

**T.C.**  
**ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI**

**MİDE KANSERLİ DOKULARDA GENETİK MARKERLARIN**  
**FISH (FLORESAN IN SITU HİBRİDİZASYON) ANALİZİ İLE**  
**DEĞERLENDİRİLMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**HANDE SAYGILI**

**DANIŞMAN**

**YRD.DOÇ. DR. MUHSİN ÖZDEMİR**

**TEMMUZ 2010**



## KABUL VE ONAY SAYFASI

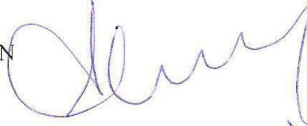
**Hande SAYGILI'** nin Yüksek Lisans Tezi olarak hazırladığı **"Mide Kanserli Dokularda Genetik Markerların FISH (Floresan In Situ Hibridizasyon) Analizi ile Değerlendirilmesi"** başlıklı bu çalışma Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddesi uyarınca değerlendirilerek **"KABUL"** edilmiştir.

21.07.2010

Üye: Prof.Dr. Sevilhan ARTAN



Üye: Prof.Dr. Ajlan TÜKÜN



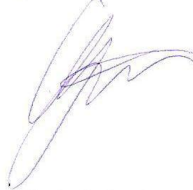
Üye: Yrd.Doç.Dr. Muhsin ÖZDEMİR (Danışman)




Üye: Yrd.Doç.Dr. Beyhan DURAK ARAS



Üye: Yrd.Doç.Dr. Oğuz ÇİLİNGİR



Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 26/08/2010 tarih ve 840/2885 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

  
Prof.Dr.Ferruh YÜCEL  
Enstitü Müdürü

## ÖZET

Çalışmamız; öncelikle, mide kanserli dokularda EGFR, HER-2/neu ve TOP2A onkogenlerinin FISH tekniği için dizayn edilmiş sentromer ve lokus spesifik gen bölgelerinin incelenerek saptanan yeniden düzenlenmelerle hastalığın evresi arasında ilişki kurabilmek, ikinci olarak hastalarımıza ait demografik ve histopatolojik bilgilerle bulduğumuz sonuçlar arasında ilişki saptayabilmek ve son olarak da Türk toplumunda farklı gelişim aşamalarında bulunan mide kanserli hastaların EGFR, HER-2/neu ve TOP2A genlerindeki amplifikasyonları, 7. ve 17. kromozomlardaki sayısal anomalileri, saptayarak mide kanseri için geliştirilecek tedavi yöntemlerine ışık tutmak amacıyla yapılmıştır.

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Gastroenteroloji Bilim Dalı'ndan ve Genel Cerrahi Anabilim Dalı'dan gelen mide kanseri tanısı almış 15 olgudan alınan doku örneklerine direk doku preparasyonu yapıldıktan sonra FISH analizi yapılmıştır. EGFR, HER-2/neu ve TOP2A genleri için dizayn edilmiş problarla tümörlü dokularda kopya sayısı değişikliklerini belirlemede "altın standart" olarak kullanılan Floresan In Situ Hibridizasyon (FISH) yöntemi uygulanmıştır. Analiz edilen 15 olgunun hepsinden sonuç alınmıştır.

Yaptığımız çalışmada tespit ettiğimiz gen amplifikasyonu oranları, literatürlere göre yüksek tespit edilmiştir. Oranın bu şekilde çıkmasını olgu sayısının azlığı, tümör heterojenitesi ve evreleri ile ilişkilendirilmiştir. Yapılan çalışmalarda HER-2/neu ile klinik evre arasında genellikle herhangi bir ilişki kurulamamıştır. Çalışmamızda HER-2/neu gen amplifikasyonuna sahip yedi olgunun evre IV'e ait olduğu tespit edilmiştir. Ancak evre IV ile HER-2/neu gen amplifikasyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç bulunamamıştır. Çalışmamızda HER-2/neu gen amplifikasyonu görülen yedi hastanın altısında TOP2A gen amplifikasyonu da (%85,7) görülmüştür. Bu sonuç literatürlerle uyum göstermektedir.

EGFR, HER-2/neu ve TOP2A genlerinin hastanın yaşı, cinsiyeti, tümör tipi, sigara kullanımı, aile öyküsü ve hastalığın klinik evresi ve diğer genlerle arasında istatistiksel olarak herhangi bir ilişki kurulamamıştır.

Çalışmamız, Türk populasyonunda mide kanserinde gen amplifikasyonlarının araştırıldığı ilk çalışma olma özelliğini taşımaktadır.

Çalışmamız ve bu yönde yapılacak çalışmalar, mide kanserlerinin etiyolojisine, yeni tedavi protokollerin geliştirilmesine, bu protokollerin klinikte kullanımlarına ışık tutacaktır.

Anahtar kelimeler: Mide kanseri, TOP2A, HER-2/neu, EGFR, FISH

## **SUMMARY**

Our study firstly aims at revealing the relation between two issues: The rearrangements determined by studying centromere and locus specific gene regions designed for the FISH technique of the EGFR, HER-2/neu and TOP2A oncogenes in gastric cancer tissues; and the stages of the disease. Secondly, it carries the purpose of building a link between the patients' demographic and histopathological data and the results achieved. Finally, the study tries to find out the treatment methods of the gastric cancer was carried out to keep the light by determining the amplifications at EGFR, HER-2/neu and TOP2A of the Turkish population at various stages of the disease and numerical anomalies at 7<sup>th</sup> and 17<sup>th</sup> chromosomes.

After the samples of 15 patients, acquired from Gastroenterology and General Surgery Department of Eskisehir Osmangazi University, have been applied direct tissue preparations, Fluorescent In Situ Hibridizasyon (FISH) analysis is implemented on them. Fluorescent In Situ Hybridization (FISH) is a 'golden standard' in determining the copy number changes in tissues with tumors by utilizing probs designed for EGFR, HER-2/neu and TOP2A genes. Following the application of FISH, all analyses have produced results.

The gene amplification ratios determined in the study conducted came out to be higher than the literatures. The reason of this outcome could be linked to low number experiment subjects as well as tumor heterogeneity and stages. Generally, no relation has been found between HER-2/neu and clinical stage. It has been determined that the seven patients with HER-2/neu gene amplification belonged to stage IV. However, no meaningful statistical result has been seen between stage IV and HER-2/neu gene amplification. The study has understood that six patients out of the seven with HER2 gene amplification also have TOP2A gene amplification (%85.7). This outcome is in line with the literature.

No statistical relationship could be established between EGFR, HER-2/neu and TOP2A genes, and the patient's age, gender, tumor type, smoking, family history and clinical stage of disease.

Our study is important due to being the first study analyzing the amplification of these genes in gastric cancer in Turkish population.

Our study and the studies like this will shed light on etiology of gastric cancer, developing new treatment strategies and applications of these strategies in clinic.

Keywords: Gastric cancer, TOP2A, HER-2/neu, EGFR, FISH

## İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	v
SUMMARY.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xii
TABLolar DİZİNİ.....	xiv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xv
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2.GENEL BİLGİLER.....	3
2.1.Kanser.....	3
2.2.Kanserin Gelişimi.....	3
2.3. Kanser ve Genetik.....	4
2.4. Kanser oluşumunda sorumlu genler ve fonksiyonları.....	5
2.4.1. Onkogenlerin protein ürünleri.....	6
2.4.2. Onkogenlerin aktivasyonları.....	6
2.5. Hücre yüzey reseptörleri.....	8
2.5.1. Epidermal büyüme faktörü reseptörleri.....	9
2.5.2. Epidermal büyüme faktör reseptör inhibitörleri.....	13
2.6. Topoizomerazlar.....	14
2.7.Mide Kanseri.....	15
2.7.1.Midenin Embriyolojisi ve Postnatal Gelişimi.....	15
2.7.2. Midenin Anatomisi.....	15
2.7.3.Midenin Histolojisi.....	16
2.8.Mide Tümörleri.....	16
2.8.1.DSÖ Klasifikasyonu ( 2000 ).....	17
2.8.1.1.Adenokarsinom.....	18
2.8.1.1.1.Adenokarsinomların Epidemiyolojisi.....	18
2.8.1.1.2.Mide Adenokarsinomlarında Evreleme.....	19



## İÇİNDEKİLER(Devam ediyor)

Sayfa

2.9.Etyopatogenez.....	21
2.9.1.Çevresel Faktörler.....	21
2.9.2.Kişisel Faktörler.....	21
2.10.Floresan In Situ Hibridizasyon (FISH).....	21
2.10.1. FISH Tekniğinde Kullanılan Problar ve Özellikleri.....	23
2.10.2. FISH Tekniğinin Temel Mekanizması.....	23
<b>3.GEREÇ ve YÖNTEMLER.....</b>	<b>25</b>
3.1. Gereç.....	25
3.1.1. Kullanılan Gereçler.....	25
3.1.2. Cam Malzeme.....	26
3.1.3. Kimyasal Maddeler.....	26
3.1.4.Kullanılan Problar.....	27
3.2 Yöntem.....	27
3.2.1 Materyal Alımı.....	27
3.2.2. Moleküler Sitogenetik Analiz.....	27
3.2.2.1. Direkt Doku Preparasyonu.....	27
3.2.2.2. FISH Tekniğinin Uygulanması.....	28
3.2.2.2.1. Preparatların Ön Yıkaması ve Denatürasyonu.....	31
3.2.2.2.2. Prob Denatürasyonu.....	31
3.2.2.2.3.Hibridizasyon.....	31
3.2.2.2.4 Hibridizasyon Sonrası Yıkamalar.....	32
3.2.2.2.5. Hibridize Olan Bölgelerin Görüntülenmesi.....	32
3.2.2.2.6. Preparatların Mikroskopta İncelenmesi.....	32
3.2.2.2.7. Değerlendirme.....	33
3.2.3. İstatistiksel Analiz.....	34

## İÇİNDEKİLER(Devam ediyor)

Sayfa

<b>4. BULGULAR</b> .....	35
4.1.Yöntem ve Değerlendirmeye İlişkin Bulgular.....	37
4.1.1.Olguların FISH Analiz Bulguları.....	37
4.1.1.1.EGFR Gen Bölgesine ve Sentromer 7'ye Ait Aberasyonlar.....	39
4.1.1.2.TOP2A, HER-2/neu Gen Bölgelerine ve Sentromer 17'ye Ait Aberasyonlar.....	39
4.2.Çalışmanın İstatistiksel Bulguları.....	44
<b>5. TARTIŞMA</b> .....	47
5.1.FISH Yöntemi İle Saptanan Anomalilerle Literatür Bilgilerinin Karşılaştırılması.....	46
5.1.1.EGFR Geninin FISH Yöntemi Sonuçları İle Literatür Bilgilerinin Karşılaştırılması.....	46
5.1.2.HER-2/neu Geninin FISH Yöntemi Sonuçları İle Literatür Bilgilerinin Karşılaştırılması.....	48
5.1.3.HER-2/neu ve EGFR genlerinin FISH Yöntemi Sonuçları ile Her İki Geninde Beraber Çalışıldığı Literatür Bilgilerinin Karşılaştırılması.....	51
5.1.4.HER-2/neu ve TOP2A genlerinin FISH Yöntemi Sonuçları ile Her İki Geninde Beraber Çalışıldığı Literatür Bilgilerinin Karşılaştırılması.....	53
5.1.5.EGFR, HER-2/neu ve TOP2A genlerinin FISH Yöntemi Sonuçları ile Her Üç Geninde Beraber Çalışıldığı Literatür Bilgilerinin Karşılaştırılması...54	
<b>6. SONUÇ ve ÖNERİLER</b> .....	57
<b>7.KAYNAKLAR</b> .....	59
<b>ÖZGEÇMİŞ</b>	

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

<b>Şekil 2.1</b> : EGF reseptör ailesi ve ligandları.....	11
<b>Şekil 2.2</b> : EGFR ailesi sinyal yolları.....	13
<b>Şekil 4.1</b> : Olgu 2' ye ait EGFR geni ve sentromer 7 için normal hücrelere sahip FISH görüntüsü (Cep7 yeşil sinyal, EGFR kırmızı sinyal).....	40
<b>Şekil 4.2</b> : EGFR geni amplifikasyonuna sahip olgu 9' a ait FISH görüntüsü (Cep7 yeşil sinyal, EGFR kırmızı sinyal).....	40
<b>Şekil 4.3</b> : EGFR ve sentromer 7 polizomisine sahip olgu 1'e ait FISH görüntüsü (Cep7 yeşil sinyal, EGFR kırmızı sinyal).....	41
<b>Şekil 4.4</b> : EGFR ve sentromer 7 trizomisine sahip olgu 6'ya ait FISH görüntüsü (Cep7 yeşil sinyal, EGFR kırmızı sinyal).....	41
<b>Şekil 4.5</b> : TOP2A, HER-2/neu ve sentromer 17 için normal hücrelere sahip olgu 11'e ait FISH görüntüsü (Cep17 mavi, HER-2/neu yeşil, TOP2A kırmızı sinyal).....	42
<b>Şekil 4.6</b> : TOP2A, HER-2/neu ve sentromer 17 polizomisine sahip olgu 1'e ait FISH görüntüsü (Cep17 mavi, HER-2/neu yeşil, TOP2A kırmızı sinyal).....	42
<b>Şekil 4.7.</b> : TOP2A, HER-2/neu ve sentromer 17 trizomisine sahip olgu 1'e ait FISH görüntüsü (Cep17 mavi, HER-2/neu yeşil, TOP2A kırmızı sinyal).....	43

**Şekil 4.8.** : TOP2A ve HER-2/neu amplifikasyonuna sahip olgu 15'e ait  
FISH görüntüsü  
(Cep17 mavi, HER-2/neu yeşil, TOP2A kırmızı sinyal).....43

## TABLolar DİZİNİ

Sayfa

<b>Tablo 2.1</b> : Mide Tümörleri (DSÖ 2000).....	17
<b>Tablo 3.1</b> : Carnoy's Fiksatif Solüsyonu.....	29
<b>Tablo 3.2</b> : Preparatların Ön Yıkama Solüsyonları.....	29
<b>Tablo 3.3</b> : Preparatların Denatürasyon Solüsyonu.....	29
<b>Tablo 3.4</b> : Hibridizasyon Sonrası Solüsyonlar.....	30
<b>Tablo 3.5</b> : Görüntüleme Sistemleri Solüsyonu.....	30
<b>Tablo 4.1</b> : Mide kanserli olguların yaş, cinsiyet, tümör tipi, sigara, öyküsü ve evre bilgileri .....	36
<b>Tablo 4.2</b> : Mide kanserli olguların FISH analizi sonuçları, tümör tipi ve evre bilgileri.....	38
<b>Tablo 4.3</b> : Değerlendirilen Genetik Parametrelerin Görülme Oranı.....	39
<b>Tablo 4.4</b> : HER-2/neu ile TOP2A genlerinin kopya sayılarındaki artışla bu parametreler arasındaki ilişki.....	44
<b>Tablo 4.5</b> : Klinik evre ile HER-2/neu genindeki kopya sayısı artışı arasındaki ilişki..	45
<b>Tablo 5.1</b> : EGFR, HER-2/neu ve TOP2A gen amplifikasyon sonuçlarının literatür verileri ile karşılaştırılması.....	56

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<b>Simgeler</b>	<b>Açıklama</b>
<b>CISH</b>	Kromojenik In Situ Hibridizasyon
<b>DAPI</b>	4',6'-diamino-2-fenilindol
<b>DM</b>	Double-minute Kromozomlar
<b>DNA</b>	Deoksiribonükleik Asit
<b>EGFR</b>	Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü
<b>FISH</b>	Floresan In Situ Hibridizasyon
<b>g</b>	Gram
<b>HER-2/neu</b>	Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü -2
<b>HP</b>	Helikobakter Piloni
<b>HRS</b>	Homojen Olarak Boya Alan Bölgeler
<b>IHC</b>	İmmünohistokimyasal Boyama Tekniği
<b>kDA</b>	Kilo Dalton
<b>KHAK</b>	Küçük Hücreli Akciğer Kanseri
<b>KHOAK</b>	Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanseri
<b>ml</b>	Mililitre
<b>mRNA</b>	Messenger Ribonükleik Asit
<b>NaCl</b>	Sodyum klorür
<b>NaOH</b>	Sodyum hidroksit
<b>PCR</b>	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<b>RNA</b>	Ribonükleik Asit
<b>RT PCR</b>	Revers Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<b>SSC</b>	NaCl/7 Trisodyum Sitrata
<b>TOP2A</b>	Topoizomeraz II A
<b>DSÖ</b>	Dünya Sağlık Örgütü
<b>µl</b>	Mikrolitre
<b>µg</b>	Mikrogram
<b>BTC</b>	Betaselulin
<b>NDF</b>	Neu diferansiyasyon faktörü

## 1.GİRİŞ ve AMAÇ

Yirminci yüzyılın ikinci yarısında mide kanserinin görülme sıklığı ve öldürme oranında dünya çapında belirgin bir azalma görülmesine rağmen, akciğer kanserinden sonra dünyada kanserden ölüme yol açan ikinci en sık neden olarak mide kanserleri gösterilmektedir. Dünyada mide kanseri görülme sıklığı özellikle sosyoekonomik düzeyi düşük ülkelerde artarken Amerika'da kansere bağlı ölümlerde üçüncü sıraya düşmüştür. Sosyoekonomik toplumlarda son 50 yılda mide kanserindeki azalmaya yiyecek alışkanlıklarındaki değişimler, tuz tüketiminin azalması, Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından primer kanserojen olarak kabul edilen Helicobakter Piloni'nin (HP) eradike edilmesine bağlanabilir (35).

Cerrahi ile kombine edilmiş kemoterapi, hipertermi veya kemoradyoterapi gibi yeni tedavi modalitelerinin kullanıma girmesine rağmen ilerlemiş evrelerde mide kanserinin kontrolü zordur (41). Mide kanserli vakaların prognozu başlangıç yaşı, gastrik duvar invazyonu, tümör lokalizasyonu, lenf nodu tutulumu ve sistemik metastaz gibi bazı klinik ve patolojik değişkenlere bağlıdır (58, 60).

Kanser bugün genetik orjinli bir hastalık grubu olarak bilinmektedir. Kanser oluşumu yani karsinogenezis farklı türlerde genlerin etkili olduğu çok aşamalı bir süreçtir. Kanserde etkili olduğu düşünülen genler; onkogenler, tümör süpresör genler ve DNA tamir genleri olarak 3 ana grup altında toplanırlar (25).

Gen ve genom mutasyonları kanser gelişiminde etkili olan genleri içerdiğinde (kromozom ve/veya gen delesyonları, amplifikasyonları, yapısal değişimler vb.) gen ürününün az ya da çok sentezlenmesi ya da farklı ürünün sentezlenmesine neden olmaktadır ki, bu değişimler de sellüler fonksiyonlarda bozulmalara yol açmaktadır.

