

ARAŞTIRMA MAKALESİ

CBU-SBED, 2015, 2(4):101-105

Meme Kanseri Proteom Profiline Yüzey Geliştirilmiş Lazer Desorpsiyon / İyonizasyon Uçuş Kütle Spektrometrisi (SELDI-TOF MS) ile Belirlenmesi

Yasemin Baskın¹, Türkan Yiğitbaşı², Murat Kemal Atahan³, Hakan Küpeli³, Seyran Yiğit⁴, Ercüment Tarcan³

Yayınlanma: 30.12.2015

¹Dokuz Eylül Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji A.D.²Medipol Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya A.D.³İzmir Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi I. Cerrahi Kliniği⁴İzmir Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi Patoloji Kliniği*Sorumlu Yazar Yasemin Baskın, e-mail: ybaskin65@gmail.com

Özet

Amaç: Yüzey geliştirilmiş lazer desorpsiyon / iyonizasyon (SELDI) Uçuş kütle spektrometrisi (TOF MS) kullanılarak erken evre meme kanseri hastalarında serum proteom profilinde protein markerlar tanımlandı.

Yöntem: Serum proteom fraksiyonlarını ayırlama için metal iyon kromatografi (IMAC30-Cu) kullanıldı ve farklı şekilde ekspres olan peptitler (m / z; p < 0.0001), erken evre meme kanserini benin ve sağlıklı olgulardan ayırmak için olası bir biyolojik belirteç olarak kullanıldı. Kütle spektrumları, ProteinChip Data Manager yazılımı kullanılarak analiz edildi, hasta ve sağlıklı bireyler arasında ayırım k-nearest neighbor genetik algoritması ile yapıldı. Çalışmaya 70 meme kanseri (62 invaziv meme karsinomu, 8 duktal karsinoma insitu), 31 benin meme hastası ve 37 sağlıklı birey dahil edildi.

Bulgular: İstatistiksel olarak 42 protein piki olgular ve kontroller arasında anlamlıydı (p<0.05); 10 protein piki hasta ve benin meme hastalarında farklı ekspres edilmişti. Bu sonuçlar, üç farklı grup arasında serum protein ifadesindeki farklar olduğunu göstermektedir.

Sonuç: SELDI-TOF MS ile kan örneklerinde profil taraması, meme kanseri hastalarının erken tanısı için kullanılabilir ve serum proteom profili meme kanserli hastaların klinik tanısı için potansiyel yeni bir araçtır.

Anahtar Kelimeler: Serum proteomik profil, SELDI-TOF MS, meme kanseri

Abstract

Objective: Surface-enhanced laser desorption/ionization time-of flight mass spectrometry (SELDI-TOF MS) was used to screen serum proteomic profiling to identify protein markers for early breast cancer patients.

Methods: We used metal ion affinity chromatography (IMAC30-Cu) for serum proteome fractionation technique and identify differentially expressed peptides (m/z; P < 0.0001) from benign disease and healthy controls as potential biomarkers of early breast cancer. The mass spectra, analyzed using ProteinChip Data Manager Software, distinguished between patients and healthy individuals based on k-nearest neighbor genetic algorithm. We collected 70 serum samples from patients with breast cancer (62 invasive breast carcinoma; 8 ductal carcinoma in situ), 31 benign disease and 37 healthy individuals.

Results: Forty two peaks showed statistically significantly different intensities between cases and controls (P<0.05); 10 protein peaks were differentially expressed between the patients and benign disease. These results indicate that there are differences in serum protein expression among the three different groups of patients.

Conclusion: SELDI-TOF MS could be used to screen blood samples for the early detection of breast cancer patients. Serum proteomic profiling by SELDI-TOF MS is a novel potential tool for the clinical diagnosis of patients with breast carcinoma.

Keywords: serum proteomic profiling, SELDI-TOF MS, Breast carcinoma

Giriş

Meme kanseri ülkemizde, dünyada olduğu gibi en sık görülen kanserdir (1). Meme kanseri, hücre çoğalması ve genetik kararsızlığa yol açan çok sayıda moleküler değişiklikle daha invaziv (yayılan) ve rezistan (dirençli) özellik kazanabilen karmaşık bir hastalıktır. Bu heterojenite moleküler düzeyde farklı alt gruplar yaratmakta ve farklı klinik sonuçlara, sağaltım yanıtlarına neden olmaktadır. Daha iyi klinik sonuçlara ulaşmak üzere çalışmalar, hastalığın nedeni olan moleküler yapıları belirlemeye, hastalık evrelerini, hastalığa ve kişiye özgü farklılıkları ortaya koyarak, hastalığın erken tanısını, sağaltıma yanıtı ve sağaltım sonrası nüksleri izleyebilecek kanser belirteçlerine ve yeni sağaltım hedefi olabilecek moleküler yapıları odaklanmıştır (2). Dinamik hücresel değişimleri eş

zamanlı izlemeyi gerekli kılan bu yaklaşım, ancak insan genom analizinin tamamlanması sürecinde gelişen teknoloji ile klinik çalışmalara yansımıştır.

Genom çalışmaları; hastalıkların moleküler temellerini anlamamızı sağlamıştır. Ancak, hızla değişen hücre fonksiyonlar proteom çalışmaları ile açıklık kazanmaktadır. Çünkü aynı genom farklı proteom çıktılarını neden olabilir (3). Proteom terimi, ilk olarak 1994'te kullanılmıştır ve bir hücre, doku ya da organizmanın tüm proteinlerini; proteomik ise proteomun tüm biyolojik aktiviteleriyle ilişkili çalışmalarını anlatır (3). Kanser araştırmalarında proteomik teknolojiler, işlevsel ve düzenleyici yolları ayırmayı ve tanımlayan (4), doku ve biyolojik

sıvılarda hastalığın nedeni olan moleküler yapıları belirleyen, hastalık evrelerini ya da hastalığa ve kişiye özgü farklılıkları ortaya koyan çok değerli verileri üretmektedir (5). Son yıllarda çeşitli biyolojik örneklerde yapılan proteom çalışmaları artmaktadır. Meme kanserinde de, hastalık süreçlerini daha iyi anlamak üzere, tümör dokusu ve biyolojik sıvılarında (serum, iğne aspirasyon sıvısı, duktal lavaj sıvısı ve tümör hücrelerarası sıvısı) yapılan çok sayıda öncül çalışma bulunmaktadır.

Son yıllarda kullanılmaya başlanan kütle spektroskopisinde, kompleks protein örneklerinin analizi, basınç altında gaz fazındaki iyon karışımının kütle/yük oranı (m/z) ve her m/z değerinde bulunan iyon sayısının saptanmasıyla gerçekleştirilir. "Surface-enhanced laser desorption ionization" SELDI, daha kompleks örneklerin analizini sağladığı için, özellikle kanser proteomiklerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu yöntemde, protein saflaştırma, ayırma ve moleküler etkileşimler için farklı yüzey seçenekleri olan protein yongaları kullanılır.

Literatürde SELDI-TOF-MS analizleri için iki önemli konuya dikkat çekilmektedir. Bunların ilki, düşük kalitedeki spektraların veri analizi öncesinde ayıklanmasının sağlanması ve bu amaçla yapılacak analitik geçerlilik ve kalite kontrol süreçlerinin eksikliğidir. Bu süreç proteomik verilerinde, gürültüyü (noise) azaltacak ve tanısal geçerliliğe daha az değişkenlik (variability) olarak yansıtacaktır. Bir diğer sorun, tanısal geçerlilik açısından tartışılmaktadır. SELDI-TOF-MS ile protein örüntü verileri, elde edilen büyük sayıda çıktıya göreceli olarak küçük örnek büyüklüğüne sahip olgu gruplarında elde edilmektedir. Ancak hedef saptamada çalışmaya alınacak küçük grubun çok kesin ölçütlerle ve olası en az değişkenlikle seçilmesi gereklidir.

Saptanan hedef piklerin ise daha geniş bir olgu grubunda doğrulanması ve biyoinformatik araçların etkin kullanımı gerekmektedir (6). Bol bulunan aday proteinler çoğunlukla akut faz yanıtı olan proteinleri içermektedir ve kansere özgü proteinler henüz klinik geçerlilik kazanamamıştır.

Gereç ve Yöntem

Bu prospektif çalışmada İzmir Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi yerel etik kurulu ve hastaların yazılı onayı alınarak 1. Cerrahi Polikliniğine başvuran hastalar çalışmaya dahil edildi. Kanser grubu 70 hastadan oluşmaktaydı. Bunlardan 62'si invaziv meme karsinomu (yaş aralığı 37-73; ortalama 52.6) ve 8 tanesi duktal karsinoma insitu (yaş aralığı 22-55; ortalama 41.6) idi. Kanser olmayan 68 kontrol olgusu, 31'i iyi huylu meme hastalıklarına (yaş aralığı 21-57; ortalama 40) sahip ve 37 sağlıklı kadından (yaş aralığı 23-71; ortalama 39.1) oluşuyordu. Hasta kan örneklemi cerrahi tedavi gören hastalarda (tüm iyi huylu meme hastalığı olanlar ve metastatik olmayan meme kanserli hastalar) cerrahi müdahaleden ya da diğer tüm vakalar için tedaviden önce alındı. Mamogramlar ve meme ultrasonları tüm hastalar için tedaviden önce alınmıştır. Teşhisler patoloji

etkileriyle doğrulandı. Kanser hastaları için ek klinik bilgiler hücre tipi, tümör büyüklüğü, lenf nodu durumu, östrojen ve progesteron reseptör durumundan oluşuyordu.

Histopatolojik Değerlendirme: Malign olgularda her olgu için en tanımlayıcı blok seçildi ve Strept –Avidin – Biotin yöntemi ile Östrojen reseptörü -ER(Novocastra RT4-ER-6F11 7 ml , UK) , Progesteron reseptörü-PR (Neomarkers RM 9102-S, USA) , P 53 (Dako Clone Do7; Denmark) , c erbB-2 (Labvision Clone SP 3 7 ml USA), Ki 67 proliferasyon belirleyicisi (Dako Clone MIB1 , Denmark) uygulandı. Progesteron reseptörü, P 53 ve Ki 67 proliferasyon belirleyicisi olarak kullanılan materyaller konsantrasyonları için sırasıyla 1/100, 1/25 ve 1/75 oranında dilüe edilerek uygulandı . Kromojen madde olarak diaminobenzidin (DAB) , zıt boyama için Mayer's hemotoksileni kullanıldı. ER, PR ve P53 değerlendirilmesi yapılırken nükleer boyanmanın hem boyanma yüzdesi hem de şiddeti (+zayıf, 2+orta, 3+ şiddetli) dikkate alındı ve skorlandı Cerb B-2 ; invaziv tümörlerdeki membranöz boyanma dikkate alınarak 4 skorda değerlendirildi Ki 67 ise nükleer boyanmanın en yüksek olduğu alanlar sayılarak yüzde saptandı.

SELDI-TOF-MS Analizi

Örnek Hazırlığı: Kan örnekleri, operasyon ve sağaltım öncesi dönemde, 12 saatlik açlık sonrasında, oturur pozisyonda 8 ml'lik vakumlu jelli tüplere alındı. Örnekler 1500 g'de 15 dk santrifüj edilerek serumları ayrıldı. Serum örnekleri, 250 µL olarak bölünerek -80°C'de analiz edilinceye kadar saklandı.

Serum Protein Profiline Saptanması: Serumların analizinde proteinlerin ayırılmasında, Cu²⁺ metal yüklü IMAC 30 protein yongaları kullanıldı. Örneklerin tanımlanan yerlere yüklenmesi biyoprosesör ile yapıldı. IMAC30 protein yongaları, her örnek üzerine 50 µL, 100mM CuSO₄ konularak 5 dakika oda ısısında inkübe edildi. Distile su ile temizlendi ve 200 µL bağlanma solüsyonu (500mM NaCl, 100mM NaH₂PO₄/NaOH, pH 7.0) ile 3 kez onar dakika yıkandı. Tüm serumlar, önce dilüsyon solüsyonu (9 M urea, 50mM Tris/HCl, pH 9.0, 2 % (wv-1) CHAPS) ile 5:1 oranında seyreltildi. Daha sonra bağlanma solüsyonu ile 10:1 oranında yeniden seyreltilerek yonga üzerindeki kuyucuklara 100µL olarak uygulandı. Örneklerin yüklendiği protein yongalar, yatay çalkalayıcıda (900 r.p.m, oda ısısında) bir saat tutularak proteinlerin bağlanması sağlandı. Yongalar 4 kez 200µL bağlanma solüsyonu ile (10'ar dakika yatay çalkalayıcı üzerinde) yıkandı sonrasında distile su ile temizlendi. Oda ısısında kurutuldu. Her kuyucuk üzerine 1 µL matriks solüsyonu (50% saturated solution of sinapinic acid in 50% acetonitrile, 0.5% trifluoroacetic acid) eklenerek oda ısısında kurutuldu. Bir µL Matriks solüsyonu eklenerek yeniden kurutuldu. Yongalar, "surface-enhanced laser desorption/ionization time-of flight mass spectrometry" SELDI-TOF-MS analizi için PBS IIc SELDI-TOF (CiphaGen, Biosystems Inc., Fremont, CA, USA) cihazına otomatik olarak yüklendi. Protein kütle analizi için spektralar, 0-20 kDa aralığında toplandı. Lazer uygulaması, 192 atımlı, pozitif yönlü ve 220 şiddetinde gerçekleştirildi.

Proteinlerin kütle tayini için eksternal kalibrasyon, hafif peptid standartları (All-in-one **peptide** molecular mass. **standard -CIPHERGEN** Biosystems, Inc.) kullanılarak yapıldı.

İstatistik Analiz: Spektra verileri, veri işlemci ve tek değişkenli istatistik analizleri yapabilen bir yazılıma (ProteinChip Data Manager Software) aktarıldı. Tüm spektraların kütle kalibrasyonları internal olarak yapıldı, pik şiddetleri, total iyon akımına göre normalize edildi.

Pik kümeleme ve seçme işlemi, SPA pikleri ile örtüşen çok düşük kütle bölgesi (0-1500 Da) dışlanarak gerçekleştirildi. Her pik kümesi, iki grup kıyaslama testlerinden Mann-Whitney U testi kullanılarak, gruba ait p değerleri hesaplandı. İstatistiksel önem düzeyi $p < 0.05$ olarak seçildi. ROC eğrisi altında kalan alanlar (receiver-operator characteristic curve-ROC AUC), her pik kümesi için hesaplandı. Tek yönlü istatistik analizinde istatistiksel olarak farklılık yarattığı görülen tüm pikler, hiçbir yanlış pik kalmayınca kadar, manuel sistemle kontrol edilerek doğrulandı.

Bulgular

Hasta grubunun serum proteom analizinde 118 geçerli protein örüntüsü bulundu. Bu örüntünün, kanser ve kanser olmayan grup ile tanısız sınıflamaları arasındaki dağılımları incelendi. Cluster analizine göre ayırtılma gücüne sahip bu 118 pik arasında 42 tanesi Mann-Whitney U testi ile istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Bu piklerden ROC alanı en fazla olan 10 adayın özellikleri Tablo 1’de gösterildi. 4000 Da ve 10000 Da aralığında meme kanseri, benign meme hastalığı ve sağlıklı kontrol olgularının proteomlarına ait jel görüntüleri Şekil 1’de gösterildi. Meme kanseri ve kontrol olgularının SELDI-TOF-MS pik görüntüleri Şekil 2’de gösterildi. Li ve ark. tarafından BC1, BC2 ve BC3 olarak tanımlanan 4.1 kDa, 8.1 kDa ve 8.9 kDa protein piklerine ait dağılımlar sırası ile Şekil 3-5’de gösterildi.

Tartışma

Meme kanserinde kütle spektroskopisi ile ilgili Ocak 1995 - Kasım 2015 yılları arasında 2677 çalışma yayınlanmıştır. Protein tanımlamasını içeren yalnızca 20 çalışma bulunmaktadır. Meme kanserinde tümör belirteçlerinin kullanımını düzenleyen ASCO (American Society of Clinical Oncology) yönergesini güncelleme komitesi tarafından incelenen bu çalışmalarda; serum, aspirasyon sıvısı (NAF), tümör dokusu ve hücreler arası sıvısında (TIF) saptanmış 50 kadar aday protein, klinik kullanım için umut vadeden proteomik gösterge olarak değerlendirilmiştir.

Serum ve plazma, insan vücudunun fizyolojik ve patolojik süreçlerine oldukça etkin bir yanıt üretmesi nedeniyle tüm kanserlerde olduğu gibi, meme kanseri için yapılan biyobelirteç çalışmalarında da yeğlenen kaynaklardır. Bu zengin bir protein bilgi kaynağıdır. Tümör tarafından salgılanan proteinler yanında, tümöre özgü proteazlarca yıkılan normal doku ve plazma proteinlerini, tümöre bölgesel ya da genel yanıt oluşturan proteinleri de kapsar. Bu karmaşık yapısından kaynaklanan güçlüğe karşın örneklem kolaylığı,

yinelenbilirlik açısından klinik kullanıma son derece uygundur (7). Meme kanserinde, serum ve plazma kaynağından yapılan SELDI-TOF-MS yöntemleri ile gerçekleştirilmiş çalışmalarda çoğunlukla yapısal bir tanımlama olmaksızın, tanı ve sınıflandırmaya yönelik protein örüntüleri önerilmiştir. Becker ve ark. (8) BRCA-1 mutasyonu bulunan kanserlerin tanımlanmasında, Laronga (9) tanı ve sınıflama amaçlı protein örüntülerinin kullanımını önermişlerdir. Bu çalışmalarda önerilen 23 proteini kapsayan bir örüntünün %94 duyarlılık ve % 100 özgüllük ile iki grubu tanımlayabildiğini bildirmektedir (10). Ancak bu çalışmalarda proteinlerin yapısal tanımlaması yapılmamıştır ve henüz bağımsız bir olgu grubunda geçerlilikleri test edilmemiştir. Belluco ve ark. tarafından sürdürülen tanı ve sınıflamada kullanımı önerilen yedi protein örüntüsü, yapısal olarak tanımlanmamakla birlikte, bağımsız bir olgu grubunda geçerlilikleri test edilmiş ve aday proteinler olarak sunulmuşlardır (11). Li ve ark tarafından meme kanserinde biri azalan (4.3 kDa), ikisi artan (8.1 ve 8.9 kDa) biyobelirteç olarak saptanmış; daha sonraki çalışmalarında sırasıyla ITIH4 (inter-alpha-tyrpsin inhibitor heavy chain H4), C3adesArgΔ8 (C3a des-arginine-C terminal truncated peptid) ve C3adesArg (C3a des-arginine) olarak yapısal tanımlamaları yapılmış üç protein örüntüsü bağımsız olgu gruplarında da yinelenmiştir (12). Bu biyobelirteçlerle ilişkili sonraki yayınlarda ise; 8.1 kDa olan belirteçin kanser olgularındaki artışı anlamlı bulunmamış (13-15), 8.9 kDa olan belirteçin metastatik yinelemelerde azaldığı bildirilmiştir (16). ITIH4 (4.3 kDa) fragmanı ise Song ve ark.(17), Villanueva ve ark. (18), Fung ve ark. (19) tarafından yapılan çalışmalarda kanser olgularında arttığı bulunmuştur. Bu nedenle Li ve ark. tarafından önerilen üç biyobelirteçin meme kanseri tanısındaki değerleri henüz tartışmalıdır. ITIH4 gibi, kanser hastalarının kanındaki pıhtılaşma durumunu yansıtan fibrinopeptid A, fibrinogen alpha, C3f, C4a, apolipoprotein A-IV, bradykinin, factor XIII, ve transthyretin gibi belirteçlerin tanı ve sınıflama amaçlı kullanımları önerilmektedir. Bu belirteçlerin serum ve plazma değerleri, matrikse özgü değişiklikler içermektedir (20-22). Kanser belirteçlerini tanımlamada proteomik teknolojiler, işlevsel ve düzenleyici yolları ayırtılaben ve tanımlayan, doku ve biyolojik sınırlarda hastalığın nedeni olan moleküler yapıları belirleyen, hastalık evrelerini ya da hastalığa ve kişiye özgü farklılıkları ortaya koyan çok değerli verileri üretmektedir. Bu veriler kliniğe, hastalığın erken tanısını, sağaltıma yanıtı ve sağaltım sonrası nükslerin saptanmasını sağlayan etkin belirteçlerin belirlenebilmesi olarak yansiyacaktır. Bu çalışma daha az girişim gerektiren bir yöntem olarak serum protein profilinin meme kanseri tanısında kullanımını göstermektedir. Bu bağlamda biyomarker araştırmalarında örneklerin histopatolojik, klinik özellikleri ile oluşturdukları alt gruplar tanısız gücün belirlenmesinde kafa karıştırıcı durumlar olarak karşımıza çıkar. Bu nedenle çalışmalarda örneklemin demografik özelliklerini belirtmek önemlidir. Bu alanda bilimsel yaklaşım profil belirlenmesinde mümkün olan en ortak yapıda örneklemin yapılmasıdır. Ortaya konan profilin daha sonra en değişken alt grupların oluşturduğu

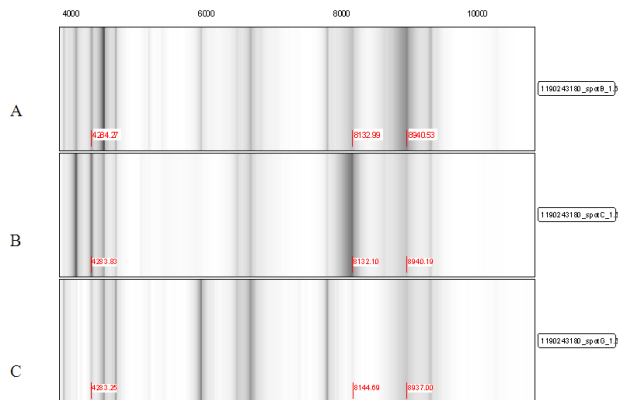
bir deney grubunda klinik validasyona girmesi beklenir. Çalışmamız bu süreçte bir tanısal profil önermektedir. Alt grup örneklerinin yeterli güçte olacağı bir validasyon çalışmasına kaynak oluşturacaktır. Literatürde de bu umut veren gelişmelere karşın, proteomik belirteçlerin tanısal amaçla kullanımları hala bir dizi validasyon çalışmasını gerektirmektedir. Bu çalışmalar sonrasında diğer tanısal işlemlerle birlikte kullanımı (mamaografi, immunoassay, ultrason, gaitada gizli kan vb.) erken tanı ve sağaltım yanıtlarının izlenmesinde önemli hale gelebilecektir.

Meme Kanseri araştırmalarında son yıllarda artan bir hızla, proteomik yöntemler kullanılmaktadır. Bu çalışmanın bulguları, önceki çalışmalarda kaydedilen bir grup proteinin doğrulamakta ve yapısal olarak tanımlanmamış bir grup protein örüntüsünü aday olarak önermektedir. Ancak bu araştırmaların, iyi tanımlanmış daha büyük örneklem gruplarıyla yapılacak prospektif çalışmalarla, farklı popülasyonlarda ve farklı analiz yöntemleriyle yinelenmesi önerilmiştir.

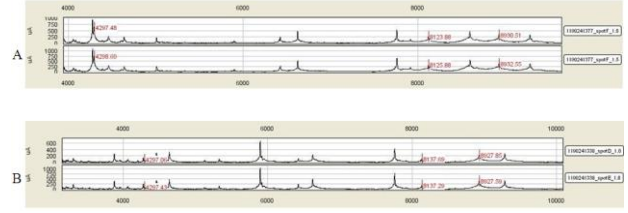
Tablo 1: Malign olguları ayırmayı sağlayan SELDI-TOF-MS protein örüntüleri içinde ROC alanı en fazla olan 10 aday protein belirteç

m/z oranı	Mann-Whitney U testi P	ROC alanı	Malign olguların "intensity" değeri Ortalama SD	Kontrol olgularının "intensity" değeri Ortalama SD	Değerlendirme yönü
1452	0.001	0.775	154.741 88.010	262.176 124.995	azalan
2670	0.0001	0.796	19.885 17.006	42.802 20.852	azalan
3973	0.0001	0.781	62.288 36.266	104.056 45.173	azalan
5336	0.001	0.760	45.738 39.679	121.968 88.218	azalan
5354	0.0001	0.805	18.480	28.644	azalan
5523	0.0001	0.809	8.944 6.808	17.004 7.649	azalan
6850	0.0001	0.219	44.547 29.012	21.947 16.653	artan
7926	0.0001	0.204	70.856 36.195	37.564 17.542	artan
8131	0.001	0.249	142.293 125.600	35.545 21.354	artan
8143	0.0001	0.219	138.371 80.325	62.195 35.949	artan

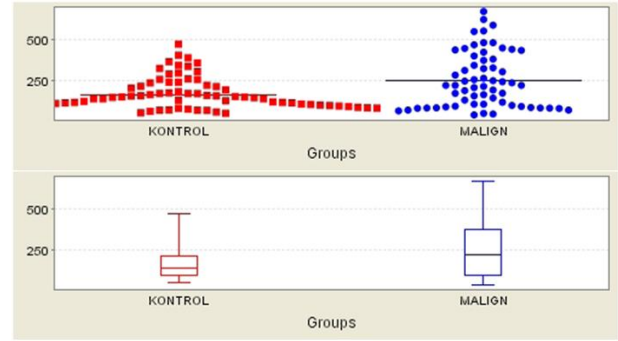
Şekil 1: SELDI-TOF-MS jel görüntüsü, benin meme hastalığı (A), meme kanseri (B) ve sağlıklı kontrol (C) serum proteomları 4000 Da 10000 Da aralığında görüntülenmiştir.



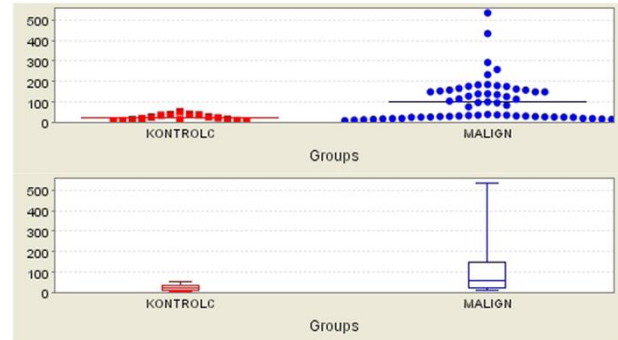
Şekil 2: SELDI-TOF-MS pik görüntüsü, meme kanseri (A) ve sağlıklı kontrol (B) serum proteomları 4000 Da 10000 Da aralığında görüntülenmiştir.



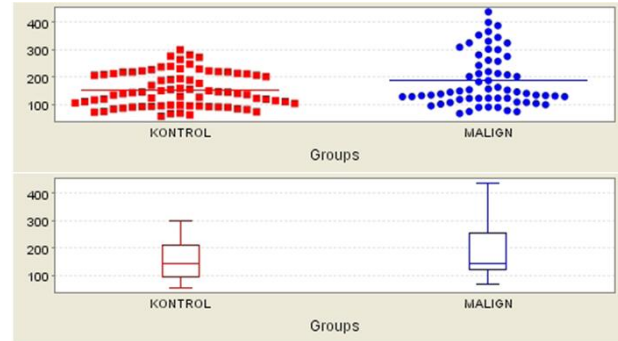
Şekil 3: Meme kanseri ve kontrol olgularının BC1 olarak bilinen 4.3 kDa proteomik belirteçine ait dağılımları.



Şekil 4: Meme kanseri ve kontrol olgularının BC2 olarak bilinen 8.1 kDa proteomik belirteçine ait dağılımları.



Şekil 5: Meme kanseri ve kontrol olgularının BC3 olarak bilinen 8.9 kDa proteomik belirteçine ait dağılımları.



Kaynaklar

1. Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin*, 2007; 57 (1): 43-669.
2. Petterson SD, Aebersold RH. Proteomics: First decade and beyond. *Nature Genetics Supplement* 2003; 33: 311-32.
3. Baskın Y. Tıpta teknolojik gelişimin neden olduğu kavram değişimleri: kişiselleştirilmiş tıp. *Türk Hijyen ve Deneysel Tıp Dergisi*, 2007; 64(2): 54-59.
4. Baskın Y, Yigitbası T. Clinical Proteomics of Breast Cancer. *Current Genomics*, 2010; 11 (7): 528-536.
5. Celis JE, Gromov P. Proteomics in translational cancer research: Toward an integrated approach. *Cancer Cell* 2003; 3: 9-15.
6. Li J, Zhang Z, Rosenzweig J, et al. Proteomics and bioinformatics approaches for identification of serum biomarkers to detect breast cancer. *Clin. Chem.* 2002; 48: 1296-1304.
7. Hanash SM, Pitteri SJ, Faca VM. Mining the plasma proteome for cancer biomarkers. *Nature*, 2008; 452:571-579.
8. Becker S, Cazares LH, Watson P et al. Surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight (SELDI-TOF) differentiation of serum protein profiles of BRCA-1 and sporadic breast cancer. *Ann Surg Oncol*, 2004; 11: 907-914.
9. Laronga C, Becker S, Watson P et al. SELDI-TOF serum profiling for prognostic and diagnostic classification of breast cancers. *Dis Markers*, 2003; 19: 229-238
10. Bertucci F, Birnbaum D, Goncalves A. Proteomics of breast cancer. *Mol. Cel. Proteomics*, 2006; 5 (10): 1772-1786.
11. Belluco C, Petricoin EF, Mammano E et al. Serum proteomic analysis identifies a highly sensitive and specific discriminatory pattern in stage I breast cancer. *Ann Surg Oncol*, 2007; 14: 2470-2476.
12. Li J, Zhang Z, Rosenzweig J et al. Proteomics and bioinformatics approaches for identification of serum biomarkers to detect breast cancer. *Clin Chem*, 2002; 48: 1296-1304.
13. Li J, Orlandi R, White CN et al. Independent validation of candidate breast cancer serum biomarkers identified by mass spectrometry. *Clin Chem (Kyoto)*, 2005; 51: 2229-2235.
14. Mathelin C, Cromer A, Wendling C et al. Serum biomarkers for detection of breast cancers: a prospective study. *Breast Cancer Res Treat*, 2006; 96: 83-90.
15. Van Winden AWJ, Gast MCW, Beijnen JH et al. Validation of previously identified serum biomarkers for breast cancer with SELDI-TOF MS: a case control study. *BMC Med Genomics*, 2009; 19: 2-4.
16. Goncalves A, Esterni B, Bertucci F et al. Postoperative serum proteomic profiles may predict metastatic relapse in highrisk primary breast cancer patients receiving adjuvant chemotherapy. *Oncogene*, 2006; 25: 981-989.
17. Song J, Patel M, Rosenzweig CN et al. Quantification of fragments of human serum inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain 4 by a surface-enhanced laser desorption/ionization- based immunoassay. *Clin Chem*, 2006; 52: 1045-1053.
18. Villanueva J, Shaffer DR, Philip J et al. Differential exoprotease activities confer tumor-specific serum peptidome patterns. *J Clin Invest*, 2006; 116:271-284.
19. Fung ET, Yip TT, Lomas L et al. Classification of cancer types by measuring variants of host response proteins using SELDI serum assays. *Int J Cancer*, 2005; 115:783-789.
20. Goldsmith GH Hemostatic changes in patients with malignancy. *Int J Hematol*, 2001; 73: 151-156.
21. Shi Q, Harris LN, Lu X et al. Declining plasma fibrinogen alpha fragment identifies HER2-positive breast cancer patients and reverts to normal levels after surgery. *J Proteome Res*, 2006; 5: 2947-2955.
22. Atahan K, Küpeli H, Gür S ve ark. The value of Serum Biomarkers (Bc1, Bc2, Bc3) in the Diagnosis of Early Breast Cancer. *International Journal of Medical Sciences*, 2011; 8(2): 148-155.

<http://edergi.cbu.edu.tr/ojs/index.php/cbusbed> isimli yazarın CBU-SBED başlıklı eseri bu Creative Commons Atıntı-Gayriticari 4.0 Uluslararası Lisansı ile lisanslanmıştır.

