



**T.C.  
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**PLAZMA NÖTROFİL JELATİNAZ İLİŞKİLİ LİPOKALİN (NGAL),  
VİMENTİN VE FİBRONEKTİN (FN) DÜZEYLERİNİN MEME KANSERİNİN  
TANISI, KEMOTERAPİYE YANIT VE PROGNOZ İLE İLİŞKİSİNİN  
DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Dr. Yunus Emre USTAALIOĞLU**

**UZMANLIK TEZİ**

**BURSA – 2015**



**T.C.  
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**PLAZMA NÖTROFİL JELATİNAZ İLİŞKİLİ LİPOKALİN (NGAL),  
VİMENTİN VE FİBRONEKTİN (FN) DÜZEYLERİNİN MEME KANSERİNİN  
TANISI, KEMOTERAPİYE YANIT VE PROGNOZ İLE İLİŞKİSİNİN  
DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Dr. Yunus Emre USTAALIOĞLU**

**UZMANLIK TEZİ**

**Danışman: Prof. Dr. Engin ULUKAYA**

**BURSA – 2015**

## İÇİNDEKİLER

Özet.....	ii
İngilizce Özet.....	iv
Kısaltmalar.....	vi
Giriş.....	1
Gereç ve Yöntem.....	39
Bulgular.....	43
Tartışma ve Sonuç.....	58
Kaynaklar.....	65
Teşekkür.....	78
Özgeçmiş.....	79

## ÖZET

Meme kanseri, dünyada kadınlar arasında deri kanserlerinden sonra en sık görülen malign tümör olup, kadınlarda görülen tüm kanserlerin önemli bir kısmını oluşturmaktadır. Amerika Birleşik Devletleri'nde, kadınlarda kanser nedeniyle oluşan ölümler içerisinde akciğer kanserinden sonra ikinci sırada yer almaktadır. Tüm kanserlerde de olduğu gibi meme kanserinde de erken tanı, uygulanan tedavinin etkinliği ve hastanın survisi açısından çok önemlidir. Meme kanserinde kullanılan CA 15-3, CEA, CA 19-9, CA-125, CA-549 gibi tümör belirteçleri erken tanı ve tedaviye yanıtı öngörmeye yetersiz kalmaktadır. Bu sebeple araştırmacılar meme kanserinde kullanılacak yeni belirteçler üzerine çalışmalar yapmaktadırlar. Bu çalışmada plazma nötrofil jelatinaz ilişkili lipokalin (NGAL), vimentin ve fibronektin (FN) proteinlerinin meme kanseri tanısında, tedavi etkinliğinin değerlendirilmesinde ve prognozu öngörmeye kullanılabilirliğini araştırdık.

Çalışmada Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Onkoloji Bölümü polikliniklerine başvuran, neoadjuvan kemoterapi (KT) planlanan primer meme kanserli 21 kadın hasta ve kontrol grubu olarak ise 22 sağlıklı kadın olgu olmak üzere toplam 43 kadın olgu yer aldı. Plazma NGAL, vimentin ve FN proteinleri ELISA ile çalışıldı.

Yapılan inceleme sonucunda meme kanserli hastalarda plazma NGAL, vimentin ve FN düzeyleri kontrollere göre anlamlı yüksek saptandı ( $p<0.001$ ). Meme kanserli hastalarda KT sonrasında plazma NGAL, vimentin ve FN düzeylerinin KT öncesine göre anlamlı azaldığı saptandı ( $p<0.05$ ). Meme kanserli hastalarda plazma NGAL, vimentin ve FN düzeylerinin klasik prognostik belirteçlerle anlamlı ilişki göstermediği bulundu ( $p>0.05$ ). Ayrıca plazma NGAL, vimentin ve FN düzeyleri ile tedavi yanıt arasındaki ilişki değerlendirildiğinde, anlamlı bir ilişki olmadığı saptandı ( $p>0.05$ ).

Bu alışma sonucunda plazma NGAL, vimentin ve FN parametrelerinin kullanılmasının meme kanseri tanısında faydalı olabileceği, ancak tedaviye yanıtı öngörmede yetersiz olduğu görüşüne varıldı.

**Anahtar kelimeler:** Meme kanseri, Nötrofil Jelatinaz İlişkili Lipokalin (NGAL), Vimentin, Fibronektin (FN).

## SUMMARY

### **Assessment of Relation between Plasma Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL), Vimentin, Fibronectin (FN) Levels and Diagnosis of Breast Cancer, Response to CT and Prognosis**

Breast Cancer is the most common malignant tumor type among women after skin cancer and forms substantial part of all types of cancer, which are seen among women. In United States of America, it takes the second place after lung cancer among the causes of death due to cancer. As so for all types of cancer, early diagnosis is very important also for breast cancer with regard to the effectiveness of the applied treatment and survival of the patient. Tumor markers which are used for breast cancer like CA 15-3, CEA, CA 19-9, CA-125, CA-549 remain incapable for prediction of response to treatment and early diagnosis. Thus, researchers study on new markers, which can be used for breast cancer. In this study, we investigated the availability of neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL), vimentin and fibronectin (FN) for diagnosis of breast cancer, assessment of effectiveness of the treatment and prediction of prognosis.

In the presented study, 43 women in total were participated. 21 of them were primary breast cancer, for whom neoadjuvant chemotherapy (CT) was planned. The number of control cases were 22. Plasma NGAL, vimentin and FN proteins in plasma were measured by ELISA.

As a result, it was detected that plasma NGAL, vimentin and FN levels were significantly higher in breast cancer patients with respect to the control cases ( $p < 0.001$ ). It was also detected that plasma NGAL, vimentin and FN levels significantly decreased in breast cancer patients after CT ( $p < 0.05$ ). It was found that plasma NGAL, vimentin and FN levels did not possess any significant relationship with classical prognostic markers in breast cancer patients ( $p > 0.05$ ). We also checked if there was any

relationship between baseline plasma NGAL, vimentin, FN levels and the response of the treatment. There was no significant relationship ( $p>0.05$ ).

In conclusion, we suggest that the determination of plasma NGAL, vimentin and FN could be useful for the diagnosis of breast cancer, but their level might not be used for the prediction of therapeutic response.

**Keywords:** Breast Cancer, Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL), Vimentin, Fibronectin (FN).

## KISALTMALAR

- AJCC:** American Joint Committee On Cancer  
**AML:** Akut myeloid lösemi  
**ALL:** Akut lenfositik lösemi  
**Bcl-2:** B-cell lymphoma 2  
**BRCA-1:** Breast Cancer Resistance Protein 1  
**BRCA-2:** Breast Cancer Resistance Protein 2  
**CA 15-3:** Karbonhidrat Antijen 15-3  
**CA 19-9:** Karbonhidrat Antijen 19-9  
**CA-125:** Karbonhidrat Antijen-125  
**CA-549:** Karbonhidrat Antijen-549  
**CEA:** Karsino Embriyonik Antijen  
**COX-2:** Siklooksijenaz 2  
**CXCL-3:** Kemokin (C-X-C motif) ligand 3  
**DM:** Diabetes Mellitus  
**ECM:** Hücre dışı matriks  
**EAA:** Eğri altında kalan alan  
**ELISA:** Enzyme-linked immunosorbent assay  
**EMT:** Epitelyal mezenkimal dönüşüm  
**ER:** Östrojen reseptör  
**FN:** Fibronektin  
**HCC:** Hepatosellüler karsinom  
**Her-2/neu:** Human epidermal growth factor receptor 2  
**HRT:** Hormon replasman tedavisi  
**HT:** Hipertansiyon  
**IL:** İnterlökin  
**KML:** Kronik myeloid lösemi  
**KT:** Kemoterapi



**LDH:** Laktat Dehidrogenaz  
**LHRH:** Lüteinizan hormon salgılatıcı hormon  
**LN:** Lenf nodu  
**MM:** Malign melanom  
**MMP-9:** Matriks metallopeptidaz 9  
**NGAL:** Nötrofil Jelatinaz ilişkili Lipokalin  
**NF-kB:** Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells  
**OKS:** Oral Kontraseptif  
**PAK:** p21-aktive edilmiş kinaz  
**PLT:** Trombosit sayısı  
**PP2A:** Protein fosfataz 2A  
**PR:** Progesteron reseptör  
**RT:** Radyoterapi  
**SERM:** Selektif östrojen reseptör modülatörleri  
**TGF- $\beta$ :** Transforming growth factor beta  
**TLR-2:** Toll-like receptor 2  
**TNF-a:** Tümör nekroz faktör alfa  
**TNM:** Tümör-nod-metastaz  
**UICC:** Union International Contre Cancere  
**WHO:** Dünya Sağlık Örgütü

# GİRİŞ

## Meme Kanseri

Meme kanseri, deri kanserleri hariç tutulursa dünyada kadınlar arasında en sık görülen malign tümör olup, kadınlarda görülen tüm kanserlerin yaklaşık %30'unu oluşturmaktadır (1). Kadınlarda yaşam boyu meme kanseri gelişme riski 1/12 ile 1/20 arasında değişmektedir (2).

Amerika Birleşik Devletleri'nde, kadınlarda kanser nedeniyle oluşan ölümler içerisinde akciğer kanserinden sonra ikinci sırada yer almaktadır (3). Meme kanserindeki ölüm oranları 1990'lardan itibaren erken tanı ve tedavideki gelişmelere bağlı olarak azalma göstermektedir (3).

Türkiye'de 2005 yılı kanser verilerine göre meme kanseri 4. sırada yer alırken, kadınlarda 1. sırada gelmektedir ve insidansı 35-47/100.000'dir (4). Meme kanseri görülme sıklığı, 30 yaşından itibaren artmaya başlar ve 45-55 yaşları arasında menapoza bağlı bir azalma gösterir, ancak 55 yaşından sonra insidansı hızla yükselmektedir (4).

Meme kanserinde erken tanı, uygulanan tedavinin etkinliği ve hastanın survisi açısından çok önemlidir. Meme kanseri tanısındaki gelişmelere ve moleküler temelinin anlaşılması olmasına rağmen erken evre meme kanserli olguların % 30'unda rekürrens görülmektedir (5).

## Meme Kanserinde Etyoloji

### A. Endokrin Etkenler

#### a) Üreme ile İlgili Etkenler

Erken menstruasyon yaşı, meme dokusunun östrojene maruz kalma süresini uzatır. Bu nedenden dolayı erken menarşın meme kanseri riskini arttırdığına inanılmaktadır (6). Menstruasyon yaşı ile ilk doğum yapma yaşı arasındaki sürenin uzamasının, meme kanseri riski ile doğru orantılı olduğu bulunmuştur. Uzun süreli laktasyonların, ovulatuvar dönem sayısını azaltarak

koruyucu etki yaptığı düşünülmektedir (7).

Doğurmamış ya da evlenmemiş kadınlarda meme kanseri görülme olasılığı daha fazladır (8). İlk doğumunu 35 yaşından sonra yapmış olmak ve geç menopoz da meme kanseri görülme olasılığını arttırmaktadır (8). Gebelik ve laktasyon sırasındaki hormonal değişikliklerin koruyucu etkisi olduğu düşünülmektedir (9). Hormon replasman tedavisi özellikle lobüler ve tübüler meme kanserlerinde risk artışına neden olmaktadır (10).

### **b) Hormonal Etkenler**

Oral kontraseptif (OKS) kullanım süresi ile meme kanseri risk artışı arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır (11). Ancak 45 yaş altı kadınlarda yapılan bir çalışmada, uzun süreli OKS kullanımının meme kanseri riskinde anlamlı artışa neden olduğu gösterilmiştir (12).

### **c) Genetik Etkenler**

Meme kanseri vakalarının çoğunluğu sporadik olmasına rağmen %5-10 oranında kalıtsal nedenli ailesel meme kanserleri ortaya çıkmaktadır (13). Meme kanseri olan anne, kız ve kız kardeşler arasında meme kanseri görülme olasılığı normal popülasyondan iki kat fazla bulunmuştur. Aile hikayesi olanlarda meme kanseri ortaya çıkış yaşı daha erkendir ve bilateral olma eğilimindedir (14).

Son yıllarda ailevi meme kanseri ile ilgili olduğu düşünülen BRCA-1 ve BRCA-2 genleri izole edilmiştir (15,16). Mutasyonlu BRCA-1 geni olanların ailevi over ve meme kanseri açısından çok riskli oldukları bulunmuştur (13). Mutasyonlu BRCA-2 geni olanların ise daha erken yaşta ve bilateral meme kanseri olma riskleri oldukça yüksek bulunmuştur (13).

Meme kanseri öyküsü olan bir kadında yaşam boyu ikinci meme kanseri oluşma riski %25-30'dur. Ayrıca meme koruyucu cerrahi sonrası geride kalan meme dokusu risk altındadır. Ancak bu risk karşı memede kanser oluşma riski kadardır ve her yıl için %0.5-1'dir (17).

### **B. Diyet**

Genel eğilim yağdan zengin beslenmenin meme kanseri riskini arttırdığı yönündedir (18). Birçok hayvan modelinde gösterildiği gibi diyetteki hayvansal yağların %10'dan fazla olması meme kanseri riskini arttırdığı,

buna karşın diyetteki yağın %5'in altında olması ve yağ içermeyen diyetle beslenme tümörün büyümesini inhibe ettiği gösterilmiştir (19). Liften zengin gıdalar ile beslenmenin bağırsaktan östrojen absorpsiyonunu engelleyerek meme kanseri oluşumu engellediği düşünülmektedir (20). Alkol kullanımının da meme kanseri riskini arttırdığı saptanmıştır (21).

### **C. Sosyoekonomik Durum**

Sosyoekonomik durumu düşük olan kişi ya da toplumlarda meme kanseri görülme oranı daha az iken, yüksek olan kesimlerde ise meme kanseri oranları daha fazladır. Bunun nedenleri arasında düşük doğum oranları, emzirmeme, aşırı yağ ve alkol tüketimi gösterilebilir (21).

### **D. Radyasyon**

Meme kanseri etyolojisinde saptanan önemli nedenlerden biri de radyasyona maruz kalmadır. Radyasyona bağlı meme kanseri gelişimi radyasyona maruz kalma süresi ile ilişkilidir ve uzun sürede gelişir (22).

## **Meme Kanseri Risk Faktörleri**

**A- Yüksek Risk Faktörleri** (4 kat ya da daha fazla risk artışına yol açarlar)

**a. Cinsiyet:** Kadın cinsiyet

**b. Yaş:** Meme kanseri riski yaşla birlikte artmaktadır. Meme kanseri olguların çoğunda kanser 50 yaşından sonra ortaya çıkmaktadır. Ancak ailesel meme kanseri öyküsü olanlarda, daha erken yaşlarda meme kanseri oluşabilmektedir (23).

**c. Meme Kanseri için BRCA-1 ve/veya BRCA-2 gibi Genetik Mutasyona Sahip Olma** (3).

**d. Ailede Meme Kanseri Öyküsü Olması:** Ailede meme kanseri hikayesi olması meme kanseri için önemli bir risk faktörüdür. Birinci derece akrabalarda (anne, kız kardeş, kızı) meme kanseri olanlarda bu risk daha yüksektir (24). Ailedeki meme kanserli hasta sayısı artınca bu risk artar. Meme kanserli hastaların anneleri normal populasyona oranla 2 kat, kız kardeşleri ise 2.5 kat meme kanseri gelişme riskine sahiptir. Kanserin

bilateral olması meme kanseri riskini 5 kat artırır. Premenopozal bilateral kanseri olan bir hastanın yakınlarında risk artışı 9 kattır. Anne ve kız kardeşinde meme kanseri bulunan bir genç kadında yaşam boyu meme kanseri gelişme riski % 50'dir (25).

**e. Daha Önce Bir Memede Kanser Öyküsü Olması:** Meme kanseri tanısı olan hastalarda diğer taraf için meme kanseri gelişme riski her yıl için % 0.5-1'dir. Bu risk meme kanseri tanısı konulduğu yaşa göre değişir (17).

**f. Atipi ile Birlikte Hiperplazi:** Benign meme hastalıklarının birçoğu meme kanseri için risk faktörü oluşturmaz. Ancak memenin benign bir hastalığı olan atipik hiperplazili meme hastalığı olanlarda risk 5 kat artmaktadır. Aynı zamanda ailesel meme kanseri öyküsü varsa risk 11 katlara kadar çıkmaktadır (22).

**g. Parite:** Nulliparite ve ilk doğumu geç yaşta yapmak meme kanseri riskini artırırken erken yaşta doğumla sonlanmış gebelik meme kanseri riskini %10 azaltmaktadır. İlk doğumunu 30 yaşından sonra yapan kadınlar 20 yaş öncesinde ilk doğumunu yapan kadınlara göre 2 kat fazla kanser riskine sahiptir. Ancak 35 yaş sonrasındaki hamileliklerdeki risk nullipar kadınlara göre daha fazladır (26).

**h. Lobuler Karsinoma İn Situ:** İnvazif kanser için %30 oranında risk taşımaktadır.

**B- Orta ve Düşük Derecede Risk Faktörleri (1-4 kat risk artışına yol açar)**

**a. Menstruasyon Öyküsü:** Erken menarş (<12 yaş) ve geç menopoz (>55 yaş), kadınların hormonlara maruz kalma süresini arttırdığı için meme kanseri riskini arttırmaktadır. Menarşın geciktiği her yıl meme kanseri riski %20 azalmaktadır. Menopaza 55 yaşından sonra kadınlarda meme kanserine yakalanma riski, 45 yaşından sonra menopoza girenlerin iki katı kadardır (27).

**b. Uzun Süreli OKS Kullanımı ve Hormon Replasman Tedavisi (HRT):** Menopozdaki HRT'nin riski kullanım süresi, seçilen ilaçlar ve hastanın özelliklerine bağlı olarak değişmektedir. Östrojenin tek başına ve aralıklı kullanımı riski arttırmamaktadır. Uzun süreli östrojen kullanımı (>5 yıldan

fazla) ve östrojenin progesterinle kullanımıyla ise meme kanseri oluşma riski artmaktadır (11).

**c. Over, Uterus yada Kolon Kanseri Öyküsü**

**d. Diabetes Mellitus**

**e. Alkol alımı:** Çalışmalarda alkol alımının meme kanseri riskini arttırdığı saptanmıştır. Günde 15 gr veya daha fazla alkol tüketimi içmeyenlere göre riski %50 arttırır (28).

**f. Obezite:** Obezite postmenopozal hastalarda riski iki kat artırmaya karşın premenopozal kadınlarda obezitenin koruyucu etkisi olduğu düşünülmektedir (29).

**C- Risk Faktörü Olmayanlar**

**a. Benign Meme Lezyonları (30)**

**b. Diyet:** Kahve, çay ve diğer kafeinli içecekler, meyve ve sebzelerin meme kanseri üzerinde risk oluşturmadığı saptanmıştır (31,32).

**c. İlaçlar:** Antibiyotikler, aspirin ve nonsteroid antiinflatuarların tutarlı bir etkisi saptanmamıştır (33,34).

**d. Abortus (35)**

**D- Riski azaltan faktörler**

**a. Asya ırkı**

**b. Erken menapoz, 14 yaş sonrası menarş (36)**

**c. Gebeliğin 20 yaş öncesinde olması (37)**

**d. Artan parite (36)**

**e. Emzirme (38)**

**f. Fiziksel aktivite (39)**

**g. Selektif östrojen reseptör modülatörü kullanımı (40)**

**Meme Kanserlerinin Histolojik Sınıflandırılması**

Meme kanserleri esas olarak adenokarsinomdur ve genellikle meme üst dış kadrından gelişir. Meme kanserlerinin çoğunluğu meme kanallarını döşeyen epitel örtüsünden (duktal kanserler) ve lobüllerin terminal kanallarının epitel hücrelerinden (lobüler kanserler) kaynaklanırlar. Dünya

Sağlık Örgütü (WHO) Meme Tümörleri Histopatolojik Sınıflaması'nın son versiyonunda, yirminin üzerinde meme karsinomu histopatolojik tipi tanımlanmaktadır. Kanser hücreleri, çevresindeki bazal hücreleri aştığında invazif, aşmadığında ise in situ olarak isimlendirilirler. İnvazif duktal karsinomun en fazla görülen meme kanseri tipi olduğu ve tüm vakaların %75'ini oluşturduğu bildirilmiştir (41). Histopatolojik sınıflamada, tümör hücrelerinin sitolojik özelliklerinin yanı sıra oluşturdukları yapısal farklılıklar da göz önüne alınmaktadır (42). Meme kanserinin WHO'ya göre histolojik olarak sınıflandırılması aşağıda görülmektedir.

1. İn situ karsinom
  - İn situ duktal karsinom
  - İn situ lobüler karsinom
2. İnvaziv karsinom
  - İnvaziv duktal karsinom
  - İnvaziv lobüler karsinom
  - Tübüler karsinom
  - İnvaziv kribriform karsinom
  - Medüller karsinom
  - Müsinöz karsinom
  - İnvaziv papiller karsinom
  - İnvaziv mikropapiller karsinom
  - Apokrin karsinom
  - Sekretuar (juvenil) karsinom
  - Adenoid kistik karsinom
  - Metaplastik karsinom
  - Nöroendokrin karsinom
  - İnflamatuar karsinom olarak sınıflandırılmıştır (42).

### **Meme Kanserlerinin Evrelendirilmesi**

Meme kanserli hastalar, hastaneye başvurduklarında kanserin yayılımı bakımından farklılıklar gösterirler. Evreleme, hastaları hastalıklarının

yayılma derecesine göre gruplara ayırma işlemidir. Sağkalım süresi, tanı konulduğunda hastalığın evresi ile ilişkilidir. Evreleme ile ayrıca hastaya uygulanacak tedavi protokolü de belirlenir. Günümüzde hemen her yerde Union International Contre Cancere (UICC) ve American Joint Committee On Cancer (AJCC)'lerinin biçimlendirdiği tümör-nod-metastaz (TNM) evreleme sistemi kullanılmaktadır (Tablo-1,2) (43,44).



**Tablo-1: TNM Sınıflandırılması (43)**

<b>Primer Tümör (T)</b>	
<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>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> Pektoral kasa ulaşmamış göğüs duvarı yayılımı <b>T4b</b> Meme cildinde ödem, ülserasyon veya aynı memede satellit deri nodülleri <b>T4c</b> T4a ve T4b birlikte
<b>Bölgesel Lenf Nodülleri (N)</b>	
<b>N0</b>	Bölgesel LN metastazı yok
<b>N1</b>	İpsilateral LN'larında metastaz (fikse değil)
<b>N2</b>	Fikse veya gruplaşmış ipsilateral aksiller LN'larında metastaz veya klinik olarak belirgin aksiller LN metastazı olmadığı durumlarda klinik olarak belirgin ipsilateral internal mammaryal nodlarında metastaz <b>N2a</b> Birbirlerine veya çevre dokulara fikse ipsilateral aksiller LN'larında metastaz <b>N2b</b> Sadece klinik olarak aksiller LN metastazı olmadığında klinik olarak belirgin ipsilateral internal mammaryal nodlarda metastaz
<b>N3</b>	İpsilateral infraklavikular LN'ları metastazı veya klinik olarak belirgin ipsilateral internal mammaryal LN'ları metastazı ile birlikte klinik olarak belirgin aksiller LN metastazı; veya ipsilateral supraklavikular LN'ları metastazı <b>N3a</b> İpsilateral infraklavikular LN'larında metastaz <b>N3b</b> İpsilateral internal mammaryal lenf nodlarında veya aksiller LN'larında metastaz <b>N3c</b> İpsilateral supraklaviküler LN'larında metastaz
<b>Uzak Metastaz (M)</b>	
<b>M0</b>	Uzak metastaz yok
<b>M1</b>	Uzak metastaz var

**Tablo-2:** Yukarıdaki Parametrelere Göre Evreleme (44)

<b>Evre</b>	<b>Tümör</b>	<b>Nod</b>	<b>Metastaz</b>
Evre 0	Tis	N0	M0
Evre I	T1	N0	M0
Evre IIA	T0	N1	M0
	T1	N1	M0
	T2	N0	M0
Evre IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
Evre IIIA	T0	N2	M0
	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1	M0
	T3	N2	M0
Evre IIIB	T4	N0	M0
	T4	N1	M0
	T4	N2	M0
Evre IIIC	Herhangi bir T	N3	M0
Evre IV	Herhangi bir T	Herhangi bir N	M1

### **Meme Kanserindeki Prognostik Faktörler**

Meme kanserli hastaya en uygun tedavinin seçiminde hastanın prognostik risk faktörlerinin belirlenmesi çok önemlidir. Prognostik faktör terimi, kanserde tanı anında var olan, tedavi yapılmadığı durumda hastalısız sağkalım ve genel sağkalımla ilgili her türlü ölçümü ifade etmede ve kanserin doğal seyirini tahmin etmek için kullanılmaktadır. Meme kanserindeki prognostik faktörler; tümöre ait, hastaya ait ve tedaviye ait olmak üzere üç ana başlıkta toplanabilir (Tablo-3) (45). Lenf nodlarının (LN) durumu, tümör

çapı, histolojik tip ve histolojik derece meme karsinomları için bilinen en önemli prognostik parametrelerdir (42).

**Tablo-3:** Meme kanserindeki prognostik faktörler (45)

<b>Tümöre ait</b>	<b>Hastaya ait</b>	<b>Tedaviye ait</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Lenf nodu tutulumu</li><li>• Tümör büyüklüğü</li><li>• Histolojik grade</li><li>• Histolojik tip</li><li>• Metastaz durumu</li><li>• Lenfovasküler invazyon</li><li>• ER ve PR durumu</li><li>• Her-2/neu</li><li>• P53</li><li>• Bcl-2</li><li>• BRCA-1, BRCA-2</li><li>• Proliferasyon belirteçleri</li><li>• E-Kaderin</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Yaş</li><li>• Menopozal durum</li><li>• İrk</li><li>• Kilo</li><li>• Eşlik eden hastalıklar</li><li>• Tedavi tercihi</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Zamanlama</li><li>• Süre</li><li>• Kullanılan ilaçlar</li><li>• Cerrahi tedavi şekli</li></ul>

**ER:** Östrojen Reseptörü **PR:** Progesteron Reseptörü

**Lenf Nodu Tutulumu:** Meme kanseri için en önemli prognostik faktördür. Meme kanseri hastalarında sıklıkla aksiller LN tutulumu erken evrelerden itibaren görülebilmektedir ve sağkalım ile yakından ilişkili olduğu bulunmuştur. Aksiller LN negatif hastalarda 10 yıllık sağkalım %70 iken, nod pozitif hastalarda bu oran %25-30'lara düşmektedir. Metastatik LN'larının yeri, sayısı ve büyüklüğü, perinodal yağ dokusuna invazyon durumu da prognoz açısından belirleyicidir (8).

**Tümör Boyutu:** Lenf nodu tutulumu ve metastaz olmayan hastalar için en önemli prognoz belirleyicisi tümör boyutudur (46). Tümör çapı arttıkça

LN tutulumu da artmakta ve sağkalım oranları düşmektedir.

**Histolojik Grade:** Meme kanserinde histolojik tipe bakılmaksızın tüm karsinomların derecelendirilmesi önerilmektedir. Bu derecelendirmede en çok kullanılanı Bloom-Richardson sistemidir. Bu derecelendirme sisteminde tümör hücrelerinin nükleer özellikleri, oluşturdukları tubulus yapılarının oranı ve mitoz sayısı ayrı ayrı skorlanarak, oluşan toplam skora göre grade 1 (düşük), grade 2 (orta) ve grade 3 (yüksek) olmak üzere dereceler belirlenir. Düşük gradeli tümörler (grade 1), orta ve yüksek gradelilere (grade 2,3) göre daha iyi prognoz gösterirler.

**Histolojik Tip:** Tübüler, invazif kribriform ve sekretuar karsinomların prognozu iyidir. İnvazif lobuler karsinom, duktal karsinoma göre daha iyi prognozludur. Metaplastik, mikropapiller ve inflamatuvar karsinomların prognozu kötüdür. Medüller karsinomun prognozu tartışmalı olmakla birlikte, duktal karsinoma göre daha iyi seyirli olduğu kabul edilmektedir (47).

**Lenfovasküler İnvazyon:** Tümör çevresindeki kan ve lenf damarlarının lümeninde tümör hücrelerinin bulunması LN'larına metastaz olasılığını artırır. Lenfovasküler invazyonun özellikle LN pozitifliği ile birlikte olması prognozu kötüleştirir ve rekürrens olasılığını artırır.

**Hormon Reseptör (ER ve PR) Durumu:** Meme kanserlerinin önemli bir bölümünde östrojen ve progesteron reseptörleri (ER ve PR) negatiftir ve hormon reseptörlerinin negatif olması hastalarda kötü prognoza işaret etmektedir (48). İyi diferansiye meme kanserlerinde reseptör seviyeleri daha yüksektir. Ayrıca ER (+) ve PR (+) meme kanserli hastaların surveyleri daha uzundur (49).

**HER-2/neu:** Epidermal growth faktör reseptör ailesinin üyesi olan bir protoonkogendir. Artan ekspresyonu bazı agresif meme kanserlerinin gelişimi ve progresyonunda önemli rol oynadığı gösterilmiştir ve kötü prognostik belirteç olarak kabul edilmektedir (50).

**P53:** Hücre döngüsünü düzenleyen ve en önemli tümör suprese eden genlerden biridir. Meme kanserlerinin %50'sinde bu genin mutasyona uğradığı saptanmıştır. Yüksek histolojik grade ve kötü prognoz ile ilişkili olduğu belirtilmiştir (21).

**Bcl-2:** Bu genin pozitif olduğu hastalarda sıklıkla tamoksifen direnci geliştiği görülmüştür. Bu sebeple tamoksifen direnç belirteci olarak da bilinmektedir. Hastalarda sıklıkla ER de pozitifdir ve bu hastaların sağkalım sürelerinin daha uzun olduğu görülmüştür.

**Proliferasyon Belirteçleri:** Tümörlerin proliferatif kapasitesi de prognoz açısından önemli kabul edilmektedir. Bu kapasite; S fazındaki hücre oranı, timidin labeling indeks, mitotik indeks, immünohistokimyasal proliferasyon işaretleyicileri (Siklin A, Ki-67) ve DNA'daki ploid tayini gibi yöntemlerle belirlenir. Bu faktörler ne kadar yüksekse prognoz da o kadar kötüdür. Son yıllarda özellikle Ki-67 skoru kullanılmaya başlanmıştır. Bu skorlamanın; tümör büyüklüğü, histolojik derece, vasküler invazyon ve aksiller lenf nodu tutulumu ile doğrudan ilişkili olduğu bilinmektedir (51).

**E-Kaderin:** E-Kaderin hücrenin hareketlilik özelliğinin baskılanmasına neden olur. E-Kaderin ekspresyonu azalan epitel hücrelerinde diferansiyasyonun azaldığı ve göç kabiliyetlerinin arttığı belirlenmiştir. Meme kanserlerinde, E-Kaderin ekspresyon kaybı veya sitoplazmik parçasının fosforilasyonundaki bozukluk nedeniyle epitel hücreleri hareketlilik kazanır ve lokal yayılımda artış gözlenir. E-Kaderin eksikliği invazif fenotipin ortaya çıkmasından sorumludur ve duktal karsinomlarda kötü prognoza yol açmaktadır (52).

**Yaş:** Meme kanseri tanısının konulduğu yaş prognoz açısından önemlidir. Otuz beş yaş altındaki hastalarda nüks riski menopoza sonrasındaki kadınlara göre daha fazladır. Ayrıca genç hastalardaki meme kanserleri daha yüksek gradelidir ve daha agresif seyredebilir.

## **Meme Kanseri Tedavisi**

Meme kanserinde hastalara cerrahi, radyoterapi (RT), kemoterapi (KT), hormonal tedavi ve hedefe yönelik tedaviler uygulanmaktadır.

### **Cerrahi**

Meme kanserlerinde hasta erken evrede yakalanırsa uygulanan tedavi şekli cerrahi rezeksiyondur. Sıklıkla uygulanan cerrahi yöntem

modifiye radikal mastektomi ve aksiller LN disseksiyonudur. Son yıllarda meme koruyucu cerrahi (lumpektomi, segmental mastektomi ya da parsiyel mastektomi) önem kazanmaya başlamıştır. Yapılan bir çalışmada survey açısından radikal mastektomi ile meme koruyucu cerrahi ve RT uygulanan hastalarda anlamlı bir farklılık olmadığı görülmüştür (53). İleri evre meme kanserli hastalarda palyatif tedavi seçenekleri düşünülmektedir. Soliter organ metastazlarında günümüzde metastazektomi seçeneği kullanılmaya başlanmıştır (54).

### **Kemoterapi (KT)**

Meme kanserli hastalara cerrahi sonrasında adjuvan olarak veya cerrahi öncesinde tümör yükünü azaltmak için neoadjuvan olarak farklı KT rejimleri uygulanmaktadır. Meme kanserinin antrasiklinler (epirubisin, doksorubisin), taksanlar (dozetakso), antimetabolitler (5-Florourasil) ve alkilleyici ajanlar (siklofosfamid) gibi çeşitli kemoterapatlere cevap verdiği bildirilmiştir (55).

Meme kanserinde en etkili KT rejimi antrasiklinleri içeren rejimdir. Kombine tedaviler ile tek ajanlı tedaviler karşılaştırıldığında kombine uygulamaların daha uzun bir hastalısız sağkalım ve survey sağladığı bulunmuştur. Ancak kombinasyon rejimlerinin tekli uygulamalara göre daha toksik olduğu bildirilmiştir (56).

### **Radyoterapi (RT)**

Cerrahiden sonra memede, göğüs duvarında veya aksilla bölgesinde kalan kanser hücrelerini ortadan kaldırmak için RT kullanılabileceği gibi, daha az sıklıkla cerrahi öncesinde tümörü küçültmek için de uygulanabilir. Radyoterapi uygulamasına cerrahi tedaviden yaklaşık bir ay sonra başlanılarak, 6 veya 7 hafta boyunca haftanın 5 günü boyunca devam edilir (57).

### **Hormonal Tedavi**

Meme kanserinde cerrahi ve KT sonrasında eğer östrojen ve/veya progesteron reseptörü pozitifse adjuvan olarak hormonoterapi uygulanmaktadır. Hormonoterapide selektif östrojen reseptör modülatörleri (SERM; tamoksifen), lüteinizan hormon salgılatıcı hormon (LHRH) analogları,

aromataz inhibitörleri tercih edilen ajanlardır.

### **Hedefe Yönelik Tedaviler**

Meme kanserinde özellikle ileri evre metastatik hasta gruplarında tercih edilirler. HER-2 proteinine yönelik transtuzumab, tirozin kinaz inhibitörü olan lapatinib, m-Tor inhibitörü olan everolimus; KT ve hormonoterapiye adjuvan olarak son yıllarda kullanılmaya başlanmıştır.

### **Meme Kanserinde Kullanılan Tümör Belirteçleri**

Tümör belirteçleri kanda veya vücut sıvılarında tümörle ilişkili olarak oluşan veya tümör hücreleri tarafından üretilen maddelerdir. Tümör belirteçleri tanı koymaya yardımcı, kanserin yaygınlığını anlamada, uygulanacak tedavi şeklinin belirlenmesinde, tedaviye yanıtı anlamada ve nüksün saptanmasında kullanılmaktadırlar. Meme kanserinde en sık kullanılan tümör belirteçleri: CA 15-3, CEA, CA 19-9, CA-125, CA-549'dur (58-62).

#### **Karbonhidrat Antijen 15-3 (CA 15-3)**

Meme dokusundaki epitel hücreleri tarafından üretilen glikoprotein yapısında yüksek molekül ağırlıklı bir antijendir. Meme kanserinin yayılımını saptamak için en sık kullanılan belirteçtir. Organa veya tümöre spesifik değildir ve meme kanserindeki sensitivitesi %77'dir. Diğer tümör belirteçleriyle birlikte kullanımı ile sensitivitesi artmaktadır. Tedaviye yanıtı değerlendirmede tek başına kullanımı önerilmemektedir, ancak tedaviye rağmen devam eden yüksek seviyeleri tedavinin yetersiz olduğunu göstermektedir (58).

#### **Karsino Embriyonik Antijen (CEA)**

Karsino embriyonik antijen, glikoprotein yapıda olan onkofetal tümör belirteçidir. Serumda artan seviyeleri malignite işareti olabilir. Temel olarak kolorektal karsinomlarda kullanılsa da, meme, akciğer, pankreas, mide ve karaciğer gibi organların malignitelerinde de kullanılmaktadır. Erken evre meme kanserindeki sensitivitesi düşük olmakla beraber, özellikle metastatik meme kanserlerinde takipte kullanılması önerilmektedir (59).

### **Karbonhidrat Antijen 19-9 (CA 19-9)**

Karbonhidrat antijen 19-9, özellikle pankreas kanserinde kullanılan bir tümör belirteçidir. Pankreas kanserinden başka safra yolları, mide, kolon, uterus ve meme kanserlerinde de serum seviyelerinin arttığı saptanmıştır (60).

### **Karbonhidrat Antijen-125 (CA-125)**

Müsin 16 olarak da bilinen CA-125, glikoprotein müsin ailesinin bir üyesidir. Özellikle over kanserli hastaların takibinde kullanılmaktadır. Birçok benign hastalıkta da seviyesi artan CA-125'in özellikle ileri evre meme kanserli hastalarda da arttığı ve kötü prognozla ilişkili olduğu bildirilmiştir (61).

### **Karbonhidrat Antijen-549 (CA-549)**

Normal meme ve epitelyal dokularda da bulunabilen bir glikoproteindir. Meme, akciğer ve kolon kanseri gibi malignitelere artan serum seviyeleri bildirilmiştir (62).

### **Laktat Dehidrogenaz (LDH)**

Laktat dehidrogenaz, tümör başlangıcında ve metabolizmasında görev alan bir enzimdir. Karaciğer, meme, mide, akciğer ve kolon kanserlerinde LDH-5 izoenziminin arttığı saptanmıştır. Tümör yükünü göstermesi açısından birçok kanserde tedavi takibinde ve prognoz belirleyicisi olarak LDH ekspresyonu kullanılmaktadır (63).

Meme kanserinde kullanılan CA15-3, CEA, CA 19-9, CA-125, CA-549 gibi tümör belirteçleri erken tanı ve tedaviye yanıtı öngörmede yetersiz kalmaktadır. Araştırmacılar tarafından, meme kanserinde kullanılabilecek yeni belirteçler bulma arayışı devam etmektedir. Bizim çalışmamızda bu belirteçlerden nötrofil jelatinaz ilişkili lipokalin (NGAL), fibronektin (FN) ve vimentin proteinleri araştırılmıştır.

### **Nötrofil Jelatinaz İlişkili Lipokalin (NGAL)**

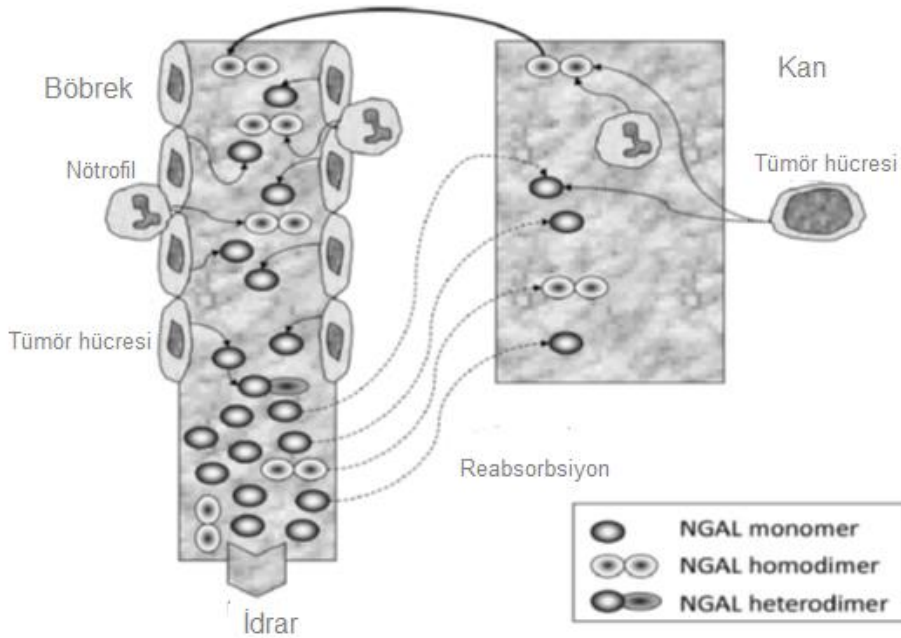
Nötrofil jelatinaz ilişkili lipokalin (NGAL), lipokalin protein ailesinin bir üyesidir. Bu grubun üyeleri, küçük ve hidrofobik molekülleri bağlama özelliği olan ve hücre homeostazında rol oynayan ekstraselüler proteinlerdir (64).



Doktor Roland Strong lipokalin ailesini, hücrelerin bazı molekülleri bağlayıp tekrar getirmesi için gönderdiği aracı proteinler olarak tanımlamıştır (65). Lipokalin ailesinin başlıca üyeleri arasında; NGAL, retinol bağlayıcı protein, retinoik asit bağlayıcı protein, alfa 2 globulin, beta laktoglobulin, apolipoprotein D, prostoglandin D sentaz yer almaktadır (66).

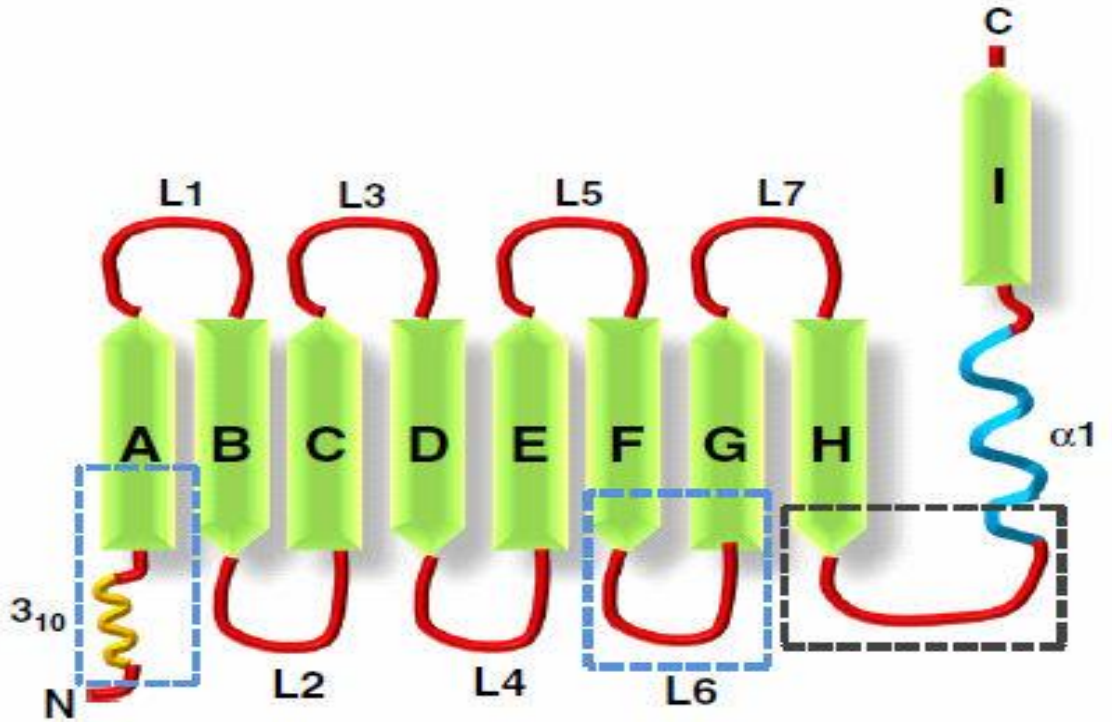
### **Nötrofil Jelatinaz İlişkili Lipokalin (NGAL) Sentezi ve Yapısı**

Nötrofil jelatinaz ilişkili lipokalin 178 amino asitten oluşan, 22 kDa ağırlığında, glikasyondan sonra 25 kDa ağırlığına ulaşan bir proteindir (66). Kodlanması 9q34.11 kromozom lokusunda yer alan bir gen tarafından olur. Bu gen en az beş fonksiyonel transkript üreten yedi ekzon içermektedir. Üç farklı moleküler formu vardır. Bunlar 22 kDa ağırlığında olan monomerik, 45 kDa ağırlığında olan homodimer (iki NGAL monomerinin dimerizasyonu), 135 kDa ağırlığında olan heterodimer (monomer ile 92kDa ağırlığındaki diğer ismi geletinaz B olan matriks metallopeptidaz 9 ile birleşimi) formdur (67,68). Monomerik form tübüler hücrelerden sentezlenirken (bir kısmı nötrofiller), homodimer form nötrofillerden sentezlenir. Heterodimer formun bir kısmı da böbreklerden sentezlenir (şekil-1) (69).



**Şekil-1:** NGAL'in biyolojisi ve tübüler hasar ile ilişkisi (69)

Yapı olarak NGAL, 8 beta halkasının, namlu eklinde kıvrılarak oluşturduğu kaliks yapısından oluşmaktadır. İnsan NGAL protein dizisinin biyoinformatik analizinde ortaya çıkan iki ana özellik; 20-aa N-ucu sinyal peptit içermesi ve molekülün çoğunluğunu oluşturan bir lipokalin etki alanı (aa 48-193) içermesidir. Lipokalin etki alanı, lipokalin ailesinin karakteristik bir özelliği olan küçük lipofilik ligandları (retinoidler, steroidler ve demir) bağlayan ve taşıyan ligand bağlayıcı bölge içermektedir (70). Lipokalin ailesinin karakteristiği olan “lipokalin fold”u antiparalel dizimli 8 beta sarmalını izleyen N-terminal 3-10 heliks oluşturmaktadır. Bir C terminal beta tabakasının bağlı bulunduğu  $\alpha$ -1 sarmalı 8. beta tabakasına bağlanır. Beta tabakaları döngüler (L1-L7) ile birbirine bağlanır ve L1, L3, L5 ve L7 döngüleri molekülün açık olan ucunu oluşturur (ligandın bağlanma yeri) (şekil-2) (70).



Şekil-2: “Lipokalin fold” şematik görünümü (70)

İlk olarak NGAL proteini simian virüs-40 ile enfekte primer fare böbrek hücrelerinde 24p3 lokalizasyonunda tespit edilmiştir (71). Daha sonra insandaki homolog proteini nötrofillerin spesifik granüllerinde de bulunmuştur (72). İnsan nötrofil jelatinazına kovalent bağlanması ile keşfedildiği için, NGAL adını almıştır. Lipokalin 2, siderokalin, onkogen protein 24p33, uterokalin, alfa-2 mikroglobulin ilişkili protein, NGAL'in sinonim isimleridir (73).

Nötrofil jelatinaz ilişkili lipokalin, nötrofillerde tip 4 kollajenaz (matrix metalloproteinaz) ile kovalent bağlı olarak bulunmaktadır. Bu sayede degradasyondan korunduğu düşünülmektedir (64). Bu protein proteazlara karşı dirençlidir, parçalandığında N-asetil-glukozaminidaz ve beta 2-mikroglobuline metabolize olur. Fizyolojik şartlarda, diğer küçük moleküller gibi lipokalinler de glomerüllerden filtre olmakta, tamamına yakını proksimal tübüldeki fırçamsı kenarda eksprese olan megalin reseptörleri aracılığıyla absorbe edilmekte ve endositoz ile hücre içine alınmaktadır (74).

Düşük molekül ağırlığı ve degradasyona dirençli yapısı nedeniyle kolayca ekskrete olarak idrarda saptanır (64). Sonuçta, sağlıklı bireylerde idrarda düşük miktarda (~5ng/mL) bulunmaktadır (74).

Goetz ve ark. (65,75), lipokalinlerin en önemli ligandlarının sideroforlar olduğunu göstermişlerdir. Sideroforlar, mikroorganizmalar tarafından salgılanan ve demire bağlanarak hücre içine taşıyan çoğu non-ribozomal peptidlerdir. Sideroforların NGAL için endojen ligand olarak görev yaptıkları, ona karakteristik parlak kırmızı rengini verdikleri ve biyolojik etkilerinin çoğunu modüle ettikleri bilinmektedir. Bakteriler, endojen demir şelatlarına oranla birkaç kat daha yüksek afinitesi olan siderofor denilen özel proteinleri geliştirerek, serbest demiri bağlarlar ve ana demir bağlama proteinlerinden demir elde edilmesini sağlarlar (75).

Spesifik hücre reseptörleri ile NGAL'in hücresel aktiviteleri sağlanmaktadır. İki tip hücresel reseptör tanımlanmış olup; birisi 24p3R (beyin tipi organik katyon taşıyıcı), diğeri ise esas olarak renal tübüler hücrelerin yüzeyinde bulunan megalin reseptörü olup, NGAL'in

endositozunda ve hücresel trafiğinde esas role sahiptirler (74). Bunlara ilave olarak, NGAL'in biyolojik aktiviteleri araştırma aşamasında olan hepatosit büyüme faktör, gelatinase B ve ekstraselüler protein kinazlar gibi diğer bazı reseptörler ve ligandlarla da etkileşimi kanıtlanmıştır (64).

### **Nötrofil Jelatinaz İlişkili Lipokalin (NGAL) Ekspresyonu ve Ölçümü**

Sağlıklı insanlarda NGAL sentezi çok düşük miktarda meydana gelmektedir ve dolaşımdaki ana kaynağını nötrofiller oluşturmaktadır (64). Aynı zamanda düşük miktarlarda böbrek, prostat, akciğer, timus, karaciğer, solunum ve sindirim yolu epitelinde, ayrıca postpartum uterus dokusu ve ek gıdaya geçiş döneminde meme dokusunda olduğu gibi involusyona uğrayan dokularda da eksprese edildiği gösterilmiştir (76).

Ekspresyonunu düzenleyen faktörler interlökin, tümör nekroz faktörü-a ve interferon gibi pro-inflamatuvar sitokinleri ve retinoik asit gibi vitaminleri içerecek şekilde çok sayıda ve çeşitlidir (70).

Stres altındaki hücrelerde NGAL sentezi meydana gelmektedir. Enfeksiyon, inflamasyon (aktive nötrofillerin sekonder granüllerinden sentezlenir), iskemi ve neoplastik transformasyon NGAL ekspresyonunun arttığı durumlardır (77).

Plazmada serbest veya tip IV kollagenaz (gelatinaz B, MMP-9) ile kompleks halinde bulunabilir. Venöz kan (serum, plazma), idrar, tükürük ve doku örneklerinden çalışılabilmektedir. Ölçümde sıklıkla ELISA yöntemi kullanılırken son yıllarda otoanalizörlerde CMIA (kemilüminesan mikropartikül immuassay) ve PETIA (Particle-enhanced turbidimetric immunoassay) yöntemleri ile de çalışılmaya başlanmıştır. Örneklerin oda ısısında 24 saat, +4 °C'de 7 gün, -80 °C'de 1 yıla kadar NGAL için stabilitelerini korudukları saptanmıştır (78).

### **Nötrofil Jelatinaz İlişkili Lipokalin (NGAL)'in Fonksiyonları**

#### **Hücre İçi Demir Depolarının Düzenlenmesi ve Bakteriyostatik Fonksiyonu**

Hücre içine yalnız protein yapısında (Apo-NGAL) ya da demir bağlayıcı sideroforlar ile kompleks halinde (Holo-NGAL) alınıp alınmadığına

bağlı olarak NGAL'in hücre içi aktivitesi, değişiklik göstermektedir. Kompleks halinde (Holo-NGAL), endozomal veziküllerin içine alındıktan sonra sitoplazmik alana göç etmekte, siderofor-demir kompleksi açığa çıkmakta ve demir bağımlı spesifik yolaklar aktive olmaktadır. Protein yapı ise, ya degrade olmakta ya da tekrar hücre dışına atılmaktadır. Tersine, Apo-NGAL ise hücre içine alındıktan sonra hücrenel demiri bir mıknatıs gibi çekmekte ve ekstraselüler aralığa yönlendirmektedir. Sonuçta hücrenel demir havuzunun tüketimine yol açmakta olduğu ve apoptozise aracılık ettiği düşünülmektedir (79). Bu apoptotik etkinin, NGAL'in antibakteriyel etkisine aracılık ettiği düşünülmektedir (80).

Bakterilerden üretilen formil peptidlere, lipopolisakkaritlere ve katekolat tip ferik ( $Fe^{+3}$ ) sideroforlar içeren küçük lipofilik substantlara NGAL'in bağlanabildiği belirtilmiştir. Bakterilerin büyümeleri için demir gerektiği için, NGAL demir depolarını tüketerek bakterilerin büyümesini engeller (bakteriyostatik etki). Bundan dolayı doğal immun sistemin efektör moleküllerinden biri gibi fonksiyon yapabilir. Bu bulguların biyolojik anlamlılığı genetik olarak modifiye farelerde gösterilmiştir. Yapılan çalışmada NGAL geni eksik olan farelerin, kontrol grubuna göre gram (-) bakteri enfeksiyonlarına daha duyarlı oldukları ve sepsiste mortalite oranlarının daha yüksek olduğu gösterilmiştir (81). Ayrıca fizyolojik koşullarda çocuklardaki bakteriyel enfeksiyonlarda nötrofil aktivasyonuna bağlı serum NGAL düzeylerinde artış tespit edilmiştir (82).

### **İnflamasyon ve Nötrofil Kemotaksisindeki Fonksiyonu**

Nötrofil jelatinaz ilişkili lipokalinin proinflamatuvar bir molekül olduğu yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur. Akciğer inflamasyonu olan fare modelleri üzerinde yapılan araştırmada proinflamatuvar uyarılara maruz kaldıktan sonra serum NGAL mRNA ve proteininin güçlü bir şekilde arttığı bulunmuştur (83). İnflamasyonda NGAL'in işlevsel rolünü açıklamak için çeşitli hipotezler öne sürülmüştür. Akut ya da kronik inflamasyonda (örn. bronşiyal astım) inflamasyon bölgelerinde granüositlerin biriktiği ve bu granüositlerin apoptozisi sonrası, NGAL içeren salgı granüllerinin serbest kaldığı ve bu şekilde lokal doku hasarına aracılık ettiği yönündedir.

Bir akut faz proteini olarak NGAL in önemi; E. Coli'nin intraperitoneal enjeksiyonunu takiben, NGAL seviyelerinin 4 saat içerisinde serumda ve karaciğer dokusunda ve 6 saat içinde dalakta yüksek olduğunun saptanması ile gösterilmiştir (70).

### **Antioksidan Fonksiyonu**

İnsan embriyosu böbrek hücrelerinde NGAL'in aşırı ekspresyonu sonucunda, antioksidan enzimler olan süperoksit dismutaz ve hem oksijenazın mRNA ve protein düzeylerinde bir upregülasyon ile birlikte NF-kB ekspresyonunda azalma olduğu saptanmıştır. Ayrıca, ektopik NGAL eksprese eden hücrelerin in vitro olarak hidrojen peroksitin sitotoksik etkilerine karşı daha dirençli olduğu bulunmuştur. Reaktif oksijen türleri aracılığıyla oluşan hücresel zararlara karşı NGAL'in koruyucu bir etkisi olabileceği düşünülmektedir.

Bir antioksidan olarak NGAL'in rolünün altında yatan mekanizma, şimdiye kadar belirlenen tek NGAL bağlayıcı siderofor olan katekolün, NGAL yokluğunda Fe<sup>+3</sup> bağlaması ve azaltması (Fenton reaksiyonu) yoluyla son derece aktif hidroksil serbest radikal oluşumunu hızlandırması, ardından ortama NGAL ilave edildiği zaman, bu reaksiyonun inhibisyonu olabilir (84).

### **Nötrofil Jelatinaz İlişkili Lipokalin (NGAL)'in İlişkili Olduğu Hastalıklar**

Yapılan çeşitli çalışmalarda NGAL proteininin; kalp yetmezliği, ateroskleroz, böbrek yetmezliği, inflamatuvar hastalıklar (pankreatit, psöriazis), metabolik hastalıklar (gestasyonel diyabet, preeklampsi) ile ilişkili olduğu ve bu hastalıklarda ekspresyonunun değiştiği saptanmıştır (85-90).

### **Nötrofil Jelatinaz İlişkili Lipokalin (NGAL) ve Kansere İlişkisi**

Yapılan araştırmalar NGAL ekspresyonunun çeşitli solid ve hematolojik kanserde uyarıldığını, ayrıca bazı kanserlerde NGAL düzeyleriyle sağkalım, hastalık düzeyi ve prognoz arasında korelasyon olduğu saptanmıştır. Hepatosit büyüme faktörü, retinoik asit ve NF-kB gibi tümör gelişimini provoke eden moleküller tarafından NGAL gen indüksiyonunun arttığı tespit edilmiştir (91).

Sindirim (özofagus, mide, karaciğer, safra kesesi ve pankreas),

solunum (akciğer), endokrin (tiroid ve over), üreme (meme ve endometrium) ve deri olmak üzere çeşitli organlardaki solid tümörlerde yüksek NGAL ekspresyonları saptanmıştır (92-97).

Pankreas kanseri solid kanserler arasında en ölümcül kanser türüdür. Normal pankreas dokusunda çok az eksprese edilen NGAL, kanser hücrelerinden oldukça fazla miktarda eksprese edilmektedir (92). Premalign lezyonlardan (pankreas intreaepitelyal neoplazi) itibaren NGAL seviyeleri düşük derecelerden yüksek derecelere doğru progresif olarak artmaya başlamaktadır. İyi diferansiye pankreas kanserinde NGAL seviyeleri oldukça yüksek saptanırken, kötü diferansiye türde NGAL yüksekliği saptanmamıştır (92). Plazma NGAL seviyesinin pankreas kanserli hastalarda sağlıklı kontrollere göre yüksek saptanması, ileride pankreas kanseri tanısında yeni bir belirteç olarak kullanılabileceğini düşündürmektedir.

Normal karaciğer hücrelerinde de NGAL sentezi düşük miktarlardayken, hepatoselüler karsinom (HCC)'da oldukça yüksek miktarda saptanmıştır (93).

Premalign ve malign mide dokularındaki NGAL ekspresyonuyla ilgili iki zıt çalışma mevcuttur; Alpizer ve ark. (94), NGAL ekspresyonlarında artış saptarken, Wang ve ark. (95), belirgin bir düşüş saptamışlardır. Mide kanserli hastalarda yapılan çalışmada, serum NGAL proteininin kullanımıyla 0.93'lük eğri altı alanı ile kanserli olgular sağlıklılardan ayırt edilmiştir (95). Serum NGAL ölçümünün erken evre mide kanseri tanısında (evre 1 ve 2) CA 19-9 ve CEA'dan daha yüksek tanısal sensitiviteye sahip olduğu görülmüştür. Ayrıca serum NGAL seviyeleri yüksek hastaların (35.6 ay), normal olanlara göre (54.4 ay) daha kısa yaşam süresine sahip oldukları saptanmıştır (94).

Normal over foliküllerinde ve benign over tümörlerinde serum NGAL proteini düşük miktarda saptanırken, grade 1 (iyi diferansiye) over kanserlerinde oldukça yüksek miktarda saptanmıştır. İlginç olarak grade 2 (orta diferansiye) ve grade 3 (kötü diferansiye) over kanserlerinde NGAL miktarı düşük saptanmıştır (96).

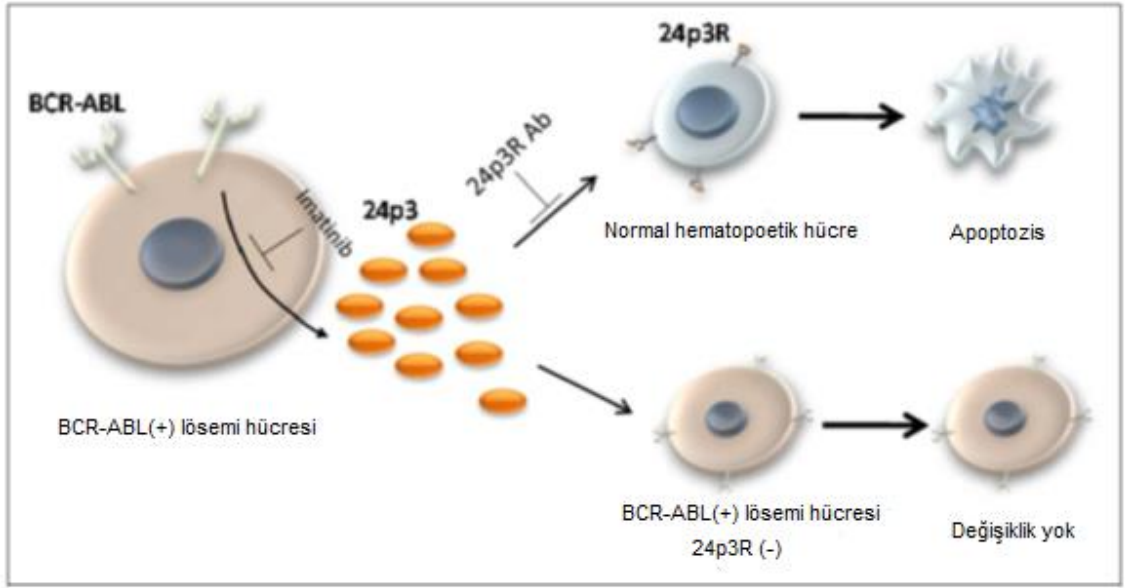
Malign endometrium bezlerinde NGAL seviyeleri normal endometrium bezlerine göre oldukça yüksek saptanmıştır.

İmmunohistokimyasal analizler sonucunda da normal endometrium dokuları zayıf NGAL ekspresyonu gösterirken, endometrial karsinom alanlarındaki NGAL seviyeleri oldukça yüksek saptanmıştır (97).

Hematolojik kanserlerde de kanser hücreleri tarafından NGAL sekrete edilmektedir. Fareler üzerinde yapılan araştırmalarda, lösemilerde BCR-ABL eksprese eden hücrelerin ayrıca güçlü bir şekilde 24p3/NGAL eksprese ettiği gösterilmiştir (79). Bir füzyon proteini olan BCR-ABL; KML başta olmak üzere, ALL (daha az) ve AML (nadiren) gibi lösemilerle ilişkidir. Bu füzyon reaksiyonu 9. ve 22. kromozomların uzun kolları arasında meydana gelen karşılıklı translokasyon ile sonuçlanır. Ürün olarak yapısal olarak aktif tirozin kinaz (aktivasyon için aktivasyon sinyali gerekmez) enzimi oluşur.

Farelerde normal hematopoetik hücreler (BCR-ABL pozitif olmayan lösemi hücreleri) NGAL için reseptör (NGALR yada 24p3R) eksprese ederler. Lösemi hücreleri kana oldukça fazla NGAL salgırlar ve NGAL reseptörleri olan normal hematopoetik hücreler apoptozis yoluyla ölürler. Lösemik hücrelerde bu reseptör yoktur ve bu sebeple etkilenmezler. Bu mekanizma lösemi hücrelerinin sağlıklı kemik iliğinde nasıl yayıldıklarının bir açıklaması olabilir (şekil-3) (70,98). Farelerde ile ilgili yapılan araştırmalarda ortaya konan sonuçlar KML hastalarında da doğrulanmıştır ve hem NGAL mRNA hem de plazma NGAL seviyelerinin KML'li olgularda oldukça yüksek olduğu saptanmıştır (98). Ayrıca imatinib (BCR-ABL tirozin kinaz inhibitörü) kullanımıyla NGAL mRNA seviyeleri azalırken plazma NGAL seviyeleri azalmamıştır (99).





**Şekil-3:** NGAL (24p3)'in hematopoetik kanserlerdeki rolü (70)

### **Nötrofil Jelatinaz İlişkili Lipokalin (NGAL) ve Meme Kanseri**

Luminal epitelyal hücrelerde myoepitelyal hücelere göre NGAL geni daha yüksek miktarlarda bulunmaktadır (100). Meme kanserlerinin de çoğunluğunun luminal epitelyal hücrelerden kaynaklandığı bilinmektedir. Bu sebeple NGAL proteininin meme kanseri progresyonunda aktif olarak yer aldığı düşünülmektedir (101).

Normal meme epitelyal hücrelerinde NGAL ekspresyonu östrojen kontrolünde iken, malign meme epitelyal hücrelerinde NGAL bu hormonal düzenlemeden kurtulur (102). Östrojen resptörü (-) meme kanseri hücre dizileri ve primer kanser örneklerinde NGAL düzeyleri yüksek saptanmıştır (103).

Aktif proliferen olan hücrelerde, LN metastazında ve HER-2 pozitif hücrelerde NGAL seviyeleri oldukça yüksek saptandığı için NGAL' in meme kanseri ilerlemesini arttırdığı düşünülmüştür. Ayrıca hücre dizisi çalışmalarında NGAL ekspresyonunun HER-2 ile düzenlendiği saptanmıştır (104).

Nötrofil jelatinaz ilişkili lipokalin, MMP-9 ile kompleks oluşturarak, MMP-9'un yıkımını önler ve aktivitesini artırır (104). Meme kanserini de içeren birçok kanserde progresyon, invazyon ve metastaz aşamalarında

MMP-9 etkili rol oynamaktadır (105).

Palpe edilemeyen meme lezyonları nedeniyle histolojik tanı için meme biyopsisi yapılan 113 hasta ve 30 sağlıklı kadın kontrol içeren bir çalışmada, MMP-9, NGAL ve MMP-9/NGAL kompleksinin seviyeleri serumda incelenmiştir. İnvaziv duktal karsinomu olan kadınlarda kontrol ile karşılaştırıldığında serumda belirgin MMP-9, NGAL ve MMP-9/NGAL artışı izlenmiştir (106). Meme hastalığı ciddiyet skoru ile MMP-9 ve NGAL serum düzeyleri arasında belirgin korelasyon izlenirken kompleksleriyle anlamlı bir korelasyon bulunamamıştır. Bu bulgular serum MMP-9 ve NGAL ölçümlerinin meme hastalığı durumunda potansiyel belirteç rolü oynamaları yanında meme kanseri progresyonunun non invaziv takibinde de kullanışlı olabileceğini göstermektedir (106).

Meme kanserli hastalarda yapılan bir başka çalışmada NGAL ekspresyonu; negatif hormon reseptör durumu, Her-2/neu artmış ekspresyonu, yüksek histolojik grade, LN metastazı ve yüksek proliferasyon indeksi ile güçlü bir korelasyon göstermiştir. Doku NGAL düzeyleri artmış mortalite ve azalmış hastaliksız sağkalım süreleri ile ilişkili bulunmuştur (103).

### **Vimentin**

Vimentin, proteinlerin tip III ara filaman (intermediate filament) ailesinin bir üyesidir. Ara filamentler tüm ökaryotik hücrelerde ve bakterilerde bulunmaktadır (107). Hücre iskeleti, ara filamentler, aktinlerin oluşturduğu mikofilamentler ve tübülünlerin oluşturduğu mikrotübüller olmak üzere üç temel yapıdan meydana gelir. Proteinlerin ara filament ailesi insanlarda, farelerde ve diğer memelilerde yaklaşık 70 üyelik gen ailesi tarafından kodlanmaktadır (108).

Ara filament ailesinin 6 ana sınıfı vardır. Bunlar tip I ve II (asidik ve bazik keratinler; özellikle epitelyal hücrelerde bulunur), tip III (vimentin; mezenkimal hücrelerde, desmin; kas hücrelerinde), tip IV (nörofilamentler; nöronlarda), tip V (laminin; hücrelerin çekirdeği), tip VI (nestin; embriyonik

nöronlar)'dır (109). Ayrıca ara filamentleri organize eden plektin, ankrin, desmoplakin ve fillagrin gibi proteinleri içeren ara filament ilişkili proteinler de vardır. Bunlar ara filamentler, organeller ve diğer hücre iskeleti komponentleri arasındaki etkileşimleri koordine etmektedirler. Ara filamentler ve ara filament ilişkili proteinler birlikte, hücrelerin içindeki sitoplazmik boşluğun ve doku yapısını oluşturan hücrelerin organizasyonunu sağlayarak, çeşitli organlara stabilite ve güç kazandırır (110).

Vimentin 57 kDa ağırlığında ve ilk olarak fare fibroblast kültürlerinde izole edilmiş bir proteindir. Vimentin ara filament protein ailesinin (tip III) üyelerinden en fazla eksprese edilen proteindir. Adını latince de esnek çubuklar dizisi anlamına gelen "vimentum"dan almıştır. Vimentin, mezenkimal hücrelerin ana iskelet bileşenidir. Fare gelişimi sırasında vimentin ekspresyonu embriyonik 8.5 günde başlar ve fetal dönemde baskındır (111).

Vimentinin erişkin dönemdeki ekspresyonu ise bağ dokusu mezenkimal hücreleri, merkezi sinir sistemi ve kas dokusu ile sınırlıdır (112). Vimentin; pankreas prekürsör hücreleri, sertoli hücreleri, nöronal prekürsör hücreler, trofoblastik hücreler, fibroblastlar, renal tübüler ve stromal hücreler, makrofajlar, nötrofiller, lökositler, mesangial hücreleri içeren oldukça geniş hücre tipinde eksprese edilmektedir (113,114).

### **Vimentinin Yapısı ve Düzenlenmesi**

Vimentin, 466 aminoasitten oluşan, amino ve karboksil uçlarında bulunan baş (77 rezidü) ve kuyruk (61 rezidü) domainleri ve bunların arasında oldukça korunmuş alfa-helikal rod domaini yer alan bir polipeptittir (115). Bu moleküller paralel olarak bir araya gelerek tüm ara filament ailesindeki temel yapısal bloğu oluşturan sarılmış sarmal (coiled-coil) formunu oluştururlar (116). İki monomer ko-translasyonel bir şekilde eksprese edilir bu da vimentin düzeneğinin ana subuniti olan dimer oluşumunu kolaylaştırır (117). Alfa helikal diziler, sarmal yüzeyi üzerinde bir "hidrofobik bölge" oluşturan hidrofobik aminoasit paterni içermektedir. Buna ek olarak, asidik ve bazik aminoasitlerin periyodik olarak dağılması, sarılmış sarmal dimerlerin stabilizasyonunda önemli rol oynamaktadır (109). Ayrıca

vimentin, ara filament ailesinin ortak özelliği olan homopolimer ve heteropolimer (diğer tip III ve IV ara filamentlerle) filamentler oluşturabilir ve homotipik ara filamentlerin heterolog alt ünitelerle bütünleşmesi mekanik direnci artırır (118).

Vimentinin in vitro olarak birçok kinaz için çok iyi bir substrat olduğu gösterilmiştir ve vimentin üzerinde birçok fosforilasyon bölgesi tanımlanmıştır (119). Vimentinin fosforilasyonu, ara filamentlerin ve çeşitli yolakların düzenlenmesini de içeren çeşitli fonksiyonel sonuçlar ile ilişkilidir. Örneğin p21-aktive edilmiş kinazın (PAK) vimentini fosforile ettiği gösterilmiştir ve PAK'ın vimentinin yapısal olarak yeniden düzenlenmesinde yer aldığı belirlenmiştir (120). Mitotik süreçlerde anahtar düzenleyici rolü olan Aurora B kinazın da, vimentini fosforile ettiği gösterilmiştir ve sitokinetik süreç sırasında vimentin filamentinin ayrılmasını düzenler (121). Ayrıca protein fosfataz 2A'nın (PP2A) vimentinin fosforilasyonu engellediğinin gösterilmesi ile PP2A'nın ara filament dinamiklerinin düzenlenmesinde önemli bir rol oynadığı kanıtlanmıştır (122).

Vimentinin; strilünizasyon, sumolasyon ve O-GlcNAc modifikasyonlarını içeren diğer post-translasyonel modifikasyon tiplerinde de hedef olarak kullanıldığı gösterilmiştir. Strilünizasyon, arginin rezidülerinin peptidilarginin deaminaz enzimi ile deamine edildiği post-translasyonel modifikasyondur. Vimentinin apoptozise giden makrofajlarda sitrülünleştiği gösterilmiştir (123). Glial vimentinin O-GlcNAcyonu ile hiperfosforilasyonu önlenir (123). Ayrıca vimentinin sumolasyonu ile glioblastome multiforme hücrelerinin yapısı ve motilitesi düzenlenir (124). Birlikte ele alındığında, vimentinin fonksiyonlarının düzenlenmesinde post-translasyonel modifikasyonların önemli rol oynadığı görülmektedir. Bu modifikasyonlar hücre ve dokulara spesifiktir.

Vimentin kromozom 10p13 üzerinde bulunan tek bir gen tarafından kodlanmaktadır. Başlangıçta vimentin promotörünün, ekspresyonu düzenleyen üç farklı öğeden oluştuğu gösterilmiştir (125). Sonraki yıllarda vimentin promotörü olarak vimentin geninin karmaşık bir kontrol altında olduğunu gösteren çeşitli cis-elementleri ve ilişkili faktörler tanımlanmıştır

(125,126). Ayrıca vimentin geninin epigenetik modifikasyonlar için bir hedef olduğu ve bazı durumlarda vimentin geninin metillendiği gösterilmiştir (127).

### **Vimentinin Fonksiyonları ve Hastalıklarla İlişkisi**

Vimentin sitozolde organellerin desteklenmesi ve konumlarını sabitlemede önemli rol oynamaktadır ve bu fonksiyonunu çekirdek, endoplazmik retikulum ve mitokondri gibi organellere terminal yada lateral olarak bağlanarak yapmaktadır (128).

Vimentinin dinamik yapısı hücreye esneklik sunması açısından önemlidir. Mikrotübül veya aktin filamentleri eksikliğinde mekanik stres altında bile vimentinin hücrelere esneklik ve dayanıklılık sağladığı saptanmıştır. Bu nedenle genel olarak vimentin, hücre bütünlüğünün devamından sorumlu sitoskeletal bileşen olarak kabul edilmektedir ve vimentin eksikliğinde mikro-punktur uygulaması ile hücre yapılarının çok kolay bozulduğu tespit edilmiştir (129).

Vimentinin, hem normal gelişim hem de metastatik süreç sırasında, mezenkimal kaynaklı ya da epitelyal mezenkimal dönüşümdeki (EMT; epitelyal hücrelerin mezenkimal fenotip kazanarak şekillerini ve motilite yeteneklerini arttırdıkları yeniden programlama süreci) hücreler için bir belirteç olarak kullanılmaya başlanmasıyla birlikte önemi artmıştır (130). Normalde ara filament olarak sadece keratin ekspresyon eden epitelyal hücreler EMT sürecinde, vimentin ekspresyon etmeye başlarlar. Bunun tersi süreç olan mezenkimal-epitelyal dönüşüm sırasında ise hücreler epitelyal fenotip kazanırken vimentin ekspresyonları azalır ve hücrelerin motilite oranları düşer (130).

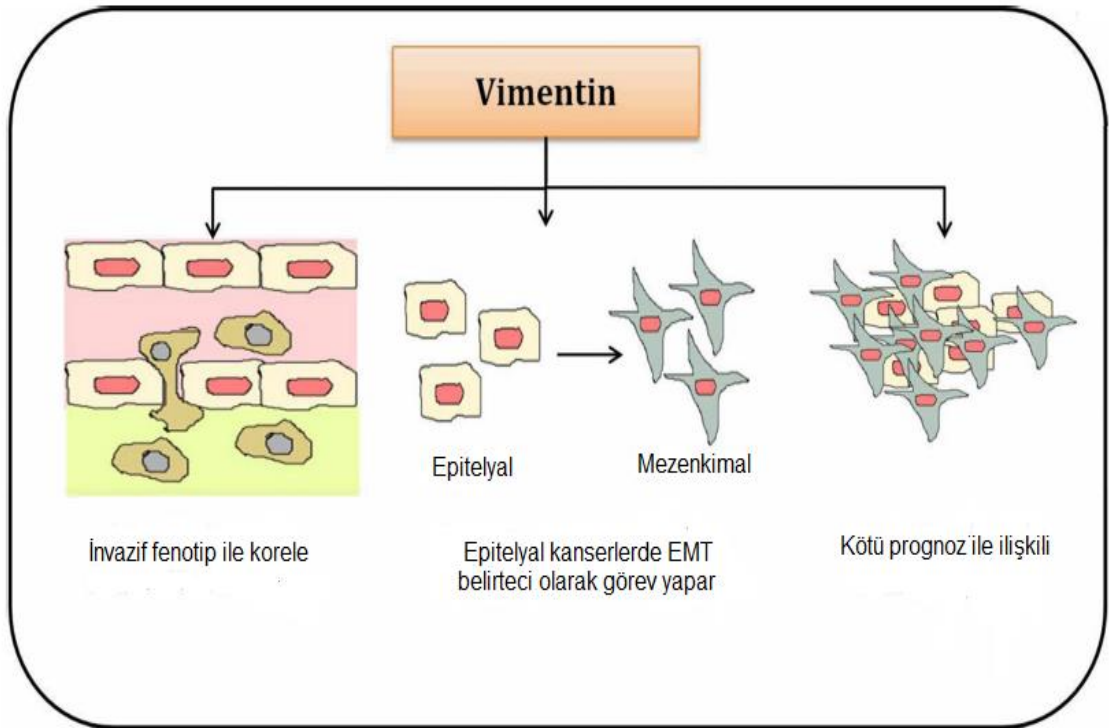
Vimentinin hücrenin yapısal süreçlerini devam ettirdiği kabul edilmesine rağmen, vimentin eksik farelerin neredeyse normale yakın fenotipleri olduğu saptanmıştır ve belirgin bir sorunları oluşmamıştır (131). Bu gözlem, vimentinin, normal fizyolojik koşullar altında, farelerin hayatta kalmasında kritik bir öneme sahip olmadığı sonucuna götürmüştür. Ancak çok daha ayrıntılı bir değerlendirme içeren sonraki çalışmalarda, vimentin (-/-) farelerde zayıf fibroblastların göç yetenekleri olmadığı için embriyonik ve erişkin evrelerde yara iyileşmesinin bozulduğu saptanmıştır. Normal fareler

ile karşılaştırıldığında, renal kitlenin azalmasını içeren patolojik durum nedeniyle son evre böbrek yetmezliği nedeniyle ölmüşlerdir (132).

Ayrıca vimentinin, düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) metabolizmasıyla ilişkisi olduğu bulunmuştur. Vimentin geni eksik farelerin hücrelerinde normal vimentin geni olan hücrelere göre daha düşük oranlarda lipoprotein depolanması olduğu görülmüştür (133).

### Vimentin ve Kanser İlişkisi

Prostat, GİS, akciğer, meme, kranial sistem kanserleri ve malign melanom gibi birçok kanserin tanı ve prognozunda vimentin ekspresyon paterninin değerlendirilmesinin yararlı olabileceği yönünde çalışmalar yapılmıştır (134-139). Vimentin, özellikle EMT sürecinde etkili olduğu bilinmesinin yanında, son yıllarda migrasyon ve invazyon gibi kanser açısından çok önemli olan olaylarda da bu proteinin etkileri olduğu saptanmıştır (şekil 4) (140).



**EMT:** Epitelyal mezenkimal dönüşüm

**Şekil-4:** Vimentinin kanserdeki rolü (140)

Bir çok çalışmada vimentin artışı ile invazif fenotip arasında pozitif korelasyon görülmüştür ve in vitro olarak vimentinin inhibe edilmesi ile bu özelliklerde azalma olduğu bildirilmiştir. Ayrıca metastaz sürecinde saptanan artmış vimentin ekspresyonları ileride metastaz promotörü rolünü aydınlatması açısından önemli olabilir (139,141-143).

Prostat kanseri hücre dizisinde vimentin ekspresyonunun arttığı saptanmıştır ve deneysel olarak vimentin ekspresyonu inhibe edilince tümör hücre dizisinin invazifliği belirgin olarak azalmıştır (141). Prostat kanserinde vimentin ekspresyonu, kötü diferansiye ve kemik metastazı olanlarda belirginken, iyi veya orta derecede diferansiye olanlarda neredeyse saptanamayacak seviyelerde bulunmuştur (134). Ayrıca prostat kanseri hücre dizilerinde vimentin ekspresyonu motilite ile ilişkili bulunmuştur ve down-regulasyonu ile tümör hücre motilitesi ve invazif aktivitede belirgin bir azalma meydana gelmiştir (144).

Gastrointestinal sistem kanserleri; mide, ince bağırsak, kolon, rektum, karaciğer ve pankreas kanserlerini kapsamaktadır. Mide kanserinde, vimentin ekspresyonu mide karsinomunun invazif fenotipi ile ilişkili bulunmuştur ve mide karsinomu metastazında vimentinin önemli bir rol oynadığı ve prognostik belirteç olarak kullanılabileceği belirtilmiştir (135).

Özofagus skuamöz hücreli karsinomlu hastaların doku örnekleri incelendiğinde vimentin eksprese eden hücrelerin LN metastaz oranları anlamlı olarak yüksek saptanmıştır (142).

Vimentin ekspresyonu HCC'de metastaz ile ilişkili bulunmuştur, ayrıca hastaların serum örneklerinde vimentinin saptanabilir seviyelerde olduğu gösterilmiştir (145). Bir başka çalışmada ise artmış vimentin seviyeleri olan HCC hücrelerinde proliferatif ve invazif kapasitenin azaldığı saptanmıştır (146).

Kolorektal kanserlerde, vimentin gen metilasyonu son zamanlarda çok önem kazanmıştır ve ileri evre kolorektal kanserlerde sıklıkla metilasyonun olduğu görülmüştür. Yüksek sensitiviteli tekniklerin

geliştirilmesi ile serum ve dışkı örneklerinde vimentin gen metilasyonu saptanması sonucunda kolon kanseri tanısı ve prognozunda önemli adımlar atılabileceği düşünülmektedir (127,147). Bununla birlikte, bir diğer hücre dizisi çalışmasında da kolorektal kanser hücrelerinde yüksek vimentin ekspresyonları saptanmıştır. Ayrıca artmış migrasyon ve invazif potansiyel ile vimentin ekspresyonları korelasyon göstermiştir ve vimentin spesifik siRNA kullanılarak vimentin seviyeleri azaltıldığında migrasyon ve invazif potansiyel de azalmıştır. Vimentindeki %70 azalmanın bile kanser hücrelerindeki invazyon ve migrasyon kapasitelerinin bozulması için yeterli olduğu belirtilmiştir (148).

Pankreas hücrelerinde vimentin ekspresyonunun farelerde embriyonik 12.5 günde başladığı ve TGF- $\beta$  proteini ile eş zamanlı olarak doğum sonrasında pik seviyesine ulaştığı saptanmıştır (149). Pankreas kanserinde diğer kanserlere kıyasla vimentin ekspresyonunda daha belirgin artışlar saptanmıştır. Ayrıca vimentinin spesifik bir antijenik izoformunun pankreas kanserinde 5-10 kat kadar arttığı görülmüştür ve pankreas kanserinin erken tanısında bu izoforma yönelik otoantikörlerin kullanılabileceği belirtilmiştir (150). Vimentinin pankreas kanser hücrelerinin invazyon potansiyelini arttırdığı ve bu potansiyelin vimentin spesifik siRNA ile azaldığı saptanmıştır (151).

Malign melanomlu (MM) örnekler üzerinde Li ve ark. (139), yapmış olduğu çalışmada, primer tümörlerde vimentin ekspresyonunun arttığı ve vimentinin sadece tanı belirteci olarak kullanılmasının yanında, metastazı da öngörebileceğini belirtmişlerdir. Ayrıca MM hastalarında vimentinin klinik sonuçların belirleyicisi olarak da kullanılabileceği, böylece melanom hastaları için bireysel tedavi stratejileri oluşturulabileceği belirtilmiştir (139). Chu ve ark. (152), yapmış oldukları çalışmada, melanom hücrelerindeki vimentin artışının metastaz ve invazif potansiyel artışı ile ilişkili olduğu saptanmıştır.

Normal insan beyinde, vimentin ekspresyonu ependimal hücreler, koroid pleksus, meningeal hücreler ve bazı subpial hücrelerde baskınken, endotelial hücrelerde zayıftır (153). Menenjiomlarda vimentinin spesifik fosforile formu, infiltratif veya invazif tümörlere göre infiltratif olmayan



tümörlerle daha ilişkili bulunmuştur ve bu formun menengiömların migrasyon potansiyelini ve farklı tip menengiömlara farklılaşmasını belirlemede kullanılabileceği belirtilmiştir (154).

Vimentin fetusun başlıca bronş epitelinde eksprese edilirken yaş arttıkça zamanla azalmaktadır ve yetişkin yaşlarda ekspresyonu bazal ve kolumnar hücreler ile sınırlıdır (155). Akciğer kanserlerinde, orta ve iyi derecede farklılaşmış adenokarsinomlar ve dev hücreli karsinomlarda artmış vimentin ekspresyonu saptanmıştır (136). Ayrıca küçük hücre dışı akciğer kanserlerinde artmış vimentin ekspresyonu kısa sağkalm ile ilişkili bulunmuştur (156).

### **Vimentin ve Meme Kanseri**

Meme karsinomlarında vimentin ekspresyonu ilk kez 1989 yılında Rayond ve ark. tarafından gösterilmiştir (157). Vimentin ekspresyonu daha çok memenin medüller karsinomunda ve duktal karsinomda pozitif olarak görülürken lobüler karsinomda negatif olarak saptanmıştır (158).

Vimentin ekspresyonunun agresif meme kanseri hücre dizilerinde yüksek olduğu gösterilmiştir ve bu artmış ekspresyon meme kanseri hücrelerinde artmış invazyon ve migrasyon ile anlamlı pozitif korelasyon göstermiştir (137,159). Ayrıca invazif olmayan MCF-7 hücrelerindeki vimentin artışı motilite ve invazyon artışı ile ilişkili bulunmuştur ve belirgin şekilde vimentin eksprese eden MDA-MB-231 hücrelerinde vimentin inhibitörü kullanımasından sonra motilite ve invazyon özellikleri belirgin olarak azalmıştır (159).

Essa ve ark.'nın (158), yapmış olduğu 58 olguluk bir çalışmada %32 oranında vimentin pozitifliği saptanmıştır. Ayrıca grade III olguların %50, grade II olguların %24'ünde vimentin pozitif bulunurken, grade I olguların hiçbirinde vimentin pozitif bulunmamıştır (158). Heatley ve ark. (160), histolojik grade, tümör çapı ve metastatik lenf nodu sayısı arttıkça vimentin ekspresyonunun arttığını ifade etmişlerdir. Memenin invazif duktal karsinomlarında vimentin ekspresyonu düşük ER ve PR, artmış invazyon kapasitesi ve ilaç direnci ile ilişkili bulunmuştur (161,162). Ancak Hücümenoğlu ve ark.'nın (163), yaptığı çalışmada ise vimentin ekspresyonu

ile histolojik grade ve aksiler metastatik lenf nodu sayısı arasında bir korelasyon izlenmemiştir.

### **Fibronektin (Fn)**

İlk kez 1948 yılında, plazma proteinlerini birbirinden ayırmak için kullanılan soğuk etanol-ayırıştırma işlemi ile hazırlanan fibrinojenin bir bulaşı olarak tanımlanan fibronektinin (Fn) 1980'lerde eşsiz bir plazma proteini (cold-insoluble globulin) olduğu anlaşıldı (164). Araştırmacılar 1970'lerde bazı hücre yüzeylerinde büyük yüzey glikoproteinlerinin bulunduğunu bildirdiler (165). Daha sonra bu plazma globulini ile hücre yüzeyi glikoproteinleri arasındaki benzerlik olduğu ortaya çıkarıldı. Bu proteine fibröz yapısı ve yapışkan benzeri özellikleri nedeniyle, latince fibra (lif) ve nectere (bağlamak) kelimelerinden türetilen fibronektin adı verilmiştir.

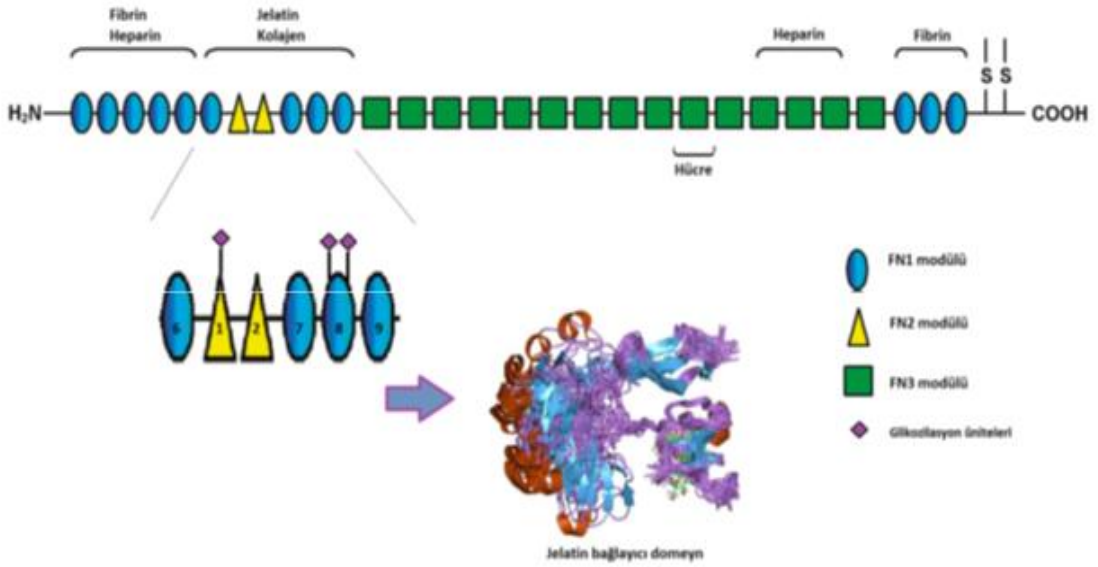
### **Fibronektin Sentezi ve Yapısı**

Fibronektinin iki ana formu vardır. Birincisi plazma, beyin omurilik sıvısı, sinoviyal sıvı, amniyotik sıvı, seminal sıvı, tükürük ve inflamatuvar eksudalar gibi vücut sıvılarında, çözünür şekilde bulunan dimerik formdur (çözünebilir form). Çözünür formun sentezi birçok hücrede olmasına rağmen ana üretim yeri hepatositlerdir (166). Diğer form ise hücre yüzeylerinde ve hücre dışı matrikste genellikle fibriller ve çözünmez şekilde bulunan multimerik formdur (bağlı form). Bağlı form, örtücü dokuların bazal membranları, hücre yüzeyi ve bağ dokusunun bir bileşenidir. Bu fibronektin formu; fibroblast, epitelyal hücreler ve makrofajlar tarafından üretilmektedir (167). Fibronektin temel olarak vücutta endotel, hepatositler, fibroblastlar, trombositler ve makrofajlar gibi çeşitli hücrelerde, ekstrasellüler sıvıda, bağ dokusunda ve bazal membranda bulunmaktadır.

Molekül ağırlığı 440-550.000 dalton olan Fn proteini, 200-250.000 dalton molekül ağırlıklı iki subunitten oluşur. Birçok makromolekülle ve hücre yüzeyiyle etkileşmesini sağlayan 5 veya 6 yapısal alanı vardır. Bu bölgeler proteazlara karşı dirençlidirler. Her bir alt ünitenin karboksi terminal uçlarının yakınında yer alan disülfid bağı Fn'i oluşturan iki alt üniteyi birleştirir. Her bir

alt ünite yaklaşık 2500 aa kalıntısı, %5-12 karbonhidrat ve katlanabilir aa zincirlerinden oluşan tekrarlayan üç tip ünite içermektedir (168).

Bu üç tip tekrarlayan sıra, Fn'nin aa dizisinin %90'dan fazlasını oluşturmaktadır. Birinci tip tekrarlayan sıra (FN1), 45 aa'den oluşur ve iki disülfid bağı içerir. Molekülün amino ve karboksil uçları 2. tip tekrarlayan sırada (FN2) bulunmaktadır. Altmış aa'den oluşan 2. tip sırada iki disülfid bağı vardır. Molekülün geri kalanını 3. tip tekrarlayan sıradan oluşan bölge oluşturur. Bu bölge 90 aa içerir ve disülfid bağı içermez. Bu bölgenin uzunluğu diğer bölgelerin 2 katıdır. Bu bölgede iki serbest sülfidril grubu bulunur. Belirli koşullarda bu sülfidril grupların oksidasyonu ile yüksek molekül ağırlıklı Fn multimerleri oluşur. Üçüncü tip tekrarlayan sıra (FN3) üzerinde; asparajin, glisin ve argininden oluşan temel hücre bağlayıcı bölge bulunmaktadır (Şekil 5) (169).



**Şekil-5:** Fibronektin ve fibronektin fragmanları (169)

Fibronektini oluşturan her bir ünite; kollojen, heparin, fibrin, gangliozid gibi moleküller ve hücreler için bağlanma bölgeleri içerir. Birinci tip tekrarlayan sıraya (FN1) fibrin, ikinciye (FN2) ise kollojen bağlanır. Karbonhidrat üniteleri biyolojik aktivasyon için temel oluşturmaz ancak

proteolize karşı direnci arttırlar. Fibronektin bir yüzey üzerinde bulunduğunda, kolları yaklaşık 70° birbirinden ayrılır. Sıvı fazda kollar içe doğru katlanarak daha globuler bir yapı kazanır (170).

Hücrelerin Fn ile etkileşimleri özgül hücre yüzeyi molekülleri ile olmaktadır. Fibronektin reseptörü olarak iş gören iki ayrı hücre yüzeyi proteini saptanmıştır. Bunlar, 140 kD ağırlığında olan ve trombosit IIb / IIIa reseptörü olarak da bilinen I. tip reseptör ve 48 kD molekül ağırlığında ve henüz tam olarak tanımlanmamış olan II. tip reseptördür. İkinci tip reseptörün Fn üzerindeki bağlanma yeri henüz tam bilinmemekle beraber, Fn'nin hücre dışı matrikse bağlanmasında iş gördüğü düşünülmektedir (171). Plazma Fn'i 24-72 saatlik bir yarı ömre sahiptir. Dolaşımı terk eden Fn'nin tümünün ne olduğu tam olarak bilinmemesine karşın, çözünen Fn'nin önemli bir kısmı hücre dışı matriks elamanlarına bağlanmaktadır (172).

### **Fibronektinin Fonksiyonları ve Hastalıklarla İlişkisi**

Fibronektinin başlıca fonksiyonları, hücre yüzeyi reseptörleri, hücrelerarası matriks proteinleri (kolajen, heparin vb), DNA, gangliozidler ve immünoglobulinler gibi farklı biyolojik bileşenlere afinite göstermesine dayanır. Fibronektin, hücre yüzeyindeki integrin reseptörüne bağlanabilen bir domeyn içerir. Bu durum fibronektinin hücre adezyonunda rol almasına aracılık eder (173). Fibronektinin yapısındaki diğer bir bağlayıcı domeyn ise heparin bağlayıcı domeyndir ve fibronektinin hücre çoğalmasında rol almasında etkisi vardır (174).

Embriyogenezis, onkojenik transformasyon, hücre adezyonu, yara iyileşmesi, doku tamiri, trombosit fonksiyonları, hücre migrasyonunda Fn'in önemli roller oynamaktadır. Plazmadaki fibronektin düzeyinin azalması pıhtı oluşumunda gecikme, pıhtı kararlılığında azalma, damar oluşumunda azalma ve bakteriyel enfeksiyonlara duyarlılıkta artış ile sonuçlanır (175,176). Plazma Fn düzeylerinin, karaciğer hastalıkları, büyük ameliyatlar, yanık ve travma sonrası, diyabetik retinopati, yaygın damar içi koagulopatisi, hematolojik hastalıklar ve yetersiz beslenen çocuklarda düştüğü bildirilmiştir. Bu olgularda plazma Fn düzeyi düşüklüğü üç olası etmene bağlanmaktadır. Bunlar; proteaz düzeylerinin ve aktivitesinin artışı, Fn tüketiminin artması ve

sentezinin azalması şeklinde sıralanmaktadır (177,178).

Ayrıca Fn, opsonin ve kemotaktik ajan olarak inflamasyonda da rol alabilir. En iyi bilinen opsoninler immunoglobulin G ve komplemanın C3b bileşeni iken son yıllarda bunlara glikoprotein yapısında ve adezyon özelliği olan Fn'de eklenmiştir (170).

İnflamasyon sırasında kanda Fn seviyesinin arttığı ve akut faz proteini gibi fonksiyon gördüğü gösterilmiştir (179). Son yıllarda Fn'nin lökosit fonksiyonları üzerinde düzenleyici bir rolü olduğu ve lökositlerden salınan Fn'nin makrofajları aktive ettiği gösterilmiştir (180).

### **Fibronektin ve Kanser İlişkisi**

Epitelyal tümörlerdeki EMT geçici bir mezenkimal görünüme (epitel özellikleri kaybı ve mezenkimal fenotip kazanımı) sahip olma durumu olarak tanımlanır. Epitelyal-mezenkimal dönüşüm kanser hücrelerinin mikroçevreye progresyonu, invazyonu ve KT direnciyle ilişkilidir (181). Epitelyal kanser hücrelerindeki EMT sürecinde ekspresyonu artan FN, kanserdeki EMT fenotipinin saptanması için mezenkimal belirteç olarak kullanılmaktadır (181).

Tümör hücreleri ve hücre dışı matriks (ECM) arasındaki karmaşık etkileşimler, tümör metastazı sırasında hücre göçü, hücre iskeletinin yeniden organizasyonu ve morfolojik geçişi de içeren, birçok sürecin düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır. ECM komponentleri arasından FN'nin, hücre adezyonu ve göçünü arttırmada anahtar role sahip olduğu kabul edilmektedir (182).

Fibronektin hücre-matriks ve hücre-hücre adezyonu, migrasyon, diferansiasyon, proliferasyon, hücreler arası sinyal iletiminin kontrol edilmesi ve onkojenik dönüşümünde rol oynamaktadır (183). Meme ve akciğer kanseri başta olmak üzere çeşitli kanserlerde Fn'nin integrin reseptörüne ( $\alpha 5\beta 1$ ) bağlanması yoluyla PI3K/Akt yolunu aktive ettiği bilinmektedir (184). İmmunohistokimyasal olarak meme kanseri, akciğer kanseri, tiroid kanseri ve kolon kanseri gibi çeşitli kanserlerde normal dokulara göre farklı FN ekspresyonları gösterilmiştir (185-188). Ayrıca FN'nin apoptozisi baskıladığı ve hematopoetik prekürsor hücre maturasyonda rol aldığı bilinmektedir (189).

Hücrelerin FN'e integrin aracılıklı bağlanmaları sonucunda fokal

adezyon plakları meydana gelir. Bu oluşumlar hem integrin moleküllerinin hem de hücre içi iskelet yapı elemanlarının kümelenmesine neden olmaktadır. Fibronektine bağlanma sonucunda meydana gelen değişimler hücre iskelet yapısını da etkilemektedir.

Akciğer kanseri hücrelerinde FN bağlanma sonucunda hücre bölünmesinde artış olduğu görülmüştür. Çeşitli çalışmalarda FN ekspresyonu ile akciğer kanseri agresifliği arasında pozitif korelasyon olduğu gösterilmiştir (186,190).

Malign asitlerin malign olmayan asitlerden ayırımında FN'nin yüksek sensitivite ve spesifiteye sahip bir tümör belirleyicisi olarak kullanılabileceği düşünülmektedir .

Deverbizier ve ark. (191), yaptıkları çalışmada, maligniteye bağlı asit oluşan hastalarda, malignite dışında bir nedene bağlı olarak asit gelişen hastalara göre asit sıvısında FN konsantrasyonunu belirgin olarak yüksek saptamışlardır.

İmmünohistokimyasal çalışmalar sonucunda normal hücrelerle karşılaştırıldığında değişime uğrayan hücrelerin yüzeyinde farklı FN ekspresyonları olduğu ortaya konmuştur. Over kanserli sıçanlarda yapılan bir çalışmada, zayıf metastatik olan grubun yüksek metastatik aktivite gösteren gruba göre, FN'e daha yüksek bağlanma gösterdiği ve hücre yüzeyi üzerinde daha fazla FN depolanması olduğu gösterilmiştir (192).

Hanamura ve ark. (188), kolon kanserli vakalarda in situ hibridizasyon ve immünohistokimyasal boyama yöntemi ile dokuda FN ekspresyonunu araştırmışlardır. Normal dokularda FN görülmezken kanserli olgularda özellikle stromada yüksek oranda FN'nin eksprese olduğunu ve FN ekspresyonu ile invazyon derinliği ve LN metastazının doğrudan ilişkili olduğunu saptamışlardır (188).

### **Fibronektin ve Meme Kanseri**

Meme kanserinde FN ekspresyonları ile ilgili çelişkili sonuçlar mevcuttur. Çeşitli çalışmalarda plazma FN düzeylerinin meme kanserinde arttığı, değişmediği veya azaldığı bulunmuştur (185,193,194).

Meme kanseri başta olmak üzere çeşitli kanser hücrelerinde FN,

MMP'lerinin ekspresyonlarını indüklemektedir (195,196). Matriks metallopeptidazlarının artmış ekspresyonu sıklıkla kanser invazyonu, metastaz ve dolayısıyla daha kötü bir prognoz ile ilişkili olduğu için önemli bir bulgudur (197). Ek olarak çeşitli çalışmalarda FN'nin; COX-2, CXCL-3, IL-8, TNF-a, TLR-2 ve NF-kB gibi inflamatuvar faktörleri arttırarak kanserlerdeki hücre büyümesini stimüle ettiği gösterilmiştir (186,198). Benzer şekilde, meme kanserindeki mikroçevreyi oluşturan başlıca inflamatuvar hücreler olan monosit / makrofajların, sinyal yolları ile doku kültürü modellerinde FN ekspresyonunu düzenlediği gösterilmiştir (199).

Fibronektin ekspresyonu genellikle meme kanserli hastaların dokularında incelenmiştir. Meme kanserinde FN ekspresyonunun prognostik önemini araştıran çalışmalardaki sonuçlar çelişkilidir ve farklı sonuçlar bulunmuştur. Kanser invazyonu ve metastaz ile ilgili olarak, FN de dahil olmak üzere hücre dışı matris proteinlerinin fonksiyonu tartışmalıdır. (183,200-202).

Christensen ve ark. (200), FN pozitif boyanma gösteren meme kanseri dokularının, azalmış metastatik potansiyel ile anlamlı ilişki gösterdiğini ve prognostik faktör olarak kullanılabileceğini bildirmişlerdir. Gorczyca ve ark. (201), stromal FN ekspresyonu ile tümör çapı arasında pozitif bir korelasyon saptarken, LN durumu ve klinik sonuçlar ile korelasyon saptamamışlardır. Ayrıca FN pozitif olanlarda daha uzun ortalama sağkalım ve hastaliksız sağkalım bulmuşlardır (201). Ioachim ve ark. ise (183), stromadaki FN ekspresyonu ile LN metastazı, Ki-67 indeksi, stromal katepsin D ekspresyonu ve kötü prognoz arasında pozitif korelasyon saptamışlardır. Bae ve ark. ise (202), stromal FN ekspresyonu ile epitelyal FN ekspresyonu, LN evresi, histolojik evre, lenfovasküler invazyon ve HER2 (+) arasında pozitif korelasyon bildirmişlerdir. Yüksek FN ekspresyonu gösteren hastalar, zayıf ve orta ekspresyon gösterenlere göre daha kısa hastaliksız sağkalım süreleri göstermişlerdir (202).

Bizim bu çalışmadaki amacımız NGAL, vimentin ve FN plazma düzeylerinin meme kanserinin tanısı, KT'ye yanıt ve prognoz ile ilişkisini araştırmaktır.

## GEREÇ VE YÖNTEM

### I- Gereçler

#### I-A-Olguların Seçimi

Bu çalışmaya Nisan 2013 ile Mart 2014 tarihleri arasında Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Onkoloji Bölümü polikliniklerine başvuran, neoadjuvan KT planlanan primer meme kanserli kadın hastalar alındı. Çalışmada hasta grubunda neoadjuvan KT planlanan 21 olgu yer aldı. Kontrol grubu olarak 18-70 yaş arası kadın olgulardan herhangi bir malignite öyküsü, sistemik hastalık (DM, HT) ve aktif enfeksiyonu olmayan 22 kadın olgu alındı.

Hasta grubunun çalışmaya dahil edilme kriterleri; 18-70 yaş arası, kadın cinsiyet ve meme kanseri varlığıydı. Dahil edilmeme kriterleri ise 18 yaş altı-70 yaş üzeri, erkek cinsiyet, meme kanseri dışında malignite varlığı, sistemik hastalık (DM, HT) ve aktif enfeksiyon bulunmasıydı.

Kontrol grubu için dahil edilme kriterleri; 18-70 yaş arası ve kadın cinsiyetti. Dışlama kriterleri ise 18 yaş altı-70 yaş üzeri, erkek cinsiyet, herhangi bir malignite öyküsü, sistemik hastalık (DM, HT) ve aktif enfeksiyon varlığıydı.

Bu proje Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Etik Kurulu'nun 26 Şubat 2013 tarih ve 2013-4/14 sayılı ve 15 Nisan 2014 tarih ve 2014-8/13 sayılı kararları ile onaylanmıştır. Çalışmaya katılmayı kabul eden olgular, araştırma ile ilgili olarak sözel olarak bilgilendirildikten sonra Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'nca onaylanmış olan "Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu" nu doldurulup imzalayarak yazılı onam vermişlerdir.

#### I-B-Örnek Toplanması

Neoadjuvan KT alan hastalardan NGAL, vimentin ve FN bakılmak üzere KT öncesi 5 mL ve KT uygulamasından 7 gün sonra 5 mL, toplam 10 mL; kontrollerden ise 1 kez 5 mL, EDTA içeren tüplere (BD Vacutainer, Plymouth/ABD) kan örnekleri alındı. Alınan kan örnekleri 3000 x rpm'de 10



1 dakika santrifüj edilerek plazmaları ayrıldı ve plazmalar analiz yapılncaya kadar -80°C'de muhafaza edildi.

Hastaların demografik verileri (yaş), rutin biyokimyasal test sonuçları (LDH, PLT, CA 15.3, CA 19.9, CA-125 ve CEA) ve patoloji raporları (histopatolojik tip, Miller Payne KT yanıtı, Bloom-Richardson histolojik grade, hastaliksız sağ kalım, tümör çapı, LN, metastaz, evre, ER, PR, Her-2/neu, BRCA-1, BRCA-2 ve E- kaderin) da toplandı.

Neoadjuvan KT kürü olarak hastalara epirubisin 60 mg/m<sup>2</sup> ve dosetaksol 75 mg/m<sup>2</sup> ilaçları verildi. Üç haftada bir kür tekrarlanmak üzere toplam 6 kür tedavi uygulandı.

## **II- Yöntemler**

**LDH:** Architect C 16000 cihazında (Abbott Diagnostics, Illinois/ABD) fotometrik yöntemle bakıldı.

**Plt:** Architect CELL-DYN 3700 cihazında (Abbott Diagnostics, Illinois/ABD) elektroimpedans yöntemiyle ölçüldü.

**CA 15.3, CA 19.9, CA-125 ve CEA:** Architect i2000 cihazında (Abbott Diagnostics, Illinois/ABD) kemilüminesans yöntemiyle saptandı.

## **Plazma NGAL Düzeylerinin Ölçülmesi**

Plazma NGAL düzeyleri Sandviç tipi Human NGAL ELISA kiti (Sunred Biological technology, Şanghay/Çin) kullanılarak ölçüldü.

## **NGAL Test Prensibi**

İnsan NGAL'ine karşı insan monoklonal antikoruyla kaplanmış kuyucukların üzerine 40 µL numune ve 10 µL biyotinli NGAL antikorunu eklendi. Bu kuyucukların üzerine 50 µL Streptavidin-HRP (Horseradish Peroxidase) eklenerek immün kompleks oluşturuldu. Bir saat 37 °C'de inkübasyon yapıldı. İnkübasyondan sonra 5 kez yapılan yıkama işlemi ile bağlı olmayan konjugatlar uzaklaştırıldı. Daha sonra 50'şer µL kromojen solüsyon A ve B eklendi ve kuyucukların içindeki sıvı maviye döndü. Tekrar 10 dakika 37 °C'de inkübasyon yapıldı. İnkübasyonu takiben oluşan renk reaksiyonu kuyucukların üzerine eklenen 50 µL stop solüsyonu ile durdurularak 450 nm'de absorban ölçüldü. Ölçülen absorban değerleri, standartlar ile

oluşturulan standart eğri grafiği yardımıyla ng/mL değerlerine dönüştürüldü. Böylece numunelerdeki NGAL miktarları ng/mL olarak belirlendi.

### **Plazma Vimentin Düzeylerinin Ölçülmesi**

Plazma vimentin düzeyleri Sandviç tipi Human Vimentin ELISA kiti (Sunred Biological technology, Şanghay/Çin) kullanılarak ölçüldü.

#### **Vimentin Test Prensi**

İnsan vimentinine karşı insan monoklonal antikoruyla kaplanmış kuyucukların üzerine 40 µL numune ve 10 µL biyotinli vimentin antikoruna eklendi. Bu kuyucukların üzerine 50 µL Streptavidin-HRP (Horseradish Peroxidase) eklenerek immün kompleks oluşturuldu. Bir saat 37 °C'de inkübasyon yapıldı. İnkübasyondan sonra 5 kez yapılan yıkama işlemi ile bağlı olmayan konjugatlar uzaklaştırıldı. Daha sonra 50'şer µl kromojen solüsyon A ve B eklendi ve kuyucukların içindeki sıvı maviye döndü. Tekrar 10 dakika 37 °C'de inkübasyon yapıldı. İnkübasyonu takiben oluşan renk reaksiyonu kuyucukların üzerine eklenen 50 µL stop solüsyonu ile durdurularak 450 nm'de absorbans ölçüldü. Ölçülen absorbans değerleri, standartlar ile oluşturulan standart eğri grafiği yardımıyla ng/mL değerlerine dönüştürüldü. Böylece numunelerdeki vimentin miktarları ng/mL olarak belirlendi.

### **Plazma FN Düzeylerinin Ölçülmesi**

Plazma FN düzeyleri Sandviç tipi Human FN ELISA kiti (Sunred Biological technology, Şanghay/Çin) kullanılarak ölçüldü.

#### **Fibronektin Test Prensi**

İnsan FN'ine karşı insan monoklonal antikoruyla kaplanmış kuyucukların üzerine 40 µL numune ve 10 µL biyotinli FN antikoruna eklendi. Bu kuyucukların üzerine 50 µL Streptavidin-HRP (Horseradish Peroxidase) eklenerek immün kompleks oluşturuldu. Bir saat 37 °C'de inkübasyon yapıldı. İnkübasyondan sonra 5 kez yapılan yıkama işlemi ile bağlı olmayan konjugatlar uzaklaştırıldı. Daha sonra 50'şer µL kromojen solüsyon A ve B eklendi ve kuyucukların içindeki sıvı maviye döndü. Tekrar 10 dakika 37 °C'de inkübasyon yapıldı. İnkübasyonu takiben oluşan renk reaksiyonu

kuyucukların üzerine eklenen 50 µL stop solüsyonu ile durdurularak 450 nm'de absorbands ölçüldü. Ölçülen absorbands değerleri, standartlar ile oluşturulan standart eğri grafiği yardımıyla ng/mL değerlerine dönüştürüldü. Böylece numunelerdeki FN miktarları ng/mL olarak belirlendi.

### III- İstatistiksel Analiz

Verilerin istatistiksel analizi SPSS 20.0 ve MedCalc istatistik paket programları kullanılarak yapıldı. Çalışmada yer alan verilerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro Wilk testi ile incelendi. Her bir grup içinde normal dağılım gösteren ardışık ölçümler arasındaki farklılıklar Paired Samples T Test'i (Eşleştirilmiş örneklem t testi) ile normal dağılım göstermeyenler Wilcoxon Signed-Rank Test'i ile analiz edildi. Bağımsız gruplar arasında karşılaştırılan değişkenler için iki grup varsa Mann-Whitney U, ikiden çok grup varsa Kruskal Wallis Analizi yapıldı. Ardışık olarak (1. ve 2. Ölçüme sahip) ölçülen değişkenler için gruplar arası karşılaştırma yapmak amacıyla hem birinci ölçüm değerleri hem de bu iki ölçümden yararlanarak [(2. Ölçüm – 1. Ölçüm)/1. Ölçüm] şeklinde hesaplanan yüzde değişim değerleri Mann-Whitney U ve/ya Kruskal Wallis analizi ile karşılaştırıldı.

Tanımlayıcı istatistikler ortanca (minimum; maksimum) ve ortalama ± standart sapma olarak verildi. Değişkenler arasındaki ilişkiler Spearman Korelasyon katsayısı ile incelendi. Bu çalışmada NGAL, vimentin ve FN'nin meme kanserindeki spesifite-sensitiviteleri ROC eğrileri ile değerlendirildi. Ayrıca ROC eğrileri yardımıyla NGAL, vimentin, FN için hasta ve sağlamları ayıracak geçerli bir cut-off değeri araştırılmıştır. Anlamlılık düzeyi  $p < 0.05$  olarak belirlendi.

## BULGULAR

### Olguların Özellikleri

Çalışmaya alınan kontrol grubu ve neoadjuvan KT alan meme kanseri hastaların özellikleri Tablo-4'de gösterildi. Çalışmaya katılan iki grup arasında yaş açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmadı ( $p=0.158$ ).

**Tablo-4:** Kontrol grubu ve meme kanseri hastaların yaş açısından değerlendirilmesi

	Meme Kanseri Ortalama $\pm$ SS	Kontrol Ortalama $\pm$ SS	p değeri
n (%)	21 (%48.8)	22 (%51.2)	
Yaş	51.9 $\pm$ 11.9	48.1 $\pm$ 3.6	p=0.158

n: hasta sayısı SS: Standart sapma

### Plazma NGAL, Vimentin ve FN Düzeylerinin İki Grupta Karşılaştırılması

Tüm olguların plazma NGAL, FN ve vimentin ölçümleri yapıldı. Elde edilen verilerin ortanca (minimum, maksimum) değerleri Tablo-5'de verildi.

**Tablo-5:** Olguların plazma NGAL, vimentin ve FN ölçümleri

	<b>Meme Kanseri</b>	<b>Kontrol</b>	<b>p değeri</b>
	<b>Ortanca (min; maks)</b>	<b>Ortanca (min; maks)</b>	
<b>N</b>	<b>21</b>	<b>22</b>	
<b>NGAL (ng/mL)</b>	402.4 (60.6; 1569.9)	70.3 (60.8; 140.3)	p< 0.001
<b>Vimentin (ng/mL)</b>	23.1 (16.7; 37.7)	5.1 (2.7; 23.4)	p< 0.001
<b>FN (ng/mL)</b>	97.7 (49.7; 340.6)	30.2 (6.3; 200.1)	p< 0.001

**n:** hasta sayısı **min:** minimum **maks:** maksimum

**NGAL:** Nötrofil jelatinaz ilişkili lipokalin **FN:** Fibronektin

Plazma NGAL, vimentin ve FN düzeyleri açısından meme kanseri hastaları ile kontrol grubu arasında anlamlı farklılık olduğu belirlendi ve bakılan üç parametrenin de meme kanserli hastalarda, kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek olduğu saptandı (p<0.001).

#### **Meme kanseri tanısında plazma NGAL, vimentin ve FN düzeylerinin sensitivite, spesifite ve cut-off değerleri**

Yapılan ROC analizlerine göre meme kanseri tanısında plazma NGAL, vimentin ve FN düzeylerinin, sensitivite, spesifite, pozitif prediktif değer, negatif prediktif değer, EAA ve cut-off değerleri Tablo-6'da verildi.

**Tablo-6:** Plazma NGAL, vimentin ve FN düzeylerinin sensitivite, spesifite ve cut-off değerleri

	<b>Sensitivite (%)</b>	<b>Spesifite (%)</b>	<b>Pozitif prediktif değer (%)</b>	<b>Negatif prediktif değer (%)</b>	<b>EAA</b>	<b>Cut-off değeri</b>
<b>NGAL</b>	90.5	95.4	95.0	91.3	0.91	139.0
<b>Vimentin</b>	95.2	81.8	83.3	94.7	0.88	16.7
<b>FN</b>	95.2	72.7	76.9	94.1	0.83	49.9

EAA: Eğri altında kalan alan

Yapılan incelemeler doğrultusunda, NGAL, vimentin ve FN'nin yüksek sensitivite, spesifite, pozitif ve negatif prediktif değerlere sahip olduğu ve eğri altında kalan alanlarının geniş olduğu bulundu.

## Meme Kanserli Hastalarda KT Öncesi ve Sonrası Belirteçlerin Karşılaştırılması

Meme kanseri tanısı alan hastalardan tedavi öncesi ve 1. KT küründen 7 gün sonra olmak üzere iki kez kan örnekleri alındı. Alınan kanlardan NGAL, vimentin, FN, LDH, PLT, CA 15.3, CA 19.9, CEA, CA-125 parametreleri çalışılarak KT öncesi ve sonrası değerler karşılaştırıldı (Tablo-7).

**Tablo-7:** Meme kanserli hastalarda KT öncesi ve sonrası bakılan belirteçlerin karşılaştırılması

n= 21	KT öncesi Ortanca (min;maks)	KT sonrası Ortanca (min;maks)	p değeri
NGAL (ng/mL)	402.4 (60.6; 1569.9)	309.2 (60.2; 1104.2)	p= 0.008
Vimentin (ng/mL)	23.1 (16.7; 37.7)	13.1 (2.5; 36.5)	p< 0.001
FN (ng/mL)	97.7 (49.7; 340.6)	23.1 (16.8; 37.7)	p= 0.001
LDH (IU/L)*	197.6 ± 51.7	189.7 ± 30.3	p= 0.515
PLT (K/μL)	293.0 (207.0; 770.0)	166.0 (125.0; 401.0)	p< 0.001
CA15.3 (U/mL)	32.3 (11.0; 531.9)	20.0 (7.4; 625.0)	p= 0.008
CA 19.9 (U/mL)	9.0 (2.0; 37.0)	7.0 (2.0; 44.0)	p=0.505
CEA (ng/mL)	3.5 (0.9; 51.3)	2.4 (0.9; 6.3)	p=0.035
CA-125 (U/mL)	13.6 (6.9; 123.0)	12.3 (5.3; 47.3)	p= 0.118

\*Normal dağılım gösteren verilen için ortalama ± SS

n: hasta sayısı KT: Kemoterapi CA 15-3: Karbonhidrat Antijen 15-3

CA 19-9: Karbonhidrat Antijen 19-9 CA-125: Karbonhidrat Antijen-125

CEA: Karsino Embriyonik Antijen LDH: Laktat dehidrogenaz PLT: Trombosit

Meme kanserli hastalarda KT kr öncesi ve sonrasında llen NGAL, vimentin, FN, PLT, CA 15.3, CEA değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu; CA 19.9, CA-125, LDH değerleri arasında ise istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı saptandı.

### **Meme Kanserli Hastalarda Plazma NGAL Düzeylerinin Prognozla İlişkisi**

Meme kanserli hastalarda plazma NGAL düzeylerinin; LN, tümör çapı, metastaz, evre, Bloom–Richardson histolojik grade, hastalıksız sağ kalmı, histolojik grup, ER, PR, Her-2/neu, BRCA 1-2, E-kaderin, p53, Ki-67 skoru, Miller Payne KT yanıtı gibi parametrelerle ilişkisine bakıldı (Tablo-8).



**Tablo-8:** Meme kanserli hastalarda plazma NGAL düzeylerinin prognostik belirteçlerle ilişkisi

Parametre	Grup	n	NGAL (ng/mL) Ortanca (min; maks)	p değeri
LN	Pozitif	18	402.98 (62.2; 1570.0)	p= 0.262
	Negatif	3	242.0 (60.6; 516.3)	
Tümör çapı	T1	4	304.4 (60.6; 801.3)	p= 0.221
	T2	5	516.3 (343.3; 809.4)	
	T3	5	482.3 (226.4; 1570.0)	
	T4	7	401.9 (62.2; 434.1)	
Metastaz	Pozitif	3	434.1 (401.9; 1570.0)	p= 0.307
	Negatif	18	395.1 (60.6; 809.4)	
Evre	Evre 1*	2	151.3 (60.6; 242.0)	p= 0.192
	Evre 2	5	516.3 (343.3; 809.4)	
	Evre 3	11	387.7 (62.2; 801.3)	
	Evre 4	3	434.1 (401.9; 1570.0)	
Bloom-Richardson histolojik grade	Grade 1	4	498.5 (60.6; 612.6)	p= 0.820
	Grade 2	16	394.8 (62.2; 1570.0)	
	Grade 3*	1	340.6	
1 yıllık Hastalıksız sağ kalım	Hastalıksız	17	387.7 (60.6; 809.4)	p= 0.362
	Nüks	4	418.3 (401.9; 1570.0)	
Histolojik grup	Duktal karsinom	12	377.2 (62.2; 801.3)	p= 0.247
	Diğerleri	9	434.1 (60.6; 1570.0)	
ER	Pozitif	18	403.0 (60.6; 1570.0)	p= 0.600
	Negatif	3	353.1 (242.0; 516.3)	
PR	Pozitif	14	403.0 (60.6; 809.4)	p= 0.856
	Negatif	7	401.9 (242.0; 1570.0)	
Her-2/neu	Pozitif	3	401.9 (366.8; 801.3)	p= 0.740
	Negatif	18	403.0 (60.6; 1570.0)	
BRCA 1 ve 2	Pozitif	3	403.5 (343.3; 741.9)	p= 0.814
	Negatif	18	402.1 (60.6; 1570.0)	
E-kaderin*	Pozitif	19	401.9 (60.6; 1570.0)	p*
	Negatif*	2	711.0 (612.6; 809.4)	
p53	Pozitif	15	403.5 (60.6; 1570.0)	p= 0.910
	Negatif	6	395.1 (248.0; 612.6)	
Ki-67 skoru	0-100	10	377.7 (60.6; 809.4)	p= 0.481
	101-500	10	418.8 (62.2; 1570.0)	
	501-1000*	1	401.9	
Miller Payne KT yanıtı	Grade 1*	0	-	p= 0.438
	Grade 2	3	402.4 (401.9; 1570.0)	
	Grade 3	9	480.6 (60.6; 809.4)	
	Grade 4	6	348.2 (226.4; 434.1)	
	Grade 5	3	516.3 (62.2; 741.9)	

\*n < 3 olan gruplarda istatistiksel analiz yapılamamıştır **LN:** Lenf nodu

**ER:** Östrojen Reseptör **PR:** Progesteron reseptör **Her-2/neu:** Human epidermal growth factor receptor 2 **BRCA 1 ve 2:** Breast Cancer Resistance Protein 1 ve 2

Meme kanserli hastalarda LN, tümör çapı, metastaz, evre, Bloom–Richardson histolojik grade, hastaliksız sağ kalım, histolojik grup, ER, PR, Her-2/neu, BRCA 1-2, E-kaderin, p53, Ki-67 skoru, Miller Payne KT yanıtı gibi parametrelerdeki plazma NGAL ölçümlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı.

### **Meme Kanserli Hastalarda Plazma Vimentin Düzeylerinin Prognozla İlişkisi**

Meme kanserli hastalarda plazma vimentin düzeylerinin; LN, tümör çapı, metastaz, evre, Bloom–Richardson histolojik grade, hastaliksız sağ kalım, histolojik grup, ER, PR, Her-2/neu, BRCA 1-2, E-kaderin, p53, Ki-67 skoru, Miller Payne KT yanıtı gibi parametrelerle ilişkisi incelendi (Tablo-9).

**Tablo-9:** Meme kanserli hastalarda plazma vimentin düzeylerinin prognostik belirteçlerle ilişkisi

Parametre	Grup	n	Vimentin (ng/mL) Ortanca (min; maks)	p değeri
LN	Pozitif	18	23.8 (18.1; 37.7)	p= 0.062
	Negatif	3	17.7 (16.8; 23.1)	
Tümör çapı	T1	4	20.6 (16.8; 30.8)	p= 0.275
	T2	5	26.5 (22.2; 37.5)	
	T3	5	20.6 (18.1; 36.9)	
	T4	7	24.0 (19.9; 37.7)	
Metastaz	Pozitif	3	24.0 (21.4; 36.9)	p= 0.600
	Negatif	18	22.7 (16.8; 37.7)	
Evre	Evre 1*	2	17.2 (16.8; 17.7)	p= 0.387
	Evre 2	5	26.5 (22.3; 37.5)	
	Evre 3	11	22.3 (18.1; 37.7)	
	Evre 4	3	24.0 (21.4; 36.9)	
Bloom-Richardson histolojik grade	Grade 1	4	20.9 (16.8; 26.5)	p= 0.290
	Grade 2	16	22.9 (17.7; 37.5)	
	Grade 3*	1	37.7	
1 yıllık Hastaliksız sağ kalım	Hastaliksız	17	23.1 (16.8; 37.7)	p= 1.000
	Nüks	4	22.7 (19.9; 36.9)	
Histolojik grup	Duktal karsinom	12	22.3 (17.7; 37.5)	p= 0.422
	Diğerleri	9	26.5 (16.7; 37.7)	
ER	Pozitif	18	22.9 (16.8; 37.7)	p= 0.740
	Negatif	3	23.1 (17.7; 27.6)	
PR	Pozitif	14	23.8 (16.8; 37.7)	p= 0.488
	Negatif	7	22.1 (17.7; 36.9)	
Her-2/neu	Pozitif	3	23.6 (21.4; 30.8)	p= 0.814
	Negatif	18	22.7 (16.8; 37.7)	
BRCA 1 ve 2	Pozitif	3	37.5 (22.3; 37.7)	p= 0.080
	Negatif	18	22.7 (16.8; 36.9)	
E-kaderin*	Pozitif	19	23.1 (16.8; 37.7)	p*
	Negatif*	2	26.2 (18.6; 33.8)	
p53	Pozitif	15	26.5 (16.8; 37.7)	p= 0.095
	Negatif	6	21.4 (18.6; 23.1)	
Ki-67	0-100	10	22.2 (16.8; 37.5)	p= 0.315
	101-500	10	23.8 (18.1; 37.7)	
	501-1000*	1	21.4	
Miller Payne KT yanıtı	Grade 1*	0	-	p= 0.481
	Grade 2	3	21.4 (20.0; 36.9)	
	Grade 3	9	20.6 (16.8; 37.5)	
	Grade 4	6	23.2 (22.1; 37.7)	
	Grade 5	3	27.0 (23.1; 30.8)	

\*n < 3 olan gruplarda istatistiksel analiz yapılamamıştır

Meme kanserli hastalarda LN, tümör çapı, metastaz, evre, Bloom–Richardson histolojik grade, hastaliksız sağ kalım, histolojik grup, ER, PR, Her-2/neu, BRCA 1-2, E-kaderin, p53, Ki-67 skoru, Miller Payne KT yanıtı gibi parametrelerdeki plazma vimentin ölçümlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığı görüldü.

### **Meme Kanserli Hastalarda Plazma FN Düzeylerinin Prognozla İlişkisi**

Meme kanserli hastalarda plazma FN düzeylerinin; LN, tümör çapı, metastaz, evre, Bloom–Richardson histolojik grade, hastaliksız sağ kalım, histolojik grup, ER, PR, Her-2/neu, BRCA 1-2, E-kaderin, p53, Ki-67 skoru, Miller Payne KT yanıtı gibi parametrelerle ilişkisi araştırıldı (Tablo-10).

**Tablo-10:** Meme kanserli hastalarda plazma FN düzeylerinin prognostik belirteçlerle ilişkisi

Parametre	Grup	n	FN (ng/mL) Ortanca (min; maks)	p değeri
LN	Pozitif	18	98.3 (49.8; 340.6)	p= 0.356
	Negatif	3	78.3 (58.0; 109.2)	
Tümör çapı	T1	4	93.8 (62.5; 142.9)	p= 0.886
	T2	5	82.2 (50.9; 138.0)	
	T3	5	88.2 (75.6; 338.2)	
	T4	7	98.8 (49.8; 340.6)	
Metastaz	Pozitif	3	97.7 (91.3; 338.2)	p= 0.471
	Negatif	18	93.5 (49.8; 340.6)	
Evre	Evre 1*	2	93.8 (78.3; 109.2)	p= 0.595
	Evre 2	5	82.2 (50.9; 138.0)	
	Evre 3	11	98.8 (49.8; 340.6)	
	Evre 4	3	97.7 (91.3; 338.2)	
Bloom-Richardson histolojik grade	Grade 1	4	76.9 (58.0; 125.4)	p= 0.290
	Grade 2	16	98.2 (49.8; 338.2)	
	Grade 3*	1	340.6	
1 yıllık Hastalıklı sağ kalım	Hastalıklı	17	98.8 (50.9; 340.6)	p= 0.897
	Nüks	4	94.5 (49.8; 338.2)	
Histolojik grup	Duktal karsinom	12	89.8 (50.9; 142.9)	p= 0.382
	Diğerleri	9	118.1 (49.8; 340.6)	
ER	Pozitif	18	94.5 (49.8; 340.6)	p= 0.962
	Negatif	3	109.2 (58.0; 118.1)	
PR	Pozitif	14	93.0 (49.8; 340.6)	p= 0.913
	Negatif	7	98.8 (58.0; 338.1)	
Her-2/neu	Pozitif	3	91.3 (62.5; 142.9)	p= 1.000
	Negatif	18	98.3 (49.8; 340.6)	
BRCA 1 ve 2	Pozitif	3	82.2 (50.9; 340.6)	p= 0.887
	Negatif	18	98.3 (49.8; 338.2)	
E-kaderin*	Pozitif	19	97.7 (49.8; 340.6)	p*
	Negatif*	2	106.8 (75.6; 138.0)	
p53	Pozitif	15	109.2 (50.9; 340.6)	p= 0.018
	Negatif	6	78.4 (49.8; 98.8)	
Ki-67	0-100	10	104.0 (49.8; 138.7)	p= 0.739
	101-500	10	93.0 (58.0; 340.6)	
	501-1000*	1	91.3	
Miller Payne KT yanıtı	Grade 1*	0	-	p= 0.445
	Grade 2	3	91.3 (49.8; 338.2)	
	Grade 3	9	81.3 (50.9; 138.0)	
	Grade 4	6	108.5 (82.2; 340.6)	
	Grade 5	3	108.7 (58.0; 125.4)	

\*n < 3 olan gruplarda istatistiksel analiz yapılamamıştır

Meme kanserli hastalarda LN, tümör çapı, metastaz, evre, Bloom–Richardson histolojik grade, hastaliksız sağ kalım, histolojik grup, ER, PR, Her-2/neu, BRCA 1-2, E-kaderin, Ki-67 skoru, Miller Payne KT yanıtı gibi parametrelerdeki plazma FN ölçümlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı. P53 pozitif ve negatif meme kanserli hastalardaki FN ölçümleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulundu.

## Korelasyon İncelemeleri

### Meme Kanserli Hastaların KT Kürü Öncesinde Ölçülen Parametreler Arasındaki Korelasyon

Meme kanserli hastalardan KT kürü öncesinde alınan kanlarından ölçülen NGAL, vimentin, FN, LDH, PLT, CA 15-3, CA 19.9, CEA ve CA-125 parametreleri arasındaki ilişki Spearman korelasyon katsayısı kullanılarak incelendi (Tablo-11).

**Tablo-11:** Meme kanserli olgulardaki KT öncesi korelasyon değerleri

n=21	Vimentin	FN	LDH	PLT	CA 15-3	CA 19.9	CEA	CA- 125
<b>NGAL</b>	r= 0.468 p= 0.033	r= 0.083 p= 0.720	r= 0.121 p=0.602	r= -0.092 p= 0.691	r= 0.409 p= 0.066	r= 0.012 p= 0.958	r= 0.373 p= 0.096	r= 0.301 p= 0.185
<b>Vimentin</b>	-	r= 0.478 p= 0.028	r= 0.043 p= 0.854	r= 0.244 p= 0.286	r= 0.064 p= 0.784	r= 0.258 p= 0.259	r= 0.271 p= 0.234	r= 0.356 p= 0.113
<b>FN</b>	-	-	r= 0.262 p=0.252	r= 0.278 p= 0.223	r= 0.077 p= 0.741	r= -0.125 p=0.589	r= 0.436 p= 0.048	r= 0.207 p= 0.367
<b>LDH</b>	-	-	-	r=- 0.161 p= 0.485	r= 0.145 p= 0.531	r= -0.021 p= 0.927	r= 0.418 p= 0.059	r= -0.098 p= 0.672
<b>PLT</b>	-	-	-	-	r= 0.140 p= 0.544	r= 0.007 p= 0.975	r= -0.112 p=0.630	r= 0.151 p= 0.513
<b>CA 15.3</b>	-	-	-	-	-	r= -0.248 p= 0.279	r= 0.366 p= 0.103	r= -0.008 p= 0.971
<b>CA 19.9</b>	-	-	-	-	-	-	r= -0.329 p= 0.145	r= -0.131 p= 0.571
<b>CEA</b>	-	-	-	-	-	-	-	r= 0.164 p= 0.477

Tablo-11’de meme kanserli olgulardaki KT öncesi ölçülen parametrelerden NGAL ile vimentin, vimentin ile FN ve FN ile CEA arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif korelasyon saptandı. Diğer parametreler arasında ise istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon olmadığı bulundu.

### Meme Kanserli Hastaların KT Kürü Sonrasında Ölçülen Parametreler Arasındaki Korelasyon

Meme kanserli hastalardan 1. KT kürü sonrasında alınan örneklerden NGAL, vimentin, FN, LDH, PLT, CA 15-3, CA19.9, CEA ve CA-125 parametreleri çalışıldı. Her bir belirteç için KT sonrası ölçüm ile KT öncesi ölçüm arasında oluşan yüzde değişim değerleri belirlenerek, parametreler arasındaki ilişki Spearman korelasyon katsayısı kullanılarak incelendi (Tablo-12).

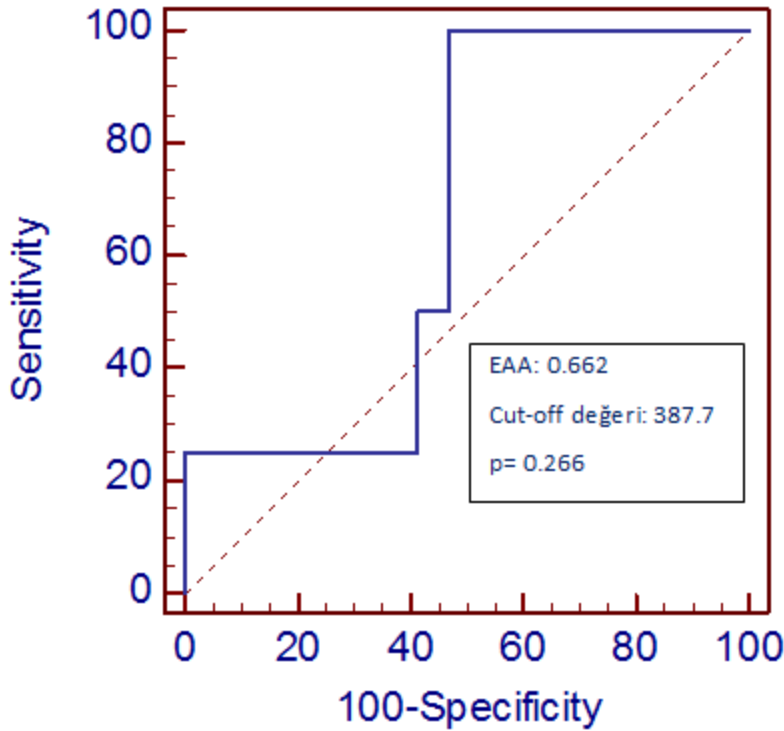
**Tablo-12:** Meme kanserli olgulardaki KT sonrası korelasyon değerleri

n=21	Vimentin	FN	LDH	PLT	CA 15-3	CA 19.9	CEA	CA- 125
<b>NGAL</b>	r= -0.064 p= 0.784	r= 0.044 p= 0.849	r= 0.195 p=0.397	r= 0.170 p= 0.461	r= -0.064 p= 0.784	r= -0.334 p= 0.139	r= 0.127 p= 0.584	r= -0.075 p= 0.746
<b>Vimentin</b>	-	r= 0.279 p= 0.220	r= -0.103 p= 0.654	r= 0.461 p= 0.035	r= -0.109 p= 0.638	r= 0.238 p= 0.298	r= -0.216 p= 0.346	r= -0.301 p= 0.184
<b>FN</b>	-	-	r= 0.022 p= 0.924	r= 0.160 p= 0.489	r= -0.304 p= 0.180	r= 0.125 p=0.590	r= -0.153 p= 0.507	r= 0.114 p= 0.622
<b>LDH</b>	-	-	-	r= -0.400 p= 0.072	r= -0.032 p= 0.889	r= -0.301 p= 0.185	r= 0.360 p= 0.109	r= 0.218 p= 0.342
<b>PLT</b>	-	-	-	-	r= -0.094 p= 0.687	r= -0.214 p= 0.351	r= -0.245 p=0.285	r=-0.165 p= 0.475
<b>CA 15.3</b>	-	-	-	-	-	r= 0.094 p= 0.685	r= 0.435 p= 0.049	r= 0.301 p= 0.184
<b>CA 19.9</b>	-	-	-	-	-	-	r= -0.042 p= 0.856	r= -0.042 p= 0.858
<b>CEA</b>	-	-	-	-	-	-	-	r= 0.594 p= 0.005

Tablo-12’de meme kanserli olgulardaki KT sonrası ve öncesi parametrelerde oluşan yüzde değişimler arası korelasyon incelendiğinde; vimentin ile PLT, CEA ile FN ve CA 15.3 arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif korelasyon olduğu bulundu. Diğer parametreler arasında ise istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon olmadığı saptandı.

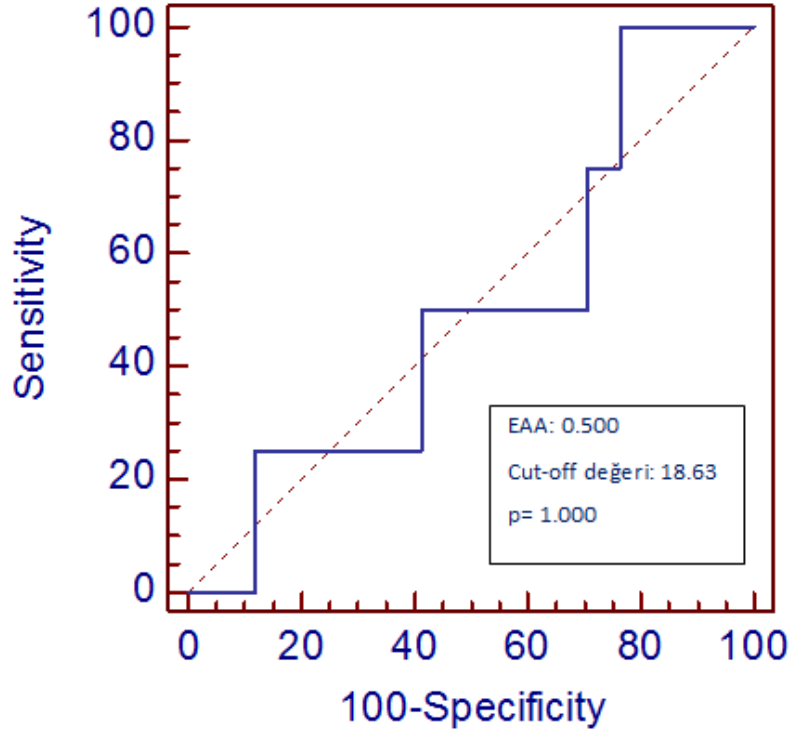
### **Meme Kanserli Hastalarda Hastaliksız Sağ Kalımı Öngörmeye Plazma NGAL, Vimentin ve FN Değerleri**

Meme kanserli 21 hastanın 1 yıllık takipleri sonunda; 4 olguda nüks geliştiği 17 olgunun ise hastaliksız olduğu saptandı. Hastaliksız sağ kalımın tanı anında öngörülmesi amacıyla yapılan ROC analizlerine göre meme kanserli hastalardaki plazma NGAL, vimentin, FN düzeylerinin cut-off, eğri altında kalan alan (EAA), sensitivite ve spesifite değerleri incelendi (Şekil-6,7,8).

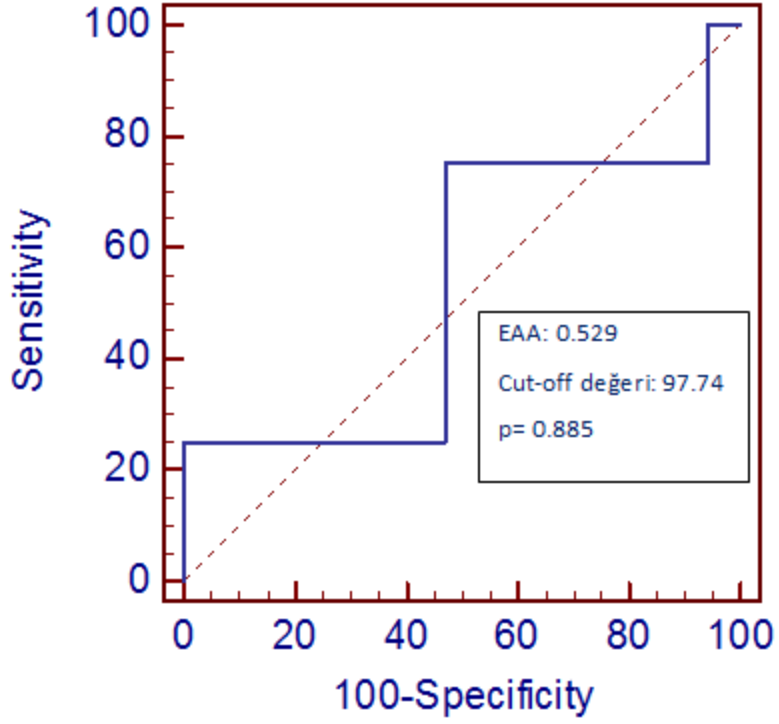


**Şekil-6:** Meme kanseri hastalarında hastaliksız sağ kalımı öngörmeye plazma NGAL değerleri





**Şekil-7:** Meme kanseri hastalarında hastalısız sağ kalımı öngörmeye plazma vimentin değerleri



**Şekil-8:** Meme kanseri hastalarında hastalıksız sağ kalımı öngörmeye plazma FN değerleri

Plazma NGAL, vimentin, FN düzeyleri kullanılarak çizilen ROC analizleri incelendiğinde (Şekil-6,7,8); hastalıksız sağ kalımı öngörmeye, üç parametreye de nüks olan olgular ile hastalıksız olgular arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı.

## TARTIŞMA VE SONUÇ

Meme kanseri, deri kanserleri hariç tutulursa dünyada kadınlar arasında en sık görülen malign tümör olup, kadınlarda görülen tüm kanserlerin önemli bir kısmını oluşturmaktadır (1). Meme kanserindeki ölüm oranları son yıllarda erken tanı ve tedavideki gelişmelere bağlı olarak azalma göstermektedir (3). Tüm kanserlerde olduğu gibi meme kanserinde de erken tanı, uygulanan tedavinin etkinliği ve hastalısız sağkalım ve survi açısından çok önemlidir. Meme kanseri tanısındaki gelişmelere ve moleküler temelinin anlaşılması olmasına rağmen meme kanserinde tanı erken dönemde konulamamakta ve mortalite oranları oldukça yüksek seyretmektedir.

Tümör belirteçleri kanser tanısında, prognozu belirlemede, tedaviyi takipte ve nüksün saptanmasında sıklıkla kullanılmaktadırlar. Meme kanserinde de bu amaçlarla CA 15-3, CEA, CA 19-9, CA-125, CA-549 gibi tümör belirteçleri uzun yıllardır kullanılmaktadır (58-62).

Ancak meme kanserinde kullanılan bu tümör belirteçleri erken tanı ve tedaviye yanıtı öngörmeye yetersiz kalmaktadır. Araştırmacılar tarafından, meme kanserinde kullanılacak yeni belirteçler bulma arayışı devam etmektedir. Tümör belirteci olarak kullanılacak belirteçten analitik beklentiler; non-invaziv ve kolayca elde edilen kan veya idrar gibi örneklerde, yatak başında veya standart klinik laboratuvarlarda uygulanabilir, yüksek duyarlılıkta olup erken teşhisi kolaylaştırılmalıdır.

Biz bu çalışmada meme kanserli hastalarda plazma NGAL, vimentin ve FN plazma düzeylerini ELISA ile ölçtük. Rutin laboratuvarlarda bu parametrelerin meme kanserli hastaların tanısında, KT'ye yanıtı öngörmeye ve prognoz ile ilişkisini değerlendirmede, klinisyenlere yardımcı birer parametre olarak kullanılabilirliğini değerlendirmeyi amaçladık.

Lipokalin protein ailesinin bir üyesi olan nötrofil jelatinaz ilişkili lipokalin (NGAL), küçük ve hidrofobik molekülleri bağlama özelliği olan ve hücre homeostazında rol oynayan ekstraselüler proteinlerdendir (64). NGAL proteininin; kalp yetmezliği, ateroskleroz, böbrek yetmezliği, inflamatuvar

hastalıklar, metabolik hastalıklar, malignite ile ilişkili olduğu ve bu hastalıklarda ekspresyonunun değiştiği saptanmıştır (85-90).

Yapılan çalışmalarda NGAL ekspresyonunun sindirim (özofagus, mide, karaciğer, safra kesesi ve pankreas), solunum (akciğer), endokrin (tiroid ve over), üreme (meme ve endometrium) ve deri olmak üzere çeşitli organlardaki solid tümörlerde ve KML, ALL, AML gibi hematolojik kanserlerde uyarıldığını, ayrıca bazı kanserlerde NGAL düzeyleriyle sağkalım, hastalık düzeyi ve prognoz arasında korelasyon olduğu saptanmıştır (92-98).

Biz çalışmamızda tanı anında meme kanserli hastalarda sağlıklı kontrollere göre plazma NGAL düzeylerinin anlamlı olarak yüksek olduğunu belirledik. Meme kanserli hastaların KT öncesi ve 1.KT kürü sonrasındaki plazma NGAL sonuçlarını değerlendirdiğimizde; KT tedavisi ile plazma NGAL sonuçlarının istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gösterdiğini saptadık. Ayrıca meme kanserli hastalarda LN, tümör çapı, metastaz, evre, Bloom–Richardson histolojik grade, hastaliksız sağ kalım, histolojik grup, ER, PR, Her-2/neu, BRCA 1-2, E-kaderin, p53, Ki-67 skoru, Miller Payne KT yanıtı gibi prognostik belirteçlerdeki plazma NGAL ölçümlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığını gördük.

NGAL proteininin meme kanseri progresyonunda aktif olarak yer aldığı düşünülmektedir (101). Meme kanseri hücre dizileri ve primer kanser örneklerinde NGAL düzeyleri yüksek saptanmıştır (103). Ayrıca aktif proliferasyon olan hücrelerde, lenf nodu metastazında ve HER-2 pozitif hücrelerde NGAL seviyeleri oldukça yüksek saptandığı için NGAL'in meme kanseri ilerlemesini de arttırdığı düşünülmektedir. (104).

Provatopoulou ve ark. (106), yaptıkları çalışmada, invaziv duktal meme karsinomu olan kadınlarda kontrol ile karşılaştırıldığında serumda belirgin MMP-9, NGAL ve MMP-9/NGAL artışı saptamışlardır. Ayrıca serum NGAL ölçümlerinin meme kanseri tanısında ve progresyonunun izlenmesinde potansiyel bir belirteç olarak kullanılabileceğini belirtmişlerdir (106).

Bauer ve ark. (103), yaptıkları çalışmada; doku NGAL ekspresyonunun; negatif hormon reseptör durumu, Her-2/neu artmış ekspresyonu, yüksek histolojik grade, lenf nodu metastazı ve yüksek

proliferasyon indeksi, artmış mortalite ve azalmış hastaliksız sağ kalım ile ilişkili olduğunu bulmuşlardır.

Mezenkimal hücrelerin ana iskelet bileşeni olan vimentin, proteinlerin tip III ara filaman ailesinin bir üyesidir. Vimentin 57 kDa ağırlığında olup, ilk olarak fare fibroblast kültürlerinde izole edilmiş bir proteindir. Vimentin; bağ dokusu mezenkimal hücreleri, merkezi sinir sistemi, kas dokusu, pankreas prekürsör hücreleri, sertoli hücreleri, nöronal prekürsör hücreler, trofoblastik hücreler, fibroblastlar, renal tübüler ve stromal hücreler, makrofajlar, nötrofiller, lökositler, mesangial hücreleri içeren oldukça geniş hücre tipinde eksprese edilmektedir (112-114).

Vimentin sitozolde organellerin desteklenmesi ve konumlarını sabitlemede ve hücrenin dinamik yapısı içerisinde hücreye esneklik sunmaktadır (128). Vimentin, hem normal gelişim hem de metastatik süreç sırasında, mezenkimal kaynaklı ya da EMT sürecindeki hücreler için bir belirteç olarak kullanılmaya başlanmasıyla birlikte daha önemli hale gelmiştir (130).

Normal ve kanserli dokularda vimentin ekspresyonunun incelenmesi sonucunda prostat, GİS, akciğer, meme, kranial sistem kanserleri ve MM gibi birçok kanserin tanısı ve prognozu açısından vimentin düzeylerinin bakılmasının yararlı olabileceği yönünde sonuçlar ortaya konmuştur (134-139).

Çalışmamızda tanı anında meme kanserli hastalarda plazma vimentin sonuçlarının sağlıklı kontrollere göre anlamlı olarak yüksek olduğunu saptadık. Meme kanserli hastaların KT öncesi ve 1.KT kürü sonrasındaki plazma vimentin sonuçlarını incelediğimizde; KT tedavisi sonrasında plazma vimentin sonuçlarının KT öncesine göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gösterdiğini bulduk. Ayrıca meme kanserli hastalarda LN, tümör çapı, metastaz, evre, Bloom–Richardson histolojik grade, hastaliksız sağ kalım, histolojik grup, ER, PR, Her-2/neu, BRCA 1-2, E-kaderin, p53, Ki-67 skoru, Miller Payne KT yanıtı gibi prognostik belirteçlerdeki plazma vimentin ölçümlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığını gördük.

Meme karsinomlarında vimentin ekspresyonunun değiştiği ilk kez Rayond ve ark. tarafından gösterilmiştir (157). Ancak meme kanserli hastalardaki vimentin ekspresyonunun değerlendirilmesi sıklıkla immunohistokimyasal olarak yapılmaktadır ve meme kanserli hastalardaki plazma vimentin düzeyleri ile ilgili yeterli çalışma yoktur.

Korsching ve ark. (159), vimentin ekspresyonunun özellikle agresif meme kanseri hücre dizilerinde yüksek olduğunu ve bu artmış ekspresyonun artmış invazyon ve migrasyon ile ilişkili olduğunu bulmuşlardır.

Essa ve ark.' da (158), yapmış oldukları doku çalışmasında özellikle yüksek gradeli meme kanserli hastalarda vimentin pozitiflik oranlarının düşük gradelilere göre anlamlı olarak yüksek olduğunu saptamışlardır.

Heatley ve ark. da (160), meme kanserli hastalarda prognostik belirteçler olan histolojik grade, tümör çapı ve metastatik lenf nodu sayısı artıkça vimentin ekspresyonunun arttığını ifade etmişlerdir.

Thompson ve ark. da (162), memenin invazif duktal karsinomlarında dokuda artmış vimentin ekspresyonlarını düşük östrojen ve progesteron resptr, artmış invazyon kapasitesi ve ilaç direnci ile ilişkili bulmuşlardır.

Ancak Hücümenoğlu ve ark.' nın (163), yaptığı çalışmada ise bizim bulgularımızla benzer olacak şekilde meme kanserli hastaların doku vimentin ekspresyonu ile histolojik grade ve aksiller LN durumu arasında bir ilişki izlenmemiştir.

Fibronektin 1980'lerden itibaren tam olarak tanımlanmış, molekül ağırlığı 440-550 kDa olan plazma proteindir (164). Embriyogenezis, onkojenik transformasyon, hücre adezyonu, yara iyileşmesi, doku tamiri, trombosit fonksiyonları, hücre migrasyonunun düzenlenmesi gibi olaylarda Fn'nin önemli roller aldığı bulunmuştur.

Epitelyal kanser hücrelerinde EMT sürecinde ekspresyonu artan FN, vimentinde olduğu gibi kanserdeki EMT fenotipinin saptanması için mezenkimal belirteç olarak kullanılmaktadır (181). Ayrıca ECM komponentleri arasından FN'nin, hücre adezyonu ve göçünü arttırmada anahtar role sahip olduğu kabul edilmektedir (182). Fibronektinin hücre adezyonu, migrasyon, diferansiasyon, proliferasyon, hücreler arası sinyal iletiminin kontrol edilmesi

ve onkojenik dönüşümünde rol oynadığı saptanmıştır (183). Meme kanseri, akciğer kanseri, tiroid kanseri ve kolon kanseri gibi çeşitli kanserlerde ve malign asit varlığında FN ekspresyonlarının değiştiği gösterilmiştir (185-188,191).

Çalışmamızda tanı anında meme kanserli hastalarda plazma FN sonuçlarının da sağlıklı kontrollere göre anlamlı olarak yüksek olduğunu saptadık. Meme kanserli hastaların KT öncesi ve 1.KT kürü sonrasındaki plazma FN sonuçlarını incelediğimizde; KT tedavisi sonrasında plazma FN değerlerinin KT öncesine göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gösterdiğini gördük. Ayrıca meme kanserli hastalarda LN, tümör çapı, metastaz, evre, Bloom–Richardson histolojik grade, hastaliksız sağ kalım, histolojik grup, ER, PR, Her-2/neu, BRCA 1-2, E-kaderin, Ki-67 skoru, Miller Payne KT yanıtı gibi prognostik belirteçlerdeki plazma FN ölçümlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığını gördük. P53 pozitif meme kanserli hastalardaki FN ölçümlerinin ise negatif hastalara göre anlamlı yüksek olduğunu saptadık. Meme kanserinde p53 durumu ile fibronektin arasındaki ilişkiyi inceleyen mevcut bir çalışma yoktur.

Meme kanserindeki FN ekspresyonları ile ilgili bugüne kadar yapılan çalışmalarda çelişkili sonuçlar ortaya konulmuştur. Öztürk ve ark. (194), yaptıkları çalışmada plazma fibronektin düzeylerinin meme kanserli hastalarda kontrol grubuna göre düşük olduğunu saptamışlardır. Ruiz- Garcia ve ark. (185), ise 2010 yılında yaptıkları çalışmada bizim çalışmamızla benzer olarak, serum fibronektin düzeylerinin meme kanserli hastalarda sağlıklı kontrollere göre anlamlı yüksek olduğunu bulmuşlardır.

Meme kanserinde FN ekspresyonunun prognostik önemini araştıran çalışmalarda da farklı sonuçlar bulunmuştur.

Christensen ve ark. (200), FN pozitif boyanma gösteren meme kanseri dokularının, azalmış metastatik potansiyel ile anlamlı ilişki gösterdiğini bildirmişlerdir.

Gorczyca ve ark. (201), FN ekspresyonu ile tümör çapı, ortalama sağkalım ve hastaliksız sağkalım arasında pozitif bir korelasyon saptarken, LN durumu ve klinik sonuçlar ile korelasyon saptamamışlardır.

loachim ve ark. (183), FN ekspresyonu ile LN metastazı, Ki-67 indeksi, stromal katepsin D ekspresyonu ve kötü prognoz arasında pozitif bir ilişki saptamışlardır.

Meme kanseri çalışmalarında FN ekspresyonu ile prognoz arasında ortaya çıkan bu farklılıklar; örnek sayısı, olguların heterojenliği, tercih edilen yöntemdeki preanalitik ve analitik farklılıklar ve yöntem sonuçlarının farklı yorumlanmasından kaynaklanıyor olabilir.

Çalışmamızda plazma NGAL, vimentin ve FN belirteçlerinin meme kanseri tanısında yüksek sensitivite ve spesifite değerlerine sahip olduğunu saptadık.

Qiu ve ark. (203), yaptıkları çalışmada meme kanseri tanısında doku NGAL düzeylerinin %78 sensitivite, %83 spesifiteye sahip olduğunu saptamışlardır. Tsang ve ark. (204), meme kanserli hastalarda yaptıkları doku çalışmasında, tanı açısından doku vimentin düzeylerinin %50 sensitivite ve %88.6 spesifiteye sahip olduğunu saptamışlardır. Plazma NGAL ve vimentin düzeyleri ile ilgili meme kanseri hastalarında sensitivite ve spesifite çalışması mevcut değildir. Ruiz Garcia ve ark. (185), yaptıkları çalışmada plazma FN düzeylerinin %75 sensitivite ve %80 spesifite ile meme kanseri tanısında kullanılabileceğini belirtmişlerdir.

Çalışmamızdaki korelasyon incelemesinde; meme kanserli olgulardaki KT öncesi ölçülen parametrelerden NGAL ile vimentin, vimentin ile FN ve FN ile CEA arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif korelasyon saptarken, diğer parametreler arasında ise istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon olmadığını bulduk.

Yang ve ark. da (101), meme kanseri hücre dizilerinde yaptıkları çalışmada NGAL'in vimentin ekspresyonunu arttırdığını ve NGAL inhibisyonu ile vimentin ekspresyonunun azaldığını saptamışlardır. Mezenkimal belirteç olarak kabul edilen vimentin ve FN'nin EMT sürecinde rol oynadıkları saptanmıştır (130,181). Javle ve ark. (205), pankreas kanserli hasta dokularında EMT belirteci olarak FN ve vimentin ekspresyonlarını incelediklerinde iki belirteç arasında anlamlı bir ilişki saptamışlardır. Meme kanserli hastalarda FN ve CEA arasındaki ilişkiyi inceleyen mevcut bir



çalışma yoktur.

Kemoterapi sonrası ve öncesi parametrelerde oluşan yüzde değişimler arası korelasyon incelendiğinde; vimentin ile PLT, CEA ile FN ve CA 15.3 arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif korelasyon olduğunu bulurken, diğer parametreler arasında ise istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon olmadığını saptadık.

Sonuç olarak bu çalışmamızın verileri meme kanserinde plazma NGAL, vimentin, FN değerlerinin arttığını ve oldukça yüksek sensitivite, spesifite, prediktif değerlere sahip olduğunu göstermiştir. Plazma NGAL, vimentin, FN ölçümü meme kanserinin tanısı için kolay ve non-invazif bir yöntemdir. Böylece gelecekte bu parametrelerin kullanıma girmesi ile meme kanserli hastalar daha erken dönemde ve non-invazif olarak tanı alabileceklerdir. Çalışmamızda KT tedavisi ile plazma NGAL, vimentin ve FN belirgin bir azalma göstermiştir. Ancak KT etkinliğinin değerlendirilmesinde ve prognostik belirteç olarak kullanımında çalışmamızda anlamlı farklılık saptamadık. Bu durum ilaç etkinliğinin değerlendirilmesinde ve prognostik belirteç olarak bu parametrelerin kullanımı için ileri araştırmalara ihtiyaç olduğunu göstermektedir.

## KAYNAKLAR

1. Greenlee RT, Murray T, Bolden S, Wingo PA. Cancer Statistics. A Cancer Journal of Clinicians 2000;50:7-33.
2. Induced abortion does not increase breast cancer risk. WHO Information FactSheets.No:240. <http://www.cancer.org./acs/groups/content/@nho/documents/document/acspc-024113.pdf>.
3. American Cancer Society. Cancer facts & Figures 2015. <http://www.cancer.org/acs/groups/content/@editorial/documents/document/acspc-044552.pdf>.
4. Sağlık Bakanlığı Kanserle Savaş Dairesi Başkanlığı 2005 Yılı Türkiye Kanser İstatistikleri.ketem.org/istatistik.php.15.06.2010.
5. Gonzalez-Annggulo AM, Morales-Vasquez F, Hortobagyi GN. Overview of resistance to systemic therapy in patients with breast cancer. Adv Exp Med Biol 2007;608:1-22.
6. Mac Mahon B, Trichopoulos D, Brown J et al. Age at menarche, probability of ovulation and breast cancer. Int J Cancer 1982;29:13-20.
7. Hoover R, Gray IA, Cole P, et al. Menopausal estrogens and breast cancer. N Engl J Med 1976;295:401-6.
8. Özışık Y, Baltalı E. Meme kanseri. in: Yasavul Ü, (eds). Hacettepe İç Hastalıkları Kitabı. Ankara: Güneş kitapevi; 1996. 864-72.
9. Thomas DB. Do hormones cause breast cancer? Cancer 1984;53:595-604.
10. Reeves G, Beral V, Green J, Gathani T, Bull D. Hormonal therapy for the menopause and breast cancer risk by histological type: a cohort study and meta-analysis. Lancet Oncol 2006;7:910-8.
11. Collaborative Group on hormonal faktors in breast cancer. Breast cancer and hormonal contraceptives, collaborative reanalysis of individual data on 53.297 woman with breast cancer and 100.239 woman without breast cancer from 54 epidemiological studies. Lancet 1996;47:1713-27.
12. Pike M, Bernstein L, Spicer D. Exogenous hormones and breast cancer risk. in: Neiderhuber J. (eds). Current Therapy in Oncology. 1st edition. St. Louis: Decker; 1993:292-302.
13. Polyak K. Breast cancer gene discovery. Expert Rev Med 2002;4:1-18.
14. Sayek İ. (editör). Meme hastalıkları. Temel Cerrahi. 1. Cilt. 3. Baskı. Ankara: Güneş Kitapevi; 1996:864-72.
15. Albain KS, Alfred KC, Clark DM. Breast cancer outcome and predictors of outcome: are there age differentials. J Natl Cancer Inst Monogr 1994;16:35.
16. Anderson DE. Some characteristics of familial breast cancer. Cancer 1971;28:1500-4.
17. Haagensen CD (eds). Diseases of Breast. 3rd edition. Philadelphia: WB Saunders; 1986.
18. Rohan TH, Howe GR, Friendenrich CM, et al. Dietary fiber vitamins A, C, and E risk of breast cancer. A cohort study. Cancer Causes Control 1993;4:29-35.
19. Dupont WD, Page DL. Risk factors for breast cancer in women with

- proliferative breast disease. *N Engl J Med* 1985;312(3):146-51.
20. Scmizu Y, Kato H, Schull WJ. Study on mortality of A bomb survivors. *Radit Res* 1990;121-141.
  21. Değerli Ü. Meme Kanseri. in: Değerli Ü. (eds). Genel Cerrahi. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri; 1998:288-96.
  22. Manavoğlu O (eds). Klinik Onkoloji El Kitabı 1. Baskı. Ankara: Palme Yayıncılık; 2004:218-29.
  23. Claus EB, Risch N, Thompson WD. Autosomal dominant inheritance of early onset breast cancer: implications of risk prediction. *Cancer* 1994;73:643-51.
  24. Yang Q, Khauny MJ, Rodriguez C, et al. Family history score as a predictor of breast cancer mortality: prospective data from the cancer prevention study II United States, 1982-1991. *Am J Epidemiol* 1998;147(7):652-9.
  25. Colditz GA, Willett WC, Hunter DJ, et al. Family history, age and risk of breast cancer. *JAMA* 1993;270(13):1563-8.
  26. Rosner B, Colditz GA, Willett WC. Reproductive risk factors in a prospective study of breast cancer: The Nurses' Health Study. *Am J Epidemiol* 1994;139: 819-35.
  27. Hsieh CC, Trichopoulos D, Katsouyanni K, Yuasa S. Age at menarche, age at menopause, height and obesity as risk factors for breast cancer: associations and interactions in an international case-control study. *Int J Cancer* 1990;46:796-800.
  28. Terry MB, Zhang FF, Kabat G, et al. Lifetime alcohol intake and breast cancer risk. *Ann Epidemiol* 2006;16:230-40.
  29. Mahoney MC, Bevers T, Linos E, Willett WC. Opportunities and strategies for breast cancer prevention through risk reduction. *CA Cancer J Clin* 2008;58:347-71.
  30. Hartmann LC, Sellers TA, Frost MH, et al. Benign breast disease and the risk of breast cancer. *N Eng J Med* 2005;353:229-37.
  31. Michels KB, Holmberg L, Bergkvist L, Wolk A. Coffee, tea, and caffeine consumption and breast cancer incidence in cohort of Swedish women. *Ann Epidemiol* 2002;12:21-6.
  32. Smith-Warner SA, Spiegelman D, Yuan SS, et al. Intake of fruits and vegetables and risk of breast cancer: a pooled analysis of cohort studies. *JAMA* 2001;285:769-76.
  33. Kaye JA, Jick H. Antibiotics and the risk of breast cancer. *Epidemiology* 2005;16:688-90.
  34. Jacobs EJ, Thun MJ, Connell CJ, et al. Aspirin and other nonsteroidal anti-inflammatory drugs and breast cancer incidence in a large U.S. cohort. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005;14:261-4.
  35. Beral V, Bull D, Doll R, Peto R, Reeves G. For the collaborative on Hormonal Factors in Breast Cancer. Breast cancer and abortion: collaborative reanalysis of data from 53 epidemiological studies, including 83,000 women with breast cancer from 16 countries. *Lancet* 2004;363:1007-16.
  36. Kelsey JL, Gammon MD, John EM. Reproductive factors and breast cancer. *Epidemiol Rev* 1993;15:36-47.

37. Lambe M, Hsieh C, Trichopoulos D, Ekblom A, Pavia M, Adami HO. Transient increase in the risk of breast cancer after giving birth. *N Engl J Med* 1994;331:5-9.
38. Newcomb PA, Storer BE, Longnecker MP, et al. Lactation and reduced risk of premenopausal breast cancer. *N Engl J Med* 1994;330:81-7.
39. McTiernan A, Kooperberg C, White E, et al. For the Women's Health Initiative Cohort Study. Recreational physical activity and the risk of breast cancer in postmenopausal women. *JAMA* 2003;290:1331-6.
40. Biglia N, Defabiani E, Ponzzone R, Mariani L, Marengo D, Sismondi P. Management of risk of breast carcinoma in postmenopausal women. *Endocr Relat Cancer* 2004;11:69-83.
41. Frykberg ER. Lobular carcinoma in situ of the breast. *The Breast J* 1999;5:296-300.
42. İvan Ş. Meme kansinomu patolojisi, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri, STE sempozyum dizisi, İstanbul, 2004:65-71.
43. Singletary SE, Connolly JL. Breast Cancer Staging: Working With the Sixth Edition of the AJCC Cancer Staging Manual. *CA Cancer J Clin* 2006;56:37-47.
44. Ferahman M. Meme Kanserinde Güncel TNM Evrelemesi, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri, Meme Kanseri sempozyum dizisi, İstanbul, 2006:87-91.
45. Erkişi MK. Meme kanserinde prognostik ve prediktif faktörler, in Karabece A (ed): *Olgular Işığında Meme Kanseri*. İstanbul: Turgut Yayıncılık ve Ticaret, 2003:91-8.
46. Goldhirsch A, Glick JH, Gelber RD, et al. Meeting highlights: International Consensus Panel on the Treatment of Primary Breast Cancer. *J Clin Oncol* 2001;19:3817-27.
47. Tolunay Ş. Meme Kanserinde Patolojik ve Prognostik Faktörler. In: Kayhan E, Kahraman Çetintaş S (eds). *Meme Kanseri*. İstanbul. Nobel Tıp Kitapevi 2005:201.
48. Lapidus RG, Nas SJ, Davidson NE. The loss of estrogen and progesterone receptor gene expression in human breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 1998;3(1):85-94.
49. Tuzlalı S, Yavuz E, İlhan R, İplikçi A. Memenin invazif lobuler kansinomlarında alt tiplerin değerlendirilmesi. *Türk Patol Der* 1994;10(2):85-7.
50. Mitri Z, Constantine T, O'Regan R. The HER2 Receptor in Breast Cancer: Pathophysiology, Clinical Use, and New Advances in Therapy. *Chemother Res Pract* 2012;2012:1-8.
51. Trihia H, Murray S, Price K, et al. Ki-67 expression in breast carcinoma: Its association with grading systems, clinical parameters and other prognostic factors-a surrogate marker? *Cancer* 2003;97:1321-31.
52. Singhai R, Patil VW, Jaiswal SR, Patil SD, Tayade MB, Patil AV. E-Cadherin as diagnostic biomarker in breast cancer, *North Am J Med Sci* 2011; 3: 227-233.
53. Fisher B, Anderson S, Redmond CK, Wolmark N, Wickerham DL, Cronin WM. Reanalysis and results after 12 years of follow up in a randomized

- clinical trial comparing total mastectomy with lumpectomy with or without irradiation in the treatment of breast cancer. *N Eng J Med* 1995;333:1456-61.
54. Hortobagyi GN. Treatment of breast cancer *N Eng J Med* 1998;339:974-84.
  55. Sausville EA, Longo DA. Principles of cancer treatment: surgery, chemotherapy and biological treatment. In: Fauci AS, Braunwald E, Kasper DL, et al. (eds), *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 17th edition. Spain: Mc Graw-Hill Interamericana; 2009.
  56. Carrick S, Parker S, Wilcken N, et al. Single agent versus combination chemotherapy for metastatic breast cancer (Review). *Cochrane Database Syst Rev* 2009;2:CD003372.
  57. Genç M, Korcum AF, Yavuz MN. Meme Kanserinde Radyoterapi Uygulamaları, Derleme. *Turkiye Klinikleri J Med Oncol-Special Topics* 2012;5(2):60-5.
  58. Safi F, Kohler I, Rottinger E, et al. The value of the tumor marker CA 15-3 in diagnosing and monitoring breast cancer. *Cancer* 1991;68:574-82.
  59. Bidard FC, David Hajage D, Thomas Bachelot T, et al. Assessment of circulating tumor cells and serum markers for progression-free survival prediction in metastatic breast cancer: a prospective observational study. *Breast Cancer Research* 2012;14:R29.
  60. Perkins G, Slater E, Sanders G, Prichard J. Serum tumor markers. *American family physician* 2003;68 (6):1075–82.
  61. Norum LF, Erikstein B, Nustad K. Elevated CA125 in breast cancer—A sign of advanced disease. *Tumour Biol* 2001;22(4):223-8.
  62. Pietenpol JA, Vogelstein B. Tumor suppressor genes. No room at the p53 inn. *Nature* 1993;365:17-8.
  63. Gallo M, Sapio L, Spina A, Naviglio D, Calogero A, Naviglio S. Lactic dehydrogenase and cancer: an overview. *Front Biosci (Landmark Ed)* 2015;20:234-49.
  64. Kjeldsen L, Johnsen AH, Sengelov H, Borregaard N. Isolation and primary structure of NGAL, a novel protein associated with human neutrophil gelatinase. *J Biol Chem* 1993;268:10425-32.
  65. Goetz DH, Willie ST, Armen RS, Bratt T, Borregaard N, Strong RK. Ligand preference inferred from the structure of neutrophil gelatinase associated lipocalin. 2000;39(8):1935-41.
  66. Bolignano D, Donato V, Coppolino G, et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as a marker of kidney damage (review). *Am J Kidney Dis* 2008; 52(3):595-605.
  67. Cai L, Rubin J, Han W, et al. The origin of multiple molecular forms in urine of HNL/NGAL. *Clin J Am Soc Nephrol* 2010;5:2229-35.
  68. Lippi G, Plebani M. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL): the laboratory perspective. *Clin Chem Lab Med* 2012;50:1483-7.
  69. Lippi G, Aloe R. Neutrophil gelatinase associated lipocalin (NGAL): Analytical issues (Review). *Ligand Assay* 2013;18(4):332-6.
  70. Chakraborty S, Kaur S, Guha S, Batra SK. The multifaceted roles of neutrophil gelatinase associated lipocalin (NGAL) in inflammation and cancer. *Biochimica et Biophysica Acta* 2012;1826:129–69.

71. Hraba-Renevey S, Turler H, Kress M, Salomon C, Weil R. SV40- induced expression of mouse gene 24p3 involves a post-transcriptional mechanism. *Oncogene* 1989;4(5):601-8.
72. Triebel S, Blaser J, Reinke H, et al. 25 kDa alpha 2-microglobulin related protein is a component of the 125 kDa form of human gelatinase. *FEBS Lett* 1992;314:386–8.
73. Liu Q, Ryon J, Nilsen-Hamilton M. Uterocalin: a mouse acute phase protein expressed in the uterus around birth. *Mol Reprod Dev* 1997;46(4):507-14.
74. Hvidberg V, Jacobsen C, Strong RK, Cowland JB, Moestrup SK, Borregaard N. The endocytic receptor megalin binds the iron transporting neutrophil-gelatinase-associated lipocalin with high affinity and mediates its cellular uptake. *FEBS Lett* 2005;579(3):773-7.
75. Goetz DH, Holmes MA, Borregaard N, Bluhm ME, Raymond KN, Strong RK. The neutrophil lipocalin NGAL is a bacteriostatic agent that interferes with siderophore mediated iron acquisition. *Mol Cell* 2002;10(5):1033-43.
76. Cowland JB, Borregaard N. Molecular characterization and pattern of tissue expression of the gene for neutrophil gelatinase-associated lipocalin from humans. *Genomics* 1997;45(1):17-23.
77. Soni SS, Cruz D, Bobek I, et al. NGAL: a biomarker of acute kidney injury and other systemic conditions. *Int. Urol. Nephrol.* 2010;42(1):141-50.
78. Pedersen KR, Rayn HB, Hiortdal VE, et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL): validation of commercially available ELISA. *Scand J Clin Lab Invest* 2010;70(5):374-82.
79. Devireddy LR, Gazin C, Zhu X, Green MR. A cell surface receptor for lipocalin 24p3 selectively mediates apoptosis and iron uptake. *Cell* 2005;123:1293-1305.
80. Yang J, Goetz D, Li JY, et al. An iron delivery pathway mediated by a lipocalin. *Mol Cell* 2002;10:1045-1056.
81. Flo TH, Smith KD, Sato S, et al. Lipocalin 2 mediates an innate immune response to bacterial infection by sequestering iron. *Nature* 2004;432:917-21.
82. Fjaertoft G, Foucard T, Xu S, Venge P. Human neutrophil lipocalin (HNL) as a diagnostic tool in children with acute infections. A study of the kinetics. *Acta Paediatr* 2005;94:661-6.
83. Andre E, Stoeger T, Takenaka S, et al. Inhalation of ultrafine carbon particles triggers biphasic proinflammatory response in the mouse lung. *Eur Respir J* 2006;28;275–85.
84. Bao G, Clifton M, Hoette TM, et al. Iron traffics in circulation bound to a siderocalin (NGAL)-catechol complex. *Nat Chem Biol* 2010;6:602–9.
85. Yndestad A, Landro L, Ueland T, et al. Increased systemic and myocardial expression of neutrophil gelatinase-associated lipocalin in clinical and experimental heart failure 1. *Eur Heart J* 2009;30:1229–36.
86. Hemdahl AL, Gabrielsen A, Zhu C, et al. Expression of neutrophil gelatinase-associated lipocalin in atherosclerosis and myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:136–42.
87. Parikh CR, Devarajan P. New biomarkers of acute kidney injury. *Crit Care Med* 2008;36(4):159-65.

88. Landro L, Damas JK, Flo TH. Decreased serum lipocalin-2 levels in human immunodeficiency virus-infected patients: increase during highly active anti-retroviral therapy. *Clin Exp Immunol* 2008;152:57–63.
89. D'Anna R, Baviera G, Giordano D. First trimester serum neutrophil gelatinase-associated lipocalin in gestational diabetes. *Diabet Med* 2009;26:1293–5.
90. D'Anna R, Baviera G, Giordano D. Second trimester neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a potential prediagnostic marker of preeclampsia. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica* 2008;87:1370-3.
91. Friedl A, Stoesz SP, Buckley P, Gould MN. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin in normal and neoplastic human tissues. Cell type-specific pattern of expression. *Histochem J* 1999;31(7):433-41.
92. Tong Z, Chakraborty S, Sung B, et al. Epidermal growth factor down-regulates the expression of neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) through E-cadherin in pancreatic cancer cells. *Cancer* 2011;117:2408-18.
93. Moniaux N, Chakraborty S, Yalniz M, et al. Early diagnosis of pancreatic cancer: neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a marker of pancreatic intraepithelial neoplasia. *Br J Cancer* 2008;98:1540- 7.
94. Alpizar YA, Ramirez BS, Fernandez DR, et al. HER1-ECD vaccination dispenses with emulsification to elicit HER1-specific anti-proliferative effects. *Hum Vaccin* 2009;5:158-65.
95. Wang HJ, He XJ, Ma YY, et al. Expressions of neutrophil gelatinase-associated lipocalin in gastric cancer: a potential biomarker for prognosis and an ancillary diagnostic test. *Anat Rec (Hoboken)* 2010;293:1855-63.
96. Lim R, Ahmed N, Borregaard N, et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) an early-screening biomarker for ovarian cancer: NGAL is associated with epidermal growth factor-induced epithelio-mesenchymal transition. *Int J Cancer* 2007;120:2426-34.
97. Miyamoto T, Kashima H, Suzuki A, et al. Laser captured microdissection-microarray analysis of the genes involved in endometrial carcinogenesis: stepwise up-regulation of lipocalin 2 expression in normal and neoplastic endometria and its functional relevance. *Hum Pathol* 2011;42(9):1265-74.
98. Leng X, Lin H, Ding T, et al. Lipocalin 2 is required for BCR-ABL induced tumorigenesis. *Oncogene* 2008;27:6110-9.
99. Owen HC, Roberts SJ, Ahmed SF, Farquharson C . Dexamethasone-induced expression of the glucocorticoid response gene lipocalin 2 in chondrocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2008;294:1023-34.
100. Jones C, Mackay A, Grigoriadis A, et al. Expression profiling of purified normal human luminal and myoepithelial breast cells: identification of novel prognostic markers for breast cancer. *Cancer Res* 2004;64:3037-45.
101. Yang J, Bielenberg DR, Rodig SJ, et al. Lipocalin 2 promotes breast cancer progression. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106:3913-8.
102. Stuckey R, Aldridge T, Lim FL, et al. Induction of iron homeostasis genes during estrogen-induced uterine growth and differentiation. *Mol Cell*

- Endocrinol 2006;253:22-9.
103. Bauer M, Eickhoff JC, Gould MN, Mundhenke C, Maass N and Friedl A. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) is a predictor of poor prognosis in human primary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2008;108:389-97.
  104. Stoesz SP, Gould MN. Over expression of neu-related lipocalin (NRL) in neu-initiated but not ras or chemically initiated rat mammary carcinomas. *Oncogene* 1995;11:2233-41.
  105. Turpeenniemi-Hujanen T. Gelatinases (MMP-2 and -9) and their natural inhibitors as prognostic indicators in solid cancers. *Biochimie* 2005;3-4:287-97.
  106. Provatopoulou X, Gounaris A, Kalogera E, et al. Circulating levels of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) neutrophil gelatinase associated lipocalin (NGAL) and their complex MMP- 9/NGAL in breast cancer disease. *BMC Cancer* 2009;9:390-5.
  107. Eriksson JE, Dechat T, Grin B, et al . Introducing intermediate filaments: from discovery to disease. *J Clin Invest* 2009;119(7):1763–71.
  108. Hesse M, Magin TM, Weber K. Genes for intermediate filament proteins and the draft sequence of the human genome: novel keratin genes and a surprisingly high number of pseudogenes related to keratin genes 8 and 18. *J Cell Sci.* 2001;114:2569–75.
  109. Fuchs E, Weber K. Intermediate filaments: structure, dynamics, function, and disease. *Annu Rev Biochem* 1994;63:345–82.
  110. Green KJ, Bohringer M, Gocken T, Jones JC. Intermediate filament associated proteins. *Adv Protein Chem* 2005;70:143–202.
  111. Franke WW, Grund C, Kuhn C, Jackson BW, Illmensee K. Formation of cytoskeletal elements during mouse embryogenesis. III. Primary mesenchymal cells and the first appearance of vimentin filaments. *Differentiation* 1982;23:43–59.
  112. Larsson A, Wilhelmsson U, Pekna M, Pekny M. Increased cell proliferation and neurogenesis in the hippocampal dentate gyrus of old GFAP(-/-) Vim(-/-) mice. *Neurochem Res* 2004;29:2069–73.
  113. Cochard P, Paulin D. Initial expression of neurofilaments and vimentin in the central and peripheral nervous system of the mouse embryo in vivo. *J Neurosci.* 1984;4:2080–94.
  114. De Souza PC, Katz SG. Coexpression of cytokeratin and vimentin in mice trophoblastic giant cells. *Tissue Cell* 2001;33:40–5.
  115. Goldie KN, Wedig T, Mitra AK, Aebi U, Herrmann H, Hoenger A. Dissecting the 3-D structure of vimentin intermediate filaments by cryo-electron tomography. *J Struct Biol* 2007; 158:378–85.
  116. Fuchs E, Hanukoglu I. Unraveling the structure of the intermediate filaments. *Cell* 1983;34:332–4.
  117. Chang L, Shav-Tal Y, Trcek T, Singer RH, Goldman RD. Assembling an intermediate filament network by dynamic cotranslation. *J Cell Biol* 2006;172(5):747-58.
  118. Ku NO, Liao J, Chou CF, Omary MB. Implications of intermediate filament protein phosphorylation. *Cancer Metastasis Rev* 1996;15:429–44.



119. Cheng TJ, Tseng YF, Chang WM, Chang MD, Lai YK. Retaining of the assembly capability of vimentin phosphorylated by mitogen-activated protein kinase-activated kinase-2. *J Cell Biochem* 2003;89:589–602.
120. Goto H, Tanabe K, Manser E, Lim L, Yasui Y, Inagaki M. Phosphorylation and reorganization of vimentin by p21-activated kinase (PAK). *Genes Cells* 2002;7:91–7.
121. Goto H, Yasui Y, Kawajiri A, et al. Aurora-B regulates the cleavage furrow-specific vimentin phosphorylation in the cytokinetic process. *J Biol Chem* 2003; 278:8526–30.
122. Turowski P, Myles T, Hemmings BA, Fernandez A, Lamb NJ. Vimentin dephosphorylation by protein phosphatase 2A is modulated by the targeting subunit B55. *Mol Biol Cell* 1999;10:1997–2015.
123. Vossenaar ER, Radstake TR, van der Heijden A, et al. Expression and activity of citrullinating peptidylarginine deiminase enzymes in monocytes and macrophages. *Ann Rheum Dis* 2004;63:373–81.
124. Wang L, Sipra B, Laura B, et al. Sumoylation of vimentin<sup>354</sup> is associated with PIAS3 inhibition of Glioma cell migration. *Oncotarget* 2010;1:620–7.
125. Rittling SR, Baserga R. Functional analysis and growth factor regulation of the human vimentin promoter. *Mol Cell Biol* 1987;7:3908–15.
126. Zhang X, Diab IH, Zehner ZE. ZBP-89 represses vimentin gene transcription by interacting with the transcriptional activator, Sp1. *Nucleic Acids Res* 2003;31:2900–14.
127. Shirahata A, Sakata M, Sakuraba K, et al. Vimentin methylation as a marker for advanced colorectal carcinoma. *Anticancer Res* 2009;29:279–81.
128. Katsumoto T, Mitsushima A, Kurimura T. The role of the vimentin intermediate filaments in rat 3Y1 cells elucidated by immunoelectron microscopy and computer-graphic reconstruction. *Biol Cell* 1990;68(2):139–46.
129. Goldman RD, Khuon S, Chou YH, Opal P, Steinert PM. The function of intermediate filaments in cell shape and cytoskeletal integrity. *J Cell Biol* 1996;134(4):971–83.
130. Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2002;2:442–54.
131. Ivaska J, Pallari HM, Nevo J, Eriksson JE. Novel functions of vimentin in cell adhesion, migration, and signaling. *Exp Cell Res* 2007;313:2050–62.
132. Eckes B, Colucci-Guyon E, Smola H, et al. Impaired wound healing in embryonic and adult mice lacking vimentin. *J Cell Sci* 2000;113(13):2455–62.
133. Sarria AJ, Panini SR, Evans RM. A functional role for vimentin intermediate filaments in the metabolism of lipoprotein-derived cholesterol in human SW-13 cells. *J Biol Chem* 1992;267(27):19455–63.
134. Zhao Y, Yan Q, Long X, Chen X, Wang Y. Vimentin affects the mobility and invasiveness of prostate cancer cells. *Cell Biochem Funct* 2008;26:571–7.
135. Fuyuhiko Y, Yashiro M, Noda S, et al. Clinical significance of vimentin-positive gastric cancer cells. *Anticancer Res* 2010;30:5239–43.

136. Upton MP, Hirohashi S, Tome Y, Miyazawa N, Suemasu K, Shimosato Y. Expression of vimentin in surgically resected adenocarcinomas and large cell carcinomas of lung. *Am J Surg Pathol* 1986;10:560–7.
137. Gilles C, Polette M, Mestdagt M, et al. Transactivation of vimentin by beta-catenin in human breast cancer cells. *Cancer Res* 2003;63:2658–64.
138. Kawahara E, Oda Y, Ooi A, Katsuda S, Nakanishi I, Umeda S. Expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in peripheral nerve sheath tumors. A comparative study of immunoreactivity of GFAP, vimentin, S-100 protein, and neurofilament in 38 schwannomas and 18 neurofibromas. *Am J Surg Pathol* 1988;12:115–20.
139. Li M, Zhang B, Sun B, et al. A novel function for vimentin: the potential biomarker for predicting melanoma hematogenous metastasis. *J Exp Clin Cancer Res* 2010;29:109.
140. Satelli A, Li S. Vimentin as a potential molecular target in cancer therapy or Vimentin, an overview and its potential as a molecular target for cancer therapy. *Cell Mol Life Sci* 2011;68(18):3033–46.
141. Singh S, Sadacharan S, Su S, Beldegrun A, Persad S, Singh G. Overexpression of vimentin: role in the invasive phenotype in an androgen-independent model of prostate cancer. *Cancer Res* 2003;63:2306–11.
142. Jin H, Morohashi S, Sato F, et al. Vimentin expression of esophageal squamous cell carcinoma and its aggressive potential for lymph node metastasis. *Biomed Res* 2010;31:105–12.
143. Steinmetz NF, Maurer J, Sheng H, et al. Two Domains of Vimentin Are Expressed on the Surface of Lymph Node, Bone and Brain Metastatic Prostate Cancer Lines along with the Putative Stem Cell Marker Proteins CD44 and CD133. *Cancers (Basel)* 2011;3(3):2870-85.
144. Lang SH, Hyde C, Reid IN, et al. Enhanced expression of vimentin in motile prostate cell lines and in poorly differentiated and metastatic prostate carcinoma. *Prostate* 2002;52:253–63.
145. Sun S, Poon RT, Lee NP, et al. Proteomics of hepatocellular carcinoma: serum vimentin as a surrogate marker for small tumors (< or =2 cm). *J Proteome Res* 2010;9:1923–30.
146. Li ZM, Wen YJ, Yang HB, et al. Enhanced expression of human vimentin intermediate filaments in hepatocellular carcinoma cells decreases their proliferative and invasive abilities in vitro. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* 2008;30:408–12.
147. Zou H, Harrington JJ, Shire AM, et al. Highly methylated genes in colorectal neoplasia: implications for screening. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007;16:2686–96.
148. Mclnroy L, Maatta A. Down-regulation of vimentin expression inhibits carcinoma cell migration and adhesion. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;360:109–14.
149. Di Bella A, Regoli M, Nicoletti C, Ermini L, Fonzi L, Bertelli E. An appraisal of intermediate filament expression in adult and developing pancreas: vimentin is expressed in alpha cells of rat and mouse embryos. *J Histochem Cytochem* 2009;57:577–86.

150. Hong SH, Misek DE, Wang H, et al. Identification of a Specific Vimentin Isoform That Induces an Antibody Response in Pancreatic Cancer. *Biomark Insights* 2006;1:175–83.
151. Walsh N, O'Donovan N, Kennedy S, et al. Identification of pancreatic cancer invasion-related proteins by proteomic analysis. *Proteome Sci* 2009;7:3.
152. Chu YW, Seftor EA, Romer LH, Hendrix MJ. Experimental coexpression of vimentin and keratin intermediate filaments in human melanoma cells augments motility. *Am J Pathol* 1996;148:63–9.
153. Yamada T, Kawamata T, Walker DG, McGeer PL. Vimentin immunoreactivity in normal and pathological human brain tissue. *Acta Neuropathol* 1992;84:157–62.
154. Bouamrani A, Ramus C, Gay E, et al. Increased phosphorylation of vimentin in noninfiltrative meningiomas. *PLoS One* 2010;5(2):e9238.
155. Broers JL, De Leij L, Rot MK, et al. Expression of intermediate filament proteins in fetal and adult human lung tissues. *Differentiation* 1989;40:119–28.
156. Al-Saad S, Al-Shibli K, Donnem T, Persson M, Bremnes RM, Busund LT. The prognostic impact of NF-kappaB p105, vimentin, E-cadherin and Par6 expression in epithelial and stromal compartment in non-small-cell lung cancer. *Br J Cancer* 2008; 99:1476–83.
157. Raymond WA, Leong AS. Vimentin--A new prognostic parameter in breast cancer? *J Pathol* 1989;158:107-14.
158. Essa TM, El Tatawi FA, Hamdi KN, Arafa WA. Vimentin expression in different types of breast carcinoma: An immunohistochemical study. *J Egypt Soc Parasitol* 1996;26:433-42.
159. Korsching E, Packeisen J, Liedtke C, et al. The origin of vimentin expression in invasive breast cancer: epithelial-mesenchymal transition, myoepithelial histogenesis or histogenesis from progenitor cells with bilinear differentiation potential? *J Pathol* 2005;206:451–7.
160. Heatley M, Whiteside C, Maxwell P, Toner P. Vimentin expression in benign and malignant breast epithelium. *J Clin Pathol* 1993;46:441-5.
161. Niveditha SR, Bajaj P. Vimentin expression in breast carcinomas. *Indian J Pathol Microbiol* 2003;46:579-84.
162. Thompson EW, Paik S, Br nner N, et al. Association of increased basement membrane invasiveness with absence of estrogen receptor and expression of vimentin in human breast cancer cell lines. *J Cell Physiol* 1992;150:534-44.
163. H c menoğlu S, Avđar F, Kafalı M, ve ark. Meme karsinomlarında S-100, vimentin, sitokeratin ve HMB-45 ekspresyonu. *Genel Tıp Derg* 2004;14(4):133-8.
164. Yamada KU, Hasegawa T, Hasegawa E, et al. Fibronectin and interactions at the cell surface. *Prog Clin Biol Res* 1984;151:1-15.
165. Blumenstock F, Saba T, Weber P, Laffin R. Biochemical and immunological characterization of human oncofetal alpha 2 SB glycoprotein: its identify with cold-insoluble glob lin. *J Biol Chem* 1978;253:4287-91.
166. Hynes R. *Fibronectins*. Springer Series in Molecular Biology 1990;1:1-

538.

167. Debra JR. Molecules in focus. Fibronectin. *Int J Biochem.Cell Biol* 1999;29:939-43.
168. Wing ST, Midwood KS. Plasma and cellular fibronectin: distinct and independent functions during tissue repair ,Review. *Fibrogenesis Tissue Repair* 2011;4:21.
169. Wu C, Chen M, Xing C. Molecular Understanding of Conformational Dynamics of a Fibronectin Module on Rutile Surface. *Langmuir* 2010;26:15972-81.
170. Güner G. Bağ dokusu Ekstrasellüler Matriks. In: Onat T, Emerk K. (eds): *Temel Biyokimya*, Saray Medikal Yayıncılık, İstanbul, 2000.
171. Yamauchi M, Nakajima H, Ohata M, et al. Detection of fibronectin receptor in sera:its clinical significance as a parameter of hepatic fibrosis. *Hepatology* 1991;14(2):244-50.
172. Mosher DF. Physiology of fibronectin. *Ann Rev Med* 1984;35:561-5.
173. Potts JR, Campbell ID. Fibronectin structure and assembly. *Curr Opin Cell Biol* 1994;6:648-55.
174. Viji RI, Kumar VB, Kiran MS, Sudhakaran PR. Angiogenic response of endothelial cells to heparin-binding domain of fibronectin. *Int J Biochem Cell Biol* 2008;40:215-26.
175. Yi M, Sakai T, Fassler R, Ruoslahti E. Antiangiogenic proteins require plasma fibronectin or vitronectin for in vivo activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:11435-8.
176. Nyberg P, Sakai T, Cho KH, Caparon MG, Fassler R, Björck L. Interactions with fibronectin attenuate the virulence of *Streptococcus pyogenes*. *EMBO J* 2004;23:2166-74.
177. Kandemir O, Polat G, Sahin E, et al. Fibronectin levels in chronic viral hepatitis and response of this protein to interferon therapy. *Hepatogastroenterology* 2004;57:811-4.
178. Martinez-Hernandez A, Amenta PS. The extracellular matrix in hepatic regeneration. *Faseb J* 1995;9:1401-10.
179. Pick-Kober KH, Munker D, Gressner AM. Fibronectin is synthesised as an acute phase reactant in rat hepatocytes. *J Clin Chem Clin Biochem* 1986;24:521-8.
180. Sandig H, Mc Donald J, Gilmour J, Arno M, Lee TH, Cousins DJ. Fibronectin is a TH1-specific molecule in human subjects. *J Allergy Clin Immunol* 2009;124:528-35.
181. Foroni C, Broggin M, Generali D, Damia G. Epithelial-mesenchymal transition and breast cancer: role, molecular mechanisms and clinical impact. *Cancer Treat Rev* 2012;38:689-97.
182. Berrier AL, Yamada KM. Cell–matrix adhesion. *J Cell Physiol* 2007;213: 565–73.
183. Ioachim E, Charchanti A, Briasoulis E, et al. Immunohistochemical expression of extracellular matrix components tenascin, FN, collagen type IV and laminin in breast cancer: their prognostic value and role in tumour invasion and progression. *Eur J Cancer* 2002;38:2362-70.
184. Han S, Khuri FR, Roman J. FN stimulates non-small cell lung carcinoma cell growth through activation of akt/mammalian target of rapamycin/S6

- kinase and inactivation of LKB1/AMP-activated protein kinase signal pathways. *Cancer Res* 2006;66:315-23.
185. Ruiz-Garcia E, Scott V, Machavoine C, et al. Gene expression profiling identifies Fibronectin 1 and CXCL9 as candidate biomarkers for breast cancer screening. *British Journal of Cancer* 2010;102:462–8.
  186. Han S, Sidell N, Roser-Page S, Roman J. FN stimulates human lungcarcinoma cell growth by inducing cyclooxygenase-2 (COX-2) expression. *Int J Cancer* 2004;11:322-31.
  187. Ryu S, Jimi S, Eura Y, Kato T, Takebayashi S. Retention of intracellular FN expression in primary and metastatic thyroid carcinoma: an immunohistochemical study. *Cancer Lett* 1998;133:215-22.
  188. Hanamura N, Yoshida T, Matsumoto E, Kawarada Y, Sakakura T. Expression of fibronectin and tenascin-C mRNA by myofibroblasts, vascular cells and epithelial cells in human colon adenomas and carcinomas. *Int J Cancer* 1997;73(1):105.
  189. Elices MJ, Tsai V, Strahl D. et al. Molecules in Focus: Fibronectin G. S. Expression and functional significance of alternatively spliced CSI fibronectin in rheumatoid arthritis microvasculature. *J Clin Znoest* 1994;93:405-16.
  190. Kijima T, Maulik G, Ma PC, Madhiwala P, Schaefer E, Salgia R. FN enhances viability and alters cytoskeletal functions (with effects on the phosphatidylinositol 3-kinase pathway) in small cell lung cancer. *J Cell Mol Med* 2003;7:157-64.
  191. Deverbizier G, Beauchant M, Chapron A, Reiss D. Fibronectin, A marker for malignant ascites. *Lancet* 1984;10:1104.
  192. Saclarides TJ. Transanal endoscopic microsurgery. *Surg Clin North Am* 1997; 77:229-39.
  193. Boccardo F, Guarneri D, Zamardi S, Costellani P, Borsi L, Zardi L. Fibronectin concentration in the plasma of patients with malignant and benign breast diseases. *Cancer Lett* 1986;33:317-23.
  194. Öztürk Z, Ekmekçi H, Sönmez H, Baloğlu H, Kökoğlu E. Meme kanserli hastalarda doku total sialik asit, fibronektin ve plazma fibronektin, lipide bağlı sialik asit düzeyleri. *Türk Biyokimya Dergisi* 2002;27(1):23-9.
  195. Meng XN, Jin Y, Yu Y et al. Characterisation of fibronectin mediated FAK signalling pathways in lung cancer cell migration and invasion. *Br J Cancer* 2009; 101:327–34.
  196. Maity G, Choudhury PR, Sen T, Ganguly KK, Sil H, Chatterjee A. Culture of human breast cancer cell line (MDA-MB-231) on fibronectin-coated surface induces pro-matrix metalloproteinase-9 expression and activity. *Tumour Biol* 2011;32:129–38.
  197. Gonzalez LO, Pidal I, Junquera S, et al. Over expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in mononuclear inflammatory cells in breast cancer correlates with metastasis-relapse. *Br J Cancer* 2007; 97:957–63.
  198. Zheng M, Jones DM, Horzempa C, Prasad A, McKeown-Longo PJ. The first type III domain of fibronectin is associated with the expression of cytokines within the lung tumor microenvironment. *J Cancer* 2011;2:478–83.

199. Pollard JW. Macrophages define the invasive microenvironment in breast cancer. *J Leukoc Biol* 2008;84:623–30.
200. Christensen L, Nielsen M, Andersen J, Clemmensen I. Stromal FN staining pattern and metastasizing ability of human breast carcinoma. *Cancer Res* 1988;48:6227-33.
201. Gorczyca W, Holm R, Nesland JM. Laminin production and FN immunoreactivity in breast carcinomas. *Anticancer Res* 1993;13:851-8.
202. Bae YK, Kim A, Kim MK, Choi JU, Kang SH, Lee SJ. Fibronectin expression in carcinoma cells correlates with tumor aggressiveness and poor clinical outcome in patients with invasive breast cancer. *Human Pathology* 2013;44:2028–37.
203. Qiu JM. Clinical significance of determination in tumor cells NGAL levels of breast cancer patients with immuno-histochemistry. *J Radioimmunol* 2012;25:546-8.
204. Julia YS Tsang, Sze-Kit Au, Yun-Bi Ni, et al. P-cadherin and vimentin are useful basal markers in breast cancers. *Human Pathology* 2013; 44:2782–91.
205. Javle MM, Gibbs JF, Iwata KK, et al. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) and activated extracellular signal-regulated kinase (p-Erk) in surgically resected pancreatic cancer. *Ann Surg Oncol* 2007;14(12):3527-33.

## TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerini hiçbir zaman esirgemeyen, eğitimim ve tezimin hazırlanmasındaki katkılarından dolayı değerli hocam ve tez danışmanım Prof. Dr. Engin ULUKAYA'ya şükranlarımı ve saygılarımı sunarım.

Değerli Biyokimya Anabilim Dalı Başkanım Sayın Prof. Dr. Esmâ GÜR ve Değerli Hocalarım Sayın Prof. Dr. Asuman TOKULLUGİL, Prof. Dr. Melahat DİRİCAN, Prof. Dr. Emre SARANDÖL, Prof. Dr. Zehra SERDAR ve Prof. Dr. Yeşim ÖZARDA'ya eğitimime sağladıkları katkılarından ve üzerimdeki emeklerinden dolayı çok teşekkür ederim ve saygılarımı sunarım.

Bilgisi, deneyimleri, dostluğu, sevecenliği ve ablalığı ile her zaman yanımda olan sevgili Doç. Dr. Arzu YILMAZTEPE ORAL'a, beraber görev yaptığım dostluklarını, arkadaşlıklarını unutmayacağım Uz. Dr. Burak ASILTAŞ'a, Dr. Mehmet AYKUŞ'a ve diğer asistan arkadaşlarıma, ayrıca Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı personeline, Uludağ Üniversitesi Biyokimya Merkez Laboratuvarı ve Acil Laboratuvarı teknisyenlerine yardımları ve destekleri için teşekkür etmeyi bir borç bilirim. Tezimi hazırlamamdaki destekleri için Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dahiliye Anabilim Dalı Onkoloji Bölümü Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Özkan KANAT'a teşekkür ederim.

Bugünlere gelmemde en çok emeği geçen, her daim yanımda olan anneme ve babama, hiçbir zaman sevgi ve desteğini esirgemeyen biricik eşim Meltem'e, yine her zaman sevgi ve desteği ile yanımda olan dostlarıma teşekkür ederim. Son olarak bu çalışmaya katılmayı kabul eden tüm kişilere teşekkür ederim.

## ÖZGEÇMİŞ

1985 yılında Çanakkale/Biga'da doğdum. İlkokulu Hüseyin Onan İlkokulu'nda, ortaokul ve liseyi Biga Atatürk Anadolu Lisesi'nde tamamladım. 2003 yılında Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi'ne başladım ve 2010 yılında mezun oldum. 2011 yılından beri Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'nda sürdürdüğüm uzmanlık eğitimime halen devam etmekteyim.