ÇANKIRI KARATEKİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

IRAKLI KADIN MEME KARSİNOMU HASTALARINDA FARE MEME TÜMÖRÜ BENZERİ (MMTV-BENZERİ) VİRÜSÜN MOLEKÜLER TESPİTİ

Hasan Ali Mohammed AL-CHAABAWI

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ÇANKIRI
2020

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Hasan Ali Mohammed AL-CHAABAWI tarafından hazırlanan "Iraklı Kadın Meme Karsinomu Hastalarında Fare Meme Tümörü Benzeri (MMTV-benzeri) Virüsün Moleküler Tespiti" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : *Dr. Öğr. Üyesi Müge FIRAT / Türkiye*

Eş Danışman : *Prof. Dr. Mohammed E. MANSUR / Irak*

Jüri üyeleri :

Doç. Dr. Özgür KUZUKIRAN, Çankırı Karatekin Üniversitesi
Çankırı Karatekin Üniversitesi, Eldivan SHMYO, Veterinerlik Bölümü

Dr. Öğr. Üyesi Müge FIRAT, Çankırı Karatekin Üniversitesi
Çankırı Karatekin Üniversitesi, Eldivan SHMYO, Veterinerlik Bölümü

Dr. Öğr. Üyesi, Emre ÖZAN, Ondokuz Mayıs Üniversitesi
Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Veterinerlik Laboratuvar Hayvanları Anabilim Dalı

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Dr. Öğr. Üyesi İlkay ÇOLAK
Enstitü Müdürü

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Çankırı Karatekin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğine göre hazırlamış olduğum "Iraklı Kadın Meme Kanseri Hastalarında Fare Meme Tümörü Benzeri (MMTV-benzeri) Virüsün Moleküler Tespiti" konulu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı, tezin içerdiği yenilik ve sonuçları başka bir yerden almadığımı, tezde kullandığım eserleri usulüne göre kaynak olarak gösterdiğimi, tezin Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nden başka bir bilim kuruluna akademik amaç ve unvan almak amacıyla vermediğimi ve bu çalışmanın Çankırı Karatekin Üniversitesi tarafından kullanılan "Bilimsel İntihal Tespit Programı"yla tarandığını, "intihal içermediğini" beyan ederim. Çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması halinde ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara razı olduğumu bildiririm. Çankırı Karatekin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca gereğinin yapılmasını arz ederim. (……/……/20…..).

HASAN ALI MOHAMMED AL-CHAABAWI

(imza)

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

IRAKLI KADIN MEME KARSİNOMU HASTALARINDA FARE MEME TÜMÖRÜ BENZERİ (MMTV-BENZERİ) VİRÜSÜN MOLEKÜLER TESPİTİ

Hasan Ali Mohammed AL-CHAABAWI

Çankırı Karatekin Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman : Dr. Öğr. Üyesi Müge FIRAT / Türkiye
Eş Danışman : Prof. Dr. Mohammed E. MANSUR / Irak

Fare meme tümörü virüsünün (MMTV) 74 yıldan uzun bir süre önce anne sütü yoluyla bulaşarak, tarla ve deney farelerinin %95'inde meme tümörlerine neden olduğu keşfedilmiştir. MMTV'nin keşfinden bu yana, insanlarda da meme kanserine sebep olan benzer virüslerin nedenler bulmak için pek çok araştırma başlamıştır ve insan meme tümörü virüsü (HMTV) keşfedilmiştir. HMTV, MMTV-benzeri virüs olarak da anılmaktadır. İnsan meme kanseri çalışması için bir hayvan modeli olarak kabul edilen MMTV-benzeri virüs, anneden kızına süt emme yoluyla bulaşabilmektedir. Bu tez çalışmasında; Iraklı kadın meme kanseri hastalarından alınmış olan doku biyopsilerinde, moleküler yöntemler kullanılarak fare meme tümörü-benzeri virüsü env geni varlığı ve meme kanseri ile ilişkisi araştırılmıştır. Elde edilen pozitif sonuçlar, benzer çalışmaların yapıldığı ve raporlandığı diğer bazı ülkelerin sonuçları ile karşılaştırılmıştır.

2021, 44 sayfa

ANAHTAR KELİMELER: Meme kanseri, MMTV-benzeri virüs, PZR, Irak.

ABSTRACT

Master Thesis

MOLECULAR DETECTION OF MOUSE MAMMARY TUMOR-LIKE VIRUS (MMTV-LIKE) IN BREAST CARCINOMA FOR IRAQI FEMALE PATIENTS

Hasan Ali Mohammed AL-CHAABAWI

Çankırı Karatekin University
Institute of Science
Department of Biology

Supervisor : Asst. Prof. Dr. Müge FIRAT / Turkey
Co-supervisor : Prof. Dr. Mohammed E. MANSUR / Iraq

The mouse mammary tumor virus (MMTV) was discovered over 74 years ago to be transmitted through mothers' milk and causal for mammary tumours in 95% of field and experimental mice. Since the discovery of MMTV, many studies have been conducted to find causes of similar viruses that cause breast cancer in humans, and human breast tumor virus (HMTV) has been discovered. HMTV is also referred to as MMTV-like virus. Considered an animal model for the human breast cancer study, MMTV-like virus can be transmitted from mother to daughter by sucking milk. In this thesis; the relationship between mouse breast tumor-like virus and breast cancer was investigated using molecular methods in tissue biopsies taken from Iraqi female breast cancer patients. The positive results obtained were compared with the results of some other countries where similar studies were conducted and reported.

2021, 44 pages

KEYWORDS: Breast cancer, MMTV-like virus, PCR, Iraq.

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

"Iraklı Kadın Meme Karsinomu Hastalarında Fare Meme Tümörü Benzeri (MMTV-Benzeri) Virüsün Moleküler Tespiti" isimli bu yüksek lisans tez çalışması, 2019-2020 yılları arasında çalışılmış ve 2020-2021 Güz Dönemi bitiminde Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'ne "Yüksek Lisans Tezi" olarak sunulmuştur. Bu çalışmanın amacı, Iraklı Kadın hastalarının meme kanserinde fare meme tümörü-benzeri virüs genini tespit etmektir. Meme kanseri, özellikle kadınlarda olmak üzere diğer kanserlerden kaynaklanan ölümlerin önde gelen nedenlerinden birisidir.

Maalesef bu hastalığa yakalananlardan biri olan Sevgili Annem de dahil olmak üzere bu korkunç hastalığa karşı savaşan kahraman meme kanseri hastalarına şükranlarımı sunarım.

Tez çalışmam boyunca yardımları ile yanımda olan Türkiye'deki danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Müge FIRAT'a teşekkür ederim.

Tez çalışmam boyunca çalışmamım hem pratik hem de teorik kısmını tamamlamama yardımcı olan, bilgi ve deneyimleni benden esirgemeyen Irak'taki eş danışmanım Prof. Dr. Mohammed E. MANSUR'a teşekkür ederim.

HASAN ALI
Çankırı, Şubat 2021

İÇİNDEKİLER

ÖZET…….…….....i
ABSTRACT……. ……..…… ii
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR…...……..…….iii
İÇİNDEKİLER……..…….....iv, v
SİMGELER DİZİNİ…….……vi
ŞEKİLLER DİZİNİ……...vii, viii
TABLOLAR DİZİNİ ……..……ix
1. GİRİŞ…… ……..……1
1.1 Kanser…….…….……...1
1.2 Meme Kanseri……..……...2
2. LİTERATÜR ÖZETİ……..5
2.1 MMTV ….……..……5
2.2 MMTV-Benzeri Virüs…….……..……6
2.3 MMTV ve MMTV-Benzeri Virüs Karşılaştırılması……...……8
3. MATERYAL VE METOD…….…….…….……...9
3.1 MATERYAL…….……9
3.1.1 Örneklerin Toplanması…….…….……..…..9
3.1.2 Kullanılan Kimyasallar…... …….…….……..10
3.1.3 Kullanılan Cihazlar…….…….……...11
3.2. METOD…….....…….…….…….....12
3.2.1 DNA İzolasyonu……..…….……13
3.2.2 DNA Konsantrasyonlarının Ölçülmesi…….…….…15
3.2.3 Tek Basamaklı Konvensiyonel PZR ile MMTV-Benzeri Virüs Geninin Tespiti……15
3.2.4 RNA İzolasyonu……....18
3.2.5 RNA Konsantrasyonlarının Ölçülmesi ……..……....19
3.2.6 Tek Basamaklı Gerçek Zamanlı (Real-Time) RT-PZR ile MMTV-Benzeri Virüs Geninin Tespiti…….……...……19
4. BULGULAR ……..21
4.1 DNA Konsantrasyonları……..21

4.2 RNA Konsantrasyonları……..21
4.3 Tek Basamaklı Konvensiyonel PZR ……..21
4.4 Tek Basamaklı Gerçek Zamanlı (Real-Time) RT-PZR …….…..26
5. TARTIŞMA VE SONUÇ…….…….……....27
KAYNAKLAR ……..…….……...29
ÖZGEÇMİŞ……...35

SİMGELER DİZİNİ

°C	Santigrat
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µm	Mikrometre
µM	Mikromolar
mL	Mililitre
HMTV	Human mammary tumor virus-İnsan meme tümörü virüsü
MMTV	Mouse mammary tumor virus-Fare meme tümörü virüsü
RNA	Ribonükleik asit
cDNA	Complementary DNA-Tamamlayıcı deoksiribonükleik asit
DNA	Deoksiribonükleik asit
dk	Dakika
sn	Saniye
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
Real Time-PZR	Gerçek Zamanlı- Polimeraz zincir reaksiyonu
FFPE	Formalinle sabitlenmiş parafine gömülmüş
UV	Ultraviyole
env	Zarf
bp	Base pair-baz çifti
BC	Breast cancer-Meme kanseri
nm	nanometre

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1 48 yaşındaki bir asemptomatik kadın hastaya ait mamografi taramasında; kraniyokaudal mamografide nokta büyütme ile, malignite şüphesi taşıyan yoğun pleomorfik kalsifikasyonlar……3
Şekil 1.2 Breast - Global Cancer Observatory - iarc 2018 istatistiklerine göre dünyadaki diğer kanserlerle karşılaştırıldığında yeni meme kanseri vaka sayıları…….4
Şekil 1.3 Breast - Global Cancer Observatory - iarc 2018 istatistiklerine göre dünyadaki diğer kanserlerle karşılaştırıldığında meme kanserine bağlı ölümlerin sayısı..4
Şekil 3.1 Formalinde Fikse Edilmiş Parafine Gömülü (FFPE) meme kanseri doku örnekleri…….9
Şekil 3.2 Morter-Pestle ve mikrotomla numunelerin işlenmesi……9
Şekil 3.3 Spektrofotometre……..……15
Şekil 3.4 a) Isısal döngü cihazı, b) Agaroz jel elektroforezi tankı……..17
Şekil 3.5 Ultraviyole transilluminator…….17
Şekil 3.6 Spektrofotometre……..19
Şekil 3.7 Gerçek zamanlı RT-PZR ısısal döngü cihazı…….……..20
Şekil 4.1 N negatif kontrol, S1-S10 (kötü huylu kanser örnekleri), C1-C6 (iyi huylu kanser örnekleri) için β-globin geninin konvensiyonel PZR sonuçları……..22
Şekil 4.2 N negatif kontrol, S11-S26 (kötü huylu kanser örnekleri) için β-globin geninin konvensiyonel PZR sonuçları……..22
Şekil 4.3 N negatif kontrol, S27-S42 (kötü huylu kanser örnekleri) için β-globin geninin konvensiyonel PZR sonuçları……..22
Şekil 4.4 N negatif kontrol, S43-S58 (kötü huylu kanser örnekleri) için β-globin geninin konvensiyonel PZR sonuçları……..23
Şekil 4.5 N negatif kontrol, S59-S74 (kötü huylu kanser örnekleri) için β-globin geninin konvensiyonel PZR sonuçları……..23
Şekil 4.6 N negatif kontrol, S75-S82 (kötü huylu kanser örnekleri) için β-globin geninin konvensiyonel PZR sonuçları……..23
Şekil 4.7 N negatif kontrol, S1-S10 (kötü huylu kanser örnekleri), C1-C6'dan (iyi huylu kanser örnekleri) için MMTV-benzeri env geninin konvensiyonel PZR sonuçları……24

Şekil 4.8 N negatif kontrol, S11-S26 (kötü huylu kanser örnekleri) için MMTV-benzeri env geninin konvensiyonel PZR sonuçları……..24
Şekil 4.9 N negatif kontrol, S27-S42 (kötü huylu kanser örnekleri) için MMTV-benzeri env geninin konvensiyonel PZR sonuçları……..24
Şekil 4.10 N negatif kontrol, S43-S58 (kötü huylu kanser örnekleri) için MMTV-benzeri env geninin konvensiyonel PZR sonuçları……..25
Şekil 4.11 N negatif kontrol, S59-S74 (kötü huylu kanser örnekleri) için MMTV-benzeri env geninin konvensiyonel PZR sonuçları……..25
Şekil 4.12 N negatif kontrol, S75-S82 (kötü huylu kanser örnekleri) için MMTV-benzeri env geninin konvensiyonel PZR sonuçları……..25
Şekil 4.13 MMTV-benzeri env geninin konvensiyonel PZR sonuçları pozitif çıkan 16 örneğin ve negative kontrolün Tek Basamaklı Gerçek Zamanlı RT- PZR sonuçları…….…….26

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Farklı ülkelerde yapılan çalışmalarda, 2007 ve 2019 yılları arasında insan meme kanseri örneklerinde MMTV-benzeri virüs bulunma oranı…….7
Çizelge 3.1 Stok çözeltilerin listesi……..10
Çizelge 3.2 Ekipman ve cihazların listesi…….11
Çizelge 3.3 Çalışmanın algoritması……..12
Çizelge 3.4 PZR amplifikasyonu için kullanılan primerlerin listesi……16
Çizelge 3.5 Tek basamaklı konvensiyonel PZR karışımı……17
Çizelge 3.6 Tek Basamaklı Gerçek Zamanlı RT-PZR ile MMTV env geni amplifikasyonunda kullanılan primerlerin listesi…….20
Çizelge 3.7 Tek Basamaklı Gerçek Zamanlı RT-PZR karışımı……...20

1. GİRİŞ

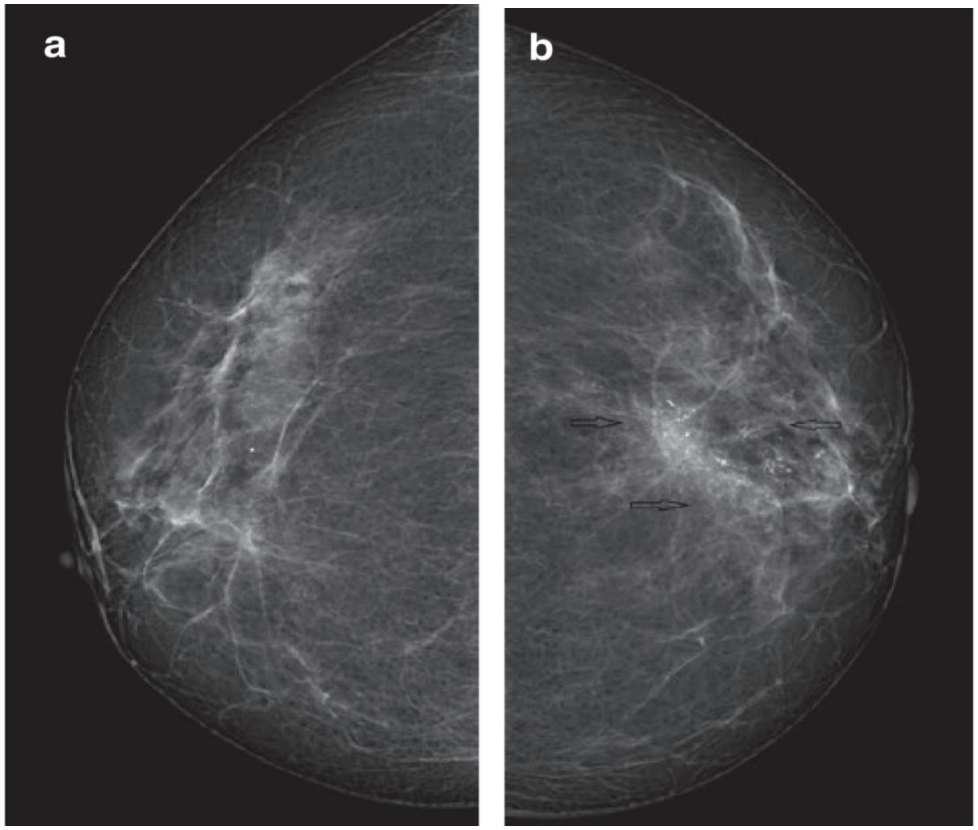
1.1 Kanser

Kanser tek bir hastalığı temsil etmeyen, insan vücudundaki farklı doku ve hücre türlerinde sayısız endojen veya eksojen kanserojen ajan ve çeşitli etiyolojik mekanizmaları içeren sayısız hastalığın toplamıdır. Kanser, trilyonlarca hücreden oluşan insan vücudunun her yerinde başlayabilir (Howlander *et al.* 2015). Kanser geliştiği zaman, organizmadaki düzenli süreç bozulur ve hücreler giderek daha anormal hale geldikçe, eski veya hasarlı hücreler ölmeleri gerektiği halde hayatta kalarak ihtiyaç duyulmayan yeni hücreler oluşturur. Bu ekstra hücreler durmadan bölünebilir ve tümör adı verilen büyümeler oluşturabilir (Siegel *et al*. 2015; Jemal *et al.* 2011). Kanserli tümörler kötü huyludur, yani yakındaki dokulara yayılabilir veya onları istila edebilirler. Ayrıca, bu tümörler büyüdükçe bazı kanser hücreleri parçalanabilir, kan veya lenf sistemi yoluyla vücudun uzak yerlerine gidebilir ve orijinal tümörden uzak yeni tümörler oluşturabilirler (Torre *et al*. 2012). Kanserlerin çoğu (%90-95); vakaların çevresel ve yaşam tarzı faktörlerinden etkilenen genetik mutasyonlardan kaynaklanmaktadır. Geriye kalan kısmı (%5-10) ise kalıtımsal olarak genetik kökenlidir (Schütze *et al.* 2011; Islami *et al* 2018). Çevresel faktörler, yalnızca kirlilik yönünden değil ayrıca yaşam tarzı, ekonomik ve davranışsal faktörler gibi genetik olarak miras alınmayan herhangi bir nedeni de ifade eder. Kanser sonucu ölüme katkıda bulunan yaygın çevresel faktörler arasında; tütün (%25-30), diyet ve obezite (%30-35), enfeksiyonlar (%15-20), radyasyon (hem iyonlaştırıcı hem de iyonlaştırıcı olmayan-%10 kadar), fiziksel aktivite eksikliği ve kirlilik bulunmaktadır. Belirli bir kansere neyin neden olduğunu kanıtlamak genellikle mümkün değildir, çünkü çeşitli nedenlerin vücutta bıraktığı belirli bir parmak izi yoktur. Örneğin, tütün kullanan bir kişi yoğun bir şekilde akciğer kanseri geliştirirse, o zaman muhtemelen tütün kullanımı neden olmuştur, ancak hava kirliliği veya radyasyonun sonucu olarak herkesin akciğer kanserine yakalanma şansı düşük de olsa olduğundan, kanser bu nedenlerden biri nedeniyle de gelişmiş olabilir (Cohen *et al*. 2019; Anand *et al.* 2008; Kushi *et al*. 2012; McPherson *et al*. 2000).

1.2 Meme Kanseri

Meme kanseri, memenin süt kanallarını veya loblarını kaplayan hücrelerin anormal büyümesi olarak tanımlanır. Karsinomlar genelde süt kanallarında, bazen loblarda ve dokuların geri kalanında, çok az olarak da şeffaf bir sıvı içinde memedeki doku ve bağışıklık hücrelerinin kalıntılarını lenf düğümleri adı verilen küçük düğümlere taşıyan kanallar olan lenf damarlarında şekillenir. Lenf damarları genellikle koltuk altı bölgesindeki düğümlere ve bazen köprücük kemiğinin üzerindeki veya sternumun altındaki düğümlere akar. Kanser hücreleri, lenf kanallarına girebilir ve bu kanallardan lenf düğümlerine ve daha sonra lenf damarları veya kan damarları yoluyla vücudun diğer organlarına yayılabilir. Meme kanseri hakkında anlaşılması gereken en önemli invaziv hücreli karsinom ile in situ hücreli karsinom arasındaki farktır ,birisi noktalardan. anormal hücrelerin kanalların ve lobların ;en tehlikeli kanserdir İnvaziv hücreli karsinom Kanserin .yayılması ve memeyi çevreleyen dokulara çıkması sonucu ortaya çıkar içinden organlara lenf düğümlerine ve ileri evrelerde karaciğer, akciğerler ve kemikler gibi diğer yayılması şeklinde ilerleyebilir. meme dokusundaki hücrelerin ;Meme kanseri sonuçlanan kontrolsüz olarak değiştiği ve bölündüğü, tipik olarak bir kitle veya kitle ile Meme .başlar (bir hastalıklar grubudur. Meme kanserleri lobüllerde (süt bezlerinde ve kolay tedavi semptom göstermez kanseri tipik olarak tümör küçük olduğunda En yaygın .erken teşhis için önemlidir meme kanseri taraması Bu nedenle .edilebilir koltuk altı lenf Bazen meme kanseri .oluşumudur fiziksel belirti ağrısız bir yumru ve orijinal meme tümörü hissedilecek kadar büyük olmadan önce yayılır düğümlerine Daha az görülen belirti ve semptomlar arasında .bile bir yumru veya şişmeye neden olur cildin şişmesi, kalınlaşması veya kızarıklığı gibi kalıcı ,hissi göğüs ağrısı veya ağırlık meme özellikle kanlı, ölçeklenme veya retraksiyon varsa spontan akıntılı değişiklikler ve veya lobülleri Nipele bağlayan kanallarda oluşan Memede .görülür başı değişiklikleri *et* Giuliano) değerlendirilmelidir herhangi bir kalıcı değişiklik bir doktor tarafından yöntemidir ve teşhis Mamografi, meme kanserinin erken teşhisi için en iyi .(*al*.2017 kanseri taraması yapılan kadınlarda ölüm oranlarında meme *et* Sanders) sağlar azalma meme muayenesi, basitliği ve düşük maliyeti yapılan kendi kendine Her ay .(2015 .*al* azalmasına yol mamografi taramasına alternatif olabilir. Ancak mortalitenin nedeniyle Üstelik kadınlar arasında gereksiz anksiyete gibi yarardan .açtığına dair bir kanıt yoktur

Manyetik rezonans .çok zarara yol açtığı için bu uygulamadan vazgeçilmektedir meme kanseri yüksek riskli kadınlarda tarama için önerilmektedir görüntüleme sadece (Le-Petross and Shetty 2011; Magnus *et al*. 2011; Freer 2015; Rosenberg *et al.* 2006; Sardanelli *et al.* 2017; Shaheen *et al.* 2011)



Şekil 1.1 a ve b 48 yaşındaki bir asemptomatik kadın hastaya ait mamografi taramasında; kraniyokaudal mamografide nokta büyütme ile, malignite şüphesi taşıyan yoğun pleomorfik kalsifikasyonlar (Aydıner vd. 2019)

Küresel olarak tüm dünyada, hem kanser insidansı hem de kansere bağlı ölümler hızla artmaktadır. 2018 yılında WHO/Breast - Global Cancer Observatory-iarc 2018 istatistiklerine göre 2,088,849 yeni meme kanseri vakası teşhis edilmiş (Şekil 1.2) ve 626,679 hastanın öldüğü belirtilmiştir (Şekil 1.3) (Bray *et al.* 2018). Bu sayılar, istatistiksel olarak akciğer kanseri insidansına eşit olup, insidans açısından tüm kanserlerin %11,6' sına karşılık gelmektedir. Ölüm oranı açısından, meme kanseri kadınlar için 1 numaralı kanser tipidir ve dünya çapındaki tüm kanserlere bağlı ölümler içinde payı %6,6 olarak belirlenmiştir. Dünyanın farklı ülkelerinde/bölgelerinde bu oranlar farklılık göstermektedir. Meme kanseri, 185 ülkenin 154 'ünde kadınlarda en sık

teşhis edilen kanserdir ve aynı zamanda 100'den fazla ülkede kansere bağlı ölümlerin önde gelen nedenidir (Ferlay *et al.* 2000; Bray *et al.* 2018).



Şekil 1.2 Breast - Global Cancer Observatory - iarc 2018 istatistiklerine göre dünyadaki diğer kanserlerle karşılaştırıldığında yeni meme kanseri vaka sayıları (Ferlay *et al.* 2000; Bray *et al*. 2018).



