

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**GRANÜLOZA HÜCRELİ OVER TÜMÖRLERİNDE HER2
AMPLİFİKASYONUNUN FISH (FLORESAN İN SİTU
HİBRİDİZASYON), EKSPRESYONUNUN IHC
(İMMUNOHİSTOKİMYA) METODU İLE GÖSTERİLMESİ**

NESLİHAN UZUN

**DANIŞMAN
PROF.DR.SENİHA HACIHANEFİOĞLU**

**TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
TIBBİ BİYOLOJİ PROGRAMI**

İSTANBUL-2012

TEZ ONAYI

Aşağıda tanıtımı yapılan tez, jüri tarafından başarılı bulunarak Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

25 / 12 / 2012

Kurum : İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Program Adı : TIBBİ BİYOLOJİ
Programın seviyesi : Yüksek Lisans Doktora
Anabilim Dalı : TIBBİ BİYOLOJİ
Tez Sahibi : NESLİHAN UZUN
Tez Başlığı : Grantüloza Hücreli Over Tümörlerinde HER2 Amplikasyonunun FISH (Floresan İn Situ Hibridizasyon). Ekspresyonunun IHC (İmmunohistokimya) Metodu İle Gösterilmesi
Sınav Yeri : TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
Sınav Tarihi : 25 / 12 / 2012

Tez Sınav Jürisi

Ünvanı Adı Soyadı Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı

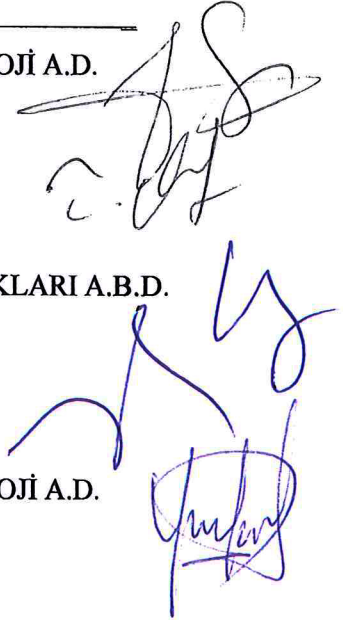
1.Prof.Dr.SENİHA HACIHANEFİOĞLU İ.Ü CTF TIBBİ BİYOLOJİ A.D.

2.Prof.Dr.TURGUT ULUTİN İ.Ü CTF TIBBİ BİYOLOJİ A.D.

3.Prof. Dr. KIVANÇ ÇEFLE İ.Ü. TIP FAKÜLTESİ İÇ HASTALIKLARI A.B.D.

4. Prof. Dr.AYHAN DEVİREN İ.Ü CTF TIBBİ BİYOLOJİ A.D.

5.Doç.Dr.YELDA TARKAN ARGÜDEN İ.Ü CTF TIBBİ BİYOLOJİ A.D.



BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Neslihan UZUN



TEŞEKKÜR

Tüm öğrencilerini bilim ışığıyla aydınlatmak için çabalayan, hoşgörü ve sabrından ödün vermeyen Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Turgut Ulutin'e,

Bu çalışmanın her aşamasına bilgi ve tecrübesiyle katkıda bulunan, yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmam boyunca benden yardımlarını esirgemeyen, her zaman anlayışlı, sevecen, güler yüzlü ve asla unutamayacağım değerli danışman hocam Prof. Dr. Seniha Hacıhanefioğlu'na,

Hayata bakışıyla beni yüreklendiren , hiçbir konuda bilgisini, tecrübesini esirgemeyen yol gösterici saygı değer hocam Prof. Dr. Ayhan Deviren'e,

Tüm özveri ve anlayışıyla tezimin yazım aşamasında büyük yol katetmeme yardım eden, beni destekleyen her konuda sıkılmadan bilgilendiren, bana yol gösterirken hoş sohbetiyle de çalışmalarımızın verimli geçmesine büyük katkılarda bulunan sevdiğim ve saygı duyduğum Doç. Dr. Yelda Tarkan Argüden'e,

Yine tez aşamam esnasında deney ve yazım süreçlerimin her ikisinde de yardımlarından dolayı tez aşamam esnasında karşılaştığım sorunlara kolaylıkla göğüs germemi sağlayan ve en değerli vakitlerini bana ayıran, sadece tez aşamamda değil hayatın her alanında fikirlerine danıştığım sevgili Dr. Ayşe Çırakoğlu'na,

Aynı şekilde hiçbir konuda yardımlarını ve ilgilerini esirgemeyen Dr. Dilhan Kuru ve Dr. Şükriye Yılmaz'a ve tüm sitogenetik ekibine,

Veri toplanmasındaki katkılarından dolayı sayın Prof. Dr. Macit Arvas'a, Dr. Onur Güralp'a ve İmmünohistokimya değerlendirmeleri ve tez aşamasındaki diğer yardımlarından dolayı Prof. Dr. Şennur İlvan'a

Tez çalışmamdaki her türlü sıkıntıya ortak olan ve beni yalnız bırakmayan değerli dostlarım Bio. Seda Öden, Bio. Başak Aslaneli Çakmak'a, Bio. Sezen Atasoy, Bio. Selin Coşkun'a, Bio. N. Oya Alansal'a ve diğer laboratuvar arkadaşlarıma,

Ve bugüne kadar benim için hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan, her zaman her koşulda bana destek olan değerli babam Ahmet Uzun, canım annem Hülya Uzun ve biricik kardeşim Yasemin Uzun'a

Teşekkür ederim....

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 13449

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN.....	İİİ
TEŞEKKÜR.....	İV
İÇİNDEKİLER	V
TABLolar LİSTESİ.....	Vİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ	Vİİİ
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	İX
ÖZET	X
ABSTRACT.....	Xİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Overin Yapısı ve Gelişimi:	3
2.2. Neoplazi:	7
2.2.1. Kanserde Derecelendirme (grade) ve Evrelendirme (stage):.....	8
2.3. Karsinogenez (kanser oluşumu):.....	9
2.3.1. Onkogenler.....	11
2.3.1.1. Gen Mutasyonu:	12
2.3.1.2. Onkogenlerin Amplifikasyonu:.....	14
2.3.2. Tümör Baskılayıcı Genler (TbG)	16
2.4. Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü Ailesi (EGFR):	18
2.4.1. HER2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor 2):.....	19
2.4.1.1. HER-2 Sinyalleşme Yolağı:	22
2.4.1.2. Tümör Oluşumunda HER2'nin Rolü:	23
2.4.1.3. HER2 ve Over kanseri:	23
2.4.2. Over Kanserinde HER2 Düzeyinin Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler: ..24	
2.4.2.1. FISH Yöntemi	24
2.4.2.2. İmmünohistokimya Yöntemi	27
2.5. Over Kanseri	31
2.5.1. Over kanserinde genetik faktörler:.....	32
2.5.2. Over tümörlerinin sınıflandırılması	33

2.5.3. Epitelyal over tümörleri:	34
2.5.4. Seks–kord stromal tümörler	34
2.6. Granüloza Hücreli Tümörler (GHT)	35
2.6.1. GHT'nin Epidemiyolojisi:	36
2.6.2. GHT'nin Klinik Özellikleri.....	37
2.6.3. GHT'nin patolojisi:	38
2.6.4. GHT'nin Prognostik faktörleri:.....	39
3. GEREÇ VE YÖNTEM	42
3.1. Gereç	42
3.1.1. Materyal	42
3.1.2. Kimyasal maddeler ve malzemeler:	44
3.1.2.1. FISH	44
3.1.2.2. IHC	44
3.1.3. Çalışmada Kullanılan Cihazlar	44
3.2. Yöntemler	45
3.2.1. FISH yöntemi	45
3.2.2. İmmünohistokimya yöntemi:	46
3.3. Değerlendirme.....	48
3.3.1. FISH:.....	48
3.3.2. IHC:.....	48
4. BULGULAR.....	49
4.1. FISH:.....	49
4.2. IHC:.....	49
5. TARTIŞMA	52
KAYNAKLAR	57
ETİK KURUL KARARI	65
ÖZGEÇMİŞ	66

TABLULAR LİSTESİ

Tablo 2-1: Over Tümörlerinin FIGO Evrelemesi	9
Tablo 2-2: Bazı onkogenler ve aktivasyon yolları	11
Tablo 2-3: Over kanserlerindeki genetik değişimler	33
Tablo 2-4: Over tümörlerinin histolojik sınıflaması	34
Tablo 3-1: Çalışmada kullanılan hastalara ait özellikler.	43
Tablo 5-1: GHT ile yapılan ekspresyon ve amplifikasyon çalışmalarının sonuçları.....	53

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Kadın üreme sisteminde fallop tüpleri, uterus, overler ve vajina .	3
Şekil 2-2: Memeli dışının reproduktif yaşam döngüsü	4
Şekil 2-3: Primordiyal folikülden olgun foliküle doğru gelişen foliküllerin şematik çizimi	6
Şekil 2-4: Hücresel Proto-onkogenden onkogene dönüşümü sağlayan aktivasyon mekanizmaları	12
Şekil 2-5: Knudson'ın iki darbe modeli	17
Şekil 2-6: <i>HER2</i> geninin lokalizasyonu	19
Şekil 2-7: Her2 sinyalleşme yolağı	23
Şekil 2-8: İn sitü hibridizasyon yönteminin şematik olarak gösterilmesi	25
Şekil 2-9: Yeşil ve kırmızı sinyallerin kromozom üzerindeki yerlerinin gösterilmesi..	27
Şekil 2-10: Üç çeşit immünohistokimyasal boyama yönteminin diyagramsal temsiller	30
Şekil 2-11: Çeşitli over neoplazilerinin kökeni sıklığı ve yaş aralığı ile ilgili veriler	32
Şekil 4-1: Olgu 17 (A) ve olgu 15'e (B) ait interfaz FISH örnekleri.....	50
Şekil 4-2: Olgu 17 (C) ,olgu 18 (D) ve kontrol meme doku kesitine (E) ait IHC örnekleri	51

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

ABC	avidin biotin complex
AJC	American Joint Committee
CEP	Chromosome enumeration probes
DAPI	4'-6-diamidino-2-phenylindole
DM	double minute chromosome
EGFR	epidermal growth factor receptor
FIGO	the international federation of gynecology and obstetrics
GHT	granüloza hücreli tümörler
HER2	human epidermal growth factor receptor 2
HSR	homogen staining region
PBS	phosphate buffer saline
PGH	primordiyal germ hücresi
RB	retinoblastoma
TBG	tümör baskılayıcı gen
WHO	world health organization
WT1	wilms' tümör

ÖZET

Uzun N. (2012). Granüloza Hücreli Over Tümörlerinde HER2 amplifikasyonunun FISH, Ekspresyonunun IHC ile Gösterilmesi İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.

Over kanseri kadın genital kanserleri içerisinde önemli bir yer tutar çünkü en çok ölüme neden olan genital kanser over kanseridir. Tüm over tümörlerinin %90'ını epitelyal over tümörleri oluşturmaktadır. Overin seks-kord stromal tümörleri, germ hücreli tümörleri ve metastatik tümörler ise hep birlikte tüm over tümörlerinin %10'unu oluştururlar. Granüloza hücreli tümörler seks kord stromal tümörler grubu içinde yer almaktadırlar.

HER2 geni; ERBB2 ve NEU olarak da adlandırılır. 17. kromozomun uzun kolunun 12-21 bölgesinde lokalize olmuş bir onkogendir. HER2'nin aşırı ekspresyonu hücre proliferasyonu, diferansiyasyonu, migrasyonu ve apoptoz ile ilişkili sinyalleşme yollarını başlatır. Aynı zamanda meme ve over kanserli hastalar için kötü prognozla ilişkilendirilir. Epitelyal kötü huylu over tümörlerinde HER2 ile ilgili çalışmalar oldukça fazladır ve bu çalışmalarda HER2 geninin aşırı ekspresyon düzeyleri oldukça değişkenlik göstermektedir. HER2 geninin amplifikasyonu birçok kanser çeşidinde gözlenmektedir. Overin seks-kord stromal tümörleri, germ hücreli tümörleri ve metastatik tümörlerinde HER2 ekspresyonu ile ilgili yapılan çalışmaların nadir ve alınan sonuçların çelişkili olmasından yola çıkarak, biz çalışmamızda arşiv dokusundan hazırlanan 20 granüloza hücreli over tümörlü parafine gömülü doku kesitinde HER2 amplifikasyonunu FISH ve ekspresyonunu IHC metodu ile araştırdık. Granüloza hücreli over tümörlü doku örneklerinin hiçbirinde HER2 gen amplifikasyonu ve ekspresyonuna rastlamadık. Bu konu ile ilgili daha fazla çalışma gerekli olmakla birlikte, sonuçlarımız meme kanserlerinin aksine granüloza hücreli over tümörlerinde HER2 ekspresyon ve amplifikasyon çalışmalarının patojenik bir öneme sahip olmadığını düşündürmektedir.

Anahtar kelimeler: HER2, Over kanseri, Amplifikasyon, Ekspresyon, FISH, IHC.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 13449

ABSTRACT

Uzun, N.(2012). Demonstration of HER2 amplification by FISH and its expression by IHC methods in granulosa cell tumors of the ovary. Istanbul University, Institute of Health Science, Department of Medical Biology, Master Thesis. Istanbul.

Ovarian cancer has an important place among female genital cancers, because it is the most lethal gynecologic malignancy. Epithelial ovarian malignancies comprise about 90% of all the ovarian tumors. Ovarian sex-cord stromal tumors, germ cell tumors and metastatic tumors together constitute 10% of all ovarian tumors. The granulosa cell tumors that we examined, are a subtype of sex-cord stromal tumors.

The HER2 gene which is located on chromosome 17q12-21 also named NEU or ERBB2. Overexpression of HER2 initiates intracellular signaling pathways involved in cell proliferation, differentiation, migration and apoptosis. At the same time its overexpression is correlated with a poor prognosis for breast and ovarian cancer patients. There are a lot of reports about HER2 expression in epithelial malignant ovarian tumors and the overexpression in these studies are quite variable. Amplification of the HER2 gene is observed in many cancer types. Considering that the studies about HER2 expression in the other malignant ovarian tumors are rare, and the results are conflicting, in this study we evaluated the HER2 gene amplification with FISH, and its over expression with IHC methods in 20 granulosa cell tumor parafin sections obtained from archival tissue. We detected neither HER2 gene amplification nor its expression in none of the granulosa cell tumors. Although further studies are required, in contrast to breast cancer our results indicate that HER2 analysis has no pathogenic significance in granulosa cell tumors of the ovary.

