



ARAŞTIRMA / RESEARCH

Lapatinib'in sıçan over ve uterus dokuları üzerine olan etkilerinin ışık ve elektron mikroskopik düzeyde araştırılması

Electron and light microscopic evaluation of effects of the Lapatinib on rat ovary and uterus

Hande Tokgönül Muşlu¹, Yurdun Kuyucu¹, Ufuk Özgü Mete¹

¹Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Adana, Turkey

Cukurova Medical Journal 2020;45(3):921-932

Abstract

Purpose: Many drugs, started to be used in targeted anti-cancer treatment as a result of advances in molecular oncology, stop proliferation of tumor cells via interacting with cell receptors and intracellular signaling molecules. Because of physiological functions of these targets, adverse effects develop during therapy. Lapatinib is one of the drugs used in targeted therapies, enters into the cell and inhibits the activity of epidermal growth factor and receptor-linked tyrosine kinase. Our study aimed to investigate changes in uterine and ovarian tissues of rats caused by Lapatinib at biochemical, light and electron microscopic levels.

Materials and Methods: 24 female Wistar rats were divided into 3 groups, 30 mg/kg and 75 mg/kg Lapatinib to experimental groups, and same amount of distilled water to the control group were applied twice a day by gavage during 14 days. Blood samples were collected for estradiol, progesterone, FSH and LH serum levels. Uterine and ovarian tissue samples were prepared for light and electron microscopic examinations and evaluated by Jeol JEM 1400 TEM and Olympus BX 50 light microscope.

Results: Besides the reduction of estradiol and progesterone levels in experimental groups, structural changes in stromal cells and glands of endometrium, oocyte, granulosa cells and interstitial cells of ovaries were observed, and it was observed that these changes were more prominent in high dose group.

Conclusion: Drugs that are used in targeted therapies, such as Lapatinib, can cause structural and functional changes in tissues and organs depending on blockage of receptors and targeted signal molecules.

Öz

Amaç: Moleküler onkolojideki gelişmeler sonucunda hedeflenmiş anti-kanser tedavisinde kullanılmaya başlanan birçok ilaç, hücre reseptörleri ve hücre içi sinyal molekülleri ile etkileşerek tümör hücrelerinin çoğalmasını durdurmaktadır. Bu hedeflerin fizyolojik görevleri nedeniyle tedavi sırasında yan etkiler gelişmektedir. Hedefe yönelik tedavide kullanılan ilaçlardan biri olan Lapatinib hücre içine girerek epidermal büyüme faktörü ve reseptörüne bağlı tirozin kinaz aktivitesini inhibe etmektedir. Çalışmamızda Lapatinib'in sıçan uterus ve over dokularında yol açabileceği değişikliklerin biyokimyasal, ışık ve elektron mikroskopik düzeyde incelenmesi amaçlandı.

Gereç ve Yöntem: 24 adet Wistar cinsi dişi sıçan 3 gruba ayrılarak, deney gruplarına sırasıyla 30 mg/kg ve 75 mg/kg Lapatinib, kontrol grubuna ise aynı miktarda distile su gavaj yoluyla, günde 2 kez 14 gün boyunca uygulandı. Deney sonunda hayvanlardan kan örnekleri alınarak serum östradiol, progesteron, FSH ve LH seviyeleri ölçüldü. Uterus ve over doku örnekleri ışık ve elektron mikroskopik doku hazırlama yöntemlerine uygun olarak hazırlandı. Dokulardan elde edilen kesitler, Jeol JEM 1400 TEM ve Olympus BX 50 ışık mikroskoplarında değerlendirildi.

Bulgular: Deney gruplarına ait sıçanlarda östradiol ve progesteron seviyelerinde azalma yanında ışık ve elektron mikroskopik kesitlerde, endometriyumda stromal hücreler ve bezlerde, overlerde ise oosit, granuloza hücreleri ile interstisyel hücrelerde yapısal değişikliklerin geliştiği ve bu değişikliklerin yüksek doz grubunda daha belirgin olduğu gözlemlendi.

Sonuç: Lapatinib gibi hedefe yönelik tedavilerde kullanılan ilaçların hedeflediği reseptörler ve sinyal moleküllerinin blokajına bağlı olarak bunların kullanıldığı doku ve organların yapı ve fonksiyonlarında değişiklikler gelişebileceği kanaatine varıldı.

Anahtar kelimeler: Over, uterus, Lapatinib, ince yapı.

Keywords: Ovary, uterus, Lapatinib, ultrastructure.

Yazışma Adresi/Address for Correspondence: Dr. Yurdun Kuyucu, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Adana, Turkey E-mail: ykuyucu@cu.edu.tr

Geliş tarihi/Received: 25.02.2020 Kabul tarihi/Accepted: 20.05.2020 Çevrimiçi yayın/Published online: 31.08.2020

GİRİŞ

Son yirmi yıl içinde moleküler onkolojideki önemli gelişmeler sonucunda karsinogenez, tümör büyümesi ve invazyonu ile metastaz biyolojisinde önemli gelişmeler olmuş ve günümüzde yeni geliştirilen anti-kanser ilaçlar ile hedeflenmiş anti-kanser tedavisi gündeme gelmiştir¹. Konvansiyonel kemoterapiler “selektif” olmadıkları için proliferen olan tümör hücrelerini yok ederken normal hücreleri de ortadan kaldırmaktadırlar. Hedeflenmiş terapötikler ise “selektif hedefleri” nedeniyle “özgül moleküler defektli” olan tümör hücrelerine yönelerek kanser hücrelerini hedef hücre aracılığı ile öldürürken normal hücrelerin sağlıklı bir ortamda devam etmesine olanak tanımaktadırlar^{1,2}.

Bu kapsamda son yıllarda epidermal büyüme faktörü reseptörüne (EGFR) özgül monoklonal ve tirozin kinaz inhibitörleri klinikte erken faz çalışmalarında yer almaya başlamıştır. EGFR’ye bağlanan ligandın bloke edilmesi, reseptörün monoklonal antikorlar ile bloke edilmesi veya tirozin kinaz aktivasyonu ile inhibe edilmesi önemli bir tedavi yaklaşımı oluşturmaktadır. İnsan epidermal büyüme faktör reseptörü 2 (HER2) pozitif meme kanserinde kemoterapiye ek olarak hedefe yönelik tedaviler geliştirilmiştir ve Trastuzumab ilk hedefe yönelik ilaç olmuştur. Lapatinib ise bunlardan sonra geliştirilen, kanserli hücrede sinyal yollarını etkin bir şekilde inhibe eden EGFR ve HER2 tirozin kinaz inhibitörüdür¹⁻⁴.

Epidermal büyüme faktörü (EGF), hücre membranlarındaki özgül reseptörlere bağlanarak intrasellüler olaylar serisini başlatırlar⁵. EGFR aktivasyonu tümör büyümesini ve ilerlemesini stimüle eder, proliferasyonu artırır ve anjiyogenesis, invazyon, metastaz ve apoptozis inhibisyonunu sağlar^{6,7}. EGFR ailesinin dört üyesinden biri olan HER2, tirozin kinaz aktivitesine sahip transmembran reseptörüdür ve normal durumda hücre büyümesi ve çoğalmasında rol alır^{2,8}. EGFR’leri, tip 1 reseptör kinaz olarak da bilinir. EGFR’nin fizyolojik olmayan aktivasyonu, kontrol edilemeyen hücre bölünmesi ile sonuçlanır. Birçok insan tümöründe EGFR’nin aşırı miktarda ekspresyonu kötü prognozla ilgilidir⁹. HER2 artışı ve aşırı ekspresyonu meme kanserlerinin %30’unda, overyan kanserlerinde ve mide kanserinde görülmüştür. EGFR’nin meme, endometriyum ve over kanserli dokularda fazla miktarda bulunduğu gösterilmiştir¹⁰.

İnsan tümörlerinde EGFR aşırı miktarda eksprese edildiğinden kanser tedavisinde bu reseptörün inhibisyonu rasyoneldir. Günümüzde inhibisyonu sağlamak için 2 yaklaşım vardır: Monoklonal antikorlar ve EGFR tirozin kinaz inhibitörleridir. Lapatinib oral alınan, küçük molekül yapısında olan bir reversible EGFR ve HER2 tirozin kinaz inhibitörüdür¹¹⁻¹⁴. Lapatinib küçük molekül yapısından olduğundan hücre içine girecek hem EGFR hem de HER2 reseptörüne bağlı tirozin kinaz aktivitesini inhibe eder².

Lapatinib’in faz 1 ve 2 denemelerinde birkaç tümör tipine karşı aktivitesine bakılmış ve özellikle meme kanserinde etkisi denenmiştir. Faz 3 çalışmasında ise Lapatinib HER2-pozitif ve HER2-negatif metastatik hastalarda denenmiştir ve sonuç olarak HER2-pozitif meme kanseri hastaların kullanımını için onay almıştır^{15,16}. Diğer tirozin kinazlara benzer şekilde, Lapatinib iyi tolere edilebilir. Başlıca toksisitesi kızarıklık (%31), ishal (%65), el ayak sendromu (%53), yorgunluk (%10) ve mide bulantısıdır (%13)¹⁶⁻²². Lapatinib’in Purkinje liflerinde kardiyak aksiyon potansiyel süresini uzattığı belirtilmiş ayrıca HER2 yolunun inhibe olmasının kardiyak disfonksiyona neden olduğu rapor edilmiştir^{12,23}. EGFR, overlerde folikül içerisinde granuloza ve teka hücrelerinin yanı sıra korpus luteumda bulunmaktadır²⁴. İnsanın menstrual siklusunda EGFR ve HER2’nin uterusu yüzey ve bez epitel hücrelerinde eksprese edildiği aynı zamanda HER2’nin (c-erbB2 veya neu) overde primordiyal germ hücrelerinde, granuloza hücrelerinde, luteal hücrelerde ve oositte eksprese olduğu ve primordiyal folikül büyümesi, granuloza hücre fonksiyonu regülasyonu, oosit olgunlaşmasında rol oynadığı öne sürülmüştür^{25,26}.

EGFR ve HER2’yi inhibe eden Lapatinib’in over ve uterus dokularında yapısal bir değişikliğe yol açmadığını gösteren bir çalışma henüz literatürde bulunmamaktadır. Bu çalışmada Lapatinib verilen sıçanların uterus ve over dokularında meydana gelen değişikliklerin ışık ve elektron mikroskopi düzeyinde incelenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Deney sırasında yapılan tüm işlemler 1986 Uluslararası Strasbourg Hayvan Hakları Evrensel Beyannemesine uygun olarak, etik kurul onayı (toplantı sayısı 12, toplantı tarihi 29 Eylül 2010) ile veteriner hekim kontrolünde Çukurova Üniversitesi

Tıbbi Bilimler Deneysel Araştırma ve Uygulama Merkezinde (TIBDAM) gerçekleştirilmiştir.

Çalışmamızda 8-12 haftalık, 200-220 gr ağırlığında 24 adet Wistar albino türü dişi sıçan kullanıldı. Deney sırasında gebe olma olasılıklarını ortadan kaldırmak amacıyla 3 hafta süre ile erkeklerden izole edilerek 12 saat karanlık, 12 saat aydınlık siklusunda bırakılan sıçanlar, ortam ısı $22 \pm 2^\circ\text{C}$ derece sabit tutularak paslanmaz tel kapaklı plastik kafesler içerisinde tutuldu. Sıçanlara ad libitum olarak hazır palet yem ve çeşme suyu verildi. 3 hafta sonunda 16 adet sıçan deney grubu olarak 2 kafese (her kafeste 8 adet), 8 adedi ise kontrol grubu olarak ayrı kafeslere konuldu. Tablet halinde bulunan Lapatinib havanda ezilerek toz haline getirildi. Çözünürlük 10 mg/ml distile su olarak belirlendi²⁷. 1. Gruba 30 mg/kg Lapatinib, 2. Gruba 75 mg/kg Lapatinib, kontrol grubuna ise distile su gavaj yoluyla sabah ve akşam günde 2 kez olmak üzere 14 gün boyunca verildi²⁸. Deneyin sonunda anestezi altındaki tüm hayvanlardan biyokimyasal analizler için intrakardiak kan örnekleri, ışık mikroskopik ve elektron mikroskopik incelemeler için over ve uterus dokuları alındı.

Biyokimyasal analizler

Östradiol, progesteron, FSH ve LH serum seviyeleri Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Balcalı Hastanesi Merkez Laboratuvarında, E 170 Immunoassay (Roche, Almanya) yöntemi ile ölçüldü.

Işık mikroskopik doku hazırlama yöntemi

Bouin solüsyonu içerisine alınan over ve uterus dokuları 4 saat süreyle tespit edildi. Leica TP 1020 ototeknikon cihazı ile rutin doku takipleri yapıldı. Bloklama işleminin ardından mikrotom ile 5 µm kalınlığında alınan parafin kesitler, Hematoksilen-Eozin boyası ile boyandı ve Olympus BX50 (Tokyo, Japonya) ışık mikroskopunda incelenerek resimleri çekildi.

Elektron mikroskopik doku hazırlama yöntemi

Elektron mikroskopik değerlendirme için alınan over ve uterus doku örnekleri Millonig fosfat tamponu ile hazırlanmış, %5'lik glutaraldehit solüsyonu içerisinde 4 saat süre ile tespit edildi. Elde edilen doku bloklardan Reichert Ultracut S ultramikrotomu ile yarı ince kesitler alınarak Toluidin mavisi ile boyandı ve ışık mikroskopunda değerlendirildi. Belirlenen alanlardan 50 nanometre kalınlığındaki alınan ince

kesitler Jeol JEM 1400 Transmisyon Elektron Mikroskobu ile incelendi ve mikrografları elde edildi.

İstatistiksel analiz

Çalışmamızda 3 gruba ait tüm hayvanlardan biyokimyasal analizler için alınan intrakardiak kan örneklerinde FSH, LH, östradiol, progesteron değerleri ölçüldü. Biyokimyasal verilerin istatistiksel analizinde SPSS 11.0 paket programı kullanılarak değerler Kruskal Wallis testi ile karşılaştırıldı. Farklılığın bulunduğu gruplar Mann-Whitney U testi ile araştırılıp, tüm testlerde istatistiksel önem düzeyi 0,05 olarak kabul edildi.

BULGULAR

Biyokimyasal analizler

Deney sonunda anestezi altındaki sıçanlardan alınan kan örneklerinde östradiol, progesteron, FSH ve LH serum değerleri incelendi. FSH ve LH değerlerinde, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görüldü. Östradiol değerleri incelendiğinde, kontrol grubuna göre Grup 1 ve Grup 2'de değerlerin azaldığı, bu azalmanın 2. Grupta istatistiksel olarak anlamlı ve daha belirgin olduğu izlendi. Progesteron değerleri kontrol grubu ile kıyaslandığında Grup 1 ve Grup 2'de azaldığı, ancak bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü (Tablo 1).

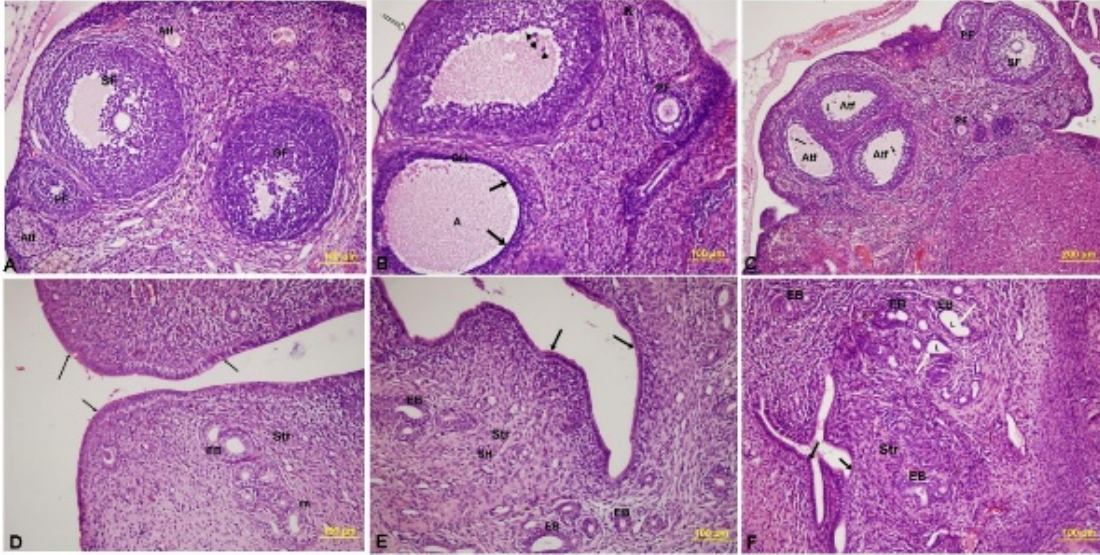
Işık mikroskopik bulgular

Kontrol grubuna ait over kesitlerinin içerisinde normal yapıda primordiyal foliküller, gelişimin farklı evrelerindeki foliküller, atretik foliküller ve korpus luteum bulunmaktaydı (Şekil 1A). 1. Gruba ait over kesitlerinin içerisinde normal morfolojik özellik gösteren foliküllerin yanında yapı olarak histolojik özelliklerini kaybetmiş foliküller de bulunmaktaydı. Bu foliküllerde granüloza hücrelerinin birbirleri ile olan ilişkilerini kaybettikleri ve granüloza hücrelerinin antral boşluğa döküldüğü izlendi. Bununla birlikte gelişimin ileri evresindeki antral foliküllerde granüloza hücrelerinin antral kavitede serbest olarak bulunduğu gözlemlendi. Bazı foliküllerde geniş antrumu çevreleyen granüloza hücrelerinin yassılaştığı dikkati çekti (Şekil 1B). 2. Gruba ait over kesitlerinde atretik foliküllerin varlığı gözlemlendi. Atretik foliküllerde, granüloza hücrelerinin birbirlerinden ayrıldığı ve oldukça koyu bir çekirdeğe sahip olduğu görüldü (Şekil 1C).

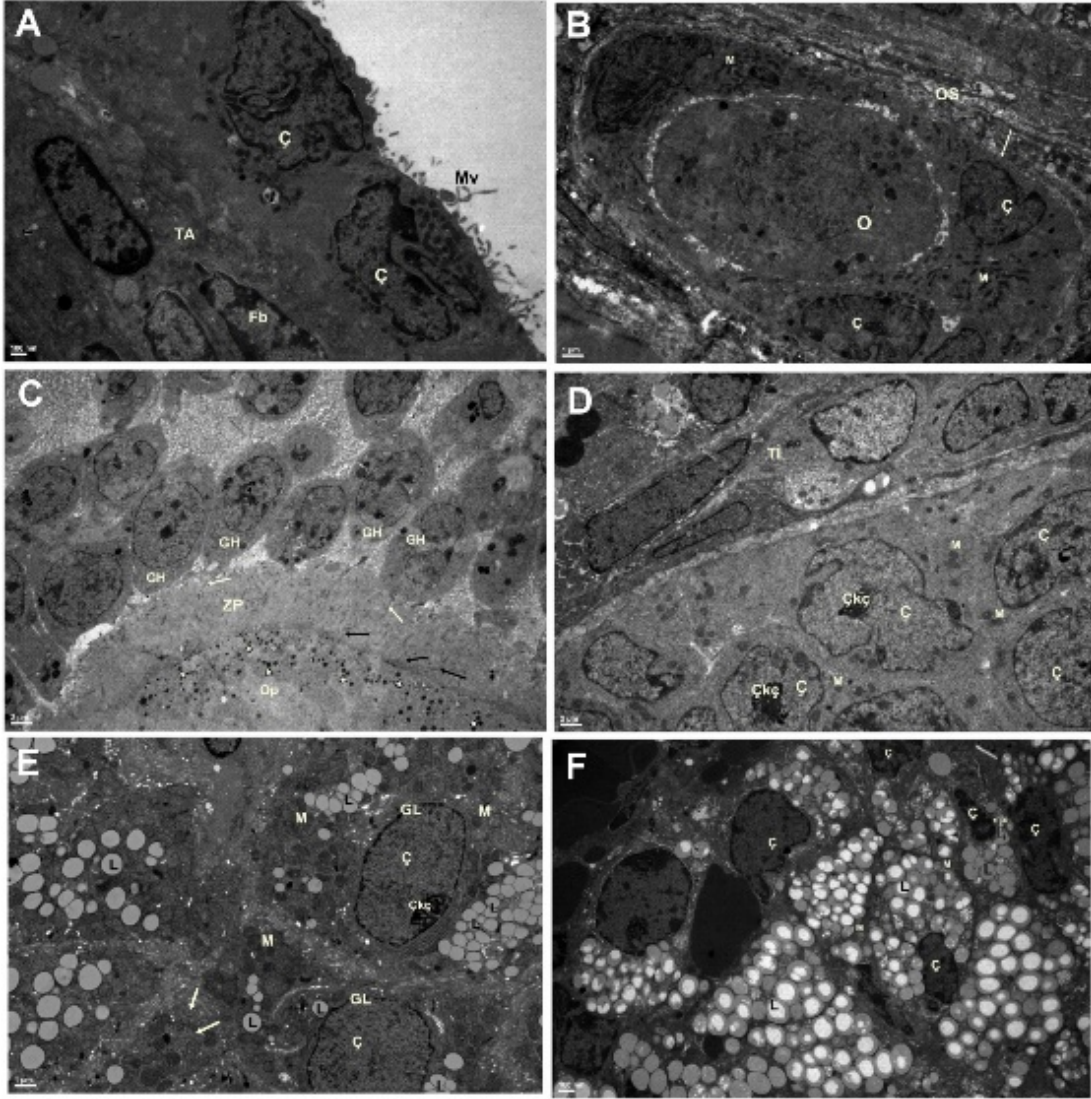
Tablo 1. Deney sonunda sıçanların intrakardiyak kan örneklerindeki serum FSH, LH, östradiol ve progesteron değerleri

Ort±SS Medyan(min-max)	FSH (mIU/mL)	LH (mIU/mL)	Östradiol (pg/mL)	Progesteron (ng/mL)
Kontrol	0,077±0,031 0,100(0,04-0,10)	0,100±0,000 0,100(0,10-0,10)	0,318±0,677 0,32(0,21-0,40)	0,294±0,956 0,26(0,14-0,40)
Grup 1 (30 mg/kg)	0,06±0,04 0,1(0,01-0,10)	0,100±0,000 0,1(0,10-0,10)	0,270±0,427 0,270(0,19-0,34)	0,239±0,130 0,185(0,118-0,40)
Grup 2 (75 mg/kg)	0,100±0,000 0,100(0,10-0,10)	0,100±0,000 0,100(0,10-0,10)	0,212±0,894 0,250(0,60-0,32)	0,224±0,121 0,209(0,52-0,40)
p [†]	0,141	1,000	0,047	0,246
P*	0,585	1,000	0,092	0,201
P**	0,063	1,000	0,035	0,110
P***	0,064	1,000	0,153	0,832

[†]Üç grup karşılaştırması; *Kontrol ve grup 1 karşılaştırması; **Kontrol ve grup 2 karşılaştırması; ***Grup 1 ve grup 2 karşılaştırması

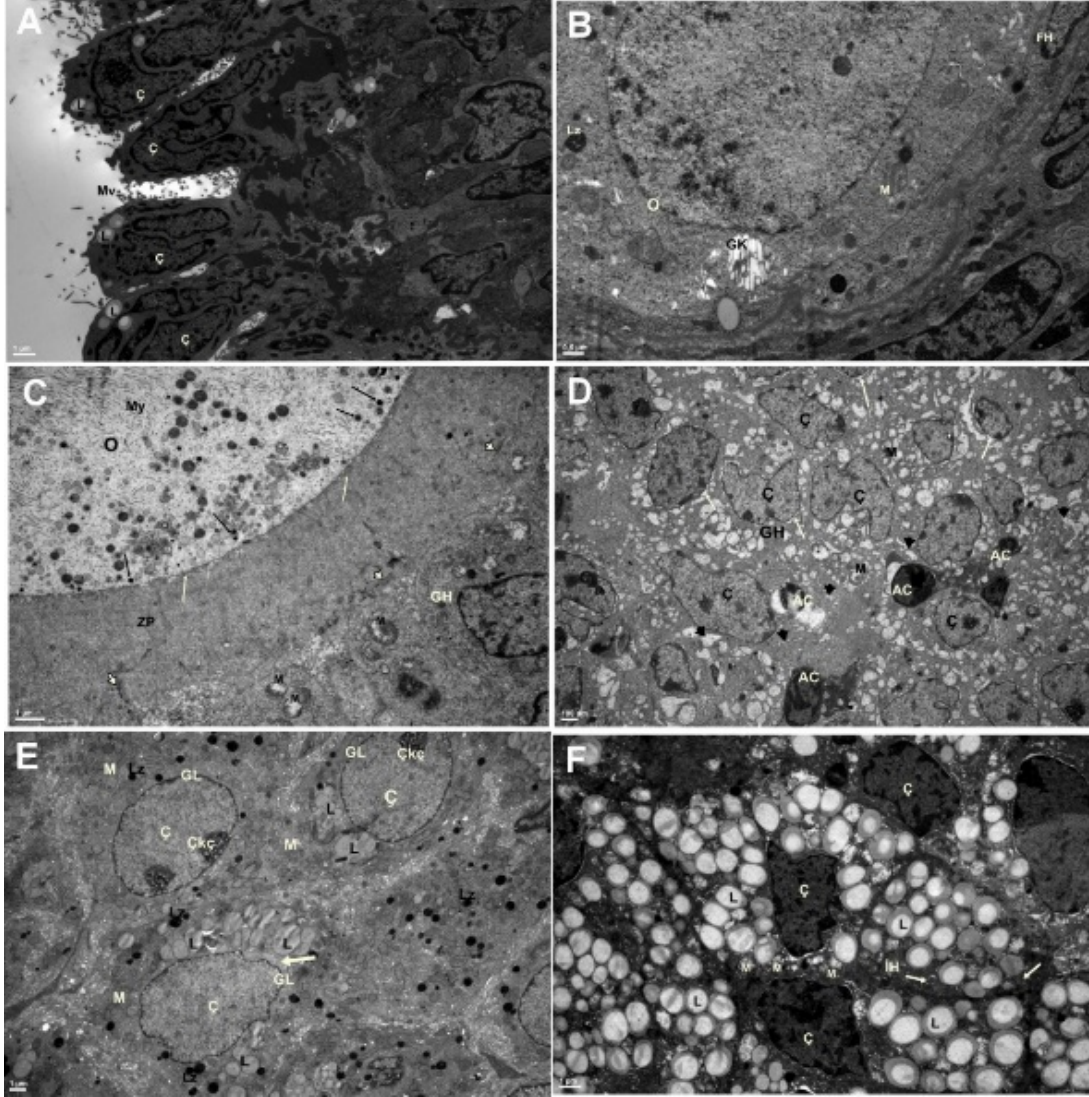
**Şekil 1. Işık mikroskopik fotoğraflar (H&E).**

A) Kontrol grubu, over. Primer folikül (PF), atretik folikül (Atf), gelişen folikül (GF), sekonder folikül (SF) izlenmekte. Bar=100 µm. B) 1. Grup. Antral foliküllerde bazı granüloza hücrelerinin antral kavitede serbest olarak bulunduğu (ok başı) gözlenmekte. Bazı foliküllerde geniş antrum (A) çevreleyen granüloza hücrelerinin (GH) yassılaştığı (siyah ok) izlenmekte. Korteks (K), yüzey epiteli (beyaz ok), primer folikül (PF). Bar=100 µm. C) 2. Grup. Atretik foliküllerde (AtF), granüloza hücrelerinin (siyah ok) birbirlerinden ayrıldığı gözlenmekte. Sekonder folikül (SF), primer folikül (PF). Bar=200 µm. D) Kontrol grubu, uterus. Prizmatik şekilli epitel hücreleri (siyah ok), endometriyal stroma (Str) içerisinde endometriyal bezler (EB) görülmekte. Bar=100 µm. E) 1. Grup. Prizmatik epitel (siyah ok), endometriyal stroma (Str), endometriyal bezler (EB), bezlerin arasında stromal hücreler (SH) normal yapıda izlenmekte. Bar=100 µm. F) 2. Grup. Uterus lümeninin prizmatik epitel (siyah ok) ile döşeli olduğu, endometriyal bezlerin (EB) sayıca azaldığı ve bazı alanlarda lümenlerinin (L) genişlemiş olduğu, bez epiteli hücrelerinin (beyaz ok) yassılaştığı izlenmekte. Endometriyal stromanın (Str) diğer gruplara göre daha fibröz bir görünüm kazandığı izlenmekte. Bar=100 µm.



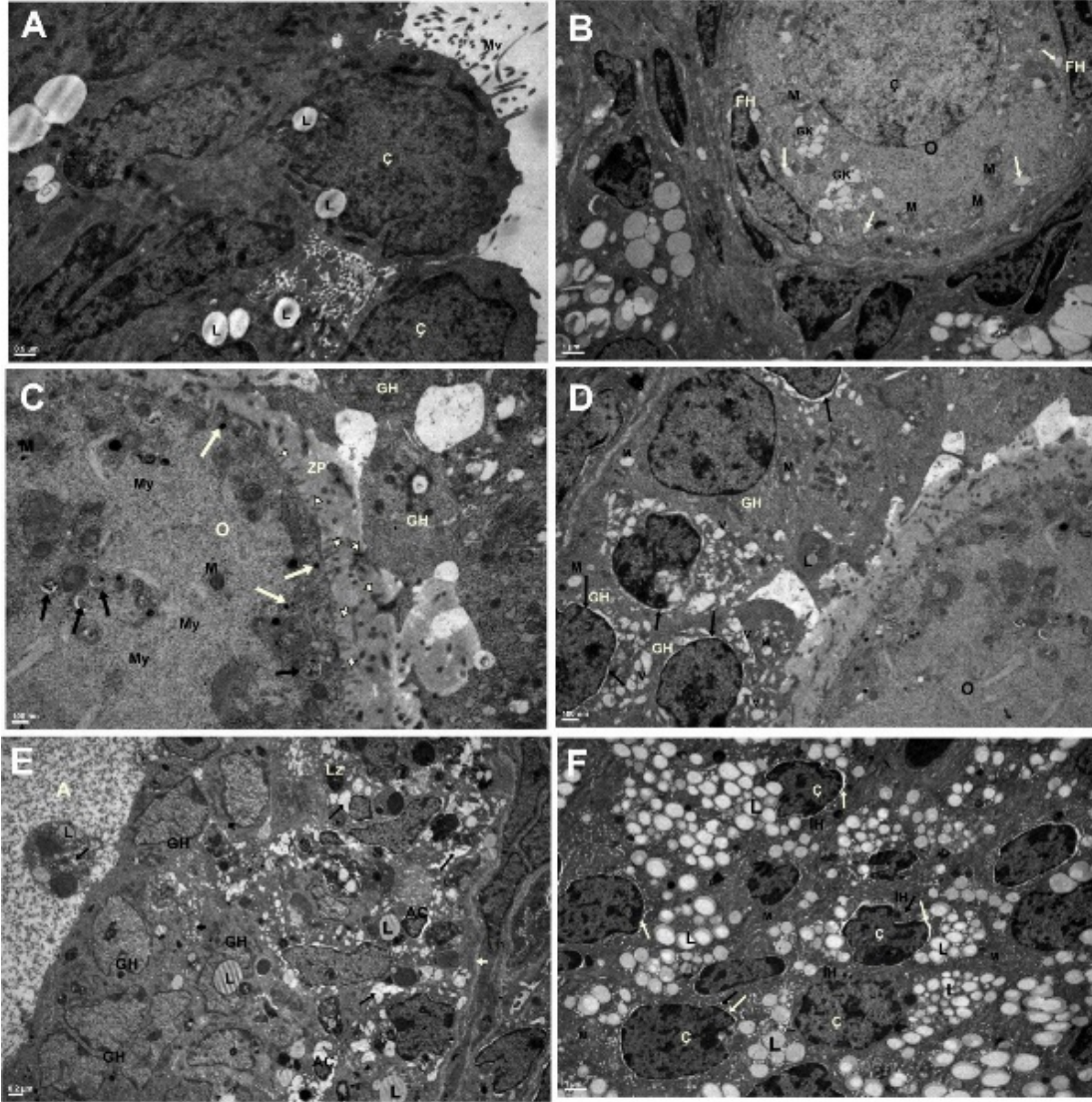
Şekil 2. Kontrol grubu over.

A) Yüzeý epiteli. Çekirdekler (C), mikrovilluslar (Mv), tunika albuginea (TA) ve fibroblast (Fb) görölmekte. Bar=100 nm. B) Primordiyal folikül. Oositi (O), foliküler hücrelerin çekirdekleri (C) ve mitokondriyonları (M), bazal lamina (beyaz ok), ovaryan stroma (OS) görölmekte. Bar=1 µm. C) Antral folikülde oosit, granüloza hücreleri (GH), zona pellusida (ZP), oositin yüzeyinden çıkan mikrovilluslar (siyah ok) ve foliküler hücrelerden uzanan sitoplazmik uzantılar (beyaz ok) görölmekte. Ooplazma (Op) periferinde kortikal granüller (ok başı) izlenmekte. Bar=2 µm. D) Granüloza hücrelerinin çekirdekleri (C), çekirdekçikleri (Çkç), sitoplazmasında mitokondriyonlar (M) gözlenmekte. Teka interna (Tİ). Bar=2 µm. E) Korpus luteum. Granüloza lutein hücrelerinin (GL) çekirdeği (C), çekirdekçığı (Çkç), sitoplazmasında lipid damlacıkları (L), tübüler tarzda kristalara sahip mitokondriyonlar (M), agranüler endoplazmik retikulum sisternaları (beyaz ok) izlenmekte. Bar=1 µm. F) İnterstisyel hücrelerin çekirdekleri (C), sitoplazmalarında lipid damlacıkları (L), agranüler endoplazmik retikulum sisternaları (SER), tübüler kristalara sahip mitokondriyonlar (M) görölmekte. Bar=100 nm.



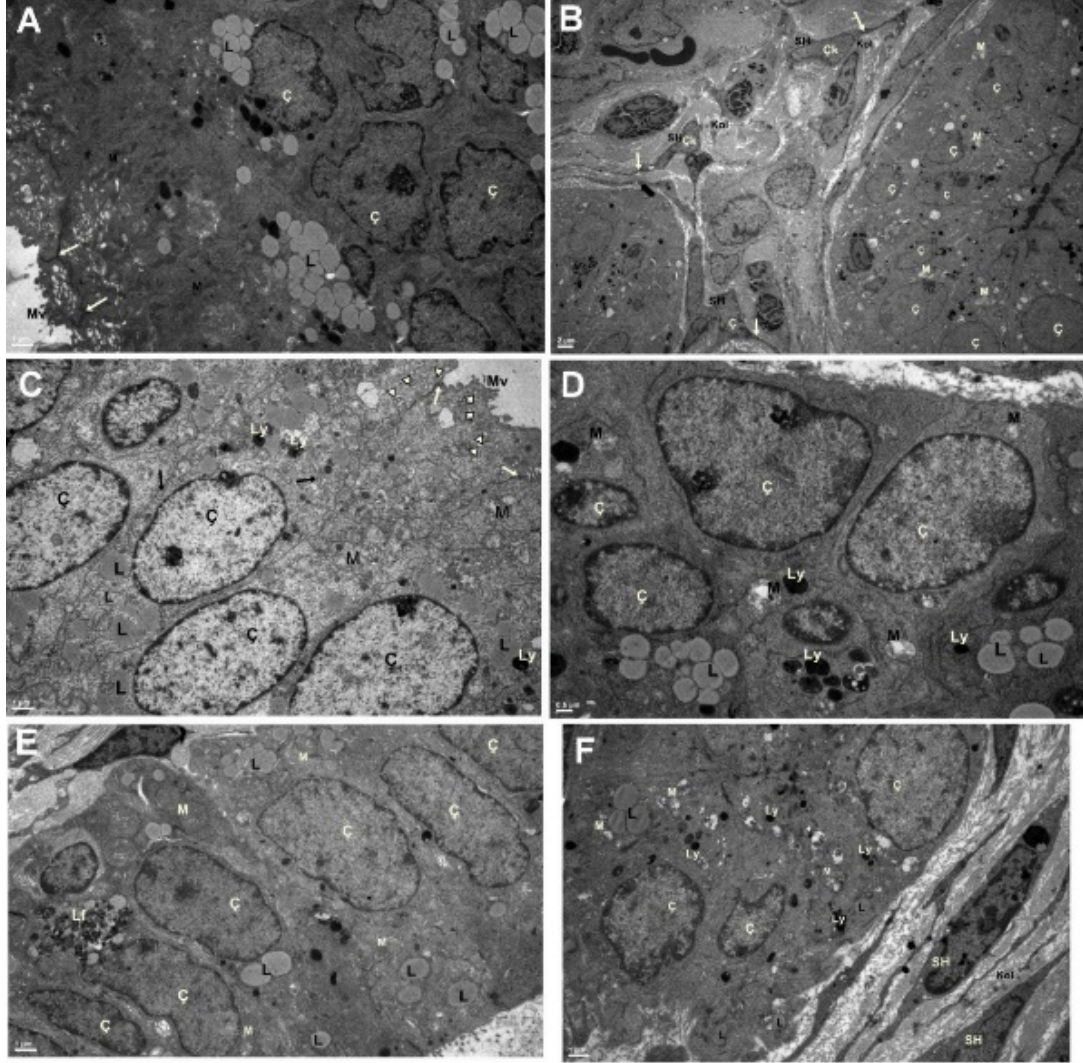
Şekil 3. 1. Grup, over.

A) Yüzeysel epitel normal yapıda görülmekte. Çekirdek (C), mikrovilluslar (Mv), lipid damlacıkları (L). Bar=1 μ m. B) Primordiyal folikülde oosit (O), mitokondriyonlar (M), lizozomlar (Lz), genişleşmiş Golgi kompleksi (GK), foliküler hücreler (FH) görülmekte. Bar=0,5 μ m. C) Antral folikülde oosit (O), kortikal granüller (siyah ok), membranöz yapılar (My), zona pellusida (ZP) içerisinde oositten uzanan mikrovilluslar (beyaz ok) ve granuloza hücrelerine (GH) ait sitoplazmik uzantıların (ok başı) varlığı, granuloza hücrelerinin sitoplazmalarında yer alan mitokondriyonlarda (M) dejenerasyon izlenmekte. Bar=1 μ m. D) Granuloza hücrelerinin (GH) çekirdeklerinin (C) indentasyonlar gösterdiği, perinükleolar sisternaların yer yer genişleşmiş olduğu (beyaz ok), mitokondriyonlarda (M) dejenerasyon, endoplazmik retikulum sisternalarında (ok başı) genişleme olduğu ve granuloza hücreleri arasında apoptotik cisimciklerin (AC) bulunduğu görülmekte. Bar=100 nm. E) Korpus luteum. Granuloza lutein hücrelerinin (GL) çekirdeği (C), çekirdekçığı (Ckc), sitoplazmasında lipid damlacıkları (L), tübüler tarzda kristallara sahip mitokondriyonlar (M), agranüler endoplazmik retikulum sisternaları (beyaz ok) ve çok sayıda lizozomun (Lz) varlığı izlenmekte. Bar=1 μ m. F) Ovarian stromada interstisyel hücrelerin (IH) heterokromatinden zengin çekirdekleri (C), sitoplazmalarında çok sayıda lipid damlacıkları (L), mitokondriyonlar (M) ve agranüler endoplazmik retikulum sisternaları bulunmakta (beyaz ok). Bar=1 μ m.



Şekil 4. 2. Grup, over.

A) Yüzey epitel hücreleri. Derin indentasyon içeren çekirdekler (C), lipid damlacıkları (L), mikrovilluslar (Mv) izlenmekte. Bar=0,5 μ m. B) Primordiyal folikülde oosit (O), çekirdek (C), ooplazma boyunca değişik hacim ve şekillerde vezikül ve vakuoller (beyaz ok), genişlemiş mitokondriyonlar (M) ile genişlemiş Golgi kompleksi (GK) içermekte. Foliküler hücreler (FH). Bar=1 μ m. C) Primer folikülde oosit (O) içerisinde lizozomal yapılar (siyah ok), membranöz yapılar (My), mitokondriyonlar (M) ve kortikal granüller (beyaz ok) gözlenmekte. Zona pellusida (ZP) içerisinde oosit ve granuloza hücrelerinden (GH) uzanan mikrovilluslar ve sitoplazmik uzantılar (ok başı) izlenmekte. Bar=100 nm. D) Primer folikülde oosit (O) ve çevresinde yer alan granuloza hücrelerinin (GH) sitoplazmasında lipid damlacıkları (L) ve perinükleer sisternalarda genişlemeler (siyah ok), mitokondriyal dejenerasyon (M) ve vakuolizasyon (V) olduğu dikkati çekmekte. Bar=100 nm. E) Antral folikülde granuloza hücrelerinin (GH) sitoplazmalarında lipid damlacıkları (L), yaygın vakuolizasyon (siyah ok), apoptotik cisimcikler (AC), lizozomlar (Lz) görülmekte. Antruma (A) dökülmüş olan granuloza hücresi izlenmekte. Bazal lamina (beyaz ok başı). Bar=0,2 μ m. F) İnterstisyel hücrelerin (IH) heterokromatinden zengin, indentasyon içeren çekirdekleri (C), perinükleer sisternalarında genişleme (beyaz ok), sitoplazmalarında yaygın olarak lipid damlacıkları (L), mitokondriyonlar (M), SER sisternaları (siyah ok) görülmekte. Bar=1 μ m.



Şekil 5. Uterus mikrografları.

A) Kontrol grubu. Prizmatik şekilli epitel hücrelerinde çekirdekler (Ç), mitokondriyonlar (M), lipid damlacıkları (L), hücrelerin apikal yüzeylerinde mikrovilluslar (Mv), lateral yüzeylerin apikal kısımlarında bağlantı kompleksleri (beyaz ok) görülmekte. Bar=1 µm. B) Kontrol grubu. Endometriyal stromada, stromal hücrelerin (SH) çekirdekleri (Çk) ve sitoplazmik uzantıları (beyaz ok), kollajen lifler (Kol) izlenmekte. Endometriyal bezlerin lümenini döşeyen hücrelerin çekirdekleri (Ç), mitokondriyonlar (M), hücreler arası bağlantı kompleksleri (ok başı) izlenmekte. Bar=2 µm. C) 1. Grupta uterus yüzey epitel hücrelerinin çekirdekleri (Ç), sitoplazmalarında hafif genişlemiş mitokondriyonlar (M), lipid damlacıkları (L), endoplazmik retikulum sisternaları (siyah ok), apikal sitoplazmalarında mikropinositotik veziküller (ok başı), lizozomal yapılar (Ly) izlenmekte. Mikrovilluslar (Mv), bağlantı kompleksleri (beyaz ok) görülmekte. Bar=1 µm. D) 1. Grupta bez epiteli hücrelerinin çekirdekleri (Ç), lipid damlacıkları (L), lizozomal yapılar (Ly), dejenerasyon gösteren mitokondriyonlar (M) izlenmekte. Bar=0,5 µm. E) 2. Grupta prizmatik epitel hücrelerinde çekirdekler (Ç), sitoplazmalarında sayıca artış gösteren lipid damlacıkları (L), lipofuksin granülleri (Lf) ve mitokondriyonlar (M) izlenmekte. Bar=1 µm. F) 2. Grupta bezlerin lümeni döşeyen hücrelerin çekirdekleri (Ç), sitoplazmalarında dejenerasyon gösteren mitokondriyonlar (M), sayıca artmış lizozomal yapılar (Ly) ve lipid damlacıkları (L) izlenmekte. Stromal hücreler (SH), kollajen (Kol). Bar=1 µm.

Kontrol grubuna ait uterus kesitlerinde yüzey epiteli, endometriyal bezler ve stroma normal yapıdaydı (Şekil 1D). 1. Grubun uterus kesitleri kontrol grubu ile benzer özelliklerde izlenmekle birlikte stroma içerisindeki yaygın kollajen liflerin varlığı dikkati çekti (Şekil 1E). 2. Grubun uterus kesitlerinde ise endometriyal bezlerin lümenlerinin genişlemiş olduğu ve bez epiteli hücrelerinin yassılaştığı görüldü. Bezlerin arasını dolduran endometriyal stromanın diğer gruplara göre daha fibröz bir görünüm kazandığı izlendi (Şekil 1F).

Elektron mikroskopik bulgular

Kontrol grubuna ait over dokuları normal ultrastrüktürel yapıda izlendi (Şekil 2). 1. Gruba ait over kesitlerinde primordiyal foliküllerde oosit sitoplazması içerisinde lizozomların ve genişlemiş Golgi kompleksine ait sisternaların bulunduğu, gelişme sürecine girmiş foliküllerde granüloza hücrelerinin çekirdeklerinin heterokromatinden zengin olduğu ve indentasyonlar gösterdiği, perinükleolar sisternalarında genişleme, mitokondriyal dejenerasyon, endoplazmik retikulum sisternalarında genişleme ve çok sayıda apoptotik cisimciklerin bulunduğu görüldü (Şekil 3). 2. Gruba ait overlerde primordiyal foliküllerde ooplazma içerisinde Golgi kompleksine ait sisternaların genişlediği, değişik hacim ve şekillerde vezikül ve vakuollerin varlığı dikkati çekti. 75 mg/kg Lapatinib verilen grubun over dokularındaki foliküllerde apoptotik değişiklikler yanında bazı foliküllerdeki granüloza hücrelerinde perinükleolar sisterna ve endoplazmik retikulum sisternalarında genişlemeler, vakuolizasyon ile karakterize değişiklikler de gözlemlendi (Şekil 4).

Kontrol grubu uterusunda normal yüzey epiteli ve bez epiteli izlendi (Şekil 5A ve 5B). 1. Gruba ait uterus dokularında yüzey epitel hücrelerde çekirdeklerin indentasyon gösterdiği, heterokromatinden zengin olduğu, endoplazmik retikulum sisternalarında genişleme, mitokondriyonlarda hacim artışı, lizozomal yapılarda ve lipid damlacıklarında artış bulunduğu izlenirken bez epiteli hücrelerinin sitoplazmalarında yaygın lipid damlacıkları ve lizozomal yapılar gözlemlendi (Şekil 5C ve 5D). 2. Gruba ait uterus dokularında ise incelenen yüzey epitel hücrelerinin sitoplazmasında lipid damlacıklarının ve mitokondriyonların artış gösterdiği, stromal hücrelerin sitoplazmalarında mitokondriyonların genişleyip dejenere olduğu dikkati çekti. Bez epiteli hücrelerinin sitoplazmalarında da yaygın lipid damlacıkları ve lizozomlar, mitokondriyonlarında

hacim artışı ve dejenerasyon görüldü (Şekil 5E ve 5F).

TARTIŞMA

Son yıllarda moleküler biyolojideki kaydedilen ilerlemeler sayesinde biyolojik temelli, hedefe yönelik tedaviler klinik kullanıma girerek yaygınlaşmaya başlamıştır. Kanserın klasik tedavisinde amaçsız ve kontrolsüz çoğalan hücrelerin sitotoksik tedavi ile yok edilmesi hedeflenir. Kemoterapötik ilaçlar ve radyoterapi mitozu durdurarak ya da DNA sentezini bozarak bunu gerçekleştirir. Fizyolojik olarak çoğalan normal hücreler de bu tedaviden etkilenir ve çeşitli yan etkiler ortaya çıkar. Hedefe yönelik tedavilerde ise kanseri başlatan, gelişmesine izin veren moleküler bozukluğa doğrudan saldırı söz konusudur. Kanser moleküler biyolojisi ve hücre biliminin ilerlemesi ile kanserin nasıl başladığı, büyüdüğü, ilerlediği ve yayıldığı daha iyi anlaşılmış ve her kademedeki bloklar ve inhibitörler geliştirilerek yeni ilaçlar tedavide kullanılmaya başlanmıştır^{29,30}.

Hedefe yönelik tedaviler kanser hücresinin yüzeyinde bulunan ve kanserin gelişmesinden sorumlu spesifik bir reseptörü ya da onların hücre içindeki bağlantı yollarını bloke ederek çekirdeğe giden bölünme sinyalinin durdurulur. Bu şekilde tümör hücre çoğalması durdurulur. Standart sitotoksik kanser kemoterapisi ile fizyolojik olarak çoğalması gereken hücreler zarar görür ve buna ait yan etkiler ortaya çıkarken hedefe yönelik tedavilerde böyle bir yan etki beklenmez^{30,31}.

Hedefe yönelik tedavilerde öncü ilaç İmatinib olmuştur. İmatinib, kronik myelositer lösemide anormal tirozin kinaz aktivitesini durdurmuş gastrointestinal stromal tümörlerdeki c-kit reseptörünü de inaktive ederek hastalığı hiçbir tedavi ile kıyaslanmayacak ölçüde kontrol altına almıştır³². Bunu Hodgkin dışı lenfomalardaki CD-20 hücre membran reseptörüne yönelik Rituximab ve meme kanserindeki HER2 reseptörüne yönelik Trastuzumab, kolon kanseri, küçük hücreli akciğer ve baş-boyun kanserlerinde kullanılan EGFR inhibitörü monoklonal antikorlar Cetuximab ve Panitumumab izlemiştir^{1,6,32}. Monoklonal antikorların hücre membranı içinden geçme yeteneği yoktur sadece hücre yüzeyinde eksprese veya sekrete edilen moleküller üzerinden etki gösterebilir. Lapatinib gibi tirozin kinaz inhibitörleri ise hücre reseptörlerinin sitoplazmik parçaları ve hücre içi sinyal molekülleri ile etkileşirler. Sinyal iletimini hücre içinde bloke eden küçük moleküllü tirozin kinaz inhibitörleri Erlotinib, Gefitinib akciğer ve pankreas kanserlerinde, çoğul

hedefe yönelik küçük molekülü tirozin kinaz inhibitörleri metastatik böbrek kanserlerinde ve hepatosellüler karaciğer kanserlerinde sağ kalımı uzatmıştır^{6,9,30,32}.

Hedefe yönelik tedavilerin yöneldiği hedeflerin fizyolojik görevleri de vardır. EGFR (ErbB1), HER2 (ErbB2), HER3 (ErbB3) ve HER4 (ErbB4)'den oluşan ERB ailesi, hem EGFR hem de HER2, mitojenler ile aktive olan protein kinazlar (MAPK) ve fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K)/Akt yolağını aktive ederek normal hücreler ve kanser hücrelerinde, hücre büyümesi farklılaşması ve motilitesinde kritik öneme sahiptir. Örneğin; EGFR'leri deri ve mukozanın yenilenmesi, onarımı ve bütünlüğünden sorumludur. Bu nedenle EGFR blokajında dermatolojik toksisite ve gastrointestinal toksisite gelişir. Erlotinib ve Gefitinib gibi EGFR inhibitörleri, deri ve gastrointestinal toksisite dışında interstisyel akciğer hastalığına %2-5 oranında neden olabilirler^{6,30}.

Aynı şekilde HER2 reseptörleri yoğun biçimde miyokarda bulunur ve miyokardiyositlerin büyümesi, yaşaması, onarımı ve kontraktilesinden sorumludur. HER2 bloke edilmiş kalpte dilate kardiyomiopati gelişmekte, sol ventriküler ejeksiyon fraksiyonu düşmektedir. Çünkü miyokard onarım prosesi HER2 aracılığı ile gelişmektedir. Yeni grup ilaçlar her ne kadar iyi tolere edilseler de, bazı hedefe yönelik ilaçların kullanımı sırasında aralarında kalp yetersizliği, sol ventrikül sistolik fonksiyonlarında bozulma, hipertansiyon, tromboembolik olaylar ve nadir olarak miyokard infarktüsünün de bulunduğu kardiyak yan etkiler bildirilmiştir^{23,30,33}.

Hücre bölünmesi ve büyümesinde görevli olan epidermal büyüme faktörü ve reseptörleri birçok memeli uterusunda var olup birçok çalışmada da EGF'nin uterus aktivitesi ve embriyo gelişimi üzerine önemli rolleri bildirilmiştir. İnsan menstrual siklusunda ErbB/HER ailesinin bütün üyeleri uterusu yüzey ve bez epitel hücrelerinde eksprese edilir. ErbB2/HER2'nin fare uterusunda EGF ilişkili büyüme faktörünün stimülasyonunda potansiyel mediatör olarak rol oynadığı öne sürülmüş, ayrıca bazı türlerde bu reseptörün uterin epitelyal hücrelerde eksprese edildiği bildirilmiştir²⁶.

Oral olarak alınan, EGFR ve HER2 reversibl inhibitörü olan Lapatinib hem EGFR hem de HER2 reseptörüne bağlı tirozin kinaz aktivitesini inhibe eder. Lapatinibin uterus ve over dokularında yol açabileceği değişikliklerin araştırılması amacıyla yapılan bu çalışmada uterus kesitlerinin elektron

mikroskopik değerlendirilmesi sonucunda, deney gruplarından elde edilen örneklerde endometriyum dokusu kontrol grubuna göre belirgin ultrastrüktürel değişiklikler göstermekteydi. Uterus mukozasında meydana gelen yapısal değişikliklerin EGFR blokajıyla ilişkili olduğu düşünüldü.

EGFR'nin overlerde folikül içerisinde granüloza ve teka hücreleri ile korpus luteumda bulunduğu, epidermal büyüme faktörünün tirozin kinaz aktivasyonu ile oosit matürasyonunu kontrol etmede fizyolojik bir öneme sahip olduğu ve foliküler gelişimi sağladığı bildirilmiştir^{24,34}. HER2 overde primordiyal germ hücrelerinde, granüloza hücrelerinde, luteal hücrelerde ve oositte eksprese olmaktadır. HER2, granüloza hücre fonksiyonu regülasyonunda, primordiyal folikül büyümesinin başlaması ve oosit olgunlaşmasında rol alır. Ayrıca EGF rolünü düzenleyen anahtar sinyal molekülü olarak aracılık eder²⁴. Çalışmamızda, Lapatinib uygulanan deney gruplarında gözlenen ve doza bağlı olarak artan bulgular Lapatinib'in etkisiyle, oosit ve granüloza hücrelerinin yapısının ve gelişiminin etkilendiğini gösteren ultrastrüktürel değişiklikler olarak değerlendirildi.

Tümör hücrelerinin proliferasyonunda, büyüme faktörlerinin tirozin kinaz reseptörlerini aktive etmesi önemli bir basamaktır. EGF reseptörünün fizyolojik olmayan aktivasyonu kontrol edilemeyen hücre bölünmesi ve sonunda tümör büyümesi ile sonuçlanır. EGF reseptörünün aktivasyonu, sadece hücre bölünmesine neden olan ras yolunun hücre içi aktivasyonuna yol açmakla kalmaz, aynı zamanda apoptozisin inhibisyonu, anjiyogenez stimülasyonu ve metastaz/invazyon ile sonuçlanan diğer hücre içi yolların da aktivasyonuna yol açar. Sunulan çalışmada yüksek doz Lapatinib verdiğimiz grubun (75 mg/kg) over dokularındaki foliküllerde tanımladığımız apoptotik değişiklikler yanında bazı foliküllerdeki granüloza hücrelerinde gözlenen perinükleolar sisterna ve endoplazmik retikulum genişlemeleri, vakuolizasyon ile karakterize değişiklikler apoptozdan farklı bir yolla oluşan ve büyüme faktörleriyle bağlantılı olarak gelişen paraptosis ile uyumluluk göstermektedir. Sperandio ve arkadaşları çalışmalarında sitoplazmik vakuolizasyon ve mitokondriyal şişme ile karakterize farklı bir hücre ölümü tipi olan paraptosisi tanımlamışlardır³⁵. Çalışmamızda yüksek doz Lapatinib alan deney grubunda overlerde gözlenen bu değişikliklerin, EGFR inhibisyonuyla ilişkili olarak, doza bağlı olarak

artan apoptoz ve paraptosis nedeniyle gerçekleştiği düşünülmektedir^{35,36}.

Çalışmanın, biyokimyasal verileri değerlendirildiğinde östradiol ve progesteron değerlerinde değişiklikler olduğu görülmektedir. Deney sonunda kontrol ve deney gruplarındaki sıçanlardan alınan kan örneklerinin progesteron ve östradiol değerleri karşılaştırıldığında, 30 mg/kg ve 75 mg/kg Lapatinib uygulanan gruplarda, progesteron ve östradiol değerlerinin doza bağlı olarak giderek düştüğü dikkati çekmekte ve bu azalmanın EGFR inhibisyonu ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Nitekim Kennedy, Steward ve Cullinan, Wollenhopt gibi araştırmacılar östradiol ve progesteronun, hücrelerdeki EGF ve EGFR ekspresyonunu, EGF ve EGFR'nin ise steroid hormon bağımlı uterin büyüme, proliferasyonu ve diferansiyasyonu stimüle ettiği bildirmişlerdir. Aynı zamanda farenin genital sisteminde EGF ve EGFR ekspresyonunda östradiolün artış gösterdiği bildirilmiştir. İnsanlarda ise menstrüel siklus boyunca EGFR ekspresyonundaki artışın serum östradiol seviyesine bağımlı olduğu bildirilmiştir²⁶.

Sonuç olarak, farklı dozlarda uygulanan Lapatinib over ve uterus üzerine etkilerinin kontrol ve deney gruplarında karşılaştırmalı olarak incelendiği çalışmamızda özellikle yüksek doz grubunda, over ve uterus dokularında yapısal değişikliklerin geliştiği gözlenmiş ancak bu değişikliklerin geriye dönüşümlü olduğu düşünülmüştür. Günümüzde birçok hedefe yönelik ilaç araştırma aşamasındadır. Ümit veren bu ilaçlarla yapılan araştırmalar halen devam etmekte ve her geçen gün bunlara yenileri eklenmektedir. Ancak hedefe yönelik ajanlar kullanıldıkça bazı beklenmeyen yan etkiler de ortaya çıkmaktadır. Çünkü bu ajanların devre dışı bıraktığı reseptörler ve sinyal molekülleri normal hücreler tarafından da gereğinde kullanılmaktadır. Böylece normal hücreler de zaman zaman hedefin içinde kalabilmektedir.

Yazar Katkıları: Çalışma konsepti/Tasarımı: HTM, YK, UÖM; Veri toplama: HTM, YK, UÖM; Veri analizi ve yorumlama: HTM, YK, UÖM; Yazı taslağı: HTM, YK, UÖM; İçeriğin eleştirel incelenmesi: HTM, YK, UÖM; Son onay ve sorumluluk: HTM, YK, UÖM; Teknik ve malzeme desteği: -; Süpervizyon: UÖM ; Fon sağlama (mevcut ise): yok.

Etik Onay: Deney sırasında yapılan tüm işlemler 1986 Uluslararası Strasbourg Hayvan Hakları Evrensel Beyanmesine uygun olarak, etik kurul onayı (toplantı sayısı 12, toplantı tarihi 29 Eylül 2010) ile veteriner hekim kontrolünde Çukurova Üniversitesi Tıbbi Bilimler Deneysel Araştırma ve Uygulama Merkezinde (TIBDAM) gerçekleştirilmiştir.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması beyan etmemişlerdir.

Finansal Destek: Yazarlar finansal destek beyan etmemişlerdir.

Yazarın Notu: Bu çalışma, Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje no: TF2010YL6).

Author Contributions: Concept/Design: HTM, YK, UÖM; Data acquisition: HTM, YK, UÖM; Data analysis and interpretation: HTM,

YK, UÖM; Drafting manuscript: HTM, YK, UÖM; Critical revision of manuscript: HTM, YK, UÖM; Final approval and accountability: HTM, YK, UÖM; Technical or material support: -; Supervision: UÖM; Securing funding (if available): n/a.

Ethical Approval: All transactions that were made during the experiment, the 1986 Strasbourg International the Universal Declaration of animal rights, in accordance with approval from the Ethics Committee (meeting Number 12 date of meeting 29 September 2010) Veterinary Medicine, Çukurova University of Medical Sciences Research and Application Centre (TIBB) was also carried out.

Peer-review: Externally peer-reviewed.

Conflict of Interest: Authors declared no conflict of interest.

Financial Disclosure: Authors declared no financial support

Acknowledgement: This study was supported by the Scientific Research Projects Unit of Çukurova University (project no: TF2010YL6).

KAYNAKLAR

1. Kansu E. Hedeflenmiş tedavilerde "hedef" moleküller. ANKEM Derg. 2005;19(Ek 2):112-6.
2. Atalay C. Her2 pozitif meme kanserine cerrahi yaklaşım nasıl olmalı?. Journal of Breast Health. 2010;6:1-4.
3. Öztıp İ. Baş boyun tümörlerinde hedefe yönelik tedavi. Uluslararası Hematoloji-Onkoloji Dergisi. 2008;1:46-56.
4. Öztıp İ. Küçük hücreli dışı akciğer kanserinde hedefe yönelik tedavi. Uluslararası Hematoloji-Onkoloji Dergisi. 2009;3:184-94.
5. Duvan Cİ, Şatroğlu H, Berker B, Çetinkaya E, Kahraman K. Yardımla üreme tekniklerinde implantasyon ve gebelik oranlarını etkileyen faktörler. T Klin Jinekoloj Obst. 2003;13:466-75.
6. Harari PM. Epidermal growth factor receptor inhibition strategies in oncology. Endocr Relat Cancer. 2004;11:689-708.
7. Chen HX, Cleck JN, Coelho R, Dancy JE. Epidermal growth factor receptor inhibitors: current status and future directions. Curr Probl Cancer. 2009;33:245-94.
8. Küçükzeybek Y, Küçükzeybek BB, Demir C. HER2 pozitif metastatik meme kanserlerinde trastuzumab içeren kemoterapi ile progresyon sonrasında tedavi seçenekleri. Van Tıp Dergisi. 2010;17:164-9.
9. Yazıcı S, Özen H. Böbrek tümörlerinde hedefe yönelik tedavi. Üroonkoloji Bülteni. 2007;3:3-10.
10. Gadducci A, Cosio S, Genazzani AR. Old and new perspectives in the pharmacological treatment of advanced or recurrent endometrial cancer: Hormonal therapy, chemotherapy and molecularly targeted therapies. Crit Rev Oncol Hematol. 2006;58:242-56.
11. Giampaglia M, Chiuri VE, Tinelli A, De Laurentis M, Silvestris N, Lorusso V. Lapatinib in breast cancer: clinical experiences and future perspectives. Cancer Treat Rev. 2010;36:72-9.
12. Kroep JR, Linn SC, Boven E, Bloemendal HJ, Baas J, Mandjes IAM et al. Lapatinib: clinical benefit in patients with HER 2-positive advanced breast cancer. Neth J Med. 2010;68:371-6.
13. Medina PJ, Goodin S. Lapatinib: A dual inhibitor of human epidermal growth factor receptor tyrosine

- kinases. *Clin Ther.* 2008;30:1426-46.
14. Tevaarwerk AJ, Kolesar JM. Lapatinib: A small-molecule inhibitor of epidermal growth factor receptor and human epidermal growth factor receptor-2 tyrosine kinases used in the treatment of breast cancer. *Clin Ther.* 2009;31:2332-48.
 15. Jagiello-Gruszfeld A, Tjulandin S, Dobrovolskaya N, Manikhas A, Pienkowski T, DeSilvio M et al. A single-arm phase II trial of first-line paclitaxel in combination with lapatinib in HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *Oncology.* 2010;79:129-35.
 16. Amir E, Ocaña A, Seruga B, Freedman O, Clemons M. Lapatinib and HER2 status: Results of a meta-analysis of randomized phase III trials in metastatic breast cancer. *Cancer Treat Rev.* 2010;36:410-5.
 17. Fouladi M, Stewart CF, Blaney SM, Onar-Thomas A, Schaiquevich P, Packer RJ et al. Phase I trial of Lapatinib in children with refractory CNS malignancies: A pediatric brain tumor consortium study. *J Clin Oncol.* 2010;28:4221-7.
 18. Burris III HA. Dual kinase inhibition in the treatment of breast cancer: initial experience with the EGFR/Erb B-2 inhibitor Lapatinib. *Oncologist.* 2004;9:10-5.
 19. Halterman PA. Lapatinib and ixabepilone for the treatment of metastatic breast cancer. *Pharmacotherapy.* 2008;28:1255-66.
 20. Kimball KJ, Numnum TM, Kirby TO, Zamboni WC, Estes JM, Barnes MN et al. A phase I study of lapatinib in combination with carboplatin in women with platinum sensitive recurrent ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol.* 2008;111:95-101.
 21. Van Erp NP, Gelderblom H, Guchelaar HJ. Clinical pharmacokinetics of tyrosine kinase inhibitors. *Cancer Treat Rev.* 2009;35:692-706.
 22. Galsky MD, Von Hoff DD, Neubauer M, Anderson T, Fleming M, Nagarwala Y et al. Target-specific, histology-independent, randomized discontinuation study of lapatinib in patients with HER2-amplified solid tumors. *Invest New Drugs.* 2012;30:695-701.
 23. Lee HA, Kim EJ, Hyun SA, Park SG and Kim KS. Electrophysiological effects of the anti-cancer drug lapatinib on cardiac repolarization. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2010;107:614-8.
 24. Moreno-Cuevas J, Khan-Dawood FS. Epidermal growth factor receptors in rat ovarian tissue. *Tissue Cell.* 1997;29:55-62.
 25. Li-Ping Z, Da-Lei Z, Jian H, Liang-Quan X, Ai-Xia X, Xiao-Yu D et al. Proto-oncogene c-erbB2 initiates rat primordial follicle growth via PKC and MAPK pathways. *Reprod Biol Endocrinol.* 2010;8:1-9.
 26. Sağsöz H, Ketani MA, Saruhan BG. Expression of the erbB/HER receptor family in the bovine uterus during the sexual cycle and the relation of this family to serum sex steroids. *Biotech Histochem.* 2012;87:105-16.
 27. Zhang Z, Oyesanya RA, Campbell DJW, Almenara JA, DeWitt JL and Sirica AE. Preclinical assessment of simultaneous targeting of epidermal growth factor receptor (ERBB1) and ERBB2 as a strategy for cholangiocarcinoma therapy. *Hepatology.* 2010;52:975-86.
 28. Strecker TE, Shen Q, Zhang Y, Hill JL, Li Y, Wang C et al. Effect of lapatinib on the development of estrogen receptor – negative mammary tumors in mice. *J Natl Cancer Inst.* 2009;101:107-13.
 29. Öztürk M. Meme Kanserinin Genetiği ve Risk Faktörleri. Meme Kanseri Sempozyum Dizisi. 2006;54:15-26.
 30. Üskent N. Hedefe yönelik tedaviler ne kadar isabetli? *Onkoloji Bülteni Onkovital.* 2010;4:1.
 31. Demirelli FH. Kanserin moleküler genetik temelleri. *Güncel Klinik Onkoloji.* 2003;37:9-15.
 32. Demirkazık A, Özal G. Prostat kanserinde hedefe yönelik tedavinin yeri. *Üroonkoloji Bülteni.* 2010;2:65-8.
 33. Aktürk E, Kurtoğlu E, Harputluoğlu H. Kanseri ilaçlarının kardiyovasküler yan etkileri: Bu yan etkiler nasıl belirlenmeli, tedavi ve takip nasıl yapılmalı? *İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi.* 2011;18:137-42.
 34. Bulgurcuoğlu S, Özsait B, Attar E. Büyüme faktörlerinin oosit ve embriyo gelişimi üzerindeki etkisi. *Artemis.* 2003;4:18-26.
 35. Sperandio S, Poksay K, de Belle I, Lafuente MJ, Liu B, Nasir J et al. Paraptosis: mediation by MAP kinases and inhibition by AIP-1/Alix. *Cell Death Differ.* 2004;11:1066-75.
 36. Devine PJ, Payne CM, McCuskey MK and Hoyer PB. Ultrastructural evaluation of oocytes during atresia in rat ovarian follicles. *Biol Reprod.* 2000;63:1245-52.