Şekil 1.3 Breast - Global Cancer Observatory - iarc 2018 istatistiklerine göre dünyadaki diğer kanserlerle karşılaştırıldığında meme kanserine bağlı ölümlerin sayısı (Ferlay *et al.* 2000; Bray *et al.* 2018).

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 MMTV

ve farelerde meme Fare meme tümörü virüsü (MMTV), süt yoluyla bulaşan betaretrovirüstür bir karsinomlarını uyaran. da John Joseph Bittner'1936 ,MMTV genç farelere bulaştırılabilen kanserli bir ajan veya "süt tarafından kanserli annelerden ve farelerdeki meme anne sütünde bulunan bir virüstür faktörü" olarak tanımlanmış Daha önceleri basit bir retrovirüs .(tümörlerinin çoğuna sebep olmaktadır (Bittner 1936 eğer eksojen ya da endojen yolla aktarılabileceği nün'MMTV olarak sınıflandırılan bildirilmiştir anne fareden yavrularına süt ile geçebildiği eksojen olarak aktarılıyorsa (Okeoma *et al*. 2007). Endojen yolla bulaşan MMTV ise, normal meme gelişimini ve laktasyonu düzenleyen tüm hormon yelpazesine yanıt verir, prolaktine (Muñoz ve Bolander 1989) ve ayrıca steroid hormonlara (androjenler, glukokortikoidler ve progestinler) yanıt gösterilmiştir (Ham *et al*. 1988). Fare ergenliğe ulaştığında virüs, östrojene duyarlı dokularda haberci RNA'sını eksprese etmeye başlar. Sonuç olarak, ergenlikten sonra tüm meme hücreleri aktif retrovirüsü içerecek ve virüs genomu çoğalmaya başlayacak ve tüm yeni meme dokusunda viral haberci RNA'yı eksprese edecektir. Bir retrovirüs olarak MMTV, viral genomunu konakçı hücre genomuna yerleştirebilir. Virüs RNA genomu, ters transkriptaz aracılığı ile DNA'ya ters transkripsiyon yapılır, virüsün bu ara DNA durumuna provirüs denir. Virüs DNA'sı bir onkojenin içine veya hatta yakınına yerleştiğinde, o genin ifadesini değiştirebilir ve kansere neden olabilir (Mant *et al*. 2004). bir B tipi mensup MMTV, retroviridae ailesine oncornavirüstür (Luther and Acha-Orbea 1997). MMTV, oldukça yoğun bir nükleokapsid ile çevrili pozitif polariteli tek iplikçikli RNA genomunun iki özdeş kopyasını taşır (Coffin 1996). MMTV partilülü yaklaşık 150 nm çapında ve küreseldir (Luther and Acha-Orbea 1997). Virüsün yüzeyinde, zarf proteinleri olan gp36 ve gp52'yi temsil eden karakteristik sivri dikenler bulunur (Luther and Acha-Orbea 1997). Viral zarf glikoproteinleri gp36 ve gp52, virüs env (zarf) geni tarafından kodlanır (Labat 1998; Luther and Acha-Orbea 1997).

2.2 MMTV-Benzeri Virüs

proteinini kodladığı ve ihraç fazladan bir kendi kendini düzenleyen mRNA nün'MMTV ilk karmaşık kemirgen retrovirüsü olduğu tespit edilmiştir belgelenen ,bu nedenle (Mertz *et al* 2005; Indik *et al* 2005). Bu gözlemler, insan meme kanserinde de benzer bir virüs etkisinin arayışına yol açmıştır. Morfolojik ve immünolojik olarak yakın benzerlik defalarca gösterilmiştir ve insan meme kanserlerinde MMTV'ye benzer (%90-98) bir moleküler yapının kimliği identifiye edilmiştir (Wang *et al.* 1995). İnsanlarda MMTV-benzeri virüse insan meme tümörü virüsü (HMTV) de denilmektedir (Liu *et a.l* 2001) MMTV-benzeri virüsün Virüsün .ekzojen veya endojen yolla aktarılabildiği bildirilmiştir anne fareden yavrularına süt ile geçirilmesidir ,ekzojen olarak aktarılması (Mant *et al.* 2004). İnsan meme kanseri çalışmaları için bir hayvan modeli olarak kabul edilen MMTV benzeri gen dizisi de, anneden kızına süt yoluyla bulaşabilmektedir. Sütün yutulmasından sonra, virüsler gastrointestinal sistem yoluyla yeni konağın makrofaj, dendritik hücre ve lenfositlerini infekte edecekleri Peyer plaklarına yayılır. Virüs enfekte olan lenfositler tarafından mukoza ile ilişkili lenfoid dokunun bir parçası olarak meme bezine taşınır (Akhter *et al.* 2014). Daha sonra MMTV-benzeri virüs konakçı meme epitel hücrelerinin DNA'sına entegre olur (Wang *et al.* 1995). Yapılan çalışmalar, MMTV ile en az %95 özdeşliği paylaşan MMTV-benzeri dizilerinin, insan meme kanserinde yüksek oranda eksprese edildiğini göstermiştir (Etkind *et al.* 2000; Wang *et al.* 1995; Wang *et al.* 2001). Ayrıca, meme kanserinden alınmış viral partiküllerin primer hücre kültürlerinde çoğaltıldıktan sonra yapılan dizileme reaksiyonları sonucu MMTV'e benzer diziler elde edilmiştir (Melana *et al.* 2007).

çalıştığımız konuyla ilgili ilk çalışma Bu tez çalışmasında olan “Suudi Arabistan'da İnsan Meme Kanseri Dokularında ve Komşu Normal Meme Dokularında Fare Meme Tümörü Virüsü (MMTV)-Benzeri Dizilerinin Yaygınlığı” Suudi Arabistan’da bildirilmiştir (Al Dossary *et al.* 2018). Amacı Suudi Arabistanlı kadınların meme kanseri örneklerinde MMTV-benzeri gen dizilerinin bulunup bulunmadığını belirlemek olan bu çalışma sonucunda, PZR ile test edilen 103 meme kanseri hastasından 9 tanesinde (%8,7) MMTV-benzeri env geni proviral dizilerinin belirlendiği bildirilmiştir. Bu sonuçlar, Suudi

Arabistan popülasyonunda MMTV-benzeri gen dizilerinin mevcut olduğunu göstermektedir.

Meme kanseri vakaları ile ilgili bazı ülkelerde yapılan bazı çalışmalarda, bu tez çalışmasında olduğu gibi MMTV-benzeri gen dizilerinin tespit edildiği bildirilmiştir. En eskiden en yeniye sıralanacak olursa; Meksika'da 119 örneğin % 4,2'sinde (Zapata *et al.* 2007), Amerika Birleşik Devletleri'nde 74 örneğin %45'inde (Lawson *et al*. 2010), Avustralya'da 91 örneğin %5'inde (*et al* Harpreet. 2011), Fas'da 42 örneğin %57,14'ünde (Slaoui*et al*. 2014), Mısır'da 23 örneğin %6,7'sinde (*et al* Amany. 2015), İran'da 59 örneğin %32,2'sinde (Shervin *et al*. 2017), Suudi Arabistan'da 194 örneğin %8,7'sinde (Al Dossary *et al*. 2018), Sudan'da 50 örneğin % 36'sında (Ammar *et al*. 2019) araştırılan meme kanseri vakaları arasında MMTV-benzeri gen dizileri tespit edilmiştir. Bu çalışmaların çoğunda, MMTV-benzeri gen dizilerinin tespiti için PZR teknolojisini kullanılmıştır. MMTV-benzeri gen varlığı ile ilgili bu çalışmalar Çizelge 2.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.1 Farklı ülkelerde yapılan çalışmalarda, 2007 ve 2019 yılları arasında insan meme kanseri örneklerinde MMTV-benzeri virüs bulunma oranı.

Yıl	Ülke	Örnek sayısı ve MMTV-benzeri pozitif örnek sayısı	MMTV-benzeri pozitiflik oranı (%)	Referans
2007	Meksika	119-5	%4,2	Zapata-Benavides et 2007 .al
2010	USA	74-33	%45	Lawson *et al.* 2010
2011	Avustralya	91-5	%5	Harpree et a*l. 2011*
2014	Fas	42-24	%57,14	Slaouiet al . *2014*
2015	Mısır	23-2	%6,7	Tawfik et a*l.* 2015
2017	İran	59-19	%32,2	Shariatpanahi *et al.* 2017
2018	S. Arabistan	103-15	%8,7	Al Dossary *et al.* 2018
2019	Sudan	50-18	%36	El Hassan *et al.* 2019

2.3 MMTV ve MMTV-Benzeri Virüs Karşılaştırılması

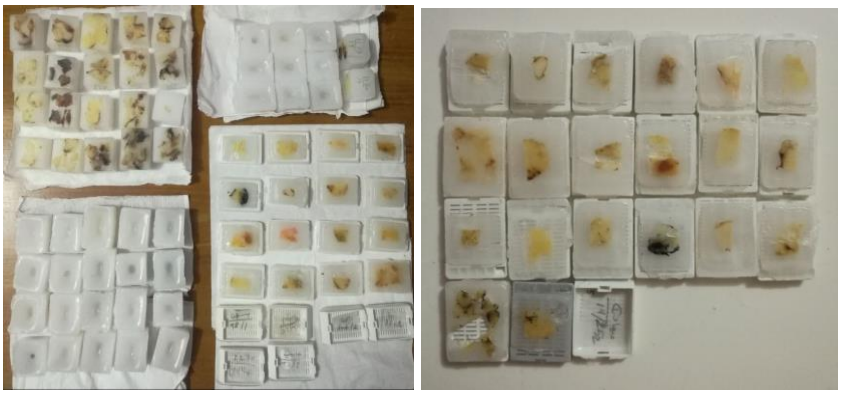
Meme kanseri olan insanlar, farelerde MMTV'nin neden olduğu kanserle benzerliklere sahiptir. Hem insan meme kanseri hem de farelerde MMTV ile ilişkili meme kanseri hormonlardan etkilenir (Labat 1998). Farelerde MMTV ekspresyonu, hamilelik sırasında steroid hormonlarının etkisiyle düzenlenir (Cato *et al*. 1987; Luther and Acha-Orbea 1997; Ringold *et al*. 1983). İnsanlarda MMTV-benzeri virüsün gebelik meme kanserindeki prevalansı %62 iken, sporadik meme kanserlerinde bu oran %30-38'dir (Wang *et al*. 2003) ve bu durum meme kanserlerinde hormonal bir etki olduğunu düşündürmektedir. İnsan meme kanserinde mutasyon sebebi onkojenler (Kenemans *et al*. 2004) MMTV ile ilişkili fare meme kanserlerinde de ayrıca mutasyon sebebidir ve aşırı eksprese edilir (Callahan 1996; Tekmal and Durgam 1995). MMTV'nin, farelerde meme kanseri ve lenfomaya neden olduğu (Racevskis 1990; Yanagawa *et al*. 1993) ve insanlarda da meme kanseri ve lenfomalarda MMTV-benzeri virüs saptandığını bildirilmiştir (Etkind *et al*. 2000; Etkind *et al*. 2004).

3. MATERYAL VE METOD

3.1 MATERYAL

3.1.1 Örneklerin Toplanması

Bu çalışma kapsamında; Irak'ın Basra, Maysan ve Najaf şehirlerinde bulunan 3 hastanenin onkoloji laboratuvarından hem iyi huylu (bening-6 adet) hem de kötü huylu (malignant-82 adet) meme kanseri hastalarına ait toplam 88 adet örnek toplandı. Örnekler, 22 ila 59 yaş arası farklı yaş gruplarından; 1 yıldan az, 1 yıllık ve 5 yıllık Formalinde Fikse Edilmiş Parafine Gömülü (FFPE) doku örneklerinden seçildi (Şekil 3.1).



a **b**

Şekil 3.1 a ve b Formalinde Fikse Edilmiş Parafine Gömülü (FFPE) meme kanseri doku örnekleri.



a **b**

Şekil 3.2 a ve b Morter-Pestle ve mikrotomla numunelerin işlenmesi.

3.1.2 Kullanılan Kimyasallar

Çizelge 3.1 Stok çözeltilerin listesi.

