

156920



T.C.

MARMARA ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**MEME KANSERLİ HASTALARDA HER2/neu ONKOGEN
AMPLİFİKASYONUNUN VE p53 TÜMÖR SÜPRESSÖR GEN
DELESYONUNUN REAL TIME PCR İLE KANTİTATİF OLARAK
ÖLÇÜLMESİ VE PROGNOSTİK FAKTÖRLERLE
KARŞILAŞTIRILMASI**

Dr. GÖZDE ÜLFER

UZMANLIK TEZİ

BİYOKİMYA
ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. Yavuz TAGA

İSTANBUL – 2005

İÇİNDEKİLER:

Önsöz.....	i
Özet.....	ii
İngilizce Özet.....	iv
Simgeler ve Kısaltmalar Dizini.....	vi
1.Giriş ve Amaç.....	1
2.Genel Bilgiler.....	2
2.1. Meme Kanseri.....	2
2.1.1.Meme Kanserinin Histolojik Tipleri.....	2
2.1.2. Meme Kanserinde Patogenez.....	3
2.1.2.1. Meme Kanseri ve Genetik Değişimler.....	3
2.1.2.2. Meme Kanseri ve Hormonal Faktörler.....	5
2.1.3. Meme Kanserinde Prognostik Faktörler.....	7
2.1.4. Meme Kanserinde Tedavi.....	7
2.2. Meme Kanseri ve HER2/neu Onkogeninin İlişkisi.....	8
2.2.1. HER2/neu'un Yapısı ve Fonksiyonları.....	8
2.2.2. HER2/neu Gen Amplifikasyonu Ve Kanseri.....	9
2.2.3. HER2/neu'un Meme Kanserinde Prognostik Önemi.....	10
2.2.4. HER2/neu'un Meme Kanserinde Tedavideki Yeri.....	11
2.3. Meme Kanseri ve p53 Tümör Süpressör Gen İlişkisi.....	12
2.3.1. p53 Tümör Süpressör Geninin Yapısı ve Fonksiyonları	12
2.3.2. p53 ve Meme Kanseri.....	13
2.3.3. p53 Tümör Süpressör Geninin ve HER2/neu Onkogenin Birlikte Meme Kanserindeki Önemi.....	14
2.4. p53 Tümör Süpressör Geninin ve HER2/neu Onkogenin Ölçüm Yöntemleri.....	15
2.4.1. İmmunohistokimya Yöntemi.....	15
2.4.2. Kantitatif Real Time PCR.....	16
2.4.2.1. PCR Prensipleri.....	16
2.4.2.2. Kantitatif RT PCR ve LightCycler Sistemi.....	17
3.Gereç ve Yöntem.....	23
4.Bulgular.....	33
5.Tartışma ve Sonuç.....	39
6.Kaynaklar.....	42
7.Özgeçmiş.....	46

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince gösterdiği yakın ilgi, değerli katkı ve yönlendirmelerinden dolayı sevgili danışmanım, kıymetli hocam;

Prof. Dr. Yavuz Tağa'ya

Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı;

Prof. Dr. A. Süha Yalçın'a

Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri;

Prof. Dr. Kaya Emerk'e

Prof. Dr. Nesrin Kartal Özer'e

Prof. Dr. Serpil Bilsel'e

Prof. Dr. Goncagül Haklar'a

Doç. Dr. Önder Şirikçi'ye

Tezimde kullandığım meme kanserli hastalara ait dokuların sağlanmasında katkıda bulunan İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden;

Prof. Dr. Zerrin Calay'a

Tez çalışması süresince alt yapı olanaklarından yararlandığım

Hipokrat Tanı Laboratuvarlarına

Çalışmanın tüm aşamalarında desteğini esirgemeyen çalışma arkadaşım;

Gözde Güvenç'e

Uzmanlık eğitimim süresince her zaman yardım ve desteklerini gördüğüm; **aileme** sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Meme kanseri kadınlarda en sık görülen habis bir hastalıktır. Amerikada her sekiz kadından biri meme kanserine yakalanmaktadır. Bu nedenle üzerinde araştırmaların sık yapıldığı bir hastalıktır. Bu çalışmada, meme kanserinin patogenezinde ve prognozunda önemi olan HER2/neu onkogeni ve p53 tümör süpressör geni araştırıldı. Günümüzde en sık immunohistokimya teknikleriyle tespit edilebilen HER2/neu onkogen amplifikasyon varlığı ve p53 tümör süpressör gen delesyonu, yeni bir yöntem olan ve gen kopya sayısını kantitatif olarak ölçen RT-PCR tekniğı kullanılarak ölçüldü. HER2/neu onkogen amplifikasyonu ile p53 tümör süpressör gen delesyonu arasındaki ilişki araştırıldı ve histopatolojik prognostik faktörlerle karşılaştırıldı.

Retrospektif yapılan çalışmada 46 invazif meme kanseri ve 4 adet selim meme hastalığı olan toplam 50 hastayla çalışma yürütüldü. Hastaların tamamında, tümörün histolojik tipi, tümörün grade'i, tümör büyüklüğü, lenf nodu invazyonu, immunohistokimya ile değerlendirilmiş ve östrojen reseptörü (ER) ve progesteron reseptörü (PR) sonuçları bilinmekteydi. Bu bilgilere ek olarak 25 hastanın immunohistokimya ile değerlendirilmiş HER2/neu sonuçları bilinmekteydi. Tümör parafin bloklarından yapılan kesitler lam üzerine tespit edildi ve bu kesitlerden tümör dokularının DNA'ları izole edildi.

50 hastanın tümör dokularından elde edilen DNA örnekleri, RT-PCR tekniğıyle "LightCycler" cihazında HER2/neu onkogen amplifikasyonunu tespit etmek amacıyla çalışıldı. Her bir örnek için hedeflenen HER2/neu gen kopya sayısının, referans gen kopya sayısına oranı hesaplandı. Buna göre bu oran < 2 ise HER2/neu onkogen amplifikasyonu negatif olarak değerlendirildi, eğer bu oran ≥ 2 ise HER2/neu onkogen amplifikasyonu pozitif olarak değerlendirildi. Aynı hastaların DNA örnekleri, p53 tümör süpressör gen delesyonunu tespit etmek için LC cihazında RT-PCR tekniğıyle kantitatif olarak çalışıldı. Uygun PCR programında öncelikle sağlıklı kişiye ait kandan elde edilen DNA örneğı yardımıyla standart kalibrasyon eğrisi oluşturuldu. Daha sonra hastalara ait DNA örneklerinde p53 gen kopya sayısı ve referans gen olan IGF1 gen kopya sayısı elde edildi. Bu değerler LOH (heterozigotluk kaybı) formülüne konarak p53 gen delesyonu açısından hastalar değerlendirildi.

Meme kanseri olan 25 hastanın immunohistokimya ile yapılmış HER2/neu sonuçlarıyla RT PCR ile kantitatif olarak ölçülen HER2/neu sonuçları arasında anlamlı ilişki tespit edildi ($p < 0.05$). IHC ile karşılaştırılan RT -PCR yönteminin duyarlılığı %57, özgüllüğü % 83 olarak bulundu. Buna göre; RT-PCR yönteminin, duyarlılığı ve özgüllüğü nedeniyle gen seviye

ölçümlerinde güvenle kullanılabilceği ve subjektif bir yöntem olan IHC'dan daha üstün olduğu tespit edildi.

Çalışmaya katılan tüm hastalarda RT-PCR ile ölçülen HER2/neu onkogen amplifikasyonu ve p53 gen delesyonu arasında anlamlı bir ilişkiye rastlanmadı. HER2/neu onkogen amplifikasyonu ve p53 gen delesyon varlığı ile tümör büyüklüğü, histolojik grade, lenf nodu invazyonu, ER durumu, PR durumu arasında anlamlı ilişki bulunamadı ($p>0.05$). Ancak HER2/neu onkogen amplifikasyonun ve p53 gen delesyonunun birlikte bulunduğu hastalarda yüksek grade'li tümör varlığı tespit edildi.



SUMMARY

Breast cancer is the most common malignancy in women. In USA, breast cancer is seen in one out of eight women. For this reason, clinical investigations are performed most frequently on this illness. In this study HER2/neu oncogene and p53 tumor suppressor gene which have been important for the prognosis in breast cancer were investigated. Presence of HER2/neu oncogene amplification and p53 tumor suppressor gene deletion which are today routinely detected by immunohistochemistry (IHC) methods, were measured by a new method RT-PCR, assaying gene copy number quantitatively. The relationship between HER2/neu oncogen amplification and p53 tumor suppressor gene deletion were assayed and compared with histopathological prognostic factors.

The study was made retrospectively on 50 patients, 46 of them were invasive breast cancer and 4 of them were benign breast disease patients. In all of the patients histological type of the tumor, tumor grade, size of the tumor, lymph node invasion, ER and PR results evaluated by IHC were previously known. In addition, HER2/neu results of 25 patients evaluated by IHC were also known. Sections obtained from tumor paraffinized blocks were prepared on microscope slides and then DNA of the tumor tissues were isolated.

DNA samples obtained from 50 patients were studied in "LightCycler" device by RT-PCR technique by an appropriate PCR programme to detect HER2/neu onkogene amplification. The proportion of HER2/neu oncogene copy number to reference gene copy number for every sample was calculated. If this rate is < 2 HER2/neu oncogene amplification was evulated negative, and if this rate is ≥ 2 HER2/neu oncogene amplification was evulated positive.

DNA samples of the same patients were also studied to detect p53 tumor suppressor gene deletion quantitatively in a LC device by RT-PCR technique. In appropriate PCR programme standard calibration curve was drawn by DNA sample obtained from healthy blood. Then p53 gene copy number and IGF-1 gene copy number which is accepted as a reference gene, were obtained from DNA samples by RT-PCR. The values were evaluated for p53 deletion by LOH (loss of heterozygoty) formula.

HER2/neu results of 25 breast cancer patients evaluated by IHC and RT PCR technique were compared and it showed a meaningful relation between two methods ($p < 0.05$). The sensitivity of RT PCR method which were compared with IHC was found 57 %, and the specificity was found 83 %. According to this, it was concluded that RT-PCR method was superior to IHC for its sensitivity and specificity in gene level measurements and it can be used safely.

In all of the patients, the correlation of HER2/neu oncogene amplification and p53 tumor suppressor gene deletion which were both measured by RT-PCR methods was found insignificant. There was also no significant correlation between HER2/neu oncogene amplification and p53 tumor suppressor gene deletion with tumor's grade, tumor' size, lymph node invasion, ER and PR status. But presence of high grade tumor was detected in patients who have HER2/neu oncogene amplification and p53 tumor suppressor gene deletion together.



SİMGELER VE KISALTMALAR

DCIS	Duktal karsinoma in situ
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksi nükleosit trifosfat
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
ELISA	Enzim-Linked İmmunosorbent Assay
ER	Östrojen Reseptörü
FISH	Fluoresans in situ hibridizasyon
FRET	Fluoresans rezonans enerji transferi
HER	İnsan epidermal büyüme faktör reseptörü
HER1	İnsan epidermal büyüme faktör reseptörü 1
HER2 /neu	İnsan epidermal büyüme faktör reseptörü 2
HER3	İnsan epidermal büyüme faktör reseptörü 3
HER4	İnsan epidermal büyüme faktör reseptörü 4
IGF-1	İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü 1
IGF-BP3	İnsülin Benzeri Büyüme Faktörüne Bağlı Protein3
IGFR	İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü Reseptörü
IHC	İmmunohistokimya
LC	'LightCycler'
LOH	Heterozigotluk kaybı (Loss Of Heterozigoty)
MAPK	Mitojen Aktive Protein Kinaz
p21	Protein 21
p53	Protein 53
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PI3	Fosfoinozitol 3
PR	Progesteron Reseptörü
RT PCR	Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Real Time PCR)
UV	Ultraviyole
WHO	Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organisation)

1. GİRİŞ VE AMAÇ:

Meme kanseri kadınlarda en sık görülen habis hastalıktır. Meme kanserinden ölüm sıklığı kadınlarda akciğer kanserinden sonra ikinci sırada gelir (1). Amerikada her sekiz kadından biri meme kanserine yakalanmaktadır (1). Bu nedenle üzerinde araştırmaların sık yapıldığı bir hastalıktır.

HER2/neu protoonkogeni fizyolojik şartlarda normal hücre büyümesinin regülasyonunda önemli görevlere sahip olup onkogenik amplifikasyonu meme kanserli hastaların %25-30'unda bulunmaktadır. Bu onkogen amplifikasyonuna sahip meme kanserli hastalarda sık relaps, kısa yaşam süresi, mevcut tedavilere direnç, kısaca kötü prognoz varlığı tespit edilmiştir. Tedavi protokollerinin değişmesine sebep olan bu onkogen varlığında klinisyenler anti HER2 terapiyi geliştirmişlerdir (2). Günümüzde HER2/neu onkogeninin tespit edilmesi meme kanserli hastalarda giderek önem kazandığından HER2/neu onkogenin ölçüm metodları geliştirilmektedir (2). Bu nedenle bu çalışmadaki birinci amacımız RT PCR tekniğiyle meme kanserli hastalarda HER2/neu onkogen amplifikasyonunu kantitatif olarak ölçmek ve en sık kullanılan ölçüm tekniği olan IHC ile karşılaştırmaktır.

Meme kanserli olguların yaklaşık % 30-50'inde p53 gen mutasyonuna rastlanılmıştır. p53 genomların koruyucusu olarak adlandırılan bir tümör süpressör genidir. p53 proteinin normal fonksiyonu hücresel düzeyde normal hücre büyümesinin regülasyonu, gen transkripsyonu, DNA onarımı ve genomik stabiliteyi sağlamaktır. p53 mutasyonun varlığı tümör gelişimi, prognoz, tedaviye cevap açısından önem taşır. p53 tümör süpressör genindeki değişiklikler ve HER2/neu onkogenin amplifikasyonu invazif duktal meme kanserinin patogenezinde birlikte rol oynamaktadırlar. Bu nedenle araştırmacılar HER2/neu onkogen varlığı ve p53 mutasyonlarının birlikteliğini meme kanserli olgularda araştırmışlar ancak tartışmalı sonuçlar elde etmişlerdir (3,4). Bu çalışmadaki amacımız yine RT PCR yöntemiyle p53 tümör süpressör geninin kantitatif olarak gen kopya sayısını ölçerek p53 delesyonuna sahip hastalarla HER2/neu onkogen amplifikasyonu olanlar arasında ilişki olup olmadığını irdelemektir.

Gerek HER2/neu onkogen amplifikasyonun varlığı gerekse de p53 tümör süpresör gen mutasyon varlığı meme kanserinde prognostik açıdan çok önemlidir. Araştırmacılar HER2/neu onkogen amplifikasyonu ve p53 tümör süpresör gen değişiklikleri olan hastalarda kötü prognoz saptamışlardır. Ancak lenf nodu durumu, tümör çapı gibi bazı histopatolojik prognostik faktörlerle ilgili sonuçlar net değildir. Bu nedenle RT PCR yöntemiyle ölçülen HER2/neu onkogen amplifikasyonu ve p53 gen delesyonunun, hastaların histopatolojik prognostik faktörleriyle karşılaştırılması bu çalışmanın diğer bir amacını oluşturmaktadır.

2.GENEL BİLGİLER:

2.1. MEME KANSERİ:

Meme kanseri kadınlarda en sık görülen habis hastalıktır. Meme kanserinden ölüm sıklığı kadınlarda akciğer kanserinden sonra ikinci sırada gelir (1). Epidemiyolojik çalışmalar, meme kanseri insidansının son elli yıl içinde artış gösterdiğini tespit etmiştir. Batı toplumlarında meme kanseri görülme sıklığı artmaktadır. İngilterede bu oran oniki kadında bir olarak tespit edilmiştir (5). Amerikada her sekiz kadından biri meme kanserine yakalanmaktadır(1). Meme kanseri çocukluk çağı hariç her yaşta görülebilir. 35 yaşın altında daha nadir görülür.

Coğrafi konum, genetik predispozisyon, artmış yaş, erken menarş, geç menapoz, multiparite, ilk çocuğa 30 yaşın üstünde sahip olmak, obezite, eksojen östrojen alımı, oral kontraseptifler, atipik epitelyal hiperplaziyle giden fibrokistik değişiklikler, kontralateral meme veya endometriyum kanserinde meme kanseri görülme riski artmaktadır (6).

2.1.1. MEME KANSERİNİN HİSTOLOJİK TİPLERİ:

Meme kanserlerinin tümünü adenokarsinomlar oluşturur, terminal duktusun lobuler ünitesinin glandular epitelinden kaynaklanırlar. Meme kanserinin histolojik sınıflaması Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organisation,WHO) tarafından aşağıdaki gibi yapılmıştır (6).

A.Noninvazif Karsinom

- 1a.Ductal karsinoma in situ (DCIS)
- 1b.Paget hastalığıyla birlikte olan DCIS
- 2a.Lobüler karsinoma in situ (LCIS)

B.İnvazif (İnfiltratif) Karsinom

- 1a.İnvazif duktal karsinom
- 1b. Paget hastalığıyla birlikte olan invazif duktal karsinom
2. İnvazif lobuler karsinom
- 3.Medüller karsinom
4. Kolloid (Müsinöz) karsinom
- 5.Tübüler karsinom
- 6.Adenoid kistik karsinom
- 7.Apokrin karsinom
- 8.İnvazif papiller karsinom

Noninvazif Meme Karsinomu: Bazal membranı aşmamış neoplastik hücre grubunun oluşturduğu kanser tipidir. Bu nedenle uzak metastaz yapma kapasitesine sahip değildir.

Ancak duktal ve lobuler karsinoma in situdan invazif karsinom gelişebilir. Bu durum invazif kanserin öncüsüdür.

İnvazif Meme Karsinomu: Neoplastik hücrelerle stromal invazyon ve fibroblastik proliferasyon gelişir bunun sonucunda klinikteki en önemli bulgusu olan kitle oluşur. Meme kanserinin en sık görülen histolojik tipi invazif duktal karsinomdur. Tüm invazif meme karsinomları içinde görülme sıklığı %75'dir (6). İnvazif meme karsinomunun histolojik tiplerinin insidansı şöyledir;

İnvazif duktal karsinom	İnsidans(%)
Saf	52.6
Miks	22.0
Medüller karsinom	6.2
Kolloid karsinom	2.4
Paget hastalığı	2.0
Diğer saf tipler	2.0
Diğer miks tipler	1.6
İnvazif lobular karsinom	4.9
Miks lobüler ve duktal tip	6.0

2.1.2. MEME KANSERİNDE PATOGENEZ:

Meme kanserinin patogenezi günümüzde anlaşılmaya çalışılmaktadır. Epidemiyolojik, moleküler ve klinik genetik çalışmalarda artmış risk faktörleri belirlenmiştir. Bunlar içinde en önemlisi genetik faktörlerdir. Hormonal değişiklikler, coğrafya, radyasyon, fibrokistik değişiklikler, geçirilmiş meme veya endometrium kanseri, virüsler, genomik değişiklikler patogeneze etkili bulunmuştur (6).

2.1.2.1. MEME KANSERİ VE GENETİK DEĞİŞİMLER:

Meme kanseri genetik geçişli bir hastalıktır. Çok basamaklı ve karmaşık bir çok etken tümör oluşum mekanizmasında rol oynar. Genetik değişimler olarak onkogen amplifikasyonları ve tümör süpressör genlerdeki inaktivasyonlar tanımlanmıştır (7). Meme kanserindeki genetik değişimler hastalığın klinikteki seyriyle ilişkili bulunmuş ve genetik değişiklikleri tespit etmek için çeşitli standardizasyon teknikleri kullanılmaya başlanmıştır.

Meme kanserinin herediter formlarında germ hücrelerindeki bazı genlerde mutasyonlar bulunmuştur (8). Bunlar; BRCA1, BRCA2, p53, E-cadherin gibi tümör süpressör genleridir.

BRCA1 geni 17. kromozomda (17q12-21) lokalizedir. Tümör süpressör gen olarak tanımlanır. BRCA1 geni transkripsiyonda görevlidir, apoptozisde rol oynar. Genomik stabiliteyi sağlar ve DNA onarımında işlevi vardır. Bu gendeki nokta mutasyon veya delesyon meme kanserine yakalanma riskini artırır. Sporadik olgularda BRCA1 geninde somatik mutasyon nadirdir.

BRCA2 geni 13.kromozomda (13q12-13) bulunur. Tümör süpressör gendir. BRCA2 geni DNA onarımını, hücre siklusunu ve transkripsiyonu kontrol eden proteinleri kodlar. Meme epitel hücrelerinin farklılaşmasında görevlidir. Sporadik meme kanserinde BRCA2 geninde mutasyon nadirdir.

p53 tümör süpressör geni (17p12) nukleer bir protein kodlar. Bu genin görevi transkripsiyon regülasyonunu, DNA replikasyonunu ve apoptozisi düzenlemektir. Herediter meme kanseri ve sporadik olgularda mutasyonlarına rastlanabilir.

E-cadherin geni (16q22.1) bir hücre adezyon proteini kodlar. Epitel hücreleri arasındaki adezyonu düzenler. Bu gendeki mutasyon invazif lobuler karsinomla ilişkilidir.

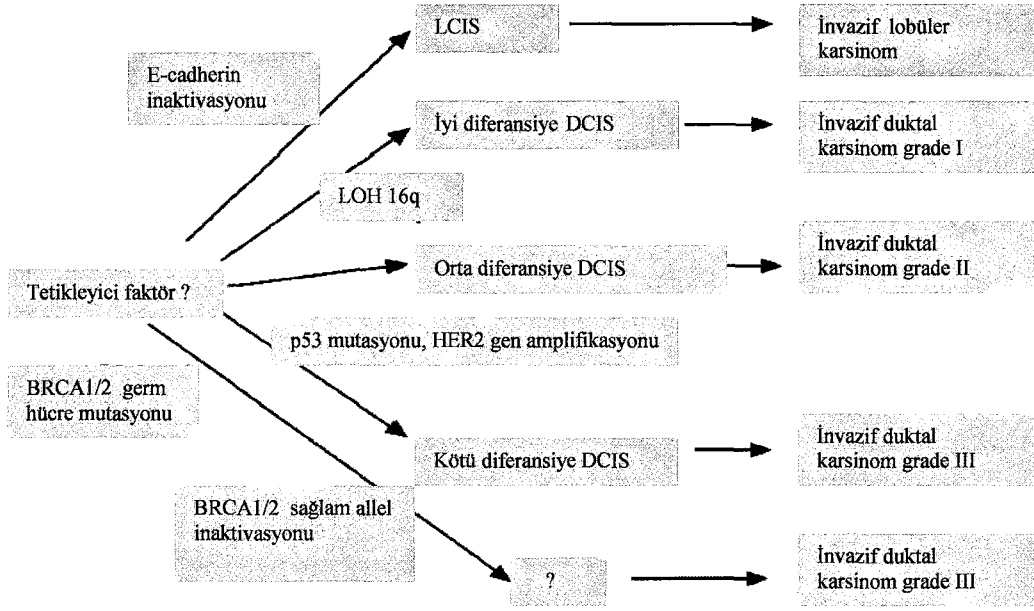
Sporadik olan meme kanserlerinde somatik genlerde mutasyonlar görülürken germ hücrelerinde mutasyon yoktur. Mutasyonlara onkogenler sebep olur. MYC, CCND1, HER2/neu gibi onkogenler sporadik olgularda rol oynarlar (8).

MYC geni bir nukleer protein kodlar hücre büyümesi ve apoptozisin düzenlenmesinde rol oynar. MYC gen amplifikasyonuna meme kanserli olgularda rastlanabilir ve östrojen reseptörü negatif olgularla birlikte bulunur. Kötü prognozu gösterir.

CCND1 geni hücre siklusunda görevlidir. CCND1'nin östrojen reseptörüne bağlandığı ve gen amplifikasyonunun östrojen reseptörü pozitif olgularla birlikteliği tespit edilmiştir. Kötü prognozu gösterir.

HER2/neu onkogeni (17q12) 185kDa'luk transmembran glikoprotein kodlar. Sitoplazmik tirozin kinaz aktivitesine sahiptir. İnsan epidermal büyüme faktör reseptör ailesine mensuptur. Mitozu artırarak onkojenik etki yapar (9).

Meme kanserinin oluşması çok basamaklı bir genetik modelle açıklanabilir. Buna göre LCIS ve lobuler karsinomun oluşmasında E-cadherin inaktivasyonu rol oynar. BRCA1 ve BRCA2 gen mutasyonları herediter meme kanserine sebep olur ve yüksek grade meme kanseriyle birlikte görülürler, sporadik olgularda etkisizdirler. p53 ve HER2/neu gen mutasyonları kötü diferansiye DCIS ve yüksek grade meme kanseriyle ilişkilidir (Şekil 1).



Şekil 1: Meme kanseri oluşumunun genetik modellerle açıklanması (7)

2.1.2.2. MEME KANSERİ VE HORMONAL FAKTÖRLER:

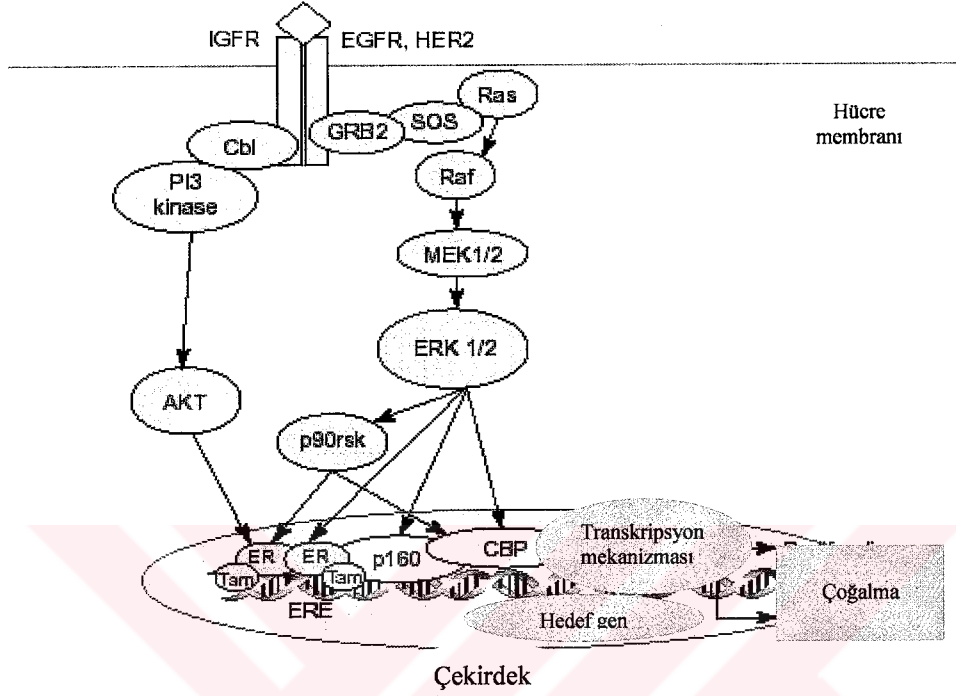
Over kaynaklı steroidler olan östrojen ve progesteron hormonları normal meme bezinin gelişiminde rol oynarlar. Kadın üreme organlarındaki etkilerini hücre içinde yer alan reseptörleriyle gerçekleştirirler (10,11). Östrojen hormonu normal meme epitel hücrelerinin çoğalmasında ve farklılaşmasında görevlidir ve etkilerini östrojen reseptörleri (ER) ile gerçekleştirir. Uzun süre östrojen etkisinde kalmak invazif meme kanseri için risk oluşturmaktadır. Bu durum östrojenin meme epiteli üzerindeki mitojenik etkilerine bağlıdır (11).

Hücre yüzeyindeki çeşitli büyüme faktörlerinin reseptörleri, intraselüler sinyal kaskadı yolu ile ER'nün α alt biriminin aktivasyonuna sebep olmaktadır. ER'nün aktivatörleri epidermal büyüme faktörü reseptörleri (EGFR), HER2/neu, insüline benzer büyüme faktör reseptörleri (IGFR) olarak tanımlanır. Bu reseptörler fosfoinozitol-3 (PI3) ve mitojen aktive protein kinazı (MAPK) aktive ederek hücre çoğalmasına neden olurlar (Şekil 2).

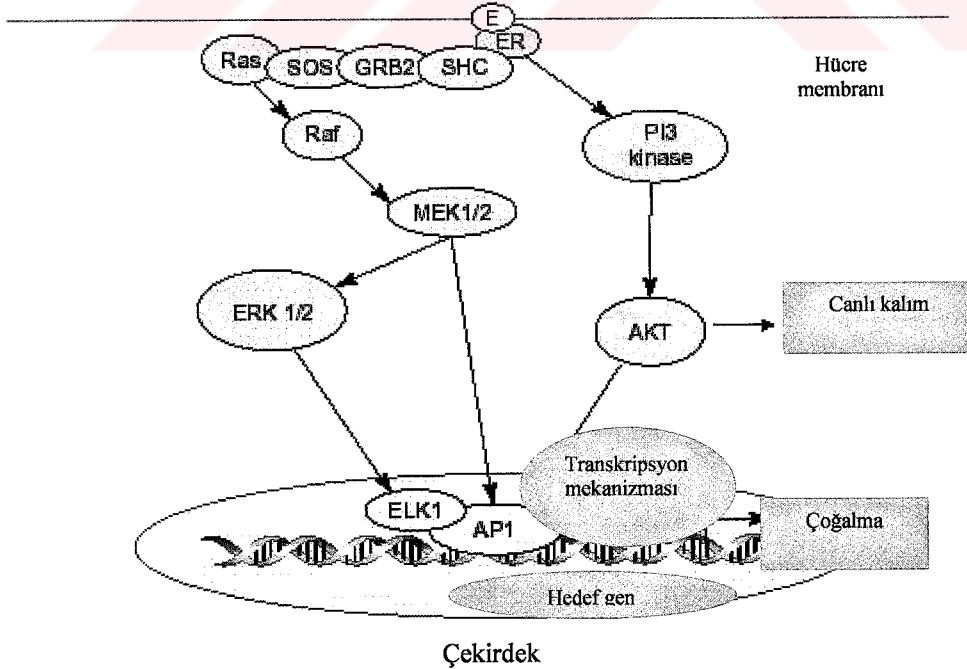
Bunun yanında ER'nün α alt birimi hücre membranında veya sitoplazmada kendisi östrojenin etkisiyle direkt olarak hücre içi sinyal kaskadını PI3 ve MAPK'ı aktive edebilir ve hücre çoğalmasını artırır (Şekil 3).

İnvazif meme kanserli hastaların %60-70'inde ER pozitifliğine rastlanmaktadır. ER pozitif bulunan hastalarda düşük relaps, uzamış yaşam süresi ve endokrin tedaviye ER negatif hastalara göre iyi cevap alınır. ER pozitif ancak tamoksifene rezistan vakalarda büyüme faktörlerinin aktivasyonları suçlanmaktadır. Progesteron reseptörleri östrojen tarafından

regüle edilir ve benzer etkilerle artmış ekspresyonu invazif meme kanserli hastaların %50-60'ında görülür. PR pozitif hastalarda iyi prognoz ve anti hormonal tedaviye iyi cevap alınmaktadır.



Şekil 2: ER reseptörlerinin büyüme faktörleriyle aktivasyonu (11)



Şekil 3: ER reseptörlerinin östrojen ile direkt aktivasyonu (11)

2.1.3. MEME KANSERİNDE PROGNOSTİK FAKTÖRLER:

Meme kanserinde prognozu bir çok faktör etkiler. Tanı konduğu zamandaki evre önemlidir. Meme kanserinde evre tümör büyüklüğü ve metastaz varlığı ile sınıflandırılır. Primer tümörün çapı 2 cm'den küçükse iyi prognozu gösterir. Lenf nodu invazyonu ve uzak bölgelerdeki lenf nodu sayısı yaşam süresi ile yakından ilişkilidir. Tümörün histolojik tipi ve grade önemli prognostik faktörlerdir. Tümörün grade'i, glandüler diferansiyasyona ve nukleer atipiye göre belirlenir. Östrojen ve progesteron reseptör pozitifliği iyi prognoz göstergeleridir. Tümörün çoğalma hızı ve DNA anaploidisi prognozda etkilidir. Onkogen amplifikasyonu ve aktiviteleri, büyüme faktörleri ve reseptörleri önemlidir. HER2/neu onkogeni kötü prognostik bir göstergedir. Tümördeki anjiogenez düzeyi metastaz gelişmesinde etkilidir (6,10).

2.1.4. MEME KANSERİNDE TEDAVİ:

Meme kanserinde en etkili tedavi erken teşhistir. Düzenli aralıklarla kişinin kendini muayene etmesi, mamogram çekilmesi ve hekim tarafından yapılan periyodik kontroller meme kanseri mortalitesini %30 oranında azaltmıştır. Klinikte en sık kitle ile fark edilirler. İnce iğne aspirasyon biyopsisi ile tanı konmaktadır (1).

Primer meme kanseri teşhisi konan hastalarda tedavi cerrahidir. Mastektomi veya meme koruyucu lumpektomi hastalığın evresine göre yapılır. Adjuvan tedavide radyoterapi, lokal nüksleri ve lenf nodu metastazlarını önlemede kullanılır. İleri evrede yakalanmış hastalara sistematik kemoterapi uygulanmaktadır. Siklofosfamid, metotreksat, florourasil gibi kemoteropatikler uygulanır.

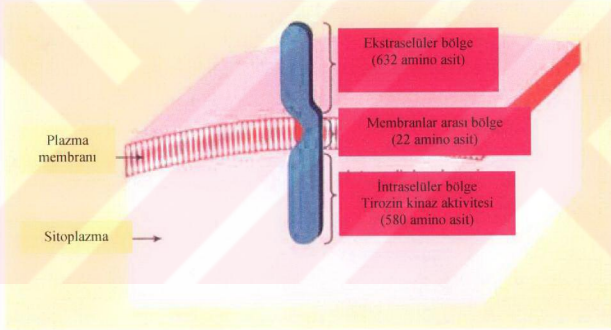
Antihormonal tedavi östrojen reseptörü pozitif hastalara uygulanır. Tedavide antiöstrojen ajan olan tamoxifen yararlıdır, ayrıca östrojen sentezini inhibe eden aromataz inhibitörleri letrozole, anastrozole kullanılmaktadır (10,11).

HER2/neu gen amplifikasyonu bulunan hastalarda tamoksifene ve kemoteropatik ajanlara karşı resistans saptanmıştır. HER2/neu ekspresse eden meme kanser hücrelerine karşı immün tedavi yöntemi geliştirilmiştir. Anti HER2 olan Herceptin tek başına veya sitotoksik kemoteropatiklerle kombine olarak kullanılmaya başlanmıştır (12). Anti HER2 tedavisi, HER2/neu pozitif tümör hücrelerinin büyümesini süprese ederken, HER2/neu negatif hücrelere karşı etkisizdir (13).

2.2. MEME KANSERİ VE HER2/neu ONKOGENİN İLİŞKİSİ:

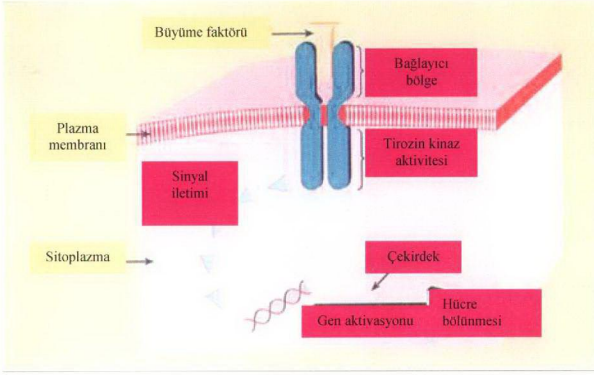
2.2.1. HER2/neu'UN YAPISI VE FONKSİYONLARI:

İnsan epidermal büyüme faktörü reseptör ailesi (HER) fizyolojik şartlarda normal hücre büyümesinin regülasyonunda önemli görevlere sahiptir. HER ailesi dört tane gen tarafından kodlanan homolog reseptörleri içerir (14). HER1, HER2/neu, HER3, HER4 olarak adlandırılırlar. HER2/neu, HER ailesi içinde merkezi role sahiptir. HER2/neu gen amplifikasyonu kanser gelişimi ile ilgilidir ve meme kanserinde önemi vardır. HER reseptörleri hücre membranında lokalize olmuşlardır ve benzer yapısal özellikler gösterirler. HER2/neu, büyüme faktörü bağlama özelliği olan bir ekstraselüler bölge, lipofilik olan membranlar arası bölge ve bir de protein kinaz aktivitesi bulunan intraselüler bölge içerir (Şekil 4). HER2/neu ve diğer üç HER ailesi transmembran tirozin kinaz reseptörleridir ve büyüme aktivasyonunu gerçekleştirirler (15). Tirozin kinaz enzimi adenosin trifosfattaki fosfor gruplarını proteinlerdeki tirozin moleküllerine aktarır.



Şekil 4: HER2/neu reseptör yapısı (14)

HER2/neu geni 17. kromozomun uzun kolunda lokalize olmuş ve 1255 amino asitten oluşmuş 185 kD'luk transmembran glikoproteini kodlar. HER2/neu aktivasyonu genellikle ligandlarına ve diğer HER reseptörlerine bağlıdır. Ekstraselüler bölgeye epidermal büyüme faktörü bağlandığında, intrinsik protein tirozin kinaz aktivasyonu sonucu sinyalizasyon gerçekleşir ve gen aktivasyonu sonucunda hücre büyümesi kontrolü ve farklılaşması gerçekleşir (Şekil 5). HER2/neu birçok hücre sistemlerinden eksprese edilir, normal hücre büyümesi ve gelişmesinde önemli rol oynar.



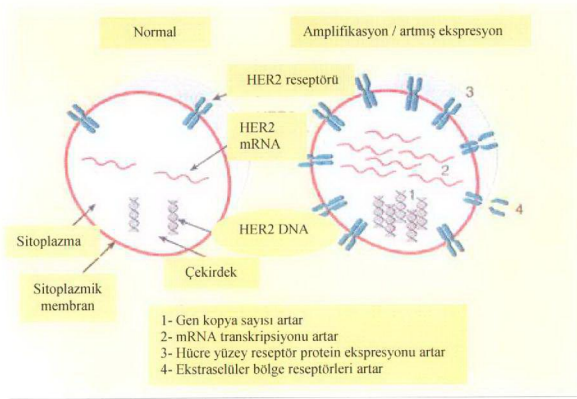
Şekil 5: HER2/neu reseptör stimülasyonu (14)

2.2.2. HER2 /neu GEN AMPLİFİKASYONU VE KANSER:

HER2/neu proto-onkogen olarak tanımlanan bir gen grubuna dahildir. Proto-onkogenler bir çok önemli proteini kodlarlar, ör: büyüme faktörleri, büyüme faktör reseptörleri sayılabilir. Bunlar normal hücre büyümesinde ve farklılaşmasında görevlidir. Eğer proto-onkogenler nokta mutasyonu, translokasyon veya gen amplifikasyonu sonucu değişime uğrarlarsa anormal ve artmış hücre büyümesi oluşturarak kanser oluşumuna sebep olurlar. Mutasyona veya değişime uğramış proto-onkogen onkogen olarak tanımlanır (16).

Kemik, kas, deri, kalp, akciğer, intestinal ve meme epiteli gibi bir çok hücrede HER2/neu düşük miktarda ekprese edilir ve HER2/neu geninden iki kopya içerirler. Onkogenik transformasyon sonucu hücrelerde gen kopya sayısı ve mRNA transkripsiyonu artar, hücre yüzeyindeki HER2/neu reseptör sayısı 10-100 kat artış gösterir. Onkogenik transformasyon sonucu büyüme faktör reseptörlerinin artması, kontrolsüz hücre büyümesine ve tümör oluşumuna neden olur. HER2/neu gen amplifikasyonu meme, over, endometriyum, mide, pankreas, prostat ve tükrük bezi kanserlerinde görülür(16,17).

Meme kanserinde, HER2/neu proto-onkogeninde translokasyona ve transmembran nokta mutasyonuna rastlanılmamıştır. Meme kanserinde, HER2/neu gen amplifikasyonu oluşmuştur. Bunun sonucunda hücrede gen kopya sayısı, mRNA transkripsiyonu, hücre yüzeyindeki protein reseptör sayısı ve ekstraselüler bölge reseptörü artar (Şekil 6). Artmış ekspresyon agresif hücre büyümesine sebep olur (18). Ayrıca tamoksifene dirençli tümörlerde HER2 /neu gen amplifikasyonu suçlanmıştır (19).



Şekil 6: HER2/neu gen amplifikasyonu (20)

2.2.3. HER2/neu'UN MEME KANSERİNDE PROGNOSTİK ÖNEMİ:

Meme kanserli hastaların %25-30'unda HER2/neu gen amplifikasyonunun varlığı saptanmış ve hastalığın gidişatı ile ilişkili bulunmuştur (21,22). HER2/neu onkogeni, meme kanserinde prognostik ve prediktif değere sahiptir (23). Meme kanserli hastalarda, HER2/neu gen amplifikasyonu lenf nodu durumu ve steroid hormon reseptör pozitifliği gibi değerli bir prognostik gösterge olarak kabul edilmektedir. HER2/neu gen amplifikasyonu agresif bir form, sık relaps, kısa yaşam süresi ve tedaviye kötü yanıtla karakterize olmuştur. Meme kanserli hastalarda HER2/neu gen amplifikasyonu yoksa ortalama yaşam süresi 6-7 yıl olarak belirlenirken, HER2/neu pozitif olgularda ortalama yaşam süresi 3 yıl olarak gösterilmiştir (21, 22, 24).

HER2/neu pozitifliği diğer prognostik faktörlerle birlikte araştırılmış ve birbirleri arasındaki ilişkiler irdelenmiştir (18).

Steroid hormon reseptörleri olan ER ve PR meme kanserinde prognoz ve adjuvan tedaviye yanıt açısından değerlidir. Yapılan çalışmalarda HER2/neu pozitifliği ve steroid hormon reseptör durumu arasında güçlü ilişki olduğu belirtilmektedir. ER ve PR reseptörü negatif olgularda HER2/neu pozitifliğinin, ER ve PR pozitif olgulara göre iki kat fazla görüldüğü bildirilmiştir (18).

Meme kanseri tanısı konulduğundaki yaş ve menopozal durum HER2/neu pozitifliği ile birlikteliği araştırılmıştır. Bir çok çalışmada HER2/neu pozitifliğine daha genç hastalarda rastlanış ve menopozal durumla ilişkili bulunmamıştır.

Birçok çalışmada tümör büyüklüğü ve HER2/neu pozitifliği arasında bir korelasyon bulunmamıştır. Ancak lenf nodu negatif ve tümör çapı 2 cm'den büyük olgularda HER2/neu pozitifliği ile korelasyon bildirilmiştir (23).

Lenf nodu pozitif meme kanser olgularında HER2/neu gen amplifikasyonu arasında korelasyon bulunmuştur. Bu hastalarda relaps ve azalmış yaşam süreleri tespit edilmiştir. Lenf nodu negatif meme kanser olgularında ise tartışmalı sonuçlar elde edilmiştir, ancak HER2/neu gen amplifikasyonu olan lenf nodu negatif hastalarda artmış metastaz riski saptanmıştır (23,25). Bu bulgular HER2/neu'nin agresif meme kanserinde biyolojik belirteç olarak nitelendirilebileceğini göstermiştir.

HER2/neu pozitifliği olan primer meme tümürlü olgularda, rekürens görülmektedir. HER2/neu pozitifliği olan vakalarda akciğer, beyin, karaciğer ve daha nadir olmakla birlikte kemik metastazları görülmektedir (25).

HER2/neu gen amplifikasyonun, meme kanserinin histolojik tiplerinde insidansı farklıdır. İnvazif duktal meme karsinomunda %22, lobuler karsinomda %7 oranında rastlanır. Kötü diferansiyel ductal karsinoma in situ olguları HER2/neu pozitifliğiyle birlikte (26).

Histolojik grade en önemli prognostik faktörlerden birisidir. Mitotik aktivite, invazyon, nukleer atipinin derecesi HER2/neu pozitifliğiyle yakından ilgilidir. Yüksek histolojik grade ile HER2/neu gen amplifikasyonu birlikte görülür (27).

Sonuç olarak HER2/neu onkogeninin pozitifliği ile steroid reseptörleri arasında ters bir oran olduğu, bunun yanında tümörün histolojik tipi, nukleer atipi, yüksek histolojik grade, tümör aneuploidisi, artmış hücre çoğalması arasında güçlü pozitif bir korelasyon olduğu bilinmektedir. Ancak lenf nodu durumu ve tümörün büyüklüğü ile HER2/neu pozitifliği arasındaki ilişki çok net değildir (28-30).

2.2.4. HER2/neu'UN MEME KANSERİNDE TEDAVİDEKİ YERİ:

HER2/neu onkogenin prognostik parametrelerle ilişkisinin yanında tedavi protokollerinin belirlenmesinde prediktif değere sahiptir. HER2/neu pozitif hastaların tamoksifen ve diğer hormonal tedavilere dirençli olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca çeşitli kemoterapatlere dirençte de etkilidir. HER2/neu pozitif hastalarda antrasiklin tedavisine iyi cevap alınırken, siklofosfamid/metotreksat/5-florourasil tedavisine kötü cevap alınır (23,31). Bu nedenle HER2/neu pozitif hastalarda denemek üzere yeni tedavi yöntemleri geliştirilmiştir. HER2/neu ekspresyon eden meme kanser hücrelerine karşı immün tedavi geliştirilmiştir. Bu tedavide HER2/neu proteinin ekstrasellüler bölgesine karşı geliştirilmiş, monoklonal antikor olan Herceptin tedavide kullanılmaktadır, anti HER2 tedavi de denmektedir (32). Anti HER2

tedavi, HER2/neu pozitif tümör hücrelerinin büyümesini engellerken, HER2/neu negatif hücrelere karşı etkisizdir (33). Herceptin tedavisi tek başına veya kemoterapiyle birlikte kullanılmaktadır. Özellikle HER2/neu pozitif metastatik meme kanserli olgularda yaşam süresini belirgin uzatmaktadır (34). Herceptin, kemoteropatik ajanların yaptığı yan etkileri yapmaz, ancak kardiyak disfonksiyon açısından hastalar takip edilmelidir.

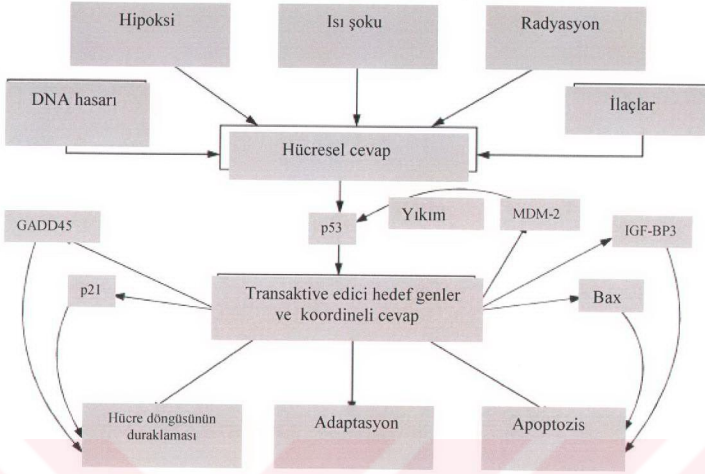
2.3. MEME KANSERİ VE p53 TÜMÖR SÜPRESSÖR GEN İLİŞKİSİ:

2.3.1. p53 TÜMÖR SÜPRESSÖR GENİNİN YAPISI VE FONKSİYONLARI:

p53 genomların koruyucusu olarak adlandırılan bir tümör süpressör genidir. p53 gen mutasyonu kanser olgularında en sık rastlanan genetik anomalidir (35).

p53 geni 20 kb uzunluğunda olup 17. kromozomun kısa koluna lokalize olmuştur. Bu gen ürünü 393 amino asit içeren 53 kDa moleküler ağırlığa sahip bir nükleer fosfoproteindir. p53 proteinin üç adet bölgesi bulunmaktadır. Amino veya N terminal bölgesi primer olarak transkripsiyonel aktiviteye sahiptir. Santral veya kor bölgesi olarak adlandırılan bölge DNA bağlamakla görevlidir. Bu bölge p53'ün normal aktivitesinde ve kanser olgularındaki p53 mutasyonu açısından kritik öneme sahiptir. Bir diğer bölge Karboksi veya C terminal bölgesi dir, nükleer lokalizasyon sinyalleri içerir.

p53 proteinin normal fonksiyonu hücrel düzeyde normal hücre büyümesinin regülasyonu, gen transkripsiyonu, DNA onarımı ve genomik stabiliteyi sağlamaktır. p53 strese bağlı bir uyarın tarafından aktive olur. Bu stres DNA hasarı, ısı şoku, iyonize radyasyon, ultraviyole radyasyon, veya kemoteropatik ajanlar olarak sayılabilir. Bu uyarınlara karşı cevap oluşturur, hücre siklusunu G1 fazında duraklatır ve DNA onarımı için olanak sağlar veya alternatif olarak apoptozise yani programlı hücre ölümüne yol açar. p53 proteini bazı transaktive edici genlerle birlikte (GAADD45, p21, bax, MDM-2, IGF-BP3) bu fonksiyonlarını yerine getirir (36). Transaktive edici genler p53'ün etkisiyle hücre büyümesini duraklatıp, gerekli hallerde apoptozisi başlatır (Şekil 7).



Şekil 7: p53 aktivasyon mekanizması (36)

2.3.2. p53 VE MEME KANSERİ :

p53 mutasyonu tüm kanser olgularının % 50'sinde bulunur (37). Kanser olgularında p53 geninde en sık nokta mutasyonlara rastlanır. Bu mutasyonların çoğu p53 proteininin DNA bağlayan bölgesinin 4 ile 10. eksonları arasında bulunur. Meme, kolon, mide, over, akciğer, beyin, ve özafagus kanserlerinde p53 mutasyonuna rastlanmaktadır. Sağlıklı p53 geni bir tümör süpressör gen olarak işlev görürken, mutant tipi dominant bir onkogen gibi davranır (37). p53 genindeki mutasyon sonucu hücre çoğalmasının kontrolü bozulur, DNA'daki hasarlar onarılamaz, genetik olarak instabil bir durum ortaya çıkar.

Meme kanserli olguların yaklaşık % 30-50'inde p53 mutasyonuna rastlanılmıştır. Meme kanserli olgularda 17. kromozomun kısa kolunda heterozigoti kaybı sonucu oluşan mutasyon tipi tanımlanmıştır. p53 mutasyonunun varlığı tümör gelişimi, prognoz, tedaviye cevap açısından önem taşır.

Ailevi meme kanseri olgusu olan Li-Fraumeni Sendromunda p53 mutasyonu tanısal değer taşır. Bu sendrom nadir görülmekle birlikte otozomal dominant geçişlidir. Li-Fraumeni Sendromunda kemik, yumuşak doku sarkoması, lösemi, adrenokortikal, beyin, meme kanserleri görülebilir. Bu sendromu taşıyan ailelerin %70'inden fazlasında p53 germ mutasyonu varlığı tespit edilmiştir. Klinik açıdan tanıda yararlıdır.

Sporadik meme kanserli olgularda p53 proteininde değişiklikler, fonksiyon kayıpları spesifik mutasyonlarına göre daha sık görülür. Sporadik meme kanserli olguların %15-35'inde spesifik p53 mutasyonu görülür (36).

Spesifik p53 mutasyonu saptanan meme kanserli olgularda tümörün antineoplastik ajanlara cevabı zayıf bulunmuştur. p53 fonksiyon kayıpları olan meme kanserli olgularda kemoteropatik ajanlara relatif direnç vardır. Meme kanser olgularındaki p53 gen değişiklikleri kötü prognostik göstergedir. Bu mutasyonun varlığı yüksek tümör proliferasyon hızı, erken rekürens, nod negatif meme kanser olgularında erken ölüm ile bağlantılı bulunmuştur. Kısaca p53 mutasyon varlığı daha agresif meme kanseri lehine bir biyolojik göstergedir. Bunun yanında tümörün proliferatif hızıyla ilgili malign potansiyel taşıyan HER2 onkogeni, bcl-2 protoonkogeni, Ki-67 antijeni ve prognostik öneme sahip östrojen ve progesteron reseptör durumları ile ilişkisi olduğu araştırılmıştır.

p53 mutasyonu veya bu proteindeki anormallikler normal meme dokusunda ve selim lezyonlarda çok nadiren görülür. Bununla birlikte yüksek grade DCIS ve komedo tiplerinde invazif duktal kansere dönüşüm hızlıdır. p53 mutasyonunun sıklığı meme kanserlerinin histolojik tiplerinde farklılık gösterir. İnvazif duktal kanserlerde diğer tiplere oranla çok daha sık rastlanır, ayrıca iyi diferansiye formlarda nadiren görülür. p53 mutasyonu ile yüksek grade tümör, anaploidi, yüksek mitotik hızı sahip meme kanserleri birlikte görülmektedir. Ayrıca p53 anormallikleri östrojen ve progesteron reseptör negatifliği ile daha sık görülür. Bu nedenle prognostik öneme sahiptir (38,39).

2.3.3. p53TÜMÖR SÜPRESSÖR GENİNİN VE HER2/neu ONKOGENİN BİRLİKTE MEME KANSERİNDEKİ ÖNEMİ:

Meme kanserinde neoplastik dönüşüm ve tümör gelişimi çok basamaklı karmaşık genetik değişikliklerle açıklanmaktadır. Onkogen aktivasyonları ve tümör süpressör genlerdeki inaktivasyonlar kanserle sonuçlanmaktadır. HER2/neu onkogen amplifikasyonu ve p53 tümör süpresör genindeki mutasyonlar invazif duktal meme kanseri oluşumunda önemli rol oynamaktadır (7). Bu iki gendeki değişiklikler tümör oluşumunun yanında prognostik açıdan da değerlidir.

HER2/neu onkogen amplifikasyonu tek başına lenf nodu pozitif meme kanserlerinde kötü prognostik göstergedir ancak lenf nodu negatif olgularda tartışmalı sonuçlar elde edilmiştir.

p53 mutasyon varlığı özellikle lenf nodu negatif meme kanser olgularında agresif tümör ve kötü prognozla ilişkilidir.

HER2/neu onkogeninin amplifikasyonu ve p53 mutasyonun bir arada incelendiği immunohistokimyasal çalışmalarda tartışmalı sonuçlar elde edilmiştir. Her iki gendeki değişikliklerin birbirinden bağımsız iki prognostik faktör olduğu ancak her ikisinde de anormallik olan durumlarda daha kötü prognoz geliştiği bildirilmiştir (3). HER2/neu onkogeninin amplifikasyonu ve p53 mutasyonun bir arada olduğu olgularda tedaviye cevapsızlık tespit edilmiştir.

Yapılan diğer çalışmalarda ise HER2/neu pozitif meme kanserli olguların çoğunda p53 değişikliklerine de rastlanmış, aralarında korelasyon tespit edilmiştir. Ancak tartışmasız olan sonuç her iki gendeki anormalliğin bir arada olduğu olgular daha kötü prognoza sahip tedaviye cevapsız olgulardır (4,40).

2.4. p53TÜMÖR SÜPRESSÖR GENİNİN VE HER2/neu ONKOGENİN ÖLÇÜM YÖNTEMLERİ:

Çeşitli laboratuvar teknikleriyle HER2/neu proteinin atmış ekspresyonu, HER2/neu onkogenin amplifikasyonu veya tümör hücrelerinden kan dolaşımına geçmiş HER2/neu proteinin miktarı ölçülebilmektedir (41). HER2/neu proteinin artmış ekspresyonu immunohistokimya (IHC) veya enzim immunoölçüm yöntemlerinden ELİSA ile gösterilebilmektedir. HER2/neu onkogenin amplifikasyonu ise Southern Blot, FISH, ve PCR teknikleri kullanılarak ölçülmektedir (42). Bu tekniklerde çeşitli hedef moleküller HER2/neu amplifikasyonunu ve artmış protein ekspresyonunu göstermekte kullanılır. Hedef moleküller tümör hücresinden elde edilmiş DNA, mRNA veya reseptör proteinlerdir (43).

p53 mutasyonun tespiti için kullanılan metodlar giderek önem kazanmaktadır. İmmunohistokimya yöntemi en sık kullanılan yöntemdir. Normal p53 proteinin yarı ömrü birkaç dakikadır bu nedenle IHC ile tespit edilememektedir. Mutant p53'ün yarı ömrü uzundur ve bu teknikte gösterilebilir. IHC kolay bir ölçüm yöntemi olmasına karşı subjektiftir. Standardize edilmesi gerekir. Bu nedenle moleküler biyoloji teknikleri gelişmektedir. PCR teknikleri ön plana geçmeye başlamıştır. RT PCR yöntemi ile p53 gen kopya sayısı kantitatif olarak ölçülebilir (44).

2.4.1. İMMUNOHİSTOKİMYA YÖNTEMİ:

İmmunohistokimya yöntemi, tümör hücrelerinden HER2/neu proteinin ekspresyonunu gösteren ve laboratuvarlarda rutinde en sık kullanılan tekniktir. İmmunohistokimya yöntemi, monoklonal ve poliklonal antikolar kullanarak dokulardaki ve hücrelerdeki spesifik proteinleri ortaya çıkarma prensibine dayanır (16). Ölçülmek istenen antijene, antikor

bağlanması kromojenik bir reaksiyon yardımıyla görülebilir. Bunun için peroksidaz gibi spesifik bir enzim kullanılır. Ölçülmek istenen proteinin hücresel lokalizasyonu ışık mikroskopisi altında incelenir. İmmunohistokimya yöntemi duyarlı, hızlı ve yorumlanması kolaydır. Bu yöntemin duyarlılığı kullanılan monoklonal antikörlara bağılı olarak değişir. HER2/neu proteinine karşı kullanılan çeşitli antikörlar farklı bağlanma afinitesi ve farklı epitop duyarlılığı gösterirler bu nedenle HER2/neu protein ekspresyon oranları değişik bulunabilir. Ayrıca HER2/neu proteinin ekspresyonunun skorlama sistemi de subjektif özellik gösterir. Bu nedenle IHC yönteminin standardizasyonu çok önemlidir (17). IHC yönteminde örnekler taze dokulardan, dondurulmuş veya parafinle muamele edilmiş tümör dokularından elde edilir. Cerrahi olarak tümörün çıkarılmasından fiksasyonuna kadar geçen süre, kullanılan fiksatif, ve tümörün fiksasyonu sonuçları etkilemektedir kısaca IHC'nın performansı iyi fiske edilmiş dokulara bağılıdır. Çünkü primer tümörün iyi fikse edilememesi antijenik determinanlarda kayıplara ve yanlış sonuçlara sebep olur (20). IHC yöntemi kolay yorumlanabilir olmasına karşı en büyük dezavantajı, subjektif olmasıdır. Bu yöntemde her zaman kontrollerle birlikte çalışılmalı, negatif, zayıf pozitif ve kuvvetli pozitif boyandığı bilinen tümör doku örneklerinden yararlanılmalıdır. Bu nedenlerden dolayı IHC standardize edilmesi HER2/neu proteininin terapatik değeri açısından önemlidir. Sonuç olarak IHC yöntemi subjektif ve semikantitatif bir yöntemdir. Örnekler zayıf pozitif (1+), orta pozitif (2+), kuvvetli pozitif (3+) olarak skorlanır (42).

2.4.2. KANTİTATİF REALTIME PCR:

Kantitatif RT PCR teknolojisi son zamanlarda duyarlılığı, doğruluğu ve pratikliği sebebiyle onkolojik araştırmalarda gen seviye ölçümlerinde kullanılmaya başlanmıştır. Gen seviyesi ölçümleri kanser gelişimi, progresyonu, tedaviye cevap veya dirençte bilgi sağlamakta diğer bir deyişle tümörlerin davranışları hakkında bilgi vermektedir (45). HER2/neu onkogenin gen amplifikasyonu ve p53 gen delesyonu kantitatif RT PCR ile ölçülebilmektedir (44,46).

2.4.2.1. PCR PRENSİBİ:

PCR; spesifik bir DNA parçasının milyonlarca kopyasının primerler tarafından yönlendirilerek enzimatik olarak sentezlenmesi şeklinde tanımlanan *in vitro* bir yöntemdir (47,48). Hücre içinde gerçekleşen doğal DNA replikasyonunu bir tüp içinde taklit eder. İlgili DNA bölgesi PCR ile çoğaltıldıktan sonra bu bölgedeki mutasyonlar direkt analiz edilebilir. Çoğaltılması istenen genin iki ucuna özgü ve baz sıralarının tamamlayıcısı olan iki oligonükleotid primer sayesinde lokalize edilen gen ya da DNA parçasının tekrar tekrar

replikasyonu yapılarak büyük miktarda eldeleri sağlanır (49). Konvansiyonel PCR yönteminde tek dallı primerler incelenen genin denatürasyonu ile tek dallı hale gelen iki DNA parçası ile komplementer olarak birleşir ve DNA sentezini ortama konan dNTP 5'→3'yönünde Taq polimeraz enzimi etkisi altında başlatılır. PCR ile 2ⁿ formülüne göre DNA segmenti çoğaltılır. 2-3 saat süren 30-40 döngüden sonra elde edilen DNA yaklaşık 1 kb. uzunluğundadır. PCR ile çoğaltılan nükleik asitlerin gösterilmesinde jel elektroforezini takiben etidyum bromit ile jeldeki bantların gözlenmesi sağlanır. Floresans boya çift iplikli DNA'nın baz çiftine bağlanır ve kırmızı ışık yayar. Işığın şiddeti, UV translüminatöründe ölçülür (50).

2.4.2.2. KANTİTATİF RT PCR VE LİHGTCYCLER SİSTEMİ:

Real Time PCR, nükleik asit amplifikasyonu ile eş zamanlı artış gösteren floresans sinyalin ölçülmesiyle kısa sürede kantitatif sonuç veren PCR yöntemidir. Floresans veren probalar kullanılarak hedef nükleik asitteki mutasyonlar saptanabilir (51,52).

RT PCR'in konvansiyonel PCR'a göre üstünlükleri vardır. RT PCR, testin özgüllük ve duyarlılığını artırır ve kısa sürede kantitatif sonuç verir. Bu teknikte elektroforeze gerek kalmadan amplifikasyon esnasında sonuç alınabilir. Kullanılan boyalar PCR amplifikasyonu için inhibitör etki yapmaz. Ayrıca etidyum bromür mutajendir oysa RT PCR'da kullanılan "cyber-green" boyası daha az mutajendir. RT PCR'da tüpler açılmadan tanıya gidildiği için kontaminasyon riski daha azdır (53).

RT PCR cihazı olan "LightCycler"(Roche Diagnostic, Almanya) sisteminin diğer PCR cihazlarına göre en büyük avantajı, ürün oluşumunun anında "real time" izlenebilmesidir (Resim1). Bunu floresansa dayanan iki metotla gerçekleştirir (54).



Resim1: "LightCycler" cihazı

A) LightCycler sisteminde fluoresansa dayanan metodlar:

- 1) DNA bağlayıcı boya SYBR Green I
- 2) Hibridizasyon Propları

1) DNA bağlayıcı boya SYBR Green I:

LightCycler (LC) sisteminin uygulamasında yalnızca çift iplikli DNA'ya bağlandıklarında fluoresans renk veren boyalar (cyber-green 1) kullanılarak amplifikasyona bağlı DNA artışı, ortaya çıkan fluoresans miktarı ile ölçülmektedir.

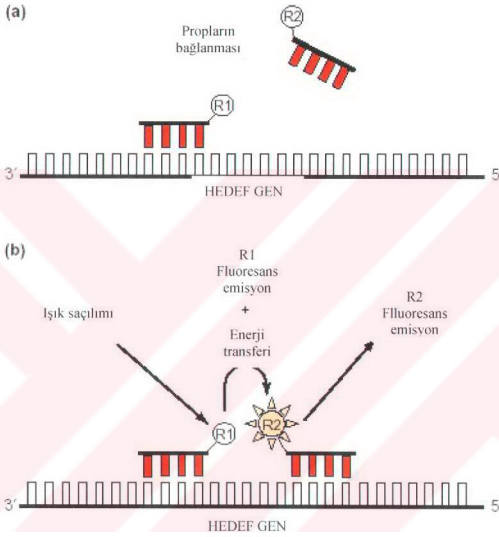
SYBR Green I boyası çift sarmal DNA'nın küçük girintisine bağlanır, uzun süre dayanıklıdır. Uyarılma ve ışık saçma dalga boyları LC'nin optik filtre setine uymaktadır. Total DNA ölçümlerinde tercihen kullanılır. Amplifikasyon öncesi reaksiyon karışımı, denatüre edilmiş DNA'yı, primerleri ve boyayı içerir.

Primerlerin bağlanmasını takiben gerçekleştirilen uzama aşamasındaki hedef DNA'nın çift sarmal hale gelmesiyle, DNA'ya bağlanan cyber-green miktarı artmakta ve buna bağlı olarak yayılan floresans miktarında artış gözlenmektedir. Bu uygulamada floresans artışı her zaman spesifik amplifikasyonu göstermeyebilir. Çünkü çift sarmal DNA'ya entegre olan cyber-green, ortamda hedef moleküller olmadığında primerlerin kendi aralarında gerçekleşecek olan bağlanmalar sonucunda da yapıya katılarak fluoresans oluşumuna sebep olabilmektedir. Bu olumsuz faktörü giderebilmek için amplifikasyon ürünlerinin "melting curve" (erime eğrisi) analizi yapılmaktadır. Her çift sarmal DNA, kendine özgü erime sıcaklığı (T_m) değerine sahiptir. PCR amplifikasyonu ardında sıcaklık yavaş yavaş yükseltılarak belirli aralıklarla tüpteki floresans miktarı kaydedilir. Çift sarmal DNA'nın zincirleri birbirinden ayrılmaya başlayınca cyber-green boyası serbest kalır ve fluoresans miktarı azalır. Denatürasyon olduğunda fluoresans sinyal aniden düşer ve erime eğrisinden yararlanılarak amplikonun T_m derecesi saptanabilir. Erime eğrisinin incelenmesiyle PCR sonucu hakkında karar verilebilir.

2) Hibridizasyon Propları :

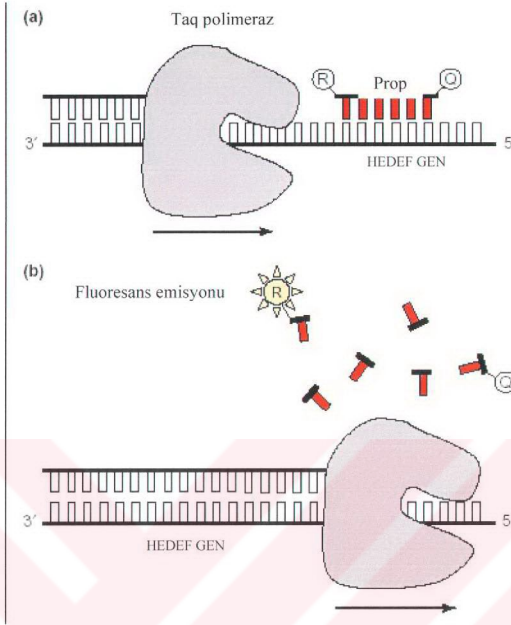
LightCycler sisteminde primerlerle birlikte hedefe özgül hibridizasyon propları kullanılır. Hibridizasyon proplarıyla DNA'nın saptanması ve kantitasyonu yapılır, ürünün tanımlanması için maksimum özgülük sağlanmış olur. İki tane özel dizayn edilmiş diziyeye özgül ve fluoresanslı boylarla işaretlenmiş oligonükleotidler kullanılır. Fluorojenik proplar uzama fazında veya bağlanma fazında kullanılabilir. Her iki yöntemde de her bir PCR amplifikasyon döngüsünde fluoresans sinyal artar. Bu yöntemlerle testin duyarlılığı ve özgülüğü artmaktadır. Bağlanma fazında proplardan biri 3' ucundan fluoresans verici boya ile işaretli (donor dye), diğeri 5' ucundan alıcı (acceptor dye) ile işaretlenmiştir. İki oligonükleotid dizisi, amplifiye olan DNA parçalarına 'head to tail' şeklinde hibridize olacak şekilde seçilmişlerdir.

Proplar hedef ampikon üzerinde birbirine yakın yere bağlanmakta ve işaretli uçlar yan yana gelmektedir. İki boyanın yan yana gelmesiyle açığa çıkan enerji ikinci prop üzerindeki alıcı boyayı etkileyerek fluoresans oluşumuna yol açar. FRET (Fluoresans rezonans enerji transferi) olarak adlandırılan bu enerji transferi sonucunda oluşan fluoresans miktarı, ortamdaki hibridizasyonun derecesine göre veya başka bir ifadeyle PCR siklusu süresince oluşan ampikonların miktarına bağlı olarak artmaktadır (Şekil 8).



Şekil 8: Bağlanma fazında hibridizasyon proplarının bağlanması ve enerji açığa çıkması (45)

Uzama fazında kullanılan hibridizasyon proplarından biri 3' ucundan fluoresans verici boya ile işaretli "donor dye", diğeri 5' ucundan fluoresans alıcı boya "acceptor dye" ile işaretlenmiştir. Bu metotta her iki boya birbirine yaklaştığı zaman alıcı sadece vericinin fluoresansını alır. Amplifikasyon olduğu zaman prop, Taq DNA polimerazın 5'-3' ekzonükleaz aktivitesi tarafından yıkıma uğratılır ve bu sırada oluşan fluoresans miktarı fluoresans detektör tarafından ölçülür (Şekil 9).



Şekil 9: Uzama fazında hibridizasyon proplarının bağlanması ve fluoresans oluşumu (45)

Her iki metod ile de, her bir PCR siklusundan sonra oluşan fluoresans sinyal artmaktadır. Bazal fluoresans yayılımının standart sapmanın on katı bir eşik değere ulaştığı PCR siklus sayısı, eşik siklus değeri olarak adlandırılır ve kantitatif ölçümlerde kullanılır. Eşik siklus değeri, hedef genetik materyelin başlangıçtaki miktarı ile ters orantılıdır. RT PCR'da kantitasyon standart eğri analiziyle yapılmaktadır. Endojen referans genler sayesinde hedeflenen genin kantitasyonu standart eğri yardımıyla yapılır. Endojen kontrol genlerine "house-keeping genler" denilmektedir. Standart eğri, X eksenine endojen genin eşik siklus değerleri, Y eksenine endojen gen kopya sayıları konularak oluşturulan lineer bir eğridir. Bu standart eğri yardımıyla hedeflenen bilinmeyen örneğin gen kopyası endojen genin standart eğrisine oranlanarak hesaplanabilir. LC sistemi bilinmeyen bir örneği standart eğri analizinden hesaplayacak otomatik relatif kantitasyon 'software'ine sahiptir. Hedeflenen gen kopya sayısı endojen gen kopya sayısına oranlanarak kantitatif değer elde edilir ve sonuç verilir. Böylece RT PCR'da hibridizasyon proplarıyla DNA kantitasyonu duyarlı ve özgül biçimde yapılır (45,55).

B) LightCycler Uygulamaları:

LightCycler uygulamalarında DNA miktar tayin ölçümü, erime eğrisi analizi ve "dual color detection" yapılır.

DNA miktar tayin ölçümü yapılmak istendiğinde SYBR Green I veya hibridizasyon propları metodlarıyla, LightCycler cihazı her amplifikasyon döngüsünün sonundaki ilerlemeleri kaydeder. Sayısal bir değere ulaşılacak istendiğinde sonuçlar daha ileri düzeydeki LC 'quantification software'ine aktarılır ve değerlendirilir. DNA miktar tayinin prensibi şöyledir; başlangıçtaki reaksiyon karışımında az miktarda kalıp molekül bulunuyorsa buna bağlı olarak daha fazla amplifikasyon döngüsü sonrası bir sinyal elde edilecektir. Eğer başlangıçtaki reaksiyon karışımındaki kalıp molekül sayısı bilinirse ve bir sinyal elde etmeye yeterli olan PCR döngü sayısı saptanırsa bu bağlantıdan yararlanılarak konsantrasyonu bilinmeyen örnekler kantifiye edilebilir (56,57).

Erime eğrisi analiziyle, LightCycler cihazında amplifikasyon aşamasından sonra oluşan PCR ürünleri yorumlanır. DNA parçalarına özel erime noktaları tayin edilerek amplifikasyon ürünleri tespit edilebilir. Erime eğrisi analiziyle, kullanılan metodlara göre(SYBR Green veya hibridizasyon propları) ürün hakkında bilgi edinilir ve mutasyon analizi yapılır (58). Primerlerin kendini eşleyen DNA'lara sahip oldukları durumda tekrarlanan PCR döngüleri sonucunda az miktarda kalıp moleküller oluşabilir SYBR Green boyası kullanıldığında primerler kendi aralarında bağlanarak dimer oluşturabilir bu nedenle spesifik ürünün çoğalması çoğalmadığını anlamak güçleşebilir. Erime eğrisi grafiğinde Y eksenini floresansı, X eksenini sıcaklığı belirtir. Eğrilerde görülen farklı eğimlerden yola çıkılarak oldukça düşük sıcaklıklarda eriyen farklı miktarda yan ürünler tespit edilebilir. LC sisteminde hibridizasyon propları yardımıyla genotipleme ve mutasyon analizleri çalışmaları yürütülebilir. Mutant allellerin erime noktaları, sağlam allellere göre daha düşüktür (59).

LC sisteminin bir başka özelliği "Dual Color Detection" özelliğinin olmasıdır. Bir örnekte aynı anda iki farklı hedef dizi saptanabilir. Kullanıcıya, tek bir reaksiyon sonucunda daha fazla sonuca ulaşabilme imkanı yaratır. Bu uygulama özellikle karmaşık genotiplemede, daha kompleks mutasyonların saptanması ve araştırılmasında yararlı olur. LC cihazı 530, 640, 710 nm dalga boylarındaki yayılan ışıkları saptayabilen üç kanallı florimetreye sahiptir. Kullanılan floresans, LC Red 640 ve LC Red 705'in yaydıkları ışınlar sırasıyla 530, 640, 710 nm'deki filtrelerden geçerler. Farklı filtreler kullanıldığı için ikili boyamalar da yapılabilir. İki mutasyon aynı anda saptandığında, her sonuç bağımsız olarak kendi içinde değerlendirilir.

C) LightCycler'ın Avantajları:

1) Real time PCR'daki esnekliği

Kantitatif PCR mutasyon tespit etme olanağı ile tek bir cihazda kombine edilebilir. Yeni hedefler için PCR rahatlıkla optimize edilebilir. Çift sarmal DNA'ya özgü SYBR Green boyası ve diziyeye özgü hibridizasyon problemleri arasında seçim yapma imkanı bulunur.

2) Hızlı PCR performansı

LC sisteminin yeni dizaynı, çok kısa zamanda sonuç alınmasını sağlar. Termal blok yerine havanın kullanılması yüksek hızda termal döngü özelliğini getirir. Kapillerin kullanımı ise yüksek hızdaki verimli ısı transferini sağlar. PCR real-time floresans ile denetlenir.

3) Gün içerisinde daha fazla sonuç alma imkanı

Tek bir PCR çalışmasından sonra kinetik analiz ve yeni değerlendirme algoritmaları ile büyük miktarda bilgi edinilebilir. Amplifikasyonu ve değerlendirmeyi dakikalar içerisinde yapan LC cihazı ile verim artar. Kolayca kullanılabilen tespit teknikleri ile hemen sonuç alınabilir.

4) LC'nin doğruluğu ve tekrarlanılabilirliği

Düzenli siklus şartları ve sinyallerin toplanması LC'nin tekrarlanılabilirlik özelliğini doğurur. PCR eşzamanlı denetlenebilir. Her bir PCR siklusunu sonuçları gerçekleştiği anda izlenebilir.

5) Sonuçların bir zaman diliminde elde edilmesi

Yüksek hızdaki termal siklus özelliği sayesinde bir siklus zamanı 30 saniyeye iner. 20-40 amplifikasyon siklusu 20-30 dakikada tamamlanır. Konvansiyonel PCR'daki jel elektroforezi ve jel boyaması gibi zaman alıcı uygulamalara gerek kalmaz.

6) Bilinen PCR metodlarının sınırlarını aşma imkanı

Özgüleştirilmiş reaktifleri ve yeni dizaynı ile PCR'ı güçlendirir. Araştırılan hedef dizisi, çoğaltılmış ürünün erime özelliğine bakılarak incelenebilir. Özgül ve özgül olmayan ürünler birbirinden ayırt edilebilir. Hedef dizinin farklı genotipleri sekanslamaya gerek kalmadan saptanabilir.

7) Her türlü laboratuvarında çalıştırılmak üzere tasarlanmış dizaynı

Kompakt ve kolayca kontrol edilebilen LC cihazı ile yerden tasarruf edilir. Çok az ses ve ısı düzeyleri oluşturduğundan herhangi bir spesifik donanıma ihtiyaç yoktur. Amplifikasyon ve değerlendirme için kapalı kapillerlerin kullanılması kontaminasyon riskini düşürür.

8) Bir çok hedefi aynı anda inceleme imkanı

Bir tek örnekte birden fazla hedef dizi tespit edilebilir. İnternal kontrol kullanımına izin verir. Komplike mutasyon çeşitleri incelenebilir. Ayrıca internal amplifikasyon standartlı deneylerin geliştirilebilmesi için temel sağlar (60).

3. GEREÇ VE YÖNTEM:

3.1. HASTALAR VE ÖRNEKLER:

Bu çalışma için Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Etik Kurulundan onay alınmıştır (MAR-YÇ-2005-0011). Retrospektif yapılan çalışmada İ.Ü.Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalına 2004 senesinde gelen 46 invazif meme kanseri ve 4 adet selim meme hastalığı olan toplam 50 hastayla çalışma yürütüldü. Hastaların tümünün tümörün histolojik tipi, tümörün grade'i, tümör büyüklüğü, lenf nodu invazyonu, IHC ile değerlendirilmiş ER ve PR sonuçları bilinmektedir. 25 hastanın bu bilgilere ek olarak IHC ile değerlendirilmiş HER2 /neu sonuçları bilinmektedir.

Tümör dokularından yapılan kesitler 10µ kalınlığında ve 50-100 mg ağırlığında olup lam üzerine parafinize edildi ve tümör dokularının DNA'ları izole edilinceye kadar buzdolabında 4°C'de muhafaza edildi.

3.2. ANALİTİK METODLAR:

3.2.1. LC RT-PCR İLE HER2/neu ONKOGENİNİN RELATİF KANTİTASYONU:

3.2.1.1. TÜMÖR DOKUSUNDAN DNA İZOLASYONU:

DNA izolasyonu, Roche Diagnostik Sistemlerine ait "High Pure PCR Template Preparation Kit" ile yapıldı.

Kit içindeki reaktifler; Tissue Lysis Buffer, Binding Buffer, Proteinaz K, Inhibitor Removal Buffer, Wash Buffer, Elution Buffer, High Pure Filter Tubes, ve Collection Tubes'dur. Kit içindeki reaktiflere ek olarak Xylen, Ethanol, İzopropil Alkol kullanıldı.

Raktiflerin hazırlanması aşamasında Proteinaz K 4,5 mL steril su ile çözüldü, Inhibitor Removal Buffer'a 20 mL ethanol eklendi, Wash Buffer'a 80 mL ethanol eklendi.

Öncelikle parafinli tümör dokularından izolasyon yapabilmek için dokular deparafinize edildi. Bunun için Xylen ve %100, %80, %60, %40'lık ethanol ve distile su kullanıldı. Sırasıyla içinde her bir solüsyondan 80 mL hazırlanmış Xylen, %100 ethanol, %80 ethanol, %60 ethanol,%40 ethanol, ve distile su olan şaleler hazırlandı. Lam üzerinde hazırlanmış tümör dokuları önce 30 dk Xylen'de bekletildi ve deparafinize edildi. Daha sonra her bir şalede 10 sn tutulacak şekilde sırasıyla %100, %80, %60, %40'lık ethanol ve distile su içeren şalelerden geçirildi. Rehidrate edilen tümör dokuları lam üstünden steril bistüriyle kazınarak 1,5 mL'lik ependorfa aktarıldı. Ependorfa aktarılan tümör dokusunun üzerine 200 µL Tissue Lysis Buffer, 40 µL Proteinaz K konularak tüp ters yüz edilerek karıştırıldı ve 37 °C'de bir gece inkübe edildi. İnkubasyon sona erdikten sonra ependorfa 20 µL Proteinaz K eklendi ve 55 °C'de 1-2 saat daha doku partikülleri kalmaması için inkübe edildi. Daha sonra

ependorfdaki karışıma 200 µL Binding Buffer eklendi ve 10 dakika 72 °C'de inkübe edildi. Bu işlemde sonra karışıma 100 µL izopropil alkol konularak tüp ters yüz edilerek karıştırıldı. Ependorf içindeki karışımın tamamı 1 mL'lik pipet yardımıyla High Pure Filter Tüp'e aktarıldı ve tüpün altına toplama tüpü konularak 8000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi. Altta toplama tüpü atılarak yenilendi. High Pure Filter Tüp içine 500 µL Inhibitor Removal Buffer eklenerek 8000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi. Altta toplama tüpü bir kez daha yenilendi. Daha sonraki aşamada High Pure Filter Tüp içine 500 µL Wash Buffer konularak 8000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi. Altta toplama tüpü atılarak yenilendi. Bir kez daha High Pure Filter Tüp içine 500 µL Wash Buffer konularak 8000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi. Toplama tüpü yenilendikten sonra residual Wash Buffer kalmaması için 14000 rpm'de 10 saniye santrifüj edildi. Bu kez High Pure Filter Tüp altına 1,5 mL'lik ependorf konuldu ve tüpe 70 °C'de 10 dakika tutulan 200 µL Elution Buffer eklendi ve 8000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi. Ependorf içinde saf DNA elde edildi. Elde edilen DNA'lar -15,- 25°C' de saklanarak uygun zamandaki çalışmaya kadar bekletildi.

3.2.1.2. LC RT-PCR İLE HER2 ONKOGENİNİN RELATİF KANTİTASYONU:

Tümör dokularından elde edilen DNA'lardan HER2 onkogenin kantitatif olarak ölçümü Roche Diagnostic Sistemlerinin Real-Time PCR cihazı olan LightCycler ile yapıldı. HER2 onkogenin kantitatif ölçümü için LightCycler HER2/neu DNA Quantification Kit kullanıldı.

Kit reaktifleri; HER2/neu detection mix (HER2/neu genine spesifik primer ve hibridizasyon prop mix), HER2/neu reference gen (referans gene spesifik primer ve hibridizasyon prop mix), HER2/neu enzyme solution ve HER2/neu reaction mix (Taq DNA polimeraz, reaksiyon buffer, dNTP), HER2/neu calibrator DNA (PCR döngüsü için kalibratör ve pozitif kontrol), PCR grade su'dur.

Reaktiflerin hazırlanmasında HER2/neu reaksiyon karışımından 60 µL pipetlenerek HER2/neu enzyme solüsyonuna eklendi ve karıştırıldı. Bu karışım HER2/neu Enzyme Master Mix olarak adlandırıldı.

LC RT-PCR Reaksiyon Karışımının Hazırlanması:

20 µL'lik bir reaksiyon karışımı hazırlanarak LC' ait kapiller tüplere konuldu. Bu karışım 9 µL PCR grade su, 2 µL HER2/neu detection mix, 2 µL HER2/neu reference gene detection mix, 2 µL HER2/neu enzyme master mix'den hazırlandı. 15 µL olan bu PCR karışımına 5 µL DNA veya pozitif veya negatif kontrol eklenerek 20 µL'lik reaksiyon karışımı oluşturuldu. Oluşturulan PCR karışımı 3000 rpm'de 5 sn santrifüj edildikten sonra LC cihazındaki uygun PCR programına yerleştirildi.

LC RT-PCR Programı:

LC RT-PCR programı üç aşamada gerçekleşti (Tablo 1). Birinci aşama preinkübasyon ve DNA'nın denatürasyonu, ikinci aşama hedef veya referans genin amplifikasyonu ve üçüncü aşama rotor ve termal çemberin soğutulmasıdır.

Tablo 1: Real Time PCR Programı

Program 1:

PREİNKÜBASYON

Siklus Programı	Değer
Siklus	1
Analiz modu	None
Sıcaklık (°C)	95
İnkübasyon süresi (dk)	10
Sıcaklık geçiş oranı (°C/s)	20
“Acquisition mode”	None

Program 2:

AMPLİFİKASYON

Siklus Programı	Değer		
Siklus	45		
Analiz modu	Quantification		
Sıcaklık (°C)	Segment 1	Segment 2	Segment 3
	95	58	72
İnkübasyon süresi (sn)	10	10	10
Sıcaklık geçiş oranı (°C/s)	20	20	20
“Acquisition mode”	None	Single	None

Program 3:

SOĞUTMA

Siklus Programı	Değer
Siklus	1
Analiz modu	None
Sıcaklık (°C)	40
İnkübasyon süresi (sn)	30
Sıcaklık geçiş oranı (°C/s)	20
“Acquisition mode”	None

LC RT-PCR "Quantification Software" İle Sonuçların Değerlendirilmesi:

LC PCR programında çalışılan örnekler için sonuçlar "Quantification Software" ile aktarıldı. Her bir örnek için hedeflenen HER2/neu gen kopya sayısının, referans gen kopya sayısına oranı hesaplandı. Buna göre bu oran < 2 ise HER2/neu onkogen amplifikasyonu negatif olarak değerlendirildi, eğer bu oran ≥ 2 ise HER2/neu onkogen amplifikasyonu pozitif olarak değerlendirildi.

3.2.2. p53 TÜMÖR SÜPRESÖR GENİNDEKİ DELESYONUN, GEN KOPYA SAYISININ RT PCR İLE KANTİTATİF ÖLÇÜLMESİ SONUCU TESPİTİ VE LOH(LOSS OF HETEROZYGOTY) ANALİZİ:

3.2.2.1. STANDART KALİBRASYON EĞRİSİNİN OLUŞTURULMASI:

Standart eğrinin oluşturulması için kanser olmadığı bilinen sağlıklı kişiden EDTA'lı hemogram tüpüne kan alınarak, DNA'sı, Roche Diagnostik Sistemlerine ait High Pure PCR Template Preparation Kit ile izole edildi.

Kandan DNA İzolasyonu:

200 μ L tam kan, hemogram tüpünden steril bir ependorfa aktarıldı. Üzerine 200 μ L Binding Buffer ve 40 μ L Proteinaz K eklenerek 10 dakika 72°C'de inkübe edildi. Bu işlemden sonra karışıma 100 μ L izopropil alkol konularak tüp ters yüz edilerek karıştırıldı. Ependorf içindeki karışımın tamamı 1 mL'lik pipet yardımıyla High Pure Filter Tüp'e aktarıldı ve tüpün altına toplama tüpü konularak 8000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi. Alttaki toplama tüpü atılarak yenilendi. High Pure Filter Tüp içine 500 μ L Inhibitor Removal Buffer eklenerek 8000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi. Alttaki toplama tüpü bir kez daha yenilendi. Daha sonraki aşamada High Pure Filter Tüp içine 500 μ L Wash Buffer konularak 8000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi. Alttaki toplama tüpü atılarak yenilendi. Bir kez daha High Pure Filter Tüp içine 500 μ L Wash Buffer konularak 8000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi. Toplama tüpü yenilendikten sonra residual Wash Buffer kalmaması için 14000 rpm'de 10 saniye santrifüj edildi. Bu kez High Pure Filter Tüp altına 1,5 mL'lik ependorf konuldu ve tüpe 70°C'de 10 dakika tutulan 200 μ L Elution Buffer eklendi ve 8000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi. Ependorf içinde saf DNA elde edildi.

DNA Konsantrasyonunun Spektrofotometre İle Ölçülmesi:

Elde edilen sağlıklı kişinin DNA'sının absorbans değeri 260 nm'de spektrofotometrede ölçüldü. 260 nm'deki absorbans değerinin 1 olması, yaklaşık 50 µg/mL DNA konsantrasyonuna eşit olduğundan standart DNA örneğinin konsantrasyonu hesaplandı (44). 12 ng DNA konsantrasyonunun 4000 gen kopya sayısına eş olduğu bilgisinden yola çıkılarak; 8000, 4000, 2000, 1000, 500, 250 gen kopya sayısı içeren standart DNA örnekleri 10 mM'lık Tris-HCl pH 8.5 ile dilüsyon yapılarak hazırlandı (44). 6 adet standart DNA örneği LC Real Time PCR cihazında standart eğri oluşturulmak üzere uygun PCR programında çalıştırıldı.

LC RT-PCR İle Standart Eğrinin Oluşturulması:

6 adet gen kopya sayısı bilinen standart DNA örneği LC RT PCR cihazında çalışıldı. Bunun için LightCycler FastStart DNA Master Hybridization Probes kit, p53 ve IGF-1 primerleri kullanıldı. IGF-1 referans gen olarak kullanıldı.

LC RT-PCR Reaksiyon Karışımının Hazırlanması:

Her bir standart örnek için p53 primerleri ve IGF-1 primerleri ile iki adet reaksiyon karışımı hazırlandı.

p53 primerleri ile hazırlanan reaksiyon karışımı:

20 µL'lik bir reaksiyon karışımı hazırlanarak LC'a ait kapiller tüplere konuldu. 9.6 µL PCR grade su, 2.4 µL MgCl₂ (25 mM), 2 µL Hybridization Probes kit, 1 µL p53 reverse primer (5µM), 1 µL p53 forward primer (5µM), 1 µL p53 hybridization probes primer- F(1µM), 1 µL p53 hybridization probes primer- LC red640 (1µM)'den oluşan toplam 18 µL karışım hazırlandı, 2 µL DNA eklendi. 20 µL'lik toplam reaksiyon karışımı 3000 rpm'de 5 sn santrifüj edildikten sonra LC cihazındaki uygun PCR programına yerleştirildi.

IGF-1 primerleri ile hazırlanan reaksiyon karışımı:

20 µL'lik bir reaksiyon karışımı hazırlanarak LC'a ait kapiller tüplere konuldu. 9.6 µL PCR grade su, 2.4 µL MgCl₂ (25 mM), 2 µL Hybridization Probes kit, 1 µL IGF-1 reverse primer (5µM), 1 µL IGF-1 forward primer (5µM), 1 µL IGF-1 hybridization probes primer- F(1µM), 1 µL IGF-1 hybridization probes primer- LC red640 (1µM)'den oluşan toplam 18 µL karışım hazırlandı, 2 µL DNA eklendi. 20 µL'lik toplam reaksiyon karışımı 3000 rpm'de 5 sn santrifüj edildikten sonra LC cihazındaki uygun PCR programına yerleştirildi.

LC RT-PCR Programı:

LC RT-PCR programı üç aşamada gerçekleşti (Tablo 2). Birinci aşama preinkübasyon ve DNA'nın denatürasyonu, ikinci aşama hedef veya referans genin amplifikasyonu ve üçüncü aşama rotor ve termal çemberin soğutulmasıdır.

Tablo 2: Real Time PCR Programı

Program 1:

PREİNKÜBASYON

Siklus Programı	Değer
Siklus	1
Analiz modu	None
Sıcaklık (°C)	95
İnkübasyon süresi (dk)	10
Sıcaklık geçiş oranı (°C/s)	20
“Acquisition mode”	None

Program 2:

AMPLİFİKASYON

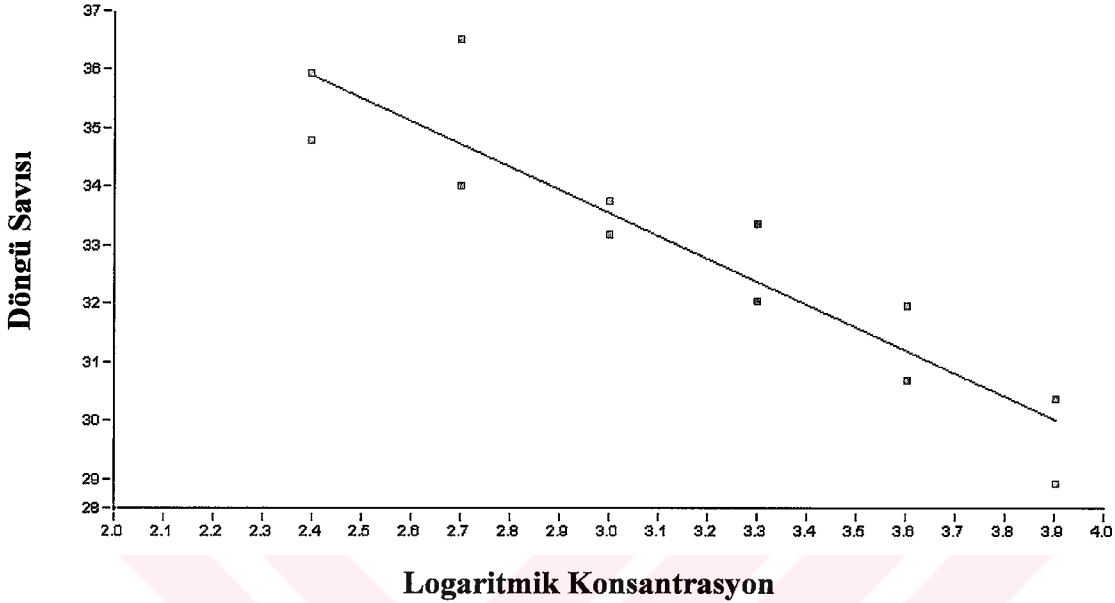
Siklus Programı	Değer		
Siklus	45		
Analiz modu	Quantification		
Sıcaklık (°C)	Segment 1	Segment 2	Segment 3
	95	55	72
İnkübasyon süresi (sn)	10	10	5
Sıcaklık geçiş oranı (°C/s)	20	20	20
“Acquisition mode”	None	Single	None

Program 3:

SOĞUTMA

Siklus Programı	Değer
Siklus	1
Analiz modu	None
Sıcaklık (°C)	40
İnkübasyon süresi (sn)	30
Sıcaklık geçiş oranı (°C/s)	20

Standart kalibrasyon eğrisi PCR programı sonucunda oluşturuldu (Şekil 10). Bu eğriye ait veriler LC hafızasına alınarak, tümör dokularından elde edilen DNA örnekleri çalışılırken gen kopya sayısının hesaplanabilmesi için kullanıldı.



Şekil 10: p53 tümör supresör gen delesyon tespiti için oluşturulan standart eğri (44)

3.2.2.2. RT-PCR İLE p53 GEN DELESYONUNUN TESPİTİ VE LOH ANALİZİ:

Tümör Dokularından Elde Edilen DNA Miktarının Spektrofotometre İle Ölçülmesi:

Tümör dokularından elde edilen DNA'lardan p53 gen delesyonunun tespit edilebilmesi için tüm DNA örneklerinin konsantrasyonları 3 ng/μL olacak şekilde hazırlandı. Bunun için tüm örneklerin 260 nm'de spektrofotometrede absorbans değerleri ölçüldü. 260 nm'deki absorbans değerinin 1 olması, yaklaşık 50 μg/mL DNA konsantrasyonuna eşit olduğundan her bir DNA örneğinin konsantrasyonu hesaplandı. 10 mM'lık Tris-HCl pH 8.5 ile dilüsyon yapılarak 3 ng/μL'e getirildi. Tüm doku örneklerin yanında, sağlıklı bir kişinin kanından elde edilen 3 ng/μL konsantrasyonundaki DNA örneği PCR programında çalışıldı.

LC RT-PCR Reaksiyon Karışımının Hazırlanması:

Her bir örnek için p53 primerleri ve IGF-1 primerleri ile iki adet reaksiyon karışımı hazırlandı.

p53 primerleri ile hazırlanan reaksiyon karışımı:

20 µL'lik bir reaksiyon karışımı hazırlanarak LC'a ait kapiller tüplere konuldu. 9.6 µL PCR grade su, 2.4 µL MgCl₂ (25 mM), 2 µL Hybridization Probes kit, 1 µL p53 reverse primer (5µM), 1 µL p53 forward primer (5µM), 1 µL p53 hybridization probes primer- F(1µM), 1 µL p53 hybridization probes primer- LC red640 (1µM)'den oluşan toplam 18 µL karışım hazırlandı, 2 µL DNA eklendi. 20 µL'lik toplam reaksiyon karışımı 3000 rpm'de 5 sn santrifüj edildikten sonra LC cihazındaki uygun PCR programına yerleştirildi.

IGF-1 primerleri ile hazırlanan reaksiyon karışımı:

20 µL'lik bir reaksiyon karışımı hazırlanarak LC'a ait kapiller tüplere konuldu. 9.6 µL PCR grade su, 2.4 µL MgCl₂ (25 mM), 2 µL Hybridization Probes kit, 1 µL IGF-1 reverse primer (5µM), 1 µL IGF-1 forward primer (5µM), 1 µL IGF-1 hybridization probes primer- F(1µM), 1 µL IGF-1 hybridization probes primer- LC red640 (1µM)'den oluşan toplam 18 µL karışım hazırlandı, 2 µL DNA eklendi. 20 µL'lik toplam reaksiyon karışımı 3000 rpm'de 5 sn santrifüj edildikten sonra LC cihazındaki uygun PCR programına yerleştirildi.

LC RT-PCR Programı:

LC RT-PCR programı üç aşamada gerçekleşti (Tablo 3). Birinci aşama preinkübasyon ve DNA'nın denatürasyonu, ikinci aşama hedef veya referans genin amplifikasyonu ve üçüncü aşama rotor ve termal çemberin soğutulmasıdır.

Tablo 3: Real Time PCR Programı

Program 1:

PREİNKÜBASYON

Siklus Programı	Değer
Siklus	1
Analiz modu	None
Sıcaklık (°C)	95
İnkübasyon süresi (dk)	10
Sıcaklık geçiş oranı (°C/s)	20
“Acquisition mode”	None

Program 2:

AMPLİFİKASYON

Siklus Programı	Değer
Siklus	45
Analiz modu	Quantification

Sıcaklık (°C)	Segment 1	Segment 2	Segment 3
	95	55	72
İnkübasyon süresi (sn)	10	10	5
Sıcaklık geçiş oranı (°C/s)	20	20	20
“Acquisition mode”	None	Single	None

Program 3:

SOĞUTMA

Siklus Programı	Değer
Siklus	1
Analiz modu	None
Sıcaklık (°C)	40
İnkübasyon süresi (sn)	30
Sıcaklık geçiş oranı (°C/s)	20

RT PCR programı sonucunda her bir örnek için p53 ve IGF-1 gen kopya sayıları standart kalibrasyon eğrisi yardımıyla kantitatif olarak hesaplandı. Her bir örnek için hesaplanan gen kopya sayıları p53 allel kaybını gösteren LOH analizine tabii tutuldu.

LOH (Heterozigotluk kaybı) Analizi:

$$LOH = 2 \times \frac{n_T^{p53} / n_T^{IGF-1}}{n_N^{p53} / n_N^{IGF-1}} - 1$$

n_T^{p53} = Tümör dokusundaki p53 gen kopya sayısı

n_T^{IGF-1} = Tümör dokusundaki IGF-1 gen kopya sayısı

n_N^{p53} = Kontrol kanındaki p53 gen kopya sayısı

n_N^{IGF-1} = Kontrol kanındaki IGF-1 gen kopya sayısı

LOH=1 → Tümör dokusu ile sağlıklı kontrol arasında allelik durum açısından fark yoktur.

0 < LOH < 1 → Bir p53 allelinde delesyon mevcuttur.

LOH > 1 → Bir p53 alleli amplifiye olmuştur veya IGF-1 delesyonu mevcuttur.

3.3. VERİLERİN İSTATİSTİKSEL ANALİZİ:

Meme kanseri olan 25 hastanın immunhistokimya ile yapılmış HER2 sonuçlarıyla aynı hastaların RT PCR ile kantitatif olarak ölçülen HER2 sonuçları iki yöntem sonuçları arasındaki ilişkiyi tespit eden Ki-kare testi ile değerlendirildi. IHC ile karşılaştırılan RT PCR yönteminin duyarlılığı ve özgüllüğü bulundu.

İnvazif duktal meme kanseri olan 46 hasta ve selim meme hastalığı olan 4 hastanın RT PCR ile ölçülen HER2 onkogen sonuçlarıyla yine RT PCR'da ölçülen p53 tümör süpresör genine ait sonuçları arasındaki ilişki Ki-kare ilişki testiyle değerlendirildi. HER2 onkogen pozitifliğiyle p53 delesyonu varlığının ilişkisi araştırıldı.

İnvazif duktal meme kanseri olan 46 hastada, tümörün grade'i, tümör büyüklüğü, lenf nodu invazyonu, IHC ile değerlendirilmiş ER, PR sonuçları bilinmekteydi. HER2 onkogen amplifikasyonunun ve p53 tümör süpresör geninin prognostik faktörlerle karşılaştırılmasında niceliksel veriler için Mann Whitney U testi kullanıldı. Niteliksel verilerin karşılaştırılmasında ise Ki-Kare testi ve Fisher Exact Ki-Kare testi kullanıldı. Sonuçlar % 95'lik güven aralığında, anlamlılık $p<0.05$ düzeyinde değerlendirildi.

4. BULGULAR:

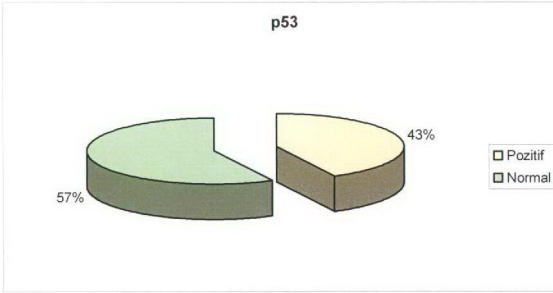
4.1. RT PCR İLE ÖLÇÜLEN HER2/neu ONKOGENİNİN VE p53 TÜMÖR SÜPRESSÖR GENİNİN KANTİTATİF SONUÇLARI VE DAĞILIMLARI:

RT PCR ile kantitatif olarak ölçülen HER2/neu onkogeninin, referans gen oranına ait değerler 0.31 ile 24.3 arasında değişmekte olup ortalama değer 2.76 ± 4.29 'dur (Tablo 4). Olguların % 24'ü RT PCR ile HER2/neu onkogen amplifikasyonu açısından pozitif, % 76'sı ise negatif olarak değerlendirilmiştir (Şekil 11).



Şekil 11: RT PCR ile ölçülen HER2/neu onkogenine ait sonuçların dağılımı

RT PCR ile kantitatif olarak ölçülen p53 gen delesyonunun tespiti için hesaplanan LOH değerleri 0.01 ile 9.0 arasında değişmekte olup ortalama değer 2.07 ± 2.60 'dır (Tablo 4). Olguların % 43'ü p53 delesyonu açısından pozitif iken; % 57'si negatiftir (Şekil 12).



Şekil 12: p53 gen delesyonu açısından pozitif ve normal olan hastaların dağılım grafiği

Tablo 4: HER2/neu onkogen amplifikasyonu ve p53 gen delesyonu değerlerinin dağılımı

		Min	Max	Ort±SD
HER2/neu		0.31	24.3	2.76±4.29
p53 delesyonu		0.01	9.00	2.07±2.60
		n	%	
HER2/neu	Pozitif	12	24.0	
	Negatif	38	76.0	
	Toplam	50	100.0	
p53 delesyonu	Pozitif	20	42.6	
	Normal	27	57.4	
	Toplam	47	100.0	

4.2. HER2/neu ONKOGEN SONUÇLARININ IHC YÖNTEMİ VE RT PCR YÖNTEMİYLE KARŞILAŞTIRILMASI:

Meme kanseri olan 25 hastanın immunohistokimya ile değerlendirilmiş HER2/neu onkogen sonuçlarıyla, aynı hastaların RT PCR ile kantitatif olarak ölçülen HER2 /neu sonuçları, iki yöntem arasındaki ilişkiyi tespit eden Ki-kare testi ile istatistiksel olarak değerlendirildi (Tablo 5). Buna göre RT PCR yöntemiyle elde edilen sonuçlarla ve IHC yöntemi ile yapılan sonuçlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulundu ($p<0.05$).

Tablo 5: RT PCR ile IHC yönteminin karşılaştırması

		RT PCR HER2/neu						Test istatistiği; p
		Pozitif		Negatif		Toplam		
		n	%	n	%	n	%	
IHC HER2/neu	Pozitif	4	57.1	3	16.7	7	28.0	$\chi^2=4.096$; 0.043*
	Negatif	3	42.9	15	83.3	18	72.0	
	Toplam	7	100.0	18	100.0	25	100.0	

χ^2 Ki-kare testi

* $p<0.05$ düzeyinde anlamlı

RT PCR ile HER2/neu pozitif olan 7 olgunun 4'ü IHC ile pozitif olarak görülürken; RT PCR ile HER2/neu negatif olan 18 olgunun 15'i IHC ile de negatif olarak tespit edildi. IHC yöntemiyle karşılaştırılan RT PCR yönteminin duyarlılığı ve özgüllüğü bulundu. RT PCR yönteminin duyarlılığı %57, özgüllüğü % 83 olarak tespit edildi

4.3. HER2 ONKOGENİ İLE p53 TÜMÖR SÜPRESSÖR GEN İLİŞKİSİ:

İnvazif duktal meme kanseri olan 43 hasta ve selim meme hastalığı olan 4 hastanın RT PCR ile ölçülen HER2/neu onkogen sonuçlarıyla yine RT PCR'da ölçülen p53 tümör süpressör genine ait sonuçları arasındaki ilişki Ki-kare ilişki testiyle değerlendirildi (Tablo 6). HER2/neu onkogen pozitifliğiyle p53 delesyonun ilişkisi araştırıldı.

Tablo 6: HER2/neu onkogen amplifikasyonu ile p53 gen delesyonunun ilişkisi

		HER2/neu						Test istatistiği; p
		Pozitif		Negatif		Toplam		
		n	%	n	%	n	%	
p53	Pozitif	6	50.0	14	40.0	20	42.6	$\chi^2=0.366$; 0.545*
	Negatif	6	50.0	21	60.0	27	57.4	
	Toplam	12	100.0	35	100.0	47	100.0	

χ^2 Ki-kare testi * p>0.05

Ki-kare ilişki testiyle değerlendirilen HER2/neu onkogen pozitifliğiyle p53 delesyonu arasında anlamlı bir ilişki olmadığı tespit edildi. Buna göre p değeri 0.545 olarak hesaplandı.

4.4. HER2/neu ONKOGENİ İLE p53 TÜMÖR SÜPRESSÖR GENİNİN PROGNOSTİK FAKTÖRLERLE İLİŞKİSİ:

4.4.1. HER2/neu ONKOGENİ İLE PROGNOSTİK FAKTÖRLERİN İLİŞKİSİ:

HER2/neu onkogen amplifikasyonunun prognostik faktörlerle karşılaştırılmasında niceliksel veriler için Mann Whitney U testi kullanıldı. Niteliksel verilerin karşılaştırılmasında ise Ki-Kare testi ve Fisher Exact Ki-Kare testi kullanıldı (Tablo 7). Sonuçlar % 95'lik güven aralığında, anlamlılık p<0.05 düzeyinde değerlendirildi. Buna göre;

HER2/neu pozitifliği ile tümör grade'i arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmadı (p>0.05). HER2/neu pozitif olan olgularda da negatif olan olgularda grade 2 olma oranı daha yüksek tespit edildi.

HER2/neu pozitifliği ile lenf nodu invazyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmadı (p>0.05). HER2/neu değeri pozitif olan olgularda da negatif olan olgularda da lenf nodu invazyonunun yüksek bir oranda pozitif olduğu görüldü.

HER2/neu pozitifliği ile ER pozitifliği ve negatifliği arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmadı (p>0.05).

HER2/neu pozitifliği ile PR pozitifliği ve negatifliği arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmadı ($p>0.05$).

HER2/neu pozitifliği ile tümör çapının 2 cm'den büyük ya da küçük olması arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmadı ($p>0.05$). HER2/neu pozitif olan olgular ile negatif olan olguların ortalama tümör çapları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılığa rastlanılmadı ($p>0.05$)

Tablo 7: HER2/neu onkogeni ile prognostik faktörlerin karşılaştırılması

		HER2/neu amplifikasyonu						Test istatistiği; p
		Pozitif		Negatif		Toplam		
		n	%	n	%	n	%	
Grade	2	8	66.7	24	70.6	32	69.6	$\chi^2=0.064$; 0.800
	3	4	33.3	10	29.4	14	30.4	
Lenf nodu	Pozitif	10	83.3	29	85.3	39	84.8	$\chi^2=0.026$; 0.871
	Negatif	2	16.7	5	14.7	7	15.2	
ER	-	3	25.0	7	20.6	10	21.7	$\chi^2=0.990$; 0.804
	+	-	-	2	5.9	2	4.3	
	++	4	33.3	9	26.5	13	28.3	
	+++	5	41.7	16	47.1	21	45.7	
ER	Pozitif	9	75.0	27	79.4	36	78.3	$\chi^2=0.101$; 0.750
	Negatif	3	25.0	7	20.6	10	21.7	
PR	-	2	16.7	6	17.6	8	17.4	$\chi^2=0.990$; 0.804
	+	4	33.3	5	14.7	9	19.6	
	++	1	8.3	11	32.4	12	26.1	
	+++	5	41.7	12	35.3	17	37.0	
PR	Pozitif	10	83.3	28	82.4	38	82.6	$\chi^2=0.006$; 0.939
	Negatif	2	16.7	6	17.6	8	17.4	
Tümör çapı	≥ 2 cm	5	41.7	19	55.9	24	52.2	$\chi^2=0.006$; 0.939
	< 2 cm	7	58.3	15	44.1	22	47.8	
Tümör çapı (Ort\pmSD)		1.93 \pm 0.73		2.72 \pm 2.04		2.52 \pm 1.82		Z=-0.892; 0.373

χ^2 Ki-kare testi Z Mann Whitney U testi

4.4.2. p53 TÜMÖR SÜPRESSÖR GEN DELESYONUNUN HİSTOPATOLOJİK PROGNOSTİK FAKTÖRLERLE İLİŞKİSİ:

p53 tümör süpressör geninin prognostik faktörlerle karşılaştırılmasında niceliksel veriler için Mann Whitney U testi kullanıldı. Niteliksel verilerin karşılaştırılmasında ise Ki-Kare testi ve Fisher Exact Ki-Kare testi kullanıldı (Tablo 8). Sonuçlar %95'lik güven aralığında, anlamlılık $p < 0.05$ düzeyinde değerlendirildi. Buna göre;

p53 delesyon varlığı ile tümör grade'i arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmadı ($p > 0.05$). p53 delesyonu olan ve olmayan olgularda grade 2 olma oranı daha yüksek tespit edildi.

p53 delesyon varlığı ile lenf nodu invazyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmadı ($p > 0.05$). p53 delesyonu olan ve olmayan olgularda lenf nodu invazyonunun yüksek bir oranda pozitif olduğu görüldü.

p53 delesyon varlığı ile ER pozitifliği ve negatifliği arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmadı ($p > 0.05$).

p53 delesyon varlığı ile PR pozitifliği ve negatifliği arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmadı ($p > 0.05$).

p53 delesyon varlığı ile tümör çapının 2 cm'den büyük ya da küçük olması arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmadı ($p > 0.05$).

p53 delesyonu olan ve olmayan olguların ortalama tümör çapları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı ($p > 0.05$).

Tablo 8: p53 tümör süpressör gen delesyonunun prognostik faktörlerle karşılaştırılması

		p53 delesyonu						Test istatistiği; p
		Pozitif		Normal		Toplam		
		n	%	n	%	n	%	
Grade	2	11	55.0	18	78.3	29	67.4	$\chi^2=2.636;$ 0,104
	3	9	45.0	5	21.7	14	32.6	
Lenf nodu	Pozitif	18	90.0	18	78.3	36	83.7	F $\chi^2=1.082;$ 0.420
	Negatif	2	10.0	5	21.7	7	16.3	
ER	-	4	20.0	6	26.1	10	23.3	$\chi^2=4.284;$ 0.232
	+	1	5.0	1	4.3	2	4.7	
	++	8	40.0	3	13.0	11	25.6	
	+++	7	35.0	13	56.5	20	46.5	
ER	Pozitif	16	80.0	17	73.9	33	76.7	$\chi^2=0.222;$ 0.637
	Negatif	4	20.0	6	26.1	10	23.3	
PR	-	3	15.0	5	21.7	8	18.6	X ² =1.811; 0.613
	+	5	25.0	4	17.4	9	20.9	
	++	6	30.0	4	17.4	10	23.3	
	+++	6	30.0	10	43.5	16	37.2	
PR	Pozitif	17	85.0	18	78.3	35	81.4	$\chi^2=0.321;$ 0.704
	Negatif	3	15.0	5	21.7	8	18.6	
Tümör çapı	≥ 2 cm	13	65.0	10	43.5	23	53.5	$\chi^2=1.992;$ 0.158
	< 2 cm	7	35.0	13	56.5	20	46.5	
Tümör çapı (Ort±SD)		2.21±0.70		2.85±2.46		2.52±1.82		Z=-0.501; 0.616

χ^2 Ki-kare testi F χ^2 Fisher's Exact Testi

Z Mann Whitney U testi

5. TARTIŞMA VE SONUÇ:

Meme kanserinin oluşumu çok basamaklı karmaşık genetik değişikliklerle açıklanmaktadır. Onkogen aktivasyonları ve tümör süpressör genlerdeki inaktivasyonlar kanserle sonuçlanmaktadır. HER2/neu onkogen amplifikasyonu ve p53 tümör süpressör genindeki mutasyonlar invazif duktal meme kanseri oluşumunda önemli rol oynamaktadır (7). Bu iki gendeki değişiklikler tümör oluşumunun yanında prognostik açıdan da değerlidir. Bu nedenle çalışmamızda HER2/neu onkogen amplifikasyonu ve p53 gen delesyonu araştırıldı. Bunun için gen seviye ölçümlerinde giderek önem kazanan kantitatif RT-PCR yöntemiyle çalışma yapıldı (45).

Çalışmamızda meme kanserli hastaların parafinize edilmiş tümör dokularından DNA izolasyonu yapılarak Real Time PCR tekniğiyle HER2/neu onkogen amplifikasyonunun kantitatif olarak ölçümü yapıldı ve en sık kullanılan ölçüm tekniği olan IHC ile karşılaştırıldı. RT-PCR yöntemiyle elde edilen sonuçlarla ve IHC yöntemi ile yapılan sonuçlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulundu ($p=0,043$). Bu sonuçlara göre RT-PCR yöntemi IHC yöntemiyle karşılaştırıldığında duyarlılığı %57, özgüllüğü %83 olarak bulundu. RT-PCR yöntemi duyarlılığı ve özgüllüğü nedeniyle gen seviye ölçümlerinde kullanılabileceği ve subjektif bir yöntem olan IHC'dan üstünlükleri olduğu gösterildi.

M. Könighshoff ve ark.(2) yaptıkları çalışmada meme tümör dokularından elde ettikleri DNA örneklerinden HER2/neu onkogenini RT-PCR tekniğiyle kantitatif olarak ölçmüşler ve sonuçları IHC tekniği ile karşılaştırmışlardır. Buna göre RT-PCR sonuçları ile IHC sonuçları arasında iyi bir korelasyon tespit etmişlerdir ($p=0.029$).

Slamon D.J. ve arkadaşları (21,22) yaptıkları çalışmada HER2/neu onkogeninin meme kanserli hastaların %25-30'unda mevcut olduğunu sık relaps ve kısa yaşam süresiyle birlikte gittiğini tespit etmişlerdir. Çalışmamızda meme kanserli hastaların %24'ü RT-PCR tekniğiyle HER2/neu onkogeni pozitif olarak tespit edildi.

A Borg ve ark.(19) HER2/neu onkogenini diğer prognostik faktörlerle karşılaştırmışlar ve birbirleri arasındaki ilişkiler irdelenmiştir. HER2/neu onkogeninin pozitifliği ile steroid reseptörleri arasında negatif bir ilişki olduğu, bunun yanında yüksek histolojik grade ile HER2/neu onkogen pozitifliğinin birlikte olduğu bildirilmiştir. Ancak lenf nodu durumu ve tümörün büyüklüğü ile HER2/neu pozitifliği arasındaki ilişki netlik kazanmamıştır. Çalışmamızda HER2/neu onkogeninin amplifikasyonu ile tümör büyüklüğü, histolojik grade, lenf nodu invazyonu, ER ve PR durumu arasında anlamlı ilişki bulunamadı ($p>0.05$). Tümör büyüklüğü ve lenf nodu durumu ile HER2/neu onkogen amplifikasyonunun ilişkili olmadığı literatürde belirtilmekte olup (2,61), çalışmamızda da anlamlı ilişkiye rastlanmadı. HER2/neu

onkogen amplifikasyonunun yüksek histolojik grade ile bir arada olması beklenirdi. Ancak retrospektif yapılan çalışmada rastgele seçilen hastaların büyük bir kısmının grade 2 olmasından dolayı istatistiksel olarak anlamlı sonuç elde edilemedi. HER2/neu onkogeninin pozitifliği ile steroid reseptörleri arasında negatif bir ilişki olduğu bildirilmektedir (61) ancak çalışmamızda birçok hastanın ER ve PR pozitif olduğundan HER2/neu onkogeninin pozitifliği ile steroid reseptörleri arasında anlamlı ilişki bulunamadı.

p53 tümör süpressör genindeki değişiklikler ve HER2/neu onkogenin amplifikasyonu invazif duktal meme kanserinin patogenezinde birlikte rol oynamakta ve prognozda önemlidir. Bu nedenle çalışmamızda HER2/neu onkogen amplifikasyonu ile p53 gen delesyonunun ilişkisi araştırıldı ve RT PCR yöntemiyle kantitatif olarak p53 gen delesyonu tespit edildi.

M. Gentile ve ark. (62) yaptığı çalışmada, p53 geninde LOH analizi yapılmış buna göre meme kanserli hastaların %43'ünde p53 geninde heterozigoti kaybına rastlanılmıştır. Çalışmamızda meme kanserli hastaların %43'ünde p53 geninde heterozigoti kaybı RT-PCR tekniğiyle bulunmuştur.

C Dimitrakakis ve ark.(4) yaptığı çalışmada p53 gen değişiklikleri ile HER2/neu onkogeni arasında korelasyon olduğu bildirilmişti ancak S. Tsutsui ve ark. yaptıkları çalışmada (3) p53 proteinin ve HER2/neu onkogeninin birbirinden bağımsız iki prognostik faktör olduğu tespit edilmiştir. Çalışmamızda RT PCR tekniğiyle kantitatif olarak ölçülen HER2 onkogen pozitifliğiyle p53 gen delesyonu arasında anlamlı bir ilişki olmadığı tespit edildi. Buna göre p değeri 0.545 olarak hesaplandı. Ancak HER2/neu onkogen amplifikasyonu ve p53 gen delesyonu birlikte tespit edilen 6 hastanın 4'ü grade 3, 2'si grade 2 invazif duktal meme kanseriydi. Bu sonuçlara göre her ne kadar iki bağımsız faktör olarak tespit edilseler de HER2/neu onkogen amplifikasyonu ve p53 gen delesyonunun birlikteliği kötü prognozu işaret etmektedir.

Çalışmamızda p53 gen delesyonu ile tümör büyüklüğü, histolojik grade, lenf nodu invazyonu, ER durumu, PR durumu arasında anlamlı ilişki bulunamadı ($p>0.05$). Litaratürde p53 gen değişiklikleriyle yüksek grade'li tümör, östrojen ve progesteron reseptör negatifliğinin daha sık görüldüğü bildirilmektedir (38,39). Ancak retrospektif yapılan çalışmada rastgele seçilen hastaların büyük bir kısmının grade 2 olmasından dolayı istatistiksel olarak anlamlı sonuç elde edilemedi aynı şekilde birçok hastanın ER ve PR pozitif olduğundan p53 gen delesyonu ile steroid hormon reseptörleri arasında anlamlı ilişki bulunamadı.

Sonuç olarak RT PCR yöntemi duyarlılığı ve özgüllüğü nedeniyle gen seviye ölçümlerinde güvenle kullanılabilir ve subjektif bir yöntem olan IHC'dan üstün bir yöntemdir. HER2/neu onkogen amplifikasyonu ile p53 gen delesyonu her ne kadar meme kanserinin patogenezinde bir arada rol oynasalar da yapılan çalışmada iki bağımsız prognostik faktör olduğu gösterildi. Ancak HER2/neu onkogen amplifikasyonun ve p53 gen delesyonunun birlikte bulunduğu hastalarda yüksek grade'li tümör varlığı tespit edildi.



6. KAYNAKLAR:

- 1- Rubin E, Farber JL. Pathology, 1039-1047, 1999.
- 2- Königshoff M, Wilhelm J, Bohle RM, Pingoud A, Hahn M. Her-2/neu Gene Copy Number Quantified by Real-Time PCR: Comparison of Gene Amplification, Heterozygosity, and Immunohistochemical Status in Breast Cancer Tissue. Clin. Chem., 49: 219-229, 2003.
- 3- Tsutsui S, Ohno S, Murakami S, Kataoka A, Kinoshita J, Hachitanda Y. Prognostic significance of the coexpression of p53 protein and c-erbB2 in breast cancer. Am. J. Surg., 185 :165–167, 2003.
- 4- Dimitrakakis C, Konstadoulakis M, Messaris E, Kymionis G, Karayannis M, Panoussopoulos D, Michalas S, Androulakis G. Molecular markers in breast cancer: Can we use c-erbB-2, p53, bcl-2 and bax gene expression as prognostic factors? Breast, 11: 279–285, 2002.
- 5- Stevens A, Lowe J. Pathology, 421-430, 2000.
- 6- Cotran, Kumar, Robbins. Pathologic Basis of Disease, 1099-1109, 1994.
- 7- Vijver MJ. Genetic alterations in breast cancer. Curr. Diagn. Pathol., 6: 271-281, 2000.
- 8- Kenemans P, Verstraeten RA, Verheijen RHM. Oncogenic pathways in hereditary and sporadic breast cancer. Eur. Menop. J., 1-9, 2004.
- 9- Porter-Jordan K, Lippman ME. Overview of the biologic markers of breast cancer. Hematol. Oncol. Clin. N., 8: 73-100, 1994.
- 10- Berardo MD, Allred DC, O'Connell P. Breast cancer. Princ. Mol.Med., 63: 625-632,1998.
- 11- Clarke RB, Anderson E, Howell A. Steroid receptors in human breast cancer. Trends Endocrin. Met., 180: 1-8, 2004.
- 12- Ross JS, Fletcher JA. The HER-2/neu onkogene in breast cancer: prognostic factor, predictive factor, target for therapy. Stem Cells, 16: 413-428, 1998.
- 13- Beselga J. Clinical trials of Herceptin (trastuzumab). Eur. J. Cancer, 37: 18-24, 2001.
- 14- Cooke T. What is HER2. Eur. J. Oncol. Nurs., 4: 2-9, 2000.
- 15- Roskoski R. The ErbB/HER receptor protein-tyrosine kinases and cancer. Biochem. Biophys. Res. Commun., 319: 1-11, 2004.
- 16- Anderson SM, Everett T. HER-2/neu Oncoprotein: A new target in the treatment of breast cancer.([http: oncogene.com./ technical/ pdf/ BC- Trtmnt.pdf](http://oncogene.com./technical/pdf/BC-Trtmnt.pdf))
- 17- Meriç F, Hung MC, Hortobagy GN, Hunt KK. HER2/neu in the manegement of invasive breast cancer. J. Am. Coll. Surg., 194: 488-501, 2002.
- 18- Revillion F, Bonnetterre J, Peyrat JP. ERBB2 onkogene in human breast cancer and its clinical significance. Eur. J. Cancer, 34: 791-808, 1998.

- 19- Borg A. ERBB2 amplification is associated with tamoxifen resistance in steroid –receptor positive breast cancer. *Cancer Lett.*, 81: 137-144, 1994.
- 20- Vijver MJ. Assessment of the need and appropriate method for testing for the human epidermal growth factor receptor-2 (HER2). *Eur. J. Cancer*, 37: 11-17, 2001.
- 21- Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science*, 235: 177-182, 1987.
- 22- Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, et al. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science*, 244: 707-712, 1989.
- 23- Thomas E, Berner G. Prognostic and predictive implications of HER2 status for breast cancer patients. *Eur. J. Oncol. Nurs.*, 4: 10-17, 2000.
- 24- Cooke T, Reeves J, Lannigan A, Stanton P. The value of the human epidermal growth factor receptor-2 (HER2) as a prognostic marker. *Eur. J. Cancer*, 37: 3-10, 2001.
- 25- Heatley M, Maxwell P, Whiteside CH, Toner PG. C-erbB2 oncogene product expression depends on tumour type and is related to oestrogen receptor and lymph node status in human breast carcinoma. *Path. Res. Pract.*, 189: 261-266, 1993.
- 26- Somerville JE, Clarke LA, Biggart JD. c-erbB-2 overexpression and histological type of in situ and invasive breast carcinoma. *J. Clin. Pathol.*, 45: 16-20, 1992.
- 27- Tsuda H, Hirohashi MD, Shimosato Y, et al. Correlation between histologic grade of malignancy and copy number of c-erbB-2 gene in breast carcinoma. *Cancer*, 65: 1794-1800, 1990.
- 28- Rilke F, Colnaghi MI, Cascinelli N, Andreola S, et al. Prognostic significance of HER2/neu expression in breast cancer and its relationship to the other prognostic factors. *Int. J. Cancer*, 49: 44-49, 1991.
- 29- Tetu B, Brisson J. Prognostic significance of HER2/neu oncoprotein expression in node-positive breast cancer. *Cancer*, 73: 2359-2365, 1994.
- 30- Hlupic L, Razumovic J, Bozikov J, Coric M, et al. Prognostic value of different factors in breast carcinoma. *Tumori*, 90: 112-119, 2004.
- 31- Piccart MJ, Leo AD, Hamilton A. HER2: a predictive factor ready to use in the daily management of breast cancer patients? *Eur. J. Cancer*, 36: 1755-1761, 2000.
- 32- Böhme C. Anti-HER2 therapy: how to use Herceptin in clinical practice *Eur. J. Oncol. Nurs.*, 4: 30-36, 2000.
- 33- Stebbing J, Copson E, Reilly SO, Herceptin (trastuzumab) In Advanced Breast Cancer. *Cancer Treat. Rev.*, 26: 287-290, 2000.

- 34- Jones BL. Trastuzumab: hopes and realites. *Lancet Oncol.*, 3: 137-144, 2002.
- 35- Phillips HA. The Role of the p53 Tumour Suppressor Gene in Human Breast Cancer. *Clin. Oncol.*, 11: 148–155, 1999.
- 36- Ziyaie D, Hupp TR, Thompson AM. p53 and breast cancer. *Breast*, 9: 239-246, 2000.
- 37- Fekia A, Irminger-Fingera I. Mutational spectrum of p53 mutations in primary breast and ovarian tumors. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 52: 103–116, 2004.
- 38- Sangrajrang S, Arpornwirat W, Cheirsilpa A, Thisuphakorn P, Kalalak A, Sornprom A, Soussi T. Serum p53 antibodies in correlation to other biological parameters of breast cancer. *Cancer Detect. Prev.*, 27: 182–186, 2003.
- 39- Keohavonga P, Gaoa W, Madye HH, Kanbour-Shakirb A, Melhemb MF. Analysis of p53 mutations in cells taken from paraffin-embedded tissue sections of ductal carcinoma in situ and atypical ductal hyperplasia of the breast. *Cancer Lett.*, 212: 121–130, 2004.
- 40- Climent MA, Seguo MA, Peiro G, Molina R, et al. Prognostic value of HER-2/neu and p53 expression in node-positive breast cancer. HER-2/neu effect on adjuvant tamoxifen treatment. *Breast*, 10: 67-77, 2001.
- 41- Barlett JMS, Mallon E, Cooke T. Molecular diagnostics for determination of HER2 status in breast cancer. *Curr. Diagn. Pathol.*, 9: 48-55, 2003.
- 42- Yaziji H, Gown AM. Controversies and guidelines in tissue-based HER2/neu testing in breast cancer. ([www.phenopath.com/about/pdf/HER2 MLO pdf](http://www.phenopath.com/about/pdf/HER2_MLO.pdf))
- 43- Dowsett M, Cooke T, Ellis I, Gullick WJ, et al. Assesment of HER2 status in breast cancer: why, when, how? *Eur. J. Cancer*, 36: 170-176, 2000.
- 44- Wilhelm J, Pingoud A, Hahn M. Detection of p53 Allel Deletions in Human Cancer by Quantification of Genomic Copy Number. Ed: Mauer S, Wittwer C, Nakagawara K. *Rapid Cycle Real Time PCR Methods and Applications*. Germany, 159-170, 2001.
- 45- Mocellin S, Rossi CR, Pilati P, Nitti D, et al. Quantitative real-time PCR: a powerful ally in cancer research. *Trends Mol. Med.*, 9: 189-195, 2003.
- 46- Byse K, Reiser A, Gross C, Möller C, et al. Real-time Quantification of HER2/neu Gene Amplification by LightCycler Polymerase Chain Reaction (PCR)- a new Research. Tool. *Biochem.*, 2: 15-18, 2001.
- 47- Leary JO. In situ amplification. Ed: Lo Y.M.D. *Clinical Applications of PCR, USA*, 109-145, 1998.
- 48- Lo Y.M.D. Amplification of archival materials. Ed: Lo Y.M.D. *Clinical Applications of PCR, USA*, 21-26, 1998.

- 49- Lo Y.M.D. PCR for the detection of minority DNA populations. Ed: Lo Y.M.D. *Clinical Applications of PCR, USA*, 101-108, 1998.
- 50- Maniatis T, Fritsah EF, Sambrook J. *Molekuler cloning. A Labrotory Manuel. USA*, 175-179, 1982.
- 51- Moss P, Thein SL. Sequencing of PCR products. Ed: Elles R. *Molekuler Diagnosis of Genetic Diseases, USA*, 145-148, 1992.
- 52- Todd AV, Fuery C.J, Imprey HL, Applegate TL, Itavghton MA. DzyNA-PCR; use of DNazmes to detect and quantfy nucleic acid sequance in RT flurescein format. *Clin. Chem.*, 46: 625-630, 2000.
- 53- Barros F. Rapid gene dosage determination by RT Fluorescent PCR. *Clin. Chem.*, 46: 1574-1582, 2000.
- 54- Wittwer C, Hahn M, Kaul K. *Rapid cycle Real Time PCR- Methods and Applications, Quantification, Germany*, 2004.
- 55- Klein D. Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations. *Trends. Mol. Med.*, 8: 257-260, 2002.
- 56- Wittwer CT, Herrmann MG, Gundry CN, et al. Real-time Multiplex PCR Assays *Methods*, 25: 430-442, 2001.
- 57- Provenzano M, Rossi CR, Mocellin S. The Usefulness of Quantitative Real-Time PCR in immunogenetics. *Sci. Commun.*, 3: 89-91, 2001.
- 58- Giesendorf BAJ, Vet JAM, Tyagi S, Mersing EJMG, et al. *Molekuler Beacons: An approach for semi automated mutations analysis. Clin. Chem.*, 44: 482-486, 1998.
- 59- Crockett AO, Wittwer CT. Fluorescein –Labelled oligonucleotides for Real Time PCR. Using inherent quenching of deoxyguanosine nucleotides. *Anal. Biochem.*, 290: 89-97, 2001.
- 60- Wittwer C. *Rapid cycle Real Time PCR*, Ed: Mauer S, Wittwer C, Nakagawara K, *Rapid cycle Real Time PCR: Methods and Applications, Germany*, 1-8, 2001.
- 61-Battifora H, Gaffey M, Estaban J, et al. Immunohistochemical Assay of neu/ c-erb2 Onkogene Product in Parafin-embedded Tissues in Early Breast Cancer: Retrospective Follow-up Study of 245 Stage I and II cases. *Modern Pathol.*, 4: 466-474,1991.
- 62- Gentile M, Jungstrom MB, Olsen KE, Soderkvist P, Wingren S. p53 and Survival in Early Onset Breast Cancer: Analysis of Gene Mutations, Loss of Heterozygosity and Protein Accumulation. *Eur. J. Cancer*, 35: 1202-1207, 1999.

7. ÖZGEÇMİŞ:

Adı soyadı: Gözde Ülfer

Doğum yeri ve tarihi: Kocaeli, 6 Haziran 1975

EĞİTİM:

İlkokul: 50.Yıl Cumhuriyet İlkokulu, Kocaeli

Ortaokul: Kocaeli Anadolu Lisesi, Kocaeli

Lise: Kocaeli Anadolu Lisesi, Kocaeli

Üniversite: İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, İstanbul

ÜYE OLDUĞU MESLEK KURULUŞLARI:

1- Türk Tabipleri Birliği (İstanbul Şubesi)

2- Türk Biyokimya Derneği (İstanbul Şubesi)

KATILDIĞI SÜREKLİ EĞİTİM KURSLARI:

1- 24-28 /12/ 2001 Tıpta Uzmanlık Öğrencisi Temel Eğitim Kursu, Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi.

2- 03 /01/2001 Deney Hayvanı Kullanımı ve Etik Yaklaşım Kursu, Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi.

3- 14-15/01/2002 Uygulamalı Biyoistatistik Kursu, Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi.

4- 05-07/04/2002: Tıbbi Laboratuvarlarda Standardizasyon ve Kalite Güvencesi Uygulamalı Eğitim, Türk Biyokimya Derneği, İstanbul.

ULUSAL KONGRELERDEKİ BİLDİRİLER:

1- Gazeteci G, Deyneli O, Yavuz G, Gözü G, Unay Ö, Haklar G, Akalın S. Yeni Bir "Point-Of-Care" Kan Glikoz Ölçüm Sisteminin Değerlendirilmesi: Precision Pcx. (24-27 Haziran 2002, XVII. Ulusal Biyokimya Kongresi, Ankara)

2- Ülfer G, Haklar G, Taga Y. Eritrosit Sedimentasyon Hızının İki Farklı Analizörde Ölçülmesi ve Westergren Yöntemi İle Karşılaştırılması. (30 Nisan- 4 Mayıs 2003 III. Ulusal Klinik Biyokimya Kongresi, İzmir)

3- Ülfer G, Haklar G, Taga Y. Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Merkez Klinik Laboratuvarında Yapılan Maliyet ve Verimlilik Analizleri. (30 Nisan- 4 Mayıs 2003 III. Ulusal Klinik Biyokimya Kongresi, İzmir)

4- Tahan V, Avşar E, Eren F, Yavuz G, Akpulat S, Emekli E, Yüksel M, Ülfer G, Gören Z, İmeryüz N, Över H, Çelikel Ç, Haklar G, Kalaycı C, Tözün N. Rosiglitazonun Sıçanlarda Metionin Ve Kolinden Eksik Diyetle Geliştirilen Non-Alkolik Steatohepatit Üzerine Etkisi. (30 Eylül-5 Kasım 2003 20. Ulusal Gastroenteroloji Haftası, Kuşadası)

5- Yılmazenç F, İmeryüz N, Akın L, Öneş T, Dede F, Turoğlu HT, Aksoy N, Ülfer G, Bekiroğlu N, Haklar G, Yeğen BÇ, Rehfeld JF, Holst JJ, Özdoğan O, Bulusoy N. Olistat Katı Mide Boşalmasını Hızlandırır. (30 Eylül- 5 Kasım 2003 20.Ulusal Gastroenteroloji Haftası, Kuşadası)

6- Macunluoğlu B, Atakan A, Citlak L, Ülfer G, Tuğlular S, Özener Ç, Akoğlu E. Siklosporin A Nefrotoksitesi Geliştirilmiş Hayvan Modelinde Aldosteron Reseptör Blokajının Etkisi. (Eylül 2004 21.Ulusal Nefroloji, Hipertansyon, Diyaliz ve Transplantasyon Kongresi)

7- Atakan A, Macunluoğlu B, Midi A, Ülfer G, Çakaloğlu F, Tuğlular S, Özener Ç, Akoğlu E. Deneysel Siklosporin A Nefrotoksitesitesi Modeli Üzerinde Lökotrien Reseptör Antagonistlerinin Etkisi. (Eylül 2004 21.Ulusal Nefroloji, Hipertansyon, Diyaliz ve Transplantasyon Kongresi)

ULUSLAR ARASI KONGRELERDEKİ BİLDİRİLER:

1- Macunluoğlu B, Atakan A, Citlak L, Ülfer G, Tuğlular S, Özener Ç, Akoğlu E. Effects Of Aldosterone Receptor Blockade On Cyclosporine A Nephrotoxicity. (May 15-18, 2004 European Renal Association XLI Congress, Lisbon, Portugal)

2- Atakan A, Macunluoğlu B, Citlak L, Ülfer G, Çakaloğlu F, Tuğlular S, Özener Ç, Akoğlu E. Renal Protective Effects Of Leukotriene Receptor Blockers In A Rat Model Of Cyclosporine Nephrotoxicity. (May 15-18, 2004 European Renal Association XLI Congress, Lisbon, Portugal)