

T.C  
BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI



**HEPATOSELÜLER KARSİNOM OLGULARINDA  
HER2/NEU GEN AMPLİFİKASYONUNUN FLORESAN İN SİTU  
HİBRİDİZASYON YÖNTEMİ İLE BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyolog Ayşegül Bacaksız

Ankara-2006

T.C  
BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI



**HEPATOSELÜLER KARSİNOM OLGULARINDA  
HER2/NEU GEN AMPLİFİKASYONUNUN FLORESANS İN SİTU  
HİBRİDİZASYON YÖNTEMİ İLE BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bu çalışma, Başkent Üniversitesi Araştırma Fonunca KA05/203  
numaralı proje olarak desteklenmiştir

Biyolog Ayşegül Bacaksız

TEZ DANIŞMANI  
Doç.Dr. Feride İ. Şahin

Ankara-2006

## ÖNSÖZ

Hepatoselüler karsinom olgularında Her-2/neu gen amplifikasyonunun floresan in situ hibridizasyon yöntemi ile belirlenmesi konulu bu tez, Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

Eğitimimde değerli katkıları olan Anabilim Dalı Başkanımız ve tez danışmanım Doç. Dr. Feride İ. Şahin'e ve hocalarım Doç. Dr. Belgin F. Ataç, Yrd. Dr. Zerrin Yılmaz'a gönülden teşekkür ediyorum. Ayrıca, tez çalışmam sırasındaki destekleri için Dr. Özge Özalp, Uzm. Kimyager Esra Başyigit, Dr. Tuğçe Bulakbaşı, Seval Pılgır'a ve çalışmam süresince bana yardım eden isimlerini saymadığım tüm dostlarıma ve beni tez çalışmam süresince destekleyen aileme teşekkür ederim.

## 1. ÖZET

Hepatoselüler karsinom (HCC) karaciğerin sık rastlanan malign tümörüdür ve en çok Çin ve Afrika popülasyonunda gözlenir. 2000 yılı verilerine göre kanserler arasında sıklık açısından beşinci sırada yer alırken kanserden ölüm sıklıkları arasında üçüncü sırada bulunmaktadır. HCC gelişiminde birçok faktörün önemli rol oynadığı bilinmekte; siroz, alkol kullanımı, hepatit B, C virüsleri ve aflatoksin risk faktörleri arasında değerlendirilmektedir. Hepatokarsinogenez sürecinde proto-onkogenler, growth faktörler ve tümör baskılayıcı genlerin değişiklikleri rol oynamaktadır. Her-2/neu (ErbB2) 17. kromozomun uzun kolunda lokalize olmuş bir proto-onkogendir (17q11.2). Epidermal growth faktör reseptör ailesi üyesi olan Her-2/neu 185 kDa (p185) ağırlığında transmembran tirozin kinaz reseptörünü kodlar ve EGFR ile yüksek derecede homoloji gösterir. Aşırı ifadenmesi kanserlerde kötü prognostik göstergedir. Değişik epitel tümörlerinde Her-2/neu geninin amplifikasyonu ya da p185 proteininin aşırı ekspresyonu gösterilmiştir. Reseptörün aşırı ifadenmesi normal kontrol mekanizmasını bozarak agresif tümör hücrelerinin oluşumuna yol açmaktadır. Bu çalışmanın amacı; Her-2/neu onkogeninin amplifikasyonunun HCC oluşumundaki olası rolünü araştırmak ve amplifikasyon ile tümörün klinik yansıması arasındaki ilişkiyi ortaya çıkarmak olarak belirlenmiştir. Bu kapsamda patolojik olarak HCC tanısı almış 35 olgunun parafin blok doku kesitleri çalışmaya alınmış, Her-2/neu probu ile hibridizasyonu takiben yapılan FISH analizleri sonucunda 2 olguda amplifikasyon saptanırken 3 olguda 17. kromozom açısından sayıca artış saptanmıştır. Bu olguların patolojik olarak grade 2 veya 3 olduğu, tümör çapının 3 -14 cm arasında değiştiği, hastalara uygulanan tedavilerin tümör büyüklüğü ve laboratuvar değerleri ile ilişkili olduğu saptanmıştır. Çalışmanın sonuçları değerlendirildiğinde HCC patogenezinde Her-2/neu amplifikasyonunun primer mekanizma olmadığı, çok aşamalı karsinogenezdeki basamakların gelişiminde rol oynadığı düşünülmektedir.

**Anahtar kelimeler:** Hepatoselüler karsinom, Her-2/neu, floresan in situ hibridizasyon

## 2. SUMMARY

Hepatocellular carcinoma (HCC) is one of the highly malignant neoplasms with a particularly high incidence in Chinese and African populations. In 2000, HCC ranked as the fifth most frequent cancer, but the third leading cause of all cancer deaths worldwide.

Several factors are known to play a major role in the development of HCC; Cirrhosis, hepatitis B (HBV), hepatitis C (HCV), and aflatoxin (AFB) are regarded as potential risk factors for hepatocarcinogenesis. Hepatocarcinogenesis involves alterations in the concerted action of proto-oncogenes, growth factors and tumour suppressor genes. Her-2/neu is a proto-oncogene that is localized on chromosome band 17q11.2. The gene encodes transmembrane tyrosine kinase receptor protein that is a member of the epidermal growth factor receptor (EGFR) with extensive homology to the EGFR. Her-2/neu gene amplification or p185 protein overexpression has been shown in some epithelial tumors and associated with poor prognosis in cancer. It has been shown to correlate with aggressive tumour behavior, and to be overexpressed in some cancers. The aim of the current study was to investigate the frequency of Her-2/neu oncogene amplification in primary hepatocellular carcinoma and reveal its impact on clinicopathological parameters. Thirty seven paraffin block sections from patients with primary HCC were examined for their Her-2/neu status. FISH analysis was performed with the Q-biogene Her-2/neu probe. Her-2/neu amplification was detected in 2(5.40 %) of the 37 primary HCCs. Also in 3 cases (8.10%), we observed increase in number of chromosome 17. These patients had grade 2 or 3 tumors with a diameter ranging between 3-14 cm and treatment protocols were relevant to tumor size and laboratory results.

In conclusion, we found overexpression of Her-2/neu in 5.40% of HCCs. These results suggest that Her-2/neu amplification is not the primary mechanism in HCC pathogenesis, however might be one of the factors affecting multistep carcinogenesis.

**Key words:** Hepatocellular carcinoma, Her-2/neu, fluorescence in situ hybridization

# İÇİNDEKİLER

	Sayfa Numaraları
1. ÖZET	iii
2. SUMMARY	iv
3. KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ	vi
4. ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
5. TABLOLAR DİZİNİ	viii
6. GİRİŞ	1
7. GENEL BİLGİLER	3
7.1 Hepatoselüler Karsinom	3
7.2 Viral Hepatitler	5
7.3 Epidermal Büyüme Faktörü Reseptör (EGFR) Ailesi	9
7.4 Her-2/neu	13
7.5 EGFR İnhibitörleri	16
8. GEREÇ VE YÖNTEM	17
8.1. Gereçler	
8.1.1. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler	17
8.1.2. Tamponlar ve çözeltiler	17
8.1.3. FISH yıkama solusyonları	18
8.1.4. Çalışmada kullanılan cihazlar	19
8.2. Yöntemler	20
8.2.1. Deparafinizasyon ve hibridizasyon	20
8.2.2. Analiz	21
9. BULGULAR	22
10. TARTIŞMA	31
11. SONUÇ	36
12. KAYNAKLAR	37

### 3. KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ

AFP	: Alfa-fetoprotein
CCC	: Kolanjioselüler karsinom
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EGFR	: Epidermal büyüme faktörü reseptörü
EGFR-TK	: Epidermal büyüme faktörü reseptör-tirozin kinaz
EGF	: Epidermal büyüme faktörü
FISH	: Floresan <i>in situ</i> hibridizasyon
HCC	: Hepatoselüler Karsinom
HBV	: Hepatit B
HBx	: Hepatit B virüsü tarafından sentezlenen X proteini
HCV	: Hepatit C
Her-2/neu	: İnsan epidermal büyüme faktör reseptörü –2
IGF-1	: İnsülin benzeri büyüme faktörü-1
LP	: Lipid peroksidasyonu
NO	: Nitrik oksit
NRG	: Neuregulin
p185	: 185 kDa' luk transmembran tirozin kinaz reseptör proteini
RTK	: Reseptör tirozin kinaz
SH2	: Src-homology-2
TGF- $\alpha$	: Transforme edici büyüme faktörü
°C	: Santigrat derece

## 4. ŞEKİLLER VE RESİMLER

Sayfa numaraları

<b>Şekil 1:</b> HER (erbB )ailesi	11
<b>Şekil 2:</b> EGFR domainlerinin dağılımları	12
<b>Şekil 3:</b> Pek çok protoonkogen ve tümör supresör genin yerleşim gösterdiği 17 nolu insan kromozomu	13
<b>Şekil 4:</b> Tirozin kinaz inhibitörünün ve monoklonal antikorların çalışma mekanizması	16
<b>Şekil 5:</b> Çalışma kapsamına alınan olgularda hepatit markerlarının dağılımları	22
<b>Şekil 6:</b> Çalışma kapsamına alınan olgularda uygulanan tedavi yöntemlerinin dağılımları	27
<b>Resim 1:</b> Her-2/neu amplifikasyonu saptanan olgunun FISH görüntüsü	30
<b>Resim 2:</b> 17. kromozom polizomisinin floresan mikroskopta görünümü	30



## 5. TABLOLAR

	Sayfa numaraları
<b>Tablo 1</b> EGFR ailesi üyelerinin farklı kanser türlerinde farklı oranlarda ifadenmesi	15
<b>Tablo 2</b> Çalışmaya dahil edilen hastaların demografik klinik ve laboratuvar özellikleri ve tümör gradeleri	23
<b>Tablo 3</b> Uygulanan tedaviler ve Her-2/neu amplifikasyonu	26
<b>Tablo 4</b> Patolojik inceleme bulguları ve tümör grade	28

## 6. GİRİŞ VE AMAÇ

İnsan vücudu milyonlarca hücreden oluşmaktadır, büyüebilmek, ölü hücreleri yenilemek ya da yaralanma sonucu zedelenmiş hücreleri onarmak amacıyla vücudumuz sürekli yeni hücreler üretmektedir. Kansere bir hücre hastalığıdır. Karsinogenezin temelinde, hücrenin yaşaması, büyümenin kontrolü ve farklılaşma gibi biyolojik olayları etkileyen mutasyonların aşamalı olarak bir araya gelmesi yer almaktadır. Kanserin gelişim sürecinde tümör hücreleri birçok fenotipik özellikler kazanır. Bu değişimler, tümör hücrelerinin hızlı ve sınırsız çoğalmalarına neden olur (1)

Hepatoselüler karsinom (HCC) karaciğerin sık rastlanan bir primer malign tümördür ve en çok Çin ve Afrika popülasyonunda gözlenir. Toksikler, bazı ilaçlar, alkol, hepatit B (HBV), hepatit C (HCV) virüsü başta olmak üzere bazı mikroorganizmaların karaciğere olumsuz etkileri söz konusudur (2, 3, 4).

Kanser oluşumundaki genetik hasarın temel etki alanı iki normal düzenleyici gen grubudur: proto-onkogenler ve tümör baskılayıcı genler. Bu iki genin herhangi birinde ortaya çıkan mutasyon normal hücrelerin kanser hücrelerine dönüşmesine neden olur. Hepatokarsinogenezis süreci de proto-onkogenler, büyüme faktörleri ve tümör baskılayıcı genlerin değişikliklerini içermektedir (1, 5)

Epidermal büyüme faktörü reseptör (EGFR) ailesi hücre-hücre, hücre-stroma arası ilişkide sinyal iletiminde görevli olup, tirozin kinaz aktivitesine sahiptir. Tirozin kinaz aktivitesi hem normal hücre büyümesi hem de malign transformasyon ile ilişkilidir (6, 7). Her-2/neu (ErbB2) 17. kromozomun uzun kolunda lokalize olmuş bir proto-onkogendir (17q11.2). Epidermal büyüme faktörü reseptör ailesi üyesi olan Her-2/neu 185 kDa (p185) ağırlığında transmembran tirozin kinaz reseptörünü kodlar ve EGFR ile yüksek derecede homoloji gösterir. p185 hücre büyümesi ve farklılaşmasını düzenleyen sinyal iletim yolunda görevlidir, aşırı ifadenmesi kanserlerde kötü prognostik göstergedir (4, 6, 8).