	Ana çözelti	Her numune için kullanılan miktar	Final Konsantrasyon
1	Ksilen	(700 µL - 1000 µ)	Saf
2	Etanol	(700 µ - 1000 µ)	%70, %75, %100
3	%2 Agaroz	Agar 10× TBE buffer Ethidyum bromid 5µL	10 g 500 mL 10 µL
4	TRIZOL	1mL	Saf
5	Kloroform	200 µL	Saf
6	İzopropanol	500 µL	Saf
7	RNaz içermeyen H_2O	100 µL	RNaz İçermez

3.1.3 Kullanılan Cihazlar

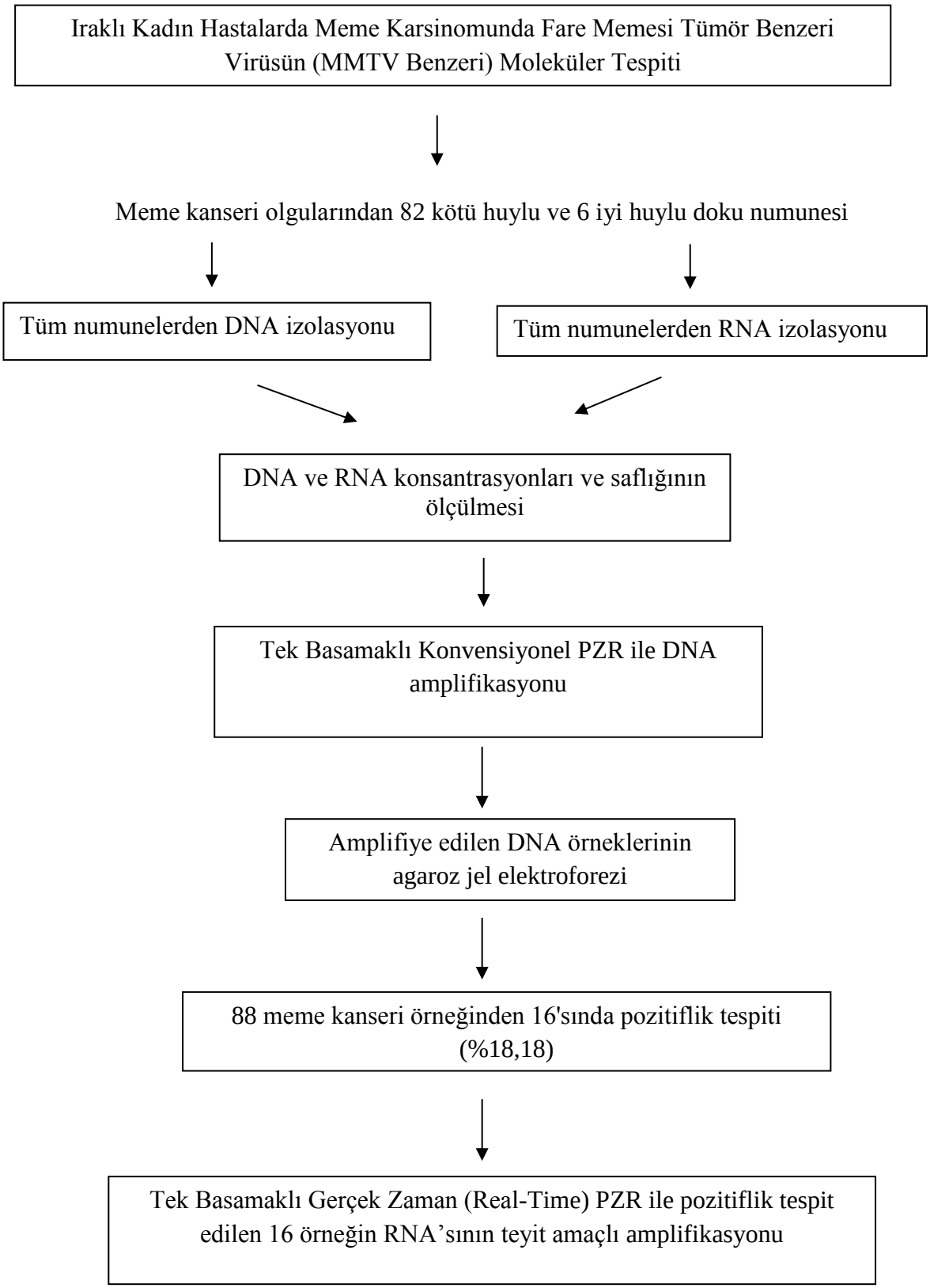
Bu çalışma kapsamında kullanılan ekipman ve cihazlar Çizelge 3.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.2 Ekipman ve cihazların listesi.

	Ekipman ve cihazlar	Model	Üretici firma
1	Soğutmalı Santrifüj	Eppendorf® Santrifüj 5424	Eppendorf, ABD
2	Çalkalayıcı	Eppendorf Mixmate Mikroplaka Çalkalayıcı 5353	Eppendorf, ABD
3	Termoblok	Termoblok TB2	Termoblok, Almanya
4	Spektrofotometre ve Qubit 4 Florometre	BIORAD SpecPlus Thermo Fisher Scientific	BIORAD, ABD Thermo Fisher Scientific, ABD
5	PZR Isısal Döngü Cihazı	Biometra	Biometra, Almanya
6	Agaroz Jel Elektroforez Tankı	Biometra Compact XS/ S, M and L/XL	Biometra, Almanya
7	UV Görüntüleme Sistemi	UVP BioDoc-lt Imaging System	UVP BioDoc, Almanya
8	Real-time PCR (Gerçek zamanlı PCR)	Toptical Gradient 96 Real-time PCR Thermal Cycler	Biometra, Almanya
9	Mikro pipetleme	Eppendorf Reference® 2 - Manual Pipetting & Dispensing	Eppendorf, ABD
10	Fırın	FIRIN Samsung	Samsung, Kore
11	Analitik Terazi	P-214 Denver Analytical Balance Instrument	USA
12	Vorteks	CLASSIC Vortex Mixer VELP	Velp Scientifica, Çin
13	Mikrotom	Leica RM2235	Leica, Çin

3.2 METOD

Çizelge 3.3 Çalışmanın algoritması.



Çalışma DNA Ekstraksiyonu ve RNA Ekstraksiyonu olarak ikiye ayrıldı. İlk olarak MMTV-benzeri genin moleküler yöntemlerle aranması için toplanılan örneklerden ticari kit (G-spinTM Total DNA Extraction Kit) ile DNA izolasyonu yapılarak DNA elde edildi ve aradığımız gen bölgesi olan MMTV-benzeri env geni için spesifik primerler kullanılarak Tek Basamaklı Konvensiyonel PZR ile DNA amplifikasyonu yapıldı. İkinci aşamada, TRIZOL Reaktifi kullanılarak ticari kit ile (AccuZol Total RNA Extraction Reagent) aynı örneklerden RNA izolasyonu ve Tek Basamaklı Konvensiyonel PZR ile MMTV-benzeri env geni pozitif bulunan örneklerin doğrulanması için Tek Basamaklı Gerçek Zamanlı (Real-Time) RT-PZR (BioNEER) yapıldı.

3.2.1 DNA İzolasyonu

DNA izolasyonunda temel basamak, bir lizat oluşturmak için hücresel yapıyı bozmaktır. Çözünür DNA, daha sonra ilgi konusu nükleik asidin nispeten saf bir formunu (15 μL) elde etmek için hücre kalıntılarından, proteinlerden ve diğer nükleik asitlerden ayrılır. Çalışmamıza söz konusu olan 88 adet (6 adet benign karakterli-82 adet malign karakterli) Iraklı meme kanserli kadın hastalardan alınan Formalinde Fikse Edilmiş Parafine Gömülü (FFPE) biyopsi örnekleri (Şekil 3.1 ve 3.2) mikrotomla ince parçalar halinde kesildi ve daha sonra ince parçalar, dokuyu daha küçük parçacıklara dönüştürmek amacıyla havan ve tokmakla ezildi. Her bir numuneden DNA izolasyonu amacı ile ticari kit (G-spinTM Total DNA Extraction Kit, LiliF Diagnostics, ABD) kullanıldı. DNA izolasyonu için aşağıdaki protokol uygulandı:

1. Herbir numune için parafin bloklarından ince parçalar halinde mikrotomda dilimler alındı.
2. 2 mL lik bir tüpe küçük bir kısım (25 mg'dan fazla olmayan-bu çalışmada 15 mg'dan az küçük bir bölüm yerleştirildi) parafinle sabitlenmiş doku yerleştirildi.
3. 1,2 mL ksilen (ekstraksiyon yoluyla parafinin uzaklaştırılması amacıyla) eklendi ve kuvvetlice vortekslenerek karıştırıldı. Ardından oda sıcaklığında 5 dakika boyunca tam hızda santrifüj yapıldı.
4. Süpernatant, peletlere dokunmadan pipetle alındı.
5. 3. ve 4. basamaklar bir kere tekrarlandı.

6. 1,2 mL saf etanol eklendi ve kuvvetlice vortekslenerek karıştırıldı. Ardından oda sıcaklığında 5 dakika boyunca tam hızda santrifüj yapıldı.

7. Süpernatant, peletlere dokunmadan pipetle alındı.

8. 6. ve 7. Basamaklar bir kez tekrarlandı.

9. Etanol tamamen buharlaşana kadar kapağı açık bırakılan tüp 65°C'de 10-15 dakika inkübe edildi (bu basamak, parafine gömülü dokudan etanolün tamamen çıkartılması için DNA izolasyonunun en önemli aşamasıdır).

10. Kurutulmuş doku örneği yeni 1,5 mL lik yeni bir tüpe alındı.

11. Tampon eklemeden havaneli kullanılarak doku 10-20 kez ezildi ve numune tüpüne 50 µL Tampon CL eklendi. Örnek, CL Tamponuna batırılmış halde tutuldu ve tamamen homojen hale gelmesi beklendi (bu aşamada, dokunun bozulma ve homojenizasyon süresi doku örneklerinin türüne bağlıdır. Doku kümeleri görülmeyene dek numunelerin tamamen parçalanması önerilmektedir çünkü doku örneği yığınlarının düzgün şekilde parçalanmaması düşük DNA miktarı ile sonuçlanmaktadır).

12. Örnek tüpüne 150 µL Tampon CL, 20 µL Proteinaz K ve 5 µL RNaz A Solüsyonu eklendi ve kuvvetlice vortekslenerek karıştırıldı.

13.Lizat 56°C'de önceden ısıtılmış ısı bloğu veya su banyosu kullanarak 10-30 dakika inkübe edildi

14. Lizis tamamlandığında, parçalanmamış doku parçacıklarını çıkarmak için örnek tüpü 13 000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Daha sonra süpernatantın 180-200 µL'si yeni bir 1,5 mL tüpe dikkatlice aktarıldı.

15. Lizis tamamlandığında, numune tüpüne 200 µL Tampon BL eklendi ve iyice karıştırıldı. Sonra karışım 70°C'de 5 dakika inkübe edildi.

16. Parçalanmamış doku parçacıklarını çıkarmak için örnek tüpü 13 000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Ardından, süpernatantın 350-400 µL'si yeni bir 1,5 mL tüpe dikkatlice aktarıldı.

17. Kapağın içindeki damlaları gidermek için 1,5 mL'lik tüp kısa süreli santrifüj edildi.

18. Lizata 200 µL mutlak etanol eklendi ve vorteks ile iyice karıştırıldı. Karıştırdıktan sonra, kapağın içindeki damlaları gidermek için 1,5 mL tüp kısa süre santrifüj edildi.

19. Karışım dikkatlice Spin Kolonuna (2 mL'lik Toplama Tüpüne yerleştirilmiş olan) aktarıldı. 13 000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldı ve Spin Kolonu yeni bir 2 mL Toplama Tüpüne yerleştirildi.

20. Spin Kolonuna 700 µL Tampon WA (Tampon WB) eklendi ve 1 dakika boyunca 13 000 rpm'de santrifüj edildi. Süpernatant atıldı.
21. Spin Kolonuna 700 µL Tampon WB eklendi ve 1 dakika boyunca 13 000 rpm'de santrifüj edildi. Süpernatant atıldı ve Kolon yeni bir 2 mL Toplama Tüpüne yerleştirildi. Ardından membranı kurutmak için 1 dakika daha santrifüj edildi.
22. Spin Kolonu yeni bir 1,5 mL tüpe yerleştirildi ve doğrudan membranın üzerine 30-100 µL Tampon CE eklendi. Oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edildi ve sonra elüsyon için 13 000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi

3.2.2 DNA Konsantrasyonlarının Ölçülmesi

DNA izolasyonundan sonra, tüm numunelerden elde edilen DNA konsantrasyonları ve saflıkları ölçüldü, numuneler bir sonraki işlemde kullanılana kadar -20°C'de saklandı. DNA konsantrasyonlarının ölçülmesi amacıyla nükleik asit absorpsiyon spektrofotometrisi kullanıldı (BIORAD SpecPlus, ABD) (Şekil 3.3).



Şekil 3.3 Spektrofotometre (BIORAD SpecPlus USA).

3.2.3 Tek Basamaklı Konvensiyonel PZR ile MMTV-Benzeri Virüs Geninin Tespiti

Tek Basamaklı Konvensiyonel Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) işlemleri ısısal döngü cihazında gerçekleştirildi (Biometra, Almanya) (Şekil 3.4 a). DNA ekstraksiyonunun etkinliğini değerlendirmek için ilk olarak tüm numuneler, insan β-globin genine özel

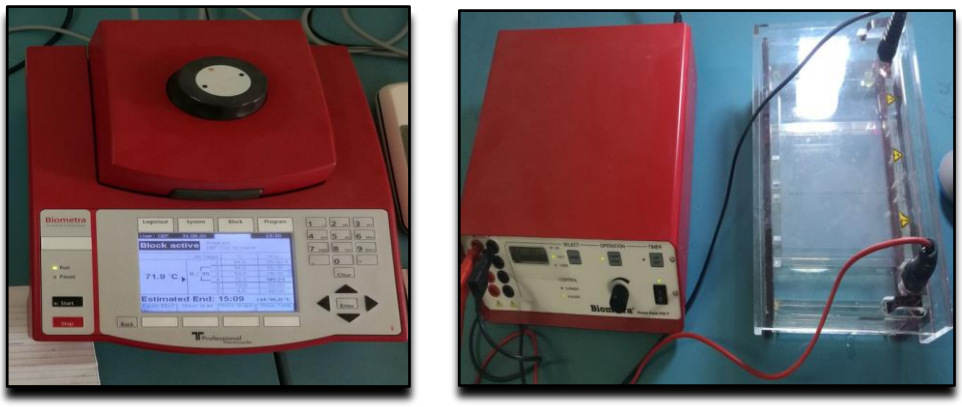
tasarlanmış primerler (Çizelge 3.4) kullanılarak PZR ile amplifiye edildi. β-globin geni moleküler biyolojide, temel hücresel fonksiyonun sürdürülmesi için gerekli olan, normal ve patofizyolojik koşullar altında bir organizmanın tüm hücrelerinde ifade edilen, tipik olarak oluşturucu genlerdendir. Bu çalışmada β-globin geninin PZR ile kontrolü, örneklerde yeterli insan hücresel DNA'sı olup olmadığını kontrol etmek için yapılmıştır (kullanılan numunenin doğru olup olmadığını ve içinde insan hücreleri olup olmadığını kontrol etmek için). MMTV-benzeri env geninin tespiti için ise 187 bp MMTV-benzeri env gen fragmanını amplifiye eden MMTV-F5 / MMTV-R5 primerleri (Çizelge 3.4) kullanıldı (Al Dossary *et al*. 2018). Amplifikasyon reaksiyonları insan β-globin geni ve MMTV-benzeri env geninin tespiti için ayrı ayrı, toplam 20 µL hacimde gerçekleştirildi. PZR karışımları her iki reaksiyon için de Çizelge 3.5'de gösterildiği şekilde hazırlandı. Her reaksiyona; bir negatif kontrol (DNA eklenmemiş PZR karışımı) dahil edildi. Her iki genin amplifikasyonu için ısısal döngü cihazında; 4 dakika boyunca 94°C'de bir başlangıç denatürasyonu uygulandı. Daha sonra bir döngü 94°C'de 30 saniye süreyle denatürasyon, 53°C'de 30 saniye bağlanma ve 72°C'de 24 saniye uzatma olmak üzere 35 döngü uygulandı. Örnekler son döngünün bitiminde 3 dakika 35°C'de inkübe edildi. PZR ürünleri kontrol amacıyla; pH 8.6 değerinde TBE tamponu ile hazırlanmış ve 100 mL'de (TBE-DW) 10 mg/ml olacak şekilde 5µL etidyum bromür ile boyanmış %2'lik agaroz jel üzerinde elektroforez tankında (Biometra, Almanya) (Şekil 3.4 b) elektroforeze tabi tutuldu. DNA amplifikasyonu sonucu oluşan 187 bp uzunluğunda amplifikasyon bantlarının kontrolu için jel ultraviyole transillüminatörde (UVP BioDoc-lt Görüntüleme Sistemi, Almanya) (Şekil 3.5) incelendi ve görüntü alındı.

Çizelde 3.4 PZR amplifikasyonu için kullanılan primerlerin listesi.

Primer adı	**Oligo (5'--->3')**	**Uzunluk (bp)**	**Kodu**
MMTV-F5	5'-ATG GGT AGA ACC TAC WTG GTT CTG-3'	24	1
MMTV-R5	5'-ATA AGG RTA AGT AAC ACA GGC AGA-3'	24	2
Beta-globin-F 5	5'-TAA GGT GAA GGC TCA TGG CAA-3'	21	3
Beta-globin-R 5	5'-GCA GCT CAC TCA GTC TGG CA-3'	20	4

Çizelge 3.5 Tek basamaklı konvensiyonel PZR karışımı.

Bileşen	Miktar (µL)	Nihai Konsantrasyonu
Steril PZR suyu	11	Saf/RNaz-DNaz ari
Forward primer	1	10 pmol
Reverse primer	1	10 pmol
Tek basamak master miks karışımı	3	-
Kalıp DNA	4	5-50 ng
Toplam Hacim	20	-



a **b**

Şekil 3.4 a) Isısal döngü cihazı (Biometra, Almanya), **b)** Agaroz jel elektroforezi tankı (Biometra, Almanya).



Şekil 3.5 Ultraviyole transilluminator (UVP BioDoc-lt Imaging Sistemi, Almanya).

3.2.4 RNA İzolasyonu

Çalışmamıza söz konusu olan 82 malign ve 6 benign Iraklı meme kanserli kadın hastalardan alınan Formalinde Fikse Edilmiş Parafine Gömülü (FFPE) biyopsi örnekleri (Şekil 3.1 ve 3.2) mikrotomla ince parçalar halinde kesildi ve daha sonra ince parçalar, dokuyu daha küçük parçacıklara dönüştürmek amacıyla havan ve tokmakla ezildi. RNA izolasyonu Trizol kullanılarak ticari kitin (AccuZol Total RNA Ekstraksiyon Reaktifi, Kore) protokolüne göre yapıldı. RNA izolasyonu için:

1. İlk önce parafin bloğundan ince parçalar alındı. 15 mg'dan fazla olmayan parafin numuneleri 2 mL'lik bir tüpe yerleştirildi.
2. Numune dokusunun ağırlığına göre 700 µL-1000 µL ksilen ilave edilerek vortekslendi. Oda sıcaklığında 5 dakika boyunca tam hızda santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı. Pelete ellenmedi.
3. 2. basamak bir kez tekrarlandı.
4. Numune dokusunun ağırlığına göre 700 µL-1000 µL saf etanol eklendi ve kuvvetlice vortekslendi. Ardından oda sıcaklığında 5 dakika boyunca tam hızda santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı. Pelete ellenmedi.
5. 4. basamak bir kez tekrarlandı.
6. Tüpün kapağı açılarak etanol buharlaşana kadar 10-15 dakika 65°C'de inkübe edildi.
7. Numuneye 1 mL Trizol eklendi ve vortekslendi.
8. 200 µL kloroform eklenerek buz üzerinde 15 dakika inkübe edildi.
9. 12 000 rpm'de 4°C'de 10 dakika santrifüj edildi. Karışım üç faza ayrıldı: renksiz üst sulu faz (RNA'ya sahip), ara faz ve altta yeşil fenol kloroform fazı.
10. Üst sulu faz yeni bir tüpe aktarıldı. Üzerine 0,5 mL izopropanol eklenerek 10 dakika buz üzerinde inkübe edildi.
11. 12 000 rpm'de de 4°C'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı.
12. Peletin üzerine 1 mL %75'lik etanol eklendi ve 7500 rpm'de (4°C'de) 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı.
13. Tüpün kapağı açık bırakılarak RNA peletleri oda sıcaklığında 15 dakika boyunca hava ile kurutuldu. Daha sonra uygun hacimde RNaz içermeyen su eklenerek hafifçe vortekslendi.

3.4.5 RNA Konsantrasyonlarının Ölçülmesi

RNA izolasyonundan sonra, tüm numunelerden elde edilen RNA konsantrasyonları ve saflıkları ölçüldü. RNA örnekleri, spektrofotometrik (Qubit 4 Florometre Thermo Fisher Scientific, ABD) (Şekil 3.6) olarak ölçüldü. RNA örneklerinden 2 µL Qubit 4 Florometre üzerine uygulandı ve RNA'nın konsantrasyonu 260/230 ve 260/280 dalga boylarında ölçüldü. Numuneler bir sonraki işlemde kullanılana kadar -20°C'de saklandı.



Şekil 3.6 Spektrofotometre (Qubit 4 Florometre Thermo Fisher Scientific, ABD).

3.4.6 Tek Basamaklı Gerçek Zamanlı (Real-Time) RT-PZR ile MMTV-Benzeri Virüs Geninin Tespiti

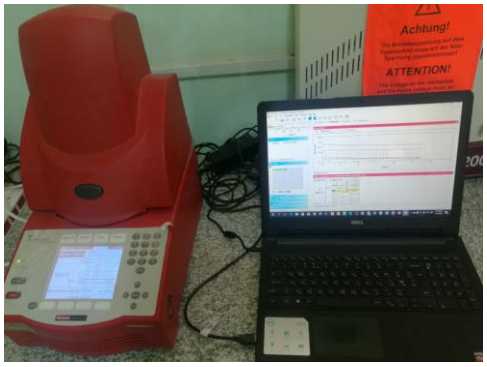
Tek Basamaklı Konvensiyonel PZR ile MMTV-benzeri env geni yönünden pozitif bulunan örneklerin RNA'ları, Tek Basamaklı Gerçek Zamanlı RT-PZR ile kontrol edildi. Tek Basamaklı Gerçek Zamanlı RT-PZR ticari kitin protokolüne göre (One step Bright Green qRT-PCR-Low ROX, abm, ABD) toplam hacim 20 µL olacak şekilde ısısal döngü cihazında (Toptical Gradient 96 Real-time PCR Thermal Cycler, Biometra, Almanya) (Şekil 3.7) gerçekleştirildi. Gerçek Zamanlı RT-PZR'da kullanılan MMTV env genine uygun olduğu bildirilmiş primerler (Al Dossary *et al.* 2018) (Çizelge 3.6) özel bir şirketten alındı (Analytik Jena, Biometra, Almanya). PZR karışımı Çizelge 3.7'de gösterildiği şekilde hazırlandı. Her reaksiyona; bir negatif kontrol (DNA eklenmemiş PZR karışımı) dahil edildi.

Çizelge 3.6 Tek Basamaklı Gerçek Zamanlı (Real-Time) RT-PZR ile MMTV env geni amplifikasyonunda kullanılan primerlerin listesi.

Primer adı	Oligo (5'--->3')	Uzunluk (bp)	Kodu
MMTV-F 5	5'-ATG GGT AGA ACC TAC WTG GTT CTG-3'	24	1
MMTV-R 5	5'-ATA AGG RTA AGT AAC ACA GGC AGA-3'	24	2
Beta-globin-F 5	5'-TAA GGT GAA GGC TCA TGG CAA-3'	21	3
Beta-globin-R 5	5'-GCA GCT CAC TCA GTC TGG CA-3'	20	4

Çizelge 3.7 Tek Basamaklı Gerçek Zamanlı (Real-Time) RT-PZR karışımı.

Bileşen	Miktar (µL)	Nihai Konsantrasyonu
Steril PZR suyu	4.5	Saf/RNaz-DNaz ari
Forward primer	1	10 pmol
Reverse primer	1	10 pmol
Enzim	0.5	-
Eva green prob	0.5	10 pmol
Tek basamak master miks karışımı	9.5	-
RNA Örneği	3	5-50 ng
Toplam hacim	20	-



Şekil 3.7 Gerçek Zamanlı (Real-Time) RT-PZR ısısal döngü cihazı (Toptical Gradient 96 Real-time PCR Thermal Cycler, Biometra, Almanya).

4. BULGULAR

4.1 DNA Konsantrasyonları

Bütün örneklerin DNA izolasyonu tamamlandıktan sonra yapılan spektrofotometrik ölçümlerde DNA konsantrasyonları 5-50 ng/µL olarak ölçüldü.

