

**Meme Kanseri Türlerinde Midkin Ekspresyonunun
İmmünohistokimyasal Ve PCR Analizinin Kantitatif
Karşılaştırılması Ve Serum Midkin Seviyesi**

Program Kodu: 1002

Proje No: 113S056

Proje Yürütücüsü: Doç.Dr. Hülya ÇETİN SORKUN

Araştırmacı(lar):

Prof.Dr. Metin AKBULUT

Doç.Dr. Yaşar ENLİ

Doç.Dr. Emre TEPELİ

Doç.Dr. Sevgi ÖZKAN

Prof.Dr. Ergun ERDEM

Bursiyer(ler):

Çiğdem GÖK

EYLÜL 2014

DENİZLİ

ÖNSÖZ

Midkinin heparin bağlayıcı bir büyüme faktörü ve kanserin ilerlemesinde önemli bir role sahip olduğu belirtilmektedir. Biz de çalışmamızda meme kanserli hastalarda meme dokusunda ve serumlarında MK ekspresyon düzeyini tespit etmektir.

Çalışma grubumuzu 61 meme kanserli hasta oluşturdu. Bunların 59 adedi kadın 2 adedi erkekti. Kontrol grubuna sağlıklı ve gönüllü 49 kadın katıldı.

Çalışma grubunun ameliyat öncesi ortalama serum MK seviyesi, kontrol grubunun ortalama serum MK seviyesinden yüksektir. Kanserli hastaların serum MK düzeyleri kanser evrelerinde anlamlı farklılık göstermekteydi. Ameliyat sonrası serum MK seviyesi önemli derecede düşmüştür. Meme dokusunda %72,1 oranında pozitif MK ekspresyonu tespit ettik.

Çalışmamız Pamukkale Üniversitesinde gerçekleştirilmiş olup, 113S056 nolu proje olarak **TÜRKİYE BİLİMSEL VE TEKNOLOJİK ARAŞTIRMA KURUMU (TÜBİTAK)** tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

Özet.....	1
Giriş.....	2
Materyal ve Metod	3
A) İmmünohistokimyasal Analiz.....	4
B) 1.RNA izolasyonu ve komplementer DNA sentezi.....	4
1.1. FFPE dokulardan total RNA izolasyonu ve cDNA sentezi.....	4
1.1.1.Parafin bloklardan total RNA izolasyonu	4
1.1.2.cDNA sentezi	6
2.Gerçek-zamanlı kantitatif PCR	7
C) Serum MK Ölçümü	9
D) İstatistiksel Analiz	9
Bulgular	9
Tartışma	15
Sonuç	17
Kaynaklar	17

TABLO VE ŞEKİL LİSTESİ

<i>Şekil 1</i>	10
<i>Şekil 2</i>	10
<i>Tablo 1</i>	11
<i>Tablo 2</i>	13
<i>Tablo 3</i>	14

MEME KANSERİ TÜRLERİNDE MİDKİN EKSPRESYONUNUN İMMÜNOHİSTOKİMYASAL VE PCR ANALİZİNİN KANTİTATİF KARŞILAŞTIRILMASI VE SERUM MİDKİN SEVİYESİ

ÖZET

Midkine heparin bağlayıcı bir büyüme faktörüdür ve kanserin ilerlemesinde önemli bir role sahiptir. Çalışmamızın amacı meme kanserli hastalarda meme dokusunda, ameliyat öncesi ve sonrası serumda MK ekspresyon düzeyini tespit etmektir.

Metod: Çalışmamıza katılan 61 meme kanserli hastanın meme dokusu, ameliyat öncesi ve sonrası serumları elde edildi. Meme kanseri olmayan 49 kadının da serumları incelemeye alındı.

61 hastamızın 44 ünün (%72,1) meme dokusunda pozitif MK ekspresyonu gözlemlendi. Meme kanserli hastaların tümör çıkarılmadan önce serum MK seviyeleri ($3,68 \pm 2,13$ ng/mL), kontrol grubunun seviyesinden ($1,77 \pm 0,38$ ng/mL) önemli derecede yüksekti ($P=0,000$). Tümörün çıkarılmasından sonra serum MK seviyesi ($2,47 \pm 1,00$ ng/mL) anlamlı derecede düşmüştü ($P=0,000$). Klinik parametreler incelendiğinde serum düzeyinin evrelere göre anlamlı olduğunu tespit ettik.

Artan serum MK seviyesi ve protein ekspresyonunun meme kanseri karsinogenezi ile ilişkili olduğunu tespit ettik. Tümör çıkarıldıktan sonra MK seviyesi azaldı. Bulgularımız, MK'nin meme kanserli hastalarda bir tümör belirteci olarak kullanılabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Midkine, Meme kanseri, Serum, İmmünohistokimya, Real-time kantitatif PCR, ELISA

ABSTRACT

Purpose: Midkine (MK), a heparin-binding growth factor, has an important role in cancer progression. The aim of this study was to determine MK expression in breast tissue, preoperative and postoperative serum levels of patients with breast cancer.

Method: 61 patients with breast cancer were participated in our study. The MK serum levels were measured pre and postoperatively for this patients. Also, we analyzed breast tissues of 61 patients by immunohistochemically.

We examined serum midkine levels in 49 healthy volunteers.

Result: MK expressions were observed in 44 (72,1%) of 61 breast cancer patients.

In breast cancer patients serum midkine levels ($3,68\pm 2,13$ ng/mL) were significantly higher than control group ($1,77\pm 0,38$ ng/mL) before tumor removal ($p=0,000$). After tumor removal, serum MK levels ($2,47\pm 1,00$ ng/mL) were significantly ($p=0,000$) decreased according to preoperative levels ($3,68\pm 2,13$ ng/mL). Increased serum levels of MK were related with tumor stages when analysed clinical parameters.

Conclusion: We found that increased serum midkine levels and protein expressions were associated with the carcinogenesis of breast cancer. Also, MK levels were decreased after tumor removal. According to our findings, MK might be a useful tumor marker for patients with breast cancer.

Keywords: Midkine, Breast Ca, Serum, İmmunohistochemistry, Real-time quantitative PCR, ELISA

GİRİŞ

Büyüme faktörleri hem kısa mesafede hem de uzun mesafede hücrelerarası iletişim kuran düşük molekül ağırlıklı proteinlerdir. Bu proteinler spesifik hücre yüzeyi reseptörleri vasıtasıyla spesifik hücrelerde hareket ederler ve hücrelerde farklılaşmayı, göçü, hayatta kalmayı ve proliferasyonu düzenlerler (Hunter, 2000).

Malign tümörlerde birden fazla büyüme faktöründe yükselme olduğu belirlenmiş ve bu faktörlerin tümör gelişimi, büyüme, invazyon, anjiogenez ve metastazda rol oynadıkları bildirilmiştir. Son dönemde, farklı kanser türlerinde, karsinogenez sürecinin aydınlatılmasına odaklanan çalışmalarda büyüme faktörlerinden birisi olan MK üzerinde durulmaktadır (Choudhuri,1997; Kadomatsu, 2002; Kadomatsu, 2004; Muramatsu, 2002; Qi, 2001). İnsan Midkine geni 11p11.2 kromozomu üzerinde yerleşmiş, bazik amino asitler ve sistein bakımından zengin 143 aminoasitten oluşan, yaklaşık ağırlığı 13-kDa olan bir proteindir (Kaname, 1993; Matsubara, 1990; Murasugi, 2003). Midkine'in, embriyonal karsinoma hücrelerinde retinoik asit duyarlı bir gen ürünü ve heparin bağlayıcı bir büyüme faktörü olduğu bildirilmiştir (Kadomatsu,1988; Matsubara, 1990). MK'nin mitotik aktiviteyi arttırdığı ve bazı hücrelerin malign değişimine de neden olduğu ileri sürülmektedir (Kadomatsu,1997; Ratovitski, 1998). Normal dokularda minimum seviyede eksprese edilirken pek çok malign ve inflamatuvar hastalıkta yüksek seviyede eksprese edildiği bildirilmektedir (Muramatsu, 2010).

