zincir- $\beta 2m$ kompleksi, golgi bezini geçerek sitotoksik T-hücreleri için bir hedef olarak rol oynayacakları hücre yüzeyine ulaşırlar^{12,13,15} (Şekil 11).



Şekil 11: Endojen Antijenlerin Sınıf I MHC Tarafından İşlenmesi ve Sunumu¹².

2.2.3. Sınıf II MHC İle Antijen Sunumu

Antijenik peptitle birlikte olan sınıf II MHC kompleksi, farklı bir intrasellüler mekanizmayla üretilir. Bu sistemde sınıf II içeren bir trans-golgi vezikülü, endositik mekanizmalar ile hücre içine alınan ekzojen protein antijeni içeren bir geç endozomla kesişmek zorundadır. Sınıf II moleküller; E.R.'da birkaç fonksiyona sahip olan invariant zincir (Ii) ile ilişkili olan α ve β zincirinden oluşurlar^{12,13} (Şekil 12).

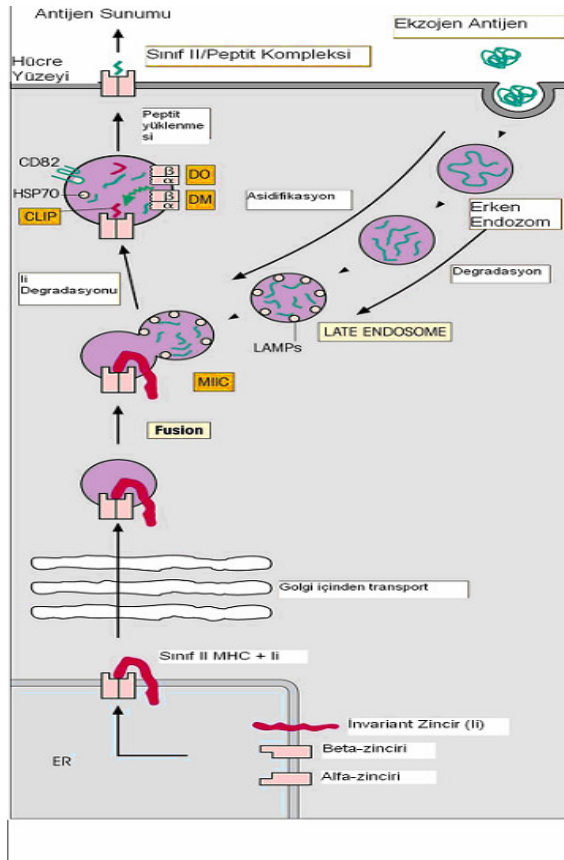
Ii'nin fonksiyonları:

- 1) Olgunlaşmamış sınıf II molekülün en uygun şekilde katlanması için bir şaperon gibi rol oynar.
- 2) Ii'nin luminal parçasının internal sekansı MHC oyuğuna yerleşir ve böylece sınıf II molekülü antijen içeren endositik kompartmana

ulaşmadan önce E.R.'daki peptitlerin vaktinden önce MHC oyuğunu işgal etmelerini önler.

- 3) Ii'nin $\alpha\beta$ sınıf II heterodimeri ile kombinasyonu, retansiyon sinyalini inaktive eder ve golgiye olan transportu sağlar.
- 4) Son olarak Ii'nin N-terminal sitoplazmik bölgesindeki hedef motifleri, sınıf II içeren veziküllerin endositik yolağa yönlendirilmesini sağlar.

Bu sırada, ekzojen protein endositoz ile hücre içine alınır, erken endozom progresif asidifikasyona maruz bırakılır ve asparajinil endopeptidazlar gibi endozomal proteazlar ile peptitlere işlenirler. Sonunda lizozom haline gelen geç endozomlar, lizozomal bağlantılı membran proteinlerini (LAMP) kazanırlar. Bu molekülün fonksiyonu tam olarak açıklık kazanmamıştır. Bu geç endozomlar; sınıf II-Ii kompleksi içeren vakuollerle birleşirler^{12,13} (Şekil12).



Şekil 12: Ekzojen Antijenlerin Sınıf II MHC Molekülleri Tarafından İşlenmesi ve Sunumu¹².

Asidik ortamda, MHC sınıf II-zenginleştirilmiş kompartmanlarda (MIIC), proteazlar li molekülünün MHC oyuğunda yerleşen parçası dışındaki kısmını degrade ederler ve geriye Sınıf-II-İlişkili İnvariant Zincir Peptidi (CLIP; class-II-associated invariant chain peptit) olarak adlandırılan kısım kalır. MHC-ilişkili dimerik bir molekül olan HLA-DM, daha sonra CLIP'in uzaklaştırılmasını katalize eder ve oyuğu açık hale getirir. Böylece endozomda üretilen peptitler bu oyuğa yerleşebilirler^{12,13}(Şekil 13).



Şekil 13: MHC Sınıf II Taşınımı ve Peptit Yükleneşinin Karikatürize Gösterimi¹².

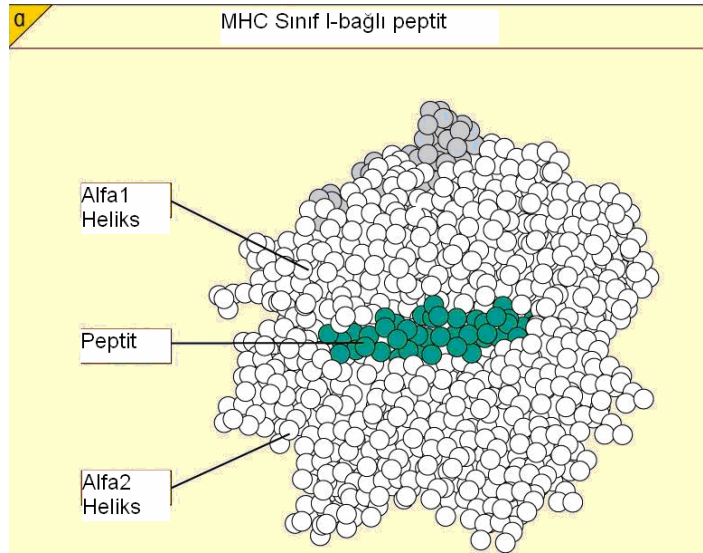
Bu işlem katlanmamış peptitleri rastgele karışık bir şekilde bağlayan hsp70 ailesinin üyeleri tarafından desteklenebilir. Başlangıçta peptit bağlanması, peptit konsantrasyonu tarafından belirlenmektedir. Fakat HLA-DM aynı zamanda yüksek affiniteli peptitlere yer açmaları için düşük affiniteli peptitlerin uzaklaştırılmasına aracılık eder. HLA-DM; en stabil bağlanma özelliğine sahip peptitleri bir araya getiren bir editör gibi rol oynar. Özellikle B hücrelerinde, ek bir MHC-ilişkili molekül olan HLA-DO, sınıf II'ye bağlı HLA-DM ile birleşir ve ph-bağımlı bir ortamda fonksiyonunu modifiye eder. B-Hücre Reseptörü (BCR) aracılığı ile hücre içine alınan antijenlerin sunumuna destek olarak etki gösteriyor olabilir. Tetraspanin ailesinin bir üyesi olan CD82 de ayrıca MIIC'de bulunmaktadır fakat rolü tam olarak açıklanamamıştır. Sınıf II-peptit kompleksleri sonunda T-helper hücrelerine sunulmak üzere membrana transport edilirler^{12,13}.

Böylece genel olarak, endojen protein antijenleri sınıf I sunumu için işlenirlerken, ekzojen protein antijenleri sınıf II sunumu için işlenirler. Sınıf II sunumu için antijenlerin işlenmesi, dışarıdan alınan çözünür proteinlerle sınırlı olsa da; aynı zamanda direkt fagositoz veya uzamış intrasellüler birlikteliğin sonucunda lizozomal yapılara antijenleri ulaşan mikroorganizmaları da kuşatabilirler. E.R.'deki proteinler ve peptitler de sınıf II oyuğu için potansiyel müşterilerdir ve MHC'ye doğru bir yolculuk yapabilirler. Aksine sınıf-I sınırlı cevap da ekzojen antijenlere karşı geliştirilebilir ve cross-priming olarak adlandırılır. Bu olay iki şekilde gerçekleşebilir. Ya proteinlerin fagozomdan sitozole transfer edildiği fagositik hücrelerde TAP-bağımlı yolakla; ya da peptit değişiminin meydana geldiği yere sınıf II-zengin kompartmanlar içinde ulaşan hücre yüzeyi MHC sınıf I moleküllerinin endositozu ile gerçekleşir^{12,13}.

MHC oyuğu; içlerine yerleştirdikleri peptitlerin yapısı ve uzunluğu hakkında iyi tanımlanmış bazı sınırlamalar koymuştur ve farklı MHC allellere göre farklılık gösterir^{12,13}.

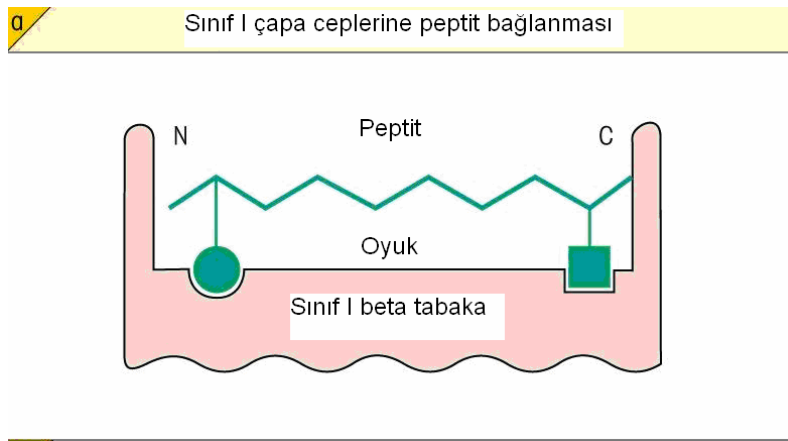
2.2.4. MHC Sınıf I'e Bağlanma

X ışını analizleri sonucunda peptitlerin sıkı bir şekilde oyuğun uzunluğu boyunca yerleştiği gösterilmiştir¹⁰ (Şekil 14).



Şekil 14: Peptitlerin MHC Sınıf I'e Bağlanması¹².

N- ve C- terminalleri oyuğun her iki ucundaki rezidülere MHC allelinden bağımsız olarak sıkı hidrojen bağlarıyla bağlanmışlardır. Doğal olarak oluşan peptitler, pürifiye MHC sınıf I'den izole edilerek incelenmiştir. Genellikle 8–9 rezidü uzunluğundadırlar ve daha uzun peptitler yarıktan yukarıya ve dışa doğru çıkıntı yaparlar. Peptit havuzu diziliminin analizi genellikle belirli anahtar pozisyonlarda güçlü amino asit sinyalleri olduğunu göstermiştir. Bunlar çapa pozisyonları olarak adlandırılırlar ve MHC oyuğundaki allel-spesifik ceplere uygun olabilecek şekilde tercih edilen amino asit yan zincirlerini gösterirler¹²(Şekil 15).

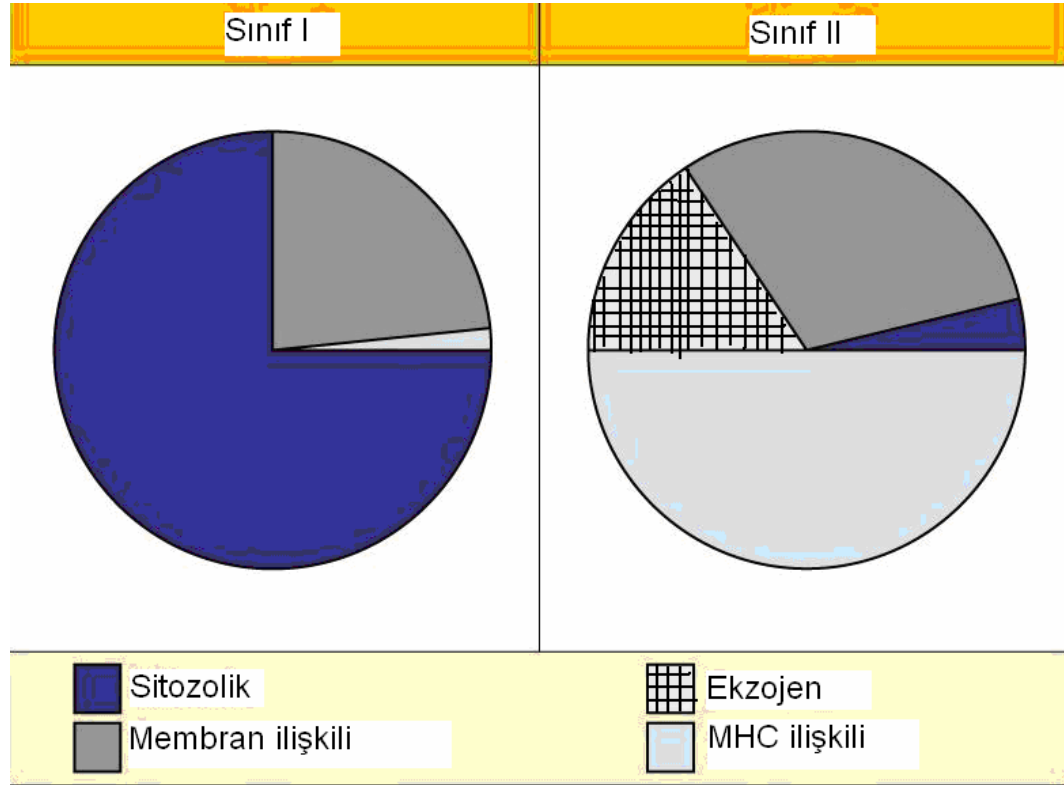


Şekil 15: Allel Spesifik Sınıf I Ceplere Peptit Bağlanması¹².

Sınıf I-bağlayan peptitler için genellikle iki bazen üç majör çapa pozisyonu bulunmaktadır. Bir tanesi C-terminal uçta bulunurken, diğeri sıklıkla p2 pozisyon 2 (p2)'de bulunur. Ancak bazen P3, P5 veya P7'de de bulunabilir. Bazen bir majör çapa cebi yerine, iki veya üç daha zayıf sekonder bağlayıcı cep bulunabilir. İki veya üç çapa motifinin sınırlayıcı özelliğine rağmen, her MHC sınıf I alleli çok sayıda farklı peptitleri yerleştirebilmektedir¹².

Viral enfeksiyon vakaları dışında, doğal sınıf I ligandları; hücreler tarafından endojen olarak sentezlenen proteinlerden, histonlardan, ısı-şok proteinlerinden, enzimlerden, lider sinyal dizilerinden kaynaklanan self peptitlerdir. Bu peptitlerin %75'i sitozolden kaynaklanır^{5,6,9} (Şekil 16). Çoğu düşük miktardadır (Her hücre için yaklaşık 100-400 kopya). Bu yüzden, tümörlerdeki onkofetal proteinlerde ve infekte olan hücrelerdeki viral antijenlerde

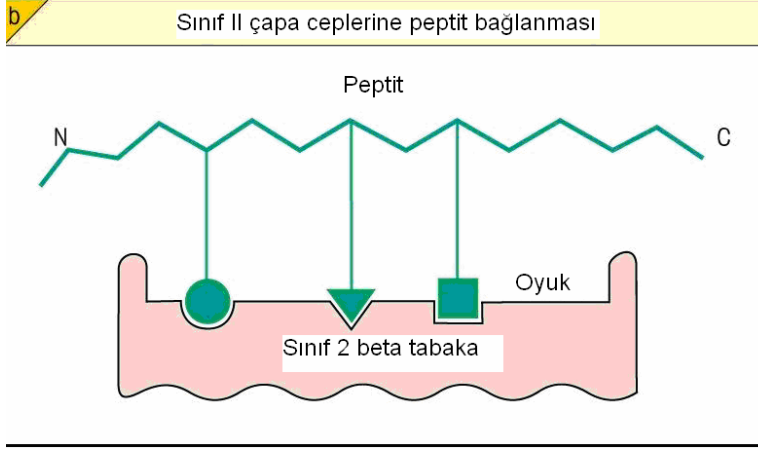
gözlendiği gibi alışılmadık şekilde fazla protein ekspresyonu gerçekleştiğinde, bu antijenler T-hücreleri tarafından kolayca saptanabilir¹².



Şekil 16: Sınıf I ve Sınıf II Bağlı Peptitlerin Kaynakları¹².

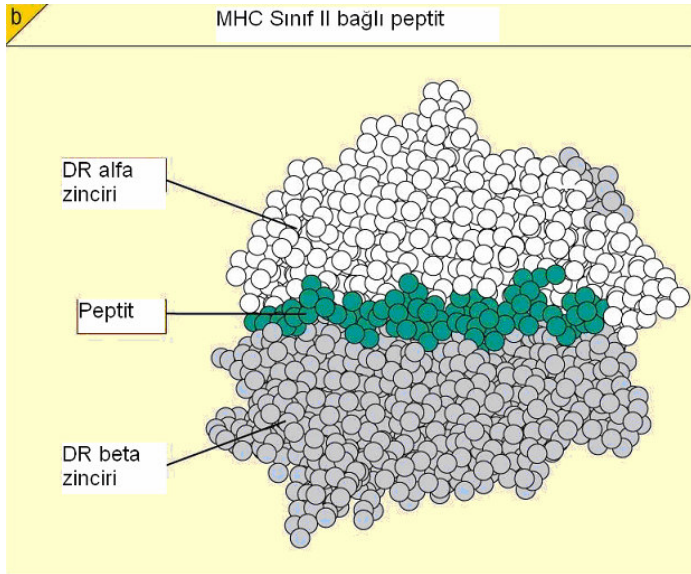
2.2.5. MHC Sınıf II'ye Bağlanma

Sınıf I'de görüldüğü üzere, N ve C terminal bölgelerinde peptite, allel bağımsız hidrojen bağları bağlanmıştır. Bunun aksine sınıf II oyukta hidrojen bağları tüm peptit uzunluğu boyunca ana zinciri oluşturan atomlarla bağ oluşturacak şekilde artmıştır. Peptit yan zincirleri için sınıf II allel-spesifik bağlayıcı cepler dikkate alındığında, 3 veya 4 majör çapa rezidüsüne dayanan motifler önem kazanmaktadır¹²(Şekil 17).



Şekil 17: Allel Spesifik Sınıf II Ceplere Peptit Bağlanması¹⁰.

Peptit zincirleri için daha düşük ilgiye sahip olan sekonder bağlayıcı cepler de hala peptit-MHC kompleksinin affinitesini modifiye edebilirler. Ne yazık ki belirlediğimiz herhangi bir peptit için oluşan ilgiyi tam olarak saptayamayız. Çünkü sınıf II oyuğunun yapısı, peptidin uzunluğu üzerine bir sınırlama getirmez ve peptit oyuğunun her iki ucundan dışarı sarkmaktadır. Bu açıdan sınıf I bölgesindeki peptit sınırlamasından tamamen farklılık göstermektedir¹².(Şekil 17 ve 18)



Şekil 18: Peptitlerin MHC Sınıf II'ye Bağlanması¹².

Daha önceden de belirtildiği gibi, her sınıf II molekülü, 8 ila 30 amino asit arasında uzunluğa sahip peptitleri bağlayabilmektedir. Doğal olarak MHC'den izole edilen bir peptit havuzunun analizi sonucunda, hangi amino asit yan zincirinin oyuktaki mevcut olan 9 uygun bölgeden hangisini tercih ettiğini saptayamamaktayız.

Oyuğun erişilebilir yapısından dolayı ve doğal molekülün katlanmamış ve indirgenmiş olarak bulunmasından ötürü herhangi bir yıkım işlemi meydana gelecek olursa, yüksek affiniteli epitoplara kendilerini sınıf II bağlayıcı oyuk içine gömebilirler ve proteolizden korunabilirler. HLA-DR1 molekülünde gösterildiği üzere; peptit bağlanması, peptit bağlayıcı oyuk boyunca genişleyen daha açık bir konformasyondan daha kompakt bir yapıya geçişi uyarmaktadır. Düzenleme işlemi peptit bağlanmasından sonra meydana gelir ve 8–30 amino asit uzunluğunda bir peptit zinciri bırakır. Oluşan peptit-MHC kompleksinin göreceli konsantrasyonunu birkaç faktör etkiler:

- 1) Çapaların uygunluğu ile belirlenen oyuğun affinitesi.
- 2) İnternal rezidüel tarafından yapılan çoğaltma ya da sınırlama (bağlayıcı rezidüel dışındaki sekansların peptit bağlama spesifitesi üzerinde etkileri çok düşük veya yoktur)
- 3) Proteaz ve disülfid indirgenmesine karşı olan duyarlılık
- 4) Daha yüksek affiniteye sahip determinantların varlığına bağlı yarışmalı inhibisyon.

Oluşan farklı peptit komplekslerinin konsantrasyon miktarları, T hücreleriyle etkileşim kabiliyetleri açısından epitoplarda bir hiyerarşi oluşturmuştur. En efektif dominant olarak tanımlanırken, daha az efektif olanlar subdominant olarak tanımlanmaktadır. Dominant ve subdominant olarak kabul edilebilen self epitoplara, genellikle timustaki T-hücre ontogenezi sırasında toleransı indükleyebilirler. Düşük miktarda self peptite sahip kompleksler ise T-hücrelerini tolere edemezler ve bu otoprotein T-hücreleri altta yatan potansiyel otoimmünite tehdidini ortaya çıkarırlar¹².

2.2.6. T-Hücre Reseptörü, MHC Molekülü ve Antijenik Peptidin Birbiriyle Etkileşimi

$\alpha\beta$ T-Hücre Reseptörü, MHC ve antijenik peptitle bir 3'lü kompleks oluşturur. MHC'ye peptit bağlanması ve peptit-MHC kompleksine TCR

bağlanmasında yer alan kuvvetler, antikor-antijen bağlanmasındakilere benzerdir (nonkovalent bağlar gibi). Rekombinant DNA teknolojisi ile üretilen çözünür TCR preparatları bir sensör çipin üzerine yerleştirildiğinde, MHC-peptit kompleksini spesifik olarak oldukça düşük bir affinite (K_a) (10^4 den 10^7 M^{-1} e kadar değişen bir aralıkta) ile bağlayabilmektedirler. T hücreleri hedef hücreler ile temas sağladığında TCR'ler ve onların MHC-peptit ligandları arasında oluşan atomik temasların azlığı ve düşük affinite, TCR saptamasının bu hücrelerel etkileşimin bağlanma enerjisine olan etkisini oldukça önemsiz kılmaktadır. Çekim gücünün asıl yükünü antijen bağımsız majör adezyon molekülleri olan Hücreler Arası Adezyon Molekülü-1/2 (ICAM-1/2; İntercellular Adhesion Molecule), Lenfosit Fonksiyonu İlişkili Antijen-1/2 (LFA-1/2; Lymphocyte Function-Associated Antigen) ve CD2 gibi moleküller üstlenmektedir. Ancak T-hücresinin MHC peptit kompleksi tarafından uyarılması gerektiğinde, sinyal iletimi mutlaka T hücre reseptörü üzerinden gerçekleşmelidir¹².

Her TCR zincirinde CDR1, CDR2 ve CDR3 olmak üzere 3 tamamlayıcı bölge bulunmaktadır. CDR1 ve CDR2, CDR3'e göre çok daha az değişkenliğe sahiptirler. MHC peptit kompleksi incelendiğinde en fazla varyasyon antijenik peptitte beklenmektedir. Bu yüzden mantıksal bir modelde, TCR zincirinin CDR1 ve CDR2 bölgeleri MHC'nin alfa-helikal yapılarıyla temasta bulunurken; CDR3 peptite bağlanmada görev almaktadır. Bu görüşe uygun olarak, bazı çalışmalar MHC içeriği içinde sunulan peptitlerdeki küçük varyasyonları saptayan T-hücrelerinin, sadece CDR3 çok değişken bölgeleri bakımından birbirlerinden farklı olduklarını göstermiştir¹².

TCR'lerin birleşme bölgesi, peptit MHC kombinasyonunun hafif dalgalı yüzeyine uyacak şekilde düz bir yapı teşkil eder. MHC sınıf I tarafından sunulan peptitlerin saptanması için TCR; TCRV α domaini ile peptit-MHC ortasından diagonal olarak uzanmakta ve MHC α 2-heliksini ve peptidin N-terminal bölgesini kaplamaktadır. V β domaini de aynı şekilde diagonal olarak uzanmakta ve α 1-heliksini ve peptidin C-terminal parçasını kaplamaktadır. Daha fazla kristal çözümüleme yapıncaya kadar, bağlanmayla ilgili katı ve hızlı kurallar koymak imkânsızdır. Fakat en fazla varyasyona sahip olan CDR3'ün peptit ile en büyük teması yaptığı ve özellikle peptidin orta kısmına (P4-P6 arası) odaklandığı açıktır. CDR1'ler hem peptit ile hem de MHC'nin alfa-heliksiyle temas kurabilir iken, CDR2'ler büyük oranda MHC alfa-heliksleri ile etkileşime girmektedirler.

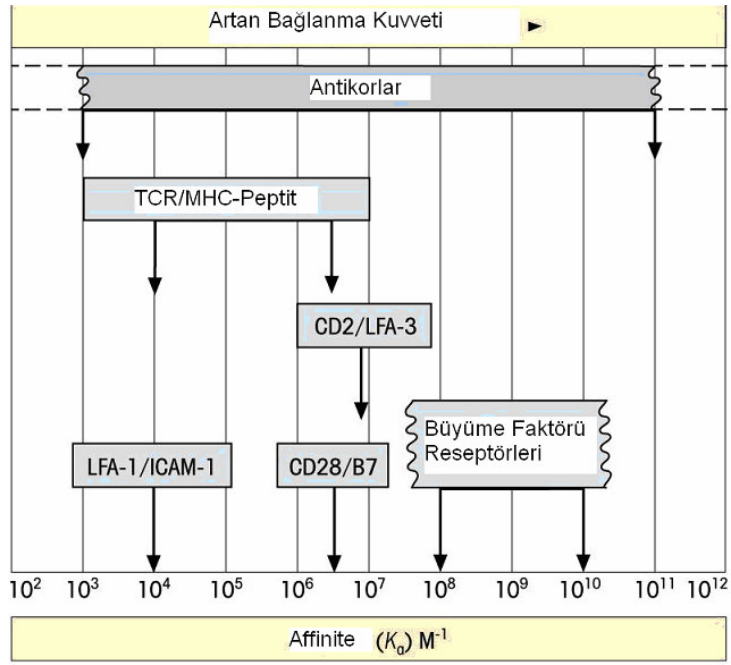
Bu etkileşimler sonucunda CDR3'lerde belirgin konformasyonel değişimler gözlenmektedir. Yeni yapılan kristal yapı analizlerinde, MHC sınıf II tarafından sunulan peptidi saptayan TCR yapısı incelendiğinde, TCR'nin bağlı olan peptidi dikey bir oryantasyon ile geçerek farklı bir oryantasyon oluşturduğu görülmüştür. MHC sınıf II molekülleri tarafından sunulan peptitler daha uzun olmasına karşın, TCR'nin peptitle kombine olan kısmının büyüklüğü maksimum 9 peptit rezidü dizisinin saptanmasına izin verir. MHC oyuğunun içindeki peptit rezidülerinin merkezi kısmı TCR'lerin saptama işlemleri için odak teşkil etmektedir. TCRV α domaini sınıf II β 1-heliksi ile temasa geçerken, V β domaini α 1-heliksi ile temasa geçer¹². B ve T hücreleri tarafından antijenlerin farklı formlarının saptanması konağa avantaj kazandırır. Antikorlar, ekstrasellüler sıvıda doğal formlarında bulunan mikroplar ve ürünleri ile savaşır. B hücre reseptörü için, epitoplari doğal formlarında saptamak konağa bir avantaj kazandırmaktadır.

$\alpha\beta$ T-hücreleri farklı bir göreve sahiptirler. Sitotoksik T-hücreleri ve sitokin sekrete ederek infekte makrofajları aktive eden T hücreleri, infekte hücreleri arayıp onlara bağlanmalı ve hedef ile yüz yüze gelerek efektör fonksiyonlarını uygulamalıdır. İlk olarak intrasellüler infeksiyoz ajanlar tarafından üretilen proteinler ele alınacak olursa, MHC molekülleri efektör T-lenfositlerine bir hücreyle karşılaştıklarını anlatır. İkinci olarak T-hücreleri, yüzeyinde doğal bir mikrobial molekül bulunan infekte olmamış bir hücreye saldırmak istemez. Ek olarak hücre yüzeyinde aşırı miktarda dolaşımdaki antikorlarla istila edilerek bloke edilmiş bir antijenik hedefe sahip olmak istemez. Bu yüzden mikrobial antijenleri yüzeylerinde doğal moleküler formlarından daha farklı eksprese etmek, infekte hücrelerin yararına olacaktır.

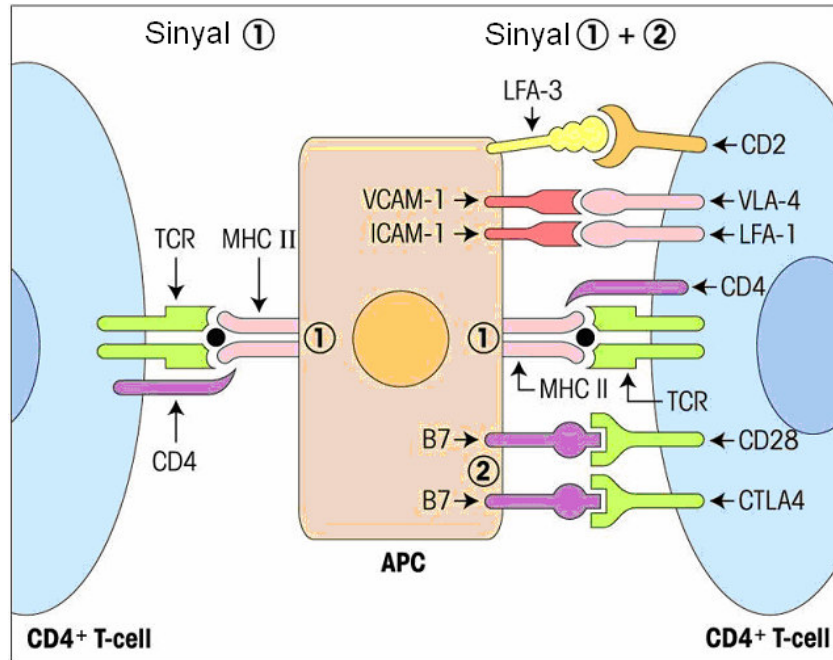
Günümüzde daha açık anlaşıldığı üzere, bu konudaki evrimsel çözüm, T-hücreleri intrasellüler antijenden kaynaklanan işlenmiş peptidi saptayabilecek hale getirme ve yüzey MHC molekülleri ile bir kompleks oluşturmasını sağlamaktadır. Daha sonra T-hücre reseptörü aynı anda hem MHC hücre belirteçlerini, hem de peptit infeksiyon belirtecini saptayabilir¹².

T-lenfositler ve antijen sunucu hücreler birkaç çift aksesuar molekül üzerinden etkileşime girerler. Normal bir TCR'nin, spesifik MHC-antijen peptit kompleksine olan afinitesi göreceli olarak düşüktür¹² (Şekil 19). Bu yüzden Antijen Sunucu Hücre (APC) ile yeterli derecede stabil bir bağlantı kurabilmeleri

ancak LFA-1/ICAM-1, CD2/LFA-3 ve diğerleri gibi komplementer aksesuar molekül çiftlerinin etkileşimi ile başarılabilir¹⁶ (Şekil 20).



Şekil 19: T-lenfositleri ve Antijen Sunucu Hücreler Arasındaki Etkileşimde Yer alan Moleküler Çiftlerin Göreceli Affiniteleri¹⁶.



Şekil 20: T-hücrelerin Aktivasyonu¹⁶.

T-hücrelerinin aktivasyonu iki sinyale gereksinim duyar. TCR'ye karşı yönlendirilen anti-idiotip veya anti CD3 antikolların hiçbiri istirahat halindeki T-hücrelerini kendi başlarına aktive edemezler. Ancak IL-1'in ilave edilmesinden sonra, RNA ve protein sentezi indüklenmiş, hücre blast benzeri bir görünüm alacak şekilde genişlemiş, IL-2 sentezi başlamış ve hücre mitoz siklusunda G0'dan G1 fazına geçmiştir. Bu nedenle istirahat halinde olan yardımcı T hücrelerin aktivasyonu için iki sinyale ihtiyaç duyulmaktadır (Şekil 20). APC'nin yüzeyindeki MHC sınıf II ile ilişkide bulunan antijen, bu gereksinimleri karşılayabilecek kabiliyete sahiptir. TCR, antijen ve MHC arasında oluşan kompleks formasyonu, reseptör-CD3 kompleksi üzerinden sinyal 1'i sağlar ve bu sinyal CD4'ün MHC ile eşleşmesiyle büyük miktarda kuvvetlendirilir. T-hücreleri artık APC tarafından üretilen bir kostimülasyon sinyal 2'ye maruz bırakılmaktadır. IL-1 de bu stimülasyonda yer alsa da, en potent kostimülasyonun APC üzerinde yer alan ve CD28'e bağlanan B7 olduğu ortaya çıkarılmıştır. Bu yüzden T-hücrelerinin aktivasyonu anti-B7 ile bloke edilebilir ve T-hücreleri anejik kılınabilir. Bunun sonucunda hiçbir antijen stimülasyonuna yanıt oluşturulamaz. ICAM-1, Vasküler Hücre Adezyon Molekülü-1 (VCAM-1; Vascular Cell Adhesion Molecule) ve LFA-3 gibi adezyon molekülleri kendi başlarına kostimülasyon değillerdir fakat diğer sinyallerin etkisini güçlendirirler¹⁶ (Şekil20).

2.3. MHC Moleküllerinin Tiplendirilmesi

MHC'nin bir hastalıkla ilişkisini ortaya koymanın iki yolu vardır.

- 1) Aile çalışmaları: HLA lokusu ile hastalığı kontrol eden genler arasında bir beraberlik olup olmadığını ortaya koymakta yararlı olur.
- 2) Popülasyon Çalışmaları: Bir hastalık ile HLA antijenleri arasındaki ilişki hasta ve kontrol gruplarında yapılan çalışmalar sonucunda belirlenir.

Otoimmün hastalıkların çoğunun HLA ile ilişkili olduğu düşünülmektedir, yani belli hastalıklar belli allelleri taşıyan bireylerde daha sık görülür. HLA-hastalık ilişkisinin en çarpıcı iki örneği: Romatoid Artrit (RA) ve İnsülin Bağımlı Diabetes Mellitus (IDDM)'tür. Hastalıkla ilişkili bulunan allellerin daha çok sınıf II genlerde bulunduğu, sınıf I ile kurulan ilişkilerin de "bağlantı dengesizliği" nedeni ile sınıf I ve sınıf II arasındaki birlikteliklerden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. HLA molekülleri sadece hastalığa yatkınlığı gösteren bir özellik olup; genellikle

hastalığın ortaya çıkmasına çok sayıda faktörün beraberce bulunması sebep olmaktadır. Bu faktörler, HLA molekülleri ile birlikte kalıtılan genlerle (ör TNF) ve farklı kromozomlarda yerleşen farklı genlerle ilişkili olabilir. Örneğin Ankilozan Spondilit ile HLA B27 ilişkisi çok iyi bilinmektedir ancak HLA B27 taşıyan kişilerin ancak %2'sinde bu hastalık ortaya çıkmaktadır. Antijenler yerine o grupta mevcut allellerin saptanması durumunda daha anlamlı sonuçlar alınabilir. Sunulacak peptitleri ve dolayısıyla oluşacak immün yanıtın özelliklerini HLA molekülleri kadar antijenlerin işlenmesi sırasında oluşan peptitlerin yapısı da belirlemektedir. Bu nedenle sınıf II MHC genleri arasında yer alan ancak yapısal olarak onlara benzerlik göstermeyen ve antijen işlenmesinde rol alan LMP ve TAP genlerindeki çeşitliliğin de hastalıklar ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir⁵.

Son yıllarda HLA tipinin belirlenmesi çok duyarlı yöntemlerle yapılabilmektedir. HLA tiplerini tanımlarken kullanılan terminoloji de kullanılan yöntemlerle ilişkilidir. Terimler arasında bir bağlantı kurmak güç olabilir. Örneğin DRB1*1501 olarak tanımlanmış bir genin DR2 nin bir alleli olduğunu tahmin etmek güç olabilir ya da DR4 olarak tanımlanmış bir antijenin hücresel yöntemlerle belirlenmiş Dw4, Dw10, Dw14 gibi alt tipleri bulunabilir. Ancak moleküler yöntemlerin giderek diğer yöntemlerin yerini alması nedeni ile güncel olarak kullanılan, allelleri tanımlayan terminolojidir. Bu amaçla kurulmuş olan bir komisyon (W.H.O Nomenclature Committee), sürekli olarak bilgileri güncelleyerek yayınlamaktadır, tablo 2'de kullanılan adlandırma sisteminin mantığı bir örnek üzerinde özetlenmiştir⁵.

Tablo 2: HLA Allellerini Tanımlarken Kullanılan Terminoloji⁵.

Terminoloji	Rakam sıra no.	İfade ettiği bilgi
HLA		HLA bölgesini ifade eder ve bir HLA genine ön ek olarak kullanılır
HLA-DRB1		Belli bir HLA lokusu Ör: DRB1
HLA-DRB1*13	1-2	Spesifik bir antijeni (Ör:DR13) kodlayan bir alle grubunu tanımlar
HLA-DRB1*1301	3-4	Spesifik bir HLA alelini tanımlar (DR13 ün 01 aleli)
HLA-DRB1*1301N	5/9	Eksprese edilmeyen (Null) bir aleli gösterir, L harfi ise zayıf ekspresyon işaretidir
HLA-DRB1*130102	5-6	Sessiz (Sinonim) mutasyonu olan bir aleli ifade eder
HLA-DRB1*130102	7-8	Kodlama bölgesi (exon) dışında mutasyonu olan bir aleli gösterir
HLA-DRB1*130102N	5/9	Kodlama bölgesi dışında mutasyonu olan Null bir aleli gösterir

2.3.1. Serolojik Olarak Sınıf I ve II Moleküllerin Gösterilmesi

Lenfosit mikrositotoksite testi olarak tanımlanan bu yöntem, 1960'lardan beri kullanılmaktadır. Yerini moleküler yöntemlere bıraksa da halen uygun verici adaylarının taranması amacı ile yaygın olarak kullanılmaktadır.

Deney iki basamaklıdır. İlk basamakta saflaştırılmış olan hücreler bir plaktaki küçük kuyucuklarda çeşitli antikolarla karşılaştırılır. Antikorum özgün olduğu antijeni taşıyan hücreler, ortamdaki antikoru bağlar. Deneyin ikinci kısmında ortama kompleman eklenerek antikor bağlamış olan hücrelerin ölmeleri sağlanır. Daha sonra eklenen bir boya aracılığıyla hücrelerin canlı mı ölü mü oldukları değerlendirilir. Kullanılan antikolar, benzer epitoplara taşıyan antijenler ile de reaksiyona girdiklerinden seyrek olmayarak çapraz reaksiyonlar görülür. MHC molekülleri bu özelliklerine göre Cross Reaktif Gruplar (CREG) olarak sınıflandırılabilir. Bir antijeni serolojik olarak tanımladığımız zaman genellikle iki basamaklı ve o molekülün bulunma sırası ile ilişkili olan rakamlar kullanılır. HLA antijenleri için üst grup (public) ve alt tip (split) şeklinde gruplamalar söz konusu olabilir. Örneğin B12 antijeni bir üst grup antijeni iken B44 ve B45 antijenleri B12 nin alt tipleridir, HLA ve lokusun adını takiben önce alt tipin adı bunu takiben de parantez içinde ait olduğu üst grup yazılır⁵.

Aynı teknik kullanılarak anti HLA antikoların taranması, "cross-match" çalışmalarının yapılması mümkündür. Hasta serumunun farklı kuyucuklara yerleşmiş farklı HLA antijeni taşıyan hücrelerle karşılaştırılmasını takiben canlı/ölü hücre ayırımı ile serumda hangi antijen ya da antijen gruplarına karşı antikor gelişmiş olduğu belirlenebilir. Bu çalışmanın bir benzeri hasta serumu ile verici kökenli hedef hücrelerin karşılaştırılması ile uygulanırsa "crossmatch" olarak değerlendirilir. Çeşitli modifikasyonları bulunan bu yöntem ile alınan sonuçların hiperakut rejeksiyonun öngörülmesinde yol gösterici olduğu bilinmektedir⁵.

2.3.2. Sınıf I- II Moleküllerin Hücresel Yöntemlerle Tayini

DNA temeline dayanan yüksek çözünürlükte HLA tiplendiriminin gelişmesi ile hücresel yöntemlere duyulan ihtiyaç giderek azalmıştır. Hücre kültüründeki lenfositlerin aynı ortamda bulunan ikinci bir seri hücrenin yüzey antijenlerine karşı çoğalarak oluşturduğu yanıt, Karışık Lenfosit Reaksiyonu

(MLR; Miksed Lymphocyte Reaction) olarak tanımlanır. MLR, invitro koşullarda sınıf II antijenlerin uyum ya da uyumsuzluğunun bir ölçütü olarak kullanılır⁵.

2.3.3. HLA Çeşitliliğinin DNA Temeline Dayanan Yöntemlerle Gösterilmesi

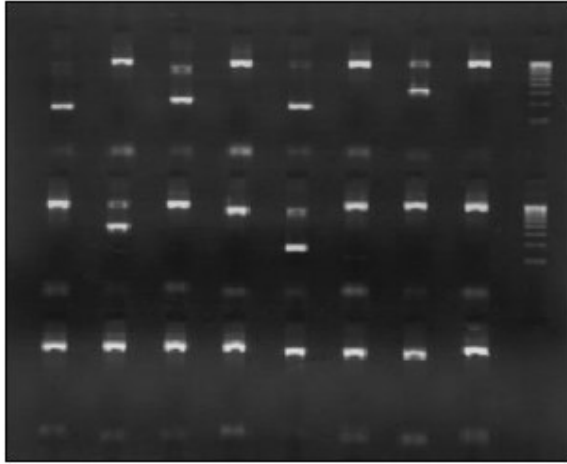
Teknolojide ve kullanılan moleküler tanı yöntemlerindeki gelişmeler, organ ve doku nakillerinde önemi olan sınıf I ve sınıf II allellerin belirlenmesini kolaylaştırmıştır. Moleküler yöntemlerin avantajları: özgün, esnek olmaları, yeni alleller tanımlandıkça yeni reaktiflerin geliştirilebilmesi, istenen duyarlılıkta çalışma yapabilecek seçeneklerin mevcut olması, çalışmalarda canlı hücre gerektirmemesi, bireyin hastalık ya da tedavi durumundan etkilenmemesi, serolojik ve hücresele yöntemlere göre otomasyona daha uygun olması, eş zamanlı olarak çok sayıda örneğin çalışılabilmesi, HLA genlerindeki tüm çeşitliliklerin gösterilebilmesi, serolojik olarak tanımlanamayan allellerin tanınabilmesi olarak özetlenebilir^{5,8}.

Çalışmalar için herhangi bir çekirdekli hücreden elde edilecek DNA örneği kullanılabilir. Genellikle tercih edilen kandaki lökositlerin kullanılmasıdır. HLA allellerini daha duyarlı olarak tespit edebilmek için DNA'nın, Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile çoğaltılarak; gösterilebilir, analiz edilebilir hale getirilmesi gerekir. Analiz edilmesi hedeflenen bölgeyi içine alacak bir DNA segmentinin çoğaltılabilmesi için bir çift sentetik oligonükleotid (primer) kullanılmalıdır. Bazı yöntemlerde (Ör: SSO) tüm lokusu içine alacak şekilde primerler seçilirken; bazı yöntemlerde (Ör:SSP) sadece bir allel ya da allel grubuna özgün DNA segmentlerinin çoğaltılabileceği primerler kullanılır. Bu çoğaltma işleminde ortam koşullarının reaksiyonun özgünlüğünü sağlayacak şekilde planlanmış olması gerekir⁵.

2.3.3.1. Sekansa Özgün Primerler Kullanılması ("Sequence Specific Priming", SSP)

Deneyde kullanılan primerler, hangi allel için hazırlanmışlar ise DNA'nın o alleli taşıyan kısmına bağlanarak (annealing) PCR reaksiyonun başlamasını sağlarlar. O deney tübünde primerin özgün olduğu DNA segmenti varsa çoğaltma (amplifikasyon) gerçekleşir. Amplifikasyondan sonra oluşan ampikonların gösterilmesi için genellikle jel veya benzeri bir ortamda elektroforez işlemi gerektirir. Her reaksiyon tübüne kontrol amacıyla çeşitlilik

göstermeyen bir hücresel proteini kodlayan gene özgün primer seti eklenir. Böylece pozitif reaksiyon olan tüplerde iki adet ürün görünür hale gelirken, negatif olarak değerlendirilen reaksiyonlarda sadece kontrol için kullanılan genin çoğaldığı görülür (şekil 21). Bir kişi için çok sayıda tüp/primer kullanılması gerektiğinden aynı anda ancak kısıtlı sayıda örnekle çalışılabilir. Kesin sonuçlara ulaşmak için çok iyi organize edilmiş primerler kullanılmalıdır; ancak bunun yeterli olmayıp “Nested PCR”, “multiplex PCR” gibi duyarlılığı arttırıcı yöntemlerin eklenmesi, dizi analizi gibi yöntemlere geçilmesi gerekebilir^{5,8}.



Şekil 6. SSP tekniği ile yapılmış bir çalışmanın görüntüsü

Şekil 21: SSP Tekniği İle Yapılmış Bir Çalışmanın Görüntüsü⁵.

2.3.3.2. Sekansa Özgü Oligonükleotidler Kullanarak Hibridizasyon Yapılması (“Sequence Specific Oligonucleotide Hybridisation”,SSOP)

Genellikle Bir HLA lokusunun PCR ile çoğaltılmasını takiben allellere özgün olan oligonükleotidler kullanılarak bu çoğalmış DNA segmenti ile özgün oligonükleotidlerin katı bir ortam üzerinde (ör: naylon bir membran, kuyucuklar ya da boncuklar) bağlanması (hibridleşmesi) sağlanır. Kullanılan oligonükleotidler işaretli olup; ortama eklenen reaktifler ile renkli bir ürün oluşması sağlanır. Katı ortama bağlı olanın DNA değil de oligonükleotidler olması durumunda olay “Reverse” olarak tanımlanır. Bu işlemde DNA nın çoğaltılması sırasında işaretlenmiş primerler kullanıldığından çoğalmış olan DNA da işaretlenmiş olur. Oligonükleotid prob lar DNA daki allele özgü ise

membran üzerinde bu problemler ve çoğalmış DNA arasında hibridleşme olur. Hangi oligonükleotid prob ile bağlanma olduğu, bireyin hangi HLA allelini taşıdığı, çeşitli reaktifler aracılığı ile görünür hale getirilebilir. Son yıllarda geliştirilmiş olan bir teknikte aynı reaksiyon tübünde bulunan 100 farklı renkte floresan veren boncuğun her birine farklı problemler bağlanarak floresan ölçümüne dayalı tiplendirme yapılabilmektedir. Bu tekniklerin üçü de aynı anda çok sayıda örnek çalışılmasına uygundur. Elde edilen sonuçların karmaşıklığını çözmek ve daha duyarlı sonuçlar verebilmek için lokusa özgün olanlar yanı sıra gruba özgün reaksiyonların da kurulması gerekebilir^{5,8}.

2.3.3.3. Sekans Spesifik Konformasyonel Polimorfizm veya Heterodupleks Analiz

Bu yöntem, çoğaltılmış olan DNA'nın denatüre edilerek (SSCP) ya da renatüre olmuş DNA dupleksi olarak (heterodupleks analiz) elektroforezi sırasında hareket farklarının tespit edilmesi prensibine dayanmaktadır. Çoğaltılmış olan DNA'nın hareketi, bilinen allellerin hareketi ile karşılaştırılarak test edilenin hangi allel olduğu bulunur. Bu yöntem, az sayıda örnek için; özellikle de aile içi bireylerin karşılaştırmalı olarak çalışılması sırasında kullanışlı olmaktadır. Bir allelin adı koyulmasa bile olası verici ile alıcının aynı alleli mi taşıdıkları görülebilmektedir⁵.

2.3.3.4. Nükleik Asitlerin Dizi Analizi (“Sequence Based Typing”, SBT)

Bireyin taşıdığı alleller, nükleotid dizileri analiz edilerek bulunur. PCR-SSP ve SSOP yöntemlerinden farklı olarak burada sadece bilinen bir alleli aramak söz konusu değildir. Bu amaçla dizi analizi öncesinde lokusa ya da allel sekansına özgü primerlerin kullanıldığı bir/birkaç PCR işlemi yapılabilir. Hedef, hemen her zaman olduğu gibi çeşitliliğin kaynağı olan bölgelerdir. Yöntemin duyarlılığı PCR reaksiyonundan çok, daha sonra yapılan dizi analizinden kaynaklanmaktadır. Bu amaçla işaretlenmiş nükleotidler kullanılarak yapılan sentez işlemini takiben elektroforez teknikleri uygulanabildiği gibi sentez sırasında dizi analizi yapılan sistemler de (pyrosequencing) kullanılmaktadır. Başlangıç materyali (mRNA, DNA), çoğaltma yöntemleri, çoğaltılan bölgeler, dizi analizi için kullanılan kimyasal tekniklerde değişiklikler yapılarak pek çok dizi analiz yöntemi geliştirilmiştir. Dizi analizi, zahmetli ve karmaşık bir işlem

olmasına rağmen özellikle hematopoetik kök hücre nakli planlanan hastalara allel bazında denk olan vericilerin tespit edilebilmesi, diğer yöntemlerle elde edilen karmaşık sonuçların çözülmesi için giderek daha yaygın olarak kullanılmaktadır. En azından HLA DRB1 bölgesi için allel düzeyinde tiplendirme yapmanın önemi vurgulanmaktadır^{5,8}.

DNA kullanılarak yapılan HLA tiplendirme işlemlerinin duyarlılığı farklı düzeylerde olabilir. Düşük çözünürlükte bir çalışmada alleller serolojik tiplendirmeye denk ancak daha doğru ve güvenilir olarak tespit edilmektedir. Bu durumda lokusun adını takiben koyulan asteriklerden sonraki iki basamakta o allelin serolojik karşılığı olan numara yer alırken bunu takip eden 2 basamakta bilinmiyor anlamına gelecek şekilde "xx" yazılır, Ör: HLADRB1*11xx. Orta duyarlıktaki bir çalışmada ise allelin adı, en çok 4–5 olasılıkla bilinmektedir. Yüksek çözünürlükte bir çalışmada ise allelin en azından 4 basamağının doğru olarak tanımlanmış olması gerekir⁵, ör:DRB1*1101.

2.4. MHC Moleküllerinin Hastalıklarla Olan İlişkisi

Bir hastalığa olan yatkınlığın; spesifik bir HLA geninin kalıtımıyla bağlantılı olabileceği ilk kez 30 yıl önce gösterilmiştir. O günden beri 500'den fazla farklı hastalıkla HLA ilişkisini gösteren çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Hastalıklı bireylerde ve genel popülasyonda eksprese edilen HLA allellerinin tiplendirilmesi ile; HLA allelleri ve hastalıklar arasındaki ilişki saptanmaya çalışılmıştır. Bu sayede genlerin hastalıklara nasıl sebep oldukları veya hastalığa olan yatkınlığı nasıl modifiye ettikleri anlaşılmaya çalışılmıştır. Tüm bu çalışmaların en büyük sebeplerinden birisi; hastalık spesifik riskin ve koruyucu belirteçlerin tanımlanması ve bunların immünolojik profillemeye, risk değerlendirilmesinde ve terapötik kararın verilmesinde kullanılmasıdır¹⁷.

Bazı hastalıkların belirli HLA tipleriyle yüksek derecede birliktelik göstermesi tanıda yardımcı olabilir. Narkolepsi hastalarının hemen hemen %100'ü HLA-DQB1*0602'ye sahip olduğu için bu hastalıktan şüphelenildiğinde tanı HLA tiplendirilmesiyle doğrulanabilir⁷.

Ancak; risk allellere sahip bireylerin hepsi hastalığı oluşturmazken; aynı zamanda tüm hasta bireyler de risk allellere sahip olmazlar. Pek çok vakada; HLA bağlantılı hastalıkların açık bir immün patoloji gösterdiği saptanmıştır. HLA-ilişkili hastalıklar tüm majör organ sistemlerinde gözlenebilir ve büyük bir

çoğunluğu otoimmün hastalıklar olarak sınıflandırılır. Belirli spesifik sınıf I veya sınıf II HLA genleri ile güçlü ilişki gösteren hastalıklar: Tip 1 diabet, romatoid artrit (R.A.), ankilozan spondilit, çölyak hastalığı gibi hastalıklardır. Tüberküloz, lepra ve AIDS gibi infeksiyonlara olan artmış veya azalmış yatkınlık da HLA ile ilişki gösterir. Bazı gruplar; HLA- bağlantılı diğer genlerin de (LMP, TAP, DM, TNF) hastalıklarla ilişkili olduğunu öne sürmüştür. Yeni çalışmalarda; hastalıkla ilişkili olabilecek daha farklı HLA-bağlantılı genlerin olabileceği öne sürülmüştür. Bu genler muhtemelen aynı zamanda klasik HLA genleri ile olan bağlantı dengesizliği etkisi altında kalabilir¹⁷.

2.4.1. Bağlantı Dengesizliği ve Hastalıklara Yatkınlık

Spesifik HLA tiplerinin belirli hastalıklarla olan ilişkisi hakkında etkileyici bilgiler toplanmıştır¹⁸ (Tablo 3). Buna ek olarak HLA-D bölgesinin kompleks yapısı çözüldüğünde daha çarpıcı ilişkiler ortaya çıkarılabilecektir. Bu ilişkiler bağlantı dengesizliği tarafından etkilenmektedir. Bir kromozom üzerinde yakın bir ilişkiye sahip genler; genetik randomizasyonla kalıtılmak yerine birlikte kalıtılmayı yeğlerler. Bunun sonucunda da beraber kalıtılan allel çiftlerinin görülme frekansı, normalde bu çiftlerin beraber görülme olasılığından daha yüksek çıkar¹⁸ (tablo 4). Bu durum; ya belirli bir haplotipin tercih edildiği bir doğal seleksiyon sonucunda gerçekleşmiş olabilir. Ya da bu yakın ilişkili lokalize olan allellerin ilk ortaya çıkışından sonra randomize dağılımlarına izin verecek kadar zaman geçmemiş olabilir¹⁸.

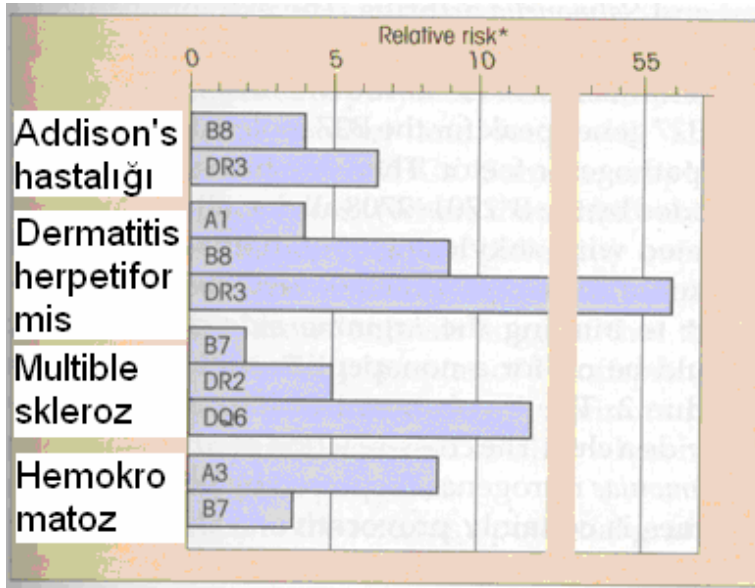
Tablo 3: HLA ve Hastalık İlişkisi¹⁸.

Hastalık	HLA Alleli	Relatif Risk
a Sınıf II ilişkili		
Hashimoto's hastalığı	DR11	3.2
Primer miksödem	DR17(*3)	5.7
Tirotoksikoz (Graves)	DR17(*3)	3.7
İnsülin bağımlı diyabet	DQ8	14
	DQ2/8	20
	DQ6	0.2
Addison's hastalığı (adrenal)	DR17(*3)	6.3
Goodpastures sendromu	*DR2	13.1
Romatoid artrit	DR4	5.8
Juvenil romatoid artrit	DR8	8.1
Sjögren's sendromu	DR17(*3)	9.7
Kronik aktif hepatit (otoimmün)	DR17(*3)	13.9
Multiple skleroz	*DR2,*DQ6	12
Narkolepsi	DQ6	38
Dermatitis herpetiformis	DR17(*3)	56.4
Çöliak hastalığı	DQ2	250
Tüberküloid lepra	*DR2	8.1
b Sınıf I, HLA-B27 ilişkili		
Ankilozan spondilit	B27	87.4
Reiter's hastalığı	B27	37.0
Post-salmonella artrit	B27	29.7
Post-shigella artrit	B27	20.7
Post-yersinea artrit	B27	17.6
Post-gonokokal artrit	B27	14.0
Üveit	B27	14.6
Romatoid artritteki amiloidoz	B27	8.2
c Diğer sınıf I ilişkiler		
Subakut tiroitit	B35	13.7
Psoriasis vulgaris	Cw6	13.3
İdiopatik hemokromatoz	A3	8.2
Myastenia gravis	B8	4.4

Tablo 4: Bağlantı Dengesizliği Saptanan Genlerin Beklenen ve Gözlenen Gen Frekansı¹⁸.

Gen frekansı %			
HLA Genleri	Tek gen	Genlerin olma şansı	beraber
		Beklenen	Gözlenen
A1	16	1,6	8,8
B8	10		
A3	13	1,3	2,8
B7	10		

Bir hastalıkla bir HLA tipi arasındaki belirgin bir ilişki, hastalığa yatkınlığı oluşturan geni bulduğumuz anlamına gelmez. Çünkü ilkiyle bağlantı dengesizliği içinde bulunan ve hastalıkla daha iyi korelasyon gösteren başka bir HLA geni bulabiliriz. Örnek olarak multiple sklerozda, ilk olarak B7 alleli ile bir ilişki saptanmıştır. Fakat hastalar D lokusu için tiplendirildiğinde DR2 ile hastalık arasında daha kuvvetli bir korelasyon saptanmıştır (Şekil 22). Başlangıçta B7 ile görülen korelasyon, B7 ve DR2 arasındaki bağlantı dengesizliğinden kaynaklanmaktadır. Hala DR2'nin kendi başına hastalığa yatkınlığı oluşturan gen olduğu hakkında emin olamayız ve başka bir yakın ilişkili gen ile daha büyük bir hastalığa yatkınlık ilişkisi olasılığını dışlayamayız. Nitekim yeni çalışmalar DQB1*0602 ile daha sıkı bir ilişki saptamışlardır¹⁸.



Şekil 22: Bağlantı Dengesizliği ve HLA ile Hastalık İlişkisi¹⁸.

2.4.2. İmmunolojik Hastalıklarla Olan İlişki

İdiyopatik hemokromatoz ve konjenital adrenal hiperplazi gibi nadir örnekler dışında, HLA-bağlantılı hastalıklar immünolojik işlemlerle ancak dolaylı olarak bağlantı kurarlar. Genel olarak HLA-D ve özellikle DR3 veya bağlantılı genlerle organ-spesifik otoimmün hastalıklar arasında ilişki bulunmaktadır. HLA'ların, hücrelerin viral bağlanmaya veya enfeksiyona olan yatkınlıklarını etkileyebildiği ve buna bağlı olarak ilişkili yüzey komponentlerine karşı

otoimmünite gelişimini etkileyebildiği düşünülmektedir. Örnek olarak HLA-D alleli yabancı antijenlerin bağlanması ve self epitoplarla çapraz reaksiyona girmesini sağlayabilir. Veya işlenmiş MHC molekülleri hücre yüzeyinde aşırı miktarda bulunduğu kendi başına self epitopa katkıda bulunabilir. İnsülin bağımlı D.M. DQ8 (DQA1*0301, DQB1*0302) ve DQ2 (DQA1*0501, DQB1*0201) ile ilişkilidir. Fakat en kuvvetli ilişki DQ2/8 heterozigotlarda ve özellikle DQ (α 1*0301, β 1*0201) de gözlenir. Hastalığa en yatkın genleri tanımlamak için 2 gene ihtiyaç olması ve bu bulguların çalışılan tüm toplumlarda aynı olması, DQ moleküllerinin kendi başlarına ve diğer moleküller ile bağlantı dengesizliğine girmeden hastalığa yatkınlıkta yer aldığını göstermektedir. DQ6'nın bazı alt tiplerine sahip olmak koruyucu bir etki oluşturmaktadır^{7,9,18}.

DR4 ve daha az miktarda olsa da DR1, beyazlarda R.A. için risk faktörü olarak görülmektedir. DR4 alt gruplarının yapılan analizinde, 67 ile 74. rezidü arasında uzanan ve hastalığa yatkınlık elementi olarak kabul edilen bir lineer T hücre sekansı tanımlanmıştır. HLA-DR türleri arasındaki gözlenen varyasyonlar da bu sekansı paylaşma durumlarına göre değişmektedir. Amino asitlerin yüzeyi yüksek derecede polimorfiktir ve peptit bağlama yarığı üzerindeki 4. ve 7. cebi oluştururlar. R.A. ile ilişkili olan DR alt tiplerine bağlı olan peptit setleri arasında çarpıcı farklılıklar bulunmaktadır. Hastalardaki DR moleküllerine bağlı olan peptitlerin analizi patogeneze hakkında önemli ipuçları verebilir. Diabette olduğu gibi, R.A. hastalarında DR2 alleli düşük miktarda sunulmakta ve DR2-pozitif hastalar daha az ciddi hastalığa sahip olmaktadır. Bu da DR2-bağımlı genin bazı yollarla koruyucu olabileceğini düşündürmektedir.

HLA ile ankilozan spondilit arasındaki ilişki çok çarpıcıdır. Hastaların %95'i B27 fenotipine sahip iken, kontrol grubunda bu oran %5'tir. Sakroiliits, Reiter's hastalığı, akut anterior üveit, psoriasis ve diğer infektif sakroiliit formu olan yersinea, gonococcal ve salmonella artritlerinin eşlik ettiği durumlarda B27 insidansı belirgin olarak artmaktadır. B*2701-2708 allelleri tarafından kodlanan 9 B27 alt tipi bulunmaktadır ve hepsi de ankilozan spondilit ile ilişki göstermektedir. Yarıklarında bir "B" cebi içerirler ve bu cep arjinin yan zincirine bağlanmak için özgünlük gösterir. İnfektif ajanların ortamda bulunması bir ipucu sunabilmektedir. Ebringer ve arkadaşları, B27'nin Klebsiella pneumoniae nitrogenazı ile olan çapraz-reaksiyonunun provokatif olabileceğini rapor

etmişlerdir. Bir görüşe göre, bir bakteriyal peptit, B-27 kaynaklı sekans ile çapraz-reaksiyona girebilir ve otoreaktif T-hücre yanıtını uyarabilir^{7,9,18}.

2.5. Meme Kanseri

Meme kanseri dünyada kadınlar arasında en sık görülen malign tümör olup, kadınlarda görülen tüm kanserlerin yaklaşık %30'unu oluşturmaktadır. Avrupa'da yılda 180000, Amerika Birleşik Devletlerinde (A.B.D) de yılda 184000 yeni olgu saptanmaktadır^{1,2}.

Meme kanseri otuz yaşından önce nadir olup, bu yaşı takip eden yıllarda hızlı bir tırmanış gösterir. Bu artış menopoz sonrasında da yavaş eğimle yükselmeye devam eder. Bu nedenle 85 yaşındaki her 9 kadından birinde meme kanseri gelişebileceği beklenmektedir. Ayrıca kadınlarda kansere bağlı ölümlerin %18'i meme kanseri nedeniyle oluşmakta ve meme kanserine bağlı ölümler; akciğer ve kolorektal kanserlerden sonra üçüncü sırayı almaktadır. Türkiye'de kadınlar arasında en sık görülen 10 kanser tipi içerisinde meme kanseri birinci sırada yer almaktadır³.

Ülkemizde kadınlarda meme kanseri görülme sıklığı T.C. Sağlık Bakanlığı 1997 Sağlık istatistiklerine göre 1995'te %23.5 olarak ilk sırada yer almaktadır³.

2.5.1. Meme Kanserinde Risk Faktörleri

İnsanlarda meme kanserinin nedeni kesin olarak bilinmemektedir. Meme kanseri genetik ve çevresel faktörler arasında güçlü etkileşimin olduğu karmaşık ve multifaktöriyel bir hastalıktır. Son araştırmalar kadında meme kanserini tetikleyen faktörlerin ne olduğunu bulmaya yönelmiştir. Genetik, hormonal, sosyobiyolojik ve psikolojik etkenlerin oluşumda rol aldığı kabul edilmekle beraber, meme kanserli kadınların %70-80'i bu risk faktörlerine sahip değildir. Çok değişik ajanların kromozomal mutasyonlara neden olarak kanserin ortaya çıkışı ve gelişimi ile yakından ilişkili olduğu düşünülmektedir. Yeni çalışmalar en önemli belirleyici faktörün genetik imza olduğu yönünde veriler içermektedir²¹.

Cinsiyet: Kadın olmak; meme kanseri gelişimindeki ana risk faktörüdür. Bu durumun ana sebebi kadınların meme hücrelerinin östrojen ve progesteron gibi dişi hormonlarının gelişimi provoke edici etkilerine sürekli maruz kalmalarıdır. Tüm meme kanserlerinin %99'u kadınlarda, %1'i erkeklerde görülür^{2,19,20,22}.

Yaş: Yaş ilerledikçe risk artar. Prepubertal dönemde meme kanseri hemen hiç görülmemekte, yirmi yaş altında ise çok nadirdir. 20 yaşından itibaren insidans giderek artar ve 45-55 yaşlarında belirli bir düzeye ulaşır, bu dönemde 100000 kadında 125 yeni vaka görülür. 55 yaşından sonra artış daha keskindir ve 60-65 yaşlarında 100000 kadında yılda 153 yeni vaka görülür. 80-85 yaşlarında bu sayı 312'ye çıkar²⁰. Kanser oluşma olasılığının yaşla birlikte artmasına rağmen; kanser gençlerde daha agresif olmaktadır²².

Daha önce malign ya da benign meme kanseri öyküsünün olması: Bir memede kanser varlığı ortalama popülasyona göre diğer memede kanser riskini 2-6 kez artırır²².

Anormal meme biyopsisi: Bazı benign meme patolojileri kanser ile yakın ilişki gösterebilir. Risk üzerine olan etkilerine göre benign meme patolojileri 3 genel gruba bölünür^{2,20,22}:

1) Non-proliferatif lezyonlar: Non-proliferatif lezyonlar meme kanseri riskini ya hiç etkilemezler; ya da çok az etki gösterirler. Bunlar; fibrozis, kist, hafif hiperplazi, adenozis (non-sklerozan), basit fibroadenom, phyllodes tümör (benign), tek bir papillom, yağ nekrozu, mastit, kanal ektazisi, benign tümörler (lipoma, hamartoma, hemanjioma, nörofibroma) ve apokrin değişimdir.

2) Atipi gözlenmeyen proliferatif lezyonlar: Atipi göstermeyen proliferatif lezyonlar (meme dokusunun kanal ve lobüllerinde aşırı miktarda hücre gelişimi gözlenir); meme kanseri riskini hafifçe (1,5-2 kat) arttırırlar. Bunlar; duktal hiperplazi (atipisiz), kompleks fibroadenoma, sklerozan adenozis, birkaç papilloma veya papillomatosis ve radial skardır.

3) Atipi gözlenen proliferatif lezyonlar: Atipi ile birlikte bulunan proliferatif lezyonlar (meme dokusunun kanal ve lobüllerinde aşırı miktarda anormal özellikte hücre gelişimi gözlenir); meme kanseri riski üzerinde güçlü etkiye sahiptir ve riski 4-5 kat arttırır. Bunlar; atipik duktal hiperplazi ve atipik lobüler hiperplazidir.

Aile öyküsü: Yakın akrabaları meme kanseri olan kadınlarda meme kanseri oluşum riski artar. Meme kanseri riski şu durumlarda artar:

- Meme veya over kanseri olan 2 veya daha fazla akraba varsa.
- Meme kanseri akrabalarda (anne, kız kardeş, büyük anne, teyze) 50 yaş öncesinde oluştuysa. Eğer anne veya kız kardeş meme kanseri öyküsüne sahip ise risk daha yükselir.

- Hem meme hem over kanseri olan yakınlar var ise.
- Meme kanserli erkek akraba varsa.
- Aile öyküsünde Li-Fraumeni veya Cowden sendromu gibi ailesel meme kanseriyle ilişkili hastalıklar varsa.

Birinci derece yakınlarda (anne, kız kardeş) 1 kişide meme kanseri olması, meme kanseri gelişme riskini 2 kat arttırır. 2 kişide meme kanseri olması, meme kanseri oluşma riskini 5 kat arttırır^{20,22}.

Genetik risk faktörleri: Mevcut araştırmalar karsinogeneziste olayları hangi genetik değişikliklerin hızlandırdığını bulmaya yönelmiştir. İnvaziv duktal karsinoma dönüşümü üzerinde durulan modele göre; hiperplaziden in situ karsinomaya geçiş ve sonuçta da invaziv karsinoma gelişimi söz konusudur. Meme kanserinin genetik temeli üzerindeki çalışmalar tümör gelişiminde birden fazla role sahip özellikli genlere yönelmiştir. Bu genler arasında onkogenler (ras, c-myc genleri), tümör süpresör genleri (p53, BRCA1, BRCA2, nm23), büyüme faktörü reseptör genleri (HER2), hücre döngüsünün düzenlenmesinde rol alan genler (telomeraz) ve apoptoziste rol alan genler (bcl gen ailesi) sayılabilir²¹. Günümüze kadar yapılan çalışmalar meme kanserinin %5-%10'nun mutasyonlar sonucunda herediter olduğunu göstermiştir. En sık rastlanan mutasyon BRCA1 ve BRCA2 genlerindeki mutasyonlardır. Normalde bu genler; hücrelerin anormal gelişimini önleyerek kanser gelişimine engel olurlar. BRCA1 ve BRCA2 mutasyonu bulunan kadınlarda yaşamlarının bir bölümünde kanser gelişme riski %80'e kadar çıkabilmektedir.

Kalıtsal meme kanserine yol açan başka genler de saptanmıştır. Bunlardan biri ATM genidir. ATM; ataxia-telanjiyektazi mutasyonu ile ilişkilidir. Normalde gen; hasarlı DNA'nın onarımından sorumludur. Diğer bir gen olan CHEK-2 geni de; mutasyona uğradığında meme kanseri riskini 2 kat arttırır. p53 tümör süpresör genindeki kalıtsal mutasyonlar da meme kanseri gelişim riskini arttırır^{2,20,22}.

İrk: Beyaz kadınlarda meme kanseri gelişme riski daha yüksek olmasına rağmen Afrika kökenli Amerikalı kadınların bu hastalıktan ölme riski daha yüksektir²².

Menstrüal öykü: Menarş ve menopoz arasındaki intervalin uzaması meme kanseri riskini yükseltir. 12 yaşından önce menstürasyon görenlerde ve 55 yaşından sonra menopoza girenlerde meme kanseri görülme riski

artmaktadır. Olgu kontrollü çalışmalarda menarjin geciktirildiği her yıl meme kanseri riski yılda %20 azalmaktadır^{20,21,22}.

45 ile 54 yaş arası yaşlarda doğal menopoza giren kadınlara karşın 45 yaşından önce menopoza giren kadınlarda RR 0.73'dür. 50 yaşından önce ooferektomi meme kanseri riskini azaltır ve ooferektomi yaşı azaldıkça bu risk daha da azalır. Sonuç olarak total menstural hayat süresi meme kanseri oluşumunda önemli bir faktördür²¹.

Doğum öyküsü: Doğum yapmamamış kadınlar meme kanseri açısından yüksek riskli gruba girerler. İlk doğumunu 30 yaş üzerinde yapanlarda risk artar. Birden fazla gebelik ve erken yaşta gebelik meme kanseri riskini azaltır^{20,22}.

Emzirme: Meme kanseri riskini azaltmada emzirmenin etkisini inceleyen çalışmalarda bulgular tartışmalıdır. Bazı çalışmalar emzirmenin (özellikle 1,5-2 yıl devam ettirilirse) meme kanseri riskini hafifçe azaltabileceğini öne sürmüştür. Laktasyonun meme kanseri riskini düşürmesini, kadındaki menstrüel siklus sayısını kümülatif olarak azaltmasına bağlamak mümkündür^{21,22}.

Östrojen alımı: Erken veya uzun süreli oral kontraseptif kullanımı, ve uzun süreli (10-15 yıl üzeri) östrojen replasman terapisinin riski artırdığı saptanmıştır. Östrojen ve progesteronu kombine kullanılan preparatların meme kanseri riskini çok hafif arttırabileceği ancak bu etkinin kısa süreli bir etki olduğu düşünülmektedir. 1996'da yapılan en kapsamlı meta-analizde 54 çalışmadan elde edilen veriler; ilacı kullanmaya devam edenlerde 1.24 oranında bir rölatif risk saptanmıştır. Ancak ilacın kullanımı kesildikten 10 yıl sonra hiçbir fark gözlenmemiştir^{22,23}.

Gözlemsel ve rastgele klinik araştırmalar sonucunda elde edilen veriler; postmenopozal hormon replasman tedavisi (HRT) ile meme kanseri arasında ilişkiyi göz önüne sermiştir. 1997'de 51 gözlemsel çalışmayla gerçekleştirilen en büyük meta-analiz; menopozdan sonra 5 veya daha fazla yıl HRT kullanan kadınlarda 1,35 oranında bir rölatif risk ortaya çıkarmıştır. Kombine HRT sadece meme kanseri riskini arttırmakla kalmaz; aynı zamanda daha ileri evrede bir kanser oluşum riskini de arttırır. 2002'de sonuçlanan ve 16000 postmenopozal kadının katıldığı bir çalışmada HRT ilişkili meme kanserlerinin, plasebo grubuna göre daha değişik prognostik özellikler gösterdiği (daha ileri evre ve daha büyük tümör) saptanmıştır. İngilterde'de yapılan geniş çaplı bir çalışmada kombine

HRT alanların, almayanlara göre meme kanserinden dolayı olan ölümlere daha yatkın olduğu saptanmıştır. Ancak menopozal semptomların tedavisi için kısa dönemli hormon kullanımının çok küçük bir risk oluşturduğu veya hiç risk oluşturmadığı öne sürülmüştür^{2,22,23}.

Alkol: Yapılan çalışmalarda günde 12 gr ve altında alkol alımının meme kanseri gelişimi ile herhangi bir ilişkisi bulunamamışken, 15 gr ve üzeri alkol alımlarında risk içmeyenlere göre %50 daha fazla olmaktadır. Etiyolojisi kesin açıklanamamakla birlikte, araştırmacılar alkol alımının kanserojenik olabilecek sitotoksik ürünlerin ortaya çıkmasına neden olduğuna inanmaktadır. Diğer olası bir nedenin ise alkolün meme dokusundaki hücre geçirgenliğinde değişikliğe yol açması olduğuna inanılmaktadır. Ayrıca alkol alımı ile östrojen düzeylerindeki yükselme arasındaki ilişki de kanser mekanizmasına katkıda bulunabilir. İngilterede yapılan araştırmalarda; alkol alımı kısıtlandığında meme kanseri vakalarının yaklaşık %6'sının önlenebileceği öne sürülmüştür^{2,20,21,24}.

Yağlı diyet: Özellikle aşırı yağlı diyetin meme kanserini artırdığı düşünülmektedir. Yüksek yağlı diyet obesiteye yol açmakta ve salınan insülin düzeyini arttırmaktadır. Bazı araştırmacılar da bunun tümörün büyümesini stimüle ettiğine inanmaktadır. Yağ ve kolesterol alımı ile steroid hormon metabolizması arasındaki muhtemel ilişki diyetteki yağın etiyolojik ajan olabileceğini düşündürmüştür. Kişi başı yağ alımı ile meme kanseri ölüm hızı arasında korelasyon mevcuttur. Ayrıca %10-20 oranında yağlı diyet ile beslenen ratlarda %5'den daha az yağlı diyet ile beslenenlere göre meme kanseri daha fazla görülmüştür^{2,20}.

Obesite: Meme kanseri riskini artırdığı bildirilmesine rağmen hala tartışılmaktadır. Östrojen adipoz dokuda birikmekte, bu da endojen östrojen üretimini arttırmakta ve meme dokusunun daha fazla östrojene maruz kalmasına neden olmaktadır. Postmenopozal kadınlarda adrenal androjenler yağ dokusunda östrojenlere dönüştüğü ve seks-hormon bağlayıcı protein düzeyleri düşük olduğu için serbest östrojen düzeyi artar. Menopozdan sonra 9,9 kg'lık bir ağırlık artışının meme kanseri gelişim riskini %18 arttırabileceği öne sürülmektedir.

Kilo ve meme kanseri riski arasındaki ilişki karmaşıktır. Mesela yetişkinlikte alınan kilolar riski arttırırken; çocukluktan beri aşırı kilolu olanlarda risk artmamaktadır. Ayrıca bel bölgesindeki yağlanma; kalça ve uyluk

bölgesindeki yağlanmaya göre riski daha fazla arttırmaktadır. Bunun sebebi vücudun farklı bölgelerindeki yağ hücrelerinin metabolizmalarındaki farklılıklar olabilir^{2,22,25}.

Radyasyon: Çocuklarda veya ergenliklerinde diğer bir kanserin (Hodgkin lenfoma gibi) tedavisi için göğüslerine radyasyon tedavisi alanlarda meme kanseri riski belirgin olarak artmaktadır. Bazı raporlarda riskin 12 kat artabileceği belirtilmiştir. Bu risk radyasyonun alındığı yaşa göre değişmektedir. Genç hastalar daha büyük risk altındadır. Tedaviye over hormon üretimini durduran kemoterapi eklenirse risk azalabilir. Meme gelişimi sırasında radyasyon alınırsa meme kanseri riski en yüksek noktaya ulaşır^{2,22}.

Işık Seviyesi: İngiltere Ulusal Kanser Enstitüsü tarafından yapılan bir çalışmada yapay ışığın meme kanseri için bir risk faktörü olabileceği öne sürülmüştür²⁶.

Tablo5: Meme Kanseri Gelişiminde Etkili Risk Faktörleri²¹.

Yüksek Risk	Orta Risk	Düşük Risk	Tartışmalı	Risk Yok
Germ mutasyonu	İleri yaş *	İlk doğum yaşı ileri olması	Doğum kontrol hapı kullanımı	Tıbbi düşük
LCIS	ADH	Hiç doğum yapmamış olmak	Sigara	Düşük
DCIS †	ALH	Basit kanal hiperplazisi	Beslenme	Elektromanyetik
Pozitif aile öyküsüyle birlikte ADH	Pozitif aile öyküsü	Erken menarj		Organokloridler
Radyasyon	Geçirilmiş meme kanseri	Geç menopoz		
	DCIS #	Alkol kullanımı		
	Artmış meme dansitesi	Hormon tedavisi		
		Şişmanlık §		
		Fiziksel hareketsizlik		
		Laktasyon eksikliği		

LCIS: Lobüler Karsinoma in situ; DCIS: Duktal Karsinoma in situ; ADH: Atipik Duktal Hiperplazi; ALH: Atipik Lobüler Hiperplazi; *: >65 yaş; †: aynı taraf meme için tanısal biyopsiden sonra başkaca bir tedavi uygulanmamış kadın; #: karşı taraf meme için; §: postmenopozal kadınlar için.

2.5.2. Meme Tümörlerinin Histopatolojik Sınıflandırılması

Meme kanseri olgularında tümörün patolog tarafından değerlendirilen çeşitli özellikleri prognoz ve tedaviyi belirlemede büyük önem taşır.

2.5.2.1. Non-İnfiltratif Meme Maligniteleri

2.5.2.1.1. İntraduktal Karsinom (Duktal Karsinoma İn Situ)

İntraduktal karsinoma sadece eksizyonel biyopsi ile tedavi edilebilen, hastaların %30-35'inde 10 yıl içinde rekürrens ya da invaziv duktal karsinoma'ya progresyon potansiyeli taşıyan non invaziv bir lezyondur. DCIS (Duktal Karsinoma İn Situ) tüm meme kanserlerinin %0.8-5'ini oluşturur. Teşhis konulduğunda genellikle klinik olarak palpe edilebilir dönemdedir. Aynı taraf memede multisensite sıklığı, diğer memenin aynı anda tutulumu için %10 ile %35 arasında değişen oranlar bildirilmiştir. Bu lezyonlar duktusun içerisinde çoğalarak duktus boyunca yayılırlar ve bazal membranı aşmazlar. Nadiren palpasyon bulgusu verirler^{20,27}.

2.5.2.1.2. Lobüler Karsinoma İn Situ (Lobüler Neoplazi)

Lobüler karsinoma in situ çoğunlukla benign veya malign bir lezyona yönelik yapılan meme biyopsilerinde tesadüfen saptanır. Menopoz sonrası lobüllerin atrofiye uğraması nedeniyle lobüler karsinoma in situ (LKIS) genellikle premenopozal egilimlidir. Tüm kanserlerin %1-6'sını noninvaziv kanserlerin %30'unu oluşturur. Multifokal ve bilateral olup genellikle mamografik ve klinik bulgu vermez. Lezyon genellikle subareolar ve periareolar yerleşimlidir. Fibroadenom zemininde en sık görülen malignitedir. Sadece biyopsi ile tedavi edilen olgularda 15-20 yıl içerisinde yaklaşık %20-30 oranında karsinom gelişir. Gelişen karsinomlar duktal veya lobüler olabilir. İnvaziv karsinomların yarıya yakınının karşı memede gelişmesi LKIS'nun prekürsör bir lezyondan çok meme karsinomu riskinin bir göstergesi olduğu şeklinde yorumlanmıştır^{21,27}.

2.5.2.2. İnfiltratif Meme Maligniteleri

Bu grubun içindeki tümörler in situ komponenti olsun olmasın stromal invazyonun saptandığı lezyonlardır.

2.5.2.2.1. İnvaziv Duktal Karsinom

İnvaziv duktal karsinomlar (IDK) memenin en sık görülen (%70–80), ancak invaziv karsinomların diğer hiçbir kategorisine, yani özel tipler denen diğer histolojik tiplerine uymayan malign tümördür. Bu nedenle özellik göstermeyen (NST: no special type; NOS: not otherwise specified) invaziv duktal karsinom veya klasik invaziv duktal karsinom gibi adlarla anılır. Mikroskopik olarak sıklıkla lenfatik ve perinöral invazyon mevcuttur. Multisentrik veya bilateral olabilir. Epitelyal ve stromal komponentlerden oluşurlar. Bu tür tümörlerde, multisentrite ve geniş eksizyon sınırlarının dışında tümör var olma olasılığı çok olup, meme koruyucu cerrahi sonrası lokal yineleme ve tedavide başarısızlık oranının yüksek olduğu belirtilmiştir^{21,27}.

2.5.2.2.2. İnvaziv Lobüler Karsinom

Meme malignitelerinin % 7-10'unu oluşturur. Bilateral ve multisentrik olma sıklığı infiltratif duktal karsinomdan iki kat fazladır, %20 oranında bilateraldir. Histolojik veya mamografik olarak infiltratif duktal karsinomu taklit edebilir. Bu kanser türünde bazen mamografik olarak bulgu saptanamayabilir, ayrıca hastalar klinik olarak asemptomatik olabilir, böylece fizik muayene ve mamografi incelemelerinde gözden kaçırılabilir^{21,27}.

2.5.2.2.3. Meduller Karsinom

Tüm meme kanserlerinin %3-5'ini oluşturur. Mamografide iyi sınırlı kitle görünümündedir. Duktal tip kanserlere göre daha genç hasta grubunda görülür. 35 yaşından genç kadınlarda görülen meme tümörlerinin %11'i meduller kanserdir ve genellikle BRCA1 geni mevcuttur. Düşük dereceli ve iyi prognozlu tümörlerdir ve lenfositlerle çevrilidirler. 5 yıllık ortalama yaşam şansı %85-90'dır. Aitpik medüller karsinomda ise hastalığın prognozu invaziv duktal karsinoma benzer. Mikroskopik olarak nekroz ve kanama sıktır. Aksiller lenf nodları meduller karsinomlarda reaktif olarak büyüyebilirler ve bu durum klinik evrelendirmede yanıltıcı olabilir^{20,21,27,28}.

2.5.2.2.4. Kolloid Karsinom (Müsinöz Karsinom)

Genellikle ileri yaş kadınlarda görülürler. Tüm meme kanserlerinin %1–7' sini oluşturur. Genç yaş grubunda %1, 75 ve üzeri yaş grubunda ise %7

oranında görülür. Tümörün büyük kısmını kaplayan jelatinöz yapı nedeniyle müsinöz adenokarsinom adını da alır. Tümör yavaş büyür ve gelişir, prognozu iyidir ve lenf nodu metastazı hemen hiç görülmez. Kısa dönemde prognoz, hele tümör çapı 3 cm'den küçük ise çok iyidir. Uygun tedavi ile 5 yıllık yaşam şansı %73'tür. Mikst tümörlerde (müsinöz+invaziv duktal karsinom) ise saf tipe göre prognoz daha kötüdür^{20,21,27}.

2.5.2.2.5. Tubüler Karsinom

Meme kanserlerinin %2'sini oluşturur. Tümör dokusunun % 75'i tubüler yapılardan oluşan infiltrate duktal karsinomadır. Tümör içerisinde tubül formasyonu izlenir. Prognoz oldukça iyidir. Tubüler karsinomların aksiller lenf nodu metastazları daha az görüldüğünden ve prognozu daha iyi olduğundan bu tip meme kanserlerinin erken teşhisi özellikle önemlidir. Bir meme kanseri %90 veya daha fazla tubüller komponent içeriyorsa uzun yaşam şansı %100'e ulaşır^{20,21,27}.