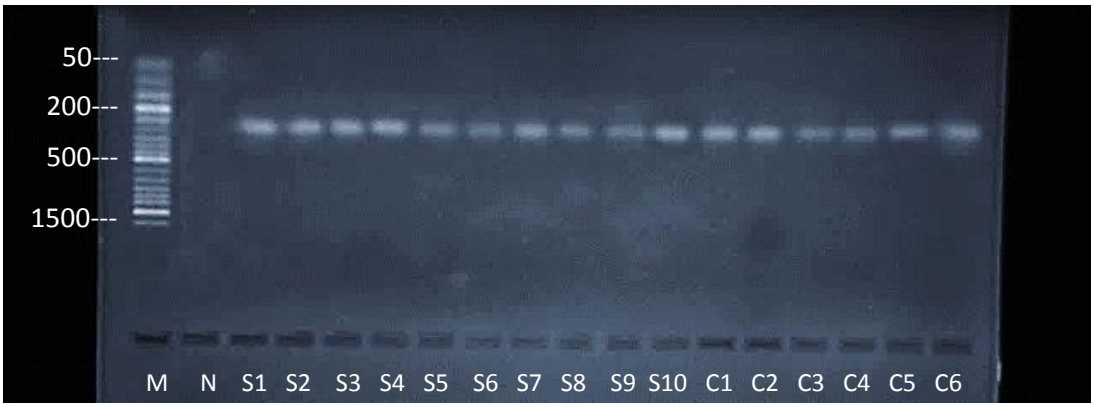
4.2 RNA Konsantrasyonları

Bütün örneklerin RNA izolasyonu tamamlandıktan sonra yapılan spektrofotometrik ölçümlerde RNA konsantrasyonları 5-50 ng/µL olarak ölçüldü.

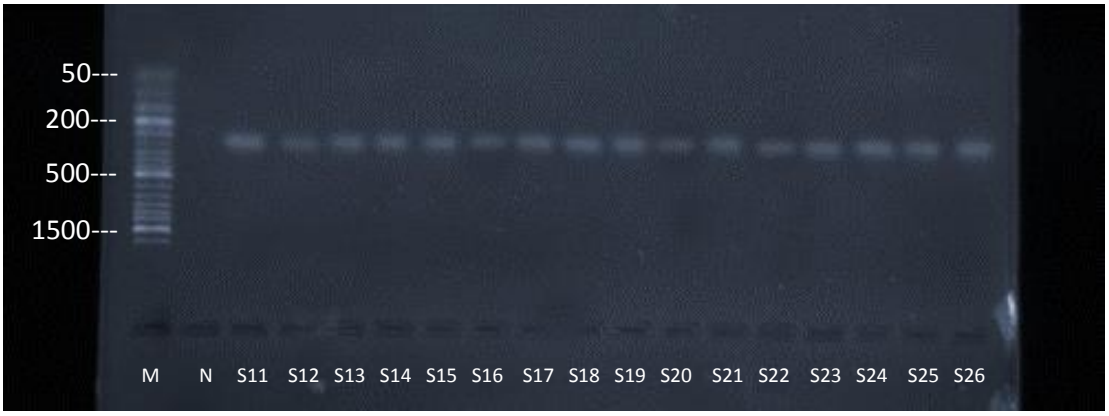
4.3 Tek Basamaklı Konvensiyonel PZR

Tüm örneklerin DNA izolasyonlarının doğruluğunu ve kalitesini kontrol etmek için yapılan insan β-globin geninin tespitine yönelik Tek Basamaklı Konvensiyonel PZR sonuçları Şekil 4.1, Şekil 4.2, Şekil 4.3, Şekil 4.4, Şekil 4.5 ve Şekil 4.6'da gösterildi. C1-C6 (benign/iyi huylu kanser örnekleri) ve S1-S82 (malign/kötü huylu kanser örnekleri) insan β-globin geni yönünden pozitif bulundu. N (negatif kontrol) negatif bulundu.

MMTV-benzeri env geninin aranmasına yönelik Tek Basamaklı Konvensiyonel PZR sonuçları Şekil 4.7, Şekil 4.8, Şekil 4.9, Şekil 4.10, Şekil 4.11 ve Şekil 4.12'de gösterildi. S2, S5 S13, S15, S16, S17, S18, S19, S21, S23, S24, S25, S31, S33, S38 ve S39 olmak üzere 16 adet kötü huylu kanser örneğinde MMTV-benzeri env geni yönünden pozitiflik tespit edildi. Diğer kötü huylu meme kanseri örnekleri ile tüm iyi huylu meme kanseri örnekleri ve negatif kontrol (N) negatif bulundu. Toplamda 88 meme kanseri örneğinden 16'sında MMTV-benzeri env geni yönünden pozitiflik (%18.18) tespit edildi.



Şekil 4.1 N negatif kontrol, S1-S10 (kötü huylu kanser örnekleri), C1-C6 (iyi huylu kanser örnekleri) için β-globin geninin konvensiyonel PZR sonuçları.



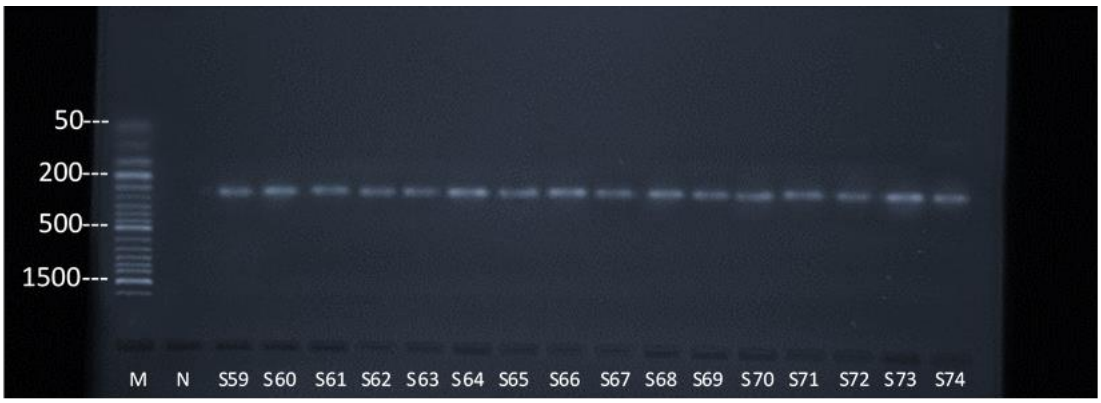
Şekil 4.2 N negatif kontrol, S11-S26 (kötü huylu kanser örnekleri) için β-globin geninin konvensiyonel PZR sonuçları.



Şekil 4.3 N negatif kontrol, S27-S42 (kötü huylu kanser örnekleri) için β-globin geninin konvensiyonel PZR sonuçları.



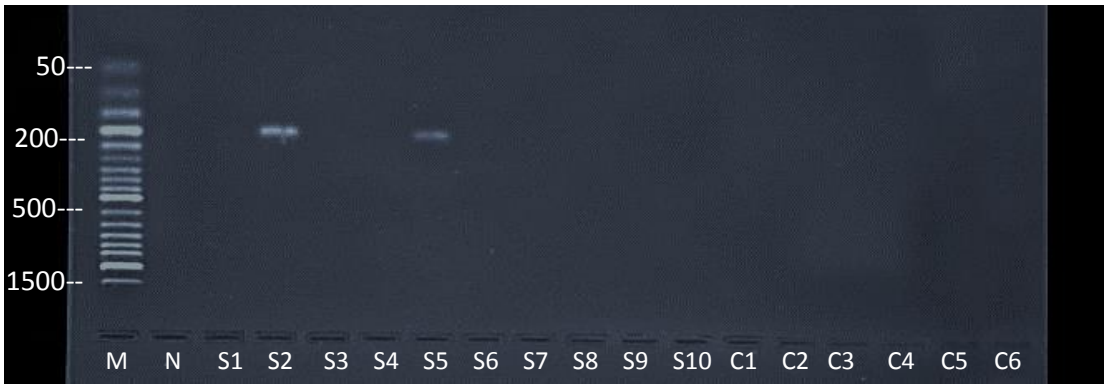
Şekil 4.4 N negatif kontrol, S43-S58 (kötü huylu kanser örnekleri) için β-globin geninin konvensiyonel PZR sonuçları.



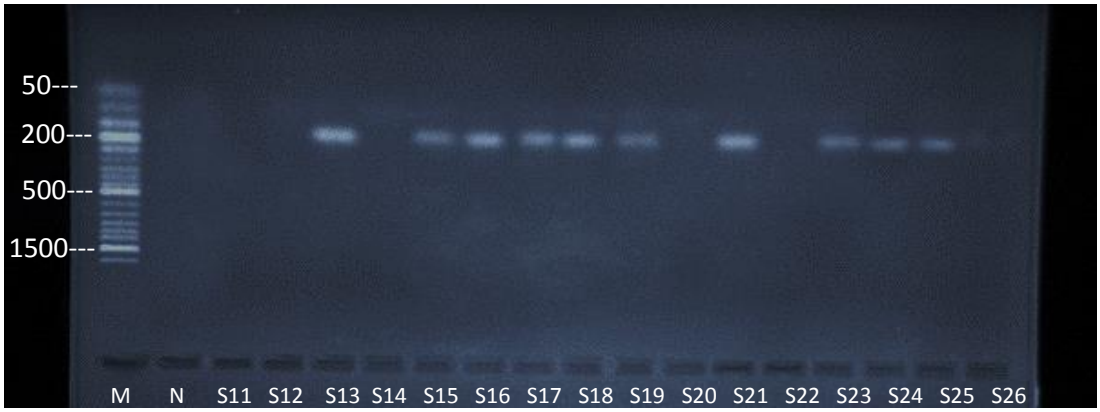
Şekil 4.5 N negatif kontrol, S59-S74 (kötü huylu kanser örnekleri) için β-globin geninin konvensiyonel PZR sonuçları.



Şekil 4.6 N negatif kontrol, S75-S82 (kötü huylu kanser örnekleri) için β-globin geninin konvensiyonel PZR sonuçları.



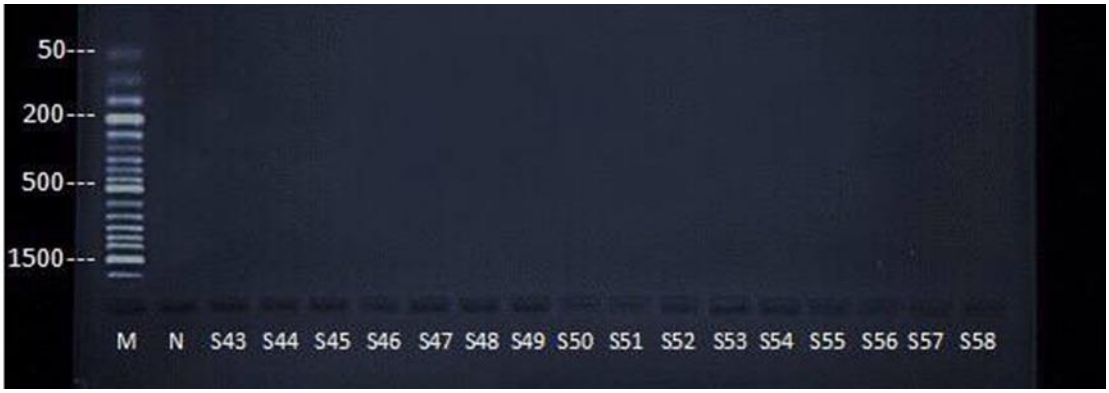
Şekil 4.7 N negatif kontrol, S1-S10 (kötü huylu kanser örnekleri), C1-C6 (iyi huylu kanser örnekleri) için MMTV-benzeri env geninin konvensiyonel PZR sonuçları.



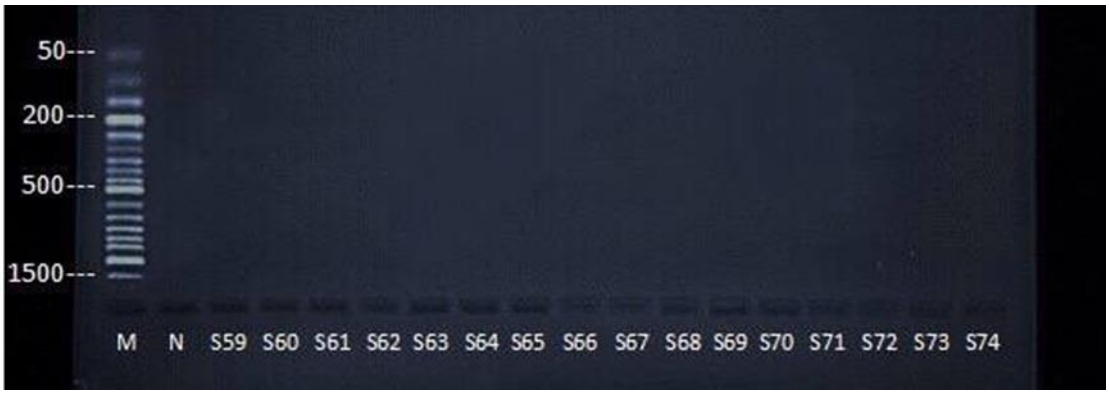
Şekil 4.8 N negatif kontrol, S11-S26 (kötü huylu kanser örnekleri) için MMTV-benzeri env geninin konvensiyonel PZR sonuçları.



Şekil 4.9 N negatif kontrol, S27-S42 (kötü huylu kanser örnekleri) için MMTV-benzeri env geninin konvensiyonel PZR sonuçları.



Şekil 4.10 N negatif kontrol, S43-S58 (kötü huylu kanser örnekleri) için MMTV-benzeri env geninin konvensiyonel PZR sonuçları.



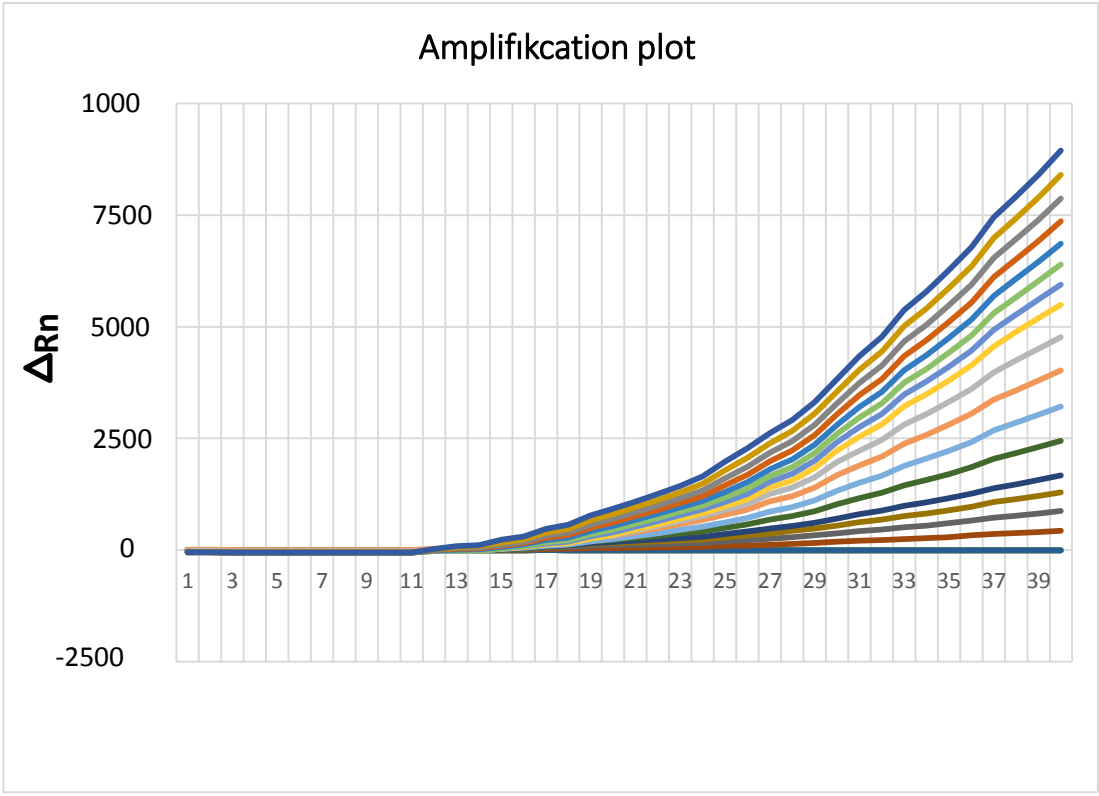
Şekil 4.11 N negatif kontrol, S59-S74 (kötü huylu kanser örnekleri) için MMTV-benzeri env geninin konvensiyonel PZR sonuçları.



Şekil 4.12 N negatif kontrol, S75-S82 (kötü huylu kanser örnekleri) için MMTV-benzeri env geninin konvensiyonel PZR sonuçları.

4.2 Tek Basamaklı Gerçek Zamanlı (Real-Time) RT-PZR

Tek Basamaklı Konvensiyonel PZR ile MMTV-benzeri env geni sonuçları pozitif çıkan 16 örneğin doğrulaması için Tek Basamaklı Gerçek Zamanlı (Real-Time) RT-PZR uygulandı. Ayrıca β-globin geninin varlığı da teyit edildi. Reaksiyona negatif kontrol de eklendi ve konvensiyonel PZR'da pozitif çıkan 16 örnek Tek Basamaklı Gerçek Zamanlı (Real-Time) RT-PZR'da da pozitif bulundu (Şekil 4.13).



Şekil 4.13 MMTV-benzeri env geninin Tek Basamaklı Konvensiyonel PZR sonuçları pozitif çıkan 16 örneğin ve negatif kontrolün Tek Basamaklı Gerçek Zamanlı RT-PZR sonuçları.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Fare populasyonunun fazla olduğu bölgelerde, MMTV'nin insanlarda meme kanserinin gelişiminde önemli bir patojen olarak kabul edilebileceği belirtilmektedir. İnsanların ve farelerin vücutlarındaki immün baskılamaya özdeş tepkiler göstermesi açısından insan ve fare arasında yüksek benzerlik vardır. İnsanların MMTV'yi kemirgenlerden aldıkları ve insanlarda meme kanseri oluşumu ile o bölgedeki fare sayısı dağılımının benzer eğilimi olduğu varsayılmaktadır. Dünyanın farklı bölgelerinde değişiklik gösteren MMTV dizilerinin tespiti ile ilgili daha fazla bilimsel veri ortaya konabilirse, insanlarda meme kanserinin fare-virüs kökeni ile ilişkilendiren bu zoonotik hipotezin en azından bazı durumlarda meme kanserinin önlenmesinde kritik bir öneme sahip olabiliceği belirtilmektedir (Stewart *et al*. 2000). Bu virüsün meme kanserinde oynadığı öneme ek olarak, bu coğrafi çeşitliliğin nedeni ve bulaşma şekli tam olarak bilinmemektedir. Ancak bu virüsün meme kanseri riski ile etkileşimini destekleyici yayınlar artmaktadır. Yayımlanmış bir çalışmada (Nartey *et al*. 2017) bu ilişkinin araştırılması için çeşitli veri kümelerinde kapsamlı bir araştırma yapıldığı ve MMTV-benzeri virüsün mevcut olduğu belirtilmiştir. Meme kanseri geliştirme riskinin artmasıyla ilişkili olan MMTV'nin Batı ülkelerinde Asya ülkelerinden biraz daha yüksek oranda görüldüğü belirtilmiştir. Ayrıca Avustralyalı kadınların meme kanserinden önce ve sonra yapılan meme biyopsilerinde, meme kanseri ile virüs nedensel ilişkisini gösteren MMTV-benzeri virüs env geninin dizileri tespit edildiği belirtilmiştir (Nartey *et al*. 2017).

Eski zamanlarda MMTV'in farelerden zoonotik olarak tükürük ve süt bulaşma yolları ile insan popülasyonuna sıçradığı ve kendini koruduğu bildirilmiştir. Yapılan bir çalışmada meme kanseri hastalarında, sağlıklı yetişkinlerde ve bebeklerde tükürükte MMTV DNA'sı tespit edilirken, yenidoğanlarda tespit edilmediği belirtilmiştir (Mazzanti *et al*. 2015). Aynı çalışmada, meme kanseri olan hastaların tükürük bezlerinde MMTV RNA'sının bulunması ile tükürüğün insanlarda bulaşma yolu olduğu belirtilmiştir (Mazzanti *et al*. 2015). Emzirme dönemindeki sağlıklı kadınların ve meme kanseri gelişme riski yüksek kadınların sütünde de MMTV dizileri bulunmuştur ve bunun insanlar arasında MMTV'ün diğer bir bulaşma yolu olduğu belirtilmiştir (Johal *et al*. 2011; Nartey *et al*. 2014).

Projemizde saptanan Iraklı kadın meme kanseri hastalarında MMTV-benzeri env geni pozitiflik oranları (%18,18) Suudi Arabistan (%8,7) (Al Dossary *et al.* 2018), Meksika (%4,2) (Zapata-Benavides *et al.* 2007), Avustralya (%5) (Harpreet *et al.* 2011) ve Mısır (%6,7) (Tawfik *et al.* 2015) gibi bazı ülkelerin sonuçlarından daha yüksek iken Amerika Birleşik Devletleri (%45) (Lawson *et al.* 2010), Fas (%57,14) (Slaoui *et al.* 2014), İran (%32,2) (Shariatpanahi *et al.* 2017) ve Sudan'da (%36) (El Hassan *et al.* 2019) yapılan araştırmalara göre ise daha düşük bulunmuştur. Bu sonuçlar, MMTV-benzeri virüsün dünyanın pek çok ülkesinde yaygın olduğunun kanıtıdır.

Bu çalışma ile Irak'ta ilk kez (Basra, Maysan ve Najaf şehirlerinde), meme kanseri olan kadınlarda MMTV-benzeri virüs varlığı gösterildi. Virüs enfeksiyonu ile meme kanseri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olmamasına rağmen, 88 numune arasından 16 numunede (%18,18) MMTV-benzeri virüs env gen bölgesi tespit edildi ve MMTV enfeksiyonunun Irak'ta meme kanserinin gelişimine katkıda bulunan bir faktör olabileceği görüldü. Bununla birlikte Irak'taki meme kanseri ile MMTV-benzeri ilişkisini daha doğru değerlendirebilmek için ülkenin diğer bölgelerinde de meme kanseri vakalarında MMTV-benzeri virüsün taranması ile ülke düzeyinde MMTV-benzeri virüsün yayılımının daha detaylı çalışılmasına ihtiyaç duyulmaktadır. Daha fazla sayıda meme kanseri vakasından alınacak taze kanser dokusu örnekleri, formalin ve parafin gibi koruyucu maddeler kullanmaktan kaçınarak DNA ve RNA izolasyonları yüksek doğrulukla yapılmalı, PZR işlemleri tamamlandıktan sonra elde edilecek MMTV-benzeri gen bölgelerinin mümkünse nükleotid dizileri de elde edilerek detaylı şekilde araştırmalar yapılması sağlanmalıdır.

KAYNAKLAR

Akhter, J., Ali Aziz, M. A., Al Ajlan, A., Tulbah, A., Akhter, M. 2014. Breast Cancer: Is There a Viral Connection?. Adv Anat Pathol., 21, 373-381.

Al Dossary, R., Alkharsah, K., Kussaibi, H. 2018. Prevalence of Mouse Mammary Tumor Virus (MMTV)-like sequences in human breast cancer tissues and adjacent normal breast tissues in Saudi Arabia. BMC Cancer, 18(1), 170. https://doi.org/10.1186/s12885-018-4074-6.

Anand, P., Kunnumakara, A. B., Sundaram, C., Harikumar, K. B., Tharakan, S. T., Lai, O. S., Sung, B., Aggarwal, B. B. 2008. Cancer is a Preventable Disease that Requires Major Lifestyle Changes. Pharmaceutical Research, 25(9), 2097-2116.

Bittner, J. J. 1936. Some Possible Effects of Nursing on the Mammary Gland Tumor Incidence in Mice. Science, 84 (2172), 162.

Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L, Torre, L. A., Jemal, A. 2018. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA Cancer J Clin, 68(6), 394-424.

Callahan, R. 1996. MMTV-induced mutations in mouse mammary tumors: their potential relevance to human breast cancer. Breast Cancer Res Treat, 39, 33-44.

Cato, A. C. B., Henderson, D., Ponta, H. 1987. The hormone responsive element of the mouse mammary tumour virus DNA mediates the progestin and androgen induction of transcription in the proviral long terminal repeat region. EMBO J, 6, 363-368.

Coffin, J. M. 1996. Retroviridae and their replication. In: Virology. Fields, B. N. et al. (eds), Raven Press,pp 1767-1848. New York.

Cohen, S.; Murphy, M. L. M., Prather, A. A. 2019. Ten Surprising Facts About Stressful Life Events and Disease Risk. Annual Review of Psychology, 70, 577–597.

El Hassan, A. S., Mohammed, A. K., Allah, A. W. W., Osamn, I. M., Mustafa, M. O., El Hussein, A. R. M. et al. 2019. Molecular Detection of Mouse Mammary Tumor Like Virus (MMTV-like) in Breast Carcinoma Patients in Sudan. Clin Microbiol, 8, 341. doi: 10.35248.2327-5073.19.8.333.

Etkind, P., Du, J., Khan, A., Pillitteri, J., Wiernik, P. H. 2000. Mouse mammary tumor virus-like env gene sequences in human breast tumors and in a lymphoma of a breast cancer patient. Clin Can Res, 6, 1273-1278.

Ferlay, J., Bray, F., Pisani, P., Parkin, D. M. 2000. Cancer incidence, mortality and prevalence worldwide. Version 1.0. Globocan 2000, IARC CancerBase No. 5., IARCPress, Lyon.

Freer, P. E. 2015. Mammographic breast density: impact on breast cancer risk and implications for screening. RadioGraphics, 35, 302-315.

Giuliano, A. E., Connolly, J. L., Edge, S. B., et al. 2017. Breast Cancer-Major changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual. CA Cancer J Clin, 67 (4), 290-303.

Ham, J., Thomson, A., Needham, M., Webb, P., Parker, M. 1988. Characterization of response elements for androgens, glucocorticoids and progestins in mouse mammary tumour virus. Nucleic Acids Research, 16 (12), 5263-5276.

Howlander, N., Noone, A. M., Krapcho, M., Garshell, J., Miller, D., Altekruse, S. F., Kosary, C. L., Yu, M., Ruhl, J., Tatalovich, Z., Mariotto, A., Lewis, D. R., Chen, H. S., Feuer, E. J., Cronin, K. A. 2015. SEER cancer statistics review, 1975-2012. https://seer.cancer.gov/archive/csr/1975_2012/#contents. Erişim Tarihi: 10.12.2020.

Indik, S., Gunzburg, W. H., Salmons, B., Rouault, F. 2005. A novel, mouse mammary tumor virus encoded protein with Rev-like properties. Virology, 337 (1), 1-6.

Islami, F., Sauer, A. G., Miller, K. D., Siegel, R. L., Fedewa, S. A., Jacobs, E. J., McCullough, M. L. et al. 2018. Proportion and number of cancer cases and deaths attributable to potentially modifiable risk factors in the United States. CA CANCER J CLIN, 68, 31-54

Jemal, A., Bray, F., Center, M. M., Ferlay, J., Ward, E., Forman, D. 2011. Global cancer statistics. CA Cancer J Clin, 61, 69-90. DOI: 10.3322/caac.20107.

Johal, H., Ford, C., Glenn, W., Heads, J., Lawson, J., Rawlinson, W. 2011. Mouse mammary tumor like virus sequences in breast milk from healthy lactating women. Breast Cancer Res Treat. 129 (1), 149-155.

Kenemans, P., Verstraeten, R. A., Verheijen, R. H. M. 2004. Oncogenic pathways in hereditary and sporadic breast cancers. Maturitas, 49, 34-43.

Kushi, L. H., Doyle, C., McCullough, M., Rock, C. L., Demark-Wahnefried, W., Bandera, E. V., Gapstur, S., Patel, A. V., Andrews, K., Gansler, T. 2012. American Cancer Society Guidelines on nutrition and physical activity for cancer prevention: reducing the risk of cancer with healthy food choices and physical activity. CA Cancer J Clin, 62 (1), 30-67.

Labat, M. L. 1998. Possible retroviral etiology of human breast cancer. Biomed & Pharmacother, 52, 6-12.

Lawson, J., Salmons, B., Glenn, W. K., Heng. B. et al. 2010. Mouse Mammary Tumor Virus-like Sequences in Human Breast Cancer. Cancer Research, 70 (9), OF1–10. DOI10.1158/0008-5472.CAN-09-4160.

Le-Petross, H. T., Shetty, M. K. 2011. Magnetic resonance imaging and breast ultrasonography as an adjunct to mammographic screening in high-risk patients. Semin Ultrasound CT MR, 32 (4), 266-272.

Liu, B., Wang, Y., Melana, S. M., Pelisson, I., Najfeld, V., Holland, J. F., Pogo, B. G. 2001. Identification of a proviral structure in human breast cancer. Cancer Res, 61, 1754-1759.

Luther, S. A., Acha-Orbea, H. 1997. Mouse mammary tumor virus: immunological interplays between virus and host. Adv Immunol., 65:139-243. PMID: 9238510.

Magnus, M. C., Ping, M., Shen, M. M., Bourgeois, J., Magnus, J. H. 2011. Effectiveness of mammography screening in reducing breast cancer mortality in women aged 39-49 years: a meta-analysis. Womens Health (Larchmt), 20 (6), 845-852.

Mant, C., Gillett, C., D'Arrigo, C., Cason, J. 2004. Human murine mammary tumour virus-like agents are genetically distinct from endogenous retroviruses and are not detectable in breast cancer cell lines or biopsies. Virology, 318 (1), 393-404.

Mazzanti, C. M., Lessi, F., Armogida, I., Zavaglia, K., Franceschi, S., Al Hamad, M., Roncella, M., Ghilli, M., Boldrini, A., Aretini, P. et al. 2015. Human saliva as route of inter-human infection for mouse mammary tumor virus. Oncotarget., 6(21):18355-63.

McPherson, K., Steel, C., Dixon, J. 2000. Breast cancer epidemiology, risk factors, and genetics. Br J Nutr, 231, 624-628.

Melana, S. M., Nepomnaschy, I., Sakalian, M., Abbott, A., Hasa, J., Holland, J. F., Pogo, B. G. 2007. Characterization of viral particles isolated from primary cultures of human breast cancer cells. Cancer Res., 67 (18), 8960-5. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-3892.

Mertz, J. A., Simper., M. S., Lozano, M. M., Payne, S. M., Dudley, J. P. 2005. Mouse mammary tumor virus encodes a self-regulatory RNA export protein and is a complex retrovirus. Journal of Virology, 79 (23), 14737-47.

Muñoz, B., Bolander, Jr, F. F. 1989. Prolactin regulation of mouse mammary tumor virus (MMTV) expression in normal mouse mammary epithelium. Molecular and Cellular Endocrinology, 62 (1), 23-29.

Nartey, T., Moran, H., Marin, T., Arcaro, K. F., Anderton, D. L., Etkind, P., Holland J. F., Melana, S. M., Pogo, B. G. 2014. Human mammary tumor virus (HMTV) sequences in human milk. Infect Agent Cancer, 9, 20.

Nartey, T., Mazzanti, C. M., Melana, S., Glenn, W. K., Bevilacqua, G., Holland, J. F., Whitaker, N. J., Lawson, J. S., Pogo, B. G. 2017. Mouse mammary tumor-like virus (MMTV) is present in human breast tissue before development of virally associated breast cancer. Infect Agent Cancer, 12, 1. doi: 10.1186/s13027-016-0113-6. Erratum in: Infect Agent Cancer, 12, 16.

Okeoma, C. M., Lovsin, N., Peterlin, B. M., Ross, S. R. 2007. APOBEC3 inhibits mouse mammary tumour virus replication in vivo. Nature, 445 (7130), 927-30. doi: 10.1038/nature05540.

Racevskis, J. 1990. Altered mouse mammary tumor virus transcript synthesis in T cell lymphoma cells. J Virol, 64, 4043-4050.

Rosenberg, R. D., Yankaskas, B. C., Abraham, L. A., Sickles, D. A., Lehman, C. D., Geller, B. M, et al. 2006. Performance benchmarks for screening mammography. Radiology, 241, 55-66.

Sanders, M. E., Schuyler, P. A., Simpson, J. F., Page, D. L., Dupont, W. D. 2015. Continued observation of the natural history of low-grade ductal carcinoma in situ reaffirms proclivity for local recurrence even after more than 30 years of follow-up. Mod Pathol., 28 (5), 662-669.

Sardanelli, F., Fallenberg, E. M., Clauser, P., Trimboli, R. M., Camps-Herrero, J., Helbich, T. H., Forrai, G. 2017. European Society of Breast Imaging

(EUSOBI), with language review by Europa Donna–The European Breast Cancer Coalition. Mammography: an update of the EUSOBI recommendations on information for women. Insights Imaging, 8 (1),11-18. doi: 10.1007/s13244-016-0531-4.

Shaheen, R., Schimmelpenninck, C. A., Stoddart, L., Raymond, H., Slanetz, P. J. 2011. Spectrum of diseases presenting as architectural distortion on mammography: multimodality radiologic imaging with pathologic correlation. Semin Ultrasound CT MR. 2011;32:351-62.

Shariatpanahi, S., Farahani, N., Salehi, A. R., Salehi, R. 2017. High prevalence of mouse mammary tumor virus-like gene sequences in breast cancer samples of Iranian women. Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids, 36 (10), 621-630. doi: 10.1080/15257770.2017.1360498.

Schütze, M., Boeing, H., Pischon, T., Rehm, J., Kehoe, T., Gmel, G., Olsen, A., Tjønneland, A. M., Dahm, C. C., Overvad, K., Clavel-Chapelon, F., Boutron-Ruault, M. C., Trichopoulou, A., Berrino, F., Tumino, R., Vineis, P., Rodríguez, L., Agudo, A., Sánchez, M. J., Dorronsoro, M., Chirlaque, M. D., Barricarte, A., Peeters, P. H., van Gils, C. H., Khaw, K. T., Wareham, N., Allen, N. E., Key, T. J., Boffetta, P., Slimani, N., Jenab, M., Romaguera, D., Wark, P. A., Riboli, E., Bergmann, M. M. 2011. Alcohol attributable burden of incidence of cancer in eight European countries based on results from prospective cohort study. BMJ, 342, d1584.

Siegel, R. L., Miller, K. D., Jemal, A. 2015. Cancer statistics. CA Cancer J Clin., 65:5-29.

Slaoui, M., El Mzibri, M., Razine, R., Qmichou, Z., Attaleb, M., Amrani, M. 2014. Detection of MMTV-Like sequences in Moroccan breast cancer cases. Infect Agent Cancer, 10 (9), 37. doi: 10.1186/1750-9378-9-37.

Stewart, T. H., Sage, R. D., Stewart, A. F., Cameron, D. W. 2000. Breast cancer incidence highest in the range of one species of house mouse, Mus domesticus. Br. J. Cancer, 82, 446-451.

Tawfik, A. M., Kassem, B. E. B., Ayoub, A., Abd El-Baseer, M. A., Mossa, L., Abdel Hamid, S. E., Mekki, G. Y. 2015. Search for Murine Mammary Tumor Virus-Like Sequences in Egyptian Females Breast Cancer. American Journal of

Medicine and Medical Sciences, 5(5), 223-226. DOI: 10.5923/j.ajmms.20150505.06.

Torre, L. A, Bray, F., Siegel, R. L., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J., Jemal A. 2012. Global cancer statistics, CA Cancer J Clin., 65: 87-108.

Wang, Y., Holland, J. F., Bleiweiss, I. J., Melana, S., Liu, X., Pelisson, I., Cantarella, A., Stellrecht, K., Mani, S., Pogo, B. G. 1995. Detection of mammary tumor virus env gene-like sequences in human breast cancer. Cancer Res., 55, 5173-5179.

Wang, Y., Pelisson, I., Melana, S. M., Holland, J. F., Pogo, B. G. 2001. Detection of MMTV-like LTR and LTR-env gene sequences in human breast cancer. Int. J. Oncol., 18, 1041-1044.

Wang, Y., Melana, S. M., Baker, B., Bleiweiss, I. J., Fernandez-Cobo, M., Mandeli, J. F., Holland, J. F., Pogo, B. G. 2003. High Prevalence of MMTV-like env Gene Sequences in Gestational Breast Cancer. Medical Onc, 20, 233-236.

Zapata-Benavides, P., Saavedra-Alonso, S., Zamora-Avila, D., Vargas-Rodarte, C., Barrera-Rodríguez, R., Salinas-Silva, J., Rodríguez-Padilla, C., Tamez-Guerra, R., Trejo-Avila, L. 2007. Mouse Mammary Tumor Virus-LikeGene Sequences in Breast Cancer Samples of Mexican Women. Intervirology, 50 (6), 402-7. doi: 10.1159/000110652.

ÖZGEÇMİŞ

Adı-Soyadı : HASAN ALI AL-CHAABAWI

Doğum Tarihi-Doğum Yeri : 1986 / IRAK

Yabancı Dil : İngilizce

Telefon : +9647702672061

e-posta : hasanbio986@gmail.com

EĞİTİM:

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Lisans	Kufa Üniversitesi, Biyoloji Bölümü	2013
Ön lisans	Teknik Enstitü, Tıp Bölümü	2007
Lise	Al-amara Lisesi	2005