

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KÜÇÜK HÜCRELİ OLMAYAN AKCİĞER
KANSERLERİNDE
FLUORESAN *in-situ* HİBRİDİZASYON İLE
HER-2/*neu* AMPLİFİKASYONUNUN
SAPTANMASI**

ŞEBNEM YILDIRIMCAN

TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK
YÜKSEK LİSANS VE DOKTORA TEZİ

İZMİR-2006

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KÜÇÜK HÜCRELİ OLMAYAN AKCİĞER
KANSERLERİNDE
FLUORESAN *in-situ* HİBRİDİZASYON İLE
HER-2/*neu* AMPLİFİKASYONUNUN
SAPTANMASI**

ŞEBNEM YILDIRIMCAN

TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK
YÜKSEK LİSANS VE DOKTORA TEZİ

Yrd.Doç.Dr.ÇİĞDEM ERESEN YAZICIOĞLU

Bu araştırma, Dokuz Eylül Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Şubesi tarafından
2005.KB.SAG.022 sayı ile desteklenmiştir.

“Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanserlerinde Fluoresan *in-situ* Hibridizasyon İle HER-2/*neu* Amplifikasyonun Saptanması” isimli Yüksek Lisans Tezi, 04/08/2006 tarihinde değerlendirilerek kabul edilmesine oy birliği ile karar verilmiştir.

Yrd.Doç.Dr. Çiğdem ERESEN YAZICIOĞLU

Jüri Başkanı

Prof.Dr.Meral SAKIZLI

Jüri Üyesi

Prof.Dr.Aydanur KARGI

Jüri Üyesi

Yrd.Doç.Dr.Oğuz ALTINGÖZ

Jüri Üyesi

Yrd.Doç.Dr.Zeynep SERCAN

Jüri Üyesi

TEŞEKKÜR

Öncelikle yüksek lisans eğitimim süresince her konuda bana destek olan Sevgili Danışmanım Yrd.Doç.Dr.Çiğdem Eresen Yazıcıoğlu'na teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca; Anabilim Dalı Başkanımız Pof.Dr. Meral Sakızlı'ya ve diğer öğretim üyesi hocalarımın destek ve ilgilerinden dolayı; Prof.Dr.Aydanur Kargı'ya çalışmalarımındaki bilimsel ve laboratuvar desteği için; Dr. Zekiye Aydoğdu Dinç'e tüm içtenliği ile olan katkılarından dolayı ve tümör örnekleri ile bulgularını benimle paylaştığı için; Moleküler Genetiği bana sevdirecek, tezimin şekillenmesinde çok büyük katkısı olan Yrd.Doç.Dr.Oğuz Altungöz'e; Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nın sevgili FISH grubuna, başta Sait Tümer olmak üzere Nevin Aygün, Yalın Kılıç ve Sultan Cingöz'e; çok teşekkür ederim. Manevi desteğinden dolayı Özgür Kadıçeşme'ye ve son olarak herşeyimi borçlu olduğum aileme sonsuz teşekkürlerimi borç bilirim.

Şebnem YILDIRIMCAN

2006

Dizin

<u>DİZİN</u>	i
<u>TABLO DİZİNİ</u>	iii
<u>ŞEKİL DİZİNİ</u>	iv
<u>RESİM DİZİNİ</u>	v
<u>KISALTMALAR</u>	vi
<u>ÖZET</u>	1
<u>SUMMARY</u>	3
<u>1. GİRİŞ VE AMAÇ</u>	5
<u>2. GENEL BİLGİLER</u>	7
<u>2.1. Akciğer Kanseri</u>	7
<u>2.1.1 Sınıflandırma</u>	7
<u>2.1.2 Küçük hücreli dışı akciğer kanserlerin alt tiplerinin histopatolojik özellikleri</u>	9
<u>2.1.3 Evreleme</u>	10
<u>2.1.3.1 TNM sınıflandırılması</u>	11
<u>2.1.3.2 Akciğer Kanserinin Sınıflandırılmasında Kullanılan Uluslararası Sistem</u>	13
<u>2.1.3.3 Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri</u>	15
<u>2.1.3.4 Küçük Hücreli Akciğer Kanseri</u>	16
<u>2.1.4 Prognoz</u>	16
<u>2.1.5 Akciğer Kanserinin Evrenmesinde Görüntülemenin Önemi</u>	17
<u>2.1.6 Akciğer Kanserinin Moleküler Epidemiyolojisi</u>	18
<u>2.1.7 Akciğer kanseri gelişiminin moleküler yolları</u>	18
<u>2.1.8 Akciğer Kanseri Gelişimi İle İlgili Moleküler Belirteçler</u>	19
<u>2.1.8.1 Diagnostik Belirteçler</u>	19
<u>2.1.8.2 Prognostik Belirteçler</u>	19
<u>2.1.8.3 Prediktif Belirteçler</u>	21
<u>2.1.8.4 Erken Saptama Belirteçleri</u>	22
<u>2.1.9 Akciğer kanserlerinde gözlenen Kromozomal Dengesizlikler</u>	23
<u>2.1.9.1 17 nolu Kromozomu İlgilendiren Anomaliler</u>	25
<u>2.2 HER AİLESİ</u>	26
<u>2.2.1 HER2/erbB-2</u>	28
<u>2.2.2 P185'in biyolojik fonksiyonu</u>	32
<u>2.2.3 HER2'nin degradasyonu</u>	32
<u>2.2.4 Her-2'nin Değerlendirilmesi</u>	34
<u>2.3 Akciğer kanseri tedavisinde moleküler yaklaşımlar</u>	35
<u>2.3.1 Risk Tahmini</u>	35
<u>2.3.2 Prognozu değerlendirmede moleküler değişikliklerin göstergeleri ve tedaviye yanıtı</u>	35
<u>2.3.3 Yeni terapötik gelişimler için moleküler değişikliklerin göstergeleri</u>	36
<u>2.3.4 Değişmiş sinyal yollarının yeniden düzenlenmesi</u>	36
<u>2.3.4.1 Anti-reseptör terapisi</u>	37

<u>2.3.4.2 Pasif immünoterapi</u>	37
<u>2.3.5 Tekrar yerine konan defektif genler</u>	42
<u>2.3.6 Tümör baskılayıcı gen fonksiyonu olmayan hücrelerin hedefli ölümü</u>	42
<u>2.3.7 Akciğer kanserinin tedavisi için diğer yaklaşımlar</u>	43
<u>2.3.8 Kemoprevention yaklaşımları</u>	43
<u>2.3.9 Akciğer kanseri gelişimi ile ilgili moleküler değişikliklerin tanımlanması için yeni teknolojiler</u>	43
<u>2.4 Fluoresan in-situ Hibridizasyon (FISH)</u>	44
<u>3. GEREÇ VE YÖNTEMLER</u>	47
<u>3.1 Olgular ve Doku Örnekleri</u>	47
<u>3.2 FISH Yöntemi</u>	47
<u>3.2.1 Manuel Deparafinizasyon Kullanılarak yapılan FISH</u>	47
<u>3.2.1.1 Deparafinizasyon ve Ön İşlemler</u>	47
<u>3.2.1.2 Hibridizasyon</u>	48
<u>3.2.1.3 Değerlendirme ve optimizasyon</u>	49
<u>3.2.2 "Paraffin Pretreatment Reagent Kit (Vysis)" ve "PathVysion® HER-2 DNA Probe Kit (LSI® HER-2/neu SpectrumOrange™ /CEP® 17 SpectrumGreen™)" Kullanılarak yapılan FISH</u>	49
<u>3.2.2.1 Deparafinizasyon ve Ön İşlemler</u>	49
<u>3.2.2.2 Hibridizasyon</u>	51
<u>3.2.2.3 Değerlendirme ve optimizasyon</u>	52
<u>3.2.3 "Chromosome 17q12 (HER2/neu) / Alphasattellite 17 Coctail Probe, Dual Colour (Q-BIOGene) Kit" Kullanılarak yapılan FISH</u>	52
<u>3.2.3.1 Deparafinizasyon ve Ön İşlemler</u>	53
<u>3.2.3.2 Hibridizasyon</u>	54
<u>3.2.3.3 Değerlendirme ve Optimizasyon</u>	54
<u>3.3 Olguların Değerlendirilmesi</u>	54
<u>3.4 Kullanılan Kimyasallar ve Hazırlanışları</u>	55
<u>3.4.1 Manuel Deparafinizasyon İçin</u>	55
<u>3.4.2 "Paraffin Pretreatment Reagent Kit (Vysis)" ile Deparafinizasyon İçin</u>	56
<u>3.4.3 "Chromosome 17q12 (HER2/neu) / Alphasattellite 17 Coctail Probe, Dual Colour (Q-BIOGene) Kit"e ait Pretreatment Kiti ile Deparafinizasyon İçin</u>	56
<u>4. BULGULAR</u>	58
<u>4.1 Olguların Histopatolojik ve Klinik Verileri</u>	58
<u>4.2 Olguların HER-2 için IHC sonuçları</u>	59
<u>4.3 Olguların HER-2 için FISH Sonuçları</u>	62
<u>4.4 Olguların FISH Bulguları ile klinik verilerinin ve IHC Sonuçlarının Değerlendirilmesi</u>	80
<u>5. TARTIŞMA</u>	87
<u>6. SONUÇ VE ÖNERİLER</u>	92
<u>KAYNAKLAR</u>	93

Tablo Dizini

Tablo 1 : TNM' ye göre evreleme	14
Tablo 2: Akciğer kanseri için uluslararası sınıflandırma sisteminin düzeltmeleri (Mountain'den)	15
Tablo 3 : Küçük hücreli dışı bronşial karsinoma için evreye bağımlı 5 yıllık yaşam oranları	15
Tablo 4 : Akciğer kanserinde en sık gözlenen dengesizlikler	25
Tablo 5: Akciğer kanserinde gözlenen trizomi olguları	25
Tablo 6 : Akciğer kanserinde gözlenen monozomi olguları	26
Tablo 7: 17q'ya bağımlı dengesizlikler	26
Tablo 8 : Her-2 durumunu değerlendirmede kullanılan yöntemler	35
Tablo 9 : Yeni Her-2 hedefli ajanlar	41
Tablo 10 : Parafin Çözme	47
Tablo 11 : Proteaz ve yıkama	48
Tablo 12 : Denatürasyon	48
Tablo 13 : Hibridizasyon sonrası yıkama	48
Tablo 14 : Parafin Çözme	50
Tablo 15 : Önişlem ve yıkamalar	50
Tablo 16 : Proteaz ve yıkama	51
Tablo 17 : Denatürasyon	51
Tablo 18: Hibridizasyon sonrası yıkama	51
Tablo 19 : Parafin Çözme	53
Tablo 20 : Önişlem ve yıkamalar	53
Tablo 21 : Proteaz ve yıkama	53
Tablo 22 : Denatürasyon	53
Tablo 23 : Hibridizasyon sonrası yıkama	54
Tablo 24 : Olguların histopatolojik özellikleri ve klinik evreleri	58
Tablo 25 : Olguların klinik verileri	59
Tablo 26 : Olguların IHC sonuçları	60
Tablo 27 : Olguların Histopatolojik verileri ile FISH bulguları	81
Tablo 28 : Histopatolojik veriler ve FISH sonuçlarının karşılaştırılması	81
Tablo 29 : Olguların evrelendirme verileri ile FISH bulguları	82
Tablo 30 : Histopatolojik veriler ve FISH sonuçlarının karşılaştırılması	82
Tablo 31 : Olguların prognostik verileri ile FISH bulguları	83
Tablo 32 : Prognostik verileri ile FISH sonuçlarının karşılaştırılması	83
Tablo 33 : Olguların immunohistokimya (HER-2 için) verileri ile FISH bulguları	84
Tablo 34 : İmmünohistokimya ve FISH sonuçlarının karşılaştırılması	84
Tablo 35 : Olguların, hücrelerde saptanan değişik HER-2/Alfasatellit oranlarına göre FISH bulguları	85
Tablo 36 : Prognostik verileri IHC sonuçları ile HER-2/Alfasatellit sonuçlarının karşılaştırılması	86

Sekil Dizini

Şekil 1 : Akciğer kanseri için bölgesel lenf nodu yerleşimleri.	13
Şekil 2 : HER1,HER2,HER3 ve HER4'ün hücre membranı üzerindeki yerleşimleri/Her sinyal yolları.	27
Şekil 3 : HER sinyal ağının yapısı.	28
Şekil 4 : 17 nolu kromozom üzerinde HER-2'nin yerleşimi	29
Şekil 5 : HER2 proteinin yapısı	29
Şekil 6 : HER ailesinin aktivasyonu ile stimüle edilen temel sinyal yolları	31
Şekil 7 : HER1-HER2 dimerizasyonu	33
Şekil 8 : Herceptin'in hareket mekanizmaları	39
Şekil 9 : Nick Translation ve DOP PCR yöntemi ile prob işaretlenmesi	44
Şekil 10 : Genel FISH protokolü	45

Resim Dizini

Resim 1 : +2 boyanmış bir adenokarsinom örneği	61
Resim 2 : +3 boyanmış bir adenokarsinom örneği	61
Resim 3 : HER-2/neu (kırmızı) ve alfasatellit 17 (yeşil) için Normal kopya sayısına sahip interfaz alanları	63
Resim 4 : Her2/neu (kırmızı) ve alfasatellit 17 (yeşil) için dengeli trizomi gösteren interfaz nükleuslarına bir örnek	63
Resim 5 : Her2/neu ve alfasatellit 17 için kopya sayısı artışı gösteren interfaz nükleusları	64

Kısaltmalar

ADCC : Antikor bağımlı hücrel sitotoksiste

AHH : Aril hidrokarbon hidroksilaz

AJCC : American Joint Committee on Cancer

AR : Amphiregulin

BAC : Bronşioalveolar karsinoma

BT : Bilgisayarlı tomografi

CGH : Comparative genomic hybridization

CK : Sitokeratinler

COX-2 : Siklo-oksijenaz

ECD : Ekstrasellüler domain

EGFR : Epidermal büyüme faktörü reseptörü

FDA : Food and Drug Administration

FHIT : Fragile histidine triad

FISH : Floresan in situ hibridizasyon

HB-EGF: Heparin bağlayan EGF büyüme faktörü

HER - c-erbB : epidermal büyüme faktörü reseptör ailesi

HGF : Hepatosit büyüme faktörü

HGFR : Hepatosit büyüme faktör reseptörü

hnRNP : Heterojen nuklear ribonukleoprotein

IHC : İmmünohistokimya

KHAK : Küçük hücreli akciğer kanseri

LCA : Lökosit genel antijeni

LOH : Loss of heterozigosity

MR : Manyetik rezonans

N-CAM/CD56 : Nöral hücre adezyon molekülü

NSE : Nöron spesifik enolaz

p185HER2 : 185 kDaltonluk HER2/neu proteini

PET : Pozitron emisyon tomografisi

Rb : Retinoblastoma geni

RTK : Reseptör tirozin kinazlar

SSCP : Tek iplikli konformasyon polimorfizmi

TGF : Transforme edici büyüme faktörü alfa

TTF-1: Tiroid transkripsiyon faktörü-1

UICC : International Union Against Cancer

VEGF : Vasküler endotelial büyüme faktörü

β -cel : Betasellülin

ÖZET

KÜÇÜK HÜCRELİ OLMAYAN AKCİĞER KANSERLERİNDE FLUORESAN *in-situ* HİBRİDİZASYON İLE HER-2/*neu* AMPLİFİKASYONUNUN SAPTANMASI *

Şebnem Yıldırımcan

İnsan sağlığı açısından, günümüzde en önemli sorunlardan biri, kanserdir. Kanser çeşitleri içinde de akciğer kanseri; insidansı hızla artarak, batı ülkelerinde hem erkek hem de kadınlar arasında en sık görülen kanser haline gelmiştir. Akciğer kanseri hücrelerin morfolojisine göre “küçük hücreli akciğer kanseri” (KHAK) ve “küçük hücreli dışı akciğer kanseri” (KHDAK) olmak üzere başlıca 2 tipe ayrılır. Tüm akciğer kanserlerinin %80’i, küçük hücreli dışı akciğer kanserleridir.

Akciğer kanseri oldukça kötü bir prognoza sahiptir ve teşhis konulan olguların %90’ından fazlasının ölümlü sonuçlandığı tesbit edilmiştir. Bu durumda, prognostik belirteçler ve tedavide yeni yaklaşımlar büyük önem kazanmaktadır. Çeşitli moleküler değişikliklerin, tümör prognozunda önemli rol oynadığı ileri sürülmektedir .

Değişime uğrayan genlerden birisi olan ve 17q12’de yerleşim gösteren HER-2/*neu* onkogeni; p185^{HER2} olarak adlandırılan 185 kDaltonluk transmembran bir tirozin kinaz reseptörünü kodlar. HER2/*neu* geninin amplifikasyonu ve dolayısı ile reseptörün overekspresyonu, hücre bölünmesinin artmasına ve hücre büyümesinin hızlanmasına neden olur. HER2/*neu* overekspresyonu, küçük hücreli dışı akciğer kanserli hastaların %10-15’inde, adenokarsinomların %30’unda rapor edilmiştir.

Bu çalışmada; küçük hücreli dışı akciğer kanseri olgularının tümör örneklerinde “fluoresan *in situ* hibridizasyon” (FISH) yöntemi ile HER-2/*neu* amplifikasyonunun değerlendirilmesi ve sonuçların olguların klinik verileri ile birleştirilerek; HER-2/*neu* amplifikasyonunun prognoz üzerine olan etkisinin araştırılması, amaçlandı. Ayrıca son yıllarda, p185^{HER2},e bağlanan ve rekombinant DNA türevli bir monoklonal antikor olan Trastuzumab’ın (Herceptin), ileri safha küçük hücreli dışı akciğer kanserlerinin tedavisinde de, kemoterapi ile birlikte uygulanabilirliği hakkında kanıtlar elde edilmiştir. Trastuzumab ile başarılı bir tedavinin önşarttı, HER-2/*neu* amplifikasyonunun doğru olarak belirlenmesidir.

Çalışmamızda; önceden immunohistokimya (IHC) ile HER-2/*neu* ekspresyonları, negatif (%46), +2 (%29) ve +3 (%25) olarak değerlendirilmiş, 23 adet küçük hücreli dışı akciğer kanseri olgusunun parafin doku örneğinde, fluoresan *in situ* hibridizasyon tekniği (FISH) kullanılarak, HER2/*neu* geni amplifikasyonları saptandı. HER2/ALFA SATELLIT

orani ≥ 2.0 olan analiz sonuçları, gen amplifikasyonu var olarak FISH pozitif (+) ; HER2/CEP 17 oranı < 2.0 olanlar ise FISH negatif (-) olarak kabul edildi. Yapılan değerlendirmeler sonucunda, 24 olgunun %100'ü FISH (-) olarak bulundu ve bu olgulardan; 22'si dengeli dizomi, 1 olgu ise dengeli quadrizomi olarak saptandı. Sonuçlarımıza göre; prognoz ile FISH sonuçları arasında anlamlı bir ilişki saptanamamıştır. Ayrıca, IHC +2, +3 pozitif sonuçlu olgularımızda (%44), HER-2/*neu* proteininin overekspresyonunun, gerçek gen amplifikasyonu ile bağlantılı olmadığı gösterilmiştir.

Anahtar kelimeler : Küçük hücreli dışı akciğer kanseri, HER-2/*neu*, Herceptin, FISH

* Bu çalışma, Dokuz Eylül Üniversitesi Bilimsel Araştırma Şubesi tarafından desteklenmiştir.
Proje no: 2005.KB.SAG.022

SUMMARY

DETERMINATION OF HER-2/*neu* AMPLIFICATION THROUGH FLUORESCENCE *in-situ* HYBRIDIZATION IN NON SMALL CELL LUNG CANCER *

Şebnem Yıldırımcan

In terms of human health, one of the most important problems is cancer nowadays. Among the types of cancer, lung cancer; by increasing rapidly its incidence, has become the most widespread type of cancer among men and women in western countries. Lung cancer, according to morphology of cells is mainly divided in two types named as non small cell lung cancer (NSCLC) and small cell lung cancer (SCLC). 80 percent of all lung cancers are non small cell lung cancer.

Lung cancer has fairly bad prognosis and it has been proved that more than 90 percent of the cases which are diagnosed have ended with dead. In this state, prognostic signs and new approaches in treatment gain importance. It has been claimed that variety of molecular alterations play significant role in tumour prognosis.

HER-2/*neu* oncogene, one of the genes which is exposed to change and is located at 17q12, encodes a 185 kDa transmembrane receptor tyrosine kinase which is named as p185^{HER2}. The amplification of HER-2/*neu* gene and as a result of this the overexpression of receptor causes increase of cell division and fastening of cell growth. HER-2/*neu* overexpression has been reported in 10-15 percent of non small cell lung cancer patients and in 30 percent of adenocarcinoma.

In this study, it has been aimed to evaluate HER-2/*neu* amplification by means of FISH and searching the effect of HER-2/*neu* amplification on prognosis, by connecting the clinic data of cases with results, in tumour samples of non small cell lung cancer cases. Also in recent years, it has been got evidence about that Herceptin which binds p185^{HER2} and which is recombinant DNA derived monoclonal antibody may use associated with chemotherapy. Precondition of successful treatment thanks to Herceptin is that HER-2/*neu* amplification rightly determine.

In our study, it was determined HER-2/*neu* gene amplifications with FISH in parafin tissue samples of 23 NSCLC cases which were evaluated as negative (%46), +2 (%29) and +3 (%25) t, with the help of immunohistochemistry. The analysis results with HER2/CEP17 ratio

≥ 2.0 were accepted as FISH positive; on the other hand analysis results with HER2/CEP 17 ratio < 2.0 were accepted as FISH negative. As the result of mated evaluations, it was found as FISH negative 100 percent of 24 cases and it was evaluated as balanced dysomy 22 and balanced quadrisomy one of these cases. To our results, a significant connection between prognosis and FISH consequences cannot be determined. Besides, it has been determined that overexpression of HER-2/*neu* protein is not associated with real gene amplification.

Key words : Non small cell lung cancer, HER-2/*neu*, Herceptin, FISH

* This study was supported by Dokuz Eylül University, Scientific Research Department.
Project No: 2005.KB.SAG.022

1. GİRİŞ VE AMAC

Kanser, günümüzün en önemli sağlık sorunlarından biridir. 20. yüzyılda tüm kanser çeşitleri arasından; akciğer kanserinin insidansı artmış ve batı ülkelerinde hem erkek hem de kadınlar arasında en sık görülen kanser haline gelmiştir (1).

Akciğer kanseri, hücrelerin morfolojisine göre, küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK) ve küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK) olmak üzere başlıca 2 tipe ayrılır. Tüm akciğer kanserlerinin %20 kadarı, küçük hücreli akciğer kanseridir. Küçük hücreli karsinoma, hızlı gelişen bir tümördür ve erken teşhis önemlidir. Akciğer kanserlerinin yaklaşık %80'i, küçük hücreli dışı tiptedir. Küçük hücreli dışı akciğer kanseri, küçük hücreli akciğer kanserinden daha çok gözlenir ve gelişimi daha yavaştır (2). Bu kanserin 3 ana tipi vardır: bu tipler arasında tedavi ve yaşam süresi açısından fark yoktur. Bu 3 ana tip, skuamöz hücreli karsinom, adenokarsinom ve büyük hücreli akciğer kanseridir (3,4,5).

17q12'de yerleşim gösteren HER2/*neu* onkogeni; HER2 reseptörü ya da proteini olarak adlandırılan, 185 kDaltonluk transmembran bir tirozin kinaz reseptörünü kodlamaktadır(6). HER-2/*neu* geninin amplifikasyonu ve dolayısı ile reseptörün overekspresyonu, hücre bölünmesinin artmasına ve hücre büyümesinin hızlanmasına neden olur. HER-2/*neu* overekspresyonu, küçük hücreli dışı akciğer kanserli hastaların %10-15'inde, adenokarsinomların %30'unda rapor edilmiştir (6).

Fluoresan *in situ* hibridizasyon (FISH), blastomer veya gamette, doku kesitinde, interfaz nukleusunda ve metafaz kromozomlarında DNA dizilerinin saptanmasına izin veren moleküler sitogenetik bir yöntemdir. Bu teknikte, tekrarlı dizilere(sentromer, telomer), lokusa özgül dizilere ve/veya tüm kromozoma hibridize olan, hedef diziyeye komplementer fluoresan işaretli DNA problemleri kullanılır. FISH ile anöploidiler ve gen yeniden düzenlenimleri saptanabilir (7,8).

Trastuzumab (Herceptin); hücre-dışı insan epidermal büyüme faktörünün protein ürünü olan p185^{HER2}ya bağlanan, rekombinant DNA türevli bir monoklonal antikordur. Herceptin'in metastatik meme kanseri için konvensiyonel tedaviye oranla daha uzun bir yaşam sağladığı ispatlanmıştır. Son yıllarda ileri safha küçük hücreli dışı akciğer kanserlerinde Herceptin ve kemoterapinin kombinasyonunun kullanılabilirliği ile ilgili kanıtlar elde edilmiştir (9).

Çalışmamızda; FISH yöntemi uygulandıktan sonra HER-2/*neu* amplifikasyonu ile olguların klinik verilerini birleştirerek, HER-2/*neu* amplifikasyonunun prognoz üzerine olan etkisini araştırmayı plandık (10,11). Çalışmamız sırasında, küçük hücreli dışı akciğer kanserli olgularda, HER-2/*neu* için FISH analizinin rutin olarak uygulanabilir hale gelmesi de elde edilen ek bir kazanım olacaktı. Böylece, HER-2/*neu* gen amplifikasyonu pozitif olan hastalarda, klinik uygun görürse Herceptin kullanabilecektir (12).

2. GENEL BİLGİLER

2.1. AKCİĞER KANSERİ

Akciğer kanseri günümüzde en yaygın görülen kanserdir ve batı ülkelerinde 20.yy boyunca insidansı giderek artmıştır. Çoğunlukla 50-70 yaşları arasında görülmektedir (13). Kötü bir prognozu vardır ve hastaların sadece %10-15'i, 5 yıl veya daha uzun bir süre yaşamaktadır. Prognoz, kanserin hücre tipine ve klinik safhaya bağlıdır (14).

Genel ölüm nedenleri arasında ikinci sıradadır. Tüm kanser ölümlerinin % 28'ini oluşturur. Kadınlarda da insidansı giderek artmaktadır (13). Kemoterapi, radyasyon tedavisi , cerrahi girişimler ve uygulamalardaki tüm gelişmelere rağmen, akciğer kanserli bireyler için en uzun yaşam süresi 5 yıldır. Bu düşük yaşam oranı için en önemli neden, pek çok akciğer kanserinin ileri evrede saptanmasıdır. Düşük yaşam oranının diğer bir nedeni; primer akciğer tümörünün eksik tedavi edildiği bireylerde yüksek sıklıkta ikincil tümörlerin ortaya çıkmasıdır (KHDAK olan bireylerde %2, KHAK olan bireylerde %4-%6) (15) .

Akciğer kanserinin, karsinojenlere maruz kalma sonucunda oluşan, çok adımlı tümörojenez sonucunda ortaya çıktığı, düşünülmektedir. Metastaz, invazyon, sürekli angiogenez, hücre ölümünden kaçış, immortalizasyon ve hücre büyümesinde etkili düzenleyici genler, tümör baskılayıcı genler ve onkogenlerdeki genetik-epigenetik değişiklikler, akciğer kanseri gelişimi ile ilgili moleküler olaylardır.

Akciğer kanseri gelişimi, akciğerin özellikle genomik kararsızlığa neden olan karsinojenlere maruz kalması ile tetiklenir. Akciğer dokusundaki bu değişikliklerin direk ölçümü ve akciğer tümörojenez yolları ile ilgili bilgiler, karsinojenlere maruz kalan bireylerde kanser riskini değerlendirmeye, erken teşhise, bireyler için en uygun tedavi yaklaşımını tanımlamaya yarar. Akciğer tümörlerinin moleküler özellikleri hakkındaki bilgiler, aynı zamanda hasar görmüş hücresel yollara yönlendirilerek tedaviye olanak sağlamaktadır(15).

2.1.1 Sınıflandırma

1924'te Marchesani, akciğer kanserini, halen WHO (World Health Organization) sınıflandırmasında da geçerli olduğu şekliyle, skuamöz hücreli karsinoma, küçük hücreli karsinoma, adenokarsinoma ve büyük hücreli karsinoma olmak üzere 4 ana histolojik tip altında toplamıştır (14).

Akciğer karsinomları için 1999 WHO/IASLC sınıflandırması aşağıdaki gibidir:

- 1) Skuamöz Hücreli Karsinom
- 2) Küçük Hücreli Karsinom
- 3) Adenokarsinom
 - Asiner
 - Papiller
 - Bronşiolalveolar
 - Nonmüsinöz
 - Müsinöz
 - Mist müsinöz ve nonmüsinöz
 - Mukus yapan solid adenokarsinom
 - Mikst tip
- 4) Büyük Hücreli Karsinom
- 5) Adenoskuamöz Hücreli Karsinom
- 6) Pleomorfik, Sarkomatoid ya da Sarkomatöz elemanlar içeren karsinomlar
 - Pleomorfik Karsinom
 - İğsi Hücreli Karsinom
 - Dev Hücreli Karsinom
 - Karsinosarkom
 - Pulmoner Blastom

Akciğer karsinomlarının %90-95'i kadar büyük kısmında ilk 4 tip gözlenmektedir. Bu tiplerin insidansı ülkelere ve zamana göre farklılık göstermektedir. Avrupa ülkelerinin büyük bir çoğunluğunda; skuamöz hücreli karsinomun görülme sıklığı %40, adenokarsinom için %25, küçük hücreli karsinom (KHK) için %25, büyük hücreli karsinom için ise %10 olarak bildirilmektedir(13).

Skuamöz hücreli karsinom ve KHK'lar çoğunlukla santral yerleşimli; adenokarsinomlar ve büyük hücreli karsinomlar ise çoğunlukla periferik yerleşimlidir (13).

Tüm akciğer kanserlerinin %30'u skuamöz hücre grubundandır. Bunlar merkezi olarak yerleşmiştir ve çapı 4 cm'den büyüktür. Kaviteasyon %82 üzerindedir. Merkezi yerleşimleri nedeni ile lobar veya segmental çöküntü yaygındır (13).

Küçük hücreli akciğer kanseri tüm akciğer kanserlerinin %18'ini oluşturur. Büyük hacimli hilar ve mediastinal lenfadenopati yaygın olarak bulunur (13).

Adenokarsinomalar; çapı 4cm'den daha az olan periferik tümörlerdir ve tüm akciğer kanserlerinin yaklaşık %31'ini oluştururlar. Adenokarsinomunun bir alt tipi olan bronşalveolar hücreli karsinoma ise tüm akciğer kanserlerinin %2-10'unu oluşturur (13).

Büyük hücreli karsinoma küçük hücreli karsinomanın görünümüne sahip olmayan farklılaşmış tümörlerdir. Tüm akciğer kanserlerinin %9'unu oluşturur (13).

Adenoskuamöz karsinoma tüm akciğer kanserlerinin %2'sini içerir. Genellikle soliter periferik nodül olarak bulunur, %50'si 1-3 cm büyüklüğündedir ve %13 oranında kavitedir (14).

Tedavi ve prognozlarındaki dikkate değer farklılık nedeni ile küçük hücreli karsinom ve küçük hücreli dışı karsinom (adeno, skuamöz hücreli ve büyük hücreli karsinom) ayırımının yapılması uygun tedavinin planlanması yönünden oldukça önemlidir (13).

KHK'ları, küçük hücreli dışı karsinomlardan ayıran belli morfolojik özellikler vardır. KHK hücrelerini KHDK hücrelerinden ayıran asıl özellik; boyut değil, kromatin yapısıdır. KHK hücrelerinin bir diğer belirgin özelliği de, tümör hücrelerinin kolay zedelenmesi nedeni ile oluşan ezilme artefaktıdır. Fakat doğru tanı koyabilmek için biyopsi örneklerinde, az da olsa iyi korunmuş tümör hücresi aranmalıdır. Bu gibi durumlarda, "lökosit genel antijeni" (LCA) ile immünohistokimyasal boyama; ezilmiş hücrelerin doğru değerlendirilmesi için uygulanabilir (13).

2.1.2 Küçük hücreli dışı akciğer kanserlerin alt tiplerinin histopatolojik özellikleri

Skuamöz hücreli karsinoma : Erkeklerde daha sık rastlanır. Büyük bronşların santralinden çıkmaya eğilimlidir. Lokal hiler lenf nodlarına kolay yayılır; fakat toraks dışına diğer tiplerden daha geç yayılır (16).

Skuamöz hücreli karsinoma, bronş epitelinde yıllar öncesinde başlayan metaplazi veya displaziyi izleyen in-situ karsinomdan sonra ortaya çıkar. Mukozada 1-2 cm çapında kalınlaşma ve irregüler nodül şeklinde kabarıklık oluşmaya başlar. Bu safhada klinik açıdan bir bulguya rastlanmamasına rağmen; balgamda atipik epitel hücrelere rastlanır. Kısa süre içerisinde tümör; bronş lümenini kapatacak şekilde bir kitle haline gelir, akciğerin diğer kısımlarına invaze olur. Histolojik olarak, keratin inciler ve intersellüler köprüler oluşturan iyi diferansiye tip ya da az derecede skuamöz özelliğe sahip andiferansiye tip şeklinde görülür. Skuamöz hücreli karsinomlar metastaz yapmadan önce büyük ve bronşları tıkayan bir kitle oluşturdukları için diğer tiplerden daha iyi bir prognoza sahiptir (16).

Adenokarsinoma : Kadınlarda ve sigara içmeyenlerde en yaygın görülen tiptir(17). Genellikle akciğerdeki mukus üreten hücrelerden kaynaklanır (18). Adenokarsinomada tümör

hücreleri tarafından müsin üretimi gerçekleşir ya da glandular farklılaşma olur(17). Çoğunlukla periferal yerleşimlidir. Yavaş büyür ve daha küçük kitle oluştururlar. Diğer alt tiplere göre daha erken safhada metastaz yaparlar. Histolojik olarak neoplastik hücreler genellikle küboidal ve kolumnardır ve müsin salgırlar. Tipik olarak tubuler, asiner ya da papiller yapılar oluştururlar(16). Tedaviye, diğer alt tiplere göre daha az yanıt verir.(19)

Bronşioalveolar karsinoma (BAC) : Özel bir adenokarsinoma tipidir (16). Bronşioalveolar karsinoma terminal bronşioalveolar bölgelerdeki pulmoner parankimada oluşur. Tüm akciğer kanserlerinin %1-9'unda çeşitli şekillerde bronşioalveolar karsinomaya rastlanır(17) İki çeşidi vardır. Müsin salgılayan çeşidinde; tümörler multifokal müsinözdür. Çoğunlukla oluşturdukları kitle bir lobda sınırlı kalır, bazen ise birden fazla loba tutanabilirler. Histolojik olarak bu kitleler yüksek kolumnar hücrelerin iyi korunmuş alveolar septalar üzerinde sıralanan yapılar oluşturur. Mitoz nadirdir. Diğer çeşidi 10 cm çapına kadar olabilen gri-beyaz renkli tek bir nodül şeklindedir ve yerleşimi perifere yakındır. Multifokal tipin aksine neoplastik hücreler müsin salgılamazlar. Alçak kolumnar ya da küboidal şekildedirler. Alveolar septalar yerine tümörün fibrovasküler stroması üzerinde irregüler sıralanırlar, papiller yapılar belirgindir. Nukleuslar büyük, santral yerleşimlidir ve mitoz gözlenir. Bronşioalveolar karsinomanın prognozu diğer akciğer karsinomlarına oranla daha iyidir. Multifokal tipte 5 yıllık yaşam %20-25 oranında gözlenirken; lokalize tek kitle yapan tipte bu oran %50-70 civarındadır(16).

Büyük hücreli karsinoma : Sitolojik diferansiyasyon göstermez. Hücreler genellikle anaplastiktir ve büyük veziküler nukleusları vardır. Çoğunlukla periferal yerleşimli olup büyük hacimlidirler. Erken fazda metastaz görülür; bu nedenle kötü prognoza sahiptir. Tanı konuların hastaların çoğunda beyin metastazı vardır ve 5 yıllık yaşam oranı %2-3'dür.(16)

2.1.3 Evreleme

Kanserli hastaların tedavilerini planlayabilmek için; hastaların prognoz özelliklerine göre gruplandırılmasına gerek duyulmuştur ve bunun sonucunda da bir evreleme sistemi geliştirilmiştir. 1946'da ilk kez Denoix tarafından önerilen TNM sistemi, 1966'da "International Union Against Cancer" (UICC) ve 1973' de "American Joint Committee on Cancer" (AJCC) tarafından akciğer kanserlerine de uyarlanmıştır. Bu farklı yaklaşımlar 1986'da AJCC ve UICC'nin yıllık toplantılarında yeniden gözden geçirilerek; "Uluslar Arası Akciğer Kanseri Evreleme Sistemi" adı altında tek bir sistem haline getirilmiştir.

Bu evreleme sisteminde Evre I, II ve IIIA içindeki TNM alt gruplarının prognoz açısından oldukça heterojen olduğu gözlenmiştir. Evreleme sisteminin daha özgül olması için AJCC ve UICC'nin 1996' da yıllık toplantılarında kabul edilen yeni bir düzenleme yapılmıştır (13).

2.1.3.1 TNM sınıflandırılması

TNM sınıflandırmasını öneren ilk kişi Denoix'dir(1946). TNM sistemi en son 1997'de modifiye edilmekle beraber; temel prensipleri aynı kalmıştır. Hem küçük hem de büyük hücreli akciğer kanserini içeren akciğerin 4 temel histolojik tipini içerir. TNM sınıflandırılmasının en son düzenlenmiş şekli 1997' de Union International Contre le Cancer (UICC) ve American Joint Committee on Cancer (AJCC) tarafından düzenlenmiştir (14).

Anterior mediastinotomi ve mediastinoskopi gibi invazif işlemler ile saptanan hastalığın anatomik derecesi; primer tümör (T), bölgesel lenf nodu (N), uzak metastaz (M)'a göre tarif edilir. Sınıflandırmanın T komponenti; primer tümörün hem büyüklük hem de lokal invazyon derecesini, N komponenti bölgesel lenf nodu içeriğini belirtir. Mountain ve Dresler tarafından tarif edilen bölgesel lenf nodu yerleşimleri, Şekil-1'de gösterilmiştir. M komponenti ise metastazın varlığını veya yokluğunu belirtir (14).

PRİMER TÜMÖR (T)

T_x : Primer tümörün belirlenememesi veya balgam ya da bronş lavajında malign hücrelerin tespit edilip görüntüleme teknikleri ya da bronkoskopi ile tümörün gösterilememesi.

T₀ : Primer tümör belirtisi yok.

T_{is} : Karsinoma in situ .

T₁ : En geniş çapı ≤ 3 cm, akciğer veya visseral plevra ile çevrili, bronkoskopik olarak lob bronşundan daha proksimale (ana bronşa) invazyon göstermeyen tümör (örneğin: ana bronşda olmayan).

T₂ : Tümörün aşağıdaki özelliklerden en az birine sahip olması:

- En geniş çapı > 3 cm,
- Ana bronş invaze ancak ana karinaya uzaklık ≥ 2 cm
- Visseral plevra invazyonu
- Hiler bölgeye ulaşan ancak tüm akciğeri kapsamayan atelektazi ya da obstrüktif pnömoni

T3 : Tümörün herhangi bir büyüklükte olup; göğüs duvarı (superior sulkus tümörleri dahil), diafragma, mediastinal plevra, pariyetal perikard gibi yapılardan herhangi birine direkt invazyon göstermesi; veya karinaya 2 cm'den daha yakın ancak karinayı tutmayan ana bronştaki tümör; ya da bütün akciğeri kapsayan atelektazi veya obstrüktif pnömoni ile birlikte görülen tümör.

T4 : Tümörün herhangi bir büyüklükte olup mediasten, kalp, büyük damarlar, trakea, özefagus, vertebral kolon, karina gibi yapılardan herhangi birini invaze etmesi; veya malign plevral veya perikardiyal sıvı ile birlikte olan tümör; ya da tümörle aynı lob içinde satellit tümör nodül ve nodülleri (13).

BÖLGESEL LENF NODU (N)

Nx : Bölgesel lenf bezlerinin değerlendirilememesi.

N0 : Bölgesel lenf bezi metastazı yok.

N1 : Aynı taraf peribronşiyal ve/veya aynı taraf hiler lenf bezlerine metastaz ve primer tümörün direkt yayılması ile intrapulmoner bezlerin tutulması.

N2 : Aynı taraf mediastinal ve/veya subkarinal lenf bezlerine metastaz .

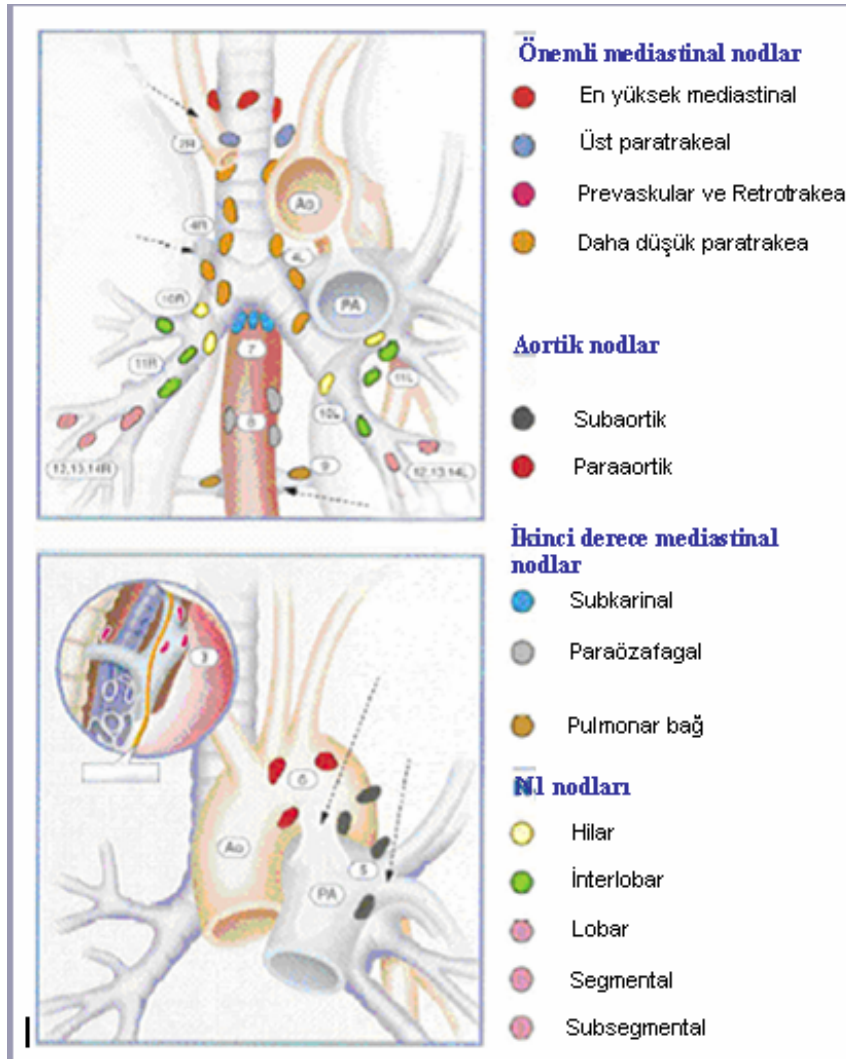
N3 : Karşı taraf mediastinal, hiler; aynı veya karşı taraf supraklavikular veya skalen lenf bezi metastazı (13).

UZAK METASTAZ (M)

Mx : Uzak metastaz varlığının değerlendirilememesi.

M0 : Uzak metastaz yok

M1 : Uzak metastaz (13)



Şekil 1 : Akciğer kanseri için bölgesel lenf nodu yerleşimleri (14).

2.1.3.2 Akciğer Kanserinin Sınıflandırılmasında Kullanılan Uluslararası Sistem

Bu sistem benzer prognoz ve tedavi seçenekleri olan hastaları gruplandırır. T, N,M' in çeşitli kombinasyonları farklı yaşamsal özellikler tarafından karakterize edilen farklı klinik veya yaşamsal patolojik safhaları tanımlar (14).

Akciğer kanserli hastaların sınıflandırılmasında, tedavinin planlanmasında ve etkinliğinin değerlendirilmesinde bölgesel lenf bezlerinin durumu oldukça önemli bir faktördür. Lenf bezlerinin durumunu daha iyi değerlendirebilmek için; haritalar geliştirilmiştir. 1970' lerde Naruke ve arkadaşları tarafından ilk kez geliştirilen harita, AJCC tarafından kabul edilmiştir. 1983' de " American Thoracic Society " tarafından geliştirilen ikinci bir harita, ilerleyen yıllarda "North American Lung Cancer Study Group " tarafından tekrar düzenlenerek yaygın bir şekilde kullanılmıştır. 1996' da Factors TNM Committee of the UICC birbirine oldukça benzeyen bu iki haritayı birleştirmiş ve tek bir bölgesel lenf bezi

haritası kullanılması önerilmiştir (Tablo 1) (13). En son olarak, Mountain tarafından uluslararası sınıflandırma sisteminde son bir düzeltme daha yapılmıştır (Tablo 2).

Tablo 1 : TNM' ye göre evreleme (13)

1996		1986	
	-*	Gizli karsinom: TxN0M0	
EVRE 0 :	Tis N0M0	EVRE 0 :	Aynı
EVRE IA :	T1N0M0	EVRE I :	T1N0M0
EVRE IB :	T2N0M0		T2N0M0
EVRE IIA :	T1N1M0	EVRE II :	T1N1M0
EVRE IIB :	T2N1M0		T2N1M0
	T3N0M0		
EVRE IIIA :	T3N1M0	EVRE IIIA :	T3N0M0
	T1N2M0		T3N1M0
	T2N2M0		T3N2M0
	T3N2M0		T1N2M0
			T2N2M0
EVRE IIIB**:	T4N0M0	EVRE IIIB :	Aynı
	T4N1M0		
	T4N2M0		
	T1N3M0		
	T2N3M0		
	T3N3M0		
	T4N3M0		
EVRE IV*** :	Herhangi bir T	EVRE IV :	Aynı
	Herhangi bir N		
	M1		
* Gizli karsinom için evreleme yapılmaz			
** T4 içine tümörle aynı lob içindeki satellit tümör nodülü dahil edilmiştir.			
*** Tümör lobu dışındaki nodüller M1 olarak sınıflandırılır.			

Tablo 2: Akciğer kanseri için uluslararası sınıflandırma sisteminin düzeltmeleri (Mountain'den) (14)

Safha	TNM subset
1A	T1N0M0
1B	T2N0M0
2A	T1N1M0
2B	T2N1M0
3A	T3N1M0 T1N2M0 T2N2M0 T3N2M0
3B	T4N0M0 T4N1M0 T4N2M0 T1N3M0 T2N3M0 T3N3M0 T4N3M0
4	T,N yok, M1

2.1.3.3 Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri

Klinik ya da cerrahi-patolojik olan TNM alttiplerinin kombinasyonları, akciğer kanserinin farklı cerrahi-patolojik veya klinik safhalarına göre gruplandırılır (Tablo-2).

Cerrahi-patolojik sınıflandırma; klinik sınıflandırmadan daha doğru bir prognoz belirtecektir (Tablo-3).

Tablo 3 : Küçük hücreli dışı bronşial karsinoma için evreye bağımlı 5 yıllık yaşam oranları

Evre	Klinik evreleme (%)	Patolojik evreleme (%)
IA	61	67
IB	38	57
IIA	34	55
IIB	22-34	38-55
IIIA	9-13	23-25
IIIB	1-8	-
IV	1	-

1997'deki son sınıflandırmaya göre, safha I ve safha II, A ve B olarak iki gruba ayrılmıştır.

Evre-I akciğer ile sınırlıdır. Karinanın 2 cm içindedir. Ana bronşüolün invazyonu, parietal pelevral invazyon, ekstratorasik metastaz veya lenf nodu yoktur. Evre-I; en iyi prognoza sahip olan IA (T1N0M0) safhasına (5 yıl için %61 yaşam) ve IB (T2N0M0) safhasına (5 yıl için %38 yaşam) ayrılır.

IIA evresi, ipsilateral hilar lenf nodu metastazı veya intrapulmonar lenf nodu metastazına (T1N1M0) sahip, T1 primer tümörleri olan hastaları içerir. Bu hastaların 5 yıl içindeki yaşam oranı %34'tür. II B evresi; lokalize olmuş hilar lenf nodu olan (T2N1M0) akciğerle sınırlı, büyük tümörü olan hastaları içerir. 5 yıl içindeki yaşam oranları %22-34 oranındadır.

IIIA tümörleri, Tablo1'de listelendiği gibi 4 cTNM alt grubunu içerir. Bu grup T1-3 tümörleri ve N2 nodları veya T3 tümörleri ve ipsilateral hilar nodları olan hastalardan oluşur. Evre I ve II tümörlerinin aksine; lobektomi veya pnömonektomi kullanarak, tamamen çıkarılamazlar. IIB safhası, N3 lenfadenopatisi veya T4 tümörleri olan tüm hastaları içerir. 5 yıllık yaşam oranları % 1-8 arasındadır.

IV evresindeki hasta grupları, prognozu kötü (5 yıl için %1), metastazı var olan hastaları içerir. Bu hastalar için, sadece destekleyici terapi uygundur (14).

2.1.3.4 Küçük Hücreli Akciğer Kanseri

Küçük hücreli akciğer kanseri olan hastalar; hastalığı sınırlı ve ilerlemiş olmak üzere iki gruba ayrılır. Sınırlı hastalık, radyoterapi bölgesi sınırlı karsinoma olarak tanımlanır. İleri karsinoma ise, radyoterapi bölgesi oldukça geniş olan karsinomayı ifade eder. Sınırlı hastalığı olan hastalar için radyoterapi ve kemoterapi, ileri hastalığı olanlar için ise palyatif terapi uygulanır .

Prognoz metastatik yerleşime bağlıdır. Karaciğer ve kemik iliği metastazı düşük prognoz taşırken; sadece beyin metastazı ile sınırlı hastalığı olanlarla aynı prognozu taşır (14).

2.1.4 Prognoz

Akciğer kanseri kötü bir prognoza sahiptir; hastaların sadece %10-15 kadarı 5 yıl veya daha uzun süre yaşar. Yapılan incelemeler 1981-1990 arasında ölümden kurtulanların sayısında %0.2 oranında azalma olduğunu göstermiştir. Bu oran meme kanseri (%11), melanoma (%32) gibi kanserler ile karşılaştırıldığında oldukça düşüktür.

Prognoz; klinik faktörler kadar tümörün histolojik sınıflandırılmasına ve anatomik derecelendirilmesine de bağlıdır. Akciğer kanserinin histolojik tipi; prognoz ve tümör davranışı ile korelasyon gösterir. Bu durum KHAK ve KHDAK karşılaştırıldığında açıkça görülmektedir.

Skumöz hücreli karsinoma (KHDAK alt tiplerinden), diğer akciğer malignansilerinden daha iyi bir prognoza sahiptir. Skumaöz tipten sonra en iyi prognoza sahip olan alt tip, adenokarsinomadır. Bronşoalveolar karsinomlarda (özellikle nodular form, %75-100), en yüksek yaşama oranı gözlenir. Adenoskumöz karsinomanın prognozu, diğer küçük hücreli dışı akciğer karsinomalarına benzer. Büyük hücreli karsinomanın prognozu genellikle kötüdür.

Akciğer kanserleri bir dizi semptomu neden olur ve hastanın performansını kötü yönde etkiler. Bunlar önemli prognostik değere sahip olabilir (14).

2.1.5 Akciğer Kanserinin Evrenmesinde Görüntülemenin Önemi

Uzun bir yaşam ve en iyi tedavi için, akciğer kanserlerinin doğru evrenmesi son derece önemlidir. Şüpheli hastaların değerlendirilmesi için, ilk başta en yaygın olarak BT (Bilgisayarlı tomografi) ve göğüs radyografisi kullanılmaktadır. BT; göğüs radyografisinden daha hassas olmasına rağmen, hastalığın derecesini fazla ya da düşük hesaplayabilir. Görüntüleme tekniklerine dayalı evrendirme, cerrahi- patolojik evrendirmeden daha iyi bir gruplandırma yapar. Bu nedenle görüntüleme tekniklerine dayalı evrendirme, prognoz için daha doğru bir tahmin öne sürmektedir. MR (manyetik rezonans), PET (pozitron emisyon tomografisi) gibi yeni teknikler daha doğru sınıflandırmaya olanak sağlamaktadır.

BT; tümör büyüklüğü ve invazyon hakkında bilgi verir. Göğüs duvarı invazyonu için BT'nin özgüllüğü ve hassaslığı %38-87 ve %40-90 arasında değişir. MR, mediastinal ve göğüs duvarı invazyonunun değerlendirilmesinde kullanılan konvensiyonel BT'den daha iyi bir yöntemdir.

Metastatik nodları normal olanlardan ayırmada, BT'nin hassaslığı (%41-67) ve özgüllüğü (%79-86) düşüktür. PET metastatik nodları değerlendirmede, BT'den daha yüksek bir hassaslığa (%67-100) ve özgüllüğe (%81-100) sahiptir.

Akciğer kanserinde cerrahi tedavinin başarısız girişimlerinin %75'ini, tanımlanmamış metastatik hastalıklar oluşturur. BT; abdominal metastazın yaklaşık %75'ini saptar; fakat adrenal bezlerdeki özgüllüğü, benign adrenal lezyonların yüksek prevalansı ile sınırlanır. PET adrenal metastazın değerlendirilmesinde yüksek hassaslık (%100) ve yüksek özgüllüğe (%80-

100) sahiptir. Negatif bir PET'den sonra, biyopsiye gerek duyulmaz. PET, aynı zamanda kemik metastazını saptayabilir. Ayrıca hastaların %11-14'ünde tüm vücutta gizli kalmış metastazları saptayabilmektedir.

Konvensiyonel BT ile PET'ın birlikte kullanımı; sınıflandırmanın doğruluğunu artırır (14).

2.1.6 Akciğer Kanserin Moleküler Epidemiyolojisi

Sigaraya maruz kalma, hava kirliliği, radon, asbestos, arsenik, nikel, metaller ve organik kimyasallara maruz kalma akciğer kanserinin temel etiolojik faktörleridir (15).

Sigara akciğer kanserini tetikleyen en önemli faktördür. Sigara, hem gaz hem de katran fazda akciğerlerde dağılan 4000' den fazla kimyasal bileşiği içerir. Bu bileşiklerin 40'ından fazlası karsinojen olarak tanımlanmıştır. Sigara içimine kronik maruz kalmanın, akciğer kanseri olgularının %90'ından sorumlu olduğu düşünülmektedir. Sigara içiminin süresi ve yoğunluğu akciğer kanseri riski ile doğrudan ilişkilidir. Örneğin 20 yıl kadar sigara içen bireylerin akciğer kanserine yakalanma riski yaklaşık %10'dur. Sigaraya ara vermenin akciğer kanseri riskini azalttığı düşünülmeye karşın, ara vermenin etkisi kişi sigarayı bıraktıktan birkaç yıl sonra gözlenmektedir. Üstelik sigaraya ara verme kanser riskinin sadece yarısını azaltabilir. Bu nedenle; yeni akciğer kanseri olgularının %50'sinden fazlası daha eski sigara içicilerinde ortaya çıkmaktadır. Skuamöz hücreli kanserlerin %90'ı ve küçük hücreli kanserlerin büyük bir kısmında sigara çok önemli bir faktör iken; adenokarsinomlarda bu oran %40 kadardır (13).

Uranyumun parçalanma ürünleri ve radon radyasyon etkisi ile akciğer kanserini tetikleyen faktörler arasında yer almaktadır. Tüberküloz, kronik obstrüktif akciğer hastalığı, akciğer infarktı, silikozis, fibrozis gibi akciğer hastalıkları ve viral infeksiyon geçirmiş kişilerin kansere yakalanma olasılığı oldukça yüksektir. P-450 sisteminde bulunan aril hidrokarbon hidroksilaz (AHH) enziminin yüksek aktivite gösterdiği kişilerde, akciğer kanser riski 8 kat kadar artmaktadır (13).

2.1.7 Akciğer kanseri gelişiminin moleküler yolları

Akciğer kanserleri uzun zaman içerisinde geliştiği için, tek bir olguda karşılaşılan genetik değişiklik sayısı son derece fazladır. Ayrıca büyüme faktörü ve reseptörlerini (HER2/*neu*, EGFR, MET, insülin büyüme faktörü reseptör genleri vb.) kodlayan genlerde, BCL-2 ve telomeraz genlerinde, epigenetik değişikliklere rastlanmaktadır. Hanahan ve

Weinberg, akciğer tümör gelişimi sırasında etkili 6 temel yolağın olduğunu ileri sürmüştür (2000). Bunlar; büyüme sinyallerindeki kendi kendine yeterliliği artırma (büyüme faktörü reseptöründeki değişiklikler vb.), antibüyüme sinyallerine duyarsızlık (Rb kontrol yolağındaki defektler vb.), apoptozdan kaçma (p53 veya Bcl-2'deki değişiklikler vb.), çoğalma potansiyelindeki sınırsızlık (sürekli telomeraz ekspresyonu vb.) , sürekli anjiogenez (vasküler endotelial büyüme faktörünün upregülasyonu vb.), doku invazyonu ve metastazdır (integrin ekspresyonundaki değişiklikler vb.)(15).

2. 1.8 Akciğer Kanseri Gelişimi İle İlgili Moleküler Belirteçler

2.1.8.1 Diagnostik Belirteçler

Nöroendokrin belirteçler : Nöroendokrin hücrelerinin hiperplastik veya neoplastik proliferasyonu, lezyonlara/tümörlere neden olur. Nöroendokrin fenotipi olan tümörler, nöron spesifik enolaz (NSE), kromogranin, synaptophysin ve nöral hücre adezyon molekülü (N-CAM/CD56) gibi belirteçler ile tanımlanır (20) .

Sitokeratinler : Sitokeratinler (CK), epitel hücrelerde karakteristik olarak bulunan intermediate filamentlerin bir ailesidir. CK özellikle karsinomanın teşhisini doğrulamada önemlidir. CK7/CK20 IHC paneli; akciğerde metastatik adenokarsinomayı primer dokudan ayırt etmek için kullanılır (20) .

Tiroid transkripsiyon faktörü-1 (TTF-1) : TTF-1, akciğerin bronşoalveolar hücrelerinde ve tiroidin foliküler ve parafoliküler C hücrelerinde, doğumdan sonra eksprese edilen nükleer bir proteindir. Akciğer neoplazmlarında; TTF-1 ekspresyonu adenokarsinomalarda %80'in üzerinde; skuamöz hücreli karsinomalarda ise % 5-40 oranında gözlenir (20) .

Mezotelial hücre belirteçleri : Plevrayı içeren akciğer karsinoması ve malignant plevral mezotelyomalar arasındaki fark, patologlar için diagnostik bir değişikliktir. Malignant mezotelyomanın teşhisinde tek bir belirteç yoktur. Ber EP4, CEA, Bg8, TTF-1 ve Leu-M1(CD15) negatif, calretinin, sitokeratin5/6, thrombomodulin ve WT-1 ise pozitif belirteç olarak kullanılır. Genelde 3 pozitif ve 2 negatif belirteci içeren sonuçlar; malignant mezotelyoma için diagnostiktir (20).

2.1.8.2 Prognostik Belirteçler

Prognostik faktörler; hastanın hayati sonucunu belirleyen tümör faktörleridir. Hücresel fonksiyonlarda düzenleyici rolleri olan yeni genlerin keşfi ile birlikte; pek çok biyolojik ve moleküler değişiklik; potansiyel moleküler prognostik faktör olarak araştırılmıştır (20).

Ras onkogeni : Ras ailesi genleri ve proteinleri; hücre yüzeyinden nukleusa biyokimyasal sinyalleri ileten, en iyi anlaşılmış moleküllerdendir. Ha-ras, K-ras ve N-ras olmak üzere ras protoonkogeninin 3 aile üyesi vardır. Bu genler ayrı kromozomlar üzerinde yerleşmiştir; fakat fonksiyonel ve yapısal olarak benzer proteinler üretirler.

Ras aktivasyonu; kanser biyolojisinde önemli olan invazyon, metastaz, anjiogenez, apoptoz ve mitojenez ile ilişkilidir. Akciğer kanserinde çoğunlukla K-ras genine ait mutasyonlar gözlenir. Bu mutasyonlar büyük hücreli faklılaşmamış karsinomaların %20, adenokarsinomaların %35'inde gözlenirken, skuamöz hücreli karsinomlarda (< 5%) çok nadir gözlenir (20).

HER/c-erbB (epidermal büyüme faktörü reseptör ailesi) ve ligandları : Reseptör tirozin kinazlar (RTK); protein tirozin rezidülerini fosforile edebilen intrasellüler tirozin kinaz domaini ve ekstrasellüler ligand bağlayan domaini olan, transmembran proteinleridir. Akciğer kanserinde en çok çalışılan ve en çok rastlanan RTKlar, HER/c-erbB ailesi reseptörlerinin üyeleri olan epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) ve HER-2/c-erbB2/*neu*'dur. İmmünohistokimya ile saptanan EGFR'in yüksek ekspresyonu; adenokarsinomaların yaklaşık %50'sinde, skuamöz hücreli karsinomaların %90'ından fazlasında gözlenir. KHDAK'de EGFR overekspresyonunun prognostik değeri tartışmalıdır .

İkinci önemli c-erbB ailesi geni meme kanserinde çok fazla çalışılmış olan HER-2/c-erbB2/*neu*'dur. HER-2 geninin amplifikasyonu akciğer kanserinde nadiren gözlenir.

KHDAK'de ilk kez Kern ve arkadaşları HER-2 ekspresyonunun prognostik önemini ve sıklığını değerlendirmişlerdir. Çalışmalarında adenokarsinoma ve skuamöz hücreli karsinomada, %36-38 oranında ekspresyon gözlemişlerdir (20).

Hepatosit Büyüme Faktörü ve reseptörü Met/HGFR : Met/hepatosit büyüme faktör reseptörü (HGFR), insülin reseptörüne yakın homoloji gösteren bir RTK'dır. Met ile ligandı HGF'in etkileşimi; diferansiyasyon, motilite ve hücre proliferasyonu üzerinde pleotropik etkiler oluşturur. Hem Met hem de HGF'in ekspresyonuna, insan kanserlerinde sıklıkla rastlanmaktadır.

Tsao ve arkadaşları in situ hibridizasyon ve IHC kullanarak; KHDAK'de HGF mRNA'sının çoğunlukla tümör hücreleri tarafından eksprese edildiğini göstermiştir (20).

Retinoblastoma (Rb) ve p16^{INK4A} : *Rb* gen inaktivasyonu, KHAK 'nin yaklaşık %90'ında, KHDAK'nin %10-30'unda görülür. p16 ekspresyon kaybına ise KHDAK'nin %50-60'ında rastlanır. *Rb* gen inaktivasyonu; %20 promotör metilasyonu, %5-10 nokta mutasyonları, %20 homozigot delesyonu ile gerçekleşir. Genelde KHDAK'nin yaklaşık %75'inde Rb/p16'yı düzenleyen hücre döngüsü kontrol noktalarının kayıp olduğu düşünülmektedir (20).

Siklin E ve p27^{kip1} : KHDAA hastalarının erken safhasında siklin E ekspresyonunun kötü prognozla korele olduğu gösterilmiştir. Hem erken hem de ileri safhadaki KHDAA 'de azalan p27^{kip1} ekspresyonu kötü prognozla korelasyon göstermektedir (20).

p53 : p53 proteini; DNA hasarına yanıt olarak hücre döngüsünü G1 evresinde durduran ve çeşitli uyaranlarla uyarılan, apoptoz için gerekli olan bir transkripsiyon faktörüdür. KHDAA'deki p53 sıklığı immünohistokimya ile %48, tek iplikli konformasyon polimorfizmi (SSCP) ile %37 olarak saptanmıştır.

p53 gen mutasyonları ve protein overekspresyonu skuamöz hücreli karsinomada %49-54, adenokarsinomada %29-36 oranında görülür. Meta-analiz sonuçları; *p53* değışikliklerinin adenokarsinomalı hastalarda negatif, skuamöz hücreli karsinomalarda ise pozitif etkiye sahip olduğunu göstermiştir (20).

Bcl-2 aile genleri : Normal bronşial epitelin bazal hücrelerinde *Bcl-2* pozitifdir. KHDAA' de %20-40 oranında bcl-2 protein ekspresyonu saptanmıştır (20).

Diğer belirteçler

FHIT (fragile histidine triad) geni, VEGF (vasküler endotelial büyüme faktörü), siklo-oksijenaz (COX-2), MMP_s ve TIMP_s'in prognostik değeri akciğer kanseri açısından araştırılmaktadır. Bu belirteçlerin tedavide kullanılabilmesi umut edilmektedir (20).

2.1.8.3 Prediktif Belirteçler

Prediktif faktörler; kemoterapi veya radyoterapi gibi adjuvant tedavilere yanıtı öngören klinik ve moleküler belirteçlerdir. Prognostik faktörler, hastadaki tümör özelliklerinin etkilerini tanımlarken; prediktif faktörler tümör üzerindeki tedavinin etkisini tanımlar (20).

Ras : Koo ve arkadaşları aktive olmuş *Ras*'ın apoptotik yanıtı güçlendirdiğini ve kemoterapiye karşı insan tümör hücrelerinin hassaslığını artırdığını bildirmişlerdir (20).

p53 : *p53* gen değışikliği; pek çok tümör tipinde hastaların kemoterapiye yanıtı için bir prediktördür. Schiller ve arkadaşları normal ve mutant *p53*'lü hastalarda etoposide ve cisplatin ile uygulanan kemoterapi sonuçlarının farklı bir etki göstermediğini bulmuştur. Bununla birlikte Tanaka ve arkadaşları adjuvant UFT (tegafur ve uraci) ile tedavi edilen safha I KHDAA hastalarında; normal *p53* genine sahip olanların daha uzun yaşadığını bildirmiştir (20).

HER-2/c-erbB2/neu : Tsai ve arkadaşları 20 KHDAK hücre hattını kullanarak yüksek HER-2 ekspresyonunun, uzun doubling time, kısa S fazı ve kemorezistans ile korelasyon gösterdiğini bildirmişlerdir (20).

Beta-tubulin gen mutasyonu : Tubulin, mikrotübül yapısındaki alfa ve beta altbirimlerinden oluşan bir heterodimerdir. Alfa-tubulin altbiriminin yapısal görevi vardır. Beta altbirimi ise hücre bölünmesi ve replikasyonda önemlidir. Monzo ve arkadaşları 49 KHDAK hastasının %33'ünde beta tubulin geninin 1. ve 4. ekzonlarında mutasyon saptamıştır (20).

2.1.8.4 Erken Saptama Belirteçleri

Akciğer kanseri safhası; hayatta kalmanın en önemli belirleyicisi olduğu için, kanserlerin erken safhada saptanması hastalığın sonucu için önemlidir (20).

hnRNP : 1980'lerde NCI-Navy grubu, sputumdaki akciğer kanseri hücrelerini saptamak için; monoklonal antikor kullanarak immünohistokimyasal boyama yapmıştır. Bu monoklonal antikorların, akciğer kanseri gelişiminden 2 yıl kadar önce hastalığı saptayabileceği gösterilmiştir. Bu antibadiler onko-gelişimsel protein olarak karakterize edilen heterojen nuklear ribonukleoprotein (hnRNP) A2/B1'i saptamaktadır. Yapılan çalışmalar sputum örneklerindeki hnRNPA2/B1 overekspresyonunun akciğer kanseri gelişiminin %67-69'unda önceden belirleyici olabileceğini göstermiştir (20).

p16 promotör metilasyonu : Palmisano ve arkadaşları, sputum örneklerinden izole edilen DNA'larda O⁶-metil-guanin-DNA metiltransferaz gen promotörleri ve p16'nın saptanmış metilasyonunu, klinik teşhisten 3 yıl önce skuamöz hücreli karsinomlu hastaların %100 'ünde saptamışlardır. Ayrıca p16 promotör metilasyonu, akciğer kanseri için yüksek risk taşıyan bireylerin %20'sinde saptanmıştır (20).

FIHT geni : Sozzi ve arkadaşları, 87 safha I-III KHDAK hastasının plazma DNA'sında, FHIT lokusunun LOH (loss of heterozigosity) ve mikrosatellit instabilitesi (D21S1245) saptamıştır (20).

Ras geni ve p53 mutasyonları : *Ki-ras* ve *p53* genlerindeki mutasyonlar, akciğer kanserli hastaların bronşiyal alveolar lavaj örneklerinde ve sputumda saptanmıştır. Mao ve arkadaşları, bu mutasyonları akciğer kanserlerinin klinik teşhisinden 1 yıl kadar önce saptamıştır. Aynı zamanda p53 geninde anlamlı (missense) mutasyon olan hastaların %30'unda p53 antibadisi saptanmıştır (20).

Retinoik asit reseptörleri : Vitamin A ve analogu retinoidler, akciğer gelişimi ve olgunlaşmasında önemlidir. Akciğer kanserinde kemoprevantasyon etmeni olarak test edilmişlerdir. Retinoidlerin hücrel etkileri, çeşitli retinoik asit reseptör izoformları olan RARs, RXRs ve RAR β ile gerçekleştirilir. RAR β akciğer kanserinde sıklıkla delete olan 3p24.2 bölgesinde yerleşim gösterir. RAR β promotör hipermetilasyonu veya delesyonu ile ekspresyon kaybı, RAR β inaktivasyonu; hem KHAK hem de KHDAK' de gözlenmiştir (20).

2.1.9 Akciğer kanserlerinde gözlenen Kromozomal Dengesizlikler

Akciğer kanserindeki sitogenetik anomaliler, oldukça komplekstir. Bu değişimler akciğer kanserinin her iki temel histolojik grubunda da gözlenmektedir.

Basit ve dengeli kromozomal değişikliklerin gözlendiği pek çok hematolojik malignansinin aksine; epitelial tümörlerde genellikle kompleks dengesiz anomalilere rastlanmaktadır. Akciğer tümörleri düşük mitotik indekse sahiptir ve bu nedenle detaylı sitogenetik analiz için yeterli metafaz elde etmek zordur. Elde edilen metafaz alanlarında tanımlanmamış son derece kompleks marker kromozomlara rastlanmaktadır. Akciğer dokusunun sitogenetik çalışma için elverişsiz olması, araştırmacıları FISH, CGH(comparative genomic hybridization) gibi moleküler sitogenetik çalışmalara sevk etmiştir.

Akciğer kanserinde, tekrarlayan sitogenetik anomaliler oluşmaktadır. Küçük hücreli akciğer kanserinde tanımlanan ilk tekrarlayan anomali, del(3p)'dir. 3p'nin kaybına akciğer kanserinin tüm histolojik alttiplerinde rastlanır.LOH çalışmalarında hem küçük hücreli hem de küçük hücreli dışı akciğer kanserlerinde, hemen hemen %100 oranında 3p'de allelik dengesizlik saptanmıştır. Akciğer kanseri gelişiminde önemli olan bir ya da daha fazla tümör baskılayıcı genin 3p bölgesinde bulunduğu düşünülmektedir.

Küçük hücreli dışı akciğer kanserinde, kromozom anomalileri küçük hücreli akciğer kanserindekinden çok daha komplekstir. 3p, 6q, 8p, 9p, 9q, 13q, 17p, 18q, 19p, 21q ve 22q'nun kayıpları, 1p, 1q, 3q,5p, 7p, 7q, 8q, 11q ve12q'nun kazanımları oldukça yaygındır.

Pei ve arkadaşları, 35 adenokarsinom ve 32 skuamöz hücreli karsinom olgusunda bu iki histolojik tip arasındaki genomik dengesizliklerin farklarını tanımlamak için CGH analizi gerçekleştirmiştir. Çalışma sonucunda; 1q, 5p ve 8q kazanımları gibi birçok dengesizliğe, hem skuamöz hücreli karsinomada hemde adenokarsinomlarda benzer sıklıkta rastlanmıştır. Bunun yanı sıra, belirgin farklılıklar da gözlenmiştir. Örneğin 3q24-qter'in kazanımına, skuamöz hücreli karsinomada %80 oranında rastlanırken, adenokarsinomların sadece %30'unda bu anomaliye rastlanmıştır. Diğer önemli bir farklılık ise, 20p13 kazanımı

adenokarsinomada %6 oranında gözlenirken; skuamöz hücreli karsinomada %30 oranında gözlenmiştir.

Goeze ve arkadaşları 83 adenokarsinoma olgusuna CGH tekniğini uygulayıp adenokarsinomların metastatik fenotiple ilişkili kromozom anomalilerini içerdiğini göstermiştir. En sık rastlanan değişiklikler 1q, 8q, 20q'daki overreprezantasyonlar ve 3p, 4q, 6q, 9p, 9q ve 13q'daki delesyonlardır. Ayrıca 3p12-p14, 3p22-p24, 4p13-15, 4q21-qter, 6q21-qter, 8p, 10q, 14q21, 17p12-p13, 20p12 ve 21 q'daki delesyonlar, 1q21-q25, 7q11, 9q34, 11q12-q13, 14q11-q13 ve 17q25'deki overreprezantasyonlar da, metastatik fenotiple ilişkili bulunmuştur (21).

Catherine Luk ve arkadaşlarının 8 primer ve 15 hücre hattını kullanarak gerçekleştirdiği CGH çalışmalarına göre; en sık rastlanan kazanım %70 oranında 5p'dir. Diğer kazanımlar; 8q (%65), 15q22-qter (%52), 20q (%48), 1q21.3-q41 (%43), 19q (%39), 3q (%35) ve 11q (%35). 8q24 (4 olgu), 5p (4 olgu), 3q24-q27 (3 olgu) ve 2p23-q24, 6cen-p21.1, 6q26, 7p21, 7q31, 11q13-qter, 20q12-q13.2 (1 olgu). En sık rastlanan kromozom kayıpları; 18q (%39), 9 (%34), 6q16-q22 (%30), 13q (%21), 5q12-q32 (%17) ve 19p (%17). 2p23-p24, 3q24-q27, 5p, 6cen-p21.1, 6q26, 7p21, 7q31, 8q, 11q13-qter bölgelerinde iken, 20q12-q13.2 bölgelerinde ise amplifikasyon bulunmuştur (22).

Soo-Yeun Park ve arkadaşları, 6 hücre hattında (NCI-H524, H865, H522, H1373, H358, A549) RxFISH ve kromozom boyama teknikleri kullanılarak yapılan çalışmalar sonucunda; 1p, 3q, 5p10-p15, 6q13-q21, 7q22-q31, 9p32, 15q22-qter, 17p, 17q21-q25, ve 21 nolu kromozomlarda sapmalar gözlemişlerdir (23).

Mattias Höglund ve arkadaşları, 432 akciğer kanserli olguyu, Mitelman veritabanını kullanarak dengesizlik açısından değerlendirmiştir (Tablo 4)(24).

Höglund ve arkadaşları yaptıkları istatistiksel çalışmada; büyük hücreli karsinoma, skuamöz hücreli karsinoma ve adenokarsinomada gözlenen dengesizliklerin (büyük hücreli karsinomadaki +20'in düşük frekansı dışında) benzer olduğunu saptamışlardır.

Tüm 3 alt tipte de, +7 ve 3p dengesizliklerine benzer sıklıkta rastlanmıştır. Bu çalışma sonucunda akciğer kanserinin +7, -3p ve +12 ile başlayan 3 yolak sayesinde gelişebileceği kanısına varılmıştır.

Bu kromozomal değişikliklerin altında yatan mekanizmalar hakkında çok az bilgi bulunmaktadır. Telomer işlev-bozuklukları ve kromozomal kırılma-füzyon köprüsü olaylarının, kromozomal değişikliklerde önemli mekanizmalar olduğu düşünülmektedir. Akciğer kanserinde etkili sitogenetik yolaklar hakkında çok fazla veri yoktur (21).

Tablo 4 : Akciğer kanserinde en sık gözlenen dengesizlikler (24). (AC, adenokarsinoma; LC, akciğer karsinoma, LCC, büyük hücreli karsinoma, SQC, skuamöz hücreli karsinoma, SCC, küçük hücreli karsinoma * p< 0.05 * p< 0.01) (24)

Dengesizlik	LC	AC	SQC	LCC	SCC
+1q10~q44	32	36	25	29	42
+2q21~q32	14	16	13	10	13
+3q10~q29	25	23	22	19	35
+5p15~p10	18	22*	15	19	6
+6p25~p10	18	21	16	19	16
+7	46	51**	48**	42*	16
+8q11~q24	16	18	18	6	13
+11q10~q24	20	28**	13*	19**	0
+12	19	23	18	13	10
+17q10~q25	14	20	12	6	6
+19q10~q13	14	10	15	10	19
+20	19	24**	17*	3	19*
-1p36~p22	37	42**	39**	39**	6
-3p26~p12	49	43*	57	45	65
-4p16~p11	30	26	34	32	32
-4q22~q35	31	29	34	32	35
-5q11~q35	32	31	40	32	26
-6q11~q27	38	40**	39**	51**	10
-8p23~p10	38	43	39	35	13
-9	47	52	49	45	23
-10p15~p10	34	32	40	32	29
-11p15~p13	33	33	43	26	19
-13q10~q34	36	39	29	38	23
-14q10~q32	31	33*	36**	32*	10
-15q10~q26	33	29	43	26	32
-16	33	33	39	39	19
-17p13~p11	43	48	42	52	35
-18	33	39	38	29	16
-19	34	44	30	35	19
-21	36	38	39	29	23
-22	39	48	38	35	35
-X	34	43	31	32	19

2.1.9.1 17 nolu Kromozomu İlgilendiren Anomaliler

Akciğer kanserlerinde saptanmış, HER-2/*neu* geninin yerleştiği 17 nolu kromozomu ilgilendiren ve Mitelman veri tabanına giren sitogenetik anomaliler Tablo 5, 6 ve 7’de özetlenmiştir.

Tablo 5: Akciğer kanserinde gözlenen trizomi olguları (25)

Anomali	Morfoloji	Topografi	Olgu sayısı
+17	Adenokarsinoma	Akciğer	14
+17	Skuamöz hücreli karsinoma	Akciğer	9
+17	Andiferensiye karsinoma	Akciğer	4
+17	Andiferensiye karsinoma, küçük hücreli	Akciğer	2

Tablo 6 : Akciğer kanserinde gözlenen monozomi olguları (25)

Anomali	Morfoloji	Topografi	Olgu sayısı
-17	Adenokarsinoma	Akciğer	30
-17	Adenoskuamöz karsinoma	Akciğer	2
-17	Malignant epitelial tümör	Akciğer	2
-17	Mezenşimal tümör	Akciğer	3
-17	Skvamöz hücreli karsinoma	Akciğer	27
-17	Andiferensiye karsinoma	Akciğer	2
-17	Andiferensiye karsinoma, büyük hücreli	Akciğer	8
-17	Andiferensiye karsinoma, küçük hücreli	Akciğer	8

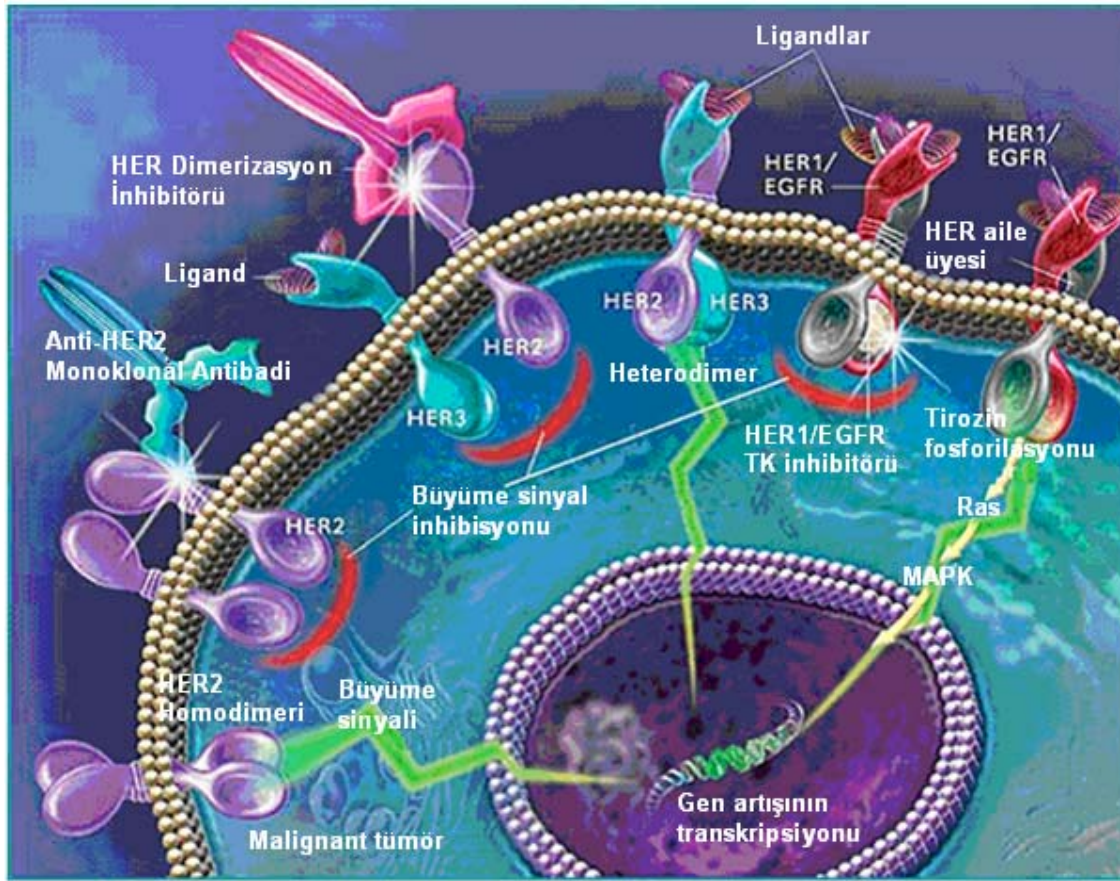
Tablo 7: 17q'ya bağımlı dengesizlikler (25)

Anomali	Morfoloji	Topografi	Olgu sayısı
İ (17) (q10)	Adenokarsinoma	Akciğer	2
İ (17) (q10)	Andiferensiye karsinoma, büyük hücreli	Akciğer	2
der(6;17)(p10;q10)	Adenokarsinoma	Akciğer	2

2.2 HER AİLESİ

Reseptör tirozin kinazlar (RTK); protein tirozin rezidülerini fosforile edebilen intrasellüler tirozin kinaz domaini ve ekstrasellüler ligand bağlayan domaine sahip olan transmembran proteinleridir (26).

Erb-B gen ailesi büyüme faktörü tirozin kinaz reseptörlerini kodlar. Aile; ErbB-1 (Her1), ErbB-2 (Her-2/*neu*), ErbB-3(Her3) ve ErbB-4 (Her 4) olmak üzere hücre membranı üzerinde yerleşim gösteren 4 reseptörden oluşur (Şekil-2)(27,34). Erb-B gen ailesinin 4 reseptörü yapısal olarak benzerdir. Sisteince zengin domainler, membran spanning bölge ve intrasellüler tirozin kinaz alanı içerirler (12). Bu reseptörler genellikle çeşitli kombinasyonlarda koeksprese edilirler ve hematopoietik sistem hariç çeşitli dokularda bulunurlar (28).

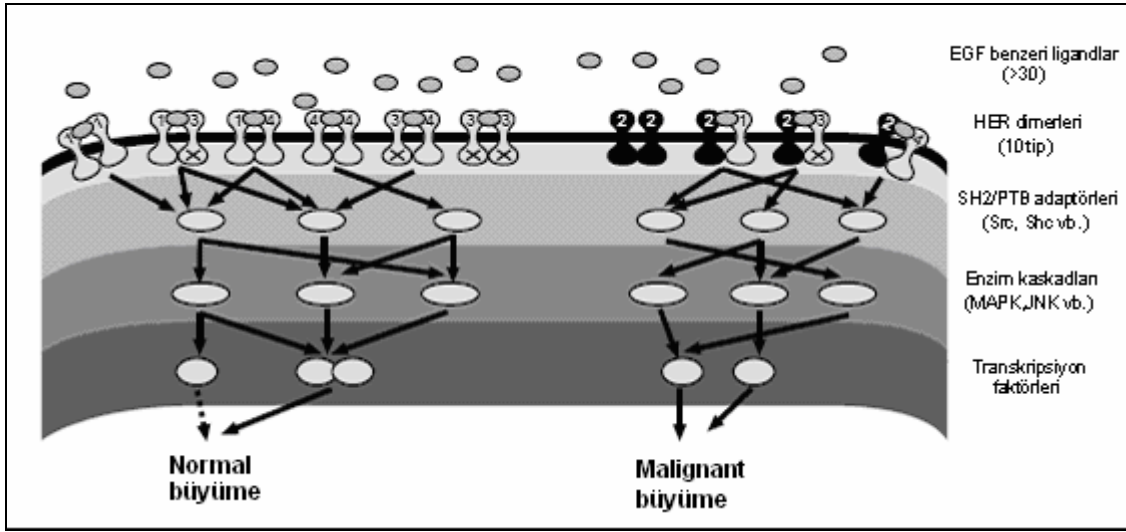


Şekil 2 : HER1,HER2,HER3 ve HER4'ün hücre membranı üzerindeki yerleşimleri/HER sinyal yolları (34).

HER reseptörleri, plazma membranında monomer halinde bulunurlar. HER aktivasyonu, genellikle ligandların ve HER ailesinin diğer reseptörlerinin varlığına bağlıdır. 4 farklı reseptör, homodimer veya heterodimer şeklinde olabilen 10 farklı dimer oluşturabilir (Şekil 3). Ligand ve iki reseptör arasında oluşan dimer kompleksi monomerik kompleksten daha stabildir (27).

HER ligandları, düşük afiniteli bölgesi HER2'ye bağlanan bivalent büyüme faktörü molekülleridir (28). HER1'in bağlandığı ligandlar; epidermal büyüme faktörü (EGF), transforme edici büyüme faktörü alfa (TGF), amphiregulin (AR), heparin bağlayan EGF büyüme faktörü (HB-EGF), betasellülin (β -cel) ve epiregulin'dir. HER2'nin ligandı yoktur. HER3 ve HER4, pekçok neuroguline veya *neu* farklılaşma faktörlerine bağlanır (27). Reseptörlere ligandların bağlanması heterodimerizasyon ve dolayısı ile aktivasyona neden olur (12). Epidermal büyüme faktörü reseptörünü (EGFR),ERBB2 (HER2), ERBB3 (HER3) ve ERBB4 (HER4)'ü içeren reseptör tirozin kinaz (RTK) I ailesi; homo-heterodimer şeklinde

aktive olarak; çeşitli hücrelerde adhezyon, motilite, farklılaşma ve normal hücre büyümesini kontrol eden sinyal yollarını ağı ile etkileşime girer (Şekil 3).



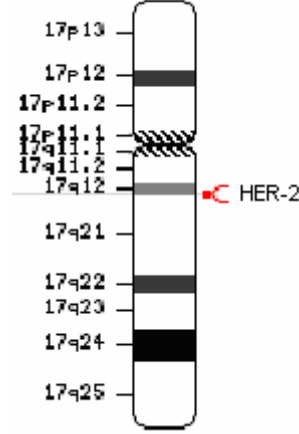
Şekil 3 : HER sinyal ağının yapısı. Reseptörler plazma membranında 10 farklı kombinasyon şeklinde bulunurlar (27).

Reseptör tirozin kinazlara (RTK) hormonların bağlanması, sinyal iletimi için gerekli olan reseptör dimerizasyonunu başlatır. Reseptörler birlikte iken, otofosforiledirler ve otofosforile olduktan sonra spesifik reseptör tirozin fosforilasyon bölgelerini tanıyan SH2 domaini içeren downstream proteinler için yer oluştururlar. ERBB2'yi içeren RTK'ların enzimatik aktivitesi; hem SH2'yi içeren efektör moleküllerin bağlanmasına izin veren otofosforilasyon için hem de tirozin fosforilasyonu ile downstream proteinlerin regülasyonu için gereklidir. RTK'lara hormon bağlanması, 5 farklı bağımsız sinyal yolağını aktive eder: PLC- γ /fosfatidilinozitol (PI) turnover, PI(3) kinaz, STAT91/ISGF-3, ras/raf MAP- Kinaz yolağı ve *src* ailesi. Bu yolların çoğu, nukleusdaki gen aktivasyonunun oluşmasına katkı sağlamaktadır (28).

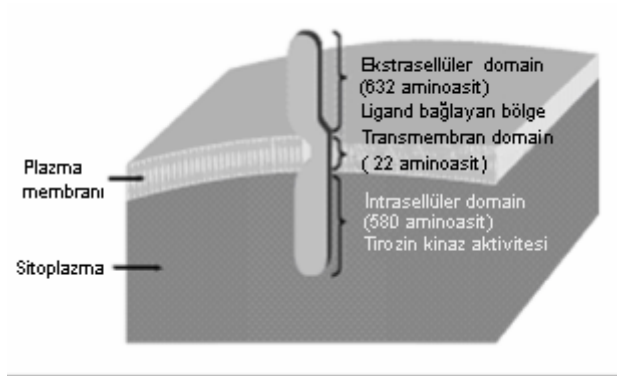
2.2.1 HER2/erbB-2

İnsan ERBB2'nin rodentdeki homologu olan Neu ; ilk kez sıçan beyin tümörlerinde bir onkogen olarak tanımlanmıştır (29). İnsanda erbB-2 geni 17q12'de yerleşim gösterir (şekil 4) (28). erbB-2, 1255 aminoasitlik ve 185 kDa'luk (p185) bir reseptör tirozin kinaz (RTK) kodlar. Tirozin kinaz aktivitesine sahip bir glikoprotein olan erb-B2 (P185 HER-2), diğer

EGFR ailesi üyelerine benzer bir yapıya sahiptir (30). Ekstrasellüler domain (ECD), tek bir transmembran segment ve sitoplazmik tirozin kinaz domaininden oluşur (Şekil 5) .



Şekil 4 : 17 nolu kromozom üzerinde HER-2'nin yerleşimi (31)



Şekil 5 : HER2 proteinin yapısı (27)

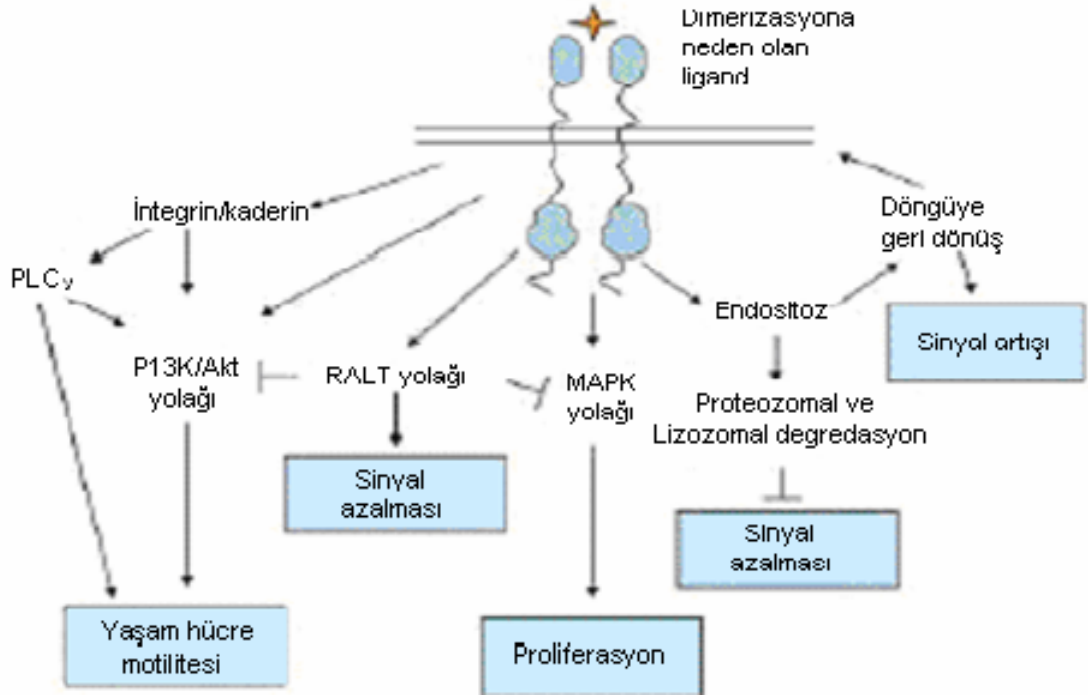
HER2; HER ailesinin ikinci üyesidir ve HER ailesinde temel bir rol oynamaktadır. Diğer HER reseptörleri ile etkileşime girerek hücre büyümesi, hücre farklılaşması ve hücre yaşamını düzenleyen sinyal yollarında görevlidir. Genelde ligand bağlayarak oluşan reseptör tirozin kinazların dimerizasyonu; aktivasyonları ve sinyal iletimindeki diğer aşamalar için gereklidir (32). Son çalışmalar, ERBB2 ve diğer üç RTKI reseptörleri arasındaki önemli yapısal farklılıkları tanımlamıştır. Bu veriler, ERBB2'nin dimerizasyonunda rol alan reseptör bölgesinin aktif durumda olduğunu; diğer RTKI reseptörlerinin ise dimerizasyon için yapısal değişikliğe uğraması gerektiğini göstermiştir.(33)

HER2, dokularda yaygın olarak bulunmasına rağmen, sinyal aktivitesi transmodüle edici partnerleri ve HER ligandlarının varlığında ortaya çıkar . Hiçbir HER2 spesifik HER

ligandı, tanımlanmamıştır fakat, HER2 diğer HER reseptörleri için heterodimerizasyon partneri olarak tercih edilir. HER3'ün doğal aktivitesi yoktur ve en temel, en iyi dimerizasyon partneri HER2'dir (27). HER-2 içeren heterodimer; diğer komplekslerden daha kuvvetli bir intrasellüler sinyal oluşturur. HER-2 sinyalinin VEGF, TGF α ve TSP-1 gibi pro ve antianjiyogenik faktörlerinin ekspresyonunu kontrol ettiği bilinmektedir (33).

HER2 heterodimerleri uzun süreli ve etkilidir. Heterodimerlerin oluşumu ve aktivasyonun başlaması geçicidir; normal hücre ve dokularda kontrol edilir. Ancak bu ağın deregülasyonu, kanserleşmeye neden olmaktadır. HER2 overekspresyonu; onkojenik transformasyonu ve stromal büyüme faktörlerine yanıtı artırmaya yol açan HER2 içeren heterodimerlerin oluşumuna ilgilidir (27). HER-2'nin overekspresyonu P13K/Akt yaşam yolağını aktive eder. Yaşam sinyali normal olarak, MAPK yolağını içeren mitojenik sinyalin aktivasyonuna bağlıdır. Her iki yolak p53'ün ubiquitinilasyonunu teşvik eder ve CDK inhibitörleri ile siklin D1 gibi efektörleri regüle ederek hücre siklusunda görev alır. Kanserde artan HER-2/*neu* ekspresyonu hem P13K/Akt hem de MAPK yolağından gelen sinyalleri artırır ve hücre siklusu kontrol noktalarının deregülasyonuna neden olur (Şekil 6) (33). p185 sıklıkla transkripsiyonal değişiklikler ve/veya gen amplifikasyonunun sonucu olarak insan tümörlerinde 100 kat kadar overekspresyon olmaktadır. Aktive edici hormonların varlığında ortaya çıkan böyle bir ekspresyon, fibroblastlarda fokus oluşumuna neden olmak için yeterlidir. Tirozindeki fosforilasyonun sitokiyometrisi; artan erbB-2 ekspresyonu ile artar. Reseptör tirozin fosforilasyonu, SH2 içeren proteinlerin bağlanmasına izin verdiği için bu hiperfosforilasyon transformasyon ve sinyali ortaya çıkarmak için yeterlidir (28). ERBB2 overekspresyonu, ERBB2'nin dahil olduğu heterodimerler sayesinde sinyalleri artırarak ve anormal ERBB2 homodimerlerinin oluşumunu kuvvetlendirerek RTK ağını tahrib eder. ERBB2 yüksek seviyelerde ekspresyon edildiğinde spontan homodimerler oluşturur (33).

SH2 içeren sinyal moleküllerinin bağlanmasına izin veren p185'in temel tirozin fosforilasyon bölgeleri, kinaz domainindeki karboksil ucunda bulunur. Tirozin 1248, 1221, 1222, 1196 ve 1139'daki mutasyon p185'in tirozin fosforilasyonunu engeller. Bu 5 fosforilasyon bölgesinin eksik olduğu EGFR/erbB-2 dimeri ile mitojenik birleşmenin azaldığı gösterilmiştir. Delesyon analizi, p185'in karboksil ucunun negatif düzenleyici fonksiyonuna sahip olduğunu göstermiştir (28).



Şekil 6 : HER ailesinin aktivasyonu ile stimüle edilen temel sinyal yolları: Ligand ile reseptör dimerizasyonunun aktivasyonu yaşam ve hücre motilitesini, proliferasyonu düzenleyen çeşitli yolların aktivasyonuna yol açar (33).

Aktive olmuş HER tümör hücrelerinde integrin ve kadherin fonksiyonlarında değişiklikler gözlenmiştir. İntegrinler ile HER ailesi üyelerinin etkileşimi (HER2 ve $\alpha_6\beta_4$ gibi) ve fokal adhezyon kinazlar; P13K yolağını (ikincil mesajcıların bırakılmasını sağlayan) çalıştırır. Bu moleküller, sırasıyla tümör hücre migrasyonunda ve aktin-sitoiskeletin reorganizasyonunda rol alan multiprotein komplekslerini çalıştırlar (33).

HER-2/*neu* protoonkogeni, normalde nokta mutasyonları ile onkogene dönüşmesine rağmen; insan kanserlerinde mutasyondan çok, gen amplifikasyonu ile overeksprese edilir. KHDAK'de Her-2 ekspresyonunun, çoğunlukla polizomi ve duplikasyonla artan kromozom kopya sayısına bağlı olduğu gösterilmiştir (12).

Küçük hücreli dışı akciğer kanserlerinde, HER-2/*neu* ekspresyonu küçük hücreli akciğer kanserindekinden daha fazla görülmektedir(12). KHDAK'de HER-2/*neu* overekspresyonunun sıklığı, yayınlarda %4-27 arasında değişmektedir. Bu heterojenite HER-2/*neu* ekspresyonunu değerlendirmek için kullanılan metodlardaki farklılıklardan kaynaklanmaktadır (30).

HER-2/*neu* overekspresyonu, farklı tümörlerde gösterilmiştir. HER-2/*neu* overekspresyonuna sık olarak en çok Hercept test ile +3 olarak değerlendirilen meme kanseri (%60) hastalarında rastlanmıştır (33). Meme kanserinde HER-2/*neu* overekspresyonunun gözleendiği vakaların %92'sinde HER2 gen amplifikasyonu bulunmaktadır (27). Bunu takiben Wilms tümöründe %50, mesane kanserinde %44, noninflamator meme kanserinde %25 oranında HER-2/*neu* overekspresyonu gözlenmektedir. Pankreas, kolon, ovum ve akciğer kanserlerinde HER-2/*neu* overekspresyonunun sıklığı farklı kaynaklara göre farklılık göstermektedir. Overekspresyonun; bu tümörlerde gen amplifikasyonundan ziyade gen deregülasyonundan kaynaklandığı öne sürülmektedir (33).

2.2.2 P185'in biyolojik fonksiyonu

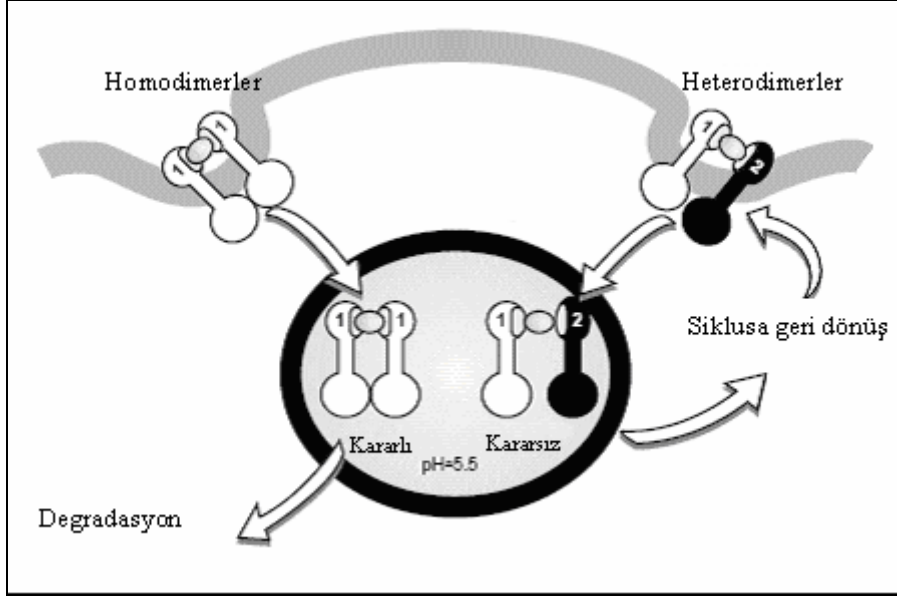
P185, hematopoietik orijinli olanların dışında tüm dokularda ve çeşitli hücrelerde eksprese edilir. İnsan fetüsünde erbB-2; sinir sisteminde, kemik, kas, deri, kalp, akciğer ve intestinal epitelyumda yaygın olarak bulunmaktadır (28).

Yapılan araştırmalarda, kardiyomiyositlerdeki T tübüllerinde zenginleşen HER2 reseptöründen gelen sinyallerin, yetişkinlerde kalp fonksiyonu açısından önemli olduğu ortaya çıkmıştır. Trastuzumab (monoklonal anti-HER2 antibadi) ile tedavi edilen meme kanseri hastalarında gözlenen kardiyak yan etkileri ışığında; HER2'nin kalp fonksiyonu ile ilgili olduğu moleküler mekanizmalar daha iyi anlaşılmalıya başlanmıştır (33).

HER2'nin Schwann hücre myelizasyonunun kontrolünde ilk sinyal molekülü olarak rol oynadığı in vivo olarak gösterilmiştir. Ayrıca Kim ve arkadaşları HER2 sinyallerinin oligodendrosit farklılaşması için önemli olduğunu in vivo olarak göstermiştir (33).

2.2.3 HER2'nin degradasyonu

Genellikle reseptöre bağlanan ligandlar endositoza uğrar ve bu veziküller erken endozom oluşturur. Endozomda ; ligand reseptörden ayrılır ve reseptör siklusa geri döner ya da ligandla degradasyonun gerçekleştiği lizozoma taşınır. HER1 homodimeri, ilk olarak lizozoma gider ve degrade olur. Bununla birlikte, HER2 ile HER1 heterodimer oluşturduğunda, HER1; HER2 tarafından hücre yüzeyine geri götürülür (Şekil 7). Tekrar döngüye girme; HER1' den gelen sinyallerin sürekliliğini artırır ve onkogeneze yol açar.



Şekil 7 : HER1-HER2 dimerizasyonu HER2; HER1'in tekrar siklusa dönmesine neden olur (27)

c-Cbl, degradasyon ve siklusa tekrar geri dönme yollarını kontrol eden bir adaptör proteindir. c-Cbl'nin ligandlar ile kombinasyonu, lizozom aracılığı ile reseptörlerin degradasyonuna neden olur.

c-Cbl, erken endozomda reseptörle birlikte oluşur ve ubiquitinasyona yol açar, ardından lizozomda reseptörün degradasyonu gerçekleşir. c-Cbl'ye kuvvetli bir şekilde bağlanan HER1'in aksine HER2, c-Cbl ile zayıf bir etkileşime girer. HER3 ve HER4 ise c-Cbl ile etkileşime girmez.

HER2 overeksprese olduğunda, HER2 ve HER ailesinin diğer üyeleri arasında oluşan heterodimerler tarafından sinyal oluşumu gerçekleştirilir. HER2 heterodimerleri, liganda oldukça kuvvetli bir şekilde bağlanır, proliferasyon için nukleusa sinyal gönderilir, ve endositozdan sonra plazma membranına tekrar işlev görmek üzere geri döner. Bu güçlü sinyal hücre çoğalmasını artırır ve malign büyümeye yol açar. Plazma membranına HER2'nin geri dönüşümü Herceptin gibi antikorlar tarafından bloklanır ve lizozomda HER2'nin yıkımı gerçekleşir. HER2'nin azalan miktarları HER ailesinin diğer üyelerinin HER2 ile dimer oluşturamayacağı anlamına gelir. Bu durum; hücre büyümesi için zayıf sinyal oluşumuna neden olur, ve malign büyüme azalır (27).

2.2.4 Her-2'nin Değerlendirilmesi

Tümör'ün HER-2/*neu* durumu, hastanın prognozu hakkında bilgi verir ve Herceptin'e yanıtın değerlendirilebilmesi için önemlidir. Bu nedenle HER-2/*neu* ekspresyon seviyelerinin doğru değerlendirilmesi, Herceptinden yararlanabilecek hastaları tanımlamak için gereklidir. HER-2'nin durumunu değerlendirmek için kullanılan yöntemler Tablo 4'te özetlenmiştir. Günümüzde en yaygın kullanılan iki yöntem FISH ve IHC'dır (35).

1) IHC : İmmünohistokimya, HER-2'ye özgül antikor kullanılarak parafin doku boyanır. Hercept Test ve Pathway Her-2 gibi kitler kullanıldığında; 0 (HER-2 ekspresyonu yok) ve +3 (yüksek HER-2 ekspresyonu) arasında değişen HER-2 reseptör dansitesi olarak bilinen derecelendirme yapılır. Herceptin'e en iyi yanıtı verenler, +3 derecesine sahip olan tümörlerdir. İmmünohistokimyanın dezavantajları, öznel yorumu ve sonuçların yarıkantitatif olmasıdır (35).

2) FISH : FISH; HER-2/*neu* gen amplifikasyonunu değerlendirmek için kullanılır. IHC'dan daha spesifik ve hassastır. FISH kantitatif sonuçlar verir yani, farklı laboratuvarlar arasındaki çeşitliliğe ve öznel yorumlara yer vermez. Ayrıca FISH, prognozu ve Herceptin'e yanıtı IHC'dan daha doğru bir şekilde değerlendirir. Genellikle IHC ve FISH %80 oranında konkordans gösterir. FDA; Herceptin temelli terapiden yararlanabilecek hastaları değerlendirmek için IHC ve FISH kullanımını onaylamıştır (35).

3) HER-2 ECD : Hala araştırılmakta olan Diğer bir yöntem; HER-2 ECD serum seviyelerinin ölçülmesidir (36). Tümör hücreleri tarafından kana bırakılan HER-2/*neu* proteininin ekstrasellüler domaini, ELISA ile değerlendirilir (36). Bu yöntemin avantajı; kanın kolaylıkla elde edilebilir; ve HER-2 hedefli terapilerde HER-2 durumunun değişikliklerinin kolayca izlenebilir olmasıdır. Yapılan çalışmalar HER2-ECD seviyelerinin daha yüksek olduğu hastalarda Herceptin tedavisine cevap oranının daha iyi olduğunu göstermiştir (35).

Tablo 8 : Her-2 durumunu değerlendirmede kullanılan yöntemler (35)

Yöntem	Avantajları	Dezavantajları	Klinik kullanımı
Western Blot	Oldukça elverişli, pahalı değil	Semikantitatif, tümör ekstraktı gerekli	Klinik kullanımı yok
PCR	Hızlı, spesifik, hassas	Semikantitatif	Klinik kullanımı yok
IHC	Oldukça elverişli, pahalı değil	Semikantitatif, subjektif yorum	FDA onaylı, klinik kullanımda
FISH	Spesifik, kantitatif Herceptin'e yanıtta güçlü korelasyon	Pahalı, özel araç, gereç gerektirir	FDA onaylı, +2 IHC Her-2 durumunda değerlendirilebilir

2.3 AKCİĞER KANSERİ TEDAVİSİNDE MOLEKÜLER YAKLAŞIMLAR

2.3.1 Risk Tahmini

Akciğer tümörögenezi çok aşamalı bir genetik süreçtir; bu nedenle akciğer kanser riskini hesaplamak için tek yöntem, akciğer dokusunu, akciğer kanseri ile birlikte yaygın olarak gözlenen moleküler değişiklikler açısından incelemektir.

Akciğer dokusunda yüksek sayıda moleküler değişikliklere sahip bireyler, akciğer kanseri gelişimi açısından yüksek riske sahiptir. Akciğer kanserlerinde en sık gözlenen değişiklikler 3p, 9p ve 17p'deki LOH ve p53 mutasyonlarıdır. Bu değişikliklerin derecesi; histolojik değişikliklerin derecesi ile ilişkilidir (15).

2.3.2 Prognozu değerlendirmede moleküler değişikliklerin göstergeleri ve tedaviye yanıtı öngörme

Akciğer kanserinde, hastanın prognozunu, sadece klinik ve histolojik parametrelerle değerlendirmek zordur. İleri evre, hastalık için kötü prognozu işaret etmesine rağmen; klinik özellikleri benzer olan hastalardaki sonuçlar önemli derecede farklılık göstermektedir.

Moleküler analizlerin amacı; tümörün geçmişi, potansiyel hassaslık, radyasyon terapisine veya kemoterapiye direnç hakkında prognostik bilgi veren değişiklikleri tanımlamaktır. Belirli birtakım moleküler değişiklikler, akciğer kanserinde prognostik açıdan önem taşır. Fakat bu değişiklikler ile ilgili farklı çalışma gruplarının yargıları benzer değildir.

M.D. Anderson'daki ve diğer enstitülerdeki son çalışmalar akciğer tümör örneklerindeki özgül paternleri tanımlamak için moleküler ve proteomiks teknolojilerinin kullanımına odaklanmıştır (15).

2.3.3 Yeni terapötik gelişimler için moleküler değişikliklerin göstergeleri

Akciğer kanserindeki terapötik yaklaşımlar ve korunma yöntemlerindeki problem; ortaya çıkan yan etkilerdir. Kemoprevention durumunda, birey henüz kanser olmadığı için tedavinin etkisi belirsizdir ve yan etkiler temel sorundur. Akciğer kanserinin tedavisinde; radyasyon terapisi, kemoterapi ve cerrahi girişimin kombinasyonlarının faydaları incelenmekte, normal dokuları yan etkilerden korumak için yeni stratejiler geliştirilmektedir. Akciğer kanseri gelişiminde rol alan belli moleküler yolların tanımlanması, tedavide bu yolların hedeflenmesine yol açmıştır (15).

2.3.4 Değişmiş sinyal yollarının yeniden düzenlenmesi

Akciğer kanserinin hedefli tedavisindeki yaklaşım, değişmiş olan sinyal yollarını yeniden düzenlemektir. Onkogenlerin aktiviteleri inhibe edilerek ya da sinyal yolları engellenerek ekspresyonları azaltılıp aktiviteleri engellenebilir. Örneğin, *ras* mutasyonları akciğer kanserinde yaygın olarak çalışılmaktadır. Klinik deneyler için hedeflenmiş diğer onkogen ürünleri; EGFR ve aile üyeleridir. Hem EGFR hem de HER-2/*neu* 'nun overekspresyonuna akciğer tümörlerinde rastlanmıştır. EGFR'in primer olarak hücre büyümesini uyardığı düşünülmesine rağmen, son çalışmalar; anjiogenez, invazyon, hücre adezyonu, hücre motilitesi gibi kanserle ilgili diğer basamaklarda da EGFR sinyal yolağının etkili olduğunu göstermiştir. Bu yolla ilgili olarak; EGFR ekspresyonunu downregüle edebilen ajanlar, EGFR ile ilgili tirozin kinazların küçük peptid inhibitörleri, immünotoksinler, monoklonal antikorlar geliştirilmiştir. İnsanlaştırılmış anti EGFR monoklonal antikorların, bu membran reseptörlerinin tirozin kinaz aktivitesini azalttığı gösterilmiştir. Preklinik çalışmalar, radyasyon terapisi ile kemoterapötik ajanlar arasında sinerji göstermiştir. M.D. Anderson'da, anti büyüme faktör reseptörü monoklonal antibadilerin kullanımı hakkında klinik deneyler yapılmaktadır. Örneğin, metastazı olan hastalarda gemcitabin, cisplatin ve trastuzumab'ın kombinasyonu çalışılmaktadır (15).

2.3.4.1 Anti-reseptör terapisi

HER-2'yi içeren heterodimerler tarafından oluşturulan sinyaller, diğer HER dimerlerine göre daha kuvvetli bir aktivite göstermektedir ve tümörlerdeki HER2 overekspresyonu, EGF ailesi ligandları tarafından oluşturulan sinyal kaskadının amplifikasyonuna yol açmaktadır.

HER-2, HER1'in partneri olarak tercih edildiği için; HER1'in aktivasyonunun inhibisyonu HER2 aktivitesini inhibe etmek için önerilmektedir. HER1'in fosforilasyonunu ve fonksiyonunu bloklayan tirozin kinaz inhibitörlerinin kullanımı; proliferasyonu HER1 veya HER2'ye bağlı olan tümörlerin terapisi için iyi bir yöntemdir.

Böyle tek inhibitör ZD1839'dur. ZD1839; oral olarak aktif, HER1'in yüksek seviyelerini eksprese eden insan tümör xenografları ve kanser hücre hatlarının büyümesini geciktiren veya geri dönüşümsüz inhibisyonunu sağlayan HER1'e spesifik tirozin kinaz inhibitörüdür (33).

2.3.4.2 Pasif immünoterapi

HER-2 overekspresyonu görülen hastalar için monoklonal antikorlar geliştirilmiştir. HER2'nin ekstrasellüler domainine spesifik olarak yönlenen monoklonal antikorlar, HER-2'si overeksprese olan kanser hücrelerinin büyümesini seçici olarak inhibe etmektedir.

Trastuzumab, HER-2'si overeksprese olan metastazlı meme kanseri hastalarına çeşitli terapötik ajanlar ile birlikte verilmiştir. Yapılan değerlendirmelerden sonra tek bir kemoterapötik ajanın verilmesinden ziyade, Trastuzumab'ın terapiye ilavesinin hastaların terapiye yanıtını olumlu yönde etkilediği sonucuna varılmıştır. Trastuzumab, HER-2 homodimerlerinin oluşumuna neden olur ve reseptörün ligand aracılı endositozunu artırır (33).

HER-2/*neu* ; meme kanserinde önemli terapötik bir hedefdir. HER-2/*neu* düzeyleri meme kanserinin pathogenezi ve prognozu ile korelasyon göstermektedir. Gen amplifikasyonu olan insan kanser hücrelerindeki HER-2/*neu* seviyesi normal yetişkin dokulardakinden çok daha fazladır. HER-2; tümör hücrelerinin büyük çoğunluğunda bulunur; bu tümörlerde HER-2'nin yüksek ekspresyonu gözlenir. Bu hastalara antiHER-2 terapisi önerilmektedir. HER-2 overekspresyonu hem primer tümörde hem de metastatik bölgelerde görülür; bu nedenle antiHER-2 terapisi tüm bölgelerde etkili olabilmektedir (35).

HER-2/*neu* reseptörüne bağlanan insanlaştırılmış monoklonal antikor olan Herceptin; HER-2/*neu* pozitif olan meme kanseri hastalarının tedavisi için FDA'dan onay almıştır. Meme kanseri hastalarının yaklaşık %25-30'unda immünohistokimya ve FISH sonuçlarına

göre HER-2/*neu* pozitifdir. HER-2/*neu*'su pozitif olup Herceptin tedavisi alan hastaların %25'i tedaviye yanıt vermiştir. Trastuzumab ile kemoterapi kombinasyonu; sadece kemoterapiye oranla tedaviye yanıtı ve yaşama oranını önemli derecede artırmıştır. Hem Hercept test hem de FISH analizi hastaların tedaviye yanıtlarını öngörmesine rağmen; FISH analizi tedavi öncesi değerlendirme için çok daha iyi bir yöntemdir (36).

HERCEPTİN'İN HAREKET MEKANİZMASI

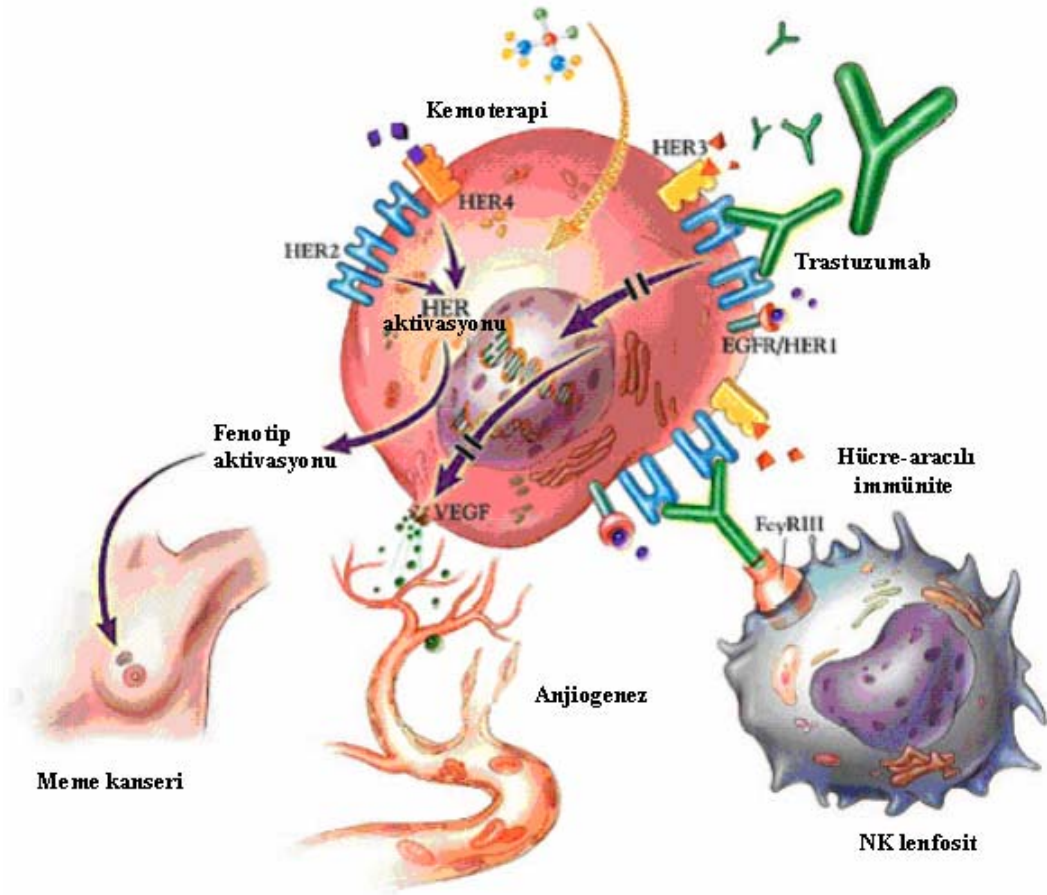
Herceptin; HER-2 proteininin ekstrasellüler domainine(ECD) yönlene insanlaştırılmış monoklonal antikordur. Herceptin, şimdilik sadece metastatik meme kanserinin tedavisi için HER-2 hedefli terapide kullanılmaktadır. Herceptin'in HER-2 overekspresyonunu azaltma mekanizmaları tam anlamıyla bilinmemekle beraber in vitro ve in vivo deneyler sonucunda çeşitli moleküler ve hücrese etkiler gözlenmiştir (35).Herceptin'in öngörülen mekanizmaları şunlardır (Şekil 8):

- ✓ HER-2'nin degradasyonu ve internalizasyonu: Reseptör dimerizasyonunu ve downstream sinyal yollarını tahrib eder.
- ✓ G1 arresti ve proliferasyonu azaltma: p27^{kip1}-cdk2 kompleks oluşumuna neden olur.
- ✓ Apoptoz: Akt aktivitesini inhibe eder.
- ✓ Anjiogenezi baskılar: Tümör vaskulaturesini, pro-anjiogenik PAI-1,Ang-1,TGF- α , VEGF'in ekspresyonunu azaltır, antianjiogenik TSP-1'e neden olur
- ✓ İmmün aracılı yanıtlar: Naturel killer hücrelerini stimüle eder.
- ✓ İnhibisyon: HER-2 ECD proteolizini ve DNA onarımını inhibe eder

Herceptin'in etkisi ile gerçekleşen başlıca mekanizmalar;

Reseptör sinyalinin azalması : HER-2 ; MAP kinaz (MAPK) ve P13 kinaz (P13K)'ı içeren çoklu hücrese sinyal yollarını aktive eder. Herceptin bu yollardan gelen sinyalleri azaltır ve böylece apoptoz ve hücre siklusu arrestini tetikler (35).

G1 arresti , p27^{kip1}'in ayarlanması : Herceptin ile tedavi edilen hücreler, hücre döngüsünün G1 fazı sırasında arreste girerler. Hücre döngüsü arresti, siklin bağımlı kinaz inhibitörü p27^{kip1} ile ilgili proteinlerin azalan ekspresyonu ile birlikte gerçekleşmektedir. Bu p27^{kip1}'in bırakılması ile sonuçlanır ve siklin E/cdk2 komplekslerini inhibe eder (35).



Şekil 8 : Herceptin'in hareket mekanizmaları (35)

Apoptozun başlaması : Herceptin, HER-2'si overeksprese olan metastatik meme kanseri hastalarında tümör büyüklüğünü azaltabilir. İn vivo çalışmalar, Herceptin'in meme kanserinde apoptoza neden yol açabileceğini göstermiştir (35).

Anjiogenezin baskılanması : İnsan tümör hücrelerindeki HER-2'nin overekspresyonu sonucu, VEGF eksprese olur ve anjiogenez artar. HER2 overekspresyonu görülen meme kanserinin Herceptin ile tedavisi sonucunda tümör hacminin ve in vitro endotelial hücre migrasyonunun azaldığı gösterilmiştir. Paclitaxel ile Herceptin kombinasyonunun, anjiogenezini inhibe etmede tek olarak uygulanan Herceptin tedavisinden çok daha etkili olduğu bildirilmiştir (35).

İmmün mekanizmalar : İn vivo meme kanseri modelleri ve klinik deneyler, pek çok hedefli ajanın aksine Herceptin'in sitotoksik özelliklere sahip olduğunu göstermiştir. NK ve ADCC (antikor bağımlı hücresel sitotoksisite) Herceptin'in sitotoksik aktivitesine önemli katkıda bulunmaktadır (35).

Her-2/ECD proteolizinin inhibisyonu : HER-2 geninin overeksprese olduğu hücrelerde, HER-2 reseptörü proteolitik kesime uğrar ve bu süreç sonunda 110 kDA'luk ECD(ekstrasellüler domain) olarak adlandırılan bir ürün meydana gelir. ECD, hücre kültürü ortamında saptanmıştır ve bu domainin 95 kDA'luk kısmı artmış tirozin kinaz aktivitesi gösteren membrana bağlı bir fragment oluşturur. HER-2 ECD, meme kanseri tanımlı hastaların serumunda saptanmıştır ve bazı meme tümörlerinde HER-2 p95'e rastlanmıştır. HER-2 ECD'nin serumdaki yüksek konsantrasyonlarının ileri meme kanserli hastalarda kötü prognoz, metastaz ve kemoterapi tedavisine yanıt vermeme ile korele olduğu düşünülmektedir. Herceptin HER-2 ECD kesimini engellemektedir. ECD seviyesinin hastaların Herceptin'e yanıtlarında etkili olabileceği düşünülmektedir (35).

DNA onarımının inhibisyonu : İn vitro çalışmalar Herceptin'in çeşitli kemoterapi ajanları ile sinerjistik olduğunu göstermiştir. Yapılan çalışmalar Herceptin'in tek başına ya da terapötik ajanlar ile birlikte DNA hasarını ilerleterek DNA onarımını inhibe ettiğini; ve apoptoza neden olduğunu göstermiştir (35).

DİRENÇLİLİK MEKANİZMALARI

Herceptin monoterapisine hastaların verdikleri yanıtlar, 9 aylık bir süreç için % 12-34 arasında değişmektedir. Günümüzde Herceptin; docetaxel, paclitaxel gibi kemoterapik ajanlarla birlikte uygulanmaktadır ve tedaviye yanıt bu şekilde artırılmaktadır. Genellikle Herceptin tedavisinden yanıt alan hastaların çoğunluğu 1 yıl içinde direnç kazanmaktadırlar. Herceptin dirençliliğiyle ilgili moleküler mekanizmalar şunlardır: (35)

Değişen reseptör-antibadi etkileşimi : Mutant reseptör, düşük Her-2 seviyesi

Artan hücre sinyalleri : Diğer Her reseptörlerinden gelen sinyaller, artan Akt aktivitesi, azalan PTEN seviyesi

P27^{kip1}'in ayarlanması : Artan protein degradasyonu nedeni ile azalan total seviye, azalan nuklear lokalizasyon

Artan IGF-IR sinyali : Overeksprese olan IGF-IR, azalan IGFBP_s seviyesi, artan IGF seviyesi, reseptör çapraz-konuşması (35)

HER-2 için yeni ilaçların geliştirilme çalışmaları devam etmektedir (Tablo 9).

Tablo 9 : Yeni Her-2 hedefli ajanlar (MAb, monoklonal antibadi; FcRI, immünglobulin G (IgG)(Fc gamma RI) için tip I Fc reseptörleri; FcRIII, immünglobulin G(IgG)(Fc gamma RIII)için tip III Fc reseptörleri; TKI, tirozin kinaz inhibitörü) (35)

Ajan	Ajanın tipi	Gelişim fazı	Kaynak
Trastuzumab-DM1	MAb-toksin konjugat	Preklinik	Genentech
Pertuzumab(2C4)	Mab	I	Genentech
CI-1033	TKI	II	Pfizer
GW572016	TKI	II	Glaxo smithkline
EIA	Transkripsiyonal inhibitör	I	Targeted genetics
2BI	F _C RIII ve HER-2' ye karşı bispesifik antibadi	II	Chiron
MDX-H210	F _C RI ve HER-2' ye karşı bispesifik antibadi	II	Medarex
Autovac	DNA aşısı	II	Pharmexa
HER-2/neu rekombinant terapötik aşısı	Rekombinant aşısı	I	Corixa ve glaxo smithkline

Meme kanserinde olduğu gibi, Trastuzumab'ın kullanımı için akciğer kanserinde de çalışmalar başlatılmıştır. Akciğer kanserindeki HER-2/*neu* overekspresyonunun sıklığı çoğunlukla KHDAK'de çalışılmıştır; ve HER-2/*neu* overekspresyon sıklığı %5-50 arasında değişmektedir. KHDAK'de HER-2/*neu* overekspresyonuna çoğunlukla adenokarsinoma ve büyük hücreli karsinoma'da (%30-40) rastlanmaktadır. Skuamöz hücreli karsinomada HER-2/*neu* overekspresyonuna daha az (%10-20) rastlanır. KHAK'de HER-2/*neu* ekspresyonu daha az çalışılmıştır. Potti ve arkadaşları ileri safha KHAK hastalarının %30'unda HER-2/*neu* overekspresyonunu saptamıştır (38).

Akciğer kanserinde HER-2/*neu* değerlendirilmesi için hiçbir immünohistokimyasal yöntem geliştirilmemiştir. Meme kanserinde HER-2/*neu* değerlendirilmesi için, Hercept Test geliştirilmiş ve FDA onayı almıştır. Akciğer tümörleri malignant meme tümörlerinden morfolojik olarak daha heterojendir. Bu heterojenite HER-2/*neu* IHC sonucunun yorumlanmasını zorlaştırır. Diğer bir farklılık; meme kanserine oranla akciğer kanserinde 0 ve

+3 tümörlere daha az rastlanır. Bu nedenle IHC sonuçlarını negatif (Hercept teste göre: 0/+1) ve pozitif (+2/+3) tümörlerde yorumlamak zordur (38).

Akciğer tümörlerinde, HER-2/*neu* ekspresyonu'nun terapötik göstergesi hala çalışılmaktadır. Akciğer kanseri hücre hatlarında yapılan prelinik çalışmalarda; HER-2/*neu* pozitif hücre hatlarında trastuzumab büyümeyi inhibe ederken, HER-2/*neu* negatif hastalarda hiçbir etki göstermemiştir. Tedavi etkisi HER-2/*neu* ekspresyon seviyesi ile korelasyon göstermiştir. Ayrıca HER-2/*neu* pozitif olan hücre hatlarında trastuzumabın; gemcitabine, cisplatin, vinorekbine ve paclitaxel gibi ajanlarla kombinasyonunun önemli sinerjistik etki gösterdiği gözlenmiştir (38).

+3 ya da gen amplifikasyonu olan hastalar, trastuzumab ile tedavi olabilme şansına sahiptirler. Gelecek çalışmalar için daha fazla hastaya ve çok merkezli çalışmalara gereksinim vardır(38)

erb-B reseptör ailesi hem erb-B1(EGFR) hem de erb-B2(HER-2) reseptörlerini ve iki reseptörün heterodimerizasyonunu kapsar. Bu nedenle anti-EGFR ve HER-2 terapisinin kombinasyonunun sinerjistik terapötik etki göstermesi olasıdır. Farklı reseptörler arasındaki etkileşimlerin rolü, erb-B reseptör ailesi üyelerine karşı spesifik hedefli terapilerin kombinasyonu; akciğer kanserinde klinik olarak açığa kavuşmamıştır (38).

2.3.5 Tekrar yerine konan defektif genler

Akciğer kanserinin hedefli tedavisine diğer bir yaklaşım; tümörjenez sırasında kaybedilmiş olan tümör baskılayıcı gen fonksiyonunu yeniden yapılandırmaktır. Örneğin *p53* fonksiyonunun kaybı, akciğer kanserinde yaygın olarak görülmektedir. İn vitro prelinik çalışmalarda, Adenovirüs'e (Adp53) *p53* geninin transferi sonucunda antitümöral etki gözlenmiştir(15).

2.3.6 Tümör baskılayıcı gen fonksiyonu olmayan hücrelerin hedefli ölümü

Günümüzdeki diğer bir yaklaşım, *p53* fonksiyonu olmayan hücreleri öldüren ve sadece çoğalan adneovirüslerin kullanımınıdır. ONYX-015 *p53* aktivitesini inaktive eden adenoviral komponentin delete olduğu bir adenovirüstür. Virüs, sadece *p53* fonksiyonal aktivitesi olmayan hücrelerde çoğalmaktadır (15).

2.3.7 Akciğer kanserinin tedavisi için diğer yaklaşımlar

Akciğer tümörlerinin metastazı ve gelişimi ile ilgili daha fazla bilgi edinildiği için, hedeflenebilir gen ürünü sayısı artmıştır. Örneğin, akciğer kanseri tümör baskılayıcı genlerin fonksiyonel aktivitesinin kaybı; genlerin promotörlerinin hipermetilasyonu ile ilgili olduğu için; diğer bir yaklaşım da , çoğalan hücrelerdeki hipermetilasyon paternini geri getirmek için azacitidine gibi ajanların kullanımınıdır.

Tümörün oluşması ve büyümesi için anjiogenez önemlidir, bu olayı başlatan ve geliştiren damarı engelleyen moleküller akciğer kanseri olan hastalarda terapötik ajan olarak incelenmektedir. M. D. Anderson' da, marimastat, neovastat, interlökin-12, endostatin, TNP-470 ve thalidomide içeren çeşitli antianjiogenik ajanlar üzerinde çalışılmaktadır. Bu ajanların büyüme faktörlerini ve reseptörlerinin proliferasyonunu bloklayarak anjiogenezi engellediği düşünülmektedir.

Metastatik gelişimin diğer önemli bir komponenti ise, tümör hücrelerinin yerleşmesi için uygun organ bulma amacıyla dolaşmasıdır. Tümör hücrelerinin özel bir bölgeye yerleşmesi stromal ve endotelial iletimi başlatmak için gereklidir. Bu etkileşimlerin özellikleri daha iyi tanımlandığı için, bu etkileşimleri engelleyecek küçük peptidler geliştirilerek, metastaz riskinin azaltılması hedeflenmiştir (15).

2.3.8 Kemoprevention yaklaşımları

Akciğer tümörjenezinde pek çok moleküler yolak rol alır. Bu nedenle akciğer kanserinin tedavisinde kullanılan stratejilerin, tedavi aşırı toksik olmamak koşuluyla; premalignant ortamda uygulanabilir olması gerekir. Araştırmacıların tümör gelişiminde etkili moleküler yolları hedefleyen çeşitli çalışmaları normal dokularda zararlı etkilere yol açmıştır. Örneğin EGFR kinaz inhibitörü ZD1839 'un faz 1 ve faz 2 klinik deneyleri sonucunda normal dokunun hasarlandığı tanımlanmıştır (15).

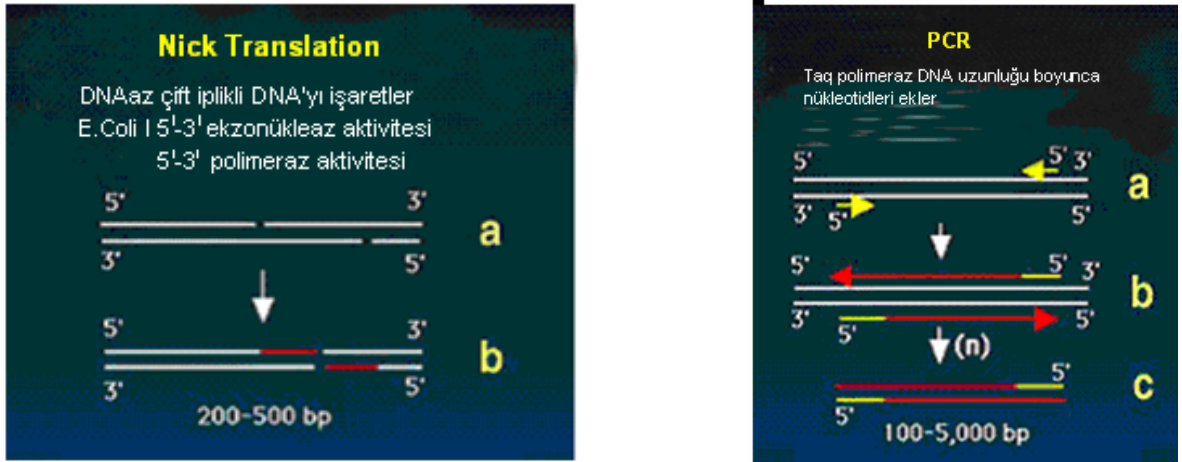
2.3.9 Akciğer kanseri gelişimi ile ilgili moleküler değişikliklerin tanımlanması için yeni teknolojiler

Akciğer kanseri gelişimi açısından tanımlanan önemli genleri daha iyi kavrayabilmek için teknoloji hızla gelişmektedir. İnsan genom projesinin tamamlanması, bireysel akciğer tümörleri ile korele olan gen ekspresyonu, gen dizisi, gen kopya sayısındaki tanımlayıcı değişiklikleri saptayabilmek için gen dizilerini çiplere yerleştirme fırsatını sağlamıştır. Bu şekilde; akciğer tümör gelişiminde önemli yeni genlerin tanımlanacağı ve akciğer tümör

gelişiminin moleküler mekanizmasının daha iyi anlaşılacağı umut edilmektedir. Akciğer tümör gelişimindeki protein ekspresyon paternlerini incelemek için de proteomiks çalışmaları gelişmektedir (15).

2.4 FLUORESAN İN-SİTU HİBRİDİZASYON (FISH)

Fluoresan *in-situ* hibridizasyon (FISH); yapısal olarak korunmuş hücrelerde, metafaz veya interfaz safhasında özgül dizilerin tanımlanmasına olanak sağlayan moleküler sitogenetik bir yöntemdir. Bu teknik, temelde, spesifik olarak aranan DNA dizisine tamamlayıcı olan işaretli probun spesifik olan dizi ile hibridizasyonuna dayanır (38). Problar; tanımlanmak istenen nükleik asit bölgesine tamamlayıcı olan ve belirleyici olarak kullanılan tek ya da çift iplikli özgün nükleik asit dizileridir(39). Problar radyoaktif olarak ya da biotin, digoksinin, dinitrofenil veya fluorokromlarla enzimatik olarak işaretlenmektedir. İşaretleme DOP PCR (degenerative oligonucleotide priming PCR) veya nick translation yöntemi ile yapılır (Şekil 9). İşaretlenmiş nükleik asit problemleri, formamid, dekstran sülfat, bloke edici DNA veya tRNA, sodyum dodesil sülfat, sığır serum albumini ve çeşitli tuzlar içeren melezleme karışımı içine konur (39). İşaretli olan prob hedefe bağlanır ve fluoresan sinyalin gelişmesine neden olur (38).



Şekil 9 : Nick Translation ve DOP PCR yöntemi ile prob işaretlenmesi (40)

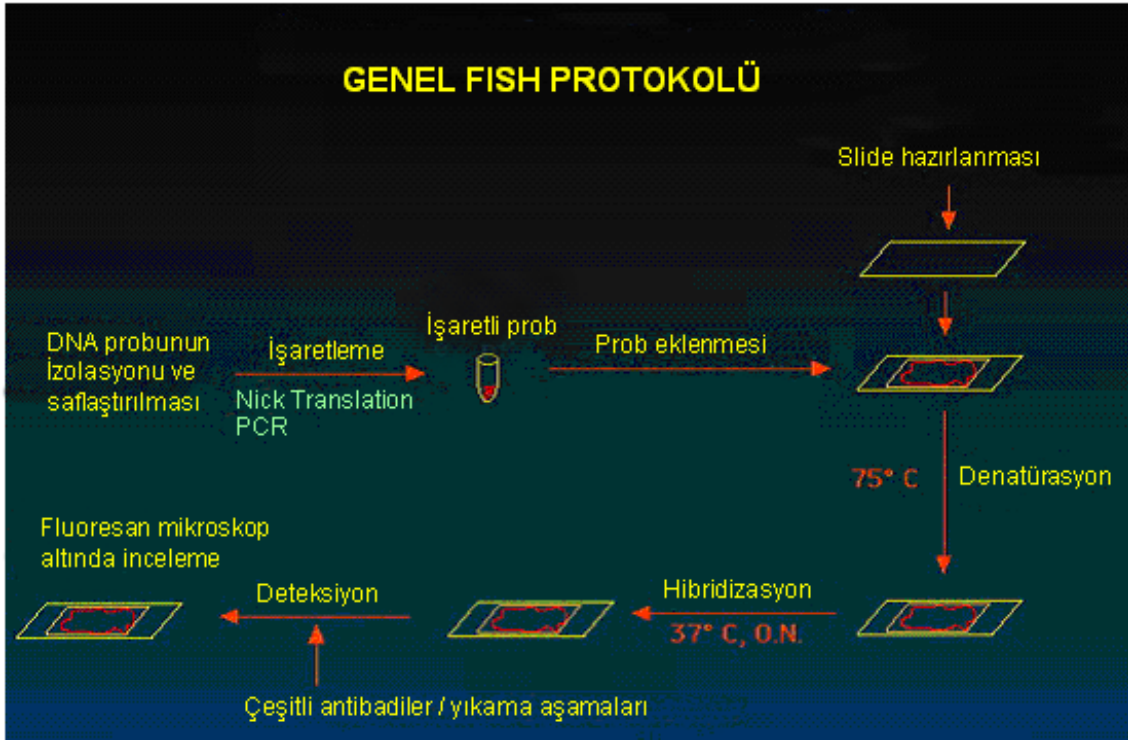
Moleküler biyoloji ve sitogenetiğin kombinasyonu ile bilimde bizlere birçok yeni fırsat sunan FISH tekniği birçok avantaja sahiptir:

- 1) İnterfaz hücrelerinden sitogenetik sonuçlar elde edilebilmesi
- 2) Renkli sonuçların kolayca anlaşılabilir ve yorumlanabilir olması

- 3) DNA oldukça stabil bir moleküldür; bu nedenle arşivlenen materyal ve parafine gömülü dokuların çalışılabilir olması.
- 4) Diğer sitogenetik ve moleküler teknikler ile kombinasyonunun daha güvenilir sonuçlar vermesi.

FISH; translokasyonların, yapısal kırılma noktalarının ve mikrodelsiyonların analizinde, yapısal düzensizliklerin, neoplazia ile ilgili gen düzensizliklerinin saptanmasında, hem prenatal hemde tümör teşhisi için ploidi analizinde, preimplantasyon analizinde, gen amplifikasyonunu saptamada ve gen haritalamada uygulanmaktadır (41).

Yöntem, denatürasyon, hibridizasyon ve posthibridizasyon olmak üzere üç temel aşamadan oluşmaktadır (Şekil 10).



Şekil 10 : Genel FISH protokolü (40)

- 1) **DENATÜRASYON** : DNA/DNA *in-situ* hibridizasyonu için, prob ve hedef dizilerin tek iplikli hale getirilmesi (denatürasyon) gerekir. Denatürasyon; asit, ısı veya alkali uygulaması ile yapılabilir. Isı ile denatürasyon, uygulamanın basitliği ve daha etkili olması nedeni ile en çok kullanılan yöntemdir (39).
- 2) **HİBRİDİZASYON** : Prob ve hedef nükleik asitler tek iplikli hale getirildikten sonra, DNA/DNA melezleri 37°C, RNA/RNA melezleri ise 50-55 °C'de bir gece inkübasyona bırakılırlar. Hibridizasyon oranı prob uzunluğuna, konsantrasyonuna ve

dizinin kompleksliğine bağlıdır (39). Optimal hibridizasyon için prob uzunluğunun 200-500 bp uzunlukları arasında olması gerekir (40).

- 3) POSTHİBRİDİZASYON : İşaretli prob, hedef dizi dışında homoloji gösteren başka dizilerle özgün olmayan melezlenmeler yapabilir. Bu tür melezler, doğru eşleşmiş olanlara göre daha dayanıksızdır; bu nedenle çeşitli yıkama işlemleri ile çözülebilir. Hibridizasyon sonrası yıkamalar, zayıf bağlanan probu temizlemek ve sadece doğru eşleşmiş olanları bırakmak amacı ile yapılır.

Posthibridizasyondan sonra hibridizasyon bölgeleri saptanır. Saptama ve görünür hale getirme yöntemleri, probu işaretlemede kullanılan işaretleyicinin tipine bağlıdır. Radyoaktif işaretli problemlerin saptanması için otoradyografik yöntemler kullanılırken, radyoaktif olmayanlar için; eğer prob doğrudan işaretli ise posthibridizasyondan hemen sonra floresan mikroskop ile melezlenmiş bölgeler görülebilir (39).

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1 OLGULAR VE DOKU ÖRNEKLERİ

Çalışma için, DEÜTF Klinik ve Laboratuvar araştırmaları Etik Kurulunun, 07.12.2004/176 tarih ve numaralı kararıyla onay alınmıştır.

Çalışma için doku örnekleri; İzmir Suat Seren Göğüs Hastalıkları ve Cerrahisi Eğitim Hastanesi'nde 2002 yılında başlamış "Küçük Hücreli Dışı Akciğer Karsinomlarında Muc4 ekspresyonu; E-Cadherin Hücre adezyon Kompleksi, Hücre Proliferasyonu, apoptoz ve Metastaz Üzerine Etkileri" isimli çalışmayı gerçekleştiren Dr.Zekiye Aydoğdu Dinç tarafından sağlandı.

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda, Pof.Dr.Aydanur Kargı tarafından; 24 adet parafin bloktan, lizinli lamlara 2 µ'luk 2'şer adet ve normal lama 1 adet kesit aldırıldı ve normal lama alınan kesitler Hematoksilen-eosin ile boyanarak kesitlerin tümörlü bölgesi işaretlendi.

3.2 FISH YÖNTEMİ

Parafin bloklardan alınan 2 µ'luk kesitlerde, Fluoresan in situ Hibridizasyon (FISH) yöntemi uygulanarak Her-2/*neu* geninin amplifikasyonuna bakıldı.

3.2.1 Manuel Deparafinizasyon Kullanılarak yapılan FISH

3.2.1.1 Deparafinizasyon ve Ön İşlemler

Yapılan işlemler sırasıyla Tablo 10, 11 ve 12'de gösterildi.

Tablo 10 : Parafin Çözme

Kimyasal/ İşlem	Konsantrasyon	Bekleme	Sıcaklık
Ksilol		10 dakika	56 ⁰ C
Ksilol		10 dakika	56 ⁰ C
Etanol	%100	5 dakika	Oda sıcaklığı
Etanol	% 90	5 dakika	Oda sıcaklığı
Etanol	% 70	5 dakika	Oda sıcaklığı
4XSSC		30 dakika	Oda sıcaklığı
1 M NaSCN		Overnight	Oda sıcaklığı

Tablo 11 : Proteaz ve yıkama

Kimyasal/ İşlem	Konsantrasyon	Bekleme	Sıcaklık
Proteaz		10 dakika	37 ⁰ C
2xPBS		2x5 dakika	Oda sıcaklığı
Etanol	%70	3 dakika	
Etanol	%90	3 dakika	
Etanol	%100	3 dakika	
Kurutma			

Tablo 12 : Denatürasyon

Kimyasal/ İşlem	Konsantrasyon	Bekleme	Sıcaklık	
Formamid	%70	5 dakika	73,5 ⁰ C	pH: 7.5
Etanol	%70	2 dakika	-20 ⁰ C	
Etanol	%90	2 dakika	-20 ⁰ C	
Etanol	%100	2 dakika	-20 ⁰ C	
Kurutma				

3.2.1.2 Hibridizasyon

73,5 ⁰C ‘ de prob kokteyli 5 dakika denatüre edildi. Hedef doku üzerine 10 µl prob damlatıldı. Lamel ile kapatılıp lastik yapışkan ile etrafı çevrildi. Nemli ortamda 37⁰C ‘de overnight inkübasyona bırakıldı.

İnkübasyon sonrasında lastik yapışkan açılarak lamel çıkartılıp yıkamaya geçildi. Yapılan işlemler sırasıyla Tablo 13’de gösterildi

Tablo 13 : Hibridizasyon sonrası yıkama

Kimyasal/ İşlem	Konsantrasyon	Bekleme	Sıcaklık
NP-40	%0.3	1 dakika	Oda sıcaklığı
NP-40	%0.3	2 dakika	65 ⁰ C
Kurutma			

Kuruyan lam üzerine 10µl DAPI damlatıldı.

3.2.1.3 Değerlendirme ve optimizasyon

Sonuçta ; parafin iyi uzaklaşmadığı için elde edilen sinyaller oldukça zayıftı. Daha sonraki deneyde parafinin iyi uzaklaşması için ksilol sıcaklığı 65⁰C'ye, ksilol süresi 15 dakikaya çıkarıldı. Pepsin dilüsyonu hazırlanırken, stoktan 400 µl alınıp; preparatın proteazla muamele süresi 15 dakikaya çıkarıldı. Bu deneme sonucunda daha iyi sinyaller elde edildi; fakat kırmızı sinyaller zayıftı. Eski tarihli prob kullanıldığı için sinyallerin zayıf olduğu kanısına varıldı.

Parafinin daha iyi uzaklaşması için ksilol sıcaklığı 80⁰C, süre 3 dakika olarak ayarlandı. Aynı prob ile periferik kandan elde edilen metafaz alanına da hibridizasyon yapıldı. Sonuç olarak kesitte parafin daha iyi uzaklaşmış ve sinyaller daha net olarak gözleniyordu; fakat analiz yapılabilecek nitelikte sinyal yoktu. Metafaz alanında da sinyaller net değildi.

Bir sonraki deneyde, zayıf sinyallerin eski tarihli prob kullanımından kaynaklanıp kaynaklanmadığını tesbit etmek için; periferik kandan elde edilen metafaz alanına yeni tarihli prob ile hibridizasyon yapıldı. Yeni tarihli prob ile metafaz alanına yapılan hibridizasyon sonucu elde edilen sinyaller oldukça netti. Problarda kırmızı renk aktivitesini kısa sürede yitirdiği için, probun eski tarihli olmasının sinyallerin zayıf çıkmasına neden olduğu sonucuna varıldı.

Parafini manuel yöntem ile iyi uzaklaştıramamamız sinyallerin hibridizasyonunu engellemektedir. O nedenle deparafinizasyon için kit kullanmaya karar verdik.

3.2.2 “Paraffin Pretreatment Reagent Kit (Vysis)” ve “PathVysion® HER-2 DNA Probe Kit (LSI® HER-2/neu SpectrumOrange™ / CEP® 17 SpectrumGreen™)” Kullanılarak yapılan FISH

Lokus Özgül Tanımlayıcı (Locus Spesific Identifier-LSI) HER-2/neu DNA probu, 190 Kilobazlık, TuruncuTayfta floresan işaretli bir probdur ve HER-2/neu gen lokusuna (17q11.2-q12) özgüdür. Kromozom Sayım Probu (Chromosome Enumeration Probe-CEP) 17 DNA probu, 5.4 Kilobazlık, YeşilTayfta floresan işaretli bir probdur ve 17 nolu kromozomun sentromerik bölgesinin alfa satellit DNA dizisine (17p11.1-q11.1) özgüdür.

3.2.2.1 Deparafinizasyon ve Ön İşlemler

Lamlar 55⁰C fırında overnight bırakıldı.

Devamında yapılan işlemler Tablo 14, 15, 16 ve 17'de gösterildi.

Tablo 14 : Parafin Çözme

Kimyasal/ İşlem	Konsantrasyon	Bekleme	Sıcaklık	
Ksilol		10 dakika	56 ⁰ C	
Ksilol		10 dakika	56 ⁰ C	
Etanol	%100	5 dakika		
Kurutma			fırında 45 ⁰ C	

Kuruyan lamlar hibridizasyon öncesi önışlem solüsyonunda bekletildi ve yıkamaları yapıldı

Tablo 15 : Önışlem ve yıkamalar

Kimyasal/ İşlem	Konsantrasyon	Bekleme	Sıcaklık
HCl	0.2 M	2-5 dakika	
Su		3 dakika	
Yıkama tamponu		3 dakika	
Yıkama tamponu		3 dakika	
Önışlem solüsyonu		30 dakika	80 ⁰ C
Su		1 dakika	
Yıkama tamponu		5 dakika	
Yıkama tamponu		5 dakika	
Kurutma Fazla sıvı alınır			

Kuruyan lamlar dokunun parçalanması için proteazla muamele edildi

Tablo 16 : Proteaz ve yıkama

Kimyasal/ İşlem	Konsantrasyon	Bekleme	Sıcaklık
Proteaz		10 dakika	37 ⁰ C
Yıkama tamponu		5 dakika	
Etanol	%70	1 dakika	
Etanol	%90	1 dakika	
Etanol	%100	1 dakika	
Kurutma			

Tablo 17 : Denatürasyon

Kimyasal/ İşlem	Konsantrasyon	Bekleme	Sıcaklık	
Formamit	%70	5 dakika	73 ⁰ C	pH: 7.5
Etanol	%70	1 dakika	-20 ⁰ C	
Etanol	%90	1 dakika	-20 ⁰ C	
Etanol	%100	1 dakika	-20 ⁰ C	
Kurutma				

3.2.2.2 Hibridizasyon :

Hedef doku üzerine 10 µl Her2/*neu* prob damlatıldı. Lamel ile kapatılıp lastik yapışkan ile etrafı çevrildi. Nemli ortamda 37⁰C 'de 12 saat inkübasyona bırakıldı (Prob denatüre edilmedi). Sonrasında yıkama işlemleri yapıldı (Tablo 18).

Tablo 18: Hibridizasyon sonrası yıkama

Kimyasal/ İşlem	Konsantrasyon	Bekleme	Sıcaklık
NP-40	%0.3	1 dakika	Oda sıcaklığı
NP-40	%0.3	2 dakika	72 ⁰ C
Kurutma			

Kuruyan lamalar üzerine 10µl DAPI damlatıldı.

3.2.2.3 Değerlendirme ve optimizasyon

Sonuçta; sinyal gözlenmedi. Arka plan, kırmızı gözlendi. Probu çalışıp çalışmadığını anlamak için, kemik iliği materyalinden elde edilen metafaz alanına, prob 73,5 °C’ de 5 dakika denatüre edilerek hibridizasyon yapıldı. Sinyaller oldukça net gözlendi. Prob oldukça iyi çalıştığı için sorunun deparafinizasyondan kaynaklanması olasıydı.

Pretreatment kit ile parafin kesitte deparafinizasyon işlemi sonrasında, hibridizasyon aşamasında prob 73,5 °C’ de 5 dakika denatüre edildi. Sonuçta sinyaller yine gözlenmedi. Farklı bir pretreatment kit ve prob karışımı ile deneme yapılmasına karar verildi.

3.2.3 “Chromosome 17q12 (HER2/*neu*) / Alphasattellite 17 Coctail Probe, Dual Colour (Q-BIOGene) Kit” Kullanılarak yapılan FISH

17q12 (HER-2/*neu*) özgül DNA probu, Rhodamine (Exc. Max. 565nm; Em. Max. 590nm) ile doğrudan-işaretlidir. Kromozom 17 Alpha-Satellite probu, Fluorescein (Exc. Max. 495nm; Em. Max. 525nm) ile doğrudan-işaretlidir.

- Preparatlar 55°C’de overnight bırakıldı.
- Ertesi gün parafin çözme işlemine geçildi (Tablo19)
- Parafin çözme işleminden sonra pretreatment kit ile preparatlar muamele edildi (Tablo 20).
- Proteaz aşamasına geçildi (Tablo 21).
- Hedef doku denatüre edildi (Tablo 22)
- Prob denatüre edilerek hibridizasyon yapıldı.
- Preparatlar nemli ortamda 37°C ‘de overnight inkübasyona bırakıldı.
- Ertesi gün post hibridizasyon yıkamalar yapıldı (Tablo 23)
- Kuruyan lamalar üzerine 10µl DAPI damlatıldı.
- Analiz aşamasına geçildi

3.2.3.1 Deparafinizasyon ve Ön İşlemler

Tablo 19 : Parafin Çözme

Kimyasal/ İşlem	Konsantrasyon	Bekleme	Sıcaklık
Ksilol		10 dakika	55 ⁰ C
Ksilol		10 dakika	55 ⁰ C
Etanol	%100	2x5 dakika	
Kurutma			

Tablo 20 : Önışlem ve yıkamalar

Kimyasal/ İşlem	Konsantrasyon	Bekleme	Sıcaklık
Pretreatment sol.	%20	15 dakika	45 ⁰ C
2xSSC		5-10 sn	Oda sıcaklığı

Tablo 21 : Proteaz ve yıkama

Kimyasal/ İşlem	Konsantrasyon	Bekleme	Sıcaklık
Proteaz		20 dakika	45 ⁰ C
2xSSC		5-10 sn	Oda sıcaklığı
Etanol	%70	1 dakika	
Etanol	%80	1 dakika	
Etanol	%100	1 dakika	
Kurutma			Oda sıcaklığı

Tablo 22 : Denatürasyon

Kimyasal/ İşlem	Konsantrasyon	Bekleme	Sıcaklık	
Formamit	%70	3 dakika	73 ⁰ C	pH: 7.5
Etanol	%70	1 dakika	-20 ⁰ C	
Etanol	%80	1 dakika	-20 ⁰ C	
Etanol	%100	1 dakika	-20 ⁰ C	
Kurutma				Oda sıcaklığı

3.2.3.2 Hibridizasyon

Hedef doku üzerine 10 µl prob kokteyli damlatıldı. Prob 75⁰C’de 5 dakika denatüre edildi. Lamel ile kapatılıp lastik yapışkan ile etrafı çevrildi.. Nemli ortamda 37⁰C ‘de overnight inkübasyona bırakıldı.

Tablo 23 : Hibridizasyon sonrası yıkama

Kimyasal/ İşlem	Konsantrasyon	Bekleme	Sıcaklık	
İn situ wash buffer	1X	5-10 sn	37 ⁰ C	
İn situ wash buffer	1X	3 dakika	65 ⁰ C	
PBD	1X	5 dakika	Oda sıcaklığı	

Kuruyan lamalar üzerine 10µl DAPI damlatıldı.

3.2.3.3 Değerlendirme ve Optimizasyon

Q Biogene kiti ile deparafinizasyon sonucu oldukça iyi sinyaller elde ettik. Çalışmaya bu şekilde devam edilmesi uygun görüldü.

3.3 OLGULARIN DEĞERLENDİRİLMESİ

Nukleuslar incelenerek; HER-2/*neu*’ya özgül rodamin işaretli (kırmızı), kromozom 17’nin alfa satellitini tanıyan flouresin işaretli (yeşil) problemlerin sinyalleri sayıldı. HER2/Alfasatellit 17 oranları saptandı.

Her bir olgu için (iki olgu hariç), minimum 100 nukleus sayıldı. Yapılan diğer çalışmalarda değerlendirilen alan sayısı, genelde minimum 60’tır. HER-2/*neu* için kırmızı, alfa satellit 17 için ise yeşil sinyal gözlemlendi. HER2/Alfasatellit 17 oranı ≥ 2 olan analiz sonuçları gen amplifikasyonu var olarak, HER2/Alfasatellit 17 oranı < 2.0 olan analiz sonuçları ise gen amplifikasyonu yok olarak kabul edildi.

Analizler, Nikon ECLIPSE E 600 flouresan mikroskopta ve Macprobe 4.0 programı kullanılarak yapıldı.

3.4 KULLANILAN KİMYASALLAR VE HAZIRLANIŞLARI

3.4.1 Manuel Deparafinizasyon İçin:

HCl dilüsyonu : 99 ml H₂O 1ml 1 N HCl ile karıştırıldı.

Stok Pepsin : 2 ml dH₂O'da 200 mg pepsin çözüldü. -20 °C ' de saklandı.

Pepsin çalışma solusyonu : 37 °C ' deki HCl dilüsyonu ile 250 µl stok pepsin karıştırıldı.

4 x SSC : 20XSSC ' den dilüe edildi.

% 70 Etil Alkol : 30 ml H₂O üzerine 70 ml Etil Alkol eklendi.

% 90 Etil Alkol : 10 ml H₂O üzerine 10 ml Etil Alkol eklendi.

% 96 Etil Alkol : Absolü alkol kullanıldı.

100 ml 1 M NaSCN (Sodyum tiyosiyanat) : 8.1 gr NaSCN (MA: 81,07 gr.) tartılıp distile su ile 100 ml ' ye tamamlandı.

Formamid: 50 ml karışım için; 35 ml formamid, 5 ml 20 X SSC ve 10 ml H₂O karıştırıldı. 7.5 pH için 25 µl HCl kullanıldı. İndikatör ile pH kontrol edildi.

2 X PBS : 20 ml 10 X PBS alınıp distile su ile 100 ml ' ye tamamlandı.

2 X SSC : 10 ml 20XSSC alınıp 100 ml distile su ile tamamlandı.

% 0.3 NP – 40 : 300 µl stok NP-40 alınıp 100 ml 2XSSC ile karıştırıldı.

3.4.2 “Paraffin Pretreatment Reagent Kit (Vysis)” ile Deparafinizasyon İçin:

20 X SSC : 66 gr tuz formu distile su ile 250 ml' ye tamamlandı.

Proteaz solusyonu : 50 ml tamponda 25 mg proteaz çözüldü (Hemen kullanılmalı).

0.2 M HCl : 20 ml 1M HCl alınıp 80 ml H₂O ile tamamlandı.

% 0.3 NP – 40 : 300 µl stok NP-40 alınıp 100 ml 2XSSC ile karıştırıldı

2 X SSC : 10 ml 20XSSC alınıp 100 ml distile su ile tamamlandı

% 70 Etil Alkol : 30 ml H₂O üzerine 70 ml Etil Alkol eklendi.

% 90 Etil Alkol : 10 ml H₂O üzerine 10 ml Etil Alkol eklendi.

% 96 Etil Alkol : Absolü alkol direk kullanıldı.

Formamid: 50 ml karışım için; 35 ml formamid, 5 ml 20 X SSC, 10 ml H₂O karıştırıldı. 7.5 pH için 25 µl HCl kullanıldı.İndikatör ile pH kontrol edildi.

3.4.3 3 “Chromosome 17q12 (HER2/neu) / Alphasattellite 17 Coctail Probe, Dual Colour (Q-BIOGene) Kit”e ait Pretreatment Kiti ile Deparafinizasyon İçin:

2XSSC : 10 ml 20XSSC alınıp 100 ml distile su ile tamamlandı.

Enzim stok: 100 mg toz üzerine 4 ml distile su eklendi. 400µl şeklinde eppendorflara alikatlandı, -20°C ' ye kaldırıldı.

Enzim çalışma solusyonu : 400µl stok enzim alınıp 40 ml 2XSSC ile karıştırıldı.

Pretreatment solusyonu : 8 gr pretreatment tartılıp 2XSSC ile 40 ml'ye tamamlandı.

1x in situ wash buffer : 5 ml 10x wash buffer alınıp 50 ml'ye distile su ile tamamlandı. Oda sıcaklığında saklandı.

1XPBD : 50 ml 10x PBD alınıp distile su ile 500 ml'ye tamamlandı. Oda sıcaklığında saklandı.

Formamid: 50 ml karışım için; 35 ml formamid, 5 ml 20 X SSC, 10 ml H₂O karıştırıldı. 7.5 pH için 25 µl HCl kullanıldı. İndikatör ile pH kontrol edildi.

% 70 Etil Alkol : 30 ml H₂O üzerine 70 ml Etil Alkol eklendi.

% 90 Etil Alkol : 10 ml H₂O üzerine 10 ml Etil Alkol eklendi.

% 96 Etil Alkol : Absolü alkol direk kullanıldı.

4. BULGULAR

Çalışılan olguların “hasta numaraları”, İzmir Suat Seren Göğüs Hastalıkları ve Cerrahisi Eğitim Hastanesi’nde verilmiştir.

4.1 OLGULARIN HİSTOPATOLOJİK VE KLİNİK VERİLERİ

Klinik veriler, Suat Seren Göğüs Hastalıkları ve Cerrahisi Eğitim Hastanesi’nde 01/01/2003 – 31/12/2005 tarihleri arasında elde edilmiş ve Dr.Zekiye Aydoğdu Dinç aracılığıyla alınmıştır. Elde edilen histopatolojik ve klinik veriler, Tablo 24 ve 25’de gösterilmiştir.

Tablo 24 : Olguların histopatolojik özellikleri ve klinik evreleri

(AK: Adeno Karsinom / SHK: Skuamöz Hücreli Karsinom / BHK: büyük Hücreli Karsinom)

Hasta no	Histolojik tip	Differansiasyon	TNM	Evre
139	AK	orta +	T2N2M0	3A
995	AK	orta	T2N0M0	1B
1749	SHK	orta	T2N0M0	1B
3719	BHK	az	T3N0M0	2B
4206	AK	orta +	T2N1M0	2B
4267	SHK	az	T2N1M0	2B
4454	SHK	orta	T1N0M0	1A
5058	SHK	orta	T2N0M0	1B
5857	SHK	orta	T2N0M0	1B
7098	SHK	az	T3N0M0	2B
8067	AK	orta +	T2N0M0	1B
8678	SHK	orta	T3N2M0	3A
9147	AK	orta	T1N0M0	1A
10016	AK	az	T2N0M0	1B
10097	BHK	orta	T2N0M0	1B
10149	SHK	orta	T2N0M0	1B
10560	AK	orta	T1N0M0	1A
10609	SHK	orta	T3N0M0	2B
12036	SHK	orta +	T2N0M0	1B
14518	BHK	az	T3N0M0	2B
14287	SHK	az	T2N1M0	2B
15206	SHK	orta	T2N0M0	1B
15666	SHK	az	T2N0M0	1B
16748	AK	orta +	T3N0M0	2B

Tablo 25 : Olguların klinik verileri

(Durum: 2005 sonundaki sağ kalım durumu / SRVALLMO: tanı konduktan sonra ay olarak total yaşam süresi / SRVDFMO: tanı konduktan sonra ay olarak hastalıksız yaşam süresi / L: lenf / Ac: akciğer / Adr: adrenal / KC: karaciğer / Serv: servikal omurlar / 2.prim: ikinci bir primer tümör)

Olgu no	DURUM	REKÜRRENS	MTSTZ	MET YER	SRVALLMO	SRVDFMO
139	Ölü(+)	Var	Lokal		6,49	7,51
995	Sağ(+)	Var	Lokal		19,41	18,10
1749	Sağ(-)	Yok	Yok		31,05	31,05
3719						
4206	Sağ(-)	Yok	Yok		26,42	26,42
4267	Ölü(+)	Var	Lokal		20,59	20,59
4454	Sağ(+)	Var	Uzak	L+Ac+Adr	28,82	24,23
5058	Sağ(-)	Yok	Yok	2.prim	26,39	26,39
5857	Sağ(-)	Yok	Yok		26,69	26,69
7098	Sağ(+)	Var	Uzak	Ac+KC	26,59	11,38
8067	Sağ(-)	Yok	Yok		26,92	26,92
8678	Sağ(+)	Var	Lokal		26,30	20,79
9147	Ölü(+)	Var	Uzak	L+Beyin	5,67	3,18
10016	Sağ(-)	Yok	Yok		22,75	22,75
10097	Sağ(-)	Yok	Yok		21,64	21,64
10149	Sağ(-)	Yok	Yok		21,28	21,28
10560	Sağ(-)	Yok	Yok		25,11	25,11
10609	Sağ(-)	Yok	Yok		24,62	24,62
12036	Sağ(+)	Var	Uzak	KC+Ac+Serv	22,92	21,34
14287	Sağ(+)	Var	Uzak	KC	22,16	6,62
14518	Sağ(-)	Yok	Yok		21,97	21,97
15206	Ölü(+)	Var	Uzak	Lokal+Adr	16,95	7,05
15666	Sağ(-)	Yok	Yok		19,48	19,48
16748	Sağ(-)	Yok	Yok		20,33	20,33

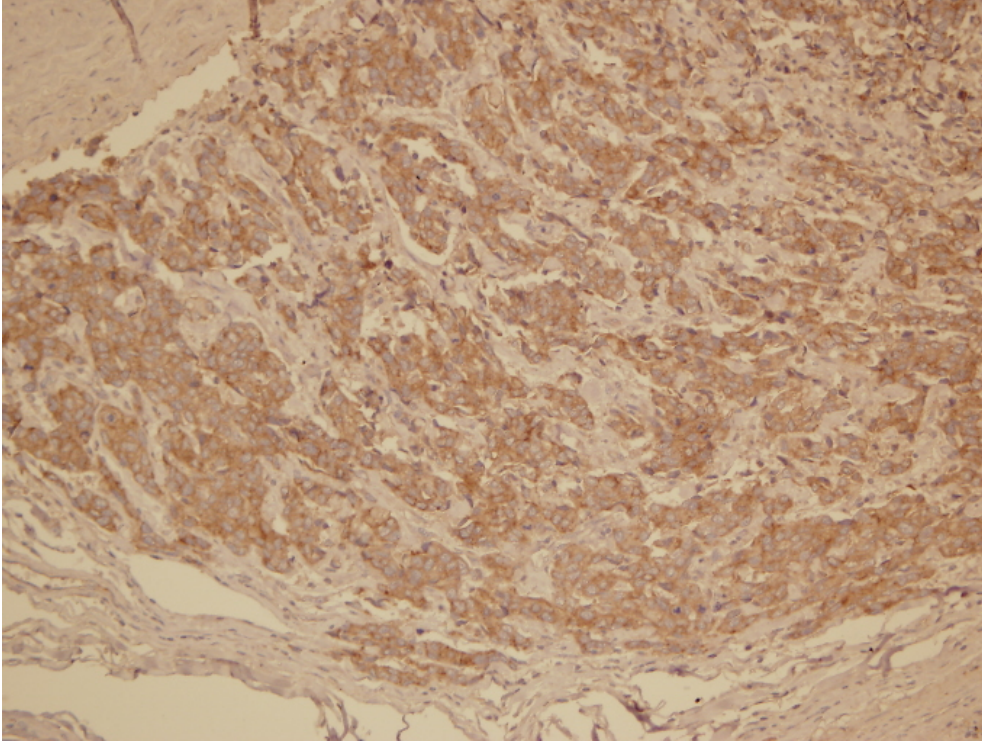
4.2 OLGULARIN HER-2 İÇİN IHC SONUÇLARI

c-ebB2 için, immunohistokimya boyama (NeoMarkers); “Küçük Hücreli Dışı Akciğer Karsinomlarında Muc4 ekspresyonu; E-Cadherin Hücre adezyon Kompleksi, Hücre Proliferasyonu, apoptoz ve Metastaz Üzerine Etkileri” isimli çalışmada yapılmıştır. 4 basamaklı (0, 1, 2, 3), membranöz boyanmayı esas alan ve cut-off değeri olarak %10’u (HER-2 akciğerde, meme ve diğer dokularda olduğu kadar yüksek düzeyde eksprese edilmemektedir) kabul eden sistem kullanılmıştır. %10’dan daha az hücrenin boyandığı örnekler -, + (negatif), %10-50 arası boyananlar ++ ve %50’nin üzerinde boyananlar +++

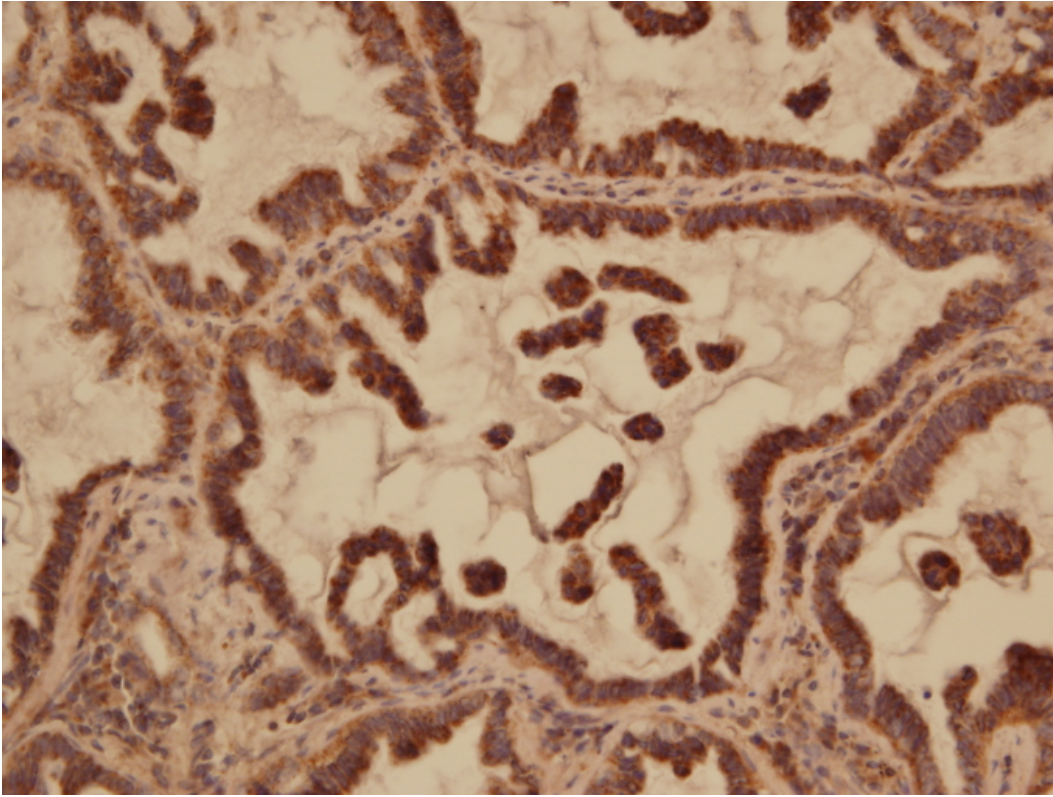
olarak kabul edilmiştir (Tablo 26). +2 ve +3 sonuçları olan iki adet adenokarsinom resmi, Dr.Zekiye Aydoğdu Dinç'in izniyle ve inceliğiyle Resim 1 ve 2'de gösterilmiştir.

Tablo 26 : Olguların IHC sonuçları

Hasta no	IHC
139	+3
995	+3
1749	Negatif
3719	Negatif
4206	Negatif
4267	Negatif
4454	+2
5058	+3
5857	+2
7098	Negatif
8067	+2
8678	Negatif
9147	+2
10016	+3
10097	Negatif
10149	+2
10560	+3
10609	Negatif
12036	Negatif
14518	+3
14287	Negatif
15206	Negatif
15666	+2
16748	+2



Resim 1 : +2 boyanmış bir adenokarsinom örneği



Resim 2 : +3 boyanmış bir adenokarsinom örneği

4.3 OLGULARIN HER-2 İÇİN FISH SONUÇLARI

Parafin bloklardan elde edilen 2µ'luk kesitlerde Dual FISH yöntemi uygulandı. Bloklardan lizinli lama da kesit alınarak DEÜ Patoloji ABD'da Hematoksilen-Eosin boyama yapıldı ve tümörlü bölgeler işaretlendi.

FISH sonrası yapılan değerlendirme sonucunda; her olgu başına (10016 ve 995 no'lu olgular hariç) minimum 100 hücrede HER2/*neu* ve Alfasatellit 17 sinyalleri sayıldı. HER2/*neu* ve Alfasatellit 17 sinyallerinin hücrelerdeki değişik kombinasyonlarının her biri, ayrı değerlendirilerek sayım yapılmıştır. Değişik kombinasyonlara ait alan resimleri, Resim 3, 4 ve 5'de gösterilmiştir.

- Her bir olguda; toplam HER2/*neu* ve Alfasatellit 17 sinyalleri hesaplandı ve toplam hücre sayısına bölünerek ortalama HER2/*neu* ve Alfasatellit 17 değerleri elde edildi .

Bu iki değer birlikte veya tektek;

1.5 ile 2.5 arasında olması dengeli dizomi (normal durum)

2.5 ile 3.5 arasında olması dengeli trizomi

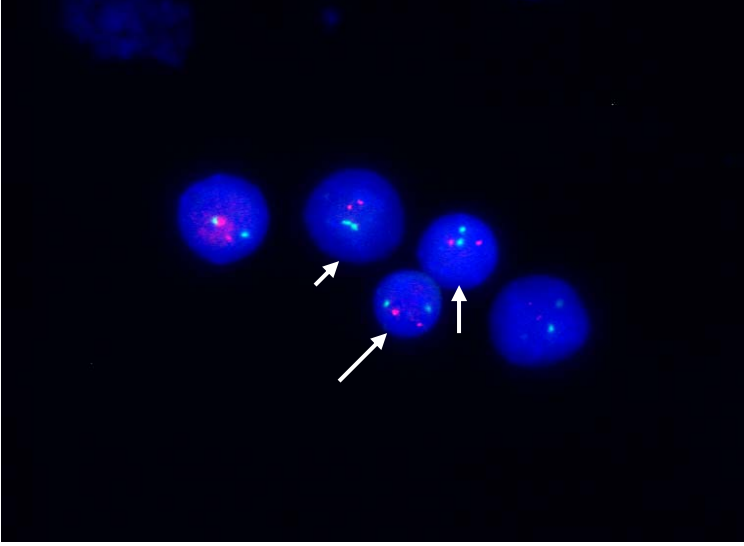
3.5 ile 4.5 arasında olması dengeli quadrizomi olarak değerlendirildi (42).

- Her bir olguda, , HER2/*neu* sinyalleri sayısı Alfasatellit 17 sinyallerinin sayısına bölündü ve çıkan oran;

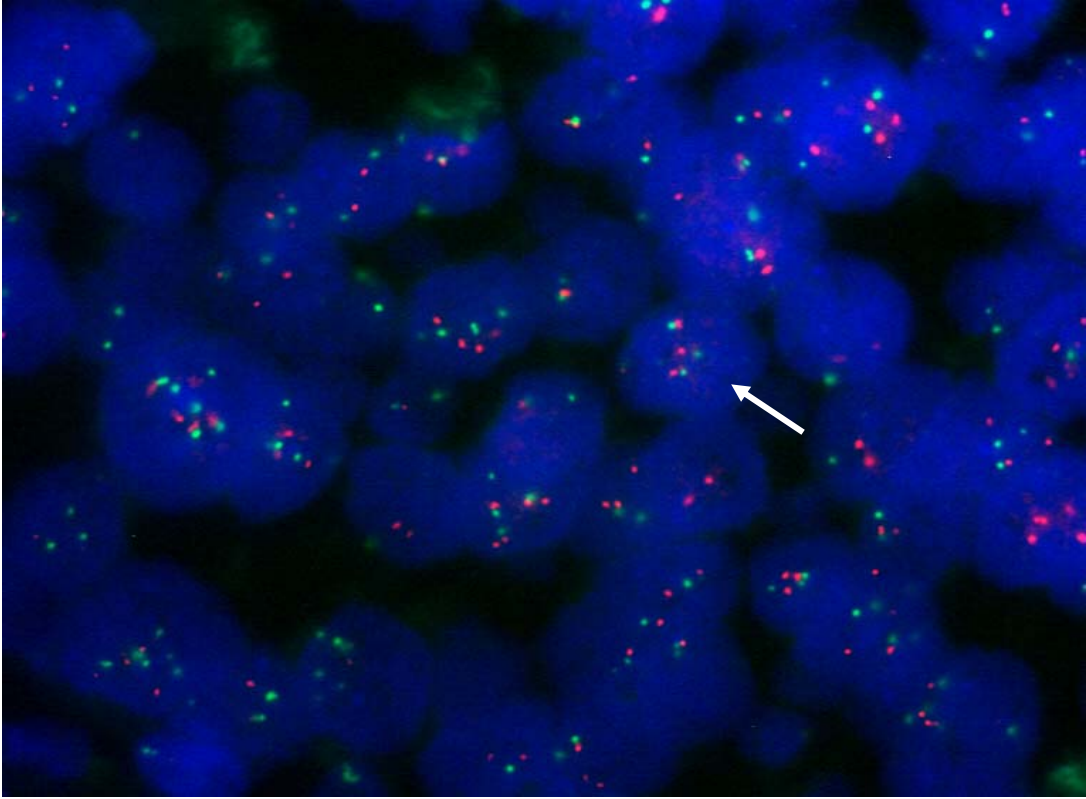
≥ 2 ise gen amplifikasyonu için (+) olarak,

< 2 ise gen amplifikasyonu için (-) olarak kabul edildi (11).

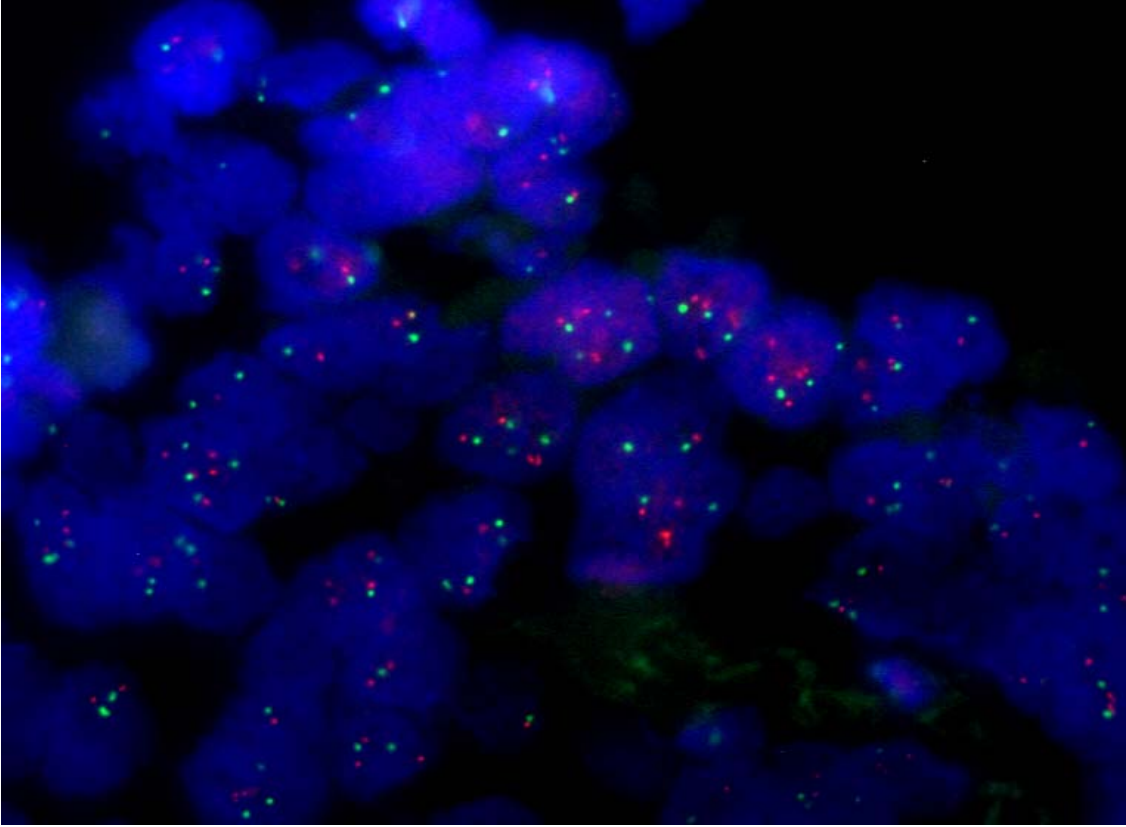
- Ayrıca, her bir olgu için, HER2/*neu* ve Alfasatellit 17 oranı 1'den farklı olan (HER-2/*neu* ve Alfasatellit 17 için kayıp ve kazanımların olduğu) nukleus sayısının yüzde oranı hesaplanarak olgularda görülen dengesizlik yüzdeleri hesaplandı.



Resim 3 : HER-2/*neu* (kırmızı) ve Alfasatellit 17 (yeşil) için Normal kopya sayısına sahip interfaz alanları



Resim 4 : Her2/*neu* (kırmızı) ve Alfasatellit 17 (yeşil) için dengeli trizomi gösteren interfaz nükleuslarına bir örnek (14518 no'lu olgu)



Resim 5 : Her2/*neu* ve Alfasatellit 17 için kopya sayısı artışı gösteren interfaz nükleusları (14518 no'lu olgu)

Yapılan analizlerin sonuçları, herbir olgu için tek tek olmak üzere aşağıda verilmiştir.

139

Hasta no 139	α satellit	HER2/ <i>neu</i>	Nükleus
	2	2	89
	2	4	3
	2	3	1
	3	2	3
	3	3	8
	3	4	1
	3	5	1
	4	4	5
			111

HER-2 ortalaması; 2,27 - Alfasatellit 17 ortalaması 2,21

HER2/Alfasatellite 17 : 1,03

89 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 2), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 2) % 80,18

8 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 3), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 3) % 7,2

5 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 4), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 4) % 4,5
 3 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 4), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 2) % 2,7
 3 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 2), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 3) % 2,7
 1 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 3), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 2) % 0,9
 1 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 4), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 3) % 0,9
 1 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 5), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 3) % 0,9

995

Hasta no 995	α satellit	HER2/neu	Nukleus
	2	2	74
	2	6	2
			76

Her-2 ortalaması; 2,11 - Alfasatellit 17 ortalaması 2,0

HER2/Alfasatellite 17 : 1,05

74 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 2), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 2) % 97,36
 2 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 6), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 2) % 2,63

1749

Hasta no 1749	α satellit	HER2/neu	Nukleus
	1	1	2
	1	2	8
	2	2	84
	2	3	2
	3	3	2
	3	4	2
			100

Her-2 ortalaması; 2,06 - Alfasatellit 17 ortalaması 1,94

HER2/Alfasatellite 17 : 1,06

84 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 1), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 2) % 84
 8 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 2), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 1) % 8
 2 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 1), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 1) % 2
 2 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 3), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 2) % 2
 2 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 3), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 3) % 2
 2 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 4), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 3) % 2

3719

Hasta no 3719	α satellit	HER2/neu	Nukleus
	2	1	2
	2	2	83
	2	3	6
	3	2	6
	4	2	1
	2	4	3
	3	3	1
			102

Her-2 ortalaması; 2,11 - Alfasatellit 17 ortalaması 2,09

HER2/Alfasatellite 17 : 1,01

83 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 2), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 2) % 81,37
 6 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 2), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 3) % 5,88
 6 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 3), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 2) % 5,88
 3 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 4), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 2) % 2,94
 2 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 1), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 2) % 1,96
 1 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 2), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 4) % 0,98
 1 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 3), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 3) % 0,98

4206

Hasta no 4206	α satellit	HER2/neu	Nukleus
	1	1	3
	1	2	1
	2	2	95
	2	3	1
			100

Her-2 ortalaması; 1,98 - Alfasatellit 17 ortalaması 1,96

HER2/Alfasatellite 17 : 1,01

95 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 2), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 2) % 95
 3 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 1), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 1) % 3
 1 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 2), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 1) % 1
 1 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 3), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 2) % 1

4267

Hasta no 4267	α satellit	HER2/neu	Nukleus
	2	2	81
	2	3	9
	2	4	1
	3	2	1
	3	3	2
	3	4	3
	5	5	3
			100

Her-2 ortalaması; 2.28 - Alfasatellit 17 ortalaması 2.15

HER2/Alfasatellite 17 : 1,06

81 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 2), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 2) % 81

9 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 3), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 2) % 9

3 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 4), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 3) % 3

3 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 5), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 5) % 3

2 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 3), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 3) % 2

1 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 4), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 2) % 1

1 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 2), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 3) % 1

4454

Hasta no 4454	α satellit	HER2/neu	Nukleus
	2	2	101
	2	3	3
			104

Her-2 ortalaması; 2,03 - Alfasatellit 17 ortalaması 2,0

HER2/Alfasatellite 17 : 1,01

101 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 2), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 2) % 97,11

3 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 3), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 2) % 2,88

5058

Hasta no 5058	α satellit	HER2/ <i>neu</i>	Nukleus
	2	2	91
	2	3	2
	3	2	2
	3	3	6
			101

Her-2 ortalaması; 2,08 - Alfasatellit 17 ortalaması 2,08

HER2/Alfasatellite 17 : 1,0

91 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 2), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 2) % 90
 6 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 3), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 3) % 5,94
 2 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 2), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 3) % 1,98
 2 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 3), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 2) % 1,98

5857

Hasta no 5857	α satellit	HER2/ <i>neu</i>	Nukleus
	1	1	3
	1	2	4
	2	2	101
	2	3	1
	2	4	2
	3	2	1
	3	3	2
			114

Her-2 ortalaması; 2,04 - Alfasatellit 17 ortalaması 1,96

HER2/Alfasatellite 17 : 1,04

101 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 2), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 2) % 88,59
 4 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 2), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 1) % 3,5
 3 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 1), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 1) % 2,63
 2 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 3), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 3) % 1,75
 2 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 4), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 2) % 1,75
 1 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 2), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 3) % 0,87
 1 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 3), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 2) % 0,87

Hasta no 7098	α satellit	HER2/neu	Nukleus
	1	1	2
	1	2	3
	2	3	3
	2	4	5
	2	5	8
	3	2	3
	3	3	7
	3	4	6
	4	2	1
	4	3	2
	4	4	2
	4	5	1
	4	6	1
	6	6	1
	2	2	77
			122

Her-2 ortalaması; 2,58 - Alfasatellit 17 ortalaması 2,24

HER2/Alfasatellite 17 : 1,15

2 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 1), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 1) % 1,63
3 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 2), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 1) % 2,45
3 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 3), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 2) % 2,45
5 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 4), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 2) % 4,09
8 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 5), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 2) % 6,5
3 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 2), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 3) % 2,45
7 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 3), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 3) % 5,73
6 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 4), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 3) % 4,91
1 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 2), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 4) % 0,81
2 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 3), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 4) % 1,63
2 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 4), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 4) % 1,63
1 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 5), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 4) % 0,81
1 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 6), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 4) % 0,81
1 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 6), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 6) % 0,81
77 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 2), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 2) % 63,11

8067

Hasta no 8067	α satellit	HER2/ <i>neu</i>	Nukleus
	2	1	1
	2	2	65
	2	3	9
	3	2	3
	4	3	1
	4	2	1
	3	1	1
	1	1	1
	1	2	4
	2	4	1
	3	3	13
			100

Her-2 ortalaması; 2,22 - Alfasatellit 17 ortalaması 2,16

HER2/Alfasatellite 17 : 1,03

65 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 2), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 2) % 65
 13 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 3), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 3) % 13
 9 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 3), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 2) % 9
 4 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 2), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 1) % 4
 3 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 2), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 3) % 3
 1 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 1), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 1) % 1
 1 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 1), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 2) % 1
 1 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 1), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 3) % 1
 1 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 2), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 4) % 1
 1 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 3), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 4) % 1
 1 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 4), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 2) % 1

8678

Hasta no 8678	α satellit	HER2/neu	Nukleus
	1	1	3
	1	2	8
	1	3	4
	2	1	1
	2	2	55
	2	3	6
	2	4	3
	3	2	7
	3	3	9
	3	4	2
	4	4	2
			100

Her-2 ortalaması; 2,29 - Alfasatellit 17 ortalaması 2,07

HER2/Alfasatellite 17 : 1,11

55 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 2), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 2) % 55
 9 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 3), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 3) % 9
 8 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 2), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 1) % 8
 7 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 2), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 3) % 7
 6 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 3), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 2) % 6
 4 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 3), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 1) % 4
 3 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 1), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 1) % 3
 3 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 4), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 2) % 3
 2 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 4), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 3) % 2
 2 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 4), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 4) % 2
 1 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 1), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 2) % 1

9147

Hasta no 9147	α satellit	HER2/neu	Nukleus
	2	1	2
	2	2	90
	2	3	5
	2	4	7
	2	5	1
	3	2	3
	3	3	5
	3	4	1
			114

Her-2 ortalaması; 2,24 - Alfasatellit 17 ortalaması 2,08

HER2/Alfasatellite 17 : 1,08

90 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 2), D17Z1 (“Alphasatellite 17 x 2) % 78,94
 7 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 4), D17Z1 (“Alphasatellite 17 x 2) % 6,14
 5 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 3), D17Z1 (“Alphasatellite 17 x 2) % 4,38
 5 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 3), D17Z1 (“Alphasatellite 17 x 3) % 4,38
 3 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 2), D17Z1 (“Alphasatellite 17 x 3) % 2,63
 2 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 1), D17Z1 (“Alphasatellite 17 x 2) % 1,75
 1 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 4), D17Z1 (“Alphasatellite 17 x 3) % 0,87
 1 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 5), D17Z1 (“Alphasatellite 17 x 2) % 0,87

10016

Hasta no 10016	α satellit	HER2/neu	Nukleus
	2	2	55
	2	6	1
			56

Her-2 ortalaması; 2,07 CEP 17 ortalaması 2,0

HER2/Alfasatellite 17 : 1,03

55 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 2), D17Z1 (“Alphasatellite 17 x 2) % 98,2
 1 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 6), D17Z1 (“Alphasatellite 17 x 2) % 1,78

10097

Hasta no 10097	α satellit	HER2/neu	Nukleus
	1	1	1
	1	2	6
	2	1	3
	2	2	75
	2	3	2
	2	4	1
	3	2	5
	3	3	8
	3	4	2
	4	3	2
	4	4	1
			106

Her-2 ortalaması; 2,15 - Alfasatellit 17 ortalaması 2,13

HER2/Alfasatellite 17 : 1,01

74 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 2), D17Z1 (“Alphasatellite 17 x 2) % 71,15
 7 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 3), D17Z1 (“Alphasatellite 17 x 2) % 6,73
 5 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 3), D17Z1 (“Alphasatellite 17 x 3) % 4,8

5 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 4), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 4) % 4,8
 2 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 2), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 3) % 1,92
 2 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 4), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 2) % 1,92
 1 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 2), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 4) % 0,96
 1 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 3), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 4) % 0,96
 1 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 3), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 5) % 0,96
 1 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 3), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 1) % 0,96
 1 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 4), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 3) % 0,96
 1 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 5), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 2) % 0,96
 1 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 5), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 5) % 0,96
 1 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 6), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 3) % 0,96
 1 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 6), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 6) % 0,96

10149

Hasta no 10149	α satellit	HER2/neu	Nukleus
	2	1	15
	2	2	69
	1	2	11
	4	6	1
	2	3	2
	1	3	3
	3	2	4
	3	1	2
	3	3	1
			108

HER-2 ortalaması; 1,94 - Alfasatellit 17 ortalaması 1,95

HER2/Alfasatellite 17 : 0,99

69 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 2), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 2) % 63,8
 15 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 1), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 2) % 13,8
 11 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 2), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 1) % 10,18
 4 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 2), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 3) % 3,7
 3 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 3), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 1) % 2,7
 2 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 1), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 3) % 1,85
 2 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 3), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 2) % 1,85
 1 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 3), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 3) % 0,92
 1 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 6), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 4) % 0,92

10560

Hasta no 10560	α satellit	HER2/neu	Nukleus
	1	1	6
	1	2	9
	1	3	1
	2	1	2
	2	2	79
	3	2	2
	4	4	1
			100

Her-2 ortalaması; 1,95 - Alfasatellit 17 ortalaması 1,88

HER2/Alfasatellite 17 : 1,04

79 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 2), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 2) % 79

9 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 2), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 1) % 9

6 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 1), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 1) % 6

2 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 1), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 2) % 2

2 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 2), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 3) % 2

1 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 3), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 1) % 1

1 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 4), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 4) % 1

10609

Hasta no 10609	α satellit	HER2/neu	Nukleus
	1	2	4
	2	2	82
	2	3	5
	2	4	1
	2	5	2
	3	2	2
	3	3	5
	3	4	4
	3	5	2
	3	6	1
	4	4	3
	5	3	1
	5	4	2
	5	5	1
	6	4	1
			116

Her-2 ortalaması; 2,45 - Alfasatellit 17 ortalaması 2,28

HER2/Alfasatellite 17 : 1,07

82 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 2), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 2) % 70,68
 5 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 3), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 2) % 4,31
 5 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 3), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 3) % 4,31
 4 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 2), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 1) % 3,44
 4 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 4), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 3) % 3,44
 3 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 4), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 4) % 2,58
 2 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 2), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 3) % 1,72
 1 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 4), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 2) % 0,86
 2 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 4), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 5) % 1,72
 2 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 5), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 2) % 1,72
 2 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 5), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 3) % 1,72
 1 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 3), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 5) % 0,86
 1 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 4), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 6) % 0,86
 1 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 5), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 5) % 0,86
 1 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 6), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 3) % 0,86

12036

Hasta no 12036	α satellit	HER2/neu	Nukleus
	2	2	94
	3	3	2
	3	4	1
	3	6	1
	4	6	2
	5	6	1
			101

Her-2 ortalaması; 2,2 - Alfasatellit 17 ortalaması 2,11

HER2/Alfasatellite 17 : 1,04

94 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 2), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 2) % 93
 2 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 3), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 3) % 1,98
 2 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 6), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 4) % 1,98
 1 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 4), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 3) % 0,99
 1 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 6), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 3) % 0,99
 1 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 6), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 5) % 0,99

14287

Hasta no 14287	α satellit	HER2/neu	Nukleus
	2	2	87
	2	3	5
	4	3	1
	3	2	5
	4	3	1
	2	1	1
			100

Her-2 ortalaması; 2,06 - Alfasatellit 17 ortalaması 2,09

HER2/Alfasatellite 17 : 0,99

87 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 2), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 2) % 87

5 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 2), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 3) % 5

5 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 3), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 2) % 5

2 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 3), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 4) % 1

1 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 1), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 2) % 1

16748

Hasta no 16748	α satellit	HER2/neu	Nukleus
	2	2	90
	2	3	3
	3	3	5
	3	4	1
	4	4	1
			100

Her-2 ortalaması; 2,12 - Alfasatellit 17 ortalaması 2,08

HER2/Alfasatellite 17 : 1,02

90 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 2), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 2) % 90

5 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 3), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 3) % 5

3 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 3), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 2) % 3

1 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 4), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 3) % 1

1 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 4), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 4) % 1

14518

Hasta no 14518	α satellit	HER2/neu	Nukleus
	2	2	92
	2	4	3
	2	5	2
	2	6	1
	3	3	10
	3	4	7
	3	5	4
	3	6	2
	3	7	1
	4	3	3
	4	4	16
	4	5	5
	4	6	1
	4	7	1
	4	8	1
	4	13	1
	5	4	2
	5	5	13
	5	6	7
	5	7	6
	6	6	9
	6	7	4
	6	9	1
	6	4	1
	6	10	1
	7	6	1
	7	7	5
	7	8	3
	7	5	1
	7	10	1
	8	6	1
	8	8	2
	8	7	1
	8	10	1
	9	12	1
	10	10	2
			213

Her-2 ortalaması; 3,93 - Alfasatellit 17 ortalaması 3,57

HER2/Alfasatellite 17 : 1,1

92 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 2), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 2) % 43,19

16 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 4), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 4) % 7,51

13 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 5), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 5) % 6,1

10 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 3), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 3) % 4,6
 9 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 6), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 6) % 4,22
 7 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 4), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 3) % 3,28
 7 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 6), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 5) % 3,28
 6 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 7), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 5) % 2,81
 5 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 5), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 4) % 2,34
 5 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 7), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 7) % 2,34
 4 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 5), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 3) % 1,87
 4 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 7), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 6) % 1,87
 3 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 3), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 4) % 1,4
 3 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 4), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 2) % 1,4
 3 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 8), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 7) % 1,4
 2 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 4), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 5) % 0,93
 2 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 5), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 2) % 0,93
 2 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 6), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 3) % 0,93
 2 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 8), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 8) % 0,93
 2 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 10), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 10) % 0,93
 1 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 4), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 6) % 0,46
 1 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 5), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 7) % 0,46
 1 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 6), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 2) % 0,46
 1 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 6), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 4) % 0,46
 1 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 6), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 7) % 0,46
 1 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 6), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 8) % 0,46
 1 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 7), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 3) % 0,46
 1 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 7), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 4) % 0,46
 1 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 7), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 8) % 0,46
 1 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 8), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 4) % 0,46
 1 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 9), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 6) % 0,46
 1 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 10), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 6) % 0,46
 1 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 10), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 7) % 0,46
 1 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 10), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 8) % 0,46
 1 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 12), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 9) % 0,46
 1 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 13), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 4) % 0,46

15206

Hasta no 15206	α satellit	HER2/neu	Nukleus
	2	2	74
	2	3	7
	2	4	2
	2	5	1
	1	3	1
	3	2	2
	3	3	5
	3	4	1
	3	6	1
	4	2	1
	4	3	1
	4	4	5
	5	3	1
	5	5	1
	6	6	1
			104

Her-2 ortalaması; 2,24 - Alfasatellit 17 ortalaması 2,31

HER2/Alfasatellite 17 : 0,97

- 74 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 2), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 2) % 71,15
7 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 3), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 2) % 6,73
5 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 3), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 3) % 4,8
5 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 4), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 4) % 4,8
2 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 2), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 3) % 1,92
2 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 4), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 2) % 1,92
1 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 2), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 4) % 0,96
1 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 3), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 1) % 0,96
1 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 3), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 4) % 0,96
1 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 4), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 3) % 0,96
1 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 5), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 2) % 0,96
1 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 5), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 5) % 0,96
1 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 6), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 3) % 0,96
1 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 6), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 6) % 0,96

15666

Hasta no 15666	α satellit	HER2/neu	Nukleus
	2	2	73
	2	3	6
	3	3	4
	3	2	6
	3	4	2
	4	2	1
	4	3	2
	4	4	1
	5	5	1
	2	1	2
	3	5	1
	2	5	1
			100

Her-2 ortalaması; 2,25 - Alfasatellit 17 ortalaması 2,25

HER2/Alfasatellite 17 : 1,0

73 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 2), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 2) % 73
6 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 2), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 3) % 6
6 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 3), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 2) % 6
4 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 3), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 3) % 4
2 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 1), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 2) % 2
2 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 3), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 4) % 2
2 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 4), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 3) % 2
1 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 2), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 4) % 1
1 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 4), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 4) % 1
1 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 5), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 2) % 1
1 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 5), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 3) % 1
1 interfaz : nuc ish 17q12 (HER-2 x 5), D17Z1 ("Alphasatellite 17 x 5) % 1

4.4 OLGULARIN FISH BULGULARI İLE KLİNİK VERİLERİNİN VE IHC SONUÇLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ

Elde edilen dual FISH verileri ile;

- olguların histopatolojik verileri Tablo 27 ve 28'de,
- evrelendirme verileri Tablo 29 ve 30'da
- prognostik verileri Tablo 31 ve 32'de,
- ICH sonuçları Tablo 33 ve 34'de, karşılaştırılmıştır.

Tablo 27 : Olguların Histopatolojik verileri ile FISH bulguları

Olgu no	Diferans.	Hist. Tip	HER-2/<i>neu</i> ort	Alfasatellit 17 ort	HER2/ Alfasatellit 17
139	orta +	AK	2,27	2,21	1,03
995	orta	AK	2,11	2	1,05
1749	orta	SHK	2,06	1,94	1,06
3719		BHK	2,11	2,09	1,01
4206	orta +	AK	1,98	2,07	1,11
4267	orta +	SHK	2,28	2,15	1,06
4454	az	SHK	2,03	2	1,01
5058	orta	SHK	2,08	2,08	1
5857	orta	SHK	2,04	1,96	1,04
7098	orta	SHK	2,58	2,24	1,15
8067	az	AK	2,22	2,16	1,03
8678	orta +	SHK	2,29	2,07	1,11
9147	orta	AK	2,24	2,08	1,08
10016	orta	AK	2,07	2	1,03
10097	az	BHK	2,15	2,13	1,01
10149	orta	SHK	1,94	1,95	0,99
10560	orta	AK	1,95	1,88	1,04
10609	orta	SHK	2,45	2,28	1,07
12036	orta	SHK	2,2	2,11	1,04
14287	orta +	SHK	2,06	2,09	0,99
14518	az	BHK	3,93	3,57	1,1
15206	az	SHK	2,24	2,31	0,97
15666	orta	SHK	2,25	2,25	1
16748	az	AK	2,12	2,08	1,02

Tablo 28 : Histopatolojik veriler ve FISH sonuçlarının karşılaştırılması

FISH	Histolojik tip		
	SHK	AK	BHK
Gen amplifikasyonu yok	13	8	3
Polizomi	-	-	1

Tablo 29 : Olguların evrelendirme verileri ile FISH bulguları

Olgu no	TNM	Evre	HER-2/neu ort	Alfasatellit 17 ort	HER2/ Alfasatellit 17
139	T2N2M0	3A	2,27	2,21	1,03
995	T2N0M0	1B	2,11	2	1,05
1749	T2N0M0	1B	2,06	1,94	1,06
3719	T3N0M0	2B	2,11	2,09	1,01
4206	T2N1M0	2B	1,98	2,07	1,11
4267	T2N1M0	2B	2,28	2,15	1,06
4454	T1N0M0	1A	2,03	2	1,01
5058	T2N0M0	1B	2,08	2,08	1
5857	T2N0M0	1B	2,04	1,96	1,04
7098	T3N0M0	2B	2,58	2,24	1,15
8067	T2N0M0	1B	2,22	2,16	1,03
8678	T3N2M0	3A	2,29	2,07	1,11
9147	T1N0M0	1A	2,24	2,08	1,08
10016	T2N0M0	1B	2,07	2	1,03
10097	T2N0M0	1B	2,15	2,13	1,01
10149	T2N0M0	1B	1,94	1,95	0,99
10560	T1N0M0	1A	1,95	1,88	1,04
10609	T3N0M0	2B	2,45	2,28	1,07
12036	T2N0M0	1B	2,2	2,11	1,04
14287	T2N1M0	2B	2,06	2,09	0,99
14518	T3N0M0	2B	3,93	3,57	1,1
15206	T2N0M0	1B	2,24	2,31	0,97
15666	T2N0M0	1B	2,25	2,25	1
16748	T3N0M0	2B	2,12	2,08	1,02

Tablo 30 : Histopatolojik veriler ve FISH sonuçlarının karşılaştırılması

FISH	EVRE				
	1A	1B	2A	2B	3A
Gen amplifikasyonu yok	3	11	-	8	2
Polizomi	-	-	-	1	-

Tablo 31 : Olguların prognostik verileri ile FISH bulguları (REK: rekürrens / MTZ: Metastaz)

Olgu no	DURUM	REK.	MTZ	SRVALLMO	SRVDFMO	HER-2/neu ort	Alfasatellit 17 ort	HER2/ Alfasatellit 17
139	Ölü(+)	Var	Lokal	6,49	7,51	2,27	2,21	1,03
995	Sağ(+)	Var	Lokal	19,41	18,10	2,11	2	1,05
1749	Sağ(-)	Yok	Yok	31,05	31,05	2,06	1,94	1,06
3719						2,11	2,09	1,01
4206	Sağ(-)	Yok	Yok	26,42	26,42	1,98	2,07	1,11
4267	Ölü(+)	Var	Lokal	20,59	20,59	2,28	2,15	1,06
4454	Sağ(+)	Var	Uzak	28,82	24,23	2,03	2	1,01
5058	Sağ(-)	Yok	Yok	26,39	26,39	2,08	2,08	1
5857	Sağ(-)	Yok	Yok	26,69	26,69	2,04	1,96	1,04
7098	Sağ(+)	Var	Uzak	26,59	11,38	2,58	2,24	1,15
8067	Sağ(-)	Yok	Yok	26,92	26,92	2,22	2,16	1,03
8678	Sağ(+)	Var	Lokal	26,30	20,79	2,29	2,07	1,11
9147	Ölü(+)	Var	Uzak	5,67	3,18	2,24	2,08	1,08
10016	Sağ(-)	Yok	Yok	22,75	22,75	2,07	2	1,03
10097	Sağ(-)	Yok	Yok	21,64	21,64	2,15	2,13	1,01
10149	Sağ(-)	Yok	Yok	21,28	21,28	1,94	1,95	0,99
10560	Sağ(-)	Yok	Yok	25,11	25,11	1,95	1,88	1,04
10609	Sağ(-)	Yok	Yok	24,62	24,62	2,45	2,28	1,07
12036	Sağ(+)	Var	Uzak	22,92	21,34	2,2	2,11	1,04
14287	Sağ(+)	Var	Uzak	22,16	6,62	2,06	2,09	0,99
14518	Sağ(-)	Yok	Yok	21,97	21,97	3,93	3,57	1,1
15206	Ölü(+)	Var	Uzak	16,95	7,05	2,24	2,31	0,97
15666	Sağ(-)	Yok	Yok	19,48	19,48	2,25	2,25	1
16748	Sağ(-)	Yok	Yok	20,33	20,33	2,12	2,08	1,02

Tablo 32 : Prognostik verileri ile FISH sonuçlarının karşılaştırılması (3719 no.lu olgu dahil edilmemiştir).

FISH	DURUM		METASTAZ			REKÜRRENS	
	Sağ	Ex	Uzak	Lokal	Yok	Var	Yok
Gen amplifikasyonu yok	19	4	6	4	13	10	13
Polizomi	1	-	-	-	1	-	1

Tablo 33 : Olguların immunohistokimya (HER-2 için) verileri ile FISH bulguları

Olgu no	IHC	HER-2/neu ort	Alfasatellit 17 ort	HER2/Alfasatellit 17
139	3	2,27	2,21	1,03
995	3	2,11	2	1,05
1749	Negatif	2,06	1,94	1,06
3719	Negatif	2,11	2,09	1,01
4206	Negatif	1,98	2,07	1,11
4267	Negatif	2,28	2,15	1,06
4454	2	2,03	2	1,01
5058	3	2,08	2,08	1
5857	2	2,04	1,96	1,04
7098	Negatif	2,58	2,24	1,15
8067	2	2,22	2,16	1,03
8678	Negatif	2,29	2,07	1,11
9147	2	2,24	2,08	1,08
10016	3	2,07	2	1,03
10097	Negatif	2,15	2,13	1,01
10149	2	1,94	1,95	0,99
10560	3	1,95	1,88	1,04
10609	Negatif	2,45	2,28	1,07
12036	Negatif	2,2	2,11	1,04
14287	Negatif	2,06	2,09	0,99
14518	3	3,93	3,57	1,1
15206	Negatif	2,24	2,31	0,97
15666	2	2,25	2,25	1
16748	2	2,12	2,08	1,02

Tablo 34 : İmmünohistokimya ve FISH sonuçlarının karşılaştırılması

FISH	IHC		
	Negatif (0,+1)	Pozitif (+2)	Pozitif (+3)
Gen amplifikasyonu yok	11	7	6
Polizomi	-	-	1

Yukarıda yer alan veri değerlendirmelerine ek olarak, her olgu için; farklı oranlarda sinyal sayısına sahip hücrelerin yüzdeleri hesaplanmıştır ve prognostik verilerle ve IHC verileri ile karşılaştırılmıştır (Tablo 35 ve 36).

Tablo 35 : Olguların, hücrelerde saptanan değişik HER-2/Alfasatellit oranlarına göre FISH bulguları. Hücre içlerinde verilen sayılar yüzde cinsindedir.

2/2: normal durum – **Pol. 1:** 17 nolu kromozom için polizomi var ancak oran 1 – **1/1:** her iki sinyalden de birer adet var – **2/1:** HER-2 sinyallinden iki, Alfasatellit sinyalinden bir adet var – **3/1:** HER-2 sinyallinden üç, Alfasatellit sinyalinden bir adet var – **1/2:** HER-2 sinyallinden bir, Alfasatellit sinyalinden iki adet var – **<1:** HER-2 ve Alfasatellit sinyal sayılarında normal duruma göre artış var, HER2 sayısı daha az – **>1:** HER-2 ve Alfasatellit sinyal sayılarında normal duruma göre artış var HER2/Alfasatellit oranı 1'den büyük – **≥2:** HER-2 ve Alfasatellit sinyal sayılarında normal duruma göre artış var HER2/Alfasatellit oranı 2ye eşit veya daha büyük – **%Den.:** Dengeli artışlar haricindeki dengesiz durumların (kayıp ve kazanç) toplam yüzdesi

Olgu no	HER-2/Alfasatellit									%Den.
	2/2	Pol. 1	1/1	2/1	3/1	1/2	<1	>1	≥2	
139	80,18	11,7					2,7	2,7	2,7	8,1
995	97,36								2,63	2,63
1749	84	2	2	8				4	0	12
3719	81,37	0,98				1,96	6,86	5,88	2,94	17,64
4206	95		3	1				1	0	31
4267	81	5					1	12	1	14
4454	97,11							2,88	0	2,88
5058	90	5,94					1,98	1,98	0	3,96
5857	88,59	1,75	2,63	3,5			0,87	0,87	1,75	7
7098	63,11	8,17	1,63	2,45			4,89	8,98	10,59	28,68
8067	65	13	1	4		1	5	9	1	21
8678	55	11	3	8	4	1	7	8	3	31
9147	78,94	4,38				1,75	2,63	5,25	7,01	16,66
10016	98,2								1,78	1,78
10097	71,15	11,52			0,96		4,8	7,69	3,84	21
10149	63,8			10,18	2,7	13,8	5,55	2,77	0	35,185
10560	79	1	6	9	1	2	2		0	14
10609	70,68	3,44		3,44			5,16	9,47	3,44	21,55
12036	93	1,98						3,96	0,99	4,95
14287	87					1	6	5	0	13
14518	43,19	26,63					6,93	18,16	4,64	30,04
15206	71,15	11,52			0,96		3,84	7,69	3,84	17,3
15666	73	6				2	9	9	1	21
16748	90	6						4	0	4

Tablo 36 : Prognostik veriler ve IHC sonuçları ile HER-2/Alfasatellit sonuçlarının karşılaştırılması (Prognostik veriler ile karşılaştırmaya 3719 no.lu olgu dahil edilmemiştir).

HER-2/Alfasatellit	DURUM		METASTAZ			REKÜRRENS		IHC		
	Sağ	Ex	Uzak	Lokal	Yok	Var	Yok	-	+2	+3
Pol. 1										
%0	6	-	2	1	3	3	3	2	2	2
%0-10	4	2	3	1	7	4	7	6	4	2
%10-20	8	2	1	2	2	3	2	3	1	1
%20-30	1	-	-	-	1	-	1	-	-	1
≥2										
%0	8	-	2	-	6	2	6	3	3	2
<%2	3	1	1	1	4	2	4	2	3	1
≥%2	7	3	3	3	3	3	3	6	1	3
%Den.										
%0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
%0-10	1	7	2	2	3	4	3	1	3	4
%10-20	3	4	3	1	2	4	2	5	1	1
%20-30	-	4	1	-	3	1	3	3	2	-
>%30	-	4	-	1	4	1	4	2	1	1

5. TARTIŞMA

Araştırmada; 13'ü (%54.17) SHK, 8'i AK (%33.33) ve 3'ü (%12.5) BHK olmak üzere 24 adet “Küçük Hücreli Dışı Akciğer parafin blok örneği çalışıldı. Amaç, FISH yöntemi uygulandıktan sonra HER-2/*neu* gen amplifikasyonu pozitif ve negatif çıkan olgu sonuçlarını, klinik verileri ile birleştirilerek; HER-2/*neu* gen amplifikasyonunun prognoz üzerine olan etkisini araştırmaktı.

Optimizasyon çalışmaları sırasında, üç farklı protokol denendi. İlk olarak deparafinizasyon ve proteinaz işlemleri manuel olarak gerçekleştirildi. Çalışmalar sonucunda, çok zayıf sinyaller elde edildi. Bu sorunun eski tarihli prob kullanımından kaynaklandığı düşünülerek, bir sonraki çalışma yeni tarihli prob ile gerçekleştirildi. Bu çalışma sonucundaki sinyaller de oldukça zayıftı ve background kırmızı olarak gözlemlendi. Sorunun, parafinin manuel yöntemle iyi uzaklaştırılmaması ve buna bağlı olarak, hedef doku ile prob arasında gerçekleşmesi gereken hibridizasyon aşamasının gerçekleşmemesi, olduğu düşünüldü. Bu nedenle, deparafinizasyon işlemi “Paraffin Pretreatment Reagent Kit (Vysis)” ile gerçekleştirildi. PathVysion® HER-2 DNA Probe Kit (LSI® HER-2/*neu* SpectrumOrange™ / CEP® 17 SpectrumGreen™) kiti ile yapılan çalışmalar sonucunda da deparafinizasyon aşamasında problem yaşandı. Son olarak “Chromosome 17q12 (HER2/*neu*) / Alphasattellite 17 Cocktail Probe, Dual Colour (Q-BIOGene) Kit” kullanıldı. İlk denemede çok iyi sinyaller elde edildi.

Aynı deney koşullarında çalışılan parafin kesitlerde, aynı kalitede sinyal elde edilemeyen durumlar oldu. Bunun birkaç tane nedeni olabilir. Aynı deparafinizasyon koşullarına rağmen, parafin tüm kesitlerde aynı derecede uzaklaşmamış olabilir ve buna bağlı olarak hibridizasyon da gerçekleşmemiş olabilir. İkinci olarak; ameliyattan gelen dokuların parafinize edilme işlemlerinde farklılık olabilir. Bir diğer neden de; sinyal alınamayan bölgelerde nekrotik dokuların yoğun olarak bulunması olabilir ki, sinyal elde edilemeyen, bir kısım bölgenin, uzman bir patolog yardımı ile nekrotik alanlara sahip olduğu tesbit edilmiştir.

IHC sonuçları, 11 tanesi negatif (%46), 7 tanesi (%29) +2 ve 6 tanesi (%25) +3 olan olguların, parafin bloklarından alınan kesitlerde, uygulanan FISH çalışması sonucunda; 23 olguda dengeli dizomi, bir adet +3 olguda dengeli quadrizomi saptanırken, olguların hiç birinde HER-2/*neu* geninin gerçek amplifikasyonu gözlenmemiştir.

Genel Dünya literatürüne baktığımız zaman, IHC sonuçlarıyla HER-2 gen amplifikasyonu arasında, çoğunlukla konkordans bulunmadığını görmemize rağmen, bir takım çalışma sonuçları da aksini söylemektedir. Örneğin; D. Tan ve arkadaşları, akciğer tümörlerinde yaptıkları FISH ve IHC çalışmaları sonucunda; FISH ile IHC yöntemleri arasında yüksek konkordans buldular ($r=0.83$, $p<0.001$). Hercept test ile pozitif çıkan tümörlerin %40'ında, hücre başına düşen HER-2/*neu* maksimum kopya sayısını dokuzdan büyük buldular ve bu tümörleri her iki yöntem açısından pozitif olarak kabul ettiler. +3 olan tümörlerin tamamı amplifikasyon gösterirken; Hercept testi negatif (0 veya +1) olan hiçbir olguda amplifikasyon saptanmadı. (44). Bizim çalışmamızda, negatif, +2 ve +3 olan olgularımızda gen amplifikasyonu saptanmadı. +3 olan tek bir olguda, dengeli quadrizomi saptanmıştır ki bu da gerçek gen amplifikasyonu olarak kabul edilmemektedir.

Bir diğer örnek olarak da; G. Cox ve ark. negatif (0 ve +1) 19 olguda ve +2 olan 4 olguda hiç amplifikasyon saptamamıştır. +2 olan tek bir olguda polizomi gözlerken; +3 olan toplam 4 olgunun hepsinde amplifikasyon saptamıştır (46). G. Cox ve çalışma grubunun sonuçlarına göre, Hercept Test; özellikle +3 olan olgularda HER-2/*neu* amplifikasyonunu saptamak için son derece güvenilir bir yöntemdir. IHC sonuçları ile FISH sonuçları arasında büyük bir korelasyon vardır (46). Bizim çalışmamız negatif olgular açısından bu çalışma ile paralel olmasına rağmen; özellikle 3 pozitif olgularımızla ters düşmektedir. Olgularımızın %100'ünde amplifikasyon saptanmadığı için, negatif sonuçların uyumlu olmasının da istatistiksel olarak bir anlamı yoktur.

Uyumu gösteren çalışmaların aksini iddia eden çalışma sayısı, daha fazladır ve daha yüksek örnek sayılarıyla yapılmışlardır. Örneğin; 106 olgu ile yapılan bir çalışmada, HER2 overekspresyonu gösteren %22 olgudan ancak %6'sında gen amplifikasyonu saptanırken, 238 olguluk bir diğer çalışmada uyum %4 olarak belirlenmiştir (12, 42).

Pellegrini ve arkadaşları 41 olgu kullanarak yaptıkları çalışmada, 23 negatif tümörün 2 sinde düşük seviyeli amplifikasyon, 18 pozitif olgunun 3 ünde düşük, 3 ünde yüksek seviyeli amplifikasyon, 1 inde polizomi saptamış, 11 inde ise amplifikasyona rastlamamıştır (11).

Nakamura ve arkadaşları çalışma sonuçlarında; ortalama HER2/*neu* kopya sayısı ≥ 3 olan tümörleri HER2/*neu* kopya sayısını artmış, HER2-*neu*/CEP $17 \geq 2$ olan tümörleri ise amplifikasyon var olarak değerlendirmiştir (45). Tümörlerin %44'ünde HER2/*neu* kopya sayısı ≥ 3 , %2'sinde ise amplifikasyon bulmuşlardır. Artmış HER2 kopya sayısına büyük hücreli karsinomada rastlamazken; adenokarsinoma ve skuamöz hücreli karsinomada rastlamışlardır (45). Biz çalışmamızdaki SHK ve AK olgularında artmış HER-2/*neu* kopya sayısına rastlamazken; bir BHK olgusunda artmış HER-2/*neu* kopya sayısına rastladık.

Kullandığımız tümörlerin %4.17'sinde HER2/neu kopya sayısı >3 olarak belirlendi. Olgularımızın hiçbirinde amplifikasyona rastlamadık. Nakamura ve arkadaşları tümörlerin %44'ünde; kromozom 17 duplikasyonunun artan HER2/*neu* kopya sayısı ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Bu sonuç; akciğer kanserinde 17 nolu kromozomun anomalilerinin sıkça oluştuğunu gösteren CGH ve konvensiyonel sitogenetik çalışmalarla konkordans göstermektedir (45). Nakamura ve arkadaşları HER-2 geninin kopya sayısındaki artışın, polizomi 17 ile korelasyon gösterirken; P185 overekspresyonu ile korelasyon göstermediğini ileri sürmüşlerdir (45). Bizim çalışmamızda da, +3 olgulardan kopya sayısı artımı gösteren tek olgu, 17 numaralı kromozomun dengeli polizomisi olarak gözlenmektedir.

Polizomi 17'ye bağımlı HER-2/*neu* artışının p185'in aşırı ekspresyonuna yol açtığı düşünülmektedir. Bazı tümörlerde bu durum doğru iken; bazı tümörler de HER-2 normal kopya sayısına sahip olmasına rağmen protein overekspresyonuna rastlanmaktadır. Üstelik; artmış kopya sayısına sahip tümörlerin %62'sinde overekspresyon yoktur. Benzer fenomen Slaman ve ark. tarafından meme ve ovum kanserleri için rapor edilmiştir. Bu nedenle overekspresyonun, gen kopya sayısından ziyade; bu tipte transkripsiyonal veya posttranskripsiyonal mekanizmaların düzenlenmelerindeki değişiklikler nedeni ile gerçekleştiği düşünülmektedir. KHDAK'de HER2 geninin mRNA overekspresyonuna sıkça rastlandığı için overekspresyonda bu mekanizmaların yaygın olabileceği düşünülmektedir (45).

Yapılan çalışmalar sonucunda meme kanseri vakalarının %20-30'unda HER-2/*neu* amplifikasyonu gözlenmiştir. FISH tekniği meme kanserinde HER-2/*neu* amplifikasyonunu saptamak için altın standart olarak belirlenmiştir. Meme kanserinde gözlenen HER-2 amplifikasyonu HER-2 RNA'sında artışa ve dolayısı ile HER2'nin overekspresyonuna neden olmaktadır (47). Ayrıca IHC sonuçları ile FISH sonuçları daha büyük uyum göstermektedir. Herceptin tedavisi alabilecek hastalar IHC ve FISH teknikleri kullanılarak saptanmaktadır (48). Akciğer kanserlerinde ise, HER2/*neu* overekspresyonu zaten daha az olan bir durumdur ve hem IHC negatif olgularda gözlenebilmekte hem de IHC ile pozitif vakaların çoğunda gözlenmemektedir.

Akciğer kanseri hücre hatları ile yapılan çalışmalarda, HER2 overekspresyonu FISH, IHC ve FACS metodlarıyla çalışılmış ve orta dereceli bir ekspresyonun az sayıda hücre hattında saptanması mümkün olmuştur (12). Artışın mekanizması, genelde 17 nolu kromozomun dublikasyonu ve polizomisine bağlanmıştır. Bu çalışmaya göre, trastuzumab uygulanmasının yalnızca HER-2/*neu* için gerçek gen amplifikasyonu olan hücre hatlarında, hücre çoğalmasını etkilediği bulunmuştur. Ancak, faz-II klinik çalışmalar, IHC ile +3 olan

vakaların Trastuzumab ile kombine tedaviden, geleneksel tedaviye göre daha olumlu yönde yararlandıklarını göstermektedir. Ancak, Herceptin kullanımının, KHDAK'lerinde kullanımı halen tartışmalı ve araştırılmakta olan bir konudur. Aynı şekilde, tedavi için hangi yöntemle HER2 artışının belirlenmesi gerektiği de tartışmalıdır. Trastuzumabın etki mekanizmaları düşünüldüğünde, bizce, her iki yöntem ve HER-2 ECD serum seviyelerinin ölçülmesinin kombinasyonunu kullanmak daha doğru gibi görünmektedir.

D. Tan ve arkadaşları, HER-2/*neu* anomalileri ile akciğer histolojik tipleri arasında önemli bir korelasyon olduğunu gözlemiştir. Yaptıkları çalışmada % 72 (5/7) oranında adenokarsinomada, %14 oranında (1/7) skuamöz hücreli karsinomada, %14 oranında (1/7) büyük hücreli karsinomada amplifikasyon saptamışlardır (44). Çalışma sonuçlarımız D.Tan'ın çalışması ile uyum göstermemektedir. Ancak, her iki çalışmanın da, çok az sayıda örnekle gerçekleştirildiği göz önünde tutulmalıdır.

Literatüre bakıldığında, KHDAK'lerde HER2 pozitifliğinin kötü prognozla ilişkili olduğu bildirilmektedir. Prognostik verilerle, FISH sonuçlarımızın karşılaştırılmasında; FISH değerlendirilmesinde öncelikli olarak HER2 pozitifliği için kabul edilmiş yöntem olan HER2/Alfasatellit oranının 2'ye eşit ve fazla olmasını kullandık. Hiç bir olgumuzda gen amplifikasyonu saptanmadığı için, anlamlı bir korelasyon verisi sağlanamadı. Polizomisi olan tek olgunun da, metastaz veya rekürrensi yoktur.

Mitelman veritabanından elde edilen verilerde; +17'ye sahip 14 adenokarsinomlu olgu, 9 skuamöz hücreli karsinoma, -17' ye sahip 30 adenokarsinomlu olgu, 27 skuamöz hücreli karsinoma, i(17)(q10) içeren 2 adenokarsinoma olgu bulundu (25). Ayrıca, Karaüzüm ve arkadaşları 30 primer kültürde yaptığı karyotip analizi sonuçlarında 6 olguda monozomi 17, 4 olguda trizomi 17 ve 1 olguda i(17)(q10) 'a, ayrıca tetraploit, pentaploid alanlara rastlamıştır (43). Olgularımızda da monozomi17, trizomi 17 ve polizomi içeren interfazlara rastladık. İnterfaz alanında yapılabilen FISH çalışmamız yerine primer kültürden metafaz elde edebilseydik; muhtemelen polizomik alanlarda i(17)(q10) anomalisi gözlenebilirdi.

Bunları göz önünde bulundurarak, farklı genlerin prognostik veya tanısal FISH değerlendirmelerinde kullanılan bir değerlendirme metodununu da denedik. HER2/Alfasatellit sayıları 2/2'den (normal durum) farklı olan hücrelerin yüzdeleri hesaplandı. Bunlar : 2/2: normal durum ; Pol. 1: 17 nolu kromozom için polizomi var ancak HER2/Alfasatellit oranı 1 ; 1/1: her iki sinyalden de birer adet var (monozomi 17) ; 2/1: HER-2 sinyallinden iki, Alfasatellit sinyalinden bir adet var (Alfasatellit probun lokalize olduğu bölgenin kaybı) ; 3/1: HER-2 sinyallinden üç, Alfasatellit sinyalinden bir adet var ; 1/2: HER-2 sinyallinden bir, Alfasatellit sinyalinden iki adet var (HER-2 probunun lokalize olduğu bölgenin kaybı) ; ≤1: HER-2 ve Alfasatellit sinyal sayılarında normal duruma göre artış var, HER2 sayısı daha az ; ≥1: HER-2 ve Alfasatellit sinyal sayılarında normal duruma göre artış var HER2/Alfasatellit oranı 1'den büyük ; ≥2: HER-2 ve Alfasatellit sinyal sayılarında normal duruma göre artış var HER2/Alfasatellit oranı 2ye eşit veya daha büyük ; %Den.: Dengeli artışlar haricindeki dengesiz durumların (kayıp ve kazanç) toplam yüzdesi olarak değerlendirildi. Ancak, KHDAK'de HER2 için belirlenmiş bir cut-off değeri yoktur ve bir cut-off değeri saptamak için verilerimiz yetersizdir. Bu nedenle; sonuçlar birkaç yüzde aralığında değerlendirildi. Bu verilerin de, prognostik verilerle veya IHC sonuçları ile anlamlı bir korelasyonu saptanamadı.

6. SONUC VE ÖNERİLER

Bu çalışmada Fluoresan in situ Hibridizasyon yöntemi ile küçük hücreli dışı akciğer kanserli hastalarda HER-2/neu amplifikasyonuna bakıldı. IHC ile FISH sonuçları karşılaştırıldı. Araştırma sonucunda; IHC sonucu negatif olan 11 olguda, +2 olan 7 olguda ve +3 olan 5 olguda ortalama HER2/*neu*/Alfasatellit oranları 2'nin altında bulundu. 1 tane +3 olan olguda (BHK), HER-2/*neu* kopya sayısı ≥ 3 bulundu. Bu KHDAK'lerinde HER2 artışının az gözleendiği ve gözlenen overekspresyonun gerçek gen amplifikasyonundan ziyade 17 nolu kromozomun polizomisi ile veya farklı mekanizmalarla olduğunu belirten araştırmalarla uyumludur. Bütün sonuçlar; FISH açısından negatif olduğu için prognostik veriler ve histopatolojik verilerle anlamlı bir ilişki kurmak mümkün olmamıştır.

Bulgularımızı daha anlamlı sonuçlara ulaştırabilmek için; örnek sayısını arttırmak, taze tümör dokusundan çalışmak, hücre kültürü çalışmaları ile primer dokudan sitogenetik analiz yapmak gibi yöntemler, önerilebilir.

KAYNAKLAR

- 1- Dworakowska D, Jassem E, Jassem J, Peters B, Dziadziuszko R, et al. *MDM2* gene amplification: a new independent factor of adverse prognosis in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2004;43:285 -295
- 2- Shin MS, Jackson LK, Shelton RW, Jr., Greene RE. Giant cell carcinoma of the lung. *Clin Chest* 1986;89:366-9
- 3- Marchesani W. Ueber den primaeren bronchiekrebs. *Frankfurter Pathol* 1924;30:158 (
- 4- American Thoracic Society/European Respiratory Society. Pretreatment evaluation of non-small cell lung cancer. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;156:320- 32.
- 5- Mountain CF. The international system for staging lung cancer. *Semin Surg Oncol* 2000;18:106 -15.
- 6- Kern J. A., Slebos R. J., Top B., Rodenhuis S., Lager D., Robinson R. A., Weiner D., Schwartz D. A. C-erbB-2 expression and codon K-ras mutations both predict shortened survival for patients with pulmonary adenocarcinomas. *J. Clin. Investig.* 1994;93: 516-520
- 7- Ferrone M, Motl SE. Trastuzumab for the treatment of non-small-cell lung cancer. *Ann Pharmacother* 2003; 37:1904-1908
- 8- Langer CJ, Stephenson P, Thor A, et al. Trastuzumab in the treatment of advanced non-small-cell lung cancer: Is there a role? Focus on Eastern Cooperative Oncology Group Study 2598. *J Clin Oncol* 2004 22:1180-1187
- 9- Rosell R. Toward Customized Trastuzumab in HER-2/*neu*-Overexpressing Non-Small-Cell Lung Cancers. *Journal of clinical oncology* 2004;22:1172-117
- 10- Nomura K, Yoshino T, Nakamura S, et al. Detection of t(11;18)(q21;q21) in marginal zone lymphoma of mucosa-associated lymphocytic tissue type on paraffin-embedded tissue sections by using fluorescence in situ hybridization. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 2003; 140: 49-54
- 11- Pellegrini C, Falleni M, Marchetti A, Cassani B, Miozzo M, Buttitta F, Roncalli M, Coggi G, Bosari S. HER-2/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* 2003; 9: 3645-3652

- 12- Bunn PA, Helfrich B, Soriano AF, Franklin WA, Varella- Garcia M, Hirsch FR, Baron A, Zeng C, Chan DC. Expression of HER-2/Neu in Human Lung Cancer Cell Lines by Immunohistochemistry and Fluorescens *in Situ* Hybridization and its Relationship to in Vitro Cytotoxicity by Trastuzumab and Chemotherapeutic Agents. *Clinical Cancer Research* 2001; 7: 3239-3250
- 13- Akkoçlu A, Öztürk C. Akciğer Kanseri. 1999 Toraks Kitapları. Bilimsel Tıp Yayınevi. 1999; 23-47
- 14- Beadsmoore CJ, Screaton NJ. Classification, staging and prognosis of lung cancer. *European Journal of Radiology* 2003; 45: 8-17
- 15- Buzdar AU, Freedman RS, Fossella FV. Lung Cancer. 281-296 (2002) <http://site.ebrary.com/lib/deulibrary>
- 16- Kumar V, Cotran RS., Robbins SL. Temel Patoloji.IV. basım. Nobel&Yüce, Nobel Tıp Kitabevleri,. 1995;.427-430
- 17- Kumar V, Abbas AK., Fausto N. Pathologic Basis of Disease. Seventh edition. Elsevier Saunders. 2005;760-762
- 18- <http://adam.about.com/reports/000072.htm>
- 19- <http://www.intelihealth.com/IH/ihtIH/EM/9339/24402.html>
- 20- Iyengar P, Tsao MS. Clinical relevance of molecular markers in lung cancer. *Surgical Oncology* 2002; 11: 167-179
- 21- Panani A, Roussos C. Cytogenetic and molecular aspects of lung cancer. *Cancer Letters* 2006;239:1–9
- 22- Luk C, Molecular cytogenetic analysis of non-small cell lung carcinoma by spectral karyotyping and comparative genomic hybridization. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 2001; 125: 87-99
- 23- Park S.Y., Characterization of chromosomal aberrations in lung cancer cell lines by cross- species color banding. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 2001; 124: 62-70
- 24- Höglund M, Statistical dissection of cytogenetic patterns in lung cancer reveals multiple modes of karyotypic evolution independent of histological classification. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 2004 154: 99-109
- 25- <http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman>
- 26- Iyengar P, Tsao MS. Clinical relevance of molecular markers in lung cancer. *Surgical Oncology* 2002; 11: 167-179
- 27- Yarden Y. Biology of HER2 and Its Importance in Breast Cancer. *Oncology*, 2001; 61:1-13

- 28- Hynes NE, Stern DF. The biology of *erbB-2/neu/HER-2* and its role in cancer. *BBA*, 1994; 165-184
- 29- Gilbertson RS. *ERBB2* in Pediatric Cancer: Innocent Until Proven Guilty. *The Oncologist*, 2005; 10:508-517
- 30- Andre F, Chevalier TL, Soria JC. Her2-neu: a target in lung cancer? *European Society for Medical Oncology* 2004; 15: 3-4
- 31- [http:// www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/maps](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/maps)
- 32- Doherty JK, Bond C, et al. The HER-2/neu receptor tyrosine kinase gene encodes a secreted autoinhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci*, 1999; 96: 10869-10874
- 33- Menard S, Casalini P, et al. Role of HER2/neu in tumor progression and therapy *Cell Mol Life Sci*, 2004; 61: 2965-2978
- 34- <http://www.biooncology.com/bioonc/approach/HERPathway.m>
- 35- Nahta R, Esteva FJ. Herceptin: mechanisms of action and resistance. *Cancer Letters* 2006; 232 : 123-138
- 36- Rosell R. Toward Customized Trastuzumab in HER-2/*neu*-Overexpressing Non-Small-Cell Lung Cancers. *Journal of Clinical Oncology* 2004; Vol 22, No 7 1171-1173
- 37- Bunn PA, Franklin WA, Hirsch FR. What is the role of HER-2/*neu* and trastuzumab (Herceptin) in lung cancer? *Lung Cancer* 2002; 36: 263-264
- 38- Mühlmann M . Molecular cytogenetics in metaphase and interphase cells for cancer and genetic research, diagnosis and prognosis. Application in tissue sections and cell suspensions. *Genetics and Molecular Research* 2002; 1(2): 117-127
- 39- Temizkan G, Yilmazer S ark. Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler. II. Basım. Nobel Tıp Kitabevleri. 2004; 121-137
- 40- <http://info.med.yale.edu/genetics/ward/tavi/FISH>
- 41- Gersen SL, Keagle MB. *The Principles of Clinical Cytogenetics*. 449 (1999)
- 42- Meert AP, Martin B, et al. Is there a relationship between *c-erbB-1* and *c-erbB-2* amplification and protein overexpression in NSCLC ? *Lung Cancer*. 2005; 47: 325-336
- 43- Karaüzüm S, Lülecı G et al. Cytogenetic Findings in Thirty Lung Carcinoma Patients. *Cancer Genetics Cytogenetic* .1998; 100: 114-123
- 44- Tan D et al, HER-2/*neu* Protein Expression and Gene Alteration in Stage I-III A Non-Small-Cell Lung Cancer: A Study of 140 Cases Using a Combination of High

Throughput Tissue Microarray, Immunohistochemistry, and Fluorescent In Situ Hybridization . *Diagn Mol Pat* 2003 ; 12;201-211

- 45- Nakamura et al. Correlation between encoded protein overexpression and copy number of the Her2 gen with survival in Non-Smanll Cell Lung Cancer. *Int. J. Cancer*.2003; 103:61-66
- 46- Cox G, Vyberg M, Melgaard B. Hercept Test: HER2 expression and gene amplification in non-small cell lung cancer. *Int. J. Cancer*. 2001; 92:480-483
- 47- Hicks D, Tubbs R. Assessment of the HER2 status in breast cancer by fluorescence in situ hybridization: a technical review with interpretive guidelines. *Human Pathology*. 200; 36:250-261
- 48- Horton J. Trastuzumab Use in Breast Cancer Clinical Issues. *Cancer control..* 2002;9: No 6