

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

KÜÇÜK HÜCRELİ OLMAYAN AKCİĞER KANSER
DOKULARINDA HER2/NEU VE EGFR GENLERİNİN FLORESAN
İN SİTU HİBRİDİZASYON (FISH) YÖNTEMİYLE İNCELENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

PINAR ULUDAĞ

DANIŞMAN

YRD.DOÇ. DR. MUHSİN ÖZDEMİR

HAZİRAN 2008

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

KÜÇÜK HÜCRELİ OLMAYAN AKCİĞER KANSER
DOKULARINDA HER2/NEU VE EGFR GENLERİNİN FLORESAN
İN SİTU HİBRİDİZASYON (FISH) YÖNTEMİYLE İNCELENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

PINAR ULUDAĞ

DANIŞMAN

YRD.DOÇ. DR. MUHSİN ÖZDEMİR

Proje no: 200711010

KABUL VE ONAY SAYFASI

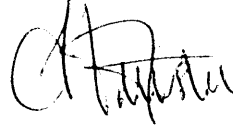
Pınar ULUDAĞ'ın Yüksek Lisans Tezi olarak hazırladığı "**Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanseri Dokularında HER2/neu ve EGFR Genlerinin Floresan In Situ Hibridizasyon (FISH) Yöntemiyle İncelenmesi**" başlıklı bu çalışma Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddesi uyarınca değerlendirilerek "**KABUL**" edilmiştir.

10.06.2008

Üye: Prof.Dr. Sevilhan ARTAN




Üye: Doç.Dr. M. Hamza MÜSLÜMANOĞLU



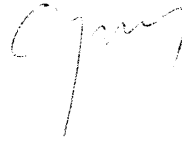
Üye : Yrd.Doç.Dr. Muhsin ÖZDEMİR



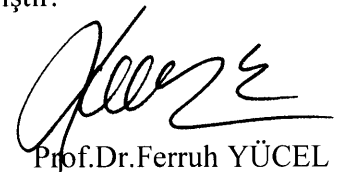
Üye: Yrd.Doç.Dr. Beyhan DURAK



Üye: Yrd.Doç.Dr. Güntülü AK



Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun **16./06/2008**. tarih ve **746./3452** sayılı kararı ile onaylanmıştır.



Prof.Dr.Ferruh YÜCEL

Enstitü Müdürü

ÖZET

Epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) ailesinde yer alan HER-2/neu ve EGFR genleri, tirozin kinaz aktivitesine sahip transmembran proteinleridir. Bu proteinleri kodlayan genlerin amplifikasyonları ve gen ekspresyonları küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (KHOAK) ve pek çok epitelyal kanser türünde araştırılmaktadır.

İstanbul Yedikule Göğüs Hastalıkları Hastanesinde, histopatolojik olarak incelenerek KHOAK tanısı almış olguların parafin bloklara gömülü dokularından kanser dokusu içeren 5 mikronluk kesitler pozitif şarjlı lamlara tespit edilmiştir. Çalışmaya 100 olgu alınmış, önce deparafinizasyon daha sonra HER-2/neu ve EGFR genleri için dizayn edilmiş problarla tümörlü dokularda kopya sayısı değişikliklerini belirlemede “altın standart” olarak kullanılan Floresan In Situ Hibridizasyon (FISH) yöntemi uygulanmıştır. Analiz edilen 100 olgunun 75’inden sonuç alınmıştır.

Literatürde KHOAK hastalarda HER-2/neu gen amplifikasyonu oranları %5.3 - %44, EGFR gen amplifikasyonu oranları ise %8.6-%47 gibi çok geniş bir yelpaze içerisinde belirtilmiştir. Yaptığımız bu çalışmada FISH yöntemi ile HER-2/neu gen amplifikasyonu için %13,3’lük, EGFR gen amplifikasyonu için %24’lük oran bulunmuştur. Çalışmamızda saptadığımız bu oranlar, en düşük ve en yüksek oranlar arasında bulunduğundan, literatürle uyumlu olduğu görülmüştür. Çalışmamızda bu genlerin amplifikasyonları ile olguların demografik ve histopatolojik bilgileri arasında anlamlı istatistiksel bir ilişki saptanamamıştır. Çalışmamız, Türk popülasyonunda bu gen amplifikasyonlarının KHOAK’de araştırıldığı ilk çalışma olma özelliğini taşımaktadır.

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

Anahtar kelimeler: Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, HER-2/neu, EGFR, FISH

SUMMARY

EGFR and Her2/neu genes which are members of epidermal growth factor receptor family are transmembrane proteins having tyrosine kinase activity. Copy number increase or over-expression of these genes encoding these proteins have been studied in many types of epithelial cancer and non-small cell lung cancer (NSCLC).

Five micron tissue sections of paraffin embedded cancer tissue from patients diagnosed as NSCLC histopathologically in Istanbul Yedikule Göğüs Hastalıkları Hospital were fixed to poly-L-lysine slides. 100 cases were included to the study. Following deparaffinizations of samples were performed and then Fluorescence in Situ Hybridization technique (FISH) which is a gold standard technique in detecting copy number changes in cancerous tissues was performed by using probes specifically designed for HER-2/neu and EGFR genes. No results could be obtained in 25 samples. The FISH success rate was 75% in deparaffinized slides.

In the literature, it is noted that the frequency of HER2/neu and EGFR gene amplifications are seen in a broad frequency range and they are 5.3-44% and 8.6-47% respectively. In our study the frequency of HER-2/neu gene amplification was determined as 13.3% and EGFR gene amplification was determined as 24% by FISH analysis. Since the frequencies obtained in our study are in the range of lowest and highest frequency in the literature, our study is comparable with the literature. In our study, association between the amplification of these genes and demographic and histopathological characteristics of patients can not be found significant statistically. Our study is important due to being the first study analyzing the amplification of these genes in NSCLC in Turkish population.

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

Key words: non-small cell lung cancer, HER-2/neu, EGFR, FISH

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	v
SUMMARY	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
TABLolar DİZİNİ	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2.GENEL BİLGİLER	4
2.1.Kanserin Tanımı.....	4
2.2. Kanser gelişim süreci.....	5
2.3. Kanser Türleri.....	6
2.4. Kanser ve Genetik	6
2.5. Kanser oluşumunda sorumlu genler ve fonksiyonları.....	8
2.5.1. Tümör baskılayıcı genler.....	9
2.5.2. DNA tamir genleri	10
2.5.3. Onkogenler.....	11
2.5.3.1. Onkogenlerin protein ürünleri.....	12
2.5.3.2. Onkogenlerin aktivasyonları.....	13
2.6. Hücre yüzey reseptörleri.....	15
2.6.1. Epidermal büyüme faktörü reseptörleri.....	16
2.7. Akciğer Kanseri.....	20
2.7.1. Akciğer kanserinin tipleri.....	21
2.7.2. Akciğer kanserinin moleküler biyolojisi.....	23

İÇİNDEKİLER(Devam ediyor)	Sayfa
2.7.2.1. Akciğer kanserlerinde büyüme faktörleri.....	24
2.7.2.1.1. Epidermal büyüme faktör reseptörleri ve küçük hücreli olmayan akciğer kanseri.....	25
2.7.2.1.1.1. Epidermal büyüme faktör reseptörleri İnhibitörleri.....	26
2.8.Floresan İn Situ Hibridizasyon.....	27
2.8.1. FISH Tekniğinde Kullanılan Problar ve Özellikleri.....	29
2.8.2. FISH Tekniğinin Temel Mekanizması.....	29
3.GEREÇ ve YÖNTEMLER.....	31
3.1. Gereç.....	31
3.1.1. Kullanılan Gereçler.....	31
3.1.2. Cam Malzeme.....	32
3.1.3. Kimyasal Maddeler.....	32
3.1.4.Kullanılan Problar.....	33
3.2 Yöntemler.....	33
3.2.1 Materyal Seçimi.....	33
3.2.2. FISH yönteminin uygulanması.....	33
3.2.2.1. Preparatların ön yıkaması ve denatürasyonu.....	37
3.2.2.2. Prob denatürasyonu.....	37
3.2.2.3. Hibridizasyon.....	38
3.2.2.4. Hibridizasyon sonrası yıkamalar.....	38
3.2.2.5. Preparatların mikroskopta incelenmesi.....	39
3.2.2.6. Değerlendirme.....	39
3.2.3. İstatistiksel Analiz.....	39

İÇİNDEKİLER(Devam ediyor)	Sayfa
4. BULGULAR	40
4.1 Yönteme İlişkin Bulgular.....	41
4.2. Çalışmanın İstatistiksel Bulguları.....	45
5. TARTIŞMA	48
5.1. Parafine Gömülü Dokuların Fikse Olduğu Preparatlardan Parafinin Uzaklaştırılması Protokollerinin Karşılaştırılması.....	48
5.2. HER-2/neu ve EGFR genlerinin FISH Yöntemi Sonuçları ile Her İki Geninde Beraber Çalışıldığı Literatür Bulgularının Karşılaştırılması.....	50
5.3. HER-2/neu Gen Amplifikasyonlarının FISH Yöntemi Sonuçları İle Literatür Bulgularının Karşılaştırılması.....	52
5.4. EGFR Gen Amplifikasyonlarının FISH Yöntemi Sonuçları İle Literatür Bulgularının Karşılaştırılması.....	55
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	58
7.KAYNAKLAR	60
ÖZGEÇMİŞ	

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1: EGF reseptör ailesi ve ligandları.....	26
Şekil 2.2: EGFR ailesi sinyal yolları.....	29
Şekil 4.1 : HER-2/neu geni ve sentromer 17 için normal hücrelere sahip bir olgunun FISH görüntüsü(Cep17 yeşil sinyal, HER-2/ <i>neu</i> kırmızı sinyal).....	42
Şekil 4.2 : HER-2/neu geni için gen kopya sayısı artışına sahip hücreler ve normal hücrelerin bir arada olduğu bir olgunun FISH görüntüsü (Cep17 yeşil sinyal, HER-2/ <i>neu</i> kırmızı sinyal).....	42
Şekil 4.3 : HER-2/neu geni için gen amplifikasyonuna sahip hücrelerin bulunduğu bir olguya ait FISH görüntüsü (Cep17 yeşil sinyal, HER-2/ <i>neu</i> kırmızı sinyal).....	43
Şekil 4.4 : EGFR geni ve sentromer7 için normal hücrelere sahip bir olgunun FISH görüntüsü(Cep7 yeşil sinyal, EGFR kırmızı sinyal).....	43
Şekil 4.5 : EGFR geni için kopya sayısı artışına sahip ve normal hücrelerin de bir arada bulunduğu bir olgunun FISH görüntüsü (Cep7 yeşil sinyal, EGFR kırmızı sinyal).....	44
Şekil 4.6 : EGFR gen kopya sayısı artışına sahip hücreler ve gen amplifikasyonuna sahip hücrelerin bir arada bulunduğu bir olgunun FISH görüntüsü(Cep7 yeşil sinyal, EGFR kırmızı sinyal).....	45

TABLÖLAR DİZİNİ

Sayfa

Tablo 3.1 : Deparafinizasyonda Kullanılan Solüsyonlar	35
Tablo 3.2 : Preparatların Ön Yıkama Solüsyonları.....	35
Tablo 3.3 : Preparatların Denatürasyon Solüsyonu.....	36
Tablo 3.4 : Hibridizasyon Sonrası Solüsyonlar.....	36
Tablo 3.5 : Görüntüleme Sistemleri Solüsyonu.....	37
Tablo 4.1 : Çalışma olgularının cinsiyet, sigara kullanımı ve aile öyküsü bilgilerine göre dağılımları.....	40
Tablo 4.2 : Çalışma olgularının grade ve histopatoloji bilgilerine göre dağılımları.....	41
Tablo 4.3 : Çalışma olgularında FISH yöntemi ile belirlenen HER-2/neu ve EGFR genlerinin amplifikasyonlarının olguların cinsiyet, sigara kullanımı aile öyküsü bilgilerine göre dağılımları.....	46
Tablo 4.4 : Çalışma olgularında FISH yöntemi ile belirlenen HER-2/neu ve EGFR genlerinin amplifikasyonlarının olguların grade ve histopatoloji bilgilerine göre dağılımları.	47
Tablo 5.1 : HER-2/neu ve EGFR gen amplifikasyon sonuçlarının litaretür verileri ile karşılaştırılması.....	54

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler	Açıklama
CISH	Cromogenik In Situ Hibridizasyon
DAPI	4',6'-diamino-2-fenilindol
DNA	Deoksiribonükleik Asit
EGFR	Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü
FISH	Floresan In Situ Hibridizasyon
g	Gram
HER-2/neu	Human Epidermal Growth Factor Receptor-2
IHK	İmmünohistokimyasal Boyama Tekniği
kDA	Kilo Dalton
KHAK	Küçük Hücreli Akciğer Kanseri
KHOAK	Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanseri
ml	Mililitre
mRNA	Messenger Ribonükleik Asit
NaCl	Sodyum klorür
NaOH	Sodyum hidroksit
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	Ribonükleik Asit
RT PCR	Revers Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SSC	NaCl ₇ Trisodyum Sitrat
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
µl	Mikrolitre
µg	Mikrogram

1.GİRİŞ ve AMAÇ

Kanser, günümüzün en önemli sağlık problemlerinden biridir ve görülme sıklığı giderek artmaktadır. Bu nedenle toplum sağlığını tehdit eden önemli hastalıkların başında yer almaktadır (35).

2003 yılında Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından yayınlanan raporda, kanserli hasta sayısının hızla arttığı ve 2020 yılında, bu oranın %50 artarak bu sayının on beş milyon kişiye çıkacağı bildirilmiştir. Yayınlanan bu raporla yıllık bir milyon iki yüz bin yeni vaka ile birlikte dünya üzerinde en sık rastlanan kanser tipinin akciğer kanseri olduğu açıklanmıştır (83).

Mortalitesi en yüksek kanser türü akciğer kanseridir. Ölüm nedenleri arasında kardiyovasküler hastalıklardan sonra 2. sırada yer almaktadır. ABD’de 1996 yılında altmış dört bin kadın akciğer kanserinden, kırk dört bin kadın ise meme kanserinden ölmüştür. Tüm dünya ortalamasına bakıldığında akciğer kanseri erkeklerde birinci, kadınlarda da meme kanserinden sonra ikinci sıradadır (26).

Ülkemizde resmi rakamlara göre her yıl yirmi ile yirmi beş bin yeni akciğer kanseri ortaya çıkmakta ve bu rakamın otuz ile kırk bine kadar artabileceği düşünülmektedir. Ülkemizde genellikle akciğer kanserleri sıklıkla erkeklerde görülmektedir. Fakat son yirmi beş yılda kadınlarda sigara tiryakiliğinin artması ülkemizde bu oranın hızla değişmesine sebep olmuştur ve kadınlarda meme kanserinden sonra en sık görülen kanser tipi haline gelmiştir. Sağlık Bakanlığı verilerine göre 1983-1989 yılları arasında ülkemizde kanser sıklığı 32/100.000’dir. Bunun %26 lık bölümünü ilk sıradaki akciğer kanseri oluşturmaktadır. Solunum sistemi kanserlerinin 1991-1992 verilerine göre oranı tüm kanserler içinde %43’tür (33).

Akciğer kanserlerinin başlıca nedeni sigaradır. Risk sigara kullanma süresi, sigara kullanımına başlama yaşı ve kullanılan sigaranın türüne göre değişmektedir. Aktif sigara kullanımı birinci risk faktörüken ikinci risk faktörü de pasif sigara içiciliğidir.

Pasif sigara içiciliğinin tek başına ortalama 1.2-1.3 kat riski arttırdığı bildirilmektedir (33).

WHO'nun verilerine göre; sigara kullanımı dünyada yılda beş milyon insanın ölümüne neden olmaktadır. Önümüzdeki 20 yıl içerisinde bu sayının iki katına çıkması beklenilmektedir. Tahminlere göre, bugün tüm dünyada sigara kullanıcıları bir milyar üç yüz bin civarında ve 2025 yılında bu sayının bir milyar yedi yüz bini bulması beklenmektedir (83).

Akciğer kanserinin başlıca nedeninin sigara kullanımı olmasına rağmen; tüm içicilerin sadece % 10-20'sinde akciğer kanseri gelişimi, genetik yatkınlığın önemine işaret etmektedir. Literatürde hem sigara kullanan hem de kullanmayan akciğer kanserli hastaların yakınlarında kanser riskinin yaş, cinsiyet, mesleki maruziyet ve sigara kullanımından bağımsız 2-4 kat artmasının kalıtımla ilişkili olduğunu göstermektedir (69,82).

Ailesel yatkınlık akciğer kanserine yakalanma riskini artırmaktadır. Hiç sigara kullanmamış ve ailesinde akciğer kanseri öyküsü bulunan bir kadında akciğer kanserine yakalanma riski aile öyküsü olmayanlara göre 2,8 kat daha fazla olduğu literatürlerde bildirilmektedir (85).

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 (23).

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, bir çoğunu kanserin teşkil ettiği birçok hastalıkta aktivasyonları veya aşırı ekspresyonları gösterilmiş, tirozin kinaz reseptörleri ailesine mensup bir transmembranik reseptör ailesidir (44).

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.

Yaptığımız çalışmada,

1. Küçük hücreli olmayan akciğer kanserlerinde HER-2/neu ve EGFR onkogenlerinin FISH tekniği için dizayn edilmiş sentromer ve lokus spesifik gen bölgelerini inceleyerek bu genlerdeki olası amplifikasyonları belirlemek,

2. Hastalarımıza ait demografik ve histopatolojik bilgilerle bulduğumuz sonuçlar arasında ilişki saptayabilmek,

3. Türk toplumunda küçük hücreli olmayan akciğer kanserli hastaların HER-2/neu ve EGFR genlerindeki amplifikasyon frekansını hesaplamak ve akciğer kanserleri için geliştirilecek tedavi yöntemlerine de ışık tutmak amaçlanmıştır.

2.GENEL BİLGİLER

Kanser hücrelerin yaşam sikluslarını düzenleyen mekanizmaların bozulması sonucunda hücrenin aşırı, kontrolsüz ve agresif şekilde çoğalmasıyla ilerleyen, çağımızın en önemli sağlık problemlerinden birisidir (23). Kanser, Sağlık Bakanlığı'na "bildirimi zorunlu" bir hastalıktır. Buna rağmen ülkemizde gerçek kanser insidansı bilinmemektedir. Dünya Sağlık Örgütü (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 (83).

2.1.Kanserin Tanımı

Kanser farklı bilim dallarında değişik tanımları olan; birden fazla mekanizmayı etkileyen bir durumdur. Genellikle tek bir hastalık gibi görünse de, gerçekte birbirinden ayrı hücre ve dokuları etkileyen karmaşık bir hastalık grubudur (85).

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 (56). 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 kütlesi" şeklinde tanımlamıştır (46). Neoplazinin kanser olabilmesi için kontrolsüz büyümesi, komşu dokuları istila edebilmesi veya metastaz özelliğine sahip olması gerekmektedir (56). Tüm neoplazilerin kökeninde normal büyüme kontrollerine verilen yanıtın kaybolması bulunur. Neoplazmlar genel olarak "tümör" adıyla bilinir. Tümörlerle ilgilenen bilim dalı ise "onkoloji" adıyla anılır (46).

Kanser hücredeki bu temel düzenleyici mekanizmaların kusurlarından kaynaklandığı için, özellikle moleküler ve hücresel düzeyde değerlendirilmesi gereken bir hastalıktır. Kanser hücreleri, hücrenin normal davranışlarını kontrol eden sinyallere doğru tepkileri göstermezler onun yerine, kontrolsüz bir şekilde çoğalmayı sürdürerek,

normal doku ve organları da istila ederler. Bu şekilde sistemlere ve hatta tüm vücuda yayılırlar (23).

Hücre bölünmesi hücre siklusuna bağlı olarak ilerler. Oysa kanser de hücrelerin hücre çoğalması hücre siklusunun kontrolünün kaybolması ile hızlanmıştır (85).

Kanser hücrelerinin büyüme ve çoğalma süreci, meydana gelen genetik değişiklikler (onkogenler, tümör baskılayıcı genler, DNA tamir mekanizma genleri), konakçı faktörleri (enzim polimorfizmi) ve tümör konakçı etkileşimi (anjiogenez, invazyon, metastaz) ile yakından ilişkilidir (19,20). Hücrenin bu temel düzenleyici mekanizma bozuklukları kanserin meydana gelmesine yol açarlar. Bu bakımdan kanserin tanısı ve tedavisi için anahtar, moleküler ve hücresel düzeydeki değerlendirmelerdedir (27).

2.2. Kanser gelişim süreci

Kanser oluşumu ve gelişimi olan Karsinogenez çok basamaklı bir süreçte değişik karsinojenlerin (kimyasal, fiziksel ve viral) etkisiyle oluşur. Karsinojenler ölümcül olmayan, genetik ve epigenetik hasarlanmalara neden olarak kanseri meydana getirirler. Fakat hemen tümör oluşumuna sebep olmazlar. Kimyasal madde, radyasyon gibi karsinojenlerin veya virüslerin etkisiyle hasara uğrayan tek bir hücre, bir dizi olay zinciri sonrasında tümör gelişimine sebep olur. Kanserde oluşan genetik değişiklikler, kromozomal düzeyde (kromozom kayıpları) ya da tek bir nükleotid düzeyinde (tek ya da multipl baz değişiklikleri) olabileceği gibi hiç baz değişikliği olmadan metilasyon, asetilasyon mekanizmaları ile oluşabilir (23,46,55).

Kanserin oluşum basamaklarından birincisi tümör başlangıcıdır. Tek bir hücrenin anormal davranışlarına paralel olarak klonal tümör hücrelerinden meydana gelen hücre topluluğu giderek büyür. Her adımda, çoğalan her bir hücre yeni bir mutasyona sahip olur. Böylelikle meydana gelen mutasyonlar hücreye yaşamını devam ettirmesinde kolaylık sağlar. Ortama adaptasyonu kolaylaşır ve diğer hücrelerin önüne geçer. Tümörün ortam koşulları değişip, besin ve oksijen miktarı azaldığında büyüme çevredeki normal dokular tarafından engellenebilir. Fakat koşulların değişimine iyi

adapte olabilen kanser hücresinden köken alan hücreler çoğalmaya devam eder ve lezyon baskın duruma geçer. Tümör büyümeye başlar. Çoğalma devam ettiği sürece ortaya çıkabilecek mutasyonlar kanser hücrelerine yeni avantajlar sağlar. Büyüme ve çoğalmadaki hızları artarak tümör topluluğu içinde gittikçe daha baskın özellikler kazanırlar (1,23).

2.3. Kanser Türleri

Neoplazmın potansiyel klinik davranışının değerlendirilmesinde benign ve malign olarak iki sınıfa ayrılır.

Bir tümörün sitolojik ve gros özelliklerine bakılarak lokalize şekilde kalacağı, diğer bölgelere yayılmayacağı söylenebilir. Bu gibi durumlarda lokal cerrahi yöntemlerle alınıp, hastanın sağ kalımını etkilemeyeceği düşünülür, ve bu tip tümörlere “benign” tümör denir.

Malign kelimesi, komşu yapılara invaze olup, onları tahrip edebileceğini ve oluştuğu bölgeden ayrı bir yere yayılarak (metastaz yaparak) ölüme yol açabileceğini anlatır. Malign tümörlerin hepsi kanser olarak adlandırılır (23).

Kanser olgularının %80'ini vücudun 11 bölgesinde ortaya çıkan kanserlerden oluşur. Kanserlerin yarısından fazlasını oluşturan dört kanser türü prostat, meme, akciğer ve barsak/rektum kanserleridir (23).

2.4. Kanser ve Genetik

Kanser, hücrelerin bölünmek için sahip oldukları kontrol mekanizmalarını kaybettikleri bir durumdur. Bu mekanizmaların yazılımları genetik koddadır ve ancak genetik kodun zarar görmesi halinde bu kontrolsüzlük meydana gelebilir. Kanserli hücrelerde genetik bozukluklar hücrenin sahip olduğu genomda farklı organizasyon düzeylerinde gerçekleşmektedir. Bu doğrultudan ele alındığında ‘kansere genetik bir hastalıktır (51).

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. Kanserin başlangıcında farklı kanser türlerinde farklı genlerin varlığı bildirilmektedir (56). 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

Farklı kanser türlerin gelişiminde bu genlerde farklı bozuklukların ve hasarların oluşması literatür tarafından da desteklenmektedir. Bu veriler “bir kanserin sporadik olaylardan dolayı bireyde gözlenmesine ya da herediter bir özellik göstererek ailede bazı bireylerde tekrar etmesine bakılmaksızın kanser genetik orijini olan bir hastalıktır” varsayımını doğrular niteliktedir (23,55).

Kanser ile diğer genetik hastalıklar arasında temel iki farklılık bulunmaktadır. İlk olarak kanser, çoğunlukla somatik hücrelerde meydana gelen genetik değişiklikler sonucu ortaya çıkmaktadır. Buna karşın diğer genetik hastalıklar genellikle germ hücrelerini de etkileyen bir mutasyon sonucu ortaya çıkarak nesilden nesile aktarılabilirler. İkinci temel farklılık, kanserin tek bir mutasyon sonucu ortaya çıkmamasıdır. Birden çok mutasyonun birikimi ile kanserin ortaya çıkması kanserin türüne bağlı olarak değişir (49).

Bazı germline mutasyonlar kanser gelişme olasılığını artırırlar. Bu mutasyonlar neoplastik kanser gelişiminin başlangıcını oluştururlar. Germline neoplastik taşıyıcısı bireylerde kansere yatkınlık artar ve kanser daha erken yaşlarda ortaya çıkar. Bu da bir çok kanser türünün daha agresif prognoza sahip olmasına zemin oluşturur (79).

Malignensi biriken mutasyonların farklılaşması bununla beraber gelişmesine bağlıdır. Mutasyonların gelişebilmeleri onların farklılaşma sıklığıyla ilişkilidir. Ortamda bulunan kimyasallar radyasyon ve ultraviyole ışınlar başkalaşımın daha çok oluşmasına neden olabilecekleri gibi hücre içi bozukluklar da başkalaşımın sıklığını etkiler. Örnek olarak DNA tamir mekanizması hasarı nedeniyle oluşan Xeroderma Pigmentosum DNA tamir mekanizmalarının üzerinde bir hasara neden olarak başlar. Bu hasarın oluşması tamir mekanizmasını devreden çıkarır. Böylece ultra viyole kaynaklı DNA hasarının tamir edilememesine o da hastalığın ortaya çıkmasına neden olur (1,49).

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 (58).

2.5 Kanser oluşumunda 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 (23). Kanser oluşumunda etkili olan genler;

- 1- Tümör süpresör genler
- 2- DNA tamir genleri
- 3- Onkogenlerdir (1,79,85).

Kanser hücrelerinin tipik kontrolsüz çoğalma isteği ve invaze olabilme yeteneği yukarıda gruplanan genlerde ve onların sahip oldukları mekanizmalarda ortaya çıkan bozulmalardan dolayıdır (23). 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 (1,71).

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 (71).

2.5.1. Tümör baskılayıcı genler

Tümör baskılayıcı genler, hücre çoğalmasının kontrolünde onkogen mekanizmasının tam tersi bir yolu simgeler, normal koşullarda hücre çoğalmasını ve tümör gelişimini baskırlar. Oluşan birçok tümörde bu genlerin hasar görmesi veya inaktive olması sonucu hücre çoğalmasını negatif yönde düzenleyen etki ortadan kalkar ve tümör hücrelerinde anormal çoğalma başlar (1).

Tümör baskılayıcı genlerinin kontrolsüz hücre proliferasyonunu kontrol etme ve inhibe etme yeteneği vardır. Bu yeteneği ancak ilgili genin her iki allelinde de başkalaşım olması durumunda kaybolur. Tümör baskılayıcı gen kontrol etme fonksiyonunu kaybeder.

İlk tümör baskılayıcı gen, retinoblastomda tanımlanmıştır. İncelenen vakalarda hasta ailelerin de bulunması ile bazı retinoblastom vakalarının kalıtsal olduğu anlaşılmıştır. 1971 yılında Knudson retinoblastom gelişmesi için iki mutasyonun gerekli olduğunu açıklayan bir hipotez öne sürmüştür. Bu durumu ifade eden hipotez, “Knudson hipotezi” veya “iki vuruş” hipotezi olarak adlandırılmıştır. Günümüzde bu görüş tek bir tümör baskılayıcı genin iki kopyasının da fonksiyon kaybına neden olan hem herediter hem sporadik kanserler için temel kabul edilen bir model oluşturur.

Ailesel geçiş gösteren kanserlerde ilk vuruş parental eşey hücrelerinde tümör baskılayıcı genin bir alelinin mutasyona uğraması, ikinci vuruş da diğer alelin farklı mekanizmalar ile somatik mutasyonudur (72). Sporadik kanser formunda ise, her iki mutasyonda somatik hücrelerde oluşur (23,32,55,71).

2.5.2. DNA tamir genleri

DNA birçok çeşitli kimyasal reaksiyonlardan geçer. DNA hücre genomunun kalıcı kopyası olduğu için yapısındaki değişiklikler, diğer hücre komponentleri olan RNA ya da proteinlere göre çok daha önemli sonuçlara neden olur. Başkalaşım, DNA replikasyonu sırasında yanlış bazların DNA ya katılması nedeniyle oluşur. Ayrıca DNA da spontan veya kimyasal ajanlara, radyasyona maruz kalma durumunda da çeşitli kimyasal değişiklikler ortaya çıkar. Hücre genomunun bütünlüğünün korunabilmesi için hücreler harap olan DNA’yı tamir etmek için mekanizmalar geliştirmek durumundadırlar. Bu DNA tamir mekanizmaları iki ana gruba ayrılır:

1. DNA hasarından sorumlu kimyasal reaksiyonun direkt olarak önlenmesi
2. Hasar olan bazların DNA’dan çıkarılması (23,55).

Ancak bu gruba dahil olan genlerde oluşacak başkalaşım, fonksiyonel ürün sentezlenmesini engellediği için DNA tamir edilemeyecek ve genom dengesi bozulacaktır ki bu da karsinogeneziste önemli bir etkidir. Örneğin Kalıtsal nonpoliposis kolorektal kanser gelişiminin %50 kadarındaki moleküler patoloji, yanlış-

eşleşme tamirinden sorumlu genlerdeki başkalaşımın nedeniyle tamirinin gerçekleşmemesidir (13).

2.5.3. Onkogenler

Onkogenler ilk kez yüksek derecede onkojenik virüslerin izolasyonu sonucu elde edilmiştir. Retroviral onkogenlerin oluşmasına öncülük eden hücresel genlere 'protoonkogen' adı verilmiştir. Onkogenler yine tümör virüsleri ile yapılan çalışmalar da, hücreleri transforme edebildikleri gösterilerek, kanserin moleküler temelleri hakkında ilk bulguların oluşturulmasını sağlamışlardır. Protoonkogenler, genellikle hücrenin normal çoğalmasını denetleyen sinyal yollarında görev yapan genlerdir. 'Onkogenler' ise protoonkogenlerin anormal ya da mutant eksprese olan şekilleridir. Böylece, onkogenler artan hücre proliferasyonuna ve tümör gelişimine sebep olurlar (23).

Protoonkogenler sinyal iletimini, hücresel farklılaşmayı ve hücre proliferasyonunu kontrol ederler. Sinyal iletimi karmaşık ve çok aşamalı bir şekilde hücre membranından başlayıp, sitoplazmaya ve nükleusa kadar gider. Normal hücre farklılaşması ve proliferasyonu için pozitif ve negatif feed back mekanizmalarıyla protoonkogen tiplerinin çeşitliliği önemlidir.

Protoonkogenler, protein ürünleri, temel biyolojik olayları düzenleyen ve evrim boyunca yüksek oranda korunmuş genlerdir. Protoonkogenler sinyal iletiminde 3 temel noktada görev yapar:

1. ATP'nin fosfat grubunun transferi ile proteinlerin serin, treonin ve tirozin aminoasitlerinin fosforilasyonunu sağlar. Böylece protein konfigürasyonunda değişiklik yaparak proteinin kinaz özelliğini aktive eder ve sinyal iletimini sağlayan proteinler için bağlanma bölgeleri oluştururlar. Bu durum Epidermal büyüme faktör ailesi protoonkogenleri için bir örnektir.

2. RAS ailesi protoonkogenleri GDP/GTP döngüsünde aracı olarak görev yaparlar.

3. Nükleus içindeki proteinlerdir ve gen ekspresyonu, DNA replikasyonu ayrıca hücre döngüsünün kontrolünde görev yaparlar (60).

2.5.3.1. Onkogenlerin protein ürünleri

Onkogenler ve bununların ürünü olan onkoproteinler uyarı ileti akışları üzerindeki rollerine göre 5 ana başlıkta sınıflandırılabilir.

a) Büyüme faktörleri: Hücrenin dışından başladığında büyüme faktörlerini kodlayan genlerin mutasyonları onları onkogenik hale getirebilir. Çoğu durumda büyüme faktörü kendi başına değişime ya da mutasyona uğramaz. Ancak Ras gibi diğer onkogenlerin ürünleri büyüme faktörü genlerinin aşırı ekspresyonuna neden olur ve böylece transforme edici büyüme faktörü- α (TGF- α) gibi büyüme faktörlerini büyük miktarda salgılamaya zorlar. Bu büyüme faktörü epidermal büyüme faktörü (EGF) ile ilişkilidir ve EGF reseptörüne bağlanarak hücre proliferasyonunu indükler.

b) Büyüme faktörü reseptörleri: Büyüme faktörü reseptörlerinin mutasyona uğramış şekillerini kodlayan çok sayıda onkogen bulunmuştur. Bu reseptörlerin normal şekillerinde tirozin kinaz aktivitesi spesifik büyüme faktörlerine bağlanarak aktive edilir. Onkogenik versiyonları ise büyüme faktörüne bağlanmaksızın, sitoplazmik tirozin kinaz aktivasyonu ile karakterizedir. Yani mutant reseptör proteinleri hücreye sürekli olarak mutajenik uyarılar gönderir (46).

c) Sinyal ileten proteinler: Normal sitoplazmik sinyal üreten proteinlerin fonksiyonlarını taklit eden onkoproteinlere ait birçok örnek bulunmuştur. Bunlardan en önemlisi olan Ras onkogeni insanlarda oluşan tüm tümörlerin yaklaşık $\frac{1}{4}$ 'ünde mutant halde bulunur.

d) Nükleustaki düzenleyici faktörler: Sonunda tüm ileti transdüksiyon yolları nükleusa girer ve hücre döngüsünü kontrol eden genlerin üzerine etki eder. Dolayısıyla DNA transkripsiyonunu düzenleyen genleri etkileyen mutasyonların da malign formasyona neden olması kaçınılmazdır. Myc geni insan tümörlerinde en sık bulunan nükleer onkogendir. Burkitt lenfoma, nörablastoma ve küçük hücreli akciğer kanserleri ile ilişkisi tanımlanmıştır.

e) Mitokondriyal onkogenler: Bu grup içerisinde en belirgin örnek Bcl-2 genidir. Bcl-2 proteini mitokondriyal membrana yerleşir ve apoptozu engeller. Diğer onkogenlerden farklı olarak hücre proliferasyonuna neden olmayan Bcl-2, hücrenin ömrünü artırarak diğer protoonkogenleri ve tümör baskılayıcı genleri etkileyen diğer mutasyonlara fırsat verir (46).

2.5.3.2. 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 (45).

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 (1,56,65).

B lenfositlerin tümörü olan insan Burkitt lenfoması ve fare plazmasitomlarında ilk kez kromozom translokasyonu sonucu oluşan onkogen aktivasyonu *c-myc* geninde gözlemlenmiştir (13,21,56). *c-myc* geni, büyüme faktör uyarısı ile aktif hale geçen bir transkripsiyon faktörüdür ve kontrolsüz ürün oluşturması hücre proliferasyonunu yönlendirir, böylece tümör gelişimi gerçekleşir (56).

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 (1,13,56). Bu translokasyon sonucunda *bcr/abl* füzyon proteini sentezlenir (22,32). *Abl* protoonkogeni onkogenik aktivite kazanmıştır (1,13,56,85).

İnsan tümörlerinde onkogenlerin aktive olmasında diğer 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 boyalı alan bölgeler (HSR'ler) veya double-minute kromozomlar (DM) olarak ifade edilen karyotipik bozukluklara sebep olur.

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 (45,60).

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 (1,56). Ayrıca Ras gen ailesi üyeleri içinde yer alan K-ras ve N-ras çeşitli karsinomlarda sporadik olarak amplifiye olurlar (45).

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.

2.6. 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 (1,46).

2.6.1. Epidermal büyüme faktörü reseptörleri

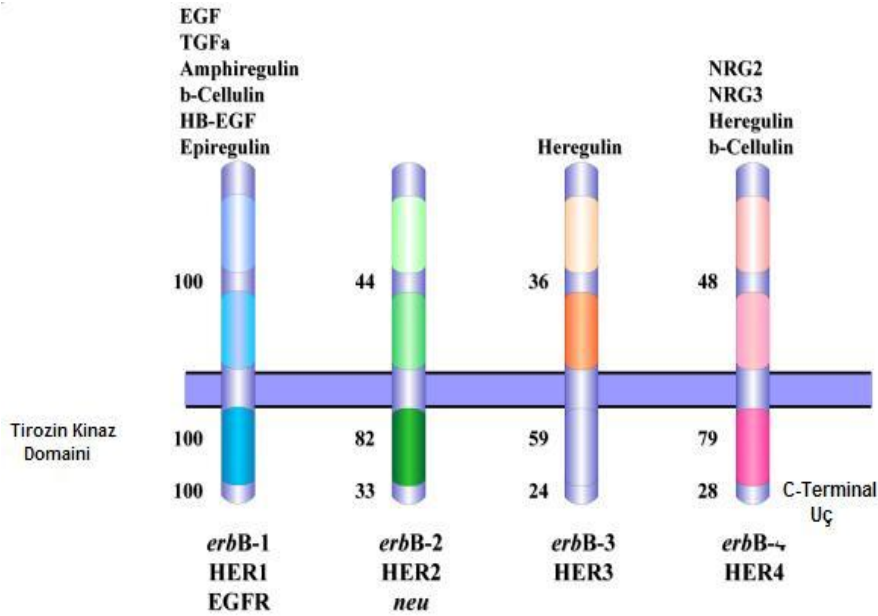
Epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR, ErbB-1, HER-1) ilk keşfedilen reseptör tirozin kinazdır. Hücre içi sinyal yollarının aktivasyonundan sorumlu mekanizmaların bir çoğu EGFR ile yapılan çalışmalarda ortaya konmuştur. EGFR' nin belirlenmesinin ardından aynı reseptör ailesinin üç üyesi daha bulunmuştur. 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 aktivasyonunu 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- α), heparin bağlayıcı EGF(HB-EGF), amfiredulin(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.

Yapılan çalışmalarda ErbB-2'nin bilinen hiçbir liganda bağlanmadığı ortaya çıkmış, bu gelişme de bilim dünyasında büyük merak uyandırmıştır. Bu yüzden literatürde en sık incelenen ErbB-2 olmuştur. Bu çalışmalarda ErbB-2'nin memeli hücrelerinde tirozin fosforilasyonunu uyaran, 44 kD'luk bir glikoprotein olan neu diferansiyasyon faktör (NDF, heregulin) bulunmuştur. Önceleri NDF'nin ErbB-2'nin spesifik ligandı olduğu düşünülürken sonraki çalışmalarda overyan ve fibroblast hücre

serilerinde NDF'nin ErbB-2 ile hiç bağlanmadığı ortaya konmuştur. Ancak NDF varlığında NDF'nin çeşitli izoformlarına bağlı olarak ErbB-2'nin EGFR, ErbB-3 ve ErbB-4 ile heterodimer oluşturarak NDF'nin bağlanmasına olanak sağladığı ve çeşitli hücre içi cevapların meydana getirildiği gösterilmiştir (42,63).

Bu gelişmeden sonra EGFR ailesindeki reseptörlerin heterodimer oluşturma özellikleri incelenmiş, ve BTC ligandı ile ilgili de benzer bulgular ortaya konmuştur. BTC ErbB-4'ü tek başına uyarabildiği gibi bazı durumlarda ErbB-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 (11,28,32,42,53,63).



Şekil 2.1: EGF reseptör ailesi ve ligandları

(http://www.cancerpublications.com/newsletter/hematolgical/amger_slide/article1/2)

Epidermal büyüme faktör reseptörlerinin yapısı: ErbB-1 geni, insanda 7. kromozomun 7p11.2 bölgesinde lokalizedir. Gen içinde 28 ekzon içerip, 170 kDA' luk glikoprotein kodlar. ErbB-2 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

Hücre dışı domain L1, CR1, L2 ve CR2 olmak üzere dört farklı bölgeden oluşur. ErbB-1'de L1 ve L2 bölgeleri arasına ligand bağlanırken, ErbB-2'de bu bölgeler arasında güçlü bir etkileşim bulunduğundan ErbB-2'nin ligand bağlama yeteneği kaybolmuştur. Bu sebeple de ErbB-2'nin fonksiyonel olabilmesi için ailenin diğer üyeleriyle heterodimer oluşturması gerekmektedir. CR1 ve CR2 domainleri çeşitli küçük moleküllerden meydana gelmiştir. Her biri bir veya iki disülfid bağıyla bir arada tutulur. Hücre içi domain ise C-terminal düzenleyici bölge ve tirozin kinaz bölgesine sahiptir. TK bölgesi N ve C olmak üzere iki lobtan oluşur. N-terminal lob ve daha büyük C- terminal lob arasında ATP bölgeleri yer alır. EGFR'nin C- terminal lobu tirozin aminoasitleri içerir. Reseptör üzerindeki bu alıcı tirozin aminoasitlerine ATP'nin γ -fosfat gruplarından ATP transfer edilir. Bu şekilde EGFR aracılığıyla sinyal iletimi tirozin aminoasitlerinin fosforilasyonu ile gerçekleştirilmiş olur (28,81).

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:

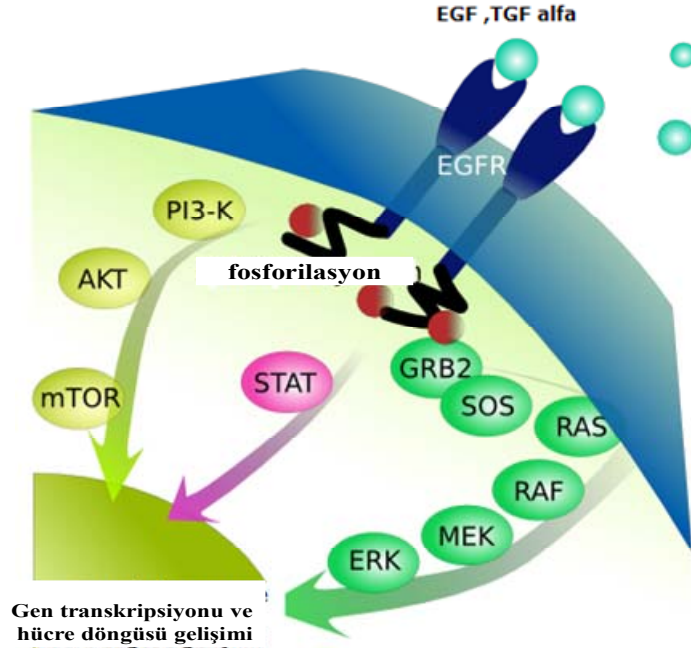
RAS/ERK yolu: Grb2 veya Shc proteinlerinin fosforile olmuş ErbB reseptörlerine bağlanmasıyla ERK yolağı aktive olmuştur. SOS (Son of sevenless) aktive olmuş reseptör dimerine bağlanır. SOS daha sonra Ras'ı aktive ederek Raf-1'in de aktive

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.

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' daki domainin fosforile olmuş tirozinlere bağlanması ile gerçekleşir. PI-3 kinazın katalitik alt birimi fosfotidilinozitol(4,5) bifosfatı fosforile ederek PtdIns(3,4,5)P₃' 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)P₃'ün temel efektörü AKT'tir. AKT, anti-apoptotik proteinlerin transkripsiyonu ile hücre devamlılığını sağlar.

JAK/STAT yolu: EGF ile başlayan diğer bir sinyal kaskadı 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.

Bu şekillerde 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).



Şekil 2.2: EGFR ailesi sinyal yolları

(http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/f/f8/EGFR/signaling_pathways_png)

2.7. Akciğer Kanseri

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'nün 2003 yılına ait kanser raporunda, global kanser oranının hızla arttığı ve 2020 yılında, bu oranın %50 artarak on beş milyon kişiyi etkileyebileceği bildirilmiştir. Akciğer kanserinin yıllık bir milyon iki yüz yeni vaka ile birlikte dünyada en yaygın kanser tipi olduğu bu raporla açıklanmıştır (83).

Akciğer kanseri, tüm dünyada mortalitesi en yüksek kanser türüdür ve kardiyovasküler hastalıklardan sonra ölüm nedenleri arasında 2. sırada yer almaktadır. 1996 yılında ABD'de atmış dört bin kadın akciğer kanserinden, kırk dört bin kadın meme kanserinden ölmüştür. Tüm dünya ortalamasına baktığımızda Akciğer kanseri erkeklerde birinci, kadınlarda da meme kanserinden sonra ikincidir (26).

2.7.1. Akciğer kanserinin tipleri

Akciğer sıklıkla ekstratorasik organların kanserlerinin metastaz yeri olmasına rağmen primer akciğer kanserleri de oldukça sık görülür. Primer akciğer tümörlerinin %95'i bronşial epitelden kaynaklanır(bronkojenik karsinomlar). Kalan %5'i içinde bronşial karsinoidler, mezoteliomalar, bronşial gland neoplazmları, mezenkimal malignensiler (fibrosarkomlar, leiomyomalar), lenfomalar ve birkaç benign lezyon bulunur. En sık görülen benign lezyon küçük (3-4 cm), küresel hamartomlardır.

Bronkojenik karsinomlar, endüstrileşmiş ülkelerdeki kansere bağlı ölümlerin büyük kısmını oluştururlar. Başlıca dört histolojik tipe bronkojenik karsinoma vardır. Bunlar, Squamöz hücreli, adenokarsinoma, Büyük hücreli indifferansiye ve küçük hücreli karsinoma'dır. Günümüzde tedavi açısından değerlendirme yapılırken ilk 3 tip bir kategoriye sokulup " Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Karsinomu" (KHOAK) diye adlandırılır. Bu şekilde " Küçük Hücreli Akciğer Karsinomu" (KHAK) bu gruptan ayrılmış olur (46).

Küçük hücreli olmayan akciğer karsinomları

Squamöz hücreli karsinoma, erkeklerde daha sık görülmektedir. Özellikle sigara kullanımı olan bireylerde gözlenir. Büyük bronşların santralinden çıkmaya meyillidir, lokal hiler lenf nodlarına kolay yayılır fakat toraks dışına diğer akciğer tümörlerinde olduğundan daha geç yayılır. Squamöz karsinoma, bronş epitelinde yıllar önce başlayan bir metaplazi veya displaziye izleyen in-situ karsinomdan sonra ortaya çıkar. Mukozada 1-2 cm çapında, kalınlaşma ve irregüler nodül tarzında kabarıklık yavaş yavaş gelişir. Bu durumda henüz klinik ve radyolojik bir bulgu olmadığı halde, balgamda bronş yıkama ve fırça ile alınan materyalde atipik epitel hücreleri görülür. Histolojik olarak bu tümörler, keratin inciler ve intersellüler köprüler oluşturan iyi diferansiye tipten, minimal bir squamöz özelliği olan indifferansiye tipe kadar değişen çeşitlerdedir. Squamöz hücreli karsinomlar, metastaz yapmadan önce büyük ve bronşları tıkayan semptomatik kitle yaptıklarından diğer tiplere göre hafifçe daha iyi bir prognoza sahiptir. Tanı konulduğunda genellikle cerrahi olarak çıkarılabilir durumdadırlar.

Adenokarsinomlar, tüm KHOAK içinde %30-35 oranında görülmektedir. Erkek ve kadında görülme sıklığı aynıdır. Sigara kullanımı ile ilişkisi squamöz karsinomaya göre daha zayıftır. Santral yerleşimli olabileceği gibi, çoğunlukla periferik yerleşimlidir. Periferik akciğer skarları ile ilgili olarak ortaya çıkar. Adenokarsinomlar, yavaş büyürler ve daha küçük kitle yaparlar. Ayrıca diğer subtiplere göre daha erken safhada metastaz yaparlar. Bronchioloalveolar karsinoma (BAC), özel bir adenokarsinoma tipidir. İki çeşidi vardır. BAC'ın yarısından azı multifokal müsinöz tümörlerdir. Bazen tek başlarına kitle yaparlar, bazen de birbirleri ile birleşen kitleler oluştururlar. Histolojik görünüm yanıltıcı olarak benign olup mitoz nadirdir. Diğer çeşidi 10 cm çapa kadar ulaşabilen, gri-beyaz tek bir nodül şeklinde olur. Üst lob içinde ve periferik yakın yerleşimlidir. BAC'ın prognozu diğer bronkojenik karsinomlara göre daha iyidir.

Büyük hücreli karsinomalar, sitolojik diferansiyasyon göstermeyen belki de squamöz veya glandüler neoplazmların, herhangi bir kategoriye giremeyecek kadar, indifferansiye şeklidir. Tümör bazen vahşi bir anaplazi gösteren dev hücrelerden oluşmuştur. Erken fazda uzak yerlere yayılma eğiliminden dolayı kötü prognozludurlar. Yarısından fazlasında tanı konduğu zaman beyin metastazı vardır ve 5 yıllık yaşama oranı %2-3 dür (46).

Küçük hücreli akciğer karsinomları

Erkeklerde kadınlara oranla daha sıktır ve sigara kullanımı ile çok yakın ilişkilidir. Soluk gri renkte, santral lokalizasyonda kitleler olup, hiler ve mediastinal lenf nodlarını erken fazda tutarlar. Bu kanserler, küçük, oval-yuvarlak, lenfosit benzeri ve çok mitoz gösteren hücrelerden meydana gelmiştir. Bu klasik yulaf hücreli (oat cell) kanserdir. KHAK'lar hızlı büyüyen, geniş infiltrasyon yapan ve erken yayılan lezyonlardır ve nadiren rezeke edilebilir durumda yakalanırlar. Bu nedenle hemen her zaman kombine radyoterapi ve kemoterapi ile tedavi edilirler. İki yıllık sağ kalım oranı %5-8 dolayındadır (46).

2.7.2. Akciğer kanserinin moleküler biyolojisi

Akciğer kanserleri çoğunlukla sigara kullanımıyla ilişkilendirilir. Fakat ağır sigara kullanıcılarının yaklaşık % 20'sinde akciğer kanseri meydana gelmektedir. Konak faktörleri bu değişik kişisel duyarlılıkta önemli rol oynarlar. Pedigri analizlerinde, akciğer kanserinin diğer kanserlerle birlikte belli ailelerde daha çok görüldüğünü göstermiştir. Birçok çalışmada akciğer kanserli hastaların ailelerinde, kontrollere nazaran 2–5 kez daha fazla akciğer kanserine rastlandığı gösterilmiştir (80). Ailesel akciğer kanseri öyküsü olan sigara kullanıcılarında akciğer kanseri riski, sigara kullanmayan ve aile öyküsü olmayanlardan 30–47 kat daha fazladır. Akciğer kanserli hastaların hem sigara içen hem de içmeyen akrabalarında akciğer kanseri riski 2.4 kat artmıştır. Artmış ailesel riskin; yaş, cinsiyet, mesleki maruziyet ve sigara kullanıcılığından bağımsız olduğu ve akciğer kanserine predispozisyon yaratan nadir bir otozomal genin Mendelyen kodominant kalıtım ile ilişkili olduğu ileri sürülmüştür (50,82).

Karsinogenez çok basamaklı bir süreçte değişik karsinojenlerin (kimyasal, fiziksel ve viral) etkisiyle oluşan genetik ve epigenetik hasarlanmalarla gerçekleşir. Kanserlerde oluşan genetik değişiklikler, kromozomal düzeyde (kromozom kayıpları) ya da tek bir nükleotid düzeyinde (tek ya da multipl baz değişiklikleri ya da DNA promotor bölge metilasyonu) oluşabilir.

Kanser oluşumunda hücrenin büyüme ve çoğalma sürecinde meydana gelen genetik değişiklikler (onkogenler, tümör baskılayıcı genler), konakçı faktörleri (enzim polimorfizmi) ve tümör konakçı etkileşimi (anjiogenez, invazyon, metastaz) sonucunda tümöral kitle oluşur.