2.5.2.2.6. Adenoid Kistik Karsinom

Adenoid kistik karsinoma genellikle tükrük bezlerinde görülen adenokarsinomanın nadir bir varyantıdır. Ancak bu formdaki tümörler meme, trakeo-bronşial ağaç, uterin serviks, larenks ve bartolin bezinde de görülür. Meme kanserlerinin %1'den daha küçük bir bölümünü oluşturur. Aksiller lenf nodu tutulumu ve uzak metastazlar nadir görülür²⁷.

2.5.2.2.7. İnfiltratif Papiller Karsinom

Tüm meme kanserlerinin %1-2'sini oluşturur. Ortalama yaş 63–67 dir. Genellikle in situ tümörlerdir ve sıklıkla postmenopozal kadınlarda görülür. Düşük dereceli, noninvaziv intraduktal lezyonlardır. Meme kanserleri içinde en az aksiler lenf tutulumu yapandır ve 5 yıllık ortalama yaşam şansı %83'tür. Santral hemoraji, nekroz ve meme başı akıntısı siktir^{20,21,27,28}.

2.5.2.2.8. Paget Karsinomu

Özel bir tip olmayıp, karakteristik klinik özelliğe sahip bir tümördür. Meme karsinomlu hastaların %12'sinde görülür. Genellikle DKİS ile ilişkilidir, ancak invaziv meme kanseri ile birlikte görülebileceği gibi nadir de olsa memede kitle

olmaksızın sadece meme başı ve areolada Paget hastalığının klinik bulguları ile de ortaya çıkabilir. Stromal invazyon da var olabilir. Meme başında kısmen krutlu, ekzamatoid lezyon şeklinde görülür. Daha sonra areolayı tutabilir, ancak seyrek olarak birkaç cm.yi geçebilir. Şüpheli olgularda kesin tanı meme başı ve areoladan tam kat deri biyopsisi ile konur. Tedavi ve prognoz zemindeki tümörün invaziv olup olmadığına, boyutuna ve lenf nodlarının durumuna bağlıdır. Sıklıkla menopozal veya perimenopozal kadınlarda görülür^{20,27}.

2.5.2.2.9. İnflamatuvar Karsinom

Meme kanserleri içerisinde en letal form olan inflamatuvar meme kanseri ilk olarak 1814 yılında Charles Bell tarafından memede kitle, ağrı ve kitlenin üzerindeki ciltte renk değişikliği olarak tanımlanmıştır. Bunlar da Paget karsinomu gibi morfolojik tip değildirler. Memede ödem, hiperemi, hassasiyet ile karakterize tümörler için bu deyim kullanılır. Tümörün dermal lenfatiklere yaygın invazyonu bu görünüme neden olur. Meme başı retraksiyonu veya aksiller lenfadenopatiler izlenebilir. Hızlı gelişen bir hastalıktır ve hastaların %75'inde ilk başvuruda aksiller metastaz mevcuttur. Klasik olarak 5 yıllık yaşam şansı %3-5 kabul edilir ancak uygun tedavi edildiğinde bu şans %30'a çıkabilir^{20,21,27}.

2.5.3. Meme Kanserin Klinik Seyri

Memedeki tümörün büyüme hızının, kaynaklandığı andan itibaren değişmediği düşünülmektedir. Doubling time (ikilenme zamanı) üzerindeki çalışmaların sonucunda, bir tümörün palpe edilir hale gelebilmesi için en az beş yıl geçmesi gerekmektedir. Hatta yavaş büyüyen tümörlerde bu süre daha uzundur²⁰.

Meme kanserli kadınların %70'inde ilk bulgu memede genellikle ağrısız, sert ve hareketsiz bir kitlenin varlığıdır. Genelde etrafındaki meme dokusu ile beraber hareket eder ve bu özelliğiyle fibroadenomdan ayırt edilir. Kitlenin sınırları çoğu kez iyi tayin edilemez. Üzeri düzensiz bir yüzeye sahiptir. Bazen kitle memede asimetri yaratabilir ya da gözle fark edilecek boyuta ulaşabilir; bu durum kolları yukarı kaldırma ya da öne eğilme ile daha belirginleşebilir²¹.

Meme içerisinde büyüyen tümör Cooper bağlarını infiltre ettiğinden bu bağların kısalmasına neden olabilir. Bu durum ise deriyi tümöre doğru çekerek derinin retraksiyonuna neden olur.

Meme asinuslerini saran lenf damarlarına giren tümör hücreleri memenin yüzeysel ve derin pleksuslarına taşınarak bir yandan bölgesel lenf bezlerine giderken özellikle subareolar pleksustan çıkan dallarla meme derisi lenfatiklerine taşınır. Lenf akımında yavaşlama ile deri ve deri altı dokusunda ödeme neden olur. Deri kalınlaşır, kıl follikülleri içeri doğru çekilmiş gibi kalır ve bu durum deriye portakal kabuğu (peau d'orange) görünümü kazandırır. Peau d'orange ileri evre meme kanseri belirtisidir. Lenfatiklerin tıkanıklığının devamı ile deride eritem olur, zamanla beslenmesi daha da bozularak ülserasyonlar başlar. Lenfatiklere yerleşen tümör hücrelerinin çoğalmaya devam etmesi ile satellit nodüller gelişir.

Derin planda olan tümörler bazen arkaya doğru büyürken önce pektoral kasın fasyasını, sonra da pektoral kası ve toraks duvarını tutar. Bu durumda hasta rahat pozisyonda bile muayene edilirken meme hareket ettirilemez²¹.

Memenin santral kadranda yer alan bir tümör bazen meme başını içeri doğru çekerek meme başını retraksiyona uğratar. Genelde çift taraflı olan retraksiyonlar yapısal olurlar. Ancak tek taraflı retraksiyon durumunda kronik enfeksiyonlar ve enflamasyonların da olabileceği akılda tutulmalıdır.

Kanser nedeni ile oluşan kitlelerin büyük çoğunluğu (%45) üst dış kadranda yer alırlar. Bunu %25 ile santral bölge izler. Üst iç kadranda %15, alt dış kadranda %10 ve alt iç kadranda %5 sıklıkla görülür. Bu dağılım meme kadranda yer aldığı meme dokusu ile paralellik gösterir. Meme dokusunun koltuk altı (Spence's tale) uzantısında da kanser gelişme ihtimali olduğundan bu bölge de muayenelerde dikkatle kontrol edilmelidir²¹.

Meme kanserli kadınların yaklaşık %10'unda ilk belirti meme başı akıntısı olabilir. Spontan akıntılarının %90'ına yakınının altında benign bir olay yatsa da akıntının nedenini araştırmak gerekir. Spontan meme başı akıntı sebepleri arasında puberte, gebeliğin son trimesteri, laktasyon başlangıcı, uzun süre oral kontraseptif kullanımı ve klimakteryum sayılabilir. Malign nedenlerle oluşan meme başı akıntısı hemen her zaman tek taraflı, tek bir porustan ve spontandır. Areolaya bası yapıldığında her zaman aynı tek porustan gelir. Seröz, seröz-kanlı veya kanlı olabilir. Bazen bir kitle akıntıya eşlik eder²¹.

Hastaların %2'sinde kanser kendini önce meme başı, daha sonraları areolayı da içine alabilen egzamatiform bir lezyon veya erozyon, ileri dönemde ise ülserasyon ile ortaya koyabilir.

Hastaların %2-4'ünde kanser enflamasyon, enfeksiyon bulguları ile ortaya çıkar. Peau d'orange görünümü mevcuttur. Lokal ısı, hassasiyet ve ağrı vardır. Meme bütünü ile büyümüş ve sertleşmiştir. İçinde herhangi bir kitle palpe edilemez. Bu görünümü dolayısıyla inflamatuvar meme kanserli hastaların önemli bir kısmı uzun süreler antibiyotik tedavisi görür. 1–2 haftalık antibiyoterapiye cevap vermeyen olgularda biyopsiye başvurulmalıdır²¹.

Meme polikliniklerine başvuran hastaların yaklaşık %50'sinde şikâyet memede ağrıdır. Ancak meme kanserli hastaların büyük çoğunluğunda özellikle de ilk dönemlerde ağrı olmaz. Klinik bulgu vermeyen ve yalnızca ağrı şikâyeti ile başlayan meme kanseri seyrekir.

Meme muayenesi kesinlikle aksiller, intraklavikuler ve supraklaviküler bölgelerin de kontrolü ile bitirilmelidir. Aksillada sert, 5mm.den büyük lenf bezlerinde metastaz düşünülmalıdır²¹.

2.5.4. Meme Kanserinde Tanı

Hastalar genellikle ya kendi kendilerine veya rastgele bir muayene sırasında tesbit edilen bir kitle ile başvururlar. Hasta kliniğe geldiğinde hem oturur, hem de yatar pozisyonda inspeksiyon ve tüm kadranların palpasyonu ile muayene edilmelidir. Her iki meme arasındaki büyüklük farkı, asimetri, pigmentasyon, meme başı akıntısı ya da pullanma ve hamile olmayan bir kadında venöz dilatasyon veya ödem olup olmadığı dikkatle incelenmelidir. Eğer palpe edilen tümör varsa bunun lokalizasyonu, büyüklüğü, mobil olup olmadığı kaydedilmelidir. Memeye ilaveten aksilla ve supraklaviküler bölge de muayene edilerek buralarda tespit edilen lenf bezinin sayısı, yapısı, mobilitesi ve büyüklüğü not edilmelidir. Aksillasında palpabl nod tespit edilen hastaların %25-30'unda patolojik olarak tümör tespit edilemezken, klinik muayenede aksillası negatif olan hastaların %20-30'unda patolojik tümör tespit edildiği bildirilmiştir.

Karaciğer büyümesi veya lenfadenopati yönünden batın muayenesinin yapılması; kemik metastazı açısından kemik ağrılarının olup olmadığının sorulması gerekir¹⁸.

Laboratuvar testleri içinde tam kan sayımı yapılmalı ve kan biyokimyasına (özellikle alkalin fosfataz, SGOT, SGPT, LDH ve bilirübinler) bakılmalıdır. Alkalin fosfataz karaciğer metastazı için hassastır ve karaciğer

metastazlı hastaların %58'inde yüksek bulunur. Meme kanserli hastada alkalen fosfataz yüksek bulunduğunda %85 oranında bu karaciğer metastazına bağlıdır. Karaciğer metastazı bulunan hastaların %60'ında SGOT seviyesi yüksek bulunur. SGPT daha az duyarlıdır²⁰.

Meme hastalıklarının görüntülenmesinde en önde gelen yöntem olan mamografi kullanılmaktadır. Memede oluşan lezyonların, özellikle de meme kanserinin kesin tanısı ancak biyopsi ile konur.

2.5.5. Meme Kanserinde Evreleme

Meme kanserinde doğru yapılmış bir evreleme hem uygun bir tedavinin yapılmasını ve hem de kullanılan değişik tedavi yöntemlerinin etkililiğini gözlemlene imkânını sağlar. Standart bir evreleme sistemi; ulusal ve uluslar arası platformda hastaların gidişatının farklı merkezlerce karşılaştırılabilmesini ve tedavi yöntemlerinin etkinliği hakkındaki bilgi birikimini sağlar.

AJCC' nin TNM Sınıflandırması (2002)^{20,29}

Primer Tümör (T)

Primer tümör (T)'ün tanımında hem klinik hem de patolojik klasifikasyon birbirine benzer. Eğer ölçüm fizik muayene ile yapılmışsa, ölçüm yapan T1, T2 veya T3 terimlerini kullanır. Diğer (mesela patolojik ya da mamografik) ölçümlerde T2'nin milimetrik subgrupları belirtilir.

Tx: Primer tümör değerlendirilememiş.

To: Primer tümöre ait kanıt yok.

Tis Karsinoma in situ: İntraduktal karsinoma, lobüler karsinoma in situ veya meme başının tümör içermeyen Paget's hastalığı.

T1 : Tümör 2 cm veya daha az büyüklükte.

T1a : 0,5 cm veya daha küçük tümör.

T1b : 0,5 cm'den büyük ama 1 cm'den küçük tümör.

T1c : 1 cm'den büyük, ama 2 cm'den küçük tümör.

T2 : Tümör 2 cm'den büyük fakat 5 cm'den küçük.

T3 : Tümör 5 cm'den büyük.

T4+ : Tümör herhangi büyüklükte ama göğüs duvarı veya cilde direkt olarak yayılmış.

T4a : Göğüs duvarına yayılmış.

T4b : Meme cildinde ödem (peau d'orange'i içeren) veya ülserasyon ya da aynı memeyle sınırlı satelit cilt nodülleri

T4c : T4a ve T4b'nin ikisi birden.

T4d : İnflamatuvar karsinom.

Bölgesel Lenf Nodları (N)

Nx : Bölgesel lenf nodları değerlendirilememiş (örneğin daha önceden çıkarılmış olabilir).

N0 : Bölgesel lenf nodu metastazı yok.

N1 : Mobil, ipsilateral aksiller nod(lar)a metastaz.

N2 : Birbirine ya da diğer yapılara fikse ipsilateral aksiller nod(lar)a metastaz.

N3 : İpsilateral internal mamarial nod(lar)a metastaz.

Patolojik Sınıflandırma

PNx : Bölgesel lenf nodları değerlendirilememiş (Örneğin, daha önce çıkarılmış ya da patolojik çalışma için gönderilmemiş olabilir).

PN0 : Bölgesel lenf nodu metastazı yok.

PN1 : Mobil, ipsilateral aksiller lenf nod(ları)na metastaz.

PN1a : Sadece mikrometastaz (Hiçbirisi 0,2 cm'den büyük değil).

PN1b : Lenf nod(ları)na metastaz, herhangi birisi 0.2 cm'den büyük olabilir.

PN1bl : 1–3 lenf nod(ları)na metastaz, herhangi birisi 0.2 cm'den büyük ama hepsi de 2 cm'den küçük.

PN1bll : 4 veya daha fazla lenf noduna metastaz, herhangi birisi 0,2 cm'den büyük ama hepsi de 2 cm'den küçük.

PN1blll : Lenf nodu kapsülünün de atake olduğu metastaz, ancak büyüklük olarak 2 cm'den küçük.

PN1blv : 2 cm veya 2 cm'den büyük lenf nodu metastazı.

PN2 : Birbirine ya da diğer yapılara fikse ipsilateral aksiller nod(lar)a metastaz.

Uzak Metastaz (M)

Mx : Uzak metastazın varlığı değerlendirilememiştir.

Mo : Uzak metastaz yok.

M1 : Uzak metastaz [ipsilateral supraklaviküler lenf nod(ları)na metastaz dahil] var.

Meme Kanserinde Evreler

Evre 0	: Tis, N0, M0.
Evre I	: T1, N0, M0.
Evre IIA	: T0-1, N1, M0; T2, N0, M0.
Evre IIB	: T2, N1, M0; T3, N0, M0.
Evre IIIA	: T0-3, N2, M0; T3, N1-2, M0.
Evre IIIB	: T4, herhangi N, M0.
Evre IIIC	: herhangi T, N3, M0.
Evre IV	: herhangi T, herhangi N, M1.

2.5.6. Meme Kanserinde Bazı Prognostik Faktörler^{21,30,31}

Lenf nodu metastazı: Aksiller lenf nodu metastazı en önemli bağımsız prognostik faktördür. Aksiller lenf nodu tutulumunun olmadığı olgularda 10 yıllık hastaliksız sağkalım %70–80 civarında iken bu oran 1–3 lenf nodu tutulumunda %35-40'e ve 10'dan fazla lenf nodu tutulumunda ise %10-15'e düşmektedir. Metastazın boyutu (makrometastazlara karşın 0.2cm.den küçük mikrometastazlar) ve kapsül invazyonu da kötü prognoz göstergesidir.

Lokal ileri hastalık: Meme derisine veya alttaki kas-kemik dokuya invaze olmuş tümörlerde uzak metastaz görülme sıklığı daha fazladır.

Tümörün boyutu: 1cm'den küçük tümörü olan kadınlarda 5 yıllık yaşam süresi %98'in üzerindedir. Ancak tümör boyutunun büyümesi, aksiller lenf nodu tutulumunda artış ve sağkalım oranında azalma ile ilişkilidir.

Multisentrisite: Multipl primer tümör bulunması, özellikle koruyucu cerrahi düşünülen olgularda prognostik bir faktördür.

Tümörün histopatolojik tipi: Tübüler karsinom, saf müsinöz karsinom, adenoid kistik karsinom ve papiller karsinom ile sekretuar karsinomun genç yaştaki formları iyi prognoza sahip tümörlerdir. Taşlı yüzük hücreli karsinom ve inflamatuvar karsinomlar ise agresif seyirli tümörlerdir.

Histolojik ve Nükleer Grade: Tümörün indifferansiye olması, nekroz içermesi, nükleer grade' inin yüksek olması, vasküler invazyon veya inflamatuvar infiltrasyonun varlığı hem lokal nüksü artırır, hem de genel sağkalımı azaltır.

DNA Ploidy İndeks: Diploid tümörler, anaploid DNA dağılımına sahip tümörlerden daha iyi prognoza sahiptirler. Diploid tümörlerde ER sıklıkla (+) iken, anaploid tümörlerde negatiftir. Düşük grade'li tümörler diploid, yüksek

grade'li tümörler ise anaploiddirler. Anaploid tümörlerde S-faz fraksiyonu daha yüksektir. Evre I-II anaploid tümörler, diploidlerden iki kat daha fazla rekürrens riski taşırlar.

Lenfovasküler invazyon: Bu bulgu lenf nodu metastazı olan kadınlarda sıklıkla birlikte görülürken, lenf nodu metastazı olmayan kadınlarda da kötü prognozdan sorumludur. Lenfatiklerde tümör embolilerinin varlığı yineleme riskinde artış, kan damarlarında tümör embolilerinin varlığı ise tümör boyutu, histolojik evresi, lenf nodu durumu, uzak metastaz gelişimi ve kötü prognoz ile ilişkilidir.

Östrojen ve Progesteron Reseptörleri: Östrojen ve progesteron reseptörleri (ER ve PR) immünohistokimyasal olarak tümör dokusunda saptanabilmektedir. Çeşitli çalışmalar ER pozitif tümörlerin %55-60'ının hormonal tedaviye yanıt verirken, ER negatif tümörlerin ancak %10'unun yanıt verdiğini göstermiştir. İyi diferansiye tümörlerde reseptör pozitifliği daha yüksek orandadır ve ER pozitif tümörlerin prognozu daha iyidir.

HER2/neu (c-erb-B2): Yapısal olarak Epidermal Büyüme Faktör (EGF) reseptörüne benzerlik gösteren protein ürünü, tirozin kinaz aktivitesi gösterir. Yapılmış olan çalışmalar neu onkogeninin hücre proliferasyon ve diferansiyasyonunun önemli bir medyatörü olduğunu göstermiştir. Bu gen 17.kromozomda lokalizedir. c-erb B2 pozitifliği; yüksek histolojik derece, ER ve PR negatif, lenf nodu pozitif ve yüksek proliferasyon oranı gösteren meme kanserlerinde karşımıza çıkmaktadır. Genel olarak sağkalımda bir azalma ile c-erb-B2 pozitifliği arasında bir ilişki mevcuttur. c-erb-B2 'nin amplifikasyonu ya da ekspresyonunun agresif meme kanserlerinde daha sık görüldüğü söylenebilmiştir. Bu genin immünohistokimyasal yöntemlerle aşırı ekspresyonunun gösterilmesi herceptine cevabın gösterilmesi açısından iyi bir belirteç olmakla birlikte, kemoterapiye cevabın gösterilmesi konusunda aynı derecede etkili olamamaktadır. Aksiller lenf nodu metastazı pozitif hastalarda c-erb-B2 geninin aşırı ekspresyonu kötü prognoz ve kısa sağ kalımın göstergesidir.

Yukarıda sayılan faktörlerin yanında etkinlikleri araştırılmakta olan Ki67, p53, katepsin D, nm 23, anjiyogenez ve bcl 2 gibi birçok etken mevcuttur. Katepsin D; östrojene bağlı, meme kanseri hücrelerince aşırı biçimde sekrete edilen ve östrojen regülasyonunun etkisi altında olan bir lizozomal proteazdır.

Normalde ihmal edilebilecek kadar düşük olmasına rağmen, memenin benign ya da malign duktal proliferatif hastalıklarında yükselir. Bazı araştırmacılara göre kötü prognoz işaretidir.

2.6. Meme Kanserinin Moleküler Mekanizması

Meme kanseri genetik bir hastalıktır. Meme kanseri klinik olarak saptandığında, meme kanseri hücrelerinin çekirdeğinde bulunan çeşitli kromozomlar üzerinde lokalize en az 4–6 major düzenleyici mutasyon gösterilmiştir. Bu genler; proliferasyon, apoptoz ve farklılaşma arasındaki fizyolojik dengenin sağlanmasında önemli bir rol oynarlar. Diğer genler de invazyon ve metastaz için önemli olan çeşitli proteinlerin ve steroid reseptörlerinin, hücre adezyon moleküllerinin ve anjiogenik faktörlerin ekspresyonunu regüle ederler. Meme kanseri tümör gelişimi en iyi şekilde çok basamaklı gelişim modeliyle açıklanabilir. Bu modelde normal meme epiteli, hiperplazi ve karsinoma in situ üzerinden invaziv kansere dönüşmekte ve sonrasında metastazları oluşturmak için lenf ve kan damarları üzerinden disseminasyona uğramaktadır. Bu basamakların her birinin, düzenleyici genlerdeki bir veya daha fazla farklı mutasyonla korele olduğu düşünülmektedir³².

Hereditör meme kanseri, ailesel meme kanseri vakalarının yaklaşık yarısını oluşturur. Ailesinde iki veya daha fazla bireyde 60 yaş öncesinde meme kanseri görülen kadınlar ailesel meme kanseri altında sınıflandırılabilir. Tanımlanmış bir germline mutasyonu temel alınarak, kalıtsal meme kanseri yatkınlığına dair kanıtlara sahip kadınlarda hereditör meme kanseri bulunur. Mutasyonları meme kanserine olan yatkınlığı arttıran majör yüksek geçişli genler BRCA1 ve BRCA2 dir. Bu genlerdeki mutasyonlar beraber tüm meme kanserlerinin %2-3'ünden, ailesel meme kanserlerinin %30-40'ından sorumludurlar³².

BRCA1 ve 2'ye ek olarak diğer çeşitli genlerin de ailesel meme kanserinde mutasyona uğradığı gözlenmiştir. Hücre siklusu kontrol noktası kinaz genindeki (CHEK2) mutasyonlar ailesel kanserin %5'ini oluştururlar. TP53 (Li-Fraumeni sendromuna neden olur) ve PTEN (Cowden's disease) deki mutasyonlar ailesel meme kanserinin ancak %1'inden sorumludurlar³².

Meme kanserine olan yatkınlık ayrıca steroid hormonların (CYP17 ve CYP19) ve karsinojenlerin (CYP1A1, NAT1 ve NAT2) metabolizmasında yer alan genlerdeki çeşitli genetik polimorfizimlerle ilişki göstermektedir.

Sporadik kanserler meme kanserlerinin büyük bir çoğunluğunu oluştururlar. Somatik genlerdeki kazanılmış ve düzeltilmemiş genetik değişimlerin birikimi sonucunda sporadik kanserler oluşur ve bu tür kanserlerde hiçbir germline mutasyonu rol oynamaz. Sporadik meme kanserleri için olan risk faktörleri genellikle hormonaldir³².

2.6.1. Meme Kanserinin Çok Basamaklı Gelişim Modeli

Çeşitli şekilde ve kromatin yapısında çekirdeğe sahip düzensiz dağılımlı epitelyal hücrelerin proliferasyonu ile karakterize duktal hiperplazi genellikle patolojinin ilk sinylidir. Hücreler göreceli olarak küçük bir sitoplâzmaya sahiptir ve net bir hücre sınırına sahip değildir. Sitolojik olarak hücreler benignidir. Hiperplaziden atipik hiperplaziye olan geçiş, artmış meme kanseri riski ile klinik bir ilişki gösterir. Bir sonraki basamak duktal veya lobuler karsinoma in situ'nun gelişimidir. Karsinoma in situ; sitolojik malignansi karakterine sahip hücrelerin proliferasyonu ile tanımlanır. Ancak stromal invazyon gözlenmez.

Hücre bazal membrandan ayrılıp stromaya invazyon gösterdiğinde tümör invaziv hale gelir. Kan ve lenf damarları yoluyla disseminasyon sonucunda invaziv hücreler lokorejyonel lenf nodlarına veya uzak organlara metastaz oluştururlar³².

Klasik çok basamaklı tümör gelişiminde, normal epitelyal hücre premalign atipik hücreye gelişir. Klonal ekspansyondan sonra premalign lezyon haline gelir ve karsinoma in situ olarak adlandırılır (basamak 1). Bir süre sonra invaziv hale gelebilir (basamak 2). Disseminasyona uğrayıp, immün sistemden kaçtıktan sonra metastaz oluşturur (basamak 3). Her basamakta oluştuğuna inanılan önemli bir genetik olayın hücrelere yeni özellikler kazandırdığı ve bunun sonucunda hücrenin klonal selektif avantaj kazandığı düşünülmektedir. Bu genetik olaylar, kromozomal delesyonlar, translokasyonlar ve amplifikasyonlar üzerinden gerçekleşen küçük nokta mutasyonlardan; kromozom kayıpları ve duplikasyonlarla karakterize büyük değişikliklere kadar değişir. Bu değişiklikler sonucunda gen ekspresyonunda veya gen ürünlerinde modifikasyonlar gözlenir.

Tümör süpresör genlerin inaktivasyonu ile birlikte meydana gelen mutasyonel onkojen aktivasyonu, çok basamaklı işlemde erken safhaları oluşturur. Mitozun regülasyonunun ve DNA tamir mekanizmalarının düzenlenmesinde yer alan genlerdeki değişimler genomik instabiliteye yol açar³².

2.6.2. Meme Karsinogenezinde Yer Alan Genler

Onkojenler: Farklı fonksiyonellikte ve hücre lokalizasyonda pek çok onkojenin meme karsinogenezinde rol oynadığı raporlanmıştır. Sporadik meme kanserinde onkojen amplifikasyonu sıklıkla gözlenir fakat bu amplifiye genlerin birkaç tanesi meme kanseri gelişiminde kritik rol oynar (MYC, EMS1, CCND1 gibi)³³. EGF, TGFβ ve IGF-1 gibi growth faktörler de ayrıca meme kanseri gelişimi ve proliferasyonunda rol oynarlar.

Tümör Süpresör Genler: Kromozom 17q12-21 üzerinde lokalize BRCA1 geni 1994'de klonlanmıştır. Transkripsiyonda; transkripsiyonel aktivasyonda veya represyonda yer alan 15'den farklı protein ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Ayrıca apoptozda rol oynamaktadır. Bir tümör süpresör olarak BRCA1, genomik stabilitenin sağlanmasında rol oynamaktadır. DNA tamirinde yer alan çeşitli proteinlerle ve komplekslerle etkileşimde bulunmaktadır³². BRCA1'deki germline mutasyonları, meme ve over kanserine yatkınlık oluşturmaktadır. 40 yaşında olan ve BRCA1 mutasyonunun kalıtıldığı kadınlarda meme kanseri riskinin kabaca 200 kat arttığı düşünülmektedir³⁴.

BRCA1'deki mutasyonlar gen boyunca yayılmıştır ve insersiyonlar, delesyonlar, çerçeve kaymaları ve baz yer değiştirmelerinden oluşmuştur. Sporadik meme kanserinde gen nadiren mutasyona uğrar ancak sıklıkla fonksiyonel bozukluk gösterir.

BRCA2 geni kromozom 13q12-13 üzerinde lokalizedir. DNA tamirinde, hücre döngüsü kontrolünde ve transkripsiyonda yer alan proteinleri kodlar ve meme epitelial hücrelerinin terminal farklılaşmasında fonksiyon gösterebilir. Sporadik meme kanserinde, BRCA2'nin mutasyonel inaktivasyonu nadirdir; çünkü inaktivasyon için her iki gen kopyasının da mutasyona uğraması veya total kaybı gereklidir.

17p13.1 kromozomu üzerindeki tümör süpresör geni p53, sporadik kanserlerdeki en sık mutasyona uğrayan gendir. Sporadik meme kanserlerinde

TP53 mutasyon varlığı geç evrede gözlenir. Nadiren TP53 mutasyonu, Li-Fraumeni sendromunda olduğu gibi herediter meme kanseriyle ilişki gösterir.

PTEN tümör süpresör geni kromozom 10q23 üzerinde lokalizedir. Cowden sendromunda olduğu gibi germline mutasyonlar meme kanserinde rol oynarken; sporadik meme kanserlerindeki somatik mutasyonlar nadirdir.

Hücre siklüsü kontrol noktası kinazı CHEK2 geni (kromozom 22'de bulunur), DNA hasar yanıtında anahtar bir mediatör rolü oynar. 1100 del C varyantının, düşük penetranslı ailesel meme kanserine olan yatkınlığa sebep olabileceği düşünülmektedir.

CDH1 geni, (16q22.1 üzerinde) adezyon molekülü E-cadherin için kodlanır. Sporadik lobuler meme kanserinde, CDH1'in tümör süpresör gen gibi davrandığı düşünülmektedir³².

Apopitoz Genleri: Apopitoz veya programlanmış hücre ölümü; normal non-neoplastik hücrelerin karakteristik özelliğidir. Kanser hücrelerinde apopitoz anormal ve tamamen inhibedir. Pro ve antiapopitoz sinyalleri Bax, Bcl2 gibi çeşitli genlerin kontrolü altındadır. Seks hormonlarının da apoptotik genleri upregulasyona veya down-regulasyona uğrattığı bilinmektedir³².

Steroid Reseptörleri: Kromozom 6q25.1 üzerinde lokalize östrojen reseptörü (ER) alfa geni, hormon bağımlı karsinogenezisde yer alan en önemli büyüme faktörü reseptörüdür. ER beta geni ise 14q22-24 üzerinde lokalizedir. Östrojenler direk DNA hasarına neden olarak tümör tetikleyicisi olarak aktivite gösterebilirler. Sürekli mitozun indüksiyonu aracılığı ile östrojenler DNA replikasyon hasarının birikimini uyararak malign fenotip oluşumuna katkıda bulunurlar. Östrojen reseptörleri, östrojen bağımlı ve östrojen bağımsız mekanizmalarla hücre siklüs kontrol proteinlerinin gen transkripsiyonunu aktive eder. Bu işlem hücre proliferasyonu ile sonuçlanır. ER alfa'nın aşırı ekspresyonu sıklıkla meme kanserinin erken evrelerinde gözlenir³².

Östrojenin meme kanseriyle olan direkt ilişkisi hakkındaki bilgiler hayvan modellerinde ve meme tümör hücre serilerinde yapılan çalışmalardan elde edilmiştir. İnsana ait bilgiler indirektir fakat güçlüdür. Östrojenin biyolojik aktivitesi östrojen reseptörüne olan yüksek affiniteli bağlanması aracılığı ile gerçekleşmektedir. Bu reseptör ligand indükte nükleer reseptör ailesinin bir üyesidir.

Östrojen ve progesteron reseptörlerinin dokularda varlığını belirlemek için immünohistokimyasal, histokimyasal, biokimyasal, otoradyografi gibi yöntemler bulunmaktadır. Immünohistokimyasal ve biokimyasal yöntemlerin reseptör durumunu saptamada benzer sonuçlar verdiği ancak immünohistokimyasal yöntemin seçici ve topografik üstünlüğünün bulunduğu, prognoz yönünden daha yol gösterici olduğu belirtilmiştir^{36,37}. İmmünohistokimyasal yöntemlerde, rutin olarak antiöstradiol antikoru kullanılır. Östrojen reseptörü (ER) ve progesteron reseptörü (PR) nükleer boyanma yapar. Malign hücrelerin en az %20'sinde nükleer boyanması olan örnekler reseptör pozitif kabul edilir. Bazı ekoller pozitifliği %5, bazıları da %10'dan fazla boyanma olarak kabul etmektedir^{36,38}.

Başta meme ve endometrium karsinomu olmak üzere, bir grup neoplastik hastalıkta östrojen ve progesteron reseptörlerinin prognostik önemi belirlenmiştir. ER ve PR pozitif tümörler hormonal sağaltıma yanıt verir ve daha iyi prognoz gösterirler. Primer meme kanserlerinin ortalama %55-65'i; meme kanseri metastazlarının yaklaşık %45-55'i ER pozitifdir. Primer ve metastatik meme kanserlerinin yaklaşık %45-60'ı PR pozitifdir. ER ve PR pozitifliği postmenopozal dönemde, premenopozal dönemden daha fazladır. ER pozitif tümörlerde, hormon sağaltımına %55-60, ER negatif tümörlerde ise %8-10 yanıt alınmaktadır. Hem ER hem de PR pozitif tümörlerde hormonal sağaltıma yanıt %75-80'e ulaşmaktadır.

ER , evre 1 ve 2 meme kanserlerinde, sağkalım ve hastalısız sağkalım ile ilgili bulunmuştur. İnsitu duktal karsinomalarda da nükleer derece arttıkça ER ve PR pozitifliğinin azaldığı saptanmıştır. ER ve PR, meme kanserlerinde bağımsız prognostik faktördür. ER ve PR pozitifliği hormonal sağaltıma yanıtı ve daha iyi prognozu gösterir³⁶.

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışma, B.30.2.MEÜ.0.01.00.00/1757 sayılı etik kurul onayı alındıktan sonra, Ocak 2006-Ocak 2007 tarihleri arasında yapılmış ve Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı tarafından takip edilen meme kanseri tanısı almış 69 kişi hasta grubunu oluşturmuştur. Kontrol grubu ise herhangi bir kanser, allerjik hastalık, diabet, romatolojik hastalık veya immünolojik hastalık öyküsü ve bulgusu bulunmayan 45 kişiden oluşmuştur. Hasta ve kontrol grubuna dahil edilen bireyler çalışmaya alınma ve dışlama kriterleri açısından ayrıntılı bir incelemeden geçirilmiştir. Kriterleri karşılayan bireyler çalışmaya davet edilip, moleküler inceleme için kan örnekleri alınmıştır.

Araştırmaya alınan bütün hasta ve kontrol grubu araştırma hakkında bilgilendirilmiş, bu amaçla hazırlanan Aydınlatılmış Onam Formu (Ek 1) okutularak, onayları alınmıştır.

Yaş, cinsiyet, yakınma, menopoz durumu, sigara ve alkol tüketimi, doğum sayısı, aile hikâyesi, geçirilmiş meme hastalığı, hormon replasman tedavisi ve oral kontraseptif kullanımı, meme kanseri türü, lokalizasyonu, evresi, östrojen ve progesteron reseptörlerinin durumu, p53 ve c-erb-B2 moleküllerinin varlığı gibi verileri içeren bir Hasta Takip Formu (Ek 2) düzenlenerek, bu form bütün olgular için mümkün olduğunca doldurulmaya çalışılmıştır. Östrojen ve progesteron reseptörleri ile p53 ve c-erb-B2 molekülleri için çalışma yapılmamış, hastaların patoloji raporları incelenerek veriler elde edilmiştir. Bu yüzden bazı hastalarda bu verilere ulaşılamamıştır.

Hasta ve kontrol gruplarından genetik çalışma için etilendiaminotetraenoik asit'li (EDTA) tüpe alınan kan örnekleri 2-8°C'de çalışma gününe kadar saklanmıştır.

Hasta ve kontrol gruplarında çalışılan parametreler:

- HLA-DRB1 tiplendirilmesi
- HLA-DQB1 tiplendirilmesi

3.1. Araç ve Gereç

Çalışmada kullanılan cihazlar:

- Luminex¹⁰⁰ cihazı ve XY Platform
- Thermal cycler (Corbett Research)
- Isıtıcı blok (Wealtec HB-1)
- Sonikatör (Branson 200 Ultrasonic Cleaner)
- Mikrosantrifüj (Sigma Sartorius 1-15)
- Vorteks (Velp Scientifica)
- Dell Optiplex PC
- Lexmark Yazıcı
- Soğutucu (Bosch)

Çalışmada kullanılan diğer malzemeler:

- Eppendorf tüpü (Isolab 1.5 ml'lik)
- 0.04 ml %7.5'lük EDTA-K₃ içeren 5 ml'lik cam tüp
- Otomatik pipet (Labmate)
- PCR tüpleri ve kapakları (AB Gene. 2ml Thermo Strip, No.AB0451/G)
- 96 kuyucuklu Thermal cycler (PCR) plate'i (Costar No6509)
- Microseal Film (MJ Research, Inc. No.MSA-5001)

Çalışmada kullanılan kitler:

- Lifecodes HLA-DRB Tiplendirme Kiti (Ref:628710-50)
- Lifecodes HLA-DQB Tiplendirme Kiti (Ref:628610)

Çalışmada kullanılan kimyasallar:

- İzopropanol (Merck)
- Mutlak etil alkol (Reidel-Haen)
- R-Pycoerythrin Conjugated Streptavidin (SA-PE), 1mg/ml (Tepnel Lifecodes Cat No.628511)
- Luminex Sheath Fluid (Tepnel Lifecodes Cat.No.628005)
- Recombinant Taq Polymerase
- Distile su

3.2. Yöntemler

3.2.1. Sınıf II HLA Moleküllerinin (HLA-DRB1 ve HLA-DQB1) Tiplendirilmesi

3.2.1.1. Tam Kandan Deoksiribonükleik Asit (DNA) Eldesi

Prensip: Hücreler proteinaz K ile kısa bir inkübasyon ile parçalanırlar. Bu sırada açığa çıkan nükleik asitlerin, nükleazlar tarafından parçalanmaması için, ortama tüm nükleazları inhibe eden guanidin-hidroklorik asit eklenir. Nükleik asitler, filtre tüplerinde bulunan ve nükleik asitlere seçici olan cam fiberlere bağlanır. Diğer hücresel elemanlar, özel bir inhibitör uzaklaştırıcı tampon kullanılarak, tekrarlayan yıkama ve santrifüj basamaklarıyla ortamdan uzaklaştırılır. Son aşamada düşük yoğunluklu tuz çözeltisi ile nükleik asitlerin cam fiberden ayrılması sağlanır.

Ayırıcılar: DNA elde edilmesi sırasında High Pure PCR Template kiti kullanılmıştır. Kit içeriği ve hazırlanması Tablo 6'da verilmiştir.

Tablo 6: High pure PCR template kit içeriği.

Kimyasal	Miktarı	İçeriği
Bağlayıcı tampon	20 ml	6 M guanidin-HCl, 10 mM üre, 10 mM Tris-HCl, %20 Triton X-100 (v/v), pH: 4.4
Proteinaz K	90 mg	Liyofilize proteinaz K
İnhibitör uzaklaştırıcı tampon	33 ml	5 M guanidine-HCl, 20 mM Tris-HCl, pH: 6.6
Yıkama tamponu	20 ml	20 mM NaCl, 2 mM Tris-HCl, pH: 7.5
Elüsyon tamponu	40 ml	10 mM Tris, pH: 8.5

Proteinaz K: Liyofilize haldeki reaktife, 4.5 ml steril distile su eklenerek kullanıma hazır hale getirilmiştir. Tamamı kullanılmayacaksa porsiyonlanarak, -20°C'de saklanmıştır.

İnhibitör uzaklaştırıcı tampon: 33 ml reaktife 20 ml mutlak etil alkol eklenerek hazırlanmıştır.

Yıkama tamponu: 20 ml reaktifte 80 ml mutlak etil alkol eklenerek hazırlanır. Bağlayıcı ve elüsyon tamponları kullanıma hazırdır.

Yöntem:

- Ependorf tüpüne, 200 µl EDTA'lı tam kan konur ve üzerine sırasıyla 200 µl bağlayıcı tampon, 40 µl proteinaz K eklenir, vortexlenir.
- 10 dakika 72 °C'de inkübe edilir.
- Tüpe 100 µl izopropanol eklenip, vortexlenir ve karışım özel filtre tüplerine aktarılır.
- 1 dakika 8000 rpm'de santrifüj edilir ve filtreden geçen karışım atılır.
- Filtre tüpün içine 500 µl inhibitör uzaklaştırıcı tampon eklenir.
- 1 dakika 8000 rpm'de santrifüj edilir ve filtreden geçen karışım atılır.
- Filtre tüpün içine 500 µl yıkama tamponu eklenir.
- 1 dakika 8000 rpm'de santrifüj edilir ve filtreden geçen karışım atılır.
- İkinci kez filtre tüpün içine 500 µl yıkama tamponu eklenir.
- 1 dakika 8000 rpm'de santrifüj edilir ve filtreden geçen karışım atılır.
- Filtre tüp boşaltılır ve 10 saniye 8000 rpm'de santrifüj edilir.
- Filtre tüpü, yeni bir ependorf tüpü içine yerleştirilir, 72°C'de bekletilmiş olan elüsyon tampondan 200 µl filtre tüpe pipetlenir.
- 1 dakikalık 8000 rpm'de santrifüj sonunda, filtre tüpten ayrılan, saf DNA elde edilir.

3.2.1.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Lökositlerden elde edilen DNA'nın, analiz yapılacak bölgesinin, belli miktarda çoğaltılması gerekir. PCR, DNA'nın bu bölgesinin iki ucuna özgü, sentetik primer (öncül)'ler, Taq polimeraz ve deoksi nükleotit trifosfatlar (dNTP) kullanılarak çoğaltılması esasına dayanır. Primerler öncü DNA görevi görürken, Taq polimeraz ise DNA polimeraz görevi görmektedir. PCR, denatürasyon, yapışma (annealing) ve zincir uzaması (extension) olmak üzere üç aşamadan oluşur. İlk aşama olan denatürasyonda, yüksek ısı etkisiyle çift sarmal DNA'nın ayrılması sağlanır. İkinci aşama olan yapışmada, sıcaklık düşürülerek, primerlerin kendilerini tamamlayıcı DNA dizilerine bağlanmaları sağlanır. Son aşama olan uzamada ise, Taq polimeraz etkisiyle, ortamda bulunan dNTP'ler

primerlere eklenerek DNA zincirleri sentezlenmiş olur. Bu döngünün tekrarlanması ile istenen DNA bölgesi çoğaltılmış olur.

3.2.1.3. Lifecodes HLA-SSO Tiplendirme Kitleri İle Luminex¹⁰⁰ Cihazında HLA-DRB1 ve HLADQB1 Allel Tiplendirilmesi

Lifecodes HLA-SSO Tiplendirme kitleri; PCR ile amplifiye edilmiş örnekteki HLA allellerini saptamak için sekans-spesifik oligonükleotitleri (SSOs) kullanır.

HLA-SSO tiplendirme prosedürü; işaretli tek sarmallı PCR ürünlerinin SSO problemlerine hibridizasyonuna dayanmaktadır. DNA'nın PCR ile amplifikasyonunda genellikle eşit miktarda forward ve reverse primerler kullanılarak çift-sarmallı DNA ürünleri elde edilir. Ancak eğer primerlerden biri diğerine göre daha fazla miktarda bulunursa, reaksiyonda çift sarmallı DNA'ya ek olarak tek sarmallı DNA üretimi de gerçekleşir. Lifecodes amplifikasyon basamağının ilk siklüslerinde çift-sarmallı DNA üretilir. İlerleyen siklüslerde az miktarda bulunan limitli primer tüketildiğinde, kalan primer çift sarmallı ürünü bir şablon gibi kullanarak tek sarmallı DNA üretimini gerçekleştirir. Bu metot ile hibridizasyon reaksiyonuna katılabilecek hem çift sarmallı hem de tek sarmallı ürünler meydana getirilir.

SSO tiplendirme metodunda kullanılan farklı problemlerin her biri amplifiye DNA'ların içindeki allel veya allel gruplarına spesifik olan sekanslara karşı homologturlar. Başka bir ifadeyle bu problemlerin her biri amplifiye DNA'da bulunan veya bulunmayan komplementer bölgelerle hibridize olmaları için tasarlanmışlardır. SSO tiplendirilmesinden elde edilen sonuçların analizi ile amplifiye DNA'daki özel DNA sekanslarının varlığı veya yokluğu saptanabilir ve örnekteki muhtemel alleller tanımlanabilir.

Lifecodes HLA-SSO Tiplendirme prosedüründe; problemler, Luminex¹⁰⁰ cihazında kullanılmak için Luminex¹⁰⁰ mikroküreciklerine bağlanmışlardır. Yaklaşık 100 farklı Luminex¹⁰⁰ mikrokürecik popülasyonu bir arada karıştırılarak Luminex¹⁰⁰ cihazıyla analiz edilebilir. Çünkü her bir mikrokürecik popülasyonu kendine has floresans veya rengeyle ayırt edilebilir. Böylece problemler de birbirlerinden kolayca ayırt edilebilirler. Luminex¹⁰⁰ cihazı; her bir Luminex¹⁰⁰ mikroküreciğine hibridize olan işaretli PCR ürünlerinin miktarını saptayabilir.

SSO problemlerinden elde edilen bu sinyaller kullanılarak amplifiye DNA örneği ile pozitif veya negatif reaksiyon gösteren problemler belirlenebilir. Böylece örnekteki HLA fenotipinin belirlenmesi için gerekli bilgi elde edilir.

3.2.1.4. DNA Amplifikasyon (PCR) ve Hibridizasyon Prosedürleri

Polimeraz zincir reaksiyonu ve hibridizasyon prosedürü için, Lifecodes HLA-DRB ve HLA-DQB Tiplendirme kiti kullanılmıştır, kit içeriği altta gösterilmiştir.

Lifecodes HLA-DRB Tiplendirme Kiti İçeriği:

Lifecodes HLA DRB Generic Master Mix: 870 mikrolitre (50 örnek için)

Lifecodes HLA DRB DR52 Master Mix: 870 mikrolitre (50 örnek için)

Lifecodes HLA DRB Probe Mix: 2x810 mikrolitre (50 örnek için)

Dilüsyon Solüsyonu: 19,7 ml (50 örnek için)

Lifecodes HLA-DQB Tiplendirme Kiti İçeriği:

Lifecodes HLA DQB Master Mix: 420 mikrolitre (20 örnek için)

Lifecodes HLA DQB Probe Mix: 360 mikrolitre (20 örnek için)

Dilüsyon Solüsyonu: 9,9 ml (20 örnek için)

3.2.1.4.1. DNA Amplifikasyon (PCR) Prosedürü

- Master Mix'in oda ısısına gelmesi beklenir.
- Master Mix 10 saniye vortekslenir.
- Her bir hasta için 15 mikrolitre Master Mix, 0,5 mikrolitre Taq polimeraz ve 24.5 mikrolitre steril distile su bir ependorfda karıştırılır, vortekslenir ve bir amplifikasyon karışımı hazırlanır.
- Her bir hasta için PCR tüpüne 10 mikrolitre DNA konur ve üzerine 40 mikrolitre amplifikasyon karışımından eklenir (tablo 7).

Tablo7: Amplifikasyon İçin Gerekli Reaksiyon İçerikleri.

İçerik	Her örnek için gereken miktar
Lifecodes Master Mix	15 µl
DNA	10 µl
Taq Polimeraz	0,5 µl
Steril distile su	24,5 µl

- Tüplerin ağzı PCR sırasında olabilecek buharlaşmayı önlemek için kapatılır.
- Örnekler thermal cycler'a yerleştirilir ve tablo 8'deki program çalıştırılır.

Tablo 8: Amplifikasyonda Kullanılan Thermal Cycler Programı.

95C ⁰ de 5dk. Siklüs sayısı:1
95C ⁰ de 30 sn 60C ⁰ de 45 sn 72C ⁰ de 45 sn Siklüs sayısı:8
95C ⁰ de 30 sn 63C ⁰ de 45 sn 72C ⁰ de 45 sn Siklüs sayısı: 32
72C ⁰ de 15 dk

3.2.1.4.2. Hibridizasyon Prosedürü

- Hibridizasyon işlemine başlamadan önce Luminex¹⁰⁰ cihazı açılarak ısınması sağlanır.
- Probe Mix'leri ısıtıcı blokta 55-60⁰C'de 7 dk ısıtılır.
- Daha sonra Probe Mixler 15 saniye sonikatöre konur ve ardından 15 saniye vorteksenerek süspansiyon haline gelmeleri sağlanır.
- PCR ürünleri Costar plate'in kuyucukları içine 5 mikrolitre pipetlenir.
- Her bir kuyucuğa 15 mikrolitre Probe Mix eklenir ve kuyucukların üzeri Mikrosealed film ile kaplanır.

- Örnekler termal cyclere yerleştirilir ve tablo 9'daki program çalıştırılır.

Tablo 9: Hibridizasyonda Kullanılan Thermal Cycler Programı.

97C ⁰ de 5 dk
47C ⁰ de 30 dk
56C ⁰ de 10 dk
56C ⁰ de tut

- Örneklerin hibridizasyonu sırasında 1:200 dilüsyon solüsyonu/SA-PE karışımı hazırlanır. Her örnek için 170 mikrolitre dilüsyon solüsyonu ile 0,85 mikrolitre SA-PE karıştırılır.
- Dilüsyon solüsyonu/SA-PE karışımı oda sıcaklığında karanlıkta tutulur. SA-PE ışığa duyarlıdır.
- Hibridizasyon basmağı ikinci 56C⁰ basamağına geçtiği anda örnekler termal cycler üzerinde iken, her bir örnek 170 mikrolitre dilüsyon solüsyonu/ SA-PE ile dilüe edilir. Tüm örnekler 5 dakika içinde dilüe edilmelidir.
- Dilüsyon işleminden sonra örnekler değerlendirilmek üzere Luminex¹⁰⁰ cihazına yerleştirilir.

3.3. İstatistiksel Yöntem

Bu çalışmada bağımsız iki grubun sürekli bir değişken bakımından karşılaştırılmasında Student t testi ve iki kategorik değişkenin düzeyleri arasındaki ilişkinin test edilmesinde ki-kare analizi kullanılmıştır. Ayrıca risk oranının belirlenmesinde Odds oranları hesaplanmış ve ilgili Odds değerleri için güven aralıkları verilmiştir. Hesaplamalar; Minitab 15 programının demo versiyonu ile gerçekleştirilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Olguların Genel Özellikleri

Çalışmamızda 69 kişi hasta grubunu oluştururken, 45 kişi kontrol grubunu oluşturmaktadır. Hasta ve kontrol grubuna ait kişisel bilgiler tablo 10'da sunulmuştur.

Tablo 10: Hasta ve Kontrol Grubunun Kişisel Bilgileri.

Kişisel Bilgiler	Kontrol Grubu (n=45)	Hasta Grubu (n= 69)
Yaş ortalaması	46,87±13,76	52,46±10,70
Menopoza girenler	21 (%46,6)	35 (%50,72)
Menopoza girmeyenler	24 (%53,4)	34 (%49,28)
OKS alanlar	8 (%17)	9 (%13,04)
OKS almayanlar	37 (%83)	60 (%86,96)
HRT alanlar	3 (%6,66)	2 (%2,89)
HRT almayanlar	42 (%93,34)	67 (%97,11)
Sigara kullananlar	10 (%22,2)	15 (%21,73)
Sigara kullanmayanlar	35 (%77,8)	54 (%78,27)
Alkol kullananlar	0 (%0)	2 (%2,89)
Alkol kullanmayanlar	45 (%100)	67 (%97,11)
Doğum sayısı medyan [25.-75.Persantil]	2[1-3]	3[2-4]

Hasta grubundaki 69 kişinin %75,36'sı (52 hasta) memede kitle şikâyeti ile hastaneye başvurmuş (Tablo 11).

Tablo 11: Hastaneye Başvuruya Neden Olan Yakınmalar. (n=69)

Kitle	52 (%75,36)
Ağrı	5 (%7,24)
Ağrı ve kitle	4 (%5,79)
Ağrı, kitle, akıntı	1 (%1,44)
Kitle ve çekinti	2 (%2,89)
Ağrı ve kızarıklık	1 (%1,44)
Mamografik bulgu	3 (%4,34)
USG	1 (%1,44)

Hasta grubundaki bireylerin aile öyküleri alındığında; %10,14'ünde (7 hasta) ailede meme kanserine; %2,89'unda (2 hasta) ailede over kanserine; %8,69'unda (6 hasta) ailede diğer kanserlere rastlanmıştır. Hasta grubundaki bireylerin özgeçmişleri sorgulandığında %8,69'unda (6 hasta) daha önceden geçirilmiş bir meme hastalığı saptanmıştır. 3 hastada benign meme hastalığı, 2 hastada mastit, 2 hastada meme tramvası öyküsü saptanmıştır.

Hasta grubunun %66,66'sında (46 hasta) invaziv duktal karsinom, %14,49'unda (10 hasta) ise invaziv lobüler karsinom saptanmıştır (Tablo 12).

Tablo12: Meme Kanseri Türü. (n=69)

İnfiltratif duktal karsinom	46 (%66,66)
İnfiltratif lobüler karsinom	10 (%14,49)
Medüller karsinom	2 (%2,89)
Musinöz karsinom	1 (%1,44)
Tübüler karsinom	1 (%1,44)
Adenoid kistik karsinom	1 (%1,44)
Paget	1 (%1,44)
İnflamatuvar karsinom	2 (%2,89)
Duktal karsinoma in situ	2 (%2,89)
İnfiltratif papiller karsinom	1 (%1,44)
Mikst karsinom	2 (%2,89)

Hastaların %56,52'sinde tümör (39 hasta) sağ memede, %42,02'sinde (29 hasta) sol memede, %1,44'ünde (1 hasta) her iki memede saptanmıştır. Tümörün memedeki lokalizasyonu açısından veriler incelendiğinde; hastaların %59,42'sinde (41 hasta) tümörün üst dış kadranda yerleştiği saptanmıştır.

Tümör evresi bakımından hasta grubu incelendiğinde; hastaların %30,43'ü (21 hasta) evre 1, %27,53'ü (19 hasta) evre 2A, %14,49'u (10 hasta) Evre 2B, %14,49'u (10 hasta) Evre 3A, %5,79'u (4 hasta) Evre 3C, %7,24'ü (5 hasta) ise Evre 4 olarak sınıflandırılmışlardır.

Hastaların patoloji raporlarının incelenmesi sonucunda 43 hastanın östrojen reseptörü analizi, 43 hastanın progesteron reseptörü analizi ve 40 hastanın c-erb-B2 molekülü analizi elde edilebilmiştir. Östrojen ve progesteron reseptörleri bakımından malign hücrelerin en az %20'sinde nükleer boyanması olan örnekler reseptör pozitif kabul edilmiştir. Hastaların %32,55'inde (14 hasta)

östrojen reseptörü pozitif olarak saptanmıştır. %67,44'ünde (29 hasta) ise östrojen reseptörü negatif olarak saptanmıştır. Progesteron reseptörü hastaların %23,25'inde (10 hasta) pozitif olarak saptanırken, %76,74'ünde (33 hasta) negatif olarak saptanmıştır. c-erb-B2 hastaların %40'ında (16 hasta) pozitif, %60'ında (24 hasta) ise negatif saptanmıştır.

4.2. Hasta ve Kontrol Grubunun HLA-DRB1 Analiz Sonuçları

Çalışmamızda Lifecodes HLA-SSO tiplendirme prosedürü kullanılarak hasta grubundaki 69 bireyin ve kontrol grubundaki 45 bireyin HLA-DRB1 tiplendirilmesi gerçekleştirilmiştir. Hasta grubunda 13 çeşit allel saptanırken, kontrol grubunda 12 çeşit allel saptanmıştır (tablo14). Kontrol grubu için yapılan analizde 45 bireyin hepsinde tam tiplendirme yapılabilmektedir. Ancak hasta grubunda 69 hastanın 64'ünde tam tiplendirme yapılabilmek; 5 hastada sadece tek bir allel tiplendirilebilmiştir. Bu yüzden kontrol grubundaki toplam allel sayısı 90 iken, hasta grubundaki toplam allel sayısı 133'tür. İstatistiksel değerlendirme birey sayısına göre değil, toplam allel sayısına göre yapılmış ve her bir allel tek başına değerlendirilmiştir. Değerlendirme sonucunda HLA-DRB1*03 allelinin hasta grubunda görülme sıklığının %7,51 (10/133) olduğu; buna karşılık kontrol grubunda görülme sıklığının ise %17,7 (16/90) olduğu belirlenmiştir (tablo13). Bu sonuca göre HLA-DRB1*03 alleli ile meme kanseri oluşumu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir negatif ilişki saptanmıştır ($p=0,019$; $OR=0,376$ %95CI: 0,162-0,872).

Tablo 13: Hasta ve Kontrol Grubunun HLA-DRB1 Allel Analizi Sonuçları.