Epidermal büyüme faktörü reseptörleri, sinyal yollarının aktivasyonunu sağlayan, aktive olduklarında hücre proliferasyonunu, diferansiyasyonunu ve programlı hücre ölümünü gerçekleştiren; normal gelişim sürecinde rol oynamakla beraber, birçoğunu kanserin teşkil ettiği birçok hastalıkta aktivasyonları veya aşırı ekspresyonları

gösterilmiş, tirozin kinaz reseptörleri ailesine mensup bir transmembranik reseptör ailesidir (45). EGFR ve HER-2/neu epidermal büyüme faktörü reseptörünün üyeleridir.

Son yıllarda kanserin etyolojisine ve tedavisine yönelik yapılan çalışmalarda en çok araştırılan konu başlıklarından biri epidermal büyüme faktörü reseptörleridir. Meme kanserinde HER-2/neu amplifikasyonu saptanan hastalarda herceptin isimli monoklonal anti HER-2/neu antikoru ajanla yüz güldürücü sonuçların alınmasının ardından, bu ilacın rutin kullanıma girmesiyle epidermal büyüme faktörü reseptörleri ile ilgili çalışmalar daha da hız kazanmıştır. EGFR inhibitörleri olan gefitinib ve erlotinib ile ilgili çalışmalar da birçok kanser türü için devam etmektedir. EGFR 7. kromozomun 7p12 bölgesinde, HER-2/neu 17. Kromozomun 17q12-q21 bölgesinde lokalizedir. Topoizomeraz II A geni (TOP2A) ise 17.kromozomun 17q12-q21 bölgesinde HER-2/neu onkogeni ile aynı amplikondadır. Anti-kanser ilaçlarının spesifik bir sınıfı olan antrasiklin için TOP2A hedef enzimdir. Yapılan çalışmalarda HER-2/neu ve TOP2A'nın beraber amplifikasyonunu birçok kanser tipinde antrasiklin terapisine duyarlılığı ile ilişkilendirilmiştir. EGFR ve TOP2A arasındaki ilişki henüz yayınlanmamıştır (47).

Yaptığımız çalışmada,

1. Mide kanserli dokularda EGFR, HER-2/neu ve TOP2A onkogenlerinin FISH tekniği için dizayn edilmiş sentromer ve lokus spesifik gen bölgelerinin incelenerek saptanan yeniden düzenlenmeler ile hastalığın evresi arasında ilişki kurabilmek,
2. Hastalarımıza ait demografik ve histopatolojik bilgilerle bulduğumuz sonuçlar arasında ilişki saptayabilmek,
3. Türk toplumunda farklı gelişim aşamalarında bulunan mide kanserli hastaların EGFR, HER-2/neu ve TOP2A genlerindeki amplifikasyonlar, 7. ve 17. kromozomlardaki sayısal anomaliler saptanarak mide kanseri için geliştirilecek tedavi yöntemlerine de ışık tutmak amaçlanmıştır.



## **2.GENEL BİLGİLER**

### **2.1.Kanser**

Kanser, hücrenin temel düzenleyici mekanizmalarındaki kusurlardan kaynaklandığı için özellikle moleküler ve hücresel düzeyde değerlendirilmesi gereken bir hastalıktır. Kanser gelişmesine neden olan temel değişiklik kanser hücrelerinin sürekli, kontrolsüz çoğalmasdır. Kanser hücreleri, hücrenin normal davranışlarını kontrol eden sinyallere doğru tepkiyi göstermek yerine kontrolsüz biçimde çoğalmayı ve bölünmeyi sürdürerek, normal doku ve organları da istila eder ve sonunda tüm hücrelere yayılır (25). DSÖ' nün 2003 yılına ait kanser raporunda, dünya çapında kanser oranının hızla arttığı ve 2020 yılında, bu oranın %50 artarak on beş milyon kişiyi etkileyebileceği bildirilmiştir (75).

### **2.2.Kanserin Gelişimi**

Kanser, daha çok bir kitle ya da tümör oluşumuna yol açtığını bildiğimiz kontrolsüz hücre proliferasyonu ile karakterize edilen neoplazinin daha kesin formlarını tanımlamak için kullanılır (53). Neoplazinin sözcük anlamı yeni büyümedir. Willis, neoplaziyi “normal dokuları aşan, onlarla koordine olmayan ve değişime yol açan uyarıyı durduktan sonra bile aynı şekilde aşırı büyümeye devam eden anormal bir doku kütleli” şeklinde tanımlamıştır (43). Neoplazinin kanser olabilmesi için kontrolsüz büyümesi, komşu dokuları istila edebilmesi veya metastaz özelliğine sahip olması gerekmektedir (53). Tüm neoplazilerin kökeninde normal büyüme kontrollerine verilen yanıtın kaybolması bulunur. Neoplazmlar genel olarak “tümör” adıyla bilinir. Tümörlerle ilgilenen bilim dalı ise “onkoloji” adıyla anılır (43). Onkolojide neoplazmların benign ve malign kategorilere ayrılması çok önemlidir. Bu sınıflandırma neoplazmin potansiyel klinik davranışının değerlendirilmesine dayanır (14). Benign tümörler, çevresindeki doku ve organlara yayılmazken, malign tümörler hem çevredeki doku ve organlara hem de vücudun diğer bölgelerine yayılmaktadırlar (25).

Orijin alan hücre tipine göre kanserler üç gruba ayrılır:

- 1- Karsinomlar
- 2- Sarkomlar
- 3- Hematopoetik

### **2.3.Kanser ve Genetik**

Kanser, basit bir ifadeyle kontrolsüz hücre çoğalması olarak tanımlanabilir. “Kontrolsüz çoğalma”, esas özellik olmakla birlikte, kanser hücresinin başka biyolojik karakteristikleri de vardır. Bunlar arasında hücre kültürlerinde kontakt inhibisyonundan kaçabilme, bölünebilmek için dış uyarılara (sinyallere) gereksinim göstermeme, çoğalmayı baskılayıcı sinyallere duyarsızlık, apoptozisten kaçabilme, anjiyogenezi uyarabilme ve metastaz yapabilme sayılabilir (23). Başlangıçta “normal” olan bir hücrenin içinden çıktığı organizmanın ölümüne yol açabilecek bu olumsuz özellikleri sonradan nasıl edindiği, bir başka deyişle “onkogenez” ya da “karsinogenez” olarak adlandırılan bu süreçte hangi mekanizmaların rol oynadığı ancak yakın zamanlarda ve kısmen anlaşılabilmiştir. Buna göre onkogenez, genetik değişiklikler; yani mutasyonlar üzerinden gelişen bir süreçtir. Son yıllarda epigenetik değişikliklerin de hücrenin malign karakter kazanmasında önemli rol oynadığı anlaşılmıştır.

Hücrenin 3 temel yaşam fonksiyonu olan büyüme, bölünme ve ölüm çeşitli genler tarafından kontrol edilir. Yapılan son araştırmalarda yoğun olarak hücre proliferasyonunun ve apoptozisinin kontrolünden sorumlu genlerin mutasyonlarının kansere neden olduğu gösterilmiştir. Kanser başlangıcında farklı kanser türlerinde farklı genlerin varlığı bildirilmektedir. Bu grupta yer alan genler:

- Mitotik döngü düzenleyicilerini kodlayan genler
- Programlanmış hücre ölümü elemanlarını kodlayan genler
- Kontakt inhibisyon oluşumunda etkili olan elemanları kodlayan genler
- Hasarlı DNA'nın tamirinden sorumlu proteinleri kodlayan genler (53).

Oluşum mekanizması ne olursa olsun, kanser oluşumu bir kez başladığında, sitogenetik yapının korunmasından ve DNA' da oluşabilecek hasarı tamirden sorumlu hücrel mekanizmaları kodlayan genlerdeki mutasyonlar kümülatif olarak bir artış göstererek kanseri yaygınlaştırırlar (56).

#### **2.4 .Kanser Oluşumundan Sorumlu Genler ve Fonksiyonları**

Karsinogenezisin meydana gelmesinde sürekli değişime uğrayan 100'ün üzerinde gen tanımlanmıştır. Ancak keşfedilmeyi bekleyen daha pek çok sayıda gen olduğu apaçık ortadadır (1).

Hücrelerin poliferasyonunu, farklılaşmasını ve sağ kalımını denetleyen genlerde gerçekleşen değişimler kanserin oluşumuna neden olur (5). Kanser oluşumunda etkili olan genler;

- 1-Tümör süpresör genler
- 2- DNA tamir genleri
- 3-**Onkogenlerdir** (1,76,77).

Kanser hücrelerinin tipik kontrolsüz çoğalma isteği ve invaze olabilme yeteneği yukarıda gruplanan genlerde ve onların sahip oldukları mekanizmalarda ortaya çıkan bozulmalardan dolayıdır (25). Bu genler normal bir hücrenin programlanmış hücre ölümünün ve hücre döngüsünün kontrol yolunda bulunmaktadırlar. Karsinojenik mutasyonlarda çoğunlukla kontrol yolunda bulunan genleri etkileyebilmektedir. Normal regülatör gen ürünleri, hücre sayısının artırılması ya da hücre sayısı artışının inhibe edilmesine göre gruplandırılır (1,70).

Tümör süpresör genler hücre çoğalmasını inhibe eder. Bu genlerin her iki allelinin de değişimi söz konusu olup, bu genlerdeki değişimler resesif özellik gösterir.

DNA tamir genleri yanlış eşleşme tamiri, nükleotit eksizyon tamiri ve baz eksizyon (kesip çıkarma) tamiri genlerini içerir. Bunlar dışında, kromozomal

segregasyon ve mitotik rekombinasyon gibi büyük kromozom parçalarını ilgilendiren kontrol sürecinde de yer alır.

Onkogenler hücre proliferasyonunun normal olarak aktivasyonunu yönetir. Bu genlerin tek bir allelindeki mutasyon hücre fenotipinin değişmesi için yeterli olup bu genlerdeki değişimler dominant özellik gösterir. Onkogenler mutasyon taşımayan normal hücrede ise proto-onkogen adını alır (70).

#### **2.4.1. Onkogenlerin protein ürünleri**

Onkogenler ve bunların ürünü olan onkoproteinler uyarı ileti akışları üzerindeki rollerine göre 5 ana başlıkta sınıflandırılabilir (25).

- a) Büyüme faktörleri
- b) Büyüme faktörü reseptörleri
- c) Sinyal ileten proteinler
- d) Nükleustaki düzenleyici faktörler
- e) Mitokondriyal onkogenler

#### **2.4.2. Onkogenlerin aktivasyonları**

Protoonkogenlerdeki değişimler onkogenlerin aktivasyonunu etkiler. Bu genetik değişimler hücreye bir büyüme avantajı sağlar. İnsan neoplazmilerinde bulunan onkogenler üç genetik mekanizma ile aktive olur.

1. Delesyonlar ve nokta mutasyonları,
2. Kromozom yeniden düzenlenmeleri,
3. Gen amplifikasyonları.

Bu mekanizmalar protoonkogen yapısında farklılıklar yaratabileceği gibi ifadelerinde de artışlara neden olabilir. Çünkü neoplazi çok aşamalı bir süreçtir. Mekanizmalardaki bir ya da birden fazla değişiklik, kanserle ilişkili genlerin sayısındaki değişmelere ve bu şekilde tümörlerin gelişimine neden olur. Neoplastik fenotipin tamamen aktarımı metastaz kapasitesiyle ilişkilidir. Genellikle bu tablo protoonkogen aktivasyonu ve tümör süpresör genlerin inaktivasyonu ile birlikte gerçekleşmesiyle oluşur (42).

Delesyonlar ve nokta mutasyonları, protoonkogenlerden onkogen oluşmasına sebep olan değişimlerden biridir. Retroviral onkogenlerin sahip olduğu delesyonların aktif hale gelmesine neden olur. Örnek olarak Met, trk, kit, ve erb-B onkogenlerinin amino uçlarında bulunan ligand bağlanma domainlerindeki delesyonları gösterilebilir. Birçok kanser türünde kromozom yapısında translokasyon, duplikasyon ve delesyon gibi anormallikler de görülür. Kromozom translokasyonlarından kaynaklanan gen düzenlenmeleri, çoğunlukla onkogenlerin ortaya çıkmasına yol açar. Solid tümörlerde görülen kromozom yeniden düzenlenmeleri içinde yer alan kromozom translokasyonları çoğunlukla lösemi ve lenfomalarda bulunmaktadır (1,53,65).

B lenfositlerin tümörü olan insan Burkitt lenfoması ve fare plazmasitomlarında ilk kez kromozom translokasyonu sonucu oluşan onkogen aktivasyonu c- myc geninde gözlemlenmiştir (13,22,53). C-myc geni, büyüme faktör uyarısı ile aktif hale geçen bir transkripsiyon faktörüdür ve kontrolsüz ürün oluşturması hücre proliferasyonunu yönlendirir, böylece tümör gelişimi gerçekleşir (53).

Genlerin protein kodlayan bölgesinde bazı protoonkogenlerin translokasyonu değişikliklere neden olarak, anormal gen ürünlerinin ortaya çıkmasını sağlar. Buna en tipik örnek; kronik myeloid lösemide, kromozom 9q2'da lokalize olan abl protoonkogenin kromozom 22q da lokalize bcr geni ile translokasyonudur (1,13,53). Bu translokasyon sonucunda bcr/abl füzyon proteini sentezlenir (24,18). Abl protoonkogeni onkogenik aktivite kazanmıştır (1,13,79,76).

İnsan tümörlerinde onkogenlerin aktive olmasında diğerk bir mekanizma da, genlerin fazla sayıda ekspresyonuna neden olan gen amplifikasyonudur. Gen amplifikasyonu genomik DNA'nın gereğinden fazla replike olması sebebiyle ortaya çıkar ve genellikle homojen olarak boya alan bölgeler (HSR'ler) veya double-minute kromozomlar (DM) olarak ifade edilen karyotipik bozukluklara sebep olur (42,57).

DM'ler sentromer içinde yer alan mini kromozom yapıları ile karakterizedir. HSR'ler ise kromozom üzerinde koyu ve açık renkte boyanan bantların normal görüntünün dışına çıkılması ile ortaya çıkan kromozom segmentleridir. DM'ler ve HSR'ler genin birkaç binden fazla kopya sayısında genomik DNA bölgeleri içerdiğini gösterir. Amplifikasyon hücre büyümesi için seçici bir avantaj sağlayarak genlerin ekspresyonunun artmasına yol açar (42,57).

Gen amplifikasyonu, normal hücrelere göre tümör hücrelerinde daha sık gözlenir. Pek çok tümörün prognozunda, onkogen amplifikasyonları rol oynar. Tümörün hızlı gelişimine ve malign yapısının artmasına neden olurlar. Bu gruba en iyi örnek nöroblastomda N-myc; meme ve over karsinomlarında ise erbB-2 onkogen amplifikasyonlarıdır. Amplifiye N-myc kopyaları hızla gelişen agresif tümörlerde sıklıkla gözlenir ki bu da N-myc'in nöroblastomanın malign özelliğinin artmasında önemli bir rolü olduğunu ifade eder (1,53). Ayrıca Ras gen ailesi üyeleri içinde yer alan K-ras ve N-ras çeşitli karsinomlarda sporadik olarak amplifiye olurlar (42).

Son yıllarda kanser tedavisinde tirozin kinaz inhibitörlerinin kullanıma girmesi ve kısmen başarılı sonuçların elde edilmesi ile onkogenlerle ilgili araştırmalar daha çok hücre yüzey reseptörlerinin daha iyi anlaşılmasına doğru kaymıştır. Bu doğrultuda hücre yüzey reseptörlerinin yapılarının, çeşitlerinin ve fonksiyonlarının kanser ve kanser tedavisi ile ilgili kişilerce daha iyi irdelenmesi gereği doğmuştur.

## **2.5. Hücre yüzey reseptörleri**

Hücrelerin tümü buldukları ortamdan sinyaller alırlar ve bu sinyallere yanıt verirler. Hücreler arası sinyal iletimi, bir hücrenin yüzeyinde eksprese edilen veya

salgılanan sinyal iletim moleküllerinin, bir diğer hücrede eksprese olan reseptörlere bağlanması ile gerçekleştirilir. Birçok sinyal iletim molekülünün reseptörlerine bağlanması ile, hücrenin metabolizmasını, sağ kalımını çoğalmasını ve farklılaşmasını içeren, hücre davranışlarını düzenleyen bir seri hücre içi reaksiyon başlar.

Hücreler arası bilgi iletimini, birçok farklı tipte molekül sağlar. Reseptörler hücreler tarafından eksprese edilse de yapı ve fonksiyon açısından farklılıklar gösterirler. Sinyal iletimi moleküllerinin de hedef hücrelerdeki etki yolları birbirinden farklıdır. Bazı sinyal iletim molekülleri plazma zarından kolaylıkla geçebilirler ve sitoplazmadaki veya nükleustaki hücre içi reseptörlerine bağlanabilirler. Bazı reseptörler de hedef hücre yüzeyinde bulunur.

Hücre sinyal iletimi, ya bir hücrenin komşusu ile doğrudan etkileşimi ya da salgılanan sinyal iletim molekülleri ile gerçekleşir. Bunlar dışında hücrelerde komşu hücrelerin yüzeyindeki sinyal iletim molekülleriyle etkileşime giren çeşitli hücre yüzey reseptörlerine de sahiptirler (1,43).

### **2.5.1. Epidermal büyüme faktörü reseptörleri**

Epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR, ErbB-1, HER-1) ilk keşfedilen reseptör tirozin kinazdır. Hücre içi sinyal yollarının aktivasyonundan sorumlu mekanizmaların birçoğu EGFR ile yapılan çalışmalarda ortaya konmuştur. EGFR' nin belirlenmesinin ardından aynı reseptör ailesinin üç üyesi daha bulunmuştur. Bunlar, ErbB-2(HER-2/neu), ErbB-3(HER-3), ErbB-4(HER-4)' dür (28).

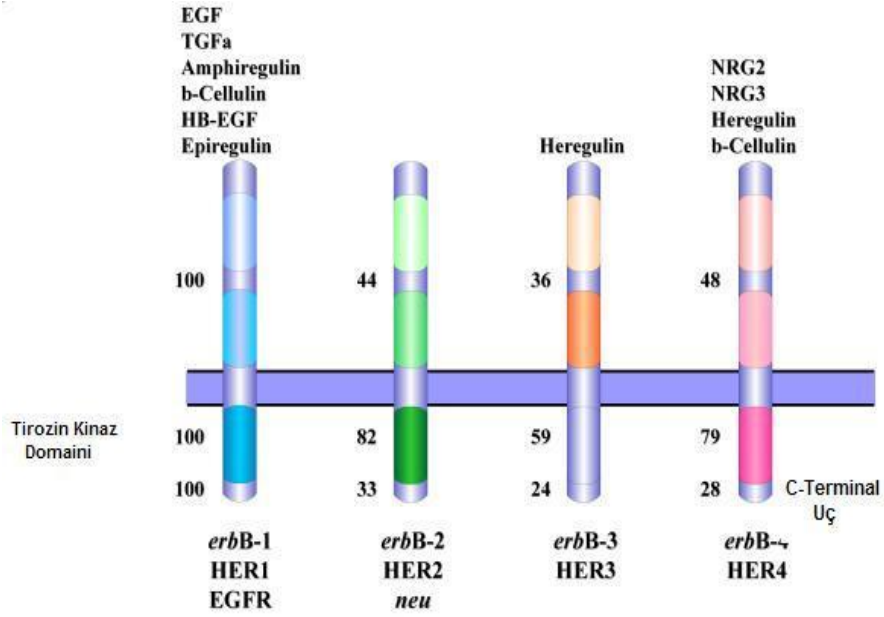
Tirozin kinaz aktivitesine sahip olan EGFR bir transmembran proteindir ve hücre dışı sinyalleri hücre içine iletir. EGFR ailesi, sinyal yollarının aktivasyonunun kontrolünde görev alan, normal gelişim sürecinde rol oynamakla beraber, kanserde aktivasyonlarının veya aşırı ekspresyonlarının ilişkisi tespit edilmiştir. EGFR ailesi üyelerine homodimerizasyon veya heterodimerizasyon ile bağlanarak, onların aktivasyonunu sağlayan EGF, transforme edici büyüme faktörü(TGF- $\alpha$ ), heparin bağlayıcı EGF(HB-EGF), amfiregulin(AR), betaselulin(BTC), epiregulin(EPR), neu

diferansiyasyon faktörü(NDF, heregulin) ve epigen gibi farklı ligandları vardır. Örneğin HER-1 ve HER-4, kendi ligandları olan HB-EGF, EPR' ye bağlanarak aktive olurlar (36,61).

Yapılan çalışmalarda HER-2/neu' nin bilinen hiçbir liganda bağlanmadığı ortaya çıkmış, bu gelişme de bilim dünyasında büyük merak uyandırmıştır. Bu yüzden literatürde en sık incelenen HER-2/neu olmuştur. Bu çalışmalarda HER-2/neu'nin memeli hücrelerinde tirozin fosforilasyonunu uyarın, 44 kD'luk bir glikoprotein olan neu diferansiyasyon faktör (NDF, heregulin) bulunmuştur. Önceleri NDF'nin HER-2/neu' nin spesifik ligandı olduğu düşünülürken sonraki çalışmalarda overyan ve fibroblast hücre serilerinde NDF'nin HER-2/neu ile hiç bağlanmadığı ortaya konmuştur. Ancak NDF varlığında NDF'nin çeşitli izoformlarına bağlı olarak HER-2/neu' nin EGFR, HER-3 ve HER-4 ile heterodimer oluşturarak NDF'nin bağlanmasına olanak sağladığı ve çeşitli hücre içi cevapların meydana getirildiği gösterilmiştir (36,61).

Bu gelişmeden sonra EGFR ailesindeki reseptörlerin heterodimer oluşturma özellikleri incelenmiş ve BTC ligandı ile ilgili de benzer bulgular ortaya konmuştur. BTC HER-4'ü tek başına uyarabildiği gibi bazı durumlarda HER-4'ün diğer üç reseptör ile dimer oluşturmuş halini de uyarabilir. Değişik büyüme faktörlerinin değişik reseptör kombinasyonları ile uyarılmaları arasındaki farklılıkların insan dokularındaki proliferasyon ve diferansiyasyonun anlaşılmasında çok önemli bir rolü olduğu düşünülmektedir (10,28,30,36,52,61).





**Şekil 2.1** EGF reseptör ailesi ve ligandları

([http://www.cancerpublications.com/newsletter/hematological/amger\\_slide/article1/2](http://www.cancerpublications.com/newsletter/hematological/amger_slide/article1/2))

**Epidermal büyüme faktör reseptörlerinin yapısı:** EGFR geni, insanda 7. kromozomun 7p11.2 bölgesinde lokalizedir. Gen içinde 28 ekzon içerip, 170 kDA' luk glikoprotein kodlar. HER-2/neu geni, 17. kromozomun 17q11-q21 bölgesinde lokalizedir. 27 ekzon içerir ve 185 kDA' luk transmembran bir glikoproteini kodlar. EGFR ailesi üyeleri üç önemli fonksiyonel domaine sahiptir:

- Hücre dışında ligandların bağlandığı bir domain,
- Hidrofobik transmembran bir domain,
- Hücre içinde yer alan sitoplazmik bir tirozin kinaz domaini (28,74).

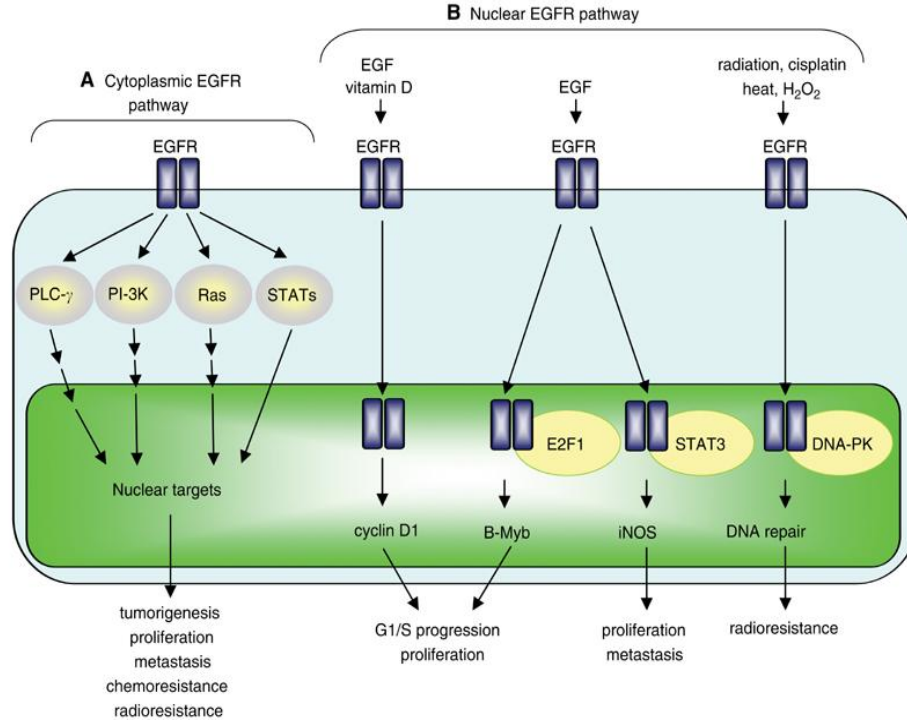
**Epidermal büyüme faktör reseptörleri sinyal yolları:** Hücre dışından gelen sinyallerin hücre içinde uygun hedeflere iletilmesi için birçok sinyal iletim yolu vardır. Reseptör tirozin kinazlar grubunda yer alan Erb-1 ve Erb-2 reseptörlerinin aldığı sinyallerin hücre içinde takip edeceği 3 yol vardır:

**RAS/ERK yolu:** Grb2 veya Shc proteinlerinin fosforile olmuş ErbB resptörlerine bağlanmasıyla ERK yolağı aktive olmuştur. SOS (Son of sevenless) aktive olmuş resptör dimerine bağlanır. SOS daha sonra Ras'ı aktive ederek Raf-1'in de aktive olmasına sebep olur. Raf-1, MEK1 ve MEK2'yi fosforile eder. Daha sonra MEK1, ERK1'i MEK2 de ERK2'yi aktive eder. Bu yolak hücre proliferasyonu, apoptozis protein inhibitörünün ve Bcl-2 ailesi üyelerinin artan transkripsiyonu ile sonuçlanır. Böylece hücre devamlılığı sağlanır (1).

**PI3 kinaz/AKT (PI-3 kinaz/protein kinaz B) yolu:** EGF önceki yol yanında bu sinyal yolunun aktivasyonu aracılığıyla hücre devamlılığını sağlar. EGF, aktive olan EGFR ailesi reseptörüne PI-3 kinazın bağlanmasını tetikler. Bu olay PI-3' deki domainin fosforile olmuş tirozinlere bağlanması ile gerçekleşir. PI-3 kinazın katalitik alt birimi fosfotidilinozitol(4,5) bifosfatı fosforile ederek PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>' ün oluşmasına yol açar. PI-3 kinaz aynı zamanda Ras' ı da aktive edebilir. Bu, ERK sinyal yolağının aktivasyonu ile hayatta kalım yolları arasındaki iletişimi gerçekleştirir. PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>'ün temel efektörü AKT'tir. AKT, anti-apoptotik proteinlerin transkripsiyonu ile hücre devamlılığını sağlar (1).

**JAK/STAT yolu:** Diğer bir sinyal yolağı EGF ile başlayan JAK/STAT yolağıdır. Bu yolak hücre devamlılığının yanıtlanmasında görev alır. JAK, plazma membranında yer alan STAT proteinlerini fosforile eder. Bu da STAT proteinlerinin nükleusa geçmesine yol açar. Burada STAT proteinleri hücre devamlılığı ile ilişkili genlerin transkripsiyonunu aktive eder (1).

Bu yollar doğrudan hücre-hücre etkileşimi aracılığı ile sinyal iletimi, embriyo gelişim sırasında ve erişkin dokuların devamlılığının sağlanmasında görev alan farklı hücre tipleri arasındaki birçok etkileşimin düzenlenmesinde kritik rol oynar (1).



**ŞEKİL 2.2** EGFR ailesi sinyal yolları

([www.nature.com/bjc/journal/v94/n2/images/6602941F1.jpg](http://www.nature.com/bjc/journal/v94/n2/images/6602941F1.jpg))

### 2.5.2. Epidermal büyüme faktör reseptör inhibitörleri

Epidermal büyüme faktörü reseptörlerinin tümör gelişimindeki rolü göz önüne alınarak, son yıllarda Epidermal büyüme faktörü reseptörleri aktivasyonunu ve fonksiyonunu bloke eden çeşitli ajanlar geliştirilmiştir. Gefitinib ve erlotinib klinik yollarla test edilen ilk tirozin kinaz inhibitörleridir. Lapatinib, EKB-596, CI-1033, PKI-166 ve AEE-788'in de yer aldığı diğer inhibitörler henüz araştırılmaktadır. Oral yolla aktif olan gefitinib ve erlotinibin çeşitli kanser türlerinde aşırı eksprese olan EGFR' yi inhibe ettiği gösterilmiştir. Epidermal büyüme faktörü reseptörleri inhibitörü ajanlar KHOAK'de yüksek oranda eksprese edilen epidermal büyüme faktörü reseptörlerinin bloke edilmesi, tirozin kinaz aktivitesinin inhibe edilmesi ve sonuçta hücre aktivasyonu ve proliferasyonunun inhibisyonuna neden olur. Gefitinib (ZD1839, İressa) ve Erlotinib (OSİ-774, Tarceva) daha önce kemoterapi ile tedavi edilen hastalarda yoğun olarak kullanılan ve araştırılan ajanlardır. Yapılan faz III çalışmalarda platin temelli kombine

kemoterapilere eklenmeleri ile istenen düzeyde sağ kalım avantajı sağlanamamıştır. Ancak seçilmiş hastalarda daha etkin olabilecekleri belirtilmektedir. Bu amaçla HER-2/neu amplifikasyonunu belirlemede geliştirilen Herceptest isimli immünohistokimyasal yönteme dayanan test, FISH yöntemi ile doğrulanmış ve etken maddesi trastuzumab olan herceptin isimli ilacın kullanılmasının uygun olacağı hastaların belirlenmesinde etkili bir yöntem olduğu saptanmıştır (15,27,66).

EGFR'ye karşı geliştirilmiş monoklonal antikordardan Cetuximab(IMC-C225,Erbıtux) ve HER-2/neu 'ye karşı geliştirilmiş monoklonal antikordardan Trastuzumab (Herceptin) ile çalışmalar devam etmektedir (15,27,66).

## **2.6. Topoizomerazlar**

Replikasyona yardımcı proteinlerin diğer gruplarını oluştururlar. DNA iplikleri açılırken replikasyon çatalı önündeki DNA dönmeye zorlanır. Bu şekildeki bir zorlama halkasal yapıdaki DNA molekülünün kendi üzerine katlanmasına neden olur ve sonuçta replikasyon bloke edilir. Böyle bir problem DNA ipliklerini dönüşümlü olarak kesen ve tekrar bağlayan topoizomerazlar tarafından bertaraf edilir. İki tip topoizomeraz vardır: Tip I; yalnızca tek ipliği keser. Tip II ise her iki iplikte de eşzamanlı kırıklar oluşturur. Oluşturulan geçici kırıklar sayesinde DNA ipliklerinin birbirleri etrafında dönmesi sağlanır ve katlanmaları önlenir. Ökaryotik kromozomlar her ne kadar lineer DNA moleküllerinden oluşmuşlarsa da yine topoizomerazlara ihtiyaç vardır, aksi takdirde sentez süresince kromozomun tamamının devamlı olarak dönmesi gerekecektir (48). Tip II topoizomeraz sadece DNA'nın açılması için değil, aynı zamanda, birbirinin içine geçmiş olan yeni sentezlenmiş çembersel DNA moleküllerinin birbirinden ayrılması için de gereklidir (25). Tip II topoizomerazın iki isoformu vardır.  $\alpha$  ve  $\beta$  isoformlarından  $\alpha$  isoformunun (TOP2A) fonksiyonu mayoz ve mitozdan önce birbirine sarılmış halde olan DNA ipliklerini ayırmaktır (48).

Topoizomeraz II A 17.kromozomun 17q12-q21 bölgesinde HER-2/neu onkogeninin hemen yanındadır. Anti-kanser ilaçlarının spesifik bir sınıfı olan antrasiklin için TOP2A hedef enzimdir. Çalışmalar HER-2/neu ve TOP2A'nın beraber amplifikasyonunu birçok

kanser tipinde antrasiklin terapisine duyarlılığı ile ilişkilendirmiştir. EGFR ve TOP2A arasındaki ilişki henüz yayınlanmamıştır (32,49).

## **2.7.Mide Kanseri**

### **2.7.1.Midenin Embriyolojisi ve Postnatal Gelişimi**

Mide özefagusu kaudal barsağın fuziform (iğsi) bir dilatasyonu gibi gelişir (16). Embriyo gelişiminin 4. haftasında, 7 mm iken, ön barsağın fusiform genişlemesi şeklinde mide belirir (16,63). Mide endodermden gelişir ve mukozanın erken glandüler differansiasyonu fetus boyu 80 mm'ye ulaştığında oluşur. Enzim ve asit üretimi ilk olarak fetal hayatın 4. ayında oluşur. Yenidoğanda mide tamamen gelişmiştir ve erişkininkine benzer (16).

### **2.7.2. Midenin Anatomisi**

Sindirim kanalının en geniş yeri olan mide, özofagus ile duodenum arasında, abdomenin epigastrium ve sol hipogastrium bölgelerinde yer alır (2,20). Boş mide, fundusunun çıkıntısı hariç, hemen hemen tubuler veya J şeklindedir (16,20). Mide; kardiya, fundus, korpus ve pilor olmak üzere dört anatomik bölgeye ayrılır. Midenin superomedial sınırı küçük kurvatur, inferolateral sınırı büyük kurvaturdur. Kardia gastroözofageal bileşkenin 1–3 cm yakınındaki bölgedir (16). Fundus gastroözofageal birleşim düzeyinin yukarısında yer alır, havayla doludur ve diafragma ile komşuluk gösterir (2,20). Korpus midenin en büyük bölümüdür, insisura angularise kadar uzanır. Fundus ile korpus arasında belirgin bir sınır bulunmaz. Distal olarak yer alan pilor antrum, pilor kanalı ve pilor sfinkteri olmak üzere 3 bölgeye ayrılır (20). Antrum geniş, pilor kanalı ise 1–2 cm uzunluğunda dar bir kanaldır. Pilor sfinkteri ise gerçek bir sfinkter olmayıp düz kastan yapılmıştır. Boş midenin mukozasında plica gastrika denilen kalın plikalar vardır. Bunlar genellikle midenin uzun eksenine paralel olarak uzanırlar (2). Organ dolarak genişlediği zaman plikalar düzleşirler (2,16). Fundus ve korpus mukozasında plikalar özellikle büyük kurvaturda daha belirginken antrumda

plikalar düzleşirler (2,8,16). Plikalar histolojik olarak mukoza, muskularis mukoza ve submukozanın bir kısmını içerir.

### **2.7.3.Midenin Histolojisi**

Mide duvarı tüm sindirim kanalının karakteristiği olan 4 genel katman sergiler: Mukoza, submukoza, muskularis propria veya eksterna, seroza.

**Mukoza:** Mide mukozası üç tabaka içerir: Yüzey epiteli, lamina propria, muskularis mukoza.

**Submukoza:** Muskularis mukoza ve muskularis propria arasında lokalize olmuş, gastrik rugaların merkezleri formundadır. Çoğu elastik lifler bulunduran gevşek konnektif doku içerir. Venler, arterler, lenfatikler ve Meissner'in otonomik sinir pleksusu burada bulunur (16,62).

**Muskularis Eksterna:** Her biri farklı planlarda yerleşmiş, düz kasın 3 tabakasını içerir. En iç oblik tabaka kesintili bir tabakadır ve her kesitte görülmeyebilir. Ortada sirküler ve en dışta da longitudinal düz kas tabakası vardır. Sirküler ve longitudinal tabaka arasında myenterik (auerbach's) sinir pleksusu mevcuttur (16,62).

**Seroza:** Mide duvarının en dışında bulunan bağ dokusunun ince bir tabakasıdır (8). Peritonla devam eden bir mezotel ile döşelidir (8,62).

### **2.8.Mide Tümörleri**

Mide tümörleri malign ya da benign olabilir. Bu tümörler histopatolojik özelliklerine dayanılarak sınıflanabilir.

**Tablo 2.1. Mide Tümörleri (DSÖ 2000)**

<b>EPİTELYAL TÜMÖRLER</b>	<b>NONEPİTELYAL TÜMÖRLER</b>
İntraepitelyal Neoplazi-Adenom	Leiomyom
Karsinom	Schwannom
Adenokarsinom İntestinal tip, Diffüz tip	Granüler hücreli tümör
Papiller adenokarsinom	Leiomyosarkom
Tubuler adenokarsinom	Glomus tümör
Müsinöz adenokarsinom	Gastrointestinal stromal tümör
Taşlı yüzük hücreli karsinom	Kaposi sarkom
Adenoskuamöz karsinom	Diğerleri
Skvamöz hücreli karsinom	Malign lenfomalar:
Küçük hücreli karsinom	Marjinal zon B hücreli lenfoma
İndiferansiye karsinom	Mantle hücreli lenfoma

Mide malign tümörlerinin yaklaşık %90 kadarı adenokarsinomlardır. Non-Hodgkin lenfomalar ve leiomyosarkomlar geri kalan %10'luk dilimi oluşturur (11,35).

### **2.8.1.DSÖ Klasifikasyonu ( 2000 )**

Histolojik değişkenliklerine rağmen genellikle dört paternden biri baskındır. Tanı baskın histolojik patern üzerine temellenmiştir (21).

**Tubuler Adenokarsinom:** Bunlar önemli oranda dilate, yarık benzeri ve değişen çaplarda dallanan tubuller içerir; Asiner yapılar da bulunabilir. Tek tek tümör hücreleri intralüminal müsinli kolumnar, küboidal veya yassılaştırılmıştır. Berrak hücreler de bulunabilir. Sitolojik atipinin derecesi düşükten yükseğe değişir. Az differansiye bir varyant bazen solid karsinom gibi adlandırılmıştır. Lenfoid stroması göze çarpan tümörler, bazen medüller karsinom veya lenfoid stromalı karsinomlar diye adlandırılmıştır. Desmoplazinin derecesi değişir ve belli belirsiz olabilir (21).

**Papiller Adenokarsinom:** Bunlar fibrovasküler bağ dokusu korları ile desteklenmiş silindirik veya küboidal hücreler ile sınırlanmış uzamış parmak benzeri uzantılar ile iyi differansiye olmuş eksofitik karsinomlardır. Hücreler polaritelerini korumaya eğilimlidir. Bazı tümörler tübüler differansiasyon ( papillotübüler ) gösterir. Seyrekçe bir mikropapiller arşitektür bulunur. Sellüler atipinin derecesi ve mitotik indeks değişir; Şiddetli nükleer atipi olabilir. Tutulan tümör kenarı, çevre yapılardan genellikle keskince sınırlanmıştır. Tümör akut ve kronik inflamatuar hücreler ile infiltre olmuş olabilir (21).

**Müsinöz Adenokarsinom:** Tümörün % 50'sinden fazlasında ekstrasellüler müsin gölcükleri bulunuyorsa tanımlanır. İki major büyüme paterni: 1-İntertisyel müsin ile beraber mukus sekrete eden kolumnar bir epitelyum ile sınırlanmış glandlar, 2-Müsinöz göllerde serbestçe yüzen zincirler veya irregüler hücre kümeleri. İnterglandüler stromada da müsin olabilir. Müsinöz adenokarsinomların derecelendirilmesi (grade) sadece birkaç hücreyi içeren tümörlerde güvenilir değildir. Müsin üreten terimi bu kontekste müsinöz ile sinonim tutulmamıştır (21).

**Taşlı Yüzük Hücreli Karsinom:** Tümörün % 50'sinden fazlası intrastoplazmik müsin içeren malign hücrelerin izole ve küçük gruplarını içerir. Yüzeysel olarak hücreler pit ve glandlar arasında uzaklara genişleyen, lamina propriada saçılarak uzanırlar (21).

### **2.8.1.1 Adenokarsinom**

#### **2.8.1.1.1. Adenokarsinomların Epidemiyolojisi**

Midenin adenokarsinomu dünyanın en yaygın tümörlerinden biridir (46). Görülüş sıklığı bölgeden bölgeye büyük oranda değişir; Özellikle Japonya, Şili, Finlandiya, Kostarika, Kolombiya, Portekiz, Rusya ve Bulgaristan gibi ülkelerde özellikle yüksek sıklığa sahiptir. A.B.D, İngiltere, Kanada, Avustralya, Yeni Zelanda, Fransa ve İsveç'te 4-6 kat daha az yaygındır (14). Birleşik Devletler'de 1930'dan



1985'e gastrik karsinom insidansı dramatik olarak azalmış ve şimdiye kadar sabit kalmıştır. Son birkaç dekatta gastrik karsinomda azalma, hemen hemen bütünüyle intestinal tip karsinom insidansındaki azalmaya bağlı olmuştur. Bunun yanısıra diffüz tipin insidansı değişmemiştir (17). İntestinal gastrik karsinomun azalmasında besin koruyucuların kullanımından daha az faydalanılması, soğutma ve taze ürünlerin daha yaygın elde edilebilirliği etkili olmuştur. Gıda koruyucusu olan nitritlerin kullanımı, taze meyve ve sebze elde edilmesindeki yetersizlik nedeniyle oluşan, vitamin C gibi diyet antioksidanlarının yokluğunun midede nitrozo içerikleri gibi karsinojenik maddelerin üretimini artırdığına inanılmıştır. Daha sonra H.Pylori, gastrik kanser arasındaki ilişki üzerine yapılan araştırmalarda İntestinal Tip ile hemen hemen %100'lük ilişki izlenmiş olup, aynı ilişki diffüz tipinde de gözlenmiştir (17) . Gastrik karsinom 40 yaşından daha genç hastalarda yaygın değildir. Yedinci dekatta pik yapmakla beraber, yaşla sıklığı artar (17). İntestinal tip gastrik karsinom 55 yaşlık bir ortalama yaş ve 2/1'lik bir erkek/kadın oranı sergiler. Diffüz gastrik kanser yaklaşık olarak eşit bir kadın/erkek oranına sahiptir ve hafifçe daha genç hastalarda oluşur (14). Japonya'da 1960'dan beri sıklığı azalmıştır. Gastrik karsinom riskli bütün popülasyonda sosyoekonomik seviyenin artması ile risk azalır. Bu mesleki faktörlere ve popülasyonun düşük sosyoekonomik grubunda H.Pylori enfeksiyonunun daha yüksek insidansına bağlı olabilir (17,46).

Japon endoskopi tarama programında vakaların % 40'ından fazlası muskuler duvarın invazyonu öncesinde tanı almıştır. Birleşik devletlerde tanı anında erken gastrik kanser %10'dan daha az oranda tespit edilmektedir. Erken gastrik karsinomların 5 yıllık yaşam şansı % 90'dan fazladır. Japonya'da bu oran daha yüksektir (17,46).

### **2.8.1.1.2.Mide Adenokarsinomlarında Evreleme**

TNM KLASİFİKASYONU (DSÖ-2000) (21,34,44,69)

1-Primer Tümör: Birincil faktör kanserin mide duvarına penetrasyonunun derecesini gösterir.

**X** : Primer tümör değerlendirilemedi

**T0** : Primer tümör mevcut değildir

**Tis**: İn situ Karsinom. Lamina propriaya invazyon göstermeyen intraepitelyal tümör

**T1** :Tümör lamina propria veya submukozada sınırlıdır

**T2** :Tümör muskularis propria veya subserozada sınırlıdır

**T3** :Tümör komşu dokulara ( dalak, transvers kolon, diafragma, pankreas, abdominal duvar, adrenal bez, böbrek, ince barsak, retroperitoneum) invazyon göstermeden serozayı geçmiştir

**T4** :Tümör komşu dokulara invazedir.

2-Nodal Tutulum: Regional lenf nodları: Büyük ve küçük kurvatur boyunca bulunan perigastrik lenf nodları, çölyak, splenik, hepatik, sol gastrik arter boyunca uzanan lenf nodlarıdır. Diğer intraabdominal lenf nodları uzak metastaz olarak kabul edilmiştir.

**NX**: Regional lenf nodu tutulumu değerlendirilemedi.

**N0** : Regional lenf nodu metastazı mevcut değildir.

**N1** : Metastazlı regional lenf nodu sayısı 1-6 arasındadır.

**N2** : Metastazlı regional lenf nodu sayısı 7-15 arasındadır.

**N3** : Metastazlı regional lenf nodu sayısı 15'den fazladır.

3-Uzak Metastaz:

**MX**: Uzak metastaz değerlendirilemedi

**M0** : Uzak metastaz mevcut değildir.

**M1** : Uzak metastaz mevcuttur

Bu bilgilere göre TNM Mide karsinomu evrelemesi şöyle oluşturulmuştur;

**EVRE 0** : Tis N0 M0

**EVRE IIIA**: T2 N2 M0

T3 N1 M0

**EVRE 1A**: T1 N0 M0

T4 N0 M0

**EVRE 1B**: T1 N1 M0

**EVRE IIIB**: T3 N2 M0

**EVRE II** : T1 N2 M0

**EVRE IV** : T4 N1,N2,N3 M0

T2 N1 M0

T1,T2,T3 N3 M0

T3 N0 M0

Herhangi bir T Herhangi bir N M1

## **2.9.Etyopatogenez**

**2.9.1.Çevresel Faktörler:** H.pylori ile infeksiyon, diyet, iyonize radyasyon, alkol kullanımı, pernisiyöz anemi, sigara kullanımı, parsiyel gastrektomi, sosyoekonomik durum

**2.9.2.Kişisel Faktörler:** A kan grubu, pozitif aile hikayesi (19).

## **2.10.Floresan In Situ Hibridizasyon (FISH)**

Moleküler sitogenetik, işaretli DNA' problemleri kullanılarak interfaz veya metafazdaki kromatin ve kromozomların mikroskobik analizi olarak tanımlanabilir. Bu yaklaşım, mitotik hücrelerin standart mikroskobik preparatlarında, denatüre edilmiş kromozomal DNA ile tek dallı DNA dizilerinin (prob) uygun koşullarda birleşebildiğinin gözlenmesi ile ortaya çıkmıştır (4,7).

İn Situ Hibridizasyon (ISH) tekniği spesifik DNA ve RNA sekanslarının doku kesitlerindeki her hücrede, kromozom preparasyonlarında veya interfaz nükleuslarında

morfolojik olarak gösterilmesini ve nükleik asitlerin doğal hücresel ortamlarında incelenmesini sağlayan, doku/hücre arkitektinin bozulmadığı bir tekniktir (4).

Non-İzotopik İn Situ Hibridizasyon (NISH), radyoaktif olmayan bir molekül ile kimyasal olarak modifiye edilen DNA problemlerinin immunolojik veya afinite reaksiyonları ile floresan veya enzimatik olarak görüntülediği bir ISH tekniğidir (4).

FISH ise probun haptenlerle ya da florokromlarla işaretlenip florokrom maddelerle görüntülenmesinden oluşan, floresan veren sinyaller ile değerlendirilmenin yapıldığı bir ISH tekniğidir (4).

İlk kez 1969 yılında Gall ve Pardeu tarafından gerçekleştirilen sitolojik preparatlarda RNA'nın DNA ile hibridizasyonu, işaretlenmiş DNA sekanslarının sitolojik preparatlarda lokalize olduklarını göstermişlerdir. Büyümekte olan hücrelere tritium verilmiş ve işaretli nükleik asitler nükleer emülsiyon aracılığı ile belirlenmiştir (7).

İlk önceleri ISH radyoaktif madde kullanılarak uygulamaya konulmuştur. Radyoaktif maddelerin pahalı olması, yarı ömürleri, özellikle toksik etkisi ve uzaklaştırılması gibi zorluklardan dolayı bu yöntemin ilk dönemlerde kullanım alanı azalmıştır. 1970 lerde gelişen moleküler klonlama teknikleri, 1975 te biotin-avidin sisteminin bulunması, hapten molekülleri ile işaretlenmiş olan problemlerin florokrom enzim veya koloidal altın gibi aracı moleküllerle belirgin hale getirilmesini sağlamıştır. Tekniğin rezolüsyonu ve güvenilirliğini etkilemiştir. Biotinin yanı sıra digoxigenin ve florescein ile işaretleme, farklı florokrom moleküllerin birlikte kullanılması ikili ve üçlü işaretleme için olanak vermiştir. 1986 da non-radyoaktif işaretli problemler kullanılarak FISH yöntemi ortaya çıkmıştır (4).

### **2.10.1. FISH Tekniğinde Kullanılan Problar ve Özellikleri**

FISH tekniğinin uygulamasında en önemli ve ilk basamak prob seçimidir. Kullanılacak probun incelenecek materyale, değerlendirilecek anomali tipine ve bölgesine uygun olması gerekir (3).

Prob; örneklerde aranan genetik materyale (DNA veya RNA) komplementer, radyoaktif veya nonradyoaktif madde ile işaretli DNA veya RNA segmentidir. Probun hangi yöntemle işaretlendiği, uzunluğu, RNA veya DNA kaynaklı olması, tek veya çift sarmallı olması spesifik olmayan sinyalleri arttırabilir (3).

FISH tekniğinde sitogenetik alanda kullanılan başlıca problemler şunlardır;

- Tekrarlayan dizi problemleri (satellit problemler)
- Lokusa özgü problemler
- Tüm kromozomu boyayan problemler
- Banda özgü problemler
- Telomer bölgesine özgü problemler

### **2.10.2. FISH Tekniğinin Temel Mekanizması**

FISH prosedürü 6 aşamada gerçekleştirilir;

1. Preparatların Hazırlanması
2. Preparatların Ön Yıkaması
3. Prob ve Hedef DNA Denatürasyonu
4. Prob ve Hedef DNA Hibridizasyonu
5. Hibridizasyon sonrası Yıkamalar
6. Görüntüleme ve İnceleme

Moleküler hibridizasyona dayalı bütün yöntemlerin (Southern blotting, Northern blotting, PCR, ISH) ana mekanizması iki komplementer daldan çift sarmal yapının oluşmasıdır. DNA-DNA hibridizasyonunda prob ve hedef DNA ların denatürasyonunu takiben oluşan DNA fragment karışımı, tek dal halindeki fragmentlerin tekrar birleşmesini sağlayacak koşullarda gerçekleştirilir (4).

Bu koşullarda etkili olan dört parametre vardır;

1. Isı
2. pH
3. Monovalent katyon konsantrasyonu
4. Organik solvent varlığı

Hibridizasyonda üç temel aşama önemlidir;

- 1-Hedef dizilerin hibridizasyon sırasında geçirgenliklerini korumaları,
- 2-Probla hedefin yüksek etkinlikle birbirlerine bağlanması,
- 3-Hibridizasyonun spesifik aktivitesi yüksek bir reporter ile en az zemin sinyali olacak biçimde en parlak şekilde görüntülenmesidir (4).

Bir hibridizasyon reaksiyonunda tolere edilebilen yanlış eşleşme derecesi 'stringency' olarak ifade edilir. Yüksek stringency koşullarında, sadece hedef sekansla tam homolog olan problemler stabil hibridler oluştururlar. Düşük stringency koşullarında ise prob sadece % 70-90 homoloji gösteren sekanslara bağlanabilir. Bu spesifik olmayan sinyaller, hibridizasyon sonrası yıkamalarda yüksek stringency koşullarının (yüksek ısı + düşük tuz konsantrasyonu) sağlanmasıyla ortamdaki uzaklaştırılır.

FISH sonrası problemlerden elde edilen sinyaller epifloresan mikroskopta incelenirler. Kullanılan florokromların gözlenebilmesi için doğru prob setleri ve uygun filtrelerin seçilmesi gerekmektedir. Birden fazla hedef dizinin görüntülenmesi gerektiğinde doğru filtreler ile yeşil, kırmızı ve mavi florokromlar gözlenebilmektedir (4).

### **3. GEREÇ ve YÖNTEMLER**

#### **3.1. Gereç**

##### **3.1.1. Kullanılan Gereçler**

Buzdolabı (Arçelik 415)

Sensys kamera (Sensys)

Deep-Freeze (Heraeus)

Elektronik terazi (Seuter, Ainworth-AA-250, Setra-M2000L)

Etüv (Friocell MMM Med Center)

Floresan mikroskop (Olympus BX-61)

Image Analyser (Applied Imaging)

Su banyosu (Nüve)

Mikropipet (Eppendorf)

Mikrosantrifüj (Eppendorf Centrifuge 5415)

Vortex (Janke and Kunkel, UF-2)

pH Metre (Jenco)

Pipet uçları

Kronometre

Eppendorf tüpü (1,5 ml lik)

Enjektör

Termometre

Cam kalemi

### **3.1.2. Cam Malzeme**

Beher (500 ml, 1000 ml)  
Erlenmayer (500 ml, 1000 ml)  
Lamel  
Mezür  
Yatay ve dikey Şale

### **3.1.3. Kimyasal Maddeler**

Absolüt Alkol (Merck)  
Antifade (Vector)  
DAPI (Sigma)  
Distile Su  
HC1 (Merck)  
Immersiyon yağı (Merck)  
Sitrik asit (Sigma)  
 $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (Carlo Erba)  
NaCl (Merck)  
NaOH ( Merck )  
Pepsin (Sigma)  
Parafilm  
Rubber Cement (Marabu Fixo gum)  
Tween 20 (Sigma)



### **3.1.4.Kullanılan Problar**

LSI TOP2A spectrum orange/LSI HER-2 spectrum green/Cep 17 spectrum aqua  
Probe Set (Vysis)  
(17q21-q22/17q11.2-q12/17p11.1-q11.1)

LSI EGFR spectrum orange/CEP 7 spectrum green Probe Set (Vysis)  
(7p12/7p11.1-q11.1)

### **3.2.Yöntem**

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Gastroenteroloji Bilim Dalı'ndan ve Genel Cerrahi Anabilim Dalı'ndan gelen mide kanseri tanısı almış 15 olgudan alınan doku örneklerine FISH analizi yapılmıştır.

#### **3.2.1.Materyal Alımı**

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Gastroenteroloji Bilim Dalı'ndan ve Genel Cerrahi Anabilim Dalı'ndan gelen mide kanseri tanısı almış 15 olgudan alınan doku örnekleri Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalına ulaştırılmıştır.

#### **3.2.2.Moleküler Sitogenetik Analiz**

##### **3.2.2.1.Direkt Doku Preparasyonu**

-Transport medium içine konulmuş mide tümörü doku örnekleri birkaç kez transport medium ile yıkanmıştır.

-Daha sonra doku örnekleri steril küçük boy petri kabına aktarılmıştır. Steril makas ve penset yardımıyla mekanik olarak küçük parçalara ayrılmıştır.

-Petriye 37°C'deki 1X Tripsin EDTA solüsyonundan 1 ml eklenerek 30 dk etüvde bekletilmiştir.

-Süre sonunda enzimatik olarak da parçalanmış hücre süspansiyonu cam pipetle ekim tüpüne aktarılıp üzerine 3 ml besi yeri eklenmiştir.

-Prefiksasyon yapıldıktan sonra tüm sıvı pipet ile ortamdaki uzaklaştırılmıştır.

-Ekim tüpüne 4 ml taze hazırlanmış Carnoy fiksatif eklenip santrifüj edilmiştir.

-Fiksatif ortamdaki uzaklaştırılarak iki kez daha fiksatif ile yıkanmıştır.

-Son fiksatif ortamdaki uzaklaştırıldıktan sonra taze hazırlanmış %60'lık asetik asitten 2 ml eklenip 10 dakika kadar bu solüsyonla muamele edilmiştir.

-Süre sonunda parçalanmış dokulardan temiz lamaların üzerine birkaç damla yerleştirilip dokular bir bent pipet tarafından aşağı yukarı hareket ettirilerek yayılmıştır.

-Hazırlanan preparatlar 1 gece oda ısısında bekletilerek hücrelerin yaşlanması sağlanmıştır.

### **3.2.2.2. FISH Tekniğinin Uygulanması**

FISH tekniğinde Rieder ve arkadaşları tarafından geliştirilen protokol uygulanmıştır (59).

## Kullanılan Stok Solüsyonlar

**Tablo3.1.** Carnoy's Fiksatif Solüsyonu

Metanol	3 kısım
Glasiyal Asetik Asit	1 kısım

**Tablo 3.2.** Preparatların Ön Yıkama Solüsyonları

<b><u>20XSSC Solüsyonu</u></b>	
NaCl (3 M)	175,3 gr
Tri Sodyum Sitrata (0,3 M)	88,24 gr
Distile su	1000 ml
<b><u>0,1XSSC Solüsyonu</u></b>	
20XSSC	3 ml
Distile su	597 ml
Tüm solüsyonlar HCl ile pH 7.0 a ayarlanır.	

**Tablo 3.3.** Preparatların Denatürasyon Solüsyonu

<b><u>0,07 M NaOH</u></b>	
1M NaOH	14 ml
Distile su	200 ml

**Tablo 3.4.** Hibridizasyon Sonrası Solüsyonlar

<b><u>1XSSC Solüsyonu</u></b>	
20XSSC	10 ml
Distile su	190 ml

<b><u>2XSSC Solüsyonu</u></b>	
20XSSC	20 ml
Distile su	180 ml

<b><u>2XSSC/Tween-20 Solüsyonu</u></b>	
20XSSC	20 ml
Tween 20	100 µl
Distile su	180 ml

Tüm solüsyonlar HCl ile pH 7.0 a ayarlanır.	
---	--

**Tablo 3.5.** Görüntüleme Sistemleri Solüsyonu

<b><u>DAPI/Antifade Solüsyonu</u></b>	
2XSSC	20 ml
DAPI	100 µl
Distile su	80 ml

### **3.2.2.2.1. Preparatların Ön Yıkaması ve Denatürasyonu**

- Preparatlar 1'er dakika olmak üzere sırasıyla % 100-%70-%50-%30 luk alkol serisinden ve 0.1XSSC solüsyonundan geçirilerek dehidre edilmiştir.
- Dehidratasyon sonrası preparatlar 70 °C deki 2XSSC solüsyonunda 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır.
- İçersinde preparatların bulunduğu 2XSSC solüsyonu içeren şale soğuk su içerisine konulmuş ve solüsyon ısısının 37 °C'ye gelmesi sağlanmıştır.
- Sıcaklığı 37 °C'ye düşen 2XSSC içerisindeki preparatlar oda sıcaklığında bulunan 0.07 M'lık NaOH solüsyonuna alınmış ve 1 dakika bekletilerek denatüre edilmiştir.
- Denatürasyonu takiben oda sıcaklığında bulunan 0,1XSSC ve ardından +4 °C'de olan 0,1XSSC ve 2XSSC solüsyonlarında 1'er dakika bekletilerek dehidratasyon ile ön yıkama tamamlanmıştır. Dehidratasyon, preparatların sırasıyla %30-%50-%70-%100'lük alkollerde 1'er dakika tutularak gerçekleştirilmiştir.

### **3.2.2.2.2. Prob Denatürasyonu**

- Problar 5 dakika 70 °C de bekletilerek denatüre edilmiştir.

### **3.2.2.2.3. Hibridizasyon**

- Probun bulunduğu ependorf tüpü santrifüj edilerek tüm probun dibe çökmesi sağlanmıştır.
- Denatüre edilen preparatlarda belirlenen alana prob (5 µl) eklenmiş ve üzerlerine 24mm'lik lamel kapatılmıştır.
- Lamel çevresi su girmemesi için rubber cement ile yalıtılmıştır.
- Preparatlar 37 °C'de bir gece nemli ortamda hibridizasyona bırakılmıştır.

#### **3.2.2.2.4. Hibridizasyon Sonrası Yıkamalar**

Bu yıkamalarda spesifik olarak bağlanmayan prob DNA'sının ortamdaki uzaklaştırılması ve olgu DNA'sına tam komplementer olan (% 80–100) dizilerin hedef bölgede sabit hale getirilmesi amaçlanmaktadır. Aşamaları:

-Hibridizasyonu tamamlanan preparatlar etüvden çıkartılarak lamellerin çevresindeki yalıtım maddesi dikkatlice temizlenmiştir.

- Preparatlar, oda ısısındaki 2XSSC solüsyonunda hafifçe karıştırılarak lameller preparatlardan uzaklaştırılmıştır.

- Preparatlar 1XSSC solüsyonu ile 74 °C'de 7-8 dakika bekletilmiştir.

- Sonrasında 2XSSC/T-20 solüsyonunda 5 dakika bırakılmıştır.

#### **3.2.2.2.5. Hibridize Olan Bölgelerin Görüntülenmesi**

Bu aşamada prob ve nukleus DNA'nın hibridize olduğu bölgelerin görünür hale getirilmesi amaçlanmaktadır.

Hibridizasyon sonrası yıkamaları yapılan preparatlar 4XSSC/DAPI solüsyonunda 2 dakika bekletilmiştir. Süre sonunda 15 µl antifade eklenmiş ve lamel ile kapatılmıştır. İnceleme aşamasına kadar – 20 °C de ve karanlıkta bekletilmişlerdir.

#### **3.2.2.2.6. Preparatların Mikroskopta İncelenmesi**

Preparatlar Olympus BX-61 Floresan mikroskobunda uygun filtrelerle incelenmiştir. Floresan mikroskoba bağlı soğutmalı kamera ve görüntü analiz sistemi (Applied Imaging) aracılığıyla her olguya ilişkin FISH analiz verileri fotoğraflanmış ve arşivlenmiştir.

### 3.2.2.2.7. Değerlendirme

Çalışmamızda mide kanseri tanısı almış 15 olgudan alınan doku örneklerine FISH analizi yapılmıştır. Her olguda her prob için 100 hücre değerlendirilmiştir. Her hücre için hedef gene ya da kromozom sentromerine ait sinyaller sayılmıştır. Atipik hücrelerle beraber normal hücrelerde sayılmıştır. Sinyaller değerlendirilirken birbirine çok yakın olan sinyaller ve sinyal çap büyüklüğü birbirinden farklı olan (iki katı ya da daha fazla olan) sinyaller değerlendirmeye alınmamıştır.

Çalışmamızda, EGFR geni ile 7. kromozom sentromerine ilişkin floresan spotların değerlendirilmesinde gen kopya fenotipleri 6 gruba ayrılmıştır:

**Dizomi** ( $> \%90$  hücrede her iki lokus için ikişer kopya),

**Düşük trizomi** ( $\geq \%40$  hücrede her iki lokus için ikişer kopya veya  $\%10-40$  hücrede her iki lokus için üçer kopya veya  $< \%10$  hücrede her iki lokus için dörder kopya)

**Yüksek trizomi** ( $\geq \%40$  hücrede her iki lokus için üçer kopya)

**Düşük polizomi** ( $\%10-40$  hücrede her iki lokus için dörder kopya)

**Yüksek polizomi** ( $\geq \%40$  hücrede her iki lokus için dörder kopya)

**Gen amplifikasyonu** ( $\geq 10$  hücrede EGFR/CEP7 oranı 2 veya  $\geq 10$  hücrede EGFR'de 15 kopya)

1) EGFR FISH-negatif yada düşük gen kopyası(dizomi, düşük trizomi, yüksek trizomi, ve düşük polizomi)

2) EGFR FISH-pozitif yada yüksek gen kopyası (yüksek polizomi ve gen amplifikasyonu)

TOP2A/ HER-2/neu /CEP 17 değerlendirilmesinde HER-2/neu ve TOP2A genleri ayrı ayrı CEP 17'ye oranlanmıştır. Hücrelerin;

$\geq \%40$ 'nda  $\geq 4$  kopya veya

$\%10 \geq$  'unda  $\geq 15$  kopya veya

Gen/kromozom oranı  $\geq 2$  saptandığı durumlarda olgular amplifikasyonun saptandığı durumlardan birine sahip olgular FISH pozitif olarak değerlendirilmiştir (5,37,38,47,64).

### **3.2.3. İstatistiksel Analiz**

SPSS 13.0 istatistik programında  $\chi^2$  istatistik testi kullanılarak hastaların cinsiyet, sigara kullanımı, aile öyküsü, tümör dokularının histopatolojik durumu ile çalışmada saptanan gen amplifikasyonları arasındaki ilişki araştırılmıştır. Fisher ve Pearson'a göre p değerleri hesaplanmıştır.  $p < 0.05$  düzeyi istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.



#### 4.BULGULAR

Çalışmamızda Ağustos 2009- Ocak 2010 tarihleri arasında Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Gastroenteroloji Bilim Dalı'ndan ve Genel Cerrahi Anabilim Dalı'ndan gelen mide kanseri tanısı almış 15 olgudan alınan doku örneklerine FISH analizi yapılmıştır. Olguların yaşları, cinsiyetleri, tümör tipleri, sigara kullanımı, aile öyküleri, ve evreleri hasta dosyalarından temin edilmiştir. Çalışmamız mide kanserli hastaların EGFR, HER-2/neu ve TOP2A genlerindeki amplifikasyonlar, 7. ve 17. kromozomlardaki sayısal anomaliler saptanarak mide kanseri için geliştirilecek tedavi yöntemlerine de ışık tutmak, hastalığın evresi ile saptanan anomaliler arasında ilişki kurabilmek, hastalarımıza ait demografik ve histopatolojik bilgilerle bulduğumuz sonuçlar arasında ilişki saptayabilmek amacıyla yapılmıştır.

İncelemeye alınan 15 olgunun yaş ortalaması  $63 \pm 2,4$  olarak tespit edilmiştir. Erkeklerde 64 iken kadınlarda yaş ortalaması 61'dir. Olguların; %46,7'si erkek, %53,4'ü kadındır.

Tümör örneklerinin histopatolojik verileri değerlendirildiğinde; olguların%46,7'si sigara kullanmaktadır. Yalnızca %20'sinde pozitif aile öyküsü bulunmaktadır. Pozitif aile öyküsü bulunan 3 hastanın, birinci derece akrabalarında mide kanseri tespit edilmiştir. Pozitif aile öyküsü görülen olgularda sigara kullanımı yoktur.

Olguların %20'si az diferansiye adenokarsinom, %13,4'ü gastrik lenfoma, %33,4'ü orta-az diferansiye adenokarsinom, %13,4'ü orta derecede diferansiye adenokarsinom, %6,7'si taşlı yüzük komponenti olan musinöz adenokarsinom ve %13,4'ü de taşlı yüzük hücreli adenokarsinomdur. Tümör tipleri arasında en çok (%33,4) orta-az diferansiye adenokarsinomlar gözlenmiştir.

Tümör örneklerinin evrelerine göre dağılımlarında ise en çok evre IV (% 66,7) gözlenmiştir. Geri kalan örneklerin %13,4'ü evre II, %6,7'si evre IIIB ve % 13,4'ü de evre IB'dir.

Çalışmaya dahil edilen olguların klinik özellikleri ve histopatolojik tanıları Tablo 4.1’de ayrıntılı olarak verilmiştir.

**Tablo 4.1.** Mide kanserli olguların yaş, cinsiyet, tümör tipi, sigara, aile öyküsü ve evre Bilgileri

Olgu No	Yaş	Cinsiyet	Tümör Tipi	Sigara Kullanımı	Aile Öyküsü	Klinik Evre
1	79	E	Az Diferansiye Adenocarsinom	-	Yok	IV
2	46	K	Gastrik Lenfoma	+	Yok	II
3	61	E	Orta-Az Diferansiye Adenocarsinom	+	Yok	IV
4	69	K	Orta-Az Diferansiye Adenocarsinom	-	Var	II
5	55	E	Orta-Az Diferansiye Adenocarsinom	+	Yok	IV
6	67	K	Orta-Az Diferansiye Adenocarsinom	-	Var	IV
7	66	K	Orta Diferansiye Adenocarsinom	-	Yok	IV
8	55	K	Orta Diferansiye Adenocarsinom	-	Var	IV
9	64	E	Az Diferansiye Adenocarsinom	+	Yok	IIIB
10	49	K	Gastrik Lenfoma	+	Yok	IB
11	76	E	Taşlı Yüzük Hücreli Musinöz Adenocarsinom	+	Yok	IV
12	61	E	Taşlı Yüzük Hücreli Az Diferansiye Adenocarsinom	+	Yok	IV
13	70	K	Az Diferansiye Adenocarsinom	-	Yok	IB
14	69	K	Taşlı Yüzük Hücreli Adenocarsinom	-	Yok	IV
15	58	E	Orta-Az Diferansiye Adenocarsinom	-	Yok	IV

#### **4.1.Yöntem ve Değerlendirmeye İlişkin Bulgular**

Çalışmamızda mide kanseri tanısı almış 15 olgudan alınan doku örneklerine FISH analizi yapılmıştır. Doku örneklerinden direk doku preparasyonu yapıldıktan sonra floresan işaretli DNA propları ile hibridizasyon gerçekleştirilmiştir. Hibridizasyon sonrası EGFR/CEP7, TOP2A/HER/CEP 17 genlerine özgü tasarlanan problardan alınan sinyaller analiz edilmiştir. Analiz edilen 15 olgunun tümünden sonuç alınmıştır. Çalışmamızın başarı oranı %100 olarak saptanmıştır.

Çalışmamızda her olguda 5 farklı FISH probuna ilişkin değerlendirmede prob başına 100 hücre analiz edilmiştir. Analiz edilen hücre sayısı, doku ve görüntü kalitesine bağlı olarak değişiklik göstermiştir.

##### **4.1.1.Olguların FISH Analiz Bulguları**

Çalışmamızda 15 olgu 5 parametre açısından FISH analizi ile değerlendirilmeye alınmış ve 3 olguda herhangi bir anomaliye rastlanmamıştır. Üç olgu da normaldir. Olguların 12' sinde ise FISH analizi ile tespit edilen en az bir anomaliye rastlanmıştır.

Çalışmamızda olguların FISH analizi sonuçları, tümör tipi ve evre bilgileri Tablo 4.2'de ayrıntılı olarak verilmiştir.

**Tablo 4.2.** Mide kanserli olguların FISH analizi sonuçları, tümör tipi ve evre bilgi

Olgu No	EGFR/CEP7	TOP2A/ HER-2/neu /CEP17	Tümör Tipi	Klinik Evre
1	Yüksek Polizomi	Polizomi	Az Diferansiye Adenocarsinom	IV
2	Dizomi	Dizomi	Gastrik Lenfoma	II
3	Monozomi	Dizomi	Orta-Az Diferansiye Adenocarsinom	IV
4	Dizomi	Dizomi	Orta-Az Diferansiye Adenocarsinom	II
5	Yüksek Trizomi	Co-Amplifikasyon	Orta-Az Diferansiye Adenocarsinom	IV
6	Yüksek Trizomi	Co-Amplifikasyon	Orta-Az Diferansiye Adenocarsinom	IV
7	Düşük Polizomi	HER-2/neu Amplifikasyonu	Orta Diferansiye Adenocarsinom	IV
8	Yüksek Trizomi	Co-Amplifikasyon	Orta Diferansiye Adenocarsinom	IV
9	Amplifikasyon	Dizomi	Az Diferansiye Adenocarsinom	IIIB
10	Amplifikasyon	Dizomi	Gastrik Lenfoma	IB
11	Düşük Polizomi	Dizomi	Taşlı Yüzük Hücreli Musinöz Adenocarsinom	IV
12	Dizomi	Dizomi	Taşlı Yüzük Hücreli Az Diferansiye Adenocarsinom	IV
13	Düşük Trizomi	Co-Amplifikasyon	Az Diferansiye Adenocarsinom	IB
14	Yüksek Trizomi	Co-Amplifikasyon	Taşlı Yüzük Hücreli Adenocarsinom	IV
15	Amplifikasyon	Co-Amplifikasyon	Orta-Az Diferansiye Adenocarsinom	IV

#### 4.1.1.1.EGFR Gen Bölgesine ve Sentromer 7'ye Ait Aberasyonlar

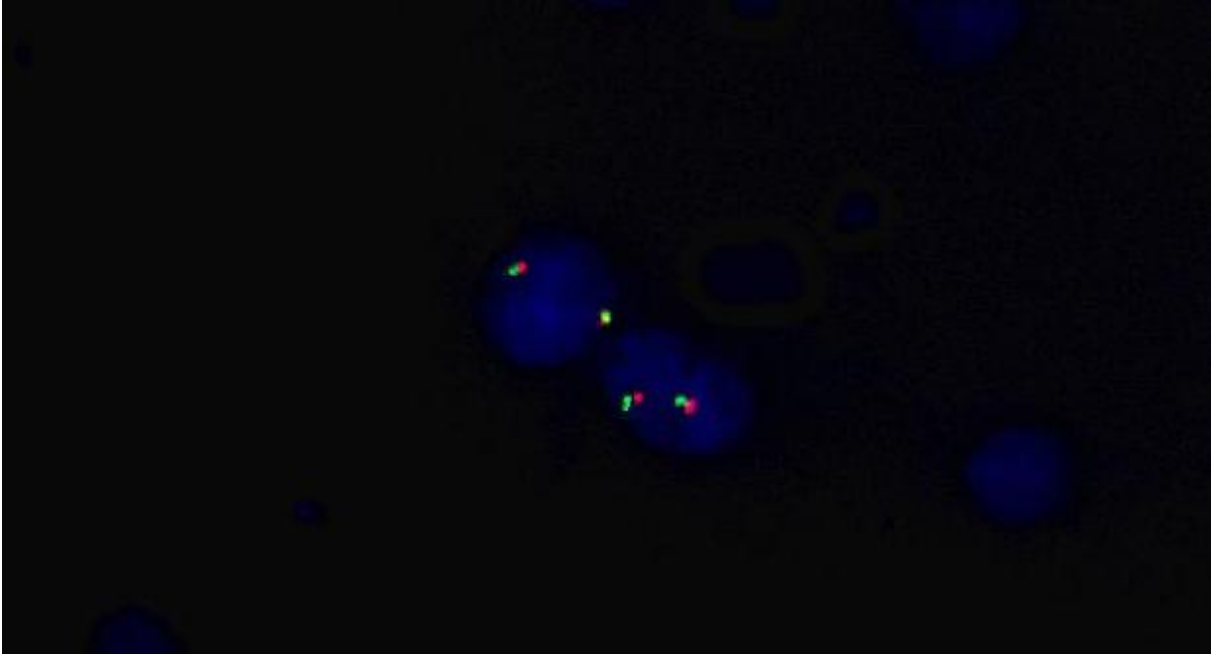
Olguların % 20'sinde dizomi, %6,7'sinde düşük trizomi, %26,7'sinde yüksek trizomi, %13,4'ünde düşük polizomi, %6,7'sinde yüksek polizomi, %20'sinde amplifikasyon, %6,7'sinde monozomi saptanmıştır.

#### 4.1.1.2.TOP2A, HER-2/neu Gen Bölgelerine ve Sentromer 17'ye Ait Aberasyonlar

Olguların %46'sında HER-2/neu amplifikasyonu, %40'ında TOP2A amplifikasyonu görülmüştür. Yedi numaralı olguda HER-2/neu amplifikasyonu tek başına saptanmıştır. TOP2A amplifikasyonu saptanan olguların hepsinde aynı zamanda HER-2/neu amplifikasyonu da tespit edilmiştir. TOP2A açısından olguların %46,7'si dizomikti. Kromozom 17 açısından bir olgu polizomikti.

**Tablo 4.3.** Değerlendirilen Genetik Parametrelerin Görülme Oranı

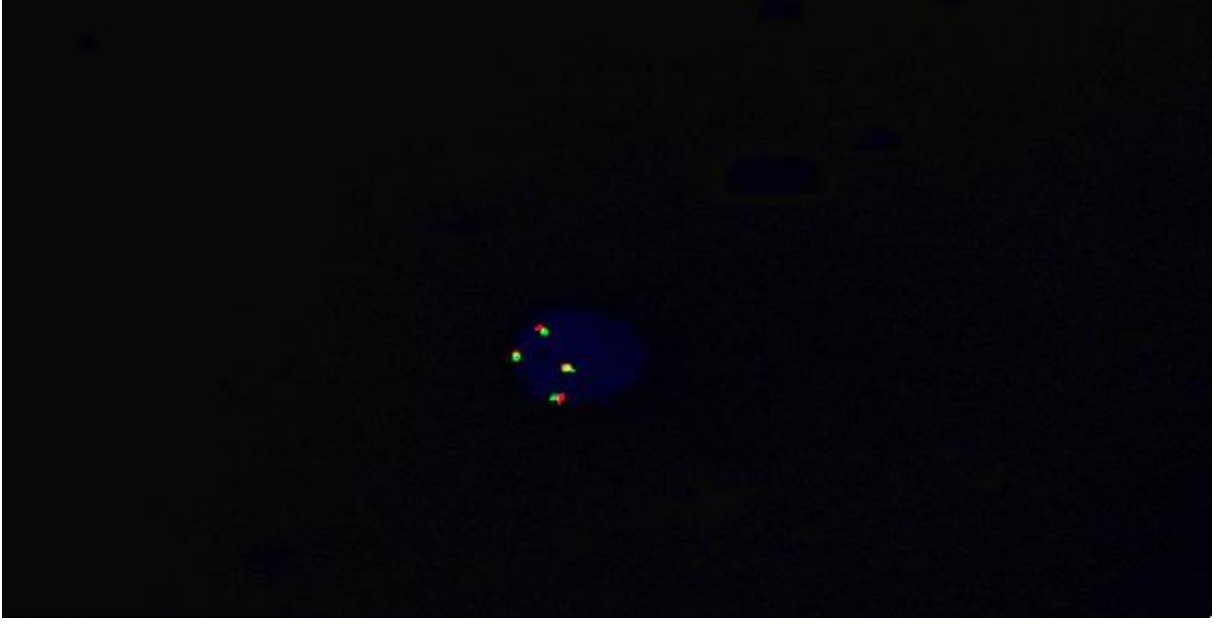
Değerlendirilen Genetik Parametreler	Yüzde/Oran
EGFR Amplifikasyon	%20 (3/15)
Sentromer 7 Düşük trizomi Yüksek trizomi Düşük polizomi Yüksek polizomi Monozomi	%6,7(1/15) %26,7(4/15) %13,4(2/15) %6,7(1/15) %6,7(1/15)
HER-2/neu Amplifikasyon	%46,7(7/15)
TOP2A Amplifikasyon	%40(6/15)
Sentromer 17 Yüksek polizomi	%6,7(1/15)



**Şekil 4.1** Olgu 2' ye ait EGFR geni ve sentromer 7 için normal hücelere sahip FISH görüntüsü (Cep7 yeşil sinyal, EGFR kırmızı sinyal).



**Şekil 4.2** EGFR geni amplifikasyonuna sahip olgu 9'a ait FISH görüntüsü (Cep7 yeşil sinyal, EGFR kırmızı sinyal)



**Şekil 4.3** EGFR ve sentromer 7 polizomisine sahip olgu 1'e ait FISH görüntüsü (Cep7 yeşil sinyal, EGFR kırmızı sinyal).



**Şekil 4.4** EGFR ve sentromer 7 trizomisine sahip olgu 6'ya ait FISH görüntüsü (Cep7 yeşil sinyal, EGFR kırmızı sinyal).



**Şekil 4.5** TOP2A, HER-2/neu ve sentromer 17 için normal hücrelere sahip olgu 11'e ait FISH görüntüsü (Cep17 mavi, HER-2/neu yeşil, TOP2A kırmızı sinyal)



**Şekil 4.6** TOP2A, HER-2/neu ve sentromer 17 polizomisine sahip olgu 1'e ait FISH görüntüsü (Cep17 mavi, HER-2/neu yeşil, TOP2A kırmızı sinyal).





**Şekil 4.7** TOP2A, HER-2/neu ve sentromer 17 trizomisine sahip olgu 1'e ait FISH görüntüsü (Cep17 mavi, HER-2/neu yeşil, TOP2A kırmızı sinyal).



**Şekil 4.8** TOP2A ve HER-2/neu amplifikasyonuna sahip olgu 15'e ait FISH görüntüsü (Cep17 mavi, HER-2/neu yeşil, TOP2A kırmızı sinyal).

#### 4.2.Çalışmanın İstatistiksel Bulguları

Çalışmamızda söz konusu parametreler ve hedef genlerin amplifikasyon durumları için SPSS 13.0 istatistik programında  $\chi^2$  istatistik testi kullanılarak Fisher ve Pearson'a göre p değerleri hesaplanmıştır. Tüm bu parametrelere göre elde edilen istatistiksel sonuçlar, EGFR ve HER-2/neu ile EGFR ve TOP2A genlerinde tespit edilen kopya sayısı artışı arasında anlamlı bir ilişki bulunmadığını göstermiştir (P>0.05).

Yapılan istatistiksel çalışmalarda HER-2/neu ile TOP2A genlerinin kopya sayılarındaki artışları arasında anlamlı bir ilişki bulunduğu gözlenmiştir (P=0,001) (Tablo 4.4). 15 olgunun 6'sında HER2 ve TOP2A genleri birlikte amplifiye olmuşlardır. 15 olgunun 7'sinde hem HER-2/neu geninde hem de TOP2A geninde dizomi gözlenmiştir. 1 olguda polizomi tespit edilmiştir. Değerlendirme dizomi ve amplifikasyon görülen olgular arasında yapılmıştır.

**Tablo 4.4.** HER-2/neu ile TOP2A genlerinin kopya sayılarındaki artışla bu parametreler arasındaki ilişki

HER-2/neu /CEP17	TOP2A/CEP17		Toplam
	Dizomi	Amplifikasyon	
Dizomi	7 %50,0	0 %0,0	7 %50,0
Amplifikasyon	1 %7,1	6 %42,9	7 %50,0
Toplam	8 %57,1	6 %42,9	14 %100,0

Klinik evre ile genler arasında yapılan istatistiksel çalışmada; klinik evre ile EGFR, TOP2A, HER-2/neu genlerindeki amplifikasyonlarla ile klinik evre arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır (P>0.05) (Tablo 4.5). istatistiksel olarak anlamlı

olmasa da HER-2/neu geninde kopya sayısı artışı gözlenen 7 olgunun evre IV'e ait olduğu tespit edilmiştir. Bir olguda polizomi tespit edilmiştir.

**Tablo 4.5.** Klinik evre ile HER-2/neu amplifikasyonu arasındaki ilişki

EVRE	HER-2/neu /CEP17			Toplam
	Dizomi	Amplifikasyon	Polizomi	
IB	2 %13,4	0 %0,0	0	2 %13,4
II	2 %13,4	0 %0,0	0 0,0	2 %13,4
IIIB	1 %6,7	0 %0,0	0 %0,0	1 %6,7
IV	2 %13,4	7 %46,7	1 %6,7	9 %67,7
Toplam	7 %46,7	7 %46,7	1 %6,7	15 %100,0

## 5.TARTIŞMA

Çalışmamızda tümör tipi DSÖ sınıflamasına göre tespit edilen 15 olguya ait doku örneklerinde FISH analizi ile **EGFR**, **HER-2/neu** ve **TOP2A** gen bölgelerine bakılmış ve bulgular literatür eşliğinde tartışılmıştır.

### 5.1.FISH Yöntemi İle Saptanan Anomalilerle Literatür Bilgilerinin Karşılaştırılması

#### 5.1.1. EGFR Geninin FISH Yöntemi Sonuçları İle Literatür Bilgilerinin Karşılaştırılması

Çalışmamızda 15 olgudan alınan mide tümörü örneklerinin 3 tanesinde (%20) EGFR gen amplifikasyonu saptanmıştır. FISH yöntemiyle incelenen mide kanserli olgularda tespit edilen EGFR geninin amplifikasyonları ile literatürdeki benzer çalışmalar karşılaştırılmıştır.

Kim ve arkadaşları tarafından 2008 yılında yapılan çalışmada mide tümörlerinde protein aşırı ekspresyonunun ve yüksek gen kopya sayısının prognostik önemini belirlemek için immunohistokimyasal çalışma (IHC) ve floresans in situ hibridizasyon (FISH) analizi yapılmıştır. Çalışılan 511 hastanın yaş ortalaması 55,4'tür. IHC ile 140 olguda (%27,4) EGFR proteini aşırı ekspresyonu saptanmıştır. Saptanan aşırı ekspresyon yüksek yaş, kötü histoloji ve yüksek evre ile ilişkili bulunmuştur. FISH analizi sonucunda 16 olguda (%3,1) yüksek polizomi, 12 olguda (%2,3) gen amplifikasyonu saptanmıştır. IHC ve FISH yöntemleri arasında istatistiksel olarak korelasyon saptanmıştır. EGFR proteininin aşırı ekspresyonunun kötü prognozla ilişkili olduğu ve ilerde EGFR hedef terapisi için önemli olacağı sonucuna varmışlardır (38).

Cathia Moutinho ve arkadaşları 2008 yılında yaptıkları çalışmada primer mide tümörlü EGFR genindeki yapısal değişimlerin tipini ve sıklığını belirlemeyi

amaçlamışlardır. Yapılan FISH analizi ile 77 olgunun 30'unda FISH analizi yapılabilmektedir. 30 olgunun 4'ünde (%13,3) amplifikasyon, 3 olguda kromozom 7 polizomisi, EGFR mutasyon analizinde %2,6 (2/77) ekzon 18-21 de EGFR gen mutasyonu saptanmıştır. Daha önceden 2'si tanımlanmış EGFR'nin intronik bölgelerini içeren 6 farklı sekans varyantı bulunmuştur. Çalışmalarında EGFR aktivasyonundaki değişimlerin mide karsinogenezinde sık gözlenmediği, değişimlerin diffuz tip ve tümör büyüklüğü ile ilişkili olduğu sonucuna varmışlardır. EGFR genindeki değişimlerin, düşük sıklıkla görülse de seçilmiş mide kanseri hastalarına farmakolojik olarak EGFR reseptörlerini içeren konvansiyonel olmayan terapidenden fayda sağlamasına yol gösterebileceği saptanmasında bulunmuşlardır (51).

J-S Kim ve arkadaşlarının (2009) çalışmasında mide rezeksiyon işlemi sonrasında 5 –florourasil ve cisplatin (FP) adjuvan kemoterapi alan III-IV (M0) evrelerindeki olgularda biyomarker analizi yapılmış epidermal büyüme faktörü (EGFR) ile ilişkisi araştırılmıştır. EGFR ekspresyonu EGFR PharmDx kiti ile standart IHC yöntemiyle incelenirken, EGFR amplifikasyonu FISH yöntemiyle incelenmiştir. FISH yöntemiyle incelenen 135 olgunun 4'ünde (%3) EGFR gen amplifikasyonu saptanmışlardır. EGFR ekspresyonuyla FISH + arasında ilişki kurulamamıştır. Aşırı EGFR ekspresyonu; hastalığın nüksettiği ve rezeksiyonla sağlığına kavuşup hayatta kalan adjuvan 5-FU ve cisplatin kemoterapisi alan evre III ve IV (M0) mide kanseri hastalarında iyi bir prediktif marker olabilir sonucuna varmışlardır (39).

Çalışmamızda FISH ile incelediğimiz EGFR gen bölgesinde %20 oranında amplifikasyon saptanmıştır. Bu oran literatürlere (38,39,51) göre yüksektir. Oranın bu şekilde çıkmasını olgu sayısının azlığı ve tümör heterojenitesi ile ilişkilendirebiliriz. Mide kanserinde EGFR geni amplifikasyonu ve EGFR genine ait bulduğumuz sonuçlarla; hastanın yaşı, cinsiyeti, tümör tipi, sigara kullanımı, aile öyküsü ve hastalığın klinik evresi ve diğer genlerle arasında istatistiksel olarak herhangi bir ilişki kurulamamıştır.

### **5.1.2. HER-2/neu Geninin FISH Yöntemi Sonuçları İle Literatür Bilgilerinin Karşılaştırılması**

Çalışmamızda 15 olgudan alınan mide tümörü örneklerinin 7 tanesinde (%46,7) HER-2/neu gen amplifikasyonu saptanmıştır. FISH yöntemiyle incelenen mide kanserli olgularda tespit edilen HER-2/neu geninin amplifikasyonları ile literatürdeki benzer çalışmalar karşılaştırılmıştır.

Yano ve arkadaşları 2006 yılında yaptıkları çalışmadan cerrahi operasyon ve biyopsi yapılarak alınan mide kanserli dokularda FISH ile HER-2/neu gen amplifikasyonuna, IHC ile HER-2/neu proteini overekspresyonuna bakmışlardır. 199 mide kanserli olguda FISH ile saptanan gen amplifikasyonu oranı % 27,1, IHC ile saptanan protein ekspresyonu %23'tür. Yöntemler arasındaki konkordans %86,9 olarak tespit edilmiştir (78).

M. Hofmann ve arkadaşları 2008 yılında FISH yöntemiyle HER-2/neu genine, IHC ile herceptest bakılmıştır. FISH ve IHC arasında konkordans %93,5 olarak bulunmuştur. Daha önceki yayınlarda bu oran %86,9, %82-%100 olarak belirtilmiştir. FISH yöntemiyle 168 mide kanserli olgunun 29'unda (%17) HER-2/neu gen amplifikasyonu tespit etmişlerdir. Bu çalışma ile meme kanseri hastalarında HER-2/neu + belirlenmesinde kullanılan skor sisteminin mide kanseri hastalarında da kullanılabilirliği değerlendirilmiştir. Meme kanseri ve mide kanseri sonuçları arasındaki farklılıkları karşılaştırarak FISH ve IHC testlerinin mide kanserli hastalar için trastuzumab tedavisi için klinik deneyler yapılırken kullanılmasını tavsiye etmişlerdir (29).

Takehana ve arkadaşları 2002 yılında HER-2/neu gen durumuna FISH, IHC ve ELISA ile karşılaştırmalı olarak bakmışlardır. IHC ve FISH arasındaki konkordansı %73-98 olarak belirtilmiştir. 352 olgunun 25'inde (%7,1) FISH analizi sonucunda HER-2/neu gen amplifikasyonu saptamışlardır. Evre III ve IV olan mide kanserli olgularda evre I ve II'ye göre daha çok HER-2/neu aşırı ekspresyonu gözlenmiştir. Mide

kanserinde p185 proteinin aşırı ekspresyonu ve aşırı HER-2/neu amplifikasyonu meme kanserinde kabul edilmiş mekanizmaya benzerlik gösterdiğini saptamışlardır. HER-2/neu amplifikasyonuna sahip mide kanserli hastaları yeni bir adjuvan terapi için aday olabileceğini sonucuna varmışlardır (71).

Min A. Kim ve arkadaşları 2007 yılında yaptıkları çalışmada 248 mide kanserli dokuda, HER-2/neu gen durumunu; IHC, FISH ve real time q-PCR yöntemleriyle değerlendirmeye çalışmışlardır. IHC ile saptanan HER-2/neu aşırı ekspresyonu % 22,6, FISH ile saptanan HER-2/neu gen amplifikasyonu % 7,7'dir. Yeni terapotik ajan Herceptin'in (trastuzumab) geliştirilmesinden sonra dikkatler HER-2/neu gen amplifikasyonuna çevrilmiştir. Buna ek olarak klinopatolojik karakteristikler ile HER-2/neu gen amplifikasyonu ve protein over ekspresyonunu karşılaştırmışlardır. IHC FISH ve real time q-PCR yöntemleri arasında yüksek derecede konkordans gözlenmiştir. IHC ile değerlendirilen HER-2/neu proteini aşırı ekspresyonu ile FISH ile değerlendirilen HER-2/neu amplifikasyonu intestinal tip mide karsinomuyla bağlantılı bulmuşlardır. HER-2/neu amplifikasyonu olan ya da olmayan mide kanser hastaları ile yaş, cinsiyet, patolojik evreleri arasında bir ilişki saptanmamıştır (37).

JD Barros-Silva ve arkadaşları 2009 yılında yaptıkları çalışmada mide kanserinde HER-2/neu gen durumu ile histopatolojik parametreler arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır. Yapılan FISH analizi sonucunda 463 olgunun 43'ünde (%9,3) HER-2/neu gen amplifikasyonu saptamışlardır. Birçok mide karsinomunda HER-2/neu amplifikasyonu intestinal tipte görülürken bu çalışmada 2 adet mixed tipte görülmüştür. HER-2/neu amplifikasyonu olan ve olmayan olgularla; yaş, cinsiyet, cerrahi tipi ve klinik evre arasında herhangi bir ilişki saptanmamıştır (6).

Dong DI Park ve arkadaşları 2006 yılında HER-2/neu amplifikasyonun mide kanserinde bağımsız bir prognostik faktör olup olmadığını araştırmışlardır. Bu çalışma ilerde mide kanseri hastaları için Herceptin terapisini gerçekleştirmek için yapılmıştır. HER-2/neu aşırı ekspresyonu ve gen amplifikasyonu; IHC, CISH( kromojenik in situ hibridizasyon) ve FISH yöntemleriyle incelenmiştir. FISH analizi sonucu 182 olgunun 7'sinde (%3,8) HER-2/neu gen amplifikasyonu saptanmışlardır.

İntestinal tip kanserde diffuz tip kansere göre daha fazla oranda HER-2/neu amplifikasyonu gözlenmiştir. HER-2/neu amplifikasyonuna sahip tümörler; kötü hayatta kalım oranı (922 -3243 gün) ve 5 yıl hayatta kalım oranı ile ilişkilendirilmiştir. Çok değişkenli analizlerle yaş, TNM evresi ve HER-2/neu amplifikasyonu bağımsız olarak hayatta kalımla ilişkili bulunmuştur. HER-2/neu amplifikasyonunun mide kanseri hastalarında bağımsız bir prognostik faktör olabileceği ve HER-2/neu amplifikasyonu gösteren hastaların yeni adjuvan terapi için potansiyel aday oluşturabileceği sonucuna varmışlardır (54).

Çalışmamızda HER-2/neu amplifikasyonu oranı %46,6 olarak bulunmuştur. Diğer literatürlerle (6,29,37,54,71,78) karşılaştırıldığında bu oran çok fazla görünse de bu sonuç olgu sayımızın azlığı ve tümör heterojenitesi ile açıklanabilir. Evre IV ile HER2 gen amplifikasyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç bulunmamasına rağmen. HER-2/neu gen amplifikasyonu görülen hastaların büyük bir kısmının evre IV'e ait olduğu tespit edilmiştir.



### **5.1.3.HER-2/neu ve EGFR genlerinin FISH Yöntemi Sonuçları ile Her İki Geninde Beraber Çalışıldığı Literatür Bilgilerinin Karşılaştırılması**

Bugüne kadar HER-2/neu ve EGFR genlerinin amplifikasyon, mRNA ve protein ekspresyon miktarına ilişkin farklı yöntemler uygulanarak pek çok sayıda çalışma yapılmış ve genellikle sonuçlar karşılaştırılarak aralarında ilişki kurulmuştur. Yapılan çalışmalarda amplifikasyon ve protein ekspresyonu arasında genellikle uyum gözlenmiştir (26,31,36,37). Meme kanseri tedavisinde HER-2/neu'nun ekstrasellüler domainine bağlanabilen bir monoklonal antikor olan transtuzumabın HER-2/neu amplifikasyonu ile seyreden hastalarda yüz güldürücü sonuçlar vermesi ile bu konudaki çalışmalar başta akciğer kanseri olmak üzere diğer kanser türlerine de kaymıştır (9,12,55,67,68,73).

Fumihiko Mitsui ve arkadaşları 2007 yılında Myc geninin protein aşırı ekspresyonu ve gen amplifikasyonlarının yanı sıra EGFR-Myc, HER-2/neu -Myc co amplifikasyonlarını çalışmışlardır. FISH yöntemiyle 300 olguda %4 EGFR gen amplifikasyonu, %7 HER-2/neu gen amplifikasyonu, %6 Myc gen amplifikasyonu tespit etmişlerdir. Myc geninin EGFR ve HER-2/neu ile co amplifikasyonun rastlantısal olmayan bir şekilde ortaya çıktığını ve bu amplifikasyonun; tek bir hücreden, muhtemelen tek bir amplikondan geliştiğini ortaya koymuşlardır. FISH yöntemiyle mide kanserinin genetik heterojenitesinin saptanmasının, terapötik ve optimal tedavi hedeflerinin belirlenmesine yardımcı olabileceği sonucuna varmışlardır (50).

Mikihiko Kimura ve arkadaşları 2004 yılında yaptıkları çalışmada, mide kanserinde artan EGFR ve HER-2/neu gen kopya sayısı, teşhise yönelik anlamlı bir kriter olabilir mi sorusuna cevabını FISH ve IHC yöntemleriyle karşılaştırarak aramışlardır. Çalıştıkları 54 adenokarsinomun 13 tanesi az diferansiye, 16 tanesi orta diferansiye ve 25 tanesi çok diferansiye tiptedir. EGFR amplifikasyonunu %7, HER-2/neu amplifikasyonunu %11 oranında bulmuşlardır. Artan HER-2/neu ve EGFR gen kopya sayıları ile tümör invazyon derinliği, TNM evresi, bölgesel lenf nodu metastazı arasında bir ilişki bulamamışlardır. Bu çalışmada önceki çalışmalarda olduğu gibi EGFR gen amplifikasyonu ile mide kanserinin histolojik tipleri arasında korelasyon

bulunamamıştır. Fakat HER-2/neu gen amplifikasyonu ile az diferansiye tipte adenokarsinomlar arasında bağlantı tespit edilmiştir (40).

Çalışmamızda EGFR ile HER-2/neu genleri arasında herhangi bir ilişki kurulamamıştır. Yalnızca bir olguda hem EGFR hemde HER-2/neu amplifikasyonu görülmüştür. Bulduğumuz sonuç olgu sayımızın azlığı, mide kanserinde her iki genin birlikte değerlendirildiği çalışmaların az sayıda olması ve tümör heterojenitesi ile açıklanabilir.

#### **5.1.4.HER-2/neu ve TOP2A genlerinin FISH Yöntemi Sonuçları ile Her İki Geninde Beraber Çalışıldığı Literatür Bilgilerinin Karşılaştırılması**

Topoizomeraz IIA geni (TOP2A) ise 17.kromozomun 17q12-q21 bölgesinde HER-2/neu onkogeninin hemen yanındadır. Anti-kanser ilaçlarının spesifik bir sınıfı olan antrasiklin için TOP2A hedef enzimdir. Çalışmalar HER-2/neu ve TOP2A'nın beraber amplifikasyonunu birçok kanser tipinde antrasiklin terapisine duyarlılığı ile ilişkilendirmiştir. EGFR ve TOP2A arasındaki ilişki henüz yayınlanmamıştır (32,49). Çalışmamızda da EGFR ve TOP2A arasında bir ilişki kurulamamıştır.

Sammy Yasmin Kanta ve arkadaşlarının 2006 yılında yaptıkları çalışmada mide kanserinde TOP2A gen amplifikasyonunun ve HER-2/neu geniyle ilişkisini IHC, western blot ve multicolor FISH yöntemleriyle incelemiştir. FISH yöntemiyle 552 olgudan 38'inde (%6,8) HER-2/neu gen amplifikasyonunu, 13'ünde (%2,3) TOP2A gen amplifikasyonunu tespit etmişlerdir. TOP2A, DNA replikasyonu ve moleküler hedef tedavi (antrasiklin) için gerekli bir enzimdir. TOP2A geni HER-2/neu onkogeninin hemen yanında bulunmaktadır. Bu çalışmada tüm TOP2A amplifikasyonu görülen hastalarda HER-2/neu amplifikasyonu da görülmüştür (33).

M. Tanner ve arkadaşları 2005 yılında mide kanserinde HER-2/neu amplifikasyonunun TOP2A gen amplifikasyonu, intestinal tip, kötü prognoz ve trastuzumab ile ilişkisini incelemiştir. FISH yöntemiyle 131 olguda %12,2 HER-2/neu gen amplifikasyonu, %7,3 TOP2A gen amplifikasyonu tespit etmişlerdir. HER-2/neu amplifikasyonunu mide kanserinin intestinal tipinde diffuz ve mixed/anaplastik tipine göre daha çok görüldüğünü saptamışlardır. Görülen amplifikasyonlar ile cinsiyet, yaş ve klinik evre arasında ilişkili bulamamışlardır. TOP2A amplifikasyonu görülen hastalarda HER-2/neu amplifikasyonu da görmüşlerdir. Meme kanserinde de HER-2/neu-TOP2A co-amplifikasyonu sıklıkla gözlenmektedir. HER-2/neu amplifikasyonuna sahip mide kanseri hastalarının TOPO 2 inhibitör ilaçlarına duyarlılık gösterebileceği sonucuna varmışlardır (72).

Çalışmamızda HER-2/neu gen amplifikasyonu görülen 7 hastanın 6'sında TOP2A gen amplifikasyonu da (%85,7) görülmüştür. Bu sonuç literatürlerle (33,72) uyum göstermektedir.

#### **5.1.5.EGFR, HER-2/neu ve TOP2A genlerinin FISH Yöntemi Sonuçları ile Her Üç Geninde Beraber Çalışıldığı Literatür Bilgilerinin Karşılaştırılması**

Zhiyong Liang ve arkadaşları 2008 yılında yaptıkları çalışmada mide adenokarsinomaya sahip olgularda kromozomal polizomi ve EGFR, HER-2/neu ve TOP2A gen durumlarının analizi yapmışlardır. Yüz olgunun %16'sında EGFR FISH+, %11'inde HER-2/neu FISH+ ve %3'ünde TOP2A amplifikasyonu, %19'unda kromozom 7 polizomisi, %16'sında kromozom 17 polizomisi gözlemişlerdir. EGFR aşırı ekspresyonuyla FISH + arasında ve kromozom 7 polizomisi ile EGFR aşırı ekspresyonu arasında ilişki saptayamamışlardır. HER-2/neu aşırı ekspresyonuyla HER-2/neu gen amplifikasyonu arasında ilişki bulamamışlardır. HER-2/neu gen amplifikasyonu ile TOP2A amplifikasyonu arasında korelasyon saptamışlardır. EGFR, HER-2/neu ve TOP2A genleri ile klinopatolojik değişkenler arasında ilişki bulamamışlardır. Çalışmalarının mide kanserli hastalar için hedef tedavinin saptanmasını kolaylaştırabileceği sonucuna varmışlardır (47).

Yaptığımız çalışmamızda; olguların %20'sinde EGFR gen amplifikasyonu, %46,6'sında HER-2/neu gen amplifikasyonu, % 40'ında TOP2A gen amplifikasyonu, %20'sinde kromozom 7 polizomisi, %6,6 sında kromozom 17 polizomisi gözlenmiştir. Literatürle uyumlu olarak çalışmamızda TOP2A ve HER-2/neu genleri arasında amplifikasyon açısından anlamlı bir sonuç elde edilmiştir. Yine literatür (47) ile uyumlu olarak EGFR, HER-2/neu ve TOP2A genleri ile klinopatolojik değişkenler arasında ilişki bulunamamıştır.

Literatürden farklı olarak çalışmamızda, istatistiksel olarak anlamlı bulunmasa da HER-2/neu gen amplifikasyonu görülen 7 olgunun evre IV'e ait olduğu tespit edilmiştir.

EGFR ile HER-2/neu ve EGFR ile TOP2A arasında kopya sayısı artışları bakımından ilişki bulunamamıştır.

Çalışmamız, Türk popülasyonunda EGFR, HER-2/neu ve TOP2A gen durumlarının mide kanserinde araştırıldığı ilk çalışma olma özelliğini taşımaktadır. Tablo 5.1 'de bulduğumuz amplifikasyon sonuçları ile literatür verileri karşılaştırılmıştır.

**Tablo 5.1.** EGFR, HER-2/neu ve TOP2A gen amplifikasyon sonuçlarının literatür verileri ile karşılaştırılması

Çalışmalar	Olgu Sayısı	Örnek	Teknik	Genler	Sonuç
Min A. Kim ve Arkadaşları – 2008	511	Adenokarsinom	FISH IHC	EGFR	% 2.3
Cathia Moutinho ve Arkadaşları – 2008	77	Adenokarsinom	FISH Mut. Analizi	EGFR	% 13.3
J. S. Kim ve Arkadaşları – 2009	135	Adenokarsinom	FISH IHC	EGFR	% 16
Yano ve Arkadaşları – 2006	199	Adenokarsinom	FISH IHC	HER-2/neu	% 27.1
M. Hofmann ve Arkadaşları – 2008	168	Adenokarsinom	FISH IHC	HER-2/neu	% 17
Takehana ve Arkadaşları – 2002	352	Adenokarsinom	FISH IHC ELISA	HER-2/neu	% 7.1
Min A. Kim ve Arkadaşları – 2007	348	Adenokarsinom	FISH IHC RT q-PCR	HER2/neu	% 7.7
J. D. Barros - Silva ve Arkadaşları – 2009	463	Adenokarsinom		HER2/neu	% 9,3
Dong DI Park ve Arkadaşları – 2006	182	Adenokarsinom	FISH IHC CISH	HER2/neu	% 3,8
Fumihiko Mitsui ve Arkadaşları – 2007	300	Adenokarsinom	FISH IHC	EGFR HER2/neu Myc	% 4 EGFR % 7 HER-2/neu % 6 Myc
Mikihiko Kimura ve Arkadaşları – 2004	54	Adenokarsinom	FISH IHC	EGFR HER-2/neu	% 7 EGFR % 11 HER-2/neu
S. Y. Kanta ve Arkadaşları – 2006	552	Adenokarsinom	Multicolor FISH IHC W. Blot	HER2/neu TOP2A	% 6,8 HER2/neu % 2,3TOP2A
M. Tanner ve Arkadaşları – 2005	131	Adenokarsinom	FISH IHC	HER2/neu TOP2A	% 12,2HER2/neu % 7,3 TOP2A
Z. Liang ve Arkadaşları – 2008	100	Adenokarsinom	FISH IHC	EGFR HER2/neu TOP2A	% 16 EGFR % 11 HER-2/neu % 3 TOP2A
Bizim Çalışmamız-2010	15	Adenokarsinom	FISH	EGFR HER-2/neu TOP2A	% 20 EGFR % 46,7HER2/neu % 40 TOP2A

## 6.SONUÇ ve ÖNERİLER

Çalışmamızda Ağustos 2009- Ocak 2010 tarihleri arasında Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Gastroenteroloji Bilim Dalı'ndan ve Genel Cerrahi Anabilim Dalı'ndan gelen mide kanseri tanısı almış 15 olgudan alınan doku örneklerine direk doku preparasyonu yapıldıktan sonra FISH analizi yapılmıştır. Olguların yaşları, cinsiyetleri, tümör tipleri, sigara kullanımlarının olup olmaması, aile öyküleri ve evreleri hasta dosyalarından temin edilmiştir. Elde edilen verilerin literatürle uyumu karşılaştırılmıştır.

Çalışmaya dahil edilen 15 örneğin hepsinden FISH tekniği ile sonuç alınabilmiştir. Çalışmamızda ameliyat sonrası alınan taze dokular direk doku preparasyonu yöntemiyle FISH preparatı haline getirilmiştir. Parafinize preparatlarla yapmadığımız için hem deparafinizasyon yönteminin zorlukları yaşanmamıştır hem de yeterli sayıda ve kalitede hücreye ulaşılmıştır. Yaptığımız çalışmada direk doku preparasyonu işlemi gerçekleştirilmiştir.

Mide kanserinde gerçekleştirdiğimiz çalışmamızın sonucunda;

1) İstatistiksel sonuçlar, EGFR ile HER-2/neu, EGFR ile TOP2A genlerindeki kopya sayıları artışları arasında anlamlı bir ilişki bulunmadığını göstermiştir

2) Yapılan istatistiksel çalışma HER-2/neu ile TOP2A genlerinin kopya sayılarındaki artışla bu parametreler arasında anlamlı bir ilişki bulunduğunu göstermiştir. Onbeş olgunun 6'sında HER2 ve TOP2A genleri birlikte amplifiye olmuşlardır. Onbeş olgunun 6'sında hem HER-2/neu geninde hem de TOP2A geninde dizomi gözlenmiştir.

3) Klinik evre ile genler arasında yapılan istatistiksel çalışmada; klinik evre ile EGFR, TOP2A, HER-2/neu genlerindeki kopya sayısı artışları ile klinik evre arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır. HER-2/neu geninde kopya sayısı artışı gözlenen 7

olgunun evre IV'e ait olduğu tespit edilmiştir. İstatistiksel açıdan anlamlı bir sonuç elde edilememiş olmasına rağmen 15 hastanın 7'sinde gözlenen HER-2/neu gen amplifikasyonunun evre IV'e ait olması, ilerleyen zamanlarda hastaların takibi ile hastaların hayatta kalma süreleri, prognozu ile kurulacak ilişki açısından önemlidir. Bu sayede yeni takip ve tedavi protokollerinin geliştirilmesi sağlanabilir.

Çalışmamız Türk populasyonunda mide kanserli hastalarda EGFR, HER-2/neu ve TOP2A genlerinin amplifikasyonlarının araştırıldığı ilk çalışma olma özelliğindedir. Çalışmamızdan elde edilen verilerin, daha da anlam kazanabilmesi için hasta sayısının artırılması, hastaların sağ kalımları, tedavi protokolleri ve hastalığın prognozu gibi verilerin de eklenmesiyle çalışmanın genişletilmesi ve IHC, Western blot, real time q-PCR, array gibi moleküler yöntemlerle desteklenmesi gerektiği düşüncesindeyiz. Çalışmamız ve belirttiğimiz yönde yapılacak çalışmalar, ülkemizde mide kanserlerinin tedavisi amacıyla yeni adjuvan terapi protokollerinin geliştirilmesine ve bu protokollerin klinikte kullanımlarına ışık tutacaktır.



## 7.KAYNAKLAR

- 1) Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.D., The molecular biology of the cell, 2002, Third Edition, Garland Publishing Inc.,New York&London
- 2) Arıncı, K., Elhan, A., Anatomi 1. cilt, Güneş Kitabevi, 1997, 304–308s.
- 3) Artan, S. 1996, FISH tekniğinde kullanılan problemler ve özellikleri, Teorik ve Pratik Floresan In Situ Hibridizasyon, Ed.Başaran,N.; Etam, Eskişehir, 14-25s.
- 4) Artan, S. 1996, Rutin FISH uygulamaları, Teorik ve Pratik Floresan In Situ Hibridizasyon, Ed.Başaran,N.; Etam, Eskişehir, 51-59s.
- 5) Antonio, C. Wolff, M., Elizabeth, H., Hammond, Jared N. ,Schwartz, Karen L., Hagerty, D., Craig Allred, Richard J., Cote, et all., 2007; American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guideline Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer, J Clin Oncol, 25: 118-145p.
- 6) Barros-Silva, JD., Leitao, D., Afonso, L., Vieira, J., Dinis-Ribeiro, M., Fragoso, M., Bento, M.J., Santos, L., Ferreira, P., Rego, S., Branda, C., Carneiro, F., Lopes, C., Schmitt, F., Teixeira, M.R., 2009, Association of ERBB2 gene status with histopathological parameters and disease-specific survival in gastric carcinoma patients, British Journal of Cancer, 100, 487 – 493p.
- 7) Başaran, N., 1999, Tıbbi Genetik. 7. Baskı, Güneş ve Nobel Tıp Kitabevi, Bursa.

### **KAYNAKLAR(Devam ediyor)**

- 8) Cecilia, M., Fenoglio, Preiser., *Gastrointestinal Pathology An Atlas and Text*, Third Edition, 2008, 135–269p.
- 9) Ciampa, A., Xu, B., Ayata, G., Baiyee, D., Wallace, J. et al., 2006, HER2 status in breast cancer correlation of gene amplification by FISH with immunohistochemistry expression using advanced cellular imaging system, *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 14, 132-137p.
- 10) Ciardiello, F., De Vita, F., Oritura, M., Tortora, G., 2004, The role of inhibitors in nonsmall cell lung cancer, *Lippincott WLuiz Carlosilliams&Wilkins*, 16, 130-135p.
- 11) Christian, T.K., Stadtlander, H., Waterbor, J.W., 1999, Molecular epidemiology, pathogenesis and prevention of gastric cancer. *Carcinogenesis*;20(12);2195–2207p.
- 12) Cobleigh, M. A., Vogel, C. L., Tripathy, D., et al., 1998, Efficacy safety of herceptin as a single agent in 222 women with her2 expression relapsed following chemotherapy for metastatic breast cancer, *Proc Am Soc Clin Oncol.*, 376, 17-97p.
- 13) Cooper, M., 1997, *The cell, a molecular approach*, ASM Press Washington, D.C.
- 14) Cotran, R.S., Kumar, V., Robbins, S.L., 1992, *Biology of Tumor Growth, Neoplasia* In: Frederick J Schoen, editor. *Robbin's Pathology* 5th ed. W.B. Saunders , Chapter 7, 293-296p.

## KAYNAKLAR(Devam ediyor)

- 15) Cox, G., Vyberg, M., Melgaard, B., Askaa, J., Oster, A., O'Byrne, K., J., 2001, Herceptest: Her-2 expression and gene amplification in non-small cell lung Cancer, Int. J. Cancer, 92, 480-483p
- 16) David A. Owen, Histology for Pathologist, Second Edition, edited by Stephen S. Sternberg, 1997, 481-493p.
- 17) Der, R., Chandrasoma, P., 1999, Gastric Neoplasms In: Parakrama Chandrasoma, editor. Gastrointestinal Pathology 1st ed. Appliton and Lange; Chapter 5: 105-144p.
- 18) Ekmekçi, A., Erbas, D., Kanserin Moleküler Mekanizması, Onkogenler ve Büyüme Faktörleri, Ankara, 1991.
- 19) Erdoğan, N., 2005, Gastrik adenokarsinomlarda HER-2/neu (C-ErbB-2) ekspresyonunun klinik ve patolojik parametreler ile karşılaştırılması ve prognostik önemi, Taksim Eğitim Araştırma Hastanesi, Patoloji Kliniği, 12-13s. (yayınlanmamıştır)
- 20) Ernest W. April, Klinik Anatomi, 3. baskı, Çeviri Editörü Prof. Dr.Mehmet Yıldırım, Nobel Tıp Kitapevleri, 1998, 346-350p.
- 21) Fenoglio-Preiser, C., Carneiro, F., Correa, P., Gulford, P., Lambert, R., Megraud, F., 2000, Gastric Carcinoma. Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System, World Health Organization Classification of Tumours, Edited by Stanley R. Hamilton, Lauri A. Aaltonen , No:3 37-66p.

### **KAYNAKLAR(Devam ediyor)**

- 22) Franks, L., M., Teich, N., M., Cellular and molecular biology of cancer, 1998, Thied edition, Oxford Uni. Pres
- 23) Genes and Cancer. In: Weaver RF, Hedrick PW; eds. Genetics. 3rd ed. Wm. Dubuque C: Brown Publishers; 1997: 482-503p.
- 24) Gelehrler, T., D., Collins, F., S., Ginsburg, D., 1998, Principles of Medical Genetic, Second Edition.
- 25) Geoffey, M., C., Hausman, E., R., 2006, Hücre: Moleküler Yaklaşım, (Çev.: Sakızlı M., Atabey N.), İzmir Tıp Kitabevi, İzmir, 592-640s.
- 26) Gjerdrum, L., M., Sorensen, B.S., Kjeldsen, E., Sorensen, F., B., Nexø, E., Hamilton Dutoit, S., 2004, Real-Time Quantitative PCR of Microdissected Paraffin-Embedded Breast Carcinoma An Alternative Method for HER-2/neu Analysis, Journal of Molecular Diagnostics, 6: 42-51p.
- 27) Goustin, A., S., Leof, E., B., Shipley, G., D., Moses, H., K., 1986, Growth factors and cancer, Cancer Research, 46: 4015-1029, 14 p.
- 28) Gschwind, A., Fischer, O.M., Ullrich, A., 2004, The discovery of receptor tyrosine kinaes: targets for cancer therapy, Nature, 4: 361-370, 9 p.
- 29) Hofmann, M., Stoss, O., Shi, D., Büttner, R., Vijver, M., Kim, W., Ochiai, A., Rüschoff, J., Henkel, T., 2008, Assessment of a HER2 scoring system for gastric cancer: results from a validation study, Histopathology 52, 797–805p.
- 30) <http://www.med.gazi.edu.tr/egitim/donem1/dersler/kansergenetikaekmekci.html>

## KAYNAKLAR(Devam ediyor)

- 31) Janina, K., Anna-Maria, T., Pal, K., Nora, U., Aniko, K., Gaor, L., Zsuzsa, S., 2006, Detection of HER-2/neu gene amplification in breast carcinomas using quantitative real-time pcr- a comparison with immunohistochemical and fish results, Pathology Oncology Research, 12:197-204p.
- 32) Järvinen, T.A.H., Liu, ET., 2006, Simultaneous amplification of HER-2(ERBB2) and Topoisomerase II $\alpha$  (TOP2A) genes-molecular basis for combination chemotherapy in cancer, Current Cancer Drug Targets, 6:579-602p.
- 33) Kanta, S.Y., Yamane, T., Dobashi, Y., Mitsui, F., Kono, K., Ooi, A., 2006, Topoisomerase IIa gene amplification in gastric carcinomas: correlation with the HER2 gene. An immunohistochemical, immunoblotting, and multicolor fluorescence in situ hybridization study, Human Pathology, 37, 1333– 1343p.
- 34) Katai, H., Yoshimura, K., Maruyama K., Sasako M., Sano T., 2000, Evaluation of the new International Union Against Cancer TNM Staging for gastric carcinoma. Cancer, 88: 1796-180063.
- 35) Kelley, J.R., Duggan, J.M., 2003, Gastric cancer epidemiology and risk factors. Journal of Clinical Epidemiology, 56: 1-9p.
- 36) Kırışoğlu, C.E., Öztürk, C., Köktürk, N., 2003, Küçük hücreli dışı akciğer kanserinde epidermal büyüme faktör reseptörü ve inhibitörlerinin yeri, Solunum, 5:146-152s.

## KAYNAKLAR(Devam ediyor)

- 37) Kim Min A, Jung Eun Ji, Lee Hye Seung, Lee Hee Eun, Jeon Yoon Kyung, Yang Han-Kwang, Kim W.H., 2007; Evaluation of HER-2 gene status in gastric carcinoma using immunohistochemistry, fluorescence in situ hybridization, and real-time quantitative polymerase chain reaction, *Human Pathology*, 38, 1386-1393p.
- 38) Kim, M.A., Lee, H.S., Lee, H.E., Leon, Y.K., Yang, H.K., Kim, W.H., 2008; EGFR in gastric carcinomas: prognostic significance of protein overexpression and high gene copy number, *Histopathology*, 52,738-746p.
- 39) Kim, J.S., Kim, M.A., Kim, T.M., et al. 2009, Biomarker analysis in stage III–IV (M0) gastric cancer patients who received curative surgery followed by adjuvant 5-fluorouracil and cisplatin chemotherapy: epidermal growth factor receptor (EGFR) associated with favourable survival, *British Journal of Cancer* 100: 732-738p.
- 40) Kimura, M., Tsuda, H., Morita, D., Ichikura, T., Ogata, S., Aida, S., Yoshizumi, Y., Maehara, T., Mochizuki, H., Matsubara, O., 2004, A proposal for diagnostically meaningful criteria to classify increased epidermal growth factor receptor and c-erbB-2 gene copy numbers in gastric carcinoma, based on correlation of fluorescence in situ hybridization and immunohistochemical measurements, *Virchows Arch*, 445:255–262p.
- 41) Kono, K., Takahashi, A., Ichihara, F., Sugai, H., Fujii, H. and Matsumoto, Y., 2002, Impaired Antibody-dependent Cellular Cytotoxicity Mediated by Herceptin in Patient with Gastric Cancer, *Cancer Research*; 62: 5813-5817p.

### **KAYNAKLAR(Devam ediyor)**

- 42) Kufe, Pollock, Weichselbaum, Bast, Gansler, Holland, Frei, 2003, *Cancer Medicine* 6, BC Decker, Chapter 16.
- 43) Kumar, V., Cotran, R.S., Robbins, S.L., Robbins Temel Patoloji, 2003, (Çev: Çevikbaş U.), Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, 172-195 s.
- 44) Kranenbarg, E.K., Hermans, J., Krieken, JHJM van., Velde, CJH van de., 2001, Evaluation of the 5th edition of the TNM classification for gastric cancer: improved prognostic value. *British Journal of Cancer*, 84(1), 64-71p.
- 45) Krause, D.S., Van Etten, R.A., 2005, Tyrosine Kinases as Target for Cancer Therapy, *The New England Journal of Medicine*, 353: 172-87, 15 p.
- 46) Lewin, D., Lewin, K., 2003, Malignant: Adenocarcinoma, Stomach In: Weidner N, Cote RJ, Suster S, Weiss LM, editor. *Modern Surgical Pathology* 1st ed. Saunders, 672-680p.
- 47) Liang, Z., Zeng, X., Gao, J., Wu, S., Wang, P., Shi, X., Zhang, J., Liu T., 2008, Analysis of EGFR, HER2, and TOP2A gene status and chromosomal polysomy in gastric adenocarcinoma from Chinese patients, *BMC Cancer*, 8:363
- 48) Lüleyap, Ü., *Moleküler Genetiğin Esasları*, 2008, Nobel Kitabevi, 42-44s.
- 49) Mano, M.S., Rosa, D.D., Azambuja, E.D., Ismael, G.F.V., Durdecq, V., 2007, The 17q12-q21 amplicon: Her2 and topoisomerase – II $\alpha$  and their importance to the biology of solid tumors, *Cancer Treatment Reviews*, 33:64-77p.

### **KAYNAKLAR(Devam ediyor)**

- 50) Mitsui, F., Dobashi, Y., Imoto, I., Inazawa, J., Kono, K., Fujii, H., Ooi, A., 2007, Non-incident al coamplification of Myc and ERBB2, and Myc and EGFR, in gastric adenocarcinomas, *Modern Pathology*, 20, 622–631p.
- 51) Moutinho, C., Mateus, A., Milanezi, F., Carneiro, F., Seruca, R., Suriano, G., 2008, Epidermal growth factor receptor structural alterations in gastric cancer, *BMC Cancer*, 8-10p.
- 52) Nair, P., 2005, Epidermal growth factor receptor family and its role in cancer progression, *Current Science*, 88: 890-898p.
- 53) Nussbaum, R., L., McInnes, R., R., Willard, H., F., Thompson&Thompson *Tıbbi Genetik*, 2005, *Güneş Kitabevi*, 312-313p..
- 54) Park, D.I., Yun, J.W., Park, J.H., Oh, S.J., Kim, H.J., Cho, Y.K., Sohn, C.I., Jeon, W.K., Kim, B.I., et al. 2005, HER-2/neu amplification is an independent prognostic factor in gastric cancer, *Dig Dis Sci*, 51:1371–1379p.
- 55) Park, K., Han, S., Kim, H.Ş. & Shin, E., 2006, HER2 status in pure ductal carcinoma in situ and in the intraductal and invasive components of invasive ductal carcinoma determined by fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry, *Histopathology*, 48, 702-707p.



## KAYNAKLAR(Devam ediyor)

- 56) Pateras, I.S., Apostolopoulou, K., Koutsami, M., et al., 2006, Downregulation of the KIP family members p27 and p57 by SKP2 and the role of methylation in p57 inactivation non small cell lung cancer, *International Journal of Cancer*, 119, 11, 2546-2556 p.
- 57) Peter, T., Sîan, E., 2005, *Emery's Elements of Medical Genetics*, Twelfth Edition.
- 58) Pinto-de-Sausa, J., David, L., Almeida, R., Leitao, D., Preto, J.R., Seixas, M., Pimenta, A., 2002, *cerbB-2 expressionis associated with tumor location and venous invasion and influences survival of patients with gastric carcinoma. Int J Surgical Pathol*, 10: 247-256p.
- 59) Rieder, H., Bonwetsch, C., Janssen, L.A.J., Maurer, J., Janssen, J.W.G., Schwartz, S., Ludwig, W.D., Gassmann, W., Bartram, C. R., Thiel, E., Löffler, H., Gökbuget, N., Hoelzer, D. and Fonatsch C., 1998, High rate of chromosome abnormalities detected by fluorescence in situ hybridization using BCR and ABL probes in adult acute lymphoblastic leukemia, *Leukemia*, 12:1473-1481p.
- 60) Roder, J.D., Bottcher, K., Siewert, J.R., Busch, R., Hermanek, P., Meyer, H.C., 1992, Prognostic factors in gastric carcinoma. Results of the German Gastric Carcinoma Study. *Cancer*, 1993, 72: 2089-2097.
- 61) Roskoski, R., 2004, The ErbB/HER receptor protein-tyrosine kinases and cancer, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 319, 1-11p.
- 62) Ross, M.H., Kaye, G.I., Pawlina, W., 2003, *Histology A Text and Atlas*, Fourth Edition, LWW, 480–490p.,

### **KAYNAKLAR(Devam ediyor)**

- 63) Sadler, T., Langman's Medikal Embriyoloji, 1996, Çeviri editörü Prof.Dr. A.Can Başaklar, Palme yayıncılık, 7.baskı, , 236–240s.
- 64) Sammy Yasmin, K., Tetsu, Y., Yoh, D., Fumihiko, M., Koji, K., Akishi, O., 2006; Topoisomerase IIa gene amplification in gastric carcinomas: correlation with the HER2 gene. An immunohistochemical, immunoblotting, and multicolor fluorescence in situ hybridization study, Human Pathology, 37,1333-1343p.
- 65) Sasaki, K., Kawauchi, S., 2003, Molecular cytogenetic analysis of solid tumors, J. Orthop. Sci., 8, 457–459p.
- 66) Sharma, S.V., Bell, D.W., Settleman, J., Haber, D.A., 2007, Epidermal growth Factor Receptor Mutations In Lung Cancer, Nature, 7: 169-181p.
- 67) Slamon, D.F. Clark, G. M. Wong, S. G. Levin, W. J. Ullrich, A. McGuire, W. J. 1987, Human Breast Cancer Correlation of Relapse and Survival with Amplification of The HER2 oncogene, Science, 235: 177-182p.
- 68) Slamon, D.J., Godolphin, W., Jones, L.A., et al. 1989, Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer, Science, 244:707-712p.
- 69) Sobin, L.H. and Wittekin Ch., 1997, UICC TNM classification of malignant tumours Wiley-Liss: Newyork

## KAYNAKLAR(Devam ediyor)

- 70) Strachan, Tom., Read, Andrew P., 1999, Human Molecular Genetics 2, [Garland Science](#)
- 71) Takehana, T., Kunitomo, K., Kono, K., Kitahara, F., Iizuka, H., Matsumoto, Y., Fujino, M., Ooi, A., 2002, Status of *c-erbB-2* in gastric adenocarcinoma: a comparative study of immunohistochemistry, fluorescence in situ hybridization and enzyme-linked immuno-sorbent assay, *Int. J. Cancer*, 98, 833–837p.
- 72) Tanner, M., Hollmen, M., Junttila, T.T., Kapanen, A.J., Tommola, S., Soini, Y., Helin, H., Salo, J., Joensuu, H., Sihvo, E., Elenius, K., Isola, J., 2005, Amplification of HER-2 in gastric carcinoma: association with Topoisomerase II a gene amplification, intestinal type, poor prognosis and sensitivity to trastuzumab, *Annals of Oncology*, 16: 273-278p.
- 73) Toikkanen, S., Helin, H., Isola, J., Joensuu, H., 1992, Prognostic Significance of HER2 Oncoprotein Expression in Breast Cancer, *J. Clinical Oncology*, 10, 1044-1048p.
- 74) Walker, A. Rosemary, 1998, The erbB/HER Type 1 Tyrosine Kinase Receptor Family, *Journal of Pathology* 185, 234-235p.
- 75) WHO “World Cancer Report”, 2003, Genova (<http://www.who.int/cancer/en/>)
- 76) William, S., K., Cummings, M., R., *Genetik Kavramlar*, 2000, (Çev.: Öner C.), Palme Yayıncılık, Ankara, 635-636p.
- 77) Vert, V., Kenneth, W. K., 2004, Cancer genes and the pathways they control, *Nature Medicine*, 10, 789-799p.

- 78) Yano, T., Doi, T., Ohtsu, A. et al. 2006, Comparison of HER2 gene amplification assessed by fluorescence in situ hybridization and HER2 protein expression assessed by immunohistochemistry in gastric cancer, *Oncol. Rep.*, 15: 65–71p.

## ÖZGEÇMİŞ

### BİREYSEL BİLGİLER

**Adı Soyadı** : Hande SAYGILI

**Doğum Tarihi** : 16/01/1984

**Doğum Yeri** : Ankara

**Uyruğu** : T.C

**Medeni Durumu:** Bekar

### **İletişim Adresleri**

**Ev Adresi:** Şehitlik Mah. Kemal Bıyıkoğlu Cad. Balkent Sitesi C blok no:11

Daire:5 TÜRKİYE/ANKARA/Polatlı

**Cep:** 90 535 423 49 64

90 554 220 30 96

**E-Posta:** handelisaygili@gmail.com

### EĞİTİM DURUMU

**Lise:** Polatlı Anadolu Lisesi

09/2002-06/2006 Fen Bilimleri

**Üniversite:** Eskişehir Osmangazi Üniversitesi

09/2003-06/2007 Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü

**Üniversite:** Anadolu Üniversitesi

09/2007-06/2011 Açıköğretim Fakültesi, İşletme Bölümü

**Yüksek Lisans:** Eskişehir Osmangazi Üniversitesi

09/2007-02/2010 Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Genetik Ana Bilim Dalı

**Yabancı Dil:** İngilizce

**MESLEKİ DENEYİM**

**Biyolog**

09/2007-02/2010

**Eskişehir Osmangazi Üniversitesi**

Prenatal/Postnatal Sitogenetik ve Moleküler

Sitogenetik

**BİLİMSEL ETKİNLİKLER**

**Tıbbi Genetik Derneği**

06/05/2008-09/05/2008

Uluslararası Katılımlı 8. Ulusal Tıbbi Genetik

Kongresi

**İstanbul Üniversitesi Genetik Kulübü**

01/02/2007-04/02/2007

4. Ulusal Moleküler Biyoloji ve Öğrenci Genetik

Kış Okulu

**Kimyagerler Derneği**

12/05/2007

GMP(Good Manufacturing Practice)