Bunun dışında, sinyal iletimi, hücre döngüsünün kontrolü ve DNA tamiri, hücre büyümesi ile ilişkili genler de akciğer kanseri oluşumunda değişik basamaklarda hasar görebilir. Akciğer kanserlerinde gözlenen genom dengesizliği; birçok kromozomal

(anöploidi) ve yapısal sitogenetik anormallikleri (delesyon, amplifikasyon, nonresiprokal translokasyonları) içerir.

Akciğer kanserlerinde görülen anöploidik değişimler, özellikle mitotik kontrol noktalarındaki (mitotik checkpoint) fonksiyonel kayıp ile ilişkilidir. Artan genetik teknikler sayesinde bu preneoplastik hücresel değişimler daha ayrıntılı incelenmektedir (11,20).

Akciğer karsinogenezisinde oluşan majör genetik olaylar şöyle sıralanabilir:

- I. Onkogenlerin mutasyonel aktivasyonu
- II. Tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu
- III. Hücre döngüsü regulasyonunda görev alan genlerde ortaya çıkan değişiklikler
- IV. DNA tamirinde görev alan genlerde ortaya çıkan değişiklikler
- V. Büyüme faktörleri ve reseptörlerine ilişkin değişiklikler (16,18,38).

2.7.2.1 Akciğer kanserlerinde büyüme faktörleri

Büyüme faktörleri, afinite gösterdikleri hücre membran reseptörlerine spesifik olarak bağlanan, normal hücre proliferasyonunu uyaran, ağırlıkları 4000-60000 dalton arasında değişen, çok az miktarları bile hücresel aktiviteleri etkileyebilen polipeptitler olarak tanımlanırlar. Büyüme faktörleri hücre içi boşluklarının kısa aralıklarında yer alırlar ve bölgesel olarak etki gösterirler. Bazıları plazmada, bazıları da serumda yer alan büyüme faktörleri platelet kökenli olup, pıhtılaşma süreci boyunca serbest halde bulunurlar. Büyüme faktörleri hücre tiplerine göre farklılıklar gösterirler. Hematopoetik sistemle ilişkili büyüme faktörleri sadece bir veya birkaç hücre tipi için uyarıcıyken somatomedin C ve EGF gibi diğer tipleri hem epitel hem mezenşimal kökenli birçok hücre tipi için uyarıcıdır. Büyüme faktörleri etkilerini hücre yüzey reseptörlerine bağlanarak gösterirler. Polipeptit büyüme faktörlerinin hücre proliferasyonu kontrolündeki kritik rollerinden dolayı büyüme faktörü sinyal iletimindeki anormallikler pek çok kanser tipini de içeren çok sayıda hastalığın nedenidir (23,53).

Neoplastik hücrelerin birçok büyüme faktörünün salınımı ile kendilerine çoğalma avantajı sağlayarak kendi büyümelerini uyardıkları bilinmektedir. Kanser gelişimini de tek bir büyüme faktörü regüle edemez. Birçok büyüme faktörü ve reseptörü meme, prostat gibi çeşitli tiplerdeki kanserlerde olduğu gibi akciğerde de kanser hücreleri ve normal hücreler tarafından eksprese edilmektedirler. Bu büyüme faktörleri otokrin, parakrin ve jukstakrin yollarla kanser büyümesinde rol oynarlar. Eğer bir tümör hücresi, hem bir büyüme faktörü hem de reseptörünü taşıyorsa kendisini uyaran büyüme halkasına sahip demektir. Buna ‘otokrin büyüme halkası’ denir. Otokrin halkalar normal hücrelerde de bulunur ve sadece fizyolojik uyarılara yanıt verirler. Dengeli büyüme için karşılıklı düzenleyici sistemler bir arada bulunur. Kanser hücrelerinde ise bu dengeler bozulmuştur. Metastaz ve invazyonun da bu büyüme faktörleri ve reseptörlerinin etkileşimi sonucu ortaya çıktığı kabul edilmektedir (12,53).

Polipeptit büyüme faktörlerinin hücre çoğalmasını ve farklılaşmasını kontrol eden çeşitli tipleri vardır. Büyüme faktörlerinin en önemli tiplerinden biri epidermal büyüme faktörleri(EGF)’ dir. İnsanda birçok dokuda varlığı gösterilen EGF, 53 aminoasitten oluşan mitojenik bir polipeptittir. Hücre proliferasyonunda kritik rollere sahiptir. Birçok mezodermal ve ektodermal kökenli hücre için mitojenik özelliğindedir. EGF, yüzey reseptörü aracılığıyla etkilerini gösterir.

Büyüme faktörlerinin herhangi bir hücreyi etkileyebilmesi, o hücrenin, o faktör için reseptöre sahip olup olmamasına bağlıdır. Reseptöre bağlanma sonucu hücre içinde özgün bir cevaba neden olan bir seri sinyal ortaya çıkar. Etki çoğunlukla tirozin kinaz uyarılarak sağlanır ve her hücrenin farklı büyüme faktörleri için farklı sayıda reseptörleri bulunmaktadır (11,23,52).

2.7.2.1.1. Epidermal büyüme faktör reseptörleri ve küçük hücreli olmayan akciğer kanseri

Epidermal büyüme faktörü reseptörleri ile karsinogenez arasındaki ilişki iki şekilde görülür. Birincisi, normal Epidermal büyüme faktörü reseptörlerinin aşırı ekspresyonu

ile hücre bölünmesinin uyarılmasıdır. İkincisi ise reseptörde mutasyon gelişimi ile reseptörün sürekli aktivite kazanması, ligandların aşırı yapımına bağlı olarak fizyolojik ligand-reseptör dengesinin bozulması, fosfotaz aktivitesindeki azalma ve heterodimerizasyondur. Çalışmalarda KHOAK' leri gibi meme, beyin, mesane, kolon, beyin ve over kanserleri ile birlikte çok çeşitli kanserlerde EGFR' nin aşırı eksprese olduğu saptanmıştır. Genellikle immünohistokimyasal metotla araştırılmış hastalarda, KHOAK' lerinin %13-80'inde EGFR ekspresyonu artmış olup, bu artışın hayatta kalabilirlik, tekrarlayabilirlik ve verilecek tedavinin belirlenmesine katkı sağlayabilmesi açısından prognostik önemi vurgulanmıştır. Bununla birlikte HER-2'nin de KHOAK' de %2 ila %40 oranında amplifiye olduğu ve kötü prognozla ilişkilendirildiği yapılan çalışmalarca ortaya konmuştur. Ancak EGFR ekspresyon artışının sağ kalım üzerine etkileri araştırılmakta olup çok çelişkili sonuçlar elde edilmektedir. Yapılan pek çok çalışmada ekspresyon artışı olan hastaların küçük molekülü tirozin kinaz inhibitörlerine karşı duyarlı olduğu bildirilmiş olup KHOAK hastalarında bu EGFR inhibitörlerinin tedavide kullanılabilir ajanlar olduğu bildirilmiştir (11,25).

EGFR geninin aşırı ekspresyonundan başka KHOAK' de EGFR' nin tirozin kinaz domaininde çeşitli mutasyonlar rapor edilmiş ve karsinogenez sürecinde ortaya çıkan belli mutasyonlar bildirilmiştir. EGFR geninin 21. ekzonunda, 858. pozisyonunda yer alan lösin-arjinin aminoasit substitasyonu, 19. ekzonundaki karakterize aminoasit 747-750 delesyonları, 20. ekzonunda yer alan 790. pozisyonunda yer alan treonin-metionin aminoasit substitasyonu ile aynı ekzondaki insersiyon tipi delesyonlar ile çok sık görülmemekle birlikte 18. ekzon mutasyonları gen üzerinde saptanmış mutasyonlardır. Bildirilen bu mutasyonların yine tirozin kinaz inhibitörlerine karşı duyarlılığı da araştırma konularındandı (25,67,76,77).

2.7.2.1.1.1.Epidermal büyüme faktör reseptörleri 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 Her2 amplifikasyonunu belirlemede geliştirilen Herceptest isimli immünohistokimyasal yöntem dayanan test, FISH yöntemi ile doğrulanmış ve etken maddesi trastuzumab olan herceptin isimli ilacın kullanılmasının uygun olacağı hastaların belirlenmesinde etkili bir yöntem olduğu saptanmıştır.

Gefitinib ileri evre KHOAK tedavisinde FDA onayı alarak 3.sıra kemoretarapi ajanı olmuştur. Ayrıca moleküler hedefe yöneltilmiş tedaviler arasında hücre sinyal iletim inhibitörleri, matriks metalloproteinaz inhibitörleri, antianjiogenesis tedaviler (VEGF'ü hedefleyen Bevacizumab), antisens tedaviler, antikor tedavileri ve immünoterapiler yer almaktadır. EGFR'ye karşı geliştirilmiş monoklonal antikorlardan Cetuximab(IMC-C225,Erbıtux) ve HER2'ye karşı geliştirilmiş monoklonal antikorlardan Trastuzumab (Herceptin) ile çalışmalar devam etmektedir (14,25,67).

2.8.Floresan İn Situ Hibridizasyon

Moleküler sitogenetik, işaretli DNA' problemleri kullanılarak interfaz veya metafazdaki kromatin ve kromozomların mikroskopik analizi olarak tanımlanabilir. Bu yaklaşım, mitotik hücrelerin standart mikroskopik preparatlarında, denatüre edilmiş kromozomal DNA ile tek dallı DNA dizilerinin (prob) uygun koşullarda birleşebildiğinin gözlenmesi ile ortaya çıkmıştır (4,5).

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 hücre ortamında 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 görüntülendiği 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 işaretili nükleik asitler nükleer emülsiyon aracılığı ile belirlenmiştir (5).

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 güvenirliliğini etkilemiştir. Biotinin yanı sıra digoxigenin ve florescein ile işaretleme, farklı florokrom moleküllerin birlikte kullanılması ikili ve üçlü işaretleme olanak vermiştir. 1986 da non-radyoaktif işaretili problemler kullanılarak FISH yöntemi ortaya çıkmıştır (4).

2.8.1. 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 (2).

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 (2).

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

2.8.2. 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 (3).

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 (3).

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 (3).

3. GEREÇ ve YÖNTEMLER

3.1. Gereç

3.1.1. Kullanılan Gereçler

Buzdolabı (Arçelik 415)

Sensys kamera (Sensys)

Deep-Freeze (Heraeus)

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

Etüv (Friocell MMM Med Center)

Floresan mikroskop (Olympus BX-61)

Image Analyser (Applied Imaging)

Su banyosu (Nüve)

Düdüklü tencere (Esman 3lt.)

Mikropipet (Eppendorf)

Mikrosantrifüj (Eppendorf Centrifuge 5415)

Vortex (Janke and Kunkel, UF-2)

pH Metre (Jenco)

Pipet uçları

Beher (500 ml, 1000 ml)

Erlenmayer (500 ml, 1000 ml)

Lamel

Mezür

Yatay ve dikey şale

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
HCl (Merck)
Immersion yağı (Merck)
Sitrik asit (Sigma)
Ksilol (Merck)
 $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Carlo Erba)
NaCl (Merck)
NaOH (Merck)
Pepsin (Sigma)
Parafilm
Rubber Cement (Marabu Fixo gum)
Tween 20 (Sigma)

3.1.4.Kullanılan Problar

PathVysion HER-2 DNA Prob Kit (LSI Her-2/Cep 17)
(17q11.2-q12/17q11.1-q11.1)

LSI EGFR Prob (LSI EGFR/Cep 7)
(7p12/7p11.1-q11.1)

3.2 Yöntemler

3.2.1 Materyal Seçimi

İstanbul Yedikule Göğüs Hastalıkları Hastanesi Patoloji Anabilim Dalı'nda, histopatolojik olarak incelenerek “küçük hücreli olmayan akciğer kanseri” tanısı almış 100 olgu çalışmaya alınmıştır. %10 formaldehit solüsyonu ile tespit edilmiş, parafin bloklara gömülü dokulardan hazırlanmış (FFPT) ve Hematoksilen- Eozin ile boyanmış olgulara ait arşiv preparatları, Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) kriterlerine göre gradelendirilmiş ve TNM sınıflamasına göre evrelendirilmiştir. Her hastaya ait doku örneklerinden kanser dokusu içeren 5 mikronluk kesitler pozitif şarjlı lamlara tespit edilerek FISH analizi uygulamasına hazır halde laboratuvarımıza ulaştırılmıştır. Olguların yaşları, cinsiyetleri, sigara kullanımlarının olup olmaması, histopatolojik bulguları, evreleri ve aile öyküleri hasta dosyalarından temin edilmiştir

3.2.2. FISH yönteminin uygulanması

FISH yönteminin uygulanmasında Rieder ve arkadaşları tarafından geliştirilen protokol kullanılmıştır (84). FISH yöntemi öncesi dokulardan parafini uzaklaştırmak için pozitif şarjlı lamlara tespit edilmiş parafin kesitlere 4 aşamalı deparafinizasyon protokolü uygulanmıştır.

Genel deparafinizasyon: Preparatlar 60⁰C'lik etüvde 60 dakika bekletilmiştir. 3 kez 5'er dakika ksilol ile muamele edilmiştir.

Hidrasyon: : Preparatlar 1 dakika absölü alkol ile muamelenin ardından 2 kez 1'er dakika %96'lık alkolde bekletilmiştir. Akan çeşme suyu altında 30 sn'ye tutularak distile suda 1 dakika bekletilmiştir.

Basınçla parafini uzaklaştırma: Dödüklü tencere içine 1 lt distile su konarak ayrı bir kap içinde lamlar suyun içine yerleştirilmiştir. 1/10 oranında dilue edilmiş sitrat buffer bulunan şale içerisine yerleştirilen preparatlar dödüklü tencereye konulmuştur. Kap içinde lamların üzerini kapatacak şekilde 1/10 dilue sitrat buffer bulunur. Dödüklü, ocağın üstünde kaynama başlayana kadar en yüksek ısıda, kaynamadan sonra dödüğü kapatılarak kısık ateşte 5 dakika bekletilmiştir. Dödüklü tencere ocaktan alındıktan sonra akan çeşme suyu altında 30 saniye bekletilerek soğutulmuştur. Dödüklü tencereden alınan lamlar cam şaledeki distile suya konmuştur.

Enzim ile muamele: 100 mg pepsin 10 ml distile suda çözülerek stok solüsyon hazırlanmış ve 100 µl porsiyonlanarak -20⁰ C'de saklanmıştır. 37⁰ C'deki su banyosunda 100 ml distile su içine 1ml HCL ve 100µl stok solüsyonu eklenerek, preparatlar bu enzim solüsyonu içinde 10 dakika inkübe edilmiştir.

Tablo 3.1. Deparafinizasyonda Kullanılan Solüsyonlar

<u>Sitrat Buffer Stok Solüsyonu</u>	
Sitrik asit	3.84 gr
Distile su	1.8 lt
NaOH ile solüsyonun Ph değeri 6.0'a ayarlanır. Kullanılmadan önce 1/10 dilüe edilir.	
<u>Pepsin Stok Solüsyonu</u>	
Pepsin	100 mgr
Distile su	10 ml
100µl'lik porsiyonlanarak -20 ⁰ C'de muhafaza edilir.	

Tablo 3.2. Preparatların Ön Yıkama Solüsyonları

<u>20XSSC Solüsyonu</u>	
NaCl (3 M)	175,3 gr
Tri Sodyum Sitrat (0,3 M)	88,24 gr
Distile su	1000 ml
<u>2XSSC Solüsyonu</u>	
20XSSC	40 ml
Distile su	360 ml
<u>0,1XSSC Solüsyonu</u>	
20XSSC	3 ml
Distile su	597 ml
Tüm solüsyonlar HCl ile pH 7.0 a ayarlanır.	

Tablo 3.3. Preparatların Denatürasyon Solüsyonu

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

Tablo 3.4. Hibridizasyon Sonrası Solüsyonlar

<u>1XSSC Solüsyonu</u>	
20XSSC	10 ml
Distile su	190 ml
<u>2XSSC Solüsyonu</u>	
20XSSC	20 ml
Distile su	180 ml
<u>2XSSC/Tween-20 Solüsyonu</u>	
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

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

3.2.2.1. 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 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. Prob denatürasyonu

- Problar 5 dakika 74 °C de bekletilerek denatüre edilmiştir.

3.2.2.3. Hibridizasyon

- Çalışmada kullanılan problar santrifüj edilerek tüm probun dibe çökmesi sağlanmıştır.

-Denatüre edilen preparatlarda belirlenen alanlara prob (5 µl) eklenmiş ve üzerlerine 24mm lik lamel kapatılmıştır.

- Lamel çevresi su girmemesi için rubber sement ile yalıtılmıştır.

- Preparatlar 37 °C de bir gece nemli ortamda hibridizasyona bırakılmıştır.

3.2.2.4. Hibridizasyon sonrası yıkamalar

Bu yıkamalarda spesifik olarak bağlanmayan prob DNA sının ortamdan 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 5 dakika yıkanmıştır.

- Sonrasında 2XSSC/Tween–20 solüsyonunda 5 dakika yıkanmıştır.

- Hibridizasyon sonrası yıkaması yapılan preparatlar 4XSSC/DAPI solüsyonunda 2 dakika bekletilmiştir.

- Preparatların üzerine 15 µl antifade eklenerek lamel ile kapatılmıştır.

- İnceleme aşamasına kadar -20 °C' de saklanmıştır.

3.2.2.5. Preparatların mikroskopta incelenmesi

Preparatlar Olympus BX-61 Floresan mikroskobunda uygun filtreler kullanılarak incelenmiştir. Floresan mikroskoba bağlı bilgisayar sistemi (Applied Imaging) ile sinyaller değerlendirilerek Sensys kamera aracılığıyla FISH sinyalleri içeren nükleuslar analiz edilmiş ve fotoğraflanmıştır.

3.2.2.6. Değerlendirme

Küçük hücreli olmayan akciğer kanser tanısı almış her örneğe yapılan FISH analizinde her prob için 100 hücre değerlendirilmiştir. Her hücre için hedef gene ve bu genin lokalize olduğu kromozom sentromerine ait sinyaller sayılmıştır. Değerlendirme sonucunda olgular, FISH pozitif ve FISH negatif olarak 2 gruba ayrılmıştır. Hücrelerin %40 ve daha fazlasında ≥ 4 kopya bulunması durumuna ya da gen amplifikasyonun (%10 \geq hücrede, gen kopya sayısı ≥ 15 ise ya da gen/kromozom oranı ≥ 2) saptandığı durumlardan birine sahip olgular ‘FISH pozitif’ olarak değerlendirilmiştir. Tüm hücrelerin %40 ve daha fazlasında ≤ 4 kopya bulunması durumunda ise olgular ‘FISH negatif’ olarak değerlendirilmiştir (6,7,8,17,30)

3.2.3. İstatistiksel Analiz

SPSS 13.0 istatistik programında χ^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.

4. BULGULAR

İstanbul Yedikule Göğüs Hastalıkları Hastanesinde, histopatolojik olarak incelenerek “küçük hücreli olmayan akciğer kanseri” tanısı almış 100 olguda HER2/*neu* ve EGFR onkogenlerinin kopya sayılarındaki artışlarının ve gen amplifikasyonlarının FISH yöntemiyle incelenmesi hedeflenmiştir. Olguların yaşları, cinsiyetleri, sigara kullanımlarının olup olmaması, histopatolojik bulguları, evreleri ve aile öyküleri hasta dosyalarından temin edilmiştir.

İncelemeye alınan tümör dokularına sahip olguların 32’si kadın, 68’i erkek olup, yaş ortalaması $58,98 \pm 3,4$ olarak saptanmıştır. Olguların bir kısmı sigara kullanıcısı olmakla birlikte ailede kanser öyküsü bulunan olgular da mevcut olup bu dağılımlar tablolarda ayrıntılı olarak belirtilmiştir.

Tablo 4.1. Çalışma olgularının cinsiyet, sigara kullanımı ve aile öyküsü bilgilerine göre dağılımları

	N	%
Cinsiyet		
Kadın	32	32,00
Erkek	68	68,00
Sigara		
Evet	90	90,00
Hayır	10	10,00
Aile öyküsü		
Var	26	26,00
Yok	74	74,00
Toplam	100	100

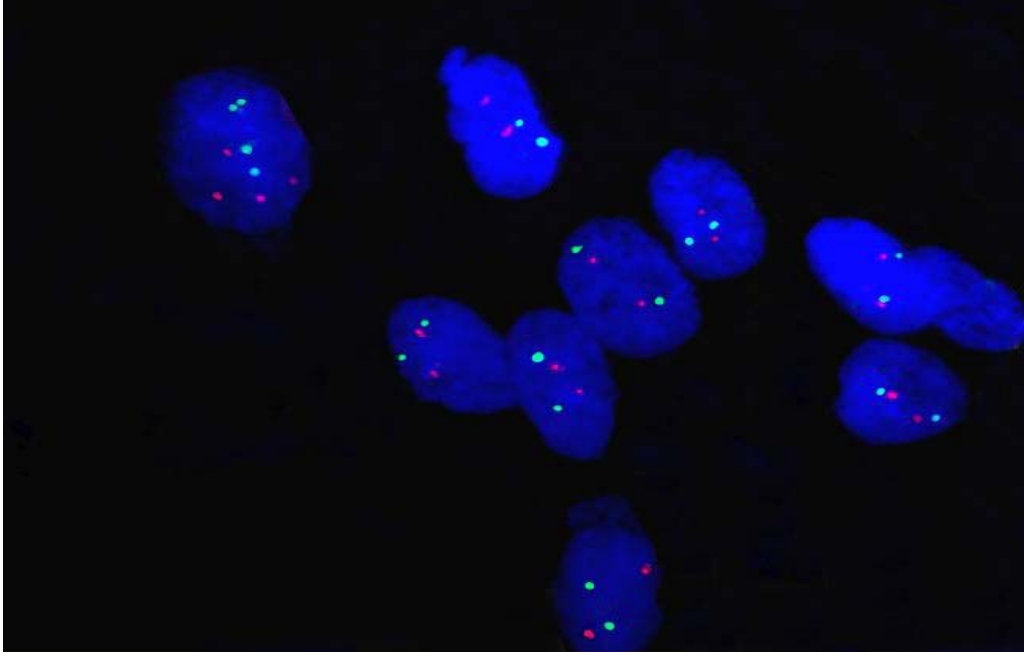
Tablo 4.2. Çalışma olgularının grade ve histopatoloji bilgilerine göre dağılımları

	n	%
Grade		
1	2	2,00
2	12	12,00
3	86	86,00
Histopatoloji		
Squamöz	46	46,00
Adenokarsinom	54	54,00
Toplam	100	100

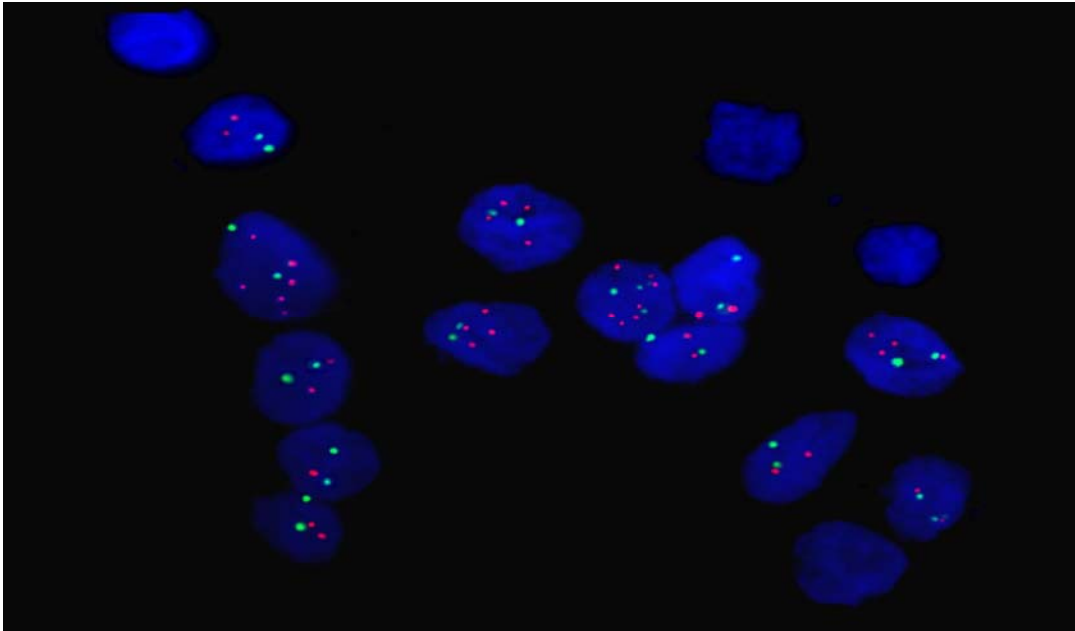
4.1 Yönteme İlişkin Bulgular

Parafine gömülü dokulardan 5 mikronluk kesitler halinde pozitif şarjlı lamlara fikse edilerek laboratuvarımıza gelmiş olan 100 örnek önce deparafinizasyon işleminden geçirilmiştir. İkinci aşama olarak floresan işaretli proplar ile hibridize edilmiştir. Hibridizasyon sonrası HER-2/neu ve EGFR genlerine özgü tasarlanan proplardan alınan sinyaller analiz edilmiştir. Analiz edilen 100 olgunun 75'inden sonuç alınmıştır. Çalışmanın başarı oranı %75 olarak saptanmıştır.

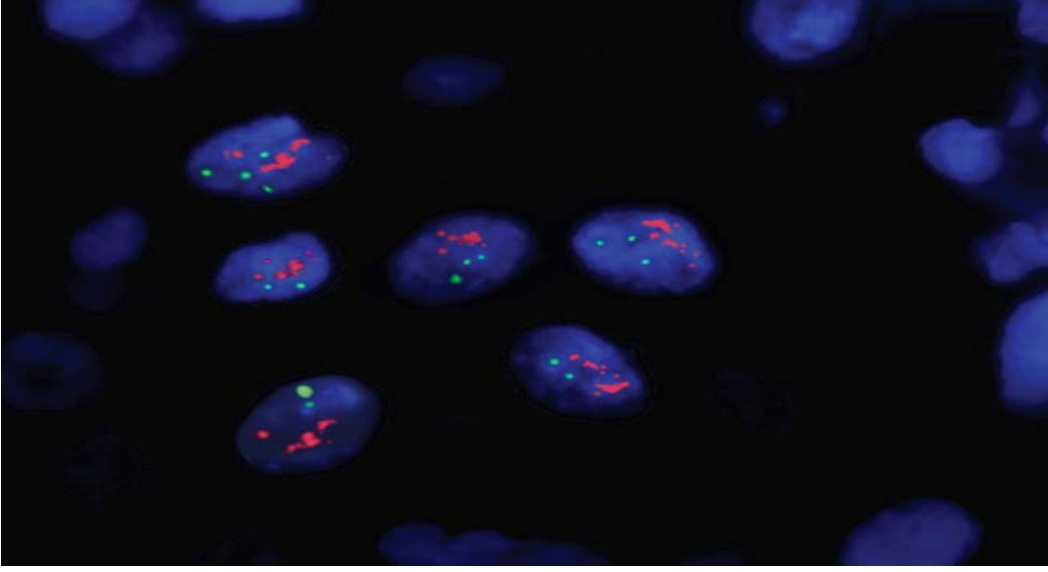
Analiz her genin ait olduğu kromozomun sentromer bölgesine özgü proptan alınan sinyaller ile gene özgü alınan sinyallerin literatürde verildiği şekilde değerlendirilmesi ile yapılmıştır (8,19,33).



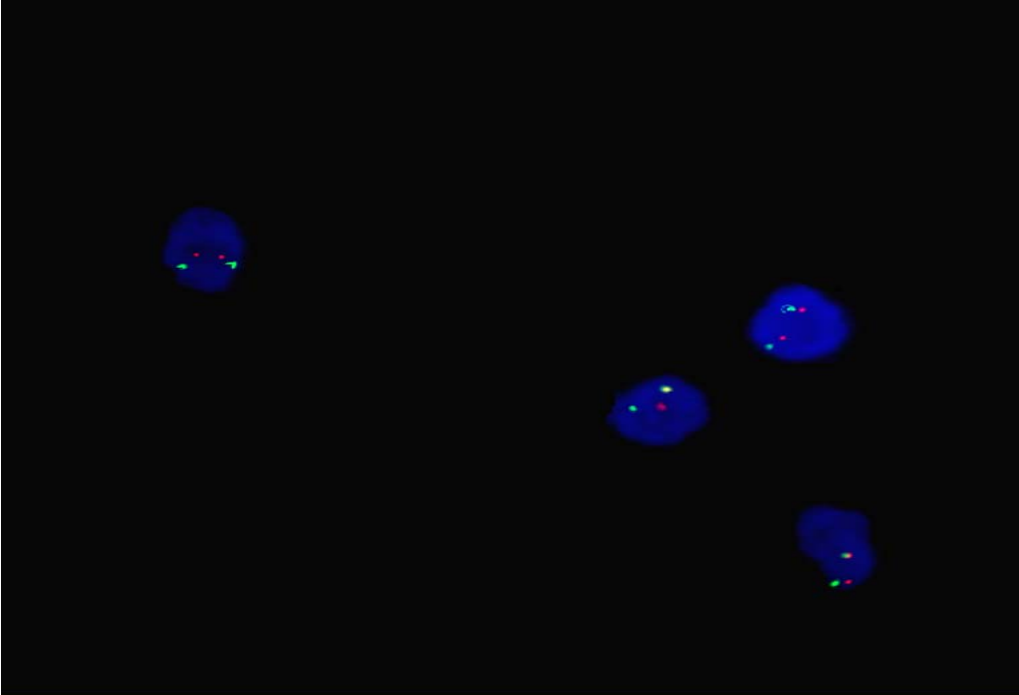
Şekil 4.1. HER-2/neu geni ve sentromer 17 için normal hücelere sahip bir olgunun FISH görüntüsü (Cep17 yeşil sinyal, HER-2/neu kırmızı sinyal).



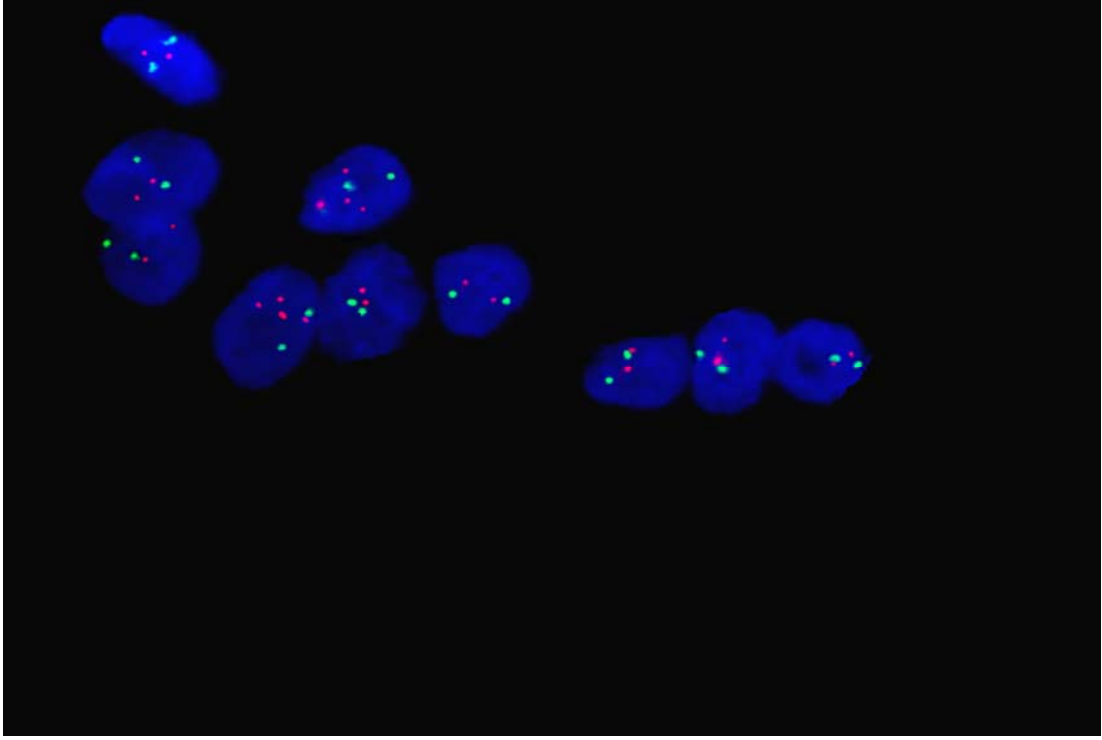
Şekil 4.2. HER-2/neu geni için gen kopya sayısı artışına sahip hüceler ve normal hücelerin bir arada olduğu bir olgunun FISH görüntüsü (Cep17 yeşil sinyal, HER-2/neu kırmızı sinyal).



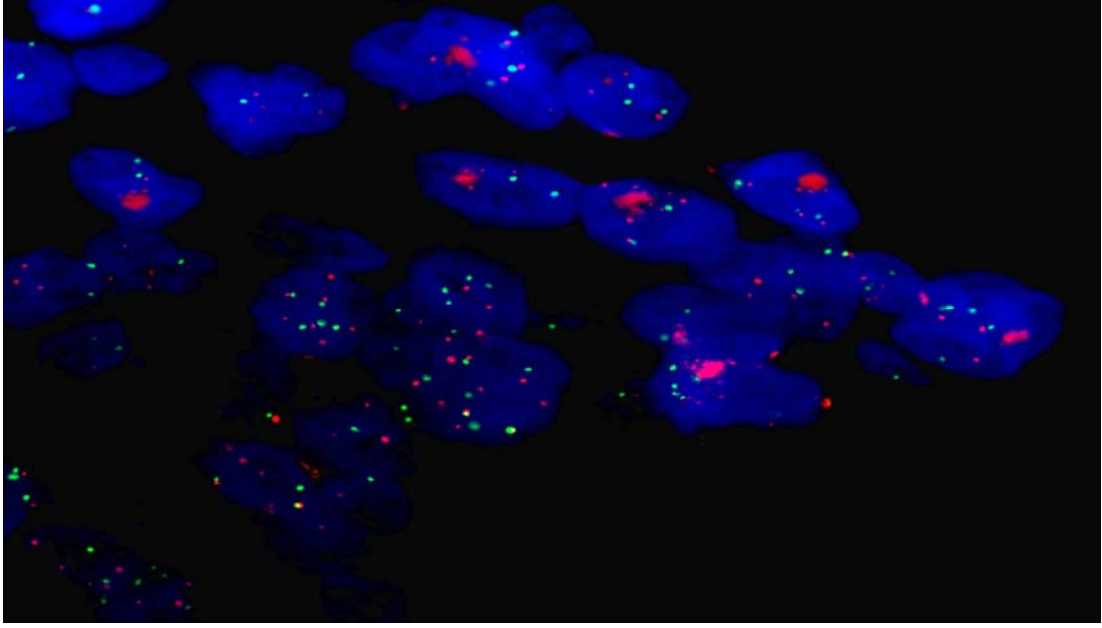
Şekil 4.3. HER-2/neu geni için gen amplifikasyonuna sahip hücrelerin bulunduğu bir olguya ait FISH görüntüsü (Cep17 yeşil sinyal, HER-2/neu kırmızı sinyal).



Şekil 4.4. EGFR geni ve sentromer7 için normal hücrelere sahip bir olgunun FISH görüntüsü (Cep7 yeşil sinyal, EGFR kırmızı sinyal).



Şekil 4.5. EGFR geni için kopya sayısı artışına sahip ve normal hücrelerin de bir arada bulunduğu bir olgunun FISH görüntüsü (Cep7 yeşil sinyal, EGFR kırmızı sinyal).



Şekil 4.6. EGFR gen kopya sayısı artışına sahip hücreler ve gen amplifikasyonuna sahip hücrelerin bir arada bulunduğu bir olgunun FISH görüntüsü (Cep7 yeşil sinyal, EGFR kırmızı sinyal).

4.2. Çalışmanın İstatistiksel Bulguları

Çalışmamızda söz konusu parametreler ve hedef genlerin amplifikasyon durumları için SPSS 13.0 istatistik programında χ^2 istatistik testi kullanılarak Fisher ve Pearson'a göre p değerleri hesaplanmıştır. Tüm bu parametrelere göre elde edilen istatistiksel sonuçlar, HER-2/neu ve EGFR genlerinin kopya sayılarındaki artışla bu parametreler arasında anlamlı bir ilişki bulunmadığını göstermiştir.

Gereç ve yöntem bölümünün değerlendirme alt başlığında anlatılan şekli ile analiz edilen 75 örneğin 10'unda HER-2/neu gen bölgesi için ve 18'inde ise EGFR gen bölgesi için amplifikasyon tespit edilmiştir. Yüzde olarak ifade edildiğinde çalışılan olgularda HER-2/neu gen bölgesi için %13.33, EGFR gen bölgesi için de %24, amplifikasyon saptanmıştır. Bu sonuçların cinsiyet, sigara kullanımı, aile öyküsü ve

histopatolojik dağılımlarına göre istatistiksel verileri elde edilmiştir. Bu verilere ilişkin hesaplanan p değerleri çizelge 4.3 ve çizelge 4.4’ de verilmiştir.

Tablo 4.3. Çalışma olgularında FISH yöntemi ile belirlenen HER-2/neu ve EGFR genlerinin amplifikasyonlarının olguların cinsiyet, sigara kullanımı, aile öyküsü bilgilerine göre dağılımları

FISH	Cinsiyet (p=0,486)		Sigara (p=0,587)		Aile öyküsü (p=0,452)	
	Kadın (%)	Erkek (%)	Evet (%)	Hayır (%)	Var (%)	Yok (%)
HER-2/neu						
Amplifikasyon	2 (2.7)	8 (10.6)	10 (13.3)	0	4 (5.3)	6 (8.0)
Normal	22 (29.3)	43 (57.3)	57 (76.0)	8 (10.6)	17 (22.6)	48 (64.0)
Toplam(n=75)	24 (32)	51 (68)	67 (89.3)	8 (10.6)	21 (28)	54 (72)
	Cinsiyet (p=0,889)		Sigara (p=0,389)		Aile öyküsü (p=0,238)	
EGFR	Kadın (%)	Erkek (%)	Evet (%)	Hayır (%)	Var (%)	Yok (%)
Amplifikasyon	6 (8.0)	12 (16.0)	15 (20.0)	3 (4.0)	7 (9.3)	11 (14.6)
Normal	18 (24.0)	39 (52.0)	52 (69.3)	5 (6.6)	14 (18.6)	43 (57.3)
Toplam(n=75)	24 (32)	51 (68)	67 (89.3)	8 (10.6)	21 (28)	54 (72)

Tablo 4.4. Çalışma olgularında FISH yöntemi ile belirlenen HER-2/neu ve EGFR genlerinin amplifikasyonlarının olguların grade ve histopatoloji bilgilerine göre dağılımları

FISH	Grade*			Histopatoloji (p=0,320)	
	1 (%)	2 (%)	3 (%)	Squamöz (%)	Adenokarsinom (%)
HER-2/neu					
Amplifikasyon	0	0	10 (13.3)	6 (8.0)	4 (5.3)
Normal	2 (2.6)	8 (10.6)	55 (75.3)	27 (36.0)	38 (50.6)
Toplam(n=75)	2 (2)	8 (10.6)	65 (88.6)	33 (44)	42 (55.9)
	Grade*			Histopatoloji (p=0,965)	
EGFR	1 (%)	2 (%)	3 (%)	Squamöz (%)	Adenokarsinom (%)
Amplifikasyon	1 (1.3)	2 (2.6)	15 (20.0)	8 (10.6)	10 (13.3)
Normal	1 (1.3)	6 (8.0)	50 (66.6)	25 (37.3)	32 (42.6)
Toplam(n=75)	2 (2.6)	8 (10.6)	65 (86.6)	33 (47.9)	42 (55.9)

*Veri sayısının yetersizliğinden dolayı istatistiksel test yapılamamıştır.

5. TARTIŞMA

Çalışmamızda 100 olguda HER2/*neu* ve EGFR genlerinin kopya sayılarındaki artışlarının ve gen amplifikasyonlarının FISH yöntemiyle incelenmesi hedeflenmiştir.

5.1. Parafine Gömülü Dokuların Fikse Olduğu Preparatlardan Parafinin Uzaklaştırılması Protokollerinin Karşılaştırılması

Çalışmamızda parafine gömülü dokuların sabitlendiği preparatlara FISH yönteminin uygulanabilmesi için ilk basamak olarak deparafinizasyon işlemi uygulanmıştır. Depararafinizasyon işlemi FISH tekniğinin gerçekleşmesi için çok önemli bir işlem olduğundan bu basamak, tekniğin uygulanmasından daha zor olmuştur. Deparafinizasyon işlemi için birden fazla protokol denenmiş, FISH yöntemi için en iyi sonuç alınan deparafinizasyon protokolü uygulanmıştır. Tüm bunlara rağmen bizim çalışmamızda FISH yöntemi ile olguların %75'i analiz edilebilmiştir. Çalışmamızdaki gibi parafine gömülü dokular kullanılarak yapılan çalışmalarda FISH yöntemi ile diğer amplifikasyon belirleme yöntemleri birlikte uygulanmış ve karşılaştırılmıştır. Bu çalışmalarda, FISH analizi ile sonuç alınabilen örnek yüzdesi %20-%90 arasında değişmektedir (6,24,39,59,64).

Başarılı bir FISH analizi için preparat üzerine sabitlenen kesitler parafinden arındırılmalıdır. Aynı zamanda parafinden arındırılan kesitlerde FISH analizi için yeterli sayıda ve kalitede hücre bulunmalıdır.

İlk olarak, bir çok literatürde deparafinizasyon protokolü olarak uygulanan, Vysis deparafinizasyon kiti protokolü kullanılmıştır(14,30,47,62). Bu kitin kullanımındaki protokol, preparatların 3 kez 10 dakika ksilol ile muamelesi ile başlar. Sonra %100'lük alkol ile 2 kez muamele edilir. Ardından 3-5 dakika havada kurtulmaya bırakılır. Ardından 0,2N'lik HCl solüsyonunda 20 dakika tutulur. Bunu takiben Vysis kit içerisinde bulunan Wash Buffer solüsyonunda 3 dakika bekletilir. Yine aynı kit içerisindeki Pretreatment solüsyonu 80⁰C'de 30 dakika inkübe edilir. Bu inkübasyon

sonrası preparatlar Wash Bufferdan 5 'er dakika geçirilerek havada 3-5 dakika kurulmaya bırakılır. Ardından yine kit içerisindeki proteaz kullanılarak 37⁰C'de 10 dakika inkübe edilir. Preparatlar havada 3-5 dakika kurumaması sonrası fiksasyon için % 10'luk formalin içerisinde 10 dakika bekletilir ve yine havada 3-5 dakika kurutulur. Bu protokolün uygulandığı çalışmalarda başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Fakat bizim çalışmamızda parafin tabakanın hücrelerin üzerinden kalkmaması nedeniyle etkin hibridizasyon gerçekleşmemiştir. Bu sebeple uyguladığımız bu deparafinizasyon tekniği bizim çalışmamızda başarılı olmamıştır.

İkinci olarak Park ve arkadaşlarının (57) meme kanserinde parafin kesitlere FISH yöntemini uygulayarak yaptıkları çalışmadaki deparafinizasyon protokolü denenmiştir. Bu literatürdeki protokol Vysis deparafinizasyon kit protokolündeki inkübasyon sıcaklıklarının değiştirilmesi ve ksilol basamağının çıkarılması ile modifiye edilmiştir. Çalışmada uygulanan bu protokolle başarılı sonuç alındığı halde bizim çalışmamızda istenen başarıya ulaşılamamıştır.

Çalışmamızda Yedikule Göğüs Hastalıkları Hastanesi Patoloji Anabilim Dalı'ndan alınan rutin immünohistokimyasal (IHK) boyama öncesi yapılan deparafinizasyon protokolü de uygulanmıştır. Bu protokol preparatların 45⁰C'lik etüvde bir gece inkübe edilmesi ile başlar. Sonrasında 2 kez 10'ar dakika ksilol muamelesi ile devam eder. Ardından % 100'lük, % 80'lik ve % 70'lik alkol serilerinden 10'ar dakika geçirilerek dehidratasyon yapılır. Bu protokolde ksilol süresi her ne kadar uzun olsa da deparafinizasyon FISH tekniğinin uygulanabilmesi için yeterli kalitede olmamıştır.

Çalışmamızda yukarıda belirtilen protokolün son basamağı, 10mg/ml'lik stok pepsin ile hazırlanmış enzim solüsyonunu eklenerek modifiye edilmiş ve tekrar denenmiştir. Enzim, hücreleri açığa çıkartmakta gözle görülür bir fark sağlamasına rağmen hücre aralarındaki bulutsu parafini yok edemediğinden yöntem çalışmamız adına FISH analizi için kaliteli sonuca ulaşılamamıştır.

Pileri ve arkadaşlarının (61) yaptıkları çalışmada parafine gömülü dokulardan parafini basınçla uzaklaştırmak için düdüklü tencere tekniği kullanılmıştır. Bu

deparafinizasyon yöntemi 4 aşamalı bir işlemdir. Birincisi genel deparafinizasyondur. Bu aşama 60°C' lik etüvde 60 dakika inkübasyon ile başlar. Ardından 3 kez 5'er dakika ksilol ile muamele edilir. Hidratasyon ikinci aşamadır, 1 dakika absolü alkol ile muamelenin ardından 2 kez 1'er dakika % 96'lık alkole bırakılır. Preparatlar akan çeşme suyu altında 30 saniye tutulur. Üçüncü aşamada basınçla parafini uzaklaştırmadır. Burada düdüklü tencere kullanılır. Tencere içerisine 1 litre distile su konarak ayrı bir kap içine de lamlar konur. Lamların bulunduğu kap içerisinde 1/10 oranında dilüe edilmiş sitrat buffer bulunur. Düdüklü tencere düdüğü kapalı olarak 5 dakika kaynatılır. Hemen akabinde akan çeşme suyu altında soğutularak kapağı açılır ve preparatlar distile suya alınır. Dördüncü aşama enzim ile muamele aşamasıdır. Preparatlar 37⁰ C'deki su banyosunda 10mg/ml'lik pepsin solüsyonunda 10 dakika inkübe edilir. Ardından distile suya konarak FISH tekniği uygulanır. Bizim çalışmamızda bu protokolle FISH analizi başarıyla yapılabildiği görülmüştür.

5.2. 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 (14,24,39,47,57,62). Uyum göstermeyen çalışmalar gen mutasyonlarının ya da post transkripsiyonel ve transkripsiyonel mekanizmalarla genin amplifikasyondan bağımsız olarak protein ekspresyonuna yol açtığı görüşünde birleşmişlerdir (15,59). Bundan dolayı bazı çalışmalarda amplifikasyon yanında mutasyonlarda araştırılmıştır (17,8,30,78). Bunun yanı sıra çalışmalarda belirlenen hasta gruplarında tirozin kinaz inhibitörlerine cevap ile HER-2/neu ve EGFR gen amplifikasyonu birlikte değerlendirilerek aralarında ilişki kurulmuş hastaların inhibitörlere karşı hassasiyeti incelenmiştir (7,8,9,29,30,17,78). 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 (10,12,57,70,75).

Capuzzo ve arkadaşlarının 2005 yılında yaptıkları bir çalışmada KHOAK tanısı almış toplam 102 hastada FISH yöntemi ile hem HER-2/neu hem de EGFR genlerindeki amplifikasyonları incelenmiştir. HER-2/neu gen amplifikasyon oranı % 22,8 EGFR gen amplifikasyonu ise %31 olarak tespit edilmiştir. Çalışma HER-2/neu ve EGFR gen amplifikasyonu tespit edilen hastalarda da tirozin kinaz inhibitörlerinin hassasiyetine yönelik olarak sürdürülmüştür (9).

Aynı çalışmada HER-2/neu amplifikasyonu bulunan hastaların çoğunu kadınların ve sigara içmeyenlerin oluşturulduğu belirtilmiş fakat istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç elde edilememiştir. Bizim çalışmamızda HER-2/neu amplifikasyonu saptanan olguların çoğu erkektir ve hepsi sigara içmektedir. Çalışmamız ile bu çalışma arasındaki fark bizim hasta grubumuzun çoğunluğunu sigara kullanan bireyler oluşturması (%76) ve çalışmaya katılan bireylerin kadın/erkek oranının azlığından kaynaklanabilir

Hirsh ve arkadaşlarının 2005 yılında 81 bronkoalveoler karsinomlu hastada FISH yöntemi ile yaptıkları çalışmada %30 oranında HER-2 gen amplifikasyonu, %32 oranında da EGFR gen amplifikasyonu saptamışlardır. Bu hastalarda, HER-2 amplifikasyonları ile survi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç elde edilememişken EGFR amplifikasyonlu hastalarda gefitinib tedavisi ile survi arasında istatistiksel olarak anlamlı sonuç elde edilebilmiş ve survinin uzadığı gösterilmiştir. FISH yönteminin gefitinib tedavisi uygulanacak hastaların belirlenmesinde uygun bir yöntem olacağı ifade edilmiştir (29).

Cappuzzo ve arkadaşları 2007 yılında KHOAK'li 190 hastada FISH yöntemiyle ile HER-2/neu ve EGFR genlerini birlikte incelemişlerdir. HER-2/neu gen amplifikasyonunu %28.8 oranında, EGFR gen amplifikasyonunu ise %25 oranında saptamışlardır. HER-2/neu ve EGFR amplifikasyonunun KHOAK'lerinde kemoterapiye

verilen cevapla ilişkili olmadığı belirtilen bu çalışmada seçilmiş tirozin kinaz inhibitörleri ile tedavinin standart kemoterapiye rakip olabileceği ve bu konudaki çalışmaların artırılması gerektiği belirtilmiştir (7).

Bizim çalışmamızda 5 hastada (%6.6) HER-2/neu ve EGFR genlerinin her ikisinde de amplifikasyon saptanmıştır. Bu oran literatürle karşılaştırıldığında düşük gibi görünse de çalışmamızdaki olgu sayısının azlığı ve KHOAK'lerinde her iki genin birlikte değerlendirildiği çalışmaların sınırlı sayıda olması ile açıklanabilir.

5.3. HER-2/neu Gen Amplifikasyonlarının FISH Yöntemi Sonuçları İle Literatür Bilgilerinin Karşılaştırılması (Çizelge 5.1)

HER-2/neu, insanda 17. kromozomun 17q11-q21 bölgesinde lokalizedir. 27 ekzon içerir ve 185 kDA'luk bir transmembran glikoproteini kodlar. HER-2/neu tirozin kinaz reseptörü olan bir transmembran proteinidir. Epidermal kökenli hücrelerin büyümesinin düzenlenmesinde önemli yere sahiptir. Yaptığımız çalışmada analiz edilebilen 75 tümör örneğinin 10 tanesinde HER-2/neu gen amplifikasyonu (%13.33) saptanmıştır. Literatürlerde HER-2/neu gen amplifikasyonlarını belirlemek için çoğunlukla FISH tekniği kullanılmıştır.

Çalışmamızda KHOAK'de FISH yöntemiyle HER-2/neu geninin amplifikasyonları araştırılmıştır. Elde ettiğimiz veriler, literatürde benzer çalışmalarla karşılaştırılmıştır.

Tan ve arkadaşlarının 2003 yılında 131 KHOAK tanısı almış hasta ile yaptıkları çalışmada FISH yöntemiyle %5.3 oranında HER-2/neu amplifikasyonu saptamışlardır. Bununla birlikte Adenokarsinom ile gen amplifikasyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir sonuca ulaşmışlar, gen amplifikasyonunun daha çok adenokarsinomda gözlendiğini ifade etmişlerdir. Bizim çalışmamızda HER-2/neu gen amplifikasyonu daha çok squamöz tipi tümöre sahip hastalarda (%8) gözlenmiş, histopatoloji ile gen

amplifikasyonu arasında anlamlı bir istatistik ilişki kurulamamıştır. Bu farklılık çalışmamızdaki tümör heterojenitesi ve populasyon farklılıkları ile yorumlanabilir (74).

Nakamura ve arkadaşları 2003 yılında 50 KHOAK'li hastada FISH yöntemi ile yaptıkları çalışmada %44 HER-2/neu gen amplifikasyonu tespit etmiştir. Bununla birlikte bu çalışmada meme kanserinden farklı olarak KHOAK'lerinde HER-2/neu gen amplifikasyonunun düşük grade de daha sık görüldüğü belirtilmiştir (54). Bu bulgu bizim çalışma verilerimizle uyumlu değildir. Ancak çalışmamızda düşük grade de olan olgu sayısının az olması bir etken olabilir. Diğer taraftan bireysel farklılıklar ve tümör heterojenitesi ile de bu farklılık yorumlanabilir.

Pellegrini ve arkadaşları 2003 yılında KHOAK tanı almış hastalarda FISH, IHK ve Real Time Revers Transkripsyon PCR (RT PCR) tekniklerini kullanarak yaptıkları çalışmaya 115 hasta dahil edilmiş, ancak 41 hasta FISH tekniği ile analiz edilebilmiştir. Bu 41 hastadan 9 'unda (%22) HER-2/neu gen amplifikasyonu tespit edilmiştir. Amplifikasyon oranı %22 olarak bulunmuştur. RT PCR yöntemiyle ulaşılan artmış ekspresyon oranı ise 115 hastada %41 olarak tespit edilmiştir. FISH yöntemi ile HER-2/neu gen amplifikasyonu bulunan hastaların tümünde RT PCR yöntemiyle HER-2/neu geninin mRNA ekspresyon artışı saptanmıştır. Ayrıca FISH tekniği ile negatif bulunan hastaların 11'inde RT PCR mRNA miktarında artış bulmuştur. Bu farklılık araştırmacılar tarafından amplifikasyon dışında başka mekanizmalara dayandırılmıştır (59).

Zinner ve arkadaşları 2004 yılında KHOAK tanısı almış 360 hastada IHK yöntemle %13 oranında HER-2/neu gen ekspresyonu saptamıştır (86).

Literatürde KHOAK hastalarda HER-2/neu gen amplifikasyonu oranları %5.3 - %44 gibi çok geniş bir yelpaze içerisinde konumlanmışlardır (54,74). Bizim çalışmamızda HER-2/neu gen amplifikasyonu için FISH yöntemi ile elde ettiğimiz % 13,3'lük oran bu yelpazenin içerisinde yer aldığından çalışmamız literatürle uyumludur. Bununla birlikte çalışmamız Türk popülasyonunda HER-2/neu gen amplifikasyonunun KHOAK'li dokularda araştırıldığı ilk çalışma olma özelliğindedir.

Tablo 5.1. HER-2/neu ve EGFR gen amplifikasyon sonuçlarının litaretür verileri ile karşılaştırılması

Araştırmacı ismi	KHOAK (n)	FISH	
		HER-2/neu	EGFR
Tan ve arkadaşları 2003	131	%5.3	–
Nakamura ve arkadaşları 2003	50	%44	–
Pellegrini ve arkadaşları 2003	41	%22	–
Capuzzo ve arkadaşları 2005	102	% 22,8	%31
Hirsh ve arkadaşları 2005	81	%30	%32
Suzuki ve arkadaşları 2005	181	–	%23
Cappuzzo ve arkadaşları 2005	102	–	%33
Tsao ve arkadaşları 2005	125	–	%47
Dacic ve arkadaşları 2006	196	–	%8.6
Ruiz ve arkadaşları 2006	44	–	%13.6
Jeon ve arkadaşları 2006	262	–	%30.2
Bozetti ve arkadaşları 2007	28	–	%36
Savic ve arkadaşları 2007	67	–	%32
Dziadziuszko ve arkadaşları 2007	102	–	%33
Sholl ve arkadaşları 2007	57	–	%12
Cappuzzo ve arkadaşları 2007	190	%28.8	%25
Bizim Çalışmamız	75	%13.3	%24

5.4. EGFR Gen Amplifikasyonlarının FISH Yöntemi Sonuçları İle Literatür Bilgilerinin Karşılaştırılması (Çizelge 5.1)

EGFR geni, insanda 7. kromozomun 7p11.2 bölgesinde lokalizedir. 28 ekzonlu bir gen olup, 170 kDA' luk bir glikoprotein kodlar. EGFR tirozin kinaz aktivitesine sahip transmembran bir proteindir ve hücre dışı sinyalleri hücre içine iletir. EGFR gen amplifikasyonu 75 olgunun 18'inde (%24) saptanmıştır. Yapılan çalışmalarda EGFR gen amplifikasyonlarını belirlemek için çoğunlukla FISH kullanılmıştır.

Suzuki ve arkadaşlarının 2005 yılında 181 KHOAK hastasında FISH yöntemi ile yaptıkları çalışmada %23 oranında EGFR gen amplifikasyonu saptamışlardır. Bu çalışmada IHK analiz ile % 34 oranda EGFR protein ekspresyon artışı tespit edilmiştir. EGFR protein ekspresyonu ve amplifikasyonu arasında anlamlı ilişki bulunmuş ve amplifikasyonlu hastaların %74'ünde protein ekspresyon artışı saptanmıştır (73). Fakat her iki parametre sonuçları ile hastaların klinikopatolojik bulguları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır. Bizim çalışmamızda EGFR onkogen amplifikasyonlarının herhangi bir klinikopatolojik bulgular arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır.

Tsao ve arkadaşlarının 2005 yılında KHOAK'li 125 hastada FISH yöntemi ile yaptıkları çalışmada % 47 EGFR gen amplifikasyonu saptamışlardır. Çalışmada EGFR amplifikasyonun adenokarsinomlu hastalarda daha yüksek oranda bulunduğu bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda da EGFR amplifikasyonları adenokarsinomlu hastalarda daha fazla bulunmuştur (Tablo 4.4.). Ayrıca bu çalışmada EGFR amplifikasyonu saptanan hastalarda yine bir tirozin kinaz inhibitörü olan erlotinibe amplifikasyon saptanmayanlara oranla daha iyi yanıt alındığı belirtilmiştir (78).

Cappuzzo ve arkadaşlarının 2005 yılında KHOAK'li 102 hastada FISH yöntemi ile yaptıkları çalışmada %33 oranında EGFR gen amplifikasyonu tespit edilmiştir. Bu çalışmada EGFR gen amplifikasyonu bulunan hastaların gefitinib tedavisine anlamlı derecede olumlu cevap verdiği irdelenmiş ve FISH yönteminin gefitinib tedavisine karar

vermede kullanılabilecek etkili bir yöntem olduğu ortaya konmuştur (8). Bu çalışmada EGFR gen amplifikasyonu kadınlarda ve sigara içmeyenlerde daha çok görülmüştür ve bu bulgular istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Bizim çalışmamızda EGFR amplifikasyonu daha çok erkeklerde ve sigara içenlerde saptanmıştır. Fakat bu durum istatistiksel olarak anlamlı değildir. Bu farklılık hasta grubumuzda sigara içmeyen bireylerin düşük sayıda bulunmasından kaynaklanmıştır. Yine de sigara içmeyen bireylerde de amplifikasyon saptanmış olması çalışmamızın bu çalışmaya yakın sonuçlar verdiğini göstermektedir.

Dacic ve arkadaşlarının 2006 yılında 196 KHOAK'li hastada FISH yöntemi ile yaptıkları çalışmada %8.6 oranında EGFR gen amplifikasyonu saptamışlardır. Hastaların klinopatolojik bilgileri ile EGFR amplifikasyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki kuramamışlardır. Bu çalışmada ayrıca IHK yöntemle EGFR protein ekspresyonu da araştırılmış ve FISH tekniği ile saptanandan daha yüksek oranda ekspresyon artışı bulunmuştur (%16). Bu durum amplifikasyon dışında başka mekanizmaların da EGFR proteininin ekspresyonunun artmasını etkilediğini düşündürmüştür. Çalışmada bu artışın sebeplerinin EGFR geninde meydana gelmiş mutasyonlar veya metilasyon gibi transkripsiyonel ve miRNA'lar gibi post transkripsiyonel faktörlerin olabileceği belirtilmiştir. Yine bu çalışmada IHK yönteminin subjektif kriterlere dayandığı ve bu yüzden IHK yönteminin değerlendirilmesinde standart kriterlerin oluşturulması gerekliliği ortaya konmuştur. Bu sebeple FISH yönteminin EGFR gen amplifikasyonunun saptanmasında daha doğru bir yöntem olduğu belirtilmiştir (15).

Ruiz ve arkadaşları 2006 yılında 58 KHOAK'li hastada FISH ve Cromogenik In Situ hibridizasyon (CISH) yöntemleri ile EGFR gen amplifikasyonunu araştırmışlardır. Çalışmada 58 hastanın 44'üne FISH analizi yapılabilmiş ve %13.6 oranında EGFR gen amplifikasyonu bulunmuştur (64).

Jeon ve arkadaşlarının 2006 yılında 262 KHOAK'li hastada FISH yöntemi ile yaptıkları çalışmada %30.2 oranında EGFR gen amplifikasyonu tespit edilmiştir. Çalışmada EGFR gen amplifikasyonları istatistiksel olarak sigara kullanan hastalarda

sigara kullanmayanlara göre anlamlı bulunmuştur (40). Bizim çalışmamızda sigara kullanımı ile EGFR gen amplifikasyonu arasında anlamlı istatistiksel bir ilişki bulunmasa da amplifikasyonların çoğu sigara kullanımı olan olgularda gözlenmiştir (Tablo 4.3.).

Bozetti ve arkadaşları 2007 yılında 28 KHOAK'li hastada FISH yöntemi ile yaptıkları çalışmada %36 oranında EGFR gen amplifikasyonu saptamışlardır. Bu çalışmaya 31 hasta alınmış ancak 28 hasta FISH yöntemiyle değerlendirilebilmiştir. Bu çalışmada da bizim karşılaştığımız deparafinizasyon zorlukları ortaya çıkmış ve 3 hasta FISH yöntemi ile değerlendirilememiştir (6).

Savic ve arkadaşları 2007 yılında 75 KHOAK'li hastada FISH yöntemi ile yaptıkları çalışmada %32,8 oranında EGFR gen amplifikasyonu belirlemişlerdir. 8 hasta deparafinizasyon tekniğine bağlı nedenlerden dolayı analiz edilememiştir(66).

Sholl ve arkadaşlarının 2007 yılında yaptıkları çalışmada FISH ve CISH yöntemlerinin her ikisiyle EGFR gen amplifikasyonlarını incelemişler ve her iki metotla da %12 oranında gen amplifikasyonu saptamışlardır. Çalışmada araştırmacılar EGFR gen amplifikasyon düzeylerinin bilinmesinin klinik olarak verilecek inhibitör tedavisinin planlanmasında bilgi sağlayabileceğini açıklamışlardır (68).

Yaptığımız çalışmada EGFR gen amplifikasyonunu, %24 oranında bulunmuştur. Literatürde EGFR gen amplifikasyonu çok farklı oranlarda (%8.6-%47) belirtilmiş olsa da bizim çalışmamızda bulduğumuz bu oran, literatürlerde bulunan en düşük ve en yüksek oranlar arasında olduğundan literatürle uyumlu olduğu görülmüştür (Tablo 5.1). Bununla birlikte çalışmamızda EGFR gen amplifikasyonunun cinsiyet, grade, sigara kullanımı, histopatolojik tanı ve aile öyküsüyle anlamlı istatistiksel bir ilişki saptanamamıştır. Ayrıca çalışmamız, Türk popülasyonunda EGFR gen amplifikasyonunun KHOAK'de araştırılan ilk çalışma olma özelliğini taşımaktadır.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Çalışmaya KHOAK'de tümör dokusundan alınan histopatolojik olarak kanser dokusu olduğu tespit edilmiş, parafine gömülü kesitlerden 5 mikron kalınlığında pozitif şarjlı lamlara fiske edilmiş 100 hastaya ait örnek dahil edilmiştir. Preparatlar HER-2/neu ve EGFR genleri için FISH tekniği ile incelenmiş, elde edilen verilerin literatürle uyumu karşılaştırılmıştır.

Çalışmaya dahil edilen 100 örnekten 75 tanesinde FISH tekniği ile sonuç alınabilmiştir. 25 örnekte FISH tekniği öncesi yapılan deparafinizasyon yönteminin zorluklarından dolayı yeterli kalitede ve sayıda hücreye ulaşılamamıştır. Bu kayıp çalışmamız için öngörülebilmıştır. Zira pek çok literatürde çalışmaya alınan örnek sayısından daha az sayıda örneğin FISH tekniği ile analiz edilebildiği gösterilmiştir. Deparafinizasyon, arşiv preparatları kullanılarak yapılan FISH çalışmalarında en zor ve en önemli basamaktır. Yaptığımız çalışmada deparafinizasyon işlemi için birçok protokol denenmiş ve modifiye edilmiştir.

Literatürlerde de belirtildiği üzere parafine gömülü dokularda gen ekspresyonu ve amplifikasyonunu belirlemek için uygulanan tekniklerin kullanıldığı çalışmalarda örnek kaybının en fazla görüldüğü teknik FISH yöntemidir. Bu verilere dayanarak parafine en duyarlı tekniğin FISH yöntemi olduğunu söylemek mümkündür. Parafin dokularda FISH yönteminin uygulanabilmesi için hücrelere ve hücre içerisindeki genetik materyale zarar vermeden hücreler arası parafinin uzaklaştırılması ve böylece DNA hibridizasyonunun etkin olması gerekmektedir. Parafinin tam olarak uzaklaştırılmadığı durumlarda yöntemin analiz basamağında, parafine yapışan problemler, dağınık sinyaller şeklinde gözlenip analizi güçleştirmektedir.

Arşiv dokulardan yapılacak FISH çalışmalarında, deparafinizasyon basamağının zorluğu göz önünde bulundurularak hedeflenen sayıdan daha fazla örneğin çalışmaya alınmasının, mümkün olduğunca ince kesitlerin tercih edilmesinin ve optimum sonuçlar

elde edilene dek farklı deparafinizasyon protokollerinin denenmesinin yararlı olacağı görüşündeyiz.

Çalışmamızın sonucunda KHOAK'de HER-2/neu gen amplifikasyonu %13,3, EGFR gen amplifikasyonu da %24 olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar literatür bilgileriyle uyumlu olarak değerlendirilmiştir.

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. Gefitinib ileri evre KHOAK tedavisinde FDA onayı alarak 3.sıra kemoretarapi ajanı olmuştur. Lapatinib, EKB-596, CI-1033, PKI-166 ve AEE-788'in de yer aldığı diğer inhibitörler henüz araştırılmaktadır. EGFR'ye karşı geliştirilmiş monoklonal antikorlardan Cetuximab(IMC-C225,Erbitux) ve HER-2/neu'ye karşı geliştirilmiş monoklonal antikorlardan Trastuzumab (Herceptin) ile çalışmalar devam etmektedir. Ancak bu ilaçların seçilmiş hastalarda daha etkin olabilecekleri belirtilmektedir. Bu amaçla HER-2/neu amplifikasyonunu belirlemede geliştirilen Herceptest isimli immünohistokimyasal yöntemeye dayanan testin, FISH yöntemi ile doğrulanarak etken maddesi trastuzumab olan herceptin isimli ilacın kullanılmasının uygun olacağı hastaların belirlenmesinde etkili bir yöntem olduğu saptanmıştır (14,34,77).

Çalışmamız Türk popülasyonunda KHOAK'li hastalarda HER-2/neu ve EGFR 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 genişletilmesinin gerektiği düşüncesindeyiz. Çalışmamız ve belirttiğimiz yönde yapılacak çalışmalar, ülkemizde akciğer kanserlerinin tedavisi amacıyla, yeni tedavi 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. Artan, S. 1996, FISH tekniğinde kullanılan problemler ve özellikleri, Teorik ve Pratik Floresan İn Situ Hibridizasyon, Ed.Başaran,N.; Etam, Eskişehir, 14-25s.
3. Artan, S. 1996, FISH tekniğinde hibridizasyon koşulları, Teorik ve Pratik Floresan İn Situ Hibridizasyon, Ed.Başaran,N.; Etam, Eskişehir, 34-39s.
4. Artan, S. 1996, Rutin FISH uygulamaları, Teorik ve Pratik Floresan İn Situ Hibridizasyon, Ed.Başaran,N.; Etam, Eskişehir, 51-59s.
5. Başaran, N., 1999, Tıbbi Genetik. 7. Baskı, Güneş ve Nobel Tıp Kitabevi, Bursa,
6. Bozetti, C., Tiseo, M., Lagrasta, C., Nizzolli, R., Guazzi, A., et all, 2008, Comparison between epidermal growth factor receptor gene expression in primary non small cell lung cancer and in fine-needle aspirate from distant metastatic sites, Journal of Thoracic Oncology, 3, 18-22p.
7. Cappuzzo, F., Ligora C., Torschi, L., Rossi, E., Trisolini, R., Paioli, D., Magrini, E., Finocchiaro, G., Bartolini, S., Cancellieri, A., Hirsch, F., R., 2007 EGFR and HER2 gene copy number and response to first-line chemotherapy in patients with advanced non-small cell cancer, Journal of Thoracic Oncology 2, 5:423-429p.

KAYNAKLAR(Devam ediyor)

- 8.** Cappuzzo, F., Varella-Garcia, M., Shigematsu, H., Domenichini, I., Bartolini, S., Ceresoli, G., L., Rossi, E., Ludovini, V., Gregorc, V., Toschi, L., Franklin, W., A., Crino, L., Gazdar, A., D., Bunn, Jr., P., A., Hirsch, F., R., 2005, Increased her2 gene copy number is associated with response to gefitinib therapy in epidermal growth factor receptor–positive non–small-cell lung cancer patients, *Journal Of Clinical Oncology*, 23, 5007-5018p.
- 9.** Cappuzzo, F., Hirsch, F., R., Rossi, E., Bartolini, S., Ceresoli, G., L., Bemis, L., Haney, J., Witta, S., Danenberg, K., Domenichini, I., Ludovini, V., Magrini, E., Gregorc, V., Doglioni, C., Sidoni, A., Tonato, M., Franklin, A., F., Crino, L., Bunn, P., A., Varella-Garcia, M., 2005, Epidermal growth factor receptor gene and protein and gefinitib sensitivity in non- small cell lung cancer, *Journal of the National Cancer Institute*, 97, 9, 643-655p.
- 10.** Ciampa, A. Xu, B. Ayata, G. Baiyee, D. Wallace, J. et all., 2006, HER2 status in breast cancer correlation of gene ampilification by fish with immunohistochemistry expression using advanced cellular imaging system, *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 14, 132-137p.
- 11.** Ciardiello, F., De Vita, F., Orditura, M., Tortora, G., 2004, The role of inhibitors in nonsmall cell lung cancer, *Lippincott Williams&Wilkins*, 16, 130-135p.
- 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 metastasic breast cancer, *Proc Am Soc Clin Oncol.*, 376, 17-97p.
- 13.** Cooper, M., 1997, *The cell, a molecular approach*, ASM Press Washington ,D.C.

KAYNAKLAR(Devam ediyor)

- 14.** 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.
- 15.** Dacic, S., Flanagan, M., Cieply, K., Ramalingam, S., Luketich, J., Belani, C., Yousem, S., A., 2006, Significance of EGFR protein of gene amplification in non-small cell lung carcinoma, *American Journal Clinical Pathology*, 25:860-865.
- 16.** Davidson, B.J., Hsu, T.C., Schantz, S.P., 1993, The genetics of tobacco induced malignancy, *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 119, 1198-1205p.
- 17.** Dziadziuszko, R., Holm, B., Skov, B., G., Osterlind K., Sellers, M., V., Franklin W., A., Bunn, P., A. Varella-Garcia, M., Hirsch F., R., 2007, Epidermal growth factor receptor gene copy number and protein level are not associated with cooutcome of non-small-cell lung cancer patients treated with chemotherapy, *Annals of Oncology*, 1:447-452,
- 18.** Field, J., K., 1999, Selection and validation of new lung cancer markers for the molecular-pathological assessment of individuals with a high risk of developing lung cancer. In: Brambilla C Brambilla E, eds. *Lung tumors fundamental biology and clinical management*, Marcel Dekker Inc., New York, 287-302 p. -
- 19.** Fong, K., W., Sekido, Y., Minna, J., D., 1999, Molecular pathogenesis of lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 118, 1136-1152 p.
- 20.** Fong, K., M., Minna, J., D., 2002, Molecular biology of lung cancer: clinical implication. *Clinics In Chest Medicine*, 23, 83-101 p.

KAYNAKLAR(Devam ediyor)

21. Franks, L., M., Teich, N., M., Cellular and molecular biology of cancer, 1998, Thied edition, Oxford Uni. Pres
22. Gelehrler, T., D., Collins, F., S., Ginsburg, D., 1998, Principles of Medical Genetic, Second Edition,
23. Geoffey, M., C., Hausman, E., R., 2006, Hücre: Moleküler Yaklaşım, (Çev.: Sakızlı M., Atabey N.), İzmir Tıp Kitabevi, İzmir, 592-640 s
24. Gjerdrum L., M., Sorensen B., S., Kjeldsen E., Sorensen F., B., Nexo 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: 42-51
25. Goustin, A., S., Leof, E., B., Shipley, G., D., Moses, H., K., 1986, Growth factors and cancer, Cancer Research, 46: 4015-1029, 14 p.
26. Grenle, R., T., Murray, T., Bolden, S., Wingo, P., A., 2000, Cancer statistics 2000, CA, Cancer J.Clin., 50, 7-33 p.
27. Groeger, A., M., Esposito, V., Mueller, M.R., et al., 1997, Advances in the understanding of lung cancer, Anticancer Research, 17, 2519-2522 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. Hirsh F., R., Varrella-Garcia, M., McCoy, J., West, H., Xavier, A., C., Gumerlock, P., Bunn, J., P., A., Franklin, W., A., Gandara, D., R., 2005, Increased epidermal growth factor receptor gene copy number detected by fluorescence in situ hibridization associates with increased sensitivity to gefinitib in patients with bronchioloalveolar carcinoma subtypes: a southwest oncology group study, Journal of Clinical Oncology, 23, 28, 6838-6845p.

KAYNAKLAR(Devam ediyor)

30. Hirsh, F., R., Varrella-Garcia, M., Cappuzzo, F., McCoy, J., Bemis, L., Xaavier, A., C., Dziadziuszko, R., Gumerlock, P., Chansky, K., Vest, H., Gazdar, A., F., Crino, L., Gandara, D., R., Franklin, W., A., Bunn, Jr., P., A., 2007, Combination of EGFR gene copy number and protein expression predicts outcome for advanced non-small cell lung cancer patients treated with gefitinib, *Annals of Oncology*, 18: 752-760p.
31. http://www.cancerpublications.com/newsletter/hematological/amger_slide/article_1/2
32. <http://www.med.gazi.edu.tr/egitim/donem1/dersler/kansergenetikaekmekci.htm>
33. <http://www.saglik.gov.tr>
34. <http://www.toraks.org.tr>
35. <http://www.turkcancer.org>
36. http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/f/f8/EGFR/signaling_pathways.png
37. <http://www.ygh.gov.tr>
38. Jacobson, D., R., Brambilla C, Brambilla E, eds., 1999, Ras mutations in lung cancer. In: *Lung tumors fundamental biology and clinical management*. Marcel Dekker Inc., New York, 139-156 p.
39. 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*, 12:197-204
40. Jeon, Y.K., Sung, S.W., Chung, J.H., Park, W.S., Seo, J.W., Kim, C.W., Chung, D.H., 2006, Clinicopathologic features and prognostic implications of epidermal growth factor receptor (EGFR) gene copy number and protein expression in non-small cell lung cancer, 54, 387-398p.

KAYNAKLAR(Devam ediyor)

41. Karlıkaya, C. 2005, Akciğer Kanseri Ders Notları
42. Kırışoğlu, C.E., Öztürk, C., Köktürk, N., 2003, Küçük hücreli dışı akciğer kanserinde epidermal büyüme faktör reseptörü ve inhibitörlerinin yeri, Solunum, 5:146-152s.
43. Köktürk N., Kırışlıoğlu, C.E., Öztürk C., 2003, Akciğer kanseri moleküler biyolojisi, Solunum,5,3,127-238p.
44. 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.
45. Kufe, Pollock, Weichselbaum, Bast, Gansler, Holland, Frei, 2003,Cancer Medicine 6,
46. Kumar, V., Cotran, R.S., Robbins, S.L., Robbins Temel Patoloji, 2003, (Çev: Çevikbaş U.), Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, 172-195 s.
47. Latta, E.K. Tjan, S. Parkes, R.K. O'Malley, F.P., 2002, The Role of Her-2/ neu Overexpression/Amplification in the Progression of Ductal Carcinoma In Situ to Invasive Carcinoma of the Breast, Mod Pathol 15(12): 1318-1325,.
48. Lecture, G.F.F., 1996, Molecular mechanisms of lung cancer. Interaction of environmental and genetic factors, Chest, 109, 14-19 p.
49. Lodish, Harvey; Berk, Arnold; Zipursky, S. Lawrence; Matsudaira, Paul; Baltimore, David; Darnell, James E, 2000; Molecular Cell Biology, Fourth Edition.
50. Martin, P., Kelly, C.M.A., Carney, D., 2006, Epidermal Growth Factor Receptor-Targeted Agents for Lung Cancer, Cancer Control, 13(2): 129-140p.

KAYNAKLAR(Devam ediyor)

51. Mitelman, 1994, Chromosomes, genes and cancer, *Cancer*, 44: 133-135p.
52. Mitsuo, S., David, S., Adif, G., Jhon, D.M., 2007, A Translational View of the Molecular Pathogenesis of Lung Cancer, *J Thorac Oncol.*, 2: 327-343p.
53. Nair, P., 2005, Epidermal growth factor receptor family and its role in cancer progression, *Current Science*, 88: 890-898p
54. Nakamura, H., Saaji, H., Ogata, A., Hosaka, M., Hagiwara, M., Kawasaki, N., Kato, H., 2003, Correlation between encoded protein overexpression and copy number of the HER2 gene with survival in non-small cell lung cancer, *Journal Cancer*, 103: 61-66p.
55. Nussbaum, R., L., McInnes, R., R., Willard, H., F., Thompson&Thompson *Tibbi Genetik*, 2005, Güneş Kitabevi, 312-313p..
56. Panagopoulos, I., Fioretos, T., Isaksson, M., 2001, Fusions of the MORF and CBP genes in acute myeloid leukemia with the t(10;16)(q22:p13), *Hum Mol Genet*, 10, 395-404 p.
57. 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.
58. 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.

KAYNAKLAR(Devam ediyor)

59. Pellegrini, C., Falleni, M., Marchetti, A., Cassani, B., Miozzo, M., Buttitta, F., Roncalli, M., Coggi, G., Bosari, S., 2003, HER2/neu alterations in non-small cell lung cancer: a comprehensive evaluation by real-time reverse transcription-pcr, fluorescence in situ hybridization, and immunohistochemistry, *Clinical Cancer Research*, 9, 3645-3652p.
60. Peter T., Sîan E., 2005, *Emery's Elements of Medical Genetics*, Twelfth Edition,
61. Pileri, S. A. Roncador, G. Ceccarelli, C. Piccioli, M. Briscoatis, A. et al, 1997, Antigen Retrieval Techniques in Immunohistochemistry: Comparison of Different Methods, *J. Pathol*, 183, 116-123p.
62. Ridolfi, R., L., Mehdi, R., Jamehdor, M., R., Arber, J., M., 2000, HER -2/neu testing in breast carcinoma: A combined immunohistochemical and fluorescence in situ hybridization approach, *Mod Pathol*, 13(8), 866-873p.
63. Roskoski Jr., R., 2004, The ErbB/HER receptor protein-tyrosine kinases and cancer, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 319, 1-11p.
64. Ruiz, M., I., G., Floor, K., Vos, W., Grünberg, K., Meijer, G., A., Rodriguez, J., A. & Giatcone, G., 2007, EGFR gene copy number detection in non-small cell lung cancer; a comparison of fluorescent in situ hybridization and chromogenic in situ hybridization, *Histopathology*, 51: 631-637p.
65. Sasaki, K., Kawauchi, S., 2003, Molecular cytogenetic analysis of solid tumors, *J. Orthop. Sci.*, 8, 457-459p.

KAYNAKLAR(Devam ediyor)

66. Savic, S. Tapia, C. Grili, B. Ruffle, A. Bihl, M. P. et all, 2008, Comprehensive Epidermal Growth Factor Receptor Gene Analysis from Cytological Specimens of Non-Small Cell Lung Cancers, *British Journal of Cancer* 98: 154-160p.
67. Sharma, S. V., Bell, D. W., Settleman, J., Haber, D. A., 2007, Epidermal growth Factor Receptor Mutations In Lung Cancer, *Nature*, 7: 169-181p.
68. Sholl LM., John Iafrate A., Chou YP., Wu MT., Goan YG., Su L., Huang YT., Christiani DC, Chirieac LR., 2007, Validation of Chromogenic In Situ Hybridization for detection of EGFR Copy Number Amplification In Nonsmall Cell Lung Carcinoma, *Modern Pathology*, 20: 1028-1035p.
69. Siegfried, S.M., 1999, Biology and chemoprevention of lung cancer, *Chest*, 113, 40S-45Sp.
70. 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
71. Strachan, Tom; Read, Andrew P.; 1999, *Human Molecular Genetics 2*, Garland Science
72. Sugimura, T., et al., 2000, Genetic and epigenetic alterations in carcinogenesis, *Mutat Res*, 462, 2, 3, 235-246p.
73. Suzuki, S. Dobashi, Y. Sakurai, H. Nishikawa, K. Hanawa, M. Ooi, A. 2005, Protein Overexpression and Gene Amplification Of Epidermal Growth Factor Receptor in Non-Small Cell Lung Carcinomas, *American cancer society*, 103, 1265-1273p.

KAYNAKLAR(Devam ediyor)

74. Tan, D. Deeb, G. Wang, J. Slocum, HK. Winston J. Wiseman, S. Beck, A. Sait, S. Anderson, T. Nwogu, C. Ramnath, N. Loewen, G., 2003, Her-2/neu protein expression and gene alteration in stage I-IIIa non small cell lung cancer: a study of 140 cases using a combination of high throughput tissue microarray, immunohistochemistry and fluorescent in situ hybridization, *Mol Path*, 12: 201-211p.
75. Toikkanen, S. Helin, H. Isola, J. Joensuu, H. 1992, Prognostic Significance of HER2 Oncoprotein Expression in Breast Cancer, *J. Clinical Oncology*, 10, 1044-1048p.
76. Tokumo, M., Toyooka, S., Ichihara, S., et al., 2006, Double mutation and gene copy number of EGFR in gefitinib refractory non-small cell lung cancer, *Elsevier*, 53: 117-121p.
77. Toschi, L., Capuzzo, F., 2007, Understanding the New Genetics of Responsiveness to Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitors, *The Oncologist*, 12, 211-220p.
78. Tsao, M.S. Sakurada, A. Cutz, J.C. et al., 2005, Erlotinib in Lung Cancer Molecular and Clinical Predictors of Outcome, *The New England Journal of Medicine* 353, 133-144p.
79. Vert, V., Kenneth, W. K., 2004, Cancer genes and the pathways they control, *Nature Medicine*, 10, 789-799p.

KAYNAKLAR(Devam ediyor)

80. Vincenzi, B., Schiavon, G., Silletta, D., Perrone, G., Di Marino, M., Angeletti, S., Baldi, A., Tonini, G., 2006, Cell cycle alterations and lung cancer, *Histol Histopathol*, 21, 423-435p.
81. Walker, A. Rosemary, 1998, The erbB/HER Type 1 Tyrosine Kinase Receptor Family, *Journal of Pathology* 185, 234-235p.
82. Wei Q., Spitz M.,R., 1997,The role of DNA repair capacity in susceptibility to lung cancer: A review. *Cancer and Metastasis Reviews* 16, 295-307p.
83. WHO “ World Cancer Report” (DSÖ), 2003, Genova (<http://www.who.int/cancer/en/>)
84. Wieser, R., Schreiner, U., Rieder, H., Pırc-Danoewinata, H., Gruner, H., Loncarevic, I., F., Fonatsch, C., 2003, Interphase fluorescence in situ hybridization assay for the detection of rearrangements of the EVI-1 locus in chromosome band 3q26 in myeloid malignancies, *Haematologica*, 88 (1), 25-30p.
85. William, S., K., Cummings, M., R., *Genetik Kavramlar*, 2000, (Çev.: Öner C.), Palme Yayıncılık, Ankara, 635-636p.
86. Zinner, R. G. Glisson, B. S. Fossella, F. V. Pisters, K. M. Kies, M. S. Massarelli, E. et al, 2004, Trastuzumab in Combination With Cisplatin And Gemcitabine Impatients with HER2 Overexpressing Untreated Advanced Non-Small Cell Lung Cancer Report of A Phase 2 Trial And Findings Regarding Optimal Identification Of Patients with HER2 Overexpressing Disease, *Lung Cancer*, 44(1), 99-110p.

PINAR ULUDAĞ

Doğum Tarihi : 29.01.1982
Doğum Yeri : ESKİŞEHİR
Uyruğu : T.C.
Medeni Hali : Bekar

Eğitim Durumu :

2005 – **Eskişehir Osmangazi Üniversitesi (Eskişehir)**
Sağlık Bil. Enst. Tıbbi Genetik Anabilim Dalı
Yüksek Lisans
2001 – 2005 **Eskişehir Osmangazi Üniversitesi (Eskişehir)**
Biyoloji Bölümü
1996 – 2000 **Prof Dr. Orhan Oğuz Anadolu Lisesi**
Lise
1989 – 1996 **Melahat Ünügür İlköğretim Okulu**
İlköğretim

Yabancı Diller :

İngilizce
(Orta seviyede)

Ulusal Toplantılarda Sunulan Yazılı Bildiriler

- 1) Çilingir O., Artan S., Cantürk K.M., Durak B., **Uludağ P.**, Bademci G., Önür H., Özdemir M., X kromozomu kısa ve uzun kol duplikasyonu ve fenotipe yansıması, 7. Ulusal Prenatal Tanı ve Tıbbi Genetik Kongresi, Kayseri, 2006
- 2) Çilingir, O., Özdemir M, Bademci, G., Aslan H., Durak B., Hassa H*, Eroğlu O., **Uludag, P.**, Atlı E., Muslumanoglu, MH., Artan S., Çoklu Kromozomal Yeniden Düzenlenmesi Olan Turner Sendromu Fenotipine Sahip Olgu, 8. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi, Çanakkale, 2008
- 3) Özdemir M., Bademci G., *Yarar C., Cantürk M., Üstüner D., **Uludağ P.**, Aldemir Ö., Gökmeşdan E., Çilingir O., Durak B., Müslümanoğlu MH., Artan S., Maternal t(5;18) Sonucu Parsiyel 5p Trizomili ve Parsiyel 18p Monozomili olgu, 8. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi, Çanakkale, 2008

Katıldığı Ulusal Bilimsel Toplantılar

1. VII. Ulusal Prenatal Tanı ve Tıbbi Genetik Kongresi, 2006, Kayseri Hilton Oteli
2. Ulusal Ege Sempozyumu, 2006, Afyon, İkbal Otel
3. Ege üniversitesi Ulusal Genetik Kongresi 2002, İzmir, EGE Tıp Fakültesi

Bilgisayar Bilgisi :

- * Microsoft Windows XP
- Word – Excel
- Applied image FISH, M FISH, Sitogenetik

İlgilenilen Alanlar: Fotoğraf, Sinema, Edebiyat, Tiyatro,