

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ**

**TÜRK TOPLUMUNDA MEME KANSERLİ HASTALARIN  
SAĞLIKLI MEME DOKUSU VE TÜMÖR DOKUSUNDA MDR-  
1(MULTİ DRUG RESİSTANCE-1) GENİNDE C1236T, G2677T/A  
VE C3435T ALLELLERİNİN SIKLIĞININ ARAŞTIRILMASI**

**Dr. Ferah ÇAKIR**

**GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI  
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**DANIŞMAN  
Prof. Dr. Sancar BAYAR**

**ANKARA  
2013**

## KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Genel Cerrahi Anabilim Dalı

Tıpta Uzmanlık eğitimi çerçevesinde yürütülmüş olan

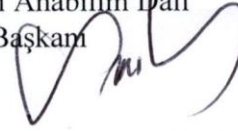
**“TÜRK TOPLUMUNDA MEME KANSERLİ HASTALARIN SAĞLIKLI MEME  
DOKUSU VE TÜMÖR DOKUSUNDA MDR-1(MULTİ DRUG RESİSTANCE-1)  
GENİNDE C1236T, G2677T/A VE C3435T ALLELLERİNİN SIKLIĞININ  
ARAŞTIRILMASI”**

başlıklı,

Dr. Ferah ÇAKIR'a ait bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından  
**Tıpta Uzmanlık Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 24.04.2013


Prof. Dr. Semih BASKAN  
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Genel Cerrahi Anabilim Dalı  
Jüri Başkanı



Prof. Dr. Sancar BAYAR  
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Cerrahi Onkoloji Bilim Dalı  
Üye/ Tez Danışmanı



Prof. Dr. Selçuk HAZİNEDAROĞLU  
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Genel Cerrahi Anabilim Dalı  
Üye



## TEŞEKKÜR

Genel cerrahi ihtisasım süresince tezimin oluşumunda desteğini esirgemeyen tez danışmanım Prof. Dr. Sancar Bayar'a, tezimin konusunun belirlenmesindeki önerileri için Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Genetik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Ajlan Tükün'e, genetik çalışmaların yürütülmesindeki emeği ve tez yazımına bilgi ve yayınları ile katkıda bulunan Doç. Dr. Güvem Gümüş Akay'a, tezimin patoloji materyallerinin temininde emeği geçen Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'ndan Uzm. Dr. Saba Kiremitçi'ye, istatistiksel değerlendirmedeki katkıları için Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'ndan Yrd. Doç. Dr. Aydın Rüstemoğlu'na,

Asistanlığım boyunca dostluklarını esirgemeyen tüm genel cerrahi araştırma görevlisi arkadaşlarıma ve uzmanlarımıza, genel cerrahi servisi ve ameliyathanesi çalışanlarına,

Asistanlığım boyunca deneyimleriyle yol gösteren, herkese bilimsel ve akademik olarak katkıda bulunmayı kendine hedef edinmiş başta Prof. Dr. M.Semih Başkan olmak üzere kliniğimizin tüm değerli öğretim üyelerine,

Aldığım her kararda bana destek olan evlatları olmaktan gurur duyduğum canım annem ve babama, kardeşime, Ankara'da geçirdiğim eğitim hayatım boyunca hep yanımda olan çok kıymetli arkadaşım Dr. Fatma Kılıç ve ailesine teşekkür ediyorum.

Dr. Ferah ÇAKIR

# İÇİNDEKİLER

## Sayfa No:

KABUL VE ONAY .....	i
TEŞEKKÜR.....	ii
İÇİNDEKİLER .....	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
TABLolar DİZİNİ .....	viii
GRAFİKLER DİZİNİ .....	ix
1. GİRİŞ .....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	3
2.1. MEME KANSERİ .....	3
2.1.1. Meme Kanserinin Epidemiyolojisi .....	3
2.1.2. Meme Kanserinde Mortalite .....	4
2.1.3. Meme Kanserinde Etyoloji .....	5
2.1.3.1. Genetik ve Aile Öyküsü .....	5
2.1.3.2. Endokrin Nedenler.....	7
2.1.3.2.1. Reprodüktif Faktörler .....	7
2.1.3.2.2. Hormonal Faktörler .....	9
2.1.3.3. Çevresel Faktörler.....	10
2.1.3.3.1. Sigara.....	10
2.1.3.3.2. Besin faktörü .....	11
2.1.3.3.3. Vücut Ağırlığı.....	11
2.1.3.3.4. Vitaminler.....	11
2.1.3.3.5. Alkol.....	12
2.1.3.4. Diğer Risk Faktörleri .....	13
2.2. KANSER VE MOLEKÜLER TEMELİ .....	13
2.2.1. Meme Kanserinde Etkili Onkogenler .....	15
2.2.1.1. Kalıtsal Meme Kanseri.....	17
2.2.1.1.1. Meme Kanseri Gelişimine Yatkınlık Yaratan Nadir Görülen, Etkinliği Yüksek Genler .....	17

2.2.1.1.2. Meme Kanseri Gelişimine Yatkınlık Yaratan Etkinliği Orta düzeyde, Az- sıklıkta Görülen Genler .....	18
2.2.1.1.3. Meme Kanseri Gelişimine Yatkınlık Yaratan Etkinliği Düşük, Sık Görülen Gen ve Lokuslar .....	18
2.3. MEME KANSERİ FARMAKOGENETİĞİ .....	18
2.3.1. Çoklu ilaç direnci .....	19
2.3.2. Çoklu İlaç Direnç Mekanizması .....	20
2.3.3. P glikoprotein .....	20
2.4. MDR1 GENİ TEK NÜKLEOTİD POLİMORFİZMLERİ .....	23
2.4.1. C3435T Polimorfizmi .....	24
2.4.2. G2677T/A Polimorfizmi .....	26
2.4.3. C1236T Polimorfizmi .....	27
2.5. MEME KANSERİNDE TNM EVRELEMESİ .....	28
3. GEREÇ VE YÖNTEM .....	34
3.1. HASTA VE KONTROL GRUPLARININ TOPLANMASI .....	34
3.2. DNA İZOLASYONU .....	34
3.3. MDR1 GENİ TEK NÜKLEOTİD POLİMORFİZMLERİNİN GENOTİPLENDİRİLMESİ .....	36
3.4. İSTATİSTİKSEL YÖNTEM .....	37
4. BULGULAR .....	38
4.1. MOLEKÜLER ANALİZ SONUÇLARI .....	38
4.2. HAPLOTİP SIKLIĞI .....	39
4.3. ALLEL SIKLIĞI .....	43
4.4. İSTATİSTİKSEL KARŞILAŞTIRMA .....	44
4.4.1. Allel Sıklığı Bakımından .....	46
4.4.2. Genotip Sıklığı Bakımından .....	47
4.4.3. Haplotip Sıklığı Bakımından .....	47
5. TARTIŞMA .....	50
6. SONUÇ VE ÖNERİLER .....	53
7. ÖZET .....	54
8. SUMMARY .....	56
9. KAYNAKLAR .....	58

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

%	: yüzde
°C	: Santigrad derece
A	: Adenin
ABC	: ATP Binding Cassette
ABCB1	: Adenosine Triphosphate-Binding Cassette B1
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
ADP	: Adenozin difosfat
ALL	: Akut Lenfoblastik Lösemi
Ark	: Arkadaşları
C	: Sitozin
COMT	: Katekol-o-metil transferaz
CYP	: Sitokrom P
DCIS	: Duktal karsinoma in situ
dH <sub>2</sub> O	: Distile su
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EP	: Etoposide/cisplatine
ER	: Östrojen reseptörü
FAD	: Flavın adenin dinükleotid
FMN	: Flavın mononükleotid
G	: Grade
G	: Guanin
GST	: Glutasyon S-transferaz
HAA	: Heterosiklik aromatik aminler
HRT	: Hormon Replasman Tedavisi
IHK	: İmmünohistokimyasal
IP	: İrinotecan/cisplatin
İTH	: İzole tümör hücreleri
kD	: Kilodalton

M	: Metastaz
MDR	: Multiple drug resistance
MgCl <sub>2</sub>	: Magnezyum klorür
ml	: Mililitre
MnSOD	: Manganez superoksit dismutaz
mRNA	: Mitokondrial ribonükleik asit
MRP	: Multi-drug rezistans ilişkili protein
N	: Nod
NAD	: Nikotiamid adenin dinükleotid
NADP	: Nikotiamid adenin dinükleotid fosfat
NAT	: N-asetil transferaz
NBD	: Nükleotid bağlama domaini (NBD)
OH	: Hidroksil
PAH	: Polisiklik aromatik hidrokarbonlar
PCB	: Polychlorinate biphenyl
P-gp	: P-glikoprotein
PR	: Progesteron reseptörü
pRb	: Protein of retinablastoma
ROS	: Reactive oxygen species
rpm	: Revolution per minute
s	: Sentez
sn	: Saniye
SNPs	: Single nucleotide polymorphisms
T	: Timin
T	: Tümör
TMD	: Transmembran domaini
vb	: ve benzeri
α	: Alfa
μl	: Mikrolitre
μM	: Mikromol

## ŞEKİLLER DİZİNİ

### Sayfa No:

- Şekil 1. P glikoproteininin iki boyutlu yapısı. .... 21
- Şekil 2. *MDR1* geninde gözlenen SNP'lerinin şematik gösterimi..... 22



## TABLolar DİZİNİ

### Sayfa No:

<b>Tablo 1.</b>	Meme Kanserinin TNM Sınıflamasına Göre Sınıflandırılması .....	33
<b>Tablo 2.</b>	Normal doku ile tümörlü meme dokusunun haplotip sıklıkları .....	39
<b>Tablo 3.</b>	Tümörlü meme dokusu ile normal popülasyonun haplotip sıklıkları .....	40
<b>Tablo 4.</b>	Tümörsüz meme dokusu ile normal popülasyonun haplotip sıklıkları.....	40
<b>Tablo 5.</b>	Tümör boyutuna göre haplotip sıklığı.....	41
<b>Tablo 6.</b>	Tümör grade'ine göre haplotip sıklıkları .....	41
<b>Tablo 7.</b>	Lenf nodu metastazına göre haplotip sıklıkları .....	41
<b>Tablo 8.</b>	Östrojen reseptörüne göre haplotip sıklıkları .....	42
<b>Tablo 9.</b>	Progesteron reseptörü durumuna göre haplotip sıklıkları .....	42
<b>Tablo 10.</b>	c-erb durumuna göre haplotip sıklıkları .....	42
<b>Tablo 11.</b>	Allel sıklığı açısından gruplar arası istatistiksel karşılaştırma .....	45
<b>Tablo 12.</b>	Genotip sıklığı açısından gruplar arasında istatistiksel karşılaştırma .....	45
<b>Tablo 13.</b>	Haplotip sıklığına göre grupların istatistiksel olarak karşılaştırılması .....	46

## GRAFİKLER DİZİNİ

**Sayfa No:**

- Grafik 1.** Normal populasyonda, tümörlü meme dokusu ve normal meme dokusunda 1236 lokusunundaki C ve T allel sıklığı (%) ..... 43
- Grafik 2.** Normal populasyonda, tümörlü meme dokusu ve normal meme dokusunda 2677 lokusunundaki G, T ve A allel sıklığı (%) ..... 43
- Grafik 3.** Normal populasyonda, tümörlü meme dokusu ve normal meme dokusunda 3435 lokusunundaki C ve T allel sıklığı (%) ..... 44

# 1. GİRİŞ

Meme kanseri Sağlık Bakanlığı'nın 1999 yılı verilerine göre kadınlarda en sık görülen kanserler arasında %24.1 oranıyla 1. sırada yer almaktadır (1). Tedavide cerrahi, sistemik kemoterapi, radyoterapi ve hormonoterapi kullanılmaktadır. Kemoterapi, cerrahiden sonra meme kanseri tedavisinde uygulanan en yaygın ve etkili yöntemdir. Ancak, kemoterapi süresince, hastaların tedaviye cevap vermemesi veya tedavi sonrası kanserin tekrarlaması sıklıkla görülen bir durumdur.

Kanser tedavisinde başarıya ulaşmak için genellikle birden fazla antineoplastik ilaç uygulanmaktadır. Ancak, sonradan kazanılan ya da tedavi öncesi kişide varolan ilaç dirençliliği, kanser kemoterapisinde başarıya ulaşmayı büyük ölçüde engellemektedir. Bu duruma "çoklu ilaç dirençliliği" (multiple drug resistance; MDR) denilmektedir (2).

Kemoterapiye karşı geliştirilen dirençlilik pekçok antikanser ilacın hastalar üzerinde beklenen etkisini gösterememesine ve hastalığın ilerlemesine neden olmaktadır. Artırılan ilaç dozları ise hastalarda görülen yan etkilerin artmasına neden olmaktadır. Ayrıca, dirençlilik nedeniyle zaman ve ilaç kaybı olmakta, hastaların tedavisi zorlaşmaktadır.

Çoklu ilaç dirençliliği birden çok ve birbirinden farklı ilaca direnç gelişimidir (2). Hücre içine pasif olarak giren ilaçların hücre dışına aktif olarak pompalanması membran transport sistemlerinin görevidir. Bu grup proteinlerinin büyük kısmı ATP Binding Cassette (ABC) süper ailesine aittir (3). Hücre içi yetersiz ilaç konsantrasyonunun nedeni membran geçirgenliğinin bozulmasıdır ve bundan sorumlu faktör 170 kilodalton (kD) ağırlığındaki plazma membran proteini olan p-glikoproteindir. Human P-glikoprotein (P-gp), 7q21'de lokalize ve 28 ekzon içeren MDR1 geni tarafından kodlanır (3). İnsan P-gp'i ince ve kalın barsaklar, karaciğer, böbrek, beyin, testis, kas dokusu, plasenta ve sürrenal gibi normal dokularda da bulunur (4). P-gp'nin fizyolojik fonksiyonu tam olarak aydınlatılmamış olmasına rağmen P-gp'nin intrasellüler potansiyel toksik metabolitleri uzaklaştırdığı düşünülmektedir. P-gp'nin aşırı ekspresyonu proliferasyon aktivitesinde azalma,

uzamış yaşam siklusu, apoptoza direnç ve hücre transformasyonunda artışla ilişkilidir (5). Günümüzde MDR 1 geni için 20'den fazlası sessiz olan 50'den fazla tek nükleotid polimorfizmi (single nucleotide polymorphisms; SNP) tanımlanmıştır (6).

Bu çalışmamızda amaç Türk toplumunda meme kanserli hastaların sağlıklı meme dokusu ve tümörlü meme dokusunda 7. kromozomda ekzon 12'deki C1236T, ekzon 21'deki G2677T=A ve ekzon 26'daki C3435T allellerinin bu olgulardaki sıklığını araştırmaktır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. MEME KANSERİ

#### 2.1.1. Meme Kanserinin Epidemiyolojisi

Kadınlar yaşamlarının herhangi bir zamanında herhangi bir meme problemi için tıbbi yardıma ihtiyaç duyarlar. Sıklıkla bu hastalarda benign meme patolojileri saptanmasına karşın meme kanserinin de görülme sıklığı hızla artmaktadır. Meme kanseri dünyada kadınlar arasında görülen en yaygın kanser türü olup, her yıl dünyada 1 milyon yeni olguya tanı konmaktadır. Kadınlarda görülen yeni kanser olgularının yaklaşık %20'sini oluşturur (7).

Yaşa bağlı en yüksek görülme oranı yılda her 100.000 kadında 86.3 ile Kuzey Amerika'da, en düşük oran ise 11.8 ile Çin'de görülmektedir. Meme kanseri sıklığı ülkeler arasında farklılık göstermekte ve bu fark özellikle menopoz sonrası kadınlarda daha belirgin şekilde ortaya çıkmaktadır (7).

Meme kanseri 50 yaşına kadar yaş artışına paralel olarak dik eğimle yükseliş gösterirken daha sonra bu artış oranı azalır. Meme kanseri görülme sıklığı 1973'den itibaren dünyanın çeşitli ülkelerinde %1- 2 oranında bir artış göstermektedir (8).

Meme kanserindeki artış, tarama yöntemlerinin daha sık ve düzenli kullanılmasına bağlı tanı oranındaki artışa bağlanmakta ve toplumların ortalama yaşam sürelerinin uzamasıyla hastalığın ileri yaş grubunda daha sık görülmesi ile açıklanmaktadır (9).

Görülme sıklığındaki yıllık artış, düşük riskli toplumlarda daha belirgindir. Bu nedenle zaman içinde Batı ülkelerinde yaşayan kadınlarla, Doğu toplumlarındaki kadınlar arasındaki meme kanseri sıklığı farkının kapanacağı öngörülmektedir (8).

İnsidansta en büyük artış Kanada, Amerika, İspanya ve İsveç'de (1960- 1975 yılları arasında %1.8) ortaya çıkmıştır. Amerikalı bir kadında yaşam süresi boyunca meme kanseri gelişme olasılığı %12.5, meme kanserinden ölüm olasılığı %3.4 olarak hesaplanmıştır (10). Ülkemizde ise kadınlarda deri dışındaki tüm kanserler içinde meme kanseri ilk sırada yer almaktadır. Meme kanseri sıklığı ülkeler arasında

farklılık göstermekte ve bu fark özellikle menopoz sonrası kadınlarda daha belirgin şekilde ortaya çıkmaktadır (11).

2010 yılı için projeksiyonlar yeni meme kanser vakalarının yıllık küresel yükünün 1,5 milyona ulaşacağını ve bunların artmakta olan bir çoğunluğunun düşük ve orta gelir seviyesindeki ülkelerde görüleceğini göstermektedir (12).

Hastalık gelişme riski, yaş ile doğrudan ilişkili olup, yaş arttıkça hastalık görülme sıklığı giderek artar. Meme kanseri 30 yaşından önce nadir olup, bu yaşı takip eden reproduktif yıllarda hızlı bir tırmanış gösterir, menopoz dönemindeki hafif bir azalmayı takiben menopoz sonrası yıllarda yavaş bir eğimle sürekli devam eden artış ortaya çıkar (13).

### **2.1.2. Meme Kanserinde Mortalite**

Meme kanseri dünya genelinde kadınlarda en yaygın kanser kaynaklı ölüm nedenlerinden biridir. Kansere bağlı ölümlerde akciğer kanserinin arkasından 2. sırada gelmektedir. ABD(Amerika Birleşik Devletleri)'de 2009 yılı için 194280 invazif meme kanseri ve 62280 in situ karsinoma gelişeceği tahmin edilmiş ve aynı yıl içerisinde 40610 kadının ise meme kanseri nedeniyle öleceği ön görülmüştür (14).

Yıllar içerisinde meme kanseri görülme sıklığında artış olmakla birlikte erken tanı ve tedavi modalitelerindeki gelişmeler sayesinde mortalite oranlarında düşüş görülmektedir. Sağlık Bakanlığı'nın verileri incelendiğinde ise Türkiye'de meme kanseri insidansının kadınlar arasında %35 oranında olduğu görülmektedir (1).

Meme kanseri kaynaklı olarak her yıl 411.000 ölüm meydana gelir ve bu tüm nedenlerden kaynaklanan kadın ölümlerinin %1,6'sını teşkil eder. Dünyada meme kanseri görülme sıklığı yıllık ortalama %0,5 oranında artmaktadır. Ancak görülme sıklığındaki bu artışa karşın, gelişmiş Batı ülkelerinde mortalite oranında az da olsa gerileme gözlenmektedir (15).

Meme kanserinin büyük ölçüde zengin ülkelerin bir sorunu olduğu yönündeki yaygın yanlış kanıya rağmen her yıl meme kanserinden ölümlerin çoğu gelişmiş ülkelerde değil, gelişmekte olan ülkelere meydana gelir (12).

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 (16).

### **2.1.3. Meme Kanserinde Etiyoloji**

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

#### **2.1.3.1. Genetik ve Aile Öyküsü**

Genetik faktörler meme kanserinin etiolojisinin yaklaşık dörtte birini oluşturmaktadır (17). İsveçli, Danimarkalı, Finlandiyalı mono ve dizogotik ikizler üzerinde yapılan bir çalışmada; genetik faktörler tüm meme kanserli olguların %27'sini açıklayabilmiştir (18).

Magnusson ve ark. meme kanserli bir kişinin annesinde toplumdaki kadınlara göre meme kanseri gelişme riskinin 2 kat fazla, kız kardeşinde ise 2.5 kat fazla olduğunu göstermiştir (19). Atipik hiperplazi saptanan kadınlarda meme kanseri oluşma riski %4.4 artarken atipik hiperplazi ile birlikte ailevi meme kanseri öyküsü olanlarda meme kanseri oluşma riski %9 artmıştır (19).

Meme kanserinin etiolojisinde suçlanan genler arasında tek başına meme kanser riskini yükselten yüksek penetranslı genler ve tek başına kanser riskinde daha az etkili olan düşük penetranslı genler olmak üzere iki grup gen vardır. Yüksek penetranslı genlerin hastalığa neden olan allelik varyantları genel popülasyonda

beklenenden azdır. Popülasyonda bu genotiplerle açıklanabilecek meme kanserini oranı düşük penetranslı genlerden çok daha azdır (20).

BRCA1 ("Breast cancer susceptibility gene"-meme kanserine yatkınlık geni1), BRCA2 ve p53 (tümör baskılayıcı gen) yaygın olan yüksek penetranslı genler olup tümör supressör gen grubundadırlar. Bu genlerin erken dönemde görülen meme kanserlerinin familial grubunun aşağı yukarı yarısını kapsadığı tahmin edilmektedir. Bu genler hem hastalığın erken başlangıçlı olmasına, hem de mültifokal tümörlere yatkınlığa neden olur (18). BRCA1 ve BRCA2 proteinleri genomik stabilitenin korunmasında, DNA zararlarına hücresel yanıtta, transkripsiyonel regülasyonda ve hücresel proliferasyonda rol oynar (21). BRCA1 geninin lokalizasyonu 17q12-21 şeklindedir ve otozomal dominant özellik gösterir. Bu gen kalıtsal meme kanserlerinin büyük bir kısmından (%42) sorumludur(18).

Erken meme kanserlilerde BRCA1'de erken protein sonlanmasına neden olan bir mutasyon (1200 insA), bir yanlış anlam mutasyonu (2080A→G) ve gen dizi farklılaşması bulunmuştur. BRCA2 13q12-13 kromozom bölgesinde yer alır. BRCA2 genindeki mutasyonlar, kalıtsal kadın meme kanser vakalarının %32'sini ve erkeklerdeki meme kanserlerinin çoğunu açıklar. İki adet birinci derece akrabasında meme kanseri olanlarda erken protein sonlanmasına neden olan (6880 insG) ve (3034 delAAAC) BRCA2 mutasyonu saptanmıştır. Bu genlerin kalıtsal meme kanseri ile ilişkisini belirlemek amacıyla yapılan popülasyon genetiği çalışmalarında değişik toplumlarda BRCA1 ve BRCA2 mutasyonlarının sıklıklarının önemli farklılıklar gösterdiği görülmüştür (22).

p53 tümör süpresör geni 17. kromozomun p12-13.3 gen bölgelerinde bulunan ve hücrede proliferasyonu düzenleyen 53 Kd'luk bir fosfoprotein kodlayan genidir. Bu protein hücrenin S(sentez) fazına girmesini pRb (protein of Retinablastoma) fosforilasyonunu engelleyerek meydana getirirler. p53 geni, insanlarda gözlenen birçok kalıtsal ve sporadik form kanserde aktif olarak rol oynamaktadır. Bu gendeki mutasyonlar kanserde en sık rastlanan genetik değişikliklerdir. Mutasyonlar hücre proliferasyonundaki en önemli baskılayıcı mekanizmayı ortadan kaldırırlar ve hücrede genetik bir dengesizlik oluştururlar. Bu olay tümör proliferasyonunun artmasına yol açar (23).



Hücre bölünmesini durduran ve DNA hasarının düzeltilmesini sağlayan genlerin transkripsiyonunu aktive eden bir transkripsiyon faktörü olmasının yanı sıra p53 onarılmayan DNA hasarlı hücrelerde de apoptozu sağlayan bir role sahiptir. Endojen faktörler veya yaşam şekli ile birlikte hareket eden düşük penetranslı genler henüz tam olarak tanımlanmamıştır (24). Düşük penetranslı genler üzerindeki bilgilerimiz meme kanseri üzerine etkisi olduğu düşünülen biyokimyasal ve fizyolojik yollara dayanmaktadır. Substrata bağlı olarak enzimler bu yolda ya inaktif ya da aktif role sahip olabilirler. Yapılan çok geniş çaplı çalışmalarda, meme kanserine ilişkin düşük penetranslı genlerin CYP, GST, NAT ve COMT'u kodladığı saptanmıştır (18).

Meme kanserlerinin yaklaşık %30'unda meme epitelinde mutasyonlar sonucu protoonkogen aşırı ekspresyonu gözlenmektedir. Bunlar arasında en karakteristik olan HER-2 (Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü) protoonkogeninin aşırı ekspresyonudur. HER-2 geni epidermal büyüme faktör reseptör ailesinin (HER-1, HER2, HER3, HER4) bir üyesidir (9). HER-2 geni 17q12-q21 kromozom bölgesinde lokalizedir. Yaklaşık 3 kb uzunluğundadır ve 27 ekson içermektedir. HER-2 185 kd ağırlığında tirozin kinaz aktivitesi gösteren bir reseptör kodlar. Aşırı HER-2 ekspresyonu hücre yüzeyinde homodimer (HER2-HER2) ve heterodimer (HER2-HER1) oluşumu artışına yol açmaktadır (25). HER-2'nin oluşturduğu dimerler diğer aile üyelerinin birleşmesiyle ortaya çıkan dimerlerden daha aktiftir. Dimerler oluşuktan sonra; Ras/MAP Kinaz, PI-3K/Akt, JAK/STAT, PLC- $\gamma$ , src ve strese bağlı aktifleşen kinaz gibi değişik sinyal yollarının uyarılabildiği gösterilmiştir. Östrojen reseptörü negatif tümörlerde HER-2 ekspresyonu daha sık görülürken reseptör pozitif tümörlerde ekspresyonun daha ender gözlenmesi HER-2 ile östrojen reseptörü arasında endokrin ve parakrin sinyallerin etkileşimi ile birbirini baskılayan bir çevrimin bulunduğunu düşündürmektedir (25).

### **2.1.3.2. Endokrin Nedenler**

#### **2.1.3.2.1. Reprodüktif Faktörler**

Son yapılan çalışmalar endojen hormon seviyesi ve meme kanserine yakalanma riski arasında bir bağlantı olduğunu göstermiştir (26). Bu bağlamda östron, östrodiol, östriol, androstenedion, testosteron, dihidroepiandrosteron,

progesteron, seks hormonu bağlayan globulin ve prolaktin serum düzeylerinin önemli olduğu düşünülmektedir. Yaşam boyunca kadınlar; menarşta, ilk gebelik döneminde, çok sayıdaki gebelik sonucu ve menopoz çağını içeren bazı dönemlerde yüksek düzeyde endojen seks steroidlerine maruz kalmaktadır. Erken yaşta başlayan düzenli menstrual siklus ve menarştan sonraki birkaç yıl çok yüksek düzeydeki östrojen seviyesi sonucu meme epitelinin sürekli östrojene maruz kalması ile kadınlarda meme kanserine yakalanma riski artmaktadır (18).

Genel olarak menarşın her bir yıl gecikmesi ile meme kanseri riskinin %20 azaldığı ön görülmektedir. Ancak, meme kanseri riski yönünden menstruasyonun başlama yaşı yanında ilk düzenli (önceden tahmin edilebilen) menstruasyon yaşı da önemlidir (7). Benzer şekilde, menopozun ileri yaşlara kadar sarkması ovulator siklusların sayısını arttırmakta ve bu da riskin artmasına neden olmaktadır (18). 45 yaşından önce menopoza giren kadınlarda meme kanseri riski, 55 yaşından sonra menopoza giren kadınlardaki riskin yarısı kadardır. Menopoz yaşında her bir yıllık artış için meme kanserine yakalanma riski yaklaşık olarak %3 artmaktadır (7). Yüksek parite ve erken doğum yaşı gibi faktörlerin her ikisi de yaşam boyunca meme kanser insidansının düşük kalmasında etkilidir (18).

İlk çocuğunu 20 yaşından önce yapma, ilk çocuğunu 30 yaşından sonra yapmaya göre meme kanserine yakalanma riskini yarı yarıya düşürmektedir. Paritenin koruyucu etkisi ve mekanizması tam olarak anlaşılmamakta ancak meme bezi hücrelerini erken dönemde tam olarak farklılaştırdığı ve onları karsinojenik transformasyonlara daha az duyarlı hale getirdiği düşünülmektedir (27). Ayrıca sürekli emzirme de meme kanserine yakalanma riskini azaltmaktadır (28).

Uzun süren laktasyonların toplam ovuluar dönem sayısını azaltarak koruyucu etki yapması beklenmektedir. Çin'de yapılan bir çalışmada toplam 5 yıllık bir emzirme süresinin meme kanseri riskini %30, 4-12 ay arasında emziren kadınlarda riski %11; iki yıl veya daha fazla emzirenlerde ise %25 oranında azalttığı gösterilmiştir (29). Östrojen reseptörü (ER) ve progesteron reseptörü (PR) pozitif olanlar negatif olanlarla karşılaştırıldığında yukarıda bahsedilen hormonla ilişkili faktörlerin bu kişilerde daha etkili olduğunu göstermiştir (30).

### 2.1.3.2.2. Hormonal Faktörler

Cinsiyet hormonları ve analogları kadınlar arasında yaygın olarak kullanılan ilaçlardan olup bunların güvenilirliği konusunda endişeler mevcuttur. Genellikle, hormonların zararlı etkilerini ayrı ayrı çalışmak mümkün değildir. Çünkü bunların birçoğu oral kontraseptiflerde veya hormon replasman tedavisinde (HRT) olduğu gibi ya kombinasyon şeklinde ya da aynı hastada arka arkaya kullanılmaktadır (18).

Epidemiyolojik olarak yapılan 54 çalışmanın sonuçları toplu olarak analiz edildiğinde; oral kontraseptif kullanımı süresi artışıyla meme kanserine yakalanma riskini arttırdığı saptanmıştır (31). Premenopoz ve uzun süreli oral kontraseptif kullanmış kadınlarda meme kanseri riskinde artış bulunmuştur. Genellikle 35 yaş ve altındaki kadınlarda daha belirgin risk artışı gözlenmektedir (32). 45 yaş altındaki genç kadınlarda uzun süreli oral kontraseptif kullanımının etkisini araştıran yedi çalışmanın tümünde meme kanseri riskinin %3.1 arttığı hesaplanmıştır. Buna göre 10 yıl boyunca oral kontraseptif kullanan genç bir kadında hiç oral kontraseptif kullanmayan bir kadına göre meme kanseri oluşma riski %36 artmaktadır. Oral kontraseptiflerin kullanımının kesilmesinden sonraki 10 yıllık süreçte meme kanserine yakalanma riski üzerindeki etkisi ortadan kalkmaktadır (31). Yapılan 51 çalışmanın analizi sonucunda HRT kullanan kadınlarda meme kanserine yakalanma riskinin az da olsa arttığı gösterilmiştir (33). 5 yıl veya daha uzun süreli HRT kullanan kadınlarda meme kanseri riskinde %35 oranında bir artış gözlenmekte ve bu risk artışı HRT kullanımıyla meydana gelen menopozda gecikmeyle ilişkilendirilmektedir. Hormon kullanımının kesilmesiyle 5 yıl sonunda çoğunlukla bu risk ortadan kalkmaktadır (34).

Günümüzde kombine östrojen-progesteron preparatları kullanılmakta olup meme kanseri riskini tek başına östrojen kullanımına göre daha fazla arttırmaktadır (34). Östrojen-progestin kullanımıyla ilgili (5 yıllık kullanım için) kontrollü olarak yapılan çalışmalarda meme kanserinde %26'lık bir artış saptanmıştır (35). Daha önce HRT kullanan kadınlarda kanserin hiç kullanmayanlara göre daha az agresif olma eğiliminde olduğu gösterilmiştir, ancak bununla çelişkili olan sonuçlar da vardır. HRT kullanıcılarında mortalite oranının düşük olduğu fakat uzun süreli kullanımlarda sağlanan yararın azaldığı gösterilmiştir (18).

Böcek zehirleri (pestisid), boyalar, kirleticiler ve gıda koruyucularını içeren, östrojene benzer etkileri olan kseno-östrojenlerin meme kanserinin etyolojisinde önemli bir role sahip olabileceği gösterilmiştir. Örneğin; PCB (polychlorinate biphenyl)'nin katekol metabolizmasının karsinojenik östrojen metabolitlerini inhibe ederek östrojen metabolizmasını değiştirdiği gösterilmiştir (36).

### **2.1.3.3. Çevresel Faktörler**

#### **2.1.3.3.1. Sigara**

Sigara ve meme kanserine yatkınlık üzerine yapılan çalışmalarda farklı sonuçlar elde edilmiştir. Meme kanserinin gelişme riskinin sigara içiciliği ile ilişkisinin zayıf olduğu bilinmektedir. Erken yaşlarda sigaraya başlayanlarda, fazla miktarda kullananlarda ve pasif içicilerde sigaranın zararlı etkileri gözlenmiştir (37). Öte yandan tütün dumanında bulunan bazı ajanlar antiöstrojenik etkilere sahiptirler. Örneğin; nikotinin CYP19 enzimlerini inhibe ettiği gösterilmiştir. Bu nedenle sigara kullananlarda menopoza kullanmayanlara göre daha erken gerçekleşmektedir (38).

Sigara katranı 3000'den fazla bileşik içermektedir. Bunların 30 tanesinin karsinojen olduğu bilinmektedir. Sigara dumanındaki en önemli karsinojenler; polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH), aril aminler, heterosiklik aromatik aminler (HAA) ve nitrosaminlerdir (39).

Sigara dumanı ile vücuda alınan PAH'lar ilk evrede: Sitokrom P4501A1, ikinci evrede ise GST enzimleri tarafından detoksifiye edilerek suda çözünebilir türevlerine dönüştürülür. PAH'lar meme hücreleri için mutajenik etkiye sahiptirler ve lipofilik bileşikler memeyi de içeren adipoz dokularda depo edilir. Bu nedenle, PAH sonucu oluşan DNA hasarı normal meme dokusunda ve kanserli meme dokusunda belirlenmiştir. Aromatik aminler, NAT enzimi ile N-asetilasyon katalizasyonu yoluyla detoksifiye olurlar (40).

Sigara dumanı oksijen radikalleri bakımından zengin olduğu gibi sigara dumanı MnSOD(manganez superoksit dismutaz) gibi bazı antioksidan enzimleri indükler. Sigara dumanındaki semiquinon radikalleri oksijene indirgenince süperoksitler oluşur. Bu şekilde hidrojen peroksit ve hidroksil radikalleri (OH)'nin

üretimi stimüle olur (41, 42). Hidroksil radikalleri reaktif olduklarından DNA'da endojen oksidasyon oluşması için başlıca adaylardır.

#### **2.1.3.3.2. Besin faktörü**

İnsanların aldığı günlük besinler çok çeşitli doğal karsinojenler ve anti-karsinojenleri içerir. Bu bileşiklerin birçoğu DNA hasarına neden olan oksijen radikalleri oluşumuna neden olur. Bu nedenle aşırı yağ kullanımı özellikle poliansature edilmiş yağ asitlerinin alınımı meme kanser riskini arttırmaktadır (43). Fakat bunu desteklemeyen çalışmalar da mevcuttur. Meme kanseri gelişen kadınların beslenme şekliyle meme kanseri gelişmeyen kadınların beslenme şekli kıyaslandığında; yağ alımı ile meme kanseri arasında ilişki bulunamamıştır (44).

#### **2.1.3.3.3. Vücut Ağırlığı**

Obezite postmenopozal kadınlarda hem aşırı endojen östrojen seviyesi hem de meme kanserine yakalanma riski ile ilişkilidir. Obez olan postmenopozal kadınlarda sirküle olan östrojenin büyük çoğunluğu adipoz dokularda androjenin östrojene dönüşümüyle oluşur. Bu durum CYP19'la katalize olan in situ aromatisasyonun östradiol seviyesini dokularda, sirkülasyondaki östrojene göre daha etkili bir şekilde arttırmasıyla gerçekleşmektedir (45). Buna zıt olan bir ilişki obez ve premenopozal meme kanserliler arasında gösterilmiştir. Bu kadınlarda anovulasyonun sık olması daha düşük östrojen miktarıyla sonuçlanmaktadır (45).

Fiziksel aktivite de azalmış meme kanseri riski ile ilişkilidir. Fiziksel aktivitenin düzenli ovulator siklusu azalttığı ve dolaşımdaki östrojen miktarını arttırdığı gösterilmiştir (46).

#### **2.1.3.3.4. Vitaminler**

Antioksidanlar, hem direkt, hem de dolaylı olarak ilaçların, karsinojenlerin, toksik radikallerin, ksenobiyotiklerin istenmeyen etkilerine karşı hücreleri koruyan maddelerdir. Doğal antioksidan kaynağı olan vitamin ve sebzelerin kullanımının meme kanseri riskini azalttığı gösterilmiştir (18).

Askorbik asit,  $\alpha$ -tokoferol ve karotenoidleri içeren antioksidan besinlerin yüksek tüketimi ile ters ilişkilendirilmesi kadar, meyve ve sebze alımı ile meme kanseri riski arasındaki ilişkiyi destekleyen nispeten tutarlı bilgiler de vardır (47). Bu besinlerin prooksidan hücre aktivitesi ve antioksidan savunmaları arasındaki dengeyi değiştirerek oksidatif stres ve ROS (reactive oxygen species) üretimini etkilediğine dair bir hipotez vardır. ROS'lar normal hücre solunumu, hücre stresi ve inflamasyonu sonucu üretilir (48). Toksik ajanlardan etkilenim veya patolojik süreçte savunma mekanizmasındaki yetersizlik ROS'un yoğun üretimine neden olduğundan oksidatif stres oluşabilir. Lipit peroksidasyonu, protein değişikliği, membran hasarı ve mitokondrial hasar ve de kırılmalarına kadar varan DNA hasarı ile sonuçlanır (48).

Karotenoidlerden A vitamini hücre farklılaşmasında regülatör olarak rol oynadığı için hücrelerin malign forma geçişini önleyebilir. Retinol in vitro koşullarda insan meme kanseri hücrelerinin büyümesini önlemiştir (49). Diyetle alınan  $\alpha$ -tokoferol lipid peroksidasyonuna karşı korur ve steroidlerin neden olduğu karaciğer hücre hasarı ve tümör gelişimine karşı kullanılabilir. Ancak; Vitamin C ve E'nin artmış lipid peroksidasyon ve serbest radikallere karşı savunmada yetersiz kaldığı belirtilmiştir (49). Riboflavin, niasin suda eriyen vitaminlerdir. Flavin mononükleotid (FMN) gibi aktif koenzim formlarında ve flavin adenin dinükleotid (FAD) halinde hazır bulunan riboflavin, solunum zinciri yoluyla enerji üretiminde ve sayısız metabolik yolda oksidasyon- redüksiyon reaksiyonlarına katılır (49). Niasin ve onun kofaktörü olan nikotiamid adenin dinükleotid (NAD) ve nikotiamid adenin dinükleotid fosfat (NADP) doku solunumunu kapsayan oksidasyon- redüksiyon reaksiyonlarının bir çeşidi olarak önemlidir. Nikotinamidin koruyucusu etkisi bir serbest radikal artıkcısı olmasından ve poli ADP-riboz sentetazın inhibisyonundaki etkisinden ya da hücredeki NAD düzeyinin yüksekliğinden kaynaklanabilir (49). Tamoksifenin antiproliferatif etkileri protein kinazın inhibisyonuyla ve DNA sentezinde rol oynayan protein olan kalmodulinin bağlanması ile ilgili olabilir (50). Ek olarak, tamoksifen programlanmış hücre ölümüne doğrudan neden olabilir (51).

#### **2.1.3.3.5. Alkol**

Alkol meme kanseri riskini arttıran unsurlardan biri olarak tanımlanmıştır. Günlük olarak alınan bir ile beş bardak arasında alkolün meme kanserine yakalanma

riskini arttırdığı gösterilmiştir (52). Alkolik kadınlarda yapılan çalışmada ise meme kanserine yakalanma riskinin yalnızca %15 oranında arttığı gösterilmiştir (53).

Alkol kullanımının özellikle yetişkinlik çağının erken dönemlerinde zararlı olduğu gösterilmiştir (54). Alkolün karsinojenik etkisinin mekanizması tam anlaşılmamıştır. Ancak alkol kullanan kadınlarda östrojen seviyesinin arttığını gösteren görüşler vardır. Bir diğer görüş ise alkol ile indüklenen ROS'un oluşması ve bu nedenle detoksifikasyon enzimlerinin protein ekspresyonlarındaki azalmaları kapsamaktadır (55).

#### **2.1.3.4. Diğer Risk Faktörleri**

İyonizan radyasyonun kadın uçuş görevlilerinde, hemşirelerde ve kimyagerler arasında meme kanseri riskini arttırdığı gösterilmiştir (18). Elektromagnetik alanların melatonin üretimini baskılayarak meme kanseri riskini etkilediğine dair güçlü olmayan kanıtlar mevcuttur. Yüksek sosyo-ekonomik durum ve meme kanseri arasında pozitif bir ilişki bulunmuştur (56).

Adolesan ve erişkin dönemde yapılan egzersizlerin meme kanseri riski üzerine etkisini araştıran bir çalışmada egzersizin 40 yaşın altındaki kadınlarda meme kanseri riskini azalttığı gösterilmiş ve haftada 4 saat veya daha fazla egzersiz yapan kadınlarda kanser riskinin hiç egzersiz yapmayanlara göre %60 daha az olduğu bildirilmiştir (50).

## **2.2. KANSER VE MOLEKÜLER TEMELİ**

Meme kanseri ve diğer maligniteler hücre büyümesi ve gelişimine katılan önemli hücresel yolları etkileyen genetik değişimler ile çok adımlı bir işlem sonucu ortaya çıkar. Çoğu genetik değişimler sadece kanserli dokudaki kanser hücrelerinde gözlenirken, daha az sıklıkla da olsa germ hücrelerindeki genetik değişimler ile ortaya çıkan maligniteler kalıtsal özellik taşırlar. Genomdaki bu kalıtsal veya kalıtsal olmayan genetik değişimler, belli hücresel genlerin belli özel değişimleri ile ilişkili bulunmuştur. Bunlar onkogenler olarak isimlendirilirler ve normal işlevlere sahip bir diğer gen grubundan (protoonkogenlerden) türevlenirler. Proto-onkogenler normal hücre büyümesi ve farklılaşması için önemli olan bazı proteinlere ait kodlar içerirler.

Eğer bir mutasyon sonucu proto-onkogenin yapısı değişirse oluşan hasar, genin dolayısı ile gen ürününün yapısının değişmesine neden olur ve çeşitli yollarla hücre bölünmesinin kontrolü ortadan kalkar ve malignite ortaya çıkar. Kansere oluşumunda, onkogenlerden başka önemli ikinci bir gen grubu da tümör-baskılayıcı genlerdir. Bu iki gen grubu karsinogenezde birbiriyle zıt etkilidir. Onkogenler malign transformasyona neden olurken tümör baskılayıcı genler, hücre büyümesinde işlev gören genleri kontrol ederek tümör oluşumunu engellerler. Eğer bu tümör baskılayıcı genlerde bir hasar olursa büyüme kontrolü ortadan kalkacağından kanser ortaya çıkar (57,58).

Onkogenlerin kansere oluşumuna katılması hakkında iki hipotez vardır. Birincisi; onkogenin ekspresyon seviyelerindeki kantitatif değişiklikler, ikincisi onkogen yapısında meydana gelen değişikliklerdir. Onkogenlerdeki değişiklikler nokta mutasyonu, gen delesyonu, kromozomlarda yeni düzenlenmeler, gen amplifikasyonu (gen çoğaltımı) ve insersiyonel mutagenesis (yeni DNA katılması) olarak sıralanabilir. Proto-onkogenler, DNA dizilerindeki sadece bir bazın değişmesi (nokta mutasyonu) ile onkogenlere dönüşebilirler. Somatik hücrelerde bu olay anormal gen ürününün (onkoprotein) sentezine yol açar ve bu ürün, hücre bölünmesini ve gelişimini uyararak kansere neden olur. Kromozomlardaki yapısal mutasyonlar proto-onkogenlerin aktivasyonunu etkileyen mekanizmalardan biridir. Çeşitli kanser türlerinde, bir kromozomun her zaman aynı yerinde bir kırık veya translokasyonun meydana gelmesi o kanser türü için ayırıcı bir özellik olarak gözlenir. Gen amplifikasyonunda ise onkogene ait DNA parçası çok fazla sayıda replike olur. Bu işlem normal hücrelerde ya hiç gözlenmez yada çok nadir gözlenir. Fakat kanserli hücrelerde sık rastlanan bir olaydır. Proto-onkogenin amplifikasyonu aynı zamanda çok fazla miktarda gen ürünlerinin de (m-RNA ve onkoproteinler) ortaya çıkmasına (aşırı ekspresyon) yol açar. Amplifiye olan DNA'nın kodladığı proteinler normal işlevlerini kaybederler veya anormal tarzda işlev görürler. Amplifikasyonun tümör gelişimi ve ilerlemesi ile yakın ilişkisi saptanmıştır. Bu konuda tipik örneklerden biri meme kanserinde *cerbb-2* (Her2-neu) onkogeninin amplifikasyonudur. İnsersiyonel mutagenesis olarak isimlendirilen bir başka mekanizma ile de onkogenler faaliyete geçerler. Bazı durumlarda retroviral genomların küçük bir parçasının, hücresel onkogenlerin hemen bitişiğine kaynaştığı



gözlenir ve bu yol ile hücrel onkogenlere promotör etki yaparlar. Bu olayın c-myc protoonkogeni için söz konusu olabileceği bildirilmiştir (58).

Tüm bu mekanizmalar sonucu ortaya çıkan onkogenlerin ürünleri hücrede yerleştikleri yerlerde özel fonksiyonlar görerek hücrenin fizyolojik aktivitesinde değişiklikler ortaya çıkarırlar. Onkoproteinler, hücre proliferasyonu ve farklılaşması sırasında hücrenin nükleusundan plazma zarına kadar uzanan bir seri işlemde rol alırlar. Örneğin hücrel onkogenler büyüme faktörü ve çeşitli hormon reseptörlerine ait kodlar içerebilirler. Böylece bu proteinler plazma membranından nükleusa doğru çeşitli sinyallerin iletilmesinde rol alırlar. Bazı onkogenler ise gen ekspresyonunu düzenlemek için transkripsiyon düzenleyici faktörler gibi DNA'ya bağlanan proteinlerin işlevini görecekten olan onkoproteinleri kodlarlar. Onkogenler hücre seviyesinde dominant bir etkiye sahiptir. Bu genler aktifleştiklerinde tek bir mutant allel bile, bir hücrenin normalden malign şekle dönüşmesine yeterli etkidedir (59).

Proto-onkogenlerin ürünleri, büyüme ve gelişmeyi ilerletici işlevlere sahiptirler. Ancak hücrede, proto-onkogenlerin çalışmalarını kontrol eden, anormal büyümeyi ve malign değişimleri engelleyen tümör baskılayıcı genler bulunur. Bu genlere ait her iki allel kaybolduğunda (heterozigotluk kaybı) veya bu genler mutasyona uğradığında kontrol mekanizması ortadan kalkar ve tümör oluşumu gerçekleşir. Protoonkogenlerdeki mutasyonlarının tersine tümör baskılayıcı genlerdeki mutasyonlar çekinik karakterlidir. Tümör baskılayıcı genin tek bir fonksiyonel kopyası (normal alleli) normal hücre fenotipinin ortaya çıkması için yeterlidir. Retinoblastoma, Wilm's tümörü ve nadir ailesel kanser tipi Li- Fraumeni sendromunda tümör baskılayıcı genlerde değişimler tespit edilmiştir. Tümör baskılayıcı genlerden olan p53, 17. kromozomun kısa kolunda saptanmıştır. Bu bölgenin kaybı ile meme kanserlerinde arasında yakın ilişki bulunmuştur (60).

### **2.2.1. Meme Kanserinde Etkili Onkogenler**

Meme kanserinin gelişiminde yüksek riske sahip hastalarda bağlantı analizlerine dayanan çalışmalar onkogenlerin ailesel meme kanserlerinde primer lezyonlarda yerini olmadığı, fakat tümör baskılayıcı genlerdeki resesif değişimlerin primer lezyon oluşumuna katıldığını gösteren çalışmalar vardır. Bu modele göre onkogenlerdeki değişimler daha sıklıkla tümör invazyonu veya metastaz ile ilişkili

olabilirler. Çok adımlı tümörögenöz hipotezinin benzeri bir model meme kanserleri için de düşünölebilir. Meme kanserinin ortaya çıkışına, ilerlemesine ve metastazına katılan bir çok faktörün varlığı bilinmektedir (61). Meme kanserlerinin bir bölümü bazı onkogenlerde ve tümör baskılayıcı genlerde meydana gelen çeşitli değişimler sonucu ortaya çıkar. Meme kanserinde heterozigotluk kaybı ve gen kopyalarının sayısındaki artış ile hiperplaziden duktal karsinoma in situ(DCIS)'ya geçişte ani artışlar gözlenir. Bu genetik değişimler tarafından etkilenen hücreşel işlem yolları diğer birçok hücreşel yol ile oldukça sıkı ilişkili olduğundan bu karmaşa nedeniyle teşhis ve tedavi uygulamaları da oldukça yavaş ilerlemektedir. Meme için ayrııcı özellikler taşıyan onkogenler vardır. Hem normal hem de kanserli meme dokularında çoğunlukla saptanan bu özel onkogenler ras, myc ve c-erbB-2 (veya HER2/neu) olarak sıralanabilir (62).

Meme kanseri heterojen bir hastalık olup genetik olarak nokta mutasyonları, kromozomal amplifikasyonlar, delesyonlar, yeniden düzenlenmeler, translokasyonlar ve duplikasyonları da içeren anormalliklerin progresif birikimi sonucu oluşur (63,64).

Meme karsinogenezisinin tam anlaşılabilmesi için büyüme, invazyon ve metastazla sonuçlanan hücreşel program dönüşümüne neden olan genetik değişikliklerin bilinmesi gerekir. DNA'dan RNA'ya ve RNA'dan proteine aktarılan genetik bilgi akışında, herhangi bir adımdaki bozukluk meme karsinogenezisine neden olur.

Germline mutasyonlar tüm meme kanserlerinin sadece %10'luk kısmını oluştururken, meme kanserlerinin çoğu sporadiktir ve somatik genetik değişikliklerle oluşur (65).

Ailevi meme kanseri tüm meme kanserlerinin yaklaşık %20-%30'unu oluşturmaktadır. BRCA1 ve BRCA2 mutasyonları kalıtsal meme kanserinin yaklaşık yarısını oluşturmaktadır. CHEK2, TP53, PTEN ve STK11 diğer şüphelenilen genlerdir. Yeni keşfedilen genler, ailevi meme kanserinin %5'in altında bir oranı oluşturmaktadır. Ailevi meme kanserinin yaklaşık yarısı hala açıklanamamıştır (65).

### **2.2.1.1. Kalıtsal Meme Kanseri**

Aile öyküsü meme kanseri için en önemli risk faktörlerinden biridir. Ailevi form meme kanserinin yaklaşık %20'lik bir kısmını oluşturur. Ailevi kansere neden olan birçok gen yakın zamanda ortaya konmuştur. Meme kanseri gelişiminde duyarlı genler sağladıkları risk düzeyi ve sıklıklarına göre üç kategoride sınıflandırılmaktadır: Nadir görülen ama etkinliği yüksek genler, nadir ama orta düzeyde etkin genler ve düşük etkinlikli genler (66).

#### **2.2.1.1.1. Meme Kanseri Gelişimine Yatkınlık Yaratan Nadir Görülen, Etkinliği Yüksek Genler**

Dominant geçişli ailevi meme kanser olgularının yarısına yakınında BRCA1 ve BRCA2 mutasyonları gözlenmektedir. Bu mutasyon genel kadın popülasyonunda meme kanser gelişme riskini 10-30 kat artırmakta, yaşam boyu meme kanser gelişimini yaklaşık %85 oranına çıkarmaktadır (67).

BRCA1 ve BRCA2'ye bağlı binden fazla germline mutasyon belirlenmiştir. Patolojik mutasyonu en sık daha kısa bir protein üretilmesine, ya da protein fonksiyonunun değişmesiyle sonuçlanır (66,67). BRCA1 ilişkili meme kanseri, BRCA2 ilişkili ve sporadik meme kanserinden farklılık gösterir. BRCA1 ilişkili meme kanseri daha agresif karakterlidir, daha genç hastalarda görülür, yüksek histolojik grade, yüksek proliferasyon oranı, anöploidi, ve ER(-), PR(-), HER2(-) ("triple-negatif") karakteri daha yüksektir. BRCA1-ilişkili "triple-negatif" fenotip "basal-like" gen ekspresyon paterni gösterir (68).

BRCA1 ve BRCA2 tümör supresör genler olup fonksiyonları genomik stabilitenin devamını sağlamaktır. Yaban tip BRCA1 ve BRCA2 mutasyonuna bağlı olarak heterozigotluk kaybı yaşandığında DNA onarımında defekt oluşur ve kanser gelişimine zemin hazırlanır (68,69).

BRCA1 ve BRCA2'nin DNA onarımındaki rolü BRCA ilişkili meme kanserinde terapötik hedefler için imkan sağlar. Platinyum ajanlarla DNA replikasyonu bloke edilebilir ya da PARP1 sellüler enzim inhibitörleri kullanılarak DNA onarımı için alternatif yollar sağlanabilir (70). Bu sınıfa giren diğer genler TP53, PTEN, STK11/LKB1 ve CDH1 genleridir. Bu genler meme kanser gelişme

riskini 8-10 kat artırmaktadır. Hepsi de otozomal dominant geçiş gösteren, tümör supresör fonksiyonu olan genlerdir (71).

#### **2.2.1.1.2. Meme Kanseri Gelişimine Yatkınlık Yaratan Etkinliği Orta düzeyde, Az-sıklıkta Görülen Genler**

Meme kanseri gelişiminde orta derecede risk yaratan dört adet gen belirlenmiştir: CHEK2, TM, BRIP1 ve PALB2. Bu genlerin her biri mutasyona uğramış bireylerde meme kanseri gelişimini 2- 3 kat artırmaktadır (67).

Bu genler kalıtsal meme kanseri olgularının %2,3'ünü oluşturmaktadır. Genel popülasyonda mutasyon sıklıkları düşük (%0,1-%1) olduğundan ilgili çalışmalarda belirlenmeleri oldukça zordur.

#### **2.2.1.1.3. Meme Kanseri Gelişimine Yatkınlık Yaratan Etkinliği Düşük, Sık Görülen Gen ve Lokuslar**

Meme kanseri olan kadınlarda %15-%40 oranında düşük risk paneline sahip yaklaşık on farklı allel ve lokus belirlenmiştir (67).

Çok sık görülmelerine karşın, bu genlere bağlı meme kanseri gelişme riski oldukça düşüktür (66). Buna karşın, bu allel ve lokuslar muhtemelen diğer orta ve yüksek risk yaratan genlerle etkileşerek klinik olarak önemli hale gelmektedir. BRCA ailesi içinde EFGFR2, MAP3K1 tek nükleotid polimorfizmleri (SNPs) BRCA2 mutasyon varlığında risk artırıcı rol oynamaktadır.

### **2.3. MEME KANSERİ FARMAKOGENETİĞİ**

Bir popülasyonda ilaçlara karşın verilen kişisel yanıtların geniş ölçüde değişkenlik gösterdiği ve aynı zamanda toplumlar arasında da ilaç yanıtı açısından farklılıkların bulunduğu bilinmektedir. İlaç kinetiğinin ve kişinin ilaçlara karşın verdiği yanıtın genetik yapıya göre bireyler ve toplumlar arasında değişkenlik göstermesi, farklı popülasyonlarda elde edilecek genetik veri tabanlarının kullanımı ile “kişiyeye özel tedavi” yaklaşımlarının geliştirilmesini gündeme getirmiştir (4,72).

Farmakodinamik ve farmakokinetik temelli olan ilaç yanıtındaki farklılıklar, ilaçların metabolizmasından sorumlu enzimlerde, ilaç taşıyıcılarında, reseptörlerinde

veya kofaktörlerindeki genetik varyasyonlardan etkilenebilmektedir (73). Bugüne kadar ilaç metabolize edici enzimlerin farmakogenetikleri üzerinde yoğun çalışmalar gerçekleştirilmiş olmakla birlikte ilaç taşıyıcılarında gözlenen genetik çeşitlilik yakın geçmişte popülerlik kazanmıştır (74). Kanser tedavisinde kemoterapinin etkinliği dirençli hücre varyantlarının gelişmesi nedeniyle azalmaktadır. Direnç, genellikle hedefte meydana gelen değişiklikler nedeniyle tek bir ilaca karşı gelişebilirken, daha sıklıkla kimyasal yapıları bir birinden oldukça farklı çok sayıdaki ilaca karşı gelişmektedir (75).

Direnç, ekstrinsik ve intrinsik olarak ikiye ayrılır. Ekstrinsik direnç ilaçların tümör hücresine ulaşamamasından, intrinsik direnç ise tümör hücrelerinin özelliğinden kaynaklanmaktadır. İntrinsik direnç in vitro olarak gözlenmekte olup 2 gruba ayrılır: basit direnç hücreler eğer tek bir ilaca karşı direnç gösterirse, çoklu ilaç direnci (Multi Drug Resistance, MDR) farklı biyokimyasal hedeflere sahip kemostatik ilaçlara karşı çapraz direnç gösterirlerse olur (2).

### **2.3.1. Çoklu ilaç direnci**

Çoklu ilaç direnci, belirli bir ajana karşı dirençli olarak seçilen birçok tümör hücresinin çeşitli ilaçlar, anthrasiklinler, vinka alkaloidler, epipodofilotoksinler, taksol, kolşisin gibi yapısal ve fonksiyonel bileşiklere karşı çapraz direnç göstermesi olarak bilinmektedir (76).

MDR, hastalarda sık olarak gözlenmekte ve bazı mekanizmalarla oluşmaktadır. Farmakolojik mekanizmaların temelinde tümörlü hücrelerden ilaçların aktif olarak atılımı yatmaktadır (2).

Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri ve kolon kanseri gibi kanserleri içeren maligniteler dirençli bir fenotip ve sitotoksik ilaçlara karşı yetersiz bir cevaba sahiptirler. İlerlemiş meme ve yumurtalık kanserleri gibi diğer tümörlerde de başlangıç yanıtından sonra relaps gelişmekte ve birçok ilaca dirençli hale gelmektedir (76).

Kanser hücrelerinde gözlenen çoklu ilaç direnci ile ilgili olarak hücre döngüsü kontrol noktalarındaki değişiklikler, apoptotik mekanizmalardaki aksaklıklar, hasarlanan hücresel hedeflerin onarımı ve hücre içi ilaç birikiminin

azaltılması gibi çeşitli mekanizmalar aydınlatılmış bulunmaktadır. Hücre zarında transmembran olarak lokalize olan ve enerji bağımlı bir pompa şeklinde çalışması nedeniyle hücre içi ilaç konsantrasyonunda azalmaya neden olan P-glikoprotein ifadesinin artışı bu mekanizmalar arasında en yaygın olanıdır (77,78).

İlaç direncini açıklayan birçok hücrel mekanizma karakterize edilmiştir. Bu mekanizmalar, insan multi-drug rezistans ilişkili protein (MRP) tarafından ilaçların artan atılımı, DNA topoizomera II gibi ilaç hedeflerindeki değişimleri ve bileşiklerin artan detoksifikasyonunu içermektedir. MDR'nin klasik formu ise, bir transmembran ilaç atılım pompası olarak fonksiyon gören P-gp'i kodlayan MDR1 geninin aşırı ekspresyonu sonucu ortaya çıkmaktadır (76).

### **2.3.2. Çoklu İlaç Direnç Mekanizması**

İlaç direncini açıklayan birçok hücrel mekanizma karakterize edilmiştir. Bu mekanizmalar, insan multi-drug rezistans ilişkili protein (MRP) tarafından ilaçların artan atılımı, DNA topoizomera II gibi ilaç hedeflerindeki değişimleri ve bileşiklerin artan detoksifikasyonunu içermektedir. MDR'nin klasik formu ise, bir transmembran ilaç atılım pompası olarak fonksiyon gören P-glikoproteini (P-gp) kodlayan MDR1 geninin aşırı ekspresyonu sonucu ortaya çıkmaktadır (76).

P-gp'nin çalışma mekanizması için günümüzde kabul edilen model "hidrofobik vakum pompası" dır. Bu modele göre substrat doğrudan proteinin ilaç-bağlama cebine bağlanmakta ve ATP'nin hidrolizinden elde edilen enerji ile hücre dışı ortama pompalanmaktadır (79).

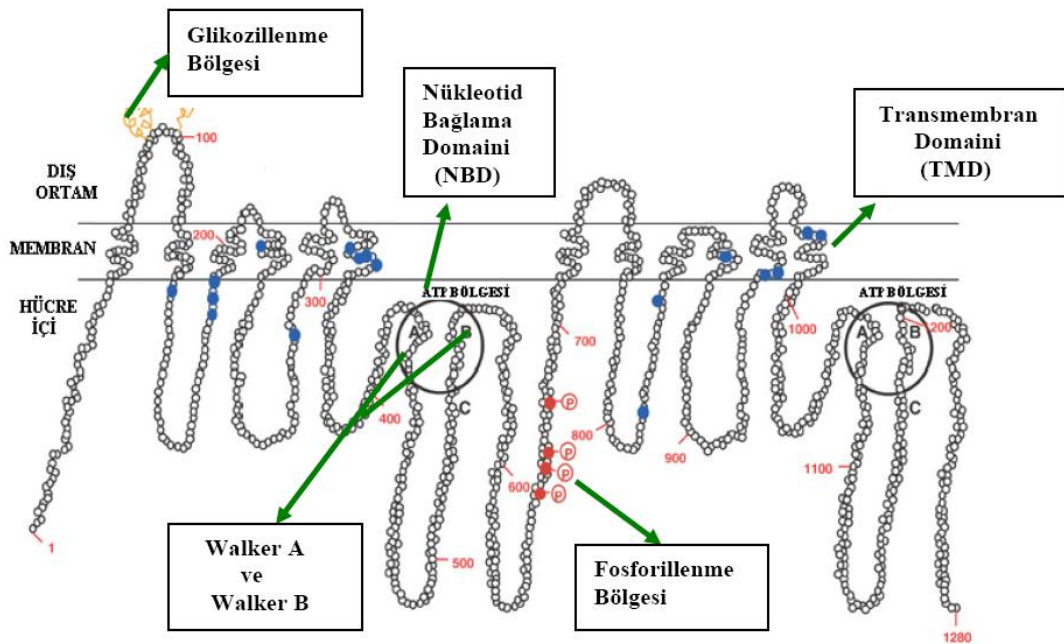
### **2.3.3. P glikoprotein**

1280 amino asit uzunluğunda ve 170 kDa büyüklüğünde bir molekül olup insanlarda 7. kromozomda lokalize MDR1 geninin ürünüdür (80).

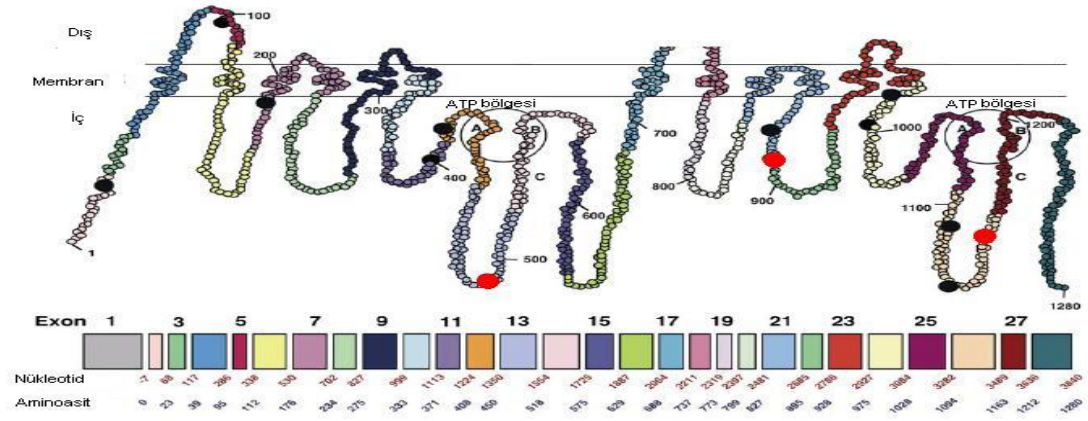
P-glikoprotein, ATP-Binding Cassette (ABC) superfamilyası olarak da bilinen taşıyıcı proteinlerin geniş bir grubuna aittir ve bu familyaya benzer yapısal ve fonksiyonel özellikler göstermektedir (3). ABC taşıyıcı protein üyeleri yüksek oranda korunmuş iki ATP bağlayıcı bölge içermektedir. Bu superfamilya üyeleri iyonlar, şekerler, amino asitler, peptidler, proteinler, ilaçlar ve toksinler gibi bir çok

maddenin taşınımından sorumludurlar (81). ABC superfamilyası içinde yer alan P-gp, fosforillenmiş ve glikozillenmiş bir protein olup 170 kDa ağırlığındadır (76).

1280 amino asit içeren P-gp, birbirine yüksek oranda benzeyen iki kısımdan oluşmaktadır. Her bir kısım, bir nükleotid bağlama domaini (NBD) ve yüksek oranda hidrofobik olan altı transmembran domaini (TMD) içermektedir (75) (Şekil 1). TMD'lerin ilaç moleküllerinin membrandan geçişinde rol oynadığı düşünülmektedir. Proteinin amino ve karboksil terminal uçları ile NBD'ler intrasellular alanda lokalize olmuştur. Molekülün N-terminal kısmının ekstrasellüler bölgesinde tek bir glikozillenme bölgesi vardır (76). Her bir NBD Walker A ve B olmak üzere iki motifden meydana gelmiştir. Bu motiflerin ATPazlarda bulunduğu, nükleotidlerin bağlanması ve hidrolizinde görev aldıkları düşünülmektedir. Her iki NBD P-gp'nin normal işleyişi için gereklidir ve P-gp aktivitesi tamamen ATP varlığına bağlıdır. ATP bağlayıcı domainler ATPaz olarak işlev görmekte olup P-gp'nin substratları membran dışına çıkarmada gerekli enerjiyi sağlamaktadır. P-gp'nin işlev görebilmesi için ATP her iki NBD'ye de bağlanmakta, fakat P-gp aktivitesi için her iki ATP'nin de hidrolize olup olmadığı henüz bilinmemektedir. ATP'nin bağlanması ile P-gp'de konformasyonel değişiklikler olmakta ve hidrolizi ile de transport gerçekleşmektedir (82).



Şekil 1. P glikoproteininin iki boyutlu yapısı (75).



**Şekil 2.** *MDR1* geninde gözlenen SNP'lerinin şematik gösterimi. (Kırmızı içi dolu dairelerle gösterilen bölgeler bizim çalışmayı planladığımız ve literatürde de fonksiyonel önemleri bildirilmiş olan SNP'lerin, kodlanan protein ürünündeki aminoasit pozisyonlarını göstermektedir.)

ATP bağımlı akış pompası olarak görev yapan P-gp, belli ekzojenik ve endojenik maddeleri hücre dışına çıkaran bir membran proteindir. P-gp'nin dokulardaki fizyolojik ekspresyonu çeşitli hücrelerdeki ilaç detoksifikasyonu için gerekli olan belirleyicilerinden biridir ve bu durum potansiyel olarak zararlı bileşiklere karşı hücrel savunma mekanizması sağlamaktadır (83). P-gp'nin içerdiği transmembran segmentlerinin ilacın dışarı atıldığı bir kanal oluşturduğu ve ATP bağlanma bölgesinin ise konsantrasyon gradyentine karşı ilacın hücre dışına çıkartılmasında gereken ATP hidrolizinde görev aldığı düşünülmektedir. ATP bağlanma bölgelerinin birinde meydana gelen önemli aminoasit değişikliklerinin pompa fonksiyonunu bozduğu gözlenmiştir.

P-glikoprotein, ilacın bağlandığı taşıyıcı proteini hücre dışına pompaladığının düşünülmesine rağmen, direkt olarak ilaca bağlandığı yönünde de kanıtlar bulunmaktadır (84). P-gp, ilaçları modifiye olmamış formuyla taşımaktadır. İlaçların hücre dışına akışını artırarak, hücre içi konsantrasyonunu düşürmekte ve sonuçta birçok sitotoksik antikanser ilaca karşı bir direnç oluşturmaktadır (85).

Çoklu ilaç direnci gösteren kanser hücrelerinde P-gp ifade artışı, promotor metilasyon değişimleri, gen yeniden düzenlenmeleri ve transkripsiyon faktörlerinin değişmiş aktivitesi gibi farklı mekanizmalarla ilişkilendirilmiştir (86,87). Yapılan



çalışmalar da bu proteinin sadece kanser hücrelerinde değil aynı zamanda ince ve kalın bağırsağın epitel hücreleri, lökositler, beyin ve testisteki kapiller endotel hücreleri, plasenta gibi normal hücrelerde de ifade bulduğu gösterilmiştir (4,88).

Bugün için P-gp'in normal dokulardaki ifadesinin başta organizmayı doğal olarak maruz kaldığı toksik ksenobiyotiklere karşı korumak olmak üzere, hormon taşınımı ve üreme, hücre hacminin düzenlenmesi ve lipid taşınımı gibi fizyolojik roller üstlendiği bilinmektedir (5). Ayrıca P-gp'in gastrointestinal yol boyunca ilaç absorpsiyonunu etkilediği, ilaçların safra ve idrara atılımını sağladığı ve yine ilaçların kan-beyin bariyerini geçişini engellediği bilinmektedir. Sonuç olarak P-gp, yalnızca kanser hücrelerinde gözlenen çoklu ilaç direncine neden olmakla kalmayıp aynı zamanda pek çok ilacın (steroid hormonlar, immunsupresanlar, antimikrobiyal ajanlar, vb.) normal dokulardaki farmakokinetiklerini de belirlemektedir (4).

P-gp'nin normal dokularda da eksprese olması bu proteine, toksik maddelerin hücre içine girişine engel olmak ve hücre içinde oluşan zararlı bazı ksenobiyotiklerin hücre dışına tekrar pompalanmasını sağlamak gibi önemli fizyolojik roller yüklemektedir. P-gp'nin normal hücre metabolizması için gerekli ve koruyucu bir protein olduğu ve bu açıdan bakıldığında karsinogenez sürecinde rol oynayabileceği öne sürülmektedir (89). Normal dokularda bazal P-gp ifade seviyesi bireyler arası değişkenlik göstermektedir. Bu değişkenlik P-gp substratı olan anti-kanser ilaçların etkinlik ve toksisitesinde bireysel farklılıklara neden olmaktadır. Normal dokularda gözlenen P-gp ifade farklılıklarının temeli tam olarak bilinmemektedir (90). Ancak son yıllarda yapılan çalışmalar MDR1 geninde var olan genetik polimorfizmlerin P-gp ifade ve fonksiyonlarında önemli olduğunu göstermiştir.

#### **2.4. MDR1 GENİ TEK NÜKLEOTİD POLİMORFİZMLERİ**

7.kromozomun uzun kolunda (7q21.1) lokalize olan MDR1 geni 100 kb dan daha fazla baz içeren 28 intron ve 28 ekzon içermektedir (75,91). Adenosine triphosphate-binding cassette B1 (ABCB1) geni olarak da adlandırılmaktadır (92).

MDR1 genine ilişkin çok sayıda tekli nükleotid polimorfizmleri bulunmaktadır. Bu polimorfizmlerin bazıları amino asit değişikliğine neden

olmazken (C1236T, C3396T ve C3435T), bazıları ise kodlanan amino-asitte değişime sebep olmaktadır (A61G, G1199A, A2956G, T3421A) (93).

MDR1 genine ait tekli nükleotid polimorfizmlerinden bazılarının P-gp ekspresyonunu etkilediği düşünölmektedir. Yapılan alışmalar normal dokularda C3435T (ekson 26), G2677T (ekson 21) ve T129C (ekson 1b) polimorfizmlerinin düşük P-gp ekspresyonuyla ilişkili olduğunu göstermiştir (94,95). MDR1 geninde yapısal varyasyonların bulunduğu ilk olarak çok sayıda örnek üzerinde yapılan RNase koruma ve dizi analizleri sonucunda ortaya konmuştur. Bu alışmalar sonucunda G2677T ve G2995A polimorfizmleri tanımlanmıştır (96,97).

MDR1 geninde ilave tek nükleotid polimorfizmlerinin varlığını göstermeye yönelik ilk sistematik alışma Hoffmeyer ve ark. tarafından yapılmıştır. Söz konusu çalışmada 28 ekzonun tamamı, kor promotor bölge ve ekzon-intron sınırları dizi analizi ile incelenmiş ve üçü aminoasit değişimine neden olan toplam 15 SNP tanımlanmıştır (6).

Günümüzde MDR1 geninin kodlayıcı bölgesi için ‘National Center for Biotechnology Information’ veri tabanında kayıtlı SNP’lerinin sayısı 60’dan fazladır. Literatürde MDR1 geni SNP’leri arasında en yaygın olarak bildirilen ve üzerinde en çok araştırma yapılan polimorfizmler C3435T, G2677T/A ve C1236T’dir. Söz konusu polimorfizmlerin P-gp aktivitesini ve ifade seviyesini etkileyerek fonksiyonu üzerinde önemli rol oynadığı yönündeki kanıtlar her geçen gün artmaktadır (74).

#### **2.4.1. C3435T Polimorfizmi**

İlk defa Hoffmeyer ve ark. tarafından tespit edilen C3435T polimorfizmi azalmış duodenal P-gp ifadesi ve oral yolla alımdan sonra artmış plazma digoksin konsantrasyonu ile ilişkili olarak bildirilmiştir (6). C3435T polimorfizmi 26.ekzonda C>T transizyonu sonucu oluşan ve amino asit değişikliğine neden olmayan sinonim bir polimorfizmdir. C3435T polimorfizminin sıklığı farklı toplumlarda değişik oranlarda bildirilmiştir. Genel olarak bakıldığında C3435T alelinin sıklığının Afrika orijinli bireylerde (%11-%27) beyaz ırka (%37-%57) kıyasla daha düşük olduğu görölmektedir (94, 98, 99, 100). Türk toplumunda C3435T polimorfizmi ile ilgili

olarak alel sıklıkları C:%48, T:%52 ve genotip sıklıkları CC:%21, CT:%53, TT:%26 olarak bildirilmiştir (101).

Sinonim bir polimorfizm olmakla birlikte C3435T polimorfizminin P-gp fonksiyonu üzerindeki etkisinin olması değişik şekillerde açıklanmaya çalışılmaktadır. Bu polimorfizm diğer sinonim olmayan polimorfizmlerle (örn: G2677T/A) güçlü bir bağlantı dengesizliği göstermektedir. Bu nedenle C3435T polimorfizminin diğer sinonim olmayan polimorfizmlerin etkisini yansıtabileceği düşünülmektedir (74). Diğer olası bir mekanizmaya göre, alelik değişikliklere bağlı olarak ortaya çıkan mRNA katlanma farklılıklarının, ayıklanma, işlenme ve translasyonel kontrol olaylarını etkileyebileceği düşünülmektedir (102).

Son olarak öne sürülen mekanizma ise meydana gelen bu sinonim polimorfizmin P-gp'in substrat özgünlüğünü değiştirdiğidir. Kimchi-Sarfaty ve ark.nın çalışmasında C>T dönüşümünün nadir kullanılan bir kodon oluşuma neden olduğu, bu durumun ribozom gecikmesine neden olarak translasyonel kinetiği etkilediği gösterilmiştir. Translasyon hızında meydana gelen değişiklik sonucu proteinin üç boyutlu katlanmasında farklılıkların ortaya çıkmasının substrat özgünlüğünü değiştirdiği bildirilmiştir (103).

Bugüne kadar C3435T polimorfizminin P-gp ekspresyonu ve fonksiyonu üzerine etkisi ile ilgili olarak yapılan çalışmalarda çelişkili sonuçların bildirildiği dikkati çekmektedir. Örneğin, Jamroziak ve ark.nın çalışmasında CC genotipi yüksek; CT genotipi orta; TT genotipi düşük seviyede P-gp aktivitesi ile ilişkilendirilirken; Imer ve ark.nın çalışmasında CC genotipi düşük P-gp ifadesi ile ilişkili olarak bildirilmiştir (104,105). Bu çalışmaların aksine, Calado ve ark. C3435T polimorfizmi için her 3 genotip arasında P-gp fonksiyonu açısından fark olmadığını belirtmişlerdir (106).

Lara ve ark.nın ileri evre küçük hücreli akciğer kanseri hastalarında irinotecan/cisplatin (IP) tedavisinin etoposide/cisplatine (EP) tedavisine kıyasla sağ kalım açısından etkinliğini araştırdıkları Faz III denemesinde, 3435TT genotipinin IP nedenli diyare ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (107).

Ashariati' nin çalışmasında, meme kanserinde pre-operatif antrasiklin kemoterapi cevabında C3435T polimorfizminin rolü değerlendirilmiş ve yalnızca

homozigot mutant TT genotipine sahip bireylerde klinik cevap elde edilebildiği gözlenmiştir (108). Kafka ve ark.nın çalışmasında da benzer sonuçlar bildirilmiştir (109).

İleri evre 41 meme kanseri hastasında üç siklus neoadjuvan kemoterapi [5-florourasil (500 mg/m<sup>2</sup>), epirubisin (75 mg/m<sup>2</sup>) ve siklofosamid (500 mg/m<sup>2</sup>)/gün] cevabı ve C3435T polimorfizmi arasındaki ilişkinin değerlendirildiği başka bir çalışmada ise bu polimorfizmin klinik cevap ile bir ilişkisinin bulunmadığı rapor edilmiştir (110).

Jiko ve ark.nın paklitaksel tedavisi alan ürogenital kanser hastalarında yaptığı çalışmada C3435T polimorfizminin paklitaksel farmakogenetiği üzerine etkisi değerlendirilmiş ancak bu polimorfizm ve paklitaksel'in tüm vücut klerensi arasında herhangi bir ilişki saptanmamıştır (111). Kırk dört erişkin akut lenfoblastik lösemi (ALL) hastasında kemoterapi cevabı ve C3435T polimorfizmi arasındaki ilişkinin değerlendirildiği Jamroziak ve ark.'nın çalışmasında, bu polimorfizmin tedavi yanıtı üzerine etkisinin bulunmadığı bildirilmiştir (112).

Effert ve ark.'nın 20 T-ALL hücre serisi, 53 ALL hastası ve 7 sağlıklı vericiyle gerçekleştirdikleri çalışmada C3435T genotipleri ve P-gp mRNA ifade seviyesi arasında ilişki bulunmadığı, bu polimorfizmin hücre serilerinde gözlenen doksorubisin direncinden sorumlu olmadığı ve hastalığın prognozu üzerinde etkiye sahip olduğu yönünde herhangi bir bulguya rastlanmadığı belirtilmiştir (113).

#### **2.4.2. G2677T/A Polimorfizmi**

G2677T/A polimorfizmi 21. ekzonda G>T transversiyonu veya G>A transizyonu sonucu oluşan sinonim olmayan bir polimorfizmdir. Protein ürününde 893. pozisyondaki alanin amino asiti G>T mutasyonu sonucu serin'e değişirken; G>A mutasyonu sonucu treonin'e değişmektedir. Yapılan çalışmalarda G2677T/A polimorfizminin P-gp ifade seviyesini etkilediği gösterilmiştir. Tanabe ve ark.nın çalışmasında bu polimorfizmi taşıyan bireylerde plasental P-gp seviyesinin azaldığı bildirilmiştir (95).

C3435T polimorfizminde olduğu gibi G2677T/A polimorfizmi ile ilgili olarak allel ve genotip sıklıkları bakımından toplumlar arasında geniş varyasyonlar

dikkati çekmektedir. AA genotipi yalnızca uzak doğu toplumlarında gözlenirken (Japonya, Kore ve Çin), Avrupa toplumlarında bu genotip bildirilmemektedir (72,74,99,114,115).

Green ve ark. 38 over kanserli hastada paklitaksel'in farmakokinetikleri ve toksisitesi üzerine CYP2C8, ABCB1 ve CYP3A4 gen polimorfizmlerinin etkisini araştırmışlardır. Sonuç olarak MDR1 G2677T/A polimorfizmi için GA genotipine sahip heterozigot bireylerin diğer MDR1 varyantlarına göre anlamlı derecede daha yüksek paklitaksel klerensi gösterdiklerini bildirmişlerdir (116). Yine Green ve ark.nın over kanserli hastalarda gerçekleştirdikleri benzer bir çalışmada 53 hastada G2677T/A ve C3435T polimorfizmlerinin paklitaksel yanıtına etkisi değerlendirilmiştir. Bu çalışma sonucunda C3435T polimorfizminin aksine, G2677T/A polimorfizminin tedavi yanıtı ile ilişkili olduğu ve bu polimorfizm bakımından homozigot mutant (TT ve TA) bireylerin daha iyi tedavi yanıtı gösterdikleri rapor edilmiştir (117). Pan ve ark.nın 54 küçük hücre dışı akciğer kanseri hastasında gerçekleştirdikleri araştırmanın sonuçlarına göre, G2677T polimorfizmi bakımından GG genotipine sahip bireyler, GT veya TT genotipi taşıyan bireylere göre docetaxel/cisplatin tedavisine daha iyi yanıt vermektedirler (118).

### **2.4.3. C1236T Polimorfizmi**

Onikinci ekzonda lokalize olan bu polimorfizm P-gp molekülünde 412. amino asidi kodlayan GGC kodonunun GGT'ye değişimine neden olmaktadır (103). Ancak her iki kodonda glisin'i kodladığı için bu polimorfizm de C3435T polimorfizmi gibi sinonimdir. Daha önceden belirtildiği gibi C1236T polimorfizmi sinonim olmasına karşın P-gp aktivitesinde fonksiyonel öneme sahiptir. Bu polimorfizmde nadir kodon kullanımına neden olarak P-gp fonksiyonunu etkileyebileceği düşünülmektedir (79).

C3435T ve G2677T/A polimorfizmlerine benzer şekilde, C1236T polimorfizmi de allel ve genotip sıklıkları açısından toplumlar arasında oldukça değişkenlik göstermektedir. Avrupa toplumlarıyla mukayese edildiğinde TT genotipinin Asya toplumlarında daha sık gözleendiği, bunun aksine CC genotipinin ise Avrupa toplumlarında daha sık gözleendiği dikkati çekmektedir (99, 114, 119).

Türk populasyonunda C1236T polimorfizmi için alel sıklıkları C:%45.5, T: %54.5 ve genotip sıklıkları CC: %20, CT: %51, TT:%29 olarak bildirilmiştir (120).

Bosch ve ark.nın dozetaksel tedavisi alan 92 solid tümörlü hastada yaptığı çalışmada C1236T polimorfizmi bakımından TT genotipine sahip bireylerde docataxel klerensinin anlamlı derecede düştüğü bildirilmiştir (121).

Schaich ve ark.nın çalışmasında temozolomide tedavisi alan glioblastoma hastalarında 2 yıllık toplam sağ kalım oranları CC genotipine sahip bireylerde %37, CT genotipine sahip bireylerde %8 ve TT genotipine sahip bireylerde %10 olarak bildirilmiş ve C1236T polimorfizminin glioblastomada temozolomide yanıtı için yeni bir prediktif faktör olduğu vurgulanmıştır (122).

## 2.5. MEME KANSERİNDE TNM EVRELEMESİ

Meme kanseri için American Joint Committee On Cancer tarafından yapılan TNM sınıflaması şu şekildedir. (123)

### Primer Tümör (T)

<b>TX</b>	Primer tümör saptanamamaktadır
<b>T0</b>	Primer tümör yok
<b>Tis</b>	Karsinoma in situ
<b>Tis(DCIS)</b>	Duktal karsinoma in situ
<b>Tis(LCIS)</b>	Lobuler karsinoma in situ
<b>Tis (Paget)</b>	Meme başının kitlesiz Paget hastalığı (Tümör olan Paget hastalarında sınıflama tümörün boyutuna göre yapılır)
<b>T1</b>	Tümörün en büyük boyutu 2 cm veya daha az
<b>T1mic</b>	En büyük boyutu 0.1 cm veya daha az olan mikroinvazyon
<b>T1a</b>	En büyük boyutu 0.1 cm.den büyük olan ancak 0.5 cm.yi geçmeyen tümör
<b>T1b</b>	En büyük boyutu 0.5 cm.den büyük olan ancak 1 cm.yi geçmeyen tümör
<b>T1c</b>	En büyük boyutu 1 cm.den büyük olan ancak 2 cm.yi geçmeyen tümör

<b>T2</b>	En büyük boyutu 2 cm.den büyük olan ancak 5 cm.yi geçmeyen tümör
<b>T3</b>	En büyük boyutu 5 cm.den büyük olan tümör
<b>T4</b>	Herhangi bir boyutta ancak (a) göğüs duvarına veya (b) cilde direkt yayılım
<b>T4a</b>	Göğüs duvarına yayılım, pektoral kası içermeden
<b>T4b</b>	Meme cildinde ödem (peau d'orange da dahil) veya ülserasyon, veya aynı memede satelit deri nodülleri
<b>T4c</b>	T4a ve T4b birlikte
<b>T4d</b>	İnflamatuvar karsinoma

## **Bölgesel Lenf Nodülleri (N)**

### **Klinik Sınıflama**

- NX** Bölgesel lenf nodları saptanamamaktadır (örn. daha önce çıkartılmış)
- N0** Bölgesel lenf nodu metastazı yok
- N1** İpsilateral lenf nod(lar)ında metastaz (fikse değil)
- N2** Fikse veya gruplaşmış ipsilateral aksiller lenf nodlarında metastaz veya klinik olarak belirgin\* aksiller lenf nodu metastazı olmadığı durumlarda klinik olarak belirgin ipsilateral internal mammaryal nodlarında metastaz
- N2a** Birbirlerine veya çevre dokulara fikse ipsilateral aksiller lenf nodlarında metastaz
- N2b** Sadece klinik olarak aksiller lenf nodu metastazı olmadığı klinik olarak belirgin\* ipsilateral internal mammaryal nodlarda metastaz olduğunda
- N3** Aksiller lenf nodu tutulumu olsun ya da olmasın ipsilateral infraklavikular lenf nod(ları) metastazı veya klinik olarak belirgin\* ipsilateral internal mammaryal lenf nod(ları) metastazı ile birlikte klinik olarak belirgin aksiller lenf nodu metastazı; veya aksiller ya da internal

mammaryal lenf nodu metastazı olsun ya da olmasın ipsilateral supraklavikular lenf nod(ları) metastazı

**N3a** ipsilateral infraklavikular lenf nod(lar)ında metastaz

**N3b** ipsilateral internal mammaryal lenf nod(lar)ında veya aksiller lenf nod(ları)nda metastaz

**N3c** ipsilateral supraklaviküler lenf nod(ları)nda metastaz

\* Görüntüleme metodları (lenfosintigrafi hariç) veya klinik muayene ile veya patolojik olarak açıkça görülerek saptanma durumunda ‘klinik olarak belirgin’ terimi kullanılır.

### **Patolojik Sınıflama (pN)a**

**pNX** Bölgesel lenf nodları saptanamamakta (örn. patolojik inceleme için daha önce çıkartılmış veya çıkartılmamış)

**pN0** Histolojik olarak bölgesel lenf nodu metastazı olmayan, izole tümör hücreleri (ITH) için ek inceleme yok

**Not:** H&E boyası ile verifiye edilebilen ancak sıklıkla sadece immünohistokimyasal(IHK) veya moleküler metodlarla saptanan, 0.2 mm.den daha geniş olmayan tek tümör hücreleri veya küçük hücre kümeleri ‘izole tümör hücreleri (ITH)’ olarak tanımlanır. ITH, proliferasyon veya stromal reaksiyon gibi malign aktivite kanıtlarını genellikle göstermez.

**pN0(i-)** Histolojik bölgesel lenf nodu metastazı yok, negatif IHK

**pN0(i+)** Histolojik bölgesel lenf nodu metastazı yok, pozitif IHK, 0.2 mm.den geniş IHK kümesi yok.

**pN0(mol -)** Histolojik bölgesel lenf nodu metastazı yok, negatif moleküler bulgular. **pN0(mol+)** Histolojik bölgesel lenf nodu metastazı yok, pozitif moleküler bulgular. <sup>a</sup>Sınıflama sentinel lenf nodu diseksiyonu uygulanan veya uygulanmayan aksiller lenf nodu diseksiyonuna göre yapılır. Ardından aksiller lenf nodu diseksiyonu uygulanmayan sentinel lenf nodu diseksiyonuna



dayalı yapılan sınıflama, sentinel nod için (sn) ile belirtilir, örn; pN0(i+)(sn).

- pN1** 1-3 arası aksiller lenf nodlarında, ve/veya internal mammaryal nodlarda sentinel lenf nodu diseksiyonu ile saptanan mikroskopik hastalıkla birlikte metastaz, fakat klinik olarak belirgin değil\*\*
- pN1mi** Mikrometastaz (0.2 mm.den geniş, 2.0 mm.den geniş değil)
- pN1a** 1-3 adet aksiller lenf nodunda metastaz
- pN1b** Sentinel lenf nodu diseksiyonu ile internal mammaryal nodlarda mikroskopik hastalık olarak saptanan metastaz, fakat klinik olarak belirgin değil\*\*
- pN1c** 1-3 adet aksiller lenf nodunda ve internal mammaryal nodlarda sentinel lenf nodu diseksiyonu ile mikroskopik olarak saptanan metastaz, fakat klinik olarak belirgin değil\*\*. (3 aksiller lenf nodundan fazla pozitif nod varsa, artmış tümör yükünü göstermek için internal mammaryal lenf nodları pN3b olarak sınıflandırılır). (pN1a + pN1b)
- pN2** 4-9 aksiller lenf nodunda metastaz, veya aksiller lenf nodu metastazı olmadığında internal mammaryal lenf nodlarında klinik olarak belirgin\* metastaz
- pN2a** 4-9 aksiller lenf nodunda metastaz (2.0 mm.den büyük en az bir tümör odağı)
- pN2b** Aksiller lenf nodu metastazı yokken, internal mammaryal lenf nodlarında klinik olarak belirgin\* metastaz
- pN3** 10 veya daha fazla aksiller lenf nodunda, veya infraklaviküler lenf nodlarında, veya 1 ya da daha fazla aksiller lenf nodu pozitif olduğunda klinik olarak belirgin\* ipsilateral internal mammaryal lenf nodlarında metastaz; veya internal mammaryal lenf nodlarında klinik olarak negatif mikroskopik metastazla

birlikte 3'ten daha fazla aksiller lenf nodunda metastaz; veya ipsilateral supraklaviküler lenf nodlarında metastaz

**pN3a** 10 veya daha fazla aksiller lenf nodunda metastaz (2.0 mm.den büyük en az bir tümör odağı), veya infraklaviküler lenf nodlarına metastaz

**pN3b** 1 veya daha fazla pozitif aksiller lenf nodu varlığında klinik olarak belirgin\* ipsilateral internal mammaryal lenf nodu metastazı; veya sentinel lenf nodu diseksiyonuyla saptanan fakat klinik olarak belirgin olmayan\*\* mikroskopik hastalıkla birlikte 3 veya daha fazla aksiller lenf nodunda veya internal mammaryal lenf nodlarında metastaz.

**pN3c** ipsilateral supraklaviküler lenf nodlarında metastaz

\*Görüntüleme metodları (lenfosintigrafi hariç) veya klinik muayene ile saptanan metastazlarda 'klinik olarak belirgin' terimi kullanılır.

\*\* Görüntüleme metodları (lenfosintigrafi hariç) veya klinik muayene ile saptanamayan metastazlarda 'klinik olarak belirgin olmayan' terimi kullanılır.

### **Uzak Metastaz (M)**

**MX** Uzak metastaz bulunamıyor

**M0** Uzak metastaz yok

**M1** Uzak metastaz var (Tümörün olduğu tarafta supraklaviküler lenf nodları ve karşı memenin bölgesel lenf nodlarına metastazlar dahil)

### **Histopatolojik Grade (G):**

**Gx:** Değerlendirilemiyor

**G3:** Kötü Diferansiye

**G1:** iyi diferansiye

**G4:** indiferansiye

**Tablo 1.** Meme Kanserinin TNM Sınıflamasına Göre Sınıflandırılması

<b>Evre 0</b>	Tis	N0	M0
<b>Evre I</b>	T1 <sup>a</sup>	N0	M0
<b>Evre IIA</b>	T0	N1	M0
	T1 <sup>a</sup>	N1	M0
<b>Evre IIB</b>	T2	N0	M0
	T2	N1	M0
<b>Evre IIIA</b>	T3	N0	M0
	T0	N2	M0
	T1 <sup>a</sup>	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1	M0
<b>Evre IIIB</b>	T3	N2	M0
	T4	N0	M0
	T4	N1	M0
<b>Evre IIIC</b>	T4	N2	M0
	Herhangi T	N3	M0
<b>Evre IV</b>	Herhangi T	HerhangiN	M1

<sup>a</sup>T1,T1mic'i de içerir

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. HASTA VE KONTROL GRUPLARININ TOPLANMASI

Meme kanserinde MDR1 gen polimorfizmlerini araştırmak amacıyla, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda patolojik incelemesi yapılan 50 kadın meme kanseri olgusuna ait materyaller kullanıldı. Eksizyonel biyopsi, kadranektomi, lumpektomi ve/veya mastektomi materyalleri incelenen vakalarda patoloji rapor nüshalarından tümör uzun çapı, tümör tipi, tümör grade'i, aksiller lenf nodülü tutulumu, ER, PR ve c-erb bilgilerine ulaşıldı. Moleküler incelemede kullanılmak üzere her bir vaka için tümörü temsil eden bir parafin blok ile nontümöral meme dokusunu içeren ikinci bir parafin blok belirlendi. Bloklardan her seferinde temiz mikrotom bıçağı kullanılarak 8 mikron kalınlığında 4-5 kesit alındı ve steril ependorf tüplerine konularak moleküler inceleme için teslim edildi. Karşılaştırma yapabilmek amacı ile sağlıklı popülasyona ait MDR1 gen polimorfizm verileri temel olarak Gümüş-Akay ve ark.'nın çalışmasından alındı (124). Bu çalışma, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Değerlendirme Kurulunun 12 Eylül 2011 tarihli toplantısında 35-764 karar numarası ile onaylanmıştır.

#### 3.2. DNA İZOLASYONU

Formalin ile fikse edilmiş parafine gömülü dokudan DNA eldesi Roche High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche, Kat. No: 11 796 828 001) kullanılarak üretici firmanın önerdiği ve aşağıda tanımlanan protokol doğrultusunda gerçekleştirildi.

([https://cssportal.roche.com/LFR\\_PublicDocs/ras/11796828001\\_en\\_20.pdf](https://cssportal.roche.com/LFR_PublicDocs/ras/11796828001_en_20.pdf)

adresinden erişilebilir).

- Bu işlem için 25 – 50 mg formalinle fikse edilmiş parafine gömülü doku parçası kullanıldı.
- Doku parçası, deparafinize olması için ksilen içinde yaklaşık 30 dakika bekletildi.

- Doku parçası, derecelendirilmiş etanol serilerinde her birinde 10 saniye olmak üzere inkübe edildi.
  - %100 etanol (dehidrasyon)/ %80 etanol/ %60 etanol/ %40 etanol.
  - 10 saniye boyunca iki kere distile edilmiş su (rehidrasyon).
- Örnek steril mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı.
- Üzerine 200 µl Doku Lizis Tamponu ve 40 µl Proteinaz K eklendikten sonra iyice karıştırıldı ve bir gece 37°C'de inkübe edildi.
- Üzerine 20 µl Proteinaz K eklendi ve 1 – 2 saat 55 °C'de inkübe edildi.
- Örnek üzerine 200 µl Bağlama Tamponu eklendi ve iyice karıştırıldıktan sonra 10 dakika 70°C'de inkübe edildi.
- Üzerine 100 µl isopropanol eklendi ve iyice karıştırıldı.
- Toplama tüpüne bir adet High Filtre Tüp yerleştirildi.
- Örnek filtre tüpünün üst tampon rezervuarına pipetlendi.
- Tüm High Pure Filtre Tüpü düzeneğini standart bir masaüstü santrifüjüne yerleştirilerek bir dakika 8,000 rpm'de santrifüjlendi.
- Santifüjledikten sonra Filtre Tüpü toplama tüpünden alındı, süzüntü ve toplama tüpü atıldı.
- Filtre Tüpü yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi.
- Filtre Tüpünün üst tampon rezervuarına 500 µl İnhibitör Uzaklaştırma Tamponu eklendi.
- 1 dakika 8,000 rpm'de santrifüjlendi.
- Filtre Tüpü toplama tüpünden alındı, süzüntü ve toplama tüpü atıldı.
- Filtre Tüpü yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi.
- Filtre tüpünün üst tampon rezervuarına 500 µl Yıkama Tamponu eklendi.
- 1 dakika 8,000 rpm'de santrifüjlendi, süzüntü ve toplama tüpü atıldı.
- Filtre Tüpü yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi.
- Filtre tüpünün üst tampon rezervuarına 500 µl Yıkama Tamponu eklendi.
- 1 dakika 8,000 rpm'de santrifüjlendi, süzüntü ve toplama tüpü atıldı.
- Tüm High Pure Filtre Tüpü düzeneği ilave bir 10 saniye boyunca tam hızda santrifüjlendi, toplama tüpü atıldı.

- Filtre Tüpü temiz, steril 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildi.
- Filtre Tüpünün üst tampon rezervuarına önceden 70 °C'ye ısıtılmış 200 µl Elüsyon Tamponu eklendi.
- Tüp düzeneği 1 dakika 8,000 rpm'de santrifüjlendi.
- Filtre tüp atıldı ve mikrosantrifüj tüp içerisinde elde edilen DNA genotiplendirme çalışmalarında kullanılmak üzere -20 °C'de saklandı.

### 3.3. MDR1 GENİ TEK NÜKLEOTİD POLİMORFİZMLERİNİN GENOTİPLENDİRİLMESİ

MDR1 geni C1236T (rs1128503), G2677T/A (rs2032582) ve C3435T (rs1045642) tek nükleotid polimorfizmlerinin belirlenmesinde gerçek-zamanlı PCR yöntemi ve “melting curve” analizi kullanıldı. Gerçek-zamanlı PCR, Roche LightCycler® 480 cihazında HybProbe (Hibridizasyon Prob) yöntemi ile gerçekleştirildi. Bu amaçla LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe (Roche Diagnostics) kullanıldı. Herbir SNP için spesifik primer ve prob karışımları TIB MOLBIOL'den satın alındı (125).

PCR karışımı, 2 µL Light-Cycler Fast-Start DNA Master Hybprobe, 1.6 µL 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 µL her bir SNP için özel Reagent Mix (Primer ve Prob karışımı) ve 10.4 µL PCR grade dH<sub>2</sub>O ile hazırlandı. Reaksiyon karışımı plate kuyularına dağıtıldıktan sonra üzerine 5 µL DNA eklendi. Plate 2500 rpm'de 30 sn santrifüj edildikten sonra cihaza yerleştirildi

Gerçek zamanlı PCR protokolü aşağıdaki gibi oluşturuldu:

	Sıcaklık	Süre	Döngü sayısı
<b>Başlangıç Denatürasyonu</b>	95 °C	10 dk	1
<b>Amplifikasyon</b>			
<b>Denatürasyon</b>	95 °C	10 sn	45
<b>“Annealing”</b>	60 °C	10 sn.	
<b>Uzama/Sentez</b>	2 °C	15 sn	
	95 °C	30 sn	
<b>Melting Curve Analizi</b>	40 °C	2 dk	1
	40 °C → 75 °C	2°C/sn (sürekli okuma)	
<b>Soğutma</b>	40 °C	30 sn	1

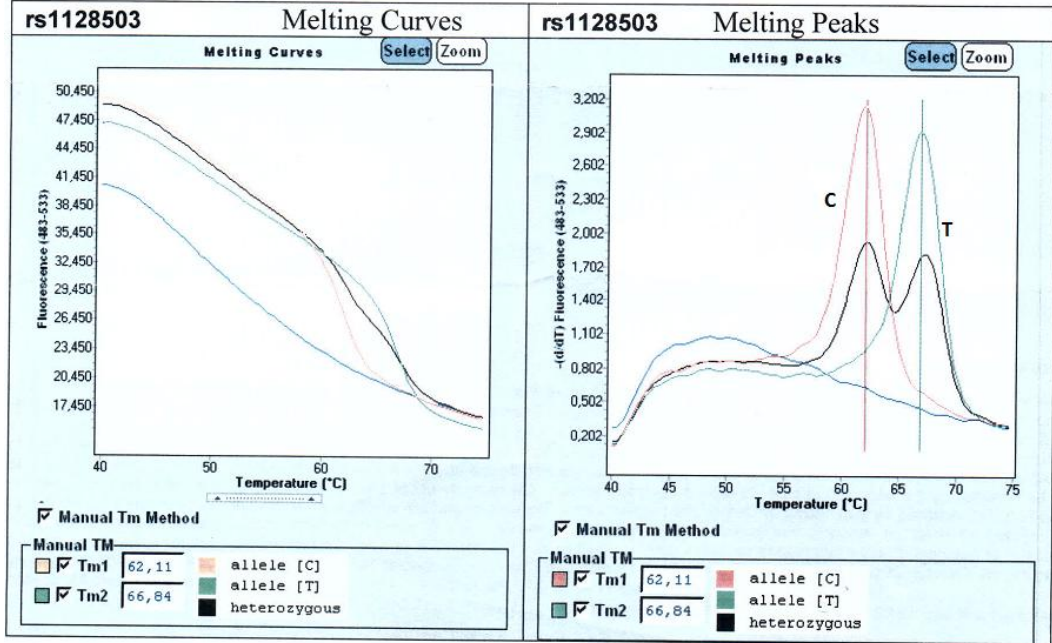
### 3.4. İSTATİSTİKSEL YÖNTEM

Çalışmanın istatistiksel analizi Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda yapıldı.

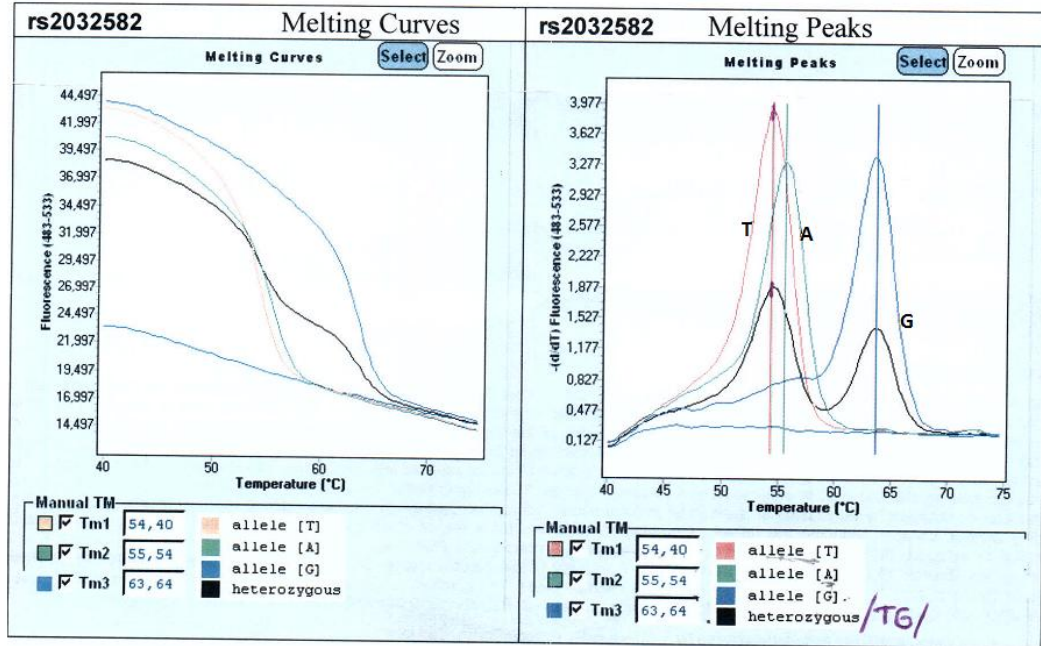
Bu tez çalışmasında kliniğimizde meme kanseri tanısı almış ve opere edilmiş olan 50 hastanın patoloji spesmenlerine ve hasta kayıtlarına ulaşıldı. Veriler normal sağlıklı popülasyonda daha önce yapılan çalışma ile elde edilen veriler ile karşılaştırıldı. Bu çalışma sonucunda elde edilen bütün genetik veri (alel sıklığı, genotip sıklığı, haplotip sıklığı) analizleri Arlequin version 3.11 yazılımı kullanılarak gerçekleştirildi. Haplotip sıklıklarının tahmininde “expectation-maximization (EM)” algoritması kullanıldı. Gruplar arası alel ve genotip sıklık farklılıklarının istatistiksel analizlerinde Fisher'in kesin  $\chi^2$  testi, Epi Info Software Version 3.2.2 kullanılarak gerçekleştirildi. Gruplar arası ve grup içi haplotip dağılımları arasındaki fark  $F_{ST}$  testi ile analiz edildi. Tespit edilen her bir haplotip için gruplar arası fark için Fisher'in kesin  $\chi^2$  testi uygulandı.  $P < 0.05$  değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

## 4. BULGULAR

### 4.1. MOLEKÜLER ANALİZ SONUÇLARI

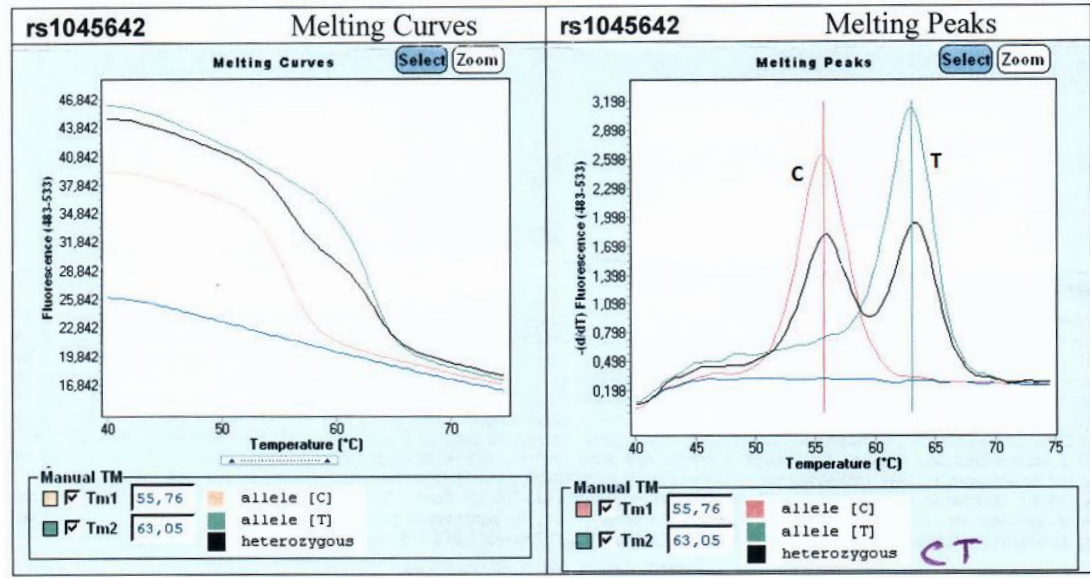


Şekil 3. C1236T polimorfizmi için heterozigot CT genotipine sahip bir bireyin “melting curve” analizi sonucu.



Şekil 4. G2677T/A polimorfizmi için heterozigot GT genotipine sahip bir bireyin “melting curve” analizi sonucu.





Şekil 5. C3435T polimorfizmi için heterozigot CT genotipine sahip bir bireyin “melting curve” analizi sonucu.

#### 4.2. HAPLOTİP SIKLIĞI

Tümörlü meme dokusu örneklerinden 8 örnekte DNA izole edilememiştir.

**Tablo 2.** Normal doku ile tümörlü meme dokusunun haplotip sıklıkları

C1236T-G2677T/A-C3435T	Tümör dokusu (n=42)	Normal doku(n=42)
CAC	0.04	0.03
CGC	0.45	0.48
CGT	0.10	0.08
CTC	0.03	0.01
TAT	0.02	0.02
TGC	0.03	0.02
TGT	0.00	
TTC	0.02	0.02
TTT	0.27	0.29
CAT		0.01

**Tablo 3.** Tümörlü meme dokusu ile normal populasyonun haplotip sıklıkları

<b>C1236T-G2677T/A-C3435T</b>	<b>Tümör dokusu (n=42)</b>	<b>Normal populasyon (n=107)</b>
CAC	0.04	0.04
CGC	0.45	0.25
CGT	0.10	0.05
CTC	0.03	0.02
TAT	0.02	
TGC	0.03	0.10
TGT	0.00	0.04
TTC	0.02	0.03
TTT	0.27	0.33
CAT		
CTT		0.08
TAC		0.01

**Tablo 4.** Tümörsüz meme dokusu ile normal populasyonun haplotip sıklıkları

<b>C1236T-G2677T/A-C3435T</b>	<b>Normal doku (n=42)</b>	<b>Normal populasyon (n=107)</b>
CAC	0.03	0.04
CGC	0.52	0.25
CGT	0.08	0.05
CTC	0.01	0.02
TAT	0.01	
TGC	0.02	0.10
TGT		0.04
TTC	0.02	0.03
TTT	0.27	0.33
CAT	0.01	
CTT		0.08
TAC		0.01

**Tablo 5.** Tümör boyutuna göre haplotip sıklığı

<b>C1236T-G2677T/A-C3435T</b>	<b>T1 (n=10)</b>	<b>T2-T3(n=32)</b>
CAC	0.10	0.03
CGC	0.37	0.47
CGT	0.17	0.08
CTC		0.05
TAT	0.10	
TGC		0.04
TTT	0.17	0.29
TGT		0.009
TTC	0.07	0.01

**Tablo 6.** Tümör grade'ine göre haplotip sıklıkları

<b>C1236T-G2677T/A-C3435T</b>	<b>G1-G2 (n=19)</b>	<b>G3(n=23)</b>
CAC	0.05	0.04
CGC	0.44	0.46
CGT	0.07	0.11
CTC	0.02	0.04
TAT	0.05	
TGC	0.05	
TTT	0.2	0.25
TGT		0.02
TTC		0.05

**Tablo 7.** Lenf nodu metastazına göre haplotip sıklıkları

<b>C1236T-G2677T/A-C3435T</b>	<b>N0-N1 (n=21)</b>	<b>N2-N3 (n=13)</b>
CAC	0.07	0.03
CGC	0.40	0.46
CGT	0.13	0.03
CTC	0.02	0.03
TAT	0.04	
TGC	0.02	0.03
TGT	0.03	
TTC	0.06	
TTT	0.19	0.38

**Tablo 8.** Östrojen reseptörüne göre haplotip sıklıkları

<b>C1236T-G2677T/A-C3435T</b>	<b>ER -(n=15)</b>	<b>ER+(n=27)</b>
CAC	0.03	0.05
CGC	0.42	0.47
CGT	0.14	0.08
CTC	0.03	0.03
TAT	0.03	0.01
TTC	0.07	
TTT	0.17	0.27
TGT		0.01
TGC		0.04

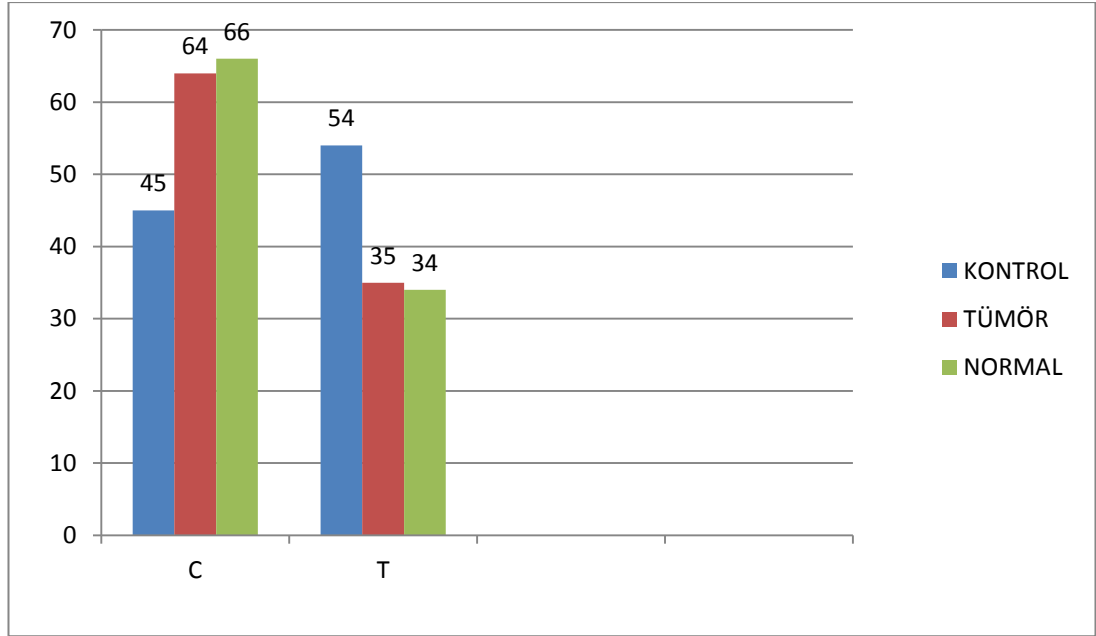
**Tablo 9.** Progesteron reseptörü durumuna göre haplotip sıklıkları

<b>C1236T-G2677T/A-C3435T</b>	<b>PR -(n=9)</b>	<b>PR+(n=33)</b>
CAC	0.05	0.04
CGC	0.37	0.47
CGT	0.12	0.09
CTC	0.05	0.03
TTC	0.07	0.01
TTT	0.31	0.25
TAT		0.02
TGC		0.03
TGT		0.008

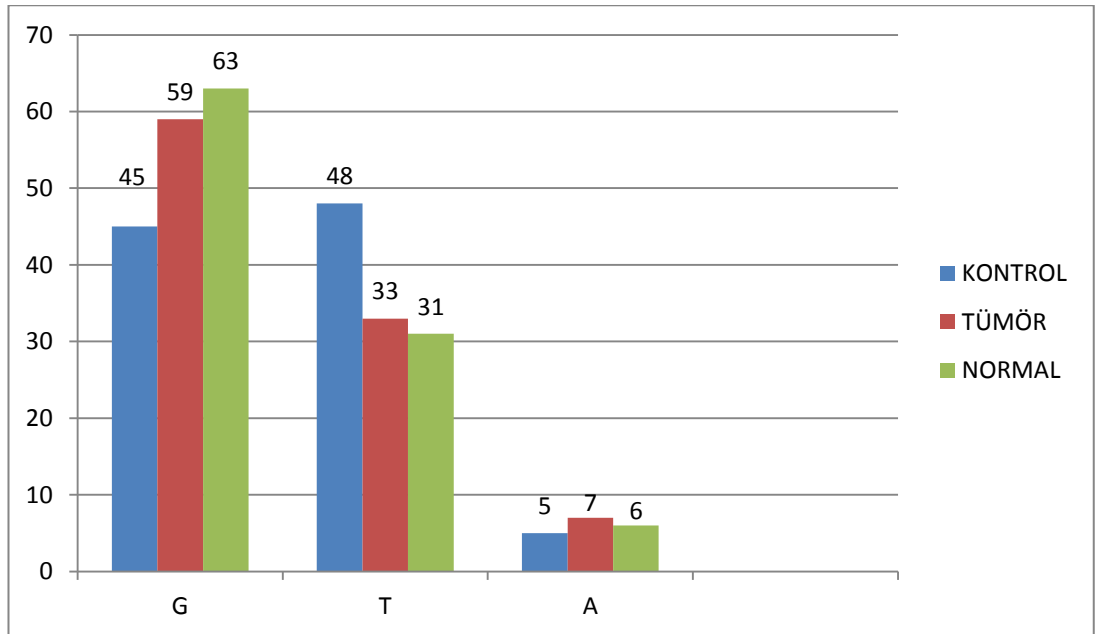
**Tablo 10.** c-erb durumuna göre haplotip sıklıkları

<b>C1236T-G2677T/A-C3435T</b>	<b>c-erb + (n=8)</b>	<b>c-erb - (n=34)</b>
CAC	0.06	0.04
CGC	0.31	0.48
CGT	0.06	0.11
TAT	0.06	0.01
TTT	0.50	0.21
CTC		0.04
TGC		0.03
TGT		0.01
TTC		0.03

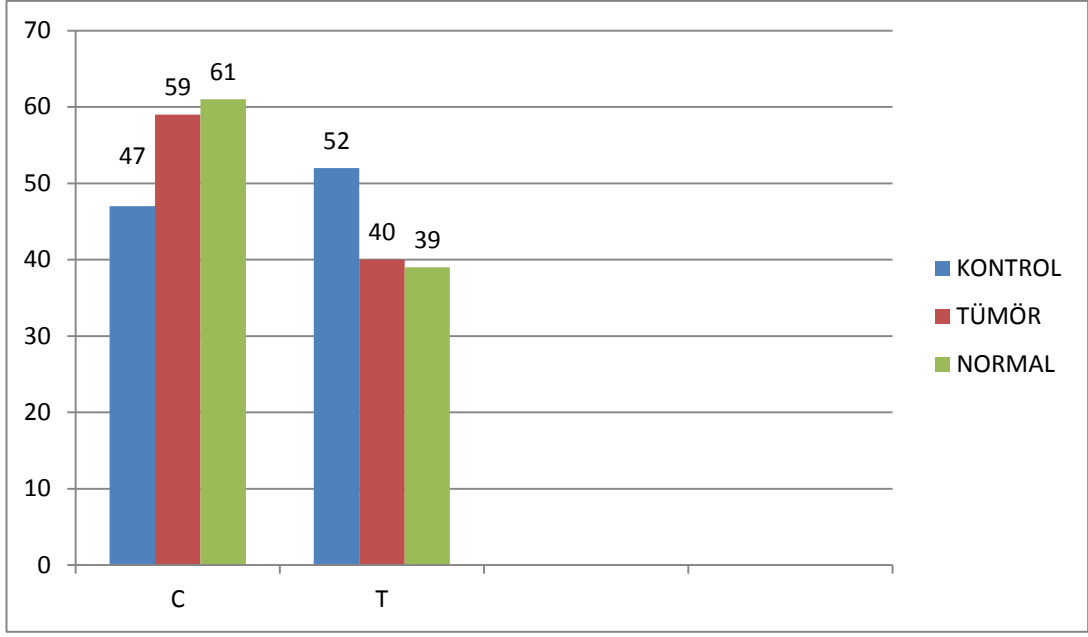
### 4.3. ALLEL SIKLIĞI



**Grafik 1.** Normal popülasyonda, tümörlü meme dokusu ve normal meme dokusunda 1236 lokusunundaki C ve T allel sıklığı (%)



**Grafik 2.** Normal popülasyonda, tümörlü meme dokusu ve normal meme dokusunda 2677 lokusunundaki G, T ve A allel sıklığı (%)



**Grafik 3.** Normal popülasyonda, tümörlü meme dokusu ve normal meme dokusunda 3435 lokusunundaki C ve T allel sıklığı (%)

#### 4.4. İSTATİSTİKSEL KARŞILAŞTIRMA

50 hastaya ait normal meme dokusu ve tümörlü meme dokusunun değerlendirildiği bu çalışmada elde edilen haplotip sıklığı ve allel sıklığı sonuçları daha önce normal popülasyonda yapılan ve 107 örneğin değerlendirildiği verilerle karşılaştırıldı. Gruplar arası allel ve genotip sıklık farklılıklarının istatistiksel analizlerinde Fisher'in kesin  $\chi^2$  testi, Epi Info Software Version 3.2.2 kullanılarak gerçekleştirildi. Gruplar arası ve grup içi haplotip dağılımları arasındaki fark  $F_{ST}$  testi ile analiz edildi. Tespit edilen her bir haplotip için gruplar arası fark için Fisher'in kesin  $\chi^2$  testi uygulandı.  $P < 0.05$  değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

**Tablo 11.** Allel sıklığı açısından gruplar arası istatistiksel karşılaştırma

SNP	Allel	Sağlıklı		Meme Kanseri				P
		Kontrol		Tümör doku		Normal doku		
		(N*=214)		(N*=84)		(N*=100)		
		n	F	n	F	n	F	
<b>C1236T</b> (rs1128503)	C	98	0.458	54	0.643	66	0.660	0.005
	T	116	0.542	30	0.357	34	0.340	(0.001)
<b>G2677T/A</b> (rs2032582)	G	98	0.458	50	0.595	63	0.630	0.029
	T	104	0.486	28	0.334	31	0.310	(0.012)
	A	12	0.056	6	0.071	6	0.060	
<b>C3435T</b> (rs1045642)	C	102	0.477	50	0.595	61	0.610	0.072
	T	112	0.523	34	0.405	39	0.390	(0.030)

\* Kromozom sayısı, \*\* Kişi sayısı, NS: P>0

**Tablo 12.** Genotip sıklığı açısından gruplar arasında istatistiksel karşılaştırma

SNP	Genotip	Sağlıklı Kontrol		Tümör doku		Normal doku		P
		(N**=107)		(N**=42)		(N**=50)		
		n	F	n	F	n	F	
<b>C1236T</b> (rs1128503)	CC	22	0.206	14	0.334	21	0.420	(0.007)
	CT	54	0.505	24	0.571	24	0.480	NS
	TT	31	0.289	4	0.095	5	0.100	0.011
<b>G2677T/A</b> (rs2032582)								(0.008)
	GG	23	0.215	12	0.286	18	0.360	NS
	GT	48	0.449	22	0.524	23	0.460	NS
	TT	24	0.224	3	0.084	4	0.080	0.033
	TA	8	0.075	0	0	0	0	(0.042)
	GA	4	0.037	4	0.095	4	0.080	NS
<b>C3435T</b> (rs1045642)	AA	0	0	1	0.026	1	0.020	NS
	CC	29	0.271	14	0.334	18	0.360	NS
	CT	44	0.411	22	0.524	25	0.500	NS
	TT	34	0.318	6	0.142	7	0.140	0.039
								(0.020)

\* Kromozom sayısı, \*\* Kişi sayısı, NS: P>0.05

**Tablo 13.** Haplotip sıklığına göre grupların istatistiksel olarak karşılaştırılması

Haplotipler	1236-2677-3435			P
	Meme Kanseri			
	Sağlıklı Kontrol (N*=214)	Tümör dokusu (N*=84)	Normal doku (N*=100)	
	F	F	F	
T-T-T	0.337	0.2701	0.2781	NS
C-G-C	<b>0.250</b>	<b>0.4522</b>	<b>0.5275</b>	<b>0.000002</b> <b>(0.001)</b>
T-G-C	<b>0.109</b>	<b>0.0318</b>	<b>0.0206</b>	<b>0.006</b> <b>(0.066)</b>
C-T-T	<b>0.087</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0.001</b> <b>(0.003)</b>
C-A-C	0.045	0.0480	0.0300	NS
C-G-T	0.054	0.1043	0.0819	NS
T-G-T	<b>0.045</b>	<b>0.0069</b>	<b>0</b>	<b>0.034</b>
T-T-C	0.039	0.0249	0.0215	NS
C-T-C	0.022	0.0383	0.0104	NS
T-A-C	0.011	0	0	NS
C-A-T	0	0	0.0102	NS
T-A-T	0	0.0234	0.0198	NS

\*Kromozom sayısı, NS: P<0.05

#### 4.4.1. Allel Sıklığı Bakımından

Yatkınlık açısından bakıldığında allel sıklığı bakımından MDR1 geni C1236T polimorfizmi için tespit edilen allel sıklıkları meme kanserli vakalarda ve sağlıklı popülasyonda karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır (p=0.001). C alleli sıklığı sağlıklı popülasyonda %45 iken, meme kanserli hastaların normal meme dokusunda %66'dır. Aksine T allel sıklığı sağlıklı popülasyonda %54 iken meme kanserli hastaların normal dokusunda %34'dür.

MDR1 geni G2677T/A polimorfizmi için tespit edilen allel sıklıkları meme kanserli vakalarda ve sağlıklı popülasyonda karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır (p=0.012).



MDR1 geni C3435T polimorfizmi için tespit edilen allel sıklıkları meme kanserli vakalarda ve sağlıklı populasyonda karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır ( $p=0.03$ ).

#### **4.4.2. Genotip Sıklığı Bakımından**

MDR1 geni C1236T polimorfizmi için tespit edilen genotip sıklığı kanserli vakalarda ve sağlıklı populasyonda kıyaslandığında CC genotipine sahip bireylerin sıklığının meme kanserli vakalarda (%42) sağlıklı populasyona göre (%20) anlamlı derecede yüksek olduğu saptandı ( $p=0.007$ ).

MDR1 geni C1236T polimorfizmi için tespit edilen genotip sıklığı kanserli vakalarda ve sağlıklı populasyonda kıyaslandığında TT genotipine sahip bireylerin sıklığının meme kanserli vakalarda (%10) sağlıklı populasyona göre (%28) anlamlı derecede düşük olduğu saptandı ( $p=0.008$ ).

MDR1 geni G2677T/A polimorfizmi için tespit edilen genotip sıklığı kanserli vakalarda ve sağlıklı populasyonda kıyaslandığında TT genotipine sahip bireylerin sıklığının meme kanserli vakalarda (%8) sağlıklı populasyona göre (%22) anlamlı derecede düşük olduğu saptandı ( $p=0.04$ ).

MDR1 geni C3435T polimorfizmi için tespit edilen genotip sıklığı kanserli vakalarda ve sağlıklı populasyonda kıyaslandığında TT genotipine sahip bireylerin sıklığının meme kanserli vakalarda (%14) sağlıklı populasyona göre (%31) anlamlı derecede düşük olduğu saptandı ( $p=0.02$ ).

#### **4.4.3. Haplotip Sıklığı Bakımından**

Haplotip sıklıkları açısından karşılaştırma yapıldığında tümörlü meme dokusu grubu ile tümörsüz meme dokusu grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır ( $p=0.994$ ).

Tümörlü meme dokusu grubu ile normal populasyonun oluşturduğu grup karşılaştırıldığında haplotip sıklığı açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır ( $p=0.010$ ).

Normal meme dokusu grubu ile normal populasyon grubu karşılaştırıldığında haplotip sıklığı açısından gruplar arasında anlamlı fark saptanmıştır ( $p=0.001$ ).

Tümörlü hastaların tümör grade'lerine göre gruplama yapıldığında gruplar arasında haplotip sıklıkları açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır (p=0.345).

Tümörlü hastaların lenf nodu metastazı durumuna göre gruplama yapıldığında gruplar arasında haplotip sıklığı açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır (p=0.638).

Tümörlü hastaların tümör boyutuna göre gruplama yapıldığında gruplar arasında haplotip sıklığı açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır (p=0.274).

Tümörlü hastaların tümörlerinin östrojen reseptörü durumuna göre gruplama yapıldığında gruplar arasında haplotip sıklığı açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır (p=0.623).

Tümörlü hastaların tümörlerinin progesteron reseptörü durumuna göre gruplama yapıldığında haplotip sıklığı açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır (p=0.489).

Tümörlü hastaların tümörlerinin c-erb durumuna göre gruplama yapıldığında haplotip sıklığı açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır (p=0.286).

1236-2677-3435 lokuslarının CGC haplotipinin sağlıklı kontrol grubu(%25) ile normal meme dokusundaki(%52) sıklıkları karşılaştırıldığında haplotip sıklığı bakımından normal meme dokusunda istatistiksel olarak anlamlı derecede yükseklik saptanmıştır (p=0.000002).

1236-2677-3435 lokuslarının TGC haplotipinin sağlıklı kontrol grubu ile normal meme dokusundaki sıklıkları karşılaştırıldığında haplotip sıklığı bakımından sağlıklı kontrol grubunda istatistiksel olarak anlamlı derecede yükseklik saptanmıştır (p=0.006).

1236-2677-3435 lokuslarında CAT haplotipi sağlıklı kontrol grubunda gözlenmezken, meme kanserli hastaların normal meme dokusunda bulunmuştur. CTT ve TAC haplotipi meme kanserli hastalarda izlenmezken, sağlıklı kontrol grubunda saptanmıştır.

CGC, TGC ve CTT haplotipleri için sağlıklı kontrol grubu ve meme kanserli vakalar arasında haplotip dağılımı karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edildi ( $p<0.001$ ).

Ayrıca tümör ve normal doku kıyaslandığında tümör oluşumunda mutasyon olup olmadığına bakıldığında 6 örnekte somatik mutasyon saptanmıştır.

## 5. TARTIŞMA

Meme kanseri kadınlarda en sık görülen kanserdir (1). Tedavide cerrahi, sistemik kemoterapi, radyoterapi ve hormonoterapi kullanılmaktadır. Kanser tedavisinde başarıya ulaşmak için genellikle birden fazla antineoplastik ilaç uygulanmaktadır. Ancak, MDR kanser kemoterapisinde başarıya ulaşmayı büyük ölçüde engellemektedir. Kemoterapiye karşı geliştirilen dirençlilik pekçok antikanser ilacın hastalar üzerinde beklenen etkisini gösterememesine ve hastalığın ilerlemesine neden olmaktadır.

Çoklu ilaç dirençliliği birden çok ve birbirinden farklı ilaca direnç gelişimidir (2). Hücre içi yetersiz ilaç konsantrasyonunun nedeni membran geçirgenliğinin bozulmasıdır ve bundan sorumlu faktörün p-glikoprotein olduğu gösterilmiştir. Human P-glikoprotein hücre içine giren toksik maddeler, kemoterapötikler gibi bir takım kimyasalların hücre dışına ATP enerjisi ile atılmasını sağlamaktadır. P-glikoproteini 7.kromozomdaki 28 ekzon içeren MDR1 geni kodlamaktadır (3). *MDR1* geninde yaygın olarak gözlenen ve literatürde en çok üzerinde durulan SNP'ler, C3435T, G2677T/A ve C1236T'dir ve söz konusu SNP'ler yaygın bir haplotipin bileşenidirler (103). Bu polimorfizmlerden C3435T ve C1236T polimorfizmleri aminoasit değişimine neden olmayan sessiz (silent = synonym) polimorfizmlerdir. C3435T her ne kadar sessiz bir polimorfizm olsa da diğer yaygın non-sinonim polimorfizmlerle birlikte herhangi bir haplotipte bulunduğu zaman azalmış P-gp fonksiyonu ile ilişkili olarak bildirilmektedir (4). Kimichi-Sarfaty ve ark. (2007) Science dergisinde yayınladıkları çalışmalarında C3435T, G2677T ve C1236T SNP'lerinin her birinin substrat özgünlüğünü değiştirdiğini, ancak her üç SNP'yi birden taşıyan haplotip söz konusu olduğunda bu etkinin en belirgin düzeye ulaştığını vurgulamaktadırlar. Bu veriler P-gp fonksiyonunu değiştirebilecek primer nedenin SNP farklılıklarından değil, bu polimorfizmlerin oluşturduğu haplotiplerden kaynaklandığı fikrini desteklemektedir (103). Bu nedenle biz de çalışmamızda tüm geni incelemek yerine 3 allelinde olduğu haplotipleri analiz ederek Türk toplumunda meme kanserli hastaların sağlıklı meme dokusu ve tümörlü meme dokusunda C1236T, G2677T=A ve C3435T allellerindeki polimorfizm sıklığını araştırdık.

Yapılan bağlantı analizleri sonucunda C3435T, G2677T/A ve C1236T SNP'leri arasında güçlü bir bağlantı dengesizliği bulunduğu farklı populasyonlarda gösterilmiştir. Örneğin, Tang ve ark. Çinli, Malay ve Hint populasyonlarında bu polimorfizmler arasında sıkı bir bağlantı olduğunu bildirmişlerdir (68). Benzer şekilde Kim ve ark.da C3435T, G2677T/A ve C1236T SNP'leri arasında güçlü bir bağlantı bulunduğunu Avrupa kökenli Amerikalılarda ve Afrika kökenli Amerikalılarda rapor etmişlerdir (126).

Bazı çalışmalarda ise söz konusu üç SNP'den ikisi arasında kuvvetli bir bağlantı dengesizliği bulunduğu gösterilmiştir. Örneğin, Tanabe ve ark. 65 Japon bireye ait örneklerin %94'ünde 3435T alelinin 2677T veya 2677A alleli ile birliktelik gösterdiğini bildirmişlerdir (95). Benzer şekilde Türk populasyonunda da üç SNP arasında anlamlı derecede bağlantı dengesizliği bulunduğu, ancak bunlardan yalnızca 2677 ve 3435 lokusları arasında nispeten güçlü bir bağlantı varlığı tespit edilmiştir (124).

MDR1 geni ile ilgili olarak veri tabanında farklı toplumlar için bildirilmiş olan bağlantı dengesizliği verilerine bakıldığında, bu gende var olan SNP'leri arasında tespit edilen bağlantı gücü ve derecesinin bir toplumdaki diğerine geniş ölçüde değişkenlik gösterdiği dikkati çekmektedir (127). C3435T, G2677T/A ve C1236T SNP'leri, aralarında var olan bağlantı nedeniyle yaygın bir haplotipin bileşeni olarak kabul edilmektedirler (103). C3435T polimorfizmi başta olmak üzere diğer MDR1 polimorfizmleri ile ilgili olarak ortaya çıkan çelişkili sonuçların nedeni olarak söz konusu çalışmalarda her bir SNP'nin bireysel olarak değerlendirilmesi ve oluşturdukları haplotiplerin göz ardı edilmesi gösterilmektedir (88). Bu sebeple çalışmamızda tek tek allel sıklığını incelemek yerine her 3 allelin oluşturduğu haplotip sıklığı değerlendirilmiştir.

MDR1 polimorfizmleri ile ilgili olarak son yıllarda yapılan çalışmalara bakıldığında zaman haplotip temelli analizlerin yer aldığı yayınların sayısının her geçen gün arttığı görülmektedir. Polimorfizmler arası bağlantı dengesizliğinde var olan varyasyonlara bakarak bu polimorfizmlerin oluşturdukları haplotip sıklıklarının da toplumlar arası geniş ölçüde değişkenlik göstermesi çok da şaşırtıcı değildir. C1236T, G2677T/A, C3435T SNP'leri açısından Afrika kökenli toplumlarda yaban

tip CGC haplotipi en sık ve TTT haplotipi nispeten daha seyrek gözlenirken; beyaz ırkta CGC ve TTT haplotip sıklıklarının birbirlerine hemen hemen eşit oldukları görülmektedir (88, 99, 126). Türk popülasyonu için CGC ve TTT haplotip sıklıkları sırasıyla %25 ve %33.7 olarak tespit edilmiştir (124).

3 lokus için olası 12 haplotip olması beklenirken sağlıklı kontrol grubunda 10 farklı haplotip tipi olduğu görülmektedir. Meme kanserli hastalarda normal meme dokusuna bakıldığında 9 haplotip olduğu görülmüştür. TTT haplotipine sahip bireylerde P-gp aktivitesinin düşük olduğu, toksik metabolitleri daha az dışarı attığı gösterilmiştir. Bu durumun kansere yatkınlık oluşturabileceği üzerinde durulmaktadır (128). Çalışmamızda TTT haplotip sıklığını meme kanserli hastalarda normal sağlıklı kontrol grubuna göre daha yüksek bulmayı beklerken aksine daha düşük sıklıkta olduğu görülmüştür. Aksiller lenf nodu tutulumu olmayan hastalarla lenf nodu tutulumu olanlar TTT haplotip sıklığı açısından karşılaştırıldığında lenf nodu tutulumu olanlarda TTT haplotip sıklığı olmayanlara göre 2 kat daha fazladır. Bu durum P-gp aktivitesinin artışı ile ilişkili olabilir.

Çalışmamızda normal popülasyon ile normal meme dokusu karşılaştırıldığında haplotip sıklığı açısından gruplar arası anlamlı fark saptanması ve normal popülasyon ile tümörlü meme dokusu grubu karşılaştırıldığında haplotip sıklığı açısından anlamlı fark saptanması meme kanserli hastalarda P-gp aktivitesinin değişmiş olabileceğini göstermektedir. MDR1 geninin göstermiş olduğu polimorfizm hastalarda prognostik öneme sahip olabilir. Hastalarda tümör boyutunun, grade'in, lenf nodu tutulumu, östrojen ve progesteron reseptörü, c erb durumunun haplotip sıklığını istatistiksel olarak anlamlı olarak değiştirmedeği saptanmıştır. Fakat örnek genişliği artırılarak farklı sonuçlar elde edilebilir.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamız sonucunda normal populasyon ile normal meme dokusu ve normal populasyon ile tümörlü meme dokusu arasında haplotip sıklığı açısından anlamlı fark saptanmıştır. Bu da meme kanserli hastalarda etyoloji ve prognozda MDR1 geninin önemi olabileceğini göstermektedir. Fakat bu konuda daha geniş örnek sayısı ile yeni çalışmalara ihtiyaç vardır. Bu çalışmamız da bu konuda yapılacak yeni çalışmalara ışık tutacaktır. Çalışmamız Türkiyeden yapılmış olan haplotip temelli ilk çalışmadır. Daha önce yapılan çalışmalar tek lokus bazlı çalışmalardır. Bu yöntem çok hassas olmasına karşın somatik mutasyon saptanan hastalarda sekans analizi yapılması planlanmaktadır.

## 7. ÖZET

**Türk toplumunda meme kanserli hastaların sağlıklı meme dokusu ve tümör dokusunda MDR1(Multi Drug Resistance-1) geninde C1236T, G2677T/A ve C3435T allellerinin sıklığının araştırılması**

Meme kanseri kadınlarda en sık görülen kanserdir. Kanser tedavisinde başarıya ulaşmak için genellikle birden fazla antineoplastik ilaç uygulanmaktadır. Ancak, çoklu ilaç direnci kanser kemoterapisinde başarıya ulaşmayı büyük ölçüde engellemektedir. Çoklu ilaç dirençliliği birden çok ve birbirinden farklı ilaca direnç gelişimidir. Hücre içi yetersiz ilaç konsantrasyonunun nedeni membran geçirgenliğinin bozulmasıdır ve bundan sorumlu faktörün p-glikoprotein olduğu gösterilmiştir. Human P-glikoprotein hücre içine giren toksik maddeler, kemoterapötikler gibi bir takım kimyasalların hücre dışına ATP enerjisi ile atılmasını sağlamaktadır.

P glikoproteini 7.kromozomdaki 28 ekzon içeren MDR1 geni kodlamaktadır. Bu bölgede en yaygın çalışılan alleller C1236T, G2677T=A ve C3435T allelleridir. Bu üç allel genomda lokus olarak birbirine yakın olarak yerleştiğinden alleller aynı anda kodlanmaktadır. Bu nedenle tüm geni incelemek yerine 3 allelinde olduğu haplotipler analiz edilerek Türk toplumunda meme kanserli hastaların sağlıklı meme dokusu ve tümörlü meme dokusunda C1236T, G2677T=A ve C3435T allellerindeki polimorfizm sıklığını araştırdık.

50 hastaya ait tümörlü meme dokusu ve normal meme dokusu örnekleri incelenerek elde edilen veriler daha önce 107 hastadan oluşan normal populasyondan elde edilen veriler ile karşılaştırıldı. DNA izolasyonu High Pure PCR Template Preparation Kiti kullanılarak gerçekleştirildi. Kantitatif gerçek zamanlı PCR, Roche LightCycler FastStart DNA Master HybProbe cihazında gerçekleştirildi.

Çalışmanın istatistiksel analizi Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında gerçekleştirildi. Tümörlü meme dokusu grubu ile normal populasyonun oluşturduğu grup karşılaştırıldığında haplotip sıklığı açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı. Normal meme dokusu



grubu ile normal populasyon grubu karşılaştırıldığında haplotip sıklığı açısından gruplar arasında anlamlı fark saptandı. Allel sıklığı açısından 1236-2677 ve 3435 lokusları karşılaştırıldığında 1236 ve 2677 lokuslarında allel sıklığı açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı. Tümörlü hastalarda tümör boyutu, tümör grade'i, lenf nodu tutulumu durumu, östrojen, progesteron ve c-erb durumu haplotip sıklığı açısından değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı.

Sonuç olarak çalışmamız Türkiye'den yapılan ilk haplotip temelli çalışma olup Türk toplumunda meme kanseri gibi çeşitli hastalıkların oluşmasında MDR1 geninin araştırılması için ve gelecekte yapılacak farmakogenetik çalışmalar için yeni bir çerçeve oluşturmaktadır. Bu konuda daha geniş populasyonlarda yapılacak yeni çalışmalara ihtiyaç vardır.

**Anahtar kelimeler:** meme kanseri, ilaç direnç geni, polimorfizm

## 8. SUMMARY

### **Prevalence of MDR1 (Multi Drug Resistance-1) gene C1236T, G2677T/A and C3435T alleles in healthy breast tissue and tumor tissue of patients with breast cancer in Turkish population**

Breast cancer is the most common cancer in women. For a successful cancer treatment usually more than one anti-neoplastic drugs are used. However multi-drug resistance prevents success in the cancer chemotherapy. Multi-drug resistance is development of resistance to different drugs. The cause of low drug concentrations in the cell is the deterioration of membrane permeability and it was shown that p-glycoprotein is the responsible factor. Human p-glycoprotein provides discharge of several chemicals such as toxic substances, chemotherapeutic agents out of the cell by consuming ATP.

P-glycoprotein is encoded by the MDR1 gene which contains 28 exons. MDR1 gene is located on the 7th chromosome. The most common studied alleles on this region are C1236T, G2677T=A, and C3435T. These alleles are located on adjacent loci on genome so they are encoded simultaneously. Therefore instead of studying a whole gene, the haplotypes that contains these three alleles were analyzed and we have studied the polymorphism frequency on C1236T, G2677T=A, and C3435T alleles in healthy and cancerous breast tissue of breast cancer patients respectively in Turkish population.

Healthy and cancerous breast tissue samples of 50 patients were examined and were compared with previously collected datas of 102 healthy individuals. DNAs were isolated by High Pure PCR Template Preparation Kit. Quantitative real-time PCR was performed in Roche LightCycler FastStart DNA Master HybProbe device.

The statistical analysis of the research was performed by the Gaziosmanpaşa University, Department of Medical Biology. When cancerous breast tissue group and healthy population group were compared, there were statistically significant difference in haplotype frequency. When 1236, 2677, and 3435 loci were compared for allele frequency, statistical significant difference were determined in 1236 and

2677 loci. Haplotype frequency of the cancerous breast tissue group were compared with tumor size and grade, lymph node involvement, estrogen and progesteron receptors, C-erb presence and there were no statistically significant difference.

In conclusion, our research, which is the first haplotype based analysis from Turkey, contributes to the study of the role of MDR1 gene in several diseases such as breast cancer in Turkish population and to the future pharmacogenetic studies. However there is a need of large population studies.

**Keywords:** breast cancer, multi-drug resistance gene, polymorphism

## 9. KAYNAKLAR

1. Tuncer M. Significance of cancer in Turkey, the burden of disease and cancer control policies. Health Ministry Publication, 2008; 74: 5-9
2. Marie JP, Legrand O. Drug Resistance in Acute Leukaemia and Reversion. Turk J Med Sci. 2003; 33: 271-9
3. Sakaeda T. MDR1 genotype-related pharmacokinetics: fact or fiction? Drug Metab Pharmacokinet. 2005; 20: 391-414
4. Schwab M, Eichelbaum M, Fromm MF. Genetic polymorphisms of the human MDR1 drug transporter. Annu Rev Pharmacol Toxicol 2003; 43: 285-307
5. Schinkel AH. The physiological function of drug-transporting P-glycoproteins. Semin Cancer Biol 1997; 8: 161-70
6. Hoffmeyer S, Burk O, von Richter O, Arnold HP, Brockmüller J, Johne A, et al. Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. Proc Natl Acad Sci 2000; 97: 3473-8
7. McPherson K, Steel CM, Dixon JM. ABC of breast diseases, breast cancer-epidemiology, risk factors, and genetics. BMJ 2000; 321: 624-628
8. Mettlin C. Global breast cancer mortality statistics. CA Cancer J Clin 1999; 49: 138-144
9. Ravdin PM, Cronin KA, Howlader N, Berg CD, Chlebowski RT, Feuer EJ, Edwards BK, Berry DA. The decrease in breast-cancer incidence in 2003 in the United States. N Engl J Med 2007; 356: 1670-4
10. Greenlee RT, Murray T, Bolden S, Wingo PA. Cancer Statistics, 2000. CA Cancer J Clin 2000; 50:7-33
11. Eser SY. Cancer incidence in Turkey. In: Tuncer M, Eds. Cancer Control in Turkey. Ankara: The ministry of Health of Turkey 2007; 10: 17-4

12. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global Cancer statistics,2002. *CA Cancer J Clin.*2005; 55: 74-108
13. Hoveer R. Breast cancer: geographic, migrant, and time-trend patterns In: Fortner JSP, Eds. *Accomplishments in cancer research.* New York: Lippincott-Raven, 1996; 11: 154-64
14. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics 2009. *CA Cancer J Clin* 2009; 59: 225-249
15. Stewart BW, Kleihues P. Breast cancer. In: *World Cancer Report.* IARC Press. Lyon, 2003:188-197
16. Giordano SH, Cohen DS, Buzdar AU, Perkins G, Hortobagyi GN. Breast carcinoma in men: A population-based study. *Cancer* 2004; 101: 51-57
17. Lichtenstein P, Holm NV, Verkasalo PK, Iliadou A, Kaprio J, Koskenvuo M, Pukkala E, Skytthe A, Hemminki K. Environmental and heritable factors in the causation of cancer analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland, *N. Engl. J. Med.* 2000; 343: 78-85
18. Mitrunen K, Hirvonen A. Molecular epidemiology of sporadic breast cancer the role of polymorphic genes involved in oestrogen biosynthesis and metabolism. *Mutation Research* 2003; 544: 9-41
19. Magnusson C, Colditz G, Rosner B, Bergstrom R, Persson I. Association of family history and other risk factors with breast cancer risk. *Cancer Causes Control* 1998; 9: 259-267
20. Rebbeck TR. Inherited genetic predisposition in breast cancer. A population-based perspective. *Cancer*, 1999; 86: 2493-2501
21. Emerit I. Reactive oxygen species, chromosome mutation and cancer: possible role of clastogenic factors in carcinogenesis. *Free Radic. Biol. Med* 1994;16:99-109
22. Judkins T, Rosenthal E, Arnell C, Burbidge LA, Geary W, Barrus T, Schoenberger J, Trost J, Wenstrup RJ, Roa BB. Clinical significance of large rearrangements in BRCA1 and BRCA2. *Cancer*, 2012;118:5210-5216
23. Kerbel RS. Tumor angiogenesis. *N Engl J Med* 2008; 358: 2039-2049

24. Johnson-Thompson MC., Guthrie J. Ongoing research to identify environmental risk factors in breast carcinoma. *Cancer* 2000; 88: 1224-1229
25. Rutter J, Chatterjee N, Wacholder S, Struewing J. The HER2 I655V polymorphism and breast cancer risk in Ashenazim. *Epidemiology* 2003; 14: 694-700
26. Kabuto M, Akiba S, Stevens RG, Neriishi K, Land CE. A prospective study of estradiol and breast cancer in Japanese women. *Cancer Epidemiol. Biomarker Prev* 2000; 9: 575-579
27. Wise LA, Titus-Ernstoff L, Newcomb PA, Trentham-Dietz A, Trichopoulos D, Hampton JM, Egan KM. Exposure to breast milk in infancy and risk of breast cancer. *Cancer causes control* 2009; 20: 1083-1090
28. Lipworth L, Bailey LR, Trichopoulos D. History of breast-feeding in relation to breast cancer risk: a review of the epidemiologic literature, *J. Natl. Cancer Inst* 2000; 92:302-312
29. Huang W-Y, Newman B, Millikan R, Schell MJ, Hulka B, Moorman P. Hormone-related factors and risk of breast cancer in relation to estrogen receptor and progesterone receptor status. *Am. J. Epidemiol* 2000; 151:703-714
30. Enger SM, Ross RK, Paganini-Hill A, Carpenter CL, Bernstein L. Body size, physical activity, and breast cancer hormone receptor status: results from two case-control studies. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev* 2000; 9: 681-687
31. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Breast cancer and hormonal contraceptives: collaborative reanalysis of individual data on 53,297 women with breast cancer and 100,239 women without breast cancer from 54 epidemiological studies. *Lancet* 1996; 347: 1713–1727
32. Hunter DJ, Colditz GA, Hankinson SE, Malspeis S, Spiegelman D, Chen W, Stampfer MJ, Willett WC. Oral contraceptive use and breast cancer: a prospective study of young women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2010; 19: 2496-502
33. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Breast cancer and hormone replacement therapy: collaborative reanalysis of data from 51

- epidemiological studies of 52,705 women with breast cancer and 108,411 women without breast cancer. *Lancet* 1997; 350: 1047–1059
34. Schairer C, Lubin J, Troisi R, Sturgeon S, Brinton L, Hoover R. Estrogen-progestin replacement and risk of breast cancer. *JAMA*, 2000; 284: 691-694.
  35. Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, Jackson RD, Beresford SA, Howard BV, Johnson KC, Kotchen JM, Ockene J. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results from the women's health initiative randomized controlled trial. *JAMA* 2002; 288: 321-333
  36. Garner CE, Burka LT, Etheridge AE, Matthews HB. Catechol metabolites of polychlorinated biphenyls inhibit the catechol-O methyltransferase-mediated metabolism of catechol estrogens. *Toxicol Appl Pharmacol* 2000; 162: 115-123
  37. Palmer J.R, Rosenberg L. Cigarette smoking and the risk of breast cancer. *Epidemiol Rev* 1993; 15: 145–156
  38. Baron J.A, Vecchia C, Levi La F. The antiestrogenic effect of cigarette smoking in women, *Am. J. Obstet. Gynecol* 1990; 162: 502–514
  39. Bartsch H, Nair U, Risch A, Rojas M, Wikman H, Alexandrov K. Genetic polymorphism of CYP genes, alone or in combination, as a risk modifier of tobacco-related cancers. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev* 2000; 9: 3-28
  40. Hein DW, Doll MA, Freatland AJ, Leff MA, Webb SJ, Xiao GH, Devanaboyina US, Nangju NA, Feng Y. Molecular genetics and epidemiology of the NAT1 and NAT2 acetylation polymorphisms. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev* 2000; 9: 29-42
  41. Gilks CB, Price K, Wright JL, Churg A. Antioxidant gene expression in rat lung after exposure to cigarette smoke. *Am. J. Pathol.* 1998; 152: 269-278
  42. Pryor WA. Cigarette smoke radicals and the role of free radicals in chemical carcinogenicity. *Environ. Health Perspect* 1997; 105: 875-882
  43. Bartsch, J. Nair, RW. Dietary polyunsaturated fatty acids and cancers of the breast and colorectum: emerging evidence for their role as risk modifiers. *Carcinogenesis* 1999; 20: 2209–2218

44. Byrne C, Rockett H, Holmes M.D. Dietary fat, fat subtypes, and breast cancer risk: lack of an association among postmenopausal women with no history of benign breast disease. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev* 2002; 11: 261–265
45. Yue W, R.J. Santen, J.P. Wang, C.J. Hamilton, L.M. Demers, Aromatase within the breast, *Endocr. Relat. Cancer* 1999; 6: 157–164
46. De Cree C, Van Kranenburg G, Geurten P, Fujimori Y, Keizer H.A. 4-Hydroxycatecholesterol metabolism responses to exercise and training: possible implications for menstrual cycle irregularities and breast cancer, *Fertil. Steril* 1997; 67: 505–516
47. Freudenheim JL, Marshall JR, Vena JE, Laughlin R, Brasure JR, Swanson M, Nemoto T, Graham S. Premenopausal breast cancer risk and intake of vegetables, fruits, and related nutrients. *J. Natl. Cancer Inst* 1996; 88: 340-348
48. Heddleston JM, Li Z, Lathia JD, Bao S, Hjelmeland AB, Rich JN. Hypoxia inducible factors in cancer stem cells. *Br J Cancer* 2010; 102: 789-795
49. Graham S, Marshall J, Mettlin C, Rzepka T, Nemoto T. Diet in the epidemiology of breast cancer. *Am J Epidemiol* 1982; 116: 68-75
50. Goh J, Kirk EA, Lee SX, Ladiges WC. Exercise, physical activity and breast cancer: the role of tumor associated macrophages. *Exerc. Immunol Rev* 2012;18: 158-76
51. Perumal SS, Shanthi P, Sachdanandam P. Augmented efficacy of tamoxifen in rat breast tumorigenesis when gavaged along with riboflavin, niacin, and CoQ10: Effects on lipid peroxidation and antioxidants in mitochondria. *Chemico-Biological Interactions*, 2005; 152: 49-58
52. Smith-Warner SA, D. Spiegelman, SS. Yaun, PA. van den Brandt, AR. Folsom, RA. Goldbohm, S. Graham, L.Holmberg, GR. Howe, JR. Marshall, AB. Miller, JD. Potter, FE. Speizer, WC. Willett, Wolk, DJ. Hunter. Alcohol and breast cancer in women: a pooled analysis of cohort studies. *JAMA* 1998; 279: 535–540
53. H. Kuper W, Ye, Weiderpass E, Ekblom A, Trichopoulos D, Nyren O, Adami H.O, Alcohol and breast cancer risk: the alcoholism paradox, *Br. J. Cancer* 2000 83: 949–951



54. Colditz G.A, Frazier A.L. Models of breast cancer show that risk is set by events of early life: prevention efforts must shift focus. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev* 1995; 4: 567–571
55. Wright R.M, McManaman J.L, Repine J.E. Alcohol induced breast cancer: a proposed mechanism, *Free Radic. Biol. Med.* 1999; 26: 348–354
56. Kheifets LI, Matkin CC. Industrialization, electromagnetic fields, and breast cancer risk. *Environ. Health Perspect* 1999; 107: 145-154
57. Lipman ME, Oncogenes and Supressor Genes In: Harris JR Disease of the Breast Eds., Morrow M, Lippman ME, Hellman S., Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia 1996, p:221-235
58. Gelmann EP. Oncogenes in human breast Cancer. In: *The Breast: Comprehensive management of benign and malignant Diseases. Vol I.* Ed: Bland KI, Copeland EM. WB saunders Company, USA, 1998, p:499-517.
59. Dickson RB, Lipman ME, Oncogenes and Supressor Genes In: *Disease of the Breast* Ed.Harris JR, Morrow M, Lippman ME, Hellman S., Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia-NewYork 1996, p:221-235
60. Osborne C, Wilson P, Tripathy D. Oncogenec and tumor supressor genes in breast cancer: Potential diagnostic and therapetic applications. *Oncologist* 2004; 9: 361-77
61. Beckmann MW, Niederacher D, Schnurch HG, Gusterson BA, Bender HG. Multistep carcinogenesis of breast cancer and tumour heterogeneity. *J Mol Med* 1997; 75: 429-39
62. Klijn M, Berns J, Schmits M, Foekens A. The Clinical significance of epidermal growth factor receptor (EGF-R) in human breast cancer: A review on 5232 patients. *Endocr Rev* 1992; 13: 3-17
63. Bell D.W. Our changing view of the genomic landscape of cancer. *J Pathol.* 2010; 220: 231-43
64. Wood LD, Parsons DW, Jones S. The genomic landscapes of human breast and colorectal cancers. *Science.* 2007; 16: 1108-13

65. Olopade O, Grushko T, Nanda R, Huo D. Advances in breast cancer: pathways to personalized medicine. *Clin Cancer Res.* 2008; 14: 7988-99
66. Turnbull C, Rahman N. Genetic predisposition to breast cancer: past, present, and future. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2008; 9:321-45
67. Foulkes WD. Inherited susceptibility to common cancers. *N Engl J Med.* 2008 13: 2143-53
68. Turner NC, Reis-Filho JS. Basal-like breast cancer and the BRCA1 phenotype. *Oncogene.* 2006; 25: 5846-53
69. Venkitaraman AR. Cancer susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2. *Cell.* 2002; 25:171-82
70. Fong PC, Boss DS, Yap TA. Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase in tumors from BRCA mutation carriers. *N Engl J Med.* 2009; 9: 123-34
71. Stratton MR, Rahman N. The emerging landscape of breast cancer susceptibility. *Nat Genet* 2008; 40: 17-22
72. Lee S.S, Kim Y, Kim Y, Thi-Le H, Yoon Y, Yea S. MDR1 genetic polymorphisms and comparison of MDR1 haplotype profiles in Korean and Vietnamese populations. *Ther Drug Monit* 2005; 27: 531-5
73. Sayitoglu M. Cancer therapy and pharmacogenetic approach: scientific letter. *Turkiye Klinikleri J Med Sci* 2007; 27: 434-41
74. Tang K, Ngoi SM, Gwee PC, Chua JM, Lee EJ, Chong SS, et al. Distinct haplotype profiles and strong linkage disequilibrium at the MDR1 multidrug transporter gene locus in three ethnic Asian populations. *Pharmacogenetics* 2002; 12: 437-50
75. Ambudkar SV, Kimchi-Sarfaty C, Sauna ZE, Gottesman MM. P-glycoprotein: from genomics to mechanism. *Oncogene* 2003; 22: 7468-85
76. Alexandrova R. Multidrug Resistance and P-Glycoprotein. *Bulgarian Academy of Sciences* 1998; 1: 62-66
77. Borst P, Elferink O. Mammalian ABC transporters in health and disease. *Annu Rev Biochem* 2002; 71: 537-92

78. Gottesman MM. Mechanisms of cancer drug resistance. *Annu Rev Med* 2002; 53: 615-27
79. Fung KL, Gottesman MM. A synonymous polymorphism in a common MDR1 (ABCB1) haplotype shapes protein function. *Biochim Biophys Acta* 2009; 17:860-71
80. Ueda K, Cardarelli C, Gottesman MM, Pastan I: Expression of a full-length cDNA for the human "MDR1" gene confers resistance to colchicine, doxorubicin, and vinblastine. *Proc Natl Acad Sci*, 1987;84: 3004–3008
81. Mealey KL. Therapeutic implications of the MDR1 gene. *J. vet. Pharmacol. Therap* 2004; 27: 257-264
82. Zhou SF. Structure, function and regulation of P-glycoprotein and its clinical relevance in drug disposition. *Xenobiotica*. 2008; 38: 802-32
83. Hattori H, Suminoe A, Wada M, Koga Y, Kohno K, Okamura J, Hara T, Matsuzaki A. Regulatory polymorphisms of multidrug resistance 1 (MDR1) gene are associated with the development of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res* 2007; 31: 1633-1640
84. Horio M, Gottesman MM, Pastan I. ATP-dependent transport of vinblastine in vesicles from human multidrug-resistant cells. *Proc Natl Acad Sci*. 1988; 85: 3580-3584
85. Kaya P, Gündüz U, Arpacı F, Ural AU, Guran S. Identification of polymorphisms on the MDR1 gene among Turkish population and their effects on multidrug resistance in acute leukemia patients. *Am J Hematol*. 2005; 80 (1): 26-34
86. Lee TB, Park JH, Min YD, Kim KJ, Choi CH. Epigenetic mechanisms involved in differential MDR1 mRNA expression between gastric and colon cancer cell lines and rationales for clinical chemotherapy. *BMC Gastroenterol* 2008; 8: 33-38
87. Labialle S, Gayet L, Marthinet E, Rigal D, Baggetto LG. Transcriptional regulators of the human multidrug resistance 1 gene: recent views. *Biochem Pharmacol* 2002; 64: 943-948

88. Kroetz DL, Pauli-Magnus C, Hodges LM, Huang C, Kawamoto M, Johns J. Pharmacogenetics of Membrane Transporters Investigators. Sequence diversity and haplotype structure in the human ABCB1 (MDR1, multidrug resistance transporter) gene. *Pharmacogenetics* 2003; 13: 481-494
89. Turgut S, Yaren A, Kursunluoğlu R. MDR1 C3435T polymorphism in patients with breast cancer. *Arch Med Res* 2007; 38, 539-544
90. Wada M. Single nucleotide polymorphisms in ABCC2 and ABCB1 genes and their clinical impact in physiology and drug response. *Cancer Lett* 2006; 234: 40-50
91. Callen DF, Baker E, Simmers RN, Seshadri R, Roninson IB. Localization of the human multiple drug resistance gene, MDR1, to 7q21.1. *Hum Genet* 1987; 77: 142-144
92. Linardi RL, Natalini CC. Multidrug resistance (MDR1) gene and P-glycoprotein influence on pharmacokinetic and pharmacodynamic of therapeutic drugs. *Ciência Rural*. 2006; 36: 336-341
93. Li YH, Wang YH, Li Y, Yang L. MDR1 gene polymorphisms and clinical relevance. *Yi Chuan Xue Bao* 2006; 33: 93-104
94. Ameyaw M, Regateiro F, Li T, Liu X, Tariq M, Mobarek A, Thornton N, Folayan G, Githang'a J, Indalo A, Ofori-Adjei D, Price-Evans DA, McLeod HL. MDR1 pharmacogenetics: frequency of the C3435T mutation in exon 26 is significantly influenced by ethnicity. *Pharmacogenetics*. 2001; 11: 217-221
95. Tanabe M, Ieiri I, Nagata N, Inoue K, Ito S, Kanamori Y, Takahashi M, Kurata Y, Kigawa J, Higuchi S, Terakawa N, Otsubo K. Expression of P-glycoprotein in human placenta: relation to Genetic polymorphism of the multidrug resistance (MDR)-1 gene. *J Pharmacol Exp Ther*. 2001; 297: 1137-1143
96. Mickley LA, Lee JS, Weng Z, Zhan Z, Alvarez M, Wilson W, et al. Genetic polymorphism in MDR-1: a tool for examining allelic expression in normal cells, unselected and drug-selected cell lines, and human tumors. *Blood* 1998; 91: 1749-1756

97. Fairchild C, Moscow J, O'Brien EE, Cowan H. Multidrug resistance in cells transfected with human genes encoding a variant P-glycoprotein and glutathione S-transferase-pi. *Mol Pharmacol* 1990; 37: 801-809
98. Schaeffeler E, Eichelbaum M, Brinkmann U, Penger A, Asante-Poku S, Zanger M. Frequency of C3435T polymorphism of MDR1 gene in African people. *Lancet* 2001; 358: 383-384
99. Wasilewska A, Zalewski G, Chyczewski L, Zoch-Zwierz W. MDR-1 gene polymorphisms and clinical course of steroid-responsive nephrotic syndrome in children. *Pediatr Nephrol* 2007; 22: 44-51
100. Ardizzone S, Maconi G, Bianchi V, Russo A, Colombo E, Cassinotti A. Multidrug resistance 1 gene polymorphism and susceptibility to inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2007;13: 516-523
101. Turgut G, Kurt E, Sengul C, Alatas G, Kursunluoglu R, Oral T. Association of MDR1 C3435T polymorphism with bipolar disorder in patients treated with valproic acid. *Mol Biol Rep* 2009; 36: 495-499
102. Shen LX, Basilion JP, Stanton VP Jr. Single nucleotide polymorphisms can cause different structural folds of mRNA. *Proc Natl Acad Sci* 1999; 96: 7871-7876
103. Kimchi-Sarfaty C, Oh JM, Kim IW, Sauna ZE, Calcagno AM, Ambudkar SV. A "silent" polymorphism in the MDR1 gene changes substrate specificity. *Science* 2007; 315: 525-529
104. Jamroziak K, Balcerczak E, Smolewski P, Robey RW, Cebula B, Panczyk M. MDR1 (ABCB1) gene polymorphism C3435T is associated with P-glycoprotein activity in Bcell chronic lymphocytic leukemia. *Pharmacol Rep* 2006; 58: 720-728
105. Ilmer T, Schuler S, Thiede C, Schwarz U, Kim RB, Gotthard S. MDR1 gene polymorphisms affect therapy outcome in acute myeloid leukemia patients. *Cancer Res* 2002; 62: 4955-62
106. Calado RT, Falcão RP, Garcia AB, Gabellini SM, Zago MA, Franco RF. Influence of functional MDR1 gene polymorphisms on P-glycoprotein activity in CD34+ hematopoietic stem cells. *Haematologica* 2002; 87: 564-8

107. Lara PN Jr, Natale R, Crowley J, Lenz HJ, Redman MW, Carleton JE, et al. Phase III trial of irinotecan/cisplatin compared with etoposide/cisplatin in extensive-stage small-cell lung cancer: clinical and pharmacogenomic results from SWOG S0124. *J Clin Oncol* 2009; 27: 2530-2535.
108. Ashariati A. Polymorphism C3435T of the MDR-1 gene predict response to preoperative chemotherapy in locally advanced breast cancer with Her2/neu expression. *Acta Med Indones* 2008; 40: 187-191.
109. Kafka A, Sauer G, Jaeger C, Grundmann R, Kreienberg R, Zeillinger R, et al. Polymorphism C3435T of the MDR-1 gene predicts response to preoperative chemotherapy in locally advanced breast cancer. *Int J Oncol* 2003; 22: 1117-1121.
110. Rodrigues FF, Santos RE, Melo MB, Silva MA, Oliveira AL, Rozenowicz RL, et al. Correlation of polymorphism C3435T of the MDR-1 gene and the response of primary chemotherapy in women with locally advanced breast cancer. *Genet Mol Res* 2008; 7:177-183.
111. Jiko M, Yano I, Sato E, Takahashi K, Motohashi H, Masuda S, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of paclitaxel with carboplatin or gemcitabine, and effects of CYP3A5 and MDR1 polymorphisms in patients with urogenital cancers. *Int J Clin Oncol* 2007; 12: 284-290.
112. Jamroziak K, Balcerczak E, Cebula B, Kowalczyk M, Panczyk M, Janus A, et al. Multi-drug transporter MDR1 gene polymorphism and prognosis in adult acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacol Rep* 2005; 57: 882-888.
113. Efferth T, Sauerbrey A, Steinbach D, Gebhart E, Drexler HG, Miyachi H, et al. Analysis of single nucleotide polymorphism C3435T of the multidrug resistance gene MDR1 in acute lymphoblastic leukemia. *Int J Oncol* 2003; 23: 509-517.
114. Komoto C, Nakamura T, Sakaeda T, Kroetz DL, Yamada T, Omatsu H, et al. MDR1 haplotype frequencies in Japanese and Caucasian, and in Japanese patients with colorectal cancer and esophageal cancer. *Drug Metab Pharmacokinet* 2006;21:126-132.
115. Pechandová K, Buzková H, Slanar O, Perlík F. Polymorphisms of the MDR1 gene in the Czech population. *Folia Biol (Praha)* 2006; 52:184-189.

116. Gréen H, Söderkvist P, Rosenberg P, Mirghani RA, Rymark P, Lundqvist EA, et al. Pharmacogenetic studies of Paclitaxel in the treatment of ovarian cancer. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2009;104:130-7.
117. Gréen H, Söderkvist P, Rosenberg P, Horvath G, Peterson C. mdr-1 single nucleotide polymorphisms in ovarian cancer tissue: G2677T/A correlates with response to paclitaxel chemotherapy. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 854-859.
118. Pan JH, Han JX, Wu JM, Huang HN, Yu QZ, Sheng LJ. MDR1 single nucleotide polymorphism G2677T/A and haplotype are correlated with response to docetaxel-cisplatin chemotherapy in patients with non-small-cell lung cancer. *Respiration* 2009; 78: 49-55.
119. Chowbay B, Cumaraswamy S, Cheung YB, Zhou Q, Lee EJ. Genetic polymorphisms in MDR1 and CYP3A4 genes in Asians and the influence of MDR1 haplotypes on cyclosporin disposition in heart transplant recipients. *Pharmacogenetics* 2003; 13: 89-95.
120. Gümüş-Akay G, Rüstemoğlu A, Karadağ A, Sunguroğlu A. Genotype and allele frequencies of MDR1 gene C1236T polymorphism in a Turkish population. *Genet Mol Res* 2008; 7: 1193-1199.
121. Bosch TM, Huitema AD, Doodeman VD, Jansen R, Witteveen E, Smit WM, et al. Pharmacogenetic screening of CYP3A and ABCB1 in relation to population pharmacokinetics of docetaxel. *Clin Cancer Res* 2006;12: 5786-5793.
122. Schaich M, Kestel L, Pfirrmann M, Robel K, Illmer T, Kramer M, et al. A MDR1 (ABCB1) gene single nucleotide polymorphism predicts outcome of temozolomide treatment in glioblastoma patients. *Ann Oncol* 2009; 20:175-181.
123. Edge SB, Byrd DR, Compton CC, et al. Breast. *AJCC Cancer Staging Manual.* 2010; 347-376.
124. Gümüş-Akay G, Rüstemoğlu A, Karadağ A, Sunguroğlu A. Haplotype-based analysis of MDR1/ABCB1 gene polymorphisms in a Turkish population. *DNA Cell Biol* 2010; 29: 83-90.

125. Mayall F., Barratt K. Shanks J. The detection of Simian virus 40 in mesotheliomas from New Zealand and England using real time FRET probe PCR protocols. *Journal of Clinical Pathology* 2003; 56, 728-730.
126. Kim RB, Leake BF, Choo EF, Dresser GK, Kubba SV, Schwarz UI, et al. Identification of functionally variant MDR1 alleles among European Americans and African Americans. *Clin Pharmacol Ther* 2001; 70: 189-199.
127. Dulucq S, Bouchet S, Turcq B, Lippert E, Etienne G, Reiffers J, et al. Multidrug resistance gene (MDR1) polymorphisms are associated with major molecular responses to standard dose imatinib in chronic myeloid leukemia. *Blood* 2008;112:2024-2027.
128. Salama NN, Yang Z, Bui T, Ho RJ. MDR1 haplotypes significantly minimize intracellular uptake and transcellular P-gp substrate transport in recombinant LLC-PK1 cells. *J Pharm Sci.* 2006; 95: 2293-2308.