	Hasta grubu (n=133)	Kontrol grubu (n=90)	Odds Oranı [%95 CI]	P
DRB1*01	10(%7,51)	6 (%6,6)	1,138 [0,399–3,251]	0,809
DRB1*03	10 (%7,51)	16 (%17,7)	0,376 [0,162–0,872]	0,019*
DRB1*04	21 (%15,78)	12 (%13,3)	1,219 [0,567–2,621]	0,612
DRB1*07	6 (%4,51)	9 (%10)	0,425 [0,146–1,240]	0,108
DRB1*08	2 (%1,50)	2 (%2,2)	0,667 [0,092–4,821]	1,000
DRB1*09	1 (%0,75)	0 (%0)	Hesaplanamadı	1,611
DRB1*10	1 (%0,75)	3 (%3,3)	0,221 [0,023–2,163]	0,367
DRB1*11	37 (%27,81)	20 (%22,2)	1,349 [0,722-2,521]	0,433
DRB1*12	3 (%2,25)	1 (%1,1)	2,054 [0,210–20,063]	0,906
DRB1*13	18 (%13,53)	6 (%6,6)	2,191 [0,834–5,756]	0,104
DRB1*14	5 (%3,75)	5 (%5,5)	0,664 [0,187–2,364]	0,760
DRB1*15	11 (%8,27)	5 (%5,5)	1,508 [0,506-4,497]	0,459
DRB1*16	8 (%6,01)	5 (%5,5)	1,088 [0,344–3,439]	0,886

HLA-DRB1 tiplendirme sonuçları menopoz açısından değerlendirilmiştir. Değerlendirme sonucunda HLA-DRB1*03 allelinin postmenopozal meme kanseri tanısı alan hasta grubunda görülme sıklığının %8,69 (6/69) olduğu; buna karşılık postmenopozal kontrol grubunda görülme sıklığının ise %21,42 (9/42) olduğu belirlenmiştir (tablo 14). Ancak postmenopozal meme kanseri tanısı almış birylerde HLA-DRB1*03 alleli ile meme kanseri oluşumu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmamıştır (p=0,057; OR=0,349 %95CI: 0,114-1,066).

Tablo 14: Postmenopozal Meme Kanseri Tanısı Alan Hasta Grubu ve Postmenopozal Kontrol Grubunun HLA-DRB1 Allel Analizi Sonuçları.

	Hasta grubu (n=69)	Kontrol grubu (n=42)	Odds Oranı [%95 CI]	P
DRB1*01	4 (%5,79)	3 (%7,14)	0,800 [0,170–3,764]	0,077
DRB1*03	6 (%8,69)	9 (%21,42)	0,349 [0,114–1,066]	0,057
DRB1*04	14 (%20,28)	7 (%16,66)	1,273 [0,468–3,464]	0,636
DRB1*07	4 (%5,79)	6 (%14,28)	0,369 [0,098–1,395]	0,241
DRB1*08	0 (%0)	0 (%0)	Hesaplanamadı	
DRB1*09	0 (%0)	0 (%0)	Hesaplanamadı	
DRB1*10	0 (%0)	1 (%2,38)	Hesaplanamadı	0,841
DRB1*11	21 (%30,43)	9 (%21,42)	1,604 [0,654–3,937]	0,300
DRB1*12	1 (%1,44)	0 (%0)	Hesaplanamadı	1,000
DRB1*13	10 (%14,49)	3 (%7,14)	2,203 [0,570–8,517]	0,243
DRB1*14	3 (%4,34)	1 (%2,38)	1,864 [0,188–18,523]	0,989
DRB1*15	3 (%4,34)	1 (%2,38)	1,864 [0,188–18,523]	0,989
DRB1*16	3 (%4,34)	2 (%4,76)	0,909 [0,146–5,677]	1,000

Premenopozal meme kanseri tanısı almış hasta grubu ve premenopozal kontrol grubu değerlendirildiğinde; herhangi bir HLA-DRB1 alleli ile meme kanseri oluşumu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmamıştır (tablo 15).

Tablo 15: Premenopozal Meme Kanseri Tanısı Alan Hasta Grubu ve Premenopozal Kontrol Grubunun HLA-DRB1 Allel Analizi Sonuçları.

	Hasta grubu (n=64)	Kontrol grubu (n=48)	Odds Oranı [%95 CI]	P
DRB1*01	6 (%9,37)	3 (%6,25)	1,552 [0,368–6,546]	0,547
DRB1*03	4 (%6,25)	7 (%14,58)	0,390 [0,107–1,420]	0,252
DRB1*04	7 (%10,93)	5 (%10,41)	1,075 [0,319–3,621]	0,907
DRB1*07	2 (%3,12)	3 (%6,25)	0,484 [0,078–3,016]	0,741
DRB1*08	2 (%3,12)	2 (%4,16)	0,377 [0,033–4,286]	0,822
DRB1*09	1 (%1,56)	0 (%0)	Hesaplanamadı.	1,000
DRB1*10	1 (%1,56)	2 (%4,16)	0,377 [0,033–4,286]	0,822
DRB1*11	16 (%25)	11 (%22,91)	1,121 [0,465–2,701]	0,799
DRB1*12	2 (%3,12)	1 (%2,08)	1,516 [0,133–17,225]	1,000
DRB1*13	8 (%12,5)	3 (%6,25)	2,143 [0,537–8,549]	0,436
DRB1*14	2 (%3,12)	4 (%8,33)	0,355 [0,062–2,023]	0,431
DRB1*15	8 (%12,5)	4 (%8,33)	1,571 [0,444–5,559]	0,480
DRB1*16	5 (%7,81)	4 (%8,33)	0,932 [0,237–3,674]	1,000

Hasta grubunun HLA-DRB1 tiplendirme sonuçları tümörün evresine göre değerlendirilmiştir. Evre 1 ve evre 2 farklı iki grup olarak ele alınırken evre 3 ve evre 4 bir grup altında değerlendirilmiştir. Değerlendirme sonucunda herhangi bir HLA-DRB1 alleli ile meme tümörü evresi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmamıştır (tablo 16).

Tablo 16: Tümör Evresine Göre HLA-DRB1 Allel Analizi Sonuçları.

	Evre I hasta grubu (n=41)	Evre II hasta grubu (n=57)	Evre III ve IV hasta grubu (n=35)	P
DRB1*01	2 (%4,87)	6 (%10,52)	2 (%5,71)	0,518
DRB1*03	3 (%7,31)	4 (%7,01)	2 (%5,71)	0,956
DRB1*04	8 (%19,51)	9 (%15,78)	4 (%11,42)	0,623
DRB1*07	1 (%2,43)	3 (%5,26)	2 (%5,71)	0,716
DRB1*08	0 (%0)	1 (%1,75)	1 (%2,85)	0,447
DRB1*09	0 (%0)	0 (%0)	1 (%2,85)	0,260
DRB1*10	1 (%2,43)	0 (%0)	0 (%0)	0,306
DRB1*11	10 (%24,39)	15 (%26,31)	12 (%34,28)	0,603
DRB1*12	2 (%4,87)	1 (%3,50)	0 (%0)	0,268
DRB1*13	4 (%9,75)	8 (%14,03)	6 (%17,14)	0,637
DRB1*14	1 (%2,43)	2 (%3,50)	2 (%5,71)	0,758
DRB1*15	4 (%9,75)	6 (%10,52)	2 (%5,71)	0,702
DRB1*16	5 (%12,19)	2 (%3,50)	1 (%2,85)	0,160

Hasta grubunun HLA-DRB1 tiplendirme sonuçları östrojen ve progesteron reseptörlerinin varlığına göre değerlendirilmiştir. Her iki reseptör için malign hücrelerin en az %20'sinde nükleer boyanması olan örnekler reseptör pozitif kabul edilmiştir. Değerlendirme sonucunda herhangi bir HLA-DRB1 alleli ile östrojen reseptörünün varlığı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmamıştır (tablo 17). Ancak progesteron reseptörleri için yapılan değerlendirme sonucunda HLA-DRB1*13 allelinin progesteron reseptörü pozitif saptanan hasta grubunda görülme sıklığının %30,00 (6/20) olduğu; buna karşılık progesteron reseptörü negatif saptanan hasta grubunda görülme sıklığının ise %8,1 (5/62) olduğu belirlenmiştir (tablo18). Bu sonuca göre HLA-DRB1*13 alleli ile meme kanserindeki progesteron reseptörü pozitifliği arasında istatistiksel olarak anlamlı bir pozitif ilişki saptanmıştır ($p=0,012$; $OR=4,886$ %95CI: 1,301-18,344).

Tablo 17: Östrojen Reseptörü Varlığına Göre Hasta Grubunun HLA-DRB1 Allel Analizi Sonuçları.

	Östrojen reseptörü pozitif hasta grubu (n=28).	Östrojen reseptörü negatif hasta grubu (n=54).	Odds Oranı [%95 CI]	P
DRB1*01	4 (%14,3%)	4 (%7,4)	2,083 [0,480-9,051]	0,320
DRB1*03	2 (%7,1)	7 (%13,0)	0,516 [0,100-2,670]	0,424
DRB1*04	2 (%7,1)	11 (%20,4)	0,301 [0,062-1,465]	0,120
DRB1*07	1 (%3,6)	3 (%5,6)	0,630 [0,062-6,348]	1,000
DRB1*08	1 (%3,6)	0 (%0)	Hesaplanamadı	0,737
DRB1*09	1 (%3,6)	0 (%0)	Hesaplanamadı	0,737
DRB1*10	0 (%0)	1 (%1,9)	Hesaplanamadı	1,000
DRB1*11	6 (%21,4)	13 (%24,1)	0,860 [0,287-2,577]	0,788
DRB1*12	0 (%0)	1 (%1,9)	Hesaplanamadı	1,000
DRB1*13	5(%17,9)	6 (%11,1)	1,739 [0,480-6,297]	0,395
DRB1*14	1 (%3,6)	2 (%3,7)	0,963 [0,084-11,104]	1,000
DRB1*15	3 (%10,7)	5 (%9,3)	1,176 [0,260-5,325]	1,000
DRB1*16	2 (%7,1)	1 (%1,9)	4,077 [0,353-47,051]	0,555

Tablo 18: Progesteron Reseptörü Varlığına Göre Hasta Grubunun HLA-DRB1 Allel Analizi Sonuçları.

	Progesteron reseptörü pozitif hasta grubu (n=20)	Progesteron reseptörü negatif hasta grubu (n=62)	Odds Oranı [%95 CI]	P
DRB1*01	1 (%5,0)	7 (%11,3)	0,414 [0,048-3,583]	0,410
DRB1*03	3 (%15,0)	6 (%9,7)	1,647 [0,372-7,296]	0,508
DRB1*04	1 (%5,0)	12 (%19,4)	0,219 [0,027-1,804]	0,126
DRB1*07	2 (%10,0)	2 (%3,2)	3,333 [0,438-25,368]	0,531
DRB1*08	1 (%5,0)	0 (%0)	Hesaplanamadı	0,548
DRB1*09	0 (%0)	1 (%1,6)	Hesaplanamadı	1,000
DRB1*10	0 (%0)	1 (%1,6)	Hesaplanamadı	1,000
DRB1*11	2 (%10,0)	17 (%27,4)	0,294 [0,062-1,405]	0,108
DRB1*12	0 (%0)	1 (%1,6)	Hesaplanamadı	1,000
DRB1*13	6 (%30,0)	5 (%8,1)	4,886 [1,301-18,344]	0,012*
DRB1*14	2 (%10,0)	1 (%1,6)	6,778 [0,581-79,123]	0,292
DRB1*15	2 (%10,0)	6 (%9,7)	1,037 [0,192-5,598]	0,966
DRB1*16	0 (%0)	3 (%4,8)	Hesaplanamadı	0,751

Hasta grubunun HLA-DRB1 tiplendirme sonuçları c-erb-B2 molekülünün varlığına göre değerlendirilmiştir. Değerlendirme sonucunda HLA-DRB1*04 allelinin c-erb-B2 pozitif saptanan hasta grubunda görülme sıklığının %26,66

(8/30) olduğu; buna karşılık c-erb-B2 negatif saptanan hasta grubunda görülme sıklığının ise %8,69 (4/46) olduğu belirlenmiştir (tablo19). Bu sonuca göre HLA-DRB1*04 alleli ile meme kanserindeki c-erb-B2 pozitifliği arasında istatistiksel olarak anlamlı bir pozitif ilişki saptanmıştır (p=0,036; OR=3,818 %95CI: 1,034-14,100).

Tablo 19: c-erb-B2 Varlığına Göre Hasta Grubunun HLA-DRB1 Allel Analizi Sonuçları.

	c-erb-B2 pozitif hasta grubu (n=30)	c-erb-B2 negatif hasta grubu (n=46)	Odds Oranı [%95 CI]	P
DRB1*01	3 (%10,00)	3 (%6,52)	1,593 [0,299–8,469]	0,909
DRB1*03	0 (%0)	7 (%15,21)	Hesaplanamadı.	0,066
DRB1*04	8 (%26,66)	4 (%8,69)	3,818 [1,034-14,100]	0,036*
DRB1*07	1 (%3,33)	3 (%6,52)	0,494 [0,049–4,988]	0,934
DRB1*08	0 (%0)	1 (%2,17)	Hesaplanamadı.	1,000
DRB1*09	1 (%3,33)	0 (%0)	Hesaplanamadı.	0,823
DRB1*10	0 (%0)	1 (%2,17)	Hesaplanamadı.	1,000
DRB1*11	8 (%26,66)	12 (%26,08)	1,030 [0,363–2,924]	0,955
DRB1*12	0 (%0)	1 (%2,17)	Hesaplanamadı.	1,000
DRB1*13	6 (%20,00)	(%10,86)	2,050 [0,565–7,442]	0,269
DRB1*14	1 (%3,33)	3 (%6,52)	0,494 [0,049-4,988]	0,934
DRB1*15	2 (%6,66)	3 (%6,52)	1,024 [0,161–6,520]	1,000
DRB1*16	0 (%0)	3 (%6,52)	Hesaplanamadı.	0,410

4.3. Hasta ve Kontrol Grubunun HLA-DQB1 Analiz Sonuçları

Çalışmamızda hasta ve kontrol grubunun her ikisinde de 5 çeşit allel saptanmıştır (tablo20). Değerlendirme sonucunda HLA-DQB1*02 allelinin hasta grubunda görülme sıklığının %11,59 (16/138) olduğu; buna karşılık kontrol grubunda görülme sıklığının ise %23,33 (21/90) olduğu belirlenmiştir (tablo21). Bu sonuca göre HLA-DQB1*02 alleli ile meme kanseri oluşumu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir negatif ilişki saptanmıştır (p=0,019; OR=0,431 %95CI: 0,211-0,880).

Tablo 20: Hasta ve Kontrol Grubunun HLA-DQB1 Allel Analizi Sonuçları.

	Hasta grubu (n=138)	Kontrol grubu (n=90)	Odds Oranı [%95 CI]	P
DQB1*02	16 (%11,59)	21 (%23,33)	0,431 [0,211–0,880]	0,019*
DQB1*03	67 (%48,55)	34 (%37,77)	1,554 [0,905-2,671]	0,109
DQB1*04	2 (%1,44)	2 (%2,22)	0,647 [0,089-4,678]	1,000
DQB1*05	26 (%18,84)	21 (%23,33)	0,763 [0,399–1,459]	0,412
DQB1*06	27 (%19,56)	12 (%13,33)	1,581 [0,755–3,311]	0,222

HLA-DQB1 tiplendirme sonuçları menopoz açısından değerlendirilmiştir. Değerlendirme sonucunda HLA-DQB1*02 allelinin postmenopozal meme kanseri tanısı alan hasta grubunda görülme sıklığının %11,42 (8/70) olduğu; buna karşılık postmenopozal kontrol grubunda görülme sıklığının ise %28,57 (12/42) olduğu belirlenmiştir (tablo 21). Bu sonuca göre HLA-DQB1*02 alleli ile postmenopozal meme kanseri oluşumu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir negatif ilişki saptanmıştır (p=0,022; OR=0,323 %95CI: 0,119-0,873).

Tablo 21: Postmenopozal Meme Kanseri Tanısı Almış Hasta Grubu ve Postmenopozal Kontrol Grubunun HLA-DQB1 Allel Analizi Sonuçları.

	Hasta grubu (n=70)	Kontrol grubu (n=42)	Odds Oranı [%95 CI]	P
DQB1*02	8 (%11,42)	12 (%28,57)	0,323 [0,119–0,873]	0,022*
DQB1*03	37 (%52,85)	17 (%40,47)	1,312 [0,605–2,846]	0,492
DQB1*04	1 (%1,42)	1 (%2,38)	0,594 [0,036–9,758]	1,000
DQB1*05	11 (%15,71)	9 (%21,42)	0,684 [0,257–1,819]	0,445
DQB1*06	13 (%18,57)	3 (%7,14)	2,965 [0,792–11,097]	0,094

Premenopozal meme kanseri tanısı almış hasta grubu ve premenopozal kontrol grubu değerlendirildiğinde; herhangi bir HLA-DQB1 alleli ile meme kanseri oluşumu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmamıştır (tablo 22).

Tablo 22: Premenopozal Meme Kanseri Tanısı Almış Hasta Grubu ve Premenopozal Kontrol Grubunun HLA-DQB1 Allel Analizi Sonuçları.

	Hasta grubu (n=68)	Kontrol grubu (n=48)	Odds Oranı [%95 CI]	P
DQB1*02	8 (%11,76)	9 (%18,75)	0,502 [0,179–1,407]	0,185
DQB1*03	30 (%44,11)	17 (%35,41)	1,440 [0,673–3,081]	0,347
DQB1*04	1 (%1,47)	1 (%2,08)	0,701 [0,043-11,499]	1,000
DQB1*05	15 (%22,05)	12 (%25)	1,047 [0,435–2,520]	0,919
DQB1*06	14 (%20,58)	9 (%18,75)	1,123 [0,442–2,857]	0,807

Hasta grubunun HLA-DQB1 tiplendirme sonuçları tümörün evresine göre değerlendirilmiştir. Evre 1 ve evre 2 farklı iki grup olarak ele alınırken evre 3 ve evre 4 bir grup altında değerlendirilmiştir. Değerlendirme sonucunda herhangi bir HLA-DQB1 alleli ile meme tümörü evresi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmamıştır (tablo 23).

Tablo 23: Tümör Evresine Göre HLA-DQB1 Allel Analizi Sonuçları.

	Evre I hasta grubu (n=42)	Evre II hasta grubu (n=58)	Evre III ve IV hasta grubu (n=38)	P
DQB1*02	5 (%11,90)	7 (%12,06)	4 (%10,52)	0,971
DQB1*03	19 (%45,23)	27 (%46,55)	21 (%55,26)	0,618
DQB1*04	1 (%2,38)	0 (%0)	1 (%2,63)	0,332
DQB1*05	9 (%21,42)	12 (%20,68)	5 (%13,15)	0,572
DQB1*06	8 (%19,04)	12 (%20,68)	7 (%18,42)	0,958

Hasta grubunun HLA-DQB1 tiplendirme sonuçları östrojen ve progesteron reseptörlerinin varlığına göre değerlendirilmiştir. Her iki reseptör için malign hücrelerin en az %20'sinde nükleer boyanması olan örnekler reseptör pozitif kabul edilmiştir. Değerlendirme sonucunda herhangi bir HLA-DQB1 alleli ile östrojen reseptörünün varlığı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmamıştır (tablo 24). Ancak progesteron reseptörleri için yapılan değerlendirme sonucunda HLA-DQB1*06 allellinin progesteron reseptörü pozitif saptanan hasta grubunda görülme sıklığının %45,00 (9/20) olduğu; buna karşılık progesteron reseptörü negatif saptanan hasta grubunda görülme sıklığının ise %12,1 (8/66) olduğu belirlenmiştir (tablo25). Bu sonuca göre HLA-DRQ1*06 alleli ile meme kanserindeki progesteron reseptörü pozitifliği arasında istatistiksel olarak anlamlı bir pozitif ilişki saptanmıştır (p=0,001; OR=5,932 %95CI:1,878-18,734). HLA-DQB1*03 allellinin ise progesteron reseptörü pozitif

saptanan hasta grubunda görülme sıklığının %20,00 (4/20) olduğu; buna karşılık progesteron reseptörü negatif saptanan hasta grubunda görülme sıklığının ise %53,00 (35/66) olduğu belirlenmiştir (tablo25). Bu sonuca göre HLA-DRQ1*03 alleli ile meme kanserindeki progesteron reseptörü pozitifliği arasında istatistiksel olarak anlamlı bir negatif ilişki saptanmıştır (p=0,009; OR=0,221 %95CI:0,067-0,733).

Tablo 24: Östrojen Reseptörü Varlığına Göre Hasta Grubunun HLA-DQB1 Allel Analizi Sonuçları.

	Östrojen reseptörü pozitif hasta grubu (n=28)	Östrojenreseptörü negatif hasta grubu (n=58)	Odds Oranı [%95CI]	P
DQB1*02	1 (%3,6)	10 (%17,2)	0,178 [0,022-1,465]	0,075
DQB1*03	11 (%39,3)	28 (%48,3)	0,693 [0,277-1,734]	0,580
DQB1*04	0 (%0)	1 (%1,7)	Hesaplanamadı	1,000
DQB1*05	8 (%28,6)	10 (%17,2)	1,920 [0,661-5,575]	0,226
DQB1*06	8 (%28,6)	9 (%15,5)	2,178 [0,736-6,446]	0,154

Tablo 25: Progesteron Reseptörü Varlığına Göre Hasta Grubunun HLA-DQB1 Allel Analizi Sonuçları.

	Progesteron reseptörü pozitif hasta grubu (n=20)	Progesteron reseptörü negatif hasta grubu (n=66)	Odds Oranı [%95 CI]	P
DQB1*02	3 (%15,0)	8 (%12,1)	1,279 [0,305-5,361]	0,736
DQB1*03	4 (%20,0)	35 (%53,0)	0,221 [0,067-0,733]	0,009*
DQB1*04	0 (%0)	1 (%1,5)	Hesaplanamadı	1,000
DQB1*05	4 (%20,0)	14 (%21,2)	0,929 [0,268-3,223]	0,907
DQB1*06	9 (%45,0)	8 (%12,1)	5,932 [1,87818,734]	0,001*

Hasta grubunun HLA-DQB1 tiplendirme sonuçları c-erb-B2 molekülünün varlığına göre değerlendirilmiştir. Değerlendirme sonucunda HLA-DQB1*02 allelinin c-erb-B2 pozitif saptanan hasta grubunda görülme sıklığının %3,125 (1/32) olduğu; buna karşılık c-erb-B2 negatif saptanan hasta grubunda görülme sıklığının ise %18,75 (9/48) olduğu belirlenmiştir (tablo26). Bu sonuca göre HLA-DQB1*02 alleli ile meme kanserindeki c-erb-B2 pozitifliği arasında

istatistiksel olarak anlamlı bir negatif ilişki saptanmıştır ($p=0,038$; $OR=0,140$ %95CI: 0,017-1,164).

Tablo26: c-erb-B2 Varlığına Göre Hasta Grubunun HLA-DQB1 Allel Analizi Sonuçları.

	c-erb-B2 pozitif hasta grubu (n=32)	c-erb-B2 negatif hasta grubu (n=48)	Odds Oranı [%95 CI]	P
DQB1*02	1 (%3,125)	9 (%18,75)	0,140 [0,017–1,164]	0,038*
DQB1*03	19 (%59,37)	19 (%39,58)	2,231 [0,896–5,555]	0,082
DQB1*04	0 (%0)	1 (%2,08)	Hesaplanamadı.	0,411
DQB1*05	5 (%15,625)	10 (%20,83)	0,704 [0,216–2,293]	0,559
DQB1*06	7 (%21,87)	9 (%18,75)	1,213 [0,401–3,675]	0,732

5.TARTIŞMA

Meme kanseri kadınların en fatal ve malign hastalıklarından biridir ve son yıllarda insidansı artmaktadır. Akciğer kanserinden sonra kadınlar arasındaki kanser ölümlerinde ikinci sırayı almaktadır ve 15-54 yaş arasındaki kanser ölümlerinin ilk sebebidir. Her ne kadar hastalığın majör etiyolojik sebebi tam olarak bilinmese de; genetik, hormonal, çevresel, mesleki ve infeksiyöz ajanlar hastalığın etiyolojisine katkıda bulunuyor olabilir. Yakın zamanda meme kanserindeki malign değişimin oluşumuna katkıda bulunabilecek genetik faktörlerin rolüyle alakalı pek çok veri elde edilmiştir. Kalıtsal ve ailesel meme kanserinde, BRCA1 ve BRCA2 genlerinde gerçekleşebilecek mutasyonların, delesyonların ve diğer genetik değişimlerin farklı ırk ve etnik gruplarda önemli bir genetik risk faktörü olduğu düşünülmüştür³⁹.

Bununla birlikte meme kanseri vakalarının büyük bir bölümü hiçbir ailesel meme veya over kanseri hikâyesi bulunmayan hastalarda saptanmaktadır. Bu yüzden özellikle sporadik olgular üzerindeki genetik risk faktörü araştırması önem kazanmıştır. MHC genleri sitotoksik T lenfositlerinin tümör antijenlerine karşı yönlendirilmesinde önemli bir rol oynamaktadır³⁹.

T hücre cevabı yüksek polimorfik HLA sınıf 1 ve sınıf 2 özgül allellere bağımlı bir yanıttır. Özgül HLA allelleri ile bazı viral kökenli tümörler arasında zayıf bir ilişki tanımlanmıştır. Buna karşın MHC polimorfiziminin spontanöz nonviral tümörlerle olan ilişkisi aydınlatılmayı beklemektedir. Çoğu tümördeki somatik değişimler tümör hücrelerindeki HLA sınıf 1 gen ekspresyonunda down-regulasyon oluşumuna katkıda bulunabilmektedir. Bu değişiklikler potansiyel olarak immün kaçışa katkıda bulunabilirler ve tümör gelişiminin çok basamaklı mekanizmasında rol alıyor olabilirler. Her ne kadar HLA sınıf 1 genleri tüm hücrelerde eksprese edilse de, immün yanıt sistemleri aynı zamanda antijenik peptitlerin HLA sınıf 2 molekülleri aracılığıyla T hücrelerine sunulmasına gereksinim duyarlar. Bu heterodimerler primer olarak makrofaj, dendritik hücreler ve B lenfositler gibi profesyonel antijen-sunucu hücreler tarafından eksprese edilirler. HLA sınıf 2 DPB, DQB veya DRB genlerinin yüksek polimorfik özgül allellerini taşıyan bazı kişilerde kanser tiplerinin bazı türlerine karşı direnç görülebilmektedir⁴⁰.

Sınıf II HLA molekülleri, yardımcı T lenfositlerine peptit sunumu için gerekli molekülüdür ve immün sistemin tetiklenmesinden sorumlu olabilirler. Bu yüzden bu antijenlerin varlığı tümörü daha immünojenik hale getirir ve bu da daha iyi bir prognoz oluşturabilir. Antijen sunumu dışında, sınıf I ve II molekülleri, neoplastik hücrelerin apoptozunu indükleyebilecek sinyallerin iletilmesini sağlamaktadırlar. Bu yüzden HLA-DR moleküllerinin eksikliğinin, tümör hücrelerinin apoptoza uğramalarını azaltabileceği düşünülmektedir.

Tümör hücrelerinde sınıf II antijenlerinin varlığı, tümöre karşı konak immün yanıtın gücünü arttırabilir. Bunu, antijen sunumu yaparak veya allojenik lenfositlerin proliferasyonunu stimule ederek gerçekleştirir. Bu yüzden HLA sınıf I antijenlerinde olduğu gibi, HLA-DR moleküllerindeki değişikliklerin de meme kanserinin gelişimiyle ve metastatik progresyonuyla ilişkili olabileceği düşünülmektedir⁴¹.

Tümörün tedaviye olan yanıtında immünoterapi öncesinde, sırasında ve sonrasındaki MHC tümör ekspresyonu önem taşımaktadır. Meme kanseri düşük bir tümör infiltre edici lenfosit aktivitesine sahiptir ve bu yüzden immünoterapi bir avantaj göstermemektedir. Çalışmalarda interlekin(IL)-2 tedavisine yanıt veren tümörlerin tedaviden önce HLA-DR ekspresyonu yaptığı gözlenmiştir. Buna rağmen immünoterapiye yanıt vermeyen tümörlerin tedavi öncesinde veya sonrasında HLA-DR ekspresyonu yapmadığı gözlenmiştir⁴².

Yapılan deneysel çalışmalar sonucunda elde edilen bilgilerde endojen peptidlerin işlenerek anti-tümör CD4+T hücrelerine sunulmasında MHC sınıf 2 moleküllerinin rolü hakkında bilgi sahibi olunmuştur. Bu moleküllerin solid tümörlere karşı uygulanan antikanser stratejilerdeki rolü ve özellikleri hakkında da çalışmalar yapılmalıdır. MHC sınıf 2 gen ürünleri içeriğinde bulunan tümör kodlayıcı antijenler tarafından başlatılan CD4+T hücrelerinin aktivasyon ve proliferasyon durumu CD8+T hücrelerinin potansiyel efektör aktivitesinin ve antitümör hafızanın uzunluğu için önemlidir. Meme kanserini infiltre eden CD4+T lenfositlerinin otolog tümör antijenlerini MHC sınıf 2 bağımlı olarak tanıdığı ve bu antijenlere cevap olarak sitokinler sekrete ettiği gösterilmiştir. Bu da kalıtsal kişisel özelliklerin anti-tümör immün yanıtın niteliğini ve miktarını etkilediğini göstermektedir. Bu yüzden "allel etkisi"nin muhtemelen CD+4T hücrelerinin tümör peptidlerine karşı olan sitotoksik etkisi (sitokin sekresyonu) ve CD+4 helper T hücrelerinin işlevi üzerinde etkisi olabileceği düşünülmektedir.

Eğer böyleyse HLA-DR allel frekansının farklı populasyonlardaki meme kanseri riskiyle olan ilişkisi araştırılmalı ve meme kanseri gelişimi için risk faktörü olarak değerlendirilebilecek önemli alleller saptanmalıdır³⁹. Eğer bu tarz alleller saptanırsa teorik olarak dominant tümör süpresör genleri olarak tanımlanabilirler⁴⁰.

HLA-sınıf 2'nin meme kanseriyle olan ilişkisi ve özellikle genetik bir risk faktörü olarak düşünüldüğü çalışmalar sınırlı sayıdadır. Meduller meme karsinomu vakalarının küçük bir bölümü MHC ekspresyonu açısından incelenmiştir. Meduller karsinom her ne kadar kötü sitolojik özellikler içerse de; genellikle yoğun bir lenfositik infiltrat ile birliktelik göstermekte ve göreceli olarak iyi bir prognoza sahip olmaktadır. Muhtemelen HLA-DR aracılığıyla tümör hücrelerinin T-lenfositleri tarafından tanınmasının sonucu olarak, sürekli bir tümör infiltre edici lenfosit (TIL) populasyonuna sahiptir. Natali ve arkadaşları yaptıkları çalışmada HLA-DR ekspresyonu yapan meme kanserlerinin yalnızca meduller karsinom ve tubüler karsinom olduğunu göstermişlerdir⁴³. Yine Bartek ve arkadaşları da 72 meme kanseri içinde 5 tanesinin belirgin HLA-DR pozitifliği gösterdiğini ve bunlardan ikisinin meduller karsinom olduğunu göstermişlerdir⁴⁴. En ilgi çekici bulgular Yazawa ve arkadaşlarının çalışmasında gözlenmiştir. Bu çalışmada incelenen 13 meduller karsinomun hepsinde de HLA-DR pozitifliği saptanmış ve 11 vakada tümör hücrelerinin %50'sinden fazlasında pozitiflik saptanmıştır⁴².

Lazzaro ve arkadaşları tarafından 11 meduller karsinom ve 15 duktal karsinom vakasının primer tümörleri ve lenf nodu metastazları HLA-DR ve lenfosit antijenleri için immünoperoksidaz boyama kullanılarak analiz edilmiştir. Meduller karsinomda, primer tümörler için HLA-DR boyaması pozitif olan hücre oranı 74,5% ve nodal metastazlar için 67,3%'tür. Duktal karsinom için, primer tümörlerde bu oran 17,7%'e, metastazlarda ise 7%'ye düşmektedir. Meduller karsinomda, lenf nodlarına metastaz olduğunda dahi HLA-DR ekspresyon düzeyi yüksek kalmakta, bununla birlikte primer duktal tümörlerde var olan HLA-DR ekspresyonu bölgesel lenf nodlarına metastaz gerçekleştiğinde düşmeye başlamaktadır⁴⁵.

Feinmesser ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada MHC-1 ve MHC-2 antijen sisteminin komponentleri olan HLA-DR antijenleri ve β 2m molekülünün meduller meme kanserinde belirgin olarak ekspresyon gösterdiği

gözenmiştir. Bu moleküllerin atipik meduller karsinomdaki daha zayıf ekspresyonu muhtemelen bu tümörün antijen sunumundaki zayıflığının nedeni olabilir. Bu yüzden de atipik meduller karsinomun prognozu meduller karsinomdan çok invaziv duktal karsinoma benzemektedir⁴².

Redondo ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada in situ karsinomda %20 (6/30), invaziv karsinomda %15 (20/131), metastatik karsinomda ise sadece 1 vakada HLA-DR antijeni için pozitiflik saptanmıştır⁴¹.

15 non-tümöral meme dokusu, 24 benign lezyon, 4 inflamatuvar karsinom ve 94 primitif meme karsinomu tümör örneği HLA sınıf II ekspresyonu bakımından Concha ve arkadaşları tarafından analiz edilmiştir. Öncelikle HLA sınıf II antijenleri tüm non-neoplastik meme dokusunda saptanabilmiş. İkinci olarak HLA sınıf II antijen ekspresyonunun benign neoplazmlarda ve hiperplastik lezyonlarda belirgin olarak arttığı saptanmış. Buna zıt olarak 92 karsinomadan sadece 32 tanesi HLA-DR antijen ekspresyonu göstermiş, 17 tümör HLA-DP, 11 tümör de HLA-DQ antijenleri bakımından pozitif olarak saptanmıştır. Sınıf II antijenlerin ekspresyonu, histolojik farklılaşma ile ilişkili bulunmuştur⁴⁶.

Tamiolakis ve arkadaşları tarafından yapılan immünohistokimyasal çalışmada atipik ve malign meme epitel hücrelerindeki MHC sınıf II (HLA-DR) ekspresyonu analiz edilmiş. Çalışma sonucunda lezyon malignansiye doğru ilerledikçe düşmeye başlayan epitelyal HLA sınıf II (DR) ekspresyonu saptanmıştır. HLA sınıf II ekspresyonunun dereceli olarak azalması, atipik formdan malign forma doğru olan hücresel farklılaşmanın bir göstergesi olabilir⁴⁷.

Zuk ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada benign lezyonların %75'inde HLA sınıf II ekspresyonu gözlenmiştir. Karsinomların büyük bir kısmında sınıf II moleküllerinin değişken epitelyal ekspresyon kaybı saptanmıştır⁴⁸.

Brunner ve arkadaşları tarafından HLA-D bölgesi ürünleri olan HLA-DR, DQ ve DP moleküllerinin meme kanseri tarafından ekspresyonun standart prognostik faktörlerle olan ilişkisi araştırılmıştır. HLA-DR ile tümörün differansiasyon durumu (P=0,02) ve progesteron reseptörü ekspresyonu (P=0,002) arasında pozitif bir ilişki bulunmuştur. Bu iki parametre iyi prognozla ve birbirleriyle ilişkilidirler⁴⁹.

Şu ana kadar aktarılan çalışmaların hepsinde sınıf II HLA molekülleri tümör üzerinde araştırılmış ve tümördeki ekspresyon düzeyleri ile meme kanseri arasında ilişki kurulmaya çalışılmıştır. Bu çalışmalarda genellikle immünohistokimyasal boyama yöntemleri kullanılarak tümör tarafından yapılan HLA-DR-DQ-DP ekspresyonları saptanmıştır. Ancak bizim çalışmamızın da dahil olduğu başka bir grup ise meme kanserli hastalar ve etnik olarak eşleştirilmiş kontrol grubu üzerinde HLA DPB, DQB ve DRB allellerinin detaylı moleküler analizini yaparak kansere yatkınlık veya direnç oluşumunda rol oynayabilen potansiyel allellerin varlığı hakkında bilgi sahibi olmaya çalışmışlardır^{4,39,40}.

İran'da primer meme kanserli 36 kadın üzerinde Ghaderi ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada sekans spesifik primerler (PCR-SSP) kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu ile HLA-DRB1 allel frekansı saptanmaya çalışılmıştır. Çalışma sonucunda HLA-DRB1*12 allel frekansı kontrol grubuyla karşılaştırıldığında hasta grubunda belirgin olarak yüksek bulunmuştur ($p < 0,03$)³⁹. Bizim çalışmamızda HLA-DRB1*12 alleli ile meme kanserine olan yatkınlık arasında istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç elde edemedik. Bunun en muhtemel sebeplerinden biri; HLA-DRB1*12 allel frekansının çalışmamızın yürütüldüğü Mersin popülasyonundaki düşüklüğü olabilir diye düşünmekteyiz. HLA-DRB1*12 alleli çalışmamızdaki hasta grubundaki 133 allelin sadece 3'ünde (%2,25); kontrol grubundaki 90 allelin de sadece 1'inde (%1,1) saptanmıştır. Dolayısıyla bu kadar düşük frekanstaki bir allel bize bir sonuç vermemektedir.

Tümörlerin yalnızca immün sistemde bir problem olduğu zaman ortaya çıktığı varsayılanmaktadır. HLA sınıf 2 genlerinin koruyucu olduğu düşünülen allellerinin kalıtımında oluşabilecek bir problemin meme kanseri gelişimiyle ilişkili olup olmadığını araştırmak için Chaudhuri ve arkadaşları tarafından 176 erken başlangıçlı meme kanseri tanısı alan beyaz kadınlarda ve 215 etnik olarak eşleştirilmiş kontrol üzerinde HLA DPB1, DQB1, DRB1 ve DRB3 allellerinin moleküler tiplendirilmesi yapılmıştır⁴⁰. HLADQB*03032 alleli kontrol grubunun 7%'sinde saptanmış fakat hastaların hiç birinde gözlenmemiştir. HLADRB1*11 allellerinin de hasta grubuyla karşılaştırıldığında belirgin olarak arttığı gözlenmiştir. Bu çalışmada HLA DRB1*11 alleli kontrol grubunda 16,3% oranında saptanırken, hasta grubunda 3,5% oranında gözlenmiştir. Bu sonuçlar HLA DQB*03032 ve HLA DRB1*11 allellerinin meme kanseri için koruyucu bir role

sahip olabileceğini düşündürmektedir. Bizim çalışmamızda ancak düşük çözünürlüklü sonuçlar elde edebildiğimiz için HLA DQB*03032 ile ilişkili bir yorum yapamadık. HLA DRB1*11 alleli için yaptığımız analiz sonucunda ise; HLA DRB1*11 alleli ile meme kanserine karşı olan koruyuculuk arasında istatistiksel bir anlam saptamadık.

Baccar ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada Tunusta'ki meme kanserli hastalar ve etnik olarak eşleştirilmiş kontrol grubunda HLA-DQB1, DRB1 allelleri ve HLA-DRB1-DQB1 haplotipleri analiz edilmiş ve çalışma sonucunda HLA-DRB1*07-DQB1*02 ile meme kanseri oluşumu arasında negatif bir ilişki saptanmıştır⁴. Bizim çalışmamızda HLA DRB1*07 alleli için yaptığımız analiz sonucunda; HLA DRB1*07 alleli ile meme kanserine karşı olan koruyuculuk arasında istatistiksel bir anlam saptamadık. Ancak HLA DQB1*02 alleli için yaptığımız analiz sonucunda; HLA DQB1*02 alleli ile meme kanserine karşı olan koruyuculuk arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptadık ve Baccar tarafından yapılan çalışmayı destekleyici bir sonuç elde ettik. HLA-DQB1*02 allelinin hasta grubunda görülme sıklığı %11,59 (16/138) iken; buna karşılık kontrol grubunda görülme sıklığı ise %23,33 (21/90) olarak belirlendi ($p=0,019$). Bu koruyucu allel; menapoza girmiş kadınlarda da istatistiksel olarak anlamlı bir allel frekansı gösterdi. HLA-DQB1*02 allelinin menopoza giren hasta grubunda görülme sıklığı %11,42 (8/70) iken; buna karşılık menopoza giren kontrol grubunda görülme sıklığı ise %28,57 (12/42) olarak belirlendi ($p=0,022$). Her iki çalışmanın sonucuna göre; HLA-DQB1*02 alleleline sahip olan bireylerin meme kanserine karşı daha dirençli olabilecekleri varsayılanmaktadır. Bu alleli taşıyan bireyler belki de tümöre karşı çok daha güçlü bir immün yanıt gelişmesine katkıda bulunabilmektedirler. Diğer allel tiplerine göre tümör antijenlerini daha etkili bir şekilde T hücrelerine sunabilirler veya sahip oldukları antijen bağlayıcı oyuklarında tümör gelişimini baskılayan özel moleküllere sahip olabilirler.

Yukarıda bazı sonuçlarına değinilen çalışmamızda; 69 kişiden oluşan hasta grubuna ve 45 kişiden oluşan kontrol grubuna ait örnekler üzerinde HLA-DRB1 ve HLA-DQB1 allel tiplendirilmesini gerçekleştirdik. Kontrol grubunu oluşturan bireylerin kanser, allerjik hastalık, diabet, romatolojik hastalık veya immünolojik bir hastalık öyküsü taşımasına özen gösterdik. Çünkü bu tür

hastalıklar belirli HLA allel tipleriyle ilişkili olabildikleri için çalışmamızın sonucuna etki edebilirlerdi.

Hasta grubu verileri incelendiğinde; hastaların en sık memede kitle şikâyeti ile hastaneye başvurduğu (%75,36), invaziv duktal karsinomanın en sık görülen malign tümör olduğu (%66,66) ve tümörlerin büyük çoğunluğunun üst dış kadranda yer aldığı (%59,42) saptanmıştır. Bu sonuçlar literatür ile uyum göstermektedir.

Çalışmamızda SSOP yöntemi kullanılarak hasta grubundaki 69 bireyin ve kontrol grubundaki 45 bireyin HLA-DRB1 ve HLA-DQB1 tiplendirilmesi gerçekleştirilmiştir^{5,8,50}. Analiz için Lifecodes HLA-DRB (Ref:628710-50) ve HLA-DQB (Ref:628610) tiplendirme kitleri kullanılmıştır. Değerlendirme sonucunda HLA-DRB1*03 allelinin hasta grubunda görülme sıklığının %7,51 (10/133) olduğu; buna karşılık kontrol grubunda görülme sıklığının ise %17,7 (16/90) olduğu belirlenmiştir. Bu sonuca göre HLA-DRB1*03 alleli ile meme kanseri oluşumu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir negatif ilişki saptanmıştır ($p=0,019$). İstatistiksel hesaplamalardan çıkardığımız sonuca göre bu allele sahip bireylerdeki meme kanseri gözlenme riskinin, bu allele sahip olmayan bireylere göre 2,65 kat daha düşük olması bizi; HLA-DRB1*03 alleli meme kanseri için koruyucu bir role sahip olabilir diye düşündürmektedir.

HLA-DQB1 için yapılan analiz sonucunda ise HLA-DQB1*02 allelinin hasta grubunda görülme sıklığının %11,59 (16/138) olduğu; buna karşılık kontrol grubunda görülme sıklığının ise %23,33 (21/90) olduğu belirlenmiştir. Bu sonuca göre HLA-DQB1*02 alleli ile meme kanseri oluşumu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir negatif ilişki saptanmıştır ($p=0,019$). İstatistiksel hesaplamalardan çıkardığımız sonuca göre bu allele sahip bireylerdeki meme kanseri gözlenme riskinin, bu allele sahip olmayan bireylere göre 2,32 kat daha düşük olması bizi; HLA-DQB1*02 alleli meme kanseri için koruyucu bir role sahip olabilir diye düşündürmektedir. Bu sonuç Baccar tarafından Tunus'da yapılan çalışmayı desteklemektedir⁴.

HLA-DRB1 ve HLA-DQB1 tiplendirme sonuçları postmenopozal meme kanseri tanısı alan hasta grubu ve postmenopozal kontrol grubunda değerlendirilmiştir. Değerlendirme sonucunda HLA-DRB1*03 allelinin postmenopozal meme kanseri tanısı alan hasta grubunda görülme sıklığının

%8,69 (6/69) olduğu; buna karşılık postmenopozal kontrol grubunda görölme sıklığının ise %21,42 (9/42) olduğu belirlenmiştir. Ancak bu allel kontrol grubunda belirgin olarak yüksek frekansta gözlenirse de meme kanseri oluşumu ile arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmamıştır ($p=0,057$).

HLA-DQB1 için yapılan değerlendirme sonucunda ise; HLA-DQB1*02 allelinin postmenopozal meme kanseri tanısı alan hasta grubunda görölme sıklığının %11,42 (8/70) olduğu; buna karşılık postmenopozal kontrol grubunda görölme sıklığının ise %28,57 (12/42) olduğu belirlenmiştir. Bu sonuca göre HLA-DQB1*02 alleli ile postmenopozal meme kanseri oluşumu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir negatif ilişki saptanmıştır ($p=0,022$). İstatistiksel hesaplamalardan çıkardığımız sonuca göre bu allele sahip bireylerdeki postmenopozal meme kanseri gözlenme riskinin, bu allele sahip olmayan bireylere göre 3,09 kat daha düşük olması bizi; HLA-DQB1*02 alleli postmenopozal meme kanseri için de koruyucu bir role sahip olabilir diye düşündürmektedir.

Premenopozal meme kanseri tanısı almış hasta grubu ve premenopozal kontrol grubu değerlendirildiğinde; herhangi bir HLA-DRB1 ve HLA-DQB1 alleli ile meme kanseri oluşumu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmamıştır. Postmenopozal grupta daha anlamlı sonuçların çıkmasına rağmen; premenopozal grupta istatistiksel olarak anlamlı bir sonuca ulaşamamızın bir sebebi olarak; premenopozal kanserlerin daha çok bazı özel gen mutasyonlarıyla ve onkojenlerle ilişkili olması gösterilebilir diye düşünmekteyiz. Muhtemelen bu tür onkojenler veya gen mutasyonları premenopozal meme kanseri gelişimi üzerine daha etkili olabilmekte ve olası bir HLA allel spesifikliğini ortadan kaldırmaktadır.

Hasta grubunun HLA-DRB1 ve HLA-DQB1 tiplendirme sonuçları tümörün evresine göre değerlendirilmiştir. Evre 1 ve evre 2 farklı iki grup olarak ele alınırken evre 3 ve evre 4 bir grup altında değerlendirilmiştir. Değerlendirme sonucunda herhangi bir HLA-DRB1 ve HLA-DQB1 alleli ile meme tümörü evresi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmamıştır. Bunun en muhtemel sebeplerinden bir tanesi; hastaneye başvurma zamanının da tümörün evresini etkileyebilmesidir. Daha iyi bir prognoz gösterebilecek bir tümöre sahip hasta eğer hastaneye başvuruda gecikmişse bu hastanın tümörü bile daha

yüksek bir evrede değerlendirilecektir. Bu yüzden tümör evresi ile allel frekansı arasında bir bağlantı kurmak zor olmaktadır diye düşünmekteyiz.

Hasta grubunun HLA-DRB1 tiplendirme sonuçları östrojen ve progesteron reseptörlerinin varlığına göre değerlendirilmiştir. Her iki reseptör için malign hücrelerin en az %20'sinde nükleer boyanması olan örnekler reseptör pozitif kabul edilmiştir. Değerlendirme sonucunda herhangi bir HLA-DRB1 alleli ile östrojen reseptörünün varlığı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmamıştır. Ancak progesteron reseptörleri için yapılan değerlendirme sonucunda HLA-DRB1*13 allelinin progesteron reseptörü pozitif saptanan hasta grubunda görülme sıklığının %30,00 (6/20) olduğu; buna karşılık progesteron reseptörü negatif saptanan hasta grubunda görülme sıklığının ise %8,1 (5/62) olduğu belirlenmiştir. Bu sonuca göre HLA-DRB1*13 alleli ile meme kanserindeki progesteron reseptörü pozitifliği arasında istatistiksel olarak anlamlı bir pozitif ilişki saptanmıştır ($p=0,012$). Progesteron reseptörünün pozitif olması meme kanseri prognozu için olumlu bir parametredir³⁶. İstatistiksel hesaplamalardan çıkardığımız sonuca göre bu allele sahip bireylerdeki pozitif progesteron reseptörüne sahip olma şansının, bu allele sahip olmayan bireylere göre 4,89 kat daha yüksek olması bizi; HLA-DRB1*13 alleli hem progesteron reseptör pozitifliği ile hem de hormon terapisine olumlu yanıt ve göreceli bir iyi prognoz ile ilişki gösterebilir diye düşündürmektedir.

Hasta grubunun HLA-DQB1 tiplendirme sonuçları östrojen ve progesteron reseptörlerinin varlığına göre değerlendirilmiştir. Her iki reseptör için malign hücrelerin en az %20'sinde nükleer boyanması olan örnekler reseptör pozitif kabul edilmiştir. Değerlendirme sonucunda herhangi bir HLA-DQB1 alleli ile östrojen reseptörünün varlığı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmamıştır. Ancak progesteron reseptörleri için yapılan değerlendirme sonucunda HLA-DQB1*06 allelinin progesteron reseptörü pozitif saptanan hasta grubunda görülme sıklığının %45,00 (9/20) olduğu; buna karşılık progesteron reseptörü negatif saptanan hasta grubunda görülme sıklığının ise %12,1 (8/66) olduğu belirlenmiştir. Bu sonuca göre HLA-DQB1*06 alleli ile meme kanserindeki progesteron reseptörü pozitifliği arasında istatistiksel olarak anlamlı bir pozitif ilişki saptanmıştır ($p=0,001$). Progesteron reseptörünün pozitif olması meme kanseri prognozu için olumlu bir

parametredir. İstatistiksel hesaplamalardan çıkardığımız sonuca göre bu allele sahip bireylerdeki pozitif progesteron reseptörüne sahip olma şansının, bu allele sahip olmayan bireylere göre 5,93 kat daha yüksek olması bizi; HLA-DQB1*06 alleli hem progesteron reseptör pozitifliği ile hem de hormon terapisine olumlu yanıt ve göreceli bir iyi prognoz ile ilişki gösterebilir diye düşündürmektedir. HLA-DQB1*03 allelinin ise progesteron reseptörü pozitif saptanan hasta grubunda görülme sıklığının %20,00 (4/20) olduğu; buna karşılık progesteron reseptörü negatif saptanan hasta grubunda görülme sıklığının ise %53,00 (35/66) olduğu belirlenmiştir. Bu sonuca göre HLA-DQB1*03 alleli ile meme kanserindeki progesteron reseptörü pozitifliği arasında istatistiksel olarak anlamlı bir negatif ilişki saptanmıştır ($p=0,009$). İstatistiksel hesaplamalardan çıkardığımız sonuca göre bu allele sahip bireylerdeki pozitif progesteron reseptörüne sahip olma şansının, bu allele sahip olmayan bireylere göre 4,52 kat daha düşük olması bizi; HLA-DQB1*03 alleli hem progesteron reseptör negatifliği ile hem de hormon terapisine olumsuz yanıt ve göreceli bir kötü prognoz ile ilişki gösterebilir diye düşündürmektedir.

Hasta grubunun HLA-DRB1 tiplendirme sonuçları c-erb-B2 molekülünün varlığına göre değerlendirilmiştir. Değerlendirme sonucunda HLA-DRB1*04 allelinin c-erb-B2 pozitif saptanan hasta grubunda görülme sıklığının %26,66 (8/30) olduğu; buna karşılık c-erb-B2 negatif saptanan hasta grubunda görülme sıklığının ise %8,69 (4/46) olduğu belirlenmiştir. Bu sonuca göre HLA-DRB1*04 alleli ile meme kanserindeki c-erb-B2 pozitifliği arasında istatistiksel olarak anlamlı bir pozitif ilişki saptanmıştır ($p=0,036$). Genel olarak sağkalımda bir azalma ile c-erb-B2 pozitifliği arasında bir ilişki mevcuttur. c-erb-B2 'nin amplifikasyonu ya da ekspresyonunun agresif meme kanserlerinde daha sık görüldüğü saptanmıştır²⁹. İstatistiksel hesaplamalardan çıkardığımız sonuca göre bu allele sahip bireylerdeki c-erb-B2 molekülünün pozitif saptanma şansının; bu allele sahip olmayan bireylere göre 3,82 kat daha yüksek olması bizi; HLA-DRB1*04 alleli hem c-erb-B2 pozitifliği ile hem de kanserin agresifliği ve kötü prognozu ile ilişkili olabilir diye düşündürmektedir.

Hasta grubunun HLA-DQB1 tiplendirme sonuçları c-erb-B2 molekülünün varlığına göre değerlendirilmiştir. Değerlendirme sonucunda HLA-DQB1*02 allelinin c-erb-B2 pozitif saptanan hasta grubunda görülme sıklığının %3,125

(1/32) olduğu; buna karşılık c-erb-B2 negatif saptanan hasta grubunda görülme sıklığının ise %18,75 (9/48) olduğu belirlenmiştir. Bu sonuca göre HLA-DQB1*02 alleli ile meme kanserindeki c-erb-B2 pozitifliği arasında istatistiksel olarak anlamlı bir negatif ilişki saptanmıştır (p=0,038). İstatistiksel hesaplamalardan çıkardığımız sonuca göre bu allele sahip bireylerdeki c-erb-B2 molekülünün pozitif saptanma şansının; bu allele sahip olmayan bireylere göre 7,14 kat daha düşük olması bizi; HLA-DQB1*02 alleli hem C-erb-B2 negatifliği ile hem de daha iyi bir prognoz ile ilişki gösterebilir diye düşündürmektedir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmada;

1. HLA-DRB1*03 alleli ile meme kanseri oluşumu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir negatif ilişki saptanması ve bu allele sahip olan bireylerde meme kanserinin gözlenme riskinin; bu allele sahip olmayan bireylere göre 2,65 kat daha düşük olması; HLA-DRB1*03 allelinin meme kanseri için koruyucu bir allel olabileceğini düşündürülebilir.
2. HLA-DQB1*02 alleli ile meme kanseri oluşumu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir negatif ilişki saptanması ve bu allele sahip olan bireylerde meme kanserinin gözlenme riskinin; bu allele sahip olmayan bireylere göre 2,32 kat daha düşük olması; HLA-DQB1*02 allelinin meme kanseri için koruyucu bir allel olabileceğini düşündürülebilir.
3. HLA-DQB1*02 alleli ile postmenopozal meme kanseri oluşumu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir negatif ilişki saptanması ve bu allele sahip olan bireylerde postmenopozal meme kanserinin gözlenme riskinin; bu allele sahip olmayan bireylere göre 3,09 kat daha düşük olması; HLA-DQB1*02 allelinin postmenopozal meme kanseri için koruyucu bir allel olabileceğini düşündürülebilir.
4. HLA-DRB1*13 alleli ile meme kanserindeki progesteron reseptörü pozitifliği arasında istatistiksel olarak anlamlı bir pozitif ilişki saptanması ve bu allele sahip olan bireylerde pozitif progesteron reseptörüne sahip olma şansının; bu allele sahip olmayan bireylere göre 4,89 kat daha yüksek olması; HLA-DRB1*13 allelinin hem progesteron reseptör pozitifliği ile hem de hormon terapisine olumlu yanıt ve göreceli bir iyi prognoz ile ilişki olabileceğini düşündürülebilir.
5. HLA-DQB1*06 alleli ile meme kanserindeki progesteron reseptörü pozitifliği arasında istatistiksel olarak anlamlı bir pozitif ilişki saptanması ve bu allele sahip olan bireylerde pozitif progesteron reseptörüne sahip olma şansının; bu allele sahip olmayan bireylere göre 5,93 kat daha yüksek olması; HLA-DQB1*06 allelinin hem progesteron reseptör pozitifliği ile hem de hormon terapisine olumlu yanıt ve göreceli bir iyi prognoz ile ilişki olabileceğini düşündürülebilir.

6. HLA-DQB1*03 alleli ile meme kanserindeki progesteron reseptörü pozitifliği arasında istatistiksel olarak anlamlı bir negatif ilişki saptanması ve bu allele sahip olan bireylerde pozitif progesteron reseptörüne sahip olma şansının; bu allele sahip olmayan bireylere göre 4,52 kat daha düşük olması; HLA-DQB1*03 allelinin hem progesteron reseptör negatifliği ile hem de hormon terapisine olumsuz yanıt ve göreceli bir kötü prognoz ile ilişki olabileceğini düşündürebilir.
7. HLA-DRB1*04 alleli ile meme kanserindeki c-erb-B2 pozitifliği arasında istatistiksel olarak anlamlı bir pozitif ilişki saptanması ve bu allele sahip olan bireylerde c-erb-B2 molekülünün pozitif saptanma şansının; bu allele sahip olmayan bireylere göre 3,82 kat daha yüksek olması; HLA-DRB1*04 allelinin hem c-erb-B2 pozitifliği ile hem de kanserin agresifliği ve kötü prognozu ile ilişki olabileceğini düşündürebilir.
8. HLA-DQB1*02 alleli ile meme kanserindeki c-erb-B2 pozitifliği arasında istatistiksel olarak anlamlı bir negatif ilişki saptanması ve bu allele sahip olan bireylerde c-erb-B2 molekülünün pozitif saptanma şansının; bu allele sahip olmayan bireylere göre 7,14 kat daha düşük olması; HLA-DQB1*02 allelinin hem c-erb-B2 negatifliği ile hem de daha iyi bir prognoz ile ilişki olabileceğini düşündürebilir.
9. HLA-DQB1*02 allelinin; a) hasta ve kontrol grubu arasında yapılan analizinde, b) postmenopozal meme kanseri tanısı alan hasta grubu ve postmenopozal kontrol grubu arasında yapılan analizinde, c) C-erb-B2 molekülü bakımından pozitif olan hasta grubuyla negatif olan hasta grubu arasında yapılan analizinde elde edilen tüm sonuçlara göre; HLA-DQB1*02 alleli hem meme kanseri için koruyucu bir allel olarak, hem de kanserin daha iyi bir prognoza sahip olmasında rol oynayabilen bir allel olarak düşünülebilir.
10. Meme kanseri için koruyucu olduğu veya iyi prognoz ile ilişkili olduğu düşünülen allellerin; teorik olarak henüz saptanmamış bir gelişim düzenleyici gen ile bağlantı dengesizliği durumunda bulunabildiği ve meme tümör gelişimini suprese edebildiği varsayımlanabilir. Koruyucu olduğu düşünülen allellere sahip bireylerin antijen sunucu hücreleri; belki de diğer hücrelere göre tümör antijenlerini çok daha erken bir dönemde ve daha etkili bir şekilde T hücrelerine sunabilirler. Meme kanserine dirençli kişilerdeki

spesifik sınıf-2 HLA moleküllerinin antijen bağlayıcı oyuklarında koruyucu spesifik peptitler yerleşmiş olabilir. İşte bu tip özel sınıf-2 HLA allellerinin tiplendirilmesinin prognostik bir değer taşıyabileceğini düşünmekteyiz. Eğer bu allellerin koruyucu değerleri doğrulanırsa, bu spesifik alleller çeşitli yöntemlerle hematopoetik hücelere ve dentritik hücelere yerleştirilerek kanser hastalarına nakil edilebilir ve böylelikle kanser hastalarında tedavi düşünülebilir. Ayrıca IL-2 ve interferon gama gibi sitokin tedavisi ile bu koruyucu MHC sınıf-2 moleküllerinin ekspresyonu arttırılarak meme kanseri tedavisine desekte bulunulabilir. Böylece bu spesifik koruyucu alleller; tümör hücrelerine karşı bir nevi aşı veya immün terapi şeklinde uygulanabilir. Sonuç olarak bu tip koruyucu allellerin hem hastalığın profilaksisinde, hem de hasta bireylerin tedavisinde kullanılabilme potansiyeline sahip olduğunu düşünmekteyiz.