Key Words: HER2, Ovarian cancer, Amplification, Expression, FISH, IHC

This study was supported by The Research Fund of Istanbul University. Project No: 13449

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Over kanseri kadın genital kanserleri içerisinde önemli bir yer tutar. En çok ölüme neden olan genital kanser over kanseridir. Semptom vermemesi nedeni ile tanı konduğu sırada hastalık genellikle ileri seviyededir (50). Over kanserlerinin %90'ı epitelyal over kanseridir. Overin seks-kord stromal tümörleri, germ hücreli tümörler ve metastatik tümörlerin tamamı tüm over tümörlerinin %10'unu oluştururlar. Granüloza hücreli tümörler epitelyal olmayan over tümörlerinin bir alt kolu olan seks kord stromal tümörler grubu içinde yer almaktadırlar (23).

HER2 (Human Epidermal growth factor Receptor 2) geni, *ERBB2* (avian erythroblastosis oncogene B) ve *NEU* (neuro/glioblastoma derived oncogene homolog) olarak da adlandırılır. 17. kromozomun uzun kolunun 12-21 bölgesinde lokalize olmuş bir onkogendir ve 185 kDa'luk bir transmembran protein kodlar. Bu protein tirozin kinaz aktivitesi gösterir (34,35). *HER2* birçok tümör tipinde anormal bir şekilde eksprese/amplifiye olmaktadır. *HER2*'nin aşırı ekspresyonu hücre proliferasyonu, diferansiyasyonu, migrasyonu ve apoptoz ile ilişkili sinyalleşme yollarını başlatır (22,23,24,25). Hücre canlılığı için anahtar bir gen olan *HER2*'nin amplifikasyonu ve aşırı ekspresyonu malign transformasyona neden olur.

HER2 geninin amplifikasyonu birçok kanser çeşidinin (kolon, mesane, meme, over, endometrium, akciğer, serviks, baş ve boyun, özofagus, ve mide kanseri gibi) %20-30'unda gözlenmektedir, aşırı ekspresyonu ise meme ve over kanserli hastalar için kötü prognozla ilişkilendirilmektedir (38). Over kanserinin tespitinde, *HER2* amplifikasyon/ekspresyon durumunun belirlenmesi için çalışılan çok sayıda metot vardır. Bu metodların içerisinde immunohistokimya (IHC) ve floresan *in situ* hibridizasyon (FISH) en yaygın kullanılanlarıdır ve yüksek oranda uyumluluk gösterdikleri belirtilmiştir (24).

Epitelyal kötü huylu over tümörlerinde *HER2* ile ilgili çalışmalar oldukça fazladır ve bu çalışmalarda *HER2* geninin aşırı ekspresyon düzeyleri oldukça değişkenlik göstermektedir. Diğer kötü huylu over tümörlerinde ise *HER2* ekspresyonu çalışmaları nadirdir ve bulunan sonuçlar çelişkilidir (23).

Buradan yola çıkarak çalışmamızda granüloza hücreli over tümörlü arşiv dokusunda *HER2* amplifikasyonunu FISH, ekspresyonunu ise IHC metoduyla inceleyerek iki yöntemi karşılaştırmayı ve bu grupta *HER2* geninin klinik öneminin belirlenmesindeki çalışmalara katkıda bulunmayı amaçladık.

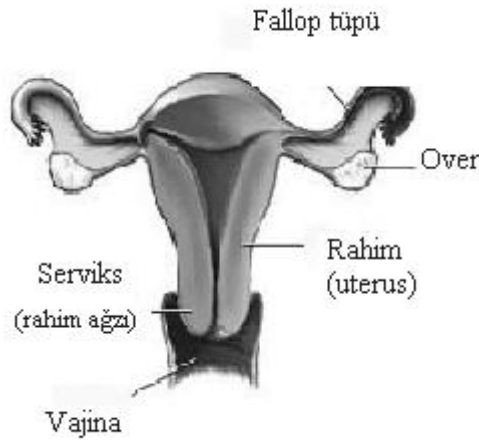
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Overin Yapısı ve Gelişimi:

Over (ovary) kelimesi latince kaynaklı bir kelime olan yumurta anlamına gelen (ovum) kelimesinden türemiştir. Memeli overi sadece gelecek nesillerin oluşumunu sağlayan germ hücrelerini içeren bir dişi gonad değildir, aynı zamanda dişi gelişimi ve fizyolojisini kontrol eden bir dişi üreme bezidir (1).

Overler uterusun her iki yanında bulunan germinal ve endokrin özellikte bir çift organdır. Badem şeklinde bir yapıya sahip olan overler, pelvis boşluğunun üst kısmında bulunur. Uterin tüplerin uçları (ovidukt, fallopyan tüpleri) overlere direkt olarak bağlı değildir. Overlerin yapısı şekil 2-1’de gösterilmiştir (1,2).

Overlerin iki farklı işlevi bulunur. Birincisi, oogenez yani gametlerin oluşumudur. İkincisi ise dişi steroid cinsiyet hormonları olan östrojen, progesteron ve bir peptid hormon olan inhibinin salgılanmasıdır (2).



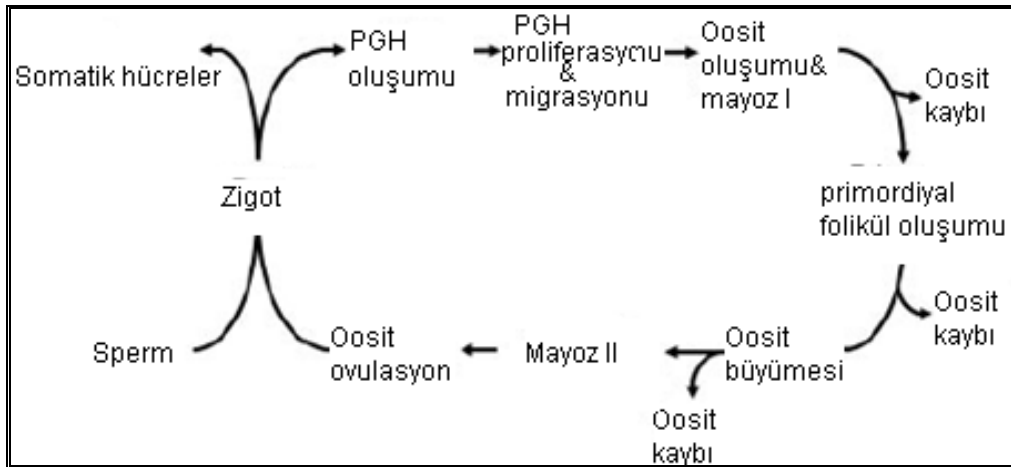
Şekil 2-1: Kadın üreme sisteminde fallop tüpleri, uterus, overler ve vajina (2).

Oosit ve spermatozoonların zigot oluşturmak için birleşmesinden sonra, embriyogenezin 8 hücreli seviyesine kadar olan tüm hücreler eşit derecede totipotentlik gösterirler çünkü morfolojik olarak tüm hücreler birbiriyle özdeştir (3).

Fakat 16 hücreli morula evresinde hücreler embriyonun iç ve dış yapısını oluşturmak üzere farklılaşırlar. Bu süreç ilerledikçe 3 farklı hücre soyu tanımlanır:

- 1- Plesantayı oluşturan ilkel trofoblastlar
- 2- Embriyoyu oluşturacak olan epiblast
- 3- Vitellüs kesesini oluşturacak olan ilkel endoderm.

İmplantasyondan ve bunu takip eden farklılaşmadan sonra epiblastda bulunan hücreler, meydana gelecek overin ilk hücreleri olan primordiyal germ hücrelerinin (PGH) öncüllerini oluşturur. PGH'ler farklılaşmamış gonada girerler ve sonuçta over, PGH'lerin mayozda tutulmuş oosite farklılaşmasını sağlar. Bu farklılaşma basamağı ve mayozla giriş ile, son oosit kök hücrelerinin bu fetal aşamada ortamdaki kaybolduğu öne sürülmektedir. Mayozda tutulan oositlerin etrafları ön-granüloza hücreleri tarafından sarılır ve tek tek primordiyal folikülleri oluştururlar. Gelecek nesilleri oluşturacak folikülleri meydana getirme potansiyeline sahip bu bekleyen oositler memelilerde puberte sonrası fertilize olmak için aday olacaktadırlar (1). Bu olayların tamamı şekil 2-2'te gösterilmiştir.



Şekil 2-2: Memeli dişinin reproduktif yaşam döngüsü (1).

Overin histolojisi:

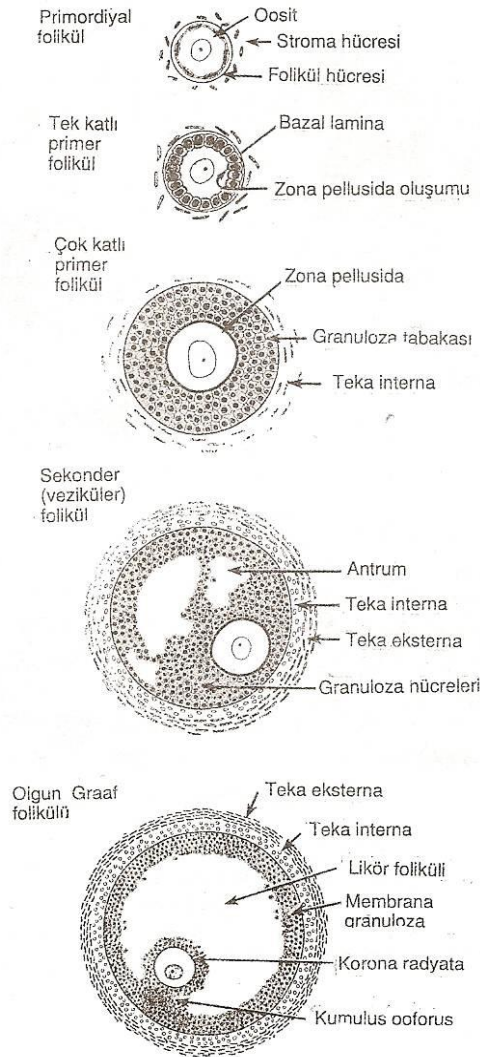
Over yüzeyi germinal epitelyum ismini alan tek katlı yassı ya da kübik epitelyum ile örtülüdür. Derininde yoğun bağ doku bulunur. Over kesitlerinde: Dışta korteks, içte medulla vardır. Overe giren-çıkan damar ve sinirler hilumdan girerler ve overin medulla dokusunda devam ederler (3).

Korteks, yoğun bağ dokusu niteliğindeki hücresel stromadır. İnce kollajen ve retiküler lif ağı ve iğ şekilli fibroblastlar ile farklı gelişim evrelerindeki follikülleri içerir. Folliküllerin yapısı ve fonksiyonu yaş ve siklusun evresine göre değişir. Puberte öncesinde sadece primordial folliküller vardır. Puberte sonrasında kortekste, gelişen folliküller, korpus luteum, korpus albicans ve atretik folliküller yer alır. Korteks menopozdan sonra ince, fibröz bağ dokusu halini alır. Medulla, gevşek fibroelastik bağ dokusudur. Bol damar ve sinirler içerir. Over follikülleri korteksin stroması içerisinde yer alır. Bir folikül, bir ya da daha fazla tabaka oluşturmuş folikül hücreleriyle (granüloza hücreleri) çevrili bir oositin meydana gelir. Foliküler gelişimin bir kaç safhası vardır (4).

Primordiyal foliküller: Primordiyal foliküllerin en çok sayıda bulunduğu dönem doğum öncesidir. Herbir primordiyal folikül tek sıra yassı folikül hücreleriyle yani granüloza hücreleriyle çevrili bir primer oositin oluşur. Granüloza hücreleri birbirine desmozomlarla bağlanırlar. Bu hücrelerin altında bir bazal lamina bulunur ve damardan yoksun folikülleri stromadan ayıran sınırı oluşturur (3).

Büyümekte olan foliküller: Foliküllerin büyümesi esas olarak folikül hücrelerinin ve bununla birlikte primer oositin ve folikülü çevreleyen stromanın büyümesi ile olur. Foliküller dinlenme evresinden çıktığında primer folikül olarak adlandırılırlar. Folikül hücreleri mitozla çoğalırlar ve çok katlı foliküler epiteli ya da granüloza tabakasını oluştururlar. Folikülün bu haline multilaminer primer folikül ismi verilir. Primer folikül evresinde primer oosit zona pellusida adı verilen glikoprotein örtüsünün sentezine başlar. Folikül hücrelerinin uzantıları ile oosit mikrovillusları zona pellusida içerisine uzanırlar ve oluklu bağlantılar (gap junction) ile birbirleriyle temas kurarlar. Takip eden evre ikincil folikül evresidir. Bu evre zona pellusidanın kalınlaştığı ve foliküler hücrelerin çoğalmaya devam ettiği bir evredir. Foliküllerin etrafını saran stroma hücreleri farklılaşma göstererek tekayı oluştururlar. Daha sonra bu tabaka da teka interna ve eksternaya farklılaşır (4).

Teka interna hücrelerinin androstenedion sentezlediği ve androstenedionun da granüloza hücreleri tarafından östrodiolü dönüştürüldüğü bilinmektedir. Teka eksterna esasen bağ dokusundan ibarettir. Folikülün büyümesi esas olarak granüloza hücrelerinin büyüklüğünün ve sayısının artmasıyla olur. Bu esnada hücreler arasında folikül sıvısı toplanmaya başlar. Sıvıyı içeren boşluklar birleşerek tek bir boşluk (antrum) oluşturur. Granüloza tabakasının hücreleri folikül duvarı üzerinde belli bir yerde daha fazla olgunlaşır. Burada hücrelerden küçük bir tepecik oluşur; oosit de içeren bu yapıya kumulus ooforus ismi verilir. Kumulus ooforus, antrumun iç kısmına doğru uzantı yapar. Bundan sonra oosit daha fazla büyümeye devam etmez.



Şekil 2-3: Primordiyal folikülden olgun foliküle doğru gelişen foliküllerin şematik çizimi (3).

Olgun foliküller: En büyük folikül olgun foliküldür ve Graaf folikülü olarak da adlandırılır. Sıvı toplanmasının bir sonucu olarak, folikül boşluğunun genişliğinde artış olur ve oosit granüloza hücreleri tarafından oluşturulan bir sap ile folikül duvarına bağlanır. Granüloza tabakası daha ince bir hale gelir. Ovum etrafındaki ilk tabakayı oluşturan granüloza hücreleri zona pellusida ile yakın temastadır. Bu hücreler uzayarak korona radyatayı oluşturur. Korona radyata ovum ovaryumu terk ederken ona eşlik eder. (Şekil 2-3) (3,4).

2.2. Neoplazi:

Neoplazi tam olarak *yeni büyüme* anlamına gelmektedir ve normal dokuları aşan, onlarla koordine olmayan ve değişime yol açan, uyarı durduktan sonra bile aynı şekilde büyümeye devam eden anormal doku kütlesi olarak tanımlanabilir. Tüm neoplazilerin kökeni normal büyüme kontrolüne cevap verme yeteneğinin kaybına dayanmaktadır. Neoplastik hücreler değişime uğrar ve normal hücrelerden bağımsız davranırlar ve bölünürler. Bununla birlikte parazit gibi davranarak normal hücre ve dokularla metabolik gereksinimlerini karşılamak için rekabete girmeleri ve otonomi göstermeleri yani lokal çevreleri ve konağın beslenme durumu nasıl olursa olsun büyümelerine devam etmeleri neoplastik hücrelerin diğer karakteristik özellikleridir (5).

Neoplaziler genelde tümör olarak adlandırılırlar. Tümörler iki gruba ayrılır: Selim (benign) ve habis (malign). Selim tümörler, sitolojik özellikleri ve yerleşimlerinin bir bölge ile sınırlı olması ve yayılım göstermemeleri nedeniyle genelde hastada tehlike oluşturmayan iyi huylu tümörlerdir. Habis tümörler ise komşu yapılara invazyon yaparak onları haraplayan ve metastaz yaparak ölüme yol açan, kötü huylu tümörlerdir (5,6).

Hangi dokudan kaynaklanırsa kaynaklansın kötü huylu tümörlerin hepsi kanser terimi altında toplanmaktadır. Epitel dokusundan (ektoderm, endoderm) kaynaklanan kanserlere karsinoma, bağ dokusundan (mesoderm) kaynaklanana da sarkoma denir (6).

2.2.1. Kanserde Derecelendirme (grade) ve Evrelendirme (stage):

Kanseri derecelendirmek (grading), onun agresifliği hakkında bilgi edinmeye ya da tümör hücrelerinin sitolojik farklılaşmasına bağlı olarak gösterdiği malignansi seviyesini ve tümördeki mitoz sayısını belirlemeye yaramaktadır. Kanseri artan anaplaziye (bazı hücre ve dokuların habis tümör özelliğinde gelişmesi) göre sırasıyla I, II, III şeklinde derecelendirilebilir (7).

Kanseri evrelendirme (staging) ise primer lezyonun boyutuna, bölgesel lenf düğümlerine dağılma alanlarına ve metastazların varlığına ya da yokluğuna göre oluşmaktadır. Bu değerlendirme genellikle klinik ve radyografik tetkike dayanmaktadır. Evrelendirmede iki ayrı sistem kullanılmaktadır, TNM sistemi (T primer tümörler için, N bölgesel lenf nodu, ve M metastazlar için) ve AJC sistemi (American Joint Committee).

TNM sisteminde T1, T2, T3 ve T4 sırasıyla primer lezyonun artan boyutunu; N0,N1,N2 ya da N3 gelişen nod durumunu; M0 ve M1 metastazın varlığını ya da yokluğunu tarif eder. AJC kriterinde ise kanser 0'dan IV'e seviyelendirilir. Over kanserlerinde farklılaşma tipine ek olarak tümörün farklılaşma derecesine göre de alt sınıflandırılmaları yapılabilir (7,8).

Over kanseri evrelemede Uluslararası Jinekoloji ve Obstetrik Federasyonu'nun (FIGO) 2009'da oluşturduğu sistem kullanılmaktadır. (Tablo 2-1) (7). FIGO tarafından önerilen derecelendirme sistemi yapısal özelliklere dayanmaktadır. Tümörde izlenen glandüler ve papiller yapıların solid tümördeki oranına göre derecelendirme yapılır.

Buna göre tümörde izlenen solid alanlar %5'den az ise grade 1, %5-50 arasında ise grade 2, %50'den fazla ise grade 3 olarak derecelendirilir (8).

Tablo 2-1: Over Tümörlerinin FIGO Evrelemesi (7).

Evre	
I	Tümör overlere sınırlıdır.
IA	Tümör bir overe sınırlı, kapsül intakt, over yüzeyinde tümör yok, asit sıvısında malign hücre yok.
IB	Tümör her iki overe sınırlı, kapsül intakt, over yüzeyinde tümör yok, asit sıvısında malign hücre yok
IC	Tümörün evresi IA ya da IB ancak bir ya da iki overin yüzeyinde tümör var ya da kapsül rüptüre ya da malign hücre içeren asit, veya peritoneal yıkamada malign hücre
II	Tümör bir ya da her iki overdedir. Pelvik yayılım mevcuttur
IIA	Uterus ve/veya tubada tümör yayılımı ve/veya tümör implantı.
IIB	Diğer pelvik dokulara yayılım.
IIC	Tümörün evresi IIA yada IIB ancak bir ya da iki overin yüzeyinde tümör var ya da kapsül rüptüre ya da malign hücre içeren asit, veya peritoneal yıkamada malign hücre
III	Bir veya her iki overde tümörle birlikte pelvis dışında mikroskopik peritoneal metastaz ve/veya bölgesel lenf nodu tutulumu. Yüzeysel karaciğer metastazları. Tümör gerçek pelvise sınırlıdır fakat histolojik olarak kanıtlanmış ince bağırsak ve omentuma malign uzantıları var.
IIIA	Tümör negatif lenf nodları ile birlikte gerçek pelvisle sınırlıdır fakat histolojik olarak kanıtlanmış mikroskopik pelvis dışı peritoneal tutulum mevcut ya da ince bağırsak veya mezenter uzantılar var.
IIIB	Bir ya da iki overde tümör var ve abdominal peritondaki implantlar

2.3. Karsinogenez (kanser oluşumu):

Hücre ölümüne neden olmayan genetik hasar ya da düzensizlik karsinogenezin meydana gelmesinde rol oynayan önemli bir etmendir. Bu tür bir genetik hasar (ya da mutasyon) kimyasallar, radyasyon ve virüsler gibi çevresel ajanların etkisi ile meydana gelebildiği gibi, germ line (eşey hücre öncülleri) yolu ile de kalıtılabilir. Kanserde gözlenen genetik değişimler; nokta mutasyonu gibi gen düzeyinde değişiklikler ve gen amplifikasyonları şeklinde olabildiği gibi kromozomal düzeyde yapısal ve sayısal anomaliler de olabilir (5).

Pek çok tümörde belirlendiği gibi kanser oluşum süreci üç aşamada tamamlanmaktadır: İnisiyasyon (başlama), promosyon (oluşum) ve progresyon (ilerleme). Başlama evresi, çeşitli mutajenik faktörlerin DNA'da oluşturduğu hasar sonucu, somatik mutasyona bağlı olarak oluşan geri dönüşümsüz bir evre olarak karakterize edilir. Promosyon evresi, papilloma gibi benign büyüme ve farklılaşma özellikleri değişmiş hücrelerin olduğu bir aşama olarak karakterize edilir. Karsinogenezin son aşaması, ilerleme ve metastazda ek genetik olaylarla genomik kararsızlık oluşur. Tümör hücrelerinin içinde daha agresif ve metastatik fenotiplerinin ortaya çıkmasıyla sonuçta invazyon ve metastaz gelişir (9,10).

Kanserin genetik hipotezi; genetik hasar meydana gelmiş tek progenitor (ata) hücrenin klonal olarak çoğalarak tümör kitlesi oluşturması ile açıklanabilir. Bu durum tümörlerin büyük çoğunluğunda gösterilmiştir.

Kanser oluşumunda genetik olarak değişime uğrayan normal regülatör (düzenleyici) genler iki sınıfa ayrılır:

- Büyüme-uyarıcı protoonkogenler
- Büyüme engelleyici tümör baskılayıcı genler

Protoonkogenlerin mutant allelleri dominant olarak kabul edilir çünkü normal karşılığının olduğu durumlarda hücrelerin dönüşümünü (transformasyon) sağlarlar. Bu olayın aksine tümör baskılayıcı genlerde dönüşümün gerçekleşmesi için her iki normal allellinde değişime uğramış olması gerekmektedir, bu yüzden tümör baskılayıcı genler resesif onkogenler olarak bilinmektedir. Karsinogenez fenotipik ve genetik seviyelerin her ikisinde de çok adımlı bir süreçtir. Bir malign neoplazi aşırı büyüme, lokal yayılım ve uzak metastaz oluşturma yetenekleri gibi bir çok fenotipik özelliğe sahiptir. Moleküler düzeydeki ilerleme ise, DNA onarımındaki bir defekt ile meydana gelen genetik lezyonların ardı ardına birikimiyle ortaya çıkar. Tümör ilerlemesinin yakıtı olan genetik değişiklikler, yalnızca büyümeyle ilgili genleri değil, angiogenezle, invazyonla ve metastazla ilgili genleri de etkiler. Bu karakteristik özellikler adım adım kazanılmaktadır ve bu olay tümör progresyonu olarak adlandırılır (5).

2.3.1. Onkogenler

Onkogenler kansere neden olan tanımlanmış ilk genlerdir (11). Kontrolsüz hücre büyümesi ve farklılaşmasına yol açan hücre proliferasyonunu aktive ederler (12). Onkogenler, hücre büyümesinin düzenlenmesi ile ilişkili protoonkogen olarak adlandırılan normal hücre genlerinin değişmiş versiyonlarıdır. Protoonkogenin onkogene dönüşümü; mutasyonlar, kromozomal yeniden düzenlenmeler ve gen amplifikasyonları gibi yapısal ya da düzenleyici değişimler ile meydana gelirler (13).

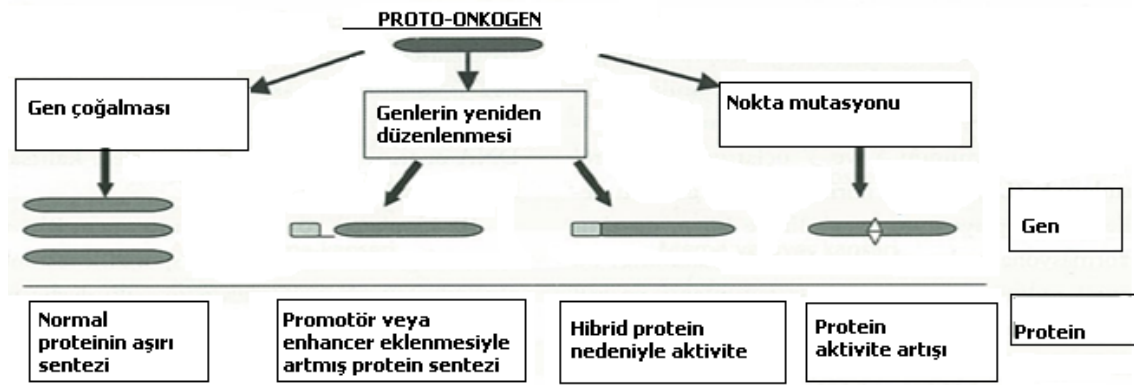
Bir konakçının genomuna mutant onkogenleri entegre eden DNA ve RNA viruslarının birçok çeşidinden onkogenler tanımlanabilir. Onkogenler genellikle dominanttır ve fonksiyon kazanım mutasyonları ile aktive olurlar. Onkogende germline (eşey hücre öncülleri) mutasyonları nadirdir, bu nedenle ağırlıklı olarak somatik bir olaydır (11, 14, 15). Bilinen bazı onkogenler ve aktivasyon yolları tablo 2-2'de gösterilmiştir.

Tablo 2-2: Bazı onkogenler ve aktivasyon yolları (10)

Onkogen	Kromozom Lokalizasyonu	Aktivasyon aracı	Protein
Büyüme faktörleri			
HST	11q13.3	konstitütif sentez	FGF ailesi
INT	11q13	konstitütif sentez	FGF ailesi
KS3	11q13.3	konstitütif sentez	FGF ailesi
V-SIS	22q12.3-13.1	konstitütif sentez	B-zincir PDGF
Tirozin kinaz büyüme faktörü			
HER1	7p1.1-1.3	gen amplifikasyonu	EGF reseptör
HER2	17q11.2-12	gen amplifikasyonu	insan EGFR 2
FMS	5q33-34	konstitütif sentez	CSF1 reseptör
G Protein ilişkili reseptör			
MAS	6q24-27	5'kodlanmayan bölgenin yeniden sentezi	anjiyotensin reseptör

Proto-onkogen fonksiyonuna bağlı olarak, onkojenik aktivasyonu farklı yollarla elde edilebilir. Örneğin farklı mekanizmalar reseptör tirozin kinazın aktif onkogenik forma dönüşmesine neden olur: gen amplifikasyonu nedeniyle aşırı ekspresyon ya da artmış gen transkripsiyonu, nokta mutasyonları içeren aktive edici mutasyonlar, delesyonlar ve insersiyonlar, aktif füzyon proteini ekspresyonu ile sonuçlanan

kromozomal yeniden düzenlenmeler (13). Onkogene dönüşüme neden olan aktivasyon mekanizmaları şekil 2-4'de gösterilmiştir.



Şekil 2-4: Hüresel Proto-onkogenen onkogene dönüşümü sağlayan aktivasyon mekanizmaları (9).

2.3.1.1. Gen Mutasyonu:

Gen mutasyonu veya nokta mutasyonu olarak tanımlanan bu mutasyon, genin yapısını oluşturan nükleotidlerin sayısının, çeşidinin, veya sırasının değişmesidir. Burada genin kromozom üzerindeki yeri değişmeden nükleotid dizisinde bir değişme söz konusudur (16).

Sık rastlanan gen mutasyonlarına ras genlerindeki mutasyonlar örnek verilebilir. Ras proteinleri, hücre yüzeyindeki büyüme faktörü reseptörlerinden sinyallerin iletilmesine yardım eden, monomerik GTPazlardır (17). Ras protein ailesine dahil olan küçük GTPaz'lar hücre biyolojisinin her alanında son derece kritik roller üstlenerek hücrelerin bölünmesini, farklılaşmasını, hücre içi protein taşınmasını ve lokalizasyonunu, hücre iskeletinin organizasyonunu, büyüme faktörü sinyal iletimini ve gen ifadesini düzenlemektedirler (18).

Büyüme sinyalleşmesini takiben Ras aktivasyonu MAPK yolağının aktivasyonu ile sonuçlanır. *Ras* onkogenleri olan *NRAS*, *HRAS* ve *KRAS* kolorektal kanserler gibi yüksek oranda solid tümörler içeren insan kanserlerinin %30'unda mutasyona uğrarlar (14). Mutasyonlar sırasıyla 12, 13, 61. kodonlarla sınırlıdır ve hepsi proteinin GTP-bağlı formunda artış ile sonuçlanır. İnsan kanserlerinde diğer birçok gen, nokta mutasyonu ile aktive olabilir. *FMS* geninin 301. ve 969. kodonlarının mutasyonu akut myeloblastik

lösemide tanımlanmıştır. Daha yakın zamanda akut lenfoblastik lösemi, akut miyeloid lösemi ve miyelodisplazi hastalarında FMS- benzeri tirozin kinaz-3'te mutasyonlara rastlanmıştır. Bu gen hematolojik hastalıklarda en sık mutasyona uğrayan genlerden biridir. Fibroblast büyüme reseptörü 3 (FGFR3) de, mesane tümörlerinin çoğunda ve çok az da olsa multipl miyelomada mutasyona uğramıştır. (13, 15).

Aşırı ekspresyon (overexpression):

Gen ekspresyonu, bir genin içerdiği bilginin fonksiyonel bir ürünün sentezinde kullanılması işlemidir. Bu ürünler genellikle proteinlerdir yalnız ribozomal RNA, taşıyıcı RNA, küçük nükleer RNA gibi protein kodlamayan genlerde bu ürün fonksiyonel RNA olmaktadır. Hayvan tümörlerinde onkogenlerin aktivasyonu, bazı hücre genlerinin aşırı ekspresyonu gözlenebilir. Bazı durumlarda alışılmamış hücre bağlamda düşük seviyeli ekspresyon da hücre fenotipini etkileyebilir.

Hücre protoonkogenlerin aşırı ekspresyonuna öncülük eden iki genetik mekanizma tanımlanmıştır; *genomik amplifikasyon* ve *translokasyon*. Her iki mekanizma ile aktive olan genlerin tanımlanması sadece genlerin neoplastik gelişimi ile ilgili değil normal fonksiyon gösterdikleri yollara ait çok fazla bilgi elde edilmesini de sağlamıştır (19).

Gen amplifikasyonu ya da transkripsiyonel deregülasyon aracılığıyla meydana gelen HER2 proteininin aşırı ekspresyonu meme ve over kanserli hastaların yaklaşık %25-30'unda görülmektedir. Meme kanserlerinde *HER2* geni 25-50 kopyaya kadar artabilirken HER2 protein ekspresyonunda da 40-100 katlık bir artış olabilir ve bu da tümör hücre yüzeyinden fazla sayıda reseptörün eksprese olması ile sonuçlanır (20).

Bu genin aşırı ekspresyonu kötü prognozla ilişkilidir. *HER2*'nin aşırı ekspresyonunun, insan meme ve over kanser hücre soylarında DNA sentezini arttırdığı, hücre büyümesini teşvik ettiği, fare xenograft modellerinde klonlama verimliliğini ve tümör üretme eğilimini arttırdığı yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır (21). Epitelyal over kanserlerinde *HER2* aşırı ekspresyonu sıklığı %20-30'dur (22). Epitelyal olmayan over tümörlerinde ise ekspresyon çalışmaları oldukça nadir ve sonuçlar çelişkilidir (23).

2.3.1.2. Onkogenlerin Amplifikasyonu:

Onkogenez süreci içinde bazen bir DNA segmenti çoğalmakta (amplifikasyon) ve o segment içinde yer alan bir proto-onkogenin bazen yüzlerce yeni kopyası genoma eklenmektedir.

Hücre içindeki gen kopyaları sayısındaki artış, ekspresyon artışına neden olan mekanizmaları açıklar. İnsan tümörleriyle yapılmış birçok sitogenetik çalışma ile ‘double minute’ kromozomlar (sentromeri olmayan küçük, ekstrakromozomal DNA parçalarıdır) ve homojen boyanan bölgeler (HSR) tanımlanmıştır. Bunlar spesifik genomik bölgelerdeki yüksek seviyeli amplifikasyonların görülebilir işaretleridir. DMleri ve HSRleri içeren tümör kaynaklı hücreler ile belli onkogenler için proplar kullanarak southern işaretleme ya da in situ hibridizasyon çalışması yapıldığında birçok amplifiye olan bölgenin onkogen dizileri içerdiği bulunmuştur. Örneğin *MYC*'in amplifikasyonu (8q24) akut lenfositik lösemi hücre soyu HL-60 ve ilişkili dizide, *MYCN*(2p24) amplifikasyonu ise nöroblastomalarda tanımlanmıştır. Üçüncü *MYC* aile üyesi *MYCL1*'in(1p34) küçük hücreli akciğer karsinomlarında amplifiye olduğu görülmüştür.

Meme ve diğer epitelyal kötü huylu tümörlerde *HER2* amplifikasyonu bulunmuştur. *HER2*'nin fare homologu olan *neu*, daha önce de NIH-3T3 deneyi ile bir onkogen olarak tanımlanmıştır. *neu* onkogeninde, proteinin transmembran bölgesindeki aktive edici bir mutasyonun, tirozin kinazın sürekli aktif formda kalmasına neden olduğu bulunmuştur.

Birçok kanser çeşidinde amplifiye olan 17q ve 20q amplifikasyon bölgeleri üzerinde daha çok çalışılmıştır. Bunlar genelde büyük ampikonlardır, iyi haritalama ve bölgeler arasında kopya sayısı ölçümleri amplifikasyonun birden fazla pik noktası olduğunu ortaya koymuştur. Bu da aynı kromozom üzerindeki birden fazla genin amplifiye olduğunu gösterir. 17q örneğinde *HER2* geni 17q12'de yer almaktadır. Bazı tümörlerde 17q23de de amplifikasyon saptanmıştır. Birçok meme tümörü 17q'daki her iki bölgeyi de kapsayan büyük bir ampikon içerir. Ekspresyon analizleri de benzer bir şekilde kompleks bir görüntü meydana getirmiştir. Sonuç olarak bu bölgelerdeki birçok gen uygun tümör örneklerinde yüksek amplifikasyon ve ekspresyon gösterir. Aynı zamanda fonksiyonel deneylerde bir onkogenden beklenen dönüştürme yeteneği gibi karakteristik özellikleri gösterirler. Bu genler HSR'ler ve DM'lerde bulunan ve

fonksiyonel olarak önemli hedef genler olan *MYC* ve *HER2*'nin tanımlanması çalışmaları sırasında ortaya çıkarılmıştır (19).

Kopya sayısı değişimlerinin genom çapında belirlenmesi ile aynı tümör dokularının ekspresyon profillerinin birlikte değerlendirilmesi, kanser hücrelerinin moleküler işaretleri hakkında kompleks ve dikkat çekici bilgiler vermiştir. Bu yaklaşım amplifikasyon hedeflerini doğrudan tanımlamayı sağlar. Yapılan çalışmalarda over kanserlerinin *HER2* amplifikasyon oranı %8'den %66'ya kadar çeşitlilik göstermektedir (24). *HER2* meme kanserli hastaların ise yaklaşık %20'sinde amplifiye olmaktadır (25). Bu onkogen diğer birçok tümör tipinde de anormal bir şekilde eksprese/amplifiye olmaktadır (23).

Translokasyonlar ve yeniden düzenlenmeler:

Tümör hücrelerine ait karyotiplerde yapılmış en dikkat çekici gözlemler; kromozomal translokasyonlardır. Sıklıkla gözlenen dengeli translokasyonlar iki kromozomun doğrudan materyal değişimi yapması ile meydana gelir.

Kromozomal translokasyonlar kronik ve akut hematopoyetik kötü huylu tümörlerde ve mezenşimal kaynaklı bazı solid tümörlerde bulunur. Bu bağlamda translokasyonların, tümör tipi ya da alt tipine özgülüğü gözlenmektedir. Bugüne kadar epitelyal kötü huylu tümörlerde yapılan kromozom çalışmalarında çok az sayıda dengeli translokasyon saptanmıştır. Kromozomal kırılma ve yeniden birleşmelerin iki çeşit sonucu vardır. Sonuçlardan bir tanesinde derivatif kromozomda kırılma noktasına yakın genin yapısında bir değişiklik meydana gelmez fakat gen daha aktif bir promotör bölgenin yakınına transloke olur ve ekspresyon seviyesi artar yani onun ekspresyon paternini değiştirir. Translokasyonun bu ilk tipi çeşitli örneklerde *MYC* genini içermektedir. Örneğin, Burkitt's lenfomada gözlenen t(8;14)(q24;q32), t(2;8)(p12;q24) ve (8;22)(q24;q11) gibi üç ana translokasyon sonucunda 8q24 bölgesinde bulunan *MYC* geni immunoglobulin promotörü yakınına yerleşerek aktive olmaktadır.

İkinci tipte ise kırılma noktalarında genlerin yapısı değişir. Bu da genellikle iki farklı genin ekzonlarının birleşmesine yol açarak yeni transkript ve füzyon proteini ürününün oluşmasına neden olur. Bu tip translokasyona örnek kronik myeloid lösemideki (KML) 9;22 translokasyonudur.

Bu translokasyon 9q34 deki *Abelson* geni ile kromozom 22 deki *BCR* geninin promotörünü içeren 5' bölgesinin füzyonu ile sonuçlanır. Her iki gende meydana gelen intron kırılmaları bu tümör hücrelerine özgü protein ve çerçeve içi (in-frame) mRNA füzyonlarının oluşumuna neden olur. Neredeyse bütün KML hastaları bu translokasyonu göstermektedir ve normal olmayan 210 kDa protein eksprese ederler. Füzyon proteini üretimi ile sonuçlanan bu ikinci tipte birçok translokasyon myeloid lösemilerde ve sarkomlarda tanımlanmıştır. Füzyon proteinlerinin birçoğu transkripsiyon faktörleri kodlamaktadır. Bu da değişmiş transkripsiyonların hücre farklılaşma programını değiştirmek sureti ile tümör tiplerinin oluşumunda anahtar rol oynadığını düşündürmektedir (19).

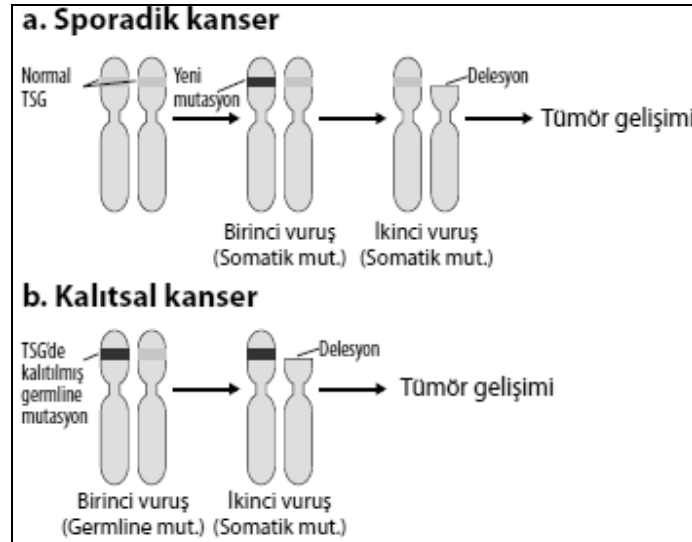
2.3.2. Tümör Baskılayıcı Genler (TBG)

Genel olarak mitoz iki yolla düzenlenir: Hücre bölünmesini baskılayan genlerin normal işleviyle ve hücre bölünmesini yürüten genlerin normal işleviyle. Bunlardan ilki, tümör baskılayıcı genler olarak adlandırılır. Hücre çoğalmasını kontrol altında tutan genlerdir. Etkilerini; bozulmuş hücre döngüsünün devamını engelleyerek, gerekli durumlarda hücreleri apoptozise yönlendirerek, hücre içerisinde DNA replikasyonu ve tamiri ile segregasyonun hatasız gerçekleşmesini kontrol altında tutarak, mutasyon oranlarının düşük seviyede tutulmasını ve genomun stabil kalmasını sağlayarak gösterirler (26).

TBG genellikle retinoblastoma (*Rb*) ve *p53* geninde çalışılmıştır. Diğer TBG'ler ya da potansiyel TBG genlerine örnek olarak; ailesel adenomatöz poliposteki Wilms' tümör (*WT1*), *APC*, *DCC* (deleted in colon carcinoma) genleri, von-Hippel- Lindau sendromundaki *HPL* geni ve nörofibromatozdaki *NF1* ve *NF2* genleri verilebilir. TBG'ler onkogenlerin karşıtlığını temsil etmektedirler. Normalde hücre büyümesini baskılayıcı ve düzenleyici görevleri vardır. Hücre büyümesinin kontrolü veya baskılanmasının bozulması için genellikle TBG'nin her iki allelinin kaybı gereklidir. Bir allelde meydana gelen mutasyon resesif etkilidir ve bir sonraki jenerasyona aktarılabilir. Bir allelinde mutasyon olan bireyler yüksek kanser riski taşırlar çünkü ikinci alleli de etkisizleştirecek tek bir mutasyon kanserleşme için yeterli olacaktır.

İlk klonlanan TBG, *Rb1* (retinoblastoma) genidir. Familial ve sporadik retinoblastoma oluşumu ilk kez Knudson'un iki-darbe modeli ile açıklanmıştır. Önerilen modelde hücrelerin büyüme avantajı kazanmaları için, bu genin (veya diğer baskılayıcı

genlerin) her iki allelin inaktive edici mutasyonunun gerekli olduğu belirtilmiştir (Şekil 2-5). İşlev kaybına neden olan (retinoblastomada *RBI* geninin bulunduğu 13q14 bölgesinde) mutasyonlar çoğunlukla heterozigosite kaybıyla birlikte olur. Heterozigosite kaybı genellikle, yanlış anlamlı (missens) mutasyonlar, kromozomal translokasyonlar, tüm genin ya da kromozomun eksilmesi ya da gen dönüşüm mekanizmalarıyla sağlanır. Kansere genetik yatkınlık sendromlarında ilk inaktive edici mutasyon (ilk darbe) germ hücrelerinde, diğer normal gendeki ikinci mutasyon (ikinci darbe) ise bu hücrelerden oluşan somatik hücrelerde ortaya çıkar. Kalıtsal olmayan sporadik kanser formunda ise, her iki mutasyon da (her iki darbe) somatik hücrelerde (ya da kök hücrelerde) oluşur (9)



Şekil 2-5: Knudson'ın iki darbe modeli (26).

Kanser oluşturan ve oluşturmayan insan hücrelerinin füzyonu ile elde edilen hibrid hücreler daha fazla tümör oluşturmaya devam etmez. Bu da normal hücrelerdeki genetik bilginin kanseri baskıladığını kanıtlamaktadır. Bu, hücre büyümesinin kontrolü ve baskılanması yeteneğine sahip genlerde meydana gelen anomalilerin (mutasyon ve delesyon) kötü huylu tümör oluşumuna neden olabileceğini göstermektedir (15, 27).

p53 geni 53 kDa'luk bir nuklear fosfoprotein kodlar. Bu protein SV40 T antijeni içeren viral onkoproteine bağlanır. Hücre döngüsü kontrolündeki rolünün bir parçası olarak, yabancı tip *p53*'ün SV40 T antijeninin hücre sel homologuna bağlandığı düşünülmektedir. Mutant *p53*'ün bağlanma yeteneğini kaybetmesi, hücre döngüsü düzenlenmesinin ortadan kalkmasına ve malign dönüşümün başlamasına neden olan kritik bir olaydır. *p53* geninde meydana gelen değişimler insan kötü huylu tümörlerde en sık görülenlerdir (28).

2.4. Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü Ailesi (EGFR):

Epidermal büyüme faktörü reseptörü ailesinden olan HER2, HER3 ve HER4 embriyonik gelişimde, doku onarımında ve kanserde anahtar rolü üstlenen tip 1 tirozin kinazlardır (29). HER reseptörleri öncelikle epitelyal, mezenşimal ve nöronal kökenli hücreler olmak üzere birçok hücre tipinde eksprese olur. Homeostatik koşullar altında, EGF ailesini oluşturan ligandların varlığında reseptör aktivasyonu düzenlenir. EGFR aktivasyonu bir çok kompleks hücre içi sinyalleşme yolağını uyarır. RAS/RAF/MEK/ERK ve PI3K/AKT içeren başlıca iki sinyal yolağı EGFR tarafından aktiflenir. Tümör hücre çoğalması, canlılığını koruması, invazyonu bu yolakların aktivasyonu üzerinden sağlanmaktadır (30).

Birçok kanser çeşidinde EGFR'nin onkojenik role sahip olduğu gösterilmiştir. En son yapılmış gen ekspresyon analizleri ve özellikle fonksiyonel çalışmalar EGFR'nin meme kanserinde anahtar rol oynadığını açıkça göstermiştir (31). EGFR ailesinden olan reseptörler kansere özgü proteinler değildir çünkü hem normal dokuda hem de kötü huylu tümörlerde bir dereceye kadar eksprese olurlar. Over dokusundaki ekspresyon durumları henüz anlaşılmamıştır. Tümör dokusunda ve normal dokudaki protein konsantrasyon oranlarının belirlenmesinin moleküler hedefler ve kansere karşı yeni tedavilerin geliştirilmesinde yararlı olabileceği düşünülmektedir (32).

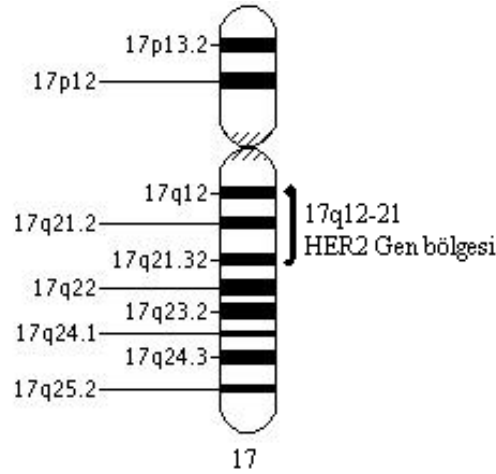
Over kaynaklı tümörlerin mikro çevresinde EGFR gibi hücre yüzey reseptörlerini uyanan biyolojik olarak aktif birçok bileşik vardır. EGFR ekspresyonu over tümörlerinde ortalama % 48 olarak rapor edilirken aşırı ekspresyon sıklığı %10-70 aralığında olduğu tahmin edilmektedir. EGFR ekspresyonu ile çeşitli hastalık parametreleri arasındaki ilişki ile ilgili kabul görmüş bir fikir birliği yoktur. Fakat elde edilen bireysel sonuçların farklılığına rağmen, EGFR ekspresyon düzensizliği ya da

aktivitesinin over kanseri oluşumunu etkileyen faktörler olduğuna dair kanıtlar mevcuttur.

Yapılan bir çalışmada, metaplastik over yüzey tümörleri ve kontrol olarak normal tuba epitelinde EGFR düzeyleri karşılaştırıldığında, EGFR aşırı ekspresyonunun hastalığın agresifliğiyle önemli ölçüde ilişkili olduğu gösterilmiştir. Çok değişkenli analizlerde, EGFR ekspresyon durumunun epitel kaynaklı over tümörlerinde genel sağkalım süreci için prognostik faktör olduğu rapor edilmiştir (33).

2.4.1. HER2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor 2):

HER2 (Human Epidermal growth factor Receptor 2) geni *ERBB2* (avian erythroblastosis oncogene B) ve *NEU* (neuro/glioblastoma derived oncogene homolog) olarak da adlandırılır. 17. kromozomun uzun kolunun 12-21 bölgesinde lokalize olmuş bir onkogendir (Şekil 2-6) (34).



Şekil 2-6: *HER2* geninin lokalizasyonu (34)

HER2 185 kDa'luk bir transmembran protein kodlar. Bu protein tirozin kinaz aktivitesi gösterir. İnsanlarda HER ailesi yapısal olarak ilişkili dört üye içermektedir: HER1, HER2, HER3, HER4. Tanımlanmış hiçbir ligandı olmayan tek reseptör HER-2 olmasına rağmen diğer HER üyeleriyle heterodimer oluşturmak için tercih edilen bir eştir. HER ailesi tarafından oluşturulan bütün dimerler arasında heterodimerizasyonla ilişkili HER2, en etkili sinyal iletim yolağıdır (35).

HER2 hücre büyümesi ve farklılaşmasında önemli rol oynar. HER2 aracılı temel sinyal yolları mitojenle aktive olan protein kinaz yolağı (MAPK) ve fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K) yolağıdır (36, 37).

Hücre canlılığı için anahtar bir gen olan *HER2*'nin amplifikasyonu ve aşırı ekspresyonu malign transformasyona neden olur. Meme, over, gastrik kanser, prostat ve diğer kanserlerde doğrudan kötü klinik sonuçlarla ilişkili olduğu bildirilmektedir (38).

Bir anti-HER-2 antikoru olan trastuzumab'ın (Herceptin™) gelişimi meme kanserinin tedavisinde büyük etki sağlamıştır ve bunu takiben HER2 spesifik antikorların çeşitliliği ve küçük moleküler inhibitörler klinik çalışmalarda değerlendirilmiştir. Hem HER2 reseptörü hem de tüm HER2 sinyalleşme yolağı kanser tedavisi için hedef olarak yaygın bir şekilde çalışılmıştır. HER2 sinyalleşme yolları, sinyalleri bloke etmek ve tümör büyümesini engellemek için umut verici hedeflerdir. Ayrıca aşırı eksprese olan sito-membran proteini gibi tümör hücrelerine hedeflenen ilacı taşınması için HER2 ilgi çekici bir tümör işaretçisidir (36, 37).

HER2 Amplikonu:

Deneysel modellerde tek bir *HER2* geninin spesifik aşırı ekspresyonu ile kanserleşme sağlanabilirken, insanda doğal olarak oluşan meme kanserleri daima 17q12-21 bölgesinin amplifikasyonu ile oluşmaktadır. Bu bölgede *HER2* ile birlikte birçok gen bulunmaktadır. Bu nedenle insan hastalıkları deneysel modellere göre daha karmaşık bir genetik temeli olmalıdır. *HER2* amplikonu birçok meme tümöründe oldukça küçük ve sabittir. *HER2* lokusu etrafında 280 kb'lık minimal bir bölgeyi kapsar. Transkribe olan 10 gen içeren bu bölgenin tümörlerde amplifikasyonu durumunda genlerin 6'sı aşırı eksprese olur. Bu da bu genlerin biyolojik olarak ilişkili genler olduğunu düşündürmektedir. Bunlar, *HER2*, *GRB7*, *MLN64*, *PNMT*, *MGC9753*, ve *MGC14832* genleridir. *GRB7* proteini, SH2 içeren bir adaptör protein olup, fosforile HER2 bağlanır ve hücre göçü ile ilgili olaylarda rol alır. *MLN64* endozomal bir membran proteini olup sterollerini bağlar ve kolesterolün taşınmasında görev alır. *PNMT* (feniletanolamin N-metiltransferaz) bir katekolamin biyosentez enzimi olup *HER2* tümörögenezi için önemli olmadığı düşünülmektedir. Hipotetik *MGC9753*, ve *MGC14832* proteinlerinin fonksiyonları bilinmemektedir (20).

HER2'nin Biyolojik Önemi

Östrojen reseptörü (ER) ve HER2 sinyal yolları meme kanserlerinin birçoğunda hücre proliferasyonu ve sağ kalımını destekleyen dominant yollardır. Bu yolları hedeflemek seçilmiş hastalarda daha etkili bir tedavi yöntemi ortaya koymaktadır. Mikrometastatik hastalık olduğu durumlarda (tekrarlama riskinde %50 azalma) ER'yi hedefleyen endokrin tedavisi ve HER2'yi hedefleyen trastuzumab tedavisi, hastalısız ve genel sağkalımı sağlamada çarpıcı yararlar sağlamaktadır. Östrojen reseptörü ve HER2'yi hedef alan tedavi uygulanan ve daha sonrasında kemoterapi gören metastatik hastalarda duraksama geçici de olsa görülebilmektedir. HER2 yolağı, 3 kısımdan oluşan kompleks biyolojik bir ağ olarak tanımlanmıştır:

Hücre dışından gelen sinyali alan membran reseptörü ve onun ligandından oluşan birinci kısım, sinyalin çekirdeğe ulaşmasını sağlayan ve protein kinazlardan oluşan ikinci kısım ve transkripsiyon faktörlerinin genleri düzenlemesi ile hücre fonksiyonlarının etkilendiği son kısım.

Bununla birlikte yolağın aktivitesini düzenleyen genler ve gen ürünleri yeniden tanımlanmaktadır. Birinci kısım 4 adet membran reseptörü/ tirozin kinazlar (HER1-4) ve onların birçok ligandından oluşmaktadır. Meme kanserinde HER2 dominant tirozin kinaz reseptörüdür ve vakaların %20'sinde amplifiye olduğu görülmüştür. Ligandların hücre dışı bölgelerine bağlanmasıyla HER proteinlerinin hücre içi bölgelerinde dimerizasyon ve transfosforilasyon meydana gelir. HER2'nin ligandı bulunmamaktadır ve yüksek seviyelerde eksprese edildiğinde aktive olmak için ya başka bir aile üyesiyle heterodimer ya da bir HER2 ile homodimer oluşturmak zorundadır. Bu fosforile olmuş tirozin kalıntıları çeşitli hücre içi sinyal molekülleriyle etkileşime girerek art arda ikincil mesaj yollarının aktive olmasını ve diğer membran sinyal yollarıyla kesişmesini sağlar. Bu yolk tarafından aktive edilen transkripsiyon faktörleri hücre çoğalmasında, sağ kalımında, farklılaşmasında, damar oluşumunda (anjyogenez), invazyon ve metastazla ilişkili genlerin düzenlenmesiyle ilişkilidir.

HER2 en güçlü katalitik kinaz aktivitesine sahiptir ve HER2'yi içeren heterodimerler de en güçlü sinyal aktivitesini içermektedirler. HER3 ligand bağlanması (heregulin) ile aktive olur fakat tirozin kinaz aktivitesi bulunmamaktadır bu yüzden HER2 gibi o da aktive olmak için başka bir aile üyesiyle eşleşmek zorundadır.

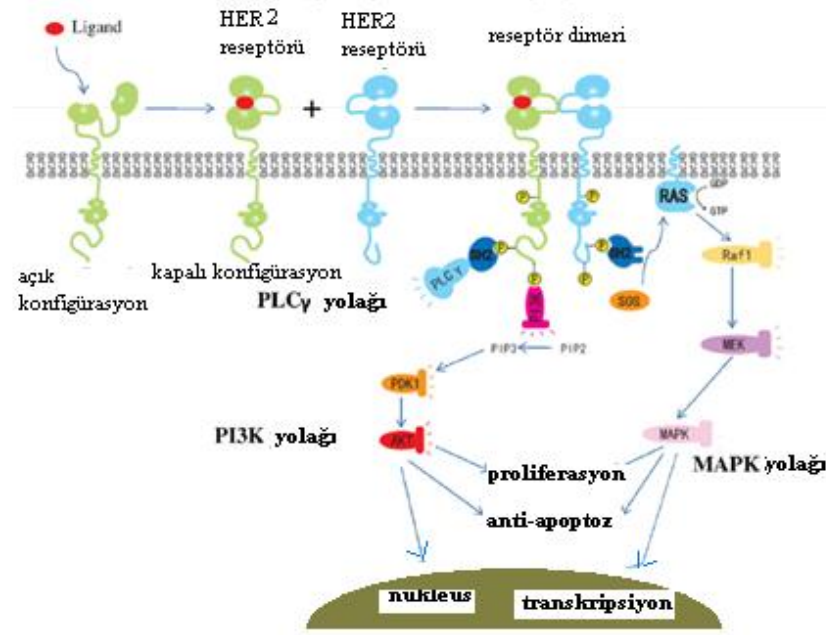
Bununla birlikte HER2'de PI3K için birçok bağlanma bölgesi bulunmaktadır ve HER2 ile heterodimer oluşturduğu zaman PI3K/AKT antiapoptoz yolağının en etkili uyarandır.

HER2 ayrıca, insülin benzeri büyüme faktörü reseptörü I gibi diğer membran reseptörleriyle kompleks oluşturarak da aktifleşebilir. Hatta östrojen bile, çekirdeğin dışındaki östrojen reseptörleri vasıtasıyla HER2 sinyal yolağını aktive edebilir.

HER2'nin hücre dışı bölgesini kaybetmesiyle oluşmuş istisnai bir şekli olan p95 olarak isimlendirilmiş protein, bazı meme kanserlerinde gözlenmiştir. p95 konstitütif olarak aktiftir çünkü bu reseptörlerin dış bölgeleri bir liganda bağlanana kadar inhibitör görevini üstlenir. p95, HER2'nin hücre dışında kalan kısmındaki bir bölgeye bağlanarak iş gören transtuzumab'a karşı direnç gösterebilir. Çünkü bu bölge p95'te bulunmamaktadır. Aynı sebeple de HER2'nin eksternal bölgesini hedef alan antikolar da p95'i tespit edemezler (25).

2.4.1.1. HER-2 Sinyalleşme Yolağı:

HER-2 dimerizasyondan sonra, PI3K, MAPK, ve C- γ (PLC γ) fosfolipaz'ı içeren en az 3 farklı yolakla sinyalleşebilir. Dimerizasyon paterni hangi sinyalleşme yolağının aktifleşeceğini etkiler. Farklı dimerik kombinasyonların farklı hücre içi sinyalleşme kaskadları ürettiği düşünülür. Örneğin PI3K lipit kinaz aktivitesi, en dönüştürücü ve mitojenik sinyalleşme kombinasyonu olan HER2/HER3 heterodimeri ile baskılanır. HER-3, PI3K'nın düzenleyici alt ünitesi olan p85 ile etkileşime girebilen çok sayıda bağlanma bölgesine sahip olduğu için tirozin-fosforile HER3 direk olarak PI3K ile eşleşmesi mümkündür. PI3K yolağından farklı olarak, dimerizasyon içeren bütün HER-2'ler(HER-1/HER-2,HER-2/HER-3 ve HER-2/HER-4) MAPK yolağını aktive eder. PI3K ve MAPK hücre proliferasyonunu teşvik eden ve apoptozu engelleyen anahtar sinyalleşme yolaklarıdır. Birçok hücre soyu ve dokuda rapor edilen nükleer lokalizasyon HER-2 sinyalleşme yolağı için diğer önemli bakış açısidir. Nükleer lokalize reseptörler siklin D1,COX2 ve p53 genleri için muhtemelen transkripsiyon faktörleri gibi davranırlar. Nükleer HER-2'nin COX-2 geni promotörünü aktive ettiği ve tümör hücrelerinde COX2 ekspresyonunu up-regüle ettiği çok iyi bir şekilde belgelenmiştir. Meme kanseri için Sitoplazmik HER2 gibi nükleer HER-2 de prognostik belirteç görevi üstlenmektedir. HER2 sinyalleşme yolağı şekil 2-7'de gösterilmiştir (36).



Şekil 2-7: Her2 sinyalleşme yolağı (36)

2.4.1.2. Tümör Oluşumunda HER2'nin Rolü:

Normal hücrelerde gelişimin bütün aşamalarında HER2 önemli rol oynar. Bununla birlikte *HER2*'nin mutasyonu ve aşırı ekspresyonu hem tümör oluşumuna hem de metastaza yol açabilir. Kemirgenlerde tümör oluşumunda *neu* geninin (kemirgen *HER2* geni) mutasyonu görülürken insanda normal *HER2* geninin aşırı ekspresyonuna daha sık rastlanmaktadır. *HER2*'nin aşırı ekspresyonu hücre dönüşümünü tetikleyen sinyalleri artırır ve uzatır. İnsanda meme, mide, over, prostat kanserlerinde *HER2* sıklıkla aşırı eksprese olur (36).

2.4.1.3. HER2 ve Over kanseri:

Over kanserlerinde *HER2*'nin rolü az çalışılmıştır ve meme kanserindeki kadar aydınlatılmamıştır. Yapılan bir çalışmada over tümörü örneğinde *HER2* aşırı ekspresyonu %27,6 olarak bulunmuştur. Bunun karşılık, evre III ve IV over kanserli hastadan elde edilen ölümsüz hücre soylarının tamamında *HER2* proteininin aşırı eksprese olduğu saptanmıştır. Bu da *HER2* aşırı ekspresyonuna over kanserlerinin ileri evrelerinde daha sık rastlanıldığını göstermektedir (36). Over kanseri hücrelerinde *HER2*'nin aşırı ekspresyonu hücrelerin hızlı bir şekilde üremesine, yüksek DNA tamiri ve koloni oluşturma yeteneğine neden olur (38).

Over kanserli hücrelerde HER2 ve östrojen reseptörleri (ER) arasında karşılıklı etkileşim olduğu gösterilmiştir. Östrojenin HER2'nin fosforilasyonuna sebep olduğu ve HER2 sinyalleşme yolağını başlattığı kanıtlanmıştır. Bu da HER2 dimerizasyonunu bloklayan perstuzumabın over kanserinde östrojen uyarıcı değişimleri tersine çevirdiği ile ilgili gözlemleri açıklar (25, 36).

Over kanserinin tespitinde HER2 düzeyinin belirlenmesinde en sık kullanılan yöntemler IHC (immunohistokimya) ve FISH (floresan in situ hibridizasyon) tir ve yüksek oranda uyumluluk göstermektedirler (39). Tedaviye uygun hasta seçerken FISH'in HER2 durumunu belirlemede IHC'ye göre daha fazla kesinlik gösterdiği belirtilmektedir (24).

Tedavide monoklonal antikorlar HER2 nin aşırı ekspresyonunun oluşturduğu tümör hücrelerinin proliferasyonunu engeller. Monoklonal antikorlar ve trastuzumab'ın, HER2 pozitif olan hastalarda özellikle kemoterapotik ilaçlarla birlikte kullanıldığında önemli ölçüde tedavi edici etkisi olduğu belirtilmiştir. Over kanserlerinin %20-30'unda HER2 onkogeninin aşırı ekspresyonu olduğu ve tümör dokusunda yükselen HER2 ekspresyonunun kötü prognozla ilişkili olduğu ileri sürülmektedir. HER2 pozitif over kanserli hastalar hastalığın erken aşamalarında anti-HER2 moAb (monoklonal antikor) tedavisinden, ileri aşamadaki hastalara göre daha fazla yarar sağlarlar. Bu nedenle over kanserinin farklı klinik evreleri boyunca HER2 dağılımını saptamak ve anti-HER2 ile tedavi öncesinde HER2 aşırı ifadesinin prognostik değerini kanıtlamak önemlidir (40).

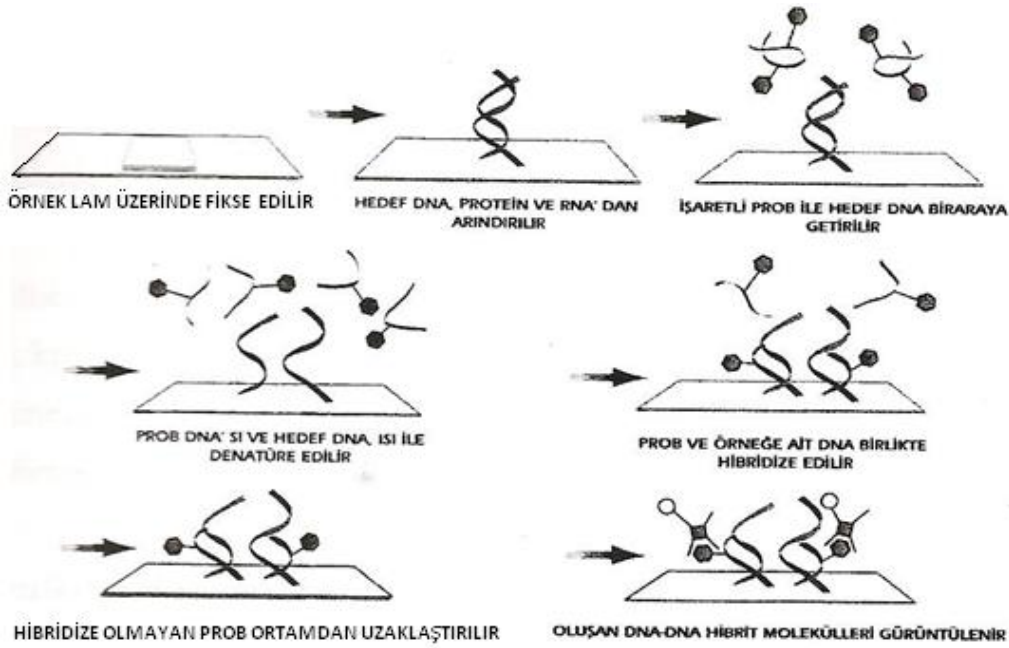
2.4.2. Over Kanserinde HER2 Düzeyinin Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler:

Floresan *in situ* hibridizasyon (FISH) yöntemi gen kopya sayılarını tayin ederek amplikasyonun, immünohistkimya (IHC) ise gen ürünü olan proteinin miktarını tayin ederek ekspresyonu belirlemek amacıyla kullanılmaktadır.

2.4.2.1. FISH Yöntemi

FISH gen haritalamasında ve kromozom değişikliklerinin saptanmasında kullanılan elverişli bir yöntemdir. Bu yöntem sitolojik preparatlara, interfaz nukleuslarına veya metafaz kromozomlarına uygulanabilir ve sitogenetik bantlama teknikleriyle tanımlanması mümkün olmayan birçok kromozom anomalisi (marker kromozomlar, küçük delesyonlar, duplikasyonlar, translokasyonlar, inversiyonlar vb.) tanımlanabilir (19, 41, 42, 43). Aslında moleküler bir teknik olan FISH, sitogenetik ve

moleküler biyolojiyi biraraya toplayarak sitogenetik analizlerin doğruluğunu ve etkinliğini büyük ölçüde geliştirir. Floresan işaretleme, in sitü hibridizasyon prensibine göre, prob ve örnek arasında hibrid bir yapı meydana gelmesiyle sinyal oluşumuna dayanan bir işlemdir. Biyolojik materyalin hazırlanması ve nükleik asit dizisinin prob elde etmek üzere floresan bir işaretleyici ile işaretlenmesi ilk işlemdir. Daha sonra nükleik asitleri tek iplikli hale getirmek için hem prob hem de materyal denatüre edilir. Bir sonraki aşamada ise tek iplikli prob, kontrollü deneysel koşullar altında biyolojik materyaldeki tek iplikli tamamlayıcı nükleik asit dizisi (hedef dizi) ile hibrid oluşturur. Böylece yeni bir çift iplikli molekül oluşur. En son aşamada floresan işaretleyiciyi taşıyan hibridizasyon bölgeleri floresan mikroskopunda saptanarak incelenir (42,43). (Şekil 2-8).



Şekil 2-8: İn sitü hibridizasyon yönteminin şematik olarak gösterilmesi (41).

Laboratuvarlardaki uygulamalar için çok sayıda, iyi kalitede FISH probları mevcuttur. Laboratuvarlarda rutin olarak kullanılan en elverişli FISH probları; 1) sentromere özgü problar, 2) tüm kromozom boyama probları, 3) gen füzyon, delesyon ya da duplikasyonları için lokusa özgü problardır (44).

Sentromere özgü problar (CEP): Kromozom sentromerlerindeki heterokromatinde bulunan tekrarlayan alfa (veya beta) satellit dizilerini hedef alır ve sayısal kromozom anomalilerinin saptanmasında kullanılır. Tüm kromozom çiftleri için ticari şekilleri vardır ve hem metafaz hem de interfazda spesifik bir kromozom çiftinin sayısının tespiti için çabuk ve kolay bir yol sağlarlar. Trizomi ve monozomilerin belirlenmesinde kullanılabilirler (44).

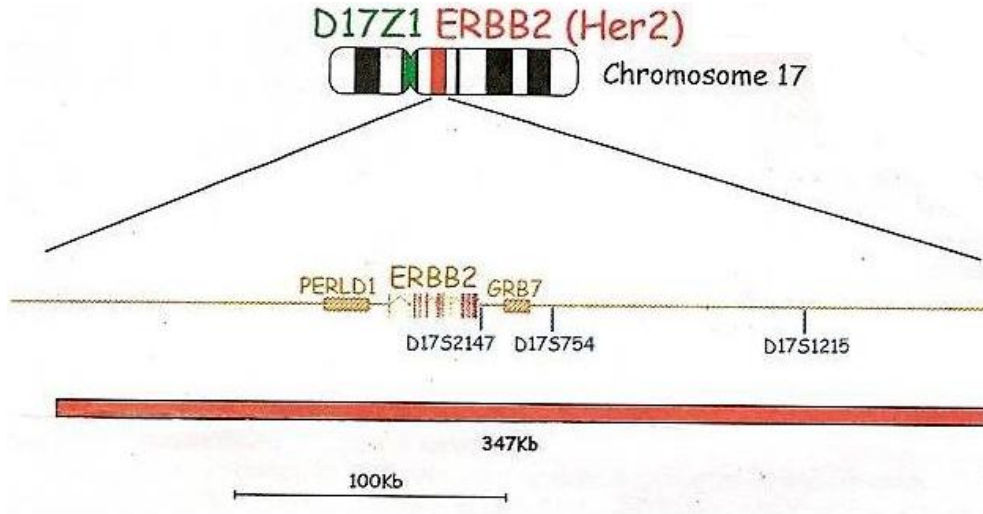
Tüm kromozom boyama problemleri: Kromozoma özgü prob kütüphanelerinden oluşturulurlar. İlgilenilen kromozomun tamamını işaretlemek için tasarlanmışlardır. Marker kromozomlar gibi karmaşık ve belirsiz değişiklikler geçiren kromozomların morfolojik alt yapılarının çözülmesinin zor olduğu sitogenetik değişiklikleri tanımlamak için kullanılır. Ancak 2-3 megabaz (Mb)'dan küçük değişiklikleri saptayabilecek kadar hassas değildirler (45).

Lokusa özgü problar: Tek kopya halinde bulunan spesifik dizileri belirlerler. Bu problar kullanılırken hibridizasyonun verimli olabilmesi için hedef dizinin büyük olması gerekmektedir. Translokasyon, inversiyon ve spesifik delesyonlar gibi yapısal değişimler bu tür problar kullanılarak tespit edilebilir. İlgilenilen hedef genlerdeki yeniden düzenlenmelerin, kazanımların ve delesyonların aynı zamanda metafaz ve interfaz hücrelerindeki amplifikasyonların tespitinde sıklıkla kullanılmaktadır (46).

Bu çalışmada 17. Kromozomun uzun kolunun 12. Bölgesindeki *HER2* genini işaretlemek amacıyla lokusa özgü bir prob olan *HER2* probu kullanılmıştır. Parafine gömülü granüloza hücreli over doku kesitlerine interfaz FISH yöntemi uygulanarak *HER2* geninin amplifikasyonunun tespiti sağlanmıştır. Bu *HER2* amplifikasyon probu, *HER2* gen bölgesi ve komşu bölgeleri kapsayan 347 kb'lık, kırmızı florofor ile işaretlenmiş ve yeşil florofor ile işaretlenmiş 17 sentromer bölgesine özgü prob karışımından oluşur (şekil 2-9).

HER2, 17q12, kırmızı

17 sentromer, (D17Z1), 17p11.1-q11.1, yeşil



Şekil 2-9: Yeşil ve kırmızı sinyallerin 17. kromozom üzerindeki yerlerinin gösterilmesi (46).

Interfaz FISH:

Bölünmeyen hücreleri hedef DNA olarak kullanabilen bir yöntemdir. Bu yöntem, hücrelerin kültürü yapılmadan direkt yaymalara veya histolojik doku kesitlerinde uygulanabilir. Kanserli hücrelerden kromozom eldesinin zor olması ve kaliteli kromozoma rastlama sıklığının az olması nedeniyle belirli bir anomali veya DNA dizisi incelendiğinde bu yöntem kullanışlı olmaktadır. Kanserlerde sıklıkla rastlanan anöploidilerin taranmasında veya herhangi bir kanser türüne özgü kromozomal delesyonların tayininde, belirli lokus veya bölgeye spesifik proplar kullanılarak interfaz FISH uygulanabilir. Ayrıca, sık gözlenen spesifik translokasyon ve inversiyonlarda füzyon genleri farklı floresan boyalarla işaretlenerek iki (veya daha fazla) renkli proplar olarak interfaz FISH'te kullanılabilir (41).

2.4.2.2. İmmünohistokimya Yöntemi

İmmünohistokimyasal yöntemlerin tanısal patolojide uzun bir geçmişi vardır. Bu metodlar hücrelerdeki proteinleri ve molekülleri tanımlamak için florofor işaretlenmiş (immünofloresan) ve enzim-işaretlenmiş (immünoperoksidaz) antikorları içermektedir. Tanısal cerrahi patolojide immunoperoksidaz metotları (genellikle tek antijen-antikor ve daha az yaygın olarak çift antikor-antijen kombinasyonları) hematoksilin ve eozin

boyanma ile sonuç elde edilemediğinde ek bilgi oluşturabilmek için yaygın olarak kullanılmaktadır. Avantajı moleküllerin hücre içinde tanımlanabilmesidir. İmmünohistokimya kanser hücre tiplerinin, kanserin alt sınıflarının ve bilinmeyen veya belirlenemeyen primer bölgelerinin ve metastatik kanserlerin olası hücre menşeyini tanımlamak için cerrahi patolojide kullanılır. Her durumda, kabul görmüş ve standart morfolojik kriterler dokunun immunohistokimyasal boyanmasına ek olarak kullanılmaktadır (47).

İmmünohistokimyasal boyama yöntemleri:

Yöntemler , immunojenik fiksasyon tarafından değiştirilmiş antijenlerin tespitini sağlamak için antikor-antijen etkileşiminin yeterli amplifikasyonunu sağlamak zorundadır. Bir enzimle işaretlenmiş antijene özgü primer antikorların kullanıldığı teknik direkt yöntem olarak adlandırılır.

Substrat enziminin eklenmesini takiben antiserum dokuda inkübe edilir, dokularda antikor bağlama yerlerinde çözünmeyen renkli bir reaksiyon ürününün birikimine neden olur. Bu reaksiyon ürünü ışık mikroskopuyla görünür şekildedir. Direkt immünohistokimyasal boyamaların uygulanması basit ve ekonomiktir. Bununla birlikte gözle görülebilir bir sinyalin az bir amplifikasyonunu sağlarlar bu nedenle kullanım alanları, otoimmün deri hastalıklarının tanısı için kullanılan deri biyopsilerindeki immunoglobulin depoları gibi antijenlerle sınırlıdır. Direkt immünoshistokimyasal boyamanın diğer bir dezavantajı ise her primer antiserumun bir enzimle bağlanmış olması gerekmesidir (48).

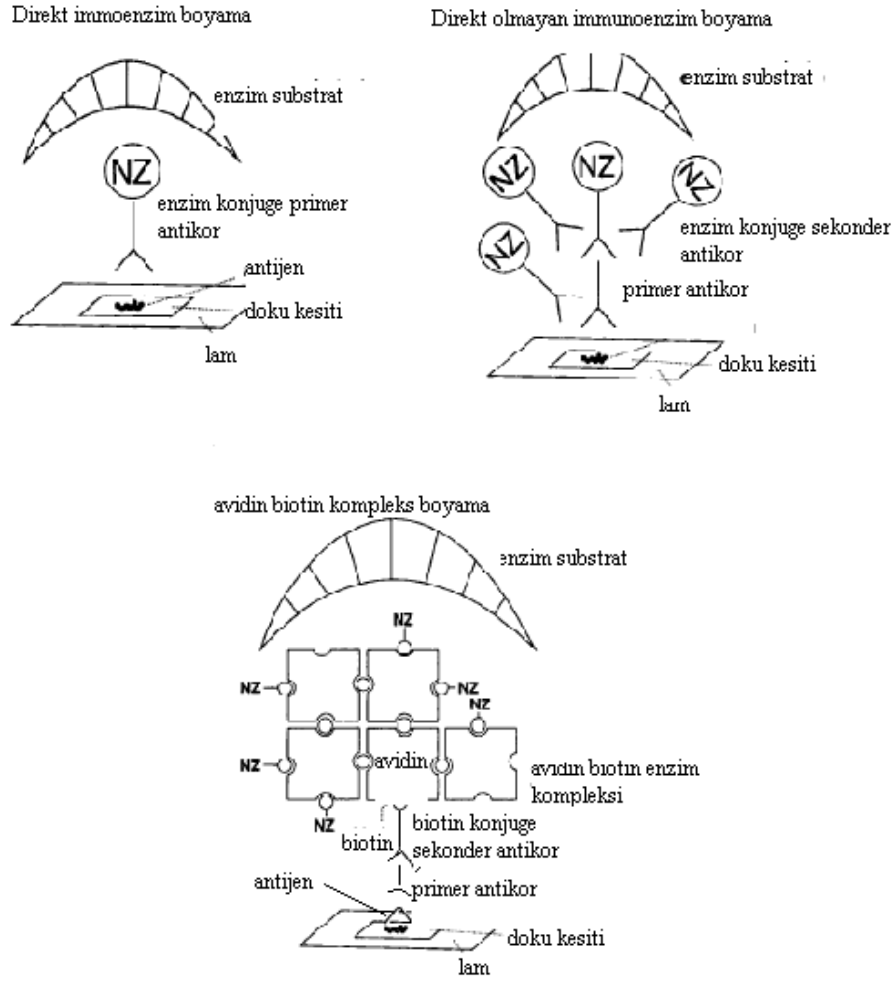
İndirekt yöntemde ise primer antikorun elde edildiği türe karşı oluşturulan ikincil bir antikor, haberci molekülü taşımaktadır. Bu yöntem tek aşamalı olana göre genellikle daha duyarlıdır. Çünkü her primer antikora sinyal taşıyan birkaç sekonder antikor birden bağlanabilir (49). İndirekt immünboyamalar fikse dokularda insulin gibi antijenlerin ve diğer peptidlerin tespitinde kullanılır.

İndirekt yöntemlere ek olarak, doku kesitlerine birincil antikorların bağlanmasıyla üretilen görünür sinyalin daha iyi amplifikasyonu için tasarlanmış çok çeşitli immünoenzim metodları mevcuttur. Avidin-biotin kompleks (ABC) metodu bunların arasında en çok amaçlı kullanılanıdır. ABC immünboyaması yumurta akından elde edilen bir glikoprotein olan ve biotine karşı yüksek afinite gösteren avidin ile gerçekleşir.

Doku kesitindeki antijenler, işaretlenmiş primer antikorları takip eden biotin ile immunoglobulin işaretlenmiş ikinci bir antikorla tespit edilir. İkinci antikor takiben, doku avidin ve biotin önceden hazır karışımına maruz kalır. Her avidin 4 biotin molekülü için bağlanma bölgesi içerir. Avidin biotin kompleksleri, avidin molekülleri üzerindeki serbest biotin bağlanma bölgelerini oluşturmak için üretilirler. Bu bölgeler komplekslerin doku ile ilişkili biyotinlenmiş ikinci antikorlara bağlanmasını kolaylaştırır. Biotin molekülleri genellikle peroksidaz enzimi ile işaretlenir. Direkt ve indirekt enzim metodlarında olduğu gibi bir enzim substratı dokuya uygulanır ve antikor-enzim kompleksinin bağlandığı bölgelerdeki kesitlerde renklenmiş reaksiyon ürünü şekillenir.

Bu boya tarafından sağlanan amplifikasyon, nadir antijenleri ve formalin fiksasyonu ile immünojenik olarak değiştirilmiş antijenleri saptamada çoğunlukla gereklidir. ABC immünboyaması çoğu tümör işaretçilerini ve formalin fikse edilmiş dokulardaki bulaşıcı hastalık ajanlarını saptamada kullanılır. (48). Buraya kadar anlatılan immünohistokimyasal boyama yöntemleri şekil 2-10'da gösterilmiştir.

Bu çalışmada parafine gömülü granüloza hücreli over kesitlerinde HER2 protein ekspresyonunu saptamak amacıyla ABC yöntemi ile IHC yapılmıştır.



Şekil 2-10: Üç çeşit immünohistokimyasal boyama yönteminin diyagramsal temsilleri (48).

2.5. Over Kanseri

Over kanseri kadın genital kanserleri içerisinde önemli bir yer tutar. Çünkü en çok ölüme neden olan genital kanser over kanseridir. Yine ölüme neden olma açısından genel kanserler içinde de meme, bağırsak ve akciğer kanserinden sonra 4. sırayı alır (50). Dünyada ise kadınlarda görülen ve her yıl 225 000 yeni hastayı etkileyen en önemli 7. kanser türüdür (51). Kullanılmakta olan tümör belirteçlerinin duyarlılık ve özgüllüklerinin yeterli olmaması ve hastalık ileri evreye ulaşmadan klinik olarak önemli semptomların meydana gelmemesi nedeniyle erken teşhis engellenmekte ve bu yüzden tüm jinekolojik kanserler içinde en çok ölümlü sonuçlananını oluşturmaktadır (24, 52). Çoğu kadın, over kanseri evre III ve evre IV te iken tanı almaktadır ve 5 yıllık sağkalım süreleri sırasıyla %20 ve %6'dır (53). Kadınların %30'undan daha azı evre I'de tanı alır ve bu olgularda 5 yıllık sağkalım %90'dır (54). Over kanserinin erken tanısı; daha fazla tedavi seçeneğinin bulunmasını ve hastalığın seyrinin iyi yönde olmasını sağlar (53). Hastalığın seyrini belirleyen en önemli faktörler; evre ve rezidüel hastalık varlığıdır (39). Yaşla beraber görülme sıklığı artan over kanserlerinin ortalama tanı yaşı 63'tür. Over kanseri görülme olasılığı 40-44 yaş grubunda yaklaşık 16/100 000 iken, 50 yaşın üzerinde 35/100000, 75-79 yaş grubunda ise 54/100 000'e ulaşır (55,56).

Over kanserleri farklı alt türleri olan ve on beşten fazla tümör tipinden oluşan bir tümör grubudur. Her biri alt tipine, özel risk faktörlerine, öncül lezyonlara, histopatolojik özelliklerine, onkogenез esnasındaki moleküler olaylarına, kemoterapiye oluşturdukları cevaba göre karakterize edilir (57). Over tümörleri üç hücre tipinden köken alır: overin etrafını kaplayan multipotent epitel (sölomik epitel), totipotent germ hücreleri ve multipotent seks-kord stromal hücreleridir (5) (Şekil 2-11).

kökene:	yüzey epitel hücreleri:	germ hücreleri:	seks-kord stromal hücreleri	overlere metastaz
sıklığı :	65-70%	15-20%	5-10%	5%
etkilenen yaş grubu:	20+ yaş	0-25+ yaş	tüm yaş	değişken
tipleri :	-seroz tumor -müsinöz tümör -endometriyal tümör -berrak hücre tümörü -brenner tümör -kistadenofibroma	-teratom -disgerminom -endodermal sinüs tümörü -koriokarsinom	-fibrom -granüloza hücre tümörü -sertoli-leydig hücre tümörü	

Şekil 2-11: Çeşitli over neoplazilerinin kökeni sıklığı ve yaş aralığı ile ilgili veriler (5).

2.5.1. Over kanserinde genetik faktörler:

Aile öyküsü over kanseri için en güçlü risk faktörü olmasına rağmen epitelyal over kanserlerinin sadece %5-10'u kalıtsaldır. Over kanserleri ile ilgili üç klinik genetik bulgu vardır: bölgesel over kanseri (site-specific), meme ve over kanser sendromları ve Herediter nonpoliposis kolorektal kanser sendromu (HNPCC, Lynch II). Bunlardan ilk ikisi kalıtsal vakaların %90'ında mevcut olan *BRCA1* ve *BRCA2* tümör baskılayıcı genlerindeki mutasyonla ilişkilidir. HNPCC ise, *hMLH1* ve *hMSH1* gibi, DNA replikasyonu sırasında yanlış eşleşmeleri onaran genlerde meydana gelen değişimlerle ilişkilidir. *BRCA* mutasyonları nedeniyle meydana gelen over kanserleri genellikle genç kadınlarda ya yüksek gradlarda ya da ilerlemiş seröz karsinomalar şeklinde görülür. Ancak *BRCA* mutasyonları müsinöz over kanserlerinde herhangi bir role sahip değildir. Over kanserinin tüm yaşam boyu *BRCA1* mutasyonu ile oluşma riski %40-50, *BRCA2* ile oluşma riski ise %20-30'dur. HNPCC mutasyonu taşıyan kadınların tüm yaşamı boyunca over kanseri geliştirme riski %12'den fazladır. Bu kadınlarda aynı zamanda over kanseri genç yaşta gelişir ve düşük derecelidir. (58, 59, 60). Over kanserindeki genetik değişimlerden bazıları tablo 2-3'te verilmiştir.

Tablo 2-3: Over kanserlerindeki genetik değişimler (9):

	Sınıf	Aktivasyon	%
<i>Hereditör</i>			
BRCA1	Tümör supresör gen	Mutasyon/delesyon	5
BRCA2	Tümör supresör gen	Mutasyon/delesyon	3
MSH/MLH1	DNA tamir	Mutasyon	1
<i>Sporadik</i>			
HER2	Tirozin kinaz	Amplifikasyon/overekspresyon	20
K-ras	G-protein	Mutasyon	5
AKT2	Kinaz	Amplifikasyon	10
PIK3CA	Kinaz	Amplifikasyon	10-20
c-myc	Transkripsiyon faktörü	Overekspresyon	20-30
p53	Tümör supresör gen transkripsiyon faktörü	Mutasyon/delesyon Overekspresyon	60

2.5.2. Over tümörlerinin sınıflandırılması

Overleri oluşturan hücre tiplerinin özelliklerini yansıtan over tümörleri neoplazilerin heterojen bir grubudur. Öncelikli olarak histopatolojik özelliklerine göre sınıflandırılırlar. WHO'nun öngördüğü kurallara göre 3 ana kategoriye ayrılırlar: Epitelyal over tümörleri, seks-kord stromal tümörleri (ör: granüloza hücreli tümörler) ve germ hücreli tümörlerdir. Overin sekonder tümörleri de 4. bir grup oluşturabilir. Bu tümörler uterus serviks gibi diğer jinekolojik organlardan, gastrointestinal sistem ya da memeden overe metastaz yapan tümörlerdir (58). Over kanserlerinde derecelendirme (grade) ise önemli prognostik faktörlerdendir. FIGO tarafından önerilen derecelendirme sistemi yapısal özelliklere dayanmakta olup, bazen nükleer özelliklerle kombine edilmektedir. Over tümörlerinin histolojik sınıflaması tablo 2-4'te verilmiştir.

Tablo 2-4: Over tümörlerinin histolojik sınıflaması (57).

1.Epitelyal tümörler
A.Seröz tümör
B.Müsinöz tümör
C.Endometrioid tümör
D.Berrak hücreli tümör
E.Tranzisyonel hücreli tümör
F.Yassı hücreli (skuamöz) tümör
G.Karışık epitelyal tümör
H.Farklaşmamış karsinoma
2.Seks kord stromal tümörler
A.Granüloza hücre tümörü
B.Teka-fibroma grubu
C.Sertoli-stromal hücre tümörü
D.Sınıflandırlamayan veya karışık tip seks kord stromal tümörler
E. Sertoli hücreli tümör
3.Germ hücre tümörü
A.Disgerminoma
B.Endodermal sinüs (yol kesesi) tümörü
C.Embriyonel karsinoma
D.Pohembryoma
E.Koryokarsinoma
F.Teratoma
G.Karışık (mixed) formlar
4.İkincil (metastatik) tümörler

2.5.3. Epitelyal over tümörleri:

Epitelyal over kanseri Amerika'da kadınlarda görülen en önemli ölümcül kanser formunu oluşturmaktadır. Over neoplazilerinin %90'ından fazlası overin yüzey epitelinden, geri kalanı germ ve stromal hücrelerden kaynaklanmaktadır. Epitelyal neoplaziler seröz (%30-70), endometrioid (%10-20), müsinöz (%5-20),berrak hücreli (%3-10) ve farklılaşmamış (%1) olarak sınıflandırılır. Alt-tipler de birbirinden risk faktörleri, biyolojik davranışları ve tedaviye oluşturdukları cevaba göre farklılaşır (52).

2.5.4. Seks–kord stromal tümörler

Seks-kord stromal tümörleri tüm over tümörlerinin yaklaşık %8'ini oluştururlar (61). Bu neoplaziler fibromatöz kalmak için over yönünde (granüloza hücreleri, teka hücreleri), testiküler yönde (sertoli,leydig hücreleri) ve stromal yönde farklılaşma yeteneğine sahip seks kord ve stroma türevlerinin birleşiminden oluşur (62). Overin seks kordları primitif gonadı saran sölomik epitelten köken alır. Embriyolojik gelişim sırasında bu epitel çoğalır ve overin mezenşimi içerisine doğru büyür. Bu seks kordları

daha sonra vitellüs kesesi duvarından göç eden primordial germ hücreleri ile bütünleşir. Seks kord hücreleri (granüloza ve sertoli) stromal hücreler (teka, leydig, fibroblast) ile birlikte overin matriksini meydana getirir. Seks kord hücreleri overin normal üretimini sağlarken stromal hücreler de destek vermektedir. Bu tümörler tipik olarak steroid hormon üretimi ile ilişkilidirler ve fonksiyonel seks kord stromal tümörleri androjenik veya östrojenik tümörler olmalarına göre de sınıflandırılırlar (63).

Seks kord stromal tümörlerin histopatolojik görünüşleri ve malign potansiyelleri oldukça değişkendir bu yüzden bu tip tümörler için optimum tedaviyi belirlemek oldukça zordur. Bu tümörlerin öngörülemez davranışları ve genellikle geç nüksleri hastaların ilerki durumları ve prognozunun seyrine rehberlik eder (64, 65). Klinik olarak önemlidirler çünkü birçoğu genellikle östrojenik bazen de androjenik olabilen steroid hormonlar salgılayabilirler. Salgıladıkları hormonların etkileri nedeniyle erken teşhis imkanları vardır (5).

Over kanserleri içerisinde oldukça nadir rastlanan seks kord stromal tümörleri genellikle postmenopozal dönemde görülmesine karşılık tüm yaş gruplarında karşımıza çıkabilir. En sık görülen tipi granüloza hücreli tümörlerdir. Bu grup granüloza hücre tümörleri ile birlikte tekoma-fibroma grubunu, sertoli- leydig hücre tümörlerini, annüler tübellü seks kord stromal tümörlerini, jinandroblastomaları ve sınıflandırılmayan seks-kord stromal tümörleri içerir (66).

2.6. Granüloza Hücreli Tümörler (GHT)

Düşük dereceli maliniteye sahip olan GHT'ler seks kord stromal neoplazilerin %70'ini oluştururlar (23). Granüloza hücreleri, over foliküllerinin somatik bileşenlerini oluşturur. Seks steroidlerini, folikülogenez ve ovulasyon için gerekli diğer büyüme faktörlerini oluşturma özelliğine sahiptirler (61). GHT'ler gibi düşük insidansa sahip bir hastalığın klinik seyrini tanımlamak veya tedavisi hakkında ortak bir görüş belirtmek zordur. Over tümörlerinin %2'sinden daha azını, tüm over kanserlerinin %6'sını oluştururlar. GHT'ler belirti vermeden büyürler ve kötü huylu tümör oluşturma potansiyellerinin varlığı klinik olarak önemlerini artırır (67).

GHT'ler genomik olarak kararlıdır ve diploiddirler, sitogenetik analizlere göre çok az anomali gösterilmiştir (57). Klinik olarak iki nedenle önemlidirler:1-yüksek östrojen hormon dağılımı potansiyelleri 2-granüloza hücre formlarının kesin malinite riski (5). Erişkin ve juvenil olmak üzere iki farklı histolojik tipi vardır. Erişkin

GHT'lere daha sık rastlanır. Genellikle 50-55 yaş grubunda daha fazla görülmekle birlikte perimenopozal ve postmenopozal kadınlarda rastlanmaktadır. Juvenil GHT'ler daha nadir olarak ortaya çıkar ve tüm GHT'nin %5'ini oluştururlar. Menarş öncesi kızlarda ve genç kadınlarda görülmektedir. Bu tümörlerin nadir olması ve ilk tanıdan 5-30 yıl sonra tekrarlaması nedeniyle juvenil ve erişkin GHT'lerin prognostik faktörleri ile ilgili yapılan çalışmalar oldukça azdır (68). 2009'da yapılan tam transkriptom sekanslama analizi çalışmasıyla erişkin tip GHT'nin %97'sinde FOXL2 (forkhead box L2) geninde (c.402C3G; p.C134W) yeni bir somatik yanlış anlamlı mutasyon tanımlanmıştır (69). Daha sonra yapılan çalışmalarda juvenil GHT ve diğer malignansilerden farklı olarak erişkin tip GHT 'de bu mutasyonun varlığı tanımlanmıştır (61).

2.6.1. GHT'nin Epidemiyolojisi:

GHT'ler her yaşta kadınlarda görülebildiği gibi genellikle üretken kadınlarda ve menopoz sonrası kadınlarda görülmektedir. Avrupalı ve Amerikalı kadınlarda sıklığı Asyalı ve Afrikalı kadınların neredeyse 2 katıdır. GHT'lerin, östrojen üretimi ile endometriyumun uyarılmasından meydana gelen endometriyal hiperplazi (progesteron olmaksızın endometriyumun sürekli olarak östrojene maruz kalması ile oluşan hastalık) ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir. GHT aşırı hormon üretimi ile ilişkili olmasına rağmen hastalarda infertilite sıklığında bir artış gözlenmemiştir (70). Wilms ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada infertilite tedavisinde over stimülasyonu için klomifen sitrat ve gonadotropin uygulanmış 12 hastada daha sonra GHT oluşumu gözlemlendiği saptanmıştır. Tümör ve tedavi arasında nedensel bir ilişki kurulamamasına rağmen hayvan araştırmaları sonucunda gonadotropin ve GHT gelişimi arasında bir ilişki olduğu belirlenmiştir ve bu araştırmacılar over stimülasyonu ve GHT arasındaki olası ilişkiyi üç şekilde açıklamışlardır. İlk olarak granüloza hücreli tümör overde mevcuttur ve hormonal bir tetik beklemektedir; ikincisi artan folikül stimüle edici hormon konsantrasyonları GHT lere onkongenik bir etki oluşturmaktadır; üçüncüsü over stimülasyonu sırasında GHTlerin başlangıcı tesadüfidir (71). BRCA1 ve BRCA2 mutasyonlarının GHT geliştirmede yüksek risk oluşturmadıkları rapor edilmiştir (70, 72).

2.6.2. GHT'nin Klinik Özellikleri

En sık görülen semptomlar; uterusun anormal kanaması ve tümörün büyüklüğünden kaynaklanan ağrıdır. Doğurgan yaş grubundaki hastalarda; menstrual düzensizlikler, menoraji, ara kanamalar ya da amenore ve postmenopozal dönemdeki kadınlarda anormal uterus kanaması belirgin semptomlardandır (73). Yaşlı hastalarda, granüloza hücreli tümör belirtileri epitelyal over kanserinin belirsiz karın ağrısı ve kilo kaybı gibi belirtilerini taklit edebilir. 50 ve 60 yaşlarında bulunan 55 GHT li hasta ile yapılan çalışmada en önemli semptomların postmenopozal kanama, kitle varlığı, pelvik ya da abdominal kitle olduğu saptanmıştır. Benzer sonuçlar başka araştırmacılar tarafından da rapor edilmiştir. Hastaların yaklaşık %10'unda anormal kanama için yapılan ameliyat sırasında tümör tesadüfi olarak ya da alınan örneğin histolojik incelenmesiyle bulunur. Endometrial hiperplazi oluşumu sıklıkla endojenik östrojen etkisine dayandırılabilir. GHT'nin yaklaşık %25-50'si endometriyal hiperplazi ile ilişkili iken %5-13'ü endometriyal karsinom ile ilişkilendirilir. Bazen, endometrium kanseri granüloza hücreli tümörler için yapılan cerrahi evreleme sırasında tesadüfen teşhis edilebilir. GHT'lerle ilişkili endometriyal karsinomlar genellikle iyi differansiyedirler, erken evrede tanı alırlar ve iyi prognoz ile ilişkilendirilirler. GHT'ler endojen östrojen etkisi nedeniyle meydana gelen meme büyümesi ve hassasiyet ile ilişkilendirilir. GHT'lerin juvenil varyantı genellikle puberteden önce meydana gelir ve histolojik özellikleri ile erişkin GHT'lerden ayrılırlar. Otuz yaşın altında rastlanan GHT'lerin çoğu juvenil tip GHT'dir. GHT'ler jinekolojide en geç tekrar eden malignansilerdir. İlk tanıdan sonra 5 yıldan fazla bir zaman diliminde tekrarlar gözükmez. GHTler için 37 yıl en uzun rapor edilmiş tekrarlama süresidir (70, 72, 74).

GHT'nin inhibin ve anti-müllerian hormon gibi bazı tümör belirteçleri vardır. *Inhibin*: İnhibin, normal over folliküllerindeki granüloza hücrelerinden sentezlenen polipeptid yapıda bir hormon olup negatif feedback etki ile ön hipofizden folikül uyarıcı hormon (FSH) salınımını inhibe etmektedir. İnhibin sekresyonu FSH ve luteinize edicci hormone (LH) tarafından uyarılmakta ve özellikle menstrual siklusun folliküler fazında meydana gelmektedir. Gebe olmayan kadınlarda inhibinin kaynağı yalnızca over olarak görülürken, gebelerde plasenta bu hormonun üretimine katkıda bulunur. Postmenopozal kadınlarda ise inhibin seviyeleri düşüktür. GHT'de inhibin yüksekliği ilk olarak 1989 yılında Lappohn ve arkadaşları tarafından bildirilmiştir. Çalışmada yükselmiş inhibin seviyeleri yalnızca GHT için spesifik olmayıp özellikle müsinoz tip epitelyal over

kanserlerinde de yükseldiği gözlenmiştir. Bu nedenle daha çok tedavi altındaki hastaların monitorizasyonu ve rekkürenslerin tespitinde kullanılabilmektedir (70, 75, 74, 76).

Anti-müllerian hormon (AMH): Müllerian inhibitör madde olarak da adlandırılan AMH yakın zamanda tespit edilmiş bir tümör belirteçidir (76, 77). Başkalaştırıcı büyüme faktörü (TGF-transforming growth factor) süper ailesinin bir üyesidir. AMH, sertoli hücrelerinde testiküler farklılaşmadan ergenliğe kadar güçlü bir şekilde, GHT’de ise doğumdan menopoza kadar daha az bir seviyede ekspresyon olur (78, 79, 80, 81). Dişilerde AMH ekspresyonu doğumdan sonra başlar ve folikül büyümesini düzenler. Primer foliküllerin granüloza hücreleri homojen AMH ekspresyonu gösterirler. Yapılan çalışmalarla GHT’lerde AMH immünoreaktivliğinin her zaman bulunduğu tespit edilmiştir (78, 81).

2.6.3. GHT’nin patolojisi:

GHT’lerin genel görünümünde çok büyük farklılıklar vardır. İçerdikleri neoplastik hücrelerin ve fibrotekamatöz stromanın oranlarına bağlı olarak yumuşak veya sert olan katı tümörler iken lezyonda hücre içindeki lipit miktarına bağlı olarak da gri ya da sarı renklidirler (70).

Daha yaygın olarak GHT’ler kistiktirler. Dış görünümüleri müsinoz kistadenoma ve kist adenokarsinomları andırabilir. Bununla birlikte kesit alındığında seröz sıvı ve pıhtılaşmış kan ile dolu olduğu görülür. Kistik GHT’li hastaların %15’i ilk olarak hemoperitoneumla (periton boşluğunda kan toplanması) ilişkili akut karın incelemesi yapılır. Farklılaşmanın temelinde GHT’ler 2 temel kategoriye ayrılır: iyi ve orta differansiye. Mikrofolliküler, solid tübüler, difüz olarak adlandırılan çeşitli formlarda görülür. Bununla birlikte bu patternlerin bir karışımı tek bir tümörde bulunabilir. Orta derecede farklılaşmış olan tümör kategorisi, sarkomatoid olarak nitelenebilen diffüz patternne sahiptir. Nadiren diffüz paternli GHT’ler ameliyat esnasında donmuş kesitte az farklılaşmış karsinomlarla karıştırılabilirler. Çekirdeğe ait görüntü bu farkı ayırt etmede yardımcı olabilmektedir. Farklılaşmamış karsinomlar, adenokarsinomlar ve karsinoidler GHT ile yüzeysel olarak benzedikleri için yanlış tanı alabilirler. Bu tümörlerin her biri dikkat çekecek şekilde farklı prognozlara sahiptirler. GHT için bir karakