



T.C
CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

WNT ANTAGONİSTİ GEN POLİMORFİZMLERİ VE MEME KANSERİ
ARASINDAKİ İLİŞKİNİN ARAŞTIRILMASI

GONCA DÖNMEZ

DOKTORA TEZİ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

SİVAS
2014

WNT ANTAGONİSTİ GEN POLİMORFİZMLERİ VE MEME KANSERİ
ARASINDAKİ İLİŞKİNİN ARAŞTIRILMASI

GONCA DÖNMEZ

DOKTORA TEZİ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
2014

T.C
CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

WNT ANTAGONİSTİ GEN POLİMORFİZMLERİ VE MEME KANSERİ
ARASINDAKİ İLİŞKİNİN ARAŞTIRILMASI

GONCA DÖNMEZ

DOKTORA TEZİ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. ALİ FAZIL YENİDÜNYA

SİVAS
2014

Bu tez Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanmış ve jürimiz tarafından Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan Prof. Dr. Hamiyet DÖNMEZ ALTUNTAŞ

Üye (Danışman) Prof. Dr. Ali Fazıl YENİDÜNYA

Üye Prof. Dr. Yusuf TUTAR

Üye Doç. Dr. Serdal ARSLAN

Üye Yrd. Doç. Dr. İzzet YELKOVAN

ONAY

Bu tez çalışması, 24.01.2014 tarihinde Sağlık Bilimleri Enstitüsü yönetim kurulu tarafından belirlenen ve yukarıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından kabul edilmiştir.

Prof. Dr. ALİ ÇELİKSÖZ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MÜDÜRÜ

Bu tez Cumhuriyet Üniversitesi senatosu'nun 24.09.2008 tarihli ve 007 sayılı toplantısında kabul edilen Sağlık Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Tez Yazım Kılavuzu adlı yönergeye göre hazırlanmıştır.

CANIM AILEM'E...

ÖZET

WNT ANTAGONİSTİ GEN POLİMORFİZMLERİ VE MEME KANSERİ ARASINDAKİ İLİŞKİNİN ARAŞTIRILMASI

Gonca DÖNMEZ

Doktora Tezi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ali Fazıl YENİDÜNYA

2014, 112 sayfa

Çalışmamızda *DKK3* nonsinonim ekzon 7 Arg335Gly, *DKK3* intron 4 G/C, *DKK4* sinonim ekzon 4 V169V ve *sFRP4* nonsinonim ekzon 6 R340K polimorfizmlerinin meme kanseri gelişiminde risk oluşturup oluşturmadığının araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmada meme kanseri tanısı konmuş 100 kadın hasta ve 100 sağlıklı kadın kontrol araştırılmıştır.

DKK3 nonsinonim ekzon 7 Arg335Gly, *DKK3* intron 4 G/C, *DKK4* sinonim ekzon 4 V169V ve *sFRP4* nonsinonim ekzon 6 R340K polimorfizmlerinin genotiplendirilmesi, izole edilen DNA'lar kullanılarak PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction ve Restriction Fragment Length Polymorphism) yöntemleri ile gerçekleştirilmiştir.

χ^2 testi kullanılarak yapılan istatistiksel analizde, *DKK3* nonsinonim ekzon 7 Arg335Gly, *DKK3* intron 4 G/C ve *sFRP4* nonsinonim ekzon 6 R340K polimorfizimlerinin dağılımı açısından hasta ve kontrol grubu arasından anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0.05$).

Bununla beraber, *DKK4* sinonim ekzon 4 V169V polimorfizmi dağılımının hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı olarak farklı olduğu gözlemlenmiştir ($p<0.05$). Ayrıca *Forward Stepwise* lojistik regresyon analizi kullanılarak yapılan istatistiksel analizde CC genotipine sahip bireylerin, CT ve TT genotipine sahip bireylere göre meme kanseri geliştirme riskinin 16 kez daha fazla olduğu bulunmuştur ($p<0.05$) (OR, 16,38; %95 CI, (6,37-42,12)). Buna ek olarak vücut kitle indeksi ve *sFRP4* nonsinonim ekzon 6 R340K genotip farklılıklarının meme kanseri gelişiminde risk faktörü olduklarını *Forward Stepwise* lojistik regresyon analizi ile belirledik.

Çalışmamızda bu polimorfizmler ve klinikopatolojik veriler arasında ilişki olup olmadığı değerlendirilmiştir. İstatistiksel analiz sonucunda, *DKK3* nonsinonim ekzon 7 Arg335Gly polimorfizminin uzak metastaz oluşumuna etkisi olduğunu belirledik.

Anahtar kelimeler: Meme kanseri, Wnt antagonistleri, *DKK3*, *DKK4*, *sFRP4*, polimorfizm

ABSTRACT

INVESTIGATION OF RELATIONSHIP BETWEEN WNT ANTAGONIST GENE POLYMORPHISMS AND BREAST CANCER

Gonca DÖNMEZ

PhD Thesis, Department of Medical Biology

Supervisor: Prof. Dr. Ali Fazıl YENİDÜNYA

2014, 112 pages

In our study, we aimed to investigate whether *DKK3* nonsynonymous exon 7 Arg335Gly, *DKK3* intron 4 G/C, *DKK4* synonymous exon 4 V169V and *sFRP4* nonsynonymous exon 6 R340K polymorphisms are risk factors of breast cancer development. In this study, 100 female patients with breast cancer and 100 healthy females as a control group were examined.

Genotyping of *DKK3* nonsynonymous exon 7 Arg335Gly, *DKK3* intron 4 G/C, *DKK4* synonymous exon 4 V169V and *sFRP4* nonsynonymous exon 6 R340K polymorphisms had been performed by PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction ve Restriction Fragment Length Polymorphism) methods using isolated DNA.

In statistical analysis using χ^2 test, we observed that there was no significant difference between case and control groups for distribution of *DKK3* nonsynonymous exon 7 Arg335Gly and *DKK3* intron 4 G/C polymorphisms ($p>0.05$).

On the other hand, distribution of *DKK4* synonymous exon 4 V169V polymorphism between case and control groups was significantly different ($p<0.05$). Using *Forward Stepwise* logistic regression analysis, we also found that individuals with CC genotype have 16 times more risk for breast cancer development than individuals with CT and TT genotypes ($p<0.05$) (OR, 16,38; 95% CI, (6,37-42,12)). In addition using *Forward Stepwise* logistic regression analysis we determined that body mass index and *sFRP4* nonsynonymous exon 6 R340K genotype differences have been identified as a risk factors in the development of breast cancer.

In our study, the relation between these polymorphisms and clinicopathologic data was evaluated. As a result of statistical analysis, we determined that there was a

significant effect of *DKK3* nonsynonymous exon 7 Arg335Gly polymorphism on distant metastasis.

Key words: Breast cancer, Wnt antagonists, *DKK3*, *DKK4*, *sFRP4*, polymorphism

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince verdiği destek ve önerilerle bana iyi bir rehber olan değerli hocam Prof. Dr. Ali Fazıl Yenidünya'ya gösterdiği sabır ve anlayıştan dolayı teşekkür ederim.

Doktora ders süreci boyunca bilgi birikimlerinden yararlandığım Tıbbi Biyoloji A.D. öğretim elemanlarından Prof. Dr. Ergün Pınarbaşı ve Yrd. Doç. Dr. İzzet Yelkovan'a, ayrıca katkılarından dolayı Biyoistatistik A.D. öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Ziyet Çınar'a teşekkür ederim.

Çalışmalarımın her aşamasında bana yardımcı olan, beraber çalışmaktan her zaman mutlu olduğum, çıkmaza girdiğim zamanlarda benden desteğini esirgemeyen can dostum Meral Yılmaz'a, önerileri her zaman benim için önemli olan, hayatımın vazgeçilmezleri arasında yer alan can dostum Erkan Gümüş'e, verdikleri manevi destekten dolayı can arkadaşlarım İsmail Sarı ve Ayça Taş'a, yüreklerindeki güzel sevgiyi benden esirgemeyen ve her zaman yanımda olacaklarına inandığım can dostlarım Esra Derkuş ve M. Ulaş Tatlıdil'e teşekkür ederim.

Desteğini, sevgisini ve yüreğini benden esirgemeyen ve tüm açmazlarımda yanımda olan Tolga Arat'a varlığından dolayı teşekkür ederim.

Hayatımın her aşamasında benim için iyi birer model olan, tüm sıkıntılarımı paylaşan, zorluklarla nasıl savaşağımı bana öğreten, sevgilerini her zaman yürekten hissettiğim canım annem ve babam, Sebahat ve Mehmet Dönmez'e ve canım ağabeyim Burçin Dönmez'e candan teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
KISALTMALAR DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Meme Anatomisi	3
2.2. Meme Kanseri	4
2.2.1. Meme Kanserinin Epidemiyolojisi	5
2.2.2. Meme Kanserine Yakalanmada Etkisi Olan Risk Faktörleri	6
2.2.2.1. Yaş	6
2.2.2.2. Kişisel meme kanseri öyküsü	6
2.2.2.3. Fertil çağı süresi	6
2.2.2.4. Doğurganlık öyküsü	7
2.2.2.5. Sosyo-ekonomik düzey	7
2.2.2.6. Östrojen alınması ve doğum kontrol hapı kullanımı	7
2.2.2.7. Alkol ve sigara kullanımı	7
2.2.2.8. Obezite	7
2.2.2.9. Hormonal faktörler	8
2.2.2.10. Radyasyona maruz kalma	8
2.2.2.11. Genetik yatkınlık	9
2.2.3. Meme Kanserinin Histopatolojisi	10
2.2.3.1. Lobüler karsinoma in situ (LCIS)	11
2.2.3.2. Duktal karsinoma in situ (DCIS)	11
2.2.3.3. İnvazif meme kanseri	11
2.2.4. Meme Kanserinin Moleküler Sınıflandırması	12
2.2.5. Meme Kanserinde Evreleme	12
2.2.6. Meme Kanseri Genetiği ve Moleküler Faktörler	14
2.2.7. Meme Kanserinde Tanı ve Tedavi	15
2.2.8. Wnt Sinyal İletim Yolağı	17
2.2.9. Wnt Sinyal İletim Yolağı Antagonistleri	19
2.2.9.1. sFRP (Secreted Frizzled-Related Protein) Ailesi	20
2.2.9.2. Dkk (Dickkopf) Ailesi	21
2.3. Polimorfizm ve Tanımı	23
2.3.1. Tek nükleotid polimorfizmi (SNP)	23
2.3.2. Genetik Polimorfizmin Saptanmasında Kullanılan Yöntemler	24
2.3.2.1. Nested-PCR	24
2.3.2.2. Resriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi (RFLP)	24
3. GEREÇ VE YÖNTEM	26
3.1. Kullanılan cihazlar	26
3.2. Kullanılan plastik malzemeler	26

3.3.	Kullanılan kimyasal malzemeler	27
3.4.	Kullanılan solüsyonlar ve tamponlar	38
3.4.1.	TE tamponu	28
3.4.2.	10 M Amonyum asetat solüsyonu	28
3.4.3.	%10 SDS solüsyonu	28
3.4.4.	<i>Nuclei lysis</i> tamponu	28
3.4.5.	TAE tamponu	28
3.4.6.	Yükleme tamponu	28
3.4.7.	dNTP çalışma solüsyonu	28
3.4.8.	Primer stoklarının hazırlanması	29
3.5.	Çalışma grubu	29
3.5.1.	Hasta grubu	29
3.5.2.	Kontrol grubu	29
3.6.	Örneklerin alınması	30
3.7.	Kan örneklerinden DNA eldesi	30
3.8.	Genotipleme	31
3.8.1.	Restriksiyon enzimleri ile yapılan tepkime karışımlarının hazırlanması	32
3.9.	Jel elektroforezi	38
3.9.1.	Agaroz jelin hazırlanması	38
3.9.2.	Agaroz jelde PCR ve RFLP ürünlerinin koşturulması	38
4.	İSTATİSTİKSEL ANALİZ	39
5.	BULGULAR	40
5.1.	Hasta ve kontrol grubunda yer alan bireylerin demografik özelliklerinin değerlendirilmesi	41
5.2.	Meme kanseri hastalarında klinikopatolojik verilerin dağılımı	42
5.3.	Polimorfizmlerin PCR ve RFLP yöntemi ile değerlendirilmesi	43
5.3.1.	<i>DKK3</i> nonsinonim ekzon 7 Arg335Gly polimorfizmi	43
5.3.2.	<i>DKK3</i> intron 4 G/C polimorfizmi	44
5.3.3.	<i>DKK4</i> sinonim ekzon 4 V169V polimorfizmi	44
5.3.4.	<i>sFRP4</i> nonsinonim ekzon 6 R340K polimorfizmi	44
5.4.	Genotip dağılımlarının istatistiksel değerlendirmesi	45
5.4.1.	<i>DKK3</i> nonsinonim ekzon 7 Arg335Gly polimorfizmi için	45
5.4.2.	<i>DKK3</i> intron 4 G/C polimorfizmi için	46
5.4.3.	<i>DKK4</i> sinonim ekzon 4 V169V polimorfizmi için	47
5.4.4.	<i>sFRP4</i> nonsinonim ekzon 6 R340K polimorfizmi için	48
5.5.	Genotip dağılımlarının klinikopatolojik parametreler ile karşılaştırılması	49
5.5.1.	<i>DKK3</i> nonsinonim ekzon 7 Arg335Gly polimorfizminin klinikopatolojik faktörler üzerine etkisi	49
5.5.2.	<i>DKK3</i> intron 4 G/C polimorfizminin klinikopatolojik faktörler üzerine etkisi	52
5.5.3.	<i>DKK4</i> sinonim ekzon 4 V169V polimorfizminin klinikopatolojik faktörler üzerine etkisi	54
5.5.4.	<i>sFRP4</i> nonsinonim ekzon 6 R340K polimorfizminin klinikopatolojik faktörler üzerine etkisi	57

5.6	Meme kanserine etki eden değişkenlerin değerlendirilmesi	60
6.	TARTIŞMA	61
7.	SONUÇLAR	70
8.	KAYNAKLAR	72
9.	ÖZGEÇMİŞ	86
10.	EKLER	87
10.1.	Ek-1: Etik kurul kararı	87
10.2.	Ek-2: Bilgilendirilmiş olur formu	90
10.3.	Ek-3: Meme kanseri tanısı ile takip edilen hastalara ait takip formu	93
10.4.	Ek-4: Kontrol grubu takip formu	94

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1	Meme anatomisi	4
Şekil 2.2	Meme tümörlerinin histopatolojik sınıflandırması	10
Şekil 2.3	Meme kanserinde 2002 yılı TNM sınıflandırması ve evreleme sistemi	13
Şekil 2.4	<i>Canonical</i> ve <i>noncanonical</i> Wnt sinyal iletim yolları (Wnt yokluğunda ve varlığında)	17
Şekil 2.5	Wnt sinyal iletim yolağının antagonistler tarafından düzenlenmesi	20
Şekil 2.6	sFRP ve Frizzled proteinlerinin CRD akrabalığı	21
Şekil 2.7	Dickkopf proteinlerinin domain yapısı	21
Şekil 2.8	Dkk ve kolipaz proteinlerinin yapısal benzerliği	22
Şekil 5.1	<i>DKK3</i> nonsinonim ekzon 7 Arg335Gly, <i>DKK3</i> intron 4 G/C, <i>DKK4</i> sinonim ekzon 4 V169V ve <i>sFRP4</i> nonsinonim ekzon 6 R340K polimorfizmlerinin RFLP sonuçlarının agaroz jelde görüntülenmesi	45

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1	Gen polimorfizmleri için 1.PCR ve 2. PCR tepkime karışımı	33
Çizelge 3.2	Gen polimorfizmleri için 1. PCR tepkime koşulları	34
Çizelge 3.3	Gen polimorfizmleri için 2. PCR tepkime koşulları	35
Çizelge 3.4	PCR tepkimesinde kullanılan primer dizileri, primerlerin yapışma sıcaklıkları ve DNA parça uzunluklarının gösterimi.	36
Çizelge 3.5	RFLP yönteminde kullanılan restriksiyon endonükleazlar ve RFLP sonrası DNA parça uzunluklarının gösterimi	37
Çizelge 5.1	Hasta ve kontrol grubuna ait demografik özelliklerinin karşılaştırılması	41
Çizelge 5.2	Meme kanseri hastalarında tümör derecelerinin dağılımı	42
Çizelge 5.3	Meme kanseri hastalarında bölgesel lenf nodu dağılımı	42
Çizelge 5.4	Meme kanseri hastalarında uzak metastaz dağılımı	43
Çizelge 5.5	Meme kanseri hastalarında histolojik grad dağılımı	43
Çizelge 5.6	<i>DKK3</i> nonsinonim ekzon 7 Arg335Gly polimorfizmi için hasta ve kontrol grubuna ait genotip, allel sıklıkları ve OR değerleri	46
Çizelge 5.7	<i>DKK3</i> intron 4 G/C polimorfizmi için hasta ve kontrol grubuna ait genotip, allel sıklıkları ve OR değerleri	47
Çizelge 5.8	<i>DKK4</i> sinonim ekzon 4 V169V polimorfizmi için hasta ve kontrol grubuna ait genotip, allel sıklıkları ve OR değerleri	48
Çizelge 5.9	<i>sFRP4</i> nonsinonim ekzon 6 R340K polimorfizmi için hasta ve kontrol grubuna ait genotip, allel sıklıkları ve OR değerleri	49
Çizelge 5.10	<i>DKK3</i> nonsinonim ekzon 7 Arg335Gly polimorfizminin histolojik grad üzerine etkisi	50
Çizelge 5.11	<i>DKK3</i> nonsinonim ekzon 7 Arg335Gly polimorfizminin primer tümör üzerine etkisi	50
Çizelge 5.12	<i>DKK3</i> nonsinonim ekzon 7 Arg335Gly polimorfizminin lenf nodül tutulumu üzerine etkisi	51
Çizelge 5.13	<i>DKK3</i> nonsinonim ekzon 7 Arg335Gly polimorfizminin metastaz durumu üzerine etkisi	52
Çizelge 5.14	<i>DKK3</i> intron 4 G/C polimorfizminin histolojik grad üzerine etkisi	52
Çizelge 5.15	<i>DKK3</i> intron 4 G/C polimorfizminin primer tümör üzerine etkisi	53
Çizelge 5.16	<i>DKK3</i> intron 4 G/C polimorfizminin lenf nodül tutulumu üzerine etkisi	53
Çizelge 5.17	<i>DKK3</i> intron 4 G/C polimorfizminin metastaz durumu üzerine etkisi	54
Çizelge 5.18	<i>DKK4</i> sinonim ekzon 4 V169V polimorfizminin histolojik grad üzerine etkisi	55
Çizelge 5.19	<i>DKK4</i> sinonim ekzon 4 V169V polimorfizminin primer tümör üzerine etkisi	55
Çizelge 5.20	<i>DKK4</i> sinonim ekzon 4 V169V polimorfizminin lenf nodül tutulumu üzerine etkisi	56

Çizelge 5.21	<i>DKK4</i> sinonim ekzon 4 V169V polimorfizminin metastaz durumu üzerine etkisi	56
Çizelge 5.22	<i>sFRP4</i> nonsinonim ekzon 6 R340K polimorfizminin histolojik grad üzerine etkisi	57
Çizelge 5.23	<i>sFRP4</i> nonsinonim ekzon 6 R340K polimorfizminin primer tümör üzerine etkisi	58
Çizelge 5.24	<i>sFRP4</i> nonsinonim ekzon 6 R340K polimorfizminin lenf nodül tutulumu üzerine etkisi	59
Çizelge 5.25	<i>sFRP4</i> nonsinonim ekzon 6 R340K polimorfizminin metastaz durumu üzerine etkisi	59
Çizelge 5.26	Meme kanserine etki eden değişkenler	60

KISALTMALAR DİZİNİ

ABD	Amerika Birleşik Devletleri
APC	Adenomatous Polyposis Coli
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated
BRCA	Breast Cancer
COMT	Catechol- <i>O</i> -methyltransferase
CRD	Cysteine-Rich Domain
CÜTFAM	Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Merkezi
CYP	Cytochromes P450
Cys	Cysteine
DCIS	Duktal karsinoma <i>in situ</i>
DKK	Dickkopf
DNA	Deoxyribonucleic acid
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EGF	Epidermal growth factor
ER	Estrogen receptor
GSTP	Glutathione S-transferase P
HER	Human epidermal growth factor receptor
Hsp	Heat shock protein
IARC	International Agency for Research on Cancer
LCIS	Lobüler karsinoma <i>in situ</i>
LEF-1	Lymphoid enhancer-binding factor-1
LRP	Lipoprotein receptor-related protein
µl	Mikrolitre
ml	Mililitre
mM	Milimolar
MTHFR	Methylenetetrahydrofolate reductase
NTR	Netrin
OR	Risk oranı (Odds ratio)
P53	Protein 53
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu (Polimerase chain reaction)
PgR	Progesterone receptor
pmol	Picomol
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
RFLP	Resriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi (Resriktion fragment length polimorphism)
sFRP	Secreted frizzled-related protein
SNP	Single Nucleotide Polymorphism (Tek Nükleotid Polimorfizmi)
TAE	Tris bazı, Asetik asit, EDTA
TNF- α	Tümör nekrozis faktör alfa
TNM	<u>T</u> umour, <u>l</u> ymph <u>N</u> odes, <u>M</u> etastases
Wif 1	Wnt inhibitory factor 1
WHO	World Health Organization
UV	Ultraviyole
VKI	Vücut Kitle İndeksi

1. GİRİŞ

Dünyada meme kanseri, kadınlarda görülen kanser türleri arasında birinci sırada yer alırken, kanser nedeni ölümlerde akciğer kanserinden sonra ikinci sıklıkta yer almaktadır. Ülkemizde ise kadınlarda görülen kanser türleri arasında %24,96 orana sahip olup birinci sırada bulunmaktadır. Meme kanseri risk faktörleri arasında cinsiyet, yaş, ailesel ve genetik faktörler, memede daha önceden kanser ya da atipik hiperplazi olması, ırk, radyasyona maruz kalma, menarşın 12 yaşın altında, menopozun 55 yaşın üzerinde başlaması yer almaktadır. Bununla beraber, hiç doğum yapmama veya 30 yaş sonrası gebelik, over aktivitesi, oral kontraseptif kullanma, menapoz sonrası dönemde hormon replasman tedavisi görme, laktasyon, alkol kullanımı, obezite ve yağlı diyet, fiziksel aktivite meme kanseri ile ilgili olduğu düşünülen diğer risk faktörleri arasında yer almaktadırlar. (1).

Kanser gelişimi; hücre gelişimi ve devamlılığını kontrol eden ve normal embriyonik gelişimde önemli roller oynayan sinyal iletim yollarının anormal aktivasyonuna bağlıdır. Omurgalı ve omurgasız embriyo gelişiminde tanımlanmış olan Wnt sinyal iletim yolağının da farklı tümör tiplerinin gelişimi ile ilişkili olduğu bilinmektedir (2). Wnt antagonistleri, Wnt sinyal iletimini modüle eden proteinlerdir ve ekstraselüler Wnt antagonisti olarak bilinen beş protein ailesi bulunmaktadır (sFRP (the secreted frizzled-related protein), Wif1 (Wnt inhibitory factor 1), Xenopus Cerberus, Wise ve Dkk (Dickkopf) protein aileleri). Bu proteinler direkt Wnt ligandına bağlanarak ya da Wnt reseptör kompleks bileşenine bağlanarak Wnt sinyal iletimini inhibe etmektedirler (3,4).

sFRP ve Dkk ailesi üyelerinin çeşitli kanser türlerinde epigenetik inaktivasyonla gen ekspresyonlarında azalma olduğu belirlenmiştir (5,6,7). Ayrıca Wnt-ilişkili genlerin epigenetik susturulması meme kanserinde de araştırılmıştır (8).

Günümüzde Wnt antagonisti genlerde bulunan polimorfizmlerin meme kanseri ile ilişkileri üzerine henüz bir araştırma rapor edilmemiştir. Wnt sinyal iletim yolağı genlerindeki anormal aktivasyonlar kanser gelişiminde etkin olmaktadır. Wnt antagonistlerinin bu yolağı inhibe ettiği bilinmektedir ve dolayısı ile bu antagonistlerin gen polimorfizmlerinin meme kanseri için risk faktörü olup olmadığının araştırılması açısından çalışmamız önem kazanmaktadır. Ayrıca meme kanseri etiyojisinin aydınlatılması, kemoterapiye cevabın öngörülmesi, bireylerin ilaçlara duyarlılığı ve

bireysel tedavi seçeneklerinin geliştirilebilmesi açısından tek nükleotid polimorfizmlerinin araştırılması önem taşımaktadır.

Çalışmamızda, Wnt antagonistleri gen polimorfizmlerinin (*DKK3* nonsinonim ekzon 7 Arg335Gly, *DKK3* intron 4 G/C, *DKK4* sinonim ekzon 4 V169V, *sFRP4* nonsinonim ekzon 6 R340K) meme kanseri gelişiminde ve/veya metastaz oluşumunda bir risk faktörü oluşturup oluşturmadığını araştırdık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Meme Anatomisi

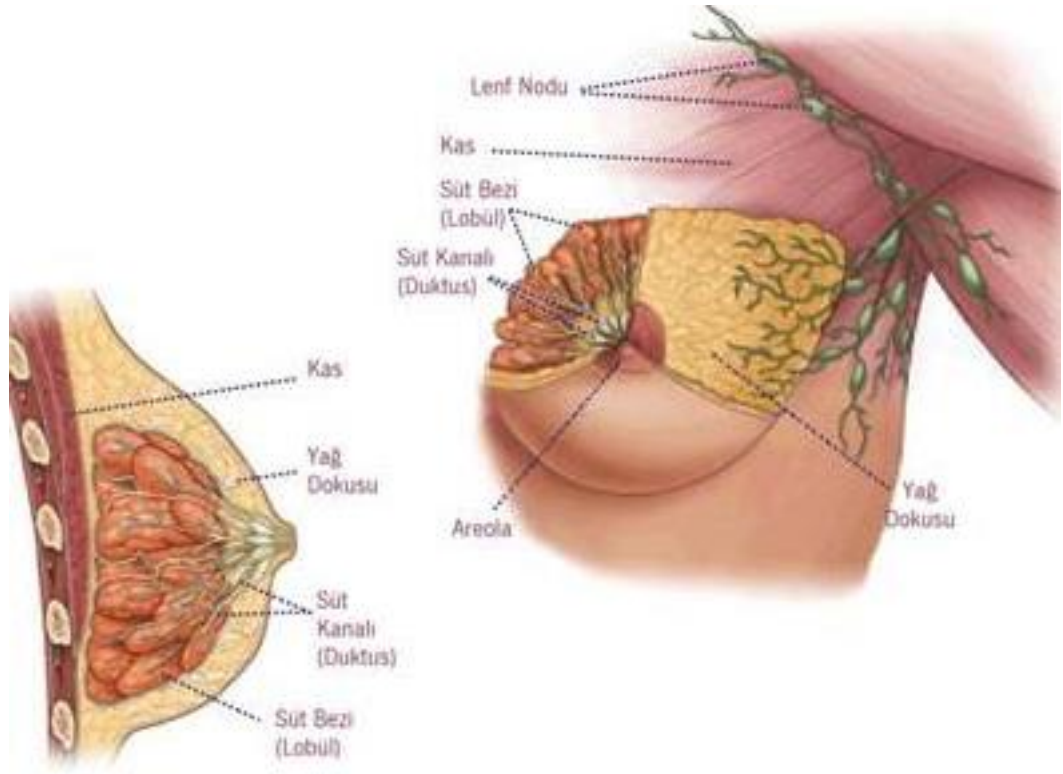
Vücut ter bezlerinden türemiş olan meme bezi özelleşmiş bir apokrin bezdir (9,10). Meme dokusu epitelyal parankim, kas, yağ ve bağ dokusu, lenf ve sinir sisteminden oluşur (11).

Erişkin kadınlarda meme bezi ön göğüs duvarının pektoral fasyasının yüzeysel ve derin tabakaları arasında bulunur ve 2. ile 7. kaburgalar arasında yerleşmiştir. Meme çapı yaklaşık olarak 10-12 cm.'dir ve merkezi bölgede en fazla 5-7 cm kalınlığındadır. Laktasyonda olmayan bir memenin ağırlığı 150-200 gram iken, laktasyonda ağırlığı 400-500 grama ulaşmaktadır (12).

Memelerin orta bölümünde meme başı ve areola bulunur. Burada daha fazla pigment bulunmasından dolayı meme derisinden daha koyu renktedir. Östrojen seviyesinin artışı ile birlikte renk koyuluğu da artmaktadır (12).

Gelişmiş meme elemanları; asinüs, duktus ve stromal elemanlardır. Memenin salgı birimi olan asinüslerin içleri küboid ya da silindirik epitel ile döşelidir. Dış yapı bağ dokusu, kan ve lenf damarları ile sarıdır. Asinüsler birleşerek lobülleri, lobüller de bir araya gelerek lobları oluştururlar. Her lob 20-40 kadar lobül içerir. Dolayısıyla, her bir duktus bir meme lobunu ve 20-40 kadar lobülü drene eder. Her bir lobülde toplatıcı duktus çevresinde gruplaşmış olan sayıları 10-100 arasında değişen asinüsler bulunur. Meme bezinin esas yapısal birimi olan lobüllerin sayısı genç kadınlarda fazla iken menapozdan sonra azalma gösterir (12,13).

Erkeklerde ise meme rudimenter olup, sadece küçük kanallardan oluşur (11).



Şekil 2.1. Meme anatomisi (<http://memesaglik.net/normal-meme-yapisi.asp>)

2.2. Meme Kanseri

Kansere bağlı ölümler arasında ikinci sırada yer alan meme kanseri kadınlarda en sık görülen malignitedir. Meme kanseri, çok sayıda kanserle ilişkili genin mutasyonu sonucunda oluşur. Bu mutasyonlar eşey hücrelerindeki genlerde meydana gelir ve nesilden nesile aktarılırsa ailesel meme kanserlerini oluşturur. Ancak somatik hücrelerde meydana gelen mutasyonlar nesilden nesile aktarılmaz ve sporadik meme kanserlerini oluşturur. Meme kanserlerinin çoğunu ise sporadik kanserler oluşturmaktadır (14).

Günümüze kadar meme kanserinin temel biyolojisi üzerindeki çalışmalar, meme kanseri yatkınlığında, başlangıcında ve gelişiminde rolü bulunan genlerin ve hücrelerin tanımlanmasında önemli gelişmelere yol açmıştır. Meme tümörleri, farklı hücre gruplarından meydana gelen heterojen yapıya sahiptirler. Bu heterojen yapıyı açıklamak üzere iki hipotez ileri sürülmüştür:

- ✓ Meme bezinde var olan hücrelerin her biri genetik değişikliklerin birikimi ile tümörijenik olma kapasitesine sahiptirler.

✓ Yalnızca meme bezinde ender bulunan özel hücrelerden tümör gelişebilir.

Meme kanserinin bu hipotezler doğrultusunda mı yoksa her ikisinin birlikteliğinden mi meydana geldiği halen araştırılmaktadır (15).

Normal meme büyümesi ve gelişimi östrojen, progesteron, androjen, glukokortikoid, prolaktin, troid hormonu, insulin, ve insulin benzeri büyüme faktörleri, fibroblast büyüme faktörleri, epidermal büyüme faktörleri gibi pek çok hormon ve büyüme faktörünün etkileşimi ile gerçekleşir. Bu faktörlerin reseptörleri ile etkileşimleri sonucunda çeşitli genlerin anlatımı artırılırken bazılarının baskılanabilir. Hücrelerde bu reseptör ve ilgili sinyal iletim yollarında görevli proteinlerin genlerindeki bozukluklar kanser gelişiminden sorumludurlar. Meme kanser hücrelerinin malign potansiyeli de üretilen büyüme uyarıcıları ve inhibitörleri arasındaki dengeye bağlıdır (16).

2.2.1. Meme Kanserinin Epidemiyolojisi

WHO ve IARC'ın (International Agency for Research on Cancer) ortak raporuna göre her yıl dünyada 1.000.000 kadında meme kanseri gelişmekte ve 370.000 kadın ise bu hastalıktan ölmektedir. Avrupa'da her yıl 340.000 yeni meme kanseri olgusu gözlenirken, ABD'de ise yılda 184.000 yeni meme kanseri gözlenmektedir. Akciğer kanserinden sonra tüm kanser ölümleri arasında %18 ile ikinci ölüm nedeni olarak bildirilmektedir. Dünyada meme kanseri görülme sıklığı yıllık ortalama %0,5 oranında artmaktadır (17).

Batı ülkelerinde (en azından son 25 yıldır) meme kanseri insidansı yaklaşık %30 artış gösterirken, ABD'de mamografi kullanımı ve hormon replasman tedavisine bağlı olarak 2001-2004 yılları arasında meme kanseri sıklığının azaldığı görülmüştür. Nedeni tam olarak anlaşılacakla birlikte üreme, beslenme özelliklerinin değişmesi ve fiziksel aktivitenin azalmasına bağlı olarak Asya ve Afrika kıtalarında gelişmekte olan ülkelere meme kanseri insidansı artmıştır (18). Meme kanseri insidansının artmasına rağmen son 25 yıldır bazı ülkelere mortalite oranı sabit kalmış ya da azalmıştır (19). Gelişmiş ülkelere mortalite oranının azalmasının nedeni, mamografi ile erken tanınması ve geliştirilen tedavilere bağlanabilir (20).

Diğer taraftan meme kanseri sadece kadınlara özel bir hastalık değildir. Tüm meme kanserlerinin yaklaşık %1'i erkeklerde görülmektedir. Meme kanseri erkeklerde görülen tüm kanser çeşitlerinin %0,2'sinden ve ölümlerin ise %0.14'ünden sorumludur (17, 21).

Türkiye'de ise meme kanseri 1990 yılından itibaren en sık görülen 2. ölüm nedenidir (22).

2.2.2. Meme Kanserine Yakalanmada Etkili Olan Risk Faktörleri

Meme kanseri vakalarının büyük çoğunluğunda etioloji bilinmemektedir. Hastalık için bir çok risk faktörü belirlenmiştir. Meme kanseri için belirlenmiş olan risk faktörlerini şu şekilde sıralayabiliriz; cinsiyet, yaş, ailede genç yaşta meme kanseri öyküsü olması, erken menarş, geç menapoz, geç yaşta ilk canlı doğum, sosyoekonomik seviye, östrojen ve doğum kontrol hapi kullanımı, alkol ve sigara kullanımı, şişmanlık ve yağlı beslenme, daha önce meme kanseri geçirmiş olma, genetik mutasyonlar (17, 23).

2.2.2.1. Yaş

Meme kanseri sıklığı ve mortalitesi yaşla birlikte artmaktadır. Yaşlı kadınlarda meme kanserinin daha ileri evrelerde tanı konduğu ileri sürülse de bir çok araştırmacı tarafından bu desteklenmemiştir (24). Bununla beraber, meme kanseri hastalarının %70'nin 50 yaş ve üzeri olduğu belirtilmiştir. 50 yaş üzeri bireylerde 50 yaşın altında olan bireylere göre meme kanseri görülme sıklığı dört kat artmaktadır (25).

2.2.2.2. Kişisel meme kanseri öyküsü

Daha önce meme kanseri geçiren ve tedavi olan bireylerde diğer memelerinde kanser geliştirme olasılığı, daha önce bu hastalığa yakalanmamış olan bireylere göre 3-4 kat daha fazla risk taşımaktadır. Ayrıca daha önce memesinde iyi huylu tümör saptanmış olan bireyde kanser gelişim riski de artmaktadır (25).

2.2.2.3. Fertil çağı süresi

Kadınlarda adet görmeye erken yaşta başlamaları ve ilerleyen yaşta menopoza girmeleri fertil çağı uzatmaktadır. Bu dönemde daha fazla östrojen hormonu etkisine maruz kaldığından meme kanseri geliştirme riski de artmaktadır (25).

2.2.2.4. Doğurganlık öyküsü

Kadınlarda ilk çocuğu doğurma yaşı meme kanserine yakalanmasına etki etmektedir. 30 yaşından sonra ilk çocuğunu doğuran kadınlarda, 20 yaşından önce doğuran kadınlara oranla iki kat daha fazla meme kanseri görüldüğü bildirilmiştir. Bununla beraber, hiç çocuk doğurmeyen kadınlarda ise bu risk daha da artmaktadır (25).

2.2.2.5. Sosyo-ekonomik düzey

Sosyo-ekonomik düzeyi yüksek olan kadınlarda meme kanseri görülme sıklığının daha fazla olduğu bildirilmiştir. Gelir düzeyi yüksek olan ailelerin kız çocuklarının daha iyi beslendikleri için erken yaşta adet görmeye başladıkları ve eğitim, iş nedeniyle daha ileri yaşta evlenip geç yaşta çocuk sahibi olmalarının bu sonucu doğurduğu düşünülmektedir (26).

2.2.2.6. Östrojen alınması ve doğum kontrol hapı kullanımı

Menopozdan dolayı uzun süre östrojen tedavisi gören kadınlarda meme kanseri görülme riski artmaktadır (27). Doğum kontrol haplarının da meme kanseri riskini yükselttiği belirtilmiştir. Ancak bu konu ile ilgili farklı görüşler bulunmaktadır. Ayrıca 10 yıl önce doğum kontrol hapı kullanmayı bırakmış kadınlarda bu riskin tamamen ortadan kalktığına da işaret edilmektedir (25).

2.2.2.7. Alkol ve sigara kullanımı

Alkol ve sigara kullanımının meme kanseri ile ilişkisi henüz netlik kazanmamıştır (25). Bununla beraber hem alkol kullanımının (28,29), hem de sigara kullanımının meme kanserine yakalanma riskini artırdığı yönünde çalışmalar vardır (25).

2.2.2.8. Obezite

50 yaş ve üzeri olan bireylerde obezitenin meme kanserine yakalanma riskini yükselttiği öne sürülmüştür (25). 18 yaşından sonra 20 kilo ve daha fazlasını alan kişilerde almayanlara göre meme kanseri riskinin 1.5 kat daha fazla olduğu saptanmıştır. Menopozdan sonra en az 8 kilo kaybeden ve ağırlık kaybını devam ettirenler %57 oranında düşük meme kanser riskine sahipken, menopozdan sonra 8-10 kilo alan kişilerde %18 meme kanser riski daha fazla olduğu belirtilmiştir (30). Böylece daha

fazla yağ dokusuna sahip olma östrojen seviyesini ve meme kanser gelişme riskinin olasılığını arttırdığı düşünülmektedir (17).

2.2.2.9. Hormonal faktörler

Östrojen ve progesteronun meme kanseri gelişiminde anahtar rol oynadığı düşünülmektedir. Östrojen meme dokusunda duktal epitelyumun diferansiyasyonu ile proliferasyonunu sağlamaktadır. Genetik ve çevresel faktörler östrojen homeostazisini etkilemektedir. Mekanizması karmaşık olmakla birlikte östrojen ve metabolitlerinin meme kanseri başlatmada ve gelişiminde etkili olduğu bilinmektedir (17).

Doğrudan tümörögenezi başlatan etkiler arasında nükleik asit sentezinde rol alarak onkogenezi aktive eden enzim ve proteinler bulunmaktadır. Dolaylı etkiler prolaktin salınımının stimüle edilmesi ve büyüme faktörleri (GF α ve EGF dönüşümü gibi) ile büyüme dışı faktör peptidlerinin (plazminojen aktivatörleri vb.) üretimi ile meydana gelebilir.

Bir organın bir hormonun proliferatif etkisine vereceği cevap normal gelişimden hiperplaziye doğru olabileceği gibi, neoplaziye doğru da olabilir. Erken menarj, ilk doğumun ileri yaşlarda olması ve geç menopozda meme kanseri riskinin artması buna karşın erken menopozda ise bu riskin azalması yukarıda açıklanan değişimi dolaylı yoldan kanıtlamaktadır (17, 31, 32). Bunlara ek olarak, emzirmenin de meme kanser riskini azalttığı gösterilmiştir (33).

2.2.2.10. Radyasyona maruz kalma

Özellikle 30 yaşından önce toraks duvarına uygulanan yüksek dozda iyonize radyasyon, meme kanseri riskini yükseltmektedir. 40 yaşından sonra iyonize radyasyona maruz kalanlarda meme kanseri riskinde artma gözlenmemiştir. Bu nedenle 30 yaşın üzerindeki kadınlarda mamografi meme kanseri riskini yükseltmemektedir. Lenfoma nedeniyle radyoterapi alan kadınlarda da, özellikle 10. yıldan sonra meme kanseri sıklığı artmaktadır (34). Radyasyona maruz kalanlarda DNA hasarına bağlı olarak 10-15 yıllık bir süre içerisinde meme kanseri riskinde %20-30'a varan artışlardan bahsedilmektedir (35).

2.2.2.11. Genetik yatkınlık

Aile bireyleri arasında meme kanserine yakalanmış kimsenin varlığı, o ailedeki diğer bireylerin meme kanserine yakalanma riskini artırmaktadır. Özellikle birinci dereceden akrabasında (anne, kız kardeş gibi) meme kanseri öyküsü olan kişilerde risk 2-5 kat artmaktadır (25, 36).

Kendisinde herhangi bir sorun saptanmayan fakat kan bağı olan yakın akrabasında (1., 2. ve 3. derecede kan bağı olan akrabaları içerir) aşağıda belirtilen durumu olan kişiler kalıtsal meme kanseri riski taşıyan grup olarak Aydıner ve arkadaşları tarafından (2010) değerlendirilmiştir (23);

- ✓ BRCA1/BRCA2 ile genetik kanser riskinin varlığı saptananlar
- ✓ Yakın akrabasında 40 yaş veya altında meme kanseri öyküsü olanlar,
- ✓ Yakın akrabasında her iki memede kanser olan, 50 yaş veya altında bir memede kanser öyküsü olan ve en az bir yakın akrabada daha 50 yaş ve altında meme kanseri veya yumurtalık kanseri öyküsü olanlar,
- ✓ Yakın akrabasında meme kanserinin herhangi bir yaşta saptanması ve en az 2 yakın akrabada daha yumurtalık kanseri öyküsü olanlar,
- ✓ Yakın akrabasında meme kanserinin herhangi bir yaşta saptanması ve en az 2 yakın akrabada daha meme kanseri öyküsü (özellikle 50 yaş altında veya iki memede çıkmışsa) olanlar,
- ✓ Yakın akrabasında meme kanserinin her hangi bir yaşta saptanması ve başka bir yakın erkek akrabasında meme kanseri öyküsü olanlar,
- ✓ Aynı yakın akrabasında hem meme hem yumurtalık kanseri öyküsü olanlar,
- ✓ En az iki yakın akrabasında yumurtalık kanseri öyküsü olanlar,
- ✓ Yakın akrabasında yumurtalık kanseri ve en az bir yakın akrabasında daha 50 yaş ve altında meme kanseri veya iki memede kanser öyküsü olanlar,
- ✓ Bir yakın akrabasında yumurtalık kanseri ve en az iki yakın akrabasında meme kanseri öyküsü olanlar,
- ✓ Yakın akrabasında yumurtalık kanseri ve en az bir yakın erkek akrabasında meme kanseri öyküsü olanlar,
- ✓ İki yakın erkek akrabasında meme kanseri öyküsü olanlar,
- ✓ Yakın erkek akrabasında meme kanseri ve en az bir yakın kadın akrabasında meme veya yumurtalık kanseri öyküsü olanlar,

- ✓ Li-Fraumeni sendromu (aynı ailede akut kan kanseri, erken yaşta meme kanseri, beyin tümörü, böbrek üstü bezi kanseri, kemik ve yumuşak doku sarkomu, diğer erken yaşta saptanan nadir adenokanserler veya çocukluk çağı kanseri öykülerinin olması) öyküsü olanlar.
- ✓ Askhenazi Yahudileri.

2.2.3. Meme Kanserinin Histopatolojisi

Meme kanserinde tümörün değerlendirilen çeşitli özellikleri prognoz ve tedaviyi belirlemede büyük önem taşımaktadır. Bu konuda en önemli verilerden biri tümörün histopatolojik türüdür. Bu amaçla yapılmış sınıflandırmalar arasında en yaygın olarak kullanılan WHO'nun Meme Tümörleri Sınıflandırması'nın Azzopardi tarafından yeniden düzenlenen şeklidir (Şekil 2.2.) (17).

EPİTELYAL TÜMÖRLER	Benign	İntraduktal Papillom; Meme başı adenomu; Adenom
	Malign	Noninvaziv; Duktal Karsinoma İn Situ; Lobüler Karsinoma İn Situ
		İnvaziv; İnvaziv duktal karsinom; İntraduktal komponenti baskın invaziv duktal karsinom; İnvaziv lobüler karsinom; Müsinöz karsinom; Medüller karsinom; Papiller karsinom; Tubuler karsinom; Adenoid kistik karsinom; Sekretuar (Juvenil) karsinom; Apokrin karsinom; Metaplastik karsinom; diğerleri
		Memenin paget karsinomu
MİKST BAĞ DOKU VE EPİTELYAL TÜMÖRLER	Fibroadenom; Filloides tümör (Sistosarkoma filloides); Karsinosarkom	
ÇEŞİTLİ TÜMÖRLER	Yumuşak doku tümörleri; Deri tümörleri; Hematopoetik ve lenfoid dokuların tümörleri	
SINIFLANDIRILAMAYAN TÜMÖRLER		
MEME DİSPLAZİSİ / FİBROKİSTİK HASTALIK		
TÜMÖRE BENZER LEZYONLAR	Duktal ektazi; İnflamatuvar psödötümör; Hamartom; Jinekomasti; Diğerleri	

Şekil 2.2 Meme tümörlerinin histopatolojik sınıflandırması

Proliferatif meme anormallikleri lobüler ve duktal epitelle sınırlıdır. Hem lobüler hem de duktal epitelde hiperplazi, atipik hiperplazi, karsinoma *in situ* (kanseri hücreleri, çevresindeki bazal hücreleri aşmıyor) ve invazif karsinom *in situ* (kanseri hücreleri,

çevresindeki bazal hücreleri aşıyor) dahil bir yelpaze şeklinde anormallikler görülebilir (37).

2.2.3.1. Lobüler karsinoma in situ (LCIS)

Memenin terminal duktal lobüler birimlerinden kaynaklanır ve sadece kadınlarda görülmektedir. Komşu stroma içinde çok tipik mikrokalsifikasyonlar görülmektedir. Meme karsinomlarının %0,3-0,8'ini oluştururlar (14) ve %25-35 oranında invazif meme kanserine değişim gösterirler (37). Tüm veriler değerlendirildiği zaman, LCIS'in malign olmadığı; ancak kuvvetli bir tümör belirteci olarak kabul edilmesi sonucu ortaya çıkmaktadır (23).

2.2.3.2. Duktal karsinoma in situ (DCIS)

Küçük duktuslardaki epitelin proliferasyonu ile karakterizedir. Erken dönemde kanser hücreleri pleomorfizm, mitoz ya da atipi göstermediğinden atipik hiperplaziden ayırt edilmesi güçtür. Meme başında kanlı akıntı, palpe edilebilen kitle şeklinde saptanırlar, %85'den fazlası sadece mamografide mikrokalsifikasyon olarak saptanabilir (23, 37).

2.2.3.3 İnvazif meme kanseri

Lobüler ve duktal kaynaklı olarak tanımlanırlar. Ayrıca, *in situ* komponenti olsun ya da olmasın stromal invazyonun saptandığı lezyonlardır. Sınıflandırma şu şekilde yapılmaktadır;

- ✓ Meme başında Paget kanseri; meme kanseri hastalarının %12'sinde görülür. Genellikle DCIS ile ilişkili ve bazen invazif duktal kanser ile birlikte görülebilir. Stromal invazyon da görülebilir.
- ✓ İnvazif duktal kanser memenin en sık görülen malign tümörüdür (%70-80 oranında). Medüller kanser yaklaşık %4 oranındadır. Papiller kanser ve tubuler kanser ise yaklaşık %2 oranında görülür.
- ✓ İnvazif lobüler kanser görülme sıklığı %10 oranındadır. İnvaziv duktal karsinoma göre çevre doku sınırları daha düzensiz tümörlerdir. Boyutları oldukça değişkendir. Bazen gözle görünür bir kitle oluşturmazlar. Klasik invazif lobüler karsinoma dışında solid, alveolar, pleomorfik, tübülolobuler, taşlı yüzük hücreli ve mikst tipleri de vardır.

- ✓ Nadir kanserler (adenoid kistik, skuamöz, apokrin) (23, 37).

2.2.4. Meme kanserinin moleküler sınıflandırması

Moleküler tekniklerin (qRT-PCR, *mikroarray* gibi) geliştirilmesi ile beraber meme kanserinden sorumlu genlerin ekspresyon profilleri belirlendi ve böylece tümörün moleküler sınıflamasına gidildi. Sporadik meme kanserlerinde gen ekspresyon farklılıklarını belirleyen çalışmalar yapıldı ve bunun sonucunda meme tümörleri beş ana gruba ayrıldı (38, 39).

- ✓ Luminal A (ER > 0 veya PgR > 0) ve (Ki-67 < % 14) ve (HER2 0/+/+)
- ✓ Luminal B (ER > 0 veya PgR > 0) ve (Ki-67 ≥ % 14) veya (HER2 +++)
- ✓ Triple negatif (ER = 0 ve PgR = 0) ve (HER2 0/+/+)
- ✓ Normal epitel benzeri grup (normal meme dokusu özelliklerini gösteren tümörler)
- ✓ HER2 pozitif grup (ER = 0 ve PgR = 0) ve (HER2 +++)

Bu farklı moleküler alt grupların prognoz ve kemoterapi duyarlılığında farklılık gösterdiği gözlemlendi. Dolayısı ile tedavinin yönlendirilmesinde önemli gelişmeler beklenmektedir.

2.2.5. Meme Kanserinde Evreleme

Tümör evreleme sistemleri kanserin yayılımı ve ciddiyeti hakkında belli standartlara göre ilgi edinilmesini sağlar. TNM Evreleme Sistemi'nde tümörleri sınırlamak için kullanılan kriterler; tümör boyutu (T), aksiller lenf nodlarına yayılım (N) ve uzak bölgelere yayılımdır (M). Daha önceden tanımlanmış kriterlere göre bu üç özellik belirlenip kombine edilerek, TNM evresi hesaplanır. Meme kanserinde TNM sınıflandırması ve evrelemesi şekil 2.1.'de verilmektedir (23).

Primer tümör

- T** T_0 Primer tümöre ait bulgu yok
 T_{is} İn situ karsinom
 T_{is} (DCIS) Duktal karsinom in situ
 T_{is} (LCIS) Lobuler karsinom in situ
 T_{is} (Paget) Meme başının paget hastalığı (primer başka tümör yok)
- T_1 En büyük çapı ≤ 2.0 cm. tümör
 T_{1mic} En büyük çapı ≤ 0.1 cm. mikroinvazif tümör
 T_{1a} Tümör çapı > 0.1 cm., ancak ≤ 0.5 cm.
 T_{1b} Tümör çapı > 0.5 cm., ancak ≤ 1.0 cm.
 T_{1c} Tümör çapı > 1.0 cm., ancak ≤ 2.0 cm.
- T_2 Tümör çapı > 2.0 cm., ancak ≤ 5.0 cm.
 T_3 Tümör çapı > 5.0 cm.
 T_4 Aşağıda belirtilen dokulara direkt yayılımı olan herhangi büyüklükte tümör
A. göğüs duvarı
B. cilt
 T_{4a} Pektoralis major kası dışında göğüs duvarına yayılım
 T_{4b} Ödem, peau d'orange, cilt ülserasyonu, aynı memede satelit cilt nodülleri
 T_{4c} T4a ve T4b
 T_{4d} Enflamatuvar karsinom

Meme Kanserinde Evreleme			
Evre	T	N	M
Evre 0	T_{is}	N_0	M_0
Evre I	T_{mic}	N_0	M_0
Evre IIA	T_1	N_0	M_0
	T_0	N_1	M_0
Evre IIB	T_1	N_1	M_0
	T_2	N_0	M_0
Evre IIIA	T_2	N_1	M_0
	T_3	N_0	M_0
Evre IIIB	T_0	N_2	M_0
	T_1	N_2	M_0
Evre IIIC	T_2	N_2	M_0
	T_3	N_1	M_0
Evre IV	T_3	N_2	M_0
	T_4	N_0	M_0
Evre IV	T_4	N_1	M_0
	T_{1-4}	N_3	M_0
Evre IV	T_{1-4}	N_{0-3}	M_1

T_x Değerlendirilemeyen primer tümör

Bölgesel Lenf Nodülleri

Klinik Sınıflandırma

- N** N_x Daha önce çıkarıldığı için değerlendirilemeyen nodal tutulum
 N_0 Bölgesel lenf nodu metastazı yok
 N_1 Hareketli, ipsilateral bölgesel lenf nodu metastazı
 N_2 Komşu dokulara yapışık ipsilateral aksiller lenf nodu metastazı veya aksiller metastaz olmaksızın klinik veya radyolojik olarak (lenfosintigrafi dışı) görülebilen ipsilateral İM nodal metastaz
 N_{2a} Komşu dokulara yapışık ipsilateral aksiller lenf nodu metastazı
 N_{2b} Aksiller metastaz olmaksızın klinik veya radyolojik olarak görülebilen ipsilateral İM nodal metastaz
 N_3 İpsilateral infraklaviküler lenf nodu metastazı veya klinik + radyolojik (lenfosintigrafi dışı) olarak görülebilen ipsilateral İM lenf nodu metastazı + aksiller lenf nodu metastazı veya supraklaviküler lenf nodu metastazı
 N_{3a} İpsilateral infraklaviküler lenf nodu metastazı + aksiller lenf nodu metastazı
 N_{3b} Klinik + radyolojik (lenfosintigrafi dışı) olarak görülebilen ipsilateral İM lenf nodu metastazı + aksiller lenf nodu metastazı
 N_{3c} Supraklaviküler lenf nodu metastazı

Patolojik Sınıflandırma

- pN_x Değerlendirilemeyen bölgesel lenf nodları
 pN_0 Bölgesel lenf nodu metastazı yok
 $pN_{0(-)}$ Bölgesel lenf nodu metastazı yok, İHK (-)
 $pN_{0(+)}$ Bölgesel lenf nodu metastazı yok, İHK (+), ancak tümör infiltrasyon alanı ≤ 0.2 mm

- pN_{0(mol-)} Bölgesel lenf nodu metastazı yok, RT-PCR (-)
pN_{0(mol+)} Bölgesel lenf nodu metastazı yok, RT-PCR (+)
pN₁
pN_{mi} Mikrometastaz, tümör infiltrasyon alanı >0.2 mm, ≤2.0 mm
pN₁ 1-3 aksiller lenf nodu tutulumu ve/veya klinik veya radyolojik olarak görüntülenemeyen ancak sentinel biyopside saptanan İM lenf nodunda mikrometastaz
pN_{1a} 1-3 aksiller lenf nodu tutulumu
pN_{1b} Klinik veya radyolojik olarak görüntülenemeyen, ancak sentinel biyopside saptanan İM lenf nodunda mikrometastaz
pN_{1c} 1-3 aksiller lenf nodu tutulumu ve klinik veya radyolojik olarak görüntülenemeyen, ancak sentinel biyopside saptanan İM lenf nodunda mikrometastaz
pN₂ 4-9 aksiller lenf nodu metastazı veya aksiller tutulum olmaksızın İM lenf nodlarında klinik + radyolojik (lenfosintigrafi dışı) olarak görüntülenebilen tutulum
pN_{2a} 4-9 aksiller lenf nodu metastazı, en küçük tümör infiltrasyon alanı >2.0 mm
pN_{2b} Aksiller tutulum olmaksızın İM lenf nodlarında klinik + radyolojik (lenfosintigrafi dışı) olarak olarak belirgin olan tutulum
pN₃ 10 veya daha fazla aksiller lenf nodu metastazı veya infraklaviküler lenf nodu metastazı veya klinik + radyolojik (lenfosintigrafi dışı) olarak belirgin İM lenf nodu metastazı + en az 1 aksiller lenf nodu metastazı veya sentinel biyopsi ile tanısı konan mikroskopik İM lenf nodu metastazı + 3'ten fazla aksiller lenf nodu metastazı
pN_{3a} 10 veya daha fazla aksiller lenf nodu metastazı, en küçük tümör infiltrasyon alanı >2.0 mm veya infraklaviküler lenf nodu metastazı
pN_{3b} Klinik + radyolojik (lenfosintigrafi dışı) olarak belirgin İM lenf nodu metastazı + en az 1 aksiller lenf nodu metastazı veya sentinel biyopsi ile tanısı konan mikroskopik İM lenf nodu metastazı + 3'den fazla aksiller lenf nodu metastazı
pN_{3c} Supraklaviküler lenf nodu metastazı

Uzak Metastaz

- M**_x Değerlendirilemeyen uzak metastaz
M₀ Uzak metastaz yok
M₁ Uzak metastaz var

Şekil 2.3. Meme Kanserinde 2002 yılı TNM Sınıflandırması ve Evreleme Sistemi

2.2.6. Meme kanseri genetiği ve moleküler faktörler

Kanserin kesin sebepleri henüz bilinmemektedir. Ancak, kişiyi bazı kanser türlerine karşı yatkın olmasına neden olan genler, kanser oluşumuna neden olan virüsler, radyasyona maruz kalma, çeşitli kimyasal maddeler kanser sebepleri arasında yer almaktadır (40).

Meme kanserlerinin büyük çoğunluğunu sporadik kanserler oluştururken, kalıtsal sebeplere bağlı olarak gelişen meme kanserleri olguların çok az bir kısmını (%10-20'si) oluşturmaktadır (41). Kalıtsal meme kanserleri penetransı yüksek olan genlerdeki (*BRCA1*, *BRCA2*, *p53*, *PTEN*, *ATM* gibi) mutasyonlardan kaynaklanmaktadır.

Bunlardan en sık rastlanan *BRCA1* ve *BRCA2* genlerindeki mutasyonlar kalıtsal meme kanserlerinin %80-90'ından sorumludurlar (42). DNA tamiri ve genomik integritenin kontrolünde gerekli olan proteinleri kodlayan bu genlerin bir defektik

kopyaları kalıtlıdır. Diğer kopya ise mutasyon, rekombinasyon, delesyon ve epigenetik inaktivasyon ile inaktive edilir (41). *BRCA1*'deki mutasyonlar kalıtsal meme kanseri gözlenen ailelerin %15-45'inde görülürken, *BRCA2*'deki mutasyonlar ise meme kanseri ailelerinin yaklaşık %76'sında görülmektedir (43). Hücre döngüsünün düzenlenmesi, DNA hasarlarının tamir edilmesi, anormal hücrelerin çoğalmasının engellenmesinde görev alan p53'deki mutasyonlar bütün meme kanseri olgularının sadece %1'inden sorumludur (44).

Sporadik meme kanserlerinde ise *BRCA1* ve *BRCA2* mutasyonlarına rastlanmazken (45), %20-40 oranında *p53* mutasyonlarına rastlanmaktadır (46). Sporadik meme kanserlerinin başlıca etkeni östrojen seviyesindeki artıştır. Dolayısı ile, östrojen biyosentezinde (*CYP17*, *CYP19*, *17 β -HSD*) ve östrojenin metabolitlerine ve ürünlerine dönüşümünde rol alan proteinlerin genlerindeki (*COMT*, *CYP1A1*, *CYP1B1*, *GSTM1*, *GSTM3*, *GSTP1*, *GSTT1*) değişimler sporadik meme kanserinde etkilidir (47).

Penetransı düşük olan genler ise meme kanseri için düşük risk oluşturmalarına rağmen, bu genlerin varyantlarına popülasyoda yüksek oranda rastlanmaktadır. Bundan dolayı meme kanseri olgularının büyük bir kısmından sorumludurlar (48). Penetransı düşük olan kansere yatkınlık allellerinin genetik polimorfizmler (çoğunu SNP'ler oluştur) sonusunda ortaya çıktığı gösterilmiştir (49). *CYP1A1*, *CYP2D6*, *CYP19*, *GSTM1* ve *GSTP1*, *ADH1C*, *MTHFR*, *XRCC1* ve *XRCC3*, *ERCC4/XPF*, *PR*, *ER*, *TNF- α* , *HSP70* gibi düşük penetranslı genlerdeki polimorfizmlerin meme kanseri ile ilişkileri araştırılmıştır (50).

Meme kanserine yatkınlık genlerinde kodlanan bölgelerdeki polimorfizimlere ek olarak kodlanmayan bölgelerdeki dizi değişimlerinin de meme kanserinde risk oluşturabileceği üzerine çalışmalar mevcuttur (51). Bununla beraber SNP'lerin meme kanserinde anlamlı risk oluşturdukları gösterilmiştir. (52).

2.2.7. Meme kanserinde tanı ve tedavi

Meme muayenesi gerek tanı gerekse meme kanseri hastalarının takibinde önemlidir. Meme kanseri hastalarının %65-75'inde ilk bulgu memede ele gelen ağrısız, sert ve hareketsiz bir kitlenin varlığıdır. Genelde etrafındaki meme dokusu ile hareket eder ve bu özelliği ile fibroadenomdan ayırt edilir. Bunun dışında meme ucunda akıntı, memede şekil değişikliği, asimetri meme kanserinin diğer belirtileridir. Lokal ileri evre meme

kanserinde dermal lenfatik kanalların tümör trombüsleri ile tıkanması sonucunda meme derisinde portakal görünümü oluşabilir. Sık rastlanan diğer bir durum ise meme başında çekilmedir (17, 53). Lenfatiklere yerleşen tümör hücrelerinin çoğalmasıyla satellit nodüller gelişir. Kanser nedenli oluşan kitlelerin çoğunluğu %45 üst dış kadran, %25 merkezi bölge, %15 üst iç kadran, %10 alt dış kadran ve %5 alt iç kadranda yer almaktadır. Malign akıntı seröz, seröz-kanlı ya da kanlı olabilir.

Meme görüntülemeye temel yöntemler ultrasonografi ve mamografidir. Kalsifikasyon, kitle lezyon, yapısal distorsiyon ve lenf ganglionları mamografik olarak tespit edilebilen bulgulardır. Ultrasonografi ile yoğun memelerde mamografik olarak tespit edilemeyen kitle, lokalizasyon nedeniyle mamografik olarak belirlenemeyen kitle ve lenf nodu tespiti yapılabilir. Yeni bir ultrasonografi yöntemi olan elastografi ile kistik-solid ayrımı, benign-malign ayrımında önemli bilgilere ulaşılabacağına dair yorumlar da bulunmaktadır. Bu yöntemlere ek olarak manyetik rezonans görüntüleme, ultrasonografi ve mamografi'nin duyarlılığını arttırmakta kullanılmaktadır. Ayrıca sintimamografi, hormon reseptör görüntüleme ve moleküler teknikler (*HER2* mutasyon taramaları) rutin uygulamalarda kullanılmaktadırlar (53). Erkek memesindeki lezyonların çoğu benignidir ve %1'inden daha azı primer meme kanseridir. Mamografi mümkündür; ancak görüntü almak zor ise ultrasonografi yöntemi kullanılır (21).

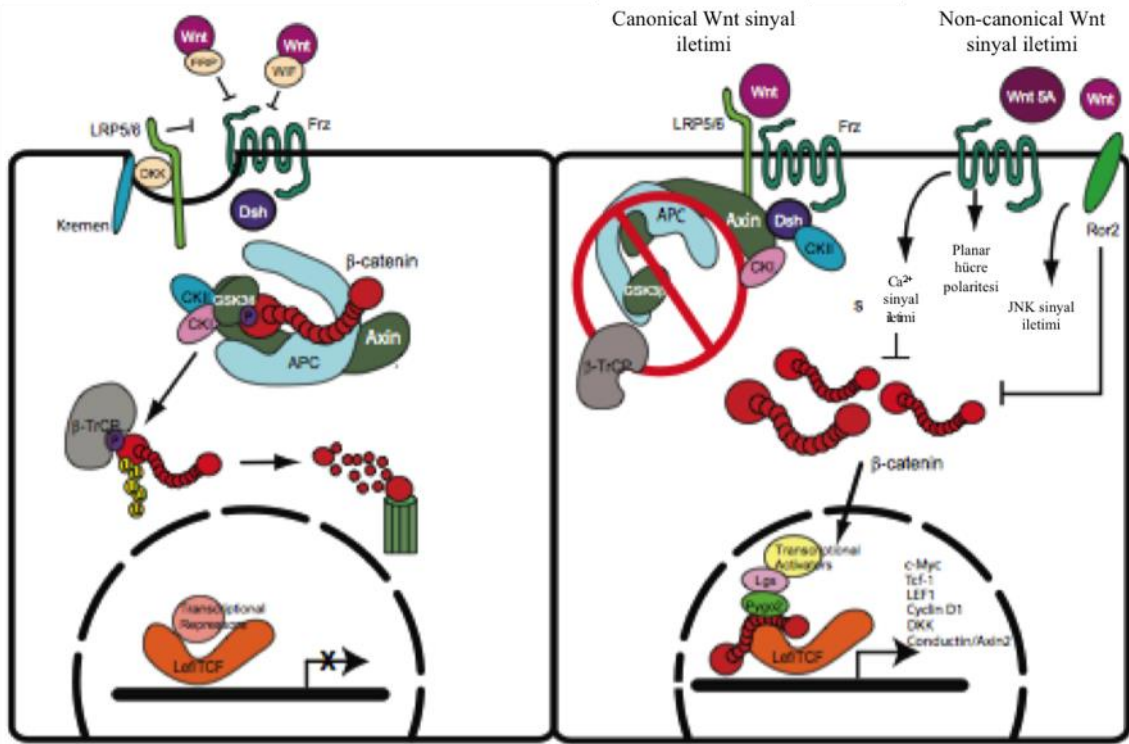
Meme kanseri için tedavi seçenekleri lokal (radyoterapi, cerrahi) ve sistemik (kemoterapi, hormon tedavisi) tedavidir. Hem sistemik hem de lokal tedaviye gereksinim olabilmektedir (54). Meme kanseri tedavi yöntemlerini şu şekilde sıralayabiliriz;

- ✓ Meme koruyucu tedavi; tümör kitlesi cerrahi olarak çıkarılır ve adjuvan radyoterapi uygulanır.
- ✓ Basit mastektomi; pektoral kasları ve aksiller lenf nodlarını yerinde bırakarak sadece memenin tamamının alınması.
- ✓ Modifiye radikal mastektomi; basit mastektomi ile birlikte pektoral kasların ve aksiller lenf nodlarının alınması.
- ✓ Deri koruyucu mastektomi; meme derisi korunur, tüm meme dokusunun meme başı ve areola kompleksi ile birlikte alınması.
- ✓ Radikal mastektomi; tüm meme dokusu üzerindeki deri ile beraber, pektoral kasları ve aksiller lenf nodlarının alınması

- ✓ Aksiller lenf nodu diseksiyonu
- ✓ Profilaktik mastektomi; yüksek oranda meme kanseri riski taşıyan kadınlarda kanser gelişmeden meme dokusunun tamamının alınması (17).

2.2.8. Wnt sinyal iletim yolağı

Wnt sinyal iletim yolağı, hücrelerin hayatta kalmasını, çoğalmasını ve istilasını düzenlemektedir. Wnt/ β -katenin yolağı tümör oluşumu, tümör istilası ve metastaz olayları ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bu yolak; *Canonical* Wnt sinyal iletim yolundan ve *Non Canonical* Wnt sinyal iletim yolundan oluşmaktadır (55).



Şekil 2.4. *Canonical* ve *Non Canonical* Wnt Sinyal iletim yolları (Wnt yokluğunda ve varlığında) (56).

Çeşitli insan solid tümörlerinde *canonical* Wnt sinyal iletiminin katılımına dair kanıtlara uyumlu olarak, anormal Wnt sinyal iletiminin meme kanseri gelişimi ve ilerleyişinde de etkili olabileceği üzerine kanıtlara da işaret edilmiştir (57-60). Ayrıca, meme kanserinde Wnt sinyal iletim yolağı ile ilişkili genlerin epigenetik mekanizmalarla susturulduğuna (DNA hipermetilasyonu aracılığıyla) dair veriler vardır (61).

Wnt'ler embriyonik gelişim süresince hücre büyümesi, hareketliliği ve farklılaşmasını düzenleyen parakrin şeklinde salgılanan glikoproteinlerdir (62). Wnt sinyal yolağı çoğunlukla, APC, axin ve onun homoloğu olan axin2/conductin ve β -katenin'deki mutasyonlar yoluyla çeşitli tümör tiplerinin (akciğer kanseri, kolorektal kanseri, hepatoselüler karsinoma, melanoma, medulloblastoma, over endometrial adenokarsinomalar, özafajial squamoz hücre karsinoması gibi) gelişimine katkıda bulunmaktadır (63-65).

Wnt-1 orjinal olarak int-1 olarak adlandırılmış ve ilk olarak farelerde meme tümör gelişiminde tanımlanmış bir genidir. Daha sonra ise, bu genin homoloğu *Drosophila*'da *wingless* olarak adlandırılmış ve bu iki ismin kombinasyonu sonucunda Wnt terimi oluşmuştur. İnsanlarda saptanmış olan 19 Wnt proteini vardır ve ortalama 40 kDa moleküler ağırlığına sahiptirler (66).

Wnt'lerin hücre yüzey reseptörleri Frizzled ailesine aittir ve yapısal olarak G-proteini bağlı reseptörler olarak toplanırlar, ve bazıları G proteinleri ve inozitol fosfolipid yolağı üzerinden sinyal iletebilirler. Başlıca sinyal iletimi, G proteini bağımsız yoldan gerçekleşir, ki bunun için Dishevelled adı verilen sitoplazmik sinyal iletimi proteinine gereksinim vardır.

En iyi şekilde karakterize edilmiş Dishevelled-bağımlı yollar, β -katenin isimli multifonksiyonal proteinin proteolizinin düzenlenmesiyle etkilidirler. β -katenin, hücre-hücre adezyonunda ve gizli bir regülatör proteini olarak işlev görür. Wnt'ler bu yolağı Frizzled proteini ve ko-reseptör proteine bağlanarak aktive ederler. Ko-reseptör proteini "low density lipoprotein (LDL)" ile ilişkilidir ve bu yüzden "LDL-reseptör-ilişkili protein (LRP)" olarak adlandırılır. Frizzled ve LRP'nin Dishevelled'i nasıl aktive ettiği henüz açık değildir (67).

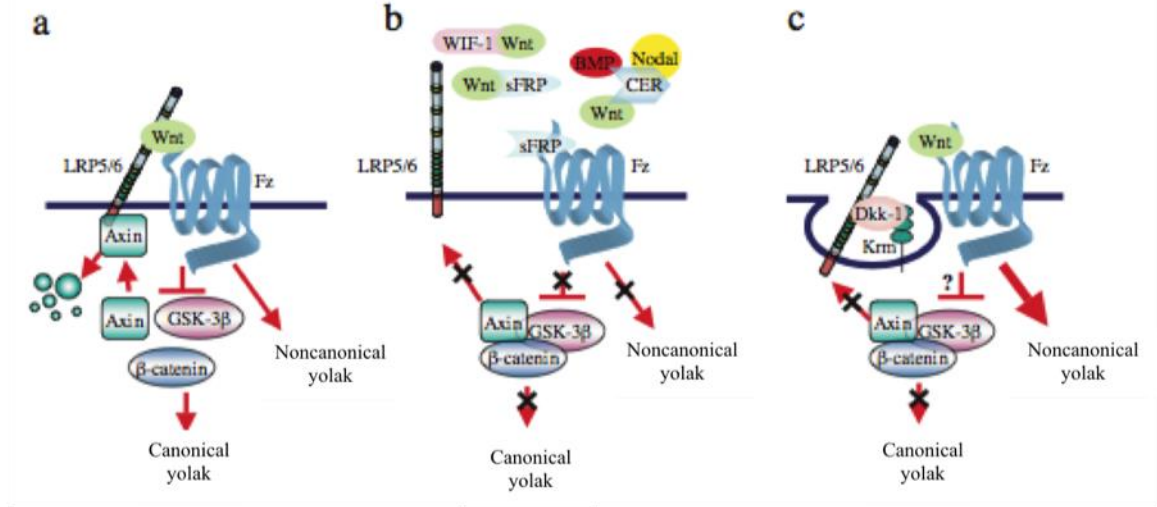
Multiprotein β -katenin degradasyon kompleksi olarak adlandırılan kompleks, axin/conductin, GSK3 β , APC, β -katenin, kazein kinaz1 α/ϵ , ve diversin'den oluşur ve β -kateninin stabilitesinin kontrolü için önemli rol oynar. Bu kompleksin ana fonksiyonu β -katenini fosforile etmek ve böylece, onun ubiquitinasyonunu başlatmak ve sonunda proteozomlarda degradasyonunu sağlamaktır (63,68,69).

Bir Wnt proteini Frizzled ve LRP'ye bağlandığı zaman, β -katenin fosforilasyonu ve degradasyonunun inhibe edilmesine yol açar. Mekanizmada Dishevelled ve buna bağlanan bir çok sinyal iletim proteinine gereksinim olduğu bilinmektedir. Serin/treonin

kinaz GSK3 β (glikojen sentaz kinaz 3) Wnt yolağında bir çok proteine bağlanır ve fosforile eder. GSK3 β tarafından 33,37 ve 41. bölgede β -katenin fosforilasyonu E3 ligaz β -TrCP'nın β -katenini tanınması için kritiktir, bu sayede β -katenin ubiquitinasyonu ve proteozomlarda degradasyonuna öncülük etmiş olur (70,71). Ek olarak, GSK3 β APC ve axin'i de fosforile etmektedir (72). Degradasyon kompleksi bileşenlerinin defosforilasyonu sadece β - katenin ubiquitinasyonunu inhibe etmekle kalmaz ayrıca β -katenin'in axin ve APC'ye olan ilgisini de düşürür, böylece β -katenin kompleksten ayrılır (73). Sonuç olarak, fosforile olamamış β -katenin sitoplazma ve nükleusta birikir. Nükleusta, Wnt sinyal iletimi için hedef genler normalde sessiz durumda tutulur, bu ise gen düzenleyici proteinlerin baskılayıcı bir kompleksi yoluyla gerçekleşir. Bu düzenleyici proteinler, korepresör protein olan Groucho'ya bağlanan LEF1/TCF ailesidir. Wnt sinyali nedeniyle deprede olmamış β -katenin'deki artış, β -katenin'in nükleus içine girmesine ve Groucho'yu yerinden ederek LEF-1/TCF'e bağlanmasına olanak sağlar. Böylece, β -katenin artık bir koaktivatör olarak görev alır, Wnt hedef genlerinin transkripsiyonunu indükler (74).

2.2.9. Wnt sinyal iletim yolağı antagonistleri

Canonical Wnt sinyal iletim yolağı iki bileşene sahip (Frizzled ve LRP5/LRP6) Wnt reseptör kompleksi ile aktive olur (Şekil 2.5-a). *Non Canonical* Wnt sinyal iletim yolağının aktivasyonu ise Frizzled ailesi Wnt reseptörü aracılığı ile aktive edilir (Şekil 2.5-a). Wnt sinyal iletim yolağının ekstraselüler antagonistleri iki ana sınıfa ayrılmaktadır. Her iki molekül sınıfı ligand-reseptör etkileşimlerini engellemektedir. Ancak, bu engelleme farklı mekanizmalarla gerçekleşmektedir. Birinci grup üyeleri sFRP (Secreted Frizzled-related protein) ailesi, WIF-1 (Wnt inhibitory factor-1) ve Cerberus'dur. Bu grup üyeleri direkt olarak Wnt proteinlerine bağlanır ve Wnt reseptör kompleksine bağlanma kabiliyetlerini değiştirirler. İkinci grupta ise, DKK (Dickkopf) ailesi üyeleri yer alır ki bunlar da LRP5 ve LRP6'ya bağlanarak Wnt sinyal iletimini inhibe ederler. Dolayısı ile, DKK ailesi proteinleri sadece *Canonical* yolağı inhibe ederken (Şekil2.5-c), sFRP ailesi proteinleri hem *Canonical* hem de *Non Canonical* yolağı inhibe ederler (Şekil2.5-b) (75).



Şekil 2.5. Wnt Sinyal iletim yolağının antagonistler tarafından düzenlenmesi

2.2.9.1. sFRP (Secreted Frizzled-Related Protein) Ailesi

sFRP'ler direkt olarak Wnt'lere bağlanan antagonistlerdir (76). Şu an için bilinen sekiz aile üyesinden beşi için sınıflandırma yapılmıştır (sFRP1-sFRP5). sFRP3 ayrıca FrzB (Frizzled motif associated with bone development) olarak da adlandırılmaktadır. Sekans homolojisi göz önüne alındığında sFRP1, sFRP2 ve sFRP5 bir alt grubu oluştururken, diğer alt grubu sFRP3 ve sFRP4 oluşturmaktadır. Sizzled, Sizzled2 ve Crescent üçüncü bir alt grubu oluşur; ancak bu proteinler memelilerde tanımlanmamışlardır. Bununla çelişkili olarak, Sizzled'ın Wnt sinyal iletim yolağını inhibe ettiğine dair yayınlar vardır (77,78).

sFRP proteinleri N-terminal kısımlarında CRD (cysteine-rich domain) domainleri içerirler. Bu domainler Frizzled proteinleri ile %30-50 oranında dizi benzerliğine sahiptirler (Şekil 2.7) ve 10 korunmuş sistein rezidusu içermektedirler (79). sFRP'ler Wnt sinyal iletim yolağını Wnt ligandları ile etkileşerek antagoize ederler; ancak bunu sisteince zengin domainleri üzerinden mi yoksa C-terminal domainleri vasıtasıyla mı gerçekleştirdikleri henüz net değildir (80,81). Bu çelişkili veriler, sFRP'ler ile kendi Wnt ortakları arasındaki farklı ilişkilerinden ötürü ya da farklı ligand kullanımından dolayı ortaya çıkmaktadır. sFRP1'in sisteince zengin domainlerinin hem kendisiyle hem de Frizzled proteini ile etkileşime girdiği belirlenmiştir (82). Bu nedenle, sFRP'ler Wnt proteinlerinin Frizzled proteinlerine bağlanmalarını engelleyerek ya da kendileri

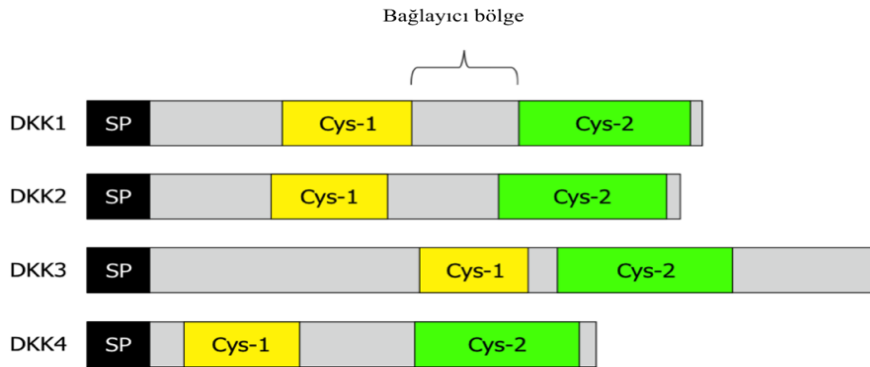
Frizzled ile işlevsel olmayan kompleksler oluşturarak Wnt sinyal iletimini engelleyebilirler (75). sFRP'lerin C-terminal kısımlarında NTR (Netrin-benzeri) domaini içerirler. NTR domaininde altı sistein rezidusu vardır ve ayrıca NTR domaini, metalloproteazlar ve bazı kompleman proteinlerin doku inhibitörlerinde de bulunmuştur (Şekil 2.6) (83).



Şekil 2.6. sFRP ve Frizzled proteinlerinin CRD akrabalığı (75)

2.2.9.2. DKK (Dickkopf) Ailesi

DKK ailesinin DKK1, DKK2, DKK3 ve DKK4 olmak üzere dört üyesi bulunmaktadır. DKK1, DKK2 ve DKK3 proteinlerinin molekül ağırlıkları 25 ve 29 kDa arasında değişirken, DKK3'ün molekül ağırlığı 38 kDa'dur. DKK'lar sisteince-zengin iki korunmuş domain içerirler. Bu domainler farklı uzunluktaki bağlayıcı bölge ile birbirlerine bağlanırlar (84). Her bir sisteince zengin domain on sistein rezidusuna sahiptir. Amino terminal sisteince zengin domain (Cys-1) her bir DKK üyesi için tektir. Buna karşın, karboksi terminal sisteince zengin domain (Cys-2) tüm DKK ailesi üyelerinde yüksek derecede korunmuş durumdadır. Tüm Dkk üyeleri arasında en farklı olan DKK3'tür. DKK3, Cys-2 bölgesinden önce uzun bir amino terminal domaini ve Cys-2'den sonra devam eden uzun bir karboksil domainine sahiptir (Şekil 2.7) (3).



Şekil 2.7. Dickkopf proteinlerinin domain yapısı

Cys-2 domaininde bulunan her bir sistein rezidusunun pozisyonu kolipaz ailesi proteinlerini ile benzerlik göstermektedir (Şekil 2.8). *Colipase* lipid hidrolizinde rol oynayan pankreatik enzimdir. Dolayısı ile DKK'ların lipidlerle etkileşime girerek Wnt/ β -katenin sinyal iletim yolağını düzenlediği öne sürülmektedir (85). Ayrıca, tüm Dkk üyeleri furin-benzeri proteazlarca tanınan proteolitik kesim bölgeleri de içermektedirler.



Şekil 2.8. DKK ve *colipase* proteinlerinin yapısal benzerliği

DKK aile üyeleri arasında en çok çalışılmış olanı DKK1'dir. DKK1'ler Wnt ile başlatılan β -katenin stabilizasyonunu baskılamaktadır. Bunun için iki model öne sürülmüştür. Birinci modelde, DKK1'ler LRP5/LRP6'nın hücre dışı domainine bağlanır. Bu yolla, Frizzled/Wnt/LRP5/LRP6 kompleksinin oluşumunu engeller. Sonuçta, Wnt aktivitesi kısıtlanır (86). İkinci modelde ise, DKK1 LRP6'nın kltrin bağımlı internalizasyonuna neden olur ve Wnt sinyal iletimi baskılanır. DKK1'in antagonistik etki mekanizması farklı hücre tiplerinde farklılık göstermektedir (87). DKK1'ler Kremen1 (Krm1) ve Kremen2 (Krm2) reseptörlerine de bağlanabilmektedirler (88,89). Bu reseptörlere yüksek afinite ile bağlanırlar ve Wnt/ β -katenin yolağını baskırlar (90).

DKK4'de DKK1 gibi LRP5/LRP6 ve Kremen reseptörlerine bağlanarak Wnt/ β -katenin yolağına karşı benzer antagonistik aktivite göstermektedir (89). DKK1 ve DKK4 aynı zamanda Wnt/ β -katenin yolağının hedefleri arasındadırlar. Dolayısı ile, Wnt/ β -katenin sinyal iletiminin düzenlenmesi için negatif geri bildirim döngüsü oluştururlar (91).

DKK1 ve DKK4 gibi DKK2 de LRP5/LRP6 ve Kremen reseptörlerine bağlanmaktadır (92).

Diğer üyelerin aksine DKK3'ün reseptörü henüz belirlenememiştir ve yolak üzerindeki etkisi hala belirsizdir. Bazı çalışmalarda DKK3'ün Wnt/ β -katenin sinyal

iletiminde gerekli olmadığı belirtilmiştir (3,93). Bu sonuçlarla zıt olarak, DKK3'ün Saos-2 osteosarkom hücrelerinde, akciğer kanserinde ve servikal kanserde β -katenin'in sitoplazmik ve nükleer birikimindeki azalması ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (94-96).

2.3. Polimorfizm ve tanımı

Polimorfizm eski Yunanca'da "**çok şekillilik**" anlamını taşımaktadır. Poli ve morfizmos kelimelerinden oluşmuştur. Bir populasyonda, farklı allellere bağlı ve genetik olarak belirlenmiş iki veya daha çok alternatif fenotipin görülmesi genetik polimorfizm olarak tanımlanmaktadır (97). Polimorfizmler insersiyon, delesyon ya da substitüsyon gibi yollarla oluşabilmektedir. Farklı habitatlarda adaptasyonun sağlanması açısından avantaj sağlayan alellere yönelik baskı sonucunda polimorfizmin ortaya çıktığı düşünülmektedir (98). Bir gen lokusu, nadir alleller en az %1 frekansında olduğu ve bu alleller için heterozigotların en az %2 oranında görülmeleri sonucunda polimorfik olarak tanımlanır. Populasyon genetiği açısından belli bir frekansa gereksinim vardır. Ancak, moleküler biyoloji çalışmaları yönünden frekansın önemi yoktur ve bir ailede dahi görülen varyant polimorfik adını almaktadır.

Polimorfizm tüm birey düzeyinde (fenotip), proteinlerin ve kan grubu bileşiklerinin varyant formlarında (biyokimyasal polimorfizm), kromozomların morfolojik özelliklerinde (kromozomal polimorfizm), DNA düzeyinde nükleotid farklılıkları (DNA polimorfizmi) şeklinde görülebilmektedir (97).

2.3.1. Tek nükleotid polimorfizmi (SNP: single nucleotide polymorphism)

Tek nükleotid polimorfizmleri (SNP) insan genomunda en çok görülen polimorfizmlerdir ve tek bir nükleotidin değişmesi sonucunda oluşmaktadırlar. İlk olarak 1980'lerde enzim kesim bölgelerinin varlığı veya yokluğunu tanımlamak amacıyla restriksiyon enzimleri kullanılarak tanımlanmıştır (98). SNP'ler, genomda yaklaşık her 1000 bazda bir tane olacak sıklıkla bulunur (99). Tek nükleotid polimorfizmleri, tek bir nükleotidin insersiyonu ya da delesyonunu da içerir. Bazıları ise restriksiyon bölgelerinde farklılıklara yol açmaktadır. İnsan genomunda kodlayan DNA dizileri yaklaşık %1,5 oranındadır ve tek nükleotid polimorfizmlerinin çoğu intron ve genler arası diziler gibi kodlama yapmayan DNA bölgelerinde oluşmaktadır (100).

2.3.2. Genetik polimorfizmin saptanmasında kullanılan yöntemler

Genetik polimorfizmlerin belirlenmesinde; PCR (Polymerase Chain Reaction: polimeraz zincir reaksiyonu), RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism: restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi), VNRT (variable number of tandem repeats: değişken ardışık tekrarlar), SSCP (single stranded conformational polymorphism: tek iplikçik yapısal çeşitlilik) laboratuvar yöntemleri kullanılmaktadır. Polimorfizm çalışmalarında elde edilen bulgular, hastalıklara yatkınlığın belirlenmesinde ve tedavinin yönlendirilmesinde önem taşımaktadır (98).

2.3.2.1. Nested PCR

Son yirmi yıl içinde özgül PCR reaksiyonlarının gerçekleştirilebilmesi için çeşitli PCR varyasyonları geliştirilmiştir. Bu varyasyonlar arasında Nested PCR da yer almaktadır. Bu yöntemde fragment amplifikasyonu için iki set primer dizisi dizayn edilir. Birinci set primerler kullanılarak standart PCR reaksiyonunda olduğu gibi bir DNA fragmenti amplifiye edilir. İkinci set ya da nested primerler olarak adlandırılan primerler birinci PCR ürünü fragmentlerinin içindeki özgül dizilere bağlanır. Böylece ilkinden daha kısa ikinci bir PCR ürünü elde edilir. Nested PCR özgül olmayan bağlanma sonucunda oluşacak istenmeyen ürünlerin oluşumunu azaltmak için tasarlanmış bir polimeraz zincir reaksiyonudur. Çünkü oluşabilecek özgül olmayan ürünlerin ikinci bir set primerle tekrar amplifiye olma olasılıkları çok düşüktür. Aynı zamanda bu yöntemle istenilen ürün miktarı da artırılmış olur (101,102).

2.3.2.2. Restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi (RFLP)

Restriksiyon enzimleri (RE), bakterial virüslerin meydana getirdiği enfeksiyonlara karşı savunma ajanları gibi işlev gören prokaryotik proteinlerdir. Bu enzimin keşfine yol açan ilk gözlemler, bazı bakteri soylarının “konakçı kontrolündeki sınırlama” (*host-controlled restriction*) olarak anılan, bakteriofaj enfeksiyonlarına bağışıklığın gösterildiği 1950’lerin başlarında yapılmıştır. Bu enzim bakterilerde doğal olarak bulunur ve bakteriyi yabancı DNA’lara karşı korumaktadır. Bugüne kadar 1200’ün üzerinde enzim tanımlanmıştır. Restriksiyon endonükleazların üç ayrı sınıfı bulunmaktadır. İşlev olarak birbirinden çok az farklılık göstermelerine rağmen, gen klonlanmasında, tip II restriksiyon endonükleazlar diğerlerine göre daha çok tercih

edilen kesici enzimlerdir. Tip II restriksiyon endonükleazlar genellikle 4, 5 veya 6 baz çifti (bç) uzunluğunda olan spesifik bir nükleotid dizisini tanır ve bu dizilerdeki metillenmemiş çift-zincirli DNA molekülünü keser (103).

RFLP, bir restriksiyon endonükleaz ile DNA'nın kesilmesi üzerine dayandırılmış bir yöntemdir. Genetik hastalıkların moleküler genetik tanısında kullanılan önemli bir yöntemdir. Enzimin tanıma dizisinde birkaç nükleotid değişimi varsa, farklı kaynaklardan alınan DNA, bazı restriksiyon enzimlerle kesildiğinde farklı uzunlukta DNA fragmentleri meydana gelir. Bu nedenle bu metod restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi olarak adlandırılmaktadır. Tüm RFLP deneyleri, bir veya daha fazla restriksiyon enzim ile DNA'yı kesmeyi kapsar. Kesilen DNA parçaları direk boyama veya otoradyografi kullanılarak jel elektroforezi aracılığıyla büyüklüklerine göre ayrılır. Küçük fragmentler büyük fragmentlere oranla jel elektroforezinde daha hızlı hareket eder. Jel üzerine yüklenecek olan, baz çifti uzunlukları bilinen bir standart ile kalibrasyon eğrisi yapılarak bilinmeyen DNA parçasının moleküler ağırlığı hesaplanabilir. Bireysel DNA'lar arasındaki farklılıkların (polimorfizm) kaynağı, bölgeye özgü enzimin tanıma bölgesi içinde meydana gelen baz substitüsyonları veya inversiyon, insersiyon ve delesyonlar gibi yeniden dizi düzenlemeleridir. Böyle değişiklikler her bir birey için karakteristik bir örneği meydana getirir ve bu durum bireyler arasındaki genetik polimorfizmi değerlendirmemizde bize yardımcı olur. RFLP analizi ile bir enzimi kodlayan gen bölgesindeki allel polimorfizmi tespit edilerek homozigot ve heterozigot allellerin sıklığı hesaplanabilir (104).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan cihazlar

- Masa üstü makro santrifüj (Mistral 1000 MSE)
- Masa üstü mikro santrifüj (Msc Micro Centaur)
- Hassas tartı (Denver Instrumen Company)
- Manyetik karıştırıcı (BIBBY Stuart)
- Vorteks (Clifton Cyclone)
- pH metre (Metle Toledo MP 2200)
- Mikrodalga fırın (BEKO MD 1500)
- Mikropipetler -10 µl, 20 µl, 200 µl ve 1000 µl- (Gilson)
- Fanlı ekonomik inkübatör (Gallenkamp)
- Spektrofotometre (UV1800 Shimatzu)
- Hot blok (Techne)
- Thermal cyler (Gen Amplifikasyon PCR 9700 applied biosystems)
- Elektroforez güç kaynağı (EC 1000-90)
- Yatay elektroforez sistemi (Whatman Biometra)
- Jel görüntüleme (Vilber lourmat photodocumentation and video graphic printer UP-895CE)
- *Laminar flow* kabin (Steril-Vbh)

3.2. Kullanılan plastik malzemeler

- 0,2 ml Mikro santrifüj tüpleri (Bio Basic Canada INC.)
- 2,0 ml Mikro santrifüj tüpleri (Isolab)
- 15 ml ve 50 ml Konik uçlu falkon Tüpleri (NEST Biotechnology)
- 0,5–10 µl Mikropipet uçları (Neptune)
- 1–200 µl, 100–1000 µl Mikropipet uçları (Thermo)
- 5 ml, 10 ml, 25 ml Plastik pipetler (LP Italiana SPA)
- DNA saklama kutusu (Heathrow)

3.3. Kullanılan kimyasal maddeler

- Tris bazı (Vivantis)
- Borik asit (BioShop)
- Asetik asit (E-Merck)
- Sodyum Klorür (Merck)
- Sodyum Dodesil Sülfat (Sigma)
- Proteinaz K (Fermentas)
- EDTA (Multicell)
- %96'lık Absolü Alkol (Riedel- de Haen)
- Primer sentezleri (Ella Biotech GmbH)
- dNTP karışımı (Fermentas)
- MgCl₂ (Fermentas)
- PCR tamponu (Fermentas)
- *Taq* DNA Polimeraz (Fermentas)
- DdeI (HpyF3I) Restriksiyon Endonükleaz (Fermentas)
- Tellow Tango tamponu (Fermentas)
- SatI (Fnu4HI) Restriksiyon Endonükleaz (Fermentas)
- G (Green) tamponu (Fermentas)
- XagI (EcoNI) Restriksiyon Endonükleaz (Fermentas)
- R (Red) tamponu (Fermentas)
- EarI (Eam1104I) Restriksiyon Endonükleaz (Fermentas)
- Agaroz (Prona)
- Formamid (Sigma)
- Xylene Cyanol (Sigma)
- Bromophenol Blue (Bio Basic Inc.)
- 100 bp DNA Ladder (Biomatik)
- 50 bp DNA Ladder (Biomatik)
- Etidyum bromür (Biomatik)

3.4. Kullanılan solüsyonlar ve tamponlar

3.4.1. TE tamponu (Tris-HCl, EDTA)

10 mM Tris-HCl 0.394 g, 1 mM Na₂EDTA 0.093 g 250 ml ultra saf suda çözdürülerek otoklavda steril edildi.

3.4.2. 10 M Amonyum asetat solüsyonu

770 g amonyum asetat 800 ml. ultra saf suda çözdürüldü ve daha sonra ultra saf su eklenerek 1000 ml.'ye tamamlandı. Filtreden geçirilerek kullanıldı.

3.4.3. %10 SDS solüsyonu

10 g SDS 80 ml ultra saf suda çözdürüldü. SDS tamamen çözüldükten sonra ultra saf su eklenerek 100 ml.'ye tamamlandı.

3.4.4. *Nuclei lysis* tamponu

10 mM Tris-HCl 1.576 g, 400 mM NaCl 23.4 g, 2mM Na₂EDTA 0.7 g tartılarak 700 ml ultra saf suda çözdürüldü ve pH 8.2'ye ayarlandı. Ultra saf su eklenerek 1000 ml'ye tamamlandı ve otoklavda steril edildi. Kullanılmak üzere +4 °C'de saklandı.

3.4.5. TAE tamponu: (50X TAE stok tamponu için)

Tris 242 g, EDTA 100 ml 0.5 M pH: 8.0, Glasiyal Asetik Asit 57.2 ml, 1000 ml bidistile su ile tamamlanarak çözdürüldü. Kullanılmak üzere oda sıcaklığında bırakıldı.

3.4.6. Yükleme tamponu (Loading dye)

Formamid (%95) 9.5 ml, Xylen Cyanol (%0.5) 0.05 g, Bromfenol Blue (%0.5) 0.05 g 15 ml'lik konik falkon santrifüj tüpü içerisine konularak vortekste karıştırıldı. Kullanılmak üzere +4 °C'de saklandı.

3.4.7. dNTP çalışma solüsyonu: (2.5 mM stok çözeltisi için)

100 mM Adenin, Timin, Guanin, Sitozin nükleotidlerinin her birinden 2.5 µl alınarak 90 µl ultra saf su ile karıştırılarak 2.5 mM'lık 100 µl dNTP çalışma solüsyonu hazırlandı.

3.4.8. Primer stoklarının hazırlanması

- İleri (*Forward*) primerleri: 100 pmol/µl'lik ana stoktan çalışma solüsyonu, konsantrasyonu 100µl 10 pmol olacak şekilde 90 µl distile suya 10 µl forward primeri eklenerek hazırlandı.
- Geri (*Reverse*) primerleri: 100 pmol/µl'lik stoktan çalışma solüsyonu konsantrasyonu 100 µl 10 pmol olacak şekilde 90 µl distile suya 10 µl reverse primeri eklenerek hazırlandı.

3.5. Çalışma grubu

3.5.1. Hasta grubu

Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi, Sağlık Hizmetleri Uygulama ve Araştırma Hastanesi Radyasyon Onkolojisi Anabilim Dalı'na 2011-2013 tarihlerinde meme kanseri ön tanısı (invaziv duktal kanser) ile yatırılarak takip ve tedavi edilmiş hastalardan meme kanseri kesin tanısı konmuş toplam 100 erişkin birey çalışmaya alınmıştır.

Kan örnekleri alınmadan önce çalışma grubunda belirtilen kriterlere sahip bireylerden, etik kurul kararı (karar no:2011/027) ile izin alınarak hazırlanan bilgilendirilmiş olur formu imzalatılmıştır (Ek-1, Ek-2 ve EK-3).

3.5.2. Kontrol grubu

Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Sağlık Hizmetleri Uygulama ve Araştırma Hastanesi Kan Bankasına 2012-2013 yılında başvuran,

- Aynı yörede bulunan,
- Yaşam özellikleri benzer,
- Yaş ve cinsiyetleri hasta grubu ile uyumlu,
- Bilinen hepatik, renal ve pankreatik yetmezlik, gastrointestinal, akut kardiyovasküler, serebrovasküler hastalık ve hipertiroidizm öyküsü mevcut

olmayan, toplam 100 sağlıklı gönüllü erişkin kadınlar arasından kontrol grubu oluşturulmuştur.

Kan örnekleri alınmadan önce kontrol grubunda belirtilen kriterlere sahip bireylerden, etik kurul kararı ile izin alınarak hazırlanan bilgilendirilmiş olur formu imzalatılmıştır (Ek-1, Ek-2 ve EK-4).

3.6. Örneklerin alınması

Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Sağlık Hizmetleri Araştırma ve Uygulama Hastanesi Radyasyon Onkolojisi kliniğine başvuran, invaziv duktal meme kanseri tanısı ile çalışmaya alınan hastalardan yatışı takiben; ayrıca hastanemiz Kan Bankası'na gelen kan donörlerinden (kontrol grubu) gerekli form ve izin belgeleri doldurtulup imzalatıldıktan sonra DNA ekstraksiyon işlemi yapılmak üzere, 4 ml periferik venöz kan alınarak -20°C'de derin dondurucuda çalışma yapılınca kadar saklanmıştır.

3.7. Kan örneklerinden DNA eldesi

Hasta ve kontrol grubuna ait 100'er bireyden alınan kan örneklerinden '*Yüksek Tuz Konsantrasyonu ile DNA İzolasyonu*' yöntemi kullanılarak DNA eldesi sağlanmıştır.

Yüksek Tuz Konsantrasyonu ile DNA eldesi

- Hasta ve kontrol gruplarından alınarak EDTA'lı steril tüplere konulan 4 ml venöz kanın üzerine kanın üç katı oranında olacak şekilde (kan ve bidistile su hacim toplamı 15 ml olacak şekilde) steril edilmiş, daha önceden +4°C'de soğutulmuş bidistile su eklenir.
- Tüplerdeki kanın su ile karışmasını sağlamak için tüp bir kaç kez hafif bir şekilde elde çalkalanır.
- 2500 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek kanın şekilli elemanlarının çökmesi sağlanır.
- Santrifüj işlemi sonrasında oluşan süpernatant atılarak dipte kalan çökelti üzerine yine üç katı hacimde olacak şekilde bidistile su konularak aynı devir ve sürede santrifüj edilir.
- Bu işlem dört kez daha tekrarlanır.
- Son yapılan santrifüjden sonra süpernatant atılır. Altta kalan çökelti üzerine hücre içeriğinin serbest kalabilmesi, hücre zarını yıkmak ve genomik

DNA'yı proteinlerden arındırmak için 100 µl %10'luk SDS, 30 µl proteinaz K (10mg/ml) ve 1500 µl *Nuclei Lysis* tamponu eklenir. Bir gece boyunca 37 °C'de etüvde bekletilir.

- Ertesi gün etüvden çıkarılan tüplerin içerisine 1000 µl, 10 M Amonyum Asetat eklenerek 10 dakika oda ısısında bekletilir. Ardından tüpler 3500 rpm'de 15 dakika santrifüj edilir.
- Süpernatant dipte kalan çökelti ile karıştırılmadan yeni bir tüpe aktarılır.
- Yeni tüpe aktarılan süpernatantın üzerine iki katı oranında olacak şekilde üzerine -20 °C'de bekletilmiş olan absolu alkol eklenir.
- Tüp hafifçe ileri-geri çalkalandığı zaman genomik DNA görünür hale gelir. İnce bir pipet ucu yardımıyla genomik DNA alınır.
- Daha önce etiketlenmiş olan ve içerisinde 250 µl TE tamponu bulunan 2 ml'lik steril tüplere elde edilen genomik DNA konulur. DNA'nın tampon içerisinde çözünmesi için bir gece oda sıcaklığında bekletilir. Elde edilen DNA örnekleri, genotipleme işlemine kadar -20 °C'de saklanır.

3.8. Genotipleme

DKK3 nonsinonim ekzon 7 Arg335Gly, DKK3 intron 4 G/C, DKK4 sinonim ekzon 4 V169V, sFRP4 nonsinonim ekzon 6 R340K gen polimorfizmleri analizi için Nested-PCR/RFLP yöntemi kullanılmıştır. PCR amplifikasyonları için kullanılan PCR tepkime karışımı çizelge 3.1'de, 1. PCR tepkime koşulları çizelge 3. 2.'de, 2. PCR tepkime koşulları çizelge 3.3.'de verilmektedir.

Ayrıca PCR tepkimesi için seçilen primer dizileri, primerlerin yapışma sıcaklıkları ve elde edilen DNA fragment uzunlukları çizelge 3. 4'de, RFLP yönteminde kullanılan restriksiyon enzimleri, RFLP sonrası elde edilen fragmentlerin uzunlukları çizelge 3. 5'de gösterilmektedir.

Bu polimorfizmler için RFLP yönteminde kullanılacak restriksiyon enzimlerinin enzime özgü tamponların isimleri ve RE tanıma bölgeleri;

DKK3 nonsinonim ekzon 7 Arg335Gly Polimorfizmi:

DdeI (*HpyF3I*) → 5'...C↓T N A G...3'
3'...G A N T↑C...5'

DKK3 intron 4 G/C Polimorfizmi:

SatI (Fnu4HI) → 5'...G C↓N G C...3'
3'...C G N↑C G...5'

DKK4 sinonim ekzon 4 V169V Polimorfizmi:

XagI (EcoNI) → 5'...C C T N N↓N N N A G G...3'
3'...G G A N N N↑N N T C C...5'

sFRP4 nonsinonim ekzon 6 R340K Polimorfizmi:

EarI (Eam1104I) → 5'...C T C T T C (N)1↓...3'
3'...G A G A A G (N)4↑...5'

3.8.1. Restriksiyon enzimleri ile yapılan tepkime karışımlarının hazırlanması

Her dört polimorfizm için elde edilen PCR örneklerinden 8 µl ependorf tüplere alınarak üzerine 1 µl RE, 1 µl X10 RE tamponu (*DdeI (HpyF3I)* ve *EarI (Eam1104I)* RE için Yellow Tango Buffer, *SatI (Fnu4HI)* RE için Green Buffer, *XagI (EcoNI)* RE için Red Buffer kullanıldı) eklenerek toplam 10 µl tepkime karışımı 37°C'de 16-20 saat bekletilerek RFLP yöntemi uygulandı.

Çizelge 3.1 Gen polimorfizmleri için 1.PCR ve 2. PCR tepkime karışımı

Solüsyonlar	Konsantrasyon (1. PCR)	Miktar (1. PCR)	Konsantrasyon (2. PCR)	Miktar (2. PCR)
PCR tamponu	1X	2.5 µl	1X	2.5 µl
dNTP karışımı	2 mM	2.5 µl	2 mM	2.5 µl
MgCl ₂	25 mM	1.5 µl	25 mM	1.5 µl
Forward primeri (1)	10 pmol	1 µl	10 pmol	1 µl
Reverse primeri (1)	10 pmol	1 µl	10 pmol	1 µl
<i>Taq</i> DNA polimeraz	5 U/µl	0.5 µl	5 U/µl	0.5 µl
dH ₂ O	-	14 µl	-	15 µl
DNA	100 ng/µl	2µl	-	-
1° PCR ürünü	-	-	-	1 µl

Çizelge 3.2 Gen polimorfizmleri için 1. PCR tepkime koşulları

Gen	Polimorfizm	Başlangıç zincir ayrılma aşaması	Zincirlerin ayrılması aşaması	Primerlerin Yapışma aşaması	Zincir Sentez aşaması	Son zincir sentez aşaması	Tepkime Döngüsü
DKK3	nonsinonim ekzon 7 Arg335Gly	94 °C—5dk	94 °C—30sn	52°C—1dk	72 °C—1 dk	72 °C—5dk	40
DKK3	intron 4 G/C	94 °C—5dk	94 °C—30sn	52°C—1dk	72 °C—1 dk	72 °C—5dk	40
DKK4	sinonim ekzon 4 V169V	95 °C—5dk	94 °C—30sn	52°C—1dk	72 °C—1 dk	72 °C—5dk	40
sFRP4	nonsinonim ekzon 6 R340K	95 °C—5dk	94 °C—30sn	52°C—1dk	72 °C—1 dk	72 °C—5dk	40

Çizelge 3.3 Gen polimorfizmleri için 2. PCR tepkime koşulları

Gen	Polimorfizm	Başlangıç zincir ayrılma aşaması	Zincirlerin ayrılması aşaması	Primerlerin Yapışma aşaması	Zincir Sentez aşaması	Son zincir sentez aşaması	Tepkime Döngüsü
DKK3	nonsinonim ekzon 7 Arg335Gly	94 °C—5dk	94 °C—30sn	58°C—1dk	72 °C—1 dk	72 °C—7dk	40
DKK3	intron 4 G/C	94 °C—5dk	94 °C—30sn	58°C—1dk	72 °C—1 dk	72 °C—7dk	40
DKK4	sinonim ekzon 4 V169V	95 °C—5dk	94 °C—30sn	58°C—1dk	72 °C—1 dk	72 °C—7dk	40
sFRP4	nonsinonim ekzon 6 R340K	95 °C—5dk	94 °C—30sn	58°C—1dk	72 °C—1 dk	72 °C—7dk	40

Çizelge 3.4 PCR tepkimesinde kullanılan primer dizileri, primerlerin yapışma sıcaklıkları ve DNA parça uzunlukları

Gen	Polimorfizm	Primer Dizileri (5'→3')		DNA parça uzunluğu (bç)	Primer yapışma sıcaklığı F (°C) R	
		İleri (<i>Forward</i>)	Geri (<i>Reverse</i>)		F	R
DKK3	nonsinonim ekzon7 Arg335Gly	1. GAGGTCCCCGATGAGTATGA	1. TAGGAAGAAGCCTGGTCAGC	242	59,4	59,4
		2. GGTCCCCGATGAGTATGAAG	2. AGCACACACCTGGGGAAATA	210	59,4	57,3
DKK3	intron 4 G/C	1. TTCCTTAGGTCCCTAGGTCCA	1. AGGGCAAAGGAGACTCTTCA	377	59,8	57,3
		2. ACAGGGCATGGCAGTTAGAG	2. CTCTTCACCCAACAGGCATT	245	59,4	57,3
DKK4	sinonim ekzon4 V169V	1. GCCATGGCATTACTGCTTTT	1. ATTGCTGGTCAATTGGCTTC	384	55,3	55,3
		2. CTGCGTGCTGTGTCTGTTTT	2. AACGCTGGAAGATTTCTGGA	292	57,3	55,3
sFRP4	nonsinonim ekzon6 R340K	1. AAGAGAGGCTGCAGGAACAG	1. TCTGTACCAAAGGGCAAACC	397	59,4	57,3
		2. AGAGCGGAGAACAGTTCAGG	2. TGGCCTTACATAGGCTGTCC	246	59,4	59,4

**Forward* (F) ve *Reverse* (R) primerleri için yapışma sıcaklıkları gösterilmiştir.

Çizelge 3.5 RFLP yönteminde kullanılan restriksiyon endonükleazlar ve RFLP sonrası DNA parça uzunlukları

Gen	Polimorfizm	Restriksiyon Endonükleaz	Homozigot Doğal Tip Allel	DNA parça uzunluğu (bç)	Homozigot Polimorfik Allel	DNA parça uzunluğu (bç)
DKK3	nonsinonim ekzon 7 Arg335Gly	<i>DdeI (HpyF3I)</i>	G alleli	210	A alleli	115+95
DKK3	intron 4 G/C	<i>SatI (Fnu4HI)</i>	G alleli	245	C alleli	171+74
DKK4	sinonim ekzon 4 V169V	<i>XagI (EcoNI)</i>	C alleli	224+68	T alleli	292
sFRP4	nonsinonim ekzon 6 R340K	<i>EaeI(Eam1104I)</i>	G alleli	134+112	A alleli	246

3.9. Jel elektroforezi

PCR ürünleri için %1'lik, RFLP ürünleri için %2'lik agaroz jel kullanıldı.

3.9.1. Agaroz jelin hazırlanması:

100 ml'lik jel tankında %1 (RFLP için %2) yoğunlukta agaroz jeli hazırlamak için 1 g (RFLP için; 2 g) agaroz tartılarak 250 ml'lik erlenmayer içine konuldu. Üzerine 50X yoğunlukta olan TAE tamponundan (Tris-HCL, Borik asit, EDTA) 1X (2 ml 50X konsantrasyonda TAE tamponuna 98 ml bidistile su eklenerek hazırlanır) yoğunlukta hazırlanan 100 ml TAE tamponu konuldu ve mikrodalga fırınında ısıtılarak berraklaşması sağlandı. Berraklaşan jelin el yakmayacak sıcaklığa düşürülmesi için akan musluk altında soğutuldu. Jel içerisine 10 µl etidium bromür (EtBr) eklenerek boyandı ve 100 ml'lik agaroz jel tankına döküldü. Kuyucuk oluşturmak için taraklar yerleştirildi ve jelin donması beklendi.

3.9.2. Agaroz jelde PCR ve RFLP ürünlerinin koşturulması

3 µl PCR ürününe 1 µl yükleme tamponu eklendi. Toplam 4 µl karışım kuyucuklara yüklendi. DNA fragmentlerinin baz çifti uzunluklarını karşılaştırmak için 50 baz çifti (bç) ve 100 bç'lik DNA belirteçleri kullanıldı. 2 µl alınan belirteç 1 µl distile su ve 1 µl yükleme tamponu ile karıştırılarak jele yüklendi. Yüklenen PCR ürünleri 100 voltta 30 dakika koşturuldu ve UV altında görüntülendi.

Toplam 10 µl olan kesim ürünlerine 3 µl yükleme tamponu eklendi ve toplam 13 µl karışım kuyucuklara yüklendi. Fragmentlerinin baz çifti uzunluklarını karşılaştırmak için 50 baz çifti (bç) ve 100 bç'lik DNA belirteçleri kullanıldı ve kesim ürünleri 100 voltta 40 dakika koşturuldu ve UV altında görüntülendi.

4. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Çalışmamızda elde edilen veriler SPSS 14.0 programına yüklenerek verilerin değerlendirilmesi yapıldı. Bu program kullanılarak, iki ortalama arasındaki farkın önemlilik testi, χ^2 testi, *Fisher Kesin χ^2* testi uygulandı. Odds oranı ve %95 güven aralıkları hesaplandı. Yanılma düzeyi 0,05 olarak alındı.

5. BULGULAR

Çalışmamızda meme kanseri ve Wnt antagonisti gen polimorfizmleri arasındaki ilişkinin araştırılması için meme kanseri tanısı konmuş 100 kadın birey hasta grubu olarak ve 100 sağlıklı kadın birey ise kontrol grubu olarak incelemeye alındı.

5. 1. Hasta ve kontrol grubunda yer alan bireylerin demografik özelliklerinin değerlendirilmesi

Hasta ve kontrol grubuna ait demografik özellikler çizelge 5.1’de verilmektedir. Hasta ve kontrol grubunda yer alan bireylerin yaş ortalamaları iki ortalama arasındaki farkın önemlilik testi ile değerlendirildi. Hasta grubunda bulunan bireylerin yaş ortalaması 47.60 ± 8.92 , kontrol grubunun yaş ortalaması ise 46.05 ± 9.84 olarak hesaplandı. Yaş yönünden gruplar arasındaki farkın önemsiz olduğu bulundu ($p=0.245$, $p>0.05$). Hasta ve kontrol grubunda yer alan bireylerin sigara ve alkol kullanımı, ailesel öyküleri, vücut kitle indeksleri (VKI), ilk menarş yaşları ile menapoza girme durumları arasında fark olup olmadığı Fisher Kesin χ^2 testine göre değerlendirildi. Hasta ve kontrol grubunda sigara içen bireylerin yüzdesinin sırası ile %11 ve %8, sigara içmeyenlerin yüzdesinin ise sırası ile %89 ve %92 olduğu belirlendi. Her iki grup arasında sigara kullanımı açısından anlamlı bir fark bulunmadı ($p=0.463$, $p>0.05$). Hasta grubunda alkol kullanan birey bulunmazken, kontrol grubunda alkol kullanan bireylerin oranının %2, alkol kullanmayan bireylerin oranının ise %98 olduğu belirlendi. Her iki grup arasında alkol kullanımı açısından anlamlı bir fark bulunmadı ($p=0.497$, $p>0.05$). Hasta grubunda bulunan bireylerde ailesinde kanser öyküsü olanların yüzdesinin %23 olduğu belirlenirken, ailesinde kanser öyküsü olmayanların yüzdesinin ise hasta grubunda %77 ve kontrol grubunda %100 olduğu belirlendi. Gruplar arasında ailesinde meme kanseri öyküsü bulunması açısından anlamlı bir fark bulundu ($p=0.001$, $p<0.05$). Gruplar arasında VKI değerlendirdiği zaman değerinin $<25 \text{ kg/m}^2$ olduğu hasta birey yüzdesinin %9, kontrol grubu bireylerinin yüzdesinin ise %35 olduğu saptandı. VKI değerinin $\geq 25 \text{ kg/m}^2$ olduğu hasta grubu bireylerinin yüzdesinin %91, kontrol grubu bireylerinin yüzdesinin ise %65 olduğu belirlendi. Gruplar arasında VKI yönünden anlamlı bir fark olduğu bulundu ($p=0.001$, $p<0.05$). Hasta ve kontrol grubunda yer alan bireylerin ilk menarş yaşının 13’den küçük olan bireylerin yüzdesinin sırası ile %23 ve %26 olduğu, 13 yaş ve üzeri olan bireylerin yüzdesinin ise sırası ile %77 ve %74

olduğu belirlendi. İlk menarş yaşı yönünden gruplar arasında anlamlı bir fark olmadığı bulundu ($p=0.622$, $p>0.05$). Menapoza girmeyen hastaların yüzdesinin %31, kontrol grubu bireylerinin yüzdesinin %77 olduğu, menapoza girenlerin ise sırası ile %69 ve %23 olduğu belirlendi. Menapoz durumu yönünden gruplar arasında anlamlı bir fark olduğu bulundu ($p=0.001$, $p<0.05$).

Çizelge 5.1 Hasta ve kontrol grubuna ait demografik özelliklerin karşılaştırılması.

Değişkenler	Hasta (n:100)	Kontrol (n:100)	p değeri
Yaş Ortalaması	47.60 ± 8.92	46.05 ± 9.84	.245
Sigara Kullanımı			
İçiyor	11	8	.463
İçmiyor	89	92	
Alkol Kullanımı			
İçiyor	0	2	.497
İçmiyor	100	98	
Ailede Meme Kanseri Öyküsü			
Var	23	0	.001*
Yok	77	100	
VKI			
<25kg/m ²	9	35	.001*
≥25kg/m ²	91	65	
İlk Menarş			
<13 yaş	23	26	.622
≥13 yaş	77	74	
Menapoz			
premenapoz	31	77	.001*
postmenapoz	69	23	

* $p < 0.05$

5.2. Meme kanseri hastalarında klinikopatolojik verilerin dağılımı

Hasta grubundaki bireylerin klinikopatolojik verilerinin dağılımı çizelge 5.2, 5.3, 5.4 ve 5.5’de verilmektedir.

Hasta grubu primer tümör dereceleri incelendiğinde yüzde dağılımların şu şekilde olduğu belirlendi; pT1 (en büyük çapı ≤ 2.0 cm. tümör) %28, pT2 (tümör çapı > 2.0 cm., ancak ≤ 5.0 cm.) %54, pT3 (tümör çapı > 5.0 cm.) %14 ve pT4 (dokulara direkt yayılımı olan her hangi büyüklükte tümör) %1. Değerlendirilemeyen primer tümör (pT_x) yüzdesi ise %3 olarak belirlendi (çizelge 5.2).

Çizelge 5.2 Meme kanseri hastalarında tümör derecelerinin dağılımı

Patolojik tümör sınıflandırması (pT)	n(%)
pT ₁	28 (%28)
pT ₂	54 (%54)
pT ₃	14 (%14)
pT ₄	1 (%1)
pT _x	3 (%3)

Hasta grubu bölgesel lenf nodülleri genel bilgiler kısmında verilmiş olan TNM evreleme sistemi baz alınarak incelendiğinde yüzde dağılımlarının şu şekilde olduğu belirlendi; N0 %28, N1 %35, N2 %13 ve N3 %21. Değerlendirilemeyen nodal tutulum (N_x) yüzdesi ise %3 olarak belirlendi (çizelge 5.3).

Çizelge 5.3 Meme kanseri hastalarında bölgesel lenf nodu dağılımı

Bölgesel lenf nodu (N)	n(%)
N ₀	28 (%28)
N ₁	35 (%35)
N ₂	13 (%13)
N ₃	21 (%21)
N _x	3 (%3)

Hasta grubundaki bireylerde uzak metastaz bulunmayan (M_0) ve bulunan (M_1) bireylerin yüzdeleri sırası ile %80 ve %20 olarak belirlendi (çizelge 5.4).

Çizelge 5.4 Meme kanseri hastalarında uzak metastaz dağılımı

Uzak metastaz (M)	n(%)
M_0	80 (%80)
M_1	20 (%20)

Hasta grubu bireylerindeki histolojik grad dağılımı ise çizelge 5.5’de verilmektedir.

Çizelge 5.5 Meme kanseri hastalarında histolojik grad dağılımı

Histolojik Grad	n(%)
1	28 (%28)
2	51 (%51)
3	21 (%21)

5.3. Polimorfizimlerin PCR-RFLP yöntemi ile değerlendirmesi

5.3.1. *DKK3* nonsinonim ekzon 7 Arg335Gly polimorfizmi

Hasta ve kontrol grubunda yer alan bireylerin tam kanlarından elde edilen DNA’lar kullanılarak yapılan Nested-PCR sonrası 210 bç büyüklüğünde bir DNA parçası elde edildi. Elde edilen GG doğal tipine ait PCR ürünüde, *DdeI* (*HpyF3I*) restriksiyon endonükleaz enzimi için tanıma bölgesi bulunmamaktadır. Homozigot GG doğal genotipinde; restriksiyon endonükleaz ile muamele edildiğinde, PCR ürünü kesilmemektedir. Dolayısıyla, 210 bç uzunluğunda DNA parçası elde edildi. G nükleotidinin yerini A nükleotidinin alması sonucunda *DdeI* (*HpyF3I*) restriksiyon endonükleaz enzimi için bir tanıma bölgesi oluşmaktadır ve enzim 210 bç’lik DNA parçasını bir bölgeden kesmektedir. Sonuçta AA polimorfik genotipi için 115+95 bç uzunluklarında iki DNA parçası elde edilir. Heterozigot GA genotipinde ise 210+115+95 bç uzunluklarında DNA parçaları elde edildi (şekil 5.1).

5. 3. 2. DKK3 intron 4 G/C polimorfizmi

Hasta ve kontrol grubunda yer alan bireylerin tam kanlarından elde edilen DNA'lar kullanılarak yapılan Nested-PCR sonrası 245 bç büyüklüğünde bir DNA parçası elde edildi. Elde edilen GG doğal tipine ait PCR ürününde, *SatI (Fnu4HI)* restriksiyon endonükleaz enzimi için tanıma bölgesi bulunmamaktadır. Homozigot GG doğal genotipinde; restriksiyon endonükleaz ile muamele edildiğinde, PCR ürünü kesilmemektedir. Dolayısıyla, 245 bç uzunluğunda DNA parçası elde edildi. G nükleotidinin yerini C nükleotidinin alması sonucunda *SatI (Fnu4HI)* restriksiyon endonükleaz enzimi için bir tanıma bölgesi oluşmaktadır ve enzim 245 bç'lik DNA parçasını bir bölgeden kesmektedir. Sonuçta CC polimorfik genotipi için 171+74 bç uzunluklarında iki DNA parçası elde edilir. Heterozigot GC genotipinde ise 245+171+74 bç uzunluklarında DNA parçaları elde edildi (şekil 5.1).

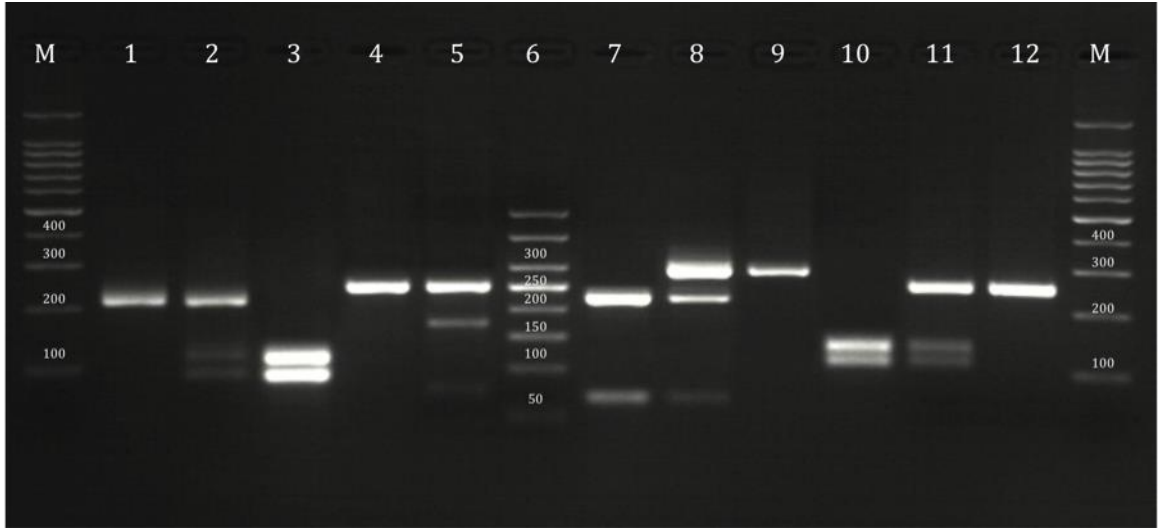
5. 3. 3. DKK4 sinonim ekzon 4 V169V polimorfizmi

Hasta ve kontrol grubunda yer alan bireylerin tam kanlarından elde edilen DNA'lar kullanılarak yapılan Nested-PCR sonrası 292 bç büyüklüğünde bir DNA parçası elde edildi. Elde edilen CC doğal tipine ait PCR ürününde, *XagI (EcoNI)* restriksiyon endonükleaz enzimi için bir tanıma bölgesi bulunmaktadır. Homozigot CC doğal genotipi restriksiyon endonükleaz ile muamele edildiğinde, PCR ürünü bir bölgeden kesilmektedir. Sonuçta, 224+68 bç uzunluğunda DNA parçaları elde edildi. C nükleotidinin yerini T nükleotidinin alması sonucunda *XagI (EcoNI)* restriksiyon endonükleaz enzimi için tanıma bölgesi kaybolmaktadır ve enzim TT polimorfik tipine ait PCR ürününü kesemediğinden 292 bç'lik DNA parçası elde edildi. Heterozigot CT genotipinde ise 292+224+68 bç uzunluklarında DNA parçaları elde edildi (şekil 5.1).

5. 3. 4. sFRP4 nonsinonim ekzon 6 R340K polimorfizmi

Hasta ve kontrol grubunda yer alan bireylerin tam kanlarından elde edilen DNA'lar kullanılarak yapılan Nested-PCR sonrası 246 bç büyüklüğünde bir DNA parçası elde edildi. Elde edilen GG doğal tipine ait PCR ürününde, *EarI(Eam1104I)* restriksiyon endonükleaz enzimi için bir tanıma bölgesi bulunmaktadır. Homozigot GG doğal genotipi restriksiyon endonükleaz ile muamele edildiğinde, PCR ürünü bir bölgeden kesilmektedir. Sonuçta, 134+112 bç uzunluğunda DNA parçaları elde edildi. G

nükleotidinin yerini A nükleotidinin alması sonucunda *EarI*(*Eam1104I*) restriksiyon endonükleaz enzimi için tanıma bölgesi kaybolmaktadır ve enzim AA polimorfik tipine ait PCR ürününü kesemediğinden 246 bç'lik DNA parçası elde edildi. Heterozigot GA genotipinde ise 246+134+112 bç uzunluklarında DNA parçaları elde edildi (şekil 5.1).



Şekil 5.1. *DKK3* nonsinonim ekzon 7 Arg335Gly, *DKK3* intron 4 G/C, *DKK4* sinonim ekzon 4 V169V, *sFRP4* nonsinonim ekzon 6 R340K polimorfizimlerinin RFLP sonuçlarının agaroz jelde görüntülenmesi;

Sol ve sağ başta bulunan belirteçler: 100 bç DNA belirteci

1-3: *DKK3* nonsinonim ekzon 7 Arg335Gly {1:GG (210 bç), 2:GA (210+115+95 bç), 3: AA (115+95 bç) }

4-5: *DKK3* intron 4 G/C {4:GG (245 bç), 5:GC (210+171+74 bç) }

6: 50 bç DNA belirteci

7-9: *DKK4* sinonim ekzon 4 V169V {7: CC (224+68 bç), 8: CT (292+224+68 bç),

9: TT (292 bç) }

10-12: *sFRP4* nonsinonim ekzon 6 R340K {10: GG (134+112 bç), 11: GA (246+134+112 bç), 12: AA (246 bç) }

5.4. Genotip dağılımlarının istatistiksel değerlendirmesi

5.4.1. *DKK3* nonsinonim ekzon 7 Arg335Gly polimorfizmi için;

DKK3 nonsinonim ekzon 7 Arg335Gly polimorfizmi açısından değerlendirilen hasta grubunda GG, GA ve AA genotiplerinin sıklıkları χ^2 testi ile hesaplandı ve sırasıyla;

%76, %23 ve %1 olarak tespit edildi. Kontrol grubunda bu genotiplerin sıklıkları ise sırasıyla; %79, %20 ve %1'dir.

Hasta ve kontrol grubuna ait genotip, allel sıklıkları ve OR değerleri çizelge 5.6.'da verilmiştir. Hasta ve kontrol gruplarındaki allel frekansları sırası ile G alleli için 0.875 ve 0.89, A alleli için ise 0.125 ve 0.11 olarak belirlendi. Allel dağılımı göz önüne alındığında gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($\chi^2=0,21$, $p=0.641$). *DKK3* nonsinonim ekzon 7 Arg335Gly polimorfizmi için GG genotipi doğal tip olduğundan referans olarak değerlendirildi. GG, GA, AA ve GA+AA genotip dağılımları karşılaştırılarak meme kanserinin ortaya çıkmasında bir risk faktörü olup olmadıkları değerlendirildi. Genotiplerin dağılımı açısından da gruplar karşılaştırıldığında anlamlı bir fark bulunmadığı belirlendi ($p>0.05$).

Çizelge 5.6. *DKK3* nonsinonim ekzon 7 Arg335Gly polimorfizmi için hasta ve kontrol grubuna ait genotip, allel sıklıkları ve OR değerleri

Polimorfizm	Genotip ve Alleler	Hasta n (%)	Kontrol n (%)	P	OR (%95 CI)
<i>DKK3</i> nonsinonim ekzon 7 (Arg335Gly)	GG	76 (%76)	79 (%79)		Referans
	GA	23 (%23)	20 (%20)	.605	1.19 (0,60-2,35)
	AA	1 (%1)	1 (%1)	.740	1.03 (0,06-16,9)
	GA+AA	24 (%24)	21 (%21)	.611	1.18 (0,61-2,31)
	G	175(%87.5)	178 (%89)		Referans
	A	25 (%12.5)	22 (%11)	.641	1.15 (0,62-2,12)

5.4.2. *DKK3* intron 4 G/C polimorfizmi için;

DKK3 intron 4 G/C polimorfizmi açısından değerlendirilen hasta grubunda GG, GC ve CC genotiplerinin sıklıkları χ^2 testi ile hesaplandı ve sırasıyla; %83, %17 ve %0 olarak tespit edildi. Kontrol grubunda bu genotiplerinin sıklıkları ise sırasıyla; %84, %16 ve %0'dır.

Hasta ve kontrol grubuna ait genotip, allel sıklıkları ve OR değerleri çizelge 5.7.'de verilmiştir. Hasta ve kontrol gruplarındaki allel frekansları sırası ile G alleli için 0.915 ve 0.92, C alleli için ise 0.085 ve 0.08 olarak belirlendi. Allel dağılımı göz önüne alındığında gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($\chi^2=0,33$, $p=0.856$). *DKK3*

intron 4 G/C polimorfizmi için GG genotipi doğal tip olduğundan referans olarak değerlendirildi. GG, GC, CC ve GC+CC genotip dağılımları karşılaştırılarak meme kanserinin ortaya çıkmasında bir risk faktörü olup olmadıkları değerlendirildi. Genotiplerin dağılımı açısından da gruplar karşılaştırıldığında anlamlı bir fark bulunmadığı belirlendi ($p>0.05$).

Çizelge 5.7. *DKK3* intron 4 G/C polimorfizmi için hasta ve kontrol grubuna ait genotip, allel sıklıkları ve OR değerleri

Polimorfizm	Genotip ve Alleler	Hasta n (%)	Kontrol n (%)	P	OR (%95 CI)
<i>DKK3</i> intron 4 G/C	GG	83 (%83)	84 (%84)		Referans
	GC	17 (%17)	16 (%16)	.849	1.07 (0,50-2,27)
	CC	0 (%0)	0 (%0)		
	GC+CC	17 (%17)	16 (%16)	.849	1.07 (0,50-2,27)
	G	183(%91.5)	184 (%92)		Referans
	C	17 (%8.5)	16 (%8)	.856	1.06 (0,52-2,17)

5.4.3. *DKK4* sinonim ekzon 4 V169V polimorfizmi için

DKK4 sinonim ekzon 4 V169V polimorfizmi açısından değerlendirilen hasta grubunda CC, CT ve TT genotiplerinin sıklıkları χ^2 testi ile hesaplandı ve sırasıyla; %75, %25 ve %0 olarak tespit edildi. Kontrol grubunda bu genotiplerin sıklıkları ise sırasıyla; %40, %37 ve %23'dür.

Hasta ve kontrol grubuna ait genotip, allel sıklıkları ve OR değerleri çizelge 5.8.'de verilmiştir. Hasta ve kontrol gruplarındaki allel frekansları sırası ile C alleli için 0.881 ve 0.585, T alleli için ise 0.119 ve 0.415 olarak belirlendi. Allel dağılımı göz önüne alındığında gruplar arasında anlamlı bir fark olduğu bulundu ($\chi^2=42,66$, $p=0.001$). *DKK4* sinonim ekzon 4 V169V polimorfizmi için CC genotipi doğal tip olduğundan referans olarak değerlendirildi. CC, CT, TT ve CT+TT dağılımları karşılaştırılarak meme kanserinin ortaya çıkmasında bir risk faktörü olup olmadıkları değerlendirildi. Genotiplerin dağılımı açısından gruplar karşılaştırıldığında anlamlı bir fark bulunduğu belirlendi ($p<0.05$). İstatistiksel değerlendirme sonucunda OR değerleri incelendiğinde bu değerlerin '1'in altında oldukları ve buna göre TT genotipinin ve T allelinin meme kanserine karşı koruyucu oldukları belirlendi.

Çizelge 5.8. *DKK4* sinonim ekzon 4 V169V polimorfizmi için hasta ve kontrol grubuna ait genotip, allel sıklıkları ve OR değerleri

Polimorfizm	Genotip ve Alleler	Hasta n (%)	Kontrol n (%)	P	OR (%95 CI)
<i>DKK4</i> sinonim ekzon 4 V169V	CC	75 (%75)	40 (%40)		Referans
	CT	25 (%25)	37 (%37)	.001*	0.36 (0,19-0,68)
	TT	0 (%0)	23 (%23)		
	CT+TT	25 (%25)	60 (%60)	.001*	0.22 (0,12-0,40)
	C	175(%88.1)	117(%58.5)		Referans
	T	25 (%11.9)	83 (%41.5)	.001*	0.20 (0,12-0,33)

* p < 0.05

5.4.4. *sFRP4* nonsinonim ekzon 6 R340K polimorfizmi için

sFRP4 nonsinonim ekzon 6 R340K polimorfizmi açısından değerlendirilen hasta grubunda GG, GA ve AA genotiplerinin sıklıkları χ^2 testi ile hesaplandı ve sırasıyla; %47, %40 ve %13 olarak tespit edildi. Kontrol grubunda bu genotiplerinin sıklıkları ise sırasıyla; %44, %48 ve %8'dir.

Hasta ve kontrol grubuna ait genotip, allel sıklıkları ve OR değerleri çizelge 5.9.'da verilmiştir. Hasta ve kontrol gruplarındaki allel frekansları sırası ile G alleli için 0.67 ve 0.68, A alleli için ise 0.33 ve 0.32 olarak belirlendi. Allel dağılımı göz önüne alındığında gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($\chi^2=0,046$, p=0.831). *sFRP4* nonsinonim ekzon 6 R340K polimorfizmi için GG genotipi doğal tip olduğundan referans olarak değerlendirildi. GG, GA, AA ve GA+AA genotip dağılımları karşılaştırılarak meme kanserinin ortaya çıkmasında bir risk faktörü olup olmadıkları değerlendirildi. Genotiplerinin dağılımı açısından da gruplar karşılaştırıldığında anlamlı bir fark bulunmadığı belirlendi (p>0.05).

Çizelge 5.9. *sFRP4* nonsinonim ekzon 6 R340K polimorfizmi için hasta ve kontrol grubuna ait genotip, allel sıklıkları ve OR değerleri

Polimorfizm	Genotip ve Alleler	Hasta n (%)	Kontrol n (%)	P	OR (%95 CI)
<i>sFRP4</i> nonsinonim ekzon 6 R340K	GG	47 (%47)	44 (%44)		Referans
	GA	40 (%40)	48 (%48)	.407	0.78 (0,43-1,40)
	AA	13 (%13)	8 (%8)	.396	1.52 (0,57-4,02)
	GA+AA	53 (%53)	56 (%56)	.670	0.88 (0,50-1,54)
	G	134 (%67)	136 (%68)		Referans
	A	66 (%33)	64 (%32)	.831	1.04 (0,68-1,59)

5.5. Genotip dağılımlarının klinikopatolojik parametreler ile karşılaştırılması

Hasta grubunda yer alan bireylerin genotip dağılımlarının klinikopatolojik faktörler ile ilişkisi değerlendirildi.

5.5.1. *DKK3* nonsinonim ekzon 7 Arg335Gly polimorfizminin klinikopatolojik faktörler üzerine etkisi

DKK3 ekzon 7’de oluşan tek nükleotid polimorfizminin histolojik grad üzerine etkisi χ^2 testi ile hesaplandı (Çizelge 5.10). Buna göre histolojik gradları 1 olan bireylerin GG, GA, AA ve GA+AA genotiplerinin sıklıkları sırası ile %82,1, %17,9, %0 ve %17,9 olarak tespit edildi. Histolojik gradları iki olan bireylerin genotip sıklıkları sırasıyla %80,4, %17,6, %2,0 ve %19,6 olarak belirlendi. Histolojik gradları 3 olanlarınki ise sırasıyla %57,1, %42,9, %0 ve %42,9 olarak hesaplandı. İstatistiksel analiz sonucunda genotip farklılıklarının histolojik grad üzerine etkisi olmadığı saptandı.

Çizelge 5.10. *DKK3* nonsinonim ekzon 7 Arg335Gly polimorfizminin histolojik grad üzerine etkisi

Polimorfizm	Genotip	Histolojik Grad 1 n (%)	Histolojik Grad 2 n (%)	Histolojik Grad 3 n (%)	χ^2 ve P
<i>DKK3</i> nonsinonim ekzon 7 (Arg335Gly)	GG	23 (%82,1)	41 (%80,4)	12 (%57,1)	6,79; 0,149
	GA	5 (%17,9)	9 (%17,6)	9 (%42,9)	
	AA	0 (%0)	1 (%2,0)	0 (%0)	0,43; 0,074
	GA+AA	5 (%17,9)	10 (%19,6)	9 (%42,9)	

DKK3 ekzon 7’de oluşan tek nükleotid polimorfizminin primer tümör evreleri üzerine etkisi χ^2 testi ile hesaplandı (Çizelge 5.11). Buna göre, 1. evrede olan hastalarda GG, GA, AA ve GA+AA genotiplerinin sıklıkları sırası ile %64,3, %32,1, %3,6 ve %35,7 olarak tespit edildi. 2. evre primer tümürlü hastalarda genotip sıklıkları sırasıyla %75,9, %24,1, %0 ve %24,1 olarak belirlendi. 3. evre primer tümürlü hastalarda ise bu oranlar %92,9, %7,1, %0 ve %7,1’dir. 4. evre primer tümürlü bireylerde ve tümör derecesi belirlenememiş (pT_x) olan bireylerde ise sadece GG genotipi belirlendi. İstatistiksel analiz sonucunda genotip farklılıklarının tümör evre gelişimi üzerine etkisi olmadığı saptandı.

Çizelge 5.11. *DKK3* nonsinonim ekzon 7 Arg335Gly polimorfizminin primer tümör evresi üzerine etkisi

Polimorfizm	Genotip	Evre 1 n (%)	Evre 2 n (%)	Evre 3 n (%)	Evre 4 n (%)	pT _x n (%)	χ^2 ve P
<i>DKK3</i> nonsinonim ekzon 7 (Arg335Gly)	GG	18 (%64,3)	41 (%75,9)	13 (%92,9)	1 (%100)	3 (%100)	7,39; 0,494
	GA	9 (%32,1)	13 (%24,1)	1 (%7,1)	0 (%0)	0 (%0)	
	AA	1 (%3,6)	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)	5,55; 0,235
	GA+AA	10 (%35,7)	13 (%24,1)	1 (%7,1)	0 (%0)	0 (%0)	

DKK3 ekzon 7'de oluşan tek nükleotid polimorfizminin lenf nodül tutulumu üzerine etkisi χ^2 testi ile hesaplandı (Çizelge 5.12). Buna göre, lenf nodül tutulumu gözlenmeyen hastaların GG, GA, AA ve GA+AA genotip sıklıkları sırası ile %64,3, %35,7, %0 ve %35,7 olarak tespit edildi. 1. Evre lenf tutulumuna sahip hastalarda ise sırasıyla %85,7, %14,3, %0 ve %14,3 olduğu belirlendi. 2. evre lenf tutulumu gözlenen hastalarda genotip sıklıkları sırasıyla %76,9, %23,1, %0 ve %23,1 olarak belirlendi. 3. evre lenf tutulumu gözlenen hastalarda ise bu oranlar %71,4, %23,8, %4,8 ve %28,6'dır. Lenf tutulum derecesi belirlenememiş (pN_x) olan bireylerde ise sadece GG genotipi belirlendi. İstatistiksel analiz sonucunda genotip farklılıklarının lenf nodül tutulumu üzerine etkisi olmadığı saptandı.

Çizelge 5.12. *DKK3* nonsinonim ekzon 7 Arg335Gly polimorfizminin lenf nodül tutulumu üzerine etkisi

Polimorfizm	Genotip	Lenf nodül tutulumu yok n (%)	Evre 1	Evre 2	Evre 3	pN _x	χ^2 ve P
			n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	
<i>DKK3</i> nonsinonim ekzon 7 (Arg335Gly)	GG	18 (%64,3)	30 (%85,7)	10 (%76,9)	15 (%71,4)	3 (%100)	8,80; 0,359
	GA	10 (%35,7)	5 (%14,3)	3 (%23,1)	5 (%23,8)	0 (%0)	
	AA	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)	1 (%4,8)	0 (%0)	
	GA+AA	10 (%35,7)	5 (%14,3)	3 (%23,1)	6 (%28,6)	0 (%0)	

DKK3 ekzon 7'de oluşan tek nükleotid polimorfizminin patolojik metastaz durumu üzerine etkisi χ^2 testi ile hesaplandı (Çizelge 5.13). Buna göre, uzak metastazı olan hastalarda GG, GA, AA ve GA+AA genotiplerinin sıklıkları sırası ile %90, %5, %5 ve %90 olarak tespit edildi. Uzak metastaz görülmeyen hastalarda genotip sıklıkları ise sırasıyla %72,5, %27,5, %0 ve %10 olarak belirlendi. İstatistiksel analiz sonucunda genotip farklılıklarının uzak metastaz oluşumu üzerine etkisi olduğu saptandı.

Çizelge 5.13. *DKK3* nonsinonim ekzon 7 Arg335Gly polimorfizminin patolojik metastaz durumu üzerine etkisi

Polimorfizm	Genotip	Metastaz Var n (%)	Metastaz Yok n (%)	χ^2 ve P
<i>DKK3</i> nonsinonim ekzon 7 (Arg335Gly)	GG	18 (%90)	58 (%72,5)	8,16; 0,017*
	GA	1 (%5)	22 (%27,5)	
	AA	1 (%5)	0 (%0)	2,68; 0,144
	GA+AA	18 (%90)	2 (%10)	

* p < 0.05

5.5.2. *DKK3* intron 4 G/C polimorfizminin klinikopatolojik faktörler üzerine etkisi

DKK3 intron 4’de oluşan tek nükleotid polimorfizminin histolojik grad üzerine etkisi χ^2 testi ile hesaplandı (Çizelge 5.14). Buna göre histolojik gradları 1 olan bireylerin GG ve GC genotiplerinin sıklıkları sırası ile %89,3 ve %10,7 olarak tespit edildi. Histolojik gradları 2 olan bireylerin genotip sıklıkları sırasıyla %82,4 ve %17,6 olarak belirlendi. Histolojik gradları 3 olanları ise sırasıyla %76,2 ve %23,8 olarak hesaplandı. Hasta grubunda CC polimorfik genotipine hiç rastlanmadığından GC+CC genotip frekansları birleştirilerek bir istatistiksel analiz yapılmadı. İstatistiksel analiz sonucunda genotip farklılıklarının histolojik grad üzerine etkisi olmadığı saptandı.

Çizelge 5.14. *DKK3* intron 4 G/C polimorfizminin histolojik grad üzerine etkisi

Polimorfizm	Genotip	Histolojik Grad 1 n (%)	Histolojik Grad 2 n (%)	Histolojik Grad 3 n (%)	χ^2 ve P
<i>DKK3</i> intron 4 G/C	GG	23 (%82,1)	41 (%80,4)	12 (%57,1)	1,48; 0,475
	GC	5 (%17,9)	9 (%17,6)	9 (%42,9)	

DKK3 intron 4’de oluşan tek nükleotid polimorfizminin primer tümör evreleri üzerine etkisi χ^2 testi ile hesaplandı (Çizelge 5.15). CC genotipine hasta grubunda rastlanmadığından istatistiksel değerlendirmeye alınmadı. Buna göre, 1. evrede olan hastalarda GG, GC genotiplerinin sıklıkları sırası ile %78,6, %21,4 olarak tespit edildi.

2. evre primer tümörlü hastalarda genotip sıklıkları sırasıyla %83,3, %16,7 olarak belirlendi. 3. evre primer tümörlü hastalarda ise bu oranlar %85,7, %2'dir. 4. evre primer tümörlü bireylerde ve tümör derecesi belirlenememiş (pT_x) olan bireylerde ise sadece GG genotipi belirlendi. İstatistiksel analiz sonucunda genotip farklılıklarının tümör evre gelişimi üzerine etkisi olmadığı saptandı.

Çizelge 5.15. *DKK3* intron 4 G/C polimorfizminin primer tümör evresi üzerine etkisi

Polimorfizm	Genotip	Evre 1 n (%)	Evre 2 n (%)	Evre 3 n (%)	Evre 4 n (%)	pT _x n (%)	χ ² ve P
<i>DKK3</i> intron 4 G/C	GG	22 (%78,6)	45 (%83,3)	12 (%85,7)	1 (%100)	3 (%100)	1,28; 0,864
	GC	6 (%21,4)	9 (%16,7)	2 (%14,3)	0 (%0)	0 (%0)	

DKK3 intron 4'de oluşan tek nükleotid polimorfizminin lenf nodül tutulumu üzerine etkisi χ² testi ile hesaplandı (Çizelge 5.16). Buna göre, lenf nodül tutulumu gözlenmeyen hastaların GG ve GC genotip sıklıkları sırası ile %78,6, %21,4 olarak tespit edildi. 1. Evre lenf tutulumuna sahip hastalarda ise sırasıyla %85,7, %14,3 olduğu belirlendi. 2. evre lenf tutulumu gözlenen hastalarda genotip sıklıkları sırasıyla %84,6, %23,1 olarak belirlendi. 3. evre lenf tutulumu gözlenen hastalarda ise bu oranlar %81 ve %19'dur. Lenf tutulum derecesi belirlenememiş (pN_x) olan bireylerde ise sadece GG genotipi belirlendi. İstatistiksel analiz sonucunda genotip farklılıklarının lenf nodül tutulumu üzerine etkisi olmadığı saptandı.

Çizelge 5.16. *DKK3* intron 4 G/C polimorfizminin lenf nodül tutulumu üzerine etkisi

Polimorfizm	Genotip	Lenf nodül tutulumu yok n (%)	Evre 1 n (%)	Evre 2 n (%)	Evre 3 n (%)	pN _x n (%)	χ ² ve P
<i>DKK3</i> intron 4 G/C	GG	22 (%78,6)	30 (%85,7)	11 (%84,6)	17 (%81)	3 (%100)	1,27; 0,866
	GC	6 (%21,4)	5 (%14,3)	2 (%15,4)	4 (%19)	0 (%0)	

DKK3 intron 4’de oluşan tek nükleotid polimorfizminin patolojik metastaz durumu üzerine etkisi χ^2 testi ile hesaplandı (Çizelge 5.17). Buna göre, uzak metastazı olan hastalarda GG, GC genotiplerinin sıklıkları sırası ile %90 ve %10 olarak tespit edildi. Uzak metastaz görülmeyen hastalarda genotip sıklıkları ise sırasıyla %81,3 ve %18,8 olarak belirlendi. İstatistiksel analiz sonucunda genotip farklılıklarının uzak metastaz oluşumu üzerine etkisi olmadığı saptandı.

Çizelge 5.17. *DKK3* intron 4 G/C tek nükleotid polimorfizminin patolojik metastaz durumu üzerine etkisi

Polimorfizm	Genotip	Metastaz Var n (%)	Metastaz Yok n (%)	χ^2 ve P
<i>DKK3</i> intron 4 G/C	GG	18 (%90)	65 (%81,3)	0,86; 0,356
	GC	2 (%10)	15 (%18,8)	

5.5.3. *DKK4* sinonim ekzon 4 V169V polimorfizminin klinikopatolojik faktörler üzerine etkisi

DKK4 ekzon 4’de oluşan tek nükleotid polimorfizminin histolojik grad üzerine etkisi χ^2 testi ile hesaplandı (Çizelge 5.18). Buna göre histolojik gradları 1 olan bireylerin CC ve CT genotiplerinin sıklıkları sırası ile %64,3 ve %35,7 olarak tespit edildi. Histolojik gradları 2 olan bireylerin genotip sıklıkları sırasıyla %74,5 ve %25,5 olarak belirlendi. Histolojik gradları 3 olanları ise sırasıyla %90,5 ve %9,5 olarak hesaplandı. Hasta grubunda TT polimorfik genotipine hiç rastlanmadığından CC+TT genotip frekansları birleştirilerek bir istatistiksel analiz yapılmadı. İstatistiksel analiz sonucunda genotip farklılıklarının histolojik grad üzerine etkisi olmadığı saptandı.

Çizelge 5.18. *DKK4* sinonim ekzon 4 V169V polimorfizminin histolojik grad üzerine etkisi

Polimorfizm	Genotip	Histolojik Grad 1 n (%)	Histolojik Grad 2 n (%)	Histolojik Grad 3 n (%)	χ^2 ve P
<i>DKK4</i> sinonim ekzon 4 V169V	CC	18 (%64,3)	38 (%74,5)	19 (%90,5)	4,40; 0,111
	CT	10 (%35,7)	13 (%25,5)	2 (%9,5)	

DKK4 ekzon 4'de oluşan tek nükleotid polimorfizminin primer tümör evreleri üzerine etkisi χ^2 testi ile hesaplandı (Çizelge 5.19). TT genotipine hasta grubunda rastlanmadığından istatistiksel değerlendirmeye alınmadı. Buna göre, 1. evrede olan hastalarda CC, CT genotiplerinin sıklıkları sırası ile %75, %25 olarak tespit edildi. 2. evre primer tümörlü hastalarda genotip sıklıkları sırasıyla %72,2 ve %27,8 olarak belirlendi. 3. evre primer tümörlü hastalarda ise bu oranlar %78,6 ve %21,4'dür. 4. evre primer tümörlü bireylerde ve tümör derecesi belirlenememiş (pT_x) olan bireylerde ise sadece CC genotipi belirlendi. İstatistiksel analiz sonucunda genotip farklılıklarının tümör evre gelişimi üzerine etkisi olmadığı saptandı.

Çizelge 5.19. *DKK4* sinonim ekzon 4 V169V polimorfizminin primer tümör evresi üzerine etkisi

Polimorfizm	Genotip	Evre 1 n (%)	Evre 2 n (%)	Evre 3 n (%)	Evre 4 n (%)	pT _x n (%)	χ^2 ve P
<i>DKK4</i> sinonim ekzon 4 V169V	GG	21 (%78,6)	39 (%83,3)	11 (%85,7)	1 (%100)	3 (%100)	1,65; 0,800
	GC	7 (%21,4)	15 (%16,7)	3 (%14,3)	0 (%0)	0 (%0)	

DKK3 intron 4'de oluşan tek nükleotid polimorfizminin lenf nodül tutulumu üzerine etkisi χ^2 testi ile hesaplandı (Çizelge 5.20). Buna göre, lenf nodül tutulumu gözlenmeyen hastaların CC ve CT genotip sıklıkları sırası ile %64,3, %35,7 olarak tespit edildi. 1. Evre lenf tutulumuna sahip hastalarda ise sırasıyla %80, %20 olduğu

belirlendi. 2. evre lenf tutulumu gözlenen hastalarda genotip sıklıkları sırasıyla %69,2 ve %30,8 olarak belirlendi. 3. evre lenf tutulumu gözlenen hastalarda ise bu oranlar %81 ve %19'dur. Lenf tutulum derecesi belirlenememiş (pN_x) olan bireylerde ise sadece CC genotipi belirlendi. İstatistiksel analiz sonucunda genotip farklılıklarının lenf nodül tutulumu üzerine etkisi olmadığı saptandı.

Çizelge 5.20. *DKK4* sinonim ekzon 4 V169V polimorfizminin lenf nodül tutulumu üzerine etkisi

Polimorfizm	Genotip	Lenf nodül tutulumu yok n (%)	Evre 1 n (%)	Evre 2 n (%)	Evre 3 n (%)	pN_x n (%)	χ^2 ve P
<i>DKK4</i> sinonim ekzon 4 V169V	CC	18 (%64,3)	28 (%80)	9 (%69,2)	17 (%81)	3 (%100)	3,80; 0,433
	CT	10 (%35,7)	7 (%20)	4 (%30,8)	4 (%19)	0 (%0)	

DKK4 ekzon 4'de oluşan tek nükleotid polimorfizminin patolojik metastaz durumu üzerine etkisi χ^2 testi ile hesaplandı (Çizelge 5.21). Buna göre, uzak metastazı olan hastalarda CC, CT genotiplerinin sıklıkları sırası ile %72,5 ve %27,5 olarak tespit edildi. Uzak metastaz görülmeyen hastalarda genotip sıklıkları ise sırasıyla %85 ve %15 olarak belirlendi. İstatistiksel analiz sonucunda genotip farklılıklarının uzak metastaz oluşumu üzerine etkisi olmadığı saptandı.

Çizelge 5.21. *DKK4* sinonim ekzon 4 V169V polimorfizminin patolojik metastaz durumu üzerine etkisi

Polimorfizm	Genotip	Metastaz Var n (%)	Metastaz Yok n (%)	χ^2 ve P
<i>DKK4</i> sinonim ekzon 4 V169V	CC	58 (%72,5)	17 (%85)	1,33; 0,248
	CT	22 (%27,5)	3 (%15)	

5.5.4. *sFRP4* nonsinonim ekzon 6 R340K polimorfizminin klinikopatolojik faktörler üzerine etkisi

sFRP4 ekzon 6'da oluşan tek nükleotid polimorfizminin histolojik grad üzerine etkisi χ^2 testi ile hesaplandı (Çizelge 5.22). Buna göre histolojik gradları 1 olan bireylerin GG, GA, AA ve GA+AA genotiplerinin sıklıkları sırası ile %35,5, %53,6, %10,7 ve %64,3 olarak tespit edildi. Histolojik gradları 2 olan bireylerin genotip sıklıkları sırasıyla %56,9, %31,4, %11,8 ve %43,1 olarak belirlendi. Histolojik gradları 3 olanlarınki ise sırasıyla %38,1, %42,9, %19 ve %61,9 olarak hesaplandı. İstatistiksel analiz sonucunda genotip farklılıklarının histolojik grad üzerine etkisi olmadığı saptandı.

Çizelge 5.22. *sFRP4* nonsinonim ekzon 6 R340K polimorfizminin histolojik grad üzerine etkisi

Polimorfizm	Genotip	Histolojik Grad 1 n (%)	Histolojik Grad 2 n (%)	Histolojik Grad 3 n (%)	χ^2 ve P
<i>sFRP4</i> nonsinonim ekzon 6 R340K	GG	10 (%35,7)	29 (%56,9)	8 (%38,1)	5,21; 0,266
	GA	15 (%53,6)	16 (%31,4)	9 (%42,9)	
	AA	3 (%10,7)	6 (%11,8)	4 (%19)	
	GA+AA	18 (%64,3)	22 (%43,1)	13 (%61,9)	

sFRP4 ekzon 6'da oluşan tek nükleotid polimorfizminin primer tümör evreleri üzerine etkisi χ^2 testi ile hesaplandı (Çizelge 5.23). Buna göre, 1. evrede olan hastalarda GG, GA, AA ve GA+AA genotiplerinin sıklıkları sırası ile %39,3, %46,4, %14,3 ve %60,7 olarak tespit edildi. 2. evre primer tümörlü hastalarda genotip sıklıkları sırasıyla %51,9, %38,9, %9,3 ve %48,1 olarak belirlendi. 3. evre primer tümörlü hastalarda ise bu oranlar %42,9, %35,7, %21,4 ve %57,1'dir. 4. evre primer tümörlü bireylerde sadece GA genotipi belirlenirken, tümör derecesi belirlenememiş (pT_x) olan bireylerde ise genotip sıklıkları sırası ile %66,7, %0, %33,3 ve %33,3 olarak belirlendi. İstatistiksel analiz sonucunda genotip farklılıklarının tümör evre gelişimi üzerine etkisi olmadığı saptandı.

Çizelge 5.23. *sFRP4* nonsinonim ekzon 6 R340K polimorfizminin primer tümör evresi üzerine etkisi

Polimorfizm	Genotip	Evre 1 n (%)	Evre 2 n (%)	Evre 3 n (%)	Evre 4 n (%)	pT _x n (%)	χ^2 ve P
<i>sFRP4</i> nonsinonim ekzon 6 R340K	GG	11 (%39,3)	28 (%51,9)	6 (%42,9)	0 (%0)	2 (%66,7)	6,32; 0,610
	GA	1 3(%46,4)	21 (%38,9)	5 (%35,7)	1 (%100)	0 (%0)	
	AA	4 (%14,3)	5 (%9,3)	3 (%21,4)	0 (%0)	1 (%33)	2,62; 0,622
	GA+AA	17 (%60,7)	26 (%48,1)	8 (%57,1)	1 (%100)	1 (%33,3)	

sFRP4 ekzon 6'da oluşan tek nükleotid polimorfizminin lenf nodül tutulumu üzerine etkisi χ^2 testi ile hesaplandı (Çizelge 5.24). Buna göre, lenf nodül tutulumu gözlenmeyen hastaların GG, GA, AA ve GA+AA genotip sıklıkları sırası ile %32,1, %50, %17,9 ve %67,9 olarak tespit edildi. 1. Evre lenf tutulumuna sahip hastalarda ise sırasıyla %54,3, %40, %5,7 ve %45,7 olduğu belirlendi. 2. evre lenf tutulumu gözlenen hastalarda genotip sıklıkları sırasıyla %53,8, %23,1, %23,1 ve %46,2 olarak belirlendi. 3. evre lenf tutulumu gözlenen hastalarda ise bu oranlar %47,6, %42,9, %9,5 ve %52,4'dır. Lenf tutulum derecesi belirlenememiş (pN_x) olan bireylerde ise %66,7, %0, %33,3 ve %33,3 olarak belirlendi. İstatistiksel analiz sonucunda genotip farklılıkların lenf nodül tutulumu üzerine etkisi olmadığı saptandı.

Çizelge 5.24. *sFRP4* nonsinonim ekzon 6 R340K polimorfizminin lenf nodül tutulumu üzerine etkisi

Polimorfizm	Genotip	Lenf nodül tutulumu yok n (%)	Evre 1 n (%)	Evre 2 n (%)	Evre 3 n (%)	pN _x n (%)	χ^2 ve P
<i>sFRP4</i> nonsinonim ekzon 6 R340K	GG	9 (%32,1)	19 (%54,3)	7 (%53,8)	10 (%46,6)	2 (%66,7)	9,06; 0,337
	GA	14 (%50)	14 (%40)	3 (%23,1)	9 (%42,9)	0 (%0)	
	AA	5 (%17,9)	2 (%5,7)	3 (%23,1)	2 (%9,5)	1 (%33,3)	
	GA+AA	19 (%67,9)	16 (%45,7)	6 (%46,2)	11 (%52,4)	1 (%33,3)	

sFRP4 ekzon 6'da oluşan tek nükleotid polimorfizminin patolojik metastaz durumu üzerine etkisi χ^2 testi ile hesaplandı (Çizelge 5.25). Buna göre, uzak metastazı olan hastalarda GG, GA, AA ve GA+AA genotiplerinin sıklıkları sırası ile %43,8, %42,5, %13,8 ve %56,3 olarak tespit edildi. Uzak metastaz görülmeyen hastalarda genotip sıklıkları ise sırasıyla %60, %30, %10 ve %40 olarak belirlendi. İstatistiksel analiz sonucunda genotip farklılıkların uzak metastaz oluşumu üzerine etkisi olmadığı saptandı.

Çizelge 5.25. *sFRP4* nonsinonim ekzon 6 R340K polimorfizminin patolojik metastaz durumu üzerine etkisi

Polimorfizm	Genotip	Metastaz Var n (%)	Metastaz Yok n (%)	χ^2 ve P
<i>sFRP4</i> nonsinonim ekzon 6 R340K	GG	35 (%43,8)	12 (%60)	1,67; 0,428
	GA	34 (%42,5)	6 (%30)	
	AA	11 (%13,8)	2 (%10)	
	GA+AA	45 (%56,3)	8 (%40)	

5.6. Meme kanserine etki eden değişkenlerin değerlendirmesi

Sigara ve alkol kullanımı, ailesel meme kanseri öyküsü, vücut kitle indeksi, ilk menarş yaşı ve genotip değişkenleri ele alınarak *Forward Stepwise* lojistik regresyon analizi uygulandı. Analiz sonucunda, meme kanserine etki eden değişkenlerin vücut kitle indeksi, *DKK4* ve *sFRP4* genotip farklılıkları olduğu belirlendi ($p < 0,05$) (Çizelge 5.26).

Çizelge 5.26 Meme kanserine etki eden değişkenler

Değişkenler	B (Regresyon katsayısı)	SE (Standart hata)	p	exp (B) (OR)	%95 CI
VKI	1,89	0,52	.001	6,67	2,38 - 18,71
<i>DKK4</i>	2,79	0,48	.001	16,38	6,37 - 42,12
<i>sFRP4</i>	-1,38	0,42	.001	0,24	0,10 - 0,57

6. TARTIŞMA

Bilim dünyasında büyük devrimlerin yaşandığı günümüzde bu etkinin en fazla görüldüğü alanlardan bir tanesi de kanserle ilgili gelişmelerdir. Kanser çoğu kez tek bir hastalık gibi görünmesine karşın, gerçekte hücre ve dokuları etkileyen karmaşık bir hastalık grubudur. Kanser genetik bilimi ile bağlantılı olabileceği düşüncesi ilk kez 20. yüzyılın başlarında atıldı ve bu fikir kanser araştırmalarının kaynağı olarak rol oynadı. Bu gün kanser bir sinyal iletim yolu bozukluğu olarak tanımlanmakta ve çalışmalar sinyal iletim yollarında yer alan onkogen ve tümör baskılayıcı gen ürünlerinin birbirleri ile etkileşimlerinin incelenmesine dayanmaktadır. Meme kanseri vakalarının büyük çoğunluğunda etioloji bilinmese de cinsiyet, yaş, ailede genç yaşta meme kanseri öyküsü olması, erken menarş, geç menapoz, geç yaşta ilk canlı doğum, sosyoekonomik seviye, östrojen ve doğum kontrol hapı kullanımı, alkol ve sigara kullanımı, şişmanlık ve yağlı beslenme, daha önce meme kanseri geçirmiş olma, genetik mutasyonların meme kanseri gelişiminde rol oynadıkları düşünülmektedir. Bununla beraber, meme bezi karsinogenezinde bir çok sinyal iletim yolağında oluşan genetik anormalliklerin de katkısı büyüktür.

Çalışmamızda, Wnt antagonistleri gen polimorfizmlerinin (*DKK3* nonsinonim ekzon 7 Arg335Gly, *DKK3* intron 4 G/C, *DKK4* sinonim ekzon 4 V169V, *sFRP4* nonsinonim ekzon 6 R340K) meme kanseri gelişiminde ve/veya metastaz oluşumunda bir risk faktörü oluşturup oluşturmadığı değerlendirilmiştir. Tüm dünyada giderek büyüyen bir sağlık sorunu olan meme kanserinin genetik alt yapısının belirlenmesi, meme kanserinde rol alan gen ürünlerinin ve etkileşimlerinin ortaya çıkarılması, bu etkileşimlerin azaltılması veya artırılmasını sağlayacak tedavilerin geliştirilmesinde etkili olacaktır. Ayrıca meme kanseri gelişimi ve ilerlemesinde etkin olan onkogen ve tümör baskılayıcı genlerin, bu genlerdeki mutasyon ve polimorfizmlerin belirlenmesi gen tedavi yöntemlerinin oluşturulmasına katkı sağlayacaktır.

Meme kanseri risk faktörleri arasında yaş önemli bir yere sahiptir ilerleyen yaşla birlikte meme kanseri riskinin arttığı öne sürülmektedir (24). Bununla beraber Brezilya'da (105) ve Çin'de (106) yapılan çalışmalarda 15-49 yaş arasındaki kadınlarda meme kanseri görülme sıklığının giderek arttığı gösterilmiştir. Ayrıca Amerika'da yapılan bir çalışmada 25-35 yaş arasındaki kadınlarda meme kanseri görülme sıklığının arttığı bildirilmiştir (107). Kolombiya'da yapılmış olan diğer bir çalışmada ise,

Medellin şehrinde 20-44 yaş arası risk grubuna girerken, bizim çalışmamızla uyumlu olarak (hasta grubu yaş ortalaması; 47.60 ± 8.92 , 31-71 yaş arası) Kolombiya genelinde yapılan çalışmada risk oluşturan yaş aralığı 45-64 yaş olarak tespit edilmiştir (108).

Henüz bir kesinlik kazanmamış olmakla birlikte sigara kullanımının meme kanseri gelişimi için risk oluşturduğu düşünülmektedir. Çevresel etkenler arasında sigara kullanımı meme kanserinin önlenebilir risk faktörlerinden biri olabilir. Sigara polisiklik aromatik hidrokarbonlar, aromatik aminler ve N-nitrozaminler içerir ve bunların hepsi potansiyel olarak meme hücre karsinogenezine yol açmaktadırlar (109). Luo ve arkadaşları aktif sigara kullanan insanlarda meme kanseri riskinin %35 arttığını bildirmişlerdir (110). Gram ve arkadaşları tarafından yapılan bir diğer çalışmada genç yaşta sigara kullanmaya başlamış ve en az 20 sene sigara içmeye devam etmiş kadınlarda meme kanseri riskinin arttığı belirtilmiştir (111). Ayrıca, Xue ve arkadaşları, özellikle ilk doğumlarını yapmamış olan kadınlarda aktif sigara kullanımının meme kanseri riskini arttırdığı yönünde bulgular elde etmişlerdir (112). Bizim çalışmamızda hasta ve kontrol grubunda sigara içen bireylerin yüzdelerinin sırası ile %11 ve %8, sigara içmeyenlerin yüzdelerinin ise sırası ile %89 ve %92 olduğu belirlendi. Her iki grup arasında sigara kullanımı açısından anlamlı bir fark bulunmadı ($p=0.463$, $p<0.05$). Elde ettiğimiz sonuçların yapılan bu çalışmalarla uyumlu olmadığı ve çalışmamızda sigara içmenin bir risk faktörü olmadığı belirlenmiştir.

İlımlı alkol tüketiminin, meme kanserinde %30-50 oranında artan risk ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (113). Menezes ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada ise, meme kanserinin de içinde bulunduğu bir çok kanser tipinde ılımlı ya da yüksek oranda alkol tüketiminin kanser gelişim riskini arttırdığı vurgulanmıştır (114). Japonya’da yapılmış olan bir başka çalışmada da alkol kullanımının meme kanseri için bir risk faktörü olduğu belirlenmiştir (115). Bizim çalışmamızda ise, hasta grubunda alkol kullanan birey bulunmazken, kontrol grubunda alkol kullanan bireylerin yüzdesinin %2 olduğu, alkol kullanmayanların yüzdelerinin ise sırası ile %100 ve %98 olduğu belirlendi. Her iki grup arasında alkol kullanımı açısından anlamlı bir fark bulunmadı ($p=0.497$, $p>0.05$). Sonuç olarak, çalışmamızda alkolün bir risk faktörü olmadığı gözlenmiştir.

Besinlerle alınan yağ oranı ve artan vücut kitle indeksinin/obezitenin meme kanseri gelişiminde potansiyel risk faktörleri oldukları bilinmektedir. Yüksek vücut

kitle indeksine ($VKI \geq 25 \text{ kg/m}^2$) sahip kadınların postmenapozal meme kanseri riski taşıdıkları bildirilmiştir (116). Yine aynı çalışmada ve buna benzer bir çalışmada, yüksek vücut kitle indeksinin ($VKI \geq 31 \text{ kg/m}^2$) premenapozal meme kanserinde azalan riskle ilişkili olduğu belirtilmiştir (116,117). Bizim yapmış olduğumuz çalışmada, gruplar arasında VKI değerlendirildiği zaman değerin $< 25 \text{ kg/m}^2$ olduğu hasta birey yüzdesinin %9, kontrol grubu bireylerinin yüzdesinin ise %35 olduğu saptandı. VKI değerinin $\geq 25 \text{ kg/m}^2$ olduğu hasta grubu bireylerinin yüzdesinin %91, kontrol grubu bireylerinin yüzdesinin ise %65 olduğu belirlendi. Gruplar arasında VKI yönünden anlamlı bir fark olduğu bulundu ($p=0.001$, $p<0.05$). Regresyon analizi sonucunda da vücut kitle indeksinin meme kanseri gelişiminde risk faktörü olduğu belirlenmiştir. VKI değeri $\geq 25 \text{ kg/m}^2$ olan bireylerde meme kanseri geliştirme riskinin 6,67 kez daha fazla olduğu bulunmuştur (Çizelge 5.26).

Meme kanseri riskinde etkili olan bir diğer faktör ise ilk menarş yaşıdır (118). 13 yaşından önce adet görmeye başlayan kadınlarda meme kanseri gelişme riskinin arttığı bildirilmiştir (119). Bununla beraber, adet görmenin geciktiği her bir yıl için meme kanseri riskinin %20 azaldığı konusunda veriler de bulunmaktadır (120,121). Bizim çalışmamızda ise, hasta ve kontrol grubunda yer alan bireylerin ilk menarş yaşının 13'den küçük olan bireylerin yüzdelerinin sırası ile %23 ve %26 olduğu, 13 yaş ve üzeri olan bireylerin yüzdelerinin ise sırası ile %77 ve %74 olduğu belirlendi. İlk menarş yaşı yönünden gruplar arasında anlamlı bir fark olmadığı ($p=0.622$, $p>0.05$) ve erken menarşın meme kanseri için risk oluşturmadığı belirlenmiştir.

Kadınlarda geç menapoza girmenin meme kanseri gelişim riskini arttırdığı yönünde çalışmalar vardır (122,123). Geç menapoza girme dolayısıyla artan siklus sayısı, proliferen olan duktal dokuda artan DNA hasarına sebep olmakta, bu da direkt meme kanserine yol açabilecek mutasyon riskini arttırabilmektedir (120,124). Bizim çalışmamızda menapoza girmeyen hastaların yüzdesinin %31, kontrol grubu bireylerinin yüzdesinin %77 olduğu, menapoza girenlerin ise sırası ile %69 ve %23 olduğu belirlendi. Menapoz durumu yönünden gruplar arasında anlamlı bir fark olduğu bulundu ($p=0.001$, $p<0.05$). Litaretürle uyumsuz olarak, çalışmamızda hasta grubuna bireylerinde menapoza giren bireylerin sayısının kontrol grubundakilere göre daha fazla olduğu saptanmıştır. Kanser tedavisi nedeni ile kemoterapi ve radyoterapi alan kişilerde yumurtalıklar oldukça etkilenmekte ve erken menopoza yol açabilmektedir. Kanser

türü, yumurtalıkların ne derece etkilendiği, tedavinin süreci, tedavi nedeniyle kullanılan ilaçların türü ve dozu menopoza tetikleyebilmektedir. Meme kanseri nedeni ile tedavi gören kadınlarda erken menopoz riski daha yüksektir (125). Sonuç olarak hasta grubu bireylerinde menopoza girmiş bireylerin sayısının kontrol grubundakilere göre daha fazla olması almış oldukları tedaviye bağlanmaktadır.

Aile öyküsü meme kanseri için önemli bir risk faktörüdür (126). Ailesel kanser öyküsü meme kanseri riskini 2-3 kat arttırmaktadır (119,127). Meme kanserli kadınların %10-30'unun akrabalarında kanser öyküsüne rastlanmıştır (128). Tazite ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, meme kanserli hastaların %18,4'ünde ailesel meme kanseri öyküsüne sahip olduğu ve premenapozal dönemde olan kadınlarda aile öyküsünün çok daha fazla olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte, Fas'lı meme kanserli kadınlar arasında yapılmış olan bir çalışmada 35 yaşın altındaki hastaların %20,6'sında ailesel meme kanseri öyküsüne rastlanmıştır (129). Çalışmamızda, hasta ve kontrol grubunda bulunan bireylerde ailesinde kanser öyküsü olanların yüzdelerinin sırası ile %23 ve %0, ailesinde kanser öyküsü olmayanların yüzdelerinin ise sırası ile %77 ve %100 olduğu belirlendi. Gruplar arasında ailesinde kanser öyküsü bulunması açısından anlamlı bir fark bulundu ($p=0.001$, $p<0.05$). Bizim bulgularımız, ailesinde meme kanseri öyküsü olanların meme kanseri için risk taşıdıkları yönündedir ve daha önce yapılmış olan çalışmalarla uyumludur.

Wnt sinyalleri normal meme bezi gelişiminin düzenlenmesinde önemli bir role sahiptir ve Wnt sinyal iletiminde oluşacak düzensizlikler meme kanserine neden olmaktadır (130). Meme özelleşmesi ve erken embriyogenezde gerekli olan Wnt3a, Wnt6 ve Wnt10b gibi Wnt'lerin MMTV-indüklü meme tümörlerinde genetik değişimler olduğu belirlenmiştir (131,132). Wnt3a, Wnt4, Wnt6, Wnt8b, Wnt9a ve Wnt10b'nin bir çok meme kanseri hücre hattında aşırı derecede eksprese oldukları bulunmuştur (133). Wnt'ler kanonikal Wnt/ β -katenin yolu üzerinden sinyal iletmektedirler. Dolayısı ile, karsinogenez sürecinde kanonikal Wnt/ β -katenin sinyal iletim yolu aktive edilmektedir (134). Ayrıca, Frizzled1 ve Frizzled2 reseptörlerinin de meme kanserinde aşırı eksprese oldukları belirlenmiştir (135).

Wnt sinyal iletim yolunun kanserde önemli role sahip olması Wnt modülatörlerinin de bu süreçte önemli olabileceklerini akla getirmektedir (3). Wnt antagonistleri

(modulatorleri) tümör baskılayıcı gibi hareket etmektedirler ve mutasyona uğramaları sonucunda Wnt sinyal iletim yolağının aktivasyonuna neden olmaktadır (136).

Kemik iliği kanser hastalarında ağırlı kemik lezyonlarına rastlanmaktadır. Bu hastalarda kemik iliği serumlarında DKK1'in arttığı belirlenmiş ve DKK1 düzeyinin lezyon oluşumu ile bağlantılı olduğu gösterilmiştir (137). Yüksek düzeyde DKK1 içeren kemik iliği serumunun osteoblast öncüsü hücrelerinin farklılaşmalarını engellediği bulunmuştur. Kemik iliği kanser hücrelerinde üretilen DKK1'in osteoblast farklılaşmasını engelleyerek litik kemik lezyonlarına neden olduğu belirlenmiştir (138). DKK ekspresyonunun tümör hücre hatlarında ya da dokularda değişime uğradığı yönünde bir çok araştırma vardır. Kolon kanserinde DKK1'in DNA metilasyonu yoluyla sessizleştirildiği ve ileri evre kolorektal tümörigenezi ile bağlantılı olduğu bildirilmiştir (91,139). Bununla beraber kolorektal kanser hücrelerinde DKK1 ekspresyonunun artmasıyla koloni oluşumunun azaldığı tespit edilmiştir. Dolayısı ile DKK1 bir tümör baskılayıcı işlevine sahiptir (139). DKK3'ün de bir tümör baskılayıcı gibi hareket ettiğine dair bulgular vardır. Tümör hücrelerinde DKK3 ekspresyonunun arttığı ve tümör hücre gelişiminin baskılandığı belirlenmiştir (75,94,140). Ayrıca, DKK3 hipermetilasyonunun ise bazı kanser tipleriyle bağlantılı olduğu bildirilmiştir (140). Son yapılan bir çalışmada, renal kanserde DKK4 ekspresyonunun arttığı ve bu sayede kanonikal Wnt sinyal iletim yolağının baskılandığı belirlenmiştir (141). Ayrıca, hepatosellüler karsinomada DKK2 metilasyon seviyesinin yüksek olduğu tespit edilmiştir (142). Ayrıca mide kanserinde (143), özafagus squamoz hücre karsinomasında (144) ve renal hücre karsinomasında da (145) DKK2'nin epigenetik olarak susturulduğu rapor edilmiştir. DKK'lar gibi sFRP'lerin de bazı kanser tiplerinde tümör baskılayıcı olarak görev yaptıkları belirlenmiştir (146,147). Meme kanserinde sFRP1'in ekspresyonunda azalma olduğu tespit edilmiştir (136). sFRP4'ün kan dolaşımına salındığı ve agresif yumurtalık kanseri fenotilerinde azaldıkları bulunmuştur. sFRP4 ekspresyonundan yoksun hastaların prognozunun ise sFRP4 eksprese edenlere göre daha kötü olduğu belirlenmiştir (148).

Ülkemizde meme kanseri ve Wnt antagonistlerinin ilişkisini gösteren herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Wnt antagonistleri ve kanser ile ilişkileri üzerine yapılmış olan çalışmalar genellikle mutasyon analizleri ve epigenetik çalışmalar şeklindedir. Bunun yanı sıra kolorektal kanser, renal kanser ve meme kanseri ile Wnt antagonistleri

gen polimorfizmi arasındaki ilişkinin belirlenmesinde yapılmış bir kaç çalışma mevcuttur (4,149,150). Meme kanserinde Wnt sinyal iletim yolağı ile ilişkili genlerdeki epigenetik değişimlerin yer alması bu genlerdeki polimorfizimlerin meme kanserinde risk faktörleri olabileceklerini düşündürmüştür. Bu düşünceden yola çıkarak çalışmamızı gerçekleştirdik.

Çalışmamızın bir kısmı *DKK3* nonsinonim ekzon 7 Arg335Gly polimorfizminin araştırılmasını içermektedir. *DKK3* hücre proliferasyonunu ve apoptozisi düzenleyen bir tümör baskılayıcı gendir. Dolayısı ile meme kanseri ile ilişkisinin araştırılması önem kazanmaktadır. Bu polimorfizm sonucunda G alleli yerine A alleli gelir ve sonuçta 335. kodonda arjinin amino asidi yerine glisin amino asidi protein yapısında yer alır (4). Çalışmamızda *DKK3* nonsinonim ekzon 7 Arg335Gly polimorfizmi değerlendirildiğinde, hasta ve kontrol gruplarındaki allel frekansları sırası ile G alleli için 0.875 ve 0.89, A alleli için ise 0.125 ve 0.11 olarak belirlendi. Allel dağılımı göz önüne alındığında gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p=0.641$). *DKK3* nonsinonim ekzon 7 Arg335Gly polimorfizmi için GG genotipi doğal tip olduğundan referans olarak değerlendirildi. GG, GA, AA ve GA+AA genotip dağılımları karşılaştırılarak meme kanserinin ortaya çıkmasında bir risk faktörü olup olmadıkları değerlendirildi. Genotiplerin dağılımı açısından gruplar karşılaştırıldığında anlamlı bir fark bulunmadığı belirlendi ($p>0.05$). Hirata ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, *DKK3* nonsinonim ekzon 7 Arg335Gly polimorfizminin renal kanser ilişkisi olduğu ve GG+AA genotipinin hasta grubunda kontrol grubuna göre daha fazla olduğu bulunmuştur (4). Buna zıt olarak, Kobayashi ve arkadaşları, akciğer kanseri hastaları ve kontrol grubu bireylerinde *DKK3* nonsinonim ekzon 7 Arg335Gly polimorfizmi açısından bir fark bulamamışlardır (6). Bizim çalışmamızda da *DKK3* nonsinonim ekzon 7 Arg335Gly polimorfizminin meme kanserinde bir risk faktörü olmadığı belirlemiştir.

Çalışmamızın bir diğer kısmını *DKK3* intron 4 G/C polimorfizminin incelenmesi oluşturmaktadır. *DKK3* intron 4 G/C polimorfizmi açısından değerlendirilen hasta ve kontrol gruplarındaki allel frekansları sırası ile G alleli için 0.915 ve 0.92, C alleli için ise 0.085 ve 0.08 olarak belirlendi. Allel dağılımı göz önüne alındığında gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p=0.856$). GG genotipi doğal tip olduğundan referans olarak değerlendirildi. GG, GC, CC ve GC+CC genotip dağılımları

karşılaştırılarak meme kanserinin ortaya çıkmasında bir risk faktörü olup olmadıkları değerlendirildi. Genotiplerin dağılımı açısından da gruplar karşılaştırıldığında anlamlı bir fark bulunmadığı belirlendi ($p>0.05$). Hirata ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, *DKK3* intron 4 G/C polimorfizminin renal kanser ile ilişkisi olduğu ve GC+CC genotipinin hasta grubunda kontrol grubuna göre daha fazla olduğu bulunmuştur (4). Bizim çalışmamızın sonucuna göre bu polimorfizmin de meme kanseri ile ilişkisi olmadığı belirlenmiştir.

Çalışmamızda ayrıca *DKK4* sinonim ekzon 4 V169V polimorfizmi ile meme kanseri arasındaki ilişki araştırılmıştır. Bu polimorfizm sonucunda C alleli yerine T alleli gelir ve sonuçta bu değişim protein yapısında her hangi bir amino asid değişimine yol açmamaktadır. *DKK4* sinonim ekzon 4 V169V polimorfizmi açısından değerlendirildiğinde hasta ve kontrol gruplarındaki allel frekansları sırası ile C alleli için 0.881 ve 0.585, T alleli için ise 0.119 ve 0.415 olarak belirlendi. Allel dağılımı göz önüne alındığında gruplar arasında anlamlı bir fark bulundu ($p=0.001$)(OR; 0,20, %95 CI; 0,12-0,33). CC genotipi doğal tip olduğundan referans olarak değerlendirildi. CC, CT, TT ve CT+TT dağılımları karşılaştırılarak meme kanserinin ortaya çıkmasında bir risk faktörü olup olmadıkları değerlendirildi. Genotiplerin dağılımı açısından gruplar karşılaştırıldığında anlamlı bir fark bulunduğu belirlendi ($p<0.05$). Hirata ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, *DKK4* sinonim ekzon 4 V169V polimorfizminin renal kanser ilişkisi olduğu ve TT genotipinin hasta grubunda kontrol grubuna göre daha fazla olduğu bulunmuştur (4). Bizim çalışmamızda ise renal kanserde olduğu gibi TT genotipinin değil, aksine CC genotipinin meme kanserli hastalarda fazla olduğu belirlendi. İstatistiksel değerlendirme sonucunda OR değerleri incelendiğinde bu değerlerin '1'in altında oldukları ve buna göre TT genotipinin ve T allelinin meme kanserine karşı koruyucu oldukları belirlendi (Çizelge 5.8). Lojistik regresyon analizi sonucunda ise hasta bireylerde CC genotipi görülme riskinin 16,38 kez daha fazla olduğu saptandı ($p=0.001$) (OR; 16,38, %95 CI; 6,37-42,12). Sonuç olarak, *DKK4* sinonim ekzon 4 V169V polimorfizminin meme kanseri için risk faktörü olabileceği düşünüldü.

sFRP4 nonsinonim ekzon 6 R340K polimorfizm sonucunda G alleli yerine A alleli geçer ve 340. kodonda arjinin amino asidi yerine lizin amino asidi protein yapısında yer alır. *sFRP4* nonsinonim ekzon 6 R340K polimorfizmi açısından değerlendirildiğinde

ise, hasta ve kontrol gruplarındaki allel frekansları sırası ile G alleli için 0.67 ve 0.68, A alleli için ise 0.33 ve 0.32 olarak belirlendi. Allel dağılımı göz önüne alındığında gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p=0.831$). GG genotipi doğal tip olduğundan referans olarak değerlendirildi. GG, GA, AA ve GA+AA genotip dağılımları karşılaştırılarak meme kanserinin ortaya çıkmasında bir risk faktörü olup olmadıkları değerlendirildi. Genotiplerin dağılımı açısından da gruplar karşılaştırıldığında anlamlı bir fark bulunmadığı belirlendi ($p>0.05$). Renal kanser ve *sFRP4* nonsinonim ekzon 6 R340K polimorfizmi arasındaki ilişkinin araştırıldığı çalışmada AA genotipine sahip hasta bireylerde iki kez daha fazla yatkınlık olduğu belirlendi (4). Bizim çalışmamızda Lojistik Regresyon analizi sonucunda hasta bireylerde AA genotipi görülme riskinin 0,24 kez daha fazla olduğu saptandı ($p=0.001$) (OR; 0,24, %95 CI; 0,10-0,57). Sonuç olarak, *sFRP4* nonsinonim ekzon 6 R340K polimorfizminin meme kanseri için risk faktörü olabileceği düşünüldü.

Çalışmamızda ayrıca bu dört polimorfizmin klinikopatolojik faktörler üzerine etkisi olup olmadığı da araştırıldı. Tek nükleotid polimorfizminin prognozla olmasa da metastaz ile ilişkili olabileceğini öne süren çalışmalar vardır (151,152). Bunun dışında, yapılan bir başka çalışmada meme kanseri gelişimi ve prognozu üzerine etkili olabilecek genetik varyasyonlar belirlenmiştir (153). Yaptığımız istatistiksel değerlendirme sonucunda *DKK3* nonsinonim ekzon 7 Arg335Gly polimorfizminin sadece uzak metastaz oluşumu üzerine etkisi olduğu saptandı ($p=0.017$). *DKK3* intron 4 G/C, *DKK4* sinonim ekzon 4 V169V, *sFRP4* nonsinonim ekzon 6 R340K polimorfizmlerinin ise tümör gelişimi, lenf nodül tutulumu, uzak metastaz ve histolojik grad üzerine etkisinin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi ($p>0,05$). Polimorfizmler ile klinikopatolojik faktörler arasında anlamlı bir ilişki bulunamamasının nedeninin, bir risk faktörü olarak rol alan tek nükleotid polimorfizmlerinin her zaman prognostik bir faktör olmamalarından kaynaklandığı düşünülmektedir. Çünkü; risk oluşturan tek nükleotid polimorfizmler neredeyse normal olan hücrelerin karsinogenezinin erken evrelerine katkıda bulunurlar. Prognostik olan tek nükleotid polimorfizmleri ise tamamen transforme olan hücrelerin devamlılığında gereklidirler (4).

Bu polimorfizmlerin meme kanseri üzerine nasıl etki ettiğine dair mekanizmalar belirsizdir. Sinonim olmayan tek nükleotid polimorfizmleri amino asit değişimlerine

neden olmaktadır. Bunun sonucunda ise protein fonksiyonu etkilenebilmektedir. Bu nedenle sinonim olmayan tek nükleotid polimorfizmlerinin kanser duyarlılığı ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir (154). Ayrıca sinonim tek nükleotid polimorfizmleri mRNA katlanmasını değiştirebilir ve mRNA stabilitesini azaltabilir. Dolayısıyla ile, RNA yapısındaki değişimler yoluyla translasyonda farklılıklar olabilir (155). Elde edilen veriler ışığında, Wnt antagonistlerin gen yapısında oluşabilecek farklılıklar proteinin etkileşimlerini de etkileyecektir. Wnt yolağını modüle eden bu antagonistlerin hedef gen transkripsiyonunu da ayarladığı söylenebilir. Sonuçta, Wnt sinyal iletiminde oluşabilecek anormallikler sonucunda kanser gelişimi söz konusu olabilir.

Sonuç olarak bu çalışma meme kanseri ile *DKK3* nonsinonim ekzon 7 Arg335Gly, *DKK3* intron 4 G/C, *DKK4* sinonim ekzon 4 V169V, *sFRP4* nonsinonim ekzon 6 R340K polimorfizimlerinin arasındaki ilişkinin ortaya konulduğu ilk ön çalışmadır. Özellikle hasta grubu genişletilerek farklı popülasyonlarda *DKK4* sinonim ekzon 4 V169V, *sFRP4* nonsinonim ekzon 6 R340K polimorfizimlerinin çalışılması sonuçlarımızı destekleyebilir. Çalışma grubunun genişletilmesinin, *DKK3* nonsinonim ekzon 7 Arg335Gly ve *DKK3* intron 4 G/C polimorfizmleri açısından çalışmayı anlamlı kılabileceği düşünülmektedir. Bu sonuçlara ek olarak, Wnt antagonistlerinin anlaşılması yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine de öncülük edecektir.

7. SONUÇLAR

1. Çalışmada 100 meme kanseri (invaziv duktal kanser) kesin tanısı konmuş hasta ile 100 sağlıklı-gönüllü birey (kontrol grubu) değerlendirmeye alınmıştır.
2. Yaş dağılımı açısından hasta-kontrol grubu arasında fark bulunmamıştır (Hasta grubunda bulunan bireylerin yaş ortalaması 47.60 ± 8.92 , kontrol grubunun yaş ortalaması ise 46.05 ± 9.84).
3. Hasta ve kontrol grubunda sigara içen bireylerin yüzdelerinin sırası ile %11 ve %8, sigara içmeyenlerin yüzdelerinin ise sırası ile %89 ve %92 olduğu belirlendi. Her iki grup arasında sigara kullanımı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır.
4. Hasta grubunda alkol kullanan birey bulunmazken, kontrol grubunda alkol kullanan bireylerin yüzdesinin %2 olduğu, alkol kullanmayanların yüzdelerinin ise sırası ile %100 ve %98 olduğu belirlendi. Her iki grup arasında alkol kullanımı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır.
5. Hasta ve kontrol grubunda bulunan bireylerde ailesinde meme kanseri öyküsü olanların yüzdelerinin sırası ile %23 ve %0, ailesinde meme kanseri öyküsü olmayanların yüzdelerinin ise sırası ile %77 ve %100 olduğu belirlendi. Gruplar arasında ailesinde kanser öyküsü bulunması açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur.
6. Gruplar arasında VKI değerlendirdiği zaman değerinin $<25 \text{ kg/m}^2$ olduğu hasta birey yüzdesinin %9, kontrol grubu bireylerinin yüzdesinin ise %35 olduğu saptandı. VKI değerinin $\geq 25 \text{ kg/m}^2$ olduğu hasta grubu bireylerinin yüzdesinin %91, kontrol grubu bireylerinin yüzdesinin ise %65 olduğu belirlendi. Gruplar arasında VKI yönünden anlamlı bir fark olduğu bulunmuştur.
7. Hasta ve kontrol grubunda yer alan bireylerin ilk menarş yaşının 13'den küçük olan bireylerin yüzdelerinin sırası ile %23 ve %26 olduğu, 13 yaş ve üzeri olan bireylerin yüzdelerinin ise sırası ile %77 ve %74 olduğu belirlendi. İlk menarş yaşı yönünden gruplar arasında anlamlı bir fark olmadığı bulunmuştur.
8. Menapoza girmeyen hastaların yüzdesinin %31, kontrol grubu bireylerinin yüzdesinin %77 olduğu, menapoza girenlerin ise sırası ile %69 ve %23 olduğu belirlendi. Menapoz durumu yönünden gruplar arasında anlamlı bir fark olduğu bulunmuştur.

9. Hasta ve kontrol grupları *DKK3* nonsinonim ekzon 7 Arg335Gly, *DKK3* intron 4 G/C ve *sFRP4* nonsinonim ekzon 6 R340K polimorfizmi açısından değerlendirildiğinde, genotip ve allellerinin dağılımında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadığı belirlendiğinden, bu polimorfizmlerin meme kanserine yakınlık oluşturmadığı düşünülmüştür. Ancak lojistik regresyon analiz sonucunda, *sFRP4* nonsinonim ekzon 6 R340K polimorfizmi açısından hasta bireylerde AA genotipi görülme riskinin 0,24 kez daha fazla olduğu saptanmıştır.

10. Hasta ve kontrol grupları *DKK4* sinonim ekzon 4 V169V polimorfizmi açısından değerlendirildiğinde, genotip ve allellerinin dağılımında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu belirlendiğinden, bu polimorfizmlerin meme kanserine yakınlık oluşturduğu düşünülmüştür. Lojistik regresyon analizi sonucunda polimorfizmin meme kanseri için risk faktörü olduğu belirlenmiştir.

11. Hasta grubunda *DKK3* nonsinonim ekzon 7 Arg335Gly, *DKK3* intron 4 G/C, *DKK4* sinonim ekzon 4 V169V, *sFRP4* nonsinonim ekzon 6 R340K polimorfizmlerinin klinikopatolojik faktörler üzerine etkileri değerlendirilmiştir. Bu değerlendirme sonucunda *DKK3* intron 4 G/C, *DKK4* sinonim ekzon 4 V169V, *sFRP4* nonsinonim ekzon 6 R340K polimorfizmleri için genotip dağılımının primer tümör gelişimine, lenf nodül tutulumuna, uzak metastaza ve histolojik grad'a etki etmediği belirlenmiştir. Bu sonuçlara ek olarak, *DKK3* nonsinonim ekzon 7 Arg335Gly polimorfizminin uzak metastaz oluşumu üzerine etkisi olduğu saptanmıştır.

8. KAYNAKLAR

1. Koç Z., Sağlam Z. (2009). Kadınların meme kanseri, koruyucu önlemler ve kendi kendine meme muayenesi ile bilgi ve uygulamalarının belirlenmesi ve eğitimin etkinliği. *Meme Sağlığı Dergisi*, Cilt 5 (1): 25-33.
2. Lusting B., Behrens J. (2003). The Wnt signalling pathway and its role in the tumor development. *J Cancer res Clin Oncol*, 129 (4): 199-221.
3. Niehrs C. (2006). Function and biological roles of the Dickkopf family of Wnt modulators. *Oncogene*, 4;25 (57); 7469-81.
4. Hirata H, Hinoda Y, Nakajima K, Kikuno N, Yamamura S, Kawakami K, Suehiro Y, Tabatabai ZL, Ishii N, Dahiya R. (2009). Wnt Antagonist gene polymorphisms and renal cancer. *Cancer*, 1;115 (19): 4488-503.
5. Caldwell GM, Jones C, Gensberg K, Jan S, Hardy RG, Byrd P, Chughtai S, Wallis Y, Matthews GM, Morton DG. (2004). The Wnt antagonist sFRP1 in colorectal tumorigenesis. *Cancer Res*. 1;64 (3): 883-8.
6. Kobayashi K, Ouchida M, Tsuji T, Hanafusa H, Miyazaki M, Namba M, Shimizu N, Shimizu K. (2002). Reduced expression of the REIC/Dkk-3 gene by promoter-hypermethylation in human tumor cells. *Gene*. 9;282 (1-2): 151-8.
7. Guo Y, Guo W, Chen Z, Kuang G, Yang Z, Dong Z. (2011). Hypermethylation and aberrant expression of Wnt-antagonist family genes in gastric cardia adenocarcinoma. *Neoplasma*. 58 (2): 110-7.
8. Suzuki H, Toyota M, Carraway H, Gabrielson E, Ohmura T, Fujikane T, Nishikawa N, Sogabe Y, Nojima M, Sonoda T, Mori M, Hirata K, Imai K, Shinomura Y, Baylin SB, Tokino T. (2008). Frequent epigenetic inactivation of Wnt antagonist genes in breast cancer. *Br J Cancer*. 25;98 (6): 1147-56.
9. Krstic, Radivoj V. (2004). *Human Microscopic Anatomy: An Atlas for Students of Medicine and Biology*. Springer. 466.
10. Schenke JG, Levisky R, Ohel G. (1984). Multiple Primary Malignant Neoplasms in Breast Cancer Patients in Israel. *Cancer*. 54:145-50.
11. Drake R., Vogl A. W., Mitchell A. W. M. (2007). *Gray's Anatomy for Students*. 116-117.

12. Spratt JS, Tabin GR. (1995). Gross anatomy of the breast. In: Donegan WL, Spratt JS, eds. *Cancer of the breast*, 4th edition. Philadelphia. London: W.B.Saunders. 22-42.
13. Kalaycı G, Acarlı K, Demirkol K, Ertekin C. (2002). Meme anatomisi ve gelişmesi. Genel cerrahi cilt 1. Türkiye, İstanbul: Nobel. 537-42.
14. Johnson-Thompson M.C, Guthrie J. (2000). Ongoing research to identify environmental risk factors in breast carcinoma. *Cancer*, 88, 1224-1229.
15. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, (2001). Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*. 414:105-111.
16. Margolese RG, Hortobagyi GN, Buchholz TA. (2003) *Breast. Erişim Nisan 2005*. Cancer Medicine 6th ed. Hamilton (Canada): BC Decker Inc. www.ncbi.nlm.nih.gov/books
17. <http://yeniweb.mersin.edu.tr/uploads/304/files/memekanseri.pdf>
18. Colditz GA, Sellers TA, Trapido E. (2006). Epidemiology – identifying the causes and preventability of cancer? *Nat Rev*. 6:75-83.
19. American Cancer Society. *Breast Cancer Facts & Figures 2007-2008* Atlanta .
20. Althuis MD, Dozier JM, Anderson WF, *et al.* (2005). Global trends in breast cancer incidence and mortality 1973-1997. *Int J Epidemiol*. 34:405-412.
21. Eroğlu A, Ersöz Ş. (2010). Erkek meme kanseri. *Yeni tıp dergisi*. 27: 202-207.
22. Haydaroğlu A, Dubova S, Ozsaran Z, Bolukbaşı Y , Yılmaz R, Kapkac M, Ozdedeli E. (2005). Ege Üniversitesinde Meme Kanseri: 3897 Olgunun Değerlendirilmesi *Meme Sağlığı Dergisi*. 1(1):6-11.
23. Aydın A, Dinçer M, Topuz E. (2010). Meme Kanseri Adjuvant Tedavi Abant Konsensüsü. *Nobel tıp kitabevi*. 3-4.
24. Ed. Mandel N.M, Onat H. (2002). *Kanser Hastasına Yaklaşım. Tanı, tedavi, takipte sorunlar*. 2. Baskı. Nobel Tıp Kitabevi. 380.
25. Somunoğlu S. (2007). Meme Kanseri Risk Faktörleri. *Fırat Sağlık Hizmetleri Dergisi*. Cilt:2, Sayı:5; 2-12.
26. Wang D.Y., DeStavola B.L., Allen D.S., Fentiman I.S., Bulbrook R.D., Hayward J.L., Reed M.J. (1997) Breast Cancer Risk is Positively Associated with Height. *Breast Cancer Research and Treatment*. 43:123-128.

27. Clavel-Chapelon F., Gerber M. (2002) Reproductive Factors and Breast Cancer Risk. Do They Differ According to Age At Diagnosis? *Breast Cancer Research and Treatment*. 72:107-115.
28. Fentiman IS. (2001). Fixed and modifiable risk factors for breast cancer. *Int J Clin Pract*. 55(8):527-530.
29. Terry MB, Zhang FF, Kabat G, et al. (2006). Lifetime alcohol intake and breast cancer risk. *Ann Epidemiol*. 16(3):230-240.
30. Byrne C, Schairer C, Brinton LA, et al. (2001). Effects of mammographic density and benign breast disease on breast cancer risk (United States). *Cancer Causes Control*. 12(2):103-110.
31. Hulka BS, Moorman PG. (2001). Breast cancer: hormones and other risk factors. *Maturitas*. 38(1):103-113; discussion 113-106.
32. Ellsworth RE, Decewicz DJ, Shriver CD. (2010). Breast cancer in the personal genomics era. *Curr Genomics*. 11:146–61.
33. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Breast cancer and breastfeeding: collaborative reanalysis of individual data from 47 epidemiological studies in 30 countries, including 50,302 women with breast cancer and 96,973 women without the disease. *Lancet* 2002; 360(9328): 187-195.
34. Garber J, Silva EO, Zumda S (Eds.). (2005). Risk Factors. in: *Breast cancer*. 3rd ed. Oxford: Elsevier Saunders. 26-53.
35. Kuzey GM, Canda T, Erhan Y, ed. Kuzey GM, (2007) *Meme k_s_m 22: Temel Patoloji*. Günes Kitabevi. 705-744.
36. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. 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(9291):1389-1399.
37. Aydın A, Dinçer M, Topuz E. *Meme Kanserinde Adjuvant Tedavi Abant Konsensusu*. Nobel tıp kitabevi 2010; 8-10.

38. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lonning PE, Borresen-Dale AL, Brown PO, Botstein D (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 406:747-752
39. Glas AM, Floore A, Delahaye LJ, et al. (2006). Converting a breast cancer microarray signature into a high-throughput diagnostic test. *BMC Genomics*. 7: 278-287.
40. <http://www.biltek.tubitak.gov.tr/bdergi/yeniufuk/icerik/kanser.pdf>
41. Schulz W.A, (2005) *Molecular Biology of Human Cancers*. Springer. 357.
42. de Jong M.M., Nolte I.M., te Meerman G.J., van der Graaf W.T., Oosterwijk J.C., Kleinbenker J.H., Schaapveld M., de Vries E.G. (2002). Genes other than BRCA1 ve BRCA2 involved in breast cancer susceptibility. *J Med Genet*, 39, 225-242.
43. Ford D., Easton D.F., Stratton M., Narod S., Goldgar D., Devilee P., Bishop D.T., Weber B., Lenoir G., Chang-Claude J., Sobol H., Teare M.D. ve ark. (1998). Genetic heterogeneity and penetrance analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in breast cancer families. The Breast Cancer Linkage Consortium, *Am J Hum Genet*, 62, 676-689.
44. Sidransky D., Tokino T., Helzlsouer K., Zehnbauer B., Rausch G., Shelton B., Prestigiacomo L., Vogelstein B., Davidson N. (1992). Inherited p53 gene mutations in breast cancer. *Cancer Res*, 52, 2984-2986.
45. Welch P.L., Owens K.N., King M.C. (2000). Insights into the functions of BRCA1 and BRCA2. *Trends Genet*, 16, 69-74.
46. Beroud C., Soussi T. (2003). The UMD p53 database: new mutations and analysis tools. *Hum Mutat*, 21, 176-81.
47. Mitrunen K, Hirvonen A. (2003). Molecular epidemiology of sporadic breast cancer. The role of polymorphic genes involved in oestrogen biosynthesis and metabolism. *Mutation Research*. 544: 9-41.
48. Nathanson K. ve Weber B.L. (2001). "Other" breast cancer susceptibility genes: searching for more holy grail. *Hum Mol Genet*, 10, 715-20.
49. Shields P.G., Harris C.C. (2000). Cancer risk and low-penetrance susceptibility genes in gene-environment interactions. *J Clin Oncol*, 18, 2309-2315.

50. Dumitrescu R.G., Cotarla I. (2005). Understanding breast cancer risk-where do we stand in 2005? *J Cell Mol Med*, 9, 208-221.
51. Polyak K. (2002). Breast cancer gene discovery. *Expert Rev Mol Med*, 4(18), 1-18
52. Tempfer C.B., Hefler L.A., Schneeberger C., Huber J.C. (2006). How valid is single nucleotide polymorphism (SNP) diagnosis for the individual risk assessment of breast cancer? *Gynecol Endocrinol*, 22(3), 155-159.
53. Ed. Mandel N.M, Onat H. Kanser Hastasına Yaklaşım. Tanı, tedavi, takipte sorunlar. 2. Baskı. Nobel Tıp Kitabevi. 2002; 8.
54. <http://serdarturhal.com.tr/Meme%20Ca.pdf>
55. Cohen ED, Tian Y, Morrisey EE. (2008). Wnt signaling: An essential regulator of cardiovascular differentiation, morphogenesis and progenitor self-renewal. *Development*. 35:789-798.
56. Incassati A, Chandramouli A, Eelkema R, Cowin P. (2010). Key signaling nodes in mammary gland development and cancer: β -catenin. *Breast Cancer Res*. 12(6):213. doi: 10.1186/bcr2723. Epub 2010 Nov 3.
57. Turashvili G, Bouchal J, Burkadze G, Kolar Z. (2006). Wnt signaling pathway in mammary gland development and carcinogenesis. *Pathobiology*. 73(5): 213-23.
58. Brennan KR, Brown AM. (2004). Wnt proteins in mammary development and cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. Apr; 9(2): 119-31.
59. Smalley MJ, Dale TC. (2001). Wnt signaling and mammary tumorigenesis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. Jan; 6(1): 37-52.
60. Howe LR, Brown AM. (2004). Wnt signaling and breast cancer. *Cancer Biol Ther*. Jan; 3(1): 36-41. Epub 2004 Jan 14.
61. Klarmann GJ, Decker A, Farrar WL. (2008). Epigenetic gene silencing in the Wnt pathway in breast cancer. *Epigenetics*. Mar-Apr; 3(2): 59-63. Epub 2008 Mar 12.
62. Cadigan KM, Nusse R (1997). Wnt signaling: a common theme in animal development. *Genes Dev* 11:3286–3305
63. Lustig B., Behrens J., (2003). The Wnt signaling pathway and its role in tumor development. *J Cancer Res Clin Oncol* 129, 199–221.

64. Kanzaki H., Ouchida M., Hanafusa H., Yano M., Suzuki H., Aoe M., Iai K., Shimizu N., Nakachi K., Shimizu K. (2006). Single nucleotide polymorphism of the AXIN2 gene is preferentially associated with human lung cancer risk in a Japanese population. *International Journal of molecular medicine*. 18:279-284.
65. Salahshor S., Woodgett J. R. (2005). The link between axin and carcinogenesis. *J. Clin. Pathol.* 58: 225-236.
66. Miller JR (2002). The Wnts. *Genome Biol* 3[Review]:S3001
67. Alberts, B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P., (2002). *Molecular Biology of The Cell*. Garland Science, Sayfa: 895-96.
68. Yardy G.W. and Brewster S.F. (2005). Wnt signalling and prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis.*, 8, 119–126.
69. Chesire D.R., Isaacs W.B (2003). β -Catenin signaling in prostate cancer: an early perspective. *Endocrine-Related Cancer* 10:537–560.
70. Kitagawa M, Hatakeyama S, Shirane M, Matsumoto M, Ishida N, Hattori K, Nakamichi I, Kikuchi A, Nakayama K (1999). An F-box protein, FWD1, mediates ubiquitin-dependent proteolysis of beta-catenin. *Embo J* 18:2401–2410.
71. Winston JT, Strack P, Beer-Romero P, Chu CY, Elledge SJ, Harper JW (1999). The SCF β -TRCP-ubiquitin ligase complex associates specifically with phosphorylated destruction motifs in β -catenin and stimulates β -catenin ubiquitination in vitro. *Genes Dev* 13:270–283.
72. Yamamoto H, Kishida S, Kishida M, Ikeda S, Takada S, Kikuchi A (1999). Phosphorylation of axin, a Wnt signal negative regulator, by glycogen synthase kinase-3 β regulates its stability. *J Biol Chem* 274:10681–10684.
73. Willert K, Shibamoto S, Nusse R (1999). Wnt-induced dephosphorylation of axin releases beta-catenin from the axin complex. *Genes Dev* 13:1768– 1773.
74. Alberts, B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P., (2002). *Molecular Biology of The Cell*. Garland Science, Sayfa: 895-96.
75. Kawano Y and Kypta R. (2003). Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway. *Journal of Cell Science*, 116, 2627-2634.
76. Jones, S. E. and Jomary, C. (2002). Secreted Frizzled-related proteins: searching for relationships and patterns. *Bioessays* 24, 811-820.

77. Salic, A. N., Kroll, K. L., Evans, L. M. and Kirschner, M. W. (1997). Sizzled: a secreted Xwnt8 antagonist expressed in the ventral marginal zone of *Xenopus* embryos. *Development* 124, 4739-4748.
78. Collavin, L. and Kirschner, M. W. (2003). The secreted Frizzled-related protein Sizzled functions as a negative feedback regulator of extreme ventral mesoderm. *Development* 130, 805-816.
79. Melkonyan HS, Chang WC, Shapiro JP, Mahadevappa M, Fitzpatrick PA, Kiefer MC, Tomei LD, Umansky SR. (1997). SARPs: a family of secreted apoptosis-related proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 94,13636 -13641.
80. Lin K, Wang S, Julius MA, Kitajewski J, Moos M, Luyten FP. (1997). The cysteine-rich frizzled domain of Frzb-1 is required and sufficient for modulation of Wnt signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 94,11196 -11200.
81. Uren A, Reichsman F, Anest V, Taylor WG, Muraiso K, Bottaro DP, Cumberland S, Rubin JS. (2000). Secreted frizzled-related protein-1 binds directly to Wntless and is a biphasic modulator of Wnt signaling. *J. Biol. Chem.*, 275,4374 -4382.
82. Bafico, A., Liu, G., Yaniv, A., Gazit, A. and Aaronson, S. A. (2001). Novel mechanism of Wnt signalling inhibition mediated by Dickkopf-1 interaction with LRP6/Arrow. *Nat. Cell Biol.* 3, 683-686.
83. Banyai L, Patthy L. (1999). The NTR module: domains of netrins, secreted frizzled related proteins, and type I procollagen C-proteinase enhancer protein are homologous with tissue inhibitors of metalloproteases. *Protein Sci.*, 8,1636 -1642.
84. Krupnik VE, Sharp JD, Jiang C, Robison K, Chickering TW, Amaravadi L, Brown DE, Guyot D, Mays G, Leiby K, Chang B, Duong T, Goodearl AD, Gearing DP, Sokol SY, McCarthy SA. (1999). Functional and structural diversity of the human Dickkopf gene family. *Gene*. 238: 301-313
85. Aravind L, Koonin EV. (1998). A colipase fold in the carboxy-terminal domain of the Wnt antagonists--the Dickkopfs. *Curr Biol.* 8: R477-R478
86. Semenov MV, Tamai K, Brott BK, Kühl M, Sokol S, He X. (2001). Head inducer Dickkopf-1 is a ligand for Wnt coreceptor LRP6. *Curr Biol.* 11: 951-961

87. Fatima S, Lee NP, Luk JM. (2011). Dickkopfs and Wnt/ β -catenin signalling in liver cancer. *World J Clin Oncol*. Aug 10;2(8):311-25.
88. Nakamura T, Nakamura T, Matsumoto K. (2008). The functions and possible significance of Kremen as the gatekeeper of Wnt signalling in development and pathology. *J Cell Mol Med*. 12: 391-408
89. Mao B, Wu W, Davidson G, Marhold J, Li M, Mechler BM, Delius H, Hoppe D, Stannek P, Walter C, Glinka A, Niehrs C. (2002). Kremen proteins are Dickkopf receptors that regulate Wnt/ beta-catenin signalling. *Nature*. 417: 664-667
90. Davidson G, Mao B, del Barco Barrantes I, Niehrs C. (2002). Kremen proteins interact with Dickkopf1 to regulate anteroposterior CNS patterning. *Development*. 129: 5587-5596
91. González-Sancho JM, Aguilera O, García JM, Pendás-Franco N, Peña C, Cal S, García de Herreros A, Bonilla F, Muñoz A. (2005). The Wnt antagonist DICKKOPF-1 gene is a downstream target of beta-catenin/TCF and is downregulated in human colon cancer. *Oncogene*. 24: 1098-1103
92. Mao B, Niehrs C. (2003). Kremen2 modulates Dickkopf2 activity during Wnt/LRP6 signaling. *Gene*. 302: 179-183
93. Glinka A, Wu W, Delius H, Monaghan AP, Blumenstock C, Niehrs C. (1998). Dickkopf-1 is a member of a new family of secreted proteins and functions in head induction. *Nature*. 391: 357-362
94. Hoang BH, Kubo T, Healey JH, Yang R, Nathan SS, Kolb EA, Mazza B, Meyers PA, Gorlick R. (2004). Dickkopf 3 inhibits invasion and motility of Saos-2 osteosarcoma cells by modulating the Wnt-beta-catenin pathway. *Cancer Res*. 64: 2734-2739
95. Lee EJ, Jo M, Rho SB, Park K, Yoo YN, Park J, Chae M, Zhang W, Lee JH. (2009). Dkk3, downregulated in cervical cancer, functions as a negative regulator of beta-catenin. *Int J Cancer*. 124: 287-297
96. Yue W, Sun Q, Dacic S, Landreneau RJ, Siegfried JM, Yu J, Zhang L. (2008). Downregulation of Dkk3 activates beta-catenin/ TCF-4 signaling in lung cancer. *Carcinogenesis*. 29: 84-92
97. Lüleci G, Sakızlı M, Alper Ö. (1995) Renkli Genetik Atlası ISBN: 975-420-035-1.

98. Database. <http://zehirlenme.blogspot.com/2010/10/polimorfizm-nedir.html>
99. Gray IC, Campbell DA and Spurr NK. (2000). Single nucleotide polymorphisms as tools in human genetics. *Human Molecular Genetics*. 9(16):2403-2408.
100. Database.<http://www.ezberim.com/saglik/188095-polimorfizm-nedir-ve-genetik-polimorfizm/>
101. http://wantprogress.com/download10P35F3/PCR_guide016.pdf
102. Yourno J. (1992). A method for nested PCR with single closed reaction tubes. *PCR Methods Appl*. Aug; 2(1): 60-5.
103. Başıbüyük HH, Bardakçı F, Belshaw R. (2000). Quicke DLJ. *Phylogenetic Systematics: A Practical Guide to Theory and Practice*. Önder matbaa, Sivas/Turkey.
104. Klug WS, Cummings MR. (2003). (Çeviri editörü: Öner C.) *Genetik Kavramlar*. Palme Yayıncılık Altıncı baskı, ISBN: 0-13-081626-4, Sayfa: 515-17.
105. Santos Sda S, Melo LR, Koifman RJ, Koifman S. (2013). Breast cancer incidence and mortality in women under 50 years of age in Brazil. *Cad Saude Publica*. Nov;29(11):2230-40.
106. Wu QJ, Vogtmann E, Zhang W, Xie L, Yang WS, Tan YT, et al. (2012). Cancer incidence among adolescents and young adults in urban Shanghai, 1973-2005. *PLoS One*. 7(8) : e42607.
107. Johnson RH, Chien FL, Bleyer A. (2013). Incidence of breast cancer with distant involvement among women in the United States, 1976 to 2009. *JAMA*. 309:800-5.
108. Cardona D, Agudelo HB. (2007). Tendencias de mortalidad en población adulta, Medellín, 1994-2003. *Biomedica*. 27:352-63.
109. Yang Y, Zhang F, Skrip L, Wang Y, Liu S. (2013). Lack of an Association between Passive Smoking and Incidence of Female Breast Cancer in Non-Smokers: Evidence from 10 Prospective Cohort Studies. *PLoS One*. Oct 18;8(10):e77029. doi: 10.1371/journal.pone.0077029.
110. Luo J, Margolis KL, Wactawski-Wende J, Horn K, Messina C, et al (2011). Association of active and passive smoking with risk of breast cancer among postmenopausal women: a prospective cohort study. *BMJ* 342: d1016.

111. Gram IT, Braaten T, Terry PD, Sasco AJ, Adami HO, Lund E, Weiderpass E. (2005). Breast cancer risk among women who start smoking as teenagers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* Jan;14(1):61-6.
112. Xue F, Willett WC, Rosner BA, Hankinson SE, Michels KB. (2010). Cigarette smoking and the incidence of breast cancer. *Arch Intern Med.* 2011 Jan 24;171(2):125-33.
113. McDonald JA, Goyal A, Terry MB. (2013). Alcohol Intake and Breast Cancer Risk: Weighing the Overall Evidence. *Curr Breast Cancer Rep.* Sep;5(3).
114. Menezes RF, Bergmann A, Thuler LC. (2013). Alcohol consumption and risk of cancer: a systematic literature review. *Asian Pac J Cancer Prev.*14(9):4965-72.
115. Gao CM, Ding JH, Li SP, Liu YT, Qian Y, Chang J, Tang JH, Tajima K. (2013). Active and passive smoking, and alcohol drinking and breast cancer risk in chinese women. *Asian Pac J Cancer Prev.*14(2):993-6.
116. van den Brandt PA, Spiegelman D, Yaun SS, Adami HO, Beeson L, Folsom AR, Fraser G, Goldbohm RA, Graham S, Kushi L, Marshall JR, Miller AB, Rohan T, Smith-Warner SA, Speizer FE, Willett WC, Wolk A, Hunter DJ: (2000). Pooled analysis of prospective cohort studies on height, weight, and breast cancer risk. *Am J Epidemiol.* 152:514–527.
117. Vrieling A, Buck K, Kaaks R, Chang-Claude J. (2010). Adult weight gain in relation to breast cancer risk by estrogen and progesterone receptor status: a meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat.* 123:641–649.
118. Terry MB, Ferris JS, Pilsner R, Flom JD, Tehranifar P, et al. (2008). Genomic DNA Methylation among Women in a Multiethnic New York City Birth Cohort. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 17: 2306–2310.
119. Parameshwari P, Muthukumar K, Jennifer HG. (2013). A population based case control study on breast cancer and the associated risk factors in a rural setting in kerala, southern India. *J Clin Diagn Res.* Sep;7(9):1913-6.
120. Kelsey JL, Gammon MD, John EM. (1993). Reproductive factors and breast cancer. *Epidemiol Rev.* 15:36-47.
121. Hassey ED, Dow K. (2005). *Pocket Guide to breast cancer.* Boston: *Jones and Bartlett.* p. 3-12.

122. Perry CS, Otero JC, Palmer JL, Gross AS. (2009). Risk factors for breast cancer in East Asian women relative to women in West. *Asia Pac J Clin Oncol*.5: 219–31.
123. Rookus MA, van Leeuwen Fe. (1994). Netherlands Oral Contraceptives and Breast Cancer Study Group. Oral contraceptives and risk of breast cancer in women aged 20-54 years. *Lancet*. 24:844-51.
124. Wohlfahrt J, Melby M. (2004). Age at any birth is associated with breast cancer risk. *Epidemiology*. 12: 68-73.
125. <http://www.bulenttiras.com/erken-menopoz>
126. Hulka BS, Moorman PG. (2001). Breast cancer: Hormones and other risk factors. *Maturitas*. 38: 103-113.
127. Pharoah PD, Day NE, Duffy S, Easton DF, Ponder BA. (1997). Family history and the risk of breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *International Journal of cancer*. May 29; 71(5): 800-09.
128. Reis-Filho JS, Lakhani SR. (2008). Breast cancer special types: why bother? *J Pathol*. 216: 394-8.
129. Tazzite A, Jouhadi H, Saiss K, Benider A, Nadifi S. (2013). Relationship between family history of breast cancer and clinicopathological features in moroccan patients. *Ethiop J Health Sci*. Jul;23(2):150-7.
130. Boras-Granic K, Wysolmerski JJ. (2008). Wnt signaling in breast organogenesis. *Organogenesis*. Apr;4(2):116-22.
131. Chu EY, Hens J, Andl T, Kairo A, Yamaguchi TP, et al. (2004). Canonical WNT signaling promotes mammary placode development and is essential for initiation of mammary gland morphogenesis. *Development* 131: 4819– 4829.
132. Callahan R (1996). MMTV-induced mutations in mouse mammary tumors: Their potential relevance to human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 39: 33–44.
133. Benhaj K, Akcali KC, Ozturk M (2006). Redundant expression of canonical Wnt ligands in human breast cancer cell lines. *Oncol Rep* 15: 701–707.
134. Lin SY, Xia W, Wang JC, Kwong KY, Spohn B, et al. (2000). Beta-catenin, a novel prognostic marker for breast cancer: Its roles in cyclin D1 expression and cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 4262– 4266.

135. Milovanovic T, Planutis K, Nguyen A, Marsh JL, Lin F, et al. (2004). Expression of Wnt genes and frizzled 1 and 2 receptors in normal breast epithelium and infiltrating breast carcinoma. *Int J Oncol* 25: 1337–1342.
136. Howard B, Ashworth A. (2006). Signalling pathways implicated in early mammary gland morphogenesis and breast cancer. *PLoS Genet.* Aug 25;2(8):e112.
137. Tian E, Zhan F, Walker R, Rasmussen E, Ma Y, Barlogie B, Shaughnessy JD Jr. (2003). The role of the Wnt-signaling antagonist DKK1 in the development of osteolytic lesions in multiple myeloma. *N Engl J Med.* Dec 25;349(26):2483-94.
138. Politou MC, Heath DJ, Rahemtulla A, Szydlo R, Anagnostou A, Dimopoulos MA et al. (2006). Serum concentrations of Dickkopf-1 protein are increased in patients with multiple myeloma and reduced after autologous stem cell transplantation. *Int J Cancer* 119: 1728–1731.
139. Aguilera O, Fraga MF, Ballestar E, Paz MF, Herranz M, Espada J et al. (2006). Epigenetic inactivation of the Wnt antagonist DICKKOPF-1 (DKK-1) gene in human colorectal cancer. *Oncogene* 25: 4116–4121.
140. Lodygin D, Epanchintsev A, Menssen A, Diebold J, Hermeking H. (2005). Functional epigenomics identifies genes frequently silenced in prostate cancer. *Cancer Res* 65: 4218–4227.
141. Hirata H, Hinoda Y, Majid S, Chen Y, Zaman MS, Ueno K, Nakajima K, Tabatabai ZL, Ishii N, Dahiya R. (2011). DICKKOPF-4 activates the noncanonical c-Jun-NH2 kinase signaling pathway while inhibiting the Wnt-canonical pathway in human renal cell carcinoma. *Cancer.* 117: 1649-1660.
142. Yang B, Du Z, Gao YT, Lou C, Zhang SG, Bai T, Wang YJ, Song WQ. (2010). Methylation of Dickkopf-3 as a prognostic factor in cirrhosis-related hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol.* 16: 755-763.
143. Sato H, Suzuki H, Toyota M, Nojima M, Maruyama R, Sasaki S, Takagi H, Sogabe Y, Sasaki Y, Idogawa M, Sonoda T, Mori M, Imai K, Tokino T, Shinomura Y. (2007). Frequent epigenetic inactivation of DICKKOPF family genes in human gastrointestinal tumors. *Carcinogenesis.* 28: 2459-2466.

144. Maehata T, Taniguchi H, Yamamoto H, Nosho K, Adachi Y, Miyamoto N, Miyamoto C, Akutsu N, Yamaoka S, Itoh F. (2008). Transcriptional silencing of Dickkopf gene family by CpG island hypermethylation in human gastrointestinal cancer. *World J Gastroenterol.* 14: 2702-2714.
145. Hirata H, Hinoda Y, Nakajima K, Kawamoto K, Kikuno N, Kawakami K, Yamamura S, Ueno K, Majid S, Saini S, Ishii N, Dahiya R. (2009). Wnt antagonist gene DKK2 is epigenetically silenced and inhibits renal cancer progression through apoptotic and cell cycle pathways. *Clin Cancer Res.* 15: 5678-5687.
146. Suzuki H, Watkins DN, Jair KW, Schuebel KE, Markowitz SD, et al. (2004). Epigenetic inactivation of SFRP genes allows constitutive WNT signaling in colorectal cancer. *Nat Genet* 36: 417–422.
147. Huang J, Zhang YL, Teng XM, Lin Y, Zheng DL, et al. (2007). Down-regulation of SFRP1 as a putative tumor suppressor gene can contribute to human hepatocellular carcinoma. *BMC Cancer* 7: 126.
148. Ford CE, Jary E, Ma SS, Nixdorf S, Heinzelmann-Schwarz VA, Ward RL. (2013). The Wnt gatekeeper SFRP4 modulates EMT, cell migration and downstream Wnt signalling in serous ovarian cancer cells. *PLoS One.* 8(1):e54362.
149. Frank B, Burwinkel B, Bermejo JL, Försti A, Hemminki K, Houlston R, Mangold E, Rahner N, Friedl W, Friedrichs N, Buettner R, Engel C, Loeffler M, Holinski-Feder E, Morak M, Keller G, Schackert HK, Krüger S, Goecke T, Moeslein G, Kloor M, Gebert J, Kunstmann E, Schulmann K, Rüschoff J, Propping P; German HNPCC Consortium. (2008). Ten recently identified associations between nsSNPs and colorectal cancer could not be replicated in German families. *Cancer Lett.* Nov 18;271(1):153-7.
150. Alanazi MS, Parine NR, Shaik JP, Alabdulkarim HA, Ajaj SA, Khan Z. (2013). Association of single nucleotide polymorphisms in Wnt signaling pathway genes with breast cancer in Saudi patients. *PLoS One.* 8(3):e59555
151. Tse KP, Tsang NM, Chen KD, et al. (2007). MCP-1 promoter polymorphism at 2518 is associated with metastasis of nasopharyngeal carcinoma after treatment. *Clin Cancer Res.* 13: 6320-6326.

152. Li Q, Wu H, Chen B, Hu G, Huang L, Qin K, Chen Y, Yuan X, Liao Z. (2012). SNPs in the TGF- β signaling pathway are associated with increased risk of brain metastasis in patients with non-small-cell lung cancer. *PLoS One*. 7(12):e51713.
153. Han JY, Wang H, Xie YT, Li Y, Zheng LY, Ruan Y, Song AP, Tian XX, Fang WG. (2012). Association of germline variation in CCNE1 and CDK2 with breast cancer risk, progression and survival among Chinese Han women. *PLoS One*. 7(11):e49296.
154. Ng PC, Henikoff S. (2006). Predicting the effects of amino acid substitutions on protein function. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 7:61-80.
155. Shen LX, Basilion JP, Stanton VP Jr. (1999). Single-nucleotide polymorphisms can cause different structural folds of mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96:7871- 7876.

9. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı-Soyadı	Gonca DÖNMEZ
İletişim Adresi	Cumhuriyet Üniversitesi, Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji AD., 58140- Sivas
Yabancı Dil	İngilizce
E-posta Adresi	donmez.gonca@gmail.com

Eğitim ve Akademik Durumu	
Lise	19 Mayıs Lisesi, Mersin, 1998
Lisans	Hacettepe Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Ankara, 2003
Yüksek Lisans	Cumhuriyet Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji AD, Sivas, 2008
Doktora	Cumhuriyet Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji AD, Sivas, 2014

İş Tecrübesi	
Cumhuriyet Üniversitesi	Araştırma Görevlisi, 2005-Halen

EK-1

ETİK KURUL KARARI

CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU KARAR FORMU

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Wnt antagonisti gen polimorfizmleri ve meme kanseri arasındaki ilişkinin araştırılması			
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU				
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof. Dr. Ali Fazıl Yenidünya/Arş. Gör. Gonca Dönmez			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Cumhuriyet Üniversitesi			
	DESTEKLEYİCİ				
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ				
	ARAŞTIRMANIN FAZİ	FAZ 1	<input type="checkbox"/>		
		FAZ 2	<input type="checkbox"/>		
		FAZ 3	<input type="checkbox"/>		
FAZ 4		<input type="checkbox"/>			
ARAŞTIRMANIN TÜRÜ	Yeni Bir Endikasyon	<input type="checkbox"/>			
	Yüksek Doz Araştırması	<input type="checkbox"/>			
	Diğer ise belirtiniz: Doktora tez çalışması				
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ <input checked="" type="checkbox"/>	ÇOK MERKEZLİ <input type="checkbox"/>	ULUSAL <input type="checkbox"/>	ULUSLARARASI <input type="checkbox"/>	

Handwritten signatures and initials are present below the form, including names like "Ali Fazıl Yenidünya" and "Gonca Dönmez".




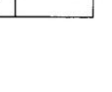
CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU KARAR FORMU

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe <input checked="" type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe <input checked="" type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe <input type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe <input type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı		Açıklama	
	TÜRKÇE ETİKET ÖRNEĞİ	<input type="checkbox"/>		
	SİGORTA	<input type="checkbox"/>		
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	<input type="checkbox"/>		
	BIYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	<input type="checkbox"/>		
	HASTA KARTI/GÜNLÜKLERİ	<input type="checkbox"/>		
	İLAN	<input type="checkbox"/>		
	YILLIK BİLDİRİM	<input type="checkbox"/>		
	SONUÇ RAPORU	<input type="checkbox"/>		
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	<input type="checkbox"/>		
DİĞER:	<input type="checkbox"/>			
KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 2011/027	Tarih: 13.12.2011		
	Yukarıda bilgileri verilen klinik araştırma başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gereke, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan Etik Kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.			

CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU	
ÇALIŞMA ESASI	Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	Prof. Dr. Ayhan Koyuncu

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişki		Katılım *		İmza
			E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Ayhan Koyuncu	Genel Cerrahi	Cumhuriyet Üniversitesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Saadettin Kılıçkap	Medikal Onkoloji	Cumhuriyet Üniversitesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Erol Kisli	Genel Cerrahi	Cumhuriyet Üniversitesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Hülya Toker	Periodontolog	Cumhuriyet Üniversitesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. Ziyet Çınar	Biyostatistik ABD	Cumhuriyet Üniversitesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. Gülay Yıldırım	Tıp Tarihi ve Etik Anabilim Dalı	Cumhuriyet Üniversitesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. Köksal Deveci	Biyokimya Uzmanı	Cumhuriyet Üniversitesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	Katılmadı
Yrd. Doç. Dr. Ali Kaya	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Uzmanı	Cumhuriyet Üniversitesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. Ahmet Altun	Tıbbi Farmakoloji Uzmanı	Cumhuriyet Üniversitesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. Fatih Kılıçlı	Endokrinoloji Bilim Dalı	Cumhuriyet Üniversitesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	

CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU KARAR FORMU

Yrd. Doç. Dr. Ayşe Demirkazık	Biyofizik ABD	Cumhuriyet Üniversitesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Uzm. Dr. Mutlu Doğan	Genel Cerrahi	Sivas Numune Hastanesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Uzm. Dr. Levent Sağlam	Aile Hekimliği ABD	Sivas Numune Hastanesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Öğr. Gör. Engin Daşlı	Avukat	Cumhuriyet Üniversitesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Öğret. Şemsettin Ağtaş,	Biyoloji Öğretmeni	Sivas Lisesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	Katılmadı

* :Toplantıda Bulunma

EK-2

BİLGİLENDİRİLMİŞ OLUR FORMU

Sayın ...

Bu katılacağınız çalışma bilimsel bir araştırma olup, araştırmanın adı “Wnt Antagonisti Gen Polimorfizmleri ve Meme Kanseri Arasındaki İlişkinin Araştırılması”dır. Meme kanserinin genetik ve çevresel birçok nedeni olduğu çeşitli çalışmalarda bildirilmektedir. Yapılan birçok çalışmada hücre büyüme ve farklılaşmasını düzenleyen ve kontrol eden genlerde meydana gelen değişikliklerin (polimorfizmlerin) kanser gelişiminde etkin olduğu gösterilmiştir.

Bu araştırmanın amacı, Wnt antagonistleri genlerinde meydana gelen polimorfizimlerinin meme kanseri için risk faktörü olup olmadığının araştırılmasıdır. Çalışmaya katılım gönüllülük esasına dayalıdır. Kararınızdan önce araştırma hakkında sizi bilgilendirmek istiyoruz. Bu bilgileri okuyup anladıktan sonra araştırmaya katılmak isterseniz formu imzalayınız.

Bu araştırmada sizin aldığınız tedaviler asla değiştirilmeyecektir. Size herhangi bir ek tedavi yapılmayacaktır. Bu araştırmada sizin kanınızdan küçük miktarda (5 ml) örnek alınarak DNA'nız izole edilecektir. Bu örneklerde ilgi genin yapısındaki değişikliklere bakılacaktır. Elde edilen veriler istatistiksel olarak değerlendirilecektir. Bu araştırmada yer almanız için bir defa gelmeniz yeterli olup, araştırmada yer alacak sizin gibi gönüllülerin sayısı 200'dür (100 hasta birey, 100 sağlıklı kontrol). Çalışma 24 ay sürecektir.

Bu araştırma ile ilgili olarak sizden beklenen istenen tahlilleri yaptırmak, araştırmacının sorularına uygun ve doğru cevap vermek ve sonuçlarını zamanında araştırmacıya ulaştırmaktır.

Bu araştırmada sizin için herhangi bir risk ve zarar söz konusu değildir. Sadece kan alımı sırasında kanın damar dışına çıkması halinde o bölgede bir miktar geçici morluk oluşabilir veya yetersiz baskı uygulanması halinde kanamanız kısa bir süre uzayabilir. Ancak hastalığın gelişmesi hakkında önemli ipuçlarının elde edilmesine katkı sağlayabileceğini düşündüğümüz bu çalışma meme kanseri hastalarının klinik takibinde yardımcı olacaktır. Özellikle çalışma sonucunda mevcut bakılacak parametrenin kanser hastalarında daha yüksek oranda tespit edilmesi halinde bu parametrenin kansere yatkınlığı olan bireylerin sağlıklı bireylerden ayrımının yapılması gibi bir katkı sağlayacağından sizden sonraki hastalar ve sağlıklı bireylerin yararına olması beklenmektedir.

Araştırma sırasında sizi ilgilendirebilecek herhangi bir gelişme olduğunda, bu durum size veya yasal temsilcinize derhal bildirilecektir. Araştırma hakkında ek bilgiler almak için ya da çalışma ile ilgili herhangi bir sorun, istenmeyen etki ya da diğer rahatsızlıklarınız için 0 346 219 1010 numaralı telefonda araştırma görevlisi Gonca DÖNMEZ'e başvurabilirsiniz.

Bu araştırmada yer almanız nedeniyle size hişbir ödeme yapılmayacaktır. Ayrıca bu araştırma kapsamındaki bütün muayene, tetkik, testler ve tıbbi bakım hizmetleri için sizden veya bağlı bulunduğunuz sosyal güvenlik kuruluşundan hişbir ücret istenmeyecektir. Bu araştırma CÜBAP tarafından desteklenmektedir.

Bu araştırmada yer almak tamamen sizin isteğinize bağlıdır. Araştırmada yer almayı reddedebilirsiniz ya da herhangi bir aşamada araştırmadan ayrılabilirsiniz. Bu durum herhangi bir cezaya ya da sizin yararlarınıza engel duruma yol açmayacaktır. Araştırıcı bilginiz dahilinde veya isteğiniz dışında, uygulanan tedavi şemasının gereklerini yerine getirmemeniz, çalışma programını aksatmanız veya tedavinin etkinliğini artırmak vb. nedenlerle sizi araştırmadan çıkarabilir. Araştırmanın sonuçları bilimsel amaçla kullanılacaktır, çalışmadan çekilmeniz ya da araştırıcı tarafından çıkarılmanız durumunda, sizle ilgili tıbbi veriler de gerekirse bilimsel amaçla kullanılabilir.

Size ait tüm tıbbi ve kimlik bilgileriniz gizli tutulacaktır ve araştırma yayınlansa bile kimlik bilgileriniz verilmeyecektir, ancak araştırmanın izleyicileri, yoklama yapanlar, etik kurullar ve resmi makamlar gerektiğinde tıbbi bilgilerinize ulaşabilir. Siz de istediğinizde kendinize ait tıbbi bilgilere ulaşabilirsiniz.

Çalışmaya Katılma Onayı:

Yukarıda yer alan ve araştırmaya başlanmadan önce gönüllüye verilmesi gereken bilgileri okudum ve sözlü olarak dinledim. Aklıma gelen tüm soruları araştırıcıya sordum, yazılı ve sözlü olarak bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Çalışmaya katılmayı isteyip istemediğime karar vermem için bana yeterli zaman tanındı. Bu koşullar altında, bana ait tıbbi bilgilerin gözden geçirilmesi, transfer edilmesi ve işlenmesi konusunda araştırma yürütücüsüne yetki veriyor ve söz konusu araştırmaya ilişkin bana yapılan katılım davetini hişbir zorlama ve baskı olmaksızın gönüllü olarak kabul ediyorum.

Bu formun imzalı bir kopyası bana verilecektir.

Gönüllünün,

Adı-Soyadı:

Adresi:

Tel.-Faks:

Tarih ve İmza:

Açıklamaları yapan araştırmacının,

Adı-Soyadı: Dr. Turgut KAÇAN

Görevi: Uzman Dr.

Adresi: C.Ü. Tıp Fakültesi Medikal Onkoloji Ünitesi, Sivas.

Tel.-Faks:

Tarih ve İmza:

Olur alma işlemine başından sonuna kadar tanıklık eden kuruluş görevlisinin/görüşme tanığının,

Adı-Soyadı: Dr. Turgut KAÇAN

Görevi: Uzman Dr.

Adresi: C.Ü. Tıp Fakültesi Medikal Onkoloji Ünitesi, Sivas.

Tel.-Faks:

Tarih ve İmza: 09.12.2011

EK-3

MEME KANSERİ TANISI İLE TAKİP EDİLEN HASTALARA AİT
TAKİP FORMU

Tarih:

Adı Soyadı:

Dosya No:

Tel no:

Yaşı:

Cinsiyeti: E K

Sigara: Var Yok

Alkol: Var Yok

Diyet: Var Yok

İlk menarş yaşı:

İlk doğum yaptığı yaş:

Canlı doğum sayısı:

Menapoz yaşı:

Boy: **Kilo:**

HER2:

Ailede Kanser Öyküsü: Var Yok

Varsa Kanser Türü:

Varsa akrabalık derecesi:

Bilinen Hastalık:DiyabetTansiyonKalp hastalıkları

Klinik Evreleme:

T evresi: N Evresi: M evresi:

Patolojik Evreleme:

T: N: M:

Histolojik Grade (diferansiyasyon):

I: II: III:

Metastaz yeri: Lokal Karaciğer
..... Beyin Kemik
..... Akciğer Diğer

EK-4
KONTROL GRUBU TAKİP FORMU

Tarih:

Adı Soyadı:

Dosya No:

Tel no:

Yaşı:

Cinsiyeti: E K

Sigara: Var Yok

Alkol: Var Yok

Diyet: Var Yok

İlk menarş yaşı:

İlk doğum yaptığı yaş:

Canlı doğum sayısı:

Menapoz yaşı:

Boy: **Kilo:**

Ailede Kanser Öyküsü: Var Yok

Varsa Kanser Türü:

Varsa akrabalık derecesi:

Bilinen Hastalık:DiyabetTansiyonKalp hastalıkları

Çalışmaya Alınacak Bireylerin Özellikleri; hasta grubunda yer alan bireylerle,

1. Aynı yörede bulunan,
2. Yaşam özellikleri benzer olan,
3. Yaş ve cinsiyetleri hasta grubu ile uyumlu olan,
4. Bilinen mevcut hastalığı olmayan.