

T.C
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
PATOLOJİ ANABİLİM DALI

MEME KARSİNOMUNDA c-erbB-2 (HER-2/neu) EKSPRESYON
VE AMPLİFİKASYONUNUN DİĞER PROGNOTİK
FAKTÖRLERLE KARŞILAŞTIRILMASI

UZMANLIK TEZİ

103467

TEZ DANIŞMANI
Prof Dr. İLHAN TUNCER

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

Dr. ŞEYDA ERDOĞAN

ADANA-2001

Uzmanlık tezimin hazırlanması sırasında büyük emeği geçen danışman hocalarım Prof Dr İlhan Tuncer'e, Yrd Doç Dr Melek Ergin'e, tüm Patoloji Anabilim dalı çalışanlarına, laboratuvar çalışmalarıma destek sağlayan, Biyokimya Anabilim Dalı, Merkez Laboratuvarı ve Dahiliye Hematoloji Bilim Dalı Laboratuvarı sorumlularına teşekkür ederim.

Dr şeyda Erdoğan

703467

Bu alışma Çukurova Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir (TF 98-U10).

İÇİNDEKİLER

Sayfa numarası

TABLO LİSTESİ.....	III
ŞEKİL LİSTESİ.....	IV
ÖZET.....	VI
ABSTRACT.....	VII
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1 Meme karsinomu.....	2
2.2 Meme karsinomunda prognostik faktörler.....	4
2.3 Polimeraz zincir reaksiyonu.....	12
3- GEREÇ VE YÖNTEM.....	20
4. BULGULAR.....	26
5. TARTIŞMA.....	42
6. SONUÇLAR.....	48
7. KAYNAKLAR.....	50
8. ÖZGEÇMİŞ.....	55

TABLO LİSTESİ

	<u>Sayfa Numarası</u>
Tablo 1. Meme tümörlerinde WHO sınıflandırması	2
Tablo-2. Modifiye Bloom-Richardson Grade Sistemi	5
Tablo 3. HER (erb) Gen ailesi	8
Tablo 4. Meme kanserlerinin TNM klasifikasyonuna göre evrelendirilmesi	11
Tablo 5. İncelenen 60 olgunun histolojik tanılarına göre dağılımı	20
Tablo 6. Meme karsinomunda konvansiyonel prognostik faktörler (60 olgu)	26
Tablo 7. Çalışmada değerlendirilen olguların listesi	27
Tablo 8. İmmünohistokimya ve PCR ile saptanan c-erbB-2'nin karşılaştırılması	29
Tablo 9. İmmünohistokimya ve karşılaştırmalı PCR ile tespit edilen c-erbB-2 ekspresyon ve amplifikasyonun, hasta yaşı, tümör tipi ve çapı, grade'i, lenfovasküler invazyon, aksiller lenf nodülü metastazı ve sayısı, östrojen reseptör varlığı ile karşılaştırılması	37

ŞEKİL LİSTESİ

	<u>Sayfa numarası</u>
Şekil 1. C-erbB-2'nin hücre membran reseptörü ve hücre içi sinyallerini kullanan etki mekanizması	8
Şekil 2. PCR yönteminin şeması	14
Şekil 3. İnfiltratif duktal karsinomda, c-erbB-2 ekspresyonunun kuvvetli (+++) pozitif membranöz boyanması, olgu no:19, ABC immünohistokimyasal yöntem, X200	30
Şekil 4. İnfiltratif duktal karsinomda, c-erbB-2 ekspresyonunun orta şiddette (++) membranöz boyanması, olgu no: 6, ABC immünohistokimyasal yöntem, X400	30
Şekil 5. İnfiltratif duktal karsinomda, c-erbB-2 ekspresyonunun zayıf (+) membranöz boyanması, olgu no:20, ABC immünohistokimyasal yöntem, X100	31
Şekil 6. İnfiltratif duktal karsinomda, negatif c-erbB-2 ekspresyonu, olgu no:28, ABC immünohistokimyasal yöntem, X100	31
Şekil 7. İnfiltratif lobüler karsinomda, c-erbB-2 ekspresyonunun kuvvetli (+++) membranöz boyanması, olgu no:44, immünohistokimyasal yöntem, X200	32
Şekil 8. İnfiltratif lobüler karsinomda, c-erbB-2 ekspresyonunun orta şiddette (++) membranöz boyanması, olgu no:41, ABC immünohistokimyasal yöntem, X100	32
Şekil 9. İnfiltratif lobüler karsinomda, c-erbB-2 ekspresyonunun zayıf şiddette (+) membranöz boyanması, olgu no:32, immünohistokimyasal yöntem, X400	33
Şekil 10. İnfiltratif duktal karsinomda nonspesifik sitoplazmik boyanma, olgu no:22, immünohistokimyasal yöntem, X200	33
Şekil 11. İnfiltratif duktal karsinomda, c-erbB-2 ekspresyonunun kuvvetli membranöz + sitoplazmik boyanması, olgu no:16, İmmünohistokimyasal yöntem, X400	34
Şekil 12. İnfiltratif duktal karsinomda, c-erbB-2 ekspresyonunun kuvvetli membranöz + sitoplazmik boyanması, olgu no: 15 ABC İmmünohistokimyasal yöntem, X100	34

- Şekil 13.** Karşılaştırmalı (differential) PCR ile c-erbB-2 gen amplifikasyonu. 35
Etidyum bromür ile boyalı, %8'lik poliakrilamid jel elektroforezi. Üstteki band dopamin reseptörü (112 bp), alttaki band ise c-erbB-2 genini (98 bp) göstermektedir. Elektroforetik bandların, "NIH Image 1.6" programı ile dansitometrik ölçümlerinin sonucunda; Olgu 1,2 negatif c-erbB-2 gen amplifikasyonunu ($c\text{-erbB-2}/\text{dopamin}=1$), olgu 4,7 yüksek düzeyde gen amplifikasyonunu ($c\text{-erbB-2}/\text{dopamin}>2$), olgu 3,6 düşük düzeyde c-erbB-2 amplifikasyonunu ($1.2<c\text{-erbB-2}/\text{dopamin}<2$), olgu 5 kontrol olarak kullanılan fibroadenomda negatif amplifikasyonu ($c\text{-erbB-2}/\text{dopamin}<1$) göstermektedir. X 'de ise moleküler tanımlayıcı izlenmektedir.
- Şekil 14.** olgu 1, 2, 5'de dansitometrik ölçümle belirlenen düşük düzeyde c-erbB-2 amplifikasyonu ($1.2 < c\text{-erbB-2}/\text{dopamin} < 2$), olgu 3'de kontrol olarak kullanılan fibrokistik hastalıkda negatif c-erbB-2 amplifikasyonu ($c\text{-erbB-2}/\text{dopamin} < 1$), olgu 4'de dansitometrik analizle saptanabilen yüksek düzeyde amplifikasyon ($c\text{-erbB-2}/\text{dopamin} > 2$), olgu 6,7,8'de negatif c-erbB-2 gen amplifikasyonu ($c\text{-erbB-2}/\text{dopamin} < 1$) görülmektedir. X= moleküler tanımlayıcı 35
- Şekil 15.** PCR yöntemi ile tespit edilen c-erbB-2 amplifikasyonu ve histolojik grade arasındaki ilişki 38
- Şekil 16.** İmmünohistokimyasal yöntemle tespit edilen c-erbB-2 ekspresyonunun tümör grade'i ile ilişkisi 38
- Şekil 17. :** PCR yöntemi ile tespit edilen c-erbB-2 amplifikasyonu pozitif ($4,88 \pm 2,16$) ve negatif ($2,50 \pm 1,56$) olan olgulardaki metastatik lenf nodülü ortalamasının karşılaştırılması (veriler Ort $\pm$ SD olarak verilmiştir). 39
- Şekil 18.** İHKY yöntem ile tespit edilen c-erbB-2 ekspresyonu pozitif ($4,65 \pm 2,29$) ve negatif ($2,62 \pm 1,56$) olan olgulardaki metastatik lenf nodülü ortalamasının karşılaştırılması (veriler Ort $\pm$ SD olarak verilmiştir). 39
- Şekil 19.** c-erbB-2 amplifikasyonu ile lenfovasküler tümör invazyonu (LVI) arasındaki ilişki 40
- Şekil 20.** İnfiltratif duktal karsinomda, pozitif nükleer boyanma gösteren östrojen reseptörü, olgu no:13, ABC immünohistokimyasal yöntem, X100 41
- Şekil 21.** İnfiltratif lobüler karsinomda, pozitif nükleer boyanma gösteren östrojen reseptörü, olgu no:53, ABC immünohistokimyasal yöntem, X100 41

ÖZET

MEME KARSİNOMUNDA c-erbB-2 (HER-2/neu) EKSPRESYON VE AMPLİFİKAYONUNUN DİĞER PROGNOSTİK FAKTÖRLERLE KARŞILAŞTIRILMASI

Meme karsinomunda, tümörün biyolojik davranışını, tedavi ve prognozunu belirleyen çeşitli parametreler tanımlanmıştır. Bunların içerisinde c-erbB-2 (HER-2/neu), Epidermal büyüme faktör reseptörüne benzeyen, hücre membranında tirozin kinaz reseptörünü kodlayan bir onkogendir. Meme karsinomlarında, c-erbB-2 onkoprotein ekspresyonunun ve gen amplifikasyonunun, tek başına ve diğer parametreler ile birlikte prognostik önemi konusunda, yayınlarda farklı sonuçlar mevcuttur. İmmünohistokimya, PCR, Southern Blot, Northern Blot, Western Blot, ELISA, FISH gibi yöntemler c-erbB-2'nin tespitinde kullanılmaktadır.

Bu çalışmada 60 adet meme karsinomlu kadın hastaya ait parafin doku örnekleri incelenmiştir. Parafin kesitlerde östrojen reseptörü ve c-erbB-2 protein ekspresyonu immünohistokimyasal teknik, c-erbB-2 geninin amplifikasyonu ise karşılaştırmalı PCR yöntemi ile saptanmıştır. Karşılaştırmalı PCR, formalinle tespitli parafin dokulara uygulanabilen, gen amplifikasyonunu tespit eden, semikantitatif, alternatif bir yöntemdir. c-erbB-2 ekspresyonu ve amplifikasyonu diğer klasik prognostik faktörlerle (hasta yaşı, tümörün histolojik tipi, çapı, grade'i, lenfovasküler invazyon, lenf nodülü tutulumu ve sayısı, östrojen reseptör varlığı) karşılaştırılmıştır. Bu çalışmada, her iki yöntemle tespit edilen c-erbB-2 amplifikasyonu ve ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmuştur ($p=0,000$). Meme karsinomunda, c-erbB-2 amplifikasyon ve ekspresyonunun artmış metastatik lenf nodülü sayısı ($p=0,003$), yüksek histolojik grade ($p=0,000$), lenfovasküler invazyon ($p=0,003$) arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki gösterilmiştir. Ancak, hasta yaşı, tümörün histolojik tipi, çapı ve östrojen reseptör varlığı ile anlamlı bir ilişki saptanmamıştır ($p>0,05$).

Çalışmamızda, meme karsinomunda, tek başına ve konvansiyonel prognostik faktörler ile birlikte c-erbB-2 ekspresyonu ve gen amplifikasyonunun önemli bir parametre olarak değerlendirilmesi gerekliliği, bu amaçla immünohistokimyasal tekniğin yanı sıra, karşılaştırmalı PCR'ın semikantitatif sonuç veren, güvenilir bir yöntem olarak, rutin uygulamada yer alabileceği sonucuna varılmıştır.

Anahtar sözcükler: c-erbB-2, İmmünohistokimya, meme karsinomu, PCR, prognostik faktörler

ABSTRACT

CORRELATION OF c-erbB-2 (HER-2/neu) EXPRESSION AND AMPLIFICATION WITH OTHER PROGNOSTIC FACTORS IN BREAST CARCINOMA

Several factors have been identified in breast carcinoma which affect the biologic behavior, therapy and the prognosis of the tumor. Among these, c-erbB-2 (HER-2/neu) oncogene encodes a transmembrane tyrosine kinase receptor with extensive homology to the Epidermal Growth Factor receptor. In the literature, studies regarding the prognostic role of c-erbB-2 oncoprotein overexpression and gene amplification with and without other parameters is controversial. Immunohistochemistry, PCR, Southern Blot, Northern Blot, Western Blot analyses, ELISA and FISH are the methods of detecting c-erbB-2 abnormalities.

In this study, paraffin sections from 60 female breast samples were analyzed. Immunohistochemistry was used to detect estrogen status and c-erbB-2 protein expression whereas differential PCR was used to detect c-erbB-2 gene amplification. Differential PCR is an alternative semi-quantitative method for evaluating gene amplification and can be performed in formalin-fixed paraffin-embedded specimens. We compared the prognostic impact of c-erbB-2 gene amplification and protein overexpression with conventional prognostic factors (age, histologic type and size of the tumor, grade, lymphatic invasion, lymph node involvement and estrogen status). In our study, a highly significant degree of concordance ($p=0.000$)

between c-erbB-2 amplification and overexpression was observed. Our results also showed that c-erbB-2 expression and gene amplification in breast carcinoma is significantly related to the number of metastatic lymph nodes ($p=0.003$), poor histologic grade ($p=0.000$) and lymphatic invasion ($p=0.003$). Age, histologic type, tumor size and estrogen status did not correlate with c-erbB-2 status in our study.

Our study confirmed the importance of c-erbB-2 overexpression and gene amplification as a single and combined prognostic parameter together with conventional factors and can be detected by both immunohistochemistry and differential PCR techniques. Differential PCR technique provides semi-quantitative, reliable results and can be used routinely.

Key words: c-erbB-2, , immunohistochemistry, breast carcinoma, PCR, prognostic factors

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Meme kanseri kadınlarda en sık görülen tümördür. Her sekiz kadından biri hayatı boyunca meme kanseri gelişme riski taşımaktadır. Meme kanserinde çok sayıda klinik, patolojik özellikleri temel alan, hastanın tedavi ve biyolojik davranışını etkileyen prognostik faktörler tanımlanmıştır. Bunlardan en önemlileri, tümör çapı, aksiller lenf nodülü metastazı, grade, östrojen reseptör varlığı ve c-erbB-2 onkogeninin aşırı ekspresyonudur (1, 2).

c-erbB-2, kromozom 17q'da yerleşmiş, hücre membranında tirozin-kinaz büyüme faktör reseptörünü kodlayan bir proto-onkogendir. Diğer adı HER-2/neu olan bu gen büyüme faktör reseptörleri ile ilişkili, dört kişilik bir ailenin üyesidir. Yüzey reseptörlerinin aracılığı ile hücre membranındaki tirozin kinaz reseptörünün, heregulin adı verilen ligandlarına bağlanır (3, 4, 5). c-erbB-2'nin aşırı amplifikasyonu, meme karsinomlarının %30'unda bulunur. Ekspresyonun kötü histolojik grade, aksiller lenf nodülü metastazı, relaps ile doğru oranda ilişkili olduğu, buna karşılık iyi prognoz göstergesi olan östrojen ve progesteron reseptörü ile ters orantılı bulunduğu gösterilmiştir (2, 3, 4, 5). Meme karsinomunda c-erbB-2 ekspresyonunun tespiti için, "Southern" ve "Slot blotting", "Northern Blot", Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR), "insitu fluorescent hybridization (FISH)", "nonfluorescent" yöntemler, immünohistokimyasal tespit, "Western Blot" testi ve "Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)" yöntemleri kullanılır. Bu yöntemlerde taze doku, frozen kesitler ve formalinle tespitli parafin bloklardan hazırlanan kesitler kullanılabilir (1-5). Son yıllarda, c-erbB-2'nin meme karsinomlarında değerlendirilmesinden elde edilen verilerle, c-erbB-2 proteinine karşı oluşturulan monoklonal antikor Trastuzumab (rhu Mab HER-2), c-erbB-2 ekspresyonu olan meme karsinomu olgularının tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır (6, 7).

Çalışmamızda, aksiller lenf nodülü metastazı olan ve olmayan, değişik histolojik tip ve grade'de invaziv meme karsinomu olgularındaki, hasta yaşı, tümörün histolojik tipi, çapı, grade'i, lenfovasküler invazyon, lenf nodülü tutulumu ve sayısı, östrojen reseptör varlığı gibi prognostik faktörler değerlendirilmiş, özellikle c-erbB-2 ile diğer parametreler arasındaki ilişki incelenmiştir. Bu çalışma, c-erbB-2 gen ekspresyonunun, immünohistokimyasal ve karşılaştırmalı "differential" PCR yöntemi ile incelemek, bu iki yöntemin sonuçlarını karşılaştırmak, PCR yönteminin immünohistokimya ile birlikte veya bağımsız, rutin uygulamada ki yerini araştırmak amacıyla planlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Meme Karsinomu

İnsan vücudunda meme, cilt ve cilt altı doku ile örtülü, modifiye bir ter bezidir. Pektoral kasın üzerine yerleşmiş olup, fasya ile kastan ayrılır. İşlevsel birimleri, terminal kanal - lobüler ünite (TDLU) ve geniş kanal sisteminden oluşur (1). İnternal, eksternal mammarian arter ve interkostal arterler tarafından beslenir. Venöz sistemi aksiller ven, internal mammarian ven ve interkostal venlerden oluşur. Lenfatik drenajın %75-97'si aksiller lenf nodülleri, %3-25'i internal mammarian nodülleri yoluyla sağlanır. Az miktarda posterior interkostal lenf nodüllerine de drenaj gerçekleşir (2).

Meme kanseri, kadınlarda en sık görülen malignensidir. Her 8 kadından 1'i yaşamı boyunca bu riski taşır (2).

Ülkemizde kadınlarda, meme kanseri sıklığı %23,1'dir (8).

Benign ve malign özellikteki meme tümörleri, öncelikle memenin duktus ve lobül epitellerinden, stromal elemanlardan ve nadiren lenfoid dokudan gelişebilir. Meme tümörlerinin histolojik sınıflandırmasında yaygın olarak, 1982 yılında Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) hazırladığı sınıflandırma kullanılmaktadır (2) (Tablo 1).

Tablo 1- MEME TÜMÖRLERİNDE WHO SINIFLANDIRMASI

1-EPİTELYAL TÜMÖRLER

A- Benign

1-İntraduktal papillom

2- Meme başının adenomu

3- Adenom

a-Tubuler

b-“ Lactating”

B- Malign

1-İnvaziv olmayan

- a- İntraduktal karsinom
- b- İnsitu Lobüler karsinom

2- İnvaziv

- a- İnvaziv Duktal karsinom
- b- Belirgin intraduktal komponenti olan invaziv duktal karsinom
- c- İnvaziv lobüler karsinom
- d- Müsinöz karsinom
- e- Medüller karsinom
- f- Papiller karsinom
- g- Tübüler karsinom
- h- Adenoid kistik karsinom
- i- Jüvenil sekretuar karsinom
- j- Apokrin karsinom
- k- Metaplazi gösteren karsinom
 - 1- Skuamöz tip
 - 2- Spindle hücreli tip
 - 3- Kartilajinöz ve osseöz tip
 - 4- Mikst tip

3- Meme başının Paget hastalığı

II-MİKST KONNEKTİF DOKU VE EPİTELYAL TÜMÖRLER

- A- Fibroadenom
- B- Filloides tümör “cystosarcoma phyllodes”
- C- Karsinosarkom

III- MUHTELİF TÜMÖRLER

- A- Yumuşak doku tümörleri
- B- Deri tümörleri
- C- Hemapoietik ve Lenfoid doku tümörleri

IV- SINIFLANDIRILAMAYAN TÜMÖRLER

V- MEMEDE DİSPLAZİ / FİBROKİSTİK HASTALIK

2.2 Meme Karsinomunda Prognostik Faktörler

Hasta Yaşı: 50 yaş üstü ve 35 yaş altı kadınlarda daha kötü prognoza sahiptir (1).