11. HLA-DRB1*04 gibi kötü prognoz ile ilişkili olduğu düşünülen allellerin; muhtemelen tümöre karşı hücrelerin gerçekleştirdiği savunma mekanizmasında bir zayıflığa ve fonksiyon bozukluğuna neden olabildiklerini düşünmekteyiz. Belki de bu tür allel ekspresyonu yapan hücreler yeterli miktarda tümör antijenini T hücrelerine sunamamakta ve böylece uygun bir antitümöral immün yanıt oluşmamaktadır. Antijenlerin MHC moleküllerine bağlanmalarında, hücre yüzeyine taşınımında ve T hücrelerine sunumlarında meydana gelebilecek fonksiyon bozukluklarının bu tür alleller ile ilişkili olabileceğini düşünmekteyiz. Bu yüzden bu tür allellerin tiplendirilmesinin; hem tümöre karşı gerçekleşen immün yanıtın gözlenmesinde hem de prognoz ve tedaviye verilen yanıt hakkında bize değerli bilgiler verebileceğini düşünmekteyiz. Ayrıca gelecekte meme kanserine yatkınlığı gösteren allel tiplerinin saptanmasıyla; risk altında olduğu düşünülen hastalar için çok daha özenli bir tarama ve takip sisteminin geliştirilebileceğini düşünmekteyiz.

12. Yaptığımız bu çalışmada saptanan sonuçlar sadece Mersin bölgesi içindir ve küçük bir grup üzerinde gerçekleştirilmiştir. Ayrıca HLA tiplendirme sonuçları düşük çözünürlüklü olarak elde edilmiştir. Bu yüzden istatistiksel olarak bile anlamlı bulduğumuz sonuçların genel bir kabul görmesi için daha geniş çaplı ve yüksek çözünürlüklü yöntemlerin kullanıldığı çalışmaların yapılması gerektiğini düşünmekteyiz.

7. KAYNAKLAR

1. Greenlee RT, Murray T, Bolden S, et al. Cancer Statistics, 2000. CA Cancer J. Clin: 50; 7-33: 2000.
2. Margolese R.G, Fisher B, Hortobagyi G.N, Bloomer W.D. Neoplasms Of The Breast. In: Holland JF, Frei E (eds). Cancer Medicine 5th. Edition. An Approved Publication Of The American Cancer Society. B.C. Decker Inc. Hamilton, London. 2000. Chapter 118. 1738-1755.
3. www.saglik.gov.tr/extras/birimler/ksdb/meme_kanseri.doc. Erişim tarihi: 04.02.2006.
4. Baccar HA, Yacobi LB, Troudi W. HLA Class II Polymorphism: Protective or Risk Factors to Breast Cancer in Tunisia? PATHOLOGY ONCOLOGY RESEARCH. Vol 12, No 2, 2006.
5. Davla K. Her Yerde Karşımda; Nedir Bu HLA Tiplendirimi. XXXI. Ulusal Hematoloji Kongresi, IV. Hematoloji İlk Basamak Kursu.
6. Roitt IM, Delves PJ. Membrane Receptors For Antigen. Roitt's Essential Immunology. Blackwell Science. Tenth Edition. 2001. Chapter 4. 62–79.
7. Margulies DH. The Majör Histocompatibility Complex. In: William EP (eds). Fundamental Immunology, Fourth Edition, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia 1999. Chapter 8. 263–280.
8. Beksaç M. HLA ve Doku Tiplendirilmesi. Türk Hematoloji Derneği Kan ve Kemik İliği Transplantasyon Kursu.
9. Nepom GT, Taurog JD. The Majör Histocompatibility Gene Complex. In: Fauci AS (eds). Harrisons's Principles Of Internal Medicine. 15th Edition Vol.2 Mc Graw-Hill Medical Publishing Division 2001. Chapter 306. 1830-1836.
10. Uçar F, Ovalı E, Değer O, Önder E, Kartı S. MHC Gen Kompleksi ve HLA Doku Tiplemesi Testlerinin Önemi. İbni Sina Tıp Dergisi 6, 2001. 117-124.
11. Çarın M: Transplantasyon İmmunolojisi (HLA sistemi) Kilinik gelişim Dergisi 10 (1-2): 7-11, 1997.
12. Roitt IM, Delves PJ. The Primary İnteraction With Antigen. Roitt's Essential Immunology. Blackwell Science. Tenth Edition. 2001. Chapter 5. 90-107.

13. Germain RN. Antigen Processing and Presentation. In: William EP (eds). Fundamental Immunology, Fourth Edition, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia 1999. Chapter 9. 287–320.
14. Greenfield JJ, High S. The Sec61 complex is located in both the ER and the ER-Golgi intermediate compartment. Journal of Cell Science. 1999; Vol 112, Issue 10 1477-1486.
15. Oliver JD, Roderick H, Llewellyn DH, High S. ERp57 Functions as a Subunit of Specific Complexes Formed with the ER Lectins Calreticulin and Calnexin. Molecular Biology of the Cell Vol. 10, 2573-2582, August 1999.
16. Roitt IM, Delves PJ. Lymphocyte Activation. Roitt's Essential Immunology. Blackwell Science. Tenth Edition. 2001. Chapter 9. 164-166.
17. Yogita G, Kaplana J, Arvind C, Bhushan P. HLA an Disease. European Journal Epidemiology (2005): 475-488.
18. Roitt I.M, Delves P.J. Transplantation. Roitt's Essential Immunology. Blackwell Science. Tenth Edition. 2001. Chapter 17. 355-369.
19. Spratt JS, Tabin GR. Gross anatomy of the breast. In: Donegan WL, Spratt JS (eds). Cancer of the breast. 4th edition. Philadelphia. London: W.B.Saunders. 1995. 22-42.
20. Tekin EH, Kurukahvecioğlu O, Yusufzade K. Jinekolojik ve Obstetrikal Cerrahi. Türkiye, İstanbul. Güneş Kitapevi: 1254-1269;2005.
21. <http://www.tamer-akca.com/dersler.html>. Erişim tarihi: 09.04.2007
22. http://www.cancer.org/docroot/CRI/content/CRI_2_4_2X_What_are_the_risk_factors_for_brast_cancer_5.asp. Erişim tarihi: 01.04.2007.
23. http://www.cancer.gov/cancertopics/pdg/genetics/breast-and-ovarian/healthprofessional#Section_340. Erişim tarihi: 01.04.2007.
24. <http://www.advisorybodies.doh.gov.uk/pdfs/alco04nontech.pdf>. Erişim tarihi: 02.04.2007.
25. <http://news.bbc.co.uk/1/hi/health/5171838.stm>. Erişim tarihi: 02.04.2007.
26. http://news.independent.co.uk/uk/health_mwdical/article_1090208.ece. Erişim tarihi: 02.04.2007.

27. Ustaoglu C. Meme Hastalıklarında Görüntüleme Yöntemleri ve Isparta Yöresi Meme Kanseri Tarama Sonuçlarımız . Uzmanlık tezi. Süleyman Demirel Ün. Radyodiagnostik AD.
28. Glover D. Onkolojik Hastalıklar. In: Myers A.R (eds), Yılmaz C (çeviri). National Medical Series For Independent Study. Williams&Wilkins. 1997. Bölüm 4. 155–161.
29. <http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/treatment/breast/HealthProfessional/page3>. Erişim tarihi: 02.04.2007.
30. Moyak D. Breast: Lokally Advanced (T3 and T4) and Recurrent Tumors. In: Perez CA, Brady LW (eds), Principles and Practice of Radiation Oncology. (2 nd ed). J.B Lippincott Company, Philadelphia 1992, pp 877-969.
31. Chan D, Sell S. Tümör Belirteçleri. In: Burtis AC, Ashwood ER (eds), Haklar G (çeviri). Tietz Klinik Kimyada Temel İlkeler. Beşinci baskıdan çeviri. Palme Yayıncılık. 2005; Konu 21, 409-412.
32. Kenemans P, Verstraeten R, Verheijen RHM. Oncogenic pathways in hereditary and sporadic breast cancer. Maturitas 49 (2004) 34–43.
33. Hui R, Ball JR, Macmillan RD. EMS1 gene expression in primary breast cancer: relationship to cyclin D1 and oestrogen receptor expression and patient survival. Nature. 1998, Volume 17, Number 8, Pages 1053-1059
34. Sellers TA. Genetic Factors in the Pathogenesis of Breast Cancer: Their Role and Relative Importance. Symposium: Diet, Anthropometry and Breast Cancer: Integration of Experimental and Epidemiologic Approaches. 1997 American Society for Nutritional Sciences.
35. Gronowski AM, Landau-Levine ME. Üremenin Endokrin İşlevi. In: Burtis AC, Ashwood ER (eds), Köseoğlu M (çeviri). Tietz Klinik Kimyada Temel İlkeler. Beşinci baskıdan çeviri. Palme Yayıncılık. 2005; Konu 42, 883-887.
36. Tavanssol F. Pathology of the breast. 2nd Ed. Stamford, Connecticut: Appleton & Lange, 1999;52-53.
37. Molino A, Micciolo R, Turazza M. Prognostic significance of estrogen receptors in 405 primary breast cancers. Breast Cancer Res Treat, 1997; 45(3): 241-9.

38. Chan D, Sell S. Tümör Belirteçleri. In: Burtis AC, Ashwood ER (eds), Haklar G (çeviri). Tietz Klinik Kimyada Temel İlkeler. Beşinci baskıdan çeviri. Palme Yayıncılık. 2005; Konu 21, 407-408.
39. Ghaderi A, Talei A, Gharesi-Fard B, Farjadhian SH, Amırzaragar A, Vasei M. HLA-DRB 1 Alleles and the Susceptibility of Iranian Patients with Breast Cancer. Pathology Oncology Research Vol 7, No 1, 2001.
40. Chaudhuri S, Cariappa A, Tang M, Bell D. Genetic susceptibility to breast cancer: HLA DQB*03032 and HLA DRB1*11 may represent protective alleles. PNAS October 10, 2000 vol. 97 no. 21 11451–11454.
41. Redondo M, Garcia J, Villar E. Major Histocompatibility Complex Status in Breast Carcinogenesis and Relationship to Apoptosis. Human Pathology Volume 34, No. 12 (December 2003).
42. Feinmesser M, Sulkes A, Morgenstern S, Sulkes J, Stern S, Okon E. HLA-DR and β_2 microglobulin expression in medullary and atypical medullary carcinoma of the breast: histopathologically similar but biologically distinct entities. J Clin Pathol 2000;53:286–291.
43. Natali PG, Giacomini P, Bigotti A, et al. Heterogeneity in the expression of HLA and tumor associated antigens by surgically removed and cultured breast carcinoma cells. Cancer Res 1983;43:660-8.
44. Bartek J, Pertek M, Vogtesek B, et al. HLA-DR antigens on differentiating human mammary gland epithelium and breast tumors. Br J Cancer 1987;56:727-33.
45. Lazzaro B, Anderson AE, Kajdacsy-Balla A, Hessner MJ. Antigenic characterization of medullary carcinoma of the breast: HLA-DR expression in lymph node positive cases. Appl Immunohistochem Mol Morphol. 2001 Sep;9(3):234-41.
46. Concha A, Ruiz-Cabello F, Cabrera T. Different patterns of HLA-DR antigen expression in normal epithelium, hyperplastic and neoplastic malignant lesions of the breast. Eur J Immunogenet. 1995 Aug;22(4):299-310.
47. Tamiolakis D, Venizelos I, Lambropoulou M. Gains and losses of HLA class II (DR) and CD4 in atypical hyperplasia, carcinoma in situ and infiltrating ductal carcinoma of the breast. Acta Medica (Hradec Kralove). 2004;47(4):257-62.

48. Zuk JA, Walker RA. HLA class II sublocus expression in benign and malignant breast epithelium. *J Pathol.* 1988 Aug;155(4):301-9.
49. Brunner CA, Gokel JM, Riethmuller, Johnson JP. Expression of HLA-D subloci DR and DQ by breast carcinomas is correlated with distinct parameters of favourable prognosis. *Eur J Cancer.* 1991;27(4):411-6.
50. Itoh Y, Mizuki N, Shimada T. High-throughput DNA typing of HLA A,-B,-C, and -DRB1 loci by PCR-SSOP-Luminex method in the Japanese population. *Immunogenetics.* Volume 57, Number 10 / November, 2005.

8. SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

MHC	Major Doku Uyuşum Kompleksi
HLA	İnsan Lökosit Antijeni
DNA	Deoksiribonükleik asit
LMP-1	Düşük Molekül Ağırlıklı Protein-1
LMP-2	Düşük Molekül Ağırlıklı Protein-2
TAP-1	Antijen İşlenmesi İle İlişkili Taşıyıcı-1
TAP-2	Antijen İşlenmesi İle İlişkili Taşıyıcı-2
HSP-70	Isı-Şok Proteini-70
TNF-α	Tümör Nekroz Faktör-alfa
TNF-β	Tümör Nekroz Faktör-beta
mHag	Minör Histokompatibilite Antijeni
GvHD	Graft versus Host Hastalığı
RFLP	Restriksiyon Fragmanı Uzunluk Polimorfizimi
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
β2m	Beta 2 mikroglobulin
Ig	İmmunglobulin
MLC	Karışık Lenfosit Kültürü
LT alfa	Lenfotoksin alfa
LT beta	Lenfotoxin beta
TCR	T Hücre Reseptörü
NK	Doğal Öldürücü Hücreler
MICA	MHC Sınıf I Zinciri-Bağlantılı Molekül A
MICB	MHC sınıf I Zinciri-Bağlantılı Molekül B
E.R.	Endoplazmik Retikulum
Ii	İnvariant Zincir
LAMP	Lizozomal Bağlantılı Membran Proteini
MIIC	MHC Sınıf II-Zenginleştirilmiş Kompartman
CD	Farklılaşma Kümesi
CLIP	Sınıf-II-İlişkili İnvariant Zincir Peptidi
BCR	B Hücre Reseptörü
ICAM	Hücreler Arası Adezyon Molekülü

LFA	Lenfosit Fonksiyonu İlişkili Antijen
APC	Antijen Sunucu Hücre
IL-1	İnterlökin-1
RNA	Ribonükleik Asit
VCAM	Vasküler Hücre Adezyon Molekülü
RA	Romatoid Artrit
IDDM	İnsülin Bağımlı Diabetes Mellitüs
MLR	Karışık Lenfosit Reaksiyonu
SSP	Sekansa Özgün Primer Kullanılması
SSOP	Sekansa Özgü Oligonükleotidler Kullanarak Hibridizasyon Yapılması
SSCP	Sekans Spesifik Konformasyonel Polimorfizm
SBT	Nükleik Asitlerin Dizi Analizi
HRT	Hormon Replasman Tedavisi
DCIS	Duktal Karsinoma İn Situ
LKIS	Lobuler Karsinoma İn situ
IDK	İnvaziv Duktal karsinom
SGOT	Serum Glutamat Oksaloasetat Transaminaz
SGPT	Serum Glutamat Pirüvat Transaminaz
LDH	Laktat Dehidrojenaz
İİAB	İnce İğne Aspirasyon Biyopsisi
EİK	Ekstensif İntraduktal Komponent
TLI	Timidin İşaretleme İndeksi
ER	Östrojen Reseptörü
PR	Progesteron Reseptörü
CHEK2	Hücre Siklüsü kontrol Noktası Kinaz-2
EGF	Epidermal Büyüme Faktörü
PTEN	Fosfataz ve Tensin Homolog Geni
NAT1	N-Asetil Transferaz-1
E2	Östrodiol
E1	Östron
EDTA	Etilendiaminotetraenoik asit
dNTP	Deoksi Nükleotit Trifosfatlar

9. ŞEKİLLER VE RESİMLER DİZİNİ

Şekiller	Sayfa No
Şekil 1 (HLA bölgesinin gen haritası)	11
Şekil 2 (Sınıf I ve Sınıf II MHC Moleküllerinin Yapısı)	12
Şekil 3 (HLA Sınıf I Molekölünün Üst Yüzeyinin Şematik Görünümü)	13
Şekil 4 (HLA Sınıf I Molekölünün Yandan Şematik Görünümü)	14
Şekil 5 (HLA-DR- α Zincirini Kodlayan Genler ve Düzenleyici Moleküller)	16
Şekil 6 (MHC Sınıf I Gen Haritası)	17
Şekil 7 (MHC sınıf II Gen Haritası)	17
Şekil 8 (MHC Sınıf III Gen Haritası)	17
Şekil 9 (CD1'in Moleküler Yapısı)	20
Şekil 10 (Sitozolik Proteinlerin Proteazom Aracılığı İle Yıkımı)	24
Şekil 11 (Endojen Antijenlerin Sınıf I MHC Tarafından İŞlenmesi ve Sunumu)	26
Şekil 12 (Eksojen Antijenlerin Sınıf II MHC Molekülleri Tarafından İŞlenmesi ve Sunumu)	27
Şekil 13 (MHC Sınıf II TaŐınımlı ve Peptit Yüklenmesinin Karikatürize Gösterimi)	28
Şekil 14 (Peptitlerin MHC Sınıf I'e Bağlanması)	29
Şekil 15 (Allel Spesifik Sınıf I Ceplere Peptit Bağlanması)	30
Şekil 16 (Sınıf I ve Sınıf II Bağlı Peptitlerin Kaynakları)	31
Şekil 17 (Allel Spesifik Sınıf II Ceplere Peptit Bağlanması)	32
Şekil 18 (Peptitlerin MHC Sınıf II'ye Bağlanması)	32
Şekil 19 (T-lenfositleri ve Antijen Sunucu Hücreler Arasındaki Etkileşimde Yer alan Moleküler Çiftlerin Göreceli Affiniteleri)	36
Şekil 20 (T-hücrelerin Aktivasyonu)	36
Şekil 21 (SSP Tekniği İle Yapılmış Bir Çalışmanın Görüntüsü)	41
Şekil 22 (Bağlantı Dengesizliği ve HLA ile Hastalık İlişkisi)	46

10. TABLOLAR DİZİNİ

Tablolar	Sayfa No
Tablo 1 (HLA bölgesindeki genlerin adları)	11
Tablo 2 (HLA Allellerini Tanımlarken Kullanılan Terminoloji)	38
Tablo 3 (HLA ve Hastalık İlişkisi)	45
Tablo 4 (Bağlantı Dengesizliği saptanan Genlerin Beklenen ve Gözlenen gen Frekansı)	45
Tablo 5 (Meme Kanseri Gelişiminde Etkili Risk Faktörleri)	53
Tablo 6 (High pure PCR template kit içeriği)	71
Tablo 7 (Amplifikasyon İçin Gerekli Reaksiyon İçerikleri)	75
Tablo 8 (Amplifikasyonda Kullanılan Thermal Cyclers Programı)	75
Tablo 9 (Hibridizasyonda Kullanılan Thermal Cyclers Programı)	76
Tablo 10 (Hasta ve Kontrol Grubunun Kişisel Bilgileri)	77
Tablo 11 (Hastaneye Başvuruya Neden Olan Yakınmalar)	77
Tablo 12 (Meme Kanseri Türü)	78
Tablo 13 (Hasta ve Kontrol Grubunun HLA-DRB1 Analiz Sonuçları)	80
Tablo 14 (Postmenopozal Meme Kanseri Tanısı Alan Hasta Grubu ve Postmenopozal Kontrol Grubunun HLA-DRB1 Analiz Sonuçları)	81
Tablo 15 (Premenopozal Meme Kanseri Tanısı Alan Hasta Grubu ve Premenopozal Kontrol Grubunun HLA-DRB1 Analiz Sonuçları)	81
Tablo 16 (Tümör Evresine Göre HLA-DRB1 Analiz sonuçları)	82
Tablo 17 (Östrojen Reseptörü Varlığına Göre Hasta Grubunun HLA-DRB1 Analiz Sonuçları)	83
Tablo 18 (Progesteron Reseptörü Varlığına Göre Hasta Grubunun HLA-DRB1 Analiz Sonuçları)	83
Tablo 19 (c-erb-B2 Varlığına Göre Hasta Grubunun HLA-DRB1 Analiz Sonuçları)	84
Tablo 20 (Hasta ve Kontrol Grubunun HLA-DQB1 Analiz Sonuçları)	85
Tablo 21 (Postmeapozal Meme Kanseri Tanısı Almış Hasta	

Grubu ve Postmenopozal Kontrol Grubunun HLA-DQB1 Analiz Sonuçları)	85
Tablo 22 (Premenopozal Meme Kanseri Tanısı Almış Hasta Grubu ve Premenopozal Kontrol Grubunun HLA-DQB1 Analiz Sonuçları)	86
Tablo 23 (Tümör Evresine Göre HLA-DQB1 Analiz sonuçları)	86
Tablo 24 (Östrojen Reseptörü Varlığına Göre Hasta Grubunun HLA-DQB1 Analiz Sonuçları)	87
Tablo 25 (Progesteron Reseptörü Varlığına Göre Hasta Grubunun HLA-DQB1 Analiz Sonuçları)	87
Tablo 26 (c-erb-B2 Varlığına Göre Hasta Grubunun HLA-DQB1 Analiz Sonuçları)	88

11. EKLER

Ek1: Onam Formu

Araştırmayı Yürüten Doktorun Beyanı:

Meme kanserinin oluşumunda rolü olan bazı genetik faktörlerin saptanması amacıyla yeni bir araştırma yapmaktayız. Araştırmamızın ismi 'MEME KANSERİNDE MHC SINIF-2 MOLEKÜLLERİNİN ROLÜ' dür. Bu çalışmaya 70 hasta, 45 sağlıklı bireyden oluşan toplam 135 kişi katılacaktır.

Sizin de bu araştırmaya katılmanızı öneriyoruz. Ancak hemen söyleyelim ki bu araştırmaya katılıp katılmamakta serbestsiniz. Çalışmaya katılım gönüllülük esasına dayalıdır. Kararınızdan önce araştırma hakkında sizi bilgilendirmek istiyoruz. Bu bilgileri okuyup anladıktan sonra araştırmaya katılmak isterseniz formu imzalayınız.

Araştırmaya davet edilmenizin nedeni meme kanseri öykünüzün bulunmasıdır. Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı ve Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı ortak katılımı ile bu hastalığın nedenlerini ortaya çıkaracak bir araştırma gerçekleştirilecektir.

Eğer araştırmaya katılmayı kabul ederseniz sizinle ilgilenen Genel Cerrahi Anabilim Dalı doktorları tarafından hastalığınızla ve sizinle ilgili bazı kayıtlar tutulacaktır. Bu kayıtlar ilerde tekrar incelenerek doğru tanı konulmasına yardımcı olacaktır. Bu kayıtlar kimliğiniz belirtilmeden tıp öğrencilerinin eğitiminde veya bilimsel nitelikte yayınlarda kullanılabilir. Bu amaçların dışında bu kayıtlar kullanılmayacak ve başkalarına verilmeyecektir.

Bu çalışmayı yapabilmek için kolunuzdan 5-10 ml. (1 hemogram tüpü) kadar kan almamız gerekmektedir. Bu kandan genetik materyal, DNA elde edilecektir. Bu aşamada başarısız olduğunda bir kez daha kan vermeniz istenebilir.

Bu çalışmaya katılmanız için sizden herhangi bir ücret istenmeyecektir. Çalışmaya katıldığınız için size ek bir ödeme de yapılmayacaktır.

Kan alınması sırasında oluşabilecek riskler: 1-) İğne batmasına bağlı olarak az bir acı duyabilirsiniz. 2-) Az bir ihtimal de olsa iğne batması sonrasında kanamanın uzaması veya enfeksiyon riski vardır. Bu araştırma için ekstra bir invaziv girişim yapılmayacaktır. Bunun dışında uygulanabilecek

işlemler araştırma ile ilgili olmayacaktır. Araştırma sırasında bir sağlık sorunu ile karşılaştığınızda; herhangi bir saatte, Dr Faik Deniz GÜN'ü, 3374300 (1530) no'lu telefondan ve Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'ndan arayabilirsiniz.

Yapılacak genetik testin getirebileceği olası riskler: Genetik bilginin kullanılmasına bağlı olarak sosyal, ekonomik ve psikolojik sorunlar ortaya çıkabilir. Size ait genetik bilginin gizli kalacağına dair elimizden geleni yapacağız. Yine hemen belirtmeliyiz ki; bu bilgiyi sizin dışınızda birisi ile paylaşmamız sadece sizin izninizle olacaktır. Genetik testlerin önemli bir riski de bu testler sonucunda anne ya da babanın biyolojik kimliğinin de saptanmasıdır. Bu durumlarda gizlilik ilkesine bağlı kalınacaktır.

Yukarıda sayılanlar böylesi bir analizde yaşanabilecek potansiyel risklerdir. Ancak bunlardan en az oranda zarar görmeyi sağlamak için elimizden geleni yapacağız. Çalışmanın devamı sırasında ortaya çıkabilecek sorun ve riskler katılımcının/hastanın kendisine ya da ebeveyni/sorumlusuna iletilecektir.

Yapılacak genetik testin getireceği olası yararlar: Böyle bir analiz sayesinde meme kanserinin oluşumunda etkili olan genetik faktörler hakkında bilgi sahibi olabileceğiz ve tedavisinde daha etkili yöntemler uygulayabileceğiz. Şu anda bu çalışmanın hemen size bir fayda olarak dönüp dönmeyeceğini bilmiyoruz. Ancak ilgili hastalığın temelinde yatan nedenlerin öğrenilmesi ileride ilgili hastalıktan etkilenmiş bireylere fayda sağlayacaktır.

Bu çalışmaya katılmayı reddedebilirsiniz. Bu araştırmaya katılmak tamamen isteğe bağlıdır ve reddettiğiniz takdirde size uygulanan tedavide herhangi bir değişiklik olmayacaktır. Yine çalışmanın herhangi bir aşamasında onayınızı çekmek hakkına da sahiptir. Ayrıca kendi rızanıza bakılmaksızın araştırmacı tarafından araştırma harici bırakılabilirsiniz.

Yukarıdaki gönüllü araştırmadan önce verilmesi gereken bilgileri gösteren metni okudum. Bunlar hakkında bana yazılı* ve sözlü açıklamalar yapıldı. Bu koşullarla söz konusu Klinik Araştırmaya kendi rızamla, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın katılmayı kabul ediyorum.

Gönüllünün Adı Soyadı:.....

İmzası:.....

Adresi (varsa telefon no, faks

no):.....

Velayet veya vesayet altında bulunanlar için veli veya vasiinin:

Adı Soyadı:.....

İmzası:.....

Adresi(varsa telefon no,

faksno):.....

Açıklamaları yapan araştırmacının:

Adı

Soyadı:.....İmzası:.....

.....

Ek 2: Hasta Takip Formu

Meme Kanseri Araştırma Formu

Ad-Soyad:

Tarih:

Yaş:

Dosya No:

Yakınma:

Menopoz:

Sigara:

Alkol:

Doğum sayısı:

Ailede meme Ca:

Ailede over Ca:

Ailede diğeri Ca:

Geçirilmiş meme hastalığı:

HRT: OKS:

Meme kanseri türü:

Hangi meme:

Lokalizasyon:

Evre:

ER:

PR:

C-erb-B2: