

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MEME KANSERİ HASTALARINDA BRCA1-BRCA2 GENLERİNDE
SAPTANAN VARYASYONLARIN KEMOTERAPİ ÜZERİNE
OLASI ETKİLERİ**

Merve GÖKBAYRAK

Kocaeli Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin

Tıbbi Genetik ve Moleküler Biyoloji Programı için Öngördüğü

BİLİM UZMANLIĞI (YÜKSEK LİSANS) TEZİ

Olarak Hazırlanmıştır.

KOCAELİ

2017

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MEME KANSERİ HASTALARINDA BRCA1-BRCA2 GENLERİNDE
SAPTANAN VARYASYONLARIN KEMOTERAPİ ÜZERİNE
OLASI ETKİLERİ**

Merve GÖKBAYRAK

Kocaeli Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin
Tıbbi Genetik ve Moleküler Biyoloji Programı için Öngördüğü
BİLİM UZMANLIĞI (YÜKSEK LİSANS) TEZİ

Olarak Hazırlanmıştır.

Danışman: Doç. Dr. Naci ÇİNE

KOCAELİ

2017

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

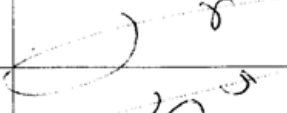
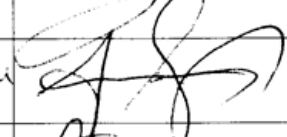
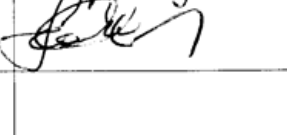
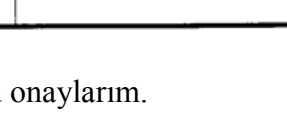
Tez Adı: Meme kanseri hastalarında BRCA1-BRCA2 genlerinde saptanan varyasyonların kemoterapi üzerine olası etkileri

Tez yazarı: Merve GÖKBAYRAK

Tez savunma tarihi: 19.06.2017

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Naci ÇİNE

Bu çalışma, sınav kurulumuz tarafından Tıbbi Genetik ve Moleküler Biyoloji Anabilim Dalında BİLİM UZMANLIĞI (YÜKSEK LİSANS) olarak kabul edilmiştir.

SINAV KURULU ÜYELERİ		İMZA
ÜNVANI	ADI SOYADI	
BAŞKAN	Doç. Dr. Naci ÇİNE	
ÜYE(DANIŞMAN)	Doç. Dr. Naci ÇİNE	
ÜYE	Prof. Dr. Seniha Tokdemirlişçi	
ÜYE	Yrd. Doç. Dr. Seada Eren Kesler	
ÜYE		

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

..../..../2017

Prof. Dr. Mustafa YILDIZ

KOÜ Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürü

ÖZET

Meme Kanseri Hastalarında BRCA1-BRCA2 Genlerinde Saptanan Varyasyonların Kemoterapi Üzerine Olası Etkileri

Amaç: Kadınlarda en sık görülen kanser türlerinden biri meme kanseridir. Meme yapısında meydana gelen kötü huylu bir gelişim olarak tanımlanmaktadır. Meme kanseri üzerinde kalıtsal, genetik, çevresel, hormonal, sosyobiyolojik ve psikolojik etkenlerin rol aldığı kabul edilmektedir. Yapılan araştırmalarda meme kanserinin ortalama 90 mutant gen taşıdığını, ancak taşıdığı bu genlerin sadece bir kısmının kansere yol açtığı saptanmıştır. Ailesel meme kanserinin üçte birinin BRCA1-BRCA2 genlerinde meydana gelen mutasyonlar sonucu olduğu gösterilmiştir. BRCA gen varyasyonlarının ayrıntılı analizleri ile ailesel meme kanseri patofizyolojisi daha iyi anlaşılmaktadır. Çalışmamızda BRCA1-2 genlerinde saptanan varyasyonların kemoterapötik ilaçlara karşı duyarlılığı incelenecektir.

Yöntem: Çalışmamızda, Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'na, Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Onkoloji Anabilim Dalı'ndan yönlendirilen 460 hastadan meme kanseri tanısı alanlar seçilmiştir. Seçilen olgular arasından tedavi almış, patojenik mutasyona sahip olan 50 ve olmayan 50 olgu çalışmaya dahil edilmiştir. BRCA1-BRCA2 genleri yeni nesil ve sanger dizi analizi teknikleri kullanılarak incelenmiştir. Elde edilen veriler hastaların aldıkları tedaviler ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. BRCA1-2 gen varyasyonları ile ilişkileri belirlenmiştir.

Bulgular: Yeni nesil dizi analiz sonuçlarına göre 50 (%10,8) patojenik varyasyon, 279 olguda (%60,7) polimorfizm saptanmıştır. 131 olguda (%28,5) varyasyon saptanmamıştır. Alınan adjuvan, neoadjuvan tedavilere ait kemoterapötikler BRCA varyasyonlarının ilişkisi incelenmiştir.

Sonuç: Elde ettiğimiz verilerin meme kanserinde takip ve prognozunda önemli olduğunu, hedefe yönelik uygun tedavilerin saptanmasında ve tedavinin kişiye özgü olarak gelişmesinde önemli olduğunu düşünmekteyiz.

Anahtar kelimeler: Meme kanseri, BRCA1, BRCA2, mutasyon analizi, kemoterapötik tedavi

ABSTRACT

Possible effects of detected variations in BRCA1-BRCA2 genes on chemotherapy in breast cancer patients

Objective: Breast cancer is one of the most common types of cancer affecting women. It is defined as a malignant development that occurs in the breast. Hereditary, genetic, environmental, hormonal, sociobiological and psychological factors play a role in breast cancer. Studies have shown that breast cancer carries an average of 90 mutant genes, but only some of these genes are carcinogenic. Mutations occurring in BRCA1-BRCA2 genes are responsible for one third of breast cancer that shows inherited characteristics. Hereditary breast cancer pathophysiology is better understood by detailed analysis of variations of BRCA genes. In this study, the susceptibility of the genetic characteristics of variations detected in BRCA1-BRCA2 genes to chemotherapeutic drugs will be compared. We aimed to develop appropriate targeted therapies in line with these results.

Method: In our study, 460 patients who were diagnosed with breast cancer from Kocaeli University Medical Faculty, Medical Genetics Department and Kocaeli University Medical Faculty, Oncology Department, were screened. Among those only diagnosed breast cancer patients were selected 100 patients. Fifty patients with pathogenic mutations and fifty patients without pathogenic mutations were included in the study. Analysis of new generation and Sanger sequence sequencing of BRCA1-BRCA2 and the treatment of the patients were investigated.

Results: Pathogenic variation in 50 (10,8%) and 279 (60,7%) polymorphisms were found in 50 of the new generation sequencing results, whereas no variation was found in 131 (28,5%). The finding that chemotherapeutic agents belonging to the adjuvant and neoadjuvant treatments were altered according to the metastatic findings and mutation pathologies observed in the patients.

Conclusion: We conclude results are also beneficial for the determination of appropriate targeted treatment. Associating the broad variations of the breast cancer patients with the demographic characteristics of the patients and the chemotherapeutic treatments. They are important for the follow-up and prognosis of the disease.

Key words: Breast cancer, BRCA1, BRCA2, mutation analysis, chemotherapeutic treatment

TEŞEKKÜR

Tıbbi Genetik alanında çalışma şansını bana tanımış olan anabilim dalı başkanımız Doç.Dr.Hakan SAVLI 'ya

Bilgi birikimi, bakış açısı, hoşgörüsü ve eğitime verdiği destek ile kendime örnek aldığım ve yüksek lisans eğitimim boyunca benden desteğini esirgemeyen tez danışmanım değerli hocam Doç.Dr.Naci ÇİNE'ye ,

Tez çalışmam boyunca bana sağladıkları destek ve hoşgörü ile yanımda olan birlikte çalışmaktan keyif aldığım değerli arkadaşlarım Nilüfer SERTDEMİR, Duygu AYDIN ve Pelin CANBAZ'a ve diğer bütün laboratuvar çalışanı arkadaşlarıma,

Her türlü desteğini ve sonsuz sevgisini her zaman hissettiğim sevgili eşim ve hayat arkadaşım Özkan GÖKBAYRAK'a,

Tüm yaşamım boyunca destekleriyle, sevgileriyle, her zaman yanımda olan değerli aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Merve GÖKBAYRAK

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ÇİZİMLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
1-GİRİŞ	1
2-GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kanser	3
2.2. Kanser İnsidansı	4
2.3. Kanser ve Genetik	5
2.3.1.Kansere Neden Olan Genler	6
2.3.1.1. Onkogenler	6
2.3.1.2. Tümör Süpressör Genler	6
2.3.1.3. Kimerik Genler	7
2.4. Kanser ve Hücre Döngüsü	8
2.4.1. Hücre Döngüsünün Regülasyonu	8
2.4.2. Hücre Döngüsü'nün Kontrolü, DNA Tamir Mekanizmaları	9
2.5. Meme Kanseri	11
2.5.1. Meme Kanseri Epidemiyolojisi	12
2.5.2. Meme Kanserinin Etyolojisi	13
2.5.3. Mortalite	13
2.6. Meme Kanseri Oluşumda Rol Oynayan Risk Faktörleri	14
2.6.1. Yaş ve Cinsiyet	14
2.6.2. Irk ve Etnik Köken	15
2.7. Hormonal Faktörler	15
2.8. Çevresel Faktörler	15
2.8.1. Radyasyona Maruz Kalma	15
2.8.2. Oral Kontraseptif Kullanımı	15
2.8.3. Alkol Kullanımı	16

2.8.4. Egzersiz	16
2.8.5. Beslenme Alışkanlığı	16
2.8.6. Kişisel ve Ailesel Kansere Öyküsü	16
2.9. Genetik Faktörler	17
2.9.1. Büyüme Faktörleri	17
2.9.2. Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü	17
2.9.3. CerbB-2	18
2.10. Sinyal İletimi ile İlişkili Nükleer Onkogenler	18
2.10.1. c-Myc	18
2.10.2. Ras	18
2.11. Tümör Baskılayıcı Genler	18
2.11.1. p53	18
2.11.2. ATM	19
2.12. Meme Kanseri BRCA1 ve BRCA2 Genleri	19
2.12.1. BRCA1 Geni	20
2.12.2. BRCA2 Geni	21
2.12.3. BRCA-1 ve BRCA-2 Gen Mutasyon Çeşitleri	22
2.13. Over Kanseri	24
2.14. BRCA Varyasyon Saptama Yöntemleri	24
2.14.1. Otomatik Dizi Analizi	24
2.14.2. Yeni Nesil Dizi Analizi	25
2.15. Meme Kanseri Kemoterapi Seçenekleri	26
2.15.1. Meme Kanseri Neoadjuvan Kemoterapi Seçenekleri	26
2.15.2. Meme Kanseri Adjuvan Kemoterapi Seçenekleri	28
2.15.3. Adjuvan Endokrin Tedavi Seçenekleri	29
3.GEREÇ-YÖNTEM	31
3.1. Araştırma Tekniği	31
3.2. Örnek Seçimi	31
3.3. Araştırmanın Yeri	31
3.4. Otomatik dizi analizi tekniği	31
3.5. Laboratuvar Aşamaları	31
3.5.1. Örnek Toplama ve DNA İzolasyonu	31
3.5.2. DNA Dizi Analizi İçin Polimeraz Zincir Reaksiyon Tekniği	31

3.5.3. Agaroz Jel Elektroforezi	33
3.5.4. Pürifikasyon İşlemi	34
3.5.5. Cihaz Yükleme Aşaması ve Verilerin Alınması	35
3.6. BRCA1 ve BRCA2 Dizi Analizinde Kullanılan Primerler	36
3.7. Veri Toplanması	37
3.8. Kullanılan Alet ve Cihazlar	37
3.9. Kullanılan Sarf Malzemeler	37
3.10. Yeni Nesil Dizi Analizi Tekniği	38
3.10.1. Pico-green İle Miktar Tayini	38
3.10.2. Dna Kütüphanesinin Hazırlanması	39
3.10.3. Yeni Nesil Dizileme	40
3.10.4. Kütüphanenin Cihaza Yüklmesi	40
3.11. Analiz	40
3.12. Kullanılan Alet ve Cihazlar	41
3.12. Kullanılan Sarf Malzemeler	41
4.BULGULAR	42
5. TARTIŞMA	52
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	58
KAYNAK DİZİNİ	59
ÖZGEÇMİŞ	65
EKLER	67
EK 1: Kullanılan Anamnez Formu	67

SİMGELER ve KISALTMALAR LİSTESİ

BRCA1:	Breast cancer 1 (Meme kanseri 1)
BRCA2:	Breast cancer 2 (Meme kanseri 2)
DNA:	Deoksiribonükleik asit
PCR:	Polymerase chain reaction (Polimeraz zincir reaksiyonu)
HNPCC:	Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Hereditör non-polipozis kolorektal kanser)
dNTP:	Deoxyribonucleotide triphosphate
TBE:	Tris base, boric acid, EDTA
EDTA:	Ethylenediaminetetraacetic acid
ATM:	Ataxia Telangiectasia Mutated
NBN:	Nibrincancer 1
RAD51:	RAD51 recombinase
RAD52:	RAD52 homologue
BLM:	Bloom Syndrome, RecQ helicase-like
XRCC1:	X-Ray Repair Cross-Complementing Protein
ADPRT:	ADP-ribosyltransferase
APEX1:	Apex nuclease
OGG1:	8-Oxoguanine DNA Glycosylase
LIG3:	DNA Ligase 3
SMUG1:	Single-Strand-Selective Monofunctional Uracil-DNA Glycosylase
MUTYH:	MutY homologue
PR :	Progesteron Reseptörü
ER:	Östrojen Reseptörü
HER-2:	Epidermal hücre büyüme reseptör erb-2
İMİK:	İnflamatuar meme kanseri
LMK:	Lokal ileri meme kanseri

ÇİZİMLER DİZİNİ

Çizim 2.1. Uluslararası Kanser Araştırmaları Derneği (International Agency for Research on Cancer) GLOBOCAN Projesi Ülkeler arası kanser grafiği	4
Çizim 2.2 BRCA'ya ait DNA tamir mekanizmaları ve BRCA eksikliğini telafi eden alternatif DNA tamir yolları.	10
Çizim 2.3. Kadınlarda En Sık Görülen Kanserlerin Toplam Sayısı ve Yüzde Dağılımları (Birleşik Veri Tabanı, 2009) (Dünya Standart Nüfusu, 100.000 Kişide)	12
Çizim 2.4. IARC Globocan proje verilerine göre ülkeler arası tüm yaşlara göre meme kanseri yüzdeleri	13
Çizim 2.5. Meme kanserinin kadınlarda yaşa göre hızları	14
Çizim 2.6. BRCA geni domain yapıları	21
Çizim 2.7. BRCA2 geni domain yapıları	21
Çizim 2.8. BRCA2 geni DNA tamir mekanizması	22
Çizim 2.9. Otomatik Sanger dizi analizi tekniği ile saptanmış mutasyon görüntüsü	25
Çizim 2.10. Yeni nesil dizi analizi tekniği-seq genomize analiz programı ile saptanmış mutasyon görüntüsü	26

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Uluslararası Kanser Ajansı (IARC) tarafından yayınlanan 100.000 kişide yaşa göre standardize edilmiş hız ** Türkiye Birleşik Veri Tabanı.	5
Çizelge 2.3. Neoadjuvan kemoterapi için örnek rejimler	28
Çizelge 2.4. Meme kanserinde sık uygulanan adjuvant tedavi seçenekleri	29
Çizelge 3.1. PCR Karışımı	32
Çizelge 3.2. Termal döngü protokolünün ısı ve süreleri	32
Çizelge 3.3. Sekans PCR Karışımı	33
Çizelge 3.4. Termal döngü sekans PCR protokolünün ısı ve süreleri	33
Çizelge 3.5. ddNTP floresan boya ve renkleri	35
Çizelge 4.1. Cinsiyetin BRCA varyasyonlarına göre dağılımı	42
Çizelge 4.2. BRCA Pozitif Hastaların Genel Yaş Ortalaması, İlk Gebelik, Menarş, Menapoz Yaşları ve Beden Kitle İndeksleri	42
Çizelge 4.3. Hastaların BRCA1 ve BRCA2 genlerinde saptanan varyasyon sonuçları.	43
Çizelge 4.4. BRCA1 ve BRCA2 genlerinde saptanan patojenik ve patojenik olmayan varyasyon dağılımı	43
Çizelge 4.5. BRCA1 geninde saptanan varyasyonlar	44
Çizelge 4.6. BRCA1 geninde saptanan patojenik varyasyonlar	45
Çizelge 4.7. BRCA2 geninde saptanan varyasyonlar	46
Çizelge 4.8. BRCA2 geninde saptanan patojenik varyasyonlar	48
Çizelge 4.9. Ailesinde meme/over kanseri öyküsü olan ve BRCA varyasyonlarının dağılımı	48
Çizelge 4.10. BRCA pozitif ve BRCA negatif hastaların histolojik özelliklere göre dağılımı	49
Çizelge 4.11. BRCA varyasyonlarına sahip hastaların kemoterapi tedavi dağılımı	50
Çizelge 4.12. BRCA pozitif olan ve üçlü negatif özellik gösteren hastaların aldıkları tedaviler, tümör çapı, tümör grade, aile hikayesi	50

BÖLÜM 1:GİRİŞ

Meme kanseri, meme yapısında meydana gelen malignitedir ve kadınlarda görülen tüm kanserlerin %30'unu kapsamaktadır. Gelişmiş ülkelerde meme kanseri daha yüksek bir insidansa sahiptir. Bu ülkelerde kadınlarda kanser nedeniyle ölümlerde meme kanseri ikinci sırada gelmektedir. Akciğer kanseri ilk sırada yer almaktadır. Meme kanserinin dünyada ortalama insidansı 38-40/100.000 oranındadır. Avrupa'da bu oran 66-67/100.000, Türkiye'de 40/100.000 seyretmektedir. Amerika'da ise yılda 184.000, Avrupa'da yılda 180.000 civarında yeni olgularla karşılaşmaktadır. Ülkemizde tüm kanserlerin %24.1'ini meme kanserlerinin oluşturduğu belirtilmektedir (Pilato ve diğ. 2011).

Meme kanseri üzerinde kalıtsal, genetik, çevresel, hormonal, sosyobiyojik ve psikolojik etkenlerin rol aldığı kabul edilmektedir. Meme kanserinin güçlü bir genetik komponenti bulunmaktadır. Kadınlarda meme kanserinin gelişme riski birinci derece yakın bireyin varlığında 3 kata kadar, birden fazla birinci derece yakınlarında etkilenen bireylerin varlığında ise 10 kata kadar artış oranına sahiptir. Yapılan çalışmalarda meme kanserlerinin bir kısmı dominant mendelyen predispozisyon göstermektedir, %20'sinin ise poligenik veya multifaktöriyel kalıtımın bir parçası olarak belirgin komponentleri vardır. Genetik yatkınlıktan sorumlu olan genlerin başında BRCA-1 (meme kanseri geni 1) ve BRCA-2 (meme kanseri geni 2) gelmektedir. Ailesel meme kanseri hastalarında BRCA1-BRCA2 mutasyonları saptanabilmektedir (Hartmann ve diğ. 2004).

Ailesel meme kanseri otozomal dominant kalıtım göstermektedir. Yapısal genlerdeki mutasyonlar dominant kalıtımla aktarılır. Otozomal dominant kalıtımda, kanser vertikal geçiş gösterir, mutant gen hem erkek hem de kız çocuklara geçebilir, kalıtım riski %50'dir. BRCA1 ve BRCA2 proteini kodlayan genler de yapısal gen özelliğindedir. Bu genlerdeki mutasyonlar sonucu oluşan proteinler tam fonksiyon gösteremezler ve bu bozuklukların fizyolojik toleransı mümkün olmadığı için heterozigot durumda bile hastalık oluşumu gözlenmekte olup ailesel kalıtım özelliğinin ortaya çıkmasına ve hastalığın toplumda yaygınlaşmasına neden olabilmektedir.

Yapılan çalışmalarda, BRCA1 ve BRCA2 mutasyonları için heterozigot olan kadınlarda 70 yaşına kadar, %80'den fazla meme kanseri gelişme riski olduğu belirlenmiştir. Bu belirlemeler incelenen ailelerin bayan akrabalarında kanser gelişme riski saptamalarına dayanmaktadır (Yang ve diğ. 1999).

Hastalığın erken evrede, hatta oluşmadan belirlenebilmesi sağ kalım oranını arttırır. Bu genlerdeki mutasyonların riskli hastalarda taranarak bilgilendirilmesi bu sebepten son derece önemlidir. Meme kanseri tanılı hastalarda ise BRCA genleri baz alınarak hedefe yönelik tedavilerin gelişmesi için çalışmalar yapılmaktadır. BRCA1/2 genlerinde patojenik mutasyon belirlenen hastalarda sistemik olarak uygulanan kemoterapi tedavisine ek olarak yeni ilaçlar geliştirmek için çalışmalar yapılmaktadır. Bunlardan biri olan Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitörlerinin farklı proteinlerle etkileşime girerek, gerçekleştirilen tedavilerden yarar sağlayabildikleri ortaya konmuştur. BRCA1 ve BRCA2 genlerinde mutasyon olan hastalarda, Poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) enzim inhibitörü ajanlarıyla farklı kemoterapötik ilaçlar arasında etkileşim saptanmış, çalışmalar devam etmektedir. Yapılan tedavilere hastalar tarafından güçlü cevap verildiği yapılan çalışmalarda ortaya konmuştur. Meme ve over kanserlerinde BRCA1/BRCA2 mutasyonu çalışılmasını ve hastaların alacakları tedavilerde yol gösterici olduğu düşünülmektedir. Genetik mutasyonun gösterilmesinin sadece tanının konulmasında ve risk altındaki popülasyonun taranmasında değil, aynı zamanda tedavi planlamasında da klinikte ve hastalığın seyri için kullanılabileceği tespit edilmiştir (Hennessy ve diğ. 2010).

Gen ekspresyonunun epigenetik düzenlenmesi hücrelerin kanserleşme aşamalarında önemli rol oynayabilmektedir. Bu nedenle, DNA'nın epigenetik modifikasyonları kanserin erken tanısında, prognoz ve tedavide belirleyici olabilme potansiyeline sahiptir. Bu değişimlerin analiz edilebilir olması, bu değişimleri hedef alan terapötik ajanların ve tedavi yöntemlerinin araştırılmasına kullanılabilir ve yol göstericidir.

Bu çalışmanın amacı 2010-2017 yılları arasında Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalına, meme kanseri, ailede meme ve/veya over kanseri öyküsü veya memede kitle tanısıyla gelen hastaların BRCA1 ve BRCA2 genlerinde saptanan varyasyonların fenotipe etkisini ve meme kanseri hastalarının aldıkları tedaviler üzerine etkilerini belirlemektir.

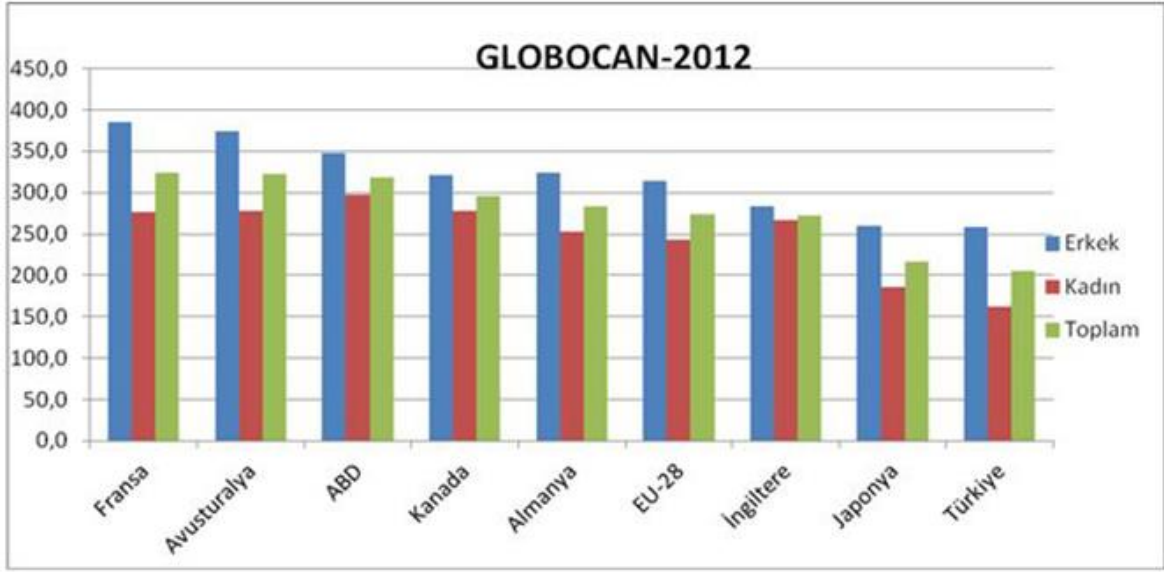
BÖLÜM 2: GENEL BİLGİ

2.1. KANSER

Kanser, hücre büyüme ve bölünmesini kontrol eden dnanın hasar görmesi sonucu ortaya çıkan bir hastalıktır. Kanserın en önemli tanımsal özelliği, vücudun çeşitli bölgelerinde ortaya çıkan ve diğer organlara yayılabilen anormal hücre bölünmeleridir. Anormal bölünen hücre topluluğu, çevresinde bulunan doku veya organı baskılayarak işlevini yerine getirmesini önler ve regülasyonu bozar (Nayak ve diğ. 2010).

Yaşamsal fonksiyonlar için gerekli olan kimyasallar, metabolik faaliyetlerde gerekli yerlere nüfus eder ve genlerdeki kodlar kullanılarak sentezlenir. Bu faaliyetler sonucu ortaya çıkan çoğu kimyasal, vücudu korumak için detoksifikasyon işlemine maruz kalır. Gerçekleşen metabolik tepkimeler sonucu meydana gelen bazı kimyasallar, DNA hasarına sebep olarak kanser mekanizmalarının devreye girmesini tetikleyebilir. Metabolik faaliyet hızına ve ortaya çıkan metabolik ürünün veya kimyasalın kanserojen özellikler taşımasına göre kanser riskinde değişken sonuçlar ortaya çıkar. Kanserlerin geriye kalan %99'luk oranı ise insanların beslenme alışkanlıkları, çalışma koşulları yaşam ortamları, doğal veya yapay radyasyona maruz kalma, elektromanyetik alanlar, ve kanserojen kimyasallarla ortaya çıkabilmektedir. Bunlar çevresel kanser risk faktörleri olarak adlandırılır. Ayrıca yapılan meta analiz çalışmalarda saptanan psikososyal faktörlerde; depresyon, stresli yaşam gibi etmenler kanser riskini arttırabileceği ilişkisi gösterilmektedir (Ozmen 2008).

Farklı moleküler mekanizmalardaki düzensizlikler her hücre tipinde kansere yol açar. DNA metilasyonu, DNA'nın genetik istikrarsızlığı gibi epigenetik faktörler ve DNA tamir mekanizmalarındaki bozukluklar da kanser gelişiminde rol oynamaktadır.



Çizim:2.1. Uluslararası Kanser Araştırmaları Derneği (International Agency for Research on Cancer)(IARC) GLOBOCAN Projesi Ülkeler arası kanser grafiği, 2012 verileri

2.2. Kanser İnsidansı

Kanser dünyada ve ülkemizde sebebi bilinen ölümler sıralamasında ikinci ölüm sebebi olarak kardiyovasküler hastalıklardan sonra gelir. Önemli bir toplum sağlığı problemidir. 2002 yılında ülkemizde kanserden ölümler tüm ölümlerin %12'sini oluşturmaktayken bu oran 2009'da %21'e çıkmıştır. Dünya üzerinde kanser istatistiklerini kayıt altına alan 184 ülkenin ve 28 kanser tipinin güncel tahminlerini yürüten Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC)'n GLOBOCAN projesindeki araştırmalarına göre, 2015 yılında dünya genelinde tanımlanan 14,1 milyon kanser vakasından 8.8 milyonu kanser nedeniyle hayatını kaybetmiştir. Projenin amacı, dünyanın 184 ülkesi için önemli kanser tiplerinden, ulusal seviyede, mortalite ve yaygınlık insidansının çağdaş tahminlerini sağlamaktır. Son 5 yıl içinde kanser teşhisi konulan ve hayatına devam eden toplam 32,6 milyon hasta bulunmaktadır. Ülkemizde kansere yakalanma yaklaşık 97 bin erkek, 62 bin kadın ve toplamda 159 bin kişi olarak tespit edilmiştir.. Türkiye'de yılda 163.500 civarında yeni kanser vakası teşhis edilmektedir. Ülkemizde bir günde yaklaşık 450 kişinin kanser teşhisi aldığı söylenebilir. Türkiye'de görülmekte olan kanserin sıklığı Avrupa Birliği ülkeleri ve Amerika gibi gelişmişlik düzeyi yüksek olan ülkelere göre daha düşüktür. Özellikle ortaya çıkışının önlenemediği, taramalarla ölümün yok edilemediği ve erken teşhis edildiğinde tedavinin yaşam kalitesine çok şey katabildiği kanser türlerini göz önüne alırsak korunmanın önemi artmaktadır (Newman ve diğ. 1998).

		Erkek		Kadın
Dünya		204,9		165,2
IARC'a üye 24 ülke		235,4		192,1
AB(28 ülke)		311,3		241,4
ABD		347		297,4
Türkiye**		220,3		156,8

Çizelge 2.1. Uluslararası Kanser Ajansı (IARC) tarafından yayımlanan 100.000 kişide yaşa göre standardize edilmiş hız ** Türkiye Birleşik Veri Tabanı.

2.3. Kanser ve Genetik

Hücrelerde kanserleşme aşamaları, hücre çoğalması ve gelişiminde rol oynayan sinyal yollarında çok adımlı olarak gerçekleşerek, hücre bölünmesi ve apoptozisi kontrol eden genetik değişimler sonucu meydana gelmektedir. Öldürücü olmayan genetik hasarlar karsinogenezin asıl nedenidir. Genlerde kalıtsal değişimler sonucu ortaya çıkan mutasyonlar kanserleşme evresinde rol oynamaktadırlar. Farklı yollarda işlev gören çeşitli özelliklere sahip olan genler kanserin oluşum evresinde etkileşime girerler. Karsinogenezis çok aşamalı süreçten meydana gelir. Tümör progresyonu olarak adlandırılan bu süreçte malignitenin içerdiği özellikler gelişir (Robert ve diğ. 2005).

Karsinogenezis aşamalarında;

- Sinyal yollarında hücre proliferasyonunda yer alan proteinleri kodlayan genler,
- Büyüme inhibe eden genlere duyarsızlık, tümör baskılayıcı genler,
- Mitotik siklusu düzenleyici genler,
- Programlanmış apoptozis komponentleri,
- Mutasyonların tanımlanması

Kanserleşme aşamalarında kanserin yerleştiği hücrelerde meydana gelen bölünme sinyallerinin üretiminin artması, kontakt inhibisyon yokluğu, sınırsız bölünme potansiyeli, apoptozisten kaçış olayları kanser hücrelerini normal hücrelerden farklı kılmaktadır. Başlıca üç tür genetik mekanizma karsinogenezisten sorumludur:

- Büyüme uyarıcı proto-onkogen aktivasyonunun inaktivasyon göstermesi
- Dna onarım regülasyonundan sorumlu tümör süpresör genlerde mutasyon varlığı
- Kromozomal translokasyonlar sonucu translokasyon bölgelerinde gen kaybı olması ile kimerik genlerin oluşumu olarak bilinmektedir (Ford 1998).

2.3.1. Kansere Neden Olan Genler

2.3.1.1. Onkogenler

Normal hücrel gen olarak bilinen proto-onkogenlerin genetik değişimlere uğramasıyla türevlenen genlerdir. Onkogenler malign transformasyona neden olurlar.

Meme hücrelerinin kanserleşme aşamalarında rol oynadığı belirlenen en önemli genetik değişimler, PI3K-Akt, Ras-Raf-MAP Kinaz, ve JAK-STAT sinyal yollarında iş gören onkogenlerdir. Onkogenler fonksiyon kazandıran (gain of function) mutasyonlar ile; hücre proliferasyonunu inaktif ederek, apoptozisi engelleme, ekspresyon seviyelerindeki kantitatif farklılıkların ortaya çıkmasıyla malign transformasyonu gerçekleştirmektedir. Onkogenlerin mekanizmasında saptanan değişimler, nokta mutasyonu, gen delesyonu, kimerik gen oluşumu, gen amplifikasyonu ve insersiyonal mutagenез (yeni DNA kalıtımı) olarak saptanmıştır.

Normal hücrelerde ve kanserli meme dokularında çoğunlukla saptanan onkogenler ras, myc ve cerbB-2 (veya HER2/neu) olarak bilinmektedir (Dickson ve diğ. 1996).

2.3.1.2. Tümör süpresör genler

Hücre siklusu kontrolü ve DNA'da oluşan hasarı onarmak yoluyla tümör oluşumunu engellemeye çalışırlar. Tümör süpresör genler tarafından kodlanan proteinlerin fonksiyon kaybı (loss of function) ile, kontrolsüz hücre bölünmesi, anormal hücre büyümesi ve hatalı apoptozis olayları ortaya çıkmaktadır.

Tümör süpresör genler iki tipi vardır: Gatekeeper (Bekçi tipi) ve Caretaker (Bakıcı tipi) olarak bilinmektedir. Gatekeeper tümör süpresör genler, hücre siklusunu kontrol etmektedirler ve saptanan anormal hücre proliferasyonunda hücrenin apoptoz mekanizmasını devreye sokarlar. Caretaker tümör süpresör genler ise DNA'da meydana gelen çift zincir kırıkları gibi hasarları onarmak yoluyla hücreyi malign transformasyonu

durdurmaya çalışırlar. Caretaker tümör süpresör genler DNA hasarında onarımı iki şekilde sağlamaktadırlar. Bir grup caretaker tümör süpresör gen DNA çift zincir kırıklarının onarımında görev alarak karsinogenesisi baskırlar. Bu mekanizmalarda görev yapan genlere; Ataxia Telangiectasia Mutated (ATM), Nibrin (NBN), Erken başlangıçlı meme kanseri 1 (Breast cancer 1, early onset=BRCA1), Erken başlangıçlı meme kanseri 2 (Breast cancer 2, early onset=BRCA2), RAD51 recombinase (RAD51),RAD52 homologe (RAD52), Bloom Syndrome, RecQ helicase-like (BLM) genler sıralanabilir. Bu genlerin, ultraviyole (U.V) ve iyonize radyasyon gibi mutajen ajanlara karşı duyarlılıkları yüksektir. Bir diğere Caretaker Tümör Süpresör gen grubu ise, yanlış baz eşleşmesinin düzeltilmesinde (baz eksizyon tamiri) hataları düzeltme aşamalarında görev alırlar. Bu genlere; X-Ray Repair Cross-Complementing Protein (XRCC1), ADP-ribosyltransferase (ADPRT), Apex nuclease (APEX1), 8-Oxoguanine DNA Glycosylase (OGG1), Ligase III, DNA ATP Dependent (LIG3), Single-Strand-Selective Monofunctional Uracil-DNA Glycosylase (SMUG1), MutY homologe (MUTYH), Thymine-DNA Glycosylase (TDG) genleri örnek gösterilebilir (Ahmed ve diğ. 2006).

2.3.1.3.Kimerik genler

Çeşitli kanser türlerinde, kromozomal düzensizliklerde oluşan mutasyonlar genetik yapıyı bozmaktadır. Kromozomal düzensizlikler yapısal ve sayısal düzensizlikler olarak iki farklı grupta yer alırlar. Otozomal ve eşey kromozomlarının ikisinde de görülebilir. Translokasyon, genellikle homolog olmayan iki kromozom arasında kromozomal parçaların kopup, farklı bir bölgeye lokalize olmasıdır. Kromozomal translokasyonlar sonucu yeni oluşan gen füzyon geni olarak bilinir ve anormal gen fonksiyonu ile mutasyon oluşumuna neden olur. Bazende kromozomal translokasyonlar sonucu translokasyon bölgelerinde gen kaybı olması, hücrenin kanserleşme mekanizmasını devreye sokar. Sonuç olarak; kanser birçok genin ve birbiriyle bağlantılı aşamalarda, aynı ya da farklı mutajen ajanlarla karşılaşması sonucu, hücresel döngünün farklı basamaklarında normalden farklı oluşan bir sürecin başlamasıdır (Hartmann ve diğ. 2004).

2.4 . Kanser ve Hücre Döngüsü

Hücre döngüsü sürecinde çoğalmak (prolifere olmak) üzere uyarılmış hücrelerde bir dizi geçici morfolojik değişiklikler biyokimyasal aktiviteler gerçekleşmektedir. Uyarılan hücre, döngüyü tamamladığında morfolojik ve genetik olarak birbirine tıpa tıp benzeyen iki hücre oluşur. Hücreler mitozis ile ikiye bölünür. Hücrelerin mitozise girmeden önce hacimce büyüdüğü bir hazırlık evresi olmaktadır. Bu hazırlık evresinde mitozis için gerekli olan çeşitli düzenleyici proteinler (Örn. Siklin'ler) ve makromoleküller (Örn. Deoksiribonükleik asit'ler) meydana gelir. Bu evreye interfaz adı verilmektedir. İnterfaz kendi içinde G1, S, ve G2 olmak üzere çeşitli alt fazlara ayrılır. Mitozis ve interfaz evrelerinin birlikte oluşturduğu süreç hücre siklusunu olarak bilinir. İnterfaz sürecinin G1 fazı, mitozun (M) bitişi ile DNA sentezinin (S) başlangıcı arasında kalan sürece denir. DNA sentezine yani replikasyona hazırlık fazı, G1 fazıdır. Hücrede bu fazla birlikte replikasyon için gerekli olan farklı proteinler sentezlenir. DNA replikasyonunun gerçekleştiği faz ise S fazıdır. Kromozom sentezi bu fazda tamamlandıktan sonraki aşamada kardeş kromatidler birbirinden ayrılmaz, bu sayede hücrenin diploid yapısı devam eder. Sentez tamamlandıktan sonra hücre G2 fazına geçer, bu fazda mitoz hazırlık fazı denmektedir. G2 fazında sentezlenen mikrotübüllere mitoz sürecinde ihtiyaç vardır. Mitoz (M) fazında ise nükleus (karyokinez) ve sitoplazma (sitokinez) bölünmeleri meydana gelir. Bu fazda gerçekleşen olaylar, kardeş kromatidlerin birbirlerinden ayrılması ve mikrotübüller aracılığı ile hücrenin zıt kutuplarına taşınma aşamalarıdır. Mitoz fazı sonucunda iki yeni hücre oluşur (Alberts ve diğ. 2002).

2.4.1. Hücre Döngüsünün Regülasyonu

Hücre döngüsünün fazları (G1, S, G2 ve M), döngü boyunca durumları değişen siklinlerden oluşan moleküler yapılar ve siklin bağımlı kinazlar (SBK) kontrolünde denetlenir. Hücre döngüsünde 5 çeşit siklin (A'dan E'ye) yer alır, özgül SBK'larla etkileşime girer. Siklinler düzenleyici olarak, SBK ise katalitik subunit olarak döngü içinde yer alırlar (Nigg 1995). Düzenleyici fonksiyonlarını diğer proteinlerin (retinoblastoma proteini; pRB ve p53) fosforilasyonu ve defosforilasyonu sayesinde kazanır. Çeşitli kontrol noktaları vardır; bunlardan ilki G1-S kontrol noktasıdır; hücrenin replikasyon için hazır olup olmadığını denetler. G2-M kontrol noktasında ise hücrenin mitoz için uygunluğu, M-G1 kontrol noktasında kromozomların yerleşimi kontrol edilir (Alberts ve diğ. 2007).

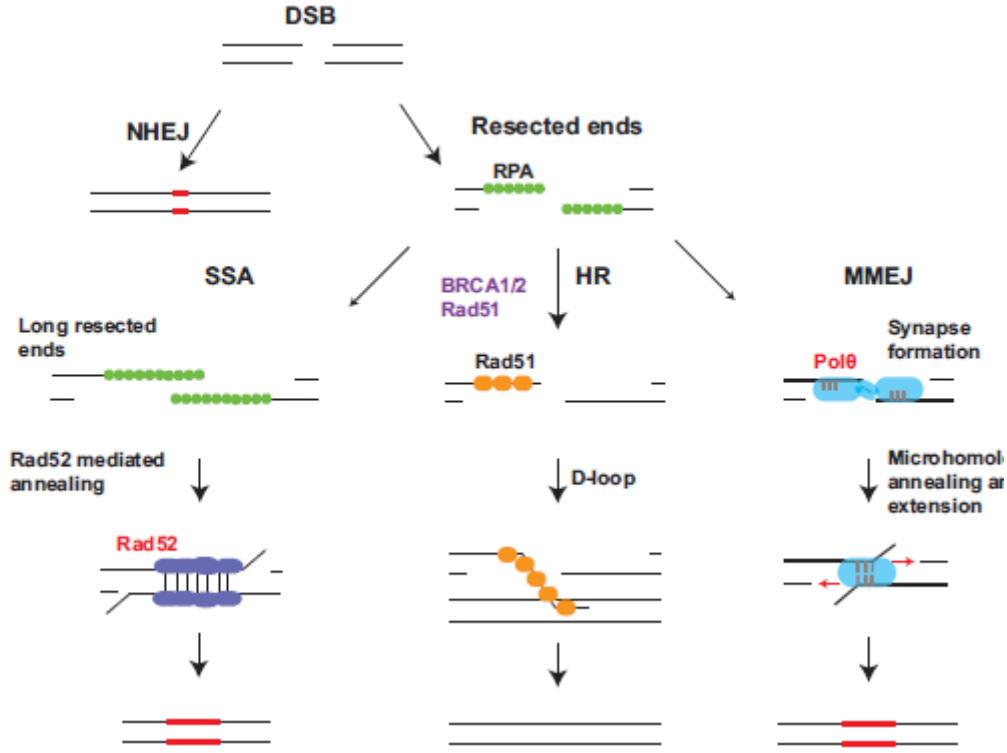
Stabil siklin-SBK birimi meydana getirerek katalitik olarak inaktivasyonu sağlayan birimler vardır. SBK'ların regülatif fonksiyonlarının gerçekleştiği proteinlerden olan p53 DNA hasarı sonrası, hasarlı DNA tamir olana kadar ya da apoptozis durdurulana kadar replikasyonun devam etmesini önlemek için G1 fazına müdahale eder. Birçok tümör türünde p53'ten kaynaklanan dna bağlama kısmında mutasyonlar saptanmıştır. p15, p16, p21 ile p27 ve insan tümörlerinde siklin-SBK birimine ait mutasyonlar görülmektedir.

2.4.2. Hücre Döngüsü'nün Kontrolü, DNA Tamir Mekanizmaları

Hücreler, hücre bölünmesi sırasında genetik bilginin yavru hücrelere hasarsız olarak aktarılabilmesi için çeşitli enzim sistemlerine ihtiyaç duyarlar. Bu sistemler DNA' da oluşan hasarları tanıyıp onarımını sağlarlar. Hücre döngüsünün regülasyonu, sırasıyla bütün basamakların hatasız tamamlandığını kontrol eden denetim noktaları tarafından gerçekleşmektedir.

Hücre döngüsü kontrol noktalarının herhangi bir basamağında DNA' da bir hasar saptanırsa hücre döngüsü durdurulur ve DNA onarım enzimlerinin sentezi artar, böylece DNA tamiri için gerekli süre elde edilir. Hücre döngüsü kontrol noktalarında, DNA hasarını tanımaktan sorumlu olan enzimler bulunmaktadır. Bunlar Ataxia Telangiectasia Mutated (ATM) ve Atm and Rad-3 Related (ATR) proteinleridir. ATM özellikle iyonize radyasyona maruz kalınması sonucu oluşan çift zincir kırıklarını tanımaktan sorumludur. ATR ise çift zincir kırıklarının tanınmasında ATM ile birlikte görev alır ve UV hasarları sonucunda DNA yapımının durmasına yol açan hasarları belirler. Hücrelerin çoğu birisi geç G1' de ve diğeri geç G2' de olmak üzere en az 2 denetim noktası tarafından kontrol edilirler. Geç G1' de bulunan denetim noktası hücrenin S evresine girişini durdururken, mitozun başlamasını engelleyen geç G2' de bulunan denetim noktasıdır. Ayrıca, daha az araştırılmış olmakla birlikte kızılötesi ışınlar (IR) tarafından indüklenebilen hücreler ise DNA hasarları tarafından S evresi kontrol noktasında da engellenebilmektedir. ATM proteini tarafından aktiflenen 2 farklı sinyal yolağı tarafından susturma işlemi, S evresi kontrol noktasında görülmektedir. İlk yolda ATM Chk2'nin aktiflenmesi meydana gelir ve Cdc25a aracılığı ile, E kompleksinin susturulmasını ve hücre döngüsünün S evresinde durdurulmasını Cdk2/Cyclin proteini yapar. İkinci yolda ise, ATM S evresinde farklı proteinlerin hücre döngüsünde durdurulmasında da görev alır. Cdc25A' dan bağımsız olarak Nibrin (NBS1), Breast Cancer 1 (BRCA1) ve Structural Maintenance of

Chromosomes 1A (SMC1) proteinlerini aktifleyerek bu işlemi meydana getirir. Bu proteinleri kodlayan genlerin herhangi birinde meydana gelen mutasyonlar, S evresi kontrol noktasının etkisiz hale gelmesini sağlayarak hücrede karsinogenez görülür (Saxena ve diğ. 2005).



Çizim 2.2. BRCA'ya ait DNA tamir mekanizmaları ve BRCA eksikliğini telafi eden alternatif DNA tamir yolları. DSB(double strand breaks.)çift zincir kırıkları, HR(homologous recombination)homolog rekombinasyon, SSA(single-strand annealing)tek zincir bağlanması, NHEJ (non-homologous end joining)homolog olmayan son kalıtım,RPA(replication protein A)replikasyon proteini, MMEJ (microhomology-mediated end joining) microhomoloji aracılı son kalıtım (Jiang ve Greenberg 2015)

Hücrede genetik mekanizmaların doğru ve aktif çalışması, DNA' nın replikasyonu aşamasının doğru olarak ilerlemesi ve DNA' da spontan olarak oluşabilen hasarların onarımını sağlamaktadır. Hücre DNA' sında endojen ve eksojen faktörlerin etkisiyle sıklıkla gelişigüzel değişimler oluşmaktadır. Endojen faktörler; DNA'da kendiliğinden gelişen hatalar olarak ortaya çıkması yanısıra hücre metabolizmasının yan ürünü olarak üretilen reaktif oksijen, nitrojen, karbonil türleri, ve kolesterol metabolitleri olabilmektedir. Ekzojen faktörler ise ultraviyole ışığı, iyonize radyasyon, ağır metaller, hava kirliliği, sigara dumanı, kemoterapötik ilaçlar olarak bilinmektedir. Bir memeli genomunda her gün çok fazla sayıda DNA hasarının ortaya çıktığı öngörülmektedir. Ancak DNA tamir

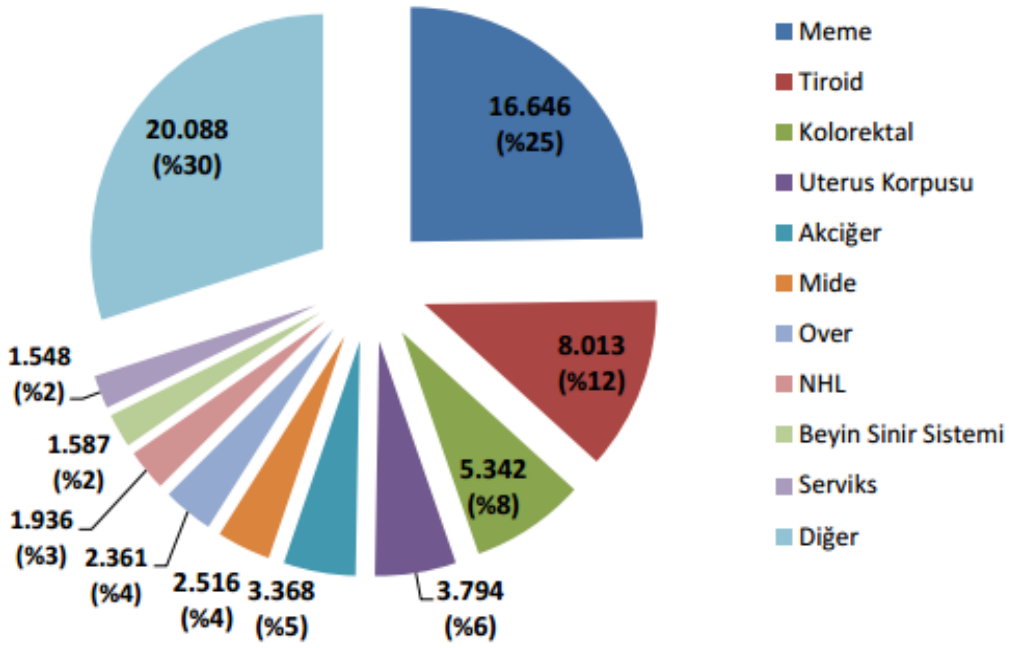
mekanizmalarının etkinliği sonucunda saptanabilen bu değişimler nadir olarak kalıcı mutasyona dönüşmektedir (Iyama ve Wilson. 2010).

2.5. Meme Kanseri

Meme kanseri, hücre proliferasyonu ve gelişimine katılan önemli hücresel yolları etkileyen genetik değişimler ile farklı mekanizmaların inaktif hale gelmesi sonucu ortaya çıkar.

Hastalık genel olarak kadınlarda görülse de erkeklerin de yakalanma ihtimali vardır. Meme kanseri in situ (non-invaziv) ya da invaziv (meme stromasını istila eden) olarak sınıflandırılırlar. In situ meme kanserleri kanal veya lobülde oluşurken invaziv meme kanserlerinin çoğunluğu (>%95) duktal adenokarsinom, bez epitelinin kanserleridir (Whittaker ve diğ. 1998). Meme kanseri, tümör hücrelerinin farklılaşması ve histopatolojik olarak evre ve derecesine göre sınıflandırılır. Evre, tümör boyutu, bölgesel lenf nodu tutulumu ve uzak metastaza göre belirlenir. Tedavi ve prognoz meme kanseri aşamasına göre belirlenir. Meme kanserleri genellikle tanıya göre menopoza öncesi sonrası ve insan epidermal büyüme faktörü reseptörü-2 (HER2)'nin ekspresyonuna ve östrojen reseptörü (ER) ve progesteron reseptörü (PR) pozitif veya negatif oluşuna göre sınıflandırılır (Clemons ve Goss 2001).

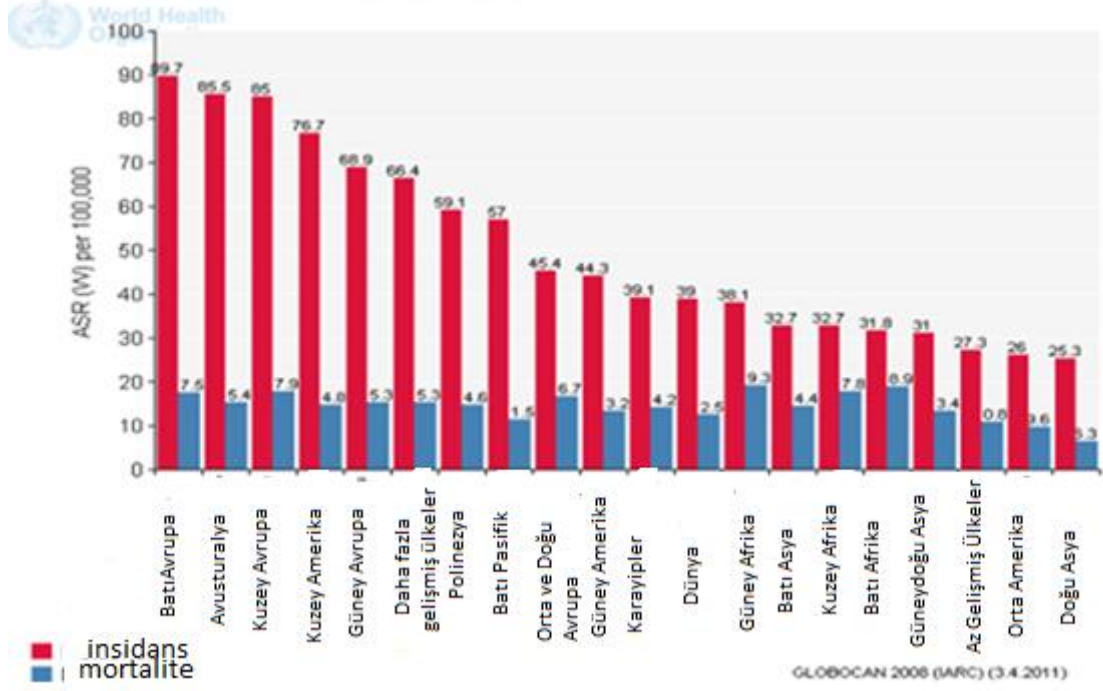
Mamografi 40-74 yaşları arasındaki kadınlar için yarar sağlayan somut delillere sahip en yaygın kullanılan tarama yöntemidir. Bunun yanında ultrasonografi, manyetik rezonans görüntüleme, tomosentez (3 Boyutlu Digital Mamografi) ve moleküler meme görüntüleme gibi teknolojiler genellikle mamografiye ek olarak değerlendirilmektedir. Meme kanser taraması meme kanserinin erken teşhisi için önemlidir. Yapılan randomize kontrollü çalışmalar sonucunda 40-47 yaş arasında kadınlarda yapılan mamografi taramasının meme kanseri nedeniyle ölümü %15-20 oranında azalttığı görülmüştür. Meme kanseri teşhisi doku biyopsisinden yapılan histolojik inceleme ile kesinleştirilir. Tedavi seçenekleri evreye, hormon reseptörü bulunmasına ve tümörün diğer özelliklerine göre değişir. Meme kanserinin tedavisi cerrahi, radyoterapi, sistematik adjuvan tedavisi (kemoterapi, tamoksifen ve aromataz inhibitörleri) şeklindedir (Nelson ve diğ. 2009).



Çizim 2.3. Kadınlarda En Sık Görülen Kanserlerin Toplam Sayısı ve Yüzde Dağılımları (Birleşik Veri Tabanı, 2009) (Dünya Standart Nüfusu, 100.000 Kişide)

2.5.1 Meme Kanserinin Epidemiyolojisi

Meme kanseri dünyada kadınlar arasında en sık görülen malign tümör olup kadınlarda görülen tüm kanserlerin yaklaşık %30'unu oluşturmaktadır. Avrupa'da yılda 180 bin, Amerika Birleşik Devletleri'nde de yılda 184 bin yeni olgu saptanmaktadır (Greenle ve diğ.2000). 1948-1985 yılları arasında kadınlarda kanser nedeniyle oluşan ölümlerin %80'i meme kanserine bağlı iken,1985 ten itibaren akciğer kanseri, kansere bağlı ölüm nedenleri sıralamasında meme kanserini geçmiştir. Erkeklerde meme kanseri nadirdir.1998 yılında ABD'nde 1600 erkek meme kanserli hasta saptanmış olup 400 kişi meme kanser nedeniyle ölmüştür (Greenlee ve diğ. 2000).



Çizim 2.4. IARC Globocan proje verilerine göre ülkeler arası tüm yaşlara göre meme kanseri yüzdeleri (Globocan 2008)

2.5.2 Meme Kanserinin Etyolojisi

İnsanlarda meme kanserinin nedeni tam olarak bilinmemektedir. Genetik, çevresel, hormonal, sosyobiyojik ve psikolojik etkenlerin oluşumunda rol aldığı kabul edilmekle birlikte, meme kanserli kadınların %70-80'i bu risk faktörlerine sahip değildir. Hayvanlarda ise bazı kimyasal maddeler, iyonizan radyasyon ve virüsler kanser oluşumuna neden olurlar. Tüm bu ajanların mutasyonlara neden olabileceği ve kromozomal mutasyonların da insanda kanser ortaya çıkışı ve gelişimi ile yakından ilişkili olduğu gösterilmiştir (Victor ve Vogel 2008).

2.5.3. Mortalite

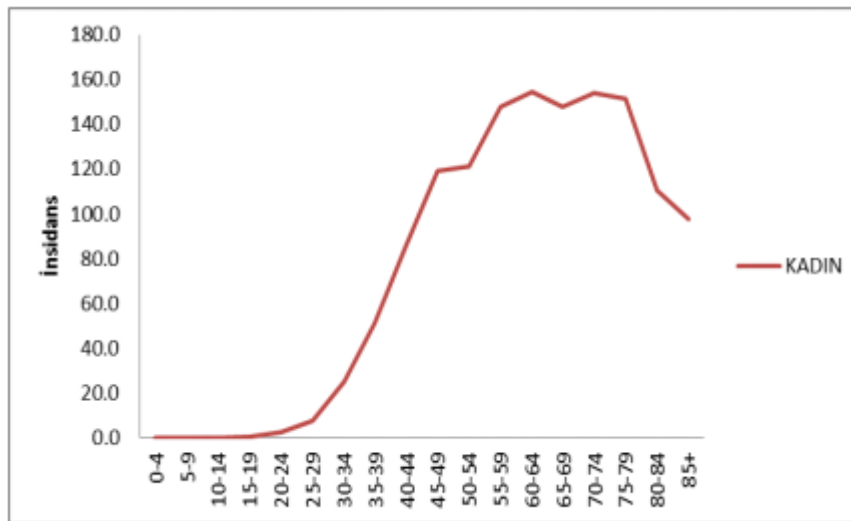
1950'lerden beri meme kanseri insidansı giderek artmaktadır. İnsidansındaki artışa paralel olarak mortalite de artmaktadır. Kadınlarda kansere bağlı ölümlerin %18'i meme kanseri nedeniyle oluşmakta ve meme kanserine bağlı ölümler, akciğer kanseri ve kolorektal kanserlerden sonra üçüncü sırayı almaktadırlar.

Görülme sıklığında olduğu gibi, mortalite de yaşa bağlı olarak artmakta ve 80 yaşındaki 100.000 kadından 155'i meme kanserinden ölmektedir. Kadınlarda kansere bağlı ölüm nedenleri ile yaş grupları arasındaki ilişki araştırıldığında ise 15 yaş altında lösemnin, 55-74 yaşlar arasında akciğer kanserinin, 74 yaş üstünde kolorektal kanserlerin, 40-44 yaş arasında ise meme kanserinin 1.sırayı aldığı görülmektedir. Dünyada meme kanserine bağlı mortalite, ülkeden ülkeye de değişmekte olup; İngiltere ve Galler'de en yüksek, Tayland'da ise en düşük seviyededir. Göç eden insanlarda zaman içinde oluşan mortalite değişikliği meme kanseri oluşumunda çevresel etkenlerin ve yaşam tarzının önemli faktörler olduğu görüşünü desteklemektedir. ABD' de ve Hawai'de yaşayan Jaonlarda meme kanserine bağlı mortalitenin, Japonya'da yaşayan Japonlara göre daha yüksek olduğu gösterilmiştir (Lenner-Ellis ve diğ. 2015).

2.6. Meme Kanseri Oluşumunda Rol Alan Risk Faktörleri

2.6.1. Yaş ve Cinsiyet

Meme kanserinin gelişim aşamalarında en önemli risk faktörlerinden biri yaş ve cinsiyettir. Meme kanserinin kadınlarda görülme riski erkeklerden 100 kat daha fazladır. Kadın cinsiyeti kadar yaşın ilerlemesi de en önemli risk faktörlerinden bir tanesidir. Bir kadının hayat boyu riski non invazif meme kanseri açısından 6'da 1 ve invazif meme kanseri bakımından 8'de 1'dir. Bu riskin büyük bölümü yaşın ilerlemesi ile ortaya çıkar (Silvia ve Zurrida 2007).



Çizim 2.5. Meme kanserinin kadınlarda yaşa göre hızları
(Birleşik Veri Tabanı, 2014)

2.6.2. Irk ve Etnik Köken

Meme kanseri beyaz kadınlarda görülme sıklığının zencilere oranla %20 daha fazla olmasına rağmen, mortalite oranlarının zenci ırkında daha fazla olduğu saptanmıştır. Etnik farklılıkların büyük oranda yaşam tarzı ve sosyoekonomik durumdan kaynaklandığı düşünülmektedir (Koçak ve diğ. 2011).

2.7. Hormonal Faktörler

Meme kanseri ile ilişkili hormonal risk faktörlerinin büyük çoğunluğu, kadın üreme hormonlarının anormal artışları ile ilişkilidir. Yüksek konsantrasyonda eksojen östrojen maruziyeti meme kanseri riskini artırır. Östrojen subtiplerinin (östradiol, estriol, estrone) üretimi over fonksiyonları tarafından düzenlenir. Menarş yaşı, gebelik ve laktasyon durumu, menapoz yaşı meme kanseri gelişiminde önemli risk faktörleridir (Cho ve diğ. 2006).

2.8. Çevresel Faktörler

2.8.1. Radyasyona maruz kalma

Özellikle 10-14 yaş arasında, memenin aktif olarak geliştiği menarş döneminde radyasyona maruz kalma meme kanseri riskini artıran bir faktördür. Erken yaşlarda toraks bölgesine yapılan terapötik radyoterapi işlemi de aynı şekilde meme kanseri riskini artırmaktadır. Kırkbeş yaşından sonra radyasyona maruz kalma veya radyoterapi meme kanseri riskini etkilememektedir (John ve diğ. 1992).

2.8.2. Oral kontraseptif kullanımı

Epidemiyolojik çalışmalarda oral kontraseptif kullanımı ile meme kanseri riski arasında bir ilişki gösterilememiştir. Geniş katılımlı bir çalışmada 1.24'lük bir rölatif risk artışı gösterilmiş olmakla birlikte yakın tarihli iki çalışmada da bu ilişki ortaya konamamıştır (Morrow ve diğ. 2002).

2.8.3. Alkol kullanımı

Çalışmalar alkol tüketim miktar ve süresinin de meme kanseri riskinde artışla ilişkili olduğunu düşündürmektedir. Alkol tüketiminin östradiol serum düzeylerini yükselttiği bilinmektedir. Birçok çalışmada orta düzeyde alkol alımının (her gün 1-2 kadeh) meme kanseri insidansında %30-50 oranında artışa neden olduğu gösterilmiştir. Yakın geçmişte yapılan bir toplum bazlı çalışmada artmış alkol alımının östrojen reseptor pozitif meme kanseri gelişiminde etkili olduğu ortaya konmuştur (Terry ve diğ. 2006).

2.8.4. Egzersiz

Fiziksel aktivitede artış özellikle premenopozal kadınlarda meme kanseri riskinde azalma ile ilişkilidir. Bu konu çok tartışmalı olmakla birlikte düzenli egzersiz yapılmasının anovulatuvar siklusların sayısını artırarak meme kanseri riskini azalttığı düşünülmektedir.

2.8.5. Beslenme alışkanlığı

Yağ içeriği yüksek yiyeceklerin uzun süreli tüketiminin de serum östrojen düzeylerini yükselterek meme kanseri riskinde artışa katkıda bulunduğunu düşündüren bazı kanıtlar vardır. Ancak konuyla ilgili çalışmaların sonuçları çelişkilidir. Haftada 5 kez kırmızı et yenilmesi ile meme kanseri riskinde artış olduğu bazı çalışmalarda gösterilmiştir. Soya yağı tüketiminin artırılması ile meme kanseri riskinde azalma arasındaki ilişki belirsizdir. Son yıllardaki epidemiyolojik çalışmalar, vitamin D'nin meme kanserine karşı koruyucu bir rolü olabileceğini ortaya koymuştur (Taylor ve diğ. 2007).

2.8.6. Kişisel ve Ailesel Kanser Öyküsü

Bir kişiye daha önce meme kanseri tanısı konmuş olması, o kişide bunu takip eden ikinci meme kanseri gelişimi için önemli bir risk faktörüdür. Sporadik meme kanseri tanısı konulduktan sonra ikinci meme kanseri riski her yıl %1 artar. Herediter meme kanseri öyküsü olan kadınlarda ikinci primer meme kanseri riski belirgin olarak yüksektir, yıllık %5 ve hayat boyu risk %50-60 olarak tespit edilmiştir. İkinci primer meme kanseri gelişme riski endometrium, over veya kolon kanseri öyküsü olanlarda olmayanlara göre daha yüksektir.

Aile öyküsü varlığı meme kanseri açısından önemli bir risk faktörüdür. Bir adet birinci derece akrabada meme kanseri olması, meme kanseri riskini 1.80 kat artırır. İki tane

birinciderece akraba varlığında ise bu risk 2.9 kat artar. Meme kanserine yakalanmış olan akraba 30 yaşından önce tanı almış ise risk 2.9 kat, 60 yaşından sonra tanı konmuş ise risk 1.5 kat artar (Pazdur ve diğ. 2003).

2.9. Genetik Faktörler

Meme kanseri ve diğer maligniteler hücre büyümesi ve gelişimine katılan önemli hücresel yolları etkileyen genetik değişimler ile çok adımlı bir işlem sonucu ortaya çıkar. Meme kanserinin gelişiminde yüksek riske sahip hastalarda bağlantı analizlerine dayanan çalışmalar onkogenlerin ailesel meme kanserlerinde primer lezyonlarda yeri olmadığı, fakat tümör baskılayıcı genlerdeki resesif değişimlerin primer lezyon oluşumuna katıldığını göstermektedir (Öztürk 2006).

2.9.1. Büyüme Faktörleri

Hücrede kansere yol açan değişimlerin büyüme faktörü sentezinde artış yada büyümeyi inhibe edici faktörlerin sayısında azalmaya başladığı ileri sürülmüştür. Bir başka görüşte hücrede büyüme faktörü uyarısına cevap verfen mekanizmalarda ortaya çıkan değişikliklerdir. Bu hipotezlerin doğruluğunu araştırmak için neoplastik hücrede çoğalmayı uyaran sinyal yollarının bilinmesi gerekir. Epitel hücrelerinin kültürde çoğaltılmasındaki güçlükler bu konuda bilgi edinilmesini geciktirmiştir. Bugün ise meme epitel hücreleri in vitro olarak çoğaltılabilmekle birlikte daha çok bazal epitelyal stem hücresi niteiği taşıyan bu hücrelerin sergiledikleri özellikleri insandakilerin aynı olup olmadığı tam olarak bilinmemektedir.

2.9.2. Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü (EGFR):

Epidermal büyüme faktörü meme epitelinin gelişmesi, meme hücresinin çoğalması ve farklılaşması açısından önem taşıyan bir moleküldür. Faktör membran üzerinde yer alan reseptöre bağlanarak etkisini gösterir.

Epidermal büyüme faktörü reseptörü 170 kd molekül ağırlığında, tirozin kinaz aktivitesine sahip bir glikoprotein reseptördür. EGFR aşırı ekspresyonunun fibroblastlarda epidermal büyüme faktöründen bağımsız transformasyon oluşturabilmesi reseptörün transformasyonda önemli rol oynadığına işaret eder. Klinikte yüksek epidermal büyüme

faktörü reseptör düzeylerinin östrojen reseptörü durumundan bağımsız olarak kötü prognoz ile ilişkili olduğu gösterilmiştir.

2.9.3. CerbB-2 (HER2/Neu):

CerbB-2 geninin amplifikasyonu veya proteinin aşırı ekspresyonu meme kanserlerindeki neoplastik hücrelerin %10-40'ında gösterilmiştir. Erken dönem meme kanserinde cerbB-2 gen amplifikasyonu kötü prognoz ile yakın ilişkili bulunmuştur. Çok sayıdaki çalışma ile cerbB-2 amplifikasyonunun diğer kötü prognostik faktörlerin varlığı, tedaviye düşük cevap ve lenf nodu pozitif meme kanserlerinde hastaların yaşam süreleriyle ilişkili olduğu, tek başına bir prognostik faktör olabileceği desteklenmiştir (Klijn ve diğ. 1992).

2.10.Sinyal İletimi ile İlişkili Nükleer Onkogenler

2.10.1.c-Myc:

C-myc geninin aşırı üretimi veya gen yapısındaki değişiklikler meme kanserine neden olmaktadır. Karsinomların %32'sinde myc proto-onkogeninin 2-15 kat amplifiye olduğu invazif duktal karsinomlarda ise myc geninin yapısal değişiklikler taşıdığı gösterilmiştir. Yaşlı kadınlarda meme kanseri ile c-myc proto-onkogeni arasında yakın bir ilişki bulunmuştur. c-myc gen amplifikasyonu meme kanserindeki en sık rastlanan genetik değişikliklerden biridir. Meme kanserlerinin 1/3'i bu genetik değişikliği taşır (Liao ve diğ. 2000).

2.10.2. Ras:

Meme kanserlerinde ras onkogenlerinde en sık rastlanan değişiklik aşırı ekspresyondur. Selim fibrokistik, fibroadenom ve karsinomlu kişilerde yapılan çalışmada c-myc, H-ras, K-ras ve N-ras ekspresyon seviyelerinin selim meme dokularından çok karsinomlarda daha yüksek oldukları bildirilmiştir. H-ras gen mutasyonları nadir olmakla birlikte meme kanserinde %70 lik bir risk nedenidir.

2.11. Tümör Baskılayıcı Genler

2.11.1. P53:

P53 geninin her iki alleldeki kaybı veya nokta mutasyonları çeşitli tümörlerde ve meme kanserlerinde gösterilmiştir. Meme kanserlerinde p53'ün yaklaşık %60'ının

noktamutasyonu şeklinde bulunduğu, bunun birçok kanser tipinde kimyasal kanserojenlerle olduğu ileri sürülmüştür (Ünçel ve diğ. 2015).

2.11.2. ATM geni (Mutant ataxia-telengiectasia):

ATM resesif olarak kalıtılır. Kromozom 11'de yerleşmiştir. ATM geni çok uzun ve komplekstir, çok sayıda ve çeşitli mutasyonlar gözlenir. İki hasarlı (mutant) allel hastalık gelişimine neden olur. Meme kanseri için yüksek risk taşır. Bir mutant allel taşıyanlarda ise meme kanseri riskinin çok yüksek olduğu gösterilmiştir. ATM taşıyıcıları oldukça yaygındır. 1/200 ila 1/100 kadında bu mutasyon orta derecede artmış genetik risk olarak kalıtılır. Toplumdaki meme kanserinin %2-7 sinden bu gen sorumludur (Norberg ve diğ.1996).

2.12. Meme Kanserinde BRCA1 ve BRCA2 Genleri

BRCA-1 ve BRCA-2 genleri yüksek penetransa sahip, kanser oluşumuna etki eden tümör süpresör genlerdirler Hücre siklus regülasyonunda ve çift sarmal dna kırıkları tamirinde rol alırlar. BRCA genlerinin inaktivasyonu genetik defektlerin birikmesine ve genetik instabiliteye neden olur. BRCA genleri, esas olarak hücre çekirdeğinde lokalizedir; DNA çift zincir kırıklarının tamiri, gen transkripsiyonunun düzenlenmesi ve hücre siklusunun kontrolünde görevlidirler. Bu genlerdeki herhangi bir defektten dolayı, genin ürünü olan BRCA proteini oluşmaz veya hatalı oluşur. Bu durumda tamir mekanizmasındaki görevini yerine getiremez, DNA onarımı gerçekleşemez. Oluşan hasar kansere neden olur (Palma ve diğ. 2006). Bu genlerdeki mutasyonların meme kanseri insidansi BRCA1 taşıyıcılarında 30 yaşında %3,8, 40 yaşında %18,2 , BRCA2 de ise 30 yaş için %0,6 ,40 yaşta %12,6 civarındadır.

Geçmişten günümüze, BRCA1 geni için 850, BRCA2 geni için ise 750'den fazla varyasyon tanımlandığı bilinmektedir. Varyasyonlar presemptomatik, patojenite riski olanlar ve hastalık yapıcı olarak sınıflanmaktadırlar. Topluma ve etnik kökene özgü olarak farklılıklar gösterir. Çeşitli tiplerine rağmen bu genlerdeki germ soyu mutasyonların çoğunluğu tek tip olarak saptanmıştır (Bove ve diğ. 2006).

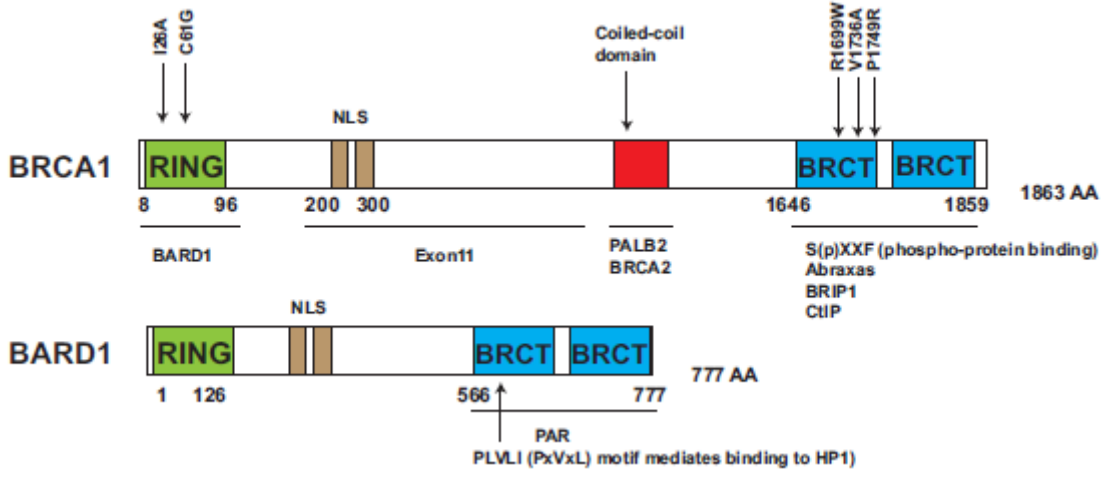
2.12.1. BRCA1 GENİ

BRCA-1 geni, 1994 yılında izole edilmiştir. Gen 17. kromozomun uzun kolunda (17q21) lokalizedir. BRCA-1 geni 24 exondan oluşur, 1863 aminoasitlik protein kodlar. Genomik DNA'nın 100kb'lık bölümünü kapsar. BRCA Genin 11. exonu geniştir ve proteinin %50'nden fazlasını kodlar. BRCA-1 proteini 2 farklı bölge içerir:

- Amino terminali yani N-terminal RING "Ring finger" protein E2 enzimleri ile etkileşimi yoluyla E3 ubiquitin ligaz aktivitesini mümkün kılar. BRCA1'in stokiyometrik bir bağlanma ortağı olan BARD1 ile etkileşim göstererek protein degradasyonunda (ubiquitilasyon) görev yapar.

-Karboksi terminalinde yani C-terminali bölgesinde BRCA1'i fosfopeptidlere bağlanan C-BRCT tekrar kısmı bulunur. BRCA1'in BRCT alanı, farklı protein kompleksleri ile işlevsel etkileşiminin çoğuna katkıda bulunur. BRIP1, Abraxas ve CtIP'in hepsi, etkileşimi yönlendirmek için serin içinde fosforile olan, konsensüs bir BRCT etkileşen motiftir. BRCT bölgesi ise RNA polimeraz II, p53, RB gibi proteinlerle etkileşerek DNA tamirinde tümör supresyonuna moleküler fonksiyonlarıyla katılır. DNA lezyonlarını tanır ve tamir mekanizmasında rol alırlar (Qin Qin ve Roger 2015).

Yapılan çalışmalarda E2 enzimleri ile etkileşimi bozan rasyonel olarak tasarlanmış bir BRCA1 RING mutantının (I26A) varlığının, farelerde genom kararlılığını ortadan kaldırmadığını veya kanser yatkınlığı kazandırmadığı görülmüştür. Tersine, E3 aktivitesini de bozan bir klinik mutant (C61G), farelerde genomda istikrarsızlığa ve kansere neden olur. , C61G mutasyonunun RING bölgesinde E3 ligaz aktivitesinin kaybı, azaltılmış BARD1 etkileşimi veya bu zararlı olayların bir kombinasyonu yoluyla kansere duyarlılığı kazandırabilir (Shakya ve diğ. 2011).

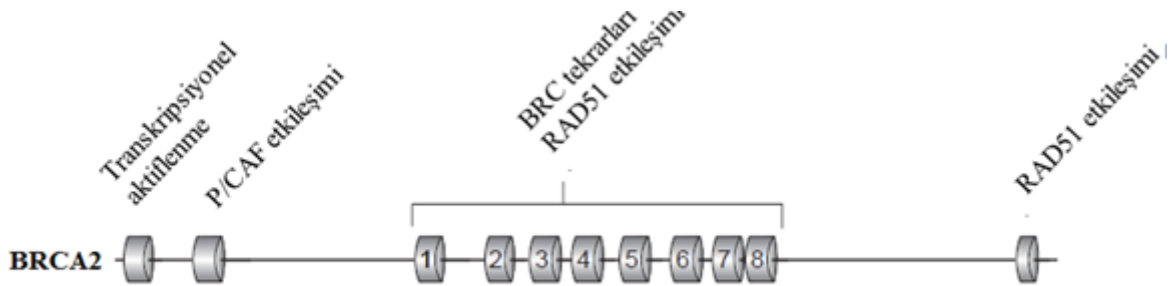


Çizim 2.6. BRCA geni domain yapıları (Jiang ve Greenberg 2015)

Endokrin dokularda eksprese edilen BRCA1, sinir sisteminde gelişmekte olan nöroepitelde en yüksek seviyelerde olduğu tespit edilmiştir. BRCA1 mutasyonunun meme kanseri geliştirme riski yaşam boyunca % 85'tir. Yaşa spesifik olarak değişen risk 40 yaşından sonra %20, 50 yaşından sonra % 51, 70 yaşından sonra ise % 85 olarak tespit edilmiştir. BRCA1 mutasyonlu hastalarda histolojik tanı olarak en çok epitelial tümörler (karsinomlar) karşılaşılr (Jose ve diğ. 2005).

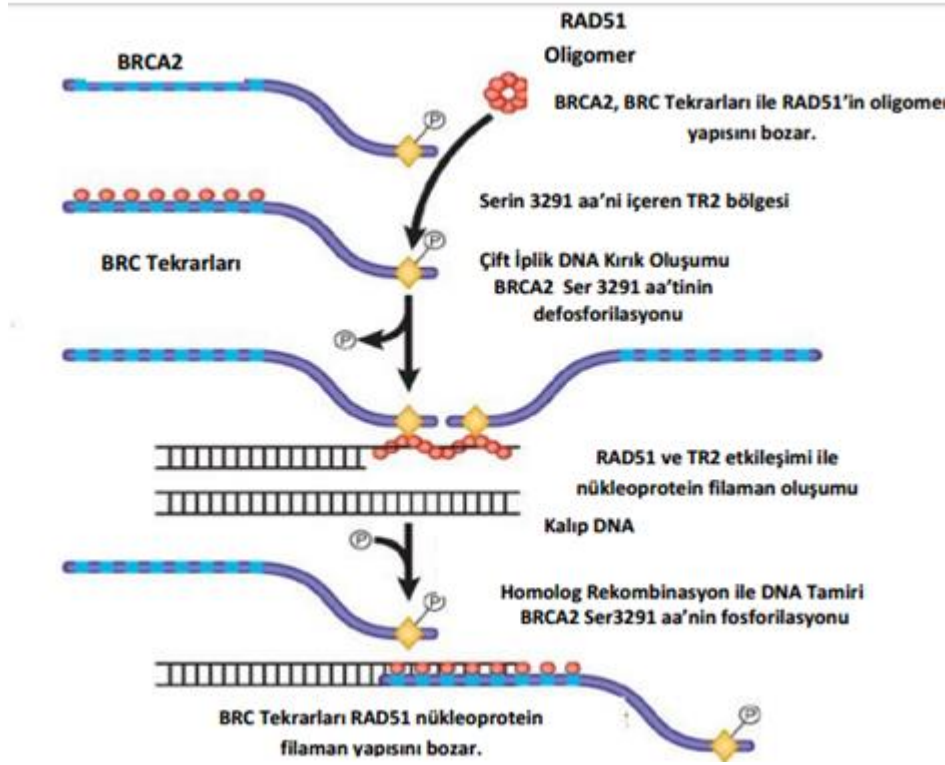
2.12.2. BRCA2 GENİ

BRCA-2 geni, 1995 yılında izole edilmiştir. Gen 13. kromozomun uzun kolunda (13q12-13) lokalizedir. BRCA-2 geni 27 exondan oluşur, 3418 aminoasitlik protein kodlar. Genin 11. exonu geniştir ve proteinin %50'nden fazlasını kodlar. BRCA-2 proteininin yapısında bulunan BRC tekrarları bölgesi RAD 51 proteini ile etkileşir, S fazında subnükleer fokusta birlikte bulunurlar.



Çizim 2.7. BRCA2 geni domain yapıları (Bertwistle ve Ashworth 1999)

BRCA2 proteini, normal hücrelerde özellikle hücre siklusunun geç-G1/erken-S fazında eksprese edilir.Çift zincir kırıkları ve DNA tamirinde rol alır. DNA hasarını takiben RAD51 ile beraber bulunurlar.



Çizim 2.8. BRCA2 geni DNA tamir mekanizması (Lord ve Ashwart. 2007)

2.12.3. BRCA-1 ve BRCA-2 gen mutasyon çeşitleri

BRCA-1 veya BRCA-2 genleri hücre proliferasyonunda dna tamir mekanizmaları ile görev alırlar fakat fonksiyon kaybı ile, hücrenin dna çift sarmal kırıklarını gideremeyerek, tolere edilemeyecek anöploidiye ve somatik mutasyonların artışına ve neden olurlar.

BRCA genlerinde nokta mutasyonları ya da küçük insersiyon ve delesyonlar olarak tespit edilen aberasyonlar mevcuttur:

BRCA-1 geninde 860 ve BRCA-2 geninde 880'in üzerinde mutasyon saptanmıştır.

- **Çerçeve kayması (frameshift):** Protein translasyonunun erken sonlanmasına neden olurlar. Karsinogenez aşamalarında bu tür mutasyonlar görülür. ekzon bölgelerinde birkaç nükleotidin delesyon ya da insersiyonu sonucu çerçeve kayması mutasyonları ortaya çıkar.

- **Non-sense mutasyonlar:** Üçlü nükleotid yapısı olan kodon içinde tek bir nükleotidin yer değiştirmesi sonucunda kodlayıcı kodonun “stop kodona” dönüşmesi sonucu ortaya çıkarlar. Bu mutasyonlar prematür defektif bir protein ekspresyonu oluşmasına neden olurlar.

- **Missense mutasyonlarda :** aminoasit kodlama aşamasında tek bir nükleotidin yer değiştirmesi ile farklı bir aminoasit kodlayan fonksiyonel bir kodon oluşumuyla ortaya çıkar.

Mutasyonların yaklaşık %80-85’i çerçeve kayması ya da non-sense mutasyonlar olup, hastalıkla kesin ilişkisi olduğu saptanmıştır. Missense mutasyonlar veya sonuçlanmış düzenleyici mutasyonlar (inferred regulatory mutations) mutasyonların kalan %15’ini oluşturur. Regulatory mutasyonlarda, tümör oluşumu definitif olan alel kaybolması ve, mutant alelden transkripsiyon engellenmesi sonucu oluşur. Regulatory mutasyonların rutin tanı testlerinde tespiti zordur (Pilato ve diğ. 2011).

BRCA geninde saptanan varyasyonun malign özelliğe sahip patojenik bir mutasyon olması kansere predispozisyon yaratmasına neden olur. Meme ve over gibi dokularda ikinci BRCA alelinin, sıklıkla bu dokuların yüksek proliferatif aktivitesine bağlı olarak kaybolduğu olgusu bilinmektedir.

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda standart tarama yöntemleri ile saptanamayan BRCA mutasyonları olduğu tespit edilmiştir. Bu mutasyonlar, germline mutasyonlar dışında büyük genomik yeniden düzenlenmeler (large genomic rearrangements, LGR) adı verilen geniş delesyon veya duplikasyonlar içeren çalışmalar yapılmaktadır. Yapılan çalışmalarda BRCA-1 genindeki büyük delesyon ve duplikasyonların yüksek riskli ailelerin %10’unda saptandığı ve bu mutasyonların tüm BRCA-1 gen mutasyonlarının üçte birini oluşturduğu gösterilmiştir (Warner ve diğ. 1999).

2.13 .Over Kanseri

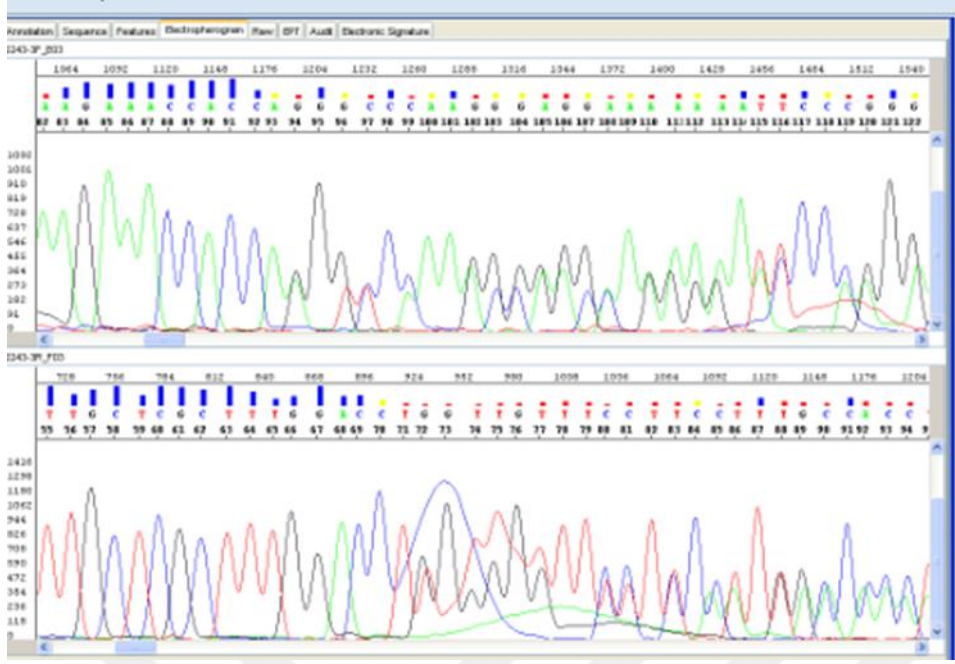
Over kanseri kadın genital kanserleri içinde önemli bir yer tutar, çünkü en çok ölüme neden olan kanser over kanseridir. Yine ölüme neden olma açısından genel kanserler içinde de meme, bağırsak ve akciğer kanserinden sonra dördüncü sırayı alır. Over kanseri tüm genital kanserlerin %20-25'ini oluşturur. Tüm kadınların %1- 2'sinin hayatlarının bir döneminde over kanserine yakalanacağı hesaplanmıştır.

Bir kadının yaşamboyu over kanseri geliştirme riski yetmişte bir veya % 1.4' tür . BRCA-1 ve BRCA-2 mutasyon taşıyıcılarında ömür boyu risk daha yüksek olup %16 ile %60 arasında bildirilmektedir (Cvetkovic 2003).

2.14. BRCA Mutasyonları Saptama Yöntemleri

2.14.1. Otomatik Dizi Analizi

Otomatik DNA analizinde, Sanger'in enzimatik DNA sentezine dayanan zincir sonlanma tekniği uygulanmaktadır. Otomatik DNA dizi analiz cihazları basit olarak, bilgisayar programların yönettiği elektroforez sistemlerine sahiptirler. Elektroforetik ünitelerde bulunan lazer ışık kaynağı ile monokromatik bir ışık oluşturarak incelenecek olan per ürünü veya dnanın bulunduğu jel matriks bu monokromatik ışık ile taranmasını sağlar. Elektroforez süresince DNA'ya bağlanan floresan boya, ışık ile taranan bölgeye geldiğinde stimüle edilir. Uyarılan boya kendi için karakteristik olan dalga boyuna ulaşır ve ışığı geri yansıtarak detektör tarafından kaydedilir. Kaydedilen veriler bilgisayar programları ile analiz edilerek sonuçlar grafiksel ya da matematiksel olarak bilgisayar ekranında görülür. DNA dizi analizi cihazlarında 6 bazdan 1000 baza kadar güvenli okuma yapılabilmektedir ABI 3130xl Genetik Analizatörü, kapiler elektroforeze dayalı DNA analizi cihazlarından biridir. Bu cihaz, jel dökme ve örnek yükleme işlemlerini otomatikleştirerek okumaları gerçekleştirir. Floresan rengi algılama sistemi ile dizi analizi ve sekans analizi işlemleri oldukça anlaşılabilir. Cihaz iki ana parçası bulunmaktadırc Birinci kısım veri ünitesidir. Veri ünitesi bir bilgisayar sistemidir. Bu bilgisayarda, ikinci kısım ile bağlantıyı kuran ve ikinci kısmı kontrol eden programlar yüklüdür ve analiz sonuçları kaydetmeye yarar. İkinci kısım analizin yapıldığı elektroforez kısmıdır (Balci ve diğ. 1999).



Çizim 2.9 .Otomatik Sanger dizi analizi tekniği ile saptanmış mutasyon görüntüsü

2.14.2. Yeni Nesil Dizi Analizi

Yeni nesil dizileme teknolojisi (YND) ile yüksek miktarda veri, çok yüksek hızda ve düşük maliyette dizileme sağlayan kodlama bölgelerindeki mutasyonları belirleyen bir moleküler tanı testidir. YND teknolojisi ile tüm genomun dizi analizinin yapılabildiği gibi (Tüm Genom Dizileme –TGD-), genomdaki protein kodlayıcı bölgelerin dizilenmesi (Tüm Ekzom Dizileme –TED-) veya hedeflenmiş gen panelleri kullanılarak hedeflenmiş yeni nesil dizi analizi (HYND)’ gibi çalışmaları yapmak mümkündür.

Meme, over ve/veya BRCA ile ilgili kanserler için yüksek risk taşıyan bireylerin tümünde BRCA1 ve BRCA2 kodlama bölgelerindeki mutasyonları belirleyebilen bir kit kullanılabilir. Üretici firmanın protokolüne uygun olarak Multiplex PCR, Universal PCR, temizleme, kütüphane oluşturma ve emPCR işlemleri gerçekleştirilir. İlk aşamada, BRCA1 ve BRCA2'nin tüm kodlama bölgeleri Bir hot-start DNA polimeraz kullanarak bireysel olarak beş ayrı çoklu PCR (multiplex pcr) amplifikasyon reaksiyonunda (Plex 1-5; 93 amplikon) amplifiye edilir. İkinci aşamada, Universal PCR'nin ikinci bir turu, amplikonların belirli MID'lar ve MPS (massive parallel sequencing)ler kullanarak sıralama için gerekli adaptörlerle etiketlenmesini sağlar. Her hastanın aynı MID adaptörü ile işaretlenen 2 PCR örneği birleştirilir ve yıkama boncukları (AMPure Bead) kullanılarak pürifiye edilir. DNA kütüphanesi oluşumu için, pürifiye edilen örneklerin DNA miktar

tainleri tekrar PicoGreen kiti ile yapılır. Yapılan hesaplamalar sonrası tüm hastaların örnekleri tek bir tüpte toplanarak DNA havuzu oluşturulur. emPCR kiti içerisinde çıkan kit kullanılarak emPCR reaksiyonu için gerekli olan emülsiyon oluşturulur. Adaptörleri taşıyan DNA havuzunun emülsiyon bazlı klonal amplifikasyonu gerçekleştirilmiş ve dizi analizi için gerekli hazırlıklar yapılır. Cihaz için gerekli olan ön işlemler yapılmıştır. Üzerinde birden çok kanalı olan ‘PicoTiterPlate’e DNA boncuklarımızla birlikte sırasıyla 4 boncuk tabakası yüklenmiş ve cihaz başlatılır. Cihaz çalışması bitiminde elde edilen hastalara ait tüm gen verileri ‘ SEQGENOMİZE’ analiz programıyla analiz edilmiştir (Perkin E 2000).

variants for sample 331-B_S3(v.9) (BRCA), Run: 20-04-17-25.-run-brca-fmf-mody, Kit BRCA
STR Dx/multiplicom
tspot file(s): No hotspot file is used for this analysis.

Filters

Variant Table Settings

Pipeline Completed Workflow Sharings Report Download

10 entries

IGV	Pat	Confidence	Gene	Position	Nucleotide Change	Alternative Coverage (F/R)	Change Type	Change Consequence	Genotype	dbSNP ID	Report	SEQ allele (mine /
	N	High	BRCA1	chr17:41249481 (Exon 10)	T → C (c.1067A>G)	61(46%) / 63(47%)	Substitution	Missense (Q368R)	HET	rs1799950	✓	0.085 /
	N	High	BRCA1	chr17:41226488 (Exon 14)	C → A (c.4535G>T)	103(56%) / 103(56%)	Substitution	Missense (S1512)	HET	rs1800744	✓	0.002 /
	B	High	BRCA1	chr17:41251931 (Intron 8)	G → A (c.442-34C>T)	0(0%) / 109(56%)	Substitution	Intronic	HET	rs799923	✓	0.249 /
	B	High	BRCA2	chr13:32800933 (Intron 7)	T → A (c.631+183T>A)	0(0%) / 91(45%)	Substitution	Intronic	HET	rs3752451	✓	0.379 /
	B	High	BRCA2	chr13:32913055 (Exon 11)	A → G (c.4563A>G)	421(100%) / 414(100%)	Substitution	Synonymous (L1521L)	HOM	rs208075	✓	1.001 /
	N	High	BRCA2	chr13:32915410 (Intron 11)	CAATT → C (c.6841+78_6841+81deIAATT)	0(0%) / 98(44%)	Deletion	Intronic	HET	rs138193280	✓	0.312 /
	B	High	BRCA2	chr13:32890572 (5'UTR)	G → A (c.-25G>A)	127(54%) / 129(56%)	Substitution	5 Prime Utr	HET	rs1799943	✓	0.284 /
	N	High	BRCA2	chr13:32829387 (Exon 14)	T → C (c.7397T>C)	228(100%) / 227(100%)	Substitution	Missense (V2488A)	HOM	rs189547	✓	1.001 /
	B	High	BRCA2	chr13:32853388 (Intron 21)	T → C (c.8755-86T>C)	179(100%) / 0(0%)	Substitution	Intronic	HOM	rs4942488	✓	0.438 /

Çizim 2.10. Yeni nesil dizi analizi tekniği-seq genomize analiz programı ile saptanmış mutasyon görüntüsü (SEQGENOMİZE veri tabanı)

2.15. MEME KANSERİNDE KEMOTERAPİ SEÇENEKLERİ

2.15.1. Meme Kanserinde Neoadjuvan Kemoterapi

Lokal tedavi öncesinde uygulanabilen kemoterapi çeşidi neoadjuvan kemoterapi olarak adlandırılmıştır. Geçmiş yıllarda inflamatuvar meme kanserinde uygulanan cerrahiye ek olarak günümüzde meme koruyucu cerrahi uygulama alanının yelpazesi genişlemiştir.

İlk olarak 1973’te, tümörü küçültmek ve bu olgularda radyoterapi veya radikal mastektomi yapabilmek için neoadjuvan kemoterapi uygulanmaya başlanmıştır. Tedavinin amaçları primer meme kanserine ait kitleyi ve lokal lenf nodu metastazlarını küçültmek

tümör evresini geriletmek, nodal evreyi küçültmek mikrometastazları kontrol altına almak ve sonuç olarak sağ kalımı uzatmak yaşam kalitesini yükseltmektir. Ayrıca yeni ilaçların etkinlik sonuçları hızlı bir şekilde değerlendirilebilmekte ve tümörün tedaviye duyarlılığı ortaya konulmaktadır (Cleator ve diğ. 2002).

İnflamatuvar meme kanseri (İMİK) tanısı klinik bulgulara göre değerlendirilir. Meme cildinde eritem, ödem, ısı artışı ile karakterize tutulum gösterir. Cilt kahverengimsi bazen de tipik portakal kabuğu görünümündedir. Cilt biyopsilerinde tümör hücrelerinin dermal lenf nodlarında tutulum gösterdiği bilinir. Kötü prognozlu seyir eder.

Lokal ileri meme kanseri (LİMİK) sadece lokal tedavi uygulandığında tekrarlayabilen geniş bir klinik spektrumdan oluşmaktadır. Bu klinik tabloda ameliyat edilebilir tümörler, cilt veya göğüs duvarı invazyonuna bağlı bir teknik olarak temiz cerrahi sınır elde edilmesi zor olan tümörler ve boyuttan ilişkisiz olarak yaygın aksiller veya non-aksiller lenf nodu metastazı olan tümörler bulunmaktadır. LİMİK'in uygulanabilmesi için belirli basamaklar kullanılır:

- 1.Dokunun tanımlanabilmesi için biyopsi veya insizyonel
- 2.Metastaz ekartasyonu
- 3.Neoadjuvan tedavi
- 4.Cerrahi yaklaşım
- 5.Adjuvan tedavi açısından değerlendirme
- 6.Radyoterapi
- 7.Endokrin tedavi

Neoadjuvan kemoterapi tedavisi uygulanan hastalarda daha erken evrede olanların LİMİK veya İMİK olanlara göre rekürrens riskinin daha düşük olduğu yapılan çalışmalarda kanıtlanmıştır. Bu tedaviye ait kemoterapi rejimleri ikili veya üçlü kombinasyonlar halinde veya ardışık olarak verilmektedir. Antrasiklin içeren rejimlerin içermeyenlere göre ve antrasiklin ve taksan bazlı kemoterapilerin LİMİK ve İMİK için neoadjuvan tedavide daha iyi yanıt verdikleri birçok çalışmada ortaya konmuştur. Adriamisin ve epirubusin içeren rejimlerin genellikle üstünlüğü olmasa bile uygun hastalarda seçim açısından kardiyotoksisite potansiyelinin adriamisine göre daha iyidir.

AC		Adriamisin,siklofosfamid
EC		Epirubisin,siklofosfamid
ED		Epirubisin,dosetaksel
EP		Epirubisin,paklitaksel
AP		Adriamisin,paklitaksel
AD		Adriamisin,dosetaksel
AC/EC Paklitaksel/dosetaksel		
Paklitaksel/dosetaksel AC/EC		
CMF		Siklofosfamid,metotreksat,5-fluorourasil
FEC		5-fluorourasil, epirubisin, siklofosfamid
FAC		5-fluorourasil, adriamisin, siklofosfamid
FAM		5-fluorourasil, adriamisin, metotreksat
DAC		Dosetaksel, adriamisin, siklofosfamid
DEC		Dosetaksel, epirubisin, siklofosfamid

Çizelge 2.2. Neoadjuvan kemoterapi için örnek rejimler

2.15.2. Meme Kanserinde Adjuvant Kemoterapi

Meme kanserinde adjuvant tedavinin amacı cerrahi sonrasında gerid kalan tümör hücrelerini yok etmek ve bu şekilde hastalığın rekürrens riskini düşürmektir. Meme kanserinin erken evrelerinde de tümör hücrelerinin dolaşıma geçerek tüm vücuda yayıldığı gözlemlenmiştir. Bu nedenle lokal tedaviler tek başına yeterli olmaz ve sistemik tedavi gereklidir. Adjuvant tedavi uygulamasıyla hastalıksız sağkalım ve genel sağkalımda önemli iyilişme görülmüştür.

Meme kanserinde adjuvant tedavi tümörün boyutu, histolojik, biyolojik özellikleri ve evresine göre uygulanır. 3 farklı şekilde uygulanabilir; Adjuvant kemoterapi, adjuvant endokrin tedavi(tamoksifen aromaz inhibitörleri), adjuvant anti-Her-2 tedavisi şeklindedir.

Meme kanserinde patolojik tümör çapı 0.5-1 cm'nin üzerinde olan hastalarda ve aksiller lenf nodu pozitif olan hastalara uygulanır. Adjuvant kemoterapiden 50 yaş altındaki premenapozal hastalar, 50 yaş üzerindeki hastalardan daha fazla yarar görür (Reitsamer ve diğ. 2005).

TAC	Dosetaksel
AC-HAFTALIK P	Doksorubidin,siklofosfamid-paklitaksel
AC-HAFTALIK P	Doksorubisin,siklofosfamid-haftalık paklitaksel
TC	Dosetaksel,siklofosfamid
AC-HAFTALIK P	Doksorubisin,siklofosfamid
CAF/FAC	Siklofosfamid,doksorubisin,5-flourasil
FEC	Siklofosfamid,epirubisin,5-flourasil
FEC-T	Siklofosfamid,epirubisin,5-flourasil-dosetaksel
CMF	Siklofosfamid,metotreksat,5-flourasil

Çizelge 2.3. Meme kanserinde sık uygulanan adjuvant tedavi seçenekleri

2.15.3. Adjuvant Endokrin Seçenekleri

Meme kanseri hastalığından korunmada selektif östrojen reseptör modülatörleri (SERM) ve aromataz inhibitörlerinin etkili olduğu gösterilmiştir. Tamoksifen ve raloksifen gibi SERM'ler etki gösterdiği hedef organa göre östrojen antagonisti veya agonisti olarak farklı etkilere sahiptirler. Her iki ajan meme kanseri prevansiyonunu sağlamak amacı ile memede antiöstrojen etki ile epitel hücre proliferasyonunu azaltır. Tamoksifen endometrium üzerine östrojen etkisi yaratırken, raloksifenin östrojen antagonisti olarak etki göstermesi ikisi arasındaki en büyük farktır.

Biri Amerika'dan, üçü Avrupa'dan 4 çalışmanın ikisinde tamoksifen meme kanseri açısından yüksek risk taşıyanların prevansiyonunda kullanılmıştır. National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project (NSABP)'nin sponsor olduğu American Breast Cancer Prevention Trial (P-1) çalışması diğeri ise International Breast Cancer Intervention Study (IBIS-1) çalışmalarında etkili bulunmuştur. İngiliz ve İtalyan çalışmalarında ise istatistiksel anlamlı farklar saptanamamıştır. Bu çalışmaların toplu olarak metaanalizinde, tamoksifen invazif meme kanseri riskini izafi olarak %38 düşürmektedir. Tamoksifenin sağladığı faydalar kesildikten sonra 3-5 yıl devam ettiği tespit edilmiştir. Prevansiyon amacıyla tamoksifen kullanımının invaziv meme kanseri gelişme riskini azaltmasının yanı sıra meme kanserine veya tüm sebeplere bağlı mortaliteyi azalttığına dair bir bulgular mevcut değildir. Tamoksifen kullananlarda yan etkiler sıcak basması, vajinal akıntı, kaşıntı, ve kuruluktur. Fakat tromboembolik olaylar (%0.8'e 0.4) ve endometrium kanser insidansının (%0.4'e,0.2) artması en ciddi yan etkiler olarak bilinmektedir (John ve diğ. 2010).

Tamoksifen, BRCA-2 gen mutasyonu taşıyıcılarının kemoprevansiyonunda etkili olduğu saptanmıştır. BRCA-1 geni için etkili bulgunun olmadığı yönündedir. Bu çalışmaların sonucunda American Society of Clinical Oncology (ASCO) ve US Preventive Services Task Force (USPSTF) 'ta tamoksifen yan etkileri göz önüne alınarak meme kanseri prevansiyonunda yüksek riskli hastalarda önerilmektedir.

Raloksifen kemik ve STAR çalışmasında ise raloksifen tamoksifenle karşılaştırılmıştır ve meme kanseri riskini azaltmada tamoksifen kadar etkili bulunmuştur. Raloksifen meme kanseri açısından yüksek riskli bireylerde invazif meme kanseri riskini azaltmaktadır. Fakat günümüzde standard olarak bu amaçla verilmemektedir. Postmenapoze uterusu alınmamış ve osteoporozu olanlarda raloksifen, tamoksifene alternatif olarak kullanılabilir. Yüksek riskli postmenapoz kadınlarda da prevansiyon amacıyla tamoksifen yerine raloksifen kullanımı saptanmıştır (Yazici ve diğ. 2005).

BÖLÜM 3:GEREÇ-YÖNTEM

3.1. Araştırma Tekniği: Araştırma tanımlayıcı epidemiyolojik ve retrospektif araştırmadır.

3.2. Örnek Seçimi: Bu araştırmada veriler Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı kayıtlarından toplanmıştır. Çalışmaya 2010-2017 yılları arasında, laboratuara BRCA gen mutasyon incelemesi için gönderilen tüm hastalar dahil edilmiştir. Çalışmaya meme/over kanseri tanısı almış, ailede meme/over kanseri öyküsü barındıran ve/veya memede kitle varlığı göstermiş hastalar ve kemoterapi tedavisi alan hastalar seçilmiştir.

3.3. Araştırmanın Yeri: Çalışma 2010 – 2017 yılları arasında Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı laboratuvarında yürütülmüştür.

3.4.Otomatik dizi analizi tekniği

3.5. Laboratuvar Aşamaları:

3.5.1. Örnek Toplama ve DNA İzolasyonu: Tüm hastalardan EDTA'lı tüplere 3ml venöz kan alınmıştır. Olgulara ait kan örneğinden Qiagen DNA izolasyon içerisinde DNA izolasyonu yapılır. 260 ve 280 nm dalga boyundaki absorbanlar spektrofotometre (NanoDrop, ND-1000) kullanılarak ölçülmüştür. A260/A280 oranı 1,7 ile 2.0 arasında olan DNA'lar kullanılır. Dizileme çalışması başlayana kadar DNA'lar +4C° ' de saklanmıştır.

3.5.2. DNA dizi analizi için polimeraz zincir reaksiyon (PCR) tekniği: İki farklı PCR reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. İlk reaksiyonda DNA zincirinden BRCA1-2 gen bölgelerinin dizilenmek istenen parçaları çoğaltılmıştır. İkinci reaksiyonda çoğaltılan diziler floresan boya ile muamele edilmiştir. Mikrotüpler içinde hazırlanan PCR karışımı (çizelge 3.1.) Termal Döngü Düzenleyici Cihazı'na (Termal Cycler) yerleştirilerek amplifikasyon başlatılmıştır. Termal döngü protokolunun ısı ve süreleri çizelge 3.2.'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. PCR Karışımı

PCR Karışımı	
Steril Su	31,5 µL
5X Buffer:	5 µL
Taq DNA Polimeraz:	0,1 µL
MgCl ₂ :	3 µL
dNTP:	2 µL
Genomik DNA:	3 µL
Forward Primer:	2,5 µL
Reverse Primer:	2,5 µL
Toplam Hacim	50 µL

Çizelge 3.2. Termal döngü protokolünün ısı ve süreleri

Sıcaklık	Süre	
94 C°	5 dakika	
94 C°	1 dakika	35 Döngü
57 C°	1 dakika	
72 C°	1 dakika	
72 C°	7 dakika	
4 C°	∞	

Sekans PCR Karışımı için termal döngü sekans PCR protokolünün ısı ve süreleri çizelge 3.2.'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.3. Sekans PCR Karışımı

Sekans PCR Karışımı	
BigDye	2 µL
5X Buffer	2 µL
Steril Su	2 µL
Forward Primer	2 µL
Reverse Primer	2 µL
PCR ürünü	2 µL
Toplam Hacim	10 µL

Çizelge 3.4. Termal döngü sekans PCR protokolünün ısı ve süreleri

Sıcaklık	Süre	
96 C°	1 dakika	
96 C°	10 saniye	30 Döngü
50 C°	5 saniye	
60 C°	4 dakika	
4 C°	∞	

3.5.3. Agaroz jel elektroforezi: İlk PCR reaksiyonundan sonra dizilenmek istenen bölgelerin çoğalıp çoğalmadığının kontrolü agaroz jel elektroforezi ile yapılır.

1lt 1X TBE Hazırlanışı: 100 mL 10X TBE (Tris, Borik Asit, EDTA- AppliChem, Germany) 900 mL distile su içinde çözülmüştür. % 3'lik agaroz jel, 80 mL 1X TBE tamponu içerisinde mikrodalga fırında eritildikten sonra bir süre soğumaya bırakılmıştır. Çözünen agaroz jelin içine 2 µL ethidium bromid eklenerek jel içinde homojen olarak dağılması sağlanmıştır. Jel, elektroforez tepsisine döküldükten sonra soğumaya bırakılmıştır. 1X TBE tamponu ile dolu olan elektroforez tankı içine jel yerleştirilip, jel kuyularına 5 µL amplikon, 2 µL yükleme boyası ile karıştırılarak pipetlenmiştir. DNA boyut markırı bir başka kuyuya pipetlenerek 90 voltta 60 dakika yürütülmüştür. DNA fragmentleri UV translüminator ile görüntülenip fotoğrafı çekilerek değerlendirilmiştir.

3.5.4. Pürifikasyon İşlemi: İkinci PCR reaksiyonundan sonra PCR karışımı içinde kalan fazla floresan boyanın uzaklaştırılması işlemi gerçekleştirilir. Toz halindeki Sephadex'ten 1gr tartılır ve 12 mL distile su içinde çözülmüştür. Filtreli Sephadex kolonları içine 600 µL karışım konulmuş ve 5400 rpm'de iki dakika santrifuj edilmiştir. Kolonlar içinde oluşan jel kolonunun üstüne PCR ürünü pipetlenmiştir. 5400 rpm'de iki dakika santrifuj edilmiştir. Bu işlem sonunda tüp içinde toplanan PCR ürünü cihaz aşaması için hazır hale gelmiştir.

3.5.5. Cihaz Yükleme Aşaması ve Verilerin Alınması: İşaretili PCR ürünleri örnek tepsisine konulup dizi analizi başlatılmıştır. Cihaz çalışması bitiminde elde edilen hastalara ait diziler referans dizilerle karşılaştırılmış farklılıklar belirlenmiştir.

Başlama komutu ile cihazın gerçekleştirdiği işlemler şu şekilde sıralanır:

- 1- Cihaz başlama komutunu aldıktan sonra kapiler ünitesinin sıcaklığını elektroforez için uygun sıcaklık olan 60 C°'ye çıkarır.
- 2- Uygun sıcaklık sağlandıktan sonra kapilerin platin çubuğa bağlı serbest uçları örnek yükleme ünitesinde bulunan distile su tüpüne girer. Cihaz polimer blok sonunda bulunan ve anoda açılan kapağı kapatır. Polimer şırıngası, üzerinde bulunan piston ile sıkıştırılır. Polimer, anot tarafı kapalı olduğu için hareket edebileceği tek yön olan kapiler içine yayılmaya başlar.
- 3- Kapiler, polimer ile doldurulduktan sonra serbest kapiler uçları örnek tepsisi üzerinde hareket ederek örnek içerisine girer.
- 4- Anot kapağı açılan cihaz üzerinde elektriksel alan yaratılır. Yaratılan elektriksel alanda tüp içerisinde bulunan DNA parçaları kapiler boru içerisine doğru harekete geçerler. DNA parçalarının kapilere taşınması için gerekli sürenin dolması ile akım kesilir ve serbest kapiler uçları distile su içerisine döner.
- 5- Platin çubuk ile kapiler çevresine örnekten bulaşan kirlilikler temizlenir.
- 6- Kapiler serbest uçları temizleme sonrası tekrar hareket ederek örnek tepsisi üzerinde bulunan yürütme çözeltisi içerisine girer. Burası kapiler serbest uçları için son noktadır.
- 7- Anot kapağı açıldıktan sonra cihaz üzerine tekrar akım verilir. Örnek tepsisi üzerinde bulunan yürütme çözeltisi ile polimer blok sonunda bulunan yürütme çözeltisi arasında 14000V' a varan bir gerilim oluşur. DNA parçaları kapiler serbest uçlarından kapiler boyunca, polimer bloğa doğru harekete geçerler. Bu yürütme sırasında lazer ünitesi içerisinden geçerler ve yaydıkları floresan ışık ile tespit edilirler. Elektroforez

sonlandığında cihaz yeni deney için işlemleri tekrar eder. Cihazın gerçekleştirdiği işlemler bittikten sonra cihaz örneklerden aldığı bilgiyi bilgisayar sistemine aktarır. Bu sistemde iki ana program yüklüdür. İki programdan birinin görevi elektroforez cihazı ile bağlantıyı kurmak, elektroforez koşullarını sağlamak ve verileri toplamaktır. İkinci programın görevi ise toplanan verilerinin değerlendirilmesidir. ABI 3130xl Genetik Analizatöründe “DATA Collection” programı birinci tip bilgisayar programına örnektir. “Sequance Analyse” programı ise cihazın ikinci tip programıdır.

ABI Big Dye v3.1 terminator reaksiyon kiti içerisinde bulunan karışım içerisinde PCR için gerekli tüm kimyasallar yanında her bir bazın eşit miktarda ddNTP’leri de bulunur. Bu ddNTP’lerin her biri farklı bir floresan boya ile işaretlenmiştir. Bu sayede tek bir reaksiyonla dizi analizi yapılabilir. Kit tüm kalıp DNA’lar için ortak bir PCR protokolu içerir ve PCR süresi ortalama 2,5 saattir. Çizelge 3.5. ABI Big Dye v3.1 terminatör reaksiyon kiti içerisindeki ddNTP floresan boya ve renkleri.

Çizelge 3.5. ddNTP floresan boya ve renkleri

ddNTP Florasan Boya Renk		
A	dR6G	Yeşil
T	dROX	Kırmızı
C	dR110	Mavi
G	dTAMRA	Siyah

3.6. BRCA1 ve BRCA2 dizi analizinde kullanılan primerler

B1G1AF (BRCA1 Grup 1A Forward):

5'- AGG AGC ATT TGT TAC TGA GCC A - 3'

B1G1AR (BRCA1 Grup 1A Reverse) :

5' -TGC CTG GTA GAA GAC TTC CTC - 3'

B1G1BF (BRCA1 Grup 1B Forward):

5'-GAG GAA GTC TTC TAC CAG GCA - 3'

B1G1BR (BRCA1 Grup 1B Reverse) :

5' – AGA TCT TTG GGG TCT TCA GCA - 3'

B1G2F (BRCA1 Grup 2 Forward):

5'- AAG AAG CCA GCT CAA GCA - 3'

B1G2R (BRCA1 Grup 2 Reverse) :

5' – AGA CAC TCG GTA GCA ACG GT - 3'

B1G3F (BRCA1 Grup 3 Forward):

5'- ATA TGA CGT GTC TGC TCC AC - 3'

B1G3R (BRCA1 Grup 3 Reverse) :

5' – TGC AAA GGG GAG TGG AAT AC - 3'

B2G4F (BRCA2 Grup 4 Forward):

5'- TGT AAA CGA ACC CAT TTT CAA GAA C - 3'

B2G4R (BRCA2 Grup 4 Reverse) :

5' – CAG AAA CAA CTA CAC TAC TCT GTA - 3'

B2G5F (BRCA2 Grup 5 Forward):

5'- TAT GGC AGG TTG TTA CGA GGC A - 3'

B2G5R (BRCA2 Grup 5 Reverse) :

5' – CCC TTA ACT TTG TGT AAG GAA C - 3'

B2G6F (BRCA2 Grup 6 Forward):

5'- AGA AAC CCA GAG CAC TGT GTA –3'

B2G6R (BRCA2 Grup 6 Reverse) :

5' – ATG TGT GGC ATG ACT TGG CA - 3'

3.7. Veri Toplanması: Bu araştırmada hastaların anamnez formları ve aldıkları tedaviye ait dosyalar veri toplama aracı olarak kullanılmıştır. Bu veri toplama aracı meme ve over kanserleri ile ilgili literatürlere dayanarak geliştirilmiştir.

3.8. Kullanılan Alet ve Cihazlar

1. Spektrofotometre (NanoDrop, ND-1000)
2. Mikrosantrifüj (Beckman Coulter)
3. Derin dondurucu (-20C° Arçelik)
4. Thermal cycler (Applied Biosystems, 2720)
5. Mikrodalga fırın (Sinbo)
6. Jel elektroforez cihazı (Lightning Volt Power Supply, Model 05P-300)
7. Fotoğraf bağlantılı UV translüminatör (Geneline Image Analysis System)
8. Hassas terazi (AND Gr-200)
9. Otomatik pipet (2.5, 10, 100, 1000 µL) (eppendorf)
10. 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems)

3.9. Kullanılan Sarf Malzemeler

1. TBE-Buffer 10X (Tris, Borik Asit, EDTA- AppliChem, Germany) :Tris 0,89 M, Borik Asit 0,89 M, EDTA 0,02 M (pH 8,3)
2. Agaroz (Prona)
3. Ethidium bromür
4. Yükleme boyası (Loading dye) (6X Fermentas)
5. PCR Pürifikasyon Kiti, Sephadex G-50 (Sigma)
6. QIAmp DNA İzolasyon Kiti (QIAmp DNA Blood Mini Kit -50-,Qiagen)
7. BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)
8. BigDye Terminator v3.1 5x Sequencing Buffer (Applied Biosystems)
9. Buffer (10x) EDTA'lı (Applied Biosystems)
10. 3130xl POP-7 Performance Optimized Polymer (Applied Biosystems)

3.10. Yeni Nesil Dizi Analizi Tekniği

3.10.1. PicoGreen ile DNA Miktar Tayini

PicoGreen Kit +4 C de saklanır. Kit içerisinden 20X TE, DNA Standart 100µl/mL, PicoGreen ıkıyor. 20X TE den 1X TE yapılmıştır. Bu dilue işlemi için 500µl 20X TE ve 9500µl distile su falkon tüpü eklenerek gerçekleştirilmiştir. lm için farklı konsantrasyonlarda standart DNA karışımı hazırlanmıştır. Kit içerisinden çıkan PicoGreen 1/200 dilue edilmiştir. Bu dilisyon örnek sayısı hesaplanarak yapılır. rnek başına 50µl dilue PicoGreen eklenmiştir. lm Roche Light Cycler 480 cihazı ile yapılır. Bunun için LC 480 plate kullanılır . rnek sayısı kadar kuyucuklara 99µl 1X TE, zerine 1µl DNA eklenir ve vorteks ve spin yapılmıştır. Hasta DNA'ları 1/100 oranında sulandırılır. Sulandırılmış hasta DNA'larından kuyucuklara 50µl yüklenmiştir. zerine 50µl 1/200 dile edilir. PicoGreen eklendikten sonra, vorteks ve spin yapılmıştır. Standart DNA lar kuyucuklara pipetlenmiştir. 50µl Standart DNA ve üzerine 50µl 1/200 dilue pico- green eklenmiştir. PicoGreen eklenmiş rnekler LC 480 de analiz edilir. DNA miktarları hesaplandıktan sonra DNA sulandırması yapılıp mikrolitre 25 ngr olacak şekilde hesaplanmıştır.

LC 480 PicoGreen Program

Detection Format: SYBR Green I / HRM Dye

Name: Program 1	Cycles: 1	Analysis Mode: Melting Curves
Target: 20 C	Acquisition Mode: None	Hold: 10 sn
Ramp Rate: 4.4		

Name: Program 2	Cycles: 5	Analysis Mode: Quantification
Target: 37 C	Acquisition Mode: Single	Hold: 10 sn
Ramp Rate: 4.4		

Sec Target: 0	Step Size: 0	Step Delay: 0
----------------------	---------------------	----------------------

Name: Program 3	Cycles: 1	Analysis Mode: Melting Curves
Target: 20 C	Acquisition Mode: None	Hold: 10 sn
Ramp Rate: 2.2		

3.10.2. DNA Kütüphanesinin Hazırlanması:

- Çalışma için konsantrasyonu ayarlanan DNA örnekleri ile çoklu (multiplex) PCR işlemi yapılır. Bu sayede tek bir PCR reaksiyonu ile birden çok DNA bölgesi çoğaltılır. BRCA için 5 primer karışımı vardır. Primer karışımları vortekslenir. 12000g de 10 sn santrifüj edilir. Hasta başına primer karışımından 10 µl ve 0.075 µl Taq DNA polimeraz eklenir. Karışımların üzerine total DNA miktarı 50ng olacak şekilde DNA dağıtılır. Total hacim 15µl olacak şekilde ayarlanmıştır.
- İkinci PCR reaksiyonu olan universal PCR ile hastalar bilinen baz dizileri (MID Adaptörleri) ile işaretlenmiştir. 20µl universal PCR karışımı, 0.125µl Taq DNA polimeraz ve 4µl MID primer mix örnek başına olacak şekilde hazırlanmıştır. Karışıma 1µl dilue PCR ürünü eklenmiştir. PCR bitiminde ürünler 1/100 oranında su ile dilue edilmiştir.
- Bu iki PCR aşaması üretici firmanın öngördüğü protokole uygun olarak gerçekleştirilmiştir.
- Her hastanın aynı MID adaptörü ile işaretlenen 5 PCR örneği birleştirilmiştir ve yıkama boncukları (AMPure Bead) kullanılarak pürifiye edilmiştir.
- DNA kütüphanesi oluşumu için, pürifiye edilen örneklerin DNA miktar tayinleri tekrar PicoGreen kiti ile yapılmıştır.
- Yapılan hesaplamalar sonrası tüm hastaların örnekleri tek bir tüpte toplanarak DNA havuzu oluşturuldu.

BRCA için Multiplex PCR Protokolü

98 C > 10 dak

95 C > 45 sn

60 C > 45 sn

68 C > 2 dak

72 C > 10 dak

4 C > ∞

X20

BRCA için Universal PCR Protokolü

98 C > 10 dak

95 C > 45 sn

64 C > 45 sn

68 C > 2 dak

X20

72 C > 10 dak

3.10.3. Yeni Nesil Dizileme

Çalışmada MiSeq (Illumina, San Diego, CA) NGS sistemi kullanılmıştır. Hedefe yönelik dizileme yapılmıştır. Kit olarak MiSeq Reagent Nano Kit V2 kullanılmıştır. Kit iki parçadan oluşmaktadır; cihaza yüklenen ve içinde dizileme için gerekli primer ve diğer solüsyonların olduğu kartuş ile dizileme işleminin gerçekleştiği Flow Cell .

3.10.4. Kütüphanenin Cihaza Yüklenmesi

- Cihaza yükleme aşamasında kullanılacak kitler ve solüsyonlar kullanım ısısına getirilir.
- Çalışmaya ait bilgiler cihaza tanımlanır.
- Oluşturulan kütüphane denatüre edilir ve kartuşta uygun kuyucuğa pipetlenir.
- Kite özel olan primerler kartuşta uygun kuyucuklara pipetlenir.
- Cihazda çalışmanın başlaması için gerekli ayarlamalar yapılır.
- Flow Cell'in yerleştirileceği alan temizlenir.
- Flow Cell distile su ile yıkanır ve lens bezi ile toz kalmayacak şekilde temizlenir.
- Atık kutusu boşaltılır, Kit içinden çıkan solüsyon cihazda uygun yere yerleştirilir.
- Kartuş cihazda uygun alana yerleştirilir.
- Çalışma parametreleri kontrol edilir ve çalışma başlatılır.

3.11. Analiz

Çalışma sonrasında MiSeq cihazından veriler FASTQ dosyası biçiminde alınmıştır. SEQ biyoformatik yeni nesil dizi analiz programı kullanılarak veriler analiz edilmiştir. (<https://seq.genomize.com/>). Mutation taster ve clinvar veritabanları kullanılmıştır.

3.12. Kullanılan Alet ve Cihazlar:

1. Spektrofotometre (NanoDrop, ND-1000)
2. Mikrosantrifüj (Beckman Coulter)
3. Derin dondurucu (-20C° Arçelik)
4. Thermal cycler (Applied Biosystems, 2720)
5. Otomatik pipet (2.5, 10, 100, 1000 µL) (eppendorf)
6. Isıtıcı Blok (Stuart, SBH 130D)
7. Santrifüj (Beckman Coulter Allegra X-12 Centrifuge)
8. Vorteks (Stuart vortex mixer (SA8))
9. Light Cycler 480 II (Roche)
10. Illumina (San Diego, CA)

3.13. Kullanılan Sarf Malzemeler:

1. MiSeq Reagent Nano Kit V2
2. Picogreen DNA Assay Kit (Invitrogen)
3. BRCA Mastr Dx (Multiplicom)
4. Library Prep Kit / Rapid Library MID Adaptors (Roche, 454 Sequencing)
5. Agencourt AMPure Bead (Beckman Coulter)
6. NaOH
7. Lens paper
8. Tris-Cl 10mM, pH8.5+% 0,1 Tween 20

BÖLÜM 4: BULGULAR

Çalışmada, Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Tıbbi Genetik ve Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı laboratuvarına 2010-2017 yılları arasında rutin tanı amaçlı genetik inceleme için gönderilen 460 hasta değerlendirmeye alınmıştır. Bu hastalardan 100 hasta presentomatik ve patojenik bulgular açısından aldıkları kemotreapötik ilaçlarla olan ilişkilerini belirlemek amacıyla seçilmiştir. Seçilen hastaların 50' si patojenik mutasyon taşırken 502 si patojenik mutasyon taşımamaktadır. Mutasyonların belirlenmesinde sanger ve yeni nesil dizi analizi teknikleri kullanılmıştır. Elde edilmiş olan veriler değerlendirilerek retrospektif bir çalışma yapılmıştır.

Çizelge 4.1. Cinsiyetin BRCA varyasyonlarına göre dağılımı

Cinsiyet	BRCA1		BRCA2	
	n	%	n	%
Kadın	292	96.3	148	94.2
Erkek	11	3.7	9	5.8
Toplam	303	100	157	100

Çalışmaya katılan 460 hastadan BRCA1 gen analizi yapılan 303 hastadan 292'si (%96.3)kadın, 11'i (%3.7) erkektir. BRCA2 gen analizi yapılan 157 hastadan 148'i (%9.2) kadın hasta iken 9'u (%9.2) erkek hastadır.

Çizelge 4.2. BRCA Pozitif Hastaların Genel Yaş Ortalaması, İlk Gebelik, Menarş, Menapoz Yaşları ve Beden Kitle İndeksleri

Grup	Hasta Sayısı (n)	Ortalama	Standart Sapma
Yaş	50	52,7	10,8
İlk gebelik yaşı	48	22,3	3,9
Menarş yaşı	48	14,0	1,3
Menapoz yaşı	36	45,5	4,4
BKİ (kg/m ²)	50	28,2	5,3

Çalışmaya dahil edilen 50 patojenik mutasyona sahip hastanın genel yaş ortalaması , ilk gebelik, menarş, menapoz yaşları ve beden kitle indeksleri incelenmiştir. Araştırmaya dahil edilen 50 patojenik mutasyona sahip hastanın genel yaş ortalaması 52,7'dir. Hastaların 12 tanesinin tam zamanlı gebelik öyküsü yoktur ve kalan 48 hastanın tam zamanlı ilk gebelik yaş ortalaması 22,3'tür. Menarş yaşları sorgulanan 48 hastanın menarş yaş ortalaması 14'tir. Postmenapozal dönemde olan 36 hastanın ortalama yaşı 45,5' tir.

Çizelge 4.3. Hastaların BRCA1 ve BRCA2 genlerinde saptanan varyasyon sonuçları.

	BRCA1		BRCA2	
	n	%	n	%
Varyasyon saptanan hasta sayısı	240	79.2	89	56.7
Varyasyon saptanmayan hasta sayısı	63	20.8	68	43.3
Toplam	303	100	157	100

Bu çalışmada BRCA1 geninin yeni nesil ve sanger dizi analizi teknikleri ile yapılan analizi sonucunda 240 aberasyon, BRCA2 geninde ise 89 aberasyon saptanmıştır. 460 olgunun 329'ünde (%71.5) aberasyon saptanmıştır. 131 (%28.5) olguda ise herhangi bir aberasyon bulunamamıştır.

Çizelge 4.4. BRCA1 ve BRCA2 genlerinde saptanan patojenik ve patojenik olmayan varyasyon dağılımı

	BRCA1		BRCA2	
	n	%	n	%
Patojenik mutasyon saptanan hasta sayısı	23	79.2	27	56.7
Patojenik mutasyon saptanmayan	21	20.8	29	43.3
Toplam	44	100	56	100

Patojenik mutasyona sahip hasta sayısı 50'dir. Patojenik mutasyona sahip olmayan meme kanseri tanısı almış 50 hasta çalışmaya dahil edilmiştir. BRCA1 geninde patojenik mutasyonu olan hasta sayısı 23 (%79.2), patojenik mutasyona sahip olmayan hasta sayısı 21 (%20.8)olarak belirlenmiştir. BRCA2 geninde patojenik mutasyon saptanan hasta sayısı 27 (%56.7), patojenik mutasyona sahip olmayan hasta sayısı 29 (%43.3)dur.

Çizelge 4.5. BRCA1 geninde saptanan varyasyonlar

Varyasyon Sayısı	Pozisyon	Exon	Nükleotid değişimi	Varyasyon İsmi	HGVS**
1	chr17:41251931	Intron 6	G -> A	IVS7-34C>T	442-34C>T
2	chr17:41215825	Intron 17	C -> T	IVS18+66G>A	5152+66G>A
3	chr17:41219780	Intron 15	T -> C	IVS16-68A>G	4987-68A>G
4	chr17:41219804	Intron 15	T -> C	IVS16-92A>G	4987-92A>G
5	chr17:41223094	Exon 15	T -> C	S1613G	4837A>G
6	chr17:41226601	Intron 13	G -> C	-	4485-63C>G
7	chr17:41234470	Exon 12	A -> G	S1436S	4308T>C
8	chr17:41243190	Intron 10	T -> G	IVS12141A>C	4097-141A>C
9	chr17:41244000	Exon 10	T -> C	K1184R	3548A>G
10	chr17:41244435	Exon 10	T -> C	E1038G	3113A>G
11	chr17:41244936	Exon 10	G -> A	P871L	2612C>T
12	chr17:41245237	Exon 10	A -> G	L771L	2311T>C
13	chr17:41245466	Exon 10	G -> A	S694S	2082C>T
14	chr17:41249363	Intron 7	TA -> T	IVS8-58delT	548-58delT
15	chr17:41276247	Intron 1	A -> G	IVS1-115T>C	19-115T>C
16	chr17:41245471	Exon 10	C -> T	D693N	2077G>A
17	chr17:41247973	Intron 8	A -> G	-	594-34T>C
19	chr17:41222975	Exon 15	C -> T	M1652I	4956G>A
20	chr17:41228595	Exon 13	AT -> A	I1044V	4393delA
21	chr17:41228598	Exon 13	G -> A	P1664L	4391C>T
22	chr17:41246426	Exon 10	T -> C	-	1122A>G
23	chr17:41246427	Exon 10	G -> A	T374I	1121C>T
24	chr17:41246488	Exon 10	T->TTCAG	A550H	1119-1120insCTGA
25	chr17:41244982	Exon 10	A -> G	Y856H	2566T>C
26	chr17:41201039	Intron 21	G -> C	-	5406+99C>G
27	chr17:41201290	Intron 20	A -> G	-	5333-79T>C
28	chr17:41256408	Intron 5	A -> AT	-	302-131dupA
29	chr17:41199683	Exon 22	C -> T	T179C	C>T
30	chr17:41246481	Exon 10	T -> C	Q356R	1067A>G
31	chr17:41249343	Intron 7	G -> T	-	548-37C>A
32	chr17:41244429	Exon 10	C -> T	S1040N	31196G>A
33	chr17:41251777	Intron 8	AC -> A	IVS8+14delG	547+14delG
34	chr17:41201290	Intron 20	A -> G	-	533-79T>C
35	chr17:41208995	Intron19	C->A	-	5277+74G>T
36	chr17:41226601	intron 13	C>G	-	
37	chr17:41223048	Exon 15	T>C	M1628T	4883T>C
38	-	Intron 17	CA>C	-	5152+85delT

39	chr17:41242931	Intron 11	G>A	-	4185+30G>A
40	chr17:41258504	Exon 4	T>G	C61G	181T>G
41	chr17:41226387	Exon 14	G>T	D1546Y	c.4636G>T
42	chr17:41219611	Intron 16	C>T	-	5074+14C>T)
43	chr17:41244516	Exon 10	A>C	E1011A	3032A>C
44	chr17:41216021	Intron 16	C>T	-	5075-53C>T
45	chr17:41244418	Exon 10	A>G	I1044V	3130A>G
46	chr17:41251803	Exon 7	A>G	Y179C	536A>G
47	chr17:41245900	Exon 10	A>C	N550H	1648A>C
48	chr17:41246092	Exon 10	T>C	F486L	1456T>C
49	chr17:41228491	Intron 13	A>G	-	4484+14A>G
50	chr17:41276141	Intron 1	G>C	-	-19-9G>C

** **HGVS** : The Human Genome Variation Society(İnsan Genom Varyasyon Topluluğu)

BRCA1 geninde 50 farklı patojenik olmayan varyasyon saptanmıştır. BRCA1 geninde ekzon 10'da saptanan K1183R, E1038, P871L ve exon 15'de saptanan S1613G varyasyonları toplam 194 olgunun hepsinde gözlenmiştir. Aynı semptomatik özelliklere sahip bu olguların fenotipik etkileri çok düşüktür. 57 olguda N550H, T539M, 2201C/T, D693N varyasyonları saptanmıştır. Veritabanlarında bu varyantlar benign olarak belirtilmiştir.

Çizelge 4.6. BRCA1 geninde saptanan patojenik varyasyonlar

Varyasyon Sayısı	Pozisyon	Exon	Nükleotid değişimi	Varyasyon İsmi	HGVS**
1	chr17:41228595	Exon 13	AT -> A	I1465*	4393delA
2	chr17:41246426	Exon 10	T -> C	-	1122A>G
3	chr17:41246428	Exon 10	T -> TTCAG	T374Lfs*5	1119- 1120insCTGA
4	chr17:41201039	Intron 21	G -> C	-	5406+99C>G
5	chr17:41199683	Exon 22	C -> T	W1815*	5444G>A
6	chr17:41258504	Exon 4	T>G	C61G	181T>G
7	chr17:41243923	Exon 10	A>AT	L1209*	3624dupA
8	chr17:43099865	Exon 7	T->C	S153G	457A>G
9	chr17:41209104	Exon 19	CT>C	G1748*	5241delA
10	chr17:43057065	Exon 20		5382 ins	Stop 1829
11	chr17:43092965	Exon 11	T->C	Y856H	2566T>C
12	chr17:43057088	Exon 10		R1203T	3607C>T
13	chr17:43051077	Exon 21	G->A	T1773I	5318C>T
14	chr17:43093955	Exon 10	G->A	Q526*	1576C>T
15	chr17: 3234007	Exon1 0	CT>C	L1908R*	5722_5723delCT
16	chr17:41209082	-	-	1129insA	Stop 635

BCA1 geninde saptanan patojenik varyasyona sahip hasta sayısı 23'tür. Ile1465* frameshift mutasyona sahip biri kız ikisi erkek üç kardeş saptanmıştır. Gln1756Profs * frameshift mutasyonu anne ve kızında rastlanmıştır. Gly1748Valfs* ise üç farklı kadın hastada saptanmıştır.

Çizelge 4.7. BRCA2 geninde saptanan varyasyonlar

Varyasyon Sayısı	Pozisyon	Exon	Nükleotid değişimi	Varyasyon İsmi	HGVS
1	chr13:32929387	Exon 14	T -> C	V2466A	7397T>C
2	chr13:32915005	Exon 11	G -> C	V2171V	6513G>C
3	chr13:32913055	Exon 11	A -> G	L1521L	4563A>G
4	chr13:32907535	Intron 10	CT -> C	IVS10+12delT	1909+12delT
5	chr13:32906729	Exon 10	A -> C	N372H	1114A>C
6	chr13:32893197	Intron 2	AT -> A	IVS2-7delT	68-7delT
7	chr13:32903685	Intron 8	C -> T	IVS8+56C>G	681+56C>T
8	chr13:32912299	Exon 11	T -> C	V1269V	3807T>C
9	chr13:32936646	Intron 16	T -> C	IVS16-14T>C	7806-14T>C
10	chr13:32953388	Intron 21	T -> C	IVS21-66T>C	8755-66T>C
11	chr13:32973012	3UTR	A -> C	10590	*105A>C
12	chr13:32899388	Intron 4	A -> C	IVS4+67A>C	425+67A>C
13	chr13:32900149	Intron 4	T -> C	IVS4-89T>C	426-89T>C
14	chr13:32900933	Intron 7	T -> A	-	631+183T>A
15	chr13:32906480	Exon 10	A -> C	N289H	865A>C
16	chr13:32906980	Exon 10	A -> G	S455S	1365A>G
17	chr13:32910721	Exon 11	T -> C	H743H	2229T>C
18	chr13:32911463	Exon 11	A -> G	N991D	2971A>G
19	chr13:32929478	Intron 14	C -> T	IVS14+53C>T	7435+53C>T
20	chr13:32890572	5UTR	G -> A	5'UTR203	26G>A
21	chr13:32900933	Intron 7	T -> A	-	631+183T>A
22	chr13:32911411	Exon 11	G -> A	S973S	2919G>A
24	chr13:32911888	Exon 11	A -> G	K1132K	3396A>G
25	chr13:32929232	Exon 14	A -> G	S2414S	7242A>G
26	chr13:32968810	Intron 24	T -> C	IVS24-16T>C	9257-16T>C
27	chr13:32912750	Exon 11	G -> T	D1420Y	4258G>T
28	chr13:32904949	Intron 8	G -> T	-	682-107G>T
29	chr13:32920844	Intron 12	T -> C	-	6938-120T>C
30	chr13:32928936	Intron 13	A -> G	IVS13-62A>G	7008-62A>G
31	chr13:32937526	Exon 18	G -> T	K2729N	8187G>T
32	chr13:32968743	Intron 24	G -> A	IVS24-83G>A	9257-83G>A
33	chr13:32972884	Exon 27	A -> G	I3412V	1023A>G

34	chr13:32890726	Intron 2	T -> G	IVS2+62T>G	67+62T>G
35	chr13:32913804	Exon 11	G -> A	G1771D	5312G>A
36	chr13:32911810	Exon 11	C -> G	S1106R	3318C>G
37	chr13:32911802	Exon 11	A -> C	T1104P	3310A>C
38	chr13:32911995	Exon 11	T -> A	M1168K	3503T>A
39	chr13:32914236	Exon 11	C -> T	T1915M	5744C>T
40	chr13:32972526	Exon 27	G -> A	P3292P	9876G>A
41	chr13:32937708	Intron 18	G -> A	-	8331+38G>A
42	chr13:32937663	Exon 18	T -> G	M2775R	8324T>G
43	chr13:32911547	Exon 11	C -> G	L1019V	3055C>G
44	chr13:32971042	Exon 26	A -> G	D3170G	9509A>G
45	chr13:32890665	Intron 2	G -> A	IVS2+1G>T	67+1G>A
46	chr13:32899103	Intron 3	C -> A	-	317-110C>A
47	chr13:32893197	Intron 2	AT>A	-	68-16delT
48		Intron 1	T-> C	-	
49	chr13:32954037	Exon 23	A-> C	Y305S	9104A>C
50	chr13:32913091	Exon 11	A-> C	K1533N	4599A>C
51	chr13:32918583	Intron 11	T-> G	-	6842-112T>G
52	chr13:32913342	Exon 11	G-> A	S1617N	4850G>A
53	chr13:32906766	Exon 10	C-> T	S384F	1151C>T
54	chr13:32971265	Intron 26	G-> A	-	9648+84G>A
55	chr13:32906471	Exon 10	T-> C	S286P	856T>C
56	chr13:32968777	Intron 24	T-> C	-	9257-49T>C
57	chr13:32913091	Exon 11	A-> C	K1533N	4599A>C
58	chr13:32937431	Exon 18	G-> A	A2698T	8092G>A
59	chr13:32930598	Exon 15	T-> C	I2490T	7469T>C
60	chr13:32903734	Intron 8	T-> G	-	681+105T>G
61	chr13:32914359	Exon 11	A-> G	D1956G	5867A>G

BRCA2 geninde V2466A, N372H, N991D, 5950delCT, T1915M ve 2020A/G varyanları toplam 38 olguda gözlenmiştir. Saptanan bu varyasyonlar benign olarak en çok saptanan değişimlerdir. Saptanan varyasyonlar çizelge 4.7.'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.8. BRCA2 geninde saptanan patojenik varyasyonlar

Varyasyon Sayısı	Pozisyon	Exon	Nükleotid değişimi	Varyasyon İsmi	HGVS
1	chr13:32907382	Exon 10	GTTTA -> G	I591Mfs*22	1768-1771delTTTA
2	chr13:32900655	Exon 7	A->AT	I180Yfs*3	536-537insT
3	chr13:32911810	Exon 11	C -> G	S1106R	3318C>G
4	chr13:32911802	Exon 11	A -> C	T1104P	3310A>C
5	chr13:32972526	Exon 27	G -> A	P3292P	9876G>A
6	chr13:32937663	Exon 18	T -> G	M2775R	8324T>G
7	chr13:32890665	Intron 2	G -> A	IVS2+1G>T	67+1G>A
8	chr13:32954037	Exon 23	A->C	Y305S	9104A>C
9	chr13:32914782	Exon 11	C->T	T2097M	6290C>T
10	chr13:32937663	Exon 18	T->G	M2775R	8324T>G
11	chr13:32893271	Exon 3	A->G	Y42C	125A>G
12	chr13:32398489	Exon 27	A->T	K3326*	9976A>T
13	chr13:32936709	Exon17	T->C	W2619R	7855T>C
14	chr13:3293741	-	A->T	R2668T	8002A>T
15	chr13: 32913077	Exon11	G->A	G1529R	4585G>A
16	chr13: 32340330	Exon11	C->T	S1992L	5975C>T
17	chr13:32911278	Exon11	T->C	L929S	2786T>C
19	chr13: 32379893	Exon23	C->CA	T3033Afs*11	9089_9090ins
20	chr13: 32398212	-	delTATG	Cys3233Trpfs	9699_9702delT

BRCA2 geninde patojenik varyasyon saptanan hasta sayısı 27'dir. Tyr42Cys mutasyonu ailesel meme kanseri öyküsü olan anne ve iki kız kardeşte saptanmıştır. Ser1992Leu mutasyonu ise anne ve kızında , Lys.3326* frameshift mutasyonu ise 4 farklı kadında rastlanmıştır.

Çizelge 4.9. Ailesel meme/over kanseri öyküsü olan hastaların BRCA varyasyon dağılımı

	Meme kanseri öyküsü olanlar		Meme kanseri öyküsü olmayanlar		Over kanseri öyküsü olanlar		Over kanseri öyküsü olmayanlar	
	n	%	n	%	n	%	n	%
BRCA Pozitif	41	82	9	18	3	6	47	94
BRCA Negatif	23	46	27	54	2	4	48	96
Toplam	64		36		5		95	

Çalışılan 50 BRCA pozitif varyasyona sahip 41 (%82) olgunun ailesel meme öyküsü vardır, 9(%18) olguda ailesel meme kanseri öyküsü yoktur. 3 (%6) olgunun ailesel over kanseri öyküsü saptanırken,47(%94) olguda ailesel over kanseri öyküsü saptanmamıştır. 50 BRCA negatif hastalarda ise 23(%46) olguda ailesel meme kanseri öyküsü ve 2 (%4) olguda ailesel over kanseri öyküsü vardır. 27(%54) olguda meme kanseri öyküsü , 48 (%96) olguda ailesel over kanseri öyküsü yoktur. Ailesinde meme/over öyküsü olanlarda ve olmayan olgularda BRCA1 ve BRCA2 aberasyon dağılımı çizelge 4.9 'da gösterilmiştir.

Çizelge 4.10. BRCA pozitif ve BRCA negatif hastaların histolojik özelliklere göre dağılımı

	BRCA Pozitif*				TOPLAM		BRCA Negatif**				TOPLAM	
	POZİTİF		NEGATİF				POZİTİF		NEGATİF			
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
ER	18	36	32	64	50	100	34	68	16	32	50	100
PR	12	24	38	76	50	100	26	52	24	48	50	100
HER-2	6	12	44	88	50	100	16	32	34	68	50	100

*BRCA Pozitif: BRCA patojenik mutasyon taşıyan 50 olgu.

**BRCA Negatif: BRCA patojenik mutasyon taşımayan 50 olgu.

100 hastaya ait histopatolojik östrojen reseptörü (ER), progesteron reseptörü (PR), insan epidermal büyüme faktörü reseptörü (HER-2) özellikler Çizelge 4.10' da gösterilmiştir. BRCA pozitif hastalarda reseptör pozitifliği ER(%36), PR(%24), HER-2(%12) olarak saptanmıştır. BRCA negatif hastalarda reseptörlerin pozitifliği ER(%68), PR8%52), HER-2(%32) olarak saptanmıştır. İstatiksel olarak değerlendirilen iki grup arasında anlamlı bir fark olduğu bulunmuştur. ER, PR, HER-2 negatif olan ve BRCA pozitif hastalardan 11 tanesi üçlü negatif hasta olarak saptanmıştır.

Çizelge 4.11. BRCA varyasyonlarına sahip hastaların kemoterapi tedavi dağılımı

	BRCA POZİTİF		BRCA NEGATİF	
	n	%	n	%
Neoadjuvan tedavi	19	38	22	44
Adjuvant tedavi	41	82	43	86
Herceptin	6	12	16	32
Hormon tedavisi	14	28	38	76
Radyoterapi	46	92	41	82

Çalışmaya alınan 50 patojenik ve 50 patojenik olmayan varyasyona sahip hastaların aldıkları tedavi dağılımı ve onkolojik özellikleri (first-line neoadjuvan tedavi, first-line adjuvant tedavi, herceptin tedavisi, hormon tedavisi ve radyoterapi) çizelge 4.11’de verilmiştir. BRCA pozitif 50 olgunun %38 neoadjuvan tedavi, %82 adjuvant tedavi, %12 herceptin(trastuzumab) , %28 hormon tedavisi, %92 radyoterapi aldığı saptanmıştır. BRCA negatif 50 olgunun %44 neoadjuvan tedavi, %86 adjuvant tedavi, %32 herceptin(trastuzumab), % 76 hormon tedavisi, %82 radyoterapi aldığı saptanmıştır.

Çizelge 4.12. BRCA pozitif olan ve üçlü negatif özellik gösteren hastaların aldıkları tedaviler, tümör evre, tümör çapı, tümör grade, aile hikayesi ve patojenik mutasyona ait genler

Hasta sayısı	Tedavi Şekli	T evre	T çapı	T Grad	Aile öyküsü	Adj KT	Adj ET	Adj RT	Patojenik mutasyon taşıyan gen
1	adjuvan	1	1,6	2	var	4AC	tamoksifen	Yok	BRCA2
2	adjuvan	1	2	3	var	3Cef 3D	tamoksifen	Almadı	BRCA1
3	adjuvan	3	4	3	yok	3Caf 3D- Trastuzumab	yok	Aldı	BRCA2
4	neoadjuvan	3	5,5	2	var	4AC4D neo	yok	Aldı	BRCA1
5	adjuvan	3	7,7	2	yok	3Caf 3D	tamoksifen	Aldı	BRCA2
6	adjuvan	2	3,5	3	yok	3Caf 3D	yok	Yok	BRCA1
7	neoadjuvan	3	5,5	3	yok	4Ac +4D	yok	Yok	BRCA1
8	adjuvan	1	1,2	2	var	3AC	tamoksifen	Almadı	BRCA2
9	neoadjuvan	2	3	3	var	3AC+3AD	yok	Aldı	BRCA2
10	adjuvan	3	4,4	2	yok	4CAF+4D	yok	Aldı	BRCA1
11	adjuvan	3	6,2	2	var	4AC	tamoksifen	Yok	BRCA2

BRCA pozitif hastalardan ER, PR VE HER-2 negatif hastalardan 11 farklı patojenik mutasyona ait hastaların aldıkları adjuvan ve neoadjuvan tedaviler.,Tümör evreleri, çapları gradeleri ve aile öyküleri çizelge 4.12’de verilmiştir. Tümör çapı ve tümör gradeleri üçlü negatif hastalarda diğer hastalara göre yüksek oranda saptanmıştır. Tümör çapı büyüdükçe hastalığın nüks oranıda artmaktadır. Yüksek tümör gradeleri ise kötü prognoza işaret eder. Erken metastaz saptanmıştır.



BÖLÜM 5: TARTIŞMA

Meme kanserleri kadınlarda en çok saptanan kanser türü olup sporadik veya kalıtsal (herediter) olarak ortaya çıkmaktadır. Meme kanseri gelişiminde önemli genetik risk faktörlerinden biri BRCA1, BRCA2 gibi DNA tamirinde rol oynayan genlerde yer alan mutasyonlardır. BRCA genlerine ait saptanan varyasyon sayısı yapılmakta olan genetik araştırmalar doğrultusunda artmaktadır. Bu varyasyonların genetik karakterizasyonlarını ortaya koymak ve klinik bulgular ile ilişkisini saptamak, prognozda yeni tedaviler için yol gösterici olabilmektedir.

Günümüzde geliştirilen moleküler teknikler yardımıyla, farklı onkogen/pro-onkogen aktivasyonu ve/veya tümör süpresör gen fonksiyonlarında kayıplara bağlı olarak, histopatolojik görünümleri aynı bile olsa tümörlerin farklı davranış, tedavi yanıtı ve prognoz gösterdikleri anlaşılmıştır. Klinikopatolojik özellikler ve hastaların demografik özellikleri arasındaki korelasyon bu bulgulara önemli katkı sağlamaktadır ve meme kanseri riskini arttırmaktadır.

Çalışmamızda 460 hastaya BRCA gen analizi yapılmış, BRCA1 geninde 240 hastada 16'sı patojenik olmak üzere 66 farklı varyasyon saptanmıştır. BRCA1 geninde patojenik mutasyona sahip hasta sayısı 23'tür. BRCA2 geninde 89 hastada 20'si patojenik olmak üzere 81 farklı varyasyon saptanmıştır. BRCA2 geninde patojenik mutasyona sahip hasta sayısı 27'dir. Bu bilgiler doğrultusunda BRCA 1 ve BRCA2 geninde toplamda 50 patojenik mutasyona sahip hasta ve 50 patojenik mutasyon taşımayan varyasyonlara sahip meme tanısı almış hastalar seçilerek yeni nesil dizi analizi ve otomatik dizi analizi sonuçları veritabanlarından elde edilen bilgiler doğrultusunda incelenmiştir. Literatürde bildirilen varyasyon sayısı BRCA1 de >900 iken BRCA2 de >500 şeklindedir (Manguoglu A.2004). Saptadığımız varyasyon sayısının az olması olgu sayısının az olmasına ve aynı bölgede yaşayan hastaları kapsamına bağlanmıştır.

Ricks ve ark. meme kanserinde BRCA pozitif toplam 206 olgu incelemiştir. Çalışmamızda saptadığımız N550H, T1915M, 2201C/T, N991D varyasyonları bu çalışmada da saptanmıştır.

100 hasta BRCA mutasyonları yönünden incelenmiştir. 50 meme/over kanseri olgunun 23'ünde BRCA1 mutasyonu, 27'sinde BRCA2 mutasyonu ve 50'sinde mutasyon saptanmamıştır. K1183R ve N991D aberasyonları mutasyon olan ve olmayan ailelerde saptanmış ve iki varyasyon ilişkili bulunmuştur. Mutasyon taşıyan ve taşımayan aileler polimorfizmleri bulundurmaları yönünden değerlendirilmiştir. Farklı olarak K1183R, E1038, P871L, S1613R varyasyonlarının sıklığı mutasyon taşıyan ailelerde yüksek bulunmuştur. Ricks ve ark. K1183R, E1038, P871L, S1613R varyasyonlarının diğer bilenen patolojik mutasyonlarla ilişkili bulmuşlardır. Yaptıkları bu çalışmada Q356R-D693N-E1038G varyasyonlarını kalıtsal meme kanseri olan kadınlarda DNA tamir kapasitesi ile ilişkili olduğunu saptamışlardır. Çalışmamızda 21 patojenik mutasyona sahip hastada K1183R, E1038, P871L, S1613R varyasyonlarını saptadık.

Çalışmaya aldığımız BRCA pozitif meme kanseri tanılı hastaları demografik özellikler açısından incelenmiş olup genel yaş ortalaması 52,7 olarak bulunmuştur. Hastaları yaş dağılımlarına göre incelediğimizde ise hastaların %49,6'sı 49 yaş ve altında, %28,4'ü 50-59 yaş aralığında ve %21,8'i 60 yaş ve üzerinde idi. Ortaya koyduğumuz yaş verileri Beji ve arkadaşlarının 405 Türk hasta ile yaptıkları ve 2007 yılında yayınlanan çalışmanın sonuçları ile uyumludur. Söz konusu araştırmada hastaların %42,7'si 49 yaş ve altında, %27,7'si 50-59 yaş aralığında ve %29,6'sı 60 yaş ve üzerinde olduğu tespit edilmiştir.

Meme kanseri gelişme riskinin yaşla doğru orantılı olduğu bilinmektedir. Fakat genç yaşta meme kanseri tanısı almış hastalar da mevcuttur. Bizim çalışmamızda 30 yaşın altında meme kanseri tanısı almış 2 vakada patojenik mutasyon olarak Thr1773Ile ve Lys3326Thr değişimleri saptanmıştır. Bu durum literatürde genç yaş aralığında görülen meme kanserinin BRCA gen mutasyonu ile ilişkili olabileceği yönündeki bilgisiyle uyumludur (Pazdur ve diğ. 2003).

Patojenik hasta grubumuza ait ilk gebelikle yaşı ortalaması % 27,3 tür. Bu hastaların %7'sinde ilk gebelik 30 yaş üzerindeydi. Beji ve arkadaşlarını yaptıkları çalışmanın sonuçlarıyla uyumludur. Söz konusu araştırmada hastaların ilk gebelik yaş aralığı 21-29 ve %13,1'inin ilk gebelik yaşı 30 yaş ve üzerinde olarak tespit edilmiştir. Hastaların menapozal durumları değerlendirildiğinde postmenapozal yaş ortalaması 45,5 ve beden kitle indeksleri 28,2 olarak saptanmıştır. Literatürde postmenapozal dönemdeki kadınlarda

artmış beden kitle indeksinin, artmış meme kanseri riski ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Neslihan ve diğ. 1998).

Çalışmamızda 100 hastanın 64' ünde birinci derece akrabalarında meme kanseri öyküsü, 5'inde over kanseri öyküsü mevcuttur. BRCA pozitif 50 olgunun %82'sinde BRCA negatif 50 hastanın %46'sında ailesel meme kanseri öyküsü saptanmıştır. Yazıcı ve ark. kalıtsal meme/over kanserli olgularda BRCA1/BRCA2 genleri ile ilgili yaptığı bir çalışmada 73 ailesel meme ve/veya over kanseri, 72 erken yaş meme kanseri olmak üzere toplam 145 Türk olgu ile belirli ekzonları taramışlardır. %24,3 oranında bir değer elde etmişlerdir. Bizim çalışmamızda ise meme kanseri aile öyküsü saptanan hasta oranı daha yüksektir. Bu durum bizim hasta sayımızın daha az olması, hasta grupları arasında etnik ve genetik farklılıklar olmasına bağlı olduğunu düşündürmektedir. Literatürde bu durumun BRCA pozitif varyasyon sayısının fazla olmasıyla ilişkili olduğu yönünde de bulgular vardır. Saptanan mutasyonların ailevi kanser olguları ile ilişkilendirilmesi, sonraki nesillerde ortaya çıkabilecek meme kanseri olgularını erken dönemde saptayabilmek, daha da iyisi; koruyucu tedavi seçeneklerini uygulayabilmektir (Victor ve diğ. 2008).

BRCA pozitif meme kanserinde varyasyon ilişkisi olan ve alınan kemoterapi tedavisi üzerinde etkili olan diğer özellikler ise histopatolojik ve moleküler patolojik bulgulardır. Hedefe yönelik tedaviler patojenitesi yüksek varyasyonların insanda kansere sebep olduğunun açık biçimde tanımlanmasıyla hızla artmıştır. Sinyal yollarının moleküler karakterleri ve anormal büyüme, apoptozis inhibisyonu, hücrel invazyon ve metastaza yol açtıklarının tanımlanması ile birlikte çok sayıda hedeflenmiş antikanser ilaç geliştirilmiştir (Telli ve diğ. 2015).

ER, PR HER-2 (cerb-B2) açısından değerlendirilen olgularda, sistemik bir kemoterapi tedavisinin uygulandığı yönünde bulgular vardır. Birçok çalışmada kombinasyon kemoterapisi ile genel hasta popülasyonunda tedaviye yanıt %30-40 arasındadır. Bu oranlar primer tümörün özelliğine göre değişir. Bu histopatolojik bulgular hastalıksız sağ kalım ve rekürrens grafisi üzerinde de etkilidir. NSABP-27(National surgical adjuvant breast and bowel project) çalışmasında neoadjuvan tedavide dosetakselin(AC) sağkalımı %12'den 26' ya çıkarttığı ortaya konmuştur.

ER, PR ve HER-2 reseptörlerinin pozitifliği saptanan 52 hastada BRCA varyasyonlarının pozitif veya negatif olması neoadjuvan tedaviyi yönlendirmede anlamlı bulunamamıştır. ER, PR ve HER-2 negatifliği saptadığımız 11 hastanın durumunda ise BRCA pozitifliği etkili bulunmuştur. Heather ve ark. poli (ADP-riboz) polimeraz (PARP) inhibitörü veliparib, BRCA1 veya BRCA2 mutasyonlarıyla birlikte lokal tekrarlayan veya metastatik meme kanseri olan hastalarda advers olayları artırmaksızın karboplatin ve paklitaksel kemoterapisine eklendiğinde genel yanıt oranını artırdığını ortaya koymuşlardır.

Klinik çalışmalarda adjuvant kemoterapide ise tümör çapı 0.5-1 cm'nin üzerinde olan hastalarda aksiller lenf nodu pozitif olan tüm hastalara uygulandığı tespit edilmiştir. 50 yaş altındaki premenopozal hastalar, 50 yaşın üzerindeki hastalardan daha fazla yarar gördüğü tespit edilmiştir. Çalışmamızda menapoz yaş ortalamasını 45,5 olan 36 hasta mevcuttur. 14 hasta premenopozal evrededir ve yaş ortalaması 37,4' tür. Aldıkları tedaviler karşılaştırıldığında premenopozal hastalarda sağ kalım oranı daha fazladır. Early Breast Cancer Trialists Cooperative Group (EBCTG) tarafından adjuvant kemoterapi kullanımı randomize klinik çalışmalarının metaanalizleri yapılmaktadır. 29.000 hastada 6 ay süreyle adjuvant çoklu kemoterapi kullanımı yıllık ölüm oranını 50 yaş altındaki hastalarda %38, 50-70 yaş hastalarda %20 oranında azaltmıştır. Adjuvant tedavide antrasiklinler 25 yıldan fazla süredir kullanılmaktadır. Antrasiklin içeren rejimlerini birinci jenerasyon klasik rejimlerden (CMF) gibi daha üstün olduğu gösterilmiştir (Feldman 2011).

Taksanlar da birçok hastada standart tedavi olarak uygulanmaktadır. Taksan grubu kemoterapötiklerin (paklitaksel, dosetaksel) tedaviye eklenmesinin, lenf nodu tutulumu ve hormon reseptör ekspresyonu BRCA pozitifliğe bakılmaksızın hasta gruplarında hastaliksız sağ kalım ve genel sağ kalımı iyileştirdiği gösterilmiştir. Çalışmamızda BRCA pozitif 42 hastada kullanımı mevcuttur. Erken evre meme kanserli hastalarda doksorubisin –siklofosamid (AC) rejimi ile dosetaksel-siklofosamid (DC) rejiminin karşılaştırıldığı randomize bir çalışmada DC rejimi AC rejiminden hastaliksız sağ kalım ve genel sağ kalım açısından daha üstün bulunmuştur (Kurebayashi ve diğ. 2006).

Premenopozal hastalarda adjuvant endokrin tedavide standart tedavi tamoksifendir. Menapozdaki hastalarda hem tamoksifen hem de aromataz inhibitörleri kullanılmaktadır. Tamoksifen östrojen hormonuna bağlanarak etki eder. 2005 yılında EBCTG tarafından

yapılan meta- analiz çalışmalarda 5 yıl tamoksifen tedavisinin yıllık rekürrens hızını %41, ölüm hızını %34 azalttığı gösterilmiştir. BRCA varyasyonu saptadığımız 42 hastada kullanımı tespit edilmiştir. Bu hastaların 11'inde metastatik bulgu saptanırken, 31 hastada saptanmamıştır. Kemoprevansiyonel yöntemlerden biri olan tamoksifen genetik olarak risk altında BRCA patojenik mutasyonu olan presemptomatik bulgulara sahip hastalarda kullanımında önerilmektedir (Phillips K. 2011).

Perou ve arkadaşları tarafından genomik profillemeye dayanarak en az dört temel moleküler alt tip belirlenmiştir. Ailesel BRCA öyküsü ve patojenik mutasyonu olan meme kanserli hastalarda “bazal benzeri” alt tipe daha çok benzeyen bir gen ekspresyon profili gözlenmektedir. Bu sınıflamada, tüm meme kanserlerinin % 10-17'sini oluşturan, genellikle genç yaşta ortaya çıkan, sıklıkla agresif bir seyre sahip ve ER; PR ve HER-2 negatifliği nedeniyle salt kemoterapötiklerle tedavi edilebilen üçlü negatif meme kanseri ilk sırada gelmektedir. Çalışmamızda BRCA patojenik mutasyonlu 50 hastadan 11'i üçlü negatif hastadır. Hastaların yaş ortalaması %37,9'dur. Üçlü negatif hastalarda ortaya çıkan tümörlerin, platin bileşiklerine veya poli (ADP-riboz) polimeraz inhibitörlerine duyarlı oldukları gösterilmiştir. Homolog DNA onarımında BRCA1 / 2 proteinlerinin işlevlerinin artan anlayışıyla BRCA ile ilişkili meme kanseri tümörlerinin belirgin farklılıklar gösterebileceği kabul edilmektedir (Cotter ve diğ. 2012).

Ciara ve ark, Poli (ADP-ribose) polimeraz inhibitörlerinin (PARPi), meme ve yumurtalık kanseri ile ilişkili olan BRCA1/2 germline mutasyonlu (gBRCAm) hastalarda klinik etkiler gösterdiğini belirtmişlerdir. Elde edilen kanıtlar PARP'ın; prostat, akciğer, endometriyal ve pankreas kanserleri gibi DNA hasar onarımı yaklaşımında yetersiz olan kanser tedavileri açısından daha geniş çaplı bir uygulama olduğunu öne sürmektedir. Birkaç PARP inhibitörü, bu solid tümörlerdeki tek faktörlü ya da birleşik tedavi olarak klinik araştırmaları I/II aşamalarında bulunmaktadır. Bu, ilerlemiş solid tümörlerde klinik sonlanımı geliştirmektedir. Bu araştırmacılar burada, prelinik verileri ve PARP inhibitörünün klinik gelişimini değerlendirip ve gBRCAm bağlantılı meme ve yumurtalık kanseri ötesindeki solid tümörlerde söz konusu inhibitörün gelecekteki gelişimini tartışmaktadırlar. PARP inhibitörü tedavisinin kapsamını genişletmek açısından Olaparib, İniparib ve Veliparib gibi türevleri üzerinden Karboplatin/Temozolamid kombinasyonu mevcut kemoterapi tedavisine eklenerek rekürrens riskini azaltmak ve sağ kalımı arttırmak amacı ile klinik araştırmalar sürmektedir (Soley ve Stefan 2011).

Literatürde farklı yöntemlerle, farklı ülkelerde bir çok çalışma yapılmış olup araştırmalardaki hasta gruplarının özellikleri ve kullanılan yöntemlerin duyarlılıkları birbirinden farklıdır. Bu nedenle BRCA-1 ve BRCA-2 gen mutasyonu pozitiflik oranları kullanılan yöntemle, hasta gruplarının özelliklerine ve araştırılan toplumun etnik ve genetik özelliklerine göre farklılık gösterebilmektedir. Meme ve yumurtalık kanserleri ötesinde solid tümörlerde BRCA pozitifliğin hasta fenotipleriyle ilişkili olan moleküler anormallikleri daha çok anlamaya çalışmak, yeni tedavi deneme stratejileri ve ilaç kombinasyonları keşfetmek ve belirleyici biyogöstermeleri tanımlamak hedefe yönelik uygun tedavi kapsamını genişletmek açısından oldukça önemli olduğunu düşünmekteyiz.



BÖLÜM 6: SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmada yer alan 100 hastanın patojenik ve patojenik olmayan mutasyonları yeni nesil dizi analizi ile yapılan çalışmalarının veri tabanından elde edilen sonuçlara göre değerlendirilmiştir.

Saptanan varyasyonlar hastaların demografik, klinikopatolojik ve histopatolojik özelliklerine göre ilişkilendirilmiştir. Elde edilen sonuçların ilerki çalışmalarla genişletilmesiyle BRCA1 ve BRCA2 varyasyonlarının kemoterapi tedavilerinin üzerine olası etkileri artmış olup meme kanseri prognozunda hedefe yönelik tedavilerin gelişmesinde katkıda bulunabileceği sonucuna vardık.



KAYNAKLAR DİZİNİ

- Ahmed M., Rahman N. ATM and breast cancer susceptibility. *Oncogene*. 2006; 25;25(43):5906-11.
- Albert F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1977; 74: 5463-7.
- Atlas Genetic Oncology.2016. Erişim: 03 Mart 2017, <http://atlasgeneticsoncology.org/>.
- Aslan F., Gürkan A. Kadınlarda Meme Kanseri Risk Düzeyi. *Meme Sağlığı Dergisi*. 2007; 3(2):63-68.
- Balci A., Huusko P., Paakkonen K., Launonen V., Uner A., Ekmekci A., Winqvist R. Mutation analysis of BRCA1 and BRCA2 in Turkish cancer families: a novel mutation BRCA2 3414del4 found in male breast cancer. *Eur J Cancer*. 1999; 35(5):707-10
- Beji NK and Reis N: Risk factors for breast cancer in Turkish women: a hospitalbased case-control study. *European Journal of Cancer Care*. 2007; 16: 178-184,
- Bertwistle D, Ashworth A. The pathology of familial breast cancer: How do the functions of BRCA1 and BRCA2 relate to breast tumour pathology? *Breast Cancer Res*. 1999;1(1):41-7.
- Bove B.A., Dunbrack R.L., Godwin A.K. BRCA-1, BRCA-2 and hereditary breast cancer. *Breast Cancer: Prognosis, Treatment and Prevention*.2002; 555-603.
- Cvetkovic D. Early events in ovarian cancer. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 68. 2003
- Clemons M, Goss P. Estrogen and the risk of breast cancer. *N. Engl J. Med*. 2001;344:276
- Cho E., Chen W.Y., Hunter D.J., Stampfer M.J., Colditz G.A., Hankinson S.E., Willett W.C. Red meat intake and risk of breast cancer among premenopausal women. *Arch Intern Med*,.2006; 166: 2253-2259.
- Cotter MB, Pierce A, McGowan PM, Flanagan L, Quinn C, Evoy D, et al. Preclinical evaluation of PARP inhibition in breast cancer: Comparative effectiveness of olaparib and iniparib. *J Clin Oncol*. 2012; 30(suppl):abstract 1042.
- De Vita VT, Hellman Jr S, Rosenberg SA *Cancer Principles and Practise of Oncology, Malign tumors of the breast*. 7th edition, Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia .2005 ; 1415-1477.
- Dereceli Ö. Herediter meme kanserinde BRCA1-BRCA2 genlerinin rolü. Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Kayseri, Yüksek Lisans Tezi, 2013
- Dickson RB, Lipman ME, *Oncogenes and Suppressor Genes In: Disease of the Breast* Ed. Harris JR,

Easton D.F., Ford D., Bishop D.T. Breast and ovarian cancer incidence in BRCA1-mutation carriers. Breast Cancer Linkage Consortium. Am J Hum Genet.1995; 56 (1): 265-71.

Egeli U., Cecener G., Tunca B., Tasdelen I. Novel germline BRCA1 and BRCA2 mutations in Turkish women with breast and/or ovarian cancer and their relatives. Cancer Invest. Sep.2006 24(5):484-91.

Familial breast cancer: collaborative reanalysis of individual data from 52 epidemiological studies including 58,209 women with breast cancer and 101,986 women without the disease. Lancet, 2001;358: 1389

Greenlee RT, Murray T, Bolden S, et al. Cancer statistics 2000. Cancer J Clin 2000;50:7-33.

Ford D, Easton DF, Stratton M, et al. Genetic heterogeneity and penetrance analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in breast cancer families. The Breast Cancer Linkage Consortium. Am J Hum Genet. 1998; 62: 676-89.

Hankinson S.E., Colditz G.A., Manson J.E., Willett W.C., Hunter D.J., Stampfer M.J., Speizer F.E. A prospective study of oral contraceptive use and risk of breast cancer. Cancer Causes Control.1997; 8:65-72.

Hartmann C., John A.L., Klaes R. Large BRCA-1 gene deletions are found in %3 of German high-risk breast cancer families. Human Mutation. 2004; 762: 1-8.

Hennessy BT, Timms KM, Carey MS, et al. Somatic mutations in BRCA1 and BRCA2 could expand the number of patients that benefit from poly (ADP ribose) polymerase inhibitors in ovarian cancer. J Clin Oncol. 2010; 28: 3570-6.

Iyama T, Wilson DM. DNA repair mechanisms in dividing and non-dividing cells. DNA Repair. 2013;12(8):620-36.

Jiang Q, Greenberg Roger A. Deciphering the BRCA1 Tumor Suppressor Network*, JBC Papers in Press, June 5, 2015, DOI 10.1074/jbc.R115.667931

John EM, Kelsey JL. Radiation and other environmental exposures and breast cancer. Epidemiol Rev. 1993; 15:157-162

Koçak S., Çelik L., Özbaş S., Dizbay Sak S., Tükün A., Yalçın B. Meme Kanserinde Risk Faktörleri, Riskin Değerlendirilmesi ve Prevansiyon: İstanbul 2010 Konsensus Raporu. Meme Sağlığı Dergisi. 2011; 7(2):47-67

Klijn J.G.M., Berns P.M.J.J., Schmits P.L.M., Foekens J.A. The Clinical significance of epidermal growth factor receptor (EGF-R) in human breast cancer: a review on 5232 patients. *Endocr Rev.* 1992; 13:3- 17

Kurebayashi J, Yamamoto Y, Kurosumi M, Okubo S, Nomura T, Tanaka K, Sonoo H Loss of BRCA1 expression may predict shorter time-to-progression in metastatic breast cancer patients treated with taxanes. *Anticancer Res.* 2006; 26:695–701

Lenner-Ellis J, Khalouei S., Sopik V., Narod S. Genetic risk assessment and prevention: the role of genetic testing panels in breast cancer, 2015

Linós E., Willett W.C. Diet and breast cancer risk reduction. *J Natl Compr Canc Netw.* 2007; 5: 711-718.

Lord J. C., Ashworth A., RAD51, BRCA2 and DNA repair: a partial resolution. *Nature Structural & Molecular Biology.* 2007; 14, 461 - 462

Ünçel M., Aköz G., Yıldırım Z., Pişkin G., Değirmenci M., Kahraman D., Ayaz D., Akbulut G., Diniz G. Meme kanserinin klinikopatolojik özelliklerinin moleküler alt tipe göre değerlendirilmesi. *Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi Dergisi* 2015; 25(3):151-156

Morrow M, Lippman ME, Hellman S., Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia-New York 1996,

Marchbanks P.A., McDonald J.A., Wilson H.G., Folger S.G., Mandel M.G., Daling J.R., Bernstein L., Malone K.E., Ursin G., Strom B.L., Norman S.A., Wingo P.A., Burkman R.T., Berlin J.A., Simon M.S., Spirtas R., Weiss L.K. Oral contraceptives and the risk of breast cancer. *N Engl J Med.* 2002; 346: 2025-2032

Manguoğlu A.E. Meme ve/veya over kanserli hastalarda BRCA1 ve BRCA2 gen mutasyonlarının taranması. Doktora tezi. 2004

National Cancer Institute ;Steering Committee on Clinical Practice Guidelines for the Care and Treatment of Breast Cancer, 1998; Veronesi, Boyle, Goldhirs. 2009

Nayak T., Jansson T., Sjogren S., Martensson C., Adereasson I., Overview on human breast cancer with focus on prognostic and predictive factors with special attention on the tumour suppressor gene p53. *Acta Oncologica* 35. 1996; (suppl 5):96-102. et al.

Neslihan Carda S, Bilge SA, Öztürk TN: The menopausal age, related factors and climacteric symptoms in Turkish women. *Maturitas.* 1998;30 (1): 37-40,

Newman B, Mu H, Butler LM, Milikan RC, Moorman PG, King MCFrequency of breast cancer attributable to BRCA1 in a population-based series of American women. J Am Med Assoc, . 1998;279:915–921.

Nigg, E.A., “Cyclin-dependent protein kinases: Key regulators of the eukaryotic cell cycle,” Bioessays, 1995;17(6), 471–480.

Ozmen M., Bolkent S., Yılmaz S., Kaner G., Unal H. Detection of c-erbB-2 mRNAs using diglabelled oligonucleotide probe with in situ hybridisation in human breast carcinoma: comparison with immunohistochemical results. Anal Cell Pathol. 1998; 16(4):201-209.

Öztürk M. Meme Kanserinin Genetiği ve Risk Faktörleri. İ. Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri Meme Kanseri Sempozyum Dizisi No: 54, 2006; Aralık, 15 – 26.

Palma M., Ristori E., Ricevuto EBRCA-1 and BRCA-2; The genetic testing and current management options for mutation carriers. Critical Reviews in Oncology / Hematology 57: 1 23. . (2006)

Pazdur R., Lawrence R.C., William J.H. Cancer management: A multidisciplinary Approach. The Oncology Group, 7th edition, New York. 2003;163-187.

PE Applied Biosystems, ABI Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit protocol, 1998.

Perkin E. ABI 310 Genetic Analyzer Manuel. 2000

Peters J.A, Rubinstein W.S. Genetics and The Multidisciplinary Breast Center. Surgical Oncology Clinics of North America, 9(2):367-396. 2000

Phillips KA Tamoxifen may reduce contralateral cancers in BRCA mutation carriers. J Clin Oncol. 2011;Abstract 1500

Pilato B., Martinucci M., Danza K., Pinto R., Petriella D., Lacalamita R., Bruno M., Lambo R., D'Amico C., Paradiso A., Tommasi S. Mutations and polymorphic BRCA variants transmission in breast cancer familial members. Breast Cancer Res Treat. Feb. 2011; 125(3):651-7

Robert L, Nusbaum MD, Roderick R, McInnes MD, Huntington F, Willard Phd. Thompson & Thompson Tıbbi Genetik. (6. Baskı). Ankara: Güneş Kitabevi; 2005.)

Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T., Molecular Cloning, a laboratory manual. Cold spring harbor laboratory Press New York. 2001

Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1977;74: 5463–5467.

Silva OE, Zurrída S: Meme kanseri uygulama kılavuzu (Çev. V. Çelik) İstanbul, Üçüncü baskı, 2007, s 26-27/ s 102-105.

Soley B., Stefan G., Systemic therapy options in BRCA mutation-associated breast cancer .Breast Cancer Res Treat . 2012; 135:355–366 DOI 10.1007/s10549-012-2158-6.

Suzuki R., Ye W., Rylander-Rudqvist T., Saji S., Colditz G.A., Wolk A. Alcohol and postmenopausal breast cancer risk defined by estrogen and progesterone receptor status: a prospective cohort study. J Natl Cancer Inst. 2005; 97: 1601-1608.

Saxena S., Chakraborty A., Kaushal M., Kotwal S., Bhatanager D., Mohil R.S., Chintamani C., Aggarwal A.K., Sharma V.K., Sharma P.C., Lenoir G., Goldgar D.E., Szabo C.I. Contribution of germline BRCA1 and BRCA2 sequence alterations to breast cancer in Northern India. BMC Med Genet. 2006;Oct 4;7:75.

Taylor E.F., Burley V.J., Greenwood D.C., Cade J.E. Meat consumption and risk of breast cancer in the UK Women's Cohort Study. Br J Cancer, 2007; .96:1139-1146.

Telli ML, Timms K, Reid JE, et al. Combined Homologous Recombination Deficiency (HRD) scores and response to neoadjuvant platinum-based chemotherapy in triple-negative and/or BRCA1/2 mutation-associated breast cancer. ASCO.2015.

Terry M.B., Zhang F.F., Kabat G., Britton J.A., Teitelbaum S.L., Neugut A.I., Gammon M.D. Lifetime alcohol intake and breast cancer risk. Ann Epidemiol. 2006;16: 230-240.

Topuz, E. Meme Kanseri.. 16, 21, 23, 29, 129, 130. Birinci Baskı, İstanbul Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Yayınları, İstanbul. 1997

Tuncer M. Significance of cancer in Turkey, the burden of disease and cancer control policies, In: Tuncer M., eds. Cancer Control in Turkey, Ankara, Onur Press, Health Ministry Publication. 2008;74: 5-9.

Urban N. Specific Keynote: Ovarian Cancer Risk Assessment and the Potential for Early Detection. Gynecologic Oncology. 2003; 88:75-79.

Ünal H., Meme Kanserinin Tanı ve Tedavisinin Tarihsel Gelişimi, Meme Kanseri Sempozyum Dizisi No:54, İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri, Aralık 2006

Ünçel M., Aköz G., Yıldırım Z., Pişkin G., Değirmenci M., Kahraman D., Ayaz D., Akbulut G., Diniz G. Meme kanserinin klinikopatolojik özelliklerinin moleküler alt tipe göre değerlendirilmesi. Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi Dergisi 2015; 25(3):151-156

Victor G, Vogel MD: Epidemiology, genetics and risk evaluation of postmenopausal women at risk of breast cancer. Menopause. 2008;15: 782-789.

Yang, X., Lippman, M.E.. BRCA1 and BRCA2 in breast cancer. Breast Cancer Research and Treatment. 1999;4:1-10.

Yazici H., Glendon G., Yazici H., Burnie S.J., Saip P., Buyru F., Bengisu E., Andrulis I.L., Dalay N., Ozcelik H. BRCA1 and BRCA2 mutations in Turkish familial and non-familial ovarian cancer patients: a high incidence of mutations in non-familial cases. Hum Mutat. 2002; 20(1):28-34.

Warner E., Foulkes W., Goodwin P. Prevalence and penetrance of BRCA1 and BRCA2 gene mutations in unselected Ashkenazi Jewish women with breast cancer. Journal of National Cancer Institute. 1999

Whittaker J.L., Walker R.A., Varley J.M. Differential expression of cellular oncogenes in benign and malignant human breast tissue. Int J Cancer. 1986; 38:651-655.

ÖZGEÇMİŞ

1. BİREYSEL BİLGİLER

Adı Soyadı: Merve GÖKBAYRAK

Doğum Yeri ve Tarihi: 09.09.1988-Karamürsel

Uyruğu: TC

Medeni Durumu: Evli

İletişim Adresi ve Telefonu: Barbaros Mah. Turgut Özal Cad. A:blok No:32/1

Başiskele/Kocaeli

Tel: 0541 658 36 41

2. EĞİTİM DURUMU

2008-2013: Kocaeli Üniversitesi Biyoloji Bölümü

2002-2006:Karamürsel Anadolu Lisesi

STAJLAR

2013: Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

2011: Lütfi Kırdar Eğitim ve Araştırma Hastanesi Patoloji Anabilim Dalı

YABANCI DİL

İngilizce

3. ÜNVANLARI

2013- : Biyolog

4. MESLEKİ DENEYİMİ

- Kan ve doku örneklerinden RNA- DNA izolasyonu
- Thermal cyclers' da pcr uygulamaları
- ABI 3130-3500 cihazlarında sanger sekans analizi
- Light cyclers cihazında real time pcr uygulamaları
- Yeni nesil dizi analizi ile tüm gen tarama
- STR bölgelerinde fragment analizi

5. BİLİMSEL ETKİNLİKLER

“SCI expanded” dergilerde yayımlanan çalışmalar:

1.Esen Gumuslu, Naci Cine, Merve Ertan Gökbayrak, Oguz Mutlu, Ipek Komsuoglu Celikyurt, Guner Ulak. Exenatide Alters Gene Expression of Neural Cell Adhesion Molecule (NCAM), Intercellular Cell Adhesion Molecule (ICAM), and Vascular Cell Adhesion Molecule (VCAM) in the Hippocampus of Type 2 Diabetic Model Mice. Med Sci Monit, 22:2664-9. (2016).

2.Guner Ulak, Esen Gumuslu, Oguz Mutlu, Merve E.Gökbayrak, Ipek Komsuoglu Celikyurt, Furuzan Akar, Faruk Erden. Haloperidol exerts depression-like behaviour in the forced swimming test while it has anxiolytic-like and analgesic effects in the elevated plus maze and hot plate tests: Altered gen expression levels of FGF2, synapsin and NGF in the hippocampus of mice. International Journal of Neuropsychopharmacology; PM434; 19(1):207-207. (2016).

3.Guner Ulak, Esen Gumuslu, Oguz Mutlu, Merve Ertan, Ipek Komsuoglu Celikyurt, Furuzan Akar, Faruk Erden. Effects of olanzapine, clozapine, risperidone and sertindole on FGF2, synapsin and NGF expression in the hippocampus of naive mice. International Journal of Neuropsychopharmacology; PM450; 19(1):212-213. (2016).

“Pubmed” kapsamındaki dergilerde yayımlanan çalışmalar:

1.Esen Gumuslu, Oguz Mutlu, Ipek Komsuoglu Celikyurt, Guner Ulak, Furuzan Akar, Faruk Erden, Merve Ertan. Exenatide enhances cognitive performance and upregulates neurotrophic factor gene expression levels in diabetic mice. Fundam Clin Pharmacol, 30(4):376-84 (2016).

2.Esen Gumuslu, Naci Cine, Merve Ertan Gökbayrak, Oguz Mutlu, Ipek Komsuoglu Celikyurt, Guner Ulak. Exenatide Alters Gene Expression of Neural Cell Adhesion Molecule (NCAM), Intercellular Cell Adhesion Molecule (ICAM), and Vascular Cell Adhesion Molecule (VCAM) in the Hippocampus of Type 2 Diabetic Model Mice. Med Sci Monit, 22:2664-9 (2016).

EK 1: Kullanılan Anamnez Formu:

Ad-Soyad:		Tarih:	
Ön Tanı:		Dosya No:	
Yaş:		DNA-RNA No:	
Doğum Yeri-Köken:		Adres:	
Mesleği:		Gönderen Dr.:	
Evlilik Süresi:		Tel:	
Eşyle Akrabalık:			

Tanı yaşı:.....Evllenme yaşı ;..... Kürtaj sayısı ;.....Yaşayan çocuk sayısı ;.....
Düşük sayısı ;..... ilk doğum yaşı ;.....ilk gebelik yaşı ;.....

Hiç emzirmediğim () Ortalama 2 - 3 ay () Ortalama 3 – 8 ay () Ortalama 8 ay üstü () İlk adet yaşıınız?
;.....

Adet durumu?

Her ay düzenli () Düzensiz () Diğer ;.....

Oral kontraseptif kullanımı:

Hayır () Evet (), ise süresi ;.....

Menopoz yaşı ;.....

ŞİKAYETLER

Meme ağrısı () Memede kitle () Memede kızarıklık () Kol ağrısı () Meme başı akıntısı () Memede iyileşmeyen yara () Adet ağrısı ()

Diğer ;.....

LABORATUVAR									
HCT:		Hb:		MCV:		MCH:		Hb elek-HbA2:	
Lökosit:		PDW:		Lenfosit:		Monosit:		Hb elek-HbF:	
RDW:		LDH:		CRP:		Trombosit:		Hb elek-HbA0:	

ALIŞKANLIKLAR	
Sigara	
Alkol	
Kullandığı ilaç:	

Hastalığın aileselliği: