

KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI

**MEME KANSERİNİN ADİPONEKTİN GEN POLİMORFİZMİ
İLE İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

DR. BURCU ERBAY

KOCAELİ 2014

KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI

**MEME KANSERİNİN ADİPONEKTİN GEN POLİMORFİZMİ İLE
İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

DR. BURCU ERBAY

TEZ DANIŞMANI: Prof. Dr. Nihat Zafer UTKAN

ANABİLİM DALI BAŞKANI: Prof. Dr. Nihat Zafer UTKAN

Etik Kurul Onay Tarihi:

Proje No: KAEK 2013/205

ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR

Meme kanseri dünya çapında kadınlarda en sık görülen kanser türlerinden biridir. Günümüzde sıklığı artan obezite ise meme kanseri gelişiminde postmenapozal kadınlarda bağımsız bir risk faktörüdür. Yapılan çalışmalarda BMI arttıkça kadınlarda meme kanseri gelişme riskinin arttığı, prognozunun kötüleştiği ve yaşam süresinin kısaldığı görülmüştür.

Günümüzde obezite arasındaki ilişki tam açıklanamazsa da adipoz dokudan salgılanan ve adipokin adı verilen sitokin benzeri proteinlerin meme kanserine yol açtığı düşünülmektedir (özellikle adiponektin ve leptin). Çeşitli adiponektin polimorfizmlerinin adiponektin seviyelerini etkilediği gösterilmiştir.

Çalışmamızda polimorfizmin meme kanseri ile ilişkisi ve bu hastalarda serum adiponektin ve leptin seviyeleri ile ilişkileri incelenmiştir. Meme kanserli vakalar ile kontrollerin, adiponektin ve tip 1 reseptörünü kodlayan genlerdeki tek nükleotit polimorfizminin (SNP) meme kanseri ile ilişkisi değerlendirilmiştir.

Genel Cerrahi eğitimim ve tez ile ilgili çalışmalarım sırasında yakın ilgi ve sabırlarını benden esirgemeyerek bilgi ve tecrübelerini hoşgörü ile aktaran, bu konuda bana çalışma fırsatı veren sayın hocam Prof. Dr. Zafer Utkan'a; Genel Cerrahi eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan hocalarım Prof. Dr. Mustafa Dülger, Prof. Dr. Oğuz Özbay, Prof. Dr. Zafer Cantürk, Prof. Dr. Ahmet Alponat, Prof. Dr. Nuri Gönüllü, Prof. Dr. Anıl Çubukçu, Doç. Dr. Erdem Okay, Doç. Dr. Oğuzhan Büyükgebiz, Yrd. Doç. Dr. Oktay Yirmibeşoğlu, Yrd. Doç. Dr. Utku Yılmaz, Yrd. Doç. Dr. Ata Güler'e; asistanlığım süresince birlikte günler ve geceler geçirdiğim asistan arkadaşlarıma; tezim için büyük çalışma ve katkıları olan sayın Yrd. Doç. Dr. Emel Ergül ve tüm ekibine, Yrd. Doç. Dr. Ceyla Aldemir ve tüm ekibine herşey için teşekkür ederim.

Mart - 2014

Burcu Erbay

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR.....	i
İÇİNDEKİLER	ii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	iii
TABLolar DİZİNİ	iv
KISALTMALAR	v
ÖZET.....	vi
ABSTRACT	vii
1. GİRİŞ	1
1.1. Meme Kanseri Tarihçesi.....	3
1.2. Meme Anatomisi	4
1.2.1. Memenin arterleri ve venleri.....	4
1.2.2. Memenin sinirleri	5
1.2.3. Memenin enfatik sistemi ve aksiler lenf nodülleri.....	5
1.2.4. Meme fizyolojisi	7
1.3. Meme kanseri hakkında genel bilgiler	8
1.3.1. Meme kanseri risk faktörleri	8
1.3.2. Meme kanserinde prognostik ve prediktif faktörler.....	20
1.3.4. Meme kanseri tedavisine genel bakış.....	24
2. GEREÇ ve YÖNTEM.....	28
2.1. Gereçler	28
2.2. Kullanılan Araç ve Gereçler	28
2.2.1. Kimyasallar	28
2.2.2. Kullanılan tampon ve çözeltiler	28
2.2.3. Araç ve gereçler	30
2.3. Metodlar.....	31
2.3.1. Numune alınması ve hazırlık işlemleri	31
2.3.2. Periferik kandan DNA izolasyonu	31
2.3.3. DNA konsantrasyonu ve saflığın ölçümü	32
2.4. Genotipleme.....	32
2.4.1. PCR	32
2.5. İstatiksel Analiz	35
3. BULGULAR	36
4. TARTIŞMA	39

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Obezite bağımlı çeşitli hastalıklarda adiponektinin rolü.....	21
Şekil 1.2. Adiponektin bağımlı olarak gelişen meme kanser hücrelerinin migrasyon ve invazyonunun inhibisyonunun moleküler mekanizması...	13
Şekil 1.3. Ob-Rb reseptörü etki mekanizması.....	16
Şekil 1.4. Leptin ve inflamatuvar sitokinlerin meme kanserindeki rolü.....	17



TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1.1.	Manchester sınıflaması.....	22
Tablo 1.2.	Meme Kanseri İçin Amerikan Birleşik Komitesinin Kansere Evreleme Sistemi (p) T (Primer Tümör).....	22
Tablo 1.3.	Meme Kanseri İçin Amerikan Birleşik Komitesinin Kansere Evreleme Sistemi (p) N (Bölgesel Lenf Nodları).....	23
Tablo 1.4.	Meme kanseri için Amerikan Birleşik Komitesinin Kansere Evreleme Sistemi (Uzak metastaz).....	23
Tablo 1.5.	Anatomik evre/pragnostik gruplar.....	24
Tablo 2.1.	Kullanılan kimyasallar, firma ve kodları.....	29
Tablo 3.1.	Hasta grubunun demografik verileri.....	36
Tablo 3.2.	Grup istatistikleri.....	37
Tablo 3.3.	Adiponektin genindeki SNP*276 allel frekansları genotip dağılımı (Chi ² :2,694; p:0,260).....	38
Tablo 3.4.	Adiponektin genindeki SNP45 allel frekansları genotip dağılımı (chi ² :1,126; P:0,569).....	38

KISALTMALAR

PCR	: Polymerase chain reaction
BRCA	: Breast cancer
ER	: Östrojen reseptörü
PR	: Progesteron reseptörü
AJCC	: American Joint Commitee on Cancer
UICC	: International Union Against Cancer
BMI	: Vücut kitle indeksi
TG	: Trigliserit
AKŞ	:Açlık kan şekeri
LDL	: Düşük dansiteli lipoprotein
HDL	: Yüksek dansiteli lipoprotein
IGF-1	: İnsülin benzeri büyüme faktörü-1

MEME KANSERİNİN ADİPONEKTİN GEN POLİMORFİZMİ İLE İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

ÖZET

Meme kanseri dünya çapında kadınlarda en sık görülen kanser türlerinden biridir. Kadınlarda kansere bağlı ölümlerin %18'i meme kanseri nedeniyle oluşmakta ve meme kanserine bağlı ölümler; akciğer ve kolorektal kanserlerden sonra üçüncü sırayı almaktadır. Obezite kaynaklı kanserler sosyo-epidemiyojik bir sağlık sorunu olarak görülmektedir. Yapılan çalışmalarda, BMI arttıkça kadınlarda meme kanseri gelişme riskinin arttığı, prognozunun kötüleştiği ve yaşam süresinin kısaldığı görülmüştür. Günümüzde obezite meme kanseri arasındaki ilişki tam açıklanamazsa da adipoz dokudan salgılanan ve adipokin adı verilen sitokin benzeri proteinlerin etkili olduğu düşünülmektedir. Çeşitli gruplarda, BMI düzeltildikten daha yüksek adiponektin düzeylerine sahip olan kadınların meme kanseri riskinde %65'lik azalma olduğu görülmüştür. Çeşitli adiponektin polimorfizmleri adiponektin seviyelerini etkilediği gösterilmiştir.

Bu çalışmada, söz konusu polimorfizmin meme kanseri ile ilişkisi ve bu hastalarda serum adiponektin ve leptin seviyeleri ile ilişkileri incelenmiştir. Çalışmada meme kanserli vakalar ile kontrollerin, adiponektin ve tip 1 reseptörünü kodlayan genlerdeki tek nükleotit polimorfizminin meme kanseri ile ilişkisi değerlendirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Meme Kanseri, Adiponektin, Gen Polimorfizmi,

INVESTIGATION OF THE CORRELATION BETWEEN BREAST CANCER AND GEN POLYMORFISM OF ADIPONECTIN

ABSTRACT

Breast cancer is the most common cancer in women worldwide, is one of the types. 18% of cancer-related death in women is caused by breast cancer and breast cancer-related deaths ranks third after the lung and colorectal cancers. Socio-epidemiological obesity -induced cancers are seen as a health problem. In the studies, as BMI increases the risk of developing breast cancer in women has increased, the prognosis is worse and it was observed that the shorter the lifetime. Today obesity and breast cancer relationship does not fully explained and adipokine secreted from adipose tissue also called cytokine-like proteins are believed to be effective. Several groups, has been corrected BMI higher adiponectin levels in women with breast cancer risk reduction of 65% was observed. Several polymorphisms of adiponectin have been shown to affect the levels of adiponectin.

In this study, the relationship between the mentioned polymorphism and breast cancer, the relationship between serum adiponectin and leptin levels in these patients were examined. Relationship of polymorphisms with breast cancer was investigated.

Key Words: Breast Cancer, Adiponectin, Gen Polymorphism

GİRİŞ

Meme kanseri dünya çapında kadınlarda en sık görülen kanser türlerinden biridir. 2013 yılında Amerika Birleşik Devletleri (A.B.D.)'nde 234,580 yeni olgu saptanmıştır [1]. Meme kanseri 30 yaşından önce nadiren görülür. 30 yaşından sonra görülme hızı giderek artar. Her kadının tüm yaşantısı boyunca bu kansere yakalanma olasılığı 1/6'dur [2]. Kadınlarda kansere bağlı ölümlerin %18'i meme kanseri nedeniyle oluşmakta ve meme kanserine bağlı ölümler; akciğer ve kolorektal kanserlerden sonra üçüncü sırayı almaktadır [3].

Günümüzde sıklığı artan obezite ise meme kanseri gelişiminde postmenapozal kadınlarda bağımsız bir risk faktörüdür [4-6]. Obezite kaynaklı kanserler günümüzde sosyo-epidemiolojik bir sağlık sorunu olarak görülmektedir. Dünya sağlık örgütü'nün verilerine göre dünyada 400 milyondan fazla obez insan olduğu ve bu sayının 2015 sonuna kadar 700 milyonu bulacağı öngörülmüştür [7]. Sağlıksız diyet ve yaşam tarzına bağlı obezitede, daha yüksek riskli ve düşük prognozlu kanser vakaları görülmektedir. A.B.D. popülasyonunda yapılan çalışmalarda tüm kanser vakalarında ölüm oranı obez hastalarda; erkeklerde %52, kadınlarda %62 normal kilodaki hastalara göre daha fazla olduğu görülmüştür [8]. Yapılan çalışmalarda BMI arttıkça kadınlarda meme kanseri gelişme riskinin arttığı, prognozunun kötüleştiği ve yaşam süresinin kısaldığı görülmüştür [9-12].

Günümüzde obezite meme kanseri arasındaki ilişki tam açıklanamazsa da adipoz dokudan salgılanan ve adipokin adı verilen sitokin benzeri proteinlerin etkili olduğu düşünülmektedir (özellikle adiponektin ve leptin). Yapılan in vitro ve prelinik çalışmalar da adiponektin meme kanser hücreleri üzerinde antiproliferatif etki gösterirken, leptin ise proliferasyonu artırıcı etkisi gösterilmiştir. Adiponektin ve leptin seviyeleri meme kanseri riski ile korele olduğu görülmüştür. Adipoz doku miktarı ile ters orantılı olan adiponektin seviyeleri, obezitede artmış meme kanseri riskini adiponektinin azalmış seviyelerini açıklayabilir [13]. Çeşitli gruplarda, BMI

düzeltildikten daha yüksek adiponektin düzeylerine sahip olan kadınların meme kanseri riskinde %65'lik azalma olduğu görülmüştür. Çeşitli adiponektin polimorfizmleri adiponektin seviyelerini etkilediği gösterilmiştir, ligandı ve adiponektin reseptörü tip 1 (AdipoR1)'in polimorfizmleri insülin direnci, kalp-damar hastalıkları ve DM riski ile ilişkilendirilmiştir.

Bu çalışmamızda bu polimorfizmin meme kanseri ile ilişkisi ve bu hastalarda serum adiponektin ve leptin seviyeleri ile ilişkileri incelendi. Çalışmada meme kanserli vakalar ile kontrollerin, adiponektin ve tip 1 reseptörünü kodlayan genlerdeki tek nükleotit polimorfizminin (SNP) meme kanseri ile ilişkisi değerlendirildi.



1. GENEL BİLGİLER

1.1. Meme Kanseri Tarihçesi

Meme hastalıklarına ilişkin en eski bilgi; cerrahi müdahale yapılmış olan 48 hastanın anlatıldığı Mısır papirüsüdür. Meme kanserinin kayıt altına alınmış en eski örneklerinden biri olan ve 45 hastanın kayıtlarını içeren bu yazıda, üzerinde elle dokunulabilen tümörler bulunan memenin, tedavi imkanının olmadığı anlatılmaktadır [14].

Meme kanseri ameliyatı ile ilgili ilk açıklamaları yapan; Bizanslı derlemeci Aetius'dur. Aetius, memenin yarısından biraz büyük ve uç kısmına yakın tümörlerin, cerrahi müdahaleye en uygun tümörler olduğunu belirtmiştir.

Aetius operasyonu şöyle tariflemiştir:

Hasta sırtüstü yatırılır. Sonra memenin kanserli bölgesi üzerinde kalan sağlam bölümüne bir yarık açılır ve kanama durana kadar dağlanır. Sonra yeni bir yarık daha açılır, yine memenin derinlerine kadar inilir ve değişik bölümleri dağlanır. Kanamanın durmasını sağlamak için kesi sonrası dağlama işlemi hızla yapılır. Bu yolla aşırı kanama tehlikesi engellenmiş olur. Kesme işlemi tamamlandığında kesilmiş tüm bölümler bir kez daha bütünü ile kuruyana kadar dağlanır. Yapılan ilk dağlamalar aşırı kanamayı engellemek için, geriye kalanlar ise hastalığın tüm kalıntılarını kökünden kazımak içindir. Bu meme kanseri ameliyatı, yüz yılların standart ameliyatı olmuştur.

Alman cerrah Wilhelm Fabry (1560-1634), meme kanserinin meme içinde pıhtılaşan ve sertleşen bir damla süttten kaynaklandığına inanıyordu. İlk başarılı Lumpektomi ameliyatını yapan Paris'te yaşayan Hollanda'lı Doktor Adrian Helvetius (1661-1741)'tur.

John Hopkins Üniversitesi'nden William Halsted tarafından XIX. Yüzyılın sonlarında geliştirilen radikal mastektomi, meme kanseri ameliyatlarının standart yöntemi olmuştur. Bu metot da rutin olarak tüm meme, lenf bezleri, pektoralis major ve minor kasları, interkostal kasların yüzeysel fasyaları ile birlikte blok halinde

çıkarılmaktadır. Bu yöntem daha sonraki altmış yıl Dr.Haagensen'in yaptığı modifikasyonla ağırlığını korumuştur. Yirminci yüzyılın ortalarından sonra radikal mastektomi, yerini daha ılımlı cerrahilere bırakmıştır.

1.2. Meme Anatomisi

Erişkin bir kadında meme glandı, genellikle ön göğüs duvarının yüzeysel pektoral fasyasının yüzeysel ve derin tabakaları arasında bulunur [15].

Memeler 2. ile 6-7.kostalar arasında yer alırlar. İçte sternumun kenarından dışta ön ve orta aksiller çizgiye kadar uzanırlar. Memenin gerçek sınırları ise yukarıda klavikula, medialde sternum ortası lateralde latissimus dorsi kasının ön kenarı ve aşağıda arkus kostaryuma kadar uzanabilir. Meme dokusu değişik derecelerde olmak üzere aksillaya doğru da uzanım gösterir (memenin aksiler kuyruğu) [16].

Memenin üst-dış kadrani diğer kadrana nazaran çok daha fazla glandüler elaman içerdiği için bu kadranda selim ve habis meme tümörleri daha sık görülür.

Laktasyonda olmayan bir memenin ağırlığı 150-200 gram, laktasyonda ise 400-500 gram kadardır [15]. Memenin çapları ve sınırları kadından kadına değişebileceği gibi aynı kadında; gebelik, emzirme, şişmanlama, zayıflama ve yaşlılık nedeniyle farklılık gösterebilir.

Meme dokusu; epiteliyal parankim, bunların muskuler ve fibröz destek elementleri ile değişken miktarda yağ, kan damarları, sinirler ve lenfatiklerden oluşur [17].

Epiteliyal parankim, her biri ayrı bir kanal ile meme başına açılan 20 veya daha fazla lobdan ibarettir [18]. 10 ile 100 arasındaki sayıda alveolun kanalcığı birleşerek bir lobül oluşturur. Bu lobüllerden 20-40 tanesinin kanalı birleşerek giderek büyür ve bir meme lobunu oluşturur. Sayıları 20 civarında olan süt boşaltıcı kanalları areola altında genişleyerek süt sinüslerini oluşturur. Bu süt sinüslerini örten epitelyum çok katlı yassı epiteldir [19, 20].

1.2.1. Memenin arterleri ve venleri

Memenin ana kan damarları;

- 1.İnternal mamaryan arterin perforan dalları,
- 2.Posterior interkostal arterlerin lateral dalları,
- 3.Aksiller arterden gelen dallardır.

Yüksek torasik, lateral torasik ve torakoakromial arterin pektoral dalları ikinci, üçüncü ve dördüncü anterior interkostal perforanlar ve internal mammaryan arterin dalları medial meme arterleri olarak memede dallanır [21, 22]. Lateral torasik arter, serratus anteriora, pektoralis major ve minöre ayrıca subskapularis kaslarına dallar verir. Memenin lateral damarları bu arterden kaynaklanır [23].

Meme ve göğüs duvarının venleri de arterlerin seyrini izler ve venöz drenaj primer olarak aksillaya doğrudur. 3 ana ven grubu;

1. İnternal torasik venin perforan dalları,
2. Posterior interkostal venlerin perforan dalları,
3. Aksiller venin küçük dallarıdır.

Vertebrayı saran ve kafatasının tabanından sakruma doğru uzanan Batson vertebral venöz pleksusu, meme kanserinin vertebra, kafa kemikleri, pelvik kemikler ve merkezi sinir sistemi metastazları için bir yol olabilir [18].

1.2.2. Memenin sinirleri

Memenin ve anterolateral göğüs duvarının duyusal inervasyonu üçten altıya kadar olan interkostal sinirlerin lateral kutanöz dalları tarafından sağlanır. Bu dallar interkostal boşluğa serratus anterior kasının lifleri arasından geçerek girer. İnterkostobrakiyal sinir, ikinci interkostal sinirin lateral kutanöz dalıdır ve aksillanın diseksiyonu sırasında görülebilir. İnterkostobrakiyal sinirin kesilmesi üst kolun medial yüzünde duyu kaybına neden olur [26].

1.2.3. Memenin enfatik sistemi ve aksiler lenf nodülleri

- 1.Yüzeyel lenfatikler (Deri lenfatikleri)

2. Derin lenfatikler (Parankimal lenfatikler)

Aksiller lenf nodları memeden gelen lenf akımının en önemli çıkış bölgesini oluşturur. Aksiller lenfatik sistem bir bütün oluşturmasına karşın, tarifi kolaylaştırmak ve meme kanserinin yayılma derecesini belirlemek amacıyla lenf nodları altı gruba ayrılarak incelenebilir [21]. Genellikle aksiller lenf nodlarının sayısı 20 ila 40 arasında değişir [15].

1. 4-6 lenf nodu içeren, aksiller venin medial ya da posteriorunda (post.) uzanarak, üst ekstremitelerden gelen lenf direnajının büyük kısmını alan aksiller ven grubu (lateral) [26].
2. 5-6 lenf nodunu kapsayan ve lateral torasik damarlara komşu, pektoralis minör kaslarının alt sınırı boyunca uzanıp memenin lateral yüzünden gelen lenf direnajının büyük kısmını alan eksternal mammaryan grup (anterior ya da pektoral grup) [21].
3. 5-7 adet lenf nodu içeren subskapular damarlara komşu skapulanın lateral sınırındaki aksilla posterior duvarı boyunca uzanıp, esas olarak alt posterior boyundan, posterior gövde ve posterior omuzdan gelen lenf drenajını alan skapular grup (posterior ya da subskapular)
4. 3-4 adet lenf nodu kapsayan ve pektoralis minör kasının hemen posteriorunda uzanan aksillanın yağlarına gömülü olup aksiler ven, dış meme ve skapula lenf nodu gruplarından ve doğrudan memeden gelen lenf direnajını alan santral grup [21].
5. 6-12 adet lenf nodu içeren ve pektoralis minör kaslarının üst sınırının posterior ve superiorunda uzanıp tüm diğer aksiler lenf nodu gruplarından gelen lenf direnajını alan subklaviküler grup (apikal) [26].
6. 1-4 adet lenf nodu içeren pektoralis majör ve pektoralis minör kaslarının arasında yer alarak doğrudan memeden gelen lenf direnajını alan interpektoral grup (Rotter) [21, 23, 26].

Lenf nodu grupları pektoralis minör kasıyla olan ilişkilerine göre düzeylere ayrılırlar:

1.Düzyen Lenf Nodları: Pektoralis minör kasının lateralinde, yukarıda Aksiler ven, lateralde latissimus dorsi kası ile sınırlanan alanda yerleşen ve aksilla lenf nodlarının büyük çoğunluğunu oluşturan gruptur. Aksiller ven, eksternal mammaryan ve skapular grupları kapsar [21, 26].

2.Düzyen Lenf Nodülleri: Pektoralis minör kasının arkasında yerleşen nispeten az sayıdaki lenf nodlarıdır. Santral ve interpektoral grupları kapsar.

3.Düzyen Lenf Nodülleri: Pektoralis minör kasının medialinde yerleşen ve aksiler venin klavikula altına girdiği yere kadar yayılan lenf nodlarıdır. Subklaviküler grubu kapsar.

Aksiller lenf nodları genellikle memenin lenf drenajının %75'inden fazlasını alır. Geri kalanı ise esas olarak memenin medial yüzünden köken alarak internal mammaryan arterin perforan dallarına eşlik eden lenf damarları boyunca ilerleyerek parasternal (internal mammaryan) lenf nodu grubuna direne olurlar.

1.2.4. Meme fizyolojisi

Memenin gelişimi ve fonksiyonu; östrojen, progesteron, prolaktin, oksitosin, tiroid hormonu, kortizol ve büyüme hormonunun da arasında bulunduğu çeşitli hormonal uyarılarla başlar.

Östrojen'in meme üzerine etkisi sitoplazma ve çekirdekdeki reseptörlere bağlandıktan sonra görülür. Östrojen reseptörlerinin sentezini hem östrojen hem de progesteron uyarır [23]. Progesteron; Prolaktin ile sinerjik etki gösterir. Epitel hücrelerinin diferansiasyonunda, lobülüs ve asinüs gelişiminde etkilidir. Laktasyonu inhibe eder. Prolaktin; hipofizde yapılır. Hamileliğin son döneminde doğumdan hemen sonra yükselir ve doğum sonrası dönemde yüksek kalır. Progesteronla birlikte lobülüs ve asinüs gelişmesini uyarır. Süt sekresyonunu ve süt proteinlerinin sentezini kontrol eder [24]. Gebelik sırasında dolaşımdaki, over ve plasenta kaynaklı, östrojenler ve progesterinlerde belirgin artışlar mevcuttur. Bu durum duktal ve lobüler epitel proliferasyonu oldukça memelerin genişlemesine ve aksesuar areolar bezlerin belirgin hale gelmesine neden olur. Plasentanın doğumdan sonra atılmasıyla dolaşımdaki progesteron ve östrojen düzeyleri düşer ve bu da prolaktinin laktojenik etkisinin tam

olarak ortaya çıkmasını sağlar. Menapozla birlikte overlerden östrojen ve progesteron salgılanmasında azalma olur, meme duktus ve alveollerinde involüsyon başlar. Çevredeki fibröz bağ dokusunun yoğunluğu artar ve meme dokularının yerini adipoz dokular alır [25].

1.3. Meme kanseri hakkında genel bilgiler

Meme kanseri dünyada kadınlar arasında en sık görülen malign tümördür. Yine kadınlarda görülen tüm kanserlerin yaklaşık %30'unu oluşturmaktadır [3]. Avrupa'da yılda 180 bin, A.B.D.'de yılda 184 bin yeni olgu saptanmaktadır [4-6]. Meme kanseri 30 yaşından önce nadiren görülür. 30 yaşından sonra görülme hızı giderek artar. Her kadının tüm yaşantısı boyunca bu kansere yakalanma olasılığı 1/10'dur [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 [7].

1.3.1. Meme kanseri risk faktörleri

1.3.1.1. Yaş

Meme kanserinin ortalama görülme yaşı 65 olmakla birlikte, insidansı 30 yaşından sonra artar. İnsidans 40 yaşta 93'de 1'e, 50 yaşta 50'de 1'e, 60 yaşında 24'de 1'e 70 yaşında 14'de 1'e 80 yaşında 10'da 1'e yükselir [27, 28].

1.3.1.2. Cinsiyet

Meme kanseri gerek meme dokusunun gelişimi gerekse hormonal etkiler nedeniyle kadınlarda çok daha sık görülür. Erkeklerde meme kanseri görülmesi sıklığı kadınların 1/100'üdür [26, 27].

Doğumda memenin epiteliyal komponenti meme başının altında az sayıda rudimenter kanaldan oluşur ve prepubertal yıllarda bu kanallar yavaş yavaş büyüme gösterir. Erkeklerde meme gelişimi bu fazda dururken, kadınlarda cinsiyet hormonlarının etkisiyle meme gelişimi pubertede hızlanmaktadır. Doğum kontrol ilaçları ve hormon replasman tedavisi kullanımı da kadınlarda meme kanserinin daha sık görülmesine katkıda bulunabilir.

1.3.1.3. Aile öyküsü

Yapılan çalışmalardan elde edilen veriler aile öyküsü ve meme kanseri riski arasında şu ilişkileri ortaya koymuştur:

1. Birinci derece akrabalarda (anne, kız kardeş ve kız çocuğu) meme kanseri olması, riski 2-3 kat artırmaktadır.
2. Uzak akrabalarda (teyze, büyükanne) meme kanseri görülmesi, riski fazla arttırmamaktadır.
3. Birinci derece akrabada ortaya çıkan meme kanseri premenopozal dönemde veya bilateral olduğunda, meme kanseri gelişme riski daha fazla artmaktadır.

Birden fazla bireyin etkilendiği ailelerde, özellikle bilateral ve erken yaş kanserlerde, meme kanseri gelişme riski %50'ye kadar yükselmektedir. Bu ailelerde meme kanseri genellikle genetik kökenli olarak ortaya çıkmaktadır.

Yine yapılan bir çalışmada ailesinde meme kanseri öyküsü olup, doğum yapmış postmenopozal kadınlarda meme kanseri gelişme riski, aile öyküsü olmayıp doğum yapmamış 70 yaş üzeri kadınlardan daha fazla bulunmuştur.

İki kuşak boyunca birinci derece akrabalarında meme kanseri öyküsü olmaksızın meme kanseri gelişen hastalar sporadik meme kanseri hastalarıdır. Birinci veya ikinci derece akrabalarında birden fazla kişide meme kanseri olan, ancak herediter meme kanseri tanımına uyacak şekilde diğer kanserlerle birlikte görülmeyen meme kanserleri ailesel meme kanseri olarak tanımlanır.

Ailede meme kanseri ile birlikte kanser (over ve kolon kanseri) öyküsü olan, otozomal dominant geçiş gösteren meme kanseri hastaları bu gruba dahil edilmektedir. Bu tanıyı destekleyecek diğer faktörler, meme kanserinin premenapozal erken yaşta ortaya çıkması ve bilateral olmasıdır. Ailesel meme kanseri sendromlarının %40'unda 17. kromozomun uzun kolu üzerinde bulunan BRCA 1 geni tanımlanmıştır. Ayrıca kromozom 13'de tespit edilen ikinci bir sorumlu gen daha mevcuttur ve BRCA 2 olarak adlandırılmıştır ailesel meme kanserlerinin %30'unda saptanmaktadır. BRCA 1 ile ilişkili kanserlerin

histopatolojisi BRCA 2 ile ilişkili kanserlere göre daha kötüdür. Yüksek grade, hormon reseptör negatifliği ve artmış S faz fraksiyonu ile karakterize tümörler içerir [29].

1.3.1.4. Hormonal durum

Kadınların hayatları süresince östrojene maruz kaldıkları süre onların meme kanseri olma risklerini arttırır. 12 yaşından önce menarş, ilk canlı doğumun 30 yaşından sonra yapılmış olması, doğurmamış olmak, menapozun 55 yaşından sonraya kalması risk artışını beraberinde getirir [29].

Marchbanks'ın popülasyona dayalı vaka kontrol çalışmasında 35-60 yaş arası kadınlarda halen oral kontraseptif kullananlarda veya geçmişte kullananlarda meme kanseri görülme riskinin artmadığı saptanmıştır [30].

HRT için ise menopozal semptomları düzeltmek amacıyla 5 yıldan az süre ile öst. , prog. kombinasyonlarının kullanılması önerilmektedir [29].

1.3.1.5. Meme hastalığı öyküsü

Meme kanseri olan kadınlarda diğer memede kanser gelişme riski 3-4 kat artmaktadır. Riskteki bu artış aile öyküsü varlığından kaynaklanan riske göre daha yüksektir [31]. Ayrıca; 30 yaşından önce göğse uygulanan radyasyon, önceki biyopside atipi veya kanser saptanması da riski arttırır.

1.3.1.6. Meme kanseri ve obezite

Obezite meme kanseri ilişkini çeşitli çalışmalarla ortaya konmaktadır. Obezitenin postmenopozal meme kanserine etkisi; tümörde östrojen ve progesteron reseptörlerinin ekspresyonu ile bağlantılıdır. Fakat her tümör östrojene yanıt vermez. Tam tersi olarak premenopozal obez kadınlarda daha çok östrojen ve progesteron reseptör negatif meme kanseri geliştiği görülmüştür. Hormon yanıtı olmayan meme kanserinde tümör gelişimi daha çok büyüme faktörleri (insülin, IGF-1) ve adipokinler (leptin v.b.) [32]. Obez meme kanseri hastaları obez olmayanlara göre daha yüksek lenf nodu metastaz riski, daha büyük tümör ve daha yüksek olum oranlarına sahip oldukları gösterilmiştir. Her ne kadar meme kanserinde obeziteyi (rölatif risk, 1,1–2,5) diğer risk faktörleri ile kıyasladığımızda risk daha düşük olsa

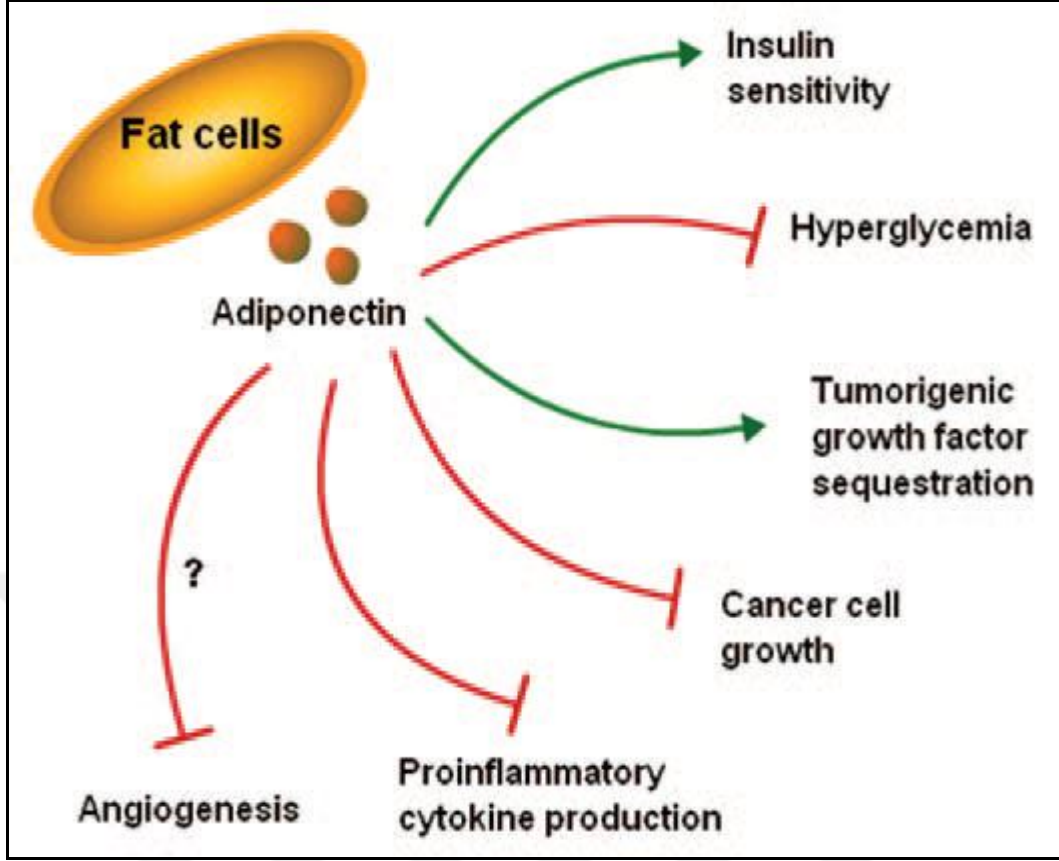
da (BRCA1 germline mutasyonu (rölatif risk, 2.00) karsinoma in situ (rölatif risk, ~16)); aile öyküsü olan kadınlarda obez olanların riski olmayanlara göre daha yüksek olduğu bildirilmiştir [33]. Obezite meme kanseri ilişkisi farklı hipotezlerle ortaya konmuştur. Bunlardan bir tanesi postmenapozal kadınlarda adipoz dokuda artan aromatzasyona bağı artmış, östrojen seviyeleridir. İkinci hipotezde obezite metabolik sendromla ilişkili olarak insulin ve insulin-like growth faktör (IGF)' un dolaşımdaki düzeylerini arttırarak mitojenik etki yapmaktadır. Yeni gelişen hipotezlerden biri ise obezitenin meme kanseri üzerindeki etkisini adipoz dokudan salınan ve adipositokinler adı verilen çeşitli faktörler yardımıyla göstermekte olduğudur [34]. Bu faktörler, mitojen (leptin), antimitojen (adiponektin), anjiogenez yapan, büyüme hormonları ve pro-inflamatuar sitokinleri (IL-1, TNF-alpha, IL-6) bünyesinde barındıran bir gruptur. Adipositokinler, cilt altı yağlı doku, visseral, yağlı meme dokusu olmak üzere birçok yağ deposundan salgılanırlar. Obezite gibi yağ dokusunda değişikliğe neden olan durumlarda bu adipokinlerin de oranlarında değişiklik olmaktadır. Örneğin; adiponektin düzeyinde azalma, leptin düzeyinde artma gibi.

Adipokinlerin meme kanseri dokusu üzerindeki etkileri; a) tümör hücre proliferasyonu, migrasyonu ve invazyonu, b) epitelyum bağımlı proteinlerin, büyüme hormonlarının ve anjiogenetik proteinlerin üretiminin ayarlanması, c) tümörün etrafındaki hücrelerin profilerasyonunu sağlayarak gösterir [35].

Adiponektin

Adiponektin, yağ hücreleri tarafından salınan adipositokinlerden ikinci en çok bilineni olarak görölmektedir. Ancak leptinin aksine bunun çeşitli faydalı ve koruyucu etkileri bulunmaktadır. Bu etkilerin arasında anti-inflamatuar, anti-aterojenik, anti-diyabetik etkiler vardır. Bu etkilerini immun hücrelerin proliferasyonunu ve aktivasyonunu baskılayarak, endotelde vasküler adezyon moleküllerini bloklayarak ve düz kas hücrelerinin migrasyonunu baskılayarak gösterir [36]. Adiponektini kodlayan cDNA ilk olarak 1995'de tanımlanmıştır. Adiponektin için eksprese olan mRNA hamileliğin 17. gününde yani embriyogenezisin son döneminde görülür. Adiponektin Acrp30, AdipoQ, apM1 veya

GBP28 olarak da bilinmektedir. Adiponektin beyaz ve kahverengi adipoz dokudan salgılanır ve yapısal olarak kompleman 1q' a benzemektedir. Üç büyük oligomerik formu bulunmaktadır; düşük-moleküler ağırlıklı (LMW) trimer, orta-moleküler ağırlıklı (MMW) heksamer ve yüksek- moleküler ağırlıklı (HMW) 12-18-mer adiponektin [37, 38]. Adiponektinin insan plazma seviyesi 2 -20µg/ml arasında değişmektedir [39-45]. Plazma konsantrasyonu vücut kitle indeksi ile negatif koreledir. TNF-α'nın adiponektin aktivitesinin güçlü bir inhibitörü olduğu ifade edilmektedir [46]. Plazma adiponektin düzeyinde azalma; insulin rezistansında artışa böylece tip 2 DM' ye ve koroner arter hastalığına neden olduğu gösterilmiştir [47]. Plazma adiponektin düzeyinde artma; HDL düzeyinde artışa, trigliserit düzeyinde azalmaya ve insulin duyarlılığında artışa neden olduğu gösterilmiştir [48]. Adiponektin etkilerini 2 reseptörü üzerinden gösterir. Bunlar Adipo R1 (42kDa) ve Adipo R2 (35kDa). Adipo R1 meme dokusu da dahil olmak üzere, vücutta çeşitli dokularda yaygın olarak bulunur. Adipo R2 ise daha çok karaciğerde bulunur. AdipoR1 veya AdipoR2 reseptörlerine bağlanan tam uzunlukta veya globuler adiponektin (gAcrp30) AMP-aktive protein kinaz (AMPK) ve peroksizom proliferatör ile aktive edilmiş reseptör (PPAR)-α metabolik yollarını aktive ederek, yağ asidi oksidasyonunda ve glikozun hücre içine alımında artışa, glikoneogenez oranında azalmaya neden olur. Böylece insülin duyarlılığında artışa neden olur [49]. TNF-α ve IL-6 adiponektin gen ekspresyonunu azaltırken, thiazolidinedione gibi PPAR-γ agonistleri adiponektin gen ekspresyonu ve adiponektin plazma seviyelerinde artışa neden olur [50, 51]. Tam uzunlukta adiponektin daha yüksek affiniteyle Adipo R2'ye bağlanırken, gAcrp30 Adipo R1'e bağlanır [52]. In vitro deneylerde, farklı meme kanser hücre dizileri adiponektin reseptörlerinin biri ya da her ikisini de içerdiği gözlenmiş ve ortamdaki adiponektin düzeyine göre hücre büyüme hızında azalmaya ve/veya apoptozda artışa neden olduğu görülmüştür [52, 53]. Adiponektin reseptörleri aracılığıyla Akt fosforilasyonunu durdurabilir ve siklin D1 ekspresyonunu azaltabilir. Aynı zamanda çeşitli büyüme faktörleri ile etkileşime geçerek meme kanseri hücrelerinin büyüme faktörlerine normal cevabını engelleyebileceği in vitro olarak gösterilmiştir [54]. Adiponektin meme kanseri dışındaki kanser hücrelerinde in vivo ve in vitro olarak angiogenezi engellediği gösterilmiştir [55] (Şekil 1.1).



Şekil 1.1. Obezite bağımlı çeşitli hastalıklarda adiponektinin rolü

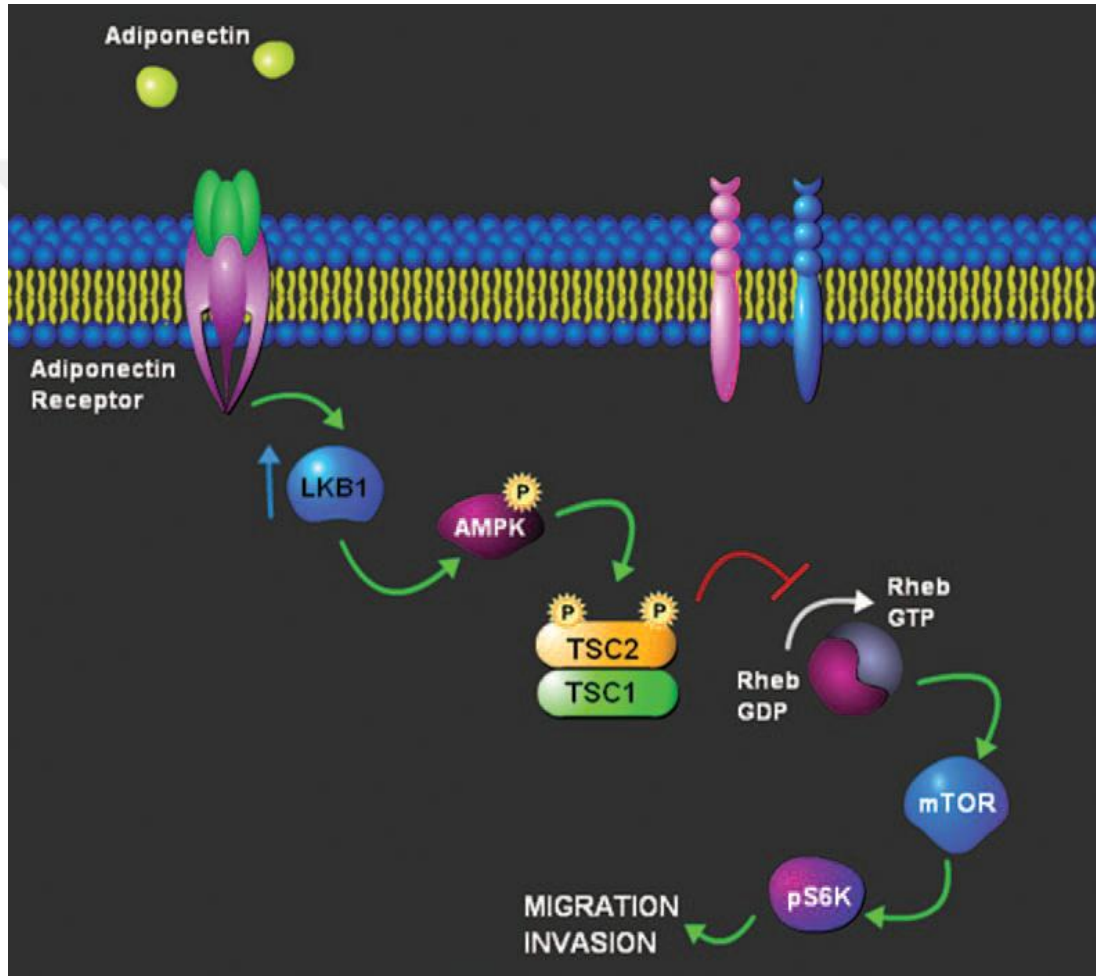
Adiponektin bağımlı olarak gelişen meme kanser hücrelerinin migrasyon ve invazyonunun inhibisyonunun moleküler mekanizması incelendiğinde (bkz. Şekil 1.2.), adiponektinin LKB1'in ekspresyonunu arttırarak AMPK fosforilasyonunu artırdığı, bunun da tümör hücrelerinin migrasyon ve invazyonu üzerinde inhibitör etki gösterdiği belirtilmektedir.

Leptin

Leptin ilk kez 1994 yılında tanımlanan adipoz doku kaynaklı sinyal faktörü olarak tanımlanmıştır [56]. Leptin ve reseptörü obese (ob) geni tarafından kontrol edilir. Leptin'in insan plazma seviyesi 5-50 ng/ml'dir [46].

Fakat obez kişilerde bu seviyenin 100 ng/ml'ye kadar yükseldiği görülmüştür [58-60]. İnsan leptini, sıçan leptini ile %83, fare leptini ile %84 homoloji gösterir [61]. Leptin serbest halde ya da leptin bağlayıcı proteine bağlı olarak plazmada dolaşır

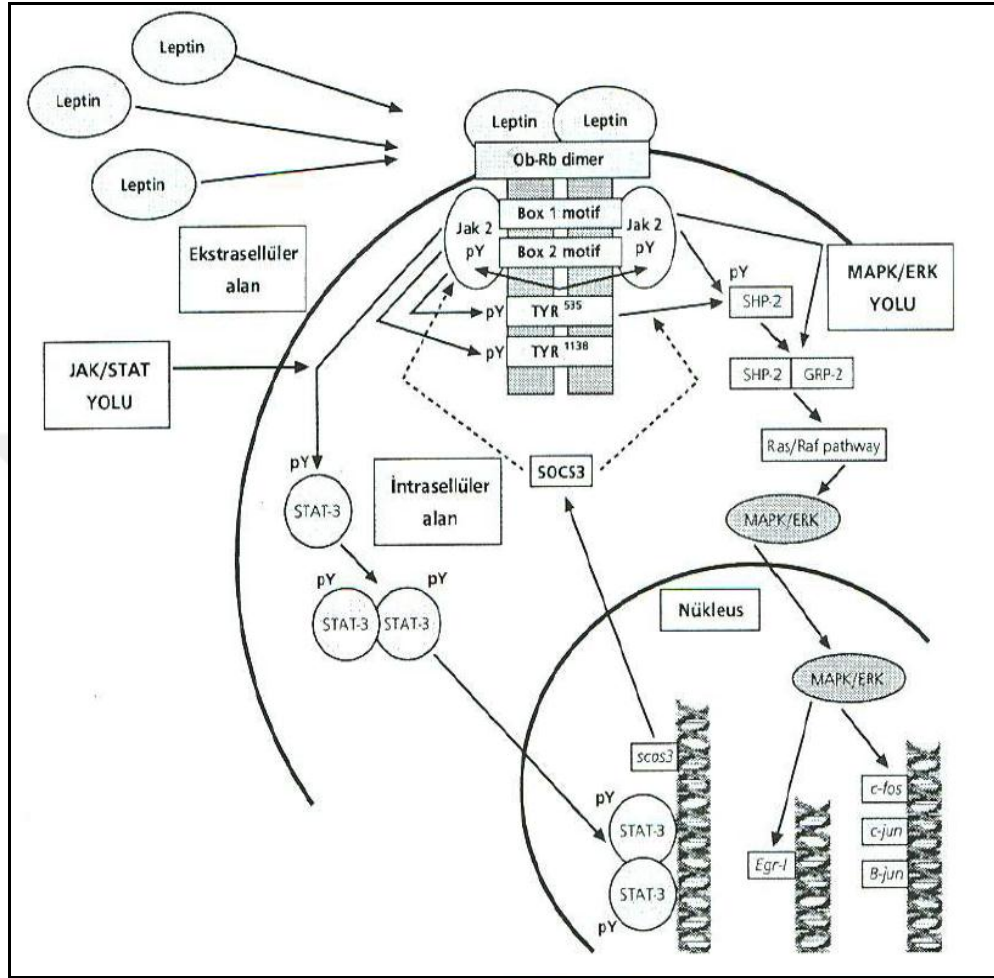
[62]. Leptin büyük kısmı adipositler olmak üzere, plasenta, fetal doku, mide ve diğer dokularda da sentez edilebilen bir hormondur [63]. Memelilerde yağ ve enerji depolanmasının majör bir regülatörü olan leptin, enerji harcanmasında artış ve besin alımında azalma yapacak şekilde hipotalamik reseptörleri üzerine etki göstermektedir [64]. Ob/ob tipi sıçanlarda Ob geninin 105. kodonunda bir nonsense mutasyon olduğu için leptin fonksiyonel formundan yoksundur ve bu nedenle ciddi hiperfaji ve obezite gelişir [65].



Şekil 1.2. Adiponektin bağımlı olarak gelişen meme kanser hücrelerinin migrasyon ve invazyonunun inhibisyonunun moleküler mekanizması

Çalışmalar leptin reseptörünün (Ob-R) db geni tarafından kodlandığını göstermiştir. db/db tipi sıçanlarda leptin reseptör geninin bir mutant alleli mevcuttur ve bu genin ürünü fonksiyonel olmayan leptin reseptörü sentezlenmesine neden olur [66]. Her iki

sıçan türünde de yapılan çalışmalarda bu sıçanlarda genetik geçişli meme kanseri gelişmediği görülmüştür [67, 68].



Şekil 1.3. Ob-Rb reseptörü etki mekanizması

(MARK/ERK = Mitojen aktive eden protein kinaz/ekstarsellüler sinyal regüle eden kinaz; SOCS-3 = Sitokin sinyal baskılayıcısı-3; JAK-2= Janus protein tirozin kinaz-2; SHP-2 = SH2 içeren fosfotaz (bir tirozin fosfataz); STAT = Sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörleri, c-fos, c-jun, B-jun; Erg-1 = Transkripsiyon faktörleri; GRB-2 = Ras/raf-MAKP/ERK döngüsünde yer alan bir molekül; Box1,2 = Ob-Rb reseptörünün JAK-2 aktivasyonunun sorumlu bölgeleri)

Leptin reseptörleri toplamda 5 adet olmak üzere genel olarak iki tiptir:

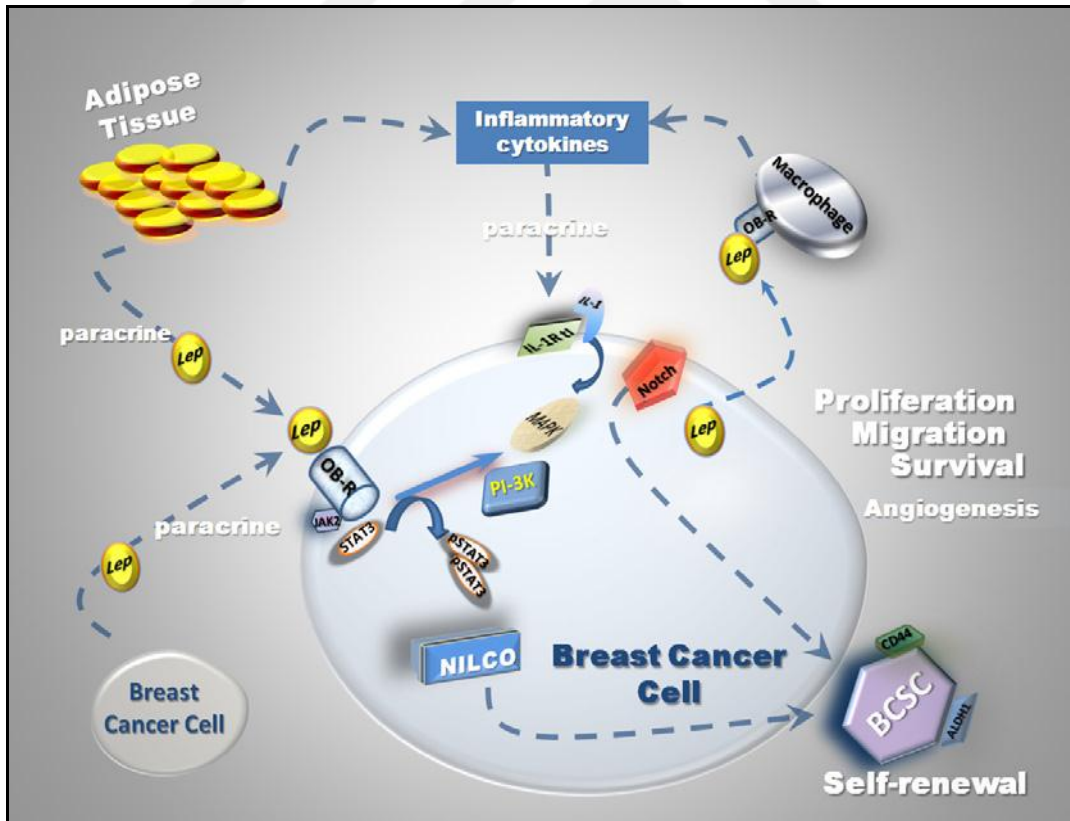
1. Uzun formu (Ob-Rb), primer olarak hipotalamusta eksprese edilir. Son yıllarda yapılan çalışmalar bu reseptörün trombositlerde de bulunduğunu göstermiştir.
2. Kısa formları (OB-Ra, Rc, Rd, Rf) tüm vücutta eksprese edilir [69]. Uzun formdaki leptin reseptörünün yapısı, kısa formdaki leptin reseptörü ile lizin 889'a

kadar aynıdır. Kısa formda bu yapıya 5 tane aminoasit, uzun formda ise 275 tane aminoasit eklenmektedir. Lee ve arkadaşları 1986 yılında kısa leptin reseptörünü Ob-RA ve uzun leptin reseptörünü OB-Rb olarak adlandırmışlardır [61, 62]. Daha sonraki yıllarda lizin 889'dan sonra gelen amino asit sayısına göre bu adlandırmalara yenileri (Ob-Rc, ObRd vs.) eklenmiştir. Fare ve insan uzun form leptin reseptörleri %71 oranında aynıdır. Her iki reseptör JAK ve STAT aracılı etki göstermektedir [61]. Ob-Rb, 302 amino asitlik stoplazmik bölge içeren ve leptinin hücre içi sinyalinden sorumlu leptin reseptörü formudur [61, 62]. Leptin reseptörünün uzun formu sınıf 1 sitokin reseptör ailesinin bir üyesidir [70]. Bu reseptörlere leptin bağlanması, reseptör aracılı Janus kinaz aktivasyonuna ve STAT gibi moleküllerin fosforilasyonuna neden olmaktadır [71]. Özellikle hipotalamusta yerleşmiş olan uzun reseptör isoformu, büyük bir ekstrasellüler kısım, kısa bir hidrofobik transmembran ve oldukça kısa bir intrasellüler kısım olmak üzere üç farklı yapıdan oluşur. db/db sıçanları, uzun reseptör formunun ekspresyonunu önleyen bir mutasyona sahiptir. Bu mutasyon leptin reseptörünün intrasellüler kısmının sentezlenmemesine neden olur. Böylece anormal yapısı olan reseptör sentezlenir. Bu anormal reseptör formu JAK-STAT şeklinde sinyal göndermeye elverişli değildir [62]. Ob-Rb Reseptörü Etki Mekanizması Şekil 1.3'te verilmektedir.

1. Leptin reseptörü sinyali, Ob-Rb reseptörünün ekstrasellüler kısmına leptin bağlanması ile başlatılır.
2. Reseptör üzerindeki Box-1 ve Box-2'ye JAK-2 bağlanması sonucu, sırasıyla JAK-2 transfosforilasyonu ve JAK-2 aktivasyonu gerçekleşir.
3. Aktive olmuş JAK-2 leptin reseptörünün Tyr985 ve Tyr 1138 amino asitlerini fosforile eder.
4. Fosforilleniş Thy 985 ve Thy 1138'e sırasıyla SHP-2 ve STAT-3 bağlanır. Daha sonra bunlar da JAK-2 tarafından fosforile edilir.
5. Fosforillenmiş SHP-2, GRB-2'ye bağlanır. Bu bağlanma Ras/raf-MAPK/ERK döngüsünün aktivasyonu ile sonuçlanır. GRB-2 direkt olarak JAK-2 tarafından da fosforile edilebilir.

6. Aktive olmuş MAPK/ERK nükleusa geçer ve orada c-fos, c-jun, B-jun ve Erg-1 gibi erken cevap genlerinin transkripsiyonunu sağlar.
7. Diğer taraftan fosforile STAT-3'e cevap veren SOCS-3 gibi genlerin transkripsiyonu ve translasyonu gerçekleşir. Sentezlenen SOCS-3 proteini fosforile olmuş Tyr 985'e bağlanarak SHP-2/MAPK/ERK döngüsünü inhibe edebilir veya JAK-2 'ye direkt olarak bağlanarak leptin reseptörü sinyalini negatif yönde regüle edebilir [66].

Leptin ve inflammatuar sitokinlerin meme kanserindeki rolüne bakıldığında, adipoz dokunun TNF- α ve IL-6 sentezleyerek obezite bağımlı insülin direncine neden olduğu belirlenmiştir. Primer meme tümöründe interlökin 1(IL-1), IL-6 ve TNF- α 'nın ekspresyonu tümör duyarlı makrofaj ile korele olduğu görülmüştür. Leptin'in meme kanserinde sitokinlerle çapraz ilişkisi tümör progresyonu (proliferasyon, migrasyon, metastaz) ile yakından ilişkilidir (bkz. Şekil 1.4.).



Şekil 1.4. Leptin ve inflammatuar sitokinlerin meme kanserindeki rolü

Biyolojik fonksiyonları

Leptin yağ asidi sentezi hız kısıtlayıcı enzimi olan asetil CoA karboksilaz üzerine inhibitör etki göstererek, yağ asidi sentezini azaltırken, diğer yandan yağ asidi oksidasyonunu artırır.

Leptin birçok dokuda lipid birikimini tersine çevirerek, insülin direnci ve beta hücre fonksiyonlarını sonuçta da glikoz homeostazını düzenler [72].

Kadınlarda yağ dokusu fazlalığı ve testosteronla leptin arasındaki ters korelasyon nedeniyle leptin düzeyi daha yüksektir. İnsanda yağ dokusundan salınan leptin, yemek sonrası glikoz ve insülin düzeyindeki oynamalarla akut değişim göstermez [73]. Leptin bir tokluk sinyali değildir. Bununla birlikte leptin, geceyarısı en yüksek, öğle saatlerinde en düşük düzeydedir.

İnsülin, glukokortikoidler, inflamatuvar sitokinler (tümör nekroz faktör, interlökinler, leukemia inhibitör faktör, lipopolisakkaritler) leptin gen ekspresyonunu artırır [74]. Açlık ve kontrolsüz diabet, leptin gen ekspresyonunu azaltır. Genetik olarak şişman ob/ob sıçanlarda infertilite, hiperinsülinemi, hiperglisemi ve troid fonksiyon yetmezliği gösterilmiştir. ob/ob sıçanların rekombinant leptin ile tedavi sonucu vücut ağırlığının düştüğü ve vücut yağ yüzdesinin azaldığı gösterilmiştir. Ayrıca ob/ob sıçanlarda leptin tedavisi infertilite, hiperinsülinemi ve hiperglisemiyi de düzeltmektedir [66]. Dışarıdan leptin verilmesi bu farelerde hem hızlı ağırlık azalmasına hem de metaolik anormalitelerin düzelmesine neden olmaktadır [71]. İnsanlarda leptin eksikliği obeziteye yol açabilmesine rağmen bu gibi bireyler nadirdir. Gerçekte obez insanlarda sıklıkla sirkülasyondaki leptin düzeyleri yükselmiştir [75]. Çünkü bu bireylerde leptinin etkilerine karşı direnç söz konusudur. Leptin reseptöründe meydana gelen mutasyon bu direncin en önemli nedenlerindedir [76]. Plazma leptin konsantrasyonları BMI ve vücut yağı ile güçlü bir korelasyona sahiptir [61]. Son yıllarda yapılan çalışmalarda leptinin vücut ağırlığının düzenlenmesinin yanı sıra, immün fonksiyonu, angiogenezi, kemik oluşumunu, fertilitiyi de regüle edebildiği gösterilmiştir. Çeşitli dokularda leptin reseptör varlığı rapor edilmiştir [64].

Tessitore ve Vizio, meme kanserli hastalarda plazma leptin seviyesi ve yağ dokuda mRNA ekspresyonunun sağlıklı kontrol grubundan anlamlı olarak yüksek olduğunu bildirmişlerdir ve meme kanserli hastalarda plazma leptin seviyelerinin bir prognostik index olarak kullanılabileceğini öne sürmüşlerdir [77]. Meme kanser hücre kültürleri ile yapılan bir diğer çalışmada, leptin mRNA ekspresyonu adipoz dokudan daha yüksek bulunmuştur [78]. Bununla birlikte kontrol grubu ile in situ meme kanserli premenapozal hastalar üzerine olan çalışma arasında fark yoktur [79].

Leptin gen ekspresyonu normal meme dokusunda, meme kanseri hücre dizilerinde ve solid tümörlerde gösterilmiştir [80]. Leptin ya da leptin reseptör eksikliği olan farelerde meme gland gelişiminin olmadığı gözlenmiştir [81]. Leptin meme kanser hücrelerinde büyüme faktörü şeklinde etki eder. Leptin MAPK aktivasyonu ile T47D [71] ve MCF-7 [80] meme kanseri hücre dizilerinde proliferasyonu arttırdığı gösterilmiştir.

Leptin, meme kanserinde pro-karsinojenik etkisini sadece proliferasyonu arttırarak değil aynı zamanda apoptotik cevabı engelleyerek de göstermektedir. MCF-7 kanser hücreleri leptine uzun süre (>24 h) maruz kalınca mRNA ve protein seviyeleri de dahil olmak üzere p53 ekspresyonunda anlamlı bir azalma olduğu görülmüş. Bax üretiminde de azalma görülmüştür [82]. Paralelinde, leptin Bcl2 ve survivin gibi anti-apoptotik genlerin ekspresyonunda da artışa sebep olmaktadır [83].

Leptin kaspas-9 aktivitesini engelleyerek doksitaksel'in apoptotik etkisini baskıladığı görülmüş, bu da leptinin kemoterapotik ilaçların yararlı etkilerine karşı koyduğunu düşündürmüştür [84]. Bcl2-negatif hücrelerde (ZR-75-1), leptin bağımlı proliferasyon p53 ve p21 WAF1/C1P1 'in engellenmesiyle geliştiği görülmüştür [85]. MDA-MB-231 Er α - negatif insan meme kanseri hücrelerinde leptinin uyardığı hücre büyümesi ve bunun etkileri STAT3 ve/veya ERK1/2 sinyalizasyon yolları aracılığıyla gerçekleşir [86]. Leptinin meme karsinogenezindeki etki aynı zamanda östrojen sistemiyle etkileşerek gösterir [87].

Örneğin; leptin aromataz mRNA ekspresyonunu, aromataz protein içeriği ve enzimatik aktivitesi ve MCF-7 hücrelerinde ER α 'nın sayısını arttırarak östrojenin meme hücrelerinde duyarlılığını artırır [88].

Çeşitli çalışmalarda leptinin proliferatif etkisinin hem ER α -pozitif hem de ER α -negatif hücrelerde görülmüştür. Bu da leptin etkili proliferatif etkinin sadece östrojen bağımlı mekanizmalar ile açıklanamayacağı düşünülmektedir.

1.3.2. Meme kanserinde prognostik ve prediktif faktörler

1.3.2.1. Tümörün histopatolojik özellikleri

Prognoz ile tümör çapı arasında aksiller lenf nodlarının durumundan bağımsız olarak bir ilişki vardır. Ayrıca primer tümörün çapı ile doğru orantılı olarak aksiller lenf nodu tutulumu olasılığı da artmaktadır [89].

Tümör çapı 1 cm'nin altında olan lenf nodu tutulumu negatif hastalarda 10 yıllık sağkalım oranları %90 veya daha iyidir. Oysa çapı 2-4 cm arasındaki tümörlerde bu oran yaklaşık %55 tir [90].

1.3.2.2. Aksiller lenf nodları

İnvaziv kanserli hastalarda tutulan aksiller lenf nodu sayısı sağ kalımdaki en önemli prognostik faktördür. 10 yıllık sağ kalım oranı aksiller lenf nodu tutulumu negatif olgularda %65 iken 4 ya da daha fazla lenf nodu tutulumu olan olgularda bu oran %15 tir [91]. Ayrıca level 3'te çapı 2 cm'den daha büyük metastatik lenf nodunun olması prognozu daha kötü hale getirmektedir.

Aksillanın evrelendirmesindeki hataları en aza indirmek için en az 10 lenf nodunun örneklenmesi gerekir. Pozitif aksiller lenf nodlarının anatomik düzeyi bağımsız bir prognostik gösterge olarak görülmemektedir [92].

Metastatik lenf nodu sayısındaki artış hastalık nedeniyle olan ölüm riskini arttırmaktadır [93, 94]. 2 mm'nin altındaki lenf nodu metastazları mikrometastaz olarak tanımlanır [92].

1.3.2.3. Lenfovasküler invazyon

İnvaziv karsinom içindeki ya da komşuluğundaki damarlar ve lenfatikler tümör hücreleri tarafından invaze edilebilir. İnvaziv karsinom çevresinde vasküler invazyon varlığı erken lokal rekürens ve uzak metastazı öngören değerli bir bulgudur.

1.3.2.4. Tümör grade'i

Grade, hücresel diferansiyasyon derecesi, hastalığın gidişini belirleyen güçlü bir faktör olarak kabul edilmektedir [95].

Meme kanserlerinin grade seçiminde en sık kullanılan sistem tubul formasyonu, nükleer derece ve mitoz oranını kullanan Fisher sistemidir.

1.3.2.5. Tümörün histolojik tipi

Meme kanserini üç ana histopatolojik kategoriye ayırarak incelemek uygundur: Noninvazif epitaliyal karsinomlar, invazif epitelial karsinomlar, mikst konnektif ve epitelial karsinomlar.

Meme kanserli hastalarda en sık rastlanan histolojik tip infiltratif duktal karsinomdur. Özel histolojik tipe sahip meme tümörlerinin (tübüler, medüller, lobüler, papiller, müsinoz) prognozu duktal karsinoma oranla daha iyidir.

1.3.2.6. Östrojen progesteron reseptör varlığı

Reseptör pozitifliği hastanın biraz daha iyi bir prognoza sahip olduğunu göstergesidir. Reseptör pozitifliğinin araştırılması tedaviye yanıt açısından önemlidir. Verilecek antiöstrojen tedaviye yanıt reseptörlerin pozitif olduğu hastalarda en yüksek orandadır (%80).

1.3.2.7. ERBB2 overekspresyonu

Membran bağlantılı bu proteinin overekspresyonu genellikle gen amplifikasyonu sonucu meydana gelir. Bu nedenle overekspresyon immünohistokimyasal yöntemler (dokuda proteinin tespiti) veya floresan in situ hibridizasyon (genlerin sayısının tespiti) ile saptanır. Overekspresyon kötü prognoz ile birlikte dir.

1.3.3. Meme kanserinde evreleme

Meme kanseri tedavisi geçmişte tamamen klinik evrelemeye dayandırılmıştır, ancak özellikle cerrahi dışı tedavinin belirlenmesinde günümüzde, patolojik evreleme ön plandadır. Klinik evrelemeye örnek olarak Manchester sınıflaması yapılmıştır.

Tablo 1.1. Manchester sınıflaması

Evre I	Memede sınırlı kalmış tümör
Evre II	Tümör memede sınırlı kalmış, ancak palpabl ve mobil lenf nodları mevcut
Evre III	Meme dışına yayılım gösteren tümör
Evre IIIa	Deri tutulumu ya da büyük bir alanda fiksasyon veya deri ülserasyonu varlığı
Evre IIIb	Kasa veya fasiaya tümör fiksasyonu, +/- mobil lenf nodu
Evre IV	Tümör meme dışına uzanmış ve göğüs duvarına tam fiksasyon mevcut, supraklaviküler lenf nodu ya da karşı memede lenf nodu varlığı, satellit nodüller veya uzak metastaz varlığı

1.3.3.1. TNM sınıflaması

Primer meme kanserinde en sık kullanılan evreleme sistemi International Union Against Cancer (UICC) ve American Joint Committee on Cancer (AJCC) tarafından tasarlanan sınıflamalardır. Burada önemli olan evreleme sistemlerinin heterojen bir hastalığı ve erken malignensiden fatal metastazlara giden klinik tabloları sunmasıdır.

Tablo 1.2. Meme Kanseri İçin Amerikan Birleşik Komitesinin Kansere Evreleme Sistemi (p) T (Primer Tümör)

Tis	Karsinoma in situ (lobüler veya duktal)
T1	Tümör ≤ 2 cm
T1a	Tümör $\geq 0.1, \leq 0.5$ cm
T1b	Tümör > 0.5 cm, ≤ 1 .cm
T1c	Tümör > 1 cm, ≤ 2 cm
T2	Tümör > 2 cm, ≤ 5 cm
T3	Tümör > 5 cm
T4	Göğüs duvarı veya cilde yayılım gösteren herhangi bir büyüklükteki tümör
T4a	Göğüs duvarına yayılım gösteren tümör (pektoralleri tutmaz)
T4b	Tümör cilde yayılmıştır. Ülserasyon, ödem ve satellit nodüller vardır.
T4c	T4a ve T4b birlikte
T4d	İnflamatuvar karsinoma

2002 yılında AJCC TNM sınıflamasını yeniden düzenledi. Tablo.1.2. - 1.5'te verilen bu sistem Primer Tümör (T), bölgesel lenf nodlarının durumu (N) ve uzak metastazların varlığını tanımlama üzerine kuruludur [29].

Tablo 1.3. Meme Kanseri İçin Amerikan Birleşik Komitesinin Kansere Evreleme Sistemi (p) N (Bölgesel Lenf Nodları)

N0	Rejyonel/Bölgesel lenf nodu tutulumu yok, özel çalışmaya gerek yok
N0(i-)	Rejyonel lenf nodu tutulumu yok, Negatif İHK (immunhistokimya)
N0(i+)	Histolojik olarak lenf nodu tutulumu yok, Pozitif İHK
N0(mol-)	Histolojik olarak lenf nodu tutulumu yok, Negatif PCR
N0(mol+)	Histolojik olarak lenf nodu tutulumu yok, Pozitif PCR
N1	1-3 aksiller ve/veya biyopsi ile internal mamaryan lenf noduna metastaz
N1(mic)	Mikrometastaz (>0.2 mm ancak >2.0 değildir)
N1a	1-3 Aksiller lenf noduna metastaz
N1b	Sentinel biyopsi ile internal mamaryan lenf nodlarında metastaz
N1c	Biyopsi ile 1-3 aksiller ve internal mamaryan lenf nodunda metastaz
N2	Klinik olarak 4-9 aksiller lenf nodunda veya aksiller metastaz olmadan internal mamaryan lenf nodunda metastaz
N2a	4-9 aksiller lenf noduna metastaz, en azından bir tanesi >2.0 mm
N2b	Klinik olarak belirgin internal mamaryan lenf nodu tutulumu, aksiller tutulum negatif
N3	≥10 aksiller lenf nodu tutulumu veya aksiller ve internal mamaryan lenf nodu tutulumu birlikteliği
N3a	≥10 aksiller nod tutulumu (>2.0 mm) veya infraklavikular lenf nodu tutulumu
N3b	Klinik olarak pozitif internal mamaryan lenf nodu ve ≥1 aksiller nod tutulumu veya biyopsi ile >3 aksiller lenf nodu ve pozitif internal mamaryan lenf nodu

Tablo 1.4. Meme kanseri için Amerikan Birleşik Komitesinin kanser evreleme sistemi (Uzak Metastaz)

M	Metastaz
M0	Uzak metastaz yok
M1	Uzak metastaz

Tablo 1.5. Anatomik evre/pragnostik gruplar

EVRE 0	Tis, N0, M0
EVRE IA	T1, N0, M0
EVRE IIA	T0, N1, M0
	T1, N1, M0
	T2, N0, M0
EVRE IIB	T2, N1, M0
	T3, N0, M0
EVRE IIIA	T0, N2, M0
	T1, N2, M0
	T2, N2, M0
	T3, N1, M0
	T3, N2, M0
EVRE IIIB	T4, herhangi bir N, M0
	Herhangi bir T, N3, M0
EVRE IV	Herhangi bir T, herhangi bir N, M1

1.3.4. Meme kanseri tedavisine genel bakış

Meme kanseri tanısı konduktan sonra, meme kanseri hastasına önerilecek tedavi tipi hastalığın evresiyle belirlenir [26]. Meme kanserlerinin erken evreleri için cerrahi uygulamalar, kür için bir şans sağlar. Son yüzyıl boyunca meme kanserlerinde cerrahi yaklaşım, tümörlerin klinik tablosu gibi dramatik değişikliklere uğramıştır.

1894’de, Halsted sonradan radikal mastektomi olarak isimlendirilen, 50 hastalık serisini ‘tam operasyon’ ile tedavi ettiğini bildirmiştir. Sonraki 75 yılda radikal mastektomi ABD’de opere edilen tüm meme maligniteleri için kullanılmıştır. Halsted’in ilk vaka çalışmaları incelendiğinde vakaların 2/3’ünün lokal ileri evre olduğu ve %60 vakada lenf nodu metastazı varlığı saptanmıştır [27].

Amerikan Cerrahlar Kolejinin (ACS) 1980 araştırmaları incelendiğinde evre 1 ve evre 2 olanlar hastaların %85’ini oluşturmuştur. Pozitif aksiler lenf nodlu vakaların sıklığı %40 olarak görülmüş ve 1970’lerde cerrahi tedavi için ölçülen tümör boyutu 2 cm veya daha az saptanmıştır. Tedavi başarısızlığının nedeninin %90 sistemik veya

visseral nükslerle alakalı olması, cerrahları radikal mastektomiye alternatif bulmaya sevk etmiştir. Böylece tedavide sistemik kemoterapi kullanımı detaylanarak ve bireysel hasta seçimlerine önem verilerek kullanılmaya başlanmıştır [29].

1982’de ACS operabl meme kanseri olgularında cerrahi uygulamaları araştırdı ve ilk yıllardaki uygulamaların sonuçları ile karşılaştırdı. Cerrahi uygulamadaki değişiklik 1970’lerin ortalarında, radikal mastektomiden modifiye radikal mastektomiye ani geçişin olması ile meydana geldi. Bu araştırmada memeleri koruyan prosedürler olguların sadece %7,2’sine yapılmıştır.

Günümüzde meme koruyucu girişimlerin oranları yaklaşık %40-60 civarındadır. Ayrıca artık birçok cerrah aksiler diseksiyon gereksinimi hakkında daha seçici davranmaktadır. Sentinel nod biyopsisinin kullanımı, negatif lenf nodlu kadınlar için rutin aksiler diseksiyonun yerini almaya başlamıştır.

1.3.4.1. Sistemik adjuvan hormonoterapi

Hormon reseptör durumuna göre hormonoterapi tedavisi planlanır. Eldeki doku yetersizse postmenapozal bayanlarda reseptörler pozitif kabul edilmelidir.

Östrojen reseptörü negatif progesteron reseptörü pozitif olan hasta grubunun küçük bir kısmı da tedaviden fayda görür [96]. Östrojen ve progesteron reseptörü pozitif ise bu hormonların varlığı tümörün uyarımına neden olur. Hormonların eliminasyonu amacıyla; tamoksifen ile reseptör blokajı, overlerin rezeksiyonu veya ablasyonu, sitotoksik kemoterapi ile over hücre hasarı yapılabilir ancak rutin olarak kullanılan tamoksifendir.

Yaş, menapoz durumu, aksiler lenf nodu profili, tümör boyutu ne olursa olsun östrojen progesteron reseptörü pozitif olan hastalara hormonal terapi önerilmelidir [26]. Bu tedavi, tümör rekürrens sıklığının azalmasında, ikincil primer meme tümörü oluşma riskinin azalmasında ve 15 yıllık yaşama süresinin artmasında etkilidir. Tamoksifen kullanımı için önerilen süre 5 yıldır.

1.3.4.2. Sistemik adjuvan kemoterapi seçimi

Meme kanserinde primer cerrahi tedaviden sonra olası mikro metastazları engellemek ve nüksü önlemek için yapılan sitotoksik tedavidir. Operabl meme kanseri için sistemik adjuvan terapinin yararı orta derecededir ve ölüm veya rekürrens olasılığını % 20-30 oranında azaltabilmektedir [97].

Adjuvan kemoterapi ile ilişkili olarak 69 çalışmadaki 30 bin kadının verileri bir araya getirilerek çıkartılan sonuçlarda; Tedavi alanlarda almayanlara göre rekürrenste istatistiksel olarak anlamlı, %23,5 azalma ve herhangi bir nedenden dolayı olan ölüm için ise %15,3 azalma olduğu gösterildi.

Nod pozitif hastalarda nod negatif hastalara göre kesin yarar daha büyüktür. Bununla beraber yıllık rekürrens olasılığında azalma benzerdir. Nod negatif hastalar için %28-34, nod pozitif hastalar için %33-42 idi [97].

EBCTCG (Early Breast Cancer Trialists Collaborative Group), 1998 yılındaki genel analizinde farklı hasta grupları için adjuvan kemoterapi sonuçlarının temelleri ortaya konmuştur [98].

Erken meme kanseri araştırmacıları işbirliği grubunun adjuvan kemoterapi incelemesi:

1. Her ne kadar rekürrens ve ölüm için mutlak farklar küçük olsa da, nod pozitif ve nod negatif hastalar için fayda benzerdir.
2. Genç hastalar bir miktar daha fazla faydalansa da tüm yaş grupları kemoterapiden fayda görür (70 yaşına kadar).
3. Üç aydan altı aya kadar uygulanan adjuvan tedavilerin sonuçları daha uzun süreli tedavilerin sonuçları ile benzerdir.
4. Antrasiklin içeren rejimler biraz daha etkindir.
5. Genç kadınlarda hem östrojen reseptörü pozitif hem de östrojen reseptörü negatif hastalar fayda görürken, daha yaşlı kadınlarda östrojen reseptörü negatif kanserler daha fazla fayda görürler.

Adjuvan kemoterapi 1990 yılından sonra standart tedavi haline gelmiştir [99]. 4-6 kürlük tedavi optimal yararı sağlarken tedavinin uzatılması toksisiteyi artırır ancak ek yarar sağlamaz. Bu toksik tedavinin sağkalıma etkisi ispatlansa da hangi hasta grubuna verilmemesi gerektiği ile ilgili çok sınırlı bilgiler mevcuttur [96]. Mevcut bilgiler ışığında kabul edilen; Lenf nodu metastazı bulunan hastalara tümör boyutu ne olursa olsun sitotoksik kemoterapi verilir.

Primer meme kanseri boyutu 1 cm'den büyük olan kanserlere sitotoksik kemoterapi verilmektedir. Ancak bu bilgiler genelleştirilmiştir ve hastaların tedavisinde kişisel yaklaşımlar gerekir. Hasta yaşı 35'den büyük, 1,1 cm. ile 2 cm. arasındaki tümörlerde lenf nodu negatif, östrojen progesteron reseptörü pozitif ve grade 1-2 ise nüks açısından orta risk grubu olarak kabul edilir [99]. 1 cm'den küçük ve nod negatif olan hastaların hastalısız sağkalım oranları %92'dir [93].

NSABP'nin B20 ve B21 nolu çalışmalarına göre; düşük risk grubunda sadece tamoksifen ile tedavi edilen hastaların 10 yıllık rekürrensiz sağkalımı tamoksifen ile %95, tamoksifen+kemoterapi ile %96 olarak bulunmuştur. Orta risk grubunda ise; oranlar %89 ve %90'dır [100].

2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. Gereçler

Bu araştırmada kullanılan kan örnekleri, Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Genel Cerrahi servisinde meme kanseri tanısı almış, cerrahi ve medikal tedavi uygulanmış, bilgilendirilmiş gönüllü onam alınan, 97 meme kanserli kadın hastadan ve yaş olarak uyumlu 102 normal sağlıklı gönüllüden alındı. 97 meme kanserli ve 102 sağlıklı kontrol grubundan alınan periferik kan örneklerinden elde edilmiş olan DNA izolasyon numulerinde retrospektif olarak Adiponektin polimorfizmini araştırmak üzere çalışacağımız gen bölgesine özgü primer dizayn ederek PCR-RFLP yapılacak ve elde edilen veriler hasta-kontrol grubunda istatistiksel olarak karşılaştırılacaktır.

2.2. Kullanılan Araç ve Gereçler

2.2.1. Kimyasallar

Sodyum hidroksit (NaOH), asetik asit (CH₃COOH) Riedel-de Haen firmasından; sülfanil amid (C₆H₈N₂O₂S), N-Naftil etilen diamin (C₁₂H₁₄N₂), sodyum nitrit (NaNO₂), sodyum nitrat (NaNO₃), sodyum tetraborat (Na₂B₄O₇.10H₂O), inko sülfat (ZnSO₄), gusin (CH₂NH₂COOH), sodyum dodesil sülfat (C₁₂H₂₅NaO₄S) Sigma firmasından, bakır sülfat (CuSO₄), sülfürik asit (H₂SO₄), kadmiyum, thiobarbutirik asit (C₄H₄N₂O₂S), n-butanol (C₄H₄O), piridin (C₅H₅N) Merck firmasından; 1,1,3,3-tetrametoksipropan (CH₃O)₂CHCH₂CH(OCH₃) ise Aldrich firmasından tümü analitik saflıkta temin edildi. (Bkz. Tablo-2.1)

2.2.2. Kullanılan tampon ve özeltiler

Araştırmada kullanılan tampon ve çözeltiler aşağıda verilmektedir.

2.2.2.1. DNA izolasyon çözeltileri

RBCL (eritrosit parçalama solusyonu) pH 7.4

0.15 M NH₄Cl, 0.01 M KHCO₃, 0.01 M EDTA (pH 8.0).

WBL (beyaz hücre parçalama solusyonu)

0.1M NaCl, 0.025 M EDTA (pH 8.0).

Amonyum asetat (NH₄Ac) solüsyonu

9.5 M NH₄Ac (sterilizasyon için 0.2 mikronluk filtreden geçirilir).

TE tamponu (pH 8.0)

10 mM Tris HCl, 1 mM EDTA pH 8.0 (+20°C).

SDS stok solüsyonu

10% (w/v) SDS, 0.2-0.45 µm membran ile filtre edilmiş.

Tablo 2.1. Kullanılan kimyasallar, firma ve kodları

Akrilamid	Sigma	A9099
Amonyum asetat	Merck	A174189
Amonyum persülfat	Sigma	A9164
Asetik asit	Sigma	A6283
Bisakrilamid	Sigma	M7279
Borik asit	Sigma	B6768
Brom fenol mavisi	Sigma	B5525
Etanol	Sigma	E702
Etidium bromid	Sigma	E875
EDTA	Sigma	E5134
Formaldehit	Sigma	F8775
Formamid	Sigma	F9037
Gümüş nitrat	Sigma	S8157
Ksilen siyanol	Sigma	X4126
Sodyum klorür	Merck	K26744400
Sodyum karbonat	Sigma	S7277
TEMED	Sigma	T7024
Tris baz	Sigma	T 8524

2.2.2.2. Elektroforez solüsyonları

Yükleme tamponları

6 X agaroz jel yükleme tampon, % 0.25 brom fenol mavisi , % 0.25 Xanal eyanol, % 30 gliserol.

Etidyum bromür stok solüsyonu

10 mg/ml etidyum bromür, 50X TAE, 2 M Tris-asetat, 0.05 M EDTA (pH 8.0).

5X TBE

0.45 M Tris borat, 0.01 M EDTA (pH 8.0).

%10'luk non-denatüre poliakrilamid jel solüsyonu (29:1 akrilamid: bisakrilamid)

%10 Akrilamid-bisakrilamid, 1X TBE

Polimerizasyon için;

0.01 M Amonyum persülfat (APS), % 0.1 TEMED ilave edildi.

2.2.2.3. Gümüş boyama solüsyonları

10 X A solüsyonu: %5 asetik asit % 95 absöüt etil alkol.

10 X B solüsyonu: %1 gümüş nitrat.

C solüsyonu: 3 g NaOH, 0.02 g boraks, % 0.2 formaldehit.

10 X D solüsyonu: 22.5 g sodyum bikarbonat / 1lt (opsiyonel).

2.2.3. Araç ve gereçler

Numune hazırlanması ve enzim analizlerinde eppendorf marka (10 µl, 100 µl, 1000 µl'lik) otomatik mikro pipetler, nüve NM 110 marka vortex, sartorius BL2105 marka 0.0001 g'a duyarlı hassas terazi, nüve NF 800R marka santrifuj cihazı, eppendorf marka 5810R model mikrosantrifüj cihazı, shimadzu 1240 model uv/visible spektrofotometre, heidolph MR 301 marka ısıtmalı manyetik karıştırıcı, erison GLP 22 marka dijital pH metre, nüve BM 402 marka sıcak su banyosu, nüve FN 800 marka etüv, elx 800 marka mikro elisa cihazı, BD vacutainer marka katkısız steril deney tüpleri ve ısı ayarlı inkübatör kullanıldı. İstatistik analizleri ise SPSS programı ile yapıldı.

Thermocycler (Eppendorf Mastercycler), Dikey elektroforez (BIORAD), Yapay elektroforez (BIORAD), Güç kaynağı (BIORAD Power Pac 3000), UV transilimünatör (BIORAD), Spektrofotometre (SHIMADZU), CanoScan N670U (Canon), Bilgisayar.

2.3. Metodlar

2.3.1. Numune alınması ve hazırlık işlemleri

Hasta ve kontrollerin medyan venlerinden 10 ml kan alınarak, katkısız steril tübe konuldu. Kan, pıhtılaştıktan hemen sonra bekletilmeden + 4°C'de 3500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifügasyon sonrası, örneklerin süpernatant (üst) kısımları 8 ayrı eppendorfa konularak (gerekli tüm bilgiler eppendorf üzerine yazılarak) - 80°C'de saklandı. Numune toplama işlemi bittikten sonra -80°C'deki örneklerden çalışılacak parametreye göre numune eppendorfları çıkartılarak oda sıcaklığında çözülmeye bırakıldı ve daha sonra analizler yapıldı.

2.3.2. Periferik kandan DNA izolasyonu

1. 10 ml periferik kan 50 ml'lik falkon tüpüne aktarılarak üzerine 1:3 oranında eritrosit lizis tamponu eklendi. +4°C'de 20 dakika bekletilip, 1500 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi.
2. Örnek santrifüjden alınarak üzerindeki süpernatant atıldı. Pellet süspansiyon edildi ve üzerine 20 ml eritrosit lizis tamponu eklendi. Tekrar 1500 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatant atıldı.
3. Pellet tamamen süspansiyon edilip üzerine 500 µl SDS (%10'luk), 50 µl proteinaz K (20mg/ml) ve 9.4 ml WBL (White Blood-Cell Lysis) tamponu eklenerek 56°C'de gece boyu bekletildi.
4. İnkübasyon sonrası üzerine 4 ml Amonyum asetat (9.5 M) eklenip iyice karıştırıldı. 20 dakika 4500 rpm'de santrifüj edildi.
5. Üstteki temiz kısım alınarak yeni bir falkon tüpe aktarıldı, pellet atıldı. Süpernatantın üzerine 20 ml etanol eklendi ve DNA'nın toplanması beklendi. DNA alınarak bir eppendorf tüpe aktarıldı ve üzerine 1 ml %70 etanol

koyuldu. Maksimum hızda (13.200 rpm) 10 dakika santrifüj edilerek DNA çöktürüldü ve süpernatant atıldı. Kurutma işlemi ile kalan alkol uçuruldu.

6. Elde edilen DNA'nın miktarına göre 100 - 300 µl kadar TE (Tris-EDTA, pH=8.0) tamponu eklenerek 56°C'de 1 saat bekletilerek +4°C'de muhafaza edildi.

2.3.3. DNA konsantrasyonu ve saflığın ölçümü

1. Stok DNA tüpünden 1 µl örnek alındı ve 1.5 ml'lik Eppendorf tüpüne aktarıldı.
2. Üzerine 99 µl TE eklenerek 1/100 oranında sulandırıldı.
3. Örneğin spektrofotometrede 260 ve 280 nm ultraviyole dalga boyunda absorpsiyon değerleri okundu.
4. DNA miktarı aşağıdaki formülle hesaplandı:

$$\text{Konsantrasyon} = 100 (\text{sulandırma}) \times 50 (\text{sabit}) \times \text{OD } 260 = \text{ng}/\mu\text{l DNA}$$

5. $\text{OD } 260/280 > \text{RNA}, < 1.8$ protein kontaminasyonu olarak değerlendirildi.

2.4. Genotipleme

Genotipleme alınan kan örneklerinden izole edilen DNA'lardan Polimeraz Zincir Reaksiyonu-Restriksiyon fragman uzunluk polimorfizmi (Polymerase Chain Reaction-Restriction Length Polymorphism (PCR-RFLP)) metodu ile yapıldı. PCR (Polimeraz Zincir reaksiyonu): Bu yöntemle her bir gen (eksonik ve intronik tüm bölgeleri içeren) için özel primerler tasarlanarak genomik DNA'nın çoğaltılması sağlanacaktır.

2.4.1. PCR

Bsml (rs1501299) polimorfizmi, Sfar S ve ark. (2006) yayınladığı metod ile incelendi ve analiz yapıldı. PCR reaksiyonu için 100 ng genomik DNA, 10 pmol forward (F: 5'-CTG AGA TGG ACG GAG TC TTT-3') ve (R: 5'-CCA AAT CAC TTC AGG TTG CTT-3') primerler kullanarak amplifiye edildi.

PRC şartları: 95°C'de 5 dk. denaturasyonu takiben 95°C 30 sn, 60°C'de 45 sn. ve 72°C'de 50sn. 35 döngü ve son olarak 72°C'de 10 dk. şeklinde yapıldı. Total miktarı 20 µl olan PCR mix'i 10 mM Tris-Cl (pH 8.8), 50 mM KCl, %0.08 Nonidet P40 ve 1,5 mM MgCl₂, 200 µM dNTP ve 1.0 U Taq DNA polimeraz (MBI Fermantas) içerecek şekilde hazırlandı.

Small (rs2241766) polimorfizmi, Sfar S ve ark. (2006) tarafından yayınlanan metod ile incelendi ve analiz yapıldı. PRC reaksiyonu için 100 ng genomic DNA, 10 pmol forward (F: 5'-GCA GCT CCT AGA AGT AGA CTC TGC TG-3') ve (R: 5'-GCA GGT CTG TGA TGA AAG AGG CC-3') primerler kullanarak amplifiye edildi.

PRC şartları: 94°C'de 5 dk. denaturasyonu takiben 95°C 45 sn., 61°C'de 45 sn. ve 72°C'de 1 dk. 35 döngü ve son olarak 72°C'de 60 sn. şeklinde yapıldı. Total miktarı 20 µl olan PCR mix'i 10 mM Tris-Cl (pH 8.8), 50 mM KCl, %0.08 Nonidet P40 ve 1.5 mM MgCl₂, 200 µM dNTP ve 1.0 U Taq DNA polimeraz (MBI Fermentas) içerecek şekilde hazırlandı.

2.4.1.1. PRC ürünlerinin agaroz jel elektroforezi

Toplam 25 µl hacimde gerçekleştirilen reaksiyondan kontrol amacı ile 5 µl alınarak 6X agaroz yükleme tamponu ile karıştırıldı. %2'lik agaroz jele pUC-Mix (MBI) size markır ile birlikte yüklenen PRC ürünleri, 50 V akımda yaklaşık 1 saat yürütüldü. UV transilüminatörde görüntülenerek fotoğrafları çekildi.

2.4.1.2. RFLP

Bell restriksiyon enzim kesimi total olarak 15 µl olup 1X Be1F1 tamponu (NE buffer), 1 U Be1FI enzimi, 5 µl PCR ürünü ve 6 µl steril distile su içerecek şekilde hazırlandı ve gece boyunca 55°C'de bekletilerek yapıldı. Hinfl restriksiyon enzim kesimide total olarak 15 µl olup 1X Hinfl tamponu (NE Buffer), 1U Hinfl enzimi, 5 µl PCR ürünü ve 6 µl steril distile su içerecek şekilde hazırlandı ve gece boyunca 37°C'de bekletilerek yapıldı. Earl restriksiyon enzim kesimi total olarak 15 µl olup 1X Earl tamponu 1U earl enzimi, 5 µl PCR ürünü ve 6 µl steril distile su içerecek şekilde hazırlandı ve gece boyunca 37°C'de bekletilerek yapıldı. Kesim ürünleri

%10'luk poliakrilamid jelde (29:1) yürütülüp, gümüş nitrat metodu ile boyanarak görüntülendi. Tarayıcı yardımı ile tüm görüntüler bilgisayara kaydedildi.

Kesim ürünlerinin poliakrilamid jel elektroforezi:

35 cm×10 cm ebatlarında hazırlanan jelin elektroforezi için dikey elektroforez cihazı kullanıldı. Jelin kalınlığı 0.5 mm olarak ayarlandı. Yüzde onluk PAGE stok solüsyonuna sırası ile %10'luk APS stoğundan %1 hacim ve TEMED'den %0.1 hacim ilave edilip 0.5 mm'lik cam aralığına döküldü. Polimerizasyonun tamamlanması için en az ½ saat beklendi.

Polimerizasyon sonrası camlar elektroforez cihazına yerleştirildi. 1X TBE içeren yürütme tamponu ilave edildi. Örnekler jel kuyucuklarına yüklendi. Yükleme tamponu içinde bulunan ve elektrik alanda hareket eden brom fenol mavisi ve ksilen siyanol boyalarının yürüdükleri mesafe takip edilerek akım aşağıdaki çizelgelerde verildiği gibi ayarlandı. Çizelgelerde verilen süreler sonunda jel çıkartılarak gümüş boyama işlemine geçildi.

Gümüş boyama:

Solüsyonlarda ve yıkamada kullanılan suyun kalitesi önemli olduğundan test edilmiş distile su kullanıldı. Elde hafif çalkalama ile aşağıdaki solüsyonlarda sıra ile bekletildi. C solüsyonu kullanımından hemen önce hazırlandı. Sonraki solüsyonlara geçerken aralarda distile su ile bir kaç saniyelik kısa süreler ile yıkandı.

A solüsyonu (Asetik asit-Ethanol): 200 ml distile suya stok solüsyondan 10 ml ilave edilerek hazırlandı ve jel bu solüsyonla 5 dk. muamele edildi.

B Solüsyonu (Gümüş nitrat): 200 ml distile suya stok solüsyonundan 10 ml ilave edilerek hazırlandı ve jel bu solüsyonla 10 dk. muamele edildi.

C Solüsyonu (NaOH-Boraks-Formaldehit): 200 ml distile suya 2.5 gr NaOH ve 0.02 gr boraks ilave edildi ve jel bu solüsyona alındıktan sonra solüsyon içerisine 1 ml formaldehit ilave edilerek bantlar görülünceye kadar jel solüsyon içersinde tutuldu.

D Solüsyonu (NaHCO_3): 200 ml distile suya stok solüsyonundan 20 ml ilave edilerek hazırlandı ve jel bu solüsyonda 5 dk. muamele edildi.

Distile suda yıkanan jel nemli olarak asetat arasına alındı ve naylon dosya poşeti içine alınarak hava alması engellenecek şekilde saklandı.

2.5. İstatiksel Analiz

İstatiksel verilerin analizinde SSPS (Statistical Package for the social Sciences) 13.0 paket programı kullanıldı. Verilerin normal dağılımına bakılarak tek yönlü varyans analizi ve posthoc test ile ve bir grup test ise Kikare testi kullanılarak değerlendirildi. Sonuçlar ortalama \pm standart sapma olarak verildi.

3. BULGULAR

Çalışmaya 97 meme kanserli kadın ve 101 sağlıklı kadın kontrol grubu olmak üzere toplam 198 kişi dahil edilmiştir. Vaka ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı yaş farkı yoktur. Meme kanserli kadınların 34 tanesi DM tanısı alıp medikal tedavi başlanmış hastalardır. 63 hastada bilinen DM tanısı ya da glikoz intoleransı tanısı yoktur. 97 meme kanseri tanısı almış hastanın 71 tanesinde serum adiponektin, leptin, HDL, LDL, HBA1c ve AKŞ düzeyleri bakılmıştır.

Tablo 3.1. Hasta grubunun demografik verileri

	N	Minimum	Maximum
Yaş	97	22	80
Adiponektin	71	4,49167	29,10830
Leptin	71	1,560	120,680
AKŞ	71	82	249
LDL	71	74,6	214,0
HDL	71	25	90
HBA1C	71	4,5	10,3
BsmIn	97	1	3
SmaIn	97	1	3
Geçerli sayı	71		

Diyabetik meme kanseri olan hastalarla diyabetik olmayan meme kanseri hastaları arasında adiponektin ve leptin seviyeleri açısından anlamlı bir fark bulunamamıştır. Diyabetik meme kanseri hastalarında, diyabetik olmayan hastalara göre HBA1c ve LDL değerleri daha yüksek olmasına karşın adiponektin ve leptin seviyeleriyle bağlantı kurulamamıştır.

Tablo 3.2. Grup istatistikleri

	DM	Sayı	Ortalama	Std. Sapma	Std. Hata Payı	t	p
Yaş	var	34	60,97	10,653	1,827	5,213	0,000
	yok	63	48,87	11,037	1,391		
Adipo	var	29	16,9650858	6,86038367	1,27394126	-0,045	0,964
	yok	42	17,0359512	6,29401557	0,97118769		
Leptin	var	29	58,01034	26,507589	4,922336	1,374	0,174
	yok	42	49,99302	22,416027	3,458868		
LDL	var	29	132,434	32,6526	6,0634	0,237	0,813
	yok	42	130,383	37,7589	5,8263		
TG	var	29	164,55	69,683	12,940	1,335	0,186
	yok	42	144,38	57,184	8,824		
HDL	var	29	44,41	12,679	2,354	-1,090	0,280
	yok	42	47,64	11,992	1,850		

Serum adiponektin ve leptin düzeyi bakılan 71 meme kanserli hastanın, 29 tanesi DM tanılı olup 42 tanesinde bilinen DM tanısı yoktur. Diyabetik meme kanseri hastalarıyla diyabetik olmayan meme kanseri hastalarının yaşları kıyaslandığında aralarında anlamlı fark bulunmuştur. Diyabetik meme kanseri hastalarının yaş ortalaması 60,97 iken, diyabetik olmayan meme kanseri hastalarının yaş ortalaması 48,87'dir (p:0,000). Diyabetik meme kanserli hastaların serum adiponektin ortalaması 16,9050858 µg/ml, diyabetik olmayan meme kanserli hastaların ortalaması 17,0359512 µg/ml'dir (p:0,964). Diyabetik meme kanserli hastaların serum leptin ortalaması 58,01034 ng/ml, diyabetik olmayan meme kanserli hastaların ortalaması 49,99302 ng/ml'dir (p:0,174). Diyabetik meme kanseri hastalarıyla diyabetik olmayan meme kanseri hastalarının serum adiponektin ve leptin ölçümleri kıyaslandığında istatistiksel olarak aralarında anlamlı fark bulunmamıştır. Aynı şekilde

serum lipid değerleri de kıyaslandığında (LDL, HDL, TG) istatıksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır.

Meme kanserli hastalarla kontrol grubunda bakılan adiponektin gen polimorfizmi Tablo 3.1 ve 3.2’de gösterilmiştir. BsmI polimorfizmi hastalarda sırasıyla; %5 (9/97) TT homozigot; %45,4 (44/97) GT heterozigot; %45,4 (44/97) GG taşıyıcı olarak saptanmıştır.

Tablo 3.3. Adiponektin genindeki SNP*276 allel frekansları genotip dağılımı (Chi2:2,694; p:0,260)

	bsmIn			Total	
	GG	TT	GT	GG	
Grup kontrol	sayı	56	5	40	101
	%	55,4%	5,0%	39,6%	100,0%
Hasta	sayı	44	9	44	97
	%	45,4%	9,3%	45,4%	100,0%
Total	sayı	100	14	84	198
	%	50,5%	7,1%	42,4%	100,0%

SNP: tek nüleotid polimorfizmi(single nucleotide polymorphism)

SmaI polimorfizmi hastalarda sırasıyla; % 61,9 (60/97) TT homozigot; %37,1 (36/97) TG heterozigot; %1 (1/97) GG taşıyıcı olarak saptanmıştır.

Tablo 3.4. Adiponektin genindeki SNP45 allel frekansları genotip dağılımı (chi2:1,126; P:0,569)

	smaIn			Total	
	TT	GG	TG	Total	
Grup kontrol	sayı	68	2	31	101
	%	67,3%	2,0%	30,7%	100,0%
Hasta	sayı	60	1	36	97
	%	61,9%	1,0%	37,1%	100,0%
Total	sayı	128	3	67	198
	%	64,6%	1,5%	33,8%	100,0%

Meme kanserli hastalarda istatıksel olarak BsmI ve SmaI polimorfizmleri kontrol grubuyla anlamlı olarak fark saptanmamıştır. Aynı zamanda genotipler arası da istatıksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır. Sadece BsmI polimorfizminde sayısal açıdan anlamlı fark olmasına karşın istatıksel açıdan anlamsızdır (hasta sayısı:9, kontrol sayısı:5, p:0,260).

4. TARTIŞMA

Meme kanseri günümüzde kadın kanserleri içinde en sık, kadın kanser ölümlerinde ise ikinci sırayı alır. Ailesinde meme kanseri hikayesinin olması durumu, ileri yaş, uzun bir reproduktif evre yaşamış olma ve çocuk doğurmamış kadınlarda meme kanserleri daha sıktır. Benzer şekilde, ilk çocuğu ileri yaşta sahip olma, obezite, eksojen östrojen ve oral kontraseptiflerin kullanımı ve diğer memede kanser bulunması meme kanseri olasılığını artırmaktadır. Ailesel kanserlerde transkripsiyonel regülasyondan sorumlu supresör BRCA1 ve BRCA2 genlerde mutasyonlar söz konusudur. Ayrıca endojen kaynaklı östrojen fazlalığının anlamlı bir rol oynadığı düşünülmektedir. Özellikle. İnsülin rezistansına bağlı olan metabolik değişiklikler ve özellikle adipoz dokudan üretilen sitokinlerin bağlı olduğu değişiklikler obez kişilerde ilerleyen meme kanserinin agresif davranışına majör yardımcıdır. Özellikle adiponektin ve leptinin son zamanlarda meme kanseri ile bağlantısı rapor edilmiştir.

Adipositokinlerin belli ölçüde kanserojen süreçte yer aldığı, ancak hepsi değilse de çoğunluğunun bu pozitif verileri kanser hücre hatlarında yapılan in vitro çalışmalarda gösterilmiştir. Obezitenin kolon, meme ve prostat kanseri gibi bazı kanser türlerinde riski artırdığı çok iyi bir şekilde belgelenmiştir.

Çalışmamızda günümüzde artan obezite ve meme kanseri sıklığı nedeniyle kadınlar için risk faktörlerini ortaya koymak ve risk altındaki kadınlar için predispozan faktörleri ortadan kaldırmak amacıyla bazı parametreler araştırılmıştır. Meme kanseri patofizyolojisi hakkında birçok çalışma yapılsa da altta yatan genetik faktörler araştırılmaya devam etmektedir. Daha önceden de bahsedildiği gibi adiponektin enerji metabolizması ve insülin duyarlılığı üzerinde önemli etkiye sahiptir. Etkilerini adiponektin reseptörleri üzerinden yapmaktadır (Adipo R1 ve R2). Azalmış adiponektin seviyeleri; meme kanseri gelişimi, tümör hücrelerinin grade'nin artışı, lenf nodu metastazı gelişimi ile doğru orantılı olduğu görülmüştür. AdipoR1 ve AdipoR2'nin hem normal meme epitel hücrelerinde hem de kanser hücrelerinde

bulunduğu gösterilmiştir. Dieudone et al. ise MCF 7 kanser hücresinin hem adiponektin reseptörleri içerdiğini hem de adiponektin hücre büyümesinde azalma şeklinde yanıt verdiğini göstermişlerdir (AMPkinaz aktivasyonu, p42/p44 MAPkinaz inaktivasyonu ile).

Leptin ise, kanser hücrelerinin in vitro olarak büyümesini, atlamasını ve yayılmasını teşvik edici olup anjiyogenezin etkisini artırmaktadır ve kanserin kötü huylu biyolojik in vitro davranışını teşvik edici kapasitededir. Aynı zamanda leptin seviyeleri hastalarda BMI ile doğru orantılıyken, adiponektin seviyelerinin BMI ile ters orantılı olduğu görülmüştür.

Bazı çalışmalarda serum adiponektin seviyeleri ile tümör çapı arasında ilişki saptanmıştır (azalmış serum seviyeleri, yüksek tümör çapı şeklinde).

Yapılan çalışmalarda adiponektin geninde çeşitli polimorfizmler saptanmış olup en çok ilgiyi T45G (rs2241766) ekzon 2’de T>G değişimi ve G276T (rs1501299) intron 2’de G>T değişimi çekmiştir. Bu iki polimorfizm obezite bağımlı insülin rezistansı ile kuvvetle ilgilidir. Aynı zamanda bu iki polimorfizmin meme kanseri ile ilişkisi olduğu düşünölmektedir.

Yapılan çalışmalarda Afrika kökenli Amerikalılarda özellikle BsmI (rs1501299)’nin meme kanseri ile ilişkisi olduğu gösterilmiştir. Bu polimorfizmde TT genotipinde adiponektin seviyeleri GG genotipine göre daha yüksek olduğu gösterilmiş. SmaI (rs2241766) polimorfizminde ise GG genotipinde adiponektin seviyeleri TT genotipine göre daha yüksek bulunmuştur.

Bizim çalıştığımız toplulukta, BsmI ve SmaI polimorfizmlerin meme kanseri ile ilişkisi gösterilememiştir. Kontrol gruplarıyla meme kanserli kadın hastalar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark çıkmamıştır (BsmI; $\chi^2=2,694$, $p=0,260$ SmaI; $\chi^2=1,124$, $p=0,569$). Meme kanseri hastalarının kendi içinde diyabetik olanlar ve olmayanlar arasında değerlendirildiğinde de anlamlı fark saptanmamıştır. Her iki polimorfizmde meme kanseri hastalarıyla kontrol grubu arasında istatistiksel açıdan fark bulmasak da sayısal bakımdan BsmI (T45G) mutasyonları arasında fark bulunmuştur (9/5). Bu polimorfizmin toplumumuzda meme kanseri ile ilişkilendirilmesi

için vaka sayısını ve kontrol gruplarını arttırarak daha geniş bir araştırılma yapılması gerektiğini düşünürüz.

Yapılan bazı çalışmalarda serum adiponektin ve leptin seviyeleri ile meme kanseri gelişimi, lenf nodu metastazı gelişip gelişmemesi ve boyutları arasında ilişki kurulmuştur. Aynı zamanda adiponektinin meme kanser hücre büyümesi üzerinde inhibitör etki yaptığı gösterilmiştir. Vücut kitle indeksinde bağımsız bir risk faktörü olarak düşük adiponektin seviyeleri ve yüksek leptin seviyeleri meme riski açısından anlamlı olduğu görülmüş. Düşük adiponektin seviyelerinin çeşitli çalışmalarda prostat kanseri için de predispozan faktörü olduğu görülmüştür.

Bizim çalışmamızda meme kanserli hastaların serum adiponektin ve leptin seviyeleri bakımından diyabetik meme kanseri hastaları ile diyabetik olmayan hastalar arasında istatistiksel olarak ilişkilendirme yapılamamıştır. Bu hastaların lipid profilleri açısından da anlamlı bir fark saptanamamıştır. Fakat bu parametrelerin toplumumuz açısından meme kanseri ile ilişkisi olup olmadığını anlamak için örneklem boyutunun arttırılması gerekmektedir. Aynı zamanda çalışmaya dahil edilen gruptaki diyabetik meme kanseri hastalarının daha önceden diyabet tanısı almış hastalar olduğu göz önünde bulundurulmalıdır. Çünkü bu hastaların hepsi diyabet ve eşlik eden sistemik hastalıkları için medikal tedavi alınan hastalardır. Diyabet tanısı almış olup, medikal tedavi almaları ve alınan medikal tedavinin meme kanseri açısından koruyucu özellikte olup olmadığı bu çalışmaların ilerleyen boyutlarında araştırılması gereken konulardır. Artmış insülin direnci ve bozulmuş glisemik indeksi olan hastaların diyabet tanısı konulmadığı için daha yüksek riske sahip olabileceği günümüzde tartışılmaktadır. Çeşitli oral antidiyabetiklerle yapılan çalışmalarda (metformin vb.) meme kanserine karşı hücre düzeyinde koruyucu özellikte olup olmadığı araştırılmaktadır.

Bizim çalışmamızda eksik kalan en önemli nokta örneklem büyüklüğünün az olması nedeniyle istatistiksel anlamlı verilere ulaşamamamızdır. Vaka sayısı arttırılarak ve subgruplar oluşturularak anlamlı sonuçlara ulaşılabilir. Literatürlerde ırklar arasında çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Bizim vakalarımız belli bir süre içerisinde toplanmış ve sınırlı bir bölgede yapılan hastane bazlı çalışmalardır. Bu yüzden genel toplumu

temsil etmiyor olabilir. Bu nedenle çalışmanın vaka sayısı ve takip süreleri açısından yetersiz olduğunu dşnmekteyiz. Prospektif çalışmalarda anlamlı sonuçların çıkacağını dşnmekteyiz.



KAYNAKLAR

- [1] Siegel R., Naishadham D., Jemal A., Cancer statistics, *CA Cancer J Clin.*, 2013, **63**, 11–30.
- [2] Siegel R., Naishadham D., Jemal A., Cancer statistics, *CA Cancer J Clin.*, 2012, **62**, 10-29.
- [3] Silvenberg E., Lubera J., Cancer Statistics, *CA Cancer J Clin.*, 1987, **37**, 2-19.
- [4] Trentham-Dietz A, et al., Weight change and risk of postmenopausal breast cancer, *Cancer Causes Control*, 2000, **11**, 533-42.
- [5] Morimoto T. et al., Increased levels of tissue endostatin in human malignant gliomas, *Clin. Cancer Res.*, 2002, **8**, 2933–2938
- [6] Carmichael A. R., Obesity and prognosis of breast cancer, *Obes Rev*, 2006, **7**, 333-340.
- [7] Fact Sheet for World Wide Prevalence of 1413 Obesity, *WHO-World Health Organization*, 2006.
- [8] Calle E. E., Rodriguez C., Walker-Thurmond K., Thun, M. J., Overweight, 950 obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. 951 adults, *N. Engl. J. Med*, 2003, **348**, 1625–1638.
- [9] Cleary M. P., Maihle N. J., The role of body mass index in the relative risk of developing premenopausal versus postmenopausal breast cancer, *Proc Soc Exp Biol Med*, 1997, **216**, 28–43.
- [10] Sweeney C., et al., Risk factors for breast cancer in elderly women, *Am J Epidemiol*, 2004, **160**, 868–875.
- [11] Loi S., et al., Obesity and outcomes in premenopausal and postmenopausal breast cancer, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2005, **14**, 1686–1691.
- [12] Porter G. A., et al., Effect of obesity on presentation of breast cancer, *Ann Surg Oncol*, 2006, **13**, 327–332.
- [13] Mantzoros C., Petridou E., Dessypris N., Adiponectin and breast cancer risk., *J Clin Endocrinol Metab*, 2004, **89**, 1102–1107.
- [14] Kalaycı G., Acarlı K., Demirkol K., Ertekin C., Meme hastalıkları ve tarihçe, Editor: Kalaycı G., *Genel Cerrahi Cilt 1.*, Nobel, İstanbul, 534-535, 2002.

- [15]Spratt J. S, Tabin G.R., Gross anatomy of the breast, Editors: Donegan W. L., Spratt J. S., *Cancer of the breast*, 4th ed., Philedelphia, London, 1995.
- [16]Cooper A. P., *The anatomy and disease of the breast*, Lea and Blanchard, Philedelphia, 1845, 1999.
- [17]Anson B. J., Wright R. R., Blood supply of the mammary gland, *Surg Gynec Obst*, **69**, 468, 1993.
- [18]Batson O. V., The role of the vertebral veins in metastatic process of the breast cancer, *Ann Int Med.*, 1942, 16-38.
- [19]Miller M. R., Kasahara M., Cutaneous innervation of the human breasts. *Anat Rec.* 1959, **135**, 153-167.
- [20]Halsell J. T. et al. Lymphatic drainage of the breast demonstrated by vital dye staining and radiography, *Ann Surg.*, 1963, **162**, 221-226.
- [21]Rouviere H., *Anatomic des lymphatiques de l'hamme*, Mason, Paris, 1932, 16-22.
- [22]Kirby I. B., Coppeland E.M., Breast. Editors: Seymour I. S., Shires G. T., Spencer F. C., Husser W. C., Principles of surgery, Vol.1, 6th ed., Mc Graw Hill, New York, 1994, 531-593.
- [23]Kirby I. B., Coppeland E. M., Breast. Physiologic considerations in normal, benign and neoplastic states. Editors: Thomas A. M., Brian J. R., *Physiologic basis of modern surgical care*, Mosby, New York, 1998, 1019-56.
- [24]Rosenbloom A. L., Breast physiology: Normal and abnormal development and function, Editors: Kirby I. B., Coppeland E. M., *The breast. Comprehensive management of benign and malignant disease*, Vol. 1, 2nd. Ed., W. B. Saunders, Philadelphia, 1988, 38-50.
- [25]Romrell L. J., Bland K. I., Anatomy of the breast, axilla, chest wall, and related metastatic sites, Editors: Bland K. I., Copeland E. M., *The breast: comprehensive management of benign and malignant diseases*, 17th ed., W. B. Saunders, Philadelphia, 1998, 19.
- [26]Brunicardi F. C., Andersen D. K., Billiar T. R., Dunn D. L., Hunter J. G., Matthews J. B., *Schwartz's Principles of Surgery*, 9th ed., McGraw-Hill, New York, 2009, 550-600.
- [27]Iglehart J. D., Kaelin C. M., Diseases of the Breast. Editors: Townsend, Beauchamp, Evers, Mattox, *Sabiston Textbook of Surgery*, W. B. Saunders, Philadelphia, 2001, 555-590.
- [28]Garfinkel L., Boring C. C., Health C. W. Jr, Changing trends: an overview of breast cancer incidence and mortality, *Cancer*, 1994, **74**: 222-227.

- [29] Courtney M. T., Mark E., Daniel B., Kenneth L. M., *The breast: Comprehensive management of benign and malignant diseases*, 2nd. Ed., W. B. Saunders, Philadelphia, 1998, 880-900.
- [30] Lu Y., Ma H., Malone K. E., Norman S. A., Sullivan-Halley J., Marchbanks P. A., McDonald, J. A., West D. W. et al., Oral contraceptive use and survival in women with invasive breast cancer, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*, 2011, **20**, 1391-1397.
- [31] Bartow S. A, Pathak D. R., Prevalence of benign, atypical, and malignant breast lesions in populations of different risk for breast cancer. A forensic autopsy study, *Cancer*, 1987, **60**, 2751-2760.
- [32] Rose D. P., Vona-Davis L., Interaction between menopausal status and obesity in affecting breast cancer risk, *Maturitas*, 2010, **66**, 33–38.
- [33] Miyoshi Y., Funahashi T., Kihara S., et al., Association of serum adiponectin levels with breast cancer risk. *Clin Cancer Res.*, 2003, **9**, 5699–5704.
- [34] Chen D. C., Chung Y. F., Yeh Y. T., et al., Serum adiponectin and leptin levels in Taiwanese breast cancer patients. *Cancer Lett.*, 2006, **237**, 109–114
- [35] Lyengar P., Combs T. P., Shah S. J., et al., Adipocyte-secreted factors synergistically promote mammary tumorigenesis through induction of anti-apoptotic transcriptional programs and proto-oncogene stabilization, *Oncogene*, 2003, **22**, 6408-6423.
- [36] Goldstein B. J., Scalia R., Adiponectin: a novel adipokine linking adipocytes and vascular function, *J Clin. Endocrinol Metab.*, 2004, **89**, 2563-2568.
- [37] Pajvani U. B., Xu Liang D., Combs T. P., et al., Structure-function studies of the adipocyte-secreted hormone Acrp30/adiponectin. Implications for metabolic regulation and bioactivity, *J Biol Chem*, 2003, **278**, 9073-9085.
- [38] Waki H., Yamauchi T., Kamon J., et al., Impaired multimerization of human adiponectin mutants associated with diabetes: molecular structure and multimer formation of adiponectin, *J Biol Chem*, 2003, **278**, 40352-40363.
- [39] Arita Y., et al., Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity, *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, **257**, 79–83.
- [40] Bondanelli M., et al., Blood growth hormone-binding protein levels in premenopausal and postmenopausal women: roles of body weight and estrogen levels, *J Clin Endocrinol Metab*, 1999, **86**, 1973–1980.
- [41] Mantzoros C., et al., Adiponectin and breast cancer risk, *J Clin Endocrinol Metab*, 2004, **89**, 1102–1107.
- [42] Miyoshi Y., Association of serum adiponectin levels with breast cancer risk, *Clin Cancer Res*, 2003, **9**, 5699–5704.

- [43]Chen D. C., et al., Serum adiponectin and leptin levels in Taiwanese breast cancer patients, *Cancer Lett*, 2006, **237**, 109–114.
- [44]Korner A., et al., Total and high molecular weight adiponectin in breast cancer: in vitro and in vivo studies, *J Clin Endocrinol Metab*, 2007, **92**, 1041–1048.
- [45]Takahata C., et al., Demonstration of adiponectin receptors 1 and 2 mRNA expression in human breast cancer cells, *Cancer Lett*, 2007, **250**, 229–236.
- [46]Maeda N., Takahashi M., Funahashi T. N., et al., PPAR γ ligands increase expression and plasma concentration of adiponectin, an adipose-derived protein, *Diabetes*, 2001, **50**, 2094-2099.
- [47]Kadowaki T., Yamauchi T., Adiponectin and adiponectin receptors, *Endocrine Reviews*, 2005, **26**, 439–451.
- [48]Yamauchi T., Kamon J., Ito Y., Tsuchida A., Yokomizo T., Kita S., Sugiyama T., Miyagishi M., Hara K., Tsunoda M. et al., Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects, *Nature*, 2003, **423**, 762–769.
- [49]Yamauchi T., Kamon J., Minokoshi Y., Ito Y., Waki H., Uchida S., Yamashita S., Noda M., Kita S., Ueki K. et al., Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase, *Nature Medicine*, 2002, **8**, 1288–1295.
- [50]Kappes A., Loffler G., Influences of ionomycin, dibutyryl-cycloAMP and tumour necrosis factor-alpha on intracellular amount and secretion of apM1 in differentiating primary human preadipocytes, *Hormone & Metabolic Research*, 2000, **32**, 548–554.
- [51]Fasshauer M., Kralisch S., Klier M., Lossner U., Bluher M., Klein J., Paschke R., Adiponectin gene expression and secretion is inhibited by interleukin-6 in 3T3-L1 adipocytes, *Biochemical & Biophysical Research Communications*, 2003, **301**, 1045–1050.
- [52]Kang J. H., Lee Y. Y., Yu B. Y., Yang B. S., Cho K. H., Yoon D. K., et al., Adiponectin induces growth arrest and apoptosis of MDA-MB-231 breast cancer cell, *Archives of Pharmaceutical Research*, 2005, **28**, 1263–1269.
- [53]Dieudonne M. N., Bussiere, M., Dos Santos E., Leneuve M. C., Giudicelli Y., Pecquery R., Adiponectin mediates antiproliferative and apoptotic responses in human MCF7 breast cancer cells, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2006, **345**, 271–279.
- [54]Wang Y., Lam K. S., Xu J. Y., Lu G., Xu L. Y., Cooper G. J., et al., Adiponectin inhibits cell proliferation by interacting with several growth factors in an oligomerization-dependent manner, *The Journal of Biological Chemistry*, 2005, **280**, 18341–18347.

- [55]Brakenhielm E., Veitonmaki N., Cao R., Kihara S., Matsuzawa Y., Zhivotovsky, B., et al., Adiponectin-induced antiangiogenesis and antitumor activity involve caspase-mediated endothelial cell apoptosis, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, **101**, 2476–2481.
- [56]Zhang Y., Proenca R., Maffei M., Barone M., Leopold L., Friedman J., Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue, *Nature* 1994, **372**, 425–431.
- [57]Garofalo C., and Surmacz E., Leptin and cancer, *Journal of Cellular Physiology*, 2006, **207**, 12–22.
- [58]Knerr I., Herzog D., Rauh M., Rascher W., Horbach T., Leptin and ghrelin expression in adipose tissues and serum levels in gastric banding patients, *European Journal of Clinical Investigation*, 2006, **36**, 389–394.
- [59]Oksanen L., Ohman M., Heiman M., Kainulainen K., Kaprio J., Mustajoki P., et al., Markers for the gene ob and serum leptin levels in human morbid obesity, *Human Genetics*, 1997, **99**, 559–564.
- [60]Ramos A. P., de Abreu M. R., Vendramini R. C., Brunetti I. L., Pepato M. T., Decrease in circulating glucose, insulin and leptin levels and improvement in insulin resistance at 1 and 3 months after gastric bypass, *Obesity Surgery*, 2006 **16**, 1359–1364.
- [61]Considine R. V., Caro J. F., Leptin and regulation of bodyweight, *Int J Biochem Cell Biol*, 1997, **29**, 1255-1272.
- [62]Teker Z., Ozer G., Topaloglu K., Mungan N.O., Yuksel B., Leptin yapı ve fizyolojisi, *Arşiv*, 2002, **11**, 30-40.
- [63]Gomez-Ambrosi J., Salvador J., Paramo J. A., Orbe J., De Irala J., Diez-Cabarello A., Gil M. T., Cienfuegos J. A., Fruhbeek G., Involvement of leptin in the association between percentage of body fat and cardiovascular risk factors, *Clin Biochem*, 2002, **35**, 315-320.
- [64]Konstantinides S., Schafer K., Koschinnick S., Loskutoff D. J., Leptin-dependent platelet aggregation and arterial thrombosis suggest a mechanism for atherothrombotic disease in obesity, *J Clin Invest*, 2001, **108**, 1533-1540.
- [65]Zhang Y., Proenca R., Maffei M., Barone M., Leopold L., Friedman J. M., Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue, *Nature*, 1994, **372**, 425-432.
- [66]Brann D. W., Wade M. F., Phandapani K. M., Mahesh V. B., Buchanan C. D., Leptin and reproduction. *Steroids*, 2002, **67**, 95-104.
- [67]Cleary M. P., Phillips F. C., Getzin S. C., Jacobson T. L., Jacobson M. K., Christensen T. A., et al. Genetically obese MMTV-TGF- α /Lep(ob)Lep(ob)

- female mice do not develop mammary tumors, *Breast Cancer Research and Treatment*, 2003, **77**, 205–215.
- [68]Cleary M. P., Juneja S. C., Phillips F. C., Hu X., Grande J. P., Maihle N. J., Leptin receptor-deficient MMTV-TGFalpha/Lepr(db)Lepr(db) female mice do not develop oncogeneinduced mammary tumors, *Experimental Biology and Medicine (Maywood)*, 2004, **229**, 182–193.
- [69]Sandoval D. A., Davis S. N., Leptin: Metabolic control and regulation, *J Diabetes Complications*, 2003, **17**, 108-113.
- [70]Tartaglia L. A., The leptin receptor, *J Biol Chem*, 1997, **272**, 6093-6096.
- [71]Pelleymounter M. A., Cullen M. J., Baker M. B., Hecht R., Winters D., Boone T, Collins F., Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice, *Science*, 1995, **269**, 540-543.
- [72]van't Veer L. J., Dai H., van de Vijver M. J., He Y. D., Hart, A. A., Mao M., et al., Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer, *Nature*, 2002, **415**, 530–536.
- [73]Gruvberger S., Ringner M., Chen Y., Panavally S., Saal L. H., Borg A., et al., Estrogen receptor status in breast cancer is associated with remarkably distinct gene expression patterns, *Cancer Res.*, 2001, **61**, 5979–5984.
- [74]West M., Blanchette C., Dressman H., Huang E., Ishida S., Spang R., et al., Predicting the clinical status of human breast cancer by using gene expression profiles, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001, **98**, 11462–11467.
- [75]Considine R. V., Sinha M. K., Heiman M. L., Kriuciuonas A., Stephens T. W., Nyce M. R., et al., Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans, *N Engl J Med*, 1996, **334**, 292-295.
- [76]Freidman J. M., Halaas J. L., Leptin and regulation of body weight in mammals, *Nature*, 1998, **395**, 763-770.
- [77]Wallace M., Sattar N., Donald C., Effect of weight loss and the inflammatory response on leptin concentrations in gastrointestinal cancer patients, *Clin Cancer Res*, 1998, **4**, 2977-2979.
- [78]Tessitore L., Vizio B., Leptin: A novel marker for breast cancer progression, *2nd Balkan Congress on Oncology*, Izmir, Türkiye, 10-14 September 1998.
- [79]O'Brien S. N., Welter B. H., Price T. M., Clemson U., Glemson S. G., Presence of Leptin in breast cell lines and breast tumors, *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, **259**, 695–698.
- [80]Dieudonne M. N., Machinal-Quelin F., Serazin-Leroy V., Leneveu M. C., Pecquery R., Giudicelli Y., Leptin mediates a proliferative response in human

- MCF7 breast cancer cells, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2002, **293**, 622–628.
- [81]Hu X., Juneja S. C., Maihle N. J., Cleary M. P., Leptin-a growth factor in normal and malignant breast cells and for normal mammary gland development, *Journal of National Cancer Institute*, 2002, **94**, 1704–1711.
- [82]Nkhata K. J., Ray A., Schuster T. F., Grossmann M. E., Cleary M. P., Effects of adiponectin and leptin co-treatment on human breast cancer cell growth, *Oncol Rep*, 2009, **21**, 1611–1619.
- [83]Perera C. N., Chin H. G., Duru N., Camarillo I. G., Leptin-regulated gene expression in MCF-7 breast cancer cells: mechanistic insights into leptin-regulated mammary tumor growth and progression, *J Endocrinol*, 2008, **199**, 221–233.
- [84]Jiang H., Yu J., Guo H., Song H., Chen S., Upregulation of survivin by leptin/STAT3 signaling in MCF-7 cells, *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, **368**, 1–5.
- [85]Chen C., Chang Y. C., Liu C. L., Chang K. J., Guo I. C., Leptin-induced growth of human ZR-75-1 breast cancer cells is associated with up-regulation of cyclin D1 and c-Myc and downregulation of tumor suppressor p53 and p21WAF1/CIP1, *Breast Cancer Res Treat*, 2006, **98**, 121–32.
- [86]Naviglio S., Di Gesto D., Sorrentino A., et al., Leptin enhances growth inhibition by cAMP elevating agents through apoptosis of MDA-MB-231 breast cancer cells, *Cancer Biol Ther*, 2009, **8**, 1183–1190.
- [87]Jarde T., Caldefie-Chezet F., Damez M., et al., Leptin and leptin receptor involvement in cancer development: a study on human primary breast carcinoma, *Oncol Rep*, 2008, **19**, 905–911.
- [88]Catalano S., Marsico S., Giordano C., et al., Leptin enhances, via AP-1, expression of aromatase in the MCF-7 cell line, *J Biol Chem*, 2003, **278**, 28668–28676.
- [89]Silverstein M. J., Gierson E. D., Waisman J. R., Axillary lymph node dissection for T1a breast carcinoma, *Cancer*, 1994, **73**, 664-667.
- [90]Sener S. F., Lee L. H., Staging of breast cancer. Editors: Singletary S. E., Robb G. L., *Advanced Therapy of Breast Disease*, BC Decker Inc, Philadelphia, 113-119, 2000.
- [91]Silverstein M. J., Gierson E. D., Waisman J. R., Predicting axillary lymph node positivity in patients with invasive carcinoma of the breast by using a combination of T category and palpability, *J Am Coll Surg*, 1995, **180**, 700-704.

- [92]Barth R. J., Danforth D. N., Venson D. J., Level of axillary involvement of lymph node metastases from breast cancer is not an independent predictor of survival, *Arch Surg*, 1991, **126**, 574-577.
- [93]Fisher B., Bauer M., Wickerham D. L., Other NSABP investigators: Relation of number of positive axillary nodes to the prognosis of patients with primary breast cancer. An NSABP update, *Cancer*, 1983, **52**, 1551-1557.
- [94]Osborne C. K., Prognostic factors in breast cancer, *Principles Pract Oncol*, 1990, **4**, 1-11.
- [95]Carter C. L., Allen C., Henson D. E., Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24,740 breast cancer cases, *Cancer*, 1989, **63**, 181-187.
- [96]Sikorak K., et al., Genes, dreams and cancer, *BMJ*, 1994, **308**, 1217-1221, .8. National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement: Adjuvant Therapy for Breast Cancer, November 1–3, 2000.
- [97]Vinay K., Ramzi C., Stanley L. R., *Robbins Basic Pathology*, 7th ed., Elsevier, New York, 714-719, 2000.
- [98]Winer E. P., Hudis C., Burstein H. J., et al., American Society of Clinical Oncology Technology assessment on the use of aromatase inhibitors as adjuvant therapy for women with hormone receptor-positive breast cancer: Status report, *J Clin Oncol*, 2002, **20**, 3317-3327.
- [99]Early Breast Cancer Trialists Collaborative Group, Systemic treatment of early breast cancer by hormonal, cytotoxic, or immune therapy. 133 randomised trials involving 31.000 recurrences and 24.000 deaths among 75.000 women, *Lancet*, 1992, **339**, 1-15.
- [100] Debniak T., Gorski B., Huzarski, Byrski T., Cybulski C., Mackiewicz A., Gozdecka G. S., A common variant of CDKN2A (p16) predisposes to breast, *Cancer J Med Genet*, 2005, **42**, 763–765.