Yapılan birçok araştırmada Her-2/neu'un (ErbB2) aşırı ifadenmesi meme, pankreas, kolon, mide kanseri gibi çeşitli tümörlerle büyük oranda ilişkili olup tümör gelişiminden sorumlu moleküler mekanizmalardan biri olduğu bilinmektedir (9, 10).

Bu tez çalışmasının amacı; Her-2/neu onkogeninin amplifikasyonunun HCC oluşumundaki olası rolünü araştırmak ve amplifikasyon ile tümörün klinik yansıması arasındaki ilişkiyi ortaya çıkarmak olarak belirlenmiştir.

HCC örnekleri üzerinde yapılan araştırmamız ile Her-2/neu aşırı ifadenmesinin yaş, AFP oranı, HCV, HBV taşıyıcılığı ve hücresel değişiklikler gibi ölçütlerle ilişkilendirilmesi hedeflenmiştir.

## 7. GENEL BİLGİLER

### 7.1. Hepatoselüler Karsinom (HCC)

Primer karaciğer kanseri, tüm dünyada en sık görülen tümörlerden biridir. Primer karaciğer kanserleri, Hepatositlerden kaynaklanan hepatoselüler karsinom (HCC) ve intrahepatik safra kanallarından gelişen kolanjiyelüler karsinom (CCC) olmak üzere iki şekilde tanımlanır (11).

HCC, primer karaciğer malignitelerinin % 90'ını oluşturmakta, en çok Çin ve Afrika popülasyonunda gözlenmekte ve sıklığı coğrafik olarak farklılıklar göstermekte olup, erkeklerde kadınlara oranla daha sık gözlenmektedir. Birçok epitelyal tümörde olduğu gibi yaşlılarda daha sık ortaya çıkmaktadır (2, 4, 11, 12). Görülme sıklığı giderek artmakla birlikte, her yıl dünyada yaklaşık 250.000 – 1.250.000 kişi HCC'dan ölmektedir. Tek başına Çin'de bu hastalıktan ölen yıllık hasta sayısı 100.000'dir (11). 2000 yılı verilerine göre HCC kanserler arasında sıklık açısından beşinci sırada yer alırken kanserden ölüm sıklıkları arasında üçüncü sırada yer almaktadır (2, 13).

HCC nin patogenezi tam olarak anlaşılamamıştır ancak gelişiminde alkolik siroz, Hepatit B ve C enfeksiyonları önemli rol oynamaktadır (2, 3, 14). HCC batılı toplumlarda değişik nedenlere bağlı sirozların komplikasyonu olarak ileri yaşlarda; az gelişmiş toplumlarda ise HBV ve HCV enfeksiyonu ile aflatoxin gibi karsinojenlere bağlı olarak (siroz gelişmeden de) hemen her yaşta görülmektedir. HBV ve HCV'nin karsinojenik virüsler olduğu düşünülmektedir; viral enfeksiyonun hücreleri karsinojenik etkilere açık ve duyarlı duruma getirdikleri görüşü ağırlıklıdır yani direkt olarak karaciğer hücre hasarına yol açmadığı ve immün mekanizmaların önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir. Siroz da, rejenerasyonu uyardığı için risk oluşturmaktadır (15).

Karaciğer, işlevleri bakımından oldukça geniş bir alana etki ederken hastalanması ve işlev yapamaz duruma gelmesi sonucu yapılabilecekler

sınırlıdır. Karaciğer hücreleri çok yüksek bir metabolizma hızına sahip kimyasal olarak aktif bir havuz oluştururlar. Burada çeşitli metabolik sistemler, substrat ve enerjilerini paylaşırlar. Vücudun diğer bölgelerine taşınacak birçok maddeler sentez edilir, işlenir ve diğer metabolik işlevler yürütülür. Karaciğerin görevleri, kanın filtrasyonu ve depolanması, karbohidratların, proteinlerin, yağların, hormonların ve yabancı kimyasalların metabolize edilmesi, safranın oluşumu, vitaminlerin ve demirin depolanması ve kanın pıhtılaşması şeklinde özetlenebilir (16). Toksinler, bazı ilaçlar, alkol, hepatit B (HBV) ve hepatit C (HCV) virüsü başta olmak üzere birtakım mikroorganizmalar karaciğere olumsuz etki yapar (3).

Hepatit B ve C hastalığına yakalanan kişilerin %70 den fazlası bu virüsleri uzun süre taşıyarak kronik taşıyıcı haline gelmektedir. Kronik taşıyıcıların %15-20 arasındaki bir bölümünde ise siroz adı verilen karaciğer hastalığı ortaya çıkar. Hastalığın ortaya çıkmasını takiben birkaç yıl içinde az sayıda hastada karaciğer kanseri ortaya çıkabilmektedir (17). Bu virüsler karaciğere yerleşerek doku hasarı oluştururlar. HCC'ların yaklaşık % 70' i sirotik karaciğer zemininde gelişmektedir (11, 15). Siroz, karaciğerin diffüz olarak fibrozis, nodül oluşumu ve rejenerasyon göstermesi ile karakterli geri dönüşsüz bir lezyondur. Hepatositlerin ölümüne yol açan ve uzun süren süreçler, fibrozis ve rejenerasyonla birlikte olduklarında siroz ortaya çıkar. Sirozun oluşma hızı ve seyri, etyolojiye göre değişiklik gösterir. Bu hastalarda HCC riski de artmıştır (15).

Karaciğer sirozunun kalıtsal yatkınlık dışındaki en önemli nedeni viral hepatit geçirmiş olmak ve alkolizmdir. Hepatit B ve hepatit C virüsünün ortak olan klinik özelliği uzun süreli yerleşim, kalıcılık nedeniyle kronik hepatite yol açmasıdır. HCC gelişiminin mekanizması tam olarak bilinmemekle beraber invaziv karsinoma neden olduğu düşünülmektedir (15, 18).

## 7.2. Viral Hepatitler

Viral hepatitler, dünyadaki en önemli sağlık sorunlarından birini oluştururlar. Akut ve kronik hepatitler ve bunların komplikasyonlarına ek olarak, viral hepatitler; toplum sağlığı yönü ve getirdiği ağır ekonomik maliyet boyutuyla da çözümlenmesi en güç sağlık sorunlarının içinde yer almakta ve bu durum araştırıcıların yoğun ilgisine yol açmaktadır (14). Dünyada bugün viral hepatit etkeni olarak bilinen beş virus vardır. Bunlar; hepatit A (HAV), hepatit B (HBV), hepatit C (HCV), hepatit D (HDV), hepatit E (HEV) viruslarıdır (19).

Taşıyıcılık, kronikleşme, siroz ve hepatosellüler karsinoma oluşturabilme riskleri bulunan HBV enfeksiyonunun viral hepatitler içinde ayrı bir yeri vardır. Birçok bölgede uygulanan çalışmalarda HBsAg taşıyıcılarının, HBV enfeksiyonunun serolojik kanıtı olmayanlara göre 200 kat fazla HCC riski taşıdıkları görölmüştür (15). HBV'nin a) Kılıf proteinleri ve HbsAg, b) Nükleokapsid proteinleri: HBcAg ve HBeAg, c) DNA polimeraz, d) HBx - proteini olmak üzere dört grup proteini vardır. HBV DNA'sı, konak hepatositlerin ve hepatosellüler karsinom hücrelerinin genomuna entegre olmuş şekilde saptanmaktadır, fakat herhangi bir direkt onkojenik etkisi olup olmadığı bilinmemektedir (11). HBV tarafından kodlanan 17kDa HBx proteinin de viral replikasyonda ve muhtemelen HCC gelişiminde rol oynadığı, HBV ile enfekte karaciğer hücrelerinde x-proteininin konak hücre protoonkogenlerini aktive ederek normal büyüme kontrolünü bozduğu bilinmektedir (14). HBV DNA'sı insan HCC hücrelerinin DNA'sına entegre olarak buralardaki onkogenlerle veya tümör supresör genlerle etkileşir. HBV'nün x proteini ya p53 ile reaksiyona girer, ya da tümör oluşumunda transaktivatör olarak rol oynar. Entegre olan HBV DNA'sının kanser gelişimine yol açan bazı genlerin transaktive eden peptidler salgıladığı hakkında kanıtlar vardır (11, 20). Epidemiyolojik kanıtlar kronik HBV enfeksiyonu ile HCC arasında güçlü bir bağlantı kurmasına karşın virüsün tümör oluşumundaki rolü belirsizdir (14). Hastaların az bir kısmında ise olay kronikleşerek kronik hepatit gelişir ve bu hastaların bir bölümünde de karaciğer sirozu ve HCC ortaya çıkar. Taşıyıcılık oranı da ülkeden ülkeye değişiklik

göstermektedir. Gelişmiş ülkelerde taşıyıcılık oranları %1'in çok altındadır. Afrika'da %20'yi geçebilen bu oran ülkemizde %5-10 olarak bildirilmiş (18, 21).

HCV, akut ve kronik hepatite neden olan tek sarmallı RNA virüsüdür. HCV enfeksiyonluların %60'dan fazlasının yıllar sonra kronik karaciğer hastalığı, karaciğer sirozu (KS), HCC gelişimine aday olmaları, son yıllarda ilginin HCV üzerinde odaklaşmasına yol açmıştır (3, 5). Karaciğer hastalığının semptomatik, biyokimyasal veya serolojik bulgularının 6 aydan uzun sürmesi kronik hepatit olarak kabul edilir (18). Kronik hepatit-C enfeksiyonu, karaciğer hücrelerinde inflamasyona neden olmakta ve sonuçta siroz gelişebilmektedir. Kronik hepatit-C hastası olan her beş kişiden birinde 20 yıldan sonra siroz gelişmektedir (17). Kronik Hepatit-B ye benzer şekilde karaciğer hasarı yapmaktadır ve dünyada sirozun en sık nedenidir. HBV nin çoğu özelliklerine benzer şekilde HCV de akut ve kronik hepatite, kronik taşıyıcılık durumlarına neden olur; ayrıca HCC nin de gelişmesi riskleri açısından HBV enfeksiyonundan çok daha tehlikelidir (15, 22). Yapılan çalışmalarda olguların bir kısmında HBV ve HCV birlikte bulunmaktadır. Bu iki virüsün HCC gelişiminde sinerjik etkili rol oynadığı düşünülmektedir (11, 14). Ayrıca yapılan araştırmalarda HCV kor proteininin hücresel proto-onkogenlerin transkripsiyon düzeyini, hücre proliferasyonunu ve normal hepatosit hücre büyümesini etkilediği ve HCC patogenezinde rol oynadığı bilinmektedir (5, 14, 20). Farklı HCV tipleri hastalık patogenezi ve antiviral tedaviye yanıt açısından farklılık gösterip, kimi ülke ya da coğrafi bölgelerde pek çok tipi bir arada görülürken bazı bölgelerde belirli bir tipin hakim olduğu saptanmıştır (5).

1999 ve 2002 yılları arasında Türkiye'nin güneyinde yapılan çalışmada karaciğer sirozu nedeniyle takip edilen 226 hastanın 35'inde ilk başvuru ve takipte HCC tanısı koyulmuştur. Olguların %65.7'sinde kronik HBV enfeksiyonu, %28.6'sında kronik HCV enfeksiyonu HCC için neden olarak belirlenmiştir (23).