Gebelik: Emzirme veya gebelik döneminde ortaya çıkan meme karsinomlarının, kötü prognoza sahip olduğuna dair ortak bir görüş vardır. Beş yıllık yaşam % 15-35'dir (1).

Erken Tanı: Tarama programlarıyla saptanan asemptomatik meme karsinomlarında, 5-10 yıllık yaşam oranı % 83-88'dir. Bu oran klinik bulgularla saptanan meme karsinomunun yaşam oranından daha yüksektir (1, 2).

Tümör Boyutu: Tümörün çapı en önemli prognostik faktör olup evrelendirme'nin temel parametresidir (2). Çapı 1 cm den küçük olan tümörlerde 5 yıllık yaşam oranı % 98, çapı 2 cm'den küçük tümöre sahip ve lenf nodülü metastazı olmayan olgularda, bu oran % 96'dır. Nadir olarak, tümör çapı çok küçük olan olgularda da uzak metastaz varlığı bildirilmiştir (1, 9, 10).

Stromal İnvazyon: Memenin duktal karsinomunda, en önemli prognostik faktördür. İnvaziv ve insitu komponent içeren olgularda invaziv komponentin tümör hacmine oranı ile lenf nodülü metastazı olasılığı arasında anlamlı bir ilişki tanımlanmıştır. İnsitu komponent oranı ise, multisentrisite ve dolaylı olarak okült invazyon ile ilişkili bulunmuştur (1, 2).

Histolojik Grade: Meme karsinomunda, özellikle infiltratif duktal karsinomlarda, en çok kullanılan mikroskopik grade'leme yöntemi, Modifiye Bloom-Richardson sistemidir. Bu sistem nükleer pleomorfizm, tübül oluşumu ve mitoz sayısına dayanır (Tablo 2). Her parametreye 1-3 arası puan verilir. Verilen puanlar toplanıp tümörün grade'i tespit edilir. Grade I=3-5 puan, Grade II= 6-7 puan, Grade III=8-9 puan olarak değerlendirilir (1, 2, 9, 10, 11).

Nükleer özellikleri temel alan, nükleer grade sistemi ise büyüme paternini dikkate almadığı için tüm meme karsinomu histolojik tiplerinde uygulanabilir. Bu sisteme göre; düzgün, belirgin nükleoluslu, küçük nükleuslara sahip tümör Grade I, orta derecede büyüklükteki, düzgün nükleuslar Grade II, büyük, düzensiz, hiperkromatik nükleuslar içeren tümör ise Grade III olarak sınıflandırılır (10, 11).

Tablo-2: Modifiye Bloom-Richardson Grade Sistemi

Özellikler	Bulgular	Puan
Tübül oluşumu	% 75'den fazla	1
	%10-%75 arası	2
	%10'dan az	3
Nükleer pleomorfizm	Küçük, düzgün, uniform nükleus	1
	Nükleus boyut ve şekli orta derecede değişkenlik gösteren	2
	Belirgin şekil ve boyut değişikliği	3
Mitoz sayısı	10 büyük büyütme alanında 0-9 mitoz	1
	10-19 mitoz	2
	20 ve üstü mitoz	3

Tümörün Histolojik Tipi: Meme karsinomları, prognostik olarak iyi ve kötü tipler olarak ayrılırlar. Tümör histolojik tipi önemli olsa da tümör stage'ine etkisi yoktur. Meme karsinomunun, tübüler, müsinöz (kolloid) ve adenoid kistik karsinom tipleri, temel olarak düşük grade'lidirler. Lenf nodu metastazı yoktur veya nadirdir ve nispeten iyi prognoza sahiptirler. Kötü differansiye, taşlı yüzük hücreli, inflamatuvar karsinom, karsinosarkomlar genellikle agresif neoplazm olarak kabul edilirler. En agresif meme tümörlerinden biri olan inflamatuvar karsinom da, 5 yıllık yaşam oranı sadece %11'dir (2 ,9, 12, 13). Sıradan invaziv duktal ve lobüler meme karsinomlarının prognozları arasında fark yoktur (1). Kural olarak, düşük grade'li karsinomlar daha iyi prognoza sahip iken, yüksek grade'li karsinomlar kötü prognoza sahiptirler (2).

Tümör Sınırları : Tümörün, çevre dokuyu iterek ilerlemesi, sınır oluşturması, infiltratif bir yayılıma göre daha iyi prognozu işaret eder (1, 2).

Aksiller Lenf Nodülü Metastazı: Mastektomi uygulanan invaziv karsinomlarda, metastatik lenf nodüllerinin sayısı önemli bir prognostik faktördür. Metastatik lenf nodülü sayısı arttıkça prognoz kötüleşir. Aksiller lenf nodülü tutulumu yoksa, 5 yıllık yaşam % 82,8'dir. Bir metastatik lenf nodülü varsa bu oran % 80,1'e, 2 metastatik lenf nodülü varsa %70'e, 3

metastatik lenf nodülü varsa % 54,1'e, 7-12 metastatik lenf nodülü varsa bu oran dramatik olarak % 28,4'e düşer (2).

Sadece metastatik lenf nodülü sayısı değil, tutulan nodülün yeri, seviyesi, metastatik tümör miktarı, ektranodal yayılımın varlığı, efferent damarlarda tümör varlığı da prognozu kötü yönde etkiler (1, 2, 10, 12). Yapılan ilk kesitlerde tümör metastazı saptanmayan lenf nodüllerine uygulanan seri kesitler veya immünohistokimyasal yöntemler sonucu saptanan, mikrometastaz varlığının prognozu değiştirmedığı saptanmıştır (1, 12). Ancak yapılan bazı çalışmalar sonucu mikrometastazın, peritümöral damar invazyonu ve çapı 2 cm.'den büyük tümörlerle ilişkili olduğu sonucuna varılmıştır. İnfiltratif lobüler karsinomlu olgular hariç, mikrometastaz varlığının, lenf nodülü tutulumu olmayan olgulara kıyasla daha kötü prognoz gösterdiği rapor edilmiştir (2, 13, 14, 15, 16).

Vasküler İnvazyon: Vasküler invazyon; yüksek tümör volümü, histolojik grade, özel histolojik tip, lenf nodülü tutulumu, uzak metastaz varlığı ve kötü prognozla yakından ilişkilidir (1, 2, 9, 10, 12).

Steroid Reseptörler: Meme karsinomlarının yaklaşık üçte biri hormona bağımlıdır. Yapılan çalışmalar, hormona bağımlı meme kanserinin en kuvvetli etkeninin östrojen olduğunu göstermiştir. Postmenapozal dönemdeki kadınlarda kanda, östron ve östradiol seviyesi çok düşük olmasına rağmen karsinom olgulu meme dokusunda, plazma seviyesinden daha yüksek düzeylerde östrojen bulunur. Meme dokusundaki yüksek östrojen seviyesi, tümör içinde lokal östrojen üretimine bağlanmıştır. Postmenapozal kadınlardaki ana östrojen kaynağı, meme dokusu içinde, androstenedionun östrona dönüşümü ile oluşur. Bu dönüşümü östron sülfataz enzimi katalizler (17).

Östrojen ve Progesteron reseptörlerinin tayini, invaziv meme karsinomuna tedavi yaklaşımının standart işlemi haline gelmiştir. Östrojen reseptörü tayini çalışmaları 20 yıldır sürmektedir. Bu çalışmalar, meme kanserlerinin % 60-70'inde östrojen ekspresyon varlığını göstermiştir. Adjuvan terapi alan östrojen reseptörü pozitif olgularda, tedavi almayan olgulara göre rekürrens riski %10 azalmıştır. Aynı zamanda rekürrens/mortalite oranında da % 20-30 oranında azalma saptanmıştır (2, 18). Differansiye tümörlerde östrojen reseptör pozitifliği artmıştır ve östrojen reseptörü pozitif olguların, rölatif olarak daha iyi prognozları vardır (2).

Meme kanserlerinde, östrojen reseptör tayini gibi benzer tedavi ve prognostik amaçlarla progesteron reptör tayini de yapılmaktadır. Progesteron, biyokimyasal yöntemlerle 15 yıl önce

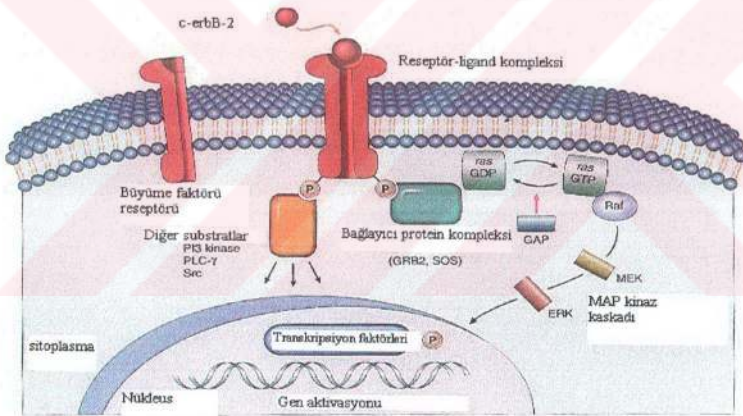
saptanmaya başlamış olup yaklaşık 10 yıldır progesterona karşı monoklonal antikörlerin bulunmasıyla, immünohistokimyasal yöntemlerle reseptörün tayini yapılmaktadır (18). Primer metastatik meme kanserlerinin yaklaşık % 45-60'ı progesteron içerir. Östrojen ve progesteron reseptörlerinin tümörde birlikte varlığı, endokrin tedaviye cevap oranını, sadece östrojen pozitifliğinde olan % 55'den % 75-80'e kadar çıkarır. Meme karsinomunun prognozunda, progesteron en az östrojen kadar değerlidir. Tümör hücrelerindeki progesteron kaybı kötü prognozla ilişkilidir. Östrojen negatif, Progesteron pozitif tümörlerin yaklaşık % 46'sı endokrin tedaviye iyi yanıt vermektedir. Sonuç olarak, östrojen ve progesteron reseptörlerinin beraber tayini, hem tedavi yaklaşımına karar vermek, hemde bağımsız prognostik özellikler açısından gereklidir (1, 2, 10, 18).

c-erbB-2 (Her-2/neu): Onkogen olan v-erbB geni, kuşlara ait bir eritroblastosis virüsüdür, ve tavuklarda eritroblastosis ve sarkomların oluşumunu indükler. Tirozin kinaz aktivitesine sahip, 170 kilodalton ağırlığındaki glikoprotein olan "Epidermal Growth Factor" (EGF) reseptör geninden ortaya çıkmıştır (16). v-erbB geni ile ilişkili olan c-erbB-2 geni ilk kez etil-nitrosoüre ile indüklenerek oluşturulan, sıçan nöroblastomalarında transforming onkogen olarak tanımlandığı için "neu" diye adlandırılmıştır (17). Semba ve arkadaşları insanda v-erbB geniyle ilişkili olan 17 nolu kromozomun q21'de yerleşmiş olan c-erbB-2 genini bulmuşlardır (19).

c-erbB-2 (HER-2/neu) geni, büyüme faktör reseptörleri ile yakın ilişkili, dört kişilik bir ailenin elemanıdır. Herbiri yüzey reseptörlerinin aracılığı ile hücre membranındaki tirozin kinaz reseptörünün ligandlarına bağlanır. Bu ligandlara "neu differentiation" veya "heregulin" adı verilir (Tablo 3) (4, 5). c-erbB-2, Klas I büyüme faktör reseptör tirozin kinaz ailesinden 185-kilodalton ağırlığındaki transmembran proteinini kodlar (2, 4, 5, 20). Hücre membranında bulunan transmembran protein tirozin kinaz reseptörü, N- uç ekstrasellüler ligand bağlayıcı alan, tek transmembran α helix ve kinaz aktivitesi olan sitozolik c- uç bölgesinden oluşur. Bu reseptörlerin en büyük özellikleri, ligandın bağlanmasıyla dimer oluşturmalarıdır. Bu yolla reseptörün otofosforilasyonu oluşur. Reseptör fosforilasyonu, hedef proteinlerinin fosforilasyonuna yol açar ve hücre içi sinyal ileti yolları tetiklenmiş olur. Artmış reseptör ekspresyonu genin amplifikasyonuna neden olur (Şekil 1). Genin amplifikasyonu, c-erbB-2 haberci RNA ve P185 proteinin aşırı ekspresyonuna yol açar. Artmış olan bu protein ekspresyonu immünohistokimyasal yöntemle, tümör hücresinde yoğun hücre membranının boyanması şeklinde izlenir (5, 20).

Tablo 3: HER (erb) Gen ailesi

Gen	Ligand
HER-1 (c-erbB-B1)	“Epidermal growth factor” “Transforming growth factor- α ” “ β -Cellulin” “Heparin binding growth factor” “Amphiregulin”
HER-2 (c-erbB-2)	“Heregulin”
HER-3 (c-erbB-3)	“Heregulin neu differentiation factor-1 and 2”
HER-4 (c-erbB-4)	“Heregulin neu differentiation factor-1 and 2”



Şekil 1. C-erbB-2'nin hücre membran reseptörü ve hücre içi sinyallerini kullanan etki mekanizması

İnsan meme kansinömlarının %30'unda, c-erbB-2'nin amplifikasyonu (2 kat veya daha fazla) bulunur. Bu amplifikasyon, prognoz ve lenf nodülü metastazlı olgulardaki relaps ile ilişkilidir. c-erbB-2 ekspresyonu; kötü histolojik grade, aksiller lenf nodüllerinin tutulumu ve tutulan lenf nodülü sayısı ile doğru orantılı, östrojen ve progesteron reseptörü ile ters

orantılıdır. Her-2 onkogen amplifikasyonu, östrojen ve progesteron reseptör yokluğu ile ilişkilidir. c-erbB-2 ekspresyonu ve "ploidy" arasında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır. Amplifikasyon, tümör grade'nin her bir komponentiyle (tümörün paterni, nükleer atipi, mitoz sayısı) yakın ilişkilidir. Primer tümörde c-erbB-2 ekspresyonu görülmese dahi metastazlarında görülebilir. Bunun aksine eğer primer tümör c-erbB-2 proteinini eksprese ediyorsa bu kapasite tümörün tüm metastazlarında da izlenir (2).

Meme karsinomunda Her-2/neu anormallikleri, uygulanan çeşitli yöntemlerle tespit edilmektedir. Bunlar gene dayalı teknikler, "Southern ve Slot blot" testi, PCR, FISH, "nonfluorescan" teknikleridir. Kalitatif ve kantitatif Her-2/neu ölçümleri, frozen kesitlere ve formalinle tespitli-parafin bloklardan hazırlanan örneklerde immünohistokimyasal yöntemlerle, "Western blot" testi ve ELISA ile yapılır (3, 4).

Aşırı c-erbB-2 ekspresyonu gösteren meme karsinomlarında adjuvan kemoterapiye anlamlı bir cevap izlenmektedir. Fakat, ekspresyonu olmayan veya minimal olan olgularda kemoterapiye cevap izlenmez (2).

c-erbB-2'nin aşırı ekspresyonu, yalnız meme karsinomlarında değil, mide, prostat, böbrek, over karsinomlarında da gösterilmiştir (21, 22, 23).

c-erbB-2 ve kemoterapi: Metastatik meme karsinomunda, c-erbB-2 eksprese eden olgularda son yıllarda tedavi protokollerine yeni bir anlayış gelmiştir. Tedavide c-erbB-2'ye dayanan çeşitli yaklaşımlar vardır; 1) Tek başına veya kombine kullanılan büyüme reseptörü inhibitörleri, 2) Fosforilasyonu engelleyerek sinyal iletimini engelleyen tirozin kinaz inhibitörleri 3) Bazı hastalarda c-erbB-2 immünojenik olduğu için, aktif immünoterapi kullanımıdır (24). Son yıllarda geliştirilen rhuMab HER-2, doğrudan c-erbB-2 proteinine karşı oluşturulmuş, monoklonal bir antikordur. 2000 yılında yapılan bir çalışmada, Trastuzumab ile kemoterapinin beraber uygulanmasının, metastatik meme karsinomlarının yaşam süresini olumlu yönde etkilediği gösterilmiştir (25). Bunun yanı sıra, c-erbB-2'ye karşı geliştirilmiş proplar ile gen tedavisi ve c-erbB-2 protein aşısı da halen çalışma aşamasındadır (3,4).

Cathepsin D: Asidik lizozomal bir proteaz olup, meme kanser hücreleri tarafından üretilip, salgılanmaktadır. Son yıllarda Cathepsin D'ye olan ilgi artmıştır. Cathepsin D, normal hücrelerden, 52 kilodalton ağırlığında bir prekürsör olarak salgınır. Hücre büyümesini indükleyici etkisi ve ekstrasellüler proteolitik aktivitesi vardır. Bu özellikleri ile meme kanserinde prognostik açıdan önemli olabilir. Bu enzimin aşırı salgınının (>70 pmol/mg protein),

agresif tümör davranışı ve relapsis geçen zaman ile ilişkili olduğuna dair görüşler vardır. Fagositik aktivitesi yüksek olan meme kanserlerinde, artmış olan Cathepsin D değeri, normalde fagositik hücrelerde bulunan lizozomal proteazlarla ilişkili olabilir. Cathepsin D ve Her2/neu onkogeni arasında ilişki bulunmaz iken, c-myc amplifikasyonu ile arasında korelasyon vardır. Bu görüşler sonucunda, Tümör Marker Grubu (ASCO), meme kanserinde tedavi planlanmasında Cathepsin D ölçümünün, yer alması gerektiği kararını almıştır (1, 2).

Onkosüpresör gen p53: Üzerinde en fazla çalışılmış bir tümör süpresör gen olup kromozom 17p13.1 üzerinde lokalizedir. İnsan tümörlerinin bir çoğunda p53 mutasyonları gözlenir. Nükleusta lokalizedir ve harekete geçtiğinde ana işlevi, pek çok genin transkripsiyonunu kontrol etmektir. “Wild” tip p53 normal hücrelerde düşük seviyelerde bulunur ve hücre siklusü, DNA sentez ve tamirinde, apoptosiste rol alır. p53’de görülen mutasyon, normalde 20 dakika olan yarılanma ömrünü uzatır ve nükleusta birikimine yol açar. Bu birikim immünohistokimyasal yöntemlerle saptanabilir. Meme karsinomunda, p53’ün aşırı ekspresyonu yaşam süresini kısaltır (2). p53, yüksek riskli meme kanserli olgularda güçlü ve bağımsız bir prognostik faktördür ancak daha düşük riskli ve standart tedavi alacak olguların belirlenmesi için uygun değildir (1, 2).

Anjiogenesis: Normalde hücre çoğalması, gelişmesi ve yara iyileşmesinde izlenen anjiogenesis; ekstrasellüler matriksin yeniden şekillenmesi, endotelial hücrelerin göçü ve proliferasyonunda yer alır. Tüm bu işlevler, anjiogenetik faktörler tarafından kontrol edilir. Anjiogenesis, aynı zamanda tümörün büyümesinde de gereklidir. Solid tümörlerin 2-3 mm³ üzerindeki büyüklüğe ulaşabilmeleri için, anjiogenesis şarttır. Tümörün yayılımı, yeni oluşmuş vasküler kanallarla teması olan hücrelerin, bu kanallar yoluyla dolaşıma katılmasıyla meydana gelir. Anjiogenesis yeteneği olan bir çok faktör invivo ve invitro olarak gösterilmiştir. Bunlar; “Vascular endothelial growth factor (VEGF)”, “Platelet derived endothelial cell growth factor (pdECGF)”, “Epidermal growth factor (EGF)”, “Transforming growth factor (TGF)”, “Tumor necrosis factor (TNF)”, “Prostaglandinler (PG)” ve bunlarla ilişkili faktörlerdir. İnvasiv meme karsinomlarında, damarlanmanın en yoğun olduğu alanlar, immünohistokimyasal olarak boyanıp, yeni oluşan mikrodamarların sayılması ile belirlenen anjiogenesis, erken evrede anlamlı bir prognostik faktör olarak değerlendirilmektedir (2, 9, 10).

Evrelendirme: Meme kanserinin evrelendirilmesi, tedavi şeklinin belirlenmesi için gereklidir. Evrelendirmede, primer tümör çapı (T), bölgesel lenf nodülü tutulumu (N) ve uzak metastaz (M) varlığı kullanılır. TNM ilk kez 1954 yılında “International Union Against Cancer (UICC)” tarafından tanımlanmıştır. 1997 yılında TNM sınıflandırmasında yeni versiyonlar oluşturulmuştur (Tablo 4)(2). Meme kanserinin TNM evrelendirmesi aşağıdaki şekildedir;

Tablo 4: Meme kanserlerinin TNM klasifikasyonuna göre Evrelendirilmesi

Stage 0	Tis (insitu karsinom)	N0	M0
Stage 1	T1	N0	M0
Stage IIA	T0	N1	M0
	T1	N1(2)	M0
	T2	N0	M0
Stage IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
Stage IIIA	T0	N2	M0
	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1,N2	M0
Stage IIIB	T4	N (herhangi biri)	M0
	T(herhangi biri)	N3	M0
Stage IV	T(herhangi biri)	N(herhangi biri)	M1

Tis: İnsitu karsinom,

T1: ≤ 2cm,

T2: >2-5 cm.,

T3: > 5 cm.,

T4: göğüs duvarı, cilt invazyonu,

N1: Aynı taraf aksillada hareketli lenf nodülü tutulumu,

PN1a: Mikrometastaz (0.2 cm.den küçük),

PN1b: Gross metastaz,

PN1bi: 1-3 lenf nodülünde, en büyük çapı 0,2 cm.-2 cm. arası olan metastaz

PN1bii: 4 veya daha fazla lenf nodülünde 0,2 cm.-2 cm metastaz

PN1biii: kapsül invazyonu olup 2 cm.'den küçük metastaz içeren lenf nodülü

PN1biv: : Bir lenf noduna en büyük çapı 2 cm. veya daha fazla olan metastaz

N2: Aynı taraf aksilladaki metastatik lenf nodüllerinin, birbirlerine veya çevre dokulara yapışarak fikse olması,

N3: Aynı taraf internal mammarian lenf nodüllerine metastaz

2.3 Polimeraz Zincir Reaksiyonu

DNA ilk kez Miescher tarafından 1869 yılında izole edilmiş ancak, tanımı 1953 yılında Watson ve Crick tarafından yapılmıştır. DNA, birbirine deoksiriboz-fosfat ile zincir şeklinde bağlanmış, sarmal bir yapı oluşturan iki nükleotit zincirden oluşur. Her bir zincirdeki nükleotit bazlar, karşı zincirdeki nükleotit bazlara hidrojen bağları ile bağlıdır. Timidin baz DNA'da Adeninle (RNA'da Üridin), Guanin baz ise Sitozin'le bağlanır. İki baz arasındaki bağlar ısı ile kırılır ve bu iki karşılıklı baz "DNA erimesi" veya "denatürasyonu" denen yöntemle birbirinden ayrılır. Her iki zincirin soğumasıyla tekrar bir araya gelirler "renatürasyon" (26, 27).

PCR, herhangi bir spesifik DNA diziliminin birkaç saat içinde milyonlarca kopyasını sağlayan bir tekniktir. Bu teknik Khorana ve arkadaşları tarafından 1970 yılında tarif edilmiştir. Ancak hayata geçirilmesi ve PCR ismini alması Kary Mullis tarafından 1983 yılında gerçekleşmiştir (26).

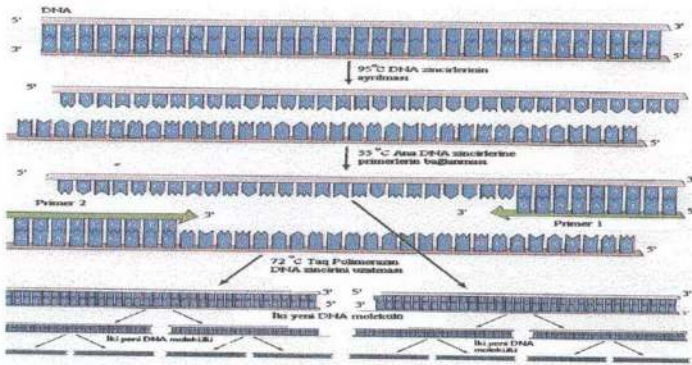
PCR uygulamak için gerekli olan kaynaklar; saflaştırılmış DNA veya mRNA, DNA Polimeraz, tampon solüsyonları, DNA sentezinde kullanılacak olan tek nükleotitler, oligonükleotit primerler, reaksiyon ısını hızlı bir şekilde değiştirecek olan ısıtıcı (Thermal Cycler) ve uygun bir DNA tespit sistemidir. Kuşkusuz en önemli ve gerekli olan basamak uygun primer oligonükleotitlerin kullanımıdır. PCR kullanımını sınırlayan teknik koşullardan birisi de, çoğaltılmak istenen DNA'nın uzunluğudur. İki primer dizilim arasındaki maksimum uzunluk yaklaşık 2000 baz çiftidir (2kb). 2 kb'dan daha büyük bir alan çoğaltılmak istendiği takdirde, PCR'ın etkinliği önemli bir ölçüde azalır. En etkili PCR, her birinde 200-500 baz çifti içeren primerlerin kullanımı ile olur (28, 29).

PCR metodunun temeli tekrarlayan sıklara dayalıdır. Her bir sıklus üç temel basamak içerir;

- Çift sarmallı DNA'nın denatürasyonu
- Oligonükleotid primerlerinin bağlanması
- DNA Polimeraz kullanarak, primer uzama

İlk basamakta, çalışılacak olan DNA örneğinin sıcaklığı 90 °C'nin üstüne çıkarılıp DNA'nın her iki zincirinin birbirinden ayrılarak denatüre olması sağlanır. Sıcaklık düşene kadar ikiye ayrılan DNA'nın her bir zinciri solüsyonda serbest olarak bulunur. İkinci basamakta, sıcaklığın 72 °C'e düşmesiyle, ortamdaki oligonükleotid primerler hızlı bir şekilde denatüre olmuş örnekteki tek zincir üstünde karşılığı gelen bölgeye bağlanır. Bu primerler, çoğaltılacak olan DNA'ya spesifik olarak bağlanan iki adet oligonükleotit parçalarıdır. Kısa tek sarmallı DNA'dan oluşurlar. Karşılığındaki DNA zinciriyle etkileşime girerler ve birbirleriyle bağlanmazlar. Siklüsün son basamağı, yeni oluşmuş DNA zincirinin primer uzamasıdır. Primer-DNA kompleksine bağlanan, DNA'yı 5' den 3' yönüne doğru uzatan DNA Polimeraz'ın kullanımı, bu basamak için gereklidir. İşlemin yürümesi için gerekli olan bu DNA Polimeraz, ısıya dayanıklı olmalıdır. 98 °C' ye kadar dayanıklı olan ve denatüre olmayan Taq DNA Polimeraz'ı PCR tekniğinde kullanılır (27,28,29,30).

Taq DNA Polimeraz, termofilik bir organizma olan *Thermus aquaticus*'dan izole edilmiştir. Ortam ısısı yükseldikçe DNA ile dışardan oluşabilecek nonspesifik bağlanmalar denatürasyon yoluyla elimine edilirken, ısıya dayanıklı Taq DNA Polimeraz sayesinde primer-DNA kompleksi bütünlüğünü korur. Bu sentez basamağı tamamlandıktan sonra, reaksiyonun derecesi tekrar yükseltilir ve yeni sentezlenmiş olan DNA zincirleri denatüre olarak tüm basamaklar tekrarlanır. Tipik bir PCR analizinde 20-40 siklüs uygulanır ve sonuçta gen ürününün 1 milyon kez katlanarak çoğalması sağlanır (27-30)(Şekil 2).



Şekil 2: PCR yönteminin şeması

Amplifikasyonun ilk basamağında oluşan ürünün uzunluğu, yalnızca DNA Polimeraz'ın fonksiyonel olduğu zamana bağlıdır. İlk DNA "uzun ürün" adını alır. Tekrarlayan siklüslerle, DNA Polimeraz bir önceki başlama noktasında sonlanır ve her yeni siklüste daha küçük DNA parçalarından oluşan "kısa ürün" meydana gelir. Temel araştırmaların yapıldığı kısım DNA'nın "kısa ürün"üdür. Reaksiyonda, orijinal DNA kalıbı tek bir parça olduğu için "uzun ürün" aritmetik olarak çoğalır, buna rağmen "kısa ürün" katlanarak artar. 20-40 siklüsün sonunda baskın olan çoğalmış gen, oligonükleotid primerlerin lokalizasyonu ile belirlenen kısa üründür. Bu nedenle, istenen ürünün çoğalmasını sağlamak için primerlerin dikkatli belirlenmesi zorunludur (30).

Primerler: PCR reaksiyonunun başarılı olmasındaki en önemli faktörlerden birisidir. Primerler doğru olarak sentez edilmemişse deney başarısızlığa uğrayacak veya yanlış bölge, yada birden çok bölgeler amplifiye olacaktır. Primerlerin sentezinde şu kriterler göz önünde bulundurulmalıdır (31):

- 1- Kendi aralarında ve içlerinde komplementer diziler taşıması
- 2- 3' uçlarında T(Timidin) bulunmaması (T nükleotid yanlış eşleşmeye duyarlıdır)
- 3- GC (Guanin-Sitozin) oranının %40-60 arasında olması
- 4- Dizinin 1-2 pürin bazı ile başlayıp bitmesi
- 5- Bir bazın 4'den fazla arkaya gelmemesi

Kalıp DNA: Amplifiye edilecek gen veya gen parçası için ana kalıp (template) olarak görev yapar. Primere göre belli bir konsantrasyonda olmalıdır. Kalıp DNA parçasının uzunluğu 2 kb'dan daha büyük olmamalıdır (ideal olanı 1kb uzunluktur). Standart PCR teknikleri ile 10 kb'a kadar olan DNA parçaları amplifiye edilebilmektedir, fakat parça büyüdükçe amplifikasyon verimi düşmekte ve istenen sonucu elde etmek zorlaşmaktadır (31).

Reaksiyon Tamponu: Reaksiyon ortamının iyonik direnci, pH'sı ve enzimatik reaksiyonlar için gereken her şey tampon solüsyonu ile ayarlanır. Daha iyi verim alabilmek ve bir takım olumsuzlukların önüne geçebilmek için reaksiyon karışımına ekstra maddeler (gliserol gibi) ilave edilebilir. PCR tamponundaki en önemli (anahtar) değişken Mg^{+2} konsantrasyonudur. Ürünün hem özgülüğü hem de kalitesi ile ilgilidir. Düşük ve yüksek konsantrasyonlar reaksiyonu farklı şekillerde etkiler. Yüksek Mg^{+2} konsantrasyonu çift iplikli DNA'yı stabilize eder ve tam olarak denatüre olmasını önler, aynı zamanda primerlerin yanlış bölgelere bağlanmasına neden olur. Düşük Mg^{+2} konsantrasyonlarında (0,5 M'dan düşük) ise, Mg^{+2} birçok DNA polimeraz ve bütün termostabl polimerazlar için kofaktör olarak işlev yaptığı için polimerizasyonu zayıflatır (30, 31).

PCR döngüleri üç evreye ayrılır:

- **Başlangıç Evresi** Primerlerin 3' uçlarının kalıp DNA molekülüne sentezin başlamasına yetecek kadar bir sürede bağlı kalarak, havuzdaki her kalıp molekülden uzun tek iplikli DNA moleküllerinin sentezlendiği döngülerdir. Bu evrede sentezlenen moleküller bir ucundan primerle sınırlanmış ve oldukça uzundur. Daha sonraki döngülerde yalnız istenen bölgenin amplifikasyonu için başlangıç döngüleri çok önemlidir, çünkü ürünün özgülüğünü belirler. Başarılı sonuç alabilmek için kullanılan primerler komplementer bölgelerine çok iyi, fakat kalıp DNA'nın diğer bölgelerine çok zayıf bir şekilde bağlanmalıdır (28, 30, 31).
- **Katlanarak (Ekspansiyon) Artış Evresi:** Bu döngülerde tercih edilen kalıp DNA çoğunlukla ikinci döngüden itibaren primerlerle sınırlandırılmış olan segmentlerdir. Bu evrede primerlerin homolog bölge bulmaları oldukça kolaylaşmıştır. Bu evrede tanınan döngü süresince (ideal döngü sayısı 20-30 arasında olmalıdır) ürün artışı katlamalıdır (28, 30, 31).
- **Plato Evresi:** Reaksiyon ürünleri biriktikçe ortamdaki enzimin hemen hepsi işgal edilir ve primer/kalıp oranı düşer, DNA iplikleri birbirleriyle birleşmeye başlar. Ürünler primerlerden daha uzun olduğu için, daha yüksek sıcaklıklarda uzama (annealing) olur. Kalıp

moleküllerin birbirleri ile birleşmesi arttıkça ve enzim miktarı yetersiz kaldıkça reaksiyon doygunluk evresine (plato evresi) gelir ve katlamalı artış durur(28, 30, 31).

PCR yöntemi, DNA çoğaltması için düşünülmüş olsa bile mRNA da bu yöntemle çoğaltılabilir. mRNA çoğaltılması için uygulanacak olan ilk basamak ters transkriptaz enzimi kullanarak mRNA'dan "complementary DNA" (cDNA) oluşturmaktır. Yeni sentezlenecek olan cDNA, aynı PCR yöntemi uygulanarak çoğaltılır (28, 29, 30).

PCR işlemi tamamlandıktan sonraki basamak, oluşan özgün, çoğaltılmış DNA'nın varlığını göstermektir. Sıklıkla bu aşamada, agaroz jel elektroforezi veya Southern blotting sistemi kullanılır.

Agaroz Jel Elektroforez: Oluşan PCR ürünü direkt olarak etidyum bromür ile boyanmış agaroz jelin üzerine yerleştirilir. Yaklaşık 1 milyon subgenomik parçaya bölünmüş olan DNA'nın her bir parçası, elektroforez sırasında jelin üzerinde ayrılır. Boyutlarına göre her bir DNA parçası ayrı olarak katoda doğru hareket eder. Elektroforetik ayrılma tamamlandıktan sonra, DNA'daki etidyum boyası ultraviyole ışınları ile aktif hale getirilip, saptanır (30, 31).

Southern Blotting: Ed Southern tarafından geliştirilmiş bir tekniktir (30). Ethidium-Bromid'le boyanmış jelde nonspesifik amplifikasyon oluşursa, veya DNA'nın boyutunun çok ağır olduğu koşullarda Southern blot tekniği, PCR ürününün tespiti için kullanılır. Analizi yapılacak olan DNA endonükleaz enzimleriyle küçük parçalara ayrılır. Parçalar halindeki DNA, jel elektroforezinde yürütülür. Jel elektroforezinden sonra jelin üzeri, nitrosellüloz filtre veya naylon membranla kaplanır. DNA parçaları, jelden membrana difüzyon yoluyla geçer. Membran, işaretlenmiş prob ile inkübe edilerek x-ray filmde görüntülenir (31).

PCR TEKNİKLERİ

"Reverse Transcription PCR" (RT-PCR)

RT- PCR en hassas olan yöntemlerden birisidir. Hedef alınan RNA'yı tespit etmek için kullanılır. RT-PCR tekniği iki basamaktan oluşur: reverse transkripsiyon ve DNA amplifikasyonu. Reverse transkriptaz enzimi kullanarak RNA'nın "complementary DNA" (cDNA)'ya dönüştürülmesi, bu tekniğin ilk basamağıdır. Yeni oluşturulmuş olan cDNA standart PCR yöntemi kullanılarak çoğaltılır (26, 28).

“Multiplex PCR”

Aynı reaksiyonda iki veya daha fazla primer setin kullanıldığı bir tekniktir. Bu sistem, değişik sayıda farklı dizilimlerin tespiti için kullanılır. Tek DNA örneğinden iki patojenik virüsün izole edilmesi buna örnek olarak verilebilir. Agaroz jelde iki ürünü de tespit etmek için, özellikle farklı boyutlar da olmalarına özen gösterilmelidir (28).

“Differential (Karşılaştırmalı) PCR”: İki primerin kullanıldığı “Multiplex PCR” yöntemidir. Hedef olan genin yanında, bilinen bir referans gen, aynı PCR reaksiyonunda amplifiye edilir. Hedef genin, referans gen amplifikasyonuna oranının tespit edildiği semikantitatif bir yöntemdir (32, 33).

“Nested PCR (nPCR)”

Polimeraz Zincir Reaksiyonunun hassasiyeti, çalışılacak olan örnekteki ana DNA’nın kötü kalitede olması veya düşük sayıda kopyalanması ile yakından ilişkilidir. Hassasiyet ve özgüllük, nPCR yönteminin kullanılması ile arttırılır. nPCR’da iki ayrı amplifikasyon kullanılır. İlk basamakta, büyük ürün oluşturmak için primerler kullanılır. Çoğaltılacak olan bu ürün, ikinci amplifikasyon için temel DNA kalıbını oluşturacaktır. Oluşan bu DNA’da ikinci bir grup primer kullanımı ile daha küçük DNA örneklerinin amplifikasyonu gerçekleşecektir. Son ürünün kalitesi, işlemin ilk basamağındaki ana DNA’ya bağlıdır. Bu yöntemle, ilk basamakta oluşturulan DNA dizilimi, daha kaliteli son ürünün oluşmasına olanak vermektedir. İki basamakta da kullanılan amplifikasyon siklusları nPCR’ın standart PCR’dan daha hassas bir teknik olmasını sağlar. Örneğin kemik iliği transplantında insan sitemegalovirüs “mtr II early” geni, standart PCR ile değil nPCR ile gösterilebilmiştir (26, 28, 35).

“Inverse PCR (IPCR)”

Standart PCR’da, uygulanan primerlerin karşılık geldiği, primer uzama sınırlarının içindeki, bilinen zincirin çoğaltılması gerçekleştirilir. IPCR primer uzama sınırlarının dışında da DNA çoğaltılmasına dayanan bir yöntemdir. Özellikle viral kanserogenesis de kullanılır (28).

PCR'IN KULLANIM ALANLARI

Polimeraz Zincir Reaksiyonu'nun tıp alanında kullanım sahası oldukça geniştir. Temel kullanım alanları aşağıda verilmiştir;

- **Translokasyonların tespiti:** PCR, translokasyonların tespitinde, Southern Blotting tekniğinden 10 000 kat daha fazla sensitif bir yöntemdir. Özellikle hematopoietik tümörlerdeki translokasyonların tespiti için sık kullanılır. Örneğin, folliküler lenfoma'da t(14;18) gibi (1, 29).
- **Onkogen aktivasyonu:** Uygun primerler kullanarak, tirozin kinaz ailesi gibi potansiyel onkogenlerin, PCR ile çoğaltılması sağlanır. Örn: Nöroblastom'da N-myc, meme kansinomunda c-erbB-2 amplifikasyonu gibi (1).
- **Klonalite:** T ve B hücre proliferasyonlarında, monoklonal ve poliklonal çoğalmanın ayırt edilmesi için kullanılır (1).
- **Nokta mutasyonları:** Tümörlerde oluşan nokta mutasyonlarının tespiti için PCR tekniği kullanılır. Örn: pankreas kansinomunda aktif ras geninin tespiti (1).
- **Tümör süpresör genlerdeki anormalliklerin tespitinde** PCR tekniği kullanılır. P53, Retinoblastom geni (Rb) gibi (1).
- **Tümörlerde viral etiyoloji:** Tümörlerin etiyopatogenezinde rolü olan virüslerin saptanması için uygun bir yöntemdir. Örn: Skuamöz hücreli kansinomlarda HPV, malign lenfomalarda EBV tespiti (1).
- **Enfeksiyon Hastalıkları:** Enfeksiyöz hastalıklarda PCR sıklıkla viral hastalıkların tespiti için kullanılır. Bu teknik, kültürün zor olduğu koşullarda çok değerli ve hassas bir yöntemdir. Human T-cell lymphotropic virus (HTLV-1), Epstein-Barr virüs (EBV),

hepatit B virüsü, sitomegalovirüs (CMV), human papilloma virüs (HPV) PCR ile tespit edilebilen enfeksiyöz ajanlardır.

- **Prenatal tanı:** Amniosentez veya koryonik villüs biyopsisi ile alınan materyalde, PCR tekniği ile çeşitli genetik geçişli hastalıkları tespit etmek mümkündür (30).
- **Adli Tıp:** Giysi üzerindeki kan damlaları ve saç örneğinden, PCR ile DNA amplifiye edilebilir. Bu amaçla, adli tıp bir kullanım sahasıdır (34).
- **Antropoloji:** Dünya popülasyonunun hareketlerini izleyen antropolojik çalışmalarda da PCR tekniği kullanılır. Bu yöntemle, nesli tükenmiş hayvanlara ait, 13 000 yaşında DNA amplifiye edilmiştir (36).



3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalında 1996-2001 yılları arasında tanı almış, 60 adet meme kanseri olgusu, 30 invaziv duktal, 30 invaziv lobüler karsinom, çalışma grubuna alınmıştır. İnvaziv duktal ve invaziv lobüler karsinom olgularından toplam 30 olguda aksiller lenf nodülü metastazı mevcuttur. Bir adet fibroadenom ve bir adet fibrokistik hastalık olgusu PCR ve İmmünohistokimya yöntemlerinin kontrolü amacıyla çalışmaya alınmıştır (tablo 5).

Tablo 5: İncelenen 60 olgunun histolojik tanılarına göre dağılımı

Histolojik Tanı	Olgu Sayısı
İnvaziv Duktal Karsinom, aksiller lenf nodülü metastazı içeren	15
İnvaziv Duktal Karsinom, aksiller lenf nodülü metastazı içermeyen	15
İnvaziv Lobüler Karsinom, aksiller lenf nodülü metastazı içeren	15
İnvaziv Lobüler Karsinom, aksiller lenf nodülü metastazı içermeyen	15
Toplam	60

Mastektomi materyalleri %10'luk formaldehit de tespit edildikten sonra, rutin takip işlemlerinden geçirildi. Parafin doku bloklarından yapılan beş mikron (μ) kalınlıktaki histolojik kesitler Hematoksilen – Eozin (H+E) ile boyandı.

Çalışma grubuna alınan olguların (60 invaziv meme kanseri, 2 kontrol) parafin bloklarından hazırlanan kesitlere Avidin-Biotin kompleks immünperoksidaz yöntemi ile c-erbB-2 (Dako A 0485), Östrojen reseptörü (Novacastra NCL-ER-6F11) uygulandı. Hazırlanan örnekler ışık mikroskopunda değerlendirildi.

Ayrıca olguların parafin bloklarından hazırlanan kesitlere PCR yöntemiyle c-erbB-2 onkogeninin amplifikasyonu yapılarak, c-erbB-2/dopamin reseptör elektroforetik bandlarının yoğunluğu semikantitatif olarak hesaplandı.

“STREPT AVIDİN-BİOTİN” BOYAMA YÖNTEMİ

(c-erbB-2 VE ÖSTROJEN RESEPTÖRÜNÜN DOKUDA GÖSTERİLMESİ İÇİN)

Dokuların Hazırlanması:

Tümörü temsil eden örnekleri içeren parafin bloklardan, lam üzerine beş mikron kalınlığında kesitler alındı. Kesitler deparafinize edilip alkollerden geçirildikten sonra fosfat tamponlu salinde (PBS, pH 7,4) yıkandı. Her kesitin çevresi kurutulduktan sonra, kesitler nemli ortama konuldu. Bu evreden başlayarak her basamakta kurutma işlemi tekrarlandı.

Boyama Evreleri:

- 1- Her kesitin üzerini tamamen kaplayacak şekilde 2-3 damla “Peroksidaz Blocking Reagent” (%3’lük H_2O_2 ’li metanol) damlatılarak 30 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Burada amaç, ortamda mevcut endojen peroksitleri yok ederek nonspesifik zemin boyanmasını azaltmaktır.
- 2- Distile suda 3-5 dakika yıkandı.
- 3- Kesitler 10 nM sitrat tampon (pH 6,0) içerisine konularak mikrodalga fırında 8-9 dakika antijen retriviel yapıldı.
- 4- Mikrodalga fırından çıkarılan kesitler oda ısısına gelene kadar sitrat tampon içerisinde 20 dakika bekletildi.
- 5- PBS’de 2-3 dakika tutularak yıkandı.
- 6- Kesitlerin kenarı silinerek asit üre solüsyonu damlatıldı ve 20-30 dakika bekletildi.
- 7- Musluk suyundan geçirilen kesitler 2-3 dakika da PBS’de yıkandı.
- 8- Dokuların kenarı silinerek protein blokajı için keçi serumu damlatılarak 20 dakika bekletildi.
- 9- Kesitler PBS’de yıkanmadan direkt olarak üzerindeki fazla protein blok dökülerek kenarları silindi;
 - a). C-erbB-2 onkoprotein boyanması için: 1/150 dilüsyonda anti-c-erbB-2 antikoru (Dako A0485) damlatılarak oda ısısında 1,5 saat inkübe edildi.
 - b). Östrojen reseptör boyanması için: 1/60 dilüsyonda östrojen reseptör monoklonal antikoru (Novacastro NCL-ER- 6F11) damlatılarak oda ısısında 1,5 saat inkübe edildi.
- 10- PBS ile 2-3 dakika yıkandı.

- 11- Kesitlerin kenarı silinerek Multilink Biotin Link (Dako K0675) dokuların üzerini kaplayacak şekilde damlatılarak 30 dakika bekletildi.
- 12- PBS ile 2-3 dakika yıkandı.
- 13- “Strept Avidin HRP conjugated”(K0675) damlatıldı ve 30 dakika inkübe edildi.
- 14- PBS ile 5 dakika yıkandı.
- 15- AEC substrat (Dako, AEC substrate, K0696) ile inkübe edildi.
- 16- Örneklerde, 10-15 dakika sonunda mikroskop altında boyanma olup olmadığı kontrol edildi.
- 17- Distile su ile reaksiyon durduruldu ve yıkandı.
- 18- Mayer Hematoksilen ile 1-2 dakika zemin boyaması yapıldı ve musluk suyunda 2-5 dakika yıkandı.
- 19- Kesitler gliserin jel ile kapatılarak mikroskopik incelemeye hazır hale getirildi.

KARŞILAŞTIRMALI PCR YÖNTEMİ İLE c-erbB-2 AMPLİFİKASYONU

Dokudan Parafinin Uzaklaştırılması:

- 1- Sadece tümörü temsil eden, etrafında normal alan bulunmayan, parafin bloklardan hazırlanan 10 µ kalınlığındaki 5 adet kesit, 1,5 ml’lik ependorf tüpüne alındı.
- 2- Her tüpe 1 ml ksilol eklenip, 30 saniye vorteksle karıştırıldı. Oda ısısında 30 dakika inkübe edildikten sonra 5 dakika 13 000 rpm’de santrifüj edilip, ksilol uzaklaştırıldı.
- 3- Bir önceki basamak tekrarlandı.
- 4-Tüp içindeki dokuya iki kez 1 ml %99,7 etanol eklenip, oda ısısında 13 000 rpm’de 5 dakika santrifüj edildi.
- 5- Alkol uzaklaştırıldıktan sonra, parafilmle tüpün üzeri kapatılıp, steril iğne ile delindi ve oda ısısında 2 saat kurumaya bırakıldı.

DNA İzolasyonu:

- 1- Dokular 392 µl “Digestion Buffer” (pH:8,5) ile sulandırıldı. 8 µl Proteinaz K (40 mg/ml stok solüsyon, Promega V 3021) eklendi ve 55 °C’lik su banyosunda bir gece bekletildi.
- 2- Doku parçalandıktan sonra ependorf tüpüne 500 µl Fenol (P4557) eklenip, vorteks ile 30 saniye karıştırıldı.
- 3- 13 000 rpm’de 5 dakika santrifüj edildi.

- 4- Üst faz temiz bir ependorf tüpüne alındı.
- 5- Bu faza 500 µl fenol eklenip, yukarıdaki adım tekrarlandı.
- 6- Üst faz temiz bir ependorf tüpüne alındı, üzerine 500 µl kloroform eklenip 30 sn. vorteksle karıştırıldı.
- 7- 13 000 rpm’de 5 dakika santrifüj edildi ve üst faz temiz bir tüpe alındı.
- 8- Üzerine tüpü dolduracak şekilde %99,7’lik –20 °C’de saklanan etanol eklenip elle çevirerek DNA görüldü.
- 9- 13 000 rpm’de 2 dakika santrifüj edildi.
- 10- Alkol uzaklaştırıldı, 1 ml % 70’lik etanol eklenip, 13 000 rpm’de 2 dakika santrifüj edildi.
- 11- Alkol uzaklaştırılıp, tüp 2 saat kurumaya bırakıldı.
- 12- Kuruduktan sonra, yeteri kadar steril “nuclease – free” su ile DNA sulandırıldı.

PCR:

C-erbB-2 geni (98 kb) ve Dopamin reseptörü (112 kb) amplifikasyonu için kullanılan oligonükleotid primerler:

- C-erbB-2 geni (2122-2141) 5’ CCT CTG ACG TCC ATC ATC TC 3’
(2217-2196) 5’ ATC TTC TGC TGC CGT CGC TT3’
- Dopamin reseptörü (6-27) 5’ CCA CTG AAT CTG TCC TGG TAT G 3’
(118-96) 5’ GTG TGG CAT AGT AGT TGT AGT GG 3’

- 1- PCR Core kit (Promega M7660) ve yukarıdaki şekilde düzenlenen primerler kullanılarak, steril mikrosantrifüj tüpünün içine, her bir örnek için aşağıda belirtilen miktarlar kullanılarak PCR karışımı hazırlandı:

MgCl ₂	3µl (final konsantrasyon 1,5 mM)
10X Buffer	5 µl (final konsantrasyon 1,0X)
“PCR Nucleotid Mix”	1 µl (final konsantrasyon 200µM)
Taq DNA polimeraz	0,25 µl (final konsantrasyon 1,25u/50µl)
c-erbB-2 primer	2 µl
Dopamin primer	2 µl
“Nuclease-free” su	31,75 µl

- 2- Hazırlanan karışımın bulunduğu her mikrosantrifüj tüpüne ayrı ayrı, olgulara ait DNA örneklerinden 5 µl eklendi. 35 PCR siklüsüne ayarlanan “Thermal-Cycler” cihazında DNA amplifiye edildi. Her siklüs de denatürasyon 95 °C’de 1 dak., yapışma (annealing) 55 °C’de 1 dak. ve uzama 72 °C’de 1 dak., ve ön faz olarak 72 °C’de 10 dakika olacak şekilde programlandı.
- 3- Oluşan PCR ürününden 10 µl alındı ve 2 µl Loading buffer ile karıştırılıp, vertikal %8’lik, etidyum bromid’le boyalı poliakrilamid jelde, 100 volt’da 70 dakika yürütüldü.

Poliakrilamid Jel

10,5 ml distile su

1,5 ml TBE 10X

3 ml stok akrilamid (%40)

150 µl %25 Amonyum Persulfat

15 µl TEMED

- 4- Jel UV ışığı kullanılarak görüntülenip, fotoğraflandı.
- 5- Oluşan C-erbB-2 ve Dopamin bandlarının dansitometrik analizleri “NIH Image 1.60” bilgisayar dansitometrik analiz programı kullanılarak yapıldı. C-erbB-2 ve Dopamin amplifikasyonunun birbirine oranı hesaplanarak c-erbB-2’nin amplifikasyon oranı tespit edildi.

Değerlendirme: Bu çalışmada immünohistokimyasal olarak uygulanan c-erbB-2 ve östrojen reseptörü bağlanma özellikleri, renklendirici substrat olarak AEC kullanılmasından dolayı kırmızı boyanış pozitif olarak kabul edildi. Östrojen reseptörü için, tümör hücrelerinde nükleer boyanma, c-erbB-2 için membranöz boyanma pozitif olarak değerlendirildi. Membranöz boyanma paterni, şiddeti ve membranda devamlılığına göre 0, 1+, 2+, 3+ olarak sınıflandırıldı. Ayrıca, tek başına veya membranöz boyanma ile birlikte sitoplazmik boyanma gösteren olgularda kaydedildi.

PCR ürünüde, c-erbB-2 amplifikasyonunun değerlendirilmesinde “NIH Image 1.60” dansitometrik analiz yöntem programı kullanıldı. Jelin çekilen fotoğrafı üzerinden, c-erbB-2 ve Dopamin elektroforetik bandlarının yoğunluğu bu yöntemle tespit edilip, c-erbB-2/Dopamin reseptör oranı yaklaşık olarak hesaplanıp, semikantitatif veriler elde edildi. Buna göre, c-erbB-2/dopamin reseptör<1,2 tek kopya, 2> c-erbB-2/dopamin reseptör≥1,2 düşük düzeyde

amplifikasyon, c-erbB-2/dopamin reseptör ≥ 2 yüksek düzeyde amplifikasyon olarak sınıflandırıldı.

Verilerin analizinde, iki ordinal kategorize değişken arasındaki uyum, ki kare test istatistiği ile ve uyumun derecesi Gamma ölçütü ile saptanmıştır. Gamma=0,58 (p=0,018).

İki kategorize değişken arasındaki ilişki veya birbirinden bağımsızlıklarında ki-kare testi uygulanmıştır. Sürekli değişkenler arasındaki fark Mann-Whitney U testi ile analiz edilmiştir. p değerinin 0,05'den küçük değerleri istatistiksel olarak önemli ilişkiyi veya iki faktör arasındaki bağımsızlığı gösterir.



4. BULGULAR

Bu çalışmada 1996-2001 yılları arasında, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalında tanı almış, 60 adet invaziv meme karsinomu olgularının prognostik parametreleri incelenmiştir. Hastaların, yaş, histolojik tanı, tümör boyutu ve grade'i, aksiller lenf nodülü metastazı ve sayısı saptanmıştır. Hastaların yaş ortalaması $50,30 \pm 12,37$ 'dir. En genç hasta 25, en yaşlı hasta yaşı ise 86 yaşındadır. Olguların hepsi kadın hastalardır. 60 olgunun 30'u infiltratif duktal karsinom ve bunların 15'inde aksiller lenf nodülü metastazı mevcuttur. 30 olgu infiltratif lobüler karsinom olup 15'inde lenf nodülü metastazı vardır (Tablo 6). Çalışmada değerlendirilen hasta listesi Tablo 7'de verilmiştir.

Tablo 6: Meme karsinomunda konvansiyonel prognostik faktörler
(60 olgu)

	n	%
Yaş		
50<	29	48,3
50≥	31	51,7
Histolojik tip		
Duktal	30	50,0
Lobüler	30	50,0
Grade		
Grade I	12	20,0
Grade II	32	53,4
Grade III	16	26,6
Tümör boyutu		
<3	17	28,3
≥ 3	43	71,7
Lenf nodülü metastazı		
Var	30	50,0
Yok	30	50,0
Lenfovasküler invazyon		
Var	24	40,0
Yok	36	60,0

Tablo 7. Çalışmada değerlendirilen olguların listesi

Vaka no	Protokol no	Hasta adı	Hasta yaşı	Cinsiyet	Histolojik tip
1	17771/00	M.E	63	K	İnfiltratif duktal karsinom
2	239/01	C.A	66	K	İnfiltratif duktal karsinom
3	16424/00	R.K	43	K	İnfiltratif duktal karsinom
4	674/01	H.K	52	K	İnfiltratif duktal karsinom
5	1491/01	A.Y	35	K	İnfiltratif duktal karsinom
6	471/01	A.A	58	K	İnfiltratif duktal karsinom
7	258/01	A.U	40	K	İnfiltratif duktal karsinom
8	4300/00	A.A	57	K	İnfiltratif duktal karsinom
9	13775/99	F.B	33	K	İnfiltratif duktal karsinom
10	17312/00	S.D	50	K	İnfiltratif duktal karsinom
11	178/01	F.G	63	K	İnfiltratif duktal karsinom
12	527/01	M.S	48	K	İnfiltratif duktal karsinom
13	744/01	S.T	75	K	İnfiltratif duktal karsinom
14	868/01	S.K	47	K	İnfiltratif duktal karsinom
15	3602/00	H.D	55	K	İnfiltratif duktal karsinom
16	2579/01	T.K	45	K	İnfiltratif duktal karsinom
17	2534/01	A.E	40	K	İnfiltratif duktal karsinom
18	990/01	B.S	62	K	İnfiltratif duktal karsinom
19	17877/00	D.G	40	K	İnfiltratif duktal karsinom
20	16516/00	E.S	41	K	İnfiltratif duktal karsinom
21	792/01	N.K	55	K	İnfiltratif duktal karsinom
22	688/01	D.Y	66	K	İnfiltratif duktal karsinom
23	312/01	S.K	57	K	İnfiltratif duktal karsinom
24	10431/00	Ö.G	25	K	İnfiltratif duktal karsinom
25	16457/99	G.K	32	K	İnfiltratif duktal karsinom
26	13369/99	A.K	44	K	İnfiltratif duktal karsinom
27	12705/99	N.C	50	K	İnfiltratif duktal karsinom
28	3683/98	E.Ü	40	K	İnfiltratif duktal karsinom
29	13652/98	A.P	32	K	İnfiltratif duktal karsinom
30	3956/98	M.Ç	49	K	İnfiltratif duktal karsinom
31	6340/98	F.Ş	39	K	İnfiltratif lobüler karsinom
32	6753/98	Y.A	56	K	İnfiltratif lobüler karsinom
33	14976/98	F.Ö	42	K	İnfiltratif lobüler karsinom
34	2093/98	H.İ	63	K	İnfiltratif lobüler karsinom
35	15537/98	F.A	42	K	İnfiltratif lobüler karsinom
36	7353/96	H.Ç	51	K	İnfiltratif lobüler karsinom
37	2210/97	S.A	40	K	İnfiltratif lobüler karsinom
38	1718/98	Z.O	65	K	İnfiltratif lobüler karsinom
39	4744/99	M.E	51	K	İnfiltratif lobüler karsinom
40	8400/97	S.A	52	K	İnfiltratif lobüler karsinom
41	17818/00	A.K	65	K	İnfiltratif lobüler karsinom
42	17848/00	K.A	60	K	İnfiltratif lobüler karsinom
43	11124/99	A.E	32	K	İnfiltratif lobüler karsinom
44	16459/98	F.Ö	42	K	İnfiltratif lobüler karsinom
45	2294/99	L.D	50	K	İnfiltratif lobüler karsinom
46	7890/98	F.B	54	K	İnfiltratif lobüler karsinom
47	13910/98	L.G	42	K	İnfiltratif lobüler karsinom

Tablo 7'nin devamı

Vaka no	Protokol no	Hasta adı	Hasta yaşı	Cinsiyet	Histolojik tip
48	2031/96	N.U	35	K	İnfiltratif lobüler karsinom
49	8314/96	Z.Y	86	K	İnfiltratif lobüler karsinom
50	7093/96	F.Ö	58	K	İnfiltratif lobüler karsinom
51	4205/96	S.D	48	K	İnfiltratif lobüler karsinom
52	1864/00	G.D	57	K	İnfiltratif lobüler karsinom
53	16301/99	F.S.A	60	K	İnfiltratif lobüler karsinom
54	2543/96	Ş.B	53	K	İnfiltratif lobüler karsinom
55	2401/99	M.Ç	72	K	İnfiltratif lobüler karsinom
56	6943/00	G.N	75	K	İnfiltratif lobüler karsinom
57	9352/00	F.N.E	75	K	İnfiltratif lobüler karsinom
58	12368/00	S.Ö	37	K	İnfiltratif lobüler karsinom
59	3780/00	D.Ş	65	K	İnfiltratif lobüler karsinom
60	5653/98	A.Ö	37	K	İnfiltratif lobüler karsinom

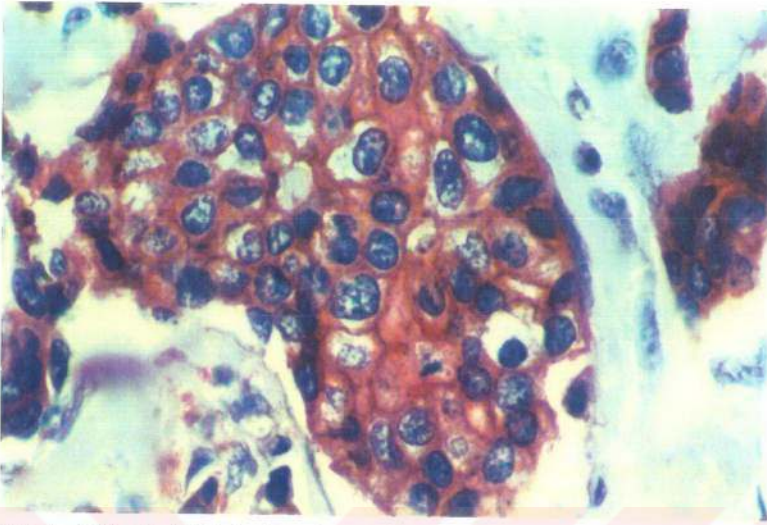
C-erbB-2 ekspresyonu ve amplifikasyonu:

Olgularda, parafin dokuda immünohistokimya ile değerlendirilen c-erbB-2 ekspresyonu, 60 örneğin 12'sinde düşük, 15'inde yüksek düzeyde saptanmıştır (Şekil 3-9). İmmünohistokimyasal yöntemle tespit edilen, c-erbB-2'nin membranöz boyanması esas alınmıştır. Ancak, tümörde tek başına veya membranöz boyanma ile olan sitoplazmik boyanmalar da değerlendirilmiştir. Olgularımızın 19'unda sadece sitoplazmik boyanma, 10'nun da sitoplazmik+membranöz boyanma saptanmıştır (Şekil 10, 11, 12). İki adet kontrol örnekte ise negatif bulunmuştur. Aynı bloklardan hazırlanan paralel kesitlere uygulanan karşılaştırmalı PCR ile yapılan c-erbB-2 amplifikasyonu değerlendirilmesinde, 60 olgunun 35'inde tek kopya (negatif), 15'inde düşük seviyede ve 10'unda yüksek seviyede amplifikasyon (pozitif) saptanmıştır (Şekil 13, 14). Kontrol olgularda ise tek kopya amplifikasyon (negatif) saptanmıştır. İki yöntem sonuçları karşılaştırıldığında, immünohistokimyasal yöntemle tespit edilen ekspresyon ile PCR'da tespit edilen amplifikasyon arasında istatistiksel olarak anlamlı bir uyum saptanmıştır (Ki kare=77,14, p=0,000, Kappa=0,80)(Tablo 8). Sitoplazmik boyanma ile PCR ile tespit edilen c-erbB-2 gen amplifikasyonu arasında ise anlamlı bir ilişki bulunmamıştır (p=0,4).

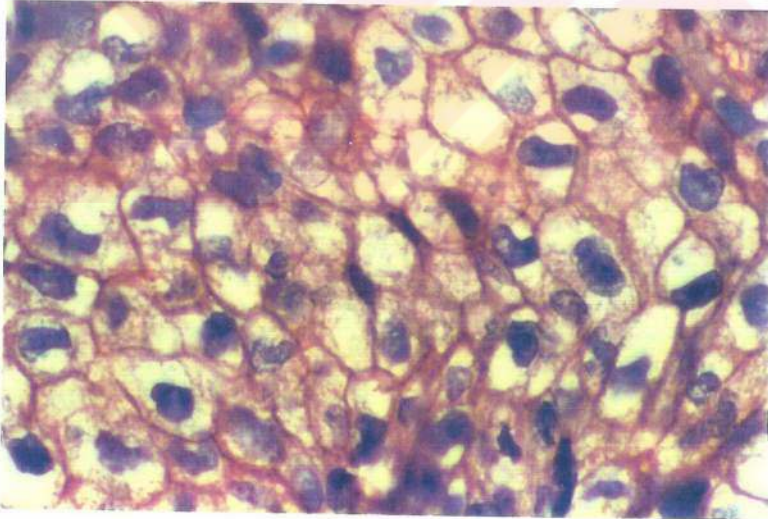
Tablo 8: İmmünohistokimya ve PCR ile saptanan c-erbB-2'nin karşılaştırılması

İmmünohistokimya ile c- erbB-2 ekspresyonu	Differential PCR ile c-erbB-2 Amplifikasyonu			
	Tek kopya (negatif)	Düşük Seviye	Yüksek seviye	Toplam
Negatif	33	-	-	33
Düşük	2	10	-	12
Yüksek	-	5	10	15
Toplam	35	15	10	60

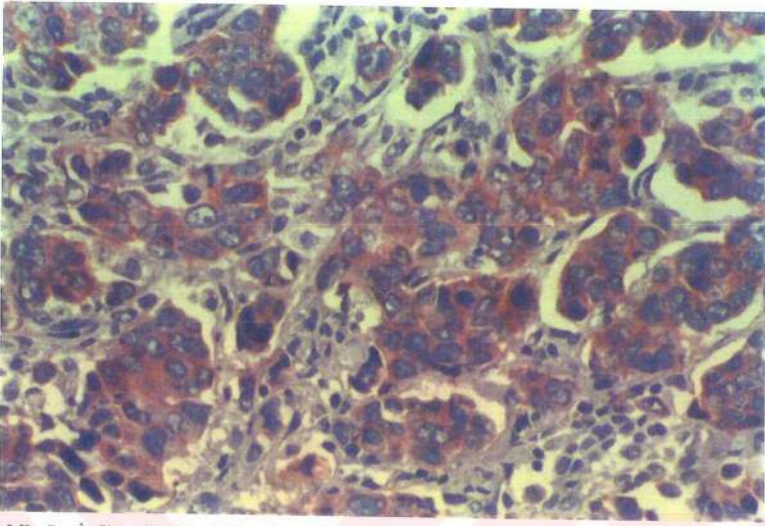
*Ki kare=77,14 *p=0,000 *Kappa=0,80



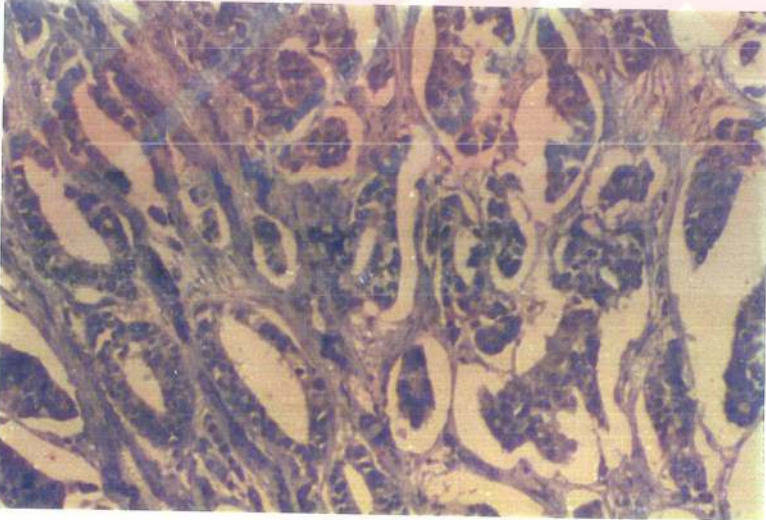
Şekil 3: İnfiltratif duktal karsinomda, c-erbB-2 ekspresyonunun kuvvetli (+++) pozitif membranöz boyanması, olgu no:19, ABC immünohistokimyasal yöntem, X 200



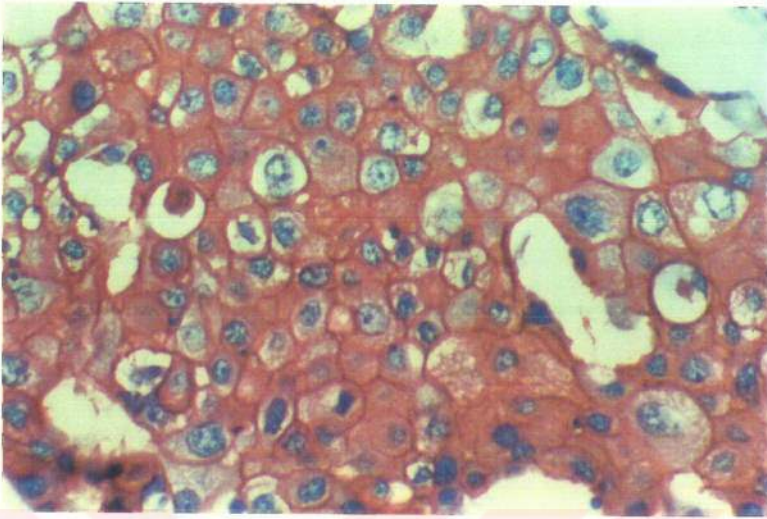
Şekil 4: İnfiltratif duktal karsinomda, c-erbB-2 ekspresyonunun orta şiddette (++) membranöz boyanması, olgu no: 6, ABC immünohistokimyasal yöntem, X400



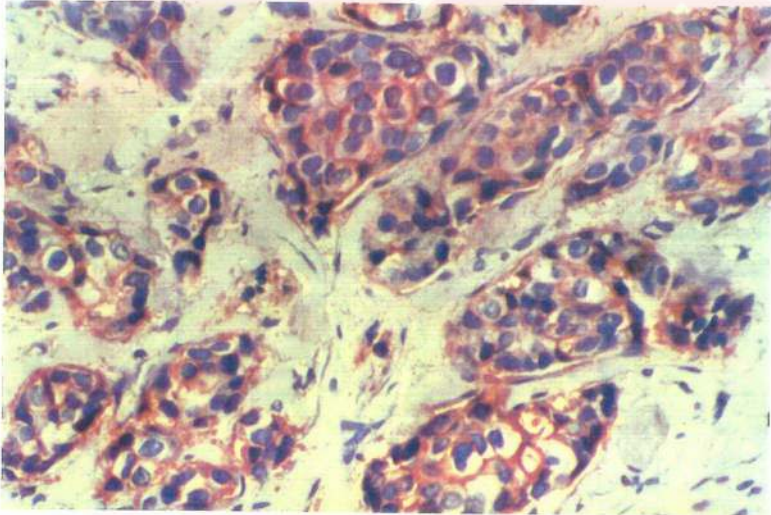
Şekil 5: İnfiltratif duktal karsinomda, c-erbB-2 ekspresyonunun zayıf (+) membranöz boyanması, olgu no:20, ABC immünohistokimyasal yöntem, X100



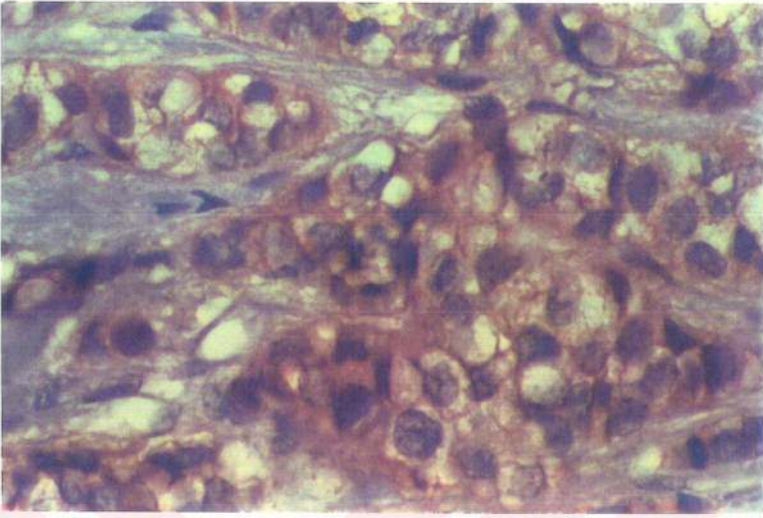
Şekil 6: İnfiltratif duktal karsinomda, negatif c-erbB-2 ekspresyonu, olgu no:28, ABC immünohistokimyasal yöntem, X100



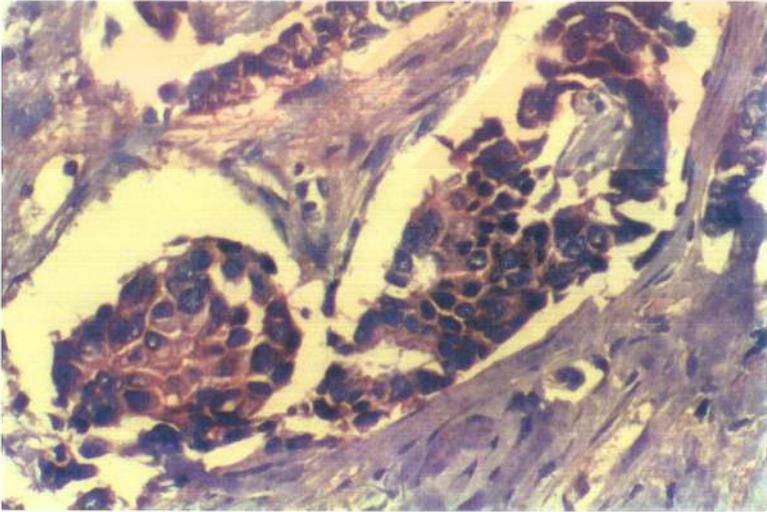
Şekil 7: İnfiltratif lobüler karsinomda, c-erbB-2 ekspresyonunun, kuvvetli (+++) membranöz boyanması, olgu no:44, immünohistokimyasal yöntem, X200



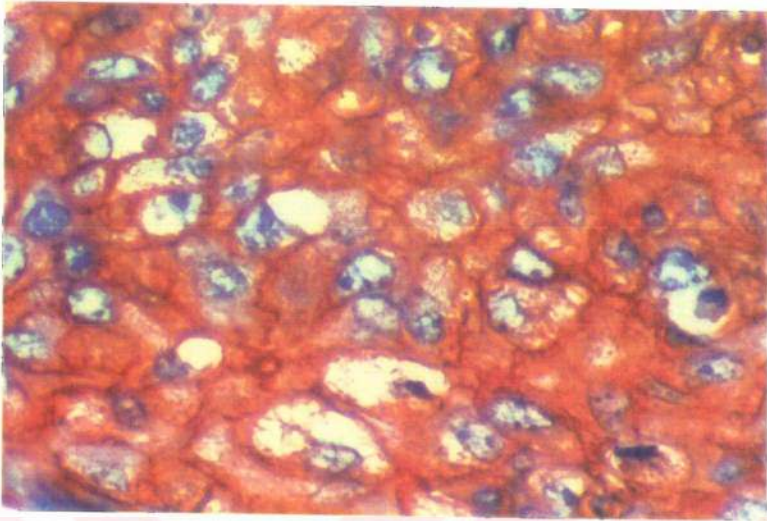
Şekil 8: İnfiltratif lobüler karsinomda, c-erbB-2 ekspresyonunun orta şiddette (++) membranöz boyanması, olgu no:41, ABC immünohistokimyasal yöntem, X 100



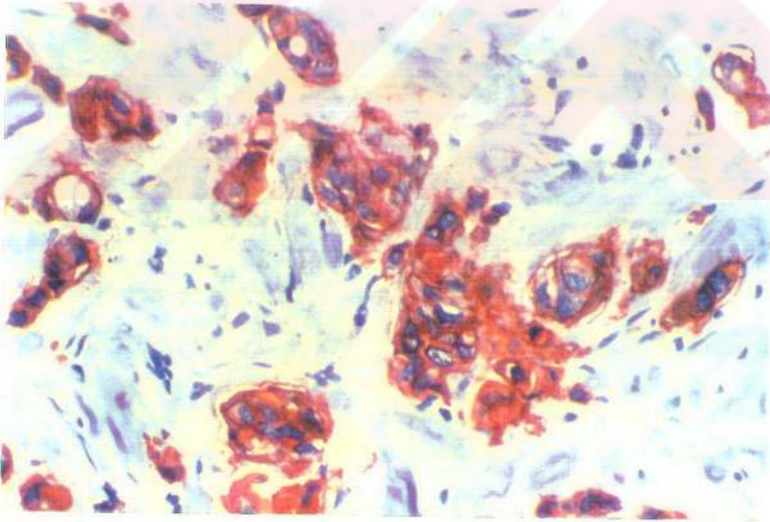
Şekil 9: İnfiltratif lobüler karsinomda, c-erbB-2 ekspresyonunun zayıf şiddette (+) membranöz boyanması, olgu no:32, immünohistokimyasal yöntem, X 400



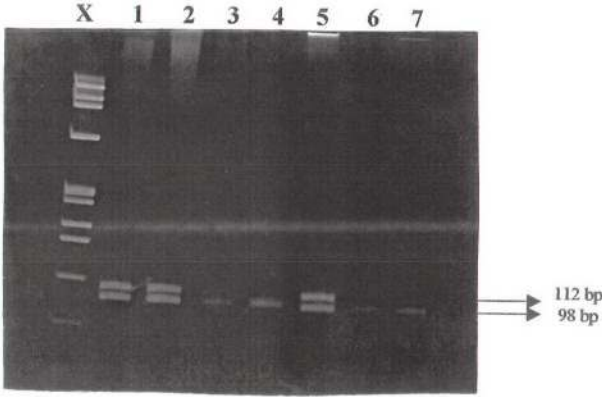
Şekil 10: İnfiltratif duktal karsinomda nonspesifik stoplazmik boyanma, olgu no:22, immünohistokimyasal yöntem, X200



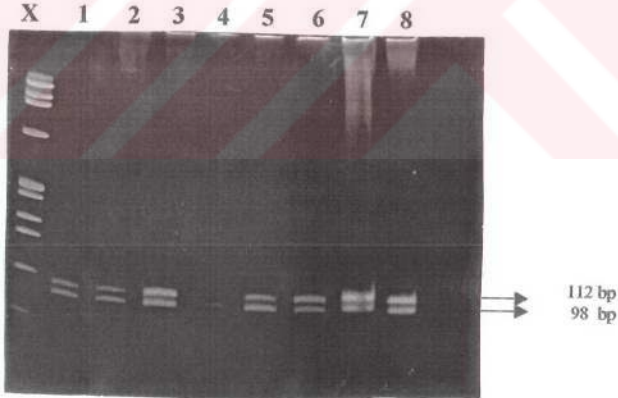
Şekil 11: İnfiltratif duktal karsinomda, c-erbB-2 ekspresyonunun, kuvvetli membranöz + stoplazmik boyanması, olgu no:16, İmmünohistokimyasal yöntem, X 400



Şekil 12: İnfiltratif duktal karsinomda, c-erbB-2 ekspresyonunun, kuvvetli membranöz + stoplazmik boyanması, olgu no: 15 ABC İmmünohistokimyasal yöntem, X 100



Şekil 13: Karşılaştırmalı (differential) PCR ile c-erbB-2 gen amplifikasyonu. Etidyum bromür'le boyalı, %8'lik poliakrilamid jel elektroforezi. Üstteki band dopamin reseptörü (112 bp), alttaki band ise c-erbB-2 genini (98 bp) göstermektedir. Elektroforetik bandların, "NIH Image 1.6" programı ile dansitometrik ölçümlerinin sonucunda; Olgu 1,2 negatif c-erbB-2 gen amplifikasyonunu (c-erbB-2/dopamin=1), olgu 4,7 yüksek düzeyde gen amplifikasyonunu (c-erbB-2/dopamin>2), olgu 3,6 düşük düzeyde c-erbB-2 amplifikasyonunu (1,2<c-erbB-2/dopamin<2), olgu 5 kontrol olarak kullanılan fibroadenomda negatif amplifikasyonu (c-erbB-2/dopamin<1) göstermektedir. X 'de ise moleküler tanımlayıcı izlenmektedir.



Şekil 14: olgu 1, 2, 5'de dansitometrik ölçümle belirlenen düşük düzeyde c-erbB-2 amplifikasyonu (1,2 <c-erbB-2/dopamin<2), olgu 3'de kontrol olarak kullanılan fibrokistik hastalıkda negatif c-erbB-2 amplifikasyonu (c-erbB-2/dopamin<1), olgu 4'de dansitometrik analizle saptanabilen yüksek amplifikasyon (c-erbB-2/dopamin>2), olgu 6,7,8'de negatif c-erbB-2 gen amplifikasyonu (c-erbB-2/dopamin<1) görülmektedir. X= moleküler tanımlayıcı.

C-erbB-2 amplifikasyonu ve ekspresyonu ile konvansiyonel prognostik parametrelerin karşılaştırılması:

C-erbB-2 ekspresyonu ve gen amplifikasyonu ayrı ayrı, hasta yaşı, tümörün histolojik tipi ve çapı, tümör grade'i, ve lenfovasküler invazyon, aksiller lenf nodülü metastazı ve sayısı ile karşılaştırılmıştır. İmmünohistokimyasal (İHKY) yöntemle tespit edilen ekspresyon pozitif (düşük+yüksek), negatif (negatif) olarak, gen amplifikasyonu ise pozitif (düşük+yüksek seviye), negatif (tek kopya sayısı) olarak değerlendirilmiştir (33).

Çalışmamızda, infiltratif duktal karsinom olguları Bloom-Richardson sistemi, infiltratif lobüler karsinom olguları ise nükleer grade sistemine göre grade'lendirilmiştir. Tümörün histolojik grade'i arttıkça, c-erbB-2 ekspresyon ve amplifikasyonunun arttığı görülmüş sonuç istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0,000$)(Tablo 9)(Şekil 15,16).

Hasta yaşı ile, c-erbB-2 ekspresyon ve amplifikasyon karşılaştırıldığında sonuç istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0,1$, $p=0,3$)(Tablo 9).

Tümörün histolojik tipi ile c-erbB-2 ekspresyon ve amplifikasyonu arasında istatistiksel olarak bir ilişki bulunmamıştır ($p=0,6$)(Tablo 9).

Tümör boyutu ve c-erbB-2 ekspresyon ve amplifikasyonunun arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamsızdır ($p>0,05$)(Tablo 9).

Aksiler lenf nodülü metastazı olmayan olgularda c-erbB-2 amplifikasyonu % 30 pozitif, %70 negatif bulunmuştur. Lenf nodülü metastazı olan hastalarda % 53,3 pozitif, %46,7 negatif izlenmiştir. Metastaz varlığı ile c-erbB-2 amplifikasyon ve ekspresyonunun arttığı izlenmiştir ancak sonuç istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p=0,1$). Metastatik lenf nodülü sayısı ile ekspresyon ve gen amplifikasyonu değerlendirildiğinde aralarındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0,000$, $p=0,003$)(Tablo 9)(Şekil 17,18).

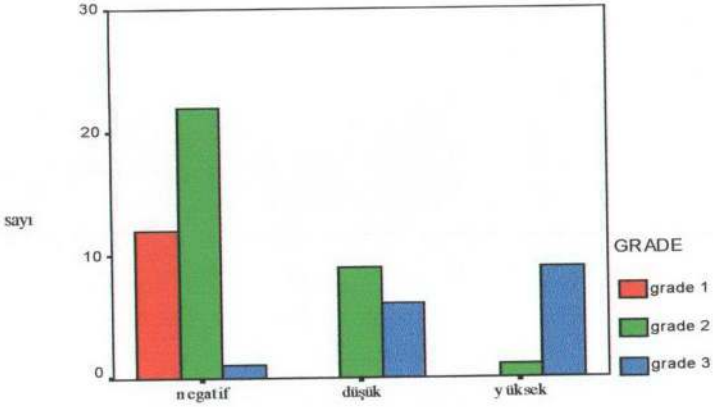
Lenfovasküler invazyon ile c-erbB-2 ekspresyonu ($p=0,006$) ve gen amplifikasyonu ($p=0,003$) arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı saptanmıştır (Tablo 9)(Şekil 19).

Tümör hücrelerinde östrojen reseptör varlığı ile c-erbB-2 ekspresyonu ve amplifikasyonu karşılaştırıldığında sonuç istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur ($p=0,4$)(Tablo 9)(Şekil 20, 21).

Tablo 9. İmmünohistokimya ve karşılaştırmalı PCR ile tespit edilen c-erbB-2 ekspresyon ve amplifikasyonun, hasta yaşı, tümör tipi ve çapı, grade'i, lenfovasküler invazyon, aksiller lenf nodülü metastazı ve sayısı, östrojen reseptör varlığı ile karşılaştırılması

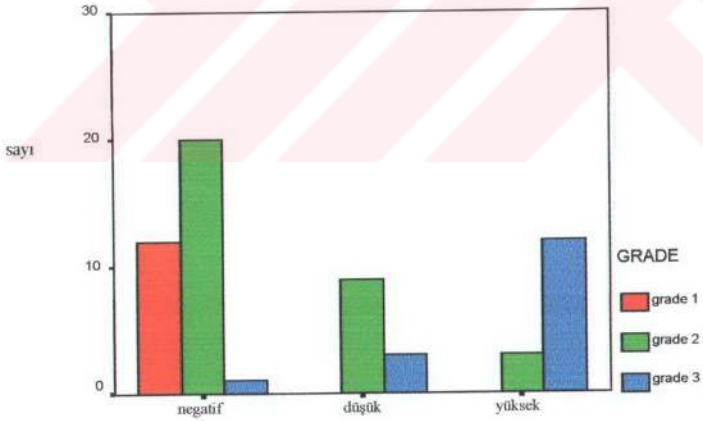
		C-erbB-2 ekspresyonu (İHKY)				p	C-erbB-2 Amplifikasyonu (PCR)				p
		Negatif		Pozitif			Negatif		Pozitif		
		N	%	n	%		N	%	n	%	
Yaş	<50	19	(65,5)	10	(34,5)	0,1	19	(65,5)	10	(34,5)	0,3
	≥50	14	(45,2)	17	(54,8)		16	(51,6)	15	(48,4)	
Tip	Duktal	15	(50,0)	15	(50,0)	0,6	16	(53,3)	14	(46,7)	0,6
	Lobüler	18	(60,0)	12	(40,0)		19	(63,3)	11	(36,7)	
Tümör boyutu	<3	12	(70,6)	5	(29,4)	0,1	13	(76,5)	4	(23,5)	0,08
	≥ 3	21	(48,8)	22	(51,2)		22	(51,2)	21	(48,8)	
*Grade	I	12	(100)	-	-	0,000	12	(100)	-	-	0,000
	II	20	(62,5)	12	(37,5)		22	(68,8)	10	(31,3)	
	III	1	(6,3)	15	(93,8)		1	(6,3)	15	(93,8)	
* Lenfovasküler invazyon	var	8	(33,3)	16	(66,7)	0,006	8	(33,3)	16	(66,7)	0,003
	yok	25	(69,4)	11	(30,6)		27	(75,0)	9	(25,0)	
Lenf nodu metastazı	Var	13	(43,3)	17	(56,7)	0,1	14	(46,7)	16	(53,3)	0,1
	yok	20	(66,7)	10	(33,3)		21	(70)	9	(30)	
*Metastatik lenf nodu sayısı	1-3	11	(84,6)	2	(15,4)	0,000	12	(78,6)	3	(21,4)	0,003
	4 ↑	2	(11,8)	15	(88,2)		2	(18,8)	13	(81,3)	
östrojen reseptörü	Var	17	(50,0)	17	(50,0)	0,4	18	(52,9)	16	(47,1)	0,4
	yok	16	(61,5)	10	(38,5)		17	(65,4)	9	(34,6)	

* c-erbB-2 ekspresyonu ve amplifikasyonu ile istatistiksel olarak anlamlı ilişkisi olan prognostik faktörler



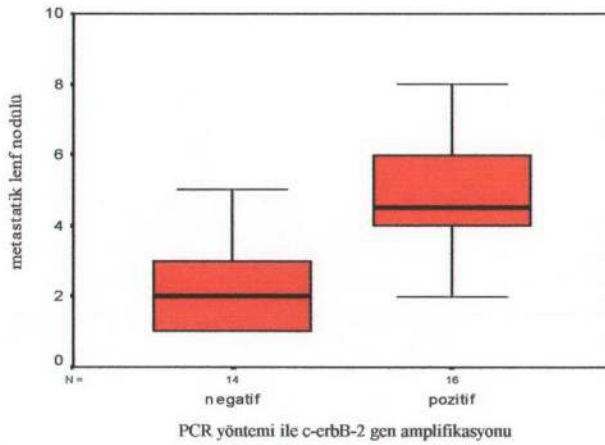
PCR yöntemi ile c-erbB-2 gen amplifikasyonu

Şekil 15: PCR yöntemi ile tespit edilen c-erbB-2 amplifikasyonu ve histolojik grade arasındaki ilişki

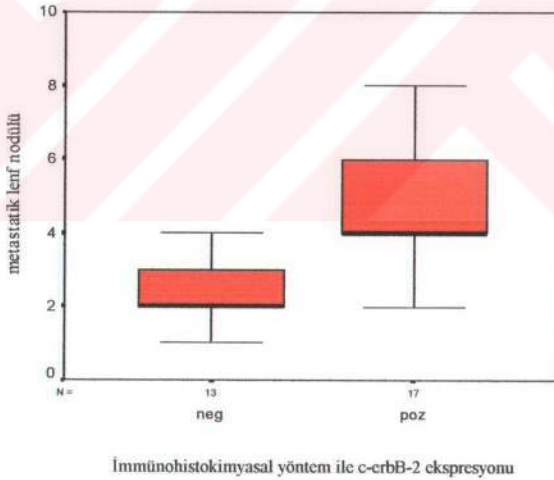


İmmünohistokimyasal yöntem ile c-erbB-2 ekspresyonu

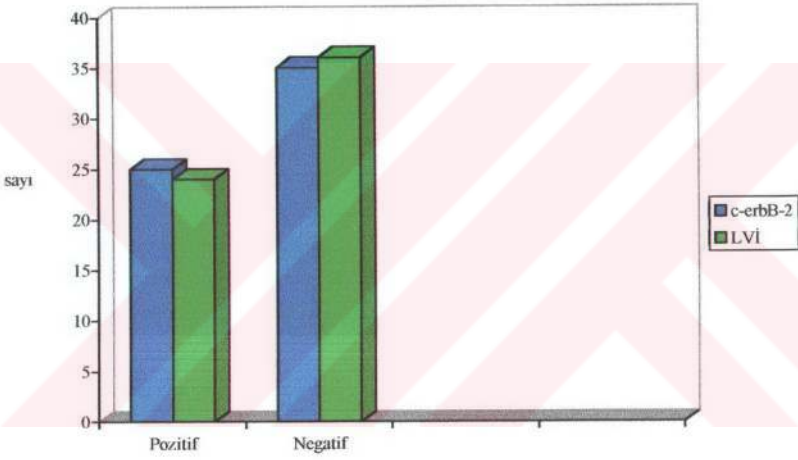
Şekil 16: İmmünohistokimyasal yöntemle tespit edilen c-erbB-2 ekspresyonunun tümör grade'i ile ilişkisi



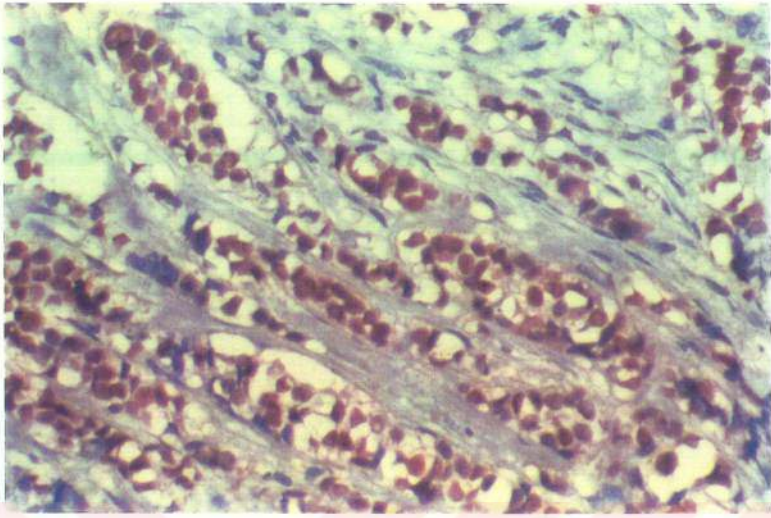
Şekil 17: PCR yöntemi ile tespit edilen c-erbB-2 amplifikasyonu pozitif ($4,88 \pm 2,16$) ve negatif ($2,50 \pm 1,56$) olan olgulardaki metastatik lenf nodülü ortalamasının karşılaştırılması (veriler Ort $\pm$ SD olarak verilmiştir).



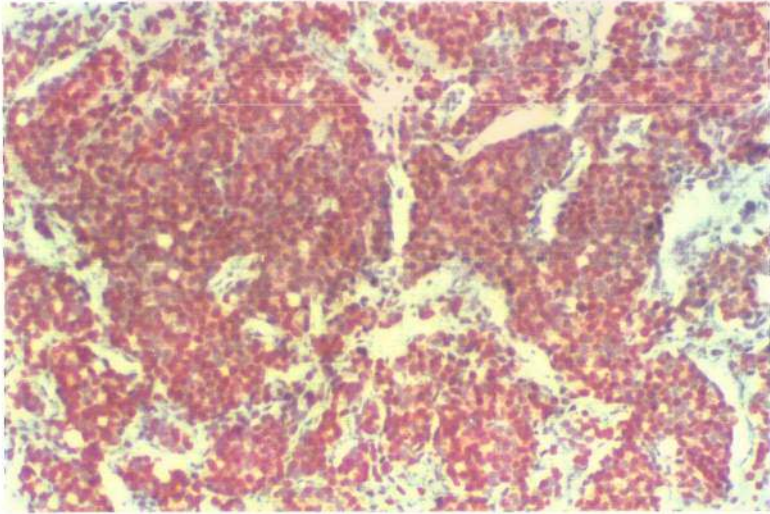
Şekil 18: İHKY yöntem ile tespit edilen c-erbB-2 ekspresyonu pozitif ($4,65 \pm 2,29$) ve negatif ($2,62 \pm 1,56$) olan olgulardaki metastatik lenf nodülü ortalamasının karşılaştırılması (veriler Ort $\pm$ SD olarak verilmiştir).



Şekil 19: c-erbB-2 amplifikasyonu ile lenfovasküler tümör invazyonu (LVI) arasındaki ilişki



Şekil 20: İnfiltratif duktal karsinomda, pozitif nükleer boyanma gösteren östrojen reseptörü, olgu no:13, ABC immünohistokimyasal yöntem, X 100



Şekil 21: İnfiltratif lobüler karsinomda, pozitif nükleer boyanma gösteren östrojen reseptörü, olgu no:53, ABC immünohistokimyasal yöntem, X 100

5. TARTIŞMA

Meme karsinomlarında, hastalığın seyrini ve tedavisini etkileyen çeşitli prognostik faktörler bildirilmiştir. Prognostik faktörlerden birisi c-erbB-2 (Her-2/neu) onkogenidir. Bu gen, hücre membranında tirozin kinaz aktivitesine sahip, yapısal olarak “Epidermal Growth factor” reseptörüne benzeyen, 185-kd ağırlığındaki glikoproteini kodlar. İlk kez 1987 yılında Slamon ve arkadaşları, c-erbB-2 amplifikasyonunun, meme karsinomlu olgularda kötü prognozla olan ilişkisini göstermiştir (36, 37). Genin amplifikasyonu, c-erbB-2 mRNA ve p185 proteinin aşırı ekspresyonuna yol açar. Artmış olan bu proteini tespit etmek için en sık kullanılan yöntem, immünohistokimyasal boyama yöntemidir. Bu teknikle, artmış olan protein, tümör hücresinde yoğun hücre membranının boyanması şeklinde izlenir (5, 20). Literatürde, en sık kullanılan yöntem olan immünohistokimyasal tetkikin, genin kopya sayısı ile doğru ilişkide olduğunu gösteren, çeşitli çalışmalar vardır (3, 4, 32, 33, 37-40, 43, 44). Taze dokudan hazırlanan kesitlere uygulanan immünohistokimyasal boyama yönteminin, sensitivitesi oldukça yüksektir. c-erbB-2'nin hasta tedavisini yönlendirmesi ile birlikte, kantitatif immünohistokimya ilk 1996 yılında O'Malley ve arkadaşları tarafından kullanılmıştır. Daha sensitif yöntem arama sonucunda, taze dokuda ELISA metodu ile tümör sitozolünde ve hasta serumunda c-erbB-2 protein seviyeleri ölçülmüştür. Gen çalışmaları Southern ve slot-blotting ile devam etmiş ve c-erbB-2'nin prognostik önemini ortaya koyan çalışmalar yapılmıştır (3, 37-40). Bu yöntem, maliyetinin yüksek olması, taze doku gerektirmesi ve uzun sürmesi nedeniyle rutin uygulamada kullanılamamıştır. Direkt c-erbB-2 proteinini hedef alan Monoklonal antikor olan rhuMAB HER-2 (Herceptin)'nin, gen amplifikasyonu olan hastalarda, tedavi amaçlı kullanılmaya başlanmasından sonra, gen amplifikasyonunu en doğru şekilde tespit edip, rutin uygulanabilecek yöntem araştırmaları devam etmiştir. Southern Blot'dan daha sensitif olan ve tümör hücrelerindeki gen amplifikasyonunu morfolojik olarak görüntüleyen, FISH yöntemi kullanıma girmiştir (3). c-erbB-2 geninin amplifikasyonunu ölçmeye dayalı olan karşılaştırmalı PCR (Differential PCR), semikantitatif bir yöntem olup, hedef genin ve bir referans geninin aynı reaksiyon tüpünde amplifikasyonuna dayanır. Hedef genin amplifikasyon seviyesi, PCR ürünlerinin jel üzerinde gösterilerek, referans gen amplifikasyonuna oranı ile tespit edilir. Kaynaklarda, Jennings ve arkadaşları (32), Gramlich ve arkadaşları (33), bu yöntemin sensitivitesini göstermişlerdir. Jennings referans gen olarak β -globin'i kullanırken, Gramlich ve

arkadaşları dopamin reseptörünü kullanmışlardır. Bu yöntemle tayin edilen gen amplifikasyonunu, immünohistokimyasal olarak saptanan protein ekspresyonu ile kıyasladıklarında, Gramlich ve arkadaşları, istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulmuşlardır (33). İmmünohistokimyasal boyama yöntemi, karşılaştırmalı PCR yöntemine göre teknik koşullardan daha fazla etkilenebilen bir yöntemdir. Dokuyu parafine gömerken kullanılan parafinin ısı, uzun süre saklanması, dokunun fiksasyon süresi, c-erbB-2 protein antijeninin degradasyonuna neden olup, yalancı negatifliğe yol açar. Bunun yanında, diğer antijenleri yeterince uzaklaştıramama, yalancı pozitiflikle sonuçlanabilir. Nonspesifik sitoplazmik boyanma bunun bir göstergesidir. Bu yüzden sadece kuvvetli membranöz boyanma dikkate alınmalıdır (4, 37, 40, 43-45). Harbeck ve arkadaşları (45) gibi bir çok araştırmacı, membranöz boyanmayı pozitif kabul etmektedir (37, 44, 46). Keshgegian ve arkadaşları ise, nedeni ne olursa olsun, sitoplazmik boyanmanın da, kötü prognozla ilişkisi olduğunu göstermiştir (47).

Çalışmamızda immünohistokimyasal yöntemle c-erbB-2 proteininin, ++ ve +++ membranöz boyanması pozitif olarak kabul edilmiştir ve PCR ile tespit edilen gen amplifikasyonu ile karşılaştırılmıştır. İki farklı yöntemden elde edilen sonuçlar karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı bir uyum bulunmuştur ($p=0,000$) ve bu bulgu kaynak bilgileri ile paralellik göstermektedir. 6 vakada, immünohistokimyasal olarak hiç boyanma saptanmazken, PCR ile tek kopya gen amplifikasyonu izlenmiştir. Bu durum, çok düşük seviyedeki gen amplifikasyonunda, belli bir kopya sayısına ulaşmadan, protein ekspresyonunun membranda gösterilememesine bağlı olabilir (3, 4, 37, 39, 48). Bu amplifikasyon "cut-off" değerinin altında olduğu için, istatistiksel sonucu etkilememiştir. İmmünohistokimyasal yöntemde, yabancı antijenleri uzaklaştıramama nedeni ile, 5 olgumuzda kuvvetli +++ pozitif boyanma görülmüştür. Aslında bu 5 olguda, PCR ile düşük seviyede gen amplifikasyonu saptanmıştır. İmmünohistokimya ile c-erbB-2 tespitinde membranöz boyanma esas alınmış ancak membranöz boyanma olmaksızın veya birlikte, sitoplazmik boyanma gösteren olgular da saptanmıştır. Olgularımızın 19'unda membranöz boyanma olmaksızın sitoplazmik boyanma, 10'nun da ise membranöz boyanma ile beraber sitoplazmik boyanma saptanmıştır. PCR ile tespit edilen c-erbB-2 gen amplifikasyonu ile immünohistokimyasal sitoplazmik c-erbB-2 boyanması karşılaştırıldığında, aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmamıştır ($p=0,4$). Bu bulgumuz, immünohistokimya'yı değerlendirirken, membranöz boyanmanın dikkate alınması gerektiği görüşünü desteklemektedir (4, 37, 40, 43-45).

Çalışmamız, iki yöntemin de c-erbB-2 tayini için kullanılabilir olduğunu göstermiştir. PCR yöntemi daha küçük amplifikasyonları da tespit edebilmekte ancak daha uzun süreli ve pahalı bir yöntemdir. İmmünohistokimya yöntemi ise, uygun antikor seçimi ve optimal teknik koşullarının sağlanması durumunda, rutin olarak daha kolay uygulanabilir ve daha kısa sürede sonuç alınabilecek bir yöntemdir. Ancak semikantitatif bir değer verdiği için karşılaştırmalı PCR, immünohistokimyadan daha objektif bir yöntemdir. İki yöntemin de parafin kesitlerde çalışılabilmesi, arşiv materyaline uygulanabilirliğini sağlamaktadır.

Bloom-Richardson histolojik grade'leme sistemi, meme karsinomlu hastalarda prognozla yakın ilişkilidir (2, 49). Hücresel pleomorfizm, mitoz sayısı ve tübül oluşumu esas alınarak uygulanır. Histolojik grade'in diğer bir prognostik faktör olan, c-erbB-2 ile ilişkisini değerlendiren Tsuda ve arkadaşları (49) 176 vakalık retrospektif çalışmada, c-erbB-2 ve histolojik grade arasında anlamlı bir ilişki bulmuştur. Histolojik grade arttıkça, c-erbB-2 ekspresyonu da artmaktadır. Bu da tümörün, agresifliğini göstermektedir (49). Çeşitli araştırmalarda histolojik grade ile c-erbB-2 ekspresyonunun doğru oranda arttığını ve kötü prognostik faktörler olduğunu göstermiştir (4, 46, 50-53). Press ve arkadaşları ise, yaptıkları 140 olguluk retrospektif bir çalışmada, "fluorescence insitu hybridization" ile tespit ettikleri genin, tümör grade'inden ilişkisiz olduğunu göstermişler ve bunların birbirinden bağımsız, prognostik parametreler olduğunu savunmuşlardır (54).

Bizde çalışmamızda, tümörün histolojik grade'i ile c-erbB-2 ekspresyonu ve amplifikasyonu arasındaki ilişkiyi araştırdık. İnfiltratif duktal karsinomlarda Bloom-Richardson, infiltratif lobüler karsinomlarda nükleer grade sistemini kullandığımız olgularda, tümör grade'i yükselirken c-erbB-2 ekspresyonunun ve amplifikasyonunun arttığını saptadık. Aralarındaki bu ilişki istatistiksel olarak anlamlıydı ($p=0,000$). Bu sonuç, tümörün agresif davranışını gösteren grade ve c-erbB-2 ekspresyonunun birbirine bağımlı, kötü prognostik faktörler olduğu görüşünü desteklemektedir (4, 46, 50-53).

Histolojik tip ile c-erbB-2'yi karşılaştıran az sayıdaki çalışmalardan biri olan Rilke ve arkadaşlarının (51) 1210 vakada yaptıkları çalışmada, ekspresyonun histolojik tiple ilişkisi olmadığı gösterilmiştir. Başka bir çalışmada, Tetu ve arkadaşları (46), infiltratif duktal karsinomda, diğer tiplere göre daha fazla ekspresyon saptamış fakat, istatistiksel olarak anlamını gösterememişlerdir. Uehana ve arkadaşları da (55) histolojik tip ile c-erbB-2 arasında ilişki bulamamışlardır. Supanoranond ve arkadaşlarının (56) yaptığı 60 tümör ve 90 benign meme hastalıklarındaki c-erbB-2 amplifikasyon tayininde, benign meme hastalığında amplifikasyon saptanmamış ve tümörlü olgularda ise tipler arasında anlamlı fark bulunmamıştır.

Çalışmamıza alınan 60 hastada duktal karsinomların %46,7'sinde, lobüler karsinomların ise %36,7'sinde c-erbB-2 amplifikasyonu saptanmıştır. İnfiltratif lobüler karsinomda gen amplifikasyonunun daha az olduğu izlenmiş ancak sonuç istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0,6$). Kaynaklarda yetersiz olan histolojik tip ve c-erbB-2 ilişkisini tespit etmek için daha geniş serilerle çalışma yapmak gerekmektedir. Çalışmamızda mevcut olgu sayımız, bu konuda kesin yorum yapmak için yeterli bulunmamıştır.

Hasta yaşı ve gen amplifikasyonu, birçok araştırmacı tarafından çalışılmış ve istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır (46, 49, 54, 57, 58). Ancak Rilke ve arkadaşları (51) c-erbB-2 gen amplifikasyonu ile artan hasta yaşı arasındaki anlamlı ilişkiyi göstermişlerdir.

Bizim olgularımızın yaş ortalaması $50,30 \pm 12,37$ 'dir. 50 yaş altı ve 50 yaş üstü olarak iki grup da değerlendirildiğine c-erbB-2 ekspresyonu, amplifikasyonu ve hasta yaşı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır ($p=0,3$). Bu bulgumuz kaynaklardaki çoğunluk çalışmalarla uyumludur (46, 49, 54, 57, 58).

Slamon ve arkadaşları (3), ilk kez 1987 yılında c-erbB-2'nin aksiller lenf nodülü metastazı olan hastalardaki prognostik önemini tanımlamıştır. Bunu takiben yayınlanmış makalelerde, 15 000'in üzerindeki olgu sayılarıyla yapılan çalışmalarda, aksiller lenf nodülü metastazı olan hastalardaki, c-erbB-2'nin kötü prognoz göstergesi olduğu doğrulanmıştır (4, 46, 50-52, 59, 60). 1997 yılında Press ve arkadaşları (53), sadece lenf nodülü metastazı olanlarda değil, lenf nodülü metastazı olmayan hastalarda ki c-erbB-2 gen amplifikasyonunun da kötü prognozla ve rekürrens riski ile olan ilişkisini göstermiştir. Ancak bu konuda daha geniş hasta gruplarında analiz yapmak gerektiğini vurgulamıştır. Birçok çalışma, c-erbB-2 amplifikasyonu ile metastatik lenf nodülü sayısının da arttığını göstermiştir (3, 4, 46, 50-52, 59 61-66).

Çalışmamızda, aksiller lenf nodülü metastazı bulunan olguların %53,3'ünde, metastazı olmayanların ise %30'unda c-erbB-2 amplifikasyonu saptadık. Metastazlı olgularda, amplifikasyonun artma eğiliminde olduğu, ancak farkın istatistiksel olarak anlamlı bulunmadığı görüldü ($p=0,1$). Serimizin küçüklüğü, literatürde de örnekleri olduğu üzere, istatistiksel anlam için yetersizdir (59). Ancak metastatik lenf nodülü sayısını ve amplifikasyonu karşılaştırdığımızda, lenf nodülü sayısı arttıkça, amplifikasyon ve ekspresyonunda arttığı tespit edilmiş, sonuç istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0,003$). Bu bulgu, metastatik lenf nodülü sayısı arttıkça, bir anlamda hastalık ilerledikçe, c-erbB-2 amplifikasyon ve ekspresyonunun arttığını ve iki parametrenin birbiriyle bağımlı prognostik faktörler olduğunu göstermektedir. Tümörün lenfovasküler invazyonu ile c-erbB-2 amplifikasyonu arasında ilişki

olup olmadığına baktığımızda, lenfovasküler invazyon arttıkça amplifikasyonun da arttığını tespit ettik. Sonuç istatistiksel olarak anlamlıydı ($p=0,003$). Aksiller lenf nodülü tespit edilmemiş fakat gen amplifikasyonu olan 4 hastada lenfovasküler tümör invazyonu saptanmıştır. Bu bulgu, bu hastaların, metastazı olmasa da risk altında olduklarını, c-erbB-2 pozitifliğinin hastalarda kötü prognozun göstergesi olduğunu düşündürmektedir. Rilke ve arkadaşlarının çalışmasında, gen amplifikasyonu ile lenf nodülü metastazı arasında istatistiksel anlamlı ilişki görülmemiş iken amplifikasyon ve lenfovasküler invazyon arasında anlamlı bir bağlantı saptanmıştır (51).

Östrojen reseptörü ve c-erbB-2 amplifikasyonu çeşitli araştırmalarda değerlendirilmiştir. Bazı araştırmacılar, östrojen reseptörü ve c-erbB-2 arasında kuvvetli bir ters ilişki bulmuşlardır (20, 50, 52, 67, 68). Östrojen reseptörü pozitif olup, c-erbB-2'yi aşırı eksprese eden hastalarda, Tamoxifen tedavisine karşı direnç geliştiği izlenmiştir (67, 69). Saceda ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, erB/HER reseptörünün aktive olmasıyla, östrojen reseptör aktivitesinin kaybolduğu öne sürülmüştür. Buna neden olarak da c-erbB-2 ligandları olan heregulin'in ve gp-30'un östrojen reseptör aktivitesini bloke ettiğini göstermişlerdir (67). Bunun yanında, c-erbB-2 ekspresyonu ile östrojen reseptörünün arasında, istatistiksel olarak anlamlı ilişki gösteremeyen çalışmalar da, kaynaklarda yer almaktadır. Bu araştırmacılar, c-erbB-2 +/-östrojen – hastaların diğer gruplara göre daha kötü prognoza sahip bulunduğunu ancak bunların birbirinden bağımsız iki parametre oldukları görüşünde birleşmişlerdir (52-54, 70).

Çalışmamızda, c-erbB-2 amplifikasyon ve ekspresyonu ve östrojen reseptörü arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmadı. Bu bulgumuz, iki faktörün birbirinden bağımsız parametreler olduğunu düşündürmüştür.

Tümör çapı ve c-erbB-2 arasında anlamlı ilişki olduğunu savunan yayınlar yanı sıra, ilişkisiz olduğunu gösteren de bir çok çalışma vardır (20, 50, 52- 54, 70, 71). Çalışmamızda, c-erbB-2 ekspresyonu ve amplifikasyonu ile tümör çapı arasındaki ilişkiyi değerlendirdik ancak aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulamadık.

Çalışmamızda elde edilen veriler sonucunda, c-erbB-2'nin meme karsinomunda önemli bir prognostik faktör olduğu, tümör grade'i, metastatik lenf nodülü sayısı ve lenfovasküler tümör invazyonu ile bağımlı, ancak hasta yaşı, tümör çapı, histolojik tipi ve östrojen reseptör varlığı gibi prognostik parametrelerden bağımsız olduğunu saptadık. c-erbB-2 ekspresyonunu tayin etmede kullanılan immünohistokimyasal yöntem ile gen amplifikasyonunu tayin etmek için, alternatif metot olan karşılaştırmalı (differential) PCR'ın, birbirleriyle uyumlu ve her

ikisinin de rutin patoloji laboratuvarında, parafin dokularda arşiv materyallerinde uygulanabilirliğini gösterdik. Hasta tedavi , takip ve yaşam sürelerini içeren daha geniş serilerde yapılacak olan çalışmalarda, c-erbB-2 ekspresyon ve amplifikasyonunun değerlendirilmesinin, meme karsinomunda hastalığın tedavi ve prognozuna olumlu katkılar sağlayacağı düşüncesindeyiz.

6. SONUÇLAR

1. Çalışmada 30 infiltratif duktal karsinom, 30 infiltratif lobüler karsinom, olmak üzere toplam 60 meme karsinom olgusu değerlendirilmiştir.
2. Meme karsinomlu olgularımız kadın hasta olup, yaş ortalaması $50,30 \pm 12,37$ 'dir. En genç hasta 25, en yaşlı hasta ise 86 yaşındadır.
3. Duktal karsinomlu 30 hastanın 15'inde (%50), lobüler karsinomlu olguların da 15'inde (%50) aksiller lenf nodülü metastazı bulunmaktadır.
4. On iki olgu (%20) grade I, 32 olgu (%53,3) grade II ve 16 olgu (%16) grade III tümöre sahiptir.
5. Olguların 17'sinde (%28,3) tümör çapı < 3 cm, 43'ünde (%71,7) tümör çapı ≥ 3 cm.dir.
6. Lenfovasküler tümör invazyonu 36 hastada (%60) görülmüştür.
7. İmmünohistokimyasal yöntem ile c-erbB-2 ekspresyonu değerlendirilmiş ve sadece membranöz boyanma pozitif kabul edilmiştir. Membranöz boyanma şiddeti ve devamlılığına göre olgular, +, ++, +++ şeklinde skorlanmıştır.
8. Tümör içeren parafin bloklardan hazırlanan histolojik kesitlerde Karşılaştırmalı (Differential) PCR yöntemi ile c-erbB-2 amplifikasyonu araştırılmış ve referans genin amplifikasyonu ile karşılaştırmalı oran saptanmıştır.
9. c-erbB-2'nin tümördeki ekspresyonu immünohistokimya ile amplifikasyonu PCR yöntemi ile değerlendirilmiş, yapılan karşılaştırmada iki yöntem arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmıştır ($P=0,000$). Bu sonuç, iki yöntemin de meme karsinomunda c-erbB-2 tayini için kullanılabilirliğini göstermiştir.
10. Tümör grade'i ve c-erbB-2 ekspresyonu ve amplifikasyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir uyum saptanmıştır ($p=0,000$). Tümör grade'i arttıkça, c-erbB-2'nin de arttığı görülmüştür.
11. Aksiller lenf nodülü metastazı olan olgularda c-erbB-2 amplifikasyonu belirlenmiş ve metastazlı hastalarda diğer gruba göre daha çok amplifikasyon saptanmış, ancak fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. C-erbB-2 ekspresyonu ve amplifikasyonu, metastatik lenf nodülü sayısı ve lenfovasküler tümör invazyonu karşılaştırılmış, her iki parametre ile aralarında istatistiksel olarak anlamlı ilişki dikkati çekmiştir ($p=0,003$).

12. Tümörde, c-erbB-2 ekspresyonu ve gen amplifikasyonu, hasta yaşı, tümör tipi ve çapı, östrojen reseptör varlığı ilişkisi değerlendirilmiş, istatistiksel olarak anlamlı sonuç bulunamamıştır ($p>0,05$).
13. Bu araştırmanın benzerleri, değişik araştırmacılar tarafından yapılmış ve halen yapılmaktadır. Elde ettiğimiz sonuçlar, kaynaklardaki veriler ile paralellik göstermekte veya aykırılıklar içermektedir. Sonuçlarımız kadar önemli bir nokta, bu çalışmada kullanılan PCR yönteminin Anabilim dalımızda moleküler tekniklerin, araştırma ve rutin amaçlı kullanılmasının başlatılmasına öncülük etmesidir. Meme karsinomunda c-erbB-2 onkogeninin, geniş hasta serilerinde klinik takipler ile birlikte, kantitatif yöntemlerle değerlendirilmesinin daha yararlı olacağı görüşünde yiz.

KAYNAKLAR:

1. Rosai J. *Ackerman's Surgical Pathology*. 8th Ed. Missouri: Mosby-year book inc., 1996.
2. Tavassoli F.A. *Pathology of the Breast*. 2nd Ed., Hong Kong: Mc Graw-Hill Company, 1999.
3. Jeffrey S. Ross, Fletcher J. The HER-2/neu Oncogene in breast cancer: Prognostic factor, Predictive Factor and Target for Therapy. *The Oncologist*, 1998; 3: 237-252.
4. Jeffrey S. Ross, Fletcher J. Her-2/neu (c-erbB-2) gene and protein in breast cancer. *Am J Clin Pathol*, 1999; 112(Suppl):53-67.
5. Wallis Y L, Macdonald F. Oncogens. *J Clin Pathol: Mod Pathol*, 1999; 52: 55-63.
6. Witters LM, Kumar R, Chinchilli VM, Lipton A. Anti-Her-2 Antibody-Effective as single agent and in combination with standart therapy. *Breast Cancer Research & Treatment*, 1997; 42(1): 1-5.
7. Disis ML, Cheever MA. HER-2/neu protein: a target for antigen-specific immunotherapy of human cancer. *Adv Cancer Res*, 1997; 71: 343-71.
8. Dinçer F, Çelik İ. *Cancer statistics in Turkey and in the world*. 1st Ed., Ankara: Alp ofset matbaacılık Ltd.sti., 1998.
9. Cotran R S, Kumar V, Collins T. *Robbins Pathologic Basis of Disease*. 6th Ed., Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1999.
10. Millis R R, Hanby A M, Oberman H A. The breast. In: Sternberg S S. Ed. *Diagnostic Surgical Pathology*, Philadelphiya: Lippincott Williams and Wilkins, 1999.
11. Carter D. *Interpretation of breast biopsies*. 3th Ed., Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1996.
12. Page D. L, Jensen R. A, Simpson J. F. Premalignant and malignant disease of the breast: The role of the pathologist. *Mod Pathol*, 1998; 11(2): 120-128.
13. Ellis I.O, Galea M, Broughton N, Locker A, Blamey R. W, Elston C.W. Pathological prognostic factors in breast cancer. II. Histological type. Relationship with survival in a large study with long-term follow-up. *Histopathology*, 1992; 20: 479-489.
14. Bettelheim R, Price K. N, Gelber R. D, Davis B. W, Castiglione M, Goldhirsch A, Neville A.M. Prognostic importance of occult axillary lymph node micrometastases from breast cancers. *The Lancet*, 1990; 335: 1565-1568.

15. Mascarel I. De, Bonichon F, Coindre J.M, Trojani M. Prognostic significance of breast cancer axillary lymph node micrometastases assessed by two special techniques: reevaluation with longer follow-up. *Br. J. Cancer*, 1992; 66:523-527.
16. Neville A.M, Price K. N, Gelber R. D, Goldhirsch. Axillary node micrometastases and breast cancer. *The Lancet*, 1991; 337: 110.
17. Evans T. R. J, Rowlands M. G, Law M, Coombes R. C. Intratumoral oestrone sulphatase activity as a prognostic marker in human breast carcinoma. *Br J Cancer*, 1994; 69: 555-561.
18. Allred D. C, Harvey J. M, Berardo M, Clark G. M. Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. *Mod Pathol*, 1998; 11(2): 155-168.
19. Akiyama T, Sudo C, Ogawara H, Toyoshima K, Yamamoto T. The product of the human c-erbB-2 gene: A 185-Kilodalton glycoprotein with tyrosine kinase activity. *Science*, 1986; 232:1644-1646.
20. McCann A. H, Dervan P. A, O'Regan M, Codd M. B, Gullick W. J, Tobin B. M. J, Carney D. N. Prognostic significance of c-erbB-2 and Estrogen receptor status in human breast cancer. *Cancer Res*, 1991; 51: 3296-3303.
21. Sharma A, Pratap M, Sawhney V. M, Khan I. U, Bhamnani S, Mitra A. B. Frequent amplification of c-erbB-2 (HER-2/Neu) oncogene in cervical carcinoma as detected by non-fluorescence in situ hybridization technique on paraffin sections. *Oncology*, 1999; 56: 83-87.
22. Brien T P, Depowski P L, Sheehan C E, Ross J S, McKenna B. Prognostic factors in gastric cancer. *Mod Pathol*, 1998; 11(9): 870-877.
23. Ross J S, Sheehan C, Hayner-Buchan A M, Ambros A R, Fisher H A, Muraca P J. HER-2/neu gene amplification status in prostate cancer by fluorescence in situ hybridization. *Human pathol*, 1997; 28: 827-833.
24. Menard S, Tagliabue E, Campiglio M, Pupa SM. Role of HER2 gene overexpression in breast carcinoma. *J Cell Physiol*, 2000; 182(2): 150-62.
25. Fornier M, Esteve M, Seidman AD. Trastuzumab in combination with chemotherapy for the treatment of metastatic breast carcinoma. *Semin Oncol*, 2000; 27(6 suppl 11): 38-45.
26. Leary o, Engels J, Dada M. A. Origins of...: The polymerase chain reaction in pathology. *J Clin Pathol*, 1997; 50(10): 805-810.
27. Fenoglio-Preiser C, Willman C. L. Molecular Biology an the Pathologist. *Arch Pathol Lab Med*, 1987; 111: 601-619.
28. Baumforth K. R. N, Nelson P. N, Digby J. E, O'Neil J. D, Murray P.G. The Polymerase Chain Reaction. *J Clin Pathol*, 1999; 52: 1-10.
29. Markham A. F. Regular Review: The polymerase chain reaction: A tool for molecular medicine. *B Med J*, 1993; 306(6875): 441-446.
30. Remick D. G, Kunkel S. L, Holbrook E. A, Hanson A. C. Theory and applications of the polymerase chain reaction. *Am J Clin Pathol*, 1990; 93(Suppl): 49-54.

31. **Sambrook J, Fritsch E.F, Maniatis T.** *Molecular Cloning*. 2nd. Ed., New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
32. **Jennings B A, Hadfield J E, Worsley S D, Girling A, Willis G.** A differential PCR assay for the detection of c-erbB-2 amplification used in a prospective study of breast cancer. *J Clin Pathol*, 1997;50:254-256.
33. **Gramlich T L, Cohen C, Fritsch C, Derosé P B, Gansler T.** Evaluation of c-erbB-2 Amplification in breast carcinoma by differential polymerase chain reaction. *Am J Clin Pathol*, 1994;101: 493-499.
34. **Wright P. A, Wynford-Thomas D.** The polymerase chain reaction; Miracle or mirage? A critical review of its uses and limitations in diagnosis and research. *J Pathol*, 1990; 162: 99-117.
35. **Cooper G M.** *The cell: A molecular approach*. 1st. Ed., Massachusetts: ASM Press, 1997.
36. **Slamon DJ, Clark GM, Wong SG.** Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science*, 1987;235: 177-182.
37. **Jacobs T, Gown A. M, Yaziji H, Barnes M, Schnitt S. J.** Comparison of Fluorescence insitu hybridization and immunohistochemistry for the evaluation of HER-2/neu in breast cancer. *J Clin Oncol*, 1999;7:1974-1982.
38. **Pauletti G, Godolphin W, Press M, Slamon D J.** Detection and quantitation of HER-2/neu gene amplification in human breast cancer archival material using fluorescence in situ hybridization. *Oncogene*, 1996; 13: 63-72.
39. **Venter DJ, Tuzi NL, Kumar S, Gullick W.** Overexpression of the c-erbB-2 oncoprotein in human breast carcinomas: Immunohistological assessment correlates with gene amplification. *The Lancet*, 1987; 11:69-71.
40. **Charpin C, Garcia S, Bouvier C, Martini F, Lavaut MN, Allasia C, Bonnier P, Andrac L.** C-erbB-2 oncoprotein detected by automated quantitative immunocytochemistry in breast carcinomas correlates with overall and disease-free survival. *B J Cancer*, 1997; 75(11): 1667-1673.
41. **Johnson RC, Ricci A Jr, Cartun RW, Ackroyd R, Tsongalis GJ.** P 185HER2 overexpression in human breast cancer using molecular and immunohistochemical methods. *Cancer Invest*, 2000; 18(4): 336-42.
42. **Jakic-Razumovic J, Petroveci M, Uzarevic B, Gamulin S.** Mutual predictive value of c-erbB-2 overexpression and various prognostic factors in ductal invasive breast carcinoma. *Tumori*, 2000; 86(1): 30-6.
43. **Wisecarver JL.** HER-2/neu testing comes of age. *Am J Clin Pathol*, 1999; 111:m 299-301.
44. **Press M F, Hung G, Godolphin W, Slamon D.** Sensitivity of HER-2/neu Antibodies in archival tissue samples: Potential source of error in immunohistochemical studies of oncogene expression. *Cancer Res*, 1994;54:2771-2777.

45. Harbeck N, Ross JS, Yurdseven S, Dettmar P, Polcher M, Kuhn W, Ulm K, Graeff H, Schmitt M. HER-2/neu gene amplification by fluorescence in situ hybridization allows risk-group assessment in node-negative breast cancer. *International Journal of Oncology*, 1999; 14: 663-671.
46. Tetu B, Brisson J. Prognostic significance of HER-2/neu oncoprotein expression in node-positive breast cancer. *Cancer*, 1994; 73:2361-65.
47. Keshgegian A, Cnaan A. ErbB-2 oncoprotein expression in breast carcinoma poor prognosis associated with high degree of cytoplasmic positivity using CB-11 Antibody. *Am J Clin Pathol*, 1997; 108:456-163.
48. Bacus S, Bacus J W, Slamon D J, Press M F. HER-2/Neu oncogene expression and DNA ploidy analysis in breast cancer. *Arch Pathol Lab Med*, 1990; 114: 164-169.
49. Tsuda H, Hirohashi S, Shimosato Y, Hirota T, Tsugane S, Watanabe S, Terada M, Yamamoto H. Correlation between histologic grade of malignancy and copy number of c-erbB-2 gene in breast carcinoma. *Cancer*, 1990; 65: 1794-1800.
50. Berger M S, Locher G W, Saurer S, Gullick W J, Waterfield M D, Groner B, Hynes N E. Correlation of c-erbB-2 gene amplification and protein expression in human breast carcinoma with nodal status and nuclear grading. *Cancer Res*, 1988; 48: 1238-1243.
51. Rilke F, Colnaghi M I, Cascinelli N, Andreola S, Baldini M T, Bufalino R, Della Porta G, Menard S, Pierotti M A, Testori A. Prognostic significance of HER-2/neu expression in breast cancer and its relationship to other prognostic factors. *Int J Cancer*, 1991; 49: 44-49.
52. Perren T J. c-erbB-2 oncogene as a prognostic marker in breast cancer. *Br J Cancer*, 1991; 63: 328-332.
53. Press M F, Bernstein L, Thomas P A, Meisner L F, Zhou J Y, Ma Y, Hung G, Robinson R A, Harris C, El-Naggar A, Slamon D J, Phillips R N, Ross J S, Wolman S R, Flom K J. HER-2/neu gene amplification characterized by fluorescence in situ hybridization: poor prognosis in node-negative breast carcinomas. *J Clin Oncol*, 1997; 15: 2894-2904.
54. Kalliomäki O P, Holli K, Visakorpi T, Koivula T, Helin H, Isola J. Association of c-erbB-2 protein over-expression with high rate of cell proliferation, increased risk of visceral metastasis and poor long-term survival in breast cancer. *Int J Cancer*, 1991; 49: 650-655.
55. Uehara T, Kaneko Y, Kanda N, Yamamoto T, Higashi Y, Nomoto C, Izumo T, Takayama S, Sakurai M. C-erbB-2 and c-erbB-1(car-1) gene amplification and c-erbB-2 protein expression in Japanese breast cancers: their relationship to the histology and other disease parameters. *Cancer Res*, 1990; 81: 620-624.
56. Supanaranond K, Sukarayodhin S, Tanyakaset M, Balachandra K, Jullaksorn D, Rienkijarn M, Hoisanka N, Tantivanich S. The significance of HER-2/neu/c-erbB-2 gene amplification in benign and malignant breast disease. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 1997; 28:631-40.
57. Descotes F, Pavy JJ, Adessi GL. Human breast cancer: correlation study between HER-2/neu amplification and prognostic factors in an unselected population. *Anticancer*, 1993; 13: 119-124.
58. Imyanitor EN, Chernitsa OI, Serova OM, Nikoforova IF, Pluzhnikova GF, Knyazev PG. Amplification of HER-2(erB-2/neu) oncogene as the most significant prognostic factor in a group of Russian breast cancer patients. *Neoplasma*, 1993; 40:35-9.
59. Masakuni N, Koyasaki N, Ohta N, Kitagawa H, Earashi M, Thomas M, Miyazaki I, Mizukami Y. C-erbB-2 oncoprotein expression versus internal mammary lymph node metastases as additional prognostic factors in patients with axillary lymph node-positive breast cancer. *Cancer*, 1992; 69: 2953-2960.

60. **Babiak J, Hugh J, Poppema S.** Significance of c-erbB-2 amplification and DNA aneuploidy analysis in 78 patients with node-negative breast cancer. *Cancer*, 1992; 70: 770-776.
61. **Bianchi S, Paglierani M, Zampi G, Cardona G, Cataliotti L, Bonardi R, Ciatto S.** Prognostic significance of c-erbB-2 expression in node negative breast cancer. *Br J Cancer*, 1993;67: 625-629.
62. **Fernandez J L, Goyanes V, Fernandez C L, Buno I, Gosalvez J.** Quantification of c-erbB-2 gene amplification in breast cancer cells using fluorescence in situ hybridization and digital analysis. *Cancer Genet Cytogenet*, 1996; 86:18-21.
63. **Peterson MC, Dietrich KD, Danyluk J, Paterson AH, Les AW, Jamil N, Hanson J, Jenkins H, Krause BE, Mc Blain WA.** Correlation between c-erbB-2 amplification and risk of recurrent disease in node-negative breast cancer. *Cancer Res*, 1991; 51(2): 556-67.
64. **Tandon AK, Clark GM, Chamness GC, Ullrich A, McGuire W.** HER-2/neu oncogene protein and prognosis in breast cancer. *J Clin Oncol*, 1989;7: 1120-1128.
65. **Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE, Levin WJ, Stuart SG, Udove J, Ullrich A, Press MF.** Studies of the HER-2/neu Proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science*, 1989; 244:707-712.
66. **Wright C, Angus B, Nicholson S, Sainsbury JR, Cairns J, Gullick WJ, Kelly P, Harris AL, Horne CH.** Expression of c-erbB-2 oncoprotein: a prognostic indicator in human breast cancer. *Cancer Res*, 1989; 49(8): 2087-90.
67. **Saceda M, Grunt T W, Colomer R, Lippman M E, Lupu R, Martin M B.** Regulation of estrogen receptor concentration and activity by an erbB/HER ligand in breast carcinoma cell lines. *Endocrinology*, 1996;137:4322-4330.
68. **Collett K, Hartveit F, Skjaerven R, Machle B O.** Prognostic role of oestrogen and progesterone receptors in patients with breast cancer: relation to age and lymph node status. *J Clin Pathol*, 1996; 49:920-925.
69. **Pinto AE, Andre S, Pereira T, Nobrega S, Soares J.** C-erbB-2 oncoprotein overexpression identifies a subgroup of estrogen receptor positive (ER+) breast cancer patients with poor prognosis. *Ann Oncol*, 2001; 12(4): 525-33.
70. **Sutterlin MW, Haller A, Gassel AM, Peters K, Caffier H, Dietl J.** The correlation of c-erbB-2 oncoprotein and established prognostic factors in human breast cancer. *Anticancer Res*, 2000; 20(6):5083-8.
71. **Yamada Y, Yoshimoto M, Murayama Y, Ebuchi M, Mori S, Yamamoto T, Sugano H, Toyoshima K.** Association of elevated expression of the c-erbB-2 protein with spread of breast cancer. *Jpn J Cancer Res*, 1989; 80(12): 1192-8.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Şeyda Erdoğan

Doğum tarihi ve yeri : 01.11.1966/ K.d.z Ereğli

Medeni durumu : Evli, 2 çocuklu

Adres : Güzelyalı mah. Adnan Kahveci Bulvarı, 10 sok. No:2,
Günhar apt. Da:12 / Adana

Telefon : 0.322.2338397

Fax : 0.322.3386956

E.mail : seydaer@yahoo.com

Mezun olduğu Tıp Fakültesi : İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi

Varsa mezuniyet derecesi : -

Görev yerleri : Hürriyet sağlık ocağı, Ceyhan, Adana, Fatih Sağlık
Ocağı, Adana, İl Sağlık Müdürlüğü, Adana, Çukurova
Üniversitesi, Tıp Fakültesi Patoloji A.B.D

Dernek Üyelikleri : Çukurova Patoloji Derneği, Türk Kanser Araştırma ve
Savaş Derneği, European Society of Pathology

Alınan Burslar : -

Yabancı Dil : İngilizce

Diğer Hususlar : -