MK ekspresyonunun insan kanser türlerinde sıklıkla düzenli yükseldiği ve MK'nin kanser tedavisi için bir tümör belirteci ve moleküler hedef olarak hizmet verebileceği belirtilmektedir (Sakamoto, 2012). Birçok kanser türünde erken safhada, serum MK seviyesinin önemli derecede arttığı da ifade edilmektedir (Ikematsu, 2000).

Kanser çağımızda insan ölümlerine neden olan en önemli etkenlerden biridir. Tüm kanser ölümlerinin ve yeni kanser vakalarının yaklaşık yarısını akciğer, meme, prostat ve kolorektal kanserleri oluşturmaktadır. 2001den 2010 a kadar kanser insidansında her yıl %0,4 oranında bir azalma olduğu ifade edilmektedir. Bu kanser insidansındaki azalmanın erkeklerde meydana geldiği, kadınlarda ise sabit kaldığı tespit edilmiştir. Hatta kadınlarda görülen meme kanseri insidansının arttığı da ifade edilmektedir (Edwards, 2013). Meme kanseri, farklı histolojik görünümüleri, biyolojik davranış, klinik bulgu ve tedaviye verdiği yanıtlar ile birçok patolojik alt tipleri olan maligniteye sahip bir hastalıktır (Perou, 2000; Sorlie, 2001). Meme kanseri nedeniyle ölüm genellikle mevcut tedaviler ile tespit edilemeyen uzak metastazların büyümesinden kaynaklanmaktadır (Hanahan, 2000). İleri evre meme kanseri tanısı alan kadınların yaklaşık %69'u 5 yıl içinde ölmektedir (Cho, 2013).

Her dört kadından birinde meme kanseri görülmektedir. Kanseri erken evrede tespit edebilecek bir marker olduğu düşünülen MK ekspresyonunun kanserli meme dokusunda immünohistokimyasal, cDNA varlığı ve serum düzeyini incelemeyi amaçladık.

MATERYAL VE METOD

Materyal:

Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Meme polikliniğine Ağustos 2013-Ağustos 2014 tarihleri arasında müracaat eden ve gönüllü olan 110 kişi çalışmaya alındı. Gönüllülerin herhangi başka bir hastalığa sahip olmamasına (karaciğer bozukluğu, romatoid artrit, diyabet, yüksek tansiyon, vb.) dikkat edildi. Hasta grubumuzu meme kanseri tanısı alan 61 olgu oluşturdu. Çalışma materyali olarak, olgulara ait %10 formaldehit solüsyonu ile tespit edilen ve sonrasında parafin bloklara gömülen doku örnekleri kullanıldı. Meme kanseri tanısı alan hastalar opere edilmeden önce ve operasyondan yaklaşık 15-30 gün sonra rutin tetkikler için alınan kan örneklerinden serum örnekleri alındı. Aynı zamanda kontrol grubunu kanser dışı nedenlerle meme ameliyatı olmuş, non-tümöral meme dokusuna sahip 49 kadın hasta oluşturdu ve bu kişilerin de serum örnekleri operasyon öncesi elde edildi. Olguların yaşları, menapoz durumları, biyopsi şekli ve herhangi başka bir hastalığının olma durumunu içeren hastalara ait patoloji raporları ve meme polikliniğindeki bilgileri incelendi ve tümör grade ve evrelerine göre olgu gruplarının belirlenmesinde bu raporlardan yararlandı.

Yöntem:

A. İmmünohistokimyasal (İHK) analiz:

Her vakayı en iyi şekilde örnekleyen, kanama ve nekrozu en az, mikrodamar yoğunluğu en fazla olan % 10 formalinde fikse edilmiş parafine gömülü dokulardan 3-5 mikron kalınlığındaki kesitler, adeziv (polilizin) kaplı lamlara alındı.

Lamlar, deparafinizasyon için 56°C' lik etüvde 1 gece bekletildikten sonra, ksilende 2 kez 15'er dakika süre ile inkübe edildi. İnkübasyondan sonra, sırası ile, %100, % 80 ve % 70'lik alkolde 10'ar dakika ve sonrasında distile suda bekletilerek rehidrate edildiler.

Dokulardaki endojen peroksidaz aktivitesini ortadan kaldırmak amacıyla kesitler, % 3'lük hidrojen peroksit solüsyonunda inkübe edildi. Mikrodalga fırında 4 defa 5'er dakika sitrat buffer (pH 6) uygulanarak antijen ortaya çıkarma (retrieval) işlemi yapıldı.

Kesitler, non-spesifik immünreaktiviteyi ortadan kaldırmak için bloklama solüsyonunda inkübe edildi ve daha sonra anti-MK monoklonal antikor (Midkine (C term) rabbit monoklonal antikor Biogen Medikal) ile reaksiyona sokuldu. PBS ile yıkama sonrası antikor fazlalığı uzaklaştırıldıktan sonra, örnekler horseradish peroksidazla işaretli goat anti-mouse veya anti-rabbit antikor ile 60 dakika inkübe edildi. Reaksiyon DAB substrat sistemi ile gözlenebilir hale getirildi ve kesitlerde hematoksilinle zıt boyama işlemi gerçekleştirildi (21,22).

Kesitlerdeki MK ekspresyonu, pozitif olarak boyanan tümör hücrelerinin yüzdelerine göre ("%0-5; negatif", "%5-25; zayıf pozitif", "%25-50; pozitif" ve "%50 den fazla güçlü pozitif) skorlandırıldı (Moon, 2003). Her bir kesit, hasta kimlik ve klinik tanı bilgileri olmaksızın iki ayrı patolog tarafından değerlendirildi.

B. 1.RNA izolasyonu ve komplementer DNA sentezi

1.1.FFPE dokulardan total RNA izolasyonu ve cDNA sentezi:

Çalışmaya dahil edilen olgulara ait FFPE doku kesitlerinden total RNA izolasyonu ticari kit yardımı ile (RNeasy FFPE kit, Qiagen) yapılmış ve izolasyon uygulama basamakları aşağıda verilmiştir:

1.1.1. Parafin bloklardan total RNA izolasyonu

- Doku örneklerinden steril bistüri ve pens yardımı ile, fazla parafinin mekanik uzaklaştırma işlemi yapıldı ve steril mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı.

- Deparafinizasyon için, her örneğe 1000 µl ksilen ilave edildi ve 2.200 rpm'de vorteks yardımı ile homojenize edildi.
- Etüvde (60°C) overnight inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyon sonrası örnekler, 14.000 rpm'de 2 dk santrifüje edildi. Santrifüj sonrası süpernatant, mikropipet yardımı ile uzaklaştırıldı.
- Örnekler, uzaklaştırılan ksilen miktarı kadar tekrar ksilen koyuldu ve 14.000 rpm'de 2 dk santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrası, süpernatant uzaklaştırıldı ve pelet üzerine 1000 µl %100 etanol ilave edildi. Vorteks yardımı ile iyice homojenize olması sağlandı.
- Örnekler 14.000 rpm'de 2 dk santrifüje edildi ve süpernatant dikkatlice uzaklaştırıldı.
- Rezidüe etanolün tamamen uzaklaştığından emin olana kadar, örnekler oda ısısında inkübe edildi.
- Pelet miktarına bağlı olarak örnekler 150 µl (az pelet gözleendiğinde) veya 240 µl (yoğun pelet gözleendiğinde) kitle birlikte sağlanan PDK tamponu ve 10 µl Proteinaz K eklendi ve vorteks yardımı ile iyice homojenize olması sağlandı.
- Örnekler önce su banyosunda 55°C'de 15 dk ve sonrasında etüvde 80°C'de 15 dk inkübe edildi.
- Pelet miktarına bağlı olarak örnekler 320 µl veya 500 µl kitle birlikte sağlanan RBC tamponu eklendi ve vorteks yardımı ile iyice homojenize edildi.
- Örnekler, kitle birlikte sağlanan "gDNA eliminatör spin kolon"lara aktarıldı ve 14.000 rpm'de 30 sn santrifüje edildi. Santrifüj sonrası kolonlar uzaklaştırıldı.
- Toplama tüplerinin içerdiği miktara bağlı olarak, toplama tüplerine 720 µl veya 1200µl 100% etanol eklendi ve mikropipet yardımı ile iyice homojenize edildi.
- Homojenize edilen örneklerden 700 µl alındı ve kitle birlikte sağlanan "RNeasy MinElute spin kolon"lara aktarıldı. Kolonlar 14.000 rpm'de 15 sn santrifüje edildi.
- Toplama tüplerindeki içerik tamamen bitine kadar bir önceki basamak tekrar edildi.
- Kolonlara 500 µl kitle birlikte sağlanan RPE tamponundan eklendi 14.000 rpm'de 15 sn santrifüje edildi.
- Kolonlar aynı tamponla bir kez daha yıkandı ve 14.000 rpm'de 2 dk santrifüje edildi.
- Kolonlardaki rezidüe tamponun tamamen uzaklaştırılması için, kolonlar 14.000 rpm'de 5 dk santrifüje edildi.
- Kolonlar, steril RNase-free mikrosantrifüj tüplerine yerleştirildi ve 20 µl "RNase-free su" ilave edildi. 14.000 rpm'de 1 dk santrifüje edildi.
- Elde edilen RNA örneklerinin, konsantrasyonlarını ve saflığını belirlemek amacı ile spektrofotometrede (Biophotometer, Eppendorf) ölçümleri yapıldı. Geride kalan RNA örnekleri, cDNA sentezinde kullanılabilecek kadar -20°C'de saklandı.

1.1.2. cDNA sentezi:

İzole edilen RNA örneklerinden cDNA sentezi ticari kit yardımı ile (QuantiTect Reverse Transcription Kit, Qiagen) yapılmış ve uygulama basamakları aşağıda verilmiştir:

- Genomik DNA'nın eliminasyonu amacıyla, her örnek için aşağıdaki reaksiyon karışımı hazırlandı:

Komponent	Miktar
gDNA wipeout tamponu	2 µl
Template RNA	1 µg (her örnek için konsantrasyon hesaplaması yapıldı)
RNase-free su	X µl (her örnek için hesaplandı)
Toplam hacim	14 µl

- Hazırlanan reaksiyon karışımı 42°C'de 2 dk inkübe edildi.
- Reverse transkripsiyon amacıyla, her örnek için aşağıdaki reaksiyon karışımı hazırlandı:

Komponent	Miktar
Reverse transkriptaz (RT)	1 µl
RT tamponu	4 µl
RT primer karışımı	1 µl
Template RNA	14 µl (bir önceki basamaktan elde edilen)
Toplam hacim	20 µl

- Hazırlanan reaksiyon karışımı 42°C'de 15 dk inkübe edildi.
- Reverse transkriptazı inaktive etmek için örnekler 95°C'de 3 dk inkübe edildi.
- Örnekler, real-time PCR ile analiz edilmek üzere -20 °C'de saklandı.
-

2. Gerçek-zamanlı kantitatif PCR:

Midkine ve β -aktin (referans gen) için relatif kantitasyon analizi, gerçek-zamanlı PCR (LightCycler, 2.0; Roche Diagnostics) yöntemi kullanılarak yapıldı. Hedef Midkine geni ve β -aktin geninin çoğaltılmasında kullanılan primerler ve hidroliz problemlerinin dizaynı Tıp Molbiol (Berlin, Almanya) tarafından yapıldı. Çalışmada kullanılan primer setleri ve hidroliz prob dizilimleri Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1. Midkine ve β -aktin genine özgün primer setleri ve hidroliz problemleri dizilimleri

β -aktin

Primer seti	5'-TGA GCG CGG CTA CAG CTT-3' (Forward)
	5'-TCC TTA ATG TCA CGC ACG ATT T-3'(Reverse)
TaqMan Prob	(FAM) 5'-ACC ACC ACG GCC GAG CGG-3' (TAMRA)

Midkine

Primer seti	5'-AGA TGC AGC ACC GAG GCT-3' (Forward)
	5'-CTT TCT TTT TGG CGA CCG -3' (Reverse)
TaqMan Prob	(FAM) 5'-CAC AGG TGC TCT GGC CCA GCA CAT A-3' (TAMRA)

Midkine ve β -aktin geninin mRNA düzeyinde kantitasyonu amacıyla optimize edilen gerçek-zamanlı PCR karışımları ve protokolleri Tablo1-2'de gösterilmiştir.

Tablo 2. Midkine ve β -aktin geninin mRNA düzeyinde kantitasyonu amacı ile hazırlanan reaksiyon karışımı

İçerik	Hacim	Final konsantrasyon (Midkine için)	Final konsantrasyon (β-aktin için)
PCR-grade su	5 µl	-	-
Forward primer	2 µl	0,5 µM	0,5 µM
Reverse primer	2 µl	0,5 µM	0,5 µM
TaqMan probu	2 µl	0,2 µM	0,2 µM
Master karışımı*	4 µl	5 X	5 X
DNA / cDNA örneği	5 µl	-	-
Toplam hacim	20 µl		

*: Reaksiyonu karışımı için “LightCycler TaqMan Master” kiti kullanıldı. Master karışımı: FastStart Taq DNA polimeraz, reaksiyon tamponu, MgCl₂ ve dNTP karışımından oluşmaktadır.

Tablo 3. Midkine ve β-aktin geninin DNA ve mRNA düzeyinde kantitasyonu amacı ile uygulanan gerçek-zamanlı PCR protokolü*

Analiz Modu	Döngü	Segment	Hedef Isı	Süre	Kazanım Modu
Pre-inkübasyon					
	1		95 °C	10 dk	-
Amplifikasyon					
		Denatürasyon	95 °C	10 sn	-
	45	Annealing	60 °C	20 sn	-
		Ekstensiyon	72 °C	1 sn	Tek okuma
Soğutma					
	1		40 °C	30 sn	-

*: Gerçek-zamanlı PCR Protokolü; **Pre-inkübasyon**: Enzim aktivasyonu ve kalıp DNA'nın denatürasyonu, **Amplifikasyon**: Hedef bölgenin primerler yardımı ile çoğaltılması ve FAM-işaretili hidroliz problemleri ile ürünün belirlenmesi, **Soğutma**: Sistemde yer alan rotorun ve termal haznenin soğutulması basamaklarını içermektedir.

Her bir örnekteki hedef RNA'nın ekspresyon düzeyi, aynı örneğe ait eksternal standard olan β -aktin'in RNA örneği kullanılarak belirlendi. Ekspresyon düzeyleri LightCycler Relatif Kantitasyon Yazılımı kullanılarak hesaplandı ve relatif kantitasyon analizi, kalibratör DNA olmaksızın eksternal standard kullanılarak yapıldı. Sonuçların yorumlanması aşamasında hedef DNA / cDNA'nın miktarı, hedef (T) gen / mRNA kopya oranının referans gen / mRNA (R) kopya oranı olarak hesaplandı. Referans genin kantitasyonu, gerçek-zamanlı PCR ile kantitasyon sırasında hedef ve referans gen / mRNA arasındaki farklılığı hesaplamada, örnek yüklemedeki varyasyonları ve PCR inhibitörlerinin etkisini dengelemede yardımcı olması amacı ile seçildi. Yazılım programının hesapladığı konsantrasyon oranı 1'in üzerindeki örnekler, ekspresyon yönünden "pozitif" olarak değerlendirildi.

C. Serum MK Ölçümü

Kan örnekleri jelli düz tüplere alındıktan yaklaşık 30 dakika sonra santrifüje edilerek serumlar ayrıldı. Serumlar ayrıldıktan hemen sonra çalışma yapıncaya kadar -20°C 'ye kaldırılarak saklandı. Ölçümlerin yapılacağı zaman, dondurulmuş serumlar oda sıcaklığında eritildi. Bu serumlardan 100 μL ölçüm için kullanıldı. Firmadan alınan (Cusabio, China) ELİSA kitinin gösterdiği şekilde işlem basamakları gerçekleştirildikten sonra, 450 nm'de okuma gerçekleştirilerek serum midkine düzeyleri ng/mL olarak ölçüldü.

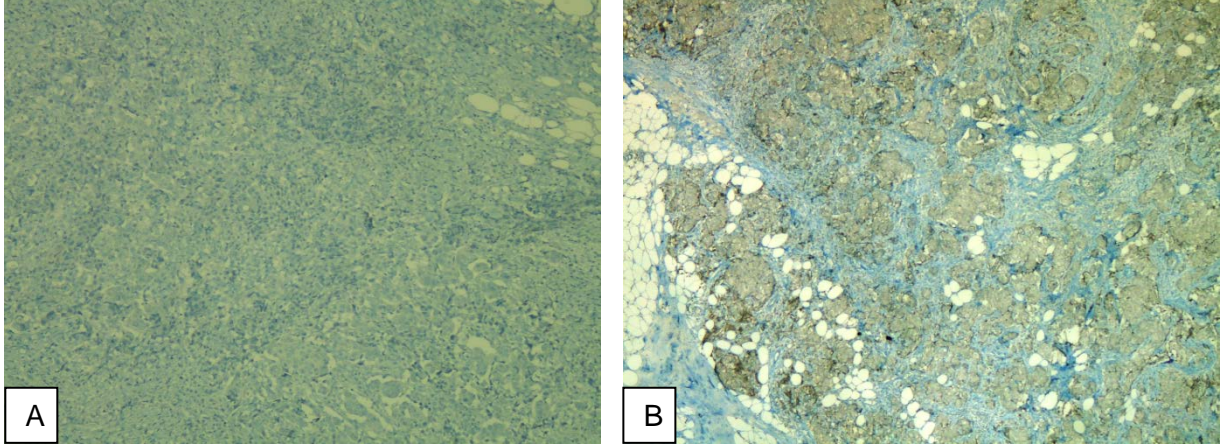
D. İstatistiksel Analiz

Hastalara ait veriler, Mann–Whitney U testi, t-testi, Oneway Anova testleri ile SPSS 17.0 paket programında değerlendirildi. P değeri 0,05 den daha az ise istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

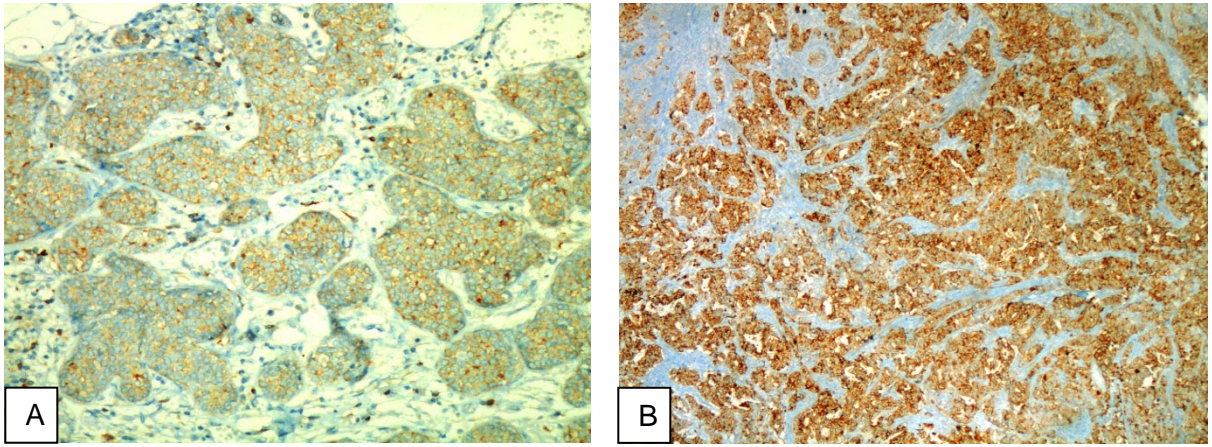
BULGULAR

Çalışmamızda hasta grubunu oluşturan 61 gönüllünün ortalama yaşı $53,38 \pm 13,74$ ile kontrol grubunun ortalama yaşı $44,00 \pm 12,89$ karşılaştırıldığında istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlıydı ($P=0,000$). Kanser tanısı alan olgularımızın 2 tanesini (%3,3) erkek hastalar oluşturmaktaydı.

Çalışmamıza katılan ve kanser tanısı alan 61 hastamızın 44 ünün(%72,1) meme dokusunda pozitif MK ekspresyonu gözlemlendi. Meme dokuları immünohistokimyasal (İHK) boyanma özelliklerine göre 17 tanesi zayıf pozitif (Fig 1A, B), 11 tanesi pozitif, 16 tanesi güçlü pozitif boyanma (Fig 2A,B) göstermiştir (Tablo 1).



Şekil.1 Meme dokusunda MK ekspresyonu. İmmünohistokimyasal boyanma yok (A)X40 ve zayıf boyanma (B)X40 örnekleri.



Şekil 2. MK ekspresyonunun meme dokusunda Pozitif (A) X100 ve güçlü pozitif (B)X40 boyanma örnekleri.

Tablo 1 :Meme kanseri hastalarının klinik parametrelere göre İHK boyanma özellikleri

Klinik parametre		-	+	++	+++	Toplam
Tümör çapı	≤2	5 (%19,2)	9(%19,2)	4(%15,4)	8(%30,8)	26 (%100)
	>2	12(%34,3)	8(%34,3)	7(%20,0)	8(%22,9)	35 (%100)
Lenf nod met	-	8(%28,6)	7(%25)	5(%17,9)	8(%28,6)	28(%100)
	+	9(%27,3)	10(%30,3)	6(%18,2)	8(%24,2)	33(%100)
Evre	I	9(%24,3)	10(%27)	8(%21,6)	10(%27)	37(%100)
	II	5 (%25)	6(%30)	3(%15)	6(%30)	20(%100)
	III	3(%75)	1(%25)	0 (%0)	0 (%0)	4(%100)
Nuklear grade	2	3(%20)	3(%20)	5(%33,3)	4(%26,7)	15(%100)
	3	14(%30,4)	14(%30,4)	6(%13,0)	12(%26,1)	46(%100)
Histolojik grade	1	0	2 (%66,7)	0	1(%33,3)	3(%100)
	2	7(%25,9)	8(%29,6)	7(%25,9)	5(%18,5)	27(%100)
	3	10(%32,3)	7(%22,6)	4(%12,9)	10(%32,3)	31(%100)
Lenfatik ve sinir invazyonu	-	9(%23,7)	12(%31,6)	9(23,7%)	8(%21,1)	38(%100)
	+	8(%34,8)	5(%21,7)	2(%8,7)	8(%34,8)	23(%100)
Yaş	<50	9(%23,1)	12(%30,8)	7(%17,9)	11(%28,2)	39(%100)
	≥50	8(%36,4)	5(%22,7)	4(%18,2)	5(%22,7)	22(%100)
Toplam		17	17	11	16	61

MK'nin meme dokusundaki ekspresyonu İHK boyanma durumuna göre değerlendirildiğinde tümör çapı, lenf nodu metastazı, evre, nuklear grade, histolojik grade, lenfatik ve sinir invazyonu bakımından önemli bir fark tespit edilememiştir.

Rastgele seçilen toplam 40 örnekte Gerçek-zamanlı relatif kantitasyon ile Midkinin mRNA düzeyinde ekspresyonları değerlendirildiğinde, 3 olguda (%7,5) mRNA düzeyinde ekspresyonun varlığı belirlenmiştir. mRNA ekspresyon varlığı olan hastaların İHK ekspresyonlarının da iyi düzeyde olduğu görülmüştür. Bir hastada meme dokusunda İHK

ekspresyon boyanması pozitif (%25-50), diğeri iki hastanın ise güçlü pozitif (%50) olduğu belirlenmiştir. Ancak meme dokusunda MK ekspresyonu İHK boyanması bakımından değerlendirildiğinde pozitif ve kuvvetli pozitif boyanmaya sahip olan başka hastalarımız olmasına karşılık mRNA ekspresyonu elde edilememiştir.

Çalışmamıza katılan ve kontrol grubunu oluşturan sağlıklı bireylerin ortalama serum MK seviyesi $1,77 \pm 0,38$ ng/mL'dir. Kontrol grubunu oluşturan bireyler menapoz durumlarına göre incelendiğinde menapozdaki ($1,65 \pm 0,22$ ng/mL) hastalarla menapoz öncesi ($1,84 \pm 0,44$ ng/mL) dönemdeki hastaların serum MK düzeyleri arasında herhangi bir fark görülememiştir ($p=0,978$).

Hasta grubunun operasyon öncesi ortalama serum MK seviyesi ($3,68 \pm 2,13$ ng/mL) ile kontrol grubunun ortalama serum MK seviyesi ($1,77 \pm 0,38$ ng/mL) karşılaştırıldığında hasta grubuna ait serum MK seviyesinin oldukça yüksek olduğunu ve istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı olduğunu bulduk. Hasta grubunun operasyon öncesi ($3,68 \pm 2,13$ ng/mL) ve tümörün çıkarılmasından sonra ($2,47 \pm 1,00$ ng/mL) serum MK seviyeleri karşılaştırıldığında, operasyon sonrası MK seviyesinin düştüğünü ve istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı olduğunu gördük ($P=0,000$). Tümör çapına göre 2 cm ve altında olanlar ile tümör çapı 2 cm'nin üzerinde olan hastaların operasyon öncesi serum MK seviyeleri karşılaştırıldığında istatistiksel bir anlamlılık söz konusu değildi ($p=0,924$). Lenf nodu metastazı olan hastaların ortalama serum MK seviyeleri lenf nodu metastazı olmayan hastaların ortalama serum MK seviyeleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı değildi (Tablo 2).

Hastalarımızı kanser evrelerine göre gruplandırmak istediğimizde 3. evrede bir hasta ve 4. evrede üç hastamız bulunmaktaydı. Hastalarımızın bu iki evrede sayısal bakımdan az olmalarından dolayı aynı grupta değerlendirerek hastalarımızı 3 evre olarak gruplandırdık. Üçüncü evrede bulunan hastaların tümör çıkarılmadan önceki serum MK seviyesi hem birinci evredeki hem de ikinci evredeki hastaların serum MK seviyesinden yüksekti ve istatistiksel olarak anlamlıydı. Operasyon sonrası serum MK seviyeleri her evrede birbirine yakın ve istatistiksel olarak anlamlı değildi (evre I; $2,57 \pm 1,03$ ng/mL, evre II; $2,26 \pm 0,96$ ng/mL, evre III; $2,58 \pm 1,10$ ng/mL).

Nuklear grade 1. evrede bir tane hasta olması nedeni ile 2. evreye dahil edildi, bu nedenle nuklear grade 2 ve 3 evreler olarak değerlendirildi. Nuklear ve histolojik grade bakımından serum MK seviyesi değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlılık göstermedi.

Lenfatik invazyonu ve/veya sinir invazyonu olan hastaların ortalama serum MK seviyeleri incelendiğinde; lenfatik invazyonu olanlarda artış göstermiş sinir invazyonu olanlarda bu

artışın daha yüksek olduğu görülmüştür. Hem lenfatik hem de sinir invazyonu olan hastaların serum MK seviyesinin en yüksek seviyede olduğu tespit edilmiştir. Lenfatik ve sinir invazyonu olmayan hastaların serum MK seviyesi en düşük seviyede idi ve istatistiksel olarak anlamlı bulunamadı (Tablo 2).

Tablo 2. Meme kanseri hastalarının klinik parametrelerine göre Serum MK seviyeleri

Klinik parametre		Hasta sayısı (n)	Operasyon öncesi serum MK seviyesi (ng/mL)	p	Operasyon sonrası serum MK seviyesi (ng/mL)	p
Tümör çapı	≤2	26	3,71±2,16	p=0,924	2,64±1,09	p=0,267
	>2	35	3,65±2,14		2,34±0,93	
Lenf nod met	-	28	3,69±2,26	p=0,959	2,53±1,00	p=0,641
	+	33	3,66±2,06		2,41±1,02	
Evre	I	37	3,71±2,09	I-III p=0,050	2,57±1,03	I-III p=1,000
	II	20	3,09±1,49	I-II p=0,520	2,26±0,96	I-II p=0,534
	III	4	6,29±3,61	II-III p=0,016	2,58±1,10	II-III p=0,837
Nuclear grade	2	15	3,86±1,84	p=0,501	2,37±0,89	p=0,681
	3	46	3,62±2,24		2,50±1,05	
Histologic grade	1	3	2,52±0,39	p=0,635	2,04±0,20	p=0,559
	2	27	3,77±1,78		2,60±1,17	
	3	31	3,71±2,50		2,39±0,88	
Lenfatik ve sinir invazyonu	-	32	3,37±1,98	p=0,565	2,28±0,80	p=0,117
	Lenf +	14	3,68±1,85		2,86±1,32	
	Sinir +	6	4,22±2,12		3,02±1,15	
	Lenf+sinir	9	4,40±3,06		2,17±0,85	
Yaş	<50	39	3,80±2,31	p=0,524	2,48±1,05	p=0,888
	≥50	22	3,46±1,81		2,44±0,94	

Meme kanseri tanısı alan hastalarımız, meme kanserinin invaziv duktal karsinom (IDC), duktal karsinom in situ (DCIS), lobular karsinom in situ (LCIS), ve müsinöz karsinom (Mca) tiplerinin bir ya da birkaçına sahipti. Sadece IDC hastaları 18 (%29,5) kişiden oluşmaktaydı. IDC ve DCIS tiplerinin her ikisine sahip 32 (%52,5) hasta mevcuttu. 2 (%3,3) kişide IDC, DCIS ve LCIS tiplerinin üçü birden tespit edildi. 3(%4,9) kişide de IDC, DCIS ile birlikte müsinöz karsinom görüldü. 1 (%1,6) kişi müsinöz karsinom, 2 (%3,3) kişi LCIS, 2 (%3,3) kişi de DCIS meme kanseri tipine sahipti. IDC ve müsinöz karsinom tiplerinin her ikisine sahip 1(%1,6) hasta mevcuttu.

Lenf nodu metastazı olup olmama durumuna göre kanser türlerini sınıflandırdığımızda müsinöz karsinoma sahip olan 1 hastayı IDC grubuna dahil ettik.

Primer invaziv kanser hastalarının metastatik meme kanseri hastalarına göre serum MK düzeyi düşüktü, ancak istatistiksel anlamlılık yoktu. DCIS lenf nodu metastazı olmayan hastaların ortalama serum düzeyi lenf nodu metastazı olan hastadan daha yüksekti. DCIS lenf nodu metastazı olmayan hastaların ameliyat sonrası ortalama serum MK seviyesinde önemli bir düşüş gözlenmesine rağmen DCIS lenf nodu metastazı olan hastanın serum düzeyi diğer gruplardan oldukça yüksekti (Tablo 3). Bu durum hastanın uzak metastaza sahip olabileceğini düşündürmekteydi.

Tablo 3: Meme kanseri olan hastaların kanser türlerine göre ameliyat öncesi ve sonrası ortalama serum MK seviyesi ve İHK boyanma oranları.

Meme kanseri türü	n	Operasyon öncesi serum MK (ng/mL)	p	Operasyon sonrası serum MK (ng/mL)	p	İHK -	İHK +
IDC lenf nod met -	25	3,50±1,67	p=0,611	2,61±1,04	p=0,617	7 (%28)	18 (%72)
IDC lenf nod met +	32	3,65±2,09		2,39±1,03		9 (%28,1)	23 (%71,9)
DCIS lenf nod met -	3	5,26±5,63		1,93±0,08		1 (%33,3)	2 (%66,7)
DCIS lenf nod met +	1	4,22		3,04		0(%0)	1 (%100)

lenf nod met - : lenf nodu metastazı yok

lenf nod met + : lenf nodu metastazı var

TARTIŞMA

Büyüme faktörleri, tümör hücreleri ve/veya stromal hücreler tarafından eksprese edilerek, büyük ölçüde tümör oluşumuna ve ilerlemesine katkıda bulunmaktadır. Çok sayıdaki çalışma dolaşımdaki büyüme faktörleri seviyesinin kanser hastalarında sağlıklı bireylere oranla artmış olduğunu ve bu büyüme faktörlerinin endokrin tarzda metastaz odaklarını teşvik edebileceğini göstermiştir (Kuroi K, 2001). Midkine, sinir hücreleri nötrofiller, makrofajlar, düz kas hücreleri, fibroblastlar ve tümör hücrelerini de içeren hedef hücreler üzerinde çeşitli etkileri indükleyebilen multifonksiyonel bir büyüme hormonudur (Kadomatsu, 2004; Muramatsu, 2002).

Tümör gelişimi, büyüme, invazyon, anjiogenez ve metastazda rol oynamaktadır. Bu nedenle bazı araştırmacılar, büyüme faktörleri içinde yer alan Midkine ekspresyonunu incelemeye ve bu ekspresyonun tümör tipi ve büyüklüğü ile olan ilişkisini ve serumdaki değerleri üzerine odaklanmıştır (Ibusuki, 2009; Ikematsu, 2000; Kaifi, 2007; Moon, 2003; Sakamoto, 2012).

MK mRNA ve protein ekspresyonunun akciğer, meme, özofagus, mide, kolorektal, idrar kesesi, prostat, glioblastoma, nöroblastoma ve Wilm's tümörleri gibi pek çok insan karsinomunda sıklıkla yükselmiştir (Aridome, 1995; Garver,1994; Konishi, 1999; Mishima,1997; Nakagawara, 1995; O'Brien, 1996; Tsutsui, 1993).

MK ekspresyonunun kanser dokusunda normal servikal dokulardan daha yüksek olduğu %88.1 kanser dokusunun anti_Midkine antibody ile reaksiyon gösterdiği belirtilmiştir (Moon, 2003).

Osteosarkoma doku örneklerinin %78,6'sı (Sueyoshi, 2012), gastrointestinal stromal tümör hastalarına ait örneklerin %54'ü (Kaifi, 2007), tiroid invaziv papillar karsinoma hastalarının %89'unda (Kato, 2000), gastrik kardiak adenokarsinom örneklerinin %76,4'ünde (Hu, 2014) MK ekspresyonu görüldüğü belirtilmektedir. Kanserli meme dokusunda aşırı MK salgılandığı (Miyashiro, 1997) ve Meme kanserinde IDC vakalarının %86'sında pozitif MK ekspresyonu gözlemlendiği (Quin, 2010) bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda 61 meme kanseri hastasına ait meme dokusu örneklerinin 44'ünde (%72.1) İHK yöntem ile MK ekspresyonu tespit edilmiştir. 56 IDC vakamıza ait 40 meme dokusunda (%71,4) İHK olarak MK ekspresyonu tespit edilmiştir. Bu yönüyle çalışmamızın İHK verilerinin yapılan çalışmalarla uyumluluk içinde olduğunu tespit ettik.

Servikal kanser vakalarında MK protein ekspresyonunun kanser evreleri, histoloji ve tümör çapı ile ilişkili olduğu (Moon, 2003) gastrointestinal stromal tümörlerde tümör çapı ile MK

ekspresyonu arasında ilişki bulunmadığı ancak proliferatif indeksle önemli bir ilişkisi olduğu belirtilmiştir. Quin ve arkadaşlarının (Quin, 2010) meme kanserinde yüksek MK ekspresyonunun lenf nodu metastazı ve TNM evreleri ile ilişkili olduğunu, yaş, menopozal durum ve tümör çapı ile ilişkili olmadığı ifade edilmiştir. Çalışmamızda kanserli meme dokularında hastaların klinik parametrelerine göre İHK yöntemi ile MK ekspresyonu değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlam göstermediğini tespit ettik.

Çalışmamızda MK'nin mRNA düzeyinde ekspresyonu rastgele seçilen 40 olgunun sadece 3 ünde (%7,5) tespit edilebilmiştir. Moon 2003 ve ark yaptıkları çalışmada servikal kanserli hastalarda MK'nin mRNA ekspresyonunu %88,1 oranında bulmuşlardır. Çalışmamızda mRNA ekspresyon düzeyinin düşük bulunma nedeninin, çalışılan örnek dokuların parafin bloklardan elde edilmesinden kaynaklandığını düşündürmektedir. Meme kanseri olan hastaların taze dokularından mRNA ekspresyon düzeyini elde etmek belki de daha sağlıklı sonuç elde etmemizi sağlayacaktır.

MK bir salgı proteini olduğu için, MK'ni fazla salgılayan tümörlere sahip hastaların periferik kanında da bulunabileceği bildirilmiştir. Özofageal karsinoma dokusundaki MK ekspresyonunun serum seviyesindeki artışı ile anlamlı ilişkisi bulunmaktadır (Kadomatsu, 2004; Shimada, 2003a; Shimada, 2003b).

Meme kanserli hastalarda plazma midkine seviyesinin kontrollerle karşılaştırıldığında yüksek olduğu ve metastatik kanser hastalarında MK seviyesinin primer invaziv kanser ve DCIS daki seviyelerden önemli ölçüde yüksek bulunduğu ifade edilmiştir. Bununla birlikte tümör çapı, nodal durum, klinik evre, vasküler invazyon, hormon reseptör durumu ve HER2 durumu açısından anlamlı bir farkın olmadığı bildirilmiştir (Ibusuki, 2009).

Ikematsu 2000 ve arkadaşlarının çalışmasında kanser hastalarının serum MK seviyesinin kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu belirtilmiştir. Bununla birlikte çeşitli kanser türlerinde serum MK seviyesindeki artışın tümör çapı ve evreye bağlı olmadığı rapor edilmiştir (Ikematsu, 2000). Kanser hastalarında, mide kanseri ve akciğer kanseri vakalarında erken safhada (evre I) bile istatistiksel olarak serum MK seviyesinin arttığını bildirmişlerdir. Karaciğer kanserli 5 hastanın tümör dokusunun cerrahi çıkarılmasından sonra 4 vakada serum MK seviyesinin önemli derecede azaldığı gözlenmiştir (Ikematsu, 2000). Çalışmamızda sağlıklı bireylerle kanser tanısı almış olan hastalarımızın serum MK düzeyleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı olduğunu tespit ettik. Hastalarımızın operasyon sonrası serum MK düzeyleri ölçüldüğünde önemli derecede düştüğünü ve istatistiksel anlamlılık olduğunu gördük. Hastalarımızı evrelere göre incelediğimizde evre III ($6,29 \pm 3,61$ ng/mL) grubunun ortalama serum MK düzeyinin evre I

(3,71±2,09 ng/mL)ve II (3,09±1,49 ng/mL) de bulunanlardan anlamlı düzeyde yüksek olduğunu tespit ettik. Çalışmamızda Evre I ve II de bulunan hastaların ortalama serum MK düzeyleri sağlıklı bireylerin ortalama serum MK (1,77±0,38 ng/mL) düzeyinden anlamlı olarak yüksektir. Çalışmamız bu yönüyle kolorektal kanser hastalarında kanser evreleriyle ilişkili olarak MK seviyesinin arttığını, erken evrede bile anlamlı olduğunu belirten Krzystek-Korpacka ve arkadaşlarının 2013 çalışmasıyla uyumluluk göstermektedir. Yine aynı çalışmada lenf nodu metastazı olan hastalarda serum MK seviyesinin daha yüksek olduğu bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda da lenf nodu metastazı olan hastalarda serum MK düzeyi yüksek olmasına karşılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Aynı zamanda tümör çapı, yaş, histolojik ve nuklear grade, ve lenfatik ve sinir invazyonuna göre de serum MK düzeyi anlamlılık göstermemiştir. Çalışmamızda IDC hastalarının lenf nodu metastazı olanların serum MK düzeyi yüksek olsa da istatistiksel olarak anlamlı değildi.

Bu bakımdan çalışmamız, endometrial karsinomada serum MK seviyesinin lenf nodu metastazı ile önemli derecede ilişkili olduğunu ifade eden Tanabe, 2008'nin çalışması ile farklılık göstermektedir.

Sonuç olarak; yapılan çalışmalarda ve bizim çalışmamızda, tümör varlığında MK ekspresyonunda bir artış olduğu görülmektedir. Bu artan ekspresyonun serum düzeyinde erken evrelerde bile yükselmiş olması ve tümörün çıkarılmasından sonra serum MK düzeyindeki azalmanın tespit edilmesi MK'nin bir kanser belirteci olarak kullanılabileceğini göstermektedir. Ancak çalışmamızda bazı hastalarda ameliyat sonrası serum MK seviyesinin az miktarda düştüğünü tespit ettik. İnmeyen serum MK düzeyine sahip hastalar takip edilerek, yüksek seviyede kalan serum MK düzeyinin metastaza bağlı olup olmadığını araştıracak yeni çalışmalara ihtiyaç vardır. Bu gibi çalışmaların yapılmasıyla MK'nin bir kanser belirteci olarak kullanılabilmesi hakkında önemli katkılar sağlanacaktır.

KAYNAKLAR

1. Aridome K., Tsutsui J., Takao S., Kadomatsu K., Ozawa M., Aikou T. and Muramatsu T. Increased midkine gene expression in human gastrointestinal cancers. *Jpn J Cancer Res* **86**: 655–661(1995).
2. Cho H., Mariotto A.B., Mann B.S., Klabunde C.N., Feuer E.J. Assessing non-cancer-related health status of US cancer patients: other-cause survival and comorbidity prevalence. *Am J Epidemiol.* 178: 339-349, (2013).

3. Choudhuri R., Zhang H.T., Donnini S., Ziche M., Bicknell R. An angiogenic role for the neurokines midkine and pleiotrophin in tumorigenesis. *Cancer Res*, 57: 1814–9, (1997).
4. Edwards B.K., Noone A.M., Mariotto A.B., Simard E.P., Boscoe F.P., Henley S.J., Jemal A., Cho H., Anderson R.N., Kohler B.A., Ehemann C.R. and Ward E.M. Annual Report to the Nation on the Status of Cancer, 1975-2010, Featuring Prevalence of Comorbidity and Impact on Survival Among Persons With Lung, Colorectal, Breast, or Prostate Cancer. *Cancer*:1-25; (2013).
5. Hanahan D., Weinberg R.A. The hallmarks of cancer. *Cell* 100: 57–70, (2000).
6. Hu X.F., Yao J., Gao S.G., Yang Y.T., Peng X.Q., Feng X.S. Midkine and syndecan-1 levels correlate with the progression of malignant gastric cardiac adenocarcinoma. *Mol Med Rep*, Sep;10(3):1409-15, (2014).
7. Hunter T. Signaling—2000 and beyond. *Cell*,100(1), 113-27, (2000).
8. Ibusuki M., Fujimori H., Yamamoto Y., Ota K., Ueda M., Shinriki S., Taketomi M., Sakuma S., Shinohara M., Iwase H., Ando Y. Midkine in plasma as a novel breast cancer marker. *Cancer Sci*, 100(9), 1735–1739, (2009).
9. Ikematsu S., Yano A., Aridome K., Kikuchi M., Kumai H., Nagano H., Okamoto K., Oda M., Sakuma S., Aikou T., Muramatsu H., Kadomatsu K., Muramatsu T. Serum midkine levels are increased in patients with various types of carcinomas. *British Journal of Cancer* 83(6): 701–706, (2000).
10. Garver R.I. Jr., Radford D.M., Donis-Keller H., Wick M.R., Milner P.G. Midkine and pleiotrophin expression in normal and malignant breast tissue. *Cancer*, 74: 1584–90, (1994).
11. Kaname T., Kuwano A., Murano I., *et al.* Midkine gene (MDK), a gene for prenatal differentiation and neuroregulation, maps to band 11p11.2 by fluorescence in situ hybridization. *Genomics*, 17(2): 514–5 (1993).
12. Kadomatsu K., Tomomura M., Muramatsu T. cDNA cloning and sequencing of a new gene intensely expressed in early differentiation stages of embryonal carcinoma cells and in mid-gestation period of mouse embryogenesis. *Biochem Biophys Res Commun*, 151: 1312–8, (1988).
13. Kadomatsu K., Hagihara M., Akhter S., Fan Q.W., Muramatsu H., Muramatsu T. Midkine induces the transformation of NIH3T3 cells. *Br J Cancer*, 75: 354–9, (1997).
14. Kadomatsu K., Muramatsu T. Midkine and pleiotrophin in neural development and cancer. *Cancer Lett*, 204: 127–43, (2004).
15. Kadomatsu K., Hagihara M., Akhter S., *et al.* Midkine induces the transformation of NIH3T3 cells. *Br J Cancer*, 75: 354–9, (1997).

16. Kaifi J.T., Fiegel H.C., Rafnsdottir S.L., Aridome K., Schurr P.G., Reichelt U., Wachowiak R., Kleinhans H., Yekebas E.F., Mann O., Ichihara-Tanaka K., Muramatsu T., Kluth D., Strate T., Izbicki J.R. Midkine as a prognostic marker for gastrointestinal stromal tumors. *J Cancer Res Clin Oncol*, 133:431–435, (2007).
17. Kato M., Maeta H., Kato S., Shinozawa T., Terada T. Immunohistochemical and In Situ Hybridization Analyses of Midkine Expression in Thyroid Papillary Carcinoma *Modern Pathology*. 13, (10) ; 1060-65, (2000).
18. Konishi N., Nakamura M., Nakaoka S., Hiasa Y., Cho M., Uemura H., Hirao Y., Muramatsu T. and Kadomatsu K. Immunohistochemical analysis of midkine expression in human prostate carcinoma. *Oncology* **57**: 253–257,(1999).
19. Krzystek-Korpaczka M, Diakowska D , Neubauer K, Gamian A. Circulating midkine in malignant and non-malignant colorectal diseases. *Cytokine* 64, 158–164, (2013).
20. Kuroi K., Toi M. Circulating angiogenesis regulators in cancer patients. *Int J Biol Markers*, **16**: 5–26 (2001).
21. Matsubara S., Tomomura M., Kadomatsu K., Muramatsu T. Structure of a retinoic acid-responsive gene, MK, which is transiently activated during the differentiation of embryonal carcinoma cells and the mid-gestation period of mouse embryogenesis. *J Biol Chem*, 265: 9441–3, (1990).
22. Mishima K., Asai A., Kadomatsu K., Ino Y., Nomura K., Narita Y., Muramatsu T. and Kurino T. Increased expression of midkine during the progression of human astrocytomas. *Neurosci Lett* **233**: 29–32, (1997).
23. Miyashiro I., Kaname T., Shin E., *et al.* Midkine expression in human breast cancers: expression of truncated form. *Breast Cancer Res Treat*, **43**: 1–6, (1997).
24. Moon H.S., Park W., Sung S.H., Choi E.A., Chung H.W., Woo B.H. Immunohistochemical and quantitative competitive PCR analyses of midkine and pleiotrophin expression in cervical cancer. *Gynecologic Oncology* 88: 289–297, (2003).
25. Muramatsu T. Midkine and pleiotrophin: two related proteins involved in development, survival, inflammation and tumorigenesis. *J Biochem*, 132: 359–71, (2002).
26. Muramatsu T. Midkine, a heparin-binding cytokine with multiple roles in development, repair and diseases. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*, 86: 410–425, (2010).
27. Murasugi A., Tohma-Aiba Y. Production of native recombinant human midkine in the yeast, *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif*, 27: 244–52, (2003).
28. Nakagawara A., Milbrandt J., Muramatsu T., Deuel T.F., Zhao H., Cnaan A. and Brodeur G.M. Differential expression of pleiotrophin and midkine in advanced neuroblastomas. *Cancer Res* **55**: 1792–1797, (1995).

29. O'Brien T., Cranston D., Fuggle S., Bicknell R., and Harris A.L. The angiogenic factor midkine is expressed in bladder cancer, and overexpression correlates with a poor outcome in patients with invasive cancers. *Cancer Res* **56**: 2515–2518, (1996).
30. Perou C.M., Sorlie T., Eisen M.B., van de Rijn M., Jeffrey S.S., Rees C.A., et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 406:747–52, (2000).
31. Qi M., Ikematsu S., Maeda N., *et al.* Haptotactic migration induced by midkine. Involvement of protein-tyrosine phosphatase zeta. Mitogen-activated protein kinase, and phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem*, 276: 15868–75, (2001).
32. Quin L.L., Huang H.L., Ping J.L., Xu W., Li J., and Dai L.C. Expression of midkine and endoglin in breast carcinomas with different immunohistochemical profiles. *APMIS*, 119: 103–110; (2010)
33. Ratovitski E.A., Kotzbauer P.T., Milbrandt J., Lowenstein C.J., Burrow C.R.. Midkine induces tumor cell proliferation and bind to a high affinity signaling receptor associated with JAK tyrosine kinase. *J Biol Chem*, 273: 3654–60, (1998).
34. Sakamoto K. and Kadomatsu K. Midkine in the pathology of cancer, neural disease, and inflammation. *Pathology International*, 62: 445–455, (2012).
35. Shimada H., Nabeya Y., Okazumi S., Matsubara H., Kadomatsu K., Muramatsu T., et al. Increased serum midkine concentration as a possible tumor marker in patients with superficial esophageal cancer. *Oncol Rep* 10: 411–414, (2003a).
36. Shimada H., Nabeya Y., Tagawa M., Okazumi S., Matsubara H., Kadomatsu K., et al. Preoperative serum midkine concentration is a prognostic marker for esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Sci* 94:628–632, (2003b).
37. Sorlie T., Perou C.M., Tibshirani R., Aas T., Geisler S., Johnsen H., et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98:10869–74, (2001).
38. Sueyoshi T., Jono H., Shinriki S., Ota K., Ota T., Tasaki M., Atsuyama E., Yakushiji T., Ueda M., Obayashi K., Mizuta H., Ando Y. Therapeutic approaches targeting midkine suppress tumor growth and lung metastasis in osteosarcoma. *Cancer Letters*, 316; 23–30, (2012).
39. Tanabe K., Matsumoto M., Ikematsu S., Nagase S., Hatakeyama A., Takano T., et al. Midkine and its clinical significance in endometrial carcinoma. *Cancer Sci* 99:1125–1130, (2008)
40. Tsutsui J., Kadomatsu K., Matsubara S., Nakagawara A., Hamanoue M., Takao S., Shimazu H., Ohi Y. and Muramatsu T. A new family of heparin-binding growth/differentiation factors: increased midkine expression in Wilms' tumour and other human carcinomas. *Cancer Res*, **53**: 1281–1285, (1993).

**TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU**

Proje Yürütücüsü:	Doç. Dr. HÜLYA ÇETİN SORKUN
Proje No:	113S056
Proje Başlığı:	Meme Kanseri Türlerinde Midkin Ekspresyonunun İmmünohistokimyasal ve PCR Analizinin Kantitatif Karşılaştırılması ve Serum Midkin Seviyesi
Proje Türü:	Hızlı Destek
Proje Süresi:	12
Araştırmacılar:	ERGÜN ERDEM, SEVGİ ÖZKAN, METİN AKBULUT, EMRE TEPELİ, YAŞAR ENLİ
Danışmanlar:	
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:	PAMUKKALE Ü. DENİZLİ SAĞLIK HİZMETLERİ MESLEK Y.O.
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:	01/09/2013 - 01/09/2014
Onaylanan Bütçe:	23600.0
Harcanan Bütçe:	23599.26
Öz:	Midkine heparin bağlayıcı bir büyüme faktörüdür. Çalışmamızın amacı meme kanserli hastalarda meme dokusunda, ameliyat öncesi ve sonrası serumda MK ekspresyon düzeyini tespit etmektir. Çalışmamızda 61 meme kanserli olgu hasta, 49 sağlıklı kadın kontrol grubunu oluşturdu. 61 hastamızın 44 ünün meme dokusunda pozitif MK ekspresyonu gözlemlendi. Meme kanserli hastaların tümör çıkarılmadan önce serum MK seviyeleri kontrol grubundan yüksekti. Tümörün çıkarılmasından sonra serum MK seviyesi anlamlı derecede düşmüştü. MK prognostik bir göstergedir.
Anahtar Kelimeler:	: Midkine, Meme kanseri, Serum, İmmünohistokimya, Real-time kantitatif PCR, ELISA
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu Mu?:	Hayır