Alkol tek başına karsinogen değildir ancak yüksek miktarda kullanımı HCC gelişiminde etkilidir. Alkolik hepatit, hemen herkes tarafından "aşırı" alkol

aldığı söylenebilecek insanların yaklaşık üçte birinde ortaya çıkmaktadır. Bunların da üçte bir kadarında siroz görülmektedir. Alkolik siroz, yıllarca aşırı miktarda alkol alan kişilerde alkolik hepatit ataklarını izleyerek yavaş yavaş ortaya çıkabilir. Yine uzun süreli alkol kullanımı da yapılan araştırmalarda HCC gelişiminde risk faktörü olarak belirlenmiştir. ABD ve batı ülkelerinin çoğunda uzun süreli, aşırı alkol kullanımı tek başına karaciğer hastalığının en önemli nedenlerindedir (15). Ayrıca alkol tüketiminin karaciğer ve karaciğer dışı dokularda oksidatif stresi indükleyerek lipid peroksidasyonuna (LP) yol açtığı bilinmektedir. Karaciğerde meydana gelen etanol metabolizmasının erken fazında oksidasyon ile açığa çıkan oksijen ve nitrik oksit (NO) radikalleri de hücre içi durumu belirgin olarak değiştirmektedir (24).

HCC genel olarak kötü prognoza sahiptir. Tümörlerin çoğu hızla kan damarını invaze ederek karaciğer içi ve karaciğer dışı metastazlara yol açar. Akciğerler, bölgesel lenf nodları, adrenal bezler, kemik iliği bu metastazların en yaygın olduğu organlardır. Yapılan araştırmalarda HCC hastalarının %64'ünde metastaz gözlenmiştir (25). Her HCC tümörünün kendine özgü özellikleri olmasına rağmen, klinik belirtileri benzerdir. Fakat tedavileri, kemoterapi ve radyoterapiye cevap yetenekleri ve ayrıca tümörün evresi, lokal yayılım, genel durum, karaciğer fonksiyonlarının durumu, etyolojik özelliklerinden dolayı farklılıklar gösterirler (11).

Tedavi, küçük ve çevreye yayılmamış tümörlerde, rezeksiyon veya transplantasyon biçimindedir. Uzak metastaz yoksa ve tümör total olarak çıkarılabilecekse çapın büyük olması cerrahi rezeksiyona engel değildir. Tümör çapı 3 cm veya altında ve sayı olarak 3 veya daha az ise transplantasyonun rezeksiyona göre daha iyi olduğu düşünülmektedir (22). Ayrıca kemoembolizasyon ile küçük çaplı tümörlerin tedavi ile tamamen yok olabileceğini gösteren kanıtlar vardır ve küçük hepatomalı hastaların yaklaşık yarısında bu yöntemle tümör çaplarının %50 den fazla küçüldüğü gösterilmiştir (11, 26).



Geçmişte karaciğer transplantasyonu, hastanın hayatını kurtarmak amacıyla son çare olarak başvurulacak bir tedavi olarak görülmekteyken, günümüzde karaciğer yetmezliğinin daha erken döneminde hayat kalitesini arttırmak amacıyla uygulanması gereken radikal bir tedavi yöntemi olarak görülmektedir. Manyetik Rezonans görüntülemenin siroz zemininde gelişen erken HCC'nin saptanmasında, özellikle küçük lezyonlarda etkin bir yöntem olduğu da bilinmektedir (22). Ayrıca HCC'nin önlenmesi ile ilgili yapılan çalışmalarda HBV enfeksiyonunun yaygınlığının aşılama yoluyla azaltılmasıyla, HCC sıklığının da azalacağı düşünülmektedir (11, 15).

### 7.3. Epidermal Büyüme Faktörü Reseptör (EGFR) Ailesi

Sinyal iletiminde meydana gelen değişimler hücrenin çoğalma ve/veya yaşama işlevlerinin kontrolünü ortadan kaldırır. Böylelikle, onkojenik sinyal iletimi tümör gelişimi ile invazyon/metastaz sürecinde etkin rol oynamaktadır (1).

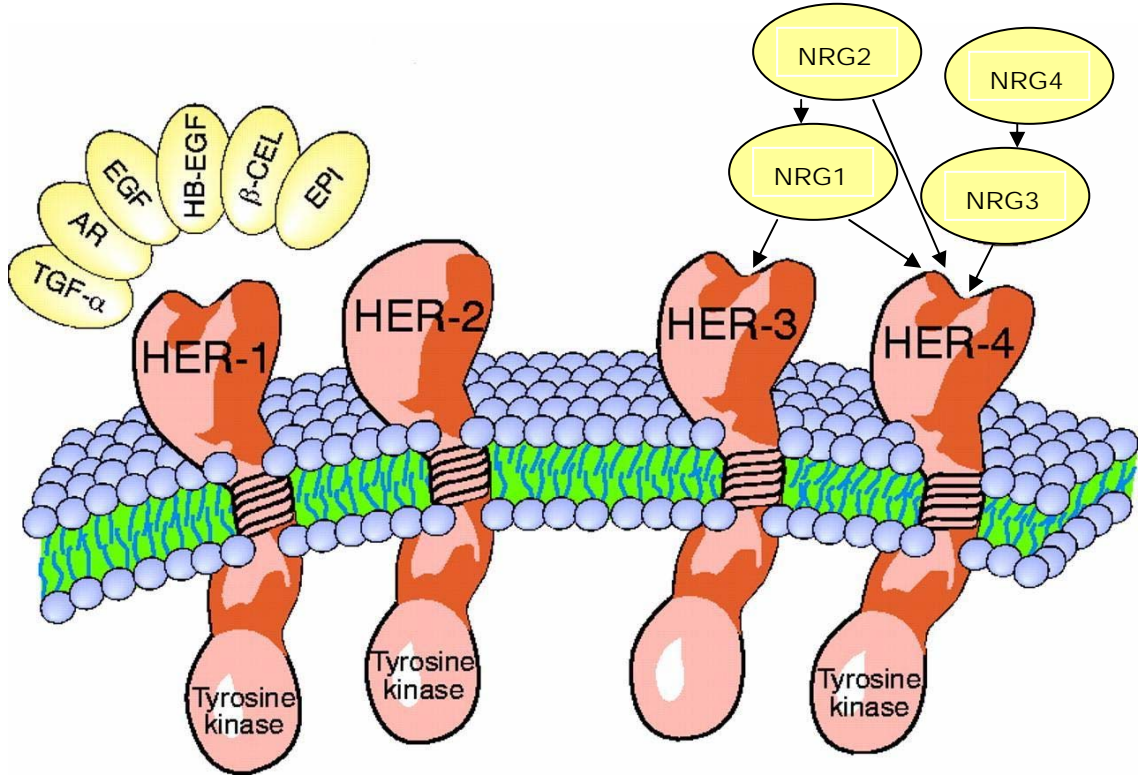
Kanser oluşumundaki genetik hasarın temel etki alanı iki normal düzenleyici gen grubudur: Proto-onkogenler ve tümör baskılayıcı genler. Onkogenler hatalı sinyal ileten proteinlerdir. Sürekli hücre bölünme sinyali vererek tümör oluşumuna yol açarlar. Onkogenler genetik olarak baskındır ve hatalı büyüme faktörleri, G proteinleri, protein kinazlar veya nükleer transkripsiyon düzenleyicilerini kodlayabilirler. Tümör baskılayıcı genler normal koşullarda hücre bölünmesini inhibe eden düzenleyici proteinleri kodlar; bu genlerdeki mutasyonlar tümör oluşumuna yol açabilir, ancak genetik olarak çekiniktirler. Bu iki genin herhangi birinde ortaya çıkan mutasyon normal hücrelerin kanser hücrelerine dönüşmesine neden olur (1). Hepatokarsinogenesis süreci de proto-onkogenler, büyüme faktörleri ve tümör baskılayıcı genlerin değişikliklerini içermektedir. Tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu ve onkogenlerin aktivasyonu tümörün gelişim süreci, histolojik evresi ve klinik evresi ile ilişkilidir (5).

Reseptörlerin veya sinyal iletili proteinlerin mutasyonları veya aşırı üretimleri hücrelerin büyüme faktörlerinden veya diğer mitotik faktörlerden bağımsız hale gelmesine neden olur ve böylece hücre proliferasyonu anormal şekilde uyarılmış olur (27). Reseptör tirozin kinaz (RTK) aktivasyonunun sonlandırılmasından ise fosfataz grubu proteinler sorumludur. Böylece, fizyolojik koşullarda sinyal iletimi tersinir özellik taşır ve RTK aracılı iletim kontrol altında tutulur. Karsinogenez sürecinde ise, sürekli ve kontrolsüz RTK aktivitesi söz konusudur (1, 27). Tümör hücrelerinde protein kinaz aktivitesinin artması onkojenik transformasyonda etkili olmaktadır yani epidermal büyüme

faktörü (EGFR, ErbB, HER) reseptör ailesinde yer alan proteinlerin sentezinin artması kanser patogenezi etkiler (7, 27)

EGFR ailesi hücre-hücre, hücre-stroma arası ilişkide sinyal iletiminde görevli olup, tirozin kinaz aktivitesine sahiptir ve hücre çoğalmasını indükleyen, hücre içi metabolik olaylar zincirinin başlatılmasında etkili sinyal iletim mekanizmasının bir parçasıdır (6, 7). Tirozin fosforilasyonu hücre çoğalmasının denetiminde gerekli moleküllerin önemli bir özelliğidir ve bazı büyüme faktörü reseptörlerinin tirozin kinaz oldukları gösterilmiştir. Epidermal büyüme faktörü reseptör-tirozin kinaz (EGFR-TK) aktivitesi hem normal hücre büyümesi hem de malign transformasyon ile ilişkili olup tümör oluşumu ve büyümesinde, hücre proliferasyonunda, apoptozin inhibisyonunda önemli rol oynar (1, 27, 28).

Epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR, ErbB-1, HER-1) ilk keşfedilen reseptör tirozin kinazdır. EGFR ailesi yapısal olarak benzer 4 reseptör tirozin kinaz proteininden oluşmaktadır: EGFR (ErbB-1), HER-2/Neu (ErbB-2), HER-3 (ErbB-3), HER-4 (ErbB-4). Bu dört molekülün hepsinin hücre içi ve dışı ve transmembran kısımları mevcuttur. EGFR'nin keşfinden sonra aynı reseptör ailesinin diğer üyeleri keşfedilmiştir. Bu reseptör ailesi hücre-hücre, hücre-stroma arası ilişkilerde sinyal iletiminde görevlidir (27, 28). EGFR ailesinin on tane ligandı vardır. Epidermal büyüme faktörü (EGF), transforme edici büyüme faktörü (TGF)- $\alpha$  gibi ligandlar bu reseptörlere bağlanarak normal ve malign epitelial hücrelerin büyümesine ve farklılaşmasına ve sağkalımına olumlu katkıda bulunurlar (27). Neuregulin1 (NRG1) ve Neuregulin 2 (NRG2) hem HER-3 hem de HER-4 e bağlanırken, neuregulin 3 (NRG3) ve neuregulin 4 (NRG4) ise HER-4 e bağlanır. HER-2/neu'nun bilinen bir ligandı yoktur ve HER-3 de tirozin kinaz aktivitesinden yoksundur (8, 27, 28).



**Şekil 1:HER (erbB)ailesi. Ross ve ark. ( 10 )'ndan alınmıştır.**

RTK aktivasyonu reseptörün kendi kendini fosforile etmesiyle başlar. İkinci aşamada bu fosforlanan bölgelere çeşitli adaptör proteinler bağlanır, adaptör proteinlerinin ortak yapısal özelliği SH2 (Src-homology-2) bölgeleri içermeleridir. Bu proteinler SH2 bölgeleri aracılığıyla reseptöre bağlanarak, RTK ile sitoplazmadaki efektör proteinler arasında köprü görevi yapar ve uyarının hücre içine iletimini sağlarlar (1, 6, 27, 28). Böylece aktifleşen tirozin kinazlar hücre dışı sinyali sitoplazmik proteinlere ve çekirdeğe aktarırlar (27, 28).

Reseptör aktivasyonu 3 önemli faktöre ihtiyaç duyar; ligand, reseptör ve dimerizasyon eşi. Reseptöre ligandın bağlanması ile reseptör aktivasyonu sonucunda tümör hücrelerinin proliferasyonu, angiogenez ve metastaz ile sonuçlanan sinyalizasyon yolunu tetikleyen reseptör dimerizasyonu ve otofosforilasyonu başlar. Büyüme faktörlerinin reseptör ile etkileşimi ile,

reseptörde dimerizasyon ve ardından otofosforilasyon olarak, sinyalizasyonda rol alan sitoplazmik proteinlerin aktivasyonu meydana gelir (6).

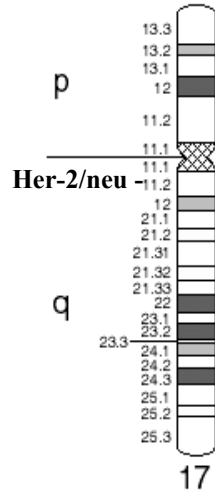
EGFR ailesi üyesine ligand bağlandıktan sonra reseptör bu ailenin üyeleri (EGFR, HER2, HER3, HER4) ile dimerize olabilir. Aynı üyelerin dimerizasyonu homodimerizasyon olarak tanımlanırken, farklı üyelerin dimerizasyonu heterodimerizasyon adını almaktadır (6, 28). L1 ve L2 bölümleri insülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1) reseptörünün ligand bağlayan bölgeleri ile benzerlik gösterir. EGFR de ligand L1 ve L2 domainleri arasında bağlanırken, HER-2 de L1 ve L2 domaini arasında güçlü bir etkileşim vardır (Şekil 2). Bu durum HER-2 ye ligand bağlanmasını engeller. Bu nedenle HER -2 normal işlevi için EGFR ailesinin başka bir üyesi ile heterodimer oluşturması gereklidir. HER-2 heterodimeri çok stabildir ve sinyalleri çok güçlüdür. CR1 ve CR2 bölgeleri küçük moleküllerden oluşur, bu moleküller bir veya iki disülfid bağı ile bir arada tutulurlar. Reseptör dimerizasyonu gerçekleştiği zaman CR1 de meydana gelen ilmek reseptörler arası ilişkiyi sağlar. Son çalışmalara göre, reseptör dimerizasyonu EGFR ailesine özgü bir özellik olarak bildirilmektedir. EGFR ailesinde reseptör dimerizasyon reseptörün özelliği olmakla birlikte ligantın reseptörde oluşturduğu konformasyon değişiklikleri de dimerizasyonda etken olabilir (27).



**Şekil 2: EGFR domainlerinin dağılımı Nair P. (27)'den alınmıştır**

#### 7.4. HER-2/neu (erbB-2) HUMAN EPİDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR-2

Her-2/neu (ErbB2) 17. kromozomun uzun kolunda lokalize olmuş bir proto-onkogendir (17q11.2). Epidermal growth faktör reseptör ailesi üyesi olan 185 kDa (p185) transmembran tirozin kinaz reseptörünü kodlar ve EGFR ile yüksek derecede homoloji gösterir. Artmış reseptör ifadenmesi, genin amplifikasyonuna ve bunu takiben, Her-2/neu mRNA ve p185 proteinin aşırı ifadenmesine yol açar. İlk kez 1987 yılında Slamon ve arkadaşları Her-2 amplifikasyonunun, meme karsinomlu olgularda kötü prognozla olan ilişkisini göstermiştir (8, 29).



**Şekil 3: Pek çok protoonkogen ve tümör supresör genin yerleşim gösterdiği 17 nolu insan kromozomu ([www.biologia.uniba.it/rmc/2-YAC-BAC/BAC-Chromosome/ideograms/17.html](http://www.biologia.uniba.it/rmc/2-YAC-BAC/BAC-Chromosome/ideograms/17.html))**

Her-2/neu diğer EGFR reseptör ailesi üyelerine göre benzersiz bir özelliğe sahiptir. Birincisi; Her-2/neu'un bilinen bir ligandı yoktur ve fonksiyonunu heterodimerize olduğu diğer reseptör eşi ile gerçekleştirmektedir. İkincisi; EGFR reseptörlerinden farklı olarak, ligandının bulunmamasına rağmen

aşırı derecede ifadelenerek hücrel transformasyona neden olabilmektedir (27). Her-2/neu'un kodladığı P185 hücre büyümesi ve farklılaşmasını düzenleyen sinyal iletim yolunda görevlidir, aşırı ifadelenmesi kanserlerde kötü prognoz ile ilişkilidir (4, 6, 8). Değişik epitel tümörlerinde Her-2/neu geninin amplifikasyonu ya da p185 proteininin aşırı ifadelenmesi gösterilmiştir. Reseptörün aşırı ifadelenmesi normal kontrol mekanizmasını bozarak agresif tümör hücrelerinin oluşumuna yol açmaktadır (4). Bu tümör hücreleri hormonal tedaviler, kemoterapi veya diğer tedavilere karşı direnç gösterirler, özgün tedavi gerektirebilirler (7, 8). Yapılan araştırmalarda meme kanseri hastalarının %25-30 un da yani her dört meme kanseri olgunun birinde Her-2/neu geninin fazla sayıda kopyasının bulunduğu gösterilmiştir (27, 28). Tsakountakis ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada Her-2/neu onkogeninin meme kanseri hastalarının %38 inde amplifikasyonu gösterilmiştir (30). Yapılan birçok araştırmada da Her-2/neu'un aşırı ifadelenmesinin meme, pankreas, kolon, mide kanseri gibi çeşitli tümörlerle ilişkili olup tümör gelişiminden sorumlu moleküler mekanizmalardan biri olduğu bildirilmektedir (9, 27, 28). Salepci ve arkadaşları yaptığı çalışmada akciğer adenokarsinom olgularının %57.1 inde Her-2/neu ifadelenmesini göstermişler ve Her-2/neu pozitifliğinin hastalarda bağımsız bir kötü prognoz göstergesi olabileceği kanısına ulaşmışlardır (31).

HCC'nin birçok organa metastaz yaptığı bilinmektedir (25). HCC'nin çeşitli organlara metastazı ve Her-2/neu'un oluşan tümör hücrelerindeki aşırı ifadelenmesi göz önüne alınarak, hepatosellüler karsinom olgusunda da Her-2/neu onkogen amplifikasyonunun gözlenip gözlenmeyeceğinin belirlenmesi ile ilgili daha önce FISH tekniği ile yapılan araştırmalarda tartışmalı sonuçlar ortaya çıkmıştır. Xian ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada Her-2/neu onkogeninin HCC de aşırı ifadelenmesi gözlenmemiş, bu genin HCC için prognostik marker gibi rol oynamadığı iddia edilmiş, diğer yandan farklı bir popülasyonda yapılan araştırma sonucunda düşük oranda da olsa Her-2/neu onkogeninin amplifikasyonu gözlenmiş, farklı ve tartışmalı sonuçları ortaya çıkarmıştır (4).

Sonuç olarak; EGFR ve Her-2/neu'un aşırı ifadenmesi çeşitli tümörlerle büyük oranda ilişkili olup, tümör gelişiminden sorumlu moleküler mekanizmalardan biri olduğu bilinmektedir (27).

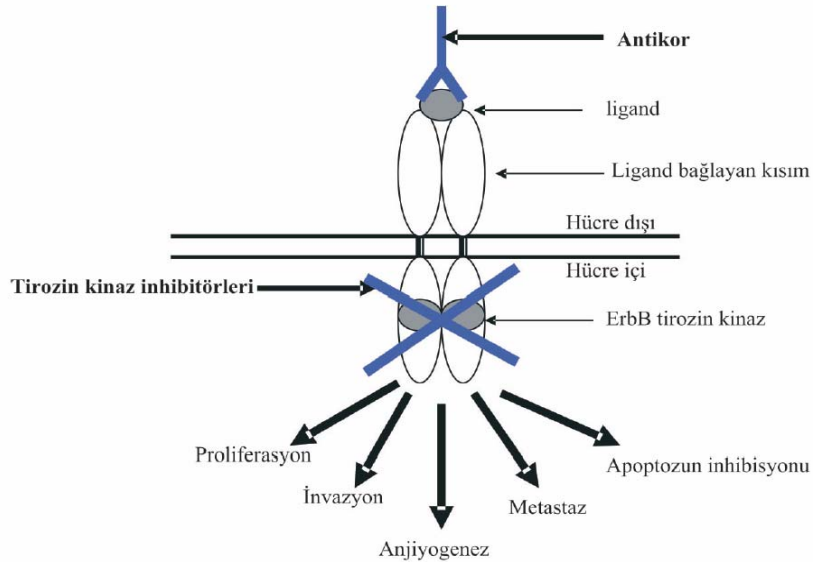
**Tablo- 1: EGFR ailesi üyelerinin farklı kanser türlerinde farklı miktarda ifadenmesi. Nair P. (27)'den alınmıştır**

	EGFR%	ErbB2%	ErbB3%	ErbB4%
Over	35-75	10-15		90
Mide	40-81	26-55	35	
Meme	14-91	25-30	22-52	
Pankreas	30-50			
Kolon	50-80	26-90	89	



## 7.5. EGFR İNHİBİTÖRLERİ

Kanser tedavisinde kemoterapi dışında yaşanan önemli gelişmeler vardır. EGFR ve Her-2/neu malign hastalıklara karşı yeni ilaçların geliştirilmesinde önemli bir stratejik hedefdir. Son yıllarda ivme kazanan hedeflenmiş tedavi yaklaşımlarında, tümör hücresi büyüme faktörleri reseptörlerini bloke eden EGFR'nin hücre dışı kısmına ligandın bağlanmasını engelleyen monoklonal antikolar (örneğin, trastuzumab) veya doğrudan tirozin kinaz aktivitesini inhibe eden ilaçlar (örneğin, Gefitinip) ile ilgili klinik çalışmalar yürütülmektedir. Trastuzumab Her-2/neu reseptörüne bağlanan monoklonal bir antikordur. Trastuzumab aşırı Her-2/neu proteini ifade eden hücre yüzeyindeki Her-2/neu protein reseptörüne bağlanır, sinyal iletimini ve tümör hücresinin büyümesini inhibe eder (9, 28, 32). İlaç, vücudun bağışıklık sistemini Her-2/neu pozitif hücrelere karşı aktive ederek ve kemoterapi ilaçlarının etkinliğini artırarak çalışır. Tirozin kinaz inhibitörleri, tirozin kinaz reseptörlerinin hücre içi katalitik kısımlarının ATP ile geri dönüşü olarak yarıştığı küçük moleküllerdir. Reseptörün hücre içi kısmındaki otofosforilasyonu inhibe ederek hücre içi iletimini etkilerler (32, 33).



**Şekil 4: Tirozin kinaz inhibitörünün ve monoklonal antikoların çalışma mekanizması Altundağ ve ark. (33)'den alınmıştır.**

## **8. GEREÇ ve YÖNTEM**

### **8.1. Gereçler**

#### **8. 1.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler**

Prob (Her2/neu Detection System) (Qbiogene), DAPI (Qbiogene), 10x Wash Buffer (Qbiogene), 10xPBD (Qbiogene), 20XSSC (Vysis), Xylene (Merck), %100 EtOH (Dop Organik), NaCl (Merck), Pepsin (Amresco), Formamide (Amresco), Distile su.

#### **8.1. 2. Çözeltiler**

**Deparafinizasyonda ve hibridizasyonda kullanılan çözeltiler:**

**4mg/ml pepsin çözeltisi :**

NaCl 0.72 gr

Pepsin 0.32 g

80 ml distile suda çözüldü ve pH HCl ile 1.3 – 1.5'e ayarlandı.

**%70 Formamide çözeltisi**

Formamide 49 ml

20 x SSC 7 ml

14 ml distile suda çözüldü.

**%70 Etil alkol çözeltisi**

70 ml %100 Etil alkol distile su ile 100 ml ye tamamlandı.

### **%85 Etil alkol çözeltisi**

85 ml %100 Etil alkol distile su ile 100 ml ye tamamlandı.

### **%100 Etil alkol**

### **20xSSC (pH=5.3) tampon çözeltisi**

20XSSC 132 gr

Distile su 400 ml

pH 5.3'e HCl ile ayarlandı ve distile su ile hacim 500 ml'ye tamamlandı.

### **2XSSC ( pH=7.0) tampon çözeltisi**

NaCl 17.5 gr

Na- citrate 8.8 gr

1 lt distile suda çözüldü ve pH HCl ile 7.0'a ayarlandı.

### **8.1. 3. FISH yıkama çözeltileri**

#### **1 x Wash Buffer**

10x Wash Buffer 5 ml

Distile su 45 ml

**1x PBD**

10x PBD                      5 ml

Distile su                      45 ml

#### **8.1. 4. Kullanılan Aletler ve Cihazlar**

Nikon eclipse E 600 floresans ataçmanlı mikroskop

CytoVision görüntü analiz sistemi

WBT Binder Etüv

Vysis HYBrite hibridizasyon cihazı

Medingen su banyosu

Costar mini santrifüj

SBS Magnetik ısıtıcı karıştırıcı

## 8. 2. YÖNTEMLER

Çalışma materyalini patolojik değerlendirme ile HCC tanısı konulan 37 olgu oluşturdu. Değerlendirmeye alınan olguların 33 (%89)'ü erkek, 4 (%11)'ü kadın olup yaşları 3 - 81 arasında değişmekteydi.

Arşiv materyali Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalından 4 µ'luk kesitler halinde hazırlanarak laboratuvarımıza ulaştırıldı. Gelen parafin blok doku kesitlerinin deparafinizasyon ve hibridizasyon işlemleri için aşağıdaki yöntemler kullanıldı (34).

### 8.2.1. Deparafinizasyon ve Hibridizasyon

Çalışmadan bir gün önce boş şale içine yerleştirdiğimiz parafinli doku kesitleri bir gece boyunca deparafinizasyon için 56°C' lik sıcak su banyosunda bekletildi. Ertesi gün kesitlerin ışık mikroskopunda kontrolünden sonra sırasıyla diğer hibridizasyon öncesi aşamalara geçildi ve her aşamadan sonra çalışma materyalleri kontrol edildi, oda sıcaklığında kurutuldu.

Deparafinizasyon için gereken tampon çözeltiler hazırlandıktan sonra deparafinizasyon işlemi için her doku kesiti 30 dk. xylene içinde bekletildi. Bu sürenin sonunda dehidratasyon işlemi için oda sıcaklığında %100' lük etanolde 15 dk. bekletildikten sonra 2 x SSC ile 75°C' de 10 dk. inkübe edildi. Bu işlemlerden sonra doku kesitleri pepsin çözeltisi ile 37°C' de 10 dk. inkübe edildikten sonra ışık mikroskopunda kontrol edildi. Parafinden uzaklaşan doku kesitlerini distile suda çalkaladıktan sonra sırası ile 2 x SSC ile oda sıcaklığında 2 dk., formamid çözeltisi ile 75°C'de 5 dk. yıkandı. Yıkanan dokular dehidratasyon işlemi için sırasıyla %70 lik etanol ile 2 – 8 °C de 2 dk., %85 lik, %100 lük etanol ile oda sıcaklığında yıkandı.

Dehidratasyon aşamasından sonra kesitlerin prob ile hibridizasyonu aşamasında Her-2/neu genini içeren ikili prob seti (Q-Biogene, Cat#: PONC1712) kullanıldı. Bu prob, 17. kromozomun uzun kolunda Her-2/neu

genini içeren q11.2-12 bölgesinin 450 kb'lık kısmını kırmızı renk, kontrol olarak kullanılan 17. kromozomun sentromerik alfa satelit bölgesini (D17Z1) ise yeşil renk ile işaretlemektedir. Prob, 75°C' de 5 dk. İnkübe edildikten sonra doku kesitlerinin üzerine büyüklüklerine göre 5 – 10 µl uygulandı, üzeri coverslip ile kapatılarak HYBrite da 76°C'de 2 dk ve 37°C'de bir gece inkübe edildi. Ertesi gün hibridizasyon aşaması tamamlanmış olan doku kesitleri 65°C' de yıkama tamponunda 5 dk., oda sıcaklığında PBD solüsyonunda 5 dk. yıkandı ve yine oda sıcaklığında kurutuldu. Son aşamada her kesit üzerine uygulanan prob miktarı kadar DAPI uygulandı ve cam lamel ile kapatıldı. Deparafinizasyondan sonraki hibridizasyon çalışmaları karanlık ortamda gerçekleştirildi. Analiz için preparatlar saklama kabına kaldırıldı ve 2 – 8°C'de saklandı.

### **8.2.2. Analiz**

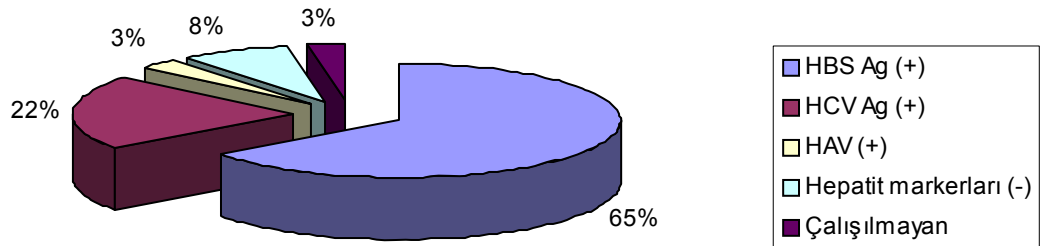
Floresan ataçmanlı mikroskopta (Nikon E 600) uygun filtreler kullanılarak x1000 büyütmede her hasta için en az 200 hücre sayımı yapıldı. İki kırmızı ve iki yeşil sinyal içeren hücreler normal olarak değerlendirildi. Her-2/neu sinyalinin (kırmızı), 17. kromozom sentromer sinyaline (yeşil) oranı incelenerek, oranın 2'nin üzerinde olduğu durumlar amplifikasyon olarak değerlendirildi. Hastalar üç grup altında sınıflandırıldı: oran < 2, grup 1 (n= 35); oran 2-5, grup 2 (n= 2); ve oran ≥ 5, grup 3 (n= 0).

Prob hibridizasyonu ve sinyal sayımının kontrolü için beş farklı doku örneğinden alınan kesitler Her-2/neu probu ile hibridize edildi ve sinyalleri sayıldı. Cut-off değeri %2.27 olarak belirlendi.

## 9. BULGULAR

Çalışma kapsamına patolojik olarak HCC tanısı almış yaşları 3-81 arasında değişen 33 erkek, 4 kadın toplam 37 olgunun parafin blok doku kesitleri alındı. Her-2/neu probu ile hibridizasyonu takiben yapılan FISH analizleri sonucunda 2 olguda amplifikasyon saptanırken 3 olguda 17. kromozom açısından sayıca artış saptandı (Resim 1, 2). Bu olguların patolojik olarak grade 2 veya 3 olduğu, tümör çapının 3 - 14 cm arasında değiştiği, hastalara uygulanan tedavilerin tümör büyüklüğü ve laboratuvar değerleri ile ilişkili olduğu saptandı. Hastaların klinik ve laboratuvar bulguları Tablo 2-4'te özetlenmiştir.

HCC tanısı koyulmuş 37 olgu klinik ve laboratuvar bulguları açısından izlenmiş olup, HCC risk faktörleri açısından değerlendirilen alkol kullanımı 6 olguda (%16.2), siroz 30 olguda (%81), HCV enfeksiyonu 8 olguda (%21.6), HBsAg pozitifliği ise 24 olguda (%64,8) gözlenmiştir (Şekil 5, Tablo 2). 37 olgunun 25'ünde (%67.5) AFP değerleri laboratuvarın normal sınırı olan 5,5 IU/ml'nin üzerinde gözlenmiştir (Tablo 2).



**Şekil 5: Çalışma kapsamına alınan olgularda hepatit markerlerinin dağılımı**

**Tablo 2: Çalışma kapsamına alınan olguların demografik klinik ve laboratuvar özellikleri**

Olgu No	Yaş	Cinsiyet	Sigara/Alkol	Siroz	Hepatit markerları	Karaciğer fonksiyon testleri AST/ALT, GGT, T.BİL, ALP *	AFP
1	57	E	Sigara(+)	(+)	Anti HBc (+)	AST/ALT,GGT, ALP, T.BİL:Yüksek,	Yüksek
2	63	K	Kullanmıyor	(+)	HCV(+)	AST/ALT, GGT: Yüksek	Yüksek
3	81	E	Sigara(+).	( + )	HCV(+)	AST/ALT, GGT, ALP :Yüksek	Yüksek
4	45	E	Kullanmıyor	( + )	HBs Ag (+)	GGT, T.BİL: Yüksek	Normal
5	76	E	Sigara (+)	( + )	HBs Ag (+ )	AST/ALT: Yüksek	Yüksek
6	70	K	Kullanmıyor	( - )	HCV(+)	AST/ALT: Yüksek	Yüksek
7	77	K	Kullanmıyor	( + )	HCV(+)	AST/ALT, GGT: Yüksek,	Yüksek
8	57	E	Sigara (+)	( + )	HBs Ag (+ )	AST, GGT, T.BİL:Yüksek	Yüksek
9	51	E	Sigara/Alkol	( - )	HBs Ag (+ )	GGT, ALP, T.BİL Yüksek	Yüksek
10	56	E	Alkol (+)	( + )	Çalışılmamış	ALP, GTT: Yüksek,	Normal
11	50	E	Kullanmıyor	( + )	HBs Ag (+)	Normal değerler	Normal
12	34	E	Sigara(+)	( + )	HBs Ag (+)	AST/ALT, GGT, ALP, T.BİL: Yüksek	Yüksek
13	20	E	Kullanmıyor	( - )	-	AST/ALT, GGT, T.BİL: Yüksek	Çalışılmamış
14	8	E	Bilgi yok	( - )	-	AST/ALT, GGT, T.BİL: Yüksek,	Yüksek
15	60	E	Alkol(+)	( + )	HBs Ag (+ )	AST/ALT, ALP, T.BİL: Yüksek,	Yüksek
16	60	E	Sigara(+).	( - )	HBs Ag (+)	AST/ALT, ALP, GGT : Yüksek	Yüksek
17	3	E	Bilgi yok	( + )	Anti HBs (+)	AST/ALT, ALP, GGT: Yüksek	Yüksek
18	50	E	Alkol(+)	( - )	HBs Ag (+)	AST, GGT, ALP, T.BİL: Yüksek	Normal
19	55	E	Sigara (+ )	( + )	HBs Ag (+)	AST, GGT, ALP, T.BİL: Yüksek,	Yüksek
20	56	E	Sigara( + )	( + )	HBs Ag (+)	Normal değerler	Yüksek

**\* Sadece yüksek olan değerler belirtilmiştir**



**Tablo 2: Çalışma kapsamına alınan olguların demografik klinik ve laboratuvar özellikleri (Tablo 2'nin devamı)**

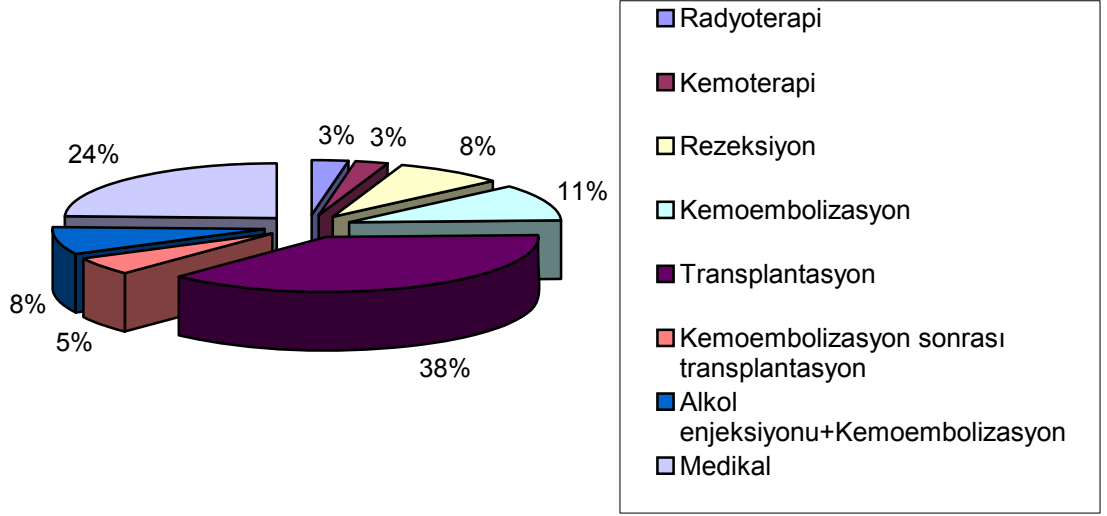
Olgu No	Yaş	Cinsiyet	Sigara/Alkol	Siroz	Hepatit markerları	Karaciğer fonksiyon testleri AST/ALT, GGT, T.BİL, ALP *	AFP
20	56	E	Sigara( + )	( + )	HBs Ag (+)	Normal değerler	Yüksek
21	50	E	Kullanmıyor	( + )	HBs Ag (+)	AST/ALT, GGT, ALP, T. BİL: Yüksek	Yüksek
22	53	E	Sigara/Alkol	( + )	HBs Ag(+)	GGT :Yüksek	Normal
23	57	E	Sigara(+)	( + )	HCV (+)	AST/ALT, GGT, ALP, T.BİL:Yüksek	Normal
24	60	E	Kullanmıyor	( + )	HCV (+)	ALP, GGT :Yüksek	Normal
25	55	E	Sigara(+)	( + )	Anti-HCV (+)	AST/ALT,GGT, T.BİL:Yüksek,	Yüksek
26	66	E	Kullanmıyor	( - )	HBs Ag (+)	AST/ALT, GGT, ALP, T.BİL :Yüksek ,	Çalışılmamış
27	50	E	Kullanmıyor	( + )	-	GGT,T.BİL:Yüksek,	Normal
28	11	E	Bilgi yok	( + )	Anti HAVIgG+	AST/ALT, GGT, T.BİL: Yüksek	Normal
29	63	K	Sigara(+)	( + )	HBs Ag (+)	AST/ALT, T.BİL: Yüksek	Yüksek
30	70	E	Kullanmıyor	( + )	HBs Ag (+)	AST/ALT, GGT, T.BİL:Yüksek,	Yüksek
31	65	E	Sigara/Alkol	( + )	HBs Ag (+)	AST/ALT, GGT, ALP :Yüksek	Yüksek
32	55	E	Kullanmıyor	( + )	HBs Ag (+)	AST/ALT, GGT, ALP:Yüksek	Normal
33	53	E	Kullanmıyor	( + )	HBs Ag (+)	AST/ALT, GGT, ALP, T.BİL:Yüksek	Yüksek
34	79	E	Kullanmıyor	( + )	HBs Ag (+)	AST/ALT, ALP: Yüksek	Yüksek
35	50	E	Kullanmıyor	( + )	HCV (+)	AST/ALT, GGT, ALP, T.BİL: Yüksek	Yüksek
36	61	E	Kullanmıyor	( + )	HBs Ag (+)	AST/ALT, GGT, ALP, T.BİL: Yüksek	Çalışılmamış
37	56	E	Kullanmıyor	( - )	HBs Ag (+)	Normal değerler	Yüksek

\* Sadece yüksek olan değerler belirtilmiştir

Hastaların 3'ünde (%8.10) tedavi yöntemi olarak rezeksiyon, 1'inde (%2.70) radyoterapi, 1'inde (%2.70) kemoterapi, 3'ünde (%8.10) alkol enjeksiyonu ve kemoembolizasyon birlikte, 4'ünde (%10.8) kemoembolizasyon tek başına uygulanmıştır. 2 olguda (%5.40) kemoembolizasyon sonrası transplantasyon, 9 olguda (24.3) medikal tedavi, 14 (%37.8) olguda allojenik karaciğer transplantasyonu tedavi yöntemi olarak seçilmiştir (Tablo 3, Şekil 6). Çalışma kapsamına alınan üç olgu tanı koyulduktan sonraki 5 ay içinde kaybedilmiştir.

**Tablo 3: Uygulanan tedaviler ve Her-2/neu amplifikasyonu**

	Rezeksiyon	Radyoterapi	Alkol Enjeksiyonu	Transplantasyon	Kemoembolizasyon	Medikal	Her-2/neu amplifikasyonu	Yaşam süresi
1					+		Normal	EX
2					+		Normal	Yaşiyor
3			+		+		Normal	Yaşiyor
4	+						Normal	Yaşiyor
5	+						Normal	Yaşiyor
6			+		+		Normal	Yaşiyor
7			+		+		Normal	Yaşiyor
8				+			<b>Polizomi</b>	Yaşiyor
9						+	Normal	Yaşiyor
10						+	Normal	Yaşiyor
11				+			Normal	Yaşiyor
12						+	<b>Amplifikasyon</b>	Yaşiyor
13					+		Normal	Yaşiyor
14							Normal	Yaşiyor
15						+	Normal	Yaşiyor
16		+					Normal	Yaşiyor
17				+			Normal	Yaşiyor
18				+			Normal	Yaşiyor
19				+			<b>Polizomi</b>	Yaşiyor
20						+	Normal	Yaşiyor
21				+			Normal	Yaşiyor
22				+			Normal	Yaşiyor
23				+			Normal	Yaşiyor
24				+			Normal	Yaşiyor
25				+			Normal	Yaşiyor
26						+	<b>Polizomi</b>	Yaşiyor
27				+			<b>Amplifikasyon</b>	Yaşiyor
28				+			Normal	Yaşiyor
29	+						Normal	Yaşiyor
30						+	Normal	EX
31				+	+		Normal	Yaşiyor
32					+		Normal	Yaşiyor
33						+	Normal	<b>Yaşiyor</b>
34						+	Normal	<b>EX</b>
35			+	+	+		Normal	Yaşiyor
36				+			Normal	Yaşiyor
37				+			Normal	Yaşiyor



**Şekil 6: Çalışma kapsamına alınan olgularda uygulanan tedavi yöntemlerinin dağılımı**

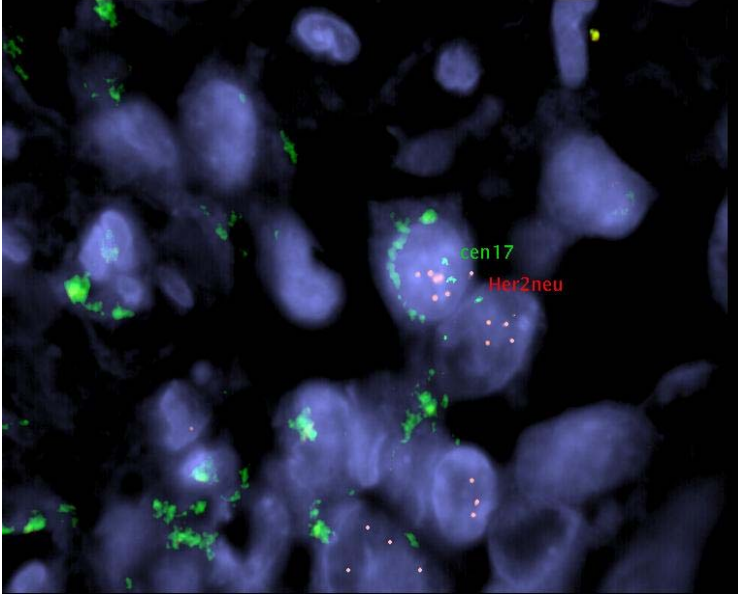
Olgulara ait patolojik inceleme bulguları ve grade' leri tablo 4' de görülmektedir. Olgularımızın tümü HCC tanısı almış, 6 olgu grade 1, 20 olgu grade 2, 10 olgu grade 3 olarak değerlendirilmiş, bir olgu ise nekrotik olarak rapor edilmişti.

**Tablo- 4: Patolojik inceleme bulguları ve tümör grade**

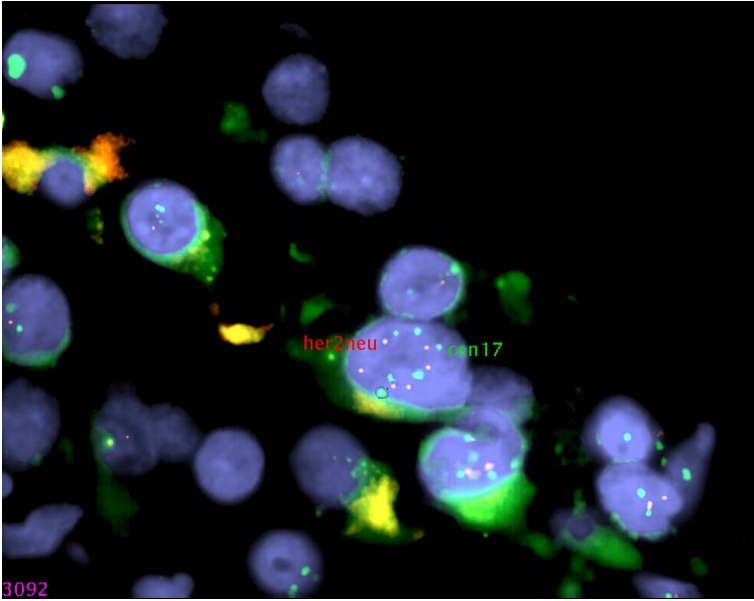
	Patolojik inceleme	Grade
1	Sağ lob 80X70X70 mm lezyon, sol lobda 12 mm lezyon, trabeküler nekroz, nükleer pleomorfizm	2
2	Sağ alt lobda 16x11 mm lezyon, nükleer pleomorfizm, nukleous, intranükleer inklüzyon ve mitotik aktivite	3
3	Sağ lobda 2X2.5 mm lezyon, HCC	3
4	Sol lobda 39x36 mm solid lezyon, displazik değerler, trabeküler yapı	3
5	2 cm, SK senozosinde 0.6 cm çapta nodül, HCC, trabeküler yapılar & kordonlar yapan karsinom yapısı	1
6	Sağ lobda 1 cm çaplı olmak üzere birkaç adet hipoeoik nodüller, kronik parankimal KC hastalığı	2
7	Sağ lob üst port segment 7 de 11 mm çaplı hiperekojen odak, sağ lobda kordonlar halinde invazyon gösteren HCC & nükleer pleomorfizm	2
8	Sol lobda yaklaşık 3 cm çaplı solid lezyon bulgular kronik hepatit B zemininde gelişen aktif siroz ve HCC	3
9	Sağ lob.da 35x33x20 mm kitle ve boyutu belirsiz artı bir kitle daha, HCC, küçük odaklar şeklinde rejenera nodüller, genişlemiş fibrotik portal alanlar	2
10	Sol medial segmentte 3x2 cm lezyon, alkolik KC hastası, nötrofil infiltrasyonu	2
11	Sol lobda HCC, 2,5X2,2 cm odak, 0.6x0.5 cm başka odak, en büyüğü 1.2 cm çapta	2
12	Sol lob lateral segmentte 8.5x 5.8 cm lezyon, kronik hepatit	3
13	Tümör büyüklüğü 14 cm, HCC fibrolamellar varyant Tm.dışı doku N. 7X7X14 cm tm.	3
14	Sağ lobda hipoejojen 13x11cm kitle, sol lobda 17x13 mm kitle, geniş hemorajik&nekrotik tm.morfolojisi nükleer pleomorfizm, mitotik aktivite	2
15	Sağ lobda 7x6cm ,sol lobda 2 adet kitle, HCC	2
16	Sol lob lateral ve medial segmentte 16.6 cm çap ve 9.5 cm lik kitle, medialde 1.5 cm nodüller trabeküler gelişim gösteren epitelik hücre	2
17	Hepatosplenomegali, siroz tanısı ile takipli, malign hepatik neoplazmi	3
18	Sol lob lateral segmentte 26x23 mm boyutta solid lezyon, kronik karaciğer parankimal hastalığı ile uyumlu kolesistekeomize,splenomegali	1
19	Konturları nodüler görünümde sirotik, çapları 2 cm ölçülen multiple lezyon, multifokal HCC, hepatektomi, aktif siroz	3
20	HCC	1

	<b>Patolojik inceleme</b>	<b>Grade</b>
21	Sağ lob 6X2.5X2.5 cm boyutlarında düzgün sınırlı lezyon, HCC, hepatokanaliküler kolestaz	nekrotik
22	Sağ lob sup.da 22 mm,19 mm,18 mm çaplı, sol lobda post.da 28 mm kitleler, multifokal HCC, hepatektomi, aktif siroz	2
23	2 cm büyüklüğünde solid lezyon, HCC, Hepatektomi, kolesistektomi siroz	1
24	Sağ lobda 3.1x2.5x2.2 cm kitle ve kitle içinde 5 adet 0,5-1,1 cm nodüler lezyon multifokal HCC,hepatektomi, aktif siroz	2
25	Sol lobda HCC ile uyumlu 11x10x7 cm solid lezyon, siroz zemininde geliştiği düşünülen HCC	2
26	Sağ lobu tamamen kaplayan 12x 12 cm çapında solid kitle, HCC	2
27	Kapsüle yakın 1,1 cm çapında tümör, HCC,Hepatektomi, kolesistektomi siroz	2
28	Orta lobda 1x1x1 cm sarı renk nodül izlenmiş, multifokal HCC, hepatektomi, aktif siroz, fibrozis mevcut değil.	2
29	Tüm karaciğeri kaplayan 2,5 cm çapında multiple hipodens nodüler metastatik lezyon izlenmiş hipervasküler lezyon, karaciğerde nodüler görünüm, kronik hepatitB	3
30	KC parankim rejenere nodüler halinde, B viral hepatit zemininde siroz	2
31	Sağ lob medialde en geniş 2 cm olan iki adet HCC odağı saptanmış, siroz	2
32	Sağ ve sol lobda boyut artışı gösteren HCC lezyonları 3,3 cm çapında lezyon portal ve periportal fibrosizler nedeniyle temel yapı bozulmuş	2
33	Sağ lobda subkapsüler yerleşimli 2,5 cm çaplı,irreguler hipoekoik alan trabeküler gelişim gösteren HCC	1
34	Sağ lob ant.da 48 mm çaplı parankim içinde multiple sayıda, irreguler solid lezyonlar, tümör adaların bir kısmında iskemik nekroz ve rejenere nodüllerde kolestaz saptanmış	2
35	Sol lobda 3 cm çaplı HCC ile uyumlu kitle, tümör komsuluğunda KC dokusunda sirotik ve displazik değerler mevcut, HCC	2
36	Sağ lobda 4 cm çaplı tümöral oluşum sentrilobüler alanda belirginleşen yaygın hepatokanaliküler kolestaz.	1
37	Sol lob lateralde 3x1,5 cm çapında ve en büyüğü1,5 cm çaplı birkaç adet solid lezyon, HCC, kolesistektomi	3

Her-2/neu probu ile hibridizasyonu takiben yapılan FISH analizleri sonucunda 2 olguda amplifikasyon saptanırken 3 olguda 17. kromozomda sayıca artış saptanmıştı.



**Resim 1: Her-2/neu amplifikasyonu saptanan olgunun FISH görüntüsü (X2000)**



**Resim 2: 17. kromozom polizomisinin floresan mikroskoptaki görüntüsü (X2000)**

## 10. TARTIŞMA

HCC, ülkemizdeki verileri net olmamakla birlikte, dünyada önemli bir sağlık sorunu olarak değerlendirilmekte, bu nedenle hem tanı hem takip ve tedavisi ile ilgili çalışmalar yapılmaktadır (11, 21). Bizim çalışmamızda, gen amplifikasyonunun HCC olgularında değerlendirilmesi amaçlandığından, incelenen Her-2/neu gen bölgesi ile ilgili amplifikasyon ya da 17. kromozomun sayıca artışının olguların laboratuvar, klinik ve tedavi durumları ile ilgili olup olmadığı değerlendirildi.

Çalışma kapsamına aldığımız olguların Tablo 2' de gözlenen ve Şekil 5' te yüzde olarak oranları verilen hepatit virüsü enfeksiyonlarının HCC'de en önemli çevresel etkenlerden olduğu bilinmektedir. Bu enfeksiyonların neden olduğu kronik hepatite bağlı gelişen sirozun HCC gelişimine zemin hazırladığı bildirilmiştir (11). Bizim olgularımızda da alınan doku örneklerinde siroz %72.9 olguda gözlemlendi. Siroz gelişiminde ayrıca kalıtsal yatkınlık ve alkolizmde rol oynadığı bilinmektedir (11, 15). Olgularımızın hepatit virüsü enfeksiyonuna ek olarak %16.2' sinde alkol kullanımı da söz konusu idi (Tablo 2). Önemli çevresel faktörlerin literatür ile uyumlu biçimde bizim olgularımızda da bulunan pozitifliği beklenen bulgular olarak değerlendirildi.

HCC tanısı ile Her-2/neu amplifikasyonu arasındaki ilişki ile ilgili tartışmalı sonuçlar bildirilmiştir. Bazı olgularda anti-c-erbB2 antikoru ile immünoaktivitenin %8-29.5 arasında değiştiği bildirilmiştir (35, 36). Nakopoulou ve arkadaşları immünohistokimyasal (IHC) olarak Her-2/neu ifadenmesini 71 HCC dokusundan 21 tanesinde (%29.6) göstermişlerdir (36). Bizim çalışmamızda uyguladığımız FISH yöntemi, immünohistokimyasal yöntemle oranla daha duyarlı olduğu bildirilmiş bir yöntemdir (9). Onkogen amplifikasyonu farklı yöntemlerle belirlenebilmekle birlikte, FISH yönteminin önceliği özellikle tümör hücrelerinde çok hassas ve spesifik olmasından kaynaklanmaktadır (37). İnterfaz FISH özellikle tümör çalışmalarında yüksek duyarlılık bir marker olarak yerini almıştır. Yöntemin bölünmekte olan hücrelere gerek duymaması nedeniyle konvensiyonel sitogenetik prosedürlere ek olarak



arşiv materyallerine de uygulanabilir olması avantaj olarak değerlendirilmektedir (38).

Huang ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada 42 HCC olgusundan 9 tanesinde (%21.4) amplifikasyon gözlenmiştir. Bu çalışmada tümör çapı ile amplifikasyon arasında korelasyon gözlenmiş olmakla birlikte hasta yaşı, cinsiyeti, AFP düzeyleri, HBV enfeksiyonu, postoperatif relaps, ve klinik evreleme ile korelasyon gözlenmemiştir. Huang ve arkadaşlarına göre, Her-2/neu amplifikasyonunun HCC oluşumu ve ilerlemesinde rol oynadığı iddia edilmiş ve Her-2/neu amplifikasyonu olan bir HCC altgrubu tanımlanmıştır. Amplifikasyonun, ameliyat sonrası kötü prognozu tahmin etmede bağımsız bir prognostik faktör olduğu bildirilmiştir (39).

Bu çalışmada, meme kanserlerinde Her-2/neu amplifikasyonu tedavi yönlendirici olduğundan, HCC olgularında kullanımının değerlendirilmesini amaçladık. Olgularımızın 2 tanesinde amplifikasyon saptarken, üç olguda 17. kromozom açısından sayıca artış saptadık. Heinze ve arkadaşlarının daha önce yaptığı çalışmada IHC ile amplifikasyon saptanmış olgularda kötü prognoz ile ilişkili olduğu bildirilmişse de bizim amplifikasyon saptadığımız iki olgumuzda tümör grade sırasıyla 3 ve 2 olarak bulunmuştur. (Tablo 1 Olgu No: 12 ve 27). Her iki olguda da yaşam süresi açısından dikkati çeken bulgu saptanmamıştır. Her-2/neu aşırı ifadenmesi Xian ve arkadaşlarının yaptığı, IHC ve FISH yöntemlerini karşılaştırdıkları çalışmada IHC ile 868 olgunun %2.42'sinde gözlenirken FISH ile sadece 1 olguda belirlenmiştir. Her-2/neu aşırı ifadenmesi veya amplifikasyonunun HCC ile ilişkili olmadığı iddia edilmiştir (4). Bizim bulgularımız bu çalışma ile benzerlik göstermektedir.

Her-2/neu amplifikasyonu saptadığımız iki olgumuzun (olgu no 12 ve 27) her ikisinde de siroz saptanmışken, 27 no'lu olguda hepatit virüs enfeksiyonu bulguları negatif bulunmuştur. Bu iki olgu açısından, çevresel faktörlerden alkol kullanımı da bulunmamaktaydı. Bu nedenle 27 no'lu olguda her-2/neu amplifikasyonu dikkati çeken bir bulgu oldu. Bu olgu için, çevresel faktörlerden

çok kalıtsal yatkınlık ve gen amplifikasyonunun HCC gelişim sürecinde tetiği çeken mekanizma olabileceğini düşündük.

Amplifikasyon saptadığımız 12 no'lu olguda tümör büyüklüğü tanıda 8.5 x 5.8 cm olduğundan medikal tedavi uygulanmış (Tablo 4), 27 no'lu olguda ise tümör büyüklüğü tanıda 1.1 cm çapında olduğundan transplantasyon tercih edilmiştir (Tablo 3, 4). Olguların her ikisi de çalışmanın yapıldığı dönemde yaşıyordu.

Bizim çalışmamızda Her-2/neu amplifikasyonu ile klinik bulgular ve takip açısından sadece iki olguda saptanan pozitif bulgu nedeniyle genelleme yapmak mümkün olmamakla birlikte, en azından 12 ve 27 no'lu olgularımız açısından prognozu olumsuz etkilemediğini düşünmekteyiz. Ancak, meme kanseri olgularında olduğu gibi Her-/neu amplifikasyonunun rutin olarak hastalara uygulanmasının yararlı olmayacağı görüşündeyiz.

Çalışma kapsamına aldığımız üç olgumuzda (olgu no 8, 19, 26) hibridizasyonu gerçekleştirdiğimiz probun sinyal oranında değişiklik olmaksızın sinyal sayısında artış saptadık. Bu bulgumuzu 17. kromozomda sayı artışı olarak değerlendirdik.

HCC de kromozomların sayısal değişiminin FISH ile analizi ile ilgili az sayıda çalışma vardır. Sayısal değişim gözlenen kromozomlardan 7, 17, 20. kromozomlarda sayı artışı veya kromozom kaybı önceki yıllarda bildirilmiştir. 17. kromozomun sayıca artışının proliferatif aktivitede artış ve malignitenin histolojik görünümü ile korelasyonu olduğu ve DNA ploidi ile birlikte bulunduğu bildirilmiştir (40).

Daha önce HCC lerde DNA içeriği için flowsitometre (FCM) ile yapılan çalışmalarda %50-62 arasındaki oranlarda anöploidi saptanmıştır. DNA ploidisinin tümör büyüklüğü ve histolojik grade ile ilişkili olduğu ve anöploidinin kötü prognoz için gösterge olduğu belirtilmiştir (41).

Kato ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada FCM ile DNA analizinde HCC olgularının %45'inde anöploidi saptanmıştır. Anöploidinin öncelikle ileri evredeki tümörlerde gözlendiğini, ancak plooidinin tümör büyüklüğü ve histolojik farklılaşma ile ilişkili olmadığını bildirmişlerdir. Çalışmanın FISH ile yapılan bölümünde ise 16, 17, 18. kromozom anöploidilerini saptamışlardır. Olguların %37'sinde kromozom 16, %75'inde kromozom 17, %60'ında kromozom 18 açısından sayısal değişimler gözlenmiştir (42).

Hamon-Benais ve arkadaşlarının çalışmasında HCC olgularında 7, 17 ve 20. kromozomların sayısal değişimi gösterilmiştir (43). 1 ve 8. kromozomun trizomisine de HCC olgularında sıklıkla rastlamak mümkündür (32). Bizim çalışmamızda da 17. kromozom açısından 3 olguda sayısal artış saptanmıştır. 17. kromozomun sayıca artmış olduğunu saptadığımız üç olguda (Tablo 1 Olgu No: 8, 19, 26) tümör grade sırasıyla 3, 3 ve 2 olarak bulunmuştur. Huang ve arkadaşlarının çalışmasında 17. kromozom polizomisi primer HCC'da Her-2/neu amplifikasyonundan daha yüksek sıklıkta bulunmuştur (39). Bizim çalışmamızda da amplifikasyonu iki olguda gözlemişken polizomiyi üç olguda gözlememiz dikkat çekicidir. Sadece 17. kromozom değil, 16. ve 18. kromozomlardaki sayısal değişimin tümör büyüklüğü ve ilerlemiş evre ile ilgili olduğu belirtilmiştir. Bu bulgular ile 17. kromozomun tamamını ve bir kısmını ya da perisentromerik kısmı da içine alan sayısal değişimlerin HCC gelişiminde erken genetik parametrelerden biri olduğu ileri sürülmektedir (42).

Her-2/neu amplifikasyonu meme kanseri olgularında trastuzumab tedavisi için hedef oluşturduğundan belirlenmesi ve hastaların tedavisinde kullanılması klinikte yarar sağlamaktadır (4). HCC'da ise tüm tedavi yöntemlerine rağmen rekürrens sıklığı fazladır. Her-2/neu amplifikasyonunun HCC olgularında amplifikasyonunun yeterli bir klinik ve prognostik takip belirteci olmadığı açıktır. Ancak multistep karsinogenezdeki basamakların gelişiminde rol oynadığı düşünülmektedir. Bu nedenle bu olguların tedavi sürecinde trastuzumab beklenen yararı sağlamayacaktır. Daha farklı genlerin

araştırılması ile HCC açısından yeni prognostik belirteçler ortaya çıkarılabilecektir.

## 11. SONUÇ

Çalışma sonuçlarını bütünüyle değerlendirdiğimizde;

1. HCC patogenezinde Her-2/neu amplifikasyonunun temel genetik mekanizma olmadığını düşündük
2. Bulgularımız, 17. kromozoma ait sayı artışının tesadüfi bir bulgu olmadığına ilişkin daha önce yapılan çalışmaları destekledi.
3. 17. kromozomun HCC'da tümörün oluşumundan çok progresyonunda rol oynadığını düşündük.
4. Her-2/neu amplifikasyonunun prognoz takibinde tanı testi olarak kullanılmasının gerekli olmadığı sonucuna vardık.

## KAYNAKLAR

1. Doğan L, G D. Sinyal iletimi mekanizmaları ve kanser. *Hacettepe Tıp Dergisi* 2004;35:34-42
2. Lau S-H, Guan X-Y. Cytogenetic and molecular genetic alterations in hepatocellular carcinoma. *Acta Pharmacologica Sinica* 2005;26:659-665
3. Michielsen P.P, Francque M.S, Lvan Dongen J. Viral hepatitis and hepatocellular carcinoma. *World Journal of Surgical Oncology* 2005;27:1-18
4. Xian Z-H ,Zhang S-H , Cong W-M , Wu W-Q ,Wu M-C . Overexpression/amplification of Her-2/neu is uncommon in hepatocellular carcinoma. *J. Clin. Pathol* 2005;58:500-503
5. Zekri A-R.N, Bahnassy A.A, Shaarawy S.M, Mansour O.A. Hepatitis C virus genotyping in relation to neu-oncoprotein overexpression and the development of hepatocellular carcinoma. *J.Med.Microbiol* 2000;49:89-95
6. Olayioye M.A. Uptade on Her-2 as a target for cancer therapy intracellular signaling pathways of ErbB2/Her-2 and family members. *Breast Cancer Res* 2001;3:385-389
7. Altimari A, Fiorentino M, Gabusi E, Gruppioni E, Corti B, D'Errico A, Grigioni W.F. Investigation of ErbB1 and ErbB2 expression for therapeutic targeting in primary liver tumours. *Digestive and Liver Disease* 2003;35:332-338

8. Chen J-S, Lan K, Hung M-C. Strategies to target Her2/neu overexpression for cancer therapy. *Drug Resistance Updates* 2003;6:129-136
9. Sauer T, Wiedswang G, Boudjema G, Christensen H, Karsen R. Assessment of Her-2/neu overexpression and/or gene amplification in breast carcinomas: should in situ hybridization be the method of choice. *APMIS* 2003;111:444-450
10. Ross S J, Fletcher A J, Linette P G, Stec J, Clark E, Ayers M, Symmans F, Puztai L, Bloom J K. The Her-2/neu gene and protein in breast cancer 2003:biomarker and target of therapy . *The Oncologist* 2003;8:307-325
11. Göksoy E, Kapan M. Karaciğerin Primer Habis Tümörleri. İ.Ü. *Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri* 2002:159-182
12. Özdemir S. Liver diseases in the elderly. *Cerrahpaşa J Med* 2001; 32 (2): 120-127
13. Melanie B. Thomas, Andrew X. Zhu. Hepatocellular Carcinoma: The Need for Progress. *Journal of Clinical Oncology* 2005;23:2892-2899
14. M. Anzola. Hepatocellular Carcinoma: Role of Hepatitis B and Hepatitis C Viruses Proteins in Hepatocarcinogenesis. *J Viral Hepat.* 2004;11:383-393
15. Çevikbaş U. Karaciğer ve safra yolları. *Temel Patoloji*. Robbins C. T. 5. Baskı, Çevikbaş U. Nobel Tıp Kitabevleri (1995), Bölüm 16; s.:523-567

16. Güzel C. Bir organ olarak karaciğer. *Tıbbi Fizyoloji*. Guyton C A, Hall E J 10. Baskı, Çavuşoğlu H. Nobel Tıp Kitabevleri (2001), Bölüm 70, s.:798-800
17. Papatheodoridis G V, Papakonstantinou E, Andrioti E, Cholongitas E, Petraki K, Kontopoulou I and Hadziyannis S J. Thrombotic risk factors and extent of liver fibrosis in chronic viral hepatitis *Gut* 2003;52;404-409
18. Dr. Nimet Şahin. Hepatit C virüsünün saptanması ve kliniği. *Official Journal Of the Turkish nephrology* 1995;3:180.183
19. Öztüfekçi G A (2005).Sağlıklı kişiler ve hemodiyaliz olgularında senv DNA prevalansı. *Uzmanlık Tezi*, Uludağ Üniv. Tıp Fakültesi
20. Adrian M. Di Bisceglie, MD. Epidemiology and Clinical Presentation of Hepatocellular Carcinoma. *J Vasc Interv Radiol.* 2002;13:169–171
21. Özdemir S, Kural Sezer E, Sonsuz A, Başaranoğlu M, Şentürk H, Özbay G, Akın P. Asymptomatic "healthy" HBsAg carrier state in Turkey. *Cerrahpaşa J Med* 1998; 29 (3): 141-144.
22. Hertl M, Cosimi B A. Liver Transplantation for Malignancy. *The Oncologist* 2005;10:269–281
23. Özer B, Serin E, Yılmaz U, Gümürdülü Y, Saygılı Ö. B, Kayaselçuk F, Boyacıoğlu S. Hepatosellüler karsinomun klinikopatolojik özellikleri ve risk faktörleri:Türkiye'nin güney bölümünde tek merkez sonuçları. *Turk J Gastroenterol* 2003; 14 (2): 85-90
24. Armutcu F, Gürel A, Söğüt S, Aksu N, Ünalacak M. Alkol Alışkanlığı Olanlarda Eritrosit Oksidan ve Antioksidan Parametre Düzeyleri. *Fırat Tıp Dergisi* 2004;9(2): 50-53



25. Filik L, Bıyıkoğlu İ, Akdoğan M, Oğuz D, Köklü S, Köksal S.A. Two cases with hepatocellular carcinoma and spleen metastasis *Turk. J. Gastroenterol* 2003;2:138-140
26. Jorge A. Marrero, MD . Hepatocellular Carcinoma. *Curr Opin Gastroenterol* 19(3):243-249, 2003
27. Nair P. Epidermal growth factor receptor family and its role in cancer Progression. *Current Science* 2005;88:890-898
28. Paul K. M, Mukhopadhyay A. K. Tyrosine kinase – Role and significance in cancer. *Int. J. Med. Sci.*2004;2:101- 115
29. Erdoğan Ş, . Ergin M, Tuncer İ. Meme karsinomunda c-erbB-2 (HER-2/neu) ekspresyonunun diğer prognostik faktörlerle karşılaştırılması. *The Turkish Journal of Pathology* 2002;18:49-52
30. Research article (2005).Tsakountakis N, Sanidas E, Stathopoulos E, KafousiM, Anogiannaki N, GeorgoulasV, Tsiftsis D. D, Correlation of breast cancer risk factors with HER-2/neu proteinoverexpression according to menopausal and estrogen receptor status
31. Salepci B, Özdemir N, Özdoğan S, Kırıl N, Salepci T, Çağalayan B. Akciğer kanseri hastalarında c-erbB-2 onkogen ekspresyonu . *Solunum* 2001; 3:121-125,
32. T. Rajkumar. Growth factors and growth factor receptors in cancer. *Current Science*, 2001; 81:, 535-541

33. Altundağ Ö, Altundağ K. Küçük hücreli dışı akciğer kanserlerinde Epidermal büyüme faktör reseptör inhibitörünün yeri. *International Journal of Hematology and Oncology* 2005;15:165-174
34. Simeone A. Detection of mRNA in tissue sections with radiolabelled riboprobes. *In Situ Hybridization*. 2nd Ed. Wilkinson D. G. Oxford University Press (1997). Chapter 3, p.:70-86
35. Ito Y, Takeda T, Sakon M. Expression and clinical significance of erb-B receptorfamily in hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer* 2001;84:1377-1378
36. Nakapoulou I, Stefanaki K, Filaktopoulos D. C-erb-B-2 oncoprotein and epidermal growth factor receptor in human hepatocellular carcinoma: an immunohistochemical study. *Histol Histopathol* 1994;9:677-682
37. Dandachi N, Dietze O, Hauser-Kronberger C. Chromogenic in situ hybridization: a novel approach to a practical and sensitive method for the detection of HER2 oncogene in archival human breast carcinoma. *Lab Invest* 82: 1007-1014, 2002.
38. Tibiletti MG. Specificity of interphase fluorescence in situ hybridization for detection of chromosome aberrations in tumor pathology. *Cancer Genet. Cytogenet* 2004;155: 143-148,
39. Huang BJ, Huang TJ, Liang QW, Huang CW, Fuang Y. Quantitative detection of Her-2 oncogene amplification in primary hepatocellular carcinoma using dual FISH technique and its clinical significance. *Acta genetica Sinica* 2001;28:793-800

40. Kimura H, Kagawa K, Deguchi T, Nakajima T, Kakasui M, Ohkawara T, Katagishi T, Okanoué T, Kashima K, Ashihara T. Cytogenetic analyses of hepatocellular carcinoma by in situ hybridization with a chromosome-specific DNA probe. *Cancer* 1995;77:271-277
41. Okada va ark..Okada S, Ishii H, Nose H, Okusaka T, Kyogoku A, Yoshimori M, Sakamoto M, Hirohashi S. Intratumoral DNA heterogeneity of small hepatocellular carcinoma. *Cancer* 1995;75:445-450
42. Kato A, Kubo K, Kurokawa F, Okita K, Oga A, Murakami T. Numerical aberrations of chromosomes 16, 17, and 18 in hepatocellular carcinoma A FISH and FCM analysis of 20 cases. *Digestive Diseases and Sciences* 1998; 43: 1-7
43. Hamon- Benais C, Ingster O, Terris B, Couturier-Turpin MH, Bernheim A, Feldmann G. Interphase cytogenetic studies of human hepatocellular carcinoma by fluorescence in situ hybridization. *Hepatology* 1996; 23: 429- 435