

24617

T.C.
İstanbul Üniversitesi
Onkoloji Enstitüsü
Müdür: Prof.Dr.Nijad BİLGE

**MEME KANSERLİ HASTALARDA
DOKU ve SERUM Neu-ONKOPROTEİN DÜZEYLERİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

DOKTORA TEZİ

Kim.Müh.(M.Sc.) Vildan YASASEVER

Tez Danışmanı:

Doç.Dr.Haluk ONAT

İstanbul – 1992

TEŐEKKÜR

Doktora tezimin hazırlanmasında bana yardımcı olan başta Onkoloji Enstitüsü Müdürü Prof.Dr.Nijad Bilge'ye, Temel Onkoloji Anabilim Dalı Başkanı Doç.Dr.Nejat Dalay'a, danışmanım Doç.Dr.Haluk Onat'a, bütün arkadaşlarıma, aileme, eşim ve çocuklarıma teşekkürü borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

| | Sayfa |
|--------------------------|-------|
| GİRİŞ | 1 |
| GENEL BİLGİLER | 3 |
| GEREÇ VE YÖNTEMLER | 17 |
| BULGULAR | 25 |
| TARTIŞMA | 30 |
| ÖZET | 33 |
| KAYNAKLAR | 34 |

GİRİŞ

Gen amplifikasyonu onkogenlerin aktiveşme yollarından biridir. Sıçan nöroglıoblastomalarında saptanmış olan onkogene "neu" adı verilmiştir. Bu genin diğer isimleri ise "HER-2" veya "C-erb B-2"dir(1,5,6,59,86).

Neu geninin aşırı ekspresyonu malign transformasyonda ilk basamak olarak kabul edilir(4). Amplifikasyon ürünü olan proteinler kanserin tanısına yardımcı parametre ve prognostik faktör olarak değerlendirilebilir(32,57,76,79,80).

İmmünohistokimyasal çalışmalarda meme tümörü dokusunda neu geninin amplifikasyonu gözlenmiştir(18,25,55,58,68,78). Bu genin ürünü olan neu onkoprotein varlığının meme kanserinde prognostik faktör olarak önem taşıdığı belirlenmiştir(76,79,80), meme kanserinin solid metastazlarında da gen amplifikasyonu bulunmuştur(69).

Nükleik asitlerin analiziyle elde edilen sonuçlara göre meme kanseri dışında over kanserinde de % 2-10 arasında değişen neu amplifikasyonu gözlenmiştir(43,65). Aynı gen ürününün düzeyi fibro-kistik hastalık ve Paget hastalığında da artmaktadır(53).

Ancak bugüne kadar yapılan bütün çalışmalar sadece tümör dokusunda onkogen proteininin ya da mRNA düzeylerinin kalitatif olarak belirlenmesiyle sınırlı kalmış(5); serum veya tümör dokusunda neu proteininin kantitatif tayini yapılmamıştır.

Bu çalışmada meme hastalıklı hastaların serum ve tümör dokusu örneklerinde neu onkoprotein miktarı kantitatif olarak tayin edilmiş, bu değerın rutin bir test olarak uygulanıp uygulanamayacağı ve prognoz açısından önemi araştırılmıştır.



GENEL BİLGİLER

Protoonkogenler - Onkogenler

Kanserin sebepleri çok çeşitlidir. Bu farklılıkların tümü hücredeki kalıtsal molekülde meydana gelen değişikliklerle paraleldir.

Genellikle maligniteye dönüşmeyle sonuçlanan bu değişiklikler nokta mutasyonları, gen amplifikasyonları ve translokasyonlar gibi farklı mekanizmaların geni aktive etmesiyle ortaya çıkar(49).

İnsan vücudunda "onkogen" adı verilen bazı hücresel genler vardır. Bunlar malignitenin oluşumunda büyük önem taşırlar. Bu genler retrovirüslerin viral onkogenlerinin hücresel kopyalarıdır ve "protoonkogen = hücresel onkogen" olarak adlandırılırlar(11). Hücresel protoonkogenlerle viral onkogenlerin nükleik asit dizileri ve dolayısıyla ürünleri olan proteinler birbiriyle benzerlik taşır. Viral onkogenler "v-onc", hücresel protoonkogenler ise "c-onc" ile gösterilirler(11,54). Normal fonksiyona sahip proteinleri kodlayan protoonkogenlerde meydana gelen değişiklikler veya bunların aşırı ekspresyonu kansere neden olabildiği gibi(8) hastalığın progresyonuyla da doğrudan ilişkilidir(49,78).

Protoonkogenler ve malignite ile ilgili veriler hayvan modelleriyle,tümör hücre soylarıyla ve insan tümörleriyle yapılan çalışma-

lar sonucu ortaya konmuştur. Hayvan modelleri ve hücre soylarından elde edilen veriler:

1- Bazı türleri tümorojenik olduğu bilinen transforme edici retrovirüslerin viral onkogenleriyle insan protoonkogenleri arasında dizi benzerliği;

2- Transfeksiyon çalışmaları: NIH/3T3 hücrelerinde ve primer embriyo fibroblastlarında protoonkogenlerin transformasyon potansiyeli;

3- Tavuk lösemi virüsü gibi transforme edici retrovirüsler tarafından oluşturulan tümörlerde belirli protoonkogenlerin önemli rolü.

İnsan tümörlerinden elde edilen veriler.

1- Bazı insan malignitelerinde spesifik proto-onkogenlerin ekspresyonunda artış.

2- Protoonkogenleri veya bunların ekspresyonu ile ilgili DNA bölgelerini kapsayan kromozomal translokasyonlar,

3- Bazı insan tümörlerinde gözlenen protoonkogenlerin amplifikasyonu(66).

Protoonkogenlerin bazıları dokuya spesifiktir; bazıları da tüm dokularda işlerlik kazanır. İnsan neoplazileri çeşitli faktörlere bağlı hastalıklardır. Primer meme tümörlerinin moleküler analizi çözülmemiş özel anormalliklerin varlığını ortaya koymuştur(3). Bu değişikliklerin önemi hakkında şimdilik çok az şey bilinmektedir(2).

Onkogen Ürünleri

Bunlar aşağıdaki şekilde gruplanabilir:

1. Protein Kinazlar: Kinaz aktivitesi gösteren, yani hücrel proteinleri fosforile eden moleküllerdir. Normal hücrede bu aktivasyon serin ve treonin üzerinden olurken, protoonkogenlerde çoğunlukla tirozin üzerinden olur. Bu nedenle grupta yer alan proteinlere "tirozin kinazlar" denir. Transforme hücrelerde tirozin kinaz aktivitesinin arttığı görülür.

2. G Proteinleri: GTP bağlayan ve hidrolizle parç alayan proteinlerdir. Membranda yer alırlar ve sinyal iletiminde sekonder moleküle cevap taşınmasında rol oynarlar.

3. Büyüme Faktörleri: Normal hücrelerin büyümesiyle, farklılaşmasını kontrol ve stimüle eden proteinlerdir. Hücrenin yüzeyinde yer alırlar. Doku kültüründe yapılan çalışmalar sonucu büyüme faktörlerinin önemi ortaya çıkmıştır. Ancak hücre proliferasyonunda önemli rol oynamalarına rağmen bu faktörlerin hücrenin malignleşmesine yol açtığı hakkında herhangi bir kanıt yoktur.

4. Çekirdek Proteinleri: DNA'ya bağlanan ve işlevi en geniş olan onkogen ürünleridir. myc, myb, fos gibi onkogenler bu türden çekirdek proteinlerini kodlar. Bunlar protein sentezinin bütün aşamalarını DNA eşleşmesiyle etkileyebilir. Çekirdek proteinleri sitoplazmaya da çıkarak mRNA'nın stabilizasyonunu etkiler, sekonder haberci moleküller gibi görev yapabilirler.

5. Büyüme Faktörü Reseptörleri: Normal hücrelerin çoğunda bulunan bu reseptörler yardımıyla hücreler büyüme ve çoğalma sinyallerini algılar. Bu reseptörler tirozin kinaz ve otofosforilasyon aktivitesine sahiptir. Bu grubun başlıca temsilcisi olan EGFR'in gen dizisi tavuk eritroblastosis virüsünün v-erb B gen dizisiyle benzerdir. Diğer iki örnek CSF-1, Ins-R'dir(12,15,16,19).

Aktifleşme

Protoonkogenlerin aktivasyonu kanserin indüksiyonu ve progresyonu ile ilişkili olabilir. Aktivasyon, tümör hücrelerinin genomundaki onkogenin kopya sayısında (amplifikasyon) ve buna bağlı protein ürününün konsantrasyonundaki artış; onkogeni kodlayan dizideki mutasyonlar ve sonucunda değişmiş gen ürünü; kromozomal kırıklar ve translokasyonlarla proteinde değişiklik ve/veya ekspresyon artışı; retroviral promotor bölgenin protoonkogene yakın yerleşimiyle oluşabilir(17).

İlk üç aktivasyon yolu insan tümörlerinde gözlenmiştir.

Büyüme Faktörü Reseptörlerini Kodlayan Genler

Protein kinaz aktivitesi gösteren pek çok transmembran reseptör molekülü vardır. EGFR, PDGFR, İnsülin-R, CSF-1 bunlara örnektir. Tirozin kinaz aktivitesi fosfat gruplarının varlığı veya yokluğu ile ilişkilidir. Fosfatın serin, treonin veya tirozine eklenmesiyle fosforilasyon olur. Fosforilasyonun büyük çoğunluğu serin ve treonine fosfat bağlanmasıyla oluşur, çok küçük bir oranı ise tirozin üzerinden ceryan eder. v-src geniyle yapılan çalışmalar sonucu(39) tirozin kinaz aktivasyonu açıklığa kavuşturulmuştur. EGFR, PDGFR, İnsülin-R, insülin-like, GF-1 ve CSF-1 reseptörleri serin, treonin ve tirozin üzerinden kendilerini fosforile edebilirler. Reseptöre ligandın bağlanması reseptör molekülünün tirozin kinaz aktivitesini artırır, tirozin üzerinden otofosforilasyonla sonuçlanır. Reseptörün tirozin kinaz aktivitesi karboksil ucunda, yani membranın sitoplazma yanında yer alır.

Viral onkogenlerden ikisi GFR'i kodlayan genlerle benzerdir. v-erb B'nin gen ürününün amino asit dizisi EGFR ile, v-erbfms'nin ürünününki de CSF-1 ile benzerlik gösterir. Bu genlerin protein

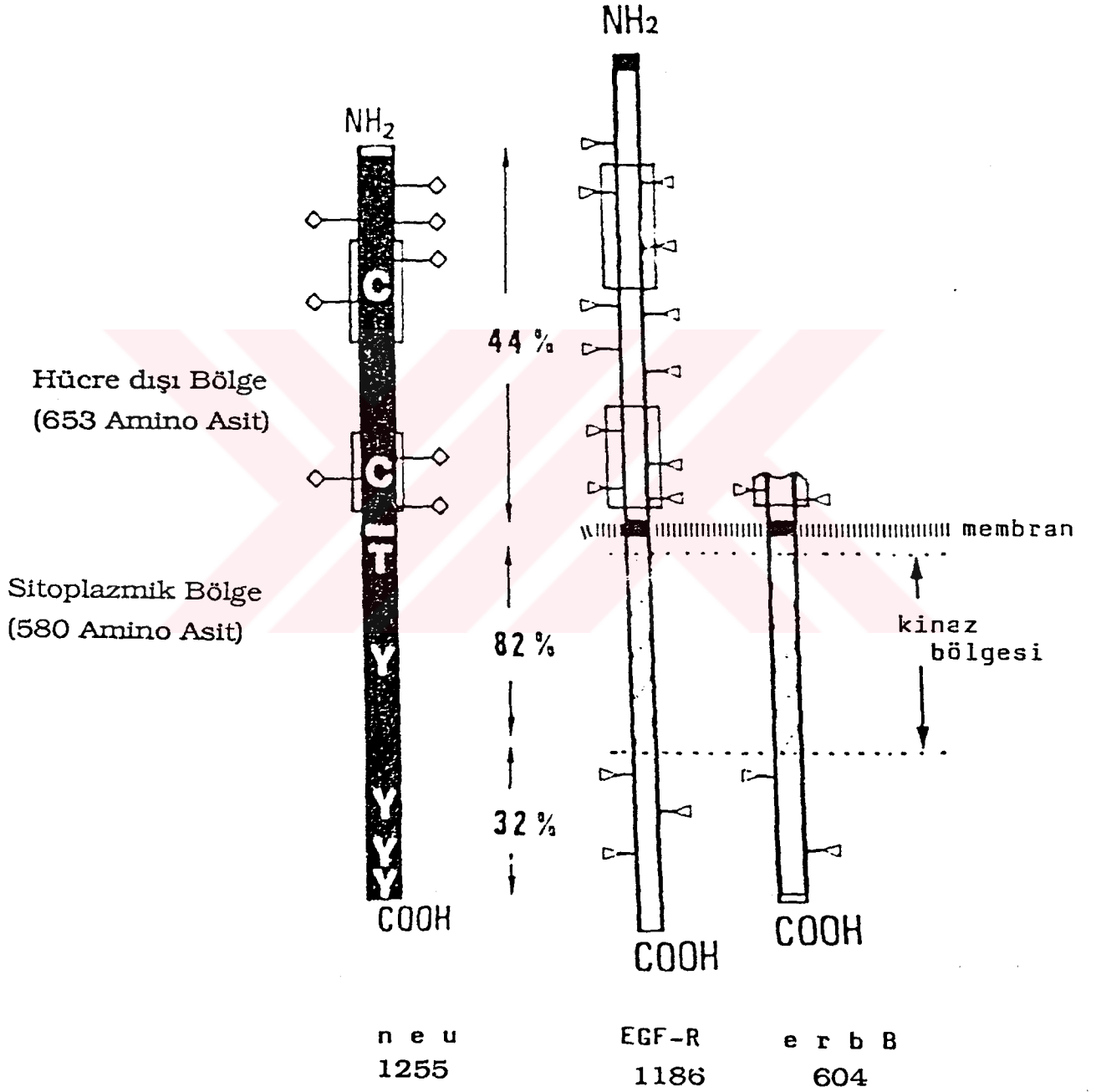
ürünleri normal hücrelerde vardır ve şimdiye kadar malign transformasyona yol açtığı gösterilmemiştir. Bunun sebebi de viral onkogenlerle hücre genleri arasındaki önemli değişikliktir. v-erb B'de EGFR'in hem hücre dışı ve hem de hücre içi bölgeleri eksiktir. v-fms proteininin molekül ağırlığı CSF-1'den daha düşüktür. Bu modifikasyonlar sonucu viral protein normal hücre proteininden farklı özellik gösterir. v-erb B'nin protein ürünü EGF'e bağlanamaz ve hücre membranında kalır. İkinci olarak da EGF'in bağlanması EGFR'in tirozin kinaz aktivitesini uyarır. Bulgular v-erb B proteininin tirozin kinaz aktivitesini hiç kaybetmediğini göstermektedir.

Tirozin kinazların ikinci bir tipi de hücre membranlarının iç kısmıyla ilişkilidir. Bu kinazlara örnek v-src, c-src, v-abl ve v-fes genlerinin protein ürünleri verilebilir. Bu örneklerden olan src proteininin amino ucu sitoplazmik membranla ilişkilidir(16,21).

Bilinen 50 kadar protoonkogenin 6-8 tanesi büyüme faktörleri veya büyüme faktörü reseptörleriyle ilgilidir. Tavuk eritroblastosis virüsünün transforme geniyle benzer olan c-erb B geni EGFR'ünü kodlar. Birçok reseptör gibi bu moleküller de tirozin-spesifik protein-kinaz ailesinin üyeleridir(66,90).

Bazı insan tümörlerinde büyüme faktörü reseptörlerini kodlayan genlerde amplifikasyon ile birlikte gen ürünlerinin arttığı gözlenir(45). Bu olay hatalı büyüme uyarısıyla sonuçlanabilir(72).

EGFR, c-erb B-1 protoonkogen ürünüdür ve bazı skuamöz hücreli karsinomaların ve beyin tümörlerinin membranlarında büyük oranda eksprese olur. Bu tip malignitelere c-erb B-1 geninde amplifikasyon, yeniden düzenlenme veya translokasyonlar ortaya çıkar. c-erb B-1/EGFR genindeki değişiklikler skuamöz epitelyumun malignitesinin indüksiyonu veya progresyonuyla ilişkilidir. İnsanlarda c-erb B-2'nin değişiklikleri glandular epitelyum tümörleriyle sınırlanmıştır(89,90).



Şekil 1

EGF-R, erb-B ve neu proteinlerinin şematik gösterilişi(19)

erb B Ailesi

Bu aileye ait ilk örnek tavuk eritroblastosisinin viral onkogeni olan v-erb B'dir(27). Bu gen c-erb B-1 ile benzerdir. c-erb B-1 175 kD molekül ağırlığında bir protein kodlar. EGFR'ü olan bu proteinin hücre dışı, membran içi ve hücre içi olmak üzere üç bölgesi vardır. Kinaz aktivitesi gösteren hücre içi bölgede en az 4 otoposforilasyon noktası yer alır. v-erb B proteini ile EGFR membran içi bölgeleri arasında % 85 oranında benzerlik vardır. v-erb B geninde membran dışı bölgeyi kodlayan büyük bir bölüm eksiktir(7,52) (Şekil 1).

Buna bağlı olarak v-erb B membran dışı bölgesi olmayan bir GFR olarak düşünülür, yani EGFR'in tronke olmuş şeklidir. Ligandı bağlayamaz ve devamlı aktif kalır. v-erb B ailesine ve EGFR'ye benzer molekül kodlayan başka genler de vardır. Bu genlere "erb B ailesi" denir(19).

Etilnitroüre ile indüklenerek oluşturulmuş sıçan nöroglıoblastomalarında bir onkogen saptanmıştır. Tirozin kinaz kodlayan bu onkogen "neu" adını taşır(14,66,90). Neu onkogeni ile kodlanan 185 kD molekül ağırlıklı reseptör benzeri p185 proteini, EGFR ile ilişkilidir. Sıçan nöroglıoblastomalarının hücre yüzeyinde bulunan p185, EGFR ile % 50; tirozin kinaz bölgesinde de % 80 oranında benzerlik gösterir(14,51,66,88).

Aynı gen iki ayrı çalışma grubu tarafından daha izole edilmiş "HER-2" veya "c-erb B-2" olarak adlandırılmıştır. Daha sonra bu genlerin aynı kromozomda yer aldıkları(1,21,29) gösterilmiş, 4 araştırmacı grup da meme kanserinde genin 5-10 kat amplifikasyon gösterdiğini belirlemiştir(64).

Neu onkoprotein yapısının EGF reseptörüyle benzerlik göstermesi, henüz belirlenmemiş bir büyüme faktörü reseptörü olduğunu düşündürmektedir. Bu, sinyal iletiminde rol oynayan hücre dışı li-

gandı bağlama bölgesine sahip hücre içi bölgesinde tirozin kinaz aktivitesi gösteren bir transmembran proteindir(21,24.84).

EGF respektörünü kodlayan erb B geni 7. kromozomun 11-13 bandları arasında yerleşmiştir(1,65) ve 175 kD'luk bir protein kodlar. c-erb B-2 (neu) onkogeni ise insan genomunda 17. kromozom q2'de haritalanmıştır(65,69). Bu onkogen 4.8 kb'lık mRNA ile 185 kD'luk tirozin ailesine ait glikoprotein olan bir onkogen ürünü meydana getirir(27,42,51,68). Western blot yöntemiyle bu proteinin 185 kD molekül ağırlığındaki neu onkoproteini olduğu saptanmıştır(25).

Neu onkoproteininin hücre membranına yerleşmiş bir reseptör olduğu varsayılabilir(77). Bu özelliklerinden dolayı neu geni tirozin kinazları kodlayan genler grubundan kabul edilir(65).

EGFR ve neu genleri birbirlerinden farklı ve bağımsız olmakla birlikte özellikle transmembran bölgeleri büyük oranda benzerdir(65).

Neu onkoprotein yapısında 3 bölge içerir: C-terminal bölgesinde 580 amino asit vardır. Molekülün bu bölgesi sitoplazmadadır ve otofosforilasyon kapasitesiyle tirozin kinaz aktivitesi gösterir. Proteinin N-terminal bölgesi 632 amino asit içerir ve molekülün hücre dışı kısmını oluşturur, henüz bilinmeyen bir ligandı-bağlama bölgesi olarak kabul edilir. 22 amino asit ihtiva eden transmembran bölgesi ise molekülün onkolojik aktivitesi yönünden önem taşır. Yapılan sıçan deneylerinde nokta mutasyonlarının yol açtığı amino asit değişikliklerinin bu bölgede gerçekleştiği gösterilmiştir(1,7,21,51,53,60,72,87).

Neu onkoproteini bir plazma membran proteini olmakla birlikte böbrek hücrelerinde, ağız mukozasında(33,36), normal meme dokusunda (44,83) ve meme kanseri hücrelerinde(10) sitoplazmik aktivite dokusunda, epitelde, apokrin metaplazide, fetal ve yetişkin

böbrek tübülüslerinde, barsak, yetişkin endoserviks, endometrium, tiroidin C-hücrelerinde, hepatositlerde ve fetal memenin tüm duktal hücrelerinde granüler intra sitoplazmik boyalarla neu onkoprotein varlığını göstermiştir(35,44). Yüksek oranda neu genine ait mRNA içermelerine rağmen böbrek hücrelerinin immünohistokimyasal incelemelerde meme dokusunda olduğu gibi hiç membran aktivitesi göstermediği bildirilmiştir(8,24).

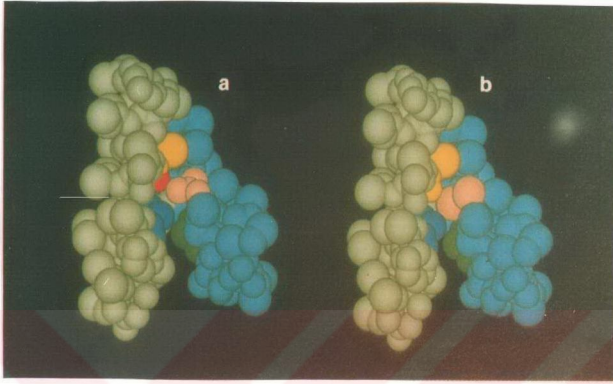
Neu Proteini'nin İşlevi

c-erb B-2 geninin birçok dokuda transkripsiyonu görülebilir. Bununla birlikte c-erb B-2'nin normal veya tümör dokusundaki rolü henüz aydınlanmamıştır(90).

Neu onkoproteini büyük ihtimalle hücre membranına yerleşmiş bir reseptördür. Bunun ligandı ras transforme hücreler tarafından üretilir. MDA-MD-231 meme kanseri hücreleri de özellikleri açısından neu'un ligandına benzeyen 30 kD'luk bir faktör salgılar. Transforme olan neu geninde nokta mutasyonu sonucu, proteinin membran bölgesinde bir amino asidin değiştiği görülür(77).

Sıçan hücre soyuna özgü onkojenik neu proteini transmembran bölgesindeki tek amino asit değişikliğiyle (glutamik asit yerine valin gelmesi) hücrenel neu geninden farklıdır. Bu nedenle neu'un aktivasyonu için bir tek amino asidin değişmesinin yeterli olduğu düşünülmektedir(14). Böyle bir değişiklik insan tümörlerinde çok nadirdir, çünkü malignite için en az iki baz değişikliği gereklidir(20) (Şekil 2).

Kimyasal yolla indüklenmiş sıçan nöroglıoblastomalarından elde edilen transforme neu geninde ise daha başka bir amino asit değişikliği gözlenmiş, benzer biçimde transmembran bölgesinde 655 konumdaki isoleusin yerine valin geçmiştir(68).



Şekil 2

Neu proteininin membran içi bölümünün modeli

- Onkojenik mutant protein 655. konumdaki glutaminin yerini alan valin kırmızı ile işaretlenmiştir.
- Normal erb B-2 gen ürünü(68)

Rat-1 hücrelerinde hem p185 ve hem de EGFR birlikte ekspres olur. Normal sıçan hücrelerinde p185'te serin ve treonin fosforile oldukları halde tirozin fosforilasyonu çok düşüktür. Buna karşılık hücreler EGF ile inkübe edildiğinde EGF'in tirozin fosforilasyonunu uyardığı görülür(72).

Gen Ekspresyonundaki Değişiklikler, Gen Amplifikasyonları

Malign hücrelerin karakteristik özelliklerinden biri de bazı onkogenlerin aşırı ekspresyonudur. Bu, artmış transkripsiyon oranı ve ya gen kopya sayısında artışla birlikte olabilir. Kanseri hücrelerinde gen kopya sayısındaki artış daha sıklıkla gözlenir ve "gen amplifikas-

yonu" olarak isimlendirilir. Amplifiye olmuş genin ekstra kopyaları "Double Minute Kromozomlar (DM)" veya "Homojen Boyama Bölgeleri (HSR)" olarak adlandırılan kromozom bölgelerinde bulunmuştur. Onkogenlerin anormal ekspresyonuna bağlı amplifikasyon, kromozom bandlama metotları, RFLP ve onkogene özgü prob kullanmak suretiyle belirlenebilir(22).

NIH/3T3 hücre soyu aktivasyonunu inceleyen çalışmalarda(26) c-erb B-2 gen amplifikasyonu, yeniden düzenlenme, nokta mutasyonu ve aşırı ekspresyon gibi değişiklikler gözlenmiştir(38).

Neu geninde yeniden düzenlenme çok nadir görülür. ECO R-1 enzimiyle belirlenmiş olan neu'un yeniden düzenlenmesini gösteren istatistiksel veriler yetersizdir(44).

Gerek in situ, gerekse invaziv duktal karsinomalarda neu ekspresyonunun menopoz öncesinde daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Yüksek ekspresyon östrojen reseptörü negatif tümörlerde de görülür(25).

Gen amplifikasyonu, bir genin çok sayıda kopyasının oluşmasına yol açar. Bu da mRNA sentezinin ve protein üretiminin artışıyla sonuçlanır. Gen amplifikasyonu, replikasyon artışının sonucu olarak düşünülebilir. Bunu, mRNA sentezinin artması, gen ürününün birikmesi ve çoğalma kolaylığı izler. Genellikle boyutu 100-1000 kb olan ve kolayca çoğalabilen gen, komşu değişken bölgesiyle birlikte amplifiye edilir(78).

c-myc ve c-sis genleri örnek alınarak gen amplifikasyonuna bağlı artmış ekspresyon üzerinde pek çok çalışma yapılmıştır(70,71). İlerlemiş epitel kanseriyle sarkomlarda ve agresif tümör tiplerinde C-myc gen amplifikasyonu gözlenmiştir. Aynı zamanda c-myc'in amplifikasyonu ile metastaz arasında da bağlantı mevcuttur(28). Küçük hücreli akciğer kanserinde(69) ve meme kanserinde de(51) c-myc ve

N-myc onkogenlerinin amplifikasyonu ile ilgili veriler bildirilmiştir. Genin kopya sayısı ile hastalığın evresi arasındaki ilişki ise en iyi nöroglıoblastomalarla yapılan çalışmalarda gösterilmiştir(22).

Myc ailesine ait genlerin amplifikasyonundan başka gen amplifikasyonları da mevcuttur(22,73).

Meme adenokarsinomalarında c-erb B-2 (neu) ve int-2(67) olmak üzere en az iki genin amplifikasyonu bildirilmiştir. Bu genlerde amplifikasyon varlığı hastanın prognozu hakkında bilgi verir(50,58). c-erb B-2 onkogen amplifikasyonu insan meme kanserlerinin % 30'unda gözlenmiş ve yaşam süresiyle remisyon süresi arasında anlamlı bir ilişki olduğu vurgulanmıştır(22,74). Bu genin meme kanserinde % 9-33 arasında amplifiye olduğu bildirilmiştir(3,24,45,77,78). Amplifikasyonun saptandığı vakalarda prognoz kötüdür. Bu nedenle c-erb B-2 amplifikasyonu ile ilgili araştırmaların sayısı oldukça fazladır(50,90). Hastalığın nüksünde ise amplifikasyon oranının 5 kat daha arttığı bildirilmiştir(51).

Buna karşılık yine birer tirozin kinaz kodlayan diğer bazı protoonkogenlerin (abl ve fcs) meme kanserinde amplifikasyon göstermedikleri belirtilmiştir(44).

Meme adenokarsinomalarında, diğer adenokarsinomalara oranla neu amplifikasyonu üç kat daha sıktır(23,90).

Neu onkogeninin aşırı ekspresyonu in situ, büyük hücreli ve komedo duktal karsinomalar gibi non-ınvaziv meme tümörlerinde(8,54,77,90) bulunmuş, daha sonra in situ küçük hücreli, kribri-form ve papiller duktal karsinomalarda da gözlenmiştir. Histolojik alt sınıflaması yapılmamış in situ duktal karsinomada neu onkogeninin aşırı ekspresyonu diğer meme kanserlerinde olduğu kadar sıklıkla bildirilmemiştir(78).

Benign meme tümörlerinde aşırı ekspresyon olmadığı gözlenmiştir(77). Fibroadenoma veya fibrokistik meme hastalıklarında neu ekspresyonu meme kanserli hastalara oranla daha düşük düzeydedir. Ancak benign lezyonlarda neu ekspresyonunun biyolojik önem taşıdığı vurgulanmıştır(50). Paget hastalığında ise yine aşırı ekspresyon bildirilmiştir(53,77).

Ayrıca over(46,83), mide ve tükrük bezlerinin adenokarsinomalarında(51,90) da neu geni amplifikasyonu görüldüğü belirtilmiştir(77).

Buna karşılık neu amplifikasyonu skuamoz hücreli karsinomalarda, sarkomlarda ve hematolojik malignitelerde gözlenmemiştir(20,90).

Neu Geni Amplifikasyonunun Prognoz İle İlişkisi

Meme kanserinde c-erb B-2 gen amplifikasyonu veya amplifikasyon saptanmadığı halde genin aşırı ekspresyonu bildirilmişse de, bunun klinik önemi henüz kesinlik kazanmamıştır(30,61,74,85). Bunun başlıca nedenleri çalışılan grupların özelliklerindeki değişiklikler, hastanın takip süresi ve tedavi yöntemlerindeki farklılıklar ve c-erb B-2'yi değerlendirmek amacıyla deneysel ve istatistiksel yöntemlerin üniform olmamasıdır(3,50).

c-erb B-2 (neu) amplifikasyonu meme kanserinde hücresel büyüme ve/veya bölünmeyle büyük oranda ilişkilidir(2,6,41,61,79). Böylece, histolojik grad ve c-erb B-2 kopya sayısı tümör yayılımından daha çok tümörün agresifliğiyle bağlantılıdır(9,17,76).

Amplifikasyon aynı zamanda tümörün büyüklüğü ve gradıyla da ilişkilidir. Yayılmış, az differansiye karsinomalarda genin amplifikasyonu daha sık görülür(9,47).

Meme kanserinde pek çok prognostik faktör olmasına rağmen aksillada lenf nodülü bulunması büyük önem taşır(34,40). Lenf nodülü pozitif olan hastalarda neu onkogen amplifikasyonu, lenf nodülü negatif hastalara oranla prognozlarının daha kötü olduğunu düşündürür(40). Buna rağmen lenf nodülü metastazı neu'un aşırı ekspresyonunu tümör hücrelerinin büyüme hızında artışa yol açar, fakat metastaz kapasitesini arttırmaz(34,76,79). Metastaz olmaması iyi prognoz işareti olsa bile, yine de lenf nodülü negatif hastaların % 20-30'unda nüks görülebilir(40,62).

c-erb B-2 amplifikasyonu hücrel atipinin gradiyle veya mitotik indeksle de ilişkilidir. Fakat histolojik tipte ilgili değildir. Aynı zamanda tümör büyüklüğüyle, hastaların yaşıyla, TNM evrelemesiyle c-erb B-2 amplifikasyonu arasında ilişki bulunamamıştır(75).

Buna karşılık neu onkogen amplifikasyonu ile östrojen progesteron reseptörlerinin durumu arasındaki ilişki henüz açıklık kazanmamıştır. Literatürde mevcut iki çalışmadan birinde arada anlamlı ilişki bulunduğu bildirilirken(63), bir diğer grup bunun tam aksini savunarak, c-erb B-2'nin amplifikasyonunun lenf tutulumuna ve tümör büyüklüğüne bağlı olmayan çok önemli prognostik faktör olduğunu ileri sürmüştür(4).

Ancak kanserin prognozunda sadece gen amplifikasyonunun tesbiti değil, genin ürünü olan onkoproteini belirlemek daha fazla önem taşıyan bir parametredir. Zira gen etkisini ürünü aracılığıyla gösterir. Ne var ki birçok onkogenin ürünü henüz saptanamadığı, ya da testlerde kullanılacak ölçüde saflaştırılmadığından bu çoğunlukla mümkün olamamaktadır. Neu proteini de ancak çok yakın bir tarihte belirlenebilmiş ve buna karşı antikolar geliştirilmesinden sonra neu onkogen proteininin kantitatif tayini olanağı doğmuştur. Tez çalışması da bu konuda literatürde mevcut ilk örneği oluşturmaktadır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Neu onkogeninin ürünü olan insan neu onkoproteininin serum veya plazmada ve doku ekstratında kantitatif miktarının belirlenmesi ELISA yöntemiyle yapılmaktadır.

ELISA Yöntemi

Bu yöntem, kantitatif olarak protein miktarını belirlemek için kullanılan non-isotopik yöntemlerden biridir. Son yıllarda büyük hızla hem araştırma ve hem de klinik laboratuvarlarında kullanılmaya başlanmıştır. ELISA yönteminde protein miktarını belirlemek için yapılan işaretleme radyoaktif maddelerle değil, enzim yardımıyla yapılır. Enzim yardımıyla oluşturulan renk reaksiyonunun absorbansı spektrofotometrede belli dalga boylarında okunur. Daha sonra da çizilen standart eğriden konsantrasyonlar hesaplanır.

ELISA terimi, "Enzym-Linked Immunosorbent Assay" sözünün baş harflerinden oluşur. Bu yöntemde reaksiyonun bileşenlerinden biri mikrotiter plağa veya küçük küreciklere yani solid faza kaplanmıştır. Bu özellik serbest veya bağlanmış işaretli moleküllerin ayrılmasına yardımcı olur. Deney esnasında bihinen miktarda antijen ihtiva eden standartlar ile örnek eklenir ve bunların antikör kaplı yüzeye bağlanması sağlanır. Yıkama işleminden sonra bağlanan anti-

kordan farklı olan enzim-işaretili ikinci antikor ilave edilir. Bu şekilde oluşturulan komplekse Antikor-Antijen-Antikor enzim solid faz sandöviç-kompleksi denir. Bağlanmamış durumdaki antikorlar yıkama işlemiyle atıldıktan sonra enzimin substratı eklenir. Enzim, substratı hidroliz eder veya oksitler. Sonuçta örnekteki antijen miktarı ile doğru orantılı bir renk reaksiyonu oluşur. Her örneğin absorpsiyonu konsantrasyonu bilinen standartlar kullanılarak çizilen standart eğri yardımıyla belirlenir(13).

Bu yöntemden yararlanılarak görünüşte sağlıklı 20 kadın ve patolojik olarak kesin tanısı konmuş, mastektomi olup, henüz hiç tedavi görmemiş 126 meme tümörlü hastayla prospektif bir çalışma yapıldı. Belli bir topluluktan rastgele örnekleme metoduyla seçilen kontrol grubu sağlıklı kadınların venöz kanları alındı, aynı gün serumları ayrılıp, -30°C'deki derin dondurucuda örnek sayısı tamamlanuncaya kadar saklandı. Aynı işlemler meme tümörlü ve hiç tedavi görmemiş hasta grubu için de yapıldı.

Ayrıca 9 hastadan ameliyat sırasında alınan normal meme ve tümör dokusu örnekleri de yine örnek sayısı tamamlanuncaya kadar -30°C'de derin dondurucuda saklandı.

Doku Örneklerinin Hazırlanması

Dokular önce Ultra-Turrax T2S tipi homojenizatör (Janke-Kunkel) yardımıyla homojenize edildi. İşlemler aşağıdaki sırayla uygulandı:

a) Dondurulmuş dokular çözüldükten sonra doku makası ile küçük parçalara ayrıldı.

b) Doku parçacıklarına 1 gr doku için 10 ml olacak şekilde 4°C'deki 10 mM Tris-HCl, pH=7.4, 1.5 mM EDTA, % 10 gliserol ihtiva

eden reseptör tamponu ilave edildi.

c) Örnekler buz üzerinde 4 defa 5'er saniye süreyle 13500 devir/dakika hızla homojenize edildi.

Her işlemten sonra örnekler 15-20 saniye buz üzerinde bekletildi.

Testin Yapılışı

Homojenattan 50 mikrolitre alınarak üzerine 10 mikrolitre Antijen Ekstraksiyon Reaktifi eklendi ve 5 dakika bekletildi. Çözelti 2500 rpm hızla 10 dakika santrifüj edildi. Oluşan supernatantın bir kısmı protein miktarı tayin edilmek üzere ayrıldı. Diğer kısmı da neu onkoproteini düzeylerini saptamak amacıyla % 1'lik sodyum azit ve sığır serum albumini içeren 10 mM fosfat ile dengelenmiş serum fizyolojik ile 200 kat seyreltildi.

Serum örnekleri ile doku homojenatlarının neu onkoprotein düzeyleri "HUMAN NEU ONCO-PROTEIN" (Applied bioTechnology Inc.-USA) kullanılarak ELISA yöntemiyle belirlendi.

50 kat seyreltilmiş serumlar ile 200 kat seyreltilmiş homojenatlardan 100'er mikrolitre alınarak fare monoklonal Anti-neu antikorlu ile kaplanmış mikro kuyucuklara otomatik pipetle eklendi. 0,10,30,60,90 ve 120 HNU/ml oranında antijen içeren standartlarda duplike olarak standart eğri için ayrılmış olan mikro kuyucuklara ilave edildi. Mikro kuyucukların üzeri kapatılarak 12-18 saat oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda plaklar % 0.5 oranında Tween 20 içeren fosfat tamponu ile dengelenmiş serum fizyolojik kullanılarak otomatik mikropate yıkayıcı (SLT Labinstruments 812 SW2) ile aşağıdaki prensibe göre 6 kez yıkandı.

Yıkama Metodu: $A + n (w + W + A + a)$

A = Normal Aspirasyon

n = Tekrar Sayısı

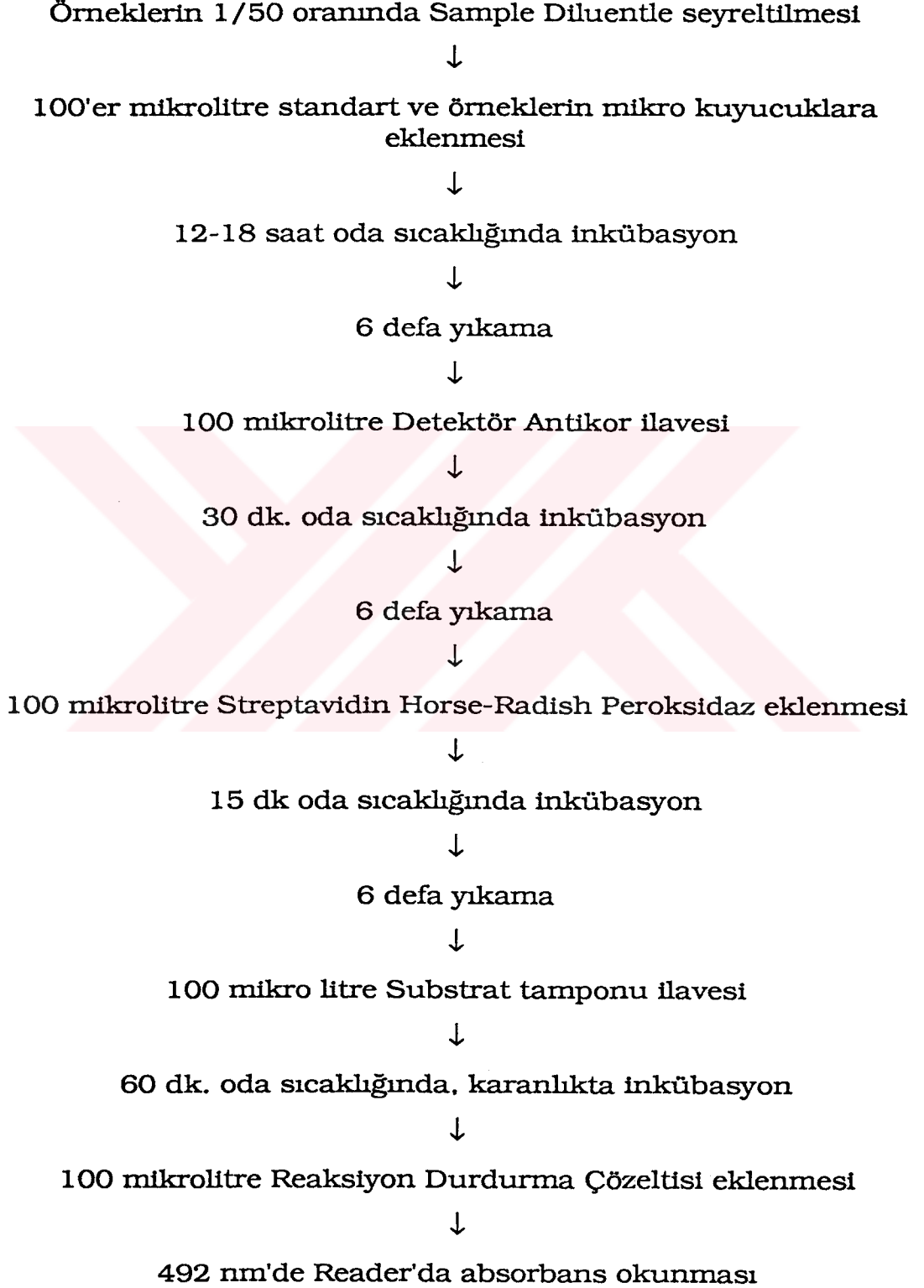
a = Dip Aspirasyon

w = Dip Yıkama

W = Normal yıkama

Mikro kuyucuklarda hiç reaktif kalmamış olmasına özellikle dikkat edildi. Yıkama işlemi tamamlanınca kuyucuklara 100'er mikrolitre detektör antikör ilave edilerek 30 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Yeniden aynı programla 6 kez yıkanan mikro kuyucuklara 100'er mikrolitre Streptavidin-Horse Radish Peroksidaz kompleksi eklendi ve 15 dakika oda sıcaklığında bekletildi. 6 kez yıkandıktan sonra O-Fenilen-diamin, 0,1 M sitrat tamponu, % 0,01 H_2O_2 içeren önceden hazırlanmış substrat tamponundan her kuyucuğa 100'er mikrolitre eklendi. Oda temperaturünde 60 dakika karanlıkta inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda 100'er mikrolitre reaksiyon durdurma çözeltisi eklenen kuyucukların 492 nm dalga boyundaki absorbansları "SLT Labinstruments Easy Reader SF Plus" ile okundu.

YÖNTEMİN AKIM ŞEMASI



Daha önce belirtilen standart konsantrasyonlarının verdiği absorbans değerleri kullanılarak çizilen standart eğriden her bir örneğin neu onkoprotein konsantrasyonu HNU/ml olarak bulundu ve örnekler testte 1/50 oranında seyreltildiği için 50 ile çarpılarak gerçek değerleri HNU/ml cinsinden hesaplandı.

Doku örneklerinden elde edilen sitozolün protein konsantrasyonları Lowry yöntemiyle tayin edildi.

Lowry Metodu

Tümör dokusu örneklerinde protein tayini Lowry(48) yöntemine göre yapıldı. Standart protein olarak sığır serum albumini (1 mg/ml) kullanıldı. Örneklerin hacmi su ile 100 µl'ye tamamlandı. % 100 TCA ile çöktürülen proteinler 50 µl 2M NaOH içinde 37°C'de 30 dakika hidrolizlendi. Örneklerin üzerine 1 ml B tamponu (% 2 Na₂CO₃, % 1 CuSO₄, % 2 K-Na Tartarat; 50:1:1) eklenip 20°C'de 10 dakika bekletildi. Daha sonra 100 µl Folin-Ciocallean Fenol Reaktif +H₂O, 1:1) ilave edilip 4°C'de 5 dakika inkübe edildi.

Örneklerin 750 nm'deki absorpsiyon değerleri LKB Labospec. spektrofotometre ile belirlendi. Protein içerikleri bilinen standartlar yardımıyla çizilen eğriden her örneğin protein içeriği saptandı.

Bulunan onkoprotein değerlerinin sitozolün protein konsantrasyonuna bölünmesiyle doku örneklerindeki onkoprotein değerleri HNU/mg cinsinden ifade edildi.

Elde edilen neu onkoprotein değerlerinin istatistiksel hesaplamaları, aritmetik ortalama, varyans ve student t-testi aşağıdaki formüller yardımıyla yapılmıştır.

Aritmetik Ortalama Formülü(81):

$$\bar{X} = \Sigma X/n$$

Burada,

\bar{X} = Aritmetik ortalama

X = Deneyden elde edilen değer

n = Örnek sayısıdır.

Varyans (sınıflanmamış -ilkel- dizilerde) Formülü:

$$S^2 = \Sigma(X-\bar{X})^2 / n-1$$

Burada,

S^2 = Varyans

X = Deneyden elde edilen değer

\bar{X} = Aritmetik Ortalama

n = Örnek sayısıdır.

Student t-testi Formülü:

$$t = |\bar{X}_1 - \bar{X}_2| / \sqrt{(S_1^2/n_1) + (S_2^2/n_2)}$$

Burada,

\bar{X}_1 = I. örneğe ait aritmetik ortalama

\bar{X}_2 = II. örneğe ait aritmetik ortalama

S_1^2 = I. grubun varyansı

S_2^2 = II. grubun varyansı

n_1 = I. gözlem grubu sayısı

n_2 = II. gözlem grubu sayısıdır

Esas student t-testi formülüyle bulunan değer "t-tablosu"ndan serbestlik derecesi (n_1+n_2-2) formülüyle hesaplanıp, sütunundan t değeri karşılığı bulunarak "anamlı" veya "anlamsız" yorumu yapıldı.



BULGULAR

Çalışma görünüşte sağlıklı 20 kadın ile meme hastalığı olan 126 kadının serum ve doku örnekleriyle yapıldı. Görünüşte sağlıklı kadınların neu onkoprotein düzeyleri kontrol grubu olarak alındı. Bu grubun yaş ortalaması 40.2 ve yaş sınırları 26-60 arası idi. Kontrol grubunun neu onkoprotein düzeylerinin aritmetik ortalaması 1221.5 ± 256.2 HNU/ml idi. Kontrol grubunun alt ve üst sınırları ise 965.5-1477.5 HNU/ml arasında değişmektedir.

Meme hastalığı olan 126 hastanın yaş ortalaması 49.3 ve yaş sınırları 23-80 arasında değişmektedir. Hasta grubunun neu onkoprotein seviyelerinin aritmetik ortalaması 2207.2 ± 1194 HNU/ml idi. Alt ve üst sınırları ise 1013.1-3401.1 HNU/ml'dir. Bu bulgular Tablo I'de sergilenmiştir.

Tablo I

| Gruplar | Sayı | Yaş.Ort. | Aritmetik Ortalama HNU/ml |
|---------|------|----------|---------------------------|
| Normal | 20 | 40.2 | 1221.5 ± 256.2 |
| Hasta | 126 | 49.3 | 2207.1 ± 1194 |

Meme hastalığı olan hastaların histolojik tipleri 100 adet invaziv duktal Ca, 7 adet sklerozan Ca, 5'er adet adeno Ca ve tübüler Ca, 2'şer adet medüller Ca ve Paget hastalığı, 1 adet kribriform Ca

ve 2 adet fibrokistik hastalıktır. 100 adet invaziv duktal karsinomun içinde primer hastalığı invaziv duktal karsinom olan 6 adet nüks hastası da bulunmaktadır. Histolojik tiplere ait serum neu onkoprotein düzeylerinin aritmetik ortalamaları invaziv duktal Ca'da 2302.5, medüller Ca'da 2170, adeno Ca'da 3006, sklerozan Ca'da 2025, kribriiform Ca'da 3000, tübüler Ca'da 2165, Paget hastalığında 1658 ve fibrokistik hastalıkta ise 2367 HNU/ml'dir. Bu değerler Tablo II'de özetlenmiştir.

Tablo II

| Histolojik Tip (Serum) | Sayı | Aritmetik Ortalama HNU/ml |
|------------------------|------|---------------------------|
| İnvaziv Duktal Ca | 100 | 2302.5 |
| Medüller Ca | 2 | 2170 |
| Adeno Ca | 5 | 3006 |
| Sklerozan Ca | 7 | 2005 |
| Kribriiform Ca | 1 | 3000 |
| Tübüler Ca | 5 | 2165 |
| Paget Hastalığı | 2 | 1658 |
| Fibrokistik Hastalık | 2 | 2367 |

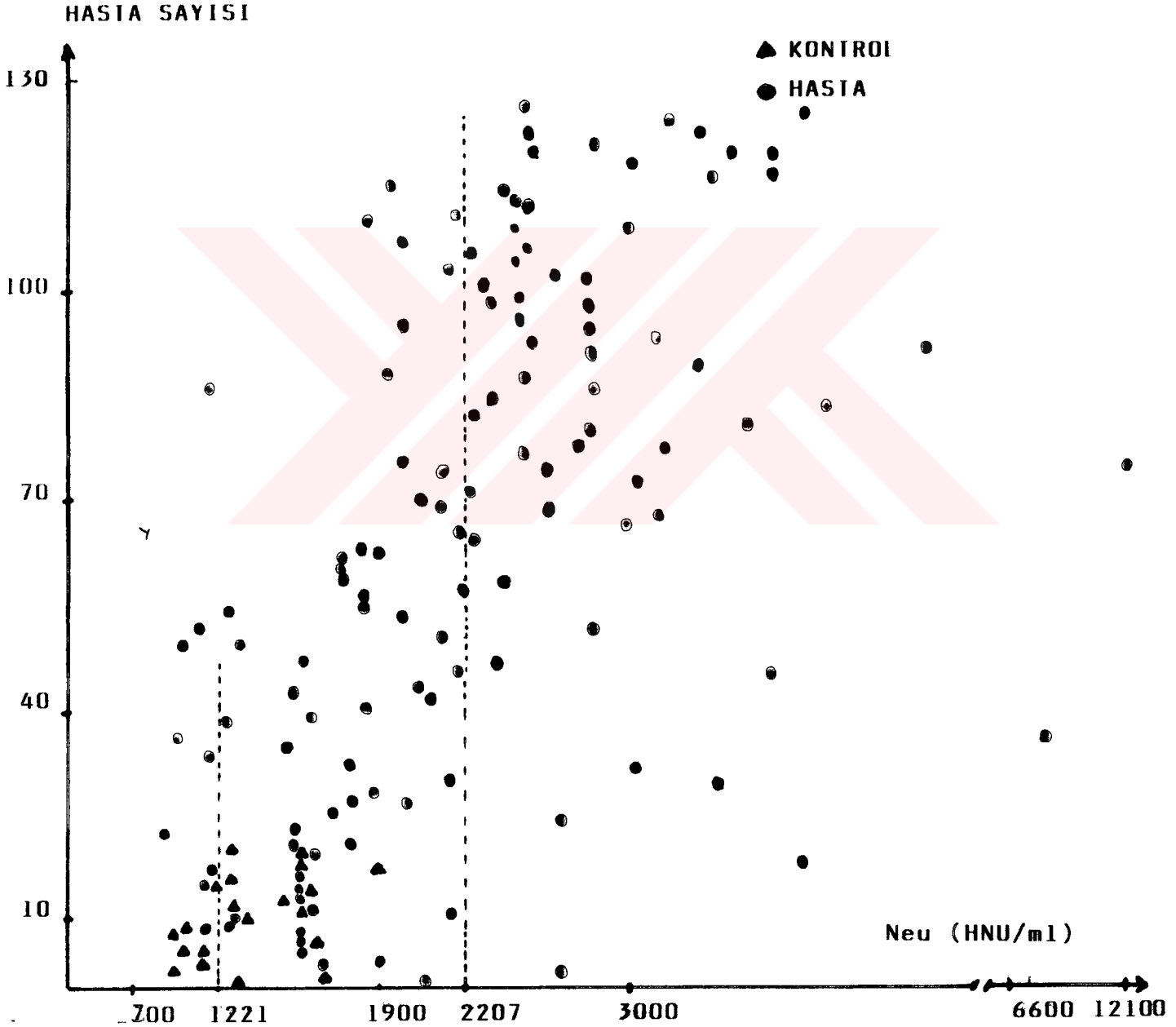
Histolojik tiplere göre bulunan aritmetik ortalamalar tüm hastaların genel aritmetik ortalamalarına çok yakındır (Tablo I ve II).

Kontrol grubu ve kanserli hastaların aritmetik ortalamalarıyla uygulanan Student t-testine göre her iki grup arasında ileri derecede anlamlılık bulunmuştur ($p < 0.001$). Tablo III'de serbestlik derecesine göre anlamlılıklar gösterilmiştir.

Tablo III

| | Serb.Derecesi | t-değeri | p |
|------------------------|---------------|----------|-------------|
| Serum Neu Onkoproteini | ∞ | 9.27 | $p < 0.001$ |
| Doku Neu Onkoproteini | ∞ | 2.35 | $p < 0.02$ |

Kontrol grubu ile meme kanserli hastaların serum neu onkoprotein düzeyleri Şekil 3'de sergilenmiştir.



Şekil 3

Kontrol ve Hasta gruplarında neu onkoprotein değerlerinin dağılımı

9 adet normal ve tümör dokusuyla yapılan 8 adet invaziv duktal karsinom ve 1 adet fibrokistik dokunun ve normal dokuların neu onkoprotein düzeylerinin aritmetik ortalamaları ise sırasıyla 1088.2 ± 901 ve 338.3 ± 212.9 HNU/mg'dır (Tablo IV).

Tablo IV

| Histolojik Tip (Doku) | Sayı | Normal Doku \bar{X} | Tümör Doku \bar{X} |
|-----------------------|------|-----------------------|----------------------|
| İnvaziv Duktal | 8 | 338.3±212.9 | 1088.2±901 |
| Fibrokistik Hastalık | 1 | 303 | 178 |

Normal doku, kontrol grubu olarak alınmış ve hasta grubunun neu onkoprotein düzeyleriyle Student t-testi kullanılarak anlamlılık bulunmuştur. Buna göre normal doku ile tümörlü doku arasında anlamlı bir ilişki mevcuttur ($p < 0.02$) (Tablo III).

Hastaların hemen tümünde serum neu onkoprotein seviyeleri yüksek düzeydedir. Aynı hastaya ait normal ve tümörlü doku örnekleri kıyaslandığında tümör dokusu örneklerinin bazı hastalarda normal dokuya kıyasla çok daha yüksek neu onkoprotein içerdikleri görülmektedir. Tablo V'de bu bulgular sergilenmiştir.

Tablo V

| Adı Soyadı | Yaş | Serum Neu (HNU/ml) | Normal Doku Neu (HNU/mg) | Tümör Doku Neu (HNU/mg) |
|------------|-----|--------------------|--------------------------|-------------------------|
| Ş.A. | 35 | 1685 | 180 | 503.6 |
| A.B. | 43 | 2185 | 351 | 310 |
| C.Y. | 65 | 2090 | 829 | 2410 |
| Z.Ş. | 42 | 2930 | 382 | 1368 |
| N.A. | 48 | 2880 | 892 | 2051 |
| Ö.A. | 29 | 2485 | 224 | 197 |
| G.M. | 31 | 2685 | 279 | 129 |
| G.Ö. | 66 | - | 303 | 178 |
| Z.K. | 57 | 1675 | 159 | 1687 |

Meme kanserli hastaların aksilla lenf tutulumları incelendiğinde 126 hastanın 89'unda lenf pozitif, 37'sinde lenf negatif olarak bulunmuştur. Kontrol grubunun serum neu onkoprotein değerinin üst sınırı olan 1477.5 HNU/ml göz önüne alındığında lenf pozitif 89 hastanın 66'sında (% 74) ve lenf negatif 37 hastanın 32'sinde (% 87) neu onkoprotein düzeyleri 1477.5 HNU/ml'den yüksek; lenf pozitif hastaların 23'ünde (% 26) ve lenf negatif hastaların 5'inde (% 13) neu onkoprotein düzeyi 1477.5 HNU/ml'den düşük bulunmuştur. İstatistiksel olarak χ^2 testi yardımıyla serum neu onkoprotein düzeyi ile lenf tutulumları arasında ilişki bulunamamıştır. Bu bulgular Tablo VI'da gösterilmiştir.

126 hastanın histolojik grad dağılımı ise 1 hastada Grad I, 84 hastada Grad II ve 41 hastada Grad III'dür. Histolojik Gradı II olan 84 hastanın 28'inde (% 33) ve Gradı III olan 41 hastanın 14'ünde (% 34) serum neu onkoprotein değerleri üst sınırı olan 1477.5 HNU/ml'den düşüktür. Histolojik Gradı II olan 56 (% 67) hastada ve histolojik Gradı III olan 27 (% 66) hastada ise serum neu onkoprotein düzeyleri 1477.5 HNU/ml'den yüksek bulunmuştur.

Tablo VI

| | Neu < 1477.5 | Neu > 1477.5 | Toplam |
|------------|--------------|--------------|--------|
| Lenf* | | | |
| + | 23 | 66 | 89 |
| - | 5 | 32 | 37 |
| His Grad** | | | |
| II | 28 | 56 | 84 |
| III | 14 | 27 | 41 |
| Toplam | 70 | 181 | 251 |

* $\chi^2 = 2.299$

s.d. = 1

0.10 < p < 0.20

** $\chi^2 = 0.012$

s.d. = 1

p = 0.911

TARTIŞMA

Bugüne dek yapılan araştırmalarda gerek hastalarda, gerekse normal kişilerde serum ve doku neu onkoprotein düzeyleri kantitatif olarak belirlenmemiş olduğu için bu çalışmada görünüşte sağlıklı kadınlar kontrol grubu olarak alınmış ve neu onkoproteininin alt-üst normal sınırları bu Şekilde tayin edilmiştir. Hasta grubunda ise patolojik tanısı konup, mastektomi olmuş ve hiç tedavi görmemiş meme hastalıklı hastaların serum ve doku neu onkoprotein düzeyleri bu belirlenen üst sınıra göre değerlendirilmiş ve bulunan yüksek değerlerin meme kanserinin tanı, tedavi ve takibinde önem taşıyıp taşımadığı araştırılmıştır.

Neu onkoproteini lenf nodülü, hormon reseptörleri, menopozal durum gibi prognostik faktörlerle birlikte prognozda önemli rol oynamaktadır(60).

Yapılan birçok immunohistokimyasal araştırmaya göre neu onkoproteininin kalitatif değeri aksilla lenf tutulumuyla ilişkilidir. Lenf tutulumu pozitif olan hastalarda neu onkoprotein amplifikasyonu % 2-15 arasında artış göstermektedir ve kötü prognoza işaret olarak kabul edilmiştir(31,34,60). Ayrıca lenf tutulumu negatif olan hastalarda da gen amplifikasyonu, lenf tutulumu pozitif olan hastalara oranla daha düşük olmakla birlikte yine de risk faktörü sayılmakta ve nüks açısından önem taşımaktadır(62).

Bu çalışmada kantitatif neu onkoprotein düzeyleri ile aksilla lenf tutulumu arasında bir ilişki bulunamamıştır. Ancak şimdiye kadar bu tip bir araştırma yapılmadığı için elimizdeki bulguların literatürle karşılaştırılabilmesi mümkün olamamaktadır.

Vakaların histolojik tipine göre neu onkoprotein düzeyleri de farklılık göstermektedir. Özellikle duktal karsinomalarda neu gen amplifikasyonu ve genin aşırı ekspresyonu ile gen ürünü olan onkoprotein miktarında artış gözlenmiştir(50). Bu çalışmada da yine duktal karsinomalarda neu onkoprotein düzeyleri kontrol grubu ortalamasından yüksek bulunmuştur. Buna karşılık Paget Hastalığında ve fibrokistik hastalıkta düzeyler literatürle uygunluk göstererek(53) düşüktür.

Diğer yandan, kantitatif serum neu onkoprotein düzeyleri ile histolojik gradlar arasında ilişki bulunamamıştır.

Meme kanserinin moleküler biyolojisi ile ilgili çalışmalara dayanılarak neu onkoproteini diğer prognostik faktörlerden bağımsız bir prognostik faktör olarak kabul edilir. Çünkü bu molekül transmembran büyüme faktörü benzeri bir glikoproteindir ve malignitede aşırı ekspresyon göstermektedir(27). Bu ekspresyonun hücresel düzeyde analizi onkogenlerin insan neoplazilerinin progresyonundaki önemli rolünü ortaya koymaktadır(56). Bu çalışmada da kantitatif neu onkoprotein artışı literatürle bağlantı göstermektedir.

Meme kanserlerinde onkogen ekspresyonunun değerlendirilmesi gerektiği düşünüşüyle tümör dokusunda pek çok immunohistokimyasal çalışmalar yapılmış ve tanıya yardımcı olan kantitatif sonuçlar ortaya konmuştur(37). Çalışmada elde ettiğimiz bulgulara dayanılarak serum ve dokuda ölçülen neu onkoprotein düzeylerinin tanı ve takip açısından yararlı ve yardımcı olacağı düşünülmektedir.

Tedavide adjuvant kemoterapi uygulanması klinisyenler için kritik bir sorundur, tedavi kararı verilirken yaş, histolojik veriler, lenf tutulumları, hormon reseptörlerinin durumu, TNM evrelemesi ve nükleer grad göz önünde tutulmaktadır. Bu prognostik faktörlere ek olarak neu onkogeninin amplifikasyonunun dolaylı yöntemlerle saptanması yerine doğrudan gen ürününün kantitatif tayini de karar vermeye yardımcı olacaktır(65).

Ayrıca neu onkogen ürünü, meme kanseri patolojisinde büyüme faktörü olarak rol oynuyorsa ligandının belirlenmesi(82) ve buna karşı spesifik antigonistler geliştirilmesi terapötik tamamlayıcı olarak önem taşıyabilir.

Çalışmanın sonuçlarına dayanılarak neu onkoprotein düzeyinin serum ve dokudaki kantitatif tayini amplifikasyonla bağlantılı olarak artmakta olduğundan tanıya yardımcı, tedaviyi seçimde yol gösterici ve takipte ise faydalı olabileceği düşüncesini vermektedir. Buna göre klinikte prognostik faktör ve tümör belirleyici olarak kullanılabileceği de düşünülmektedir.

Doku neu onkoprotein kantitatif değerleri için örnek sayısı artırılarak yeni bir çalışma yapılması aynı görüşleri kuvvetlendirecektir.

ÖZET

Sıçan nöroglıblastomalarında bulunmuş olan neu onkogeninin amplifikasyonu pekçok immunohistokimyasal araştırmalarla kantitatif olarak belirlenmiştir. Bu çalışmada neu onkogeninin ürünü olan onkoproteininin kantitatif değerleri serum ve doku örneklerinde belirlenmiş bulunan değerlerin rutin bir test olarak uygulanıp uygulanamayacağı ve prognoz açısından önemi araştırılmıştır.

Yapılan prospektif araştırmada 20 kişilik sağlıklı kontrol grubu ile 126 meme hastalıklı kadının serumları gereç olarak kullanılmıştır. Ayrıca 9 hastanın normal ve tümörlü doku örneklerinde neu onkoprotein değerleri de araştırılmıştır. ELISA yöntemiyle elde edilen bulgulara göre gruplar arasında anlamlı farklılıklar bulunmuştur (Serum için $p < 0.001$, doku için $p < 0.02$).

Kantitatif serum neu onkoprotein değerleri aksilla lenf nodüllerinin durumu ve histolojik grad ile bağlantı göstermemesine rağmen histolojik tiplere göre önem taşımaktadır. Elde edilen verilere dayanılarak neu onkoproteininin kantitatif tayininin tanıya yardımcı, tedaviyi seçimde yol gösterici ve takipte faydalı rutin bir test olarak klinikte kullanılabileceği düşünmesine varılmıştır.

KAYNAKLAR

- 1- Akiyama T., Sudo C., Ogawara A., Toyoshima K., Yamamoto T.: The Product of the Human c-erb B-2 Gene: A 185 Kilodalton Glycoprotein with Tyrosine Kinase Activity, *Science* 232, s.1644-1645 (1985).
- 2- Ali I.U., Campbell G., Lidereau R., Callahan R.: Amplification of c-erb B-2 and Aggressive Human Breast Tumors?, *Science* 240, s.1795-1796 (1988).
- 3- Ali I.U., Campbell G., Lidereau R., Callahan R.: Lack of Evidence for the Prognostic Significance of c-erb B-2 Amplification in Human Breast Carcinoma, *Oncogene Res.* 3, s.139-146 (1988).
- 4- Allread D.C., Clark G.M., Molina R., Tandon A.K., Schnitt S.J., Osborne C.K., Tormey D.C.: Immunocytochemical Evaluation of HER-2/neu Oncogene Expression in Different Evolutionary Stages of Breast Carcinoma and Correlation with Clinical - Pathological Characteristics. *Proc. Annu. Meet. Am. Soc. Clin. Oncol.* 9:A 83 (1990).
- 5- Bacus S.S., Bacus J.W., Slamon D.J., Press M.F.: HER-2/neu Oncogene Expression and DNA Ploidy Analysis in Breast Cancer, *Arch. Pathol. Lab. Med.* 114, s.164-169 (1990).

- 6- Bacus S.S., Ruby S.G., Weinberg D.S., Chin D., Ortiz R., Bacus J.W.: HER-2/neu Oncogene Expression and Proliferation in Breast Cancers, *Am. J. Path.* 137, s.103-111 (1990).
- 7- Bargmann C.I., Hung M., Weinberg R.A.: The neu Oncogene Encodes an Epidermal Growth Factor Receptor-Related Protein, *Nature* 319, s.226-230 (1986).
- 8- Barnes D.M.: Breast Cancer and a Proto-Oncogene, *B.M.J.* 229, s.1061 (1989).
- 9- Barnes D.M., Lammie G.A., Millis R.R., Gullick W.L., Allen D.S., Altman D.G.: An Immunohistochemical Evaluation of c-erb B-2 Expression in Human Breast Carcinoma, *Br. J. Cancer* 58, s.448-452 (1988).
- 10- Berger M.S., Locher G.W., Saurer S., Gullick W.J., Waterfield M.D., Groner B., Hynes N.E.: Correlation of c-erb B-2 Gene Amplification and Protein Expression in Human Breast Carcinomas with Nodal Status and Nuclear Grading, *Cancer Res.* 48, s.1238-1243 (1988).
- 11- Bishop J.M.: Cellular Oncogenes and Retroviruses, *Ann. Rev. Biochem.* 52, s.301-354 (1983).
- 12- Bishop J.M.: Cancer, "Molecular Biology of The Cell" 21. ed. B.Alberts, D.Bray, J.Lewis, M.Raff, K.Roberts, J.D.Watson, s.1187-1218, Garland Publishing Inc. U.S.A. (1989).
- 13- Buffone G.J.: Principles of Immunochemical Techniques, "Text Book of Clinical Chemistry" ed. Norbert W.Tietz, s.227-228, W.B.Saunders Comp. Philadelphia (1986).

- 14- Buick K.B., Liu E.T., Larrick J.W.: Growth Factors and Receptors, "Oncogenes" s.168-169, West Hanover, Mass. (1988).
- 15- Buick K.B., Liu E.T., Larrick J.W.: Oncogenes and Human Cancers, "Oncogenes", s.122-128, West Hanover, Mass. (1988).
- 16- Buick R.N., Tannock I.F.: Properties of Malignant Cells, "The Basic Science of Oncology" 8. ed. I.F.Tannock, R.P.Hill, s.127-139, Pergamon Press, U.S.A. (1987).
- 17- Cline M.J., Battifora H., Yokota J.: Proto-Oncogene Abnormalities in Human Breast Cancer: Correlations with Anatomic Features and Clinical Course of Disease, J. Clin. Oncol. 5, s.999-1006 (1987).
- 18- Colnaghi M.I., Miotti S., Andreola S., Da Dalt M.G., Boracchi P., Slamon D.J., Rilke F.: New Prognostic Factors in Breast Cancer (Meeting Abs.) Proc. Annu. Meet. Am. Assoc. Cancer Res. 30:A 915 (1989).
- 19- Cooper G.M.: Oncogene and Protooncogene Functions, "Oncogenes", s.163-244. Jones and Bartlet, Boston (1990).
- 20- Cory S., Adams J.M.: Transgenic Mice as Tools for Oncology, Biochimica et Biophysica Acta 1072, s.20 (1991).
- 21- Coussens L., Yang-Feng T.L., Liao Y., Chen E., Gray A., McGrath J., Seeburg P.H., Libermann T.A., Schlessinger J., Francke U., Levinson A., Ullrich A.: Tyrosine Kinase Receptor with Extensive Homology to EGF Receptor Shares Chromosomal Location with neu Oncogene, Science 230, s.1132-1139 (1985).

- 22- Dalay N.: Recombinant DNA Applications in Cancer Genetics, "Prevention of Genetic Diseases" ed. H.K.Goswani, s.23-38 Catholic Press, Ranchi (1990).
- 23- De Potter C.R., Beghin C., Makar A.P., Vandekerckhove D., Roels H.J.: The neu-Oncogene Protein as a Predictive Factor for Haematogenous Metastases in Breast Cancer Patients. Int. J. Cancer 45, s.55-58 (1990).
- 24- De Potter C.R., Quatacker J., Maertens G., Van Daele S., Pauwels C., Verhofstede C., Eechaute W., Roels H.: The Subcellular Localization of the neu Protein in Human Normal and Neoplastic Cells, Int. J. Cancer 44, s.969-974 (1989).
- 25- De Potter C.R., Van Daele S., Van de Vijver M.J., Pauwels C., Maertens G., De Boever J., Vandekerckhove D., Roels H.: The expression of the neu oncogene Product in Breast Lesions and in Normal Fetal and Adult Human Tissues, Histopath. 15, s.351-362 (1989).
- 26- Di Fiore P.P., Pierce J.H., Kraus M.H., Segatto O., King C.R., Aaronson S.A.: erb B-2 Is a Potent Oncogene When Over expressed in NIH/3T3 Cells, Science 237, s.178-182 (1987).
- 27- Dolan J., Curran B., Henry K., Lindley R., Leader M.: c-erb B-2, Protein Expression as a Prognostik Parameter in Breast Carcinoma, European Assoc. for Cancer Res. Tenth Biennial Meet. September 10-13, Galway, Ireland p.67 (1989).
- 28- Field J.K., Spandidos D.A.: The role of ras and myc Oncogenes in Human Solid Tumors and Their relevance in Diagnosis and Prognosis (Review), Anticancer Res. 10, s.1-22 (1990).

- 29- Fukushige S., Matsubaru K., Yoshida M.: Localization of a Novel v-erb B- Related Gene, c-erb B-2 on Human Chromosome-17 and its amplification in a Gastric Cell Line, *Mol. Cell. Biol* 6, s.955-958 (1986).
- 30- Garcia I., Dietrich P., Aapro M., Vauthier G., Vadas L., Engel E.: Genetic Alterations of c-myc, c-erb B-2 and c-Ha-Ras Protooncogenes and Clinical Associations in Human Breast Carcinomas, *Cancer Res.* 49, s.6675-6679 (1989).
- 31- Giovanella B.C., Vardeman D.M., Williams S.L., J., Taylor D.J., Stehlin J.S., Ullrich A., Gory H.E., Slamon D.J.: Poor Prognosis of Breast Cancer Patients Whose Tumor Took in Nude Mice Correlation with Amplification and Overexpression of the HER-2/neu Oncogene (Meet. Abs.) *Proc. Annu. Meet. Am. Assoc. Cancer Res.* 30; A235 (1989).
- 32- Guerin M., Gabillot M., Mathieu M.C., Travagli P., Riou G.: C-erb B-2 and EGF Receptor Genes Inflammatory and Non-inflammatory Breast Cancers: Association with Cancers of Poor Diagnosis, *Cancer Cells* 7, s.405-408 (1989).
- 33- Gullick W.J., Berger M.S., Bennette P.L.P., Rothbard J.B., Waterfield M.D.: Expression of The c-erb B-2 Protein in Normal and Transformed Cells, *Int. J. Cancer* 40, s.246-254 (1987).
- 34- Gullick W.J., Love S.B., Wright C., Barnes D.M., Gusterson B., Harris A.L., Altman D.G.: c-erb B-2 Protein Over expression in Breast Cancer Risk Factor in Patients with Involved and Uninvolved Lymph Nodes, *Br. J. Cancer* 63, s.434-438 (1991).

- 35- Gullick W.J., Sikora K.: Oncoprotein Stability After Tumour Resection, *Br. J. Cancer* 61, s.538-542 (1990).
- 36- Gusterson B.A., Machin L.G., Gullick W.J., Gibbs N.M., Powles T.J., Elliott C., Ashley S., Monaghan P., Harrison S.: c-erb B-2 Expression in Benign and Malignant Breast Disease, *Br.J.Cancer* 58, s.453-457 (1988).
- 37- Hainsworth P.J., Henderson M.A., Stillwell R.G., Bennet R.C.: Neu and "Group"-Ras Oncoprotein and Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Immunohistochemistry in Primary Breast Cancer (Meet. Abs.) *Br.J.Cancer* 62 (Suppl. 12), s.12 (1990).
- 38- Hudziak R.M., Schlessinger J., Ullrich A.: Increased Expression of The Putative Growth Factor Receptor p185^{HER-2} Causes Transformation and Tumorigenesis of NIH/3T3 Cells, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84, s.7159-7163 (1987).
- 39- Hunter T., Cooper J.A.: Protein-Tyrosine Kinases, *Ann. Rev. Biochem.* 54, s.897-930 (1985).
- 40- Kawasaki E.S.: The Polymerase Chain Reaction: Its Use in the Molecular Characterization and Diagnosis of Cancers, *Cancer Investigation*, s.12-13 (1991).
- 41- King C.R., Kraus M.H., Aarosan S.A.: Amplification of a Novel v-erb B-Related Gene in a Human Mammary Carcinoma, *Science* 229, s.974-976 (1985).
- 42- King C.R., Swain S.M., Porter L., Steinberg S.M., Lippman M.E., Gelmann E.P.: Heterogeneous Expression of erb B-2 Messenger RNA in Human Breast Cancer, *Cancer Res.* 49, s.4185-4190 (1989).

- 43- Kury F.D., Schneeberger C., Sliwitz G., Kubista E., Salzer H., Medl M., Leodolter S., Swoboda H., Zullinger R., Spona J.: Determination of HER-2/neu Amplification and Expression in Tumor Tissue and Cultured Cells Using a Simple Phenol Free Method for Nucleic Acid Isolation, *Oncogene* 5, s.1403-1408 (1990).
- 44- Lacroix H., Iglehart J.D., Skinner M.A., Kraus M.H.: Overexpression of erb B-2 or EGF Receptor Proteins Present in Early Stage Mammary Carcinoma is Detected Simultaneously in Matched Primary Tumors and Regional Metastases, *Oncogene* 4, s.145-151 (1989).
- 45- Libermann T.A., Nusbaum H.R., Razan N.: Amplification Enhanced Expression and Possible Rearrangement of EGF Receptor Gene in Primary Human Brain Tumors of Glial Origin, *Nature* 313, s.144-147 (1985).
- 46- Lichtenstein A., Berenson J., Gera J.F., Waldburger K., Martinez-Mazao, Berek J.S.: Resistance of Human Ovarian Cancer Cells to Tumor Necrosis Factor and Lymphokine - Activated Killer Cells: Correlation with Expression of HER-2/neu Oncogenes, *Cancer Res.* 50, s.7364-7370 (1990).
- 47- Lovekin C., Ellis I.O., Locker A., Robertson J.F.R., Bell J., Nicholson R., Gullick W.J., Elston C.W., Blamey R.W.: c-erb B-2 Oncoprotein Expression in Primary and Advanced Breast Cancer, *Br. J. Cancer* 63, s.439-443 (1991).
- 48- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J.: Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent, *J.Biol.Chem.* 193, s.265-275 (1951).

- 49- Lönn U., Lönn S., Nylén U., Winblad G., Stenkvist B.: Amplification of Oncogenes in Mammary Carcinoma Shown by Fine-Needle Biopsy, *Cancer* 67, s.1396-1400 (1991).
- 50- Mc Cann A., Dervan P.A., Johnston P.A., Gullick W.J., Carney D.N.: c-erb B-2 Oncoprotein Expression in Primary Human Tumors, *Cancer* 65, s.88-92 (1990).
- 51- Mc Kenzie S.J., Marks P.J., Lam T., Morgan J., Panicali D.L., Trimpe K.L., Carney W.P.: Generation and Characterization of Monoclonal Antibodies Specific for The Human neu Oncogene Product, p.185, *Oncogene* 4, s.543-548 (1989).
- 52- Mc Kenzie S., Marks P.J., Lam T., Tsutsumi Y., Wolfe H., Trimpe K., Carney W.: Using Monoclonal Antibodies to Detect The Human Neu. Oncoprotein, *Dupont Biotech Update* 5, s.1-4 (1990).
- 53- Meissner K., Riviere A., Haupt G., Loning T.: Study of Neu-Protein Expression in Mammary Paget's Disease with and without Underlying Breast Carcinoma and in Extramammary Paget's Disease, *Am. J. Path.* 137, s.1305-1309 (1990).
- 54- Minden M.M.: Oncogenes, "The Basic Science of Oncology" 5. ed. I.F.Tannock, R.P.Hill, s.72-88, Pergamon Press, U.S.A. (1987).
- 55- Mizukami Y., Nonnomura A. Yamada T., Kurumaya H., Hayashi M., Koyasaki N., Taniya T., Noguchi M., Nakamura S., Matsubara F.: Immunohistochemical Demonstration of Growth Factors, TGF-Alpha, TGF-Beta, IGF-1 and neu Oncogene Product in Benign and Malignant Human Breast Tissues, *Anticancer Res.* 10, s.1115-1126 (1990).

- 56- Naber S.P., Tsutsumi Y., Yin S., Zolnay S.A., Mobtaker H., Marks P.J., McKenzie S.J.: Strategies for The Analysis of Oncogene Over Expression, Studies of the Neu Oncogene in Breast Carcinoma. *Am. J. Clin. Path.* 94, s.240-241 (1990).
- 57- O'Reilly S.M., Barnes D.M., Camplejohn R.S., Bartkova J., Gregory W.M., Richards M.A.: The Relationship Between c-erb B-2 Expression S-phase Fraction and Prognosis in Breast Cancer, *Br. J. Cancer* 63, s.444-446 (1991).
- 58- Ottestad L., Neslund J.M., Heikkila R., Borresen A.L.: c-erb B-2 Protein Immunostaining in Breast Lesions, Joint NCI-IST Symposium, Third IST Int. Sym. Biology and Therapy of Breast Cancer, Sep. 25-27, 1989, Genoa, Italy:A 97 (1989).
- 59- Padhy L.C., Shih C., Cowing D., Finkelstein R., Weinberg R.: Identification of a Phosphoprotein in Specifically Induced by the Transforming DNA of Rat Neuroblastomas. *Cell* 28, s.865-871 (1982).
- 60- Paterson A.H., Lees A.W., Jamil N., Dietrich K.D., Hanson J., Fournery R.M., Slamon P.J., Paterson M.C., Danyluk J.: Comparison of HER-2/neu Oncogene Amplification with Other Prognostic Factors in Node Negative Patients with Breast Cancer, *Proc. Annu. Meet. Am. Soc. Clin. Oncol.* 8:A90 (1989).
- 61- Perren T.J.: c-erb B-2 Oncogene as a Prognostic Marker in Breast Cancer, *Cancer* 63, s.328-332 (1991).
- 62- Ro J., El-Naggar A., Ro J.Y., Blick M., Frye D., Frascini G., Fritsche H., Hortobagyi G.: c-erb B-2 Amplification in Node-Negative Human Breast Cancer, *Cancer Res.* 49, s.6941-6944 (1989).

- 63- Sabbatin R., Rossi E., Melotti G.L., Banderi E., Ferrari S., Federico M., Silingardi V.: c-erb B-2/neu Proto-oncogene in Human Breast Cancer, Proc. Annu. Meet. Am. Assoc. Cancer Res. 32, A:1722 (1991).
- 64- Schechter A.L., Hung M., Vaidyanathan L., Weinberg R.A.: The neu Gene: An erb B-Homologous Gene Distinct from and Unlinked to the Gene Encoding the EGF Receptor, Science 229, s.976-978 (1985).
- 65- Seifert G., Loning T., Riviere A., Henke P.: Expression and Localization of c-erb B-2 (neu) and C-myc Oncogenes in Human Breast and Uterus Carcinomas (Meet. Abs) J. Tumor Marker Oncol., 5, s.209 (1990).
- 66- Slamon D.J., Clark G.M., Wong S.G., Levin W.J., Ullrich A., McGuire W.L.: Human Breast Cancer: Correlation of Relapse and Survival with Amplification of the HER-2/neu Oncogene, Science 235, s.177-182 (1987).
- 67- Slamon D.J., Godolphin W., Jones L.A., Holt J.A., Wong S.G., Keith D.E., Levin W.J., Stuart S.G., Udove J., Ullrich A., Press M.F.: Studies of the HER-2/neu Proto-Oncogene in Human Breast and Ovarian Cancer, Science 244, s.707-712 (1989).
- 68- Slamon D.J., Godolphin W., Ullrich A., Press M.: Studies of the HER-2/neu Proto-Oncogene in Human Breast Cancer, Proc. Annu. Meet. Soc. Clin. Oncol. 8:A 93 (1989).
- 69- Slebos R.J., Evers S.G., Wagenaar J.P., Rodenhuis S.: Infrequent Amplification of Cellular Oncogenes in Non-Small Cell Lung Cancer, Proc. Annu. Meet. Am. Assoc. Cancer Res. 29, A 1758 (1988).

- 70- Spandidos D.A., Yiagnisis M., Papadimitriou K., Field J.K.: Ras, C-myc and c-erb B-2 Oncoproteins in Human Breast Cancer, *Anticancer Res.* 9, s.1385-1394 (1989).
- 71- Stern D.F., Kamps M.D.: EGF-Stimulated Tyrosine Phosphorylation of P¹⁸⁵neu: A Potential Model for Receptor Interactions, *The EMBO J.* 7, s.995-1001 (1988).
- 72- Suen T.C., Hung M.C.: C-myc Reverses neu. Induced Transformed Morphology by Transcriptional Repression, *Molecular and Cellular Biology* 11, s.354-362 (1991).
- 73- Tandon A.K., Clark G.M., Chamness G.G., Ullrich A., Mc Guire W.L.: HER-2/neu Oncogene Protein and Prognosis in Breast Cancer. *J. Clin. Oncol.* 7, s.1120-1128 (1989).
- 74- Thor A.D., Schwartz, L.H., Koerner F.C., Edgerton S.M., Skates S.J., Yin S., Mc Kenzie S.J., Panicali D.L., Marks P.J., Fingert H.J., Wood W.C.: Analysis of c-erb B-2 Expression in Breast Carcinomas with Clinical Follow-up, *Cancer Res.* 49, s.7147-7152 (1989).
- 75- Uchara T., Kaneko Y., Kanda N., Yamamoto T., Higashi Y., Nomoto C., Izumo T., Takayama S., Sakurai M.: c-erb B-2 and c-erb A-1 (ear-1) Gene Amplification and c-erb B-2 Protein Expression in Japanese Breast Cancers: Their Relationship to the Histology and Other Disease Parameters, *Jpn. J. Cancer Res.* 81, s.620-624 (1990).
- 76- Van de Vijver M.J., Mooi W.J., Peterse J.L., Nusse R.: Amplification and Overexpression of the Neu-Oncogene in Human Breast Carcinomas, *Eur. J. Surg. Oncol* 14, s.111-114 (1988).

- 77- Van de Vijver M.J., Nusse R.: The Molecular Biology of Breast Cancer, *Biochimica et Biophysica Acta* 1072, s.33-50 (1991).
- 78- Van de Vijver M.J., Peterse J.L., Mooi W.J., Wisman P., Lomans J., Nusse R.: Overexpression of the Neu (or c-erb B-2 or HER-2) protein is Very Frequent in Comedo-type Ductal Carcinoma in situ, but not of Prognostic Value in Stage II Breast Cancer, Cold Spring Harbor Meet. on Cancer Cells The Molecular Diagnostics of Human Cancer Sep 7-11 1988, Cold Spring Harbor N.Y. s.76 (1988).
- 79- Van de Vijver M.J., Peterse J.L., Mooi W.J., Wisman P., Lomans J., Dalesio O., Nusse R.: Neu-protein Overexpression in Breast Cancer. Association with Comedo-Type Ductal Carcinoma in situ and Limited Prognostic Value in Stage II Breast Cancer, *N. Eng. J. Med.* 319, s.1239-1245 (1988).
- 80- Varley J.M., Swallow J.E., Brammer W.J., Whittaker J.L., Walker R.A.: Alterations to Either c-erb B-2 (neu) or C-myc Proto-oncogenes in Breast Carcinomas Correlate with Poor Short-Term Prognosis, *Oncogene* 1, s.423-430 (1987).
- 81- Velicangil S.: İki Ayır Gözlem Grubundan Elde Edilen Ortalamaların Kıyaslanması, "Biyoistatistik", s.164-168, Filiz Kitabevi İstanbul (1984).
- 82- Venter D.J., Tuzi N.L., Kukar S., Gullick W.: Overexpression of The c-erb B-2 Oncoprotein in Human Breast Carcinomas: Immunohistochemical Assessment Correlates with Gene Amplification, *Lancet* 2, s.69-72 (1987).
- 83- Weinberg R.A.: The Action of Oncogenes in the Cytoplasm and Nucleus, *Science* 230, s.770-776 (1985).

- 84- Wildenhain Y., Pawson T., Blackstein M.E., Andrulis I.L.: p185 Neu is Phosphorylated on Tyrosine in Human Primary Breast Tumors which Overexpress neu/erb B-2, *Oncogene* 5, s.879-883 (1990).
- 85- Winstanley J., Cooke J., Murray G.D., Platt-Higgins A., George W.D., Holt S., Myskou M., Spedding A., Barraclough B.R., Rudland P.S.: The Long Term Prognostic Significance of c-erb B-2 in Primary Breast Cancer, *B.J. Cancer* 63, s.447-450 (1991).
- 86- Yamamoto T., Ikawa S., Akiyama T., Semba K., Namura N., Miyajima N., Saito T., Toyoshima K.: Similarity of Protein Encoded by the Human c-erb B-2 Gene to Epidermal Growth Factor Receptor, *Nature* 319, s.230-234 (1986).
- 87- Yarden Y., Weinberg R.A.: Experimental Approaches to Hypothetical Hormones: Detection of a Candidate Ligand of the neu Protooncogene, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86, s.3179-3183 (1989).
- 88- Yee L.D., Kacinski B.M., Carter D.: Oncogene Structure, Function and Expression in Breast Cancer, *Semin. Diagn. Pathol.* 6, s.110-125 (1989).
- 89- Yokota J., Yamamoto T., Toyoshima K., Terada M., Sugimura T., Battifora H., Cline M.J.: Amplification of c-erb B-2 Oncogene in Human Adenocarcinomas in vivo, *Lancet* 1, s.765-766 (1986).
- 90- Zhou D., Battifora H., Yokota J., Yamamoto T., Cline M.J.: Association of Multiple Copies of the c-erb B-2 Oncogene with Spread of Breast Cancer, *Cancer Res.* 47, s.6123-6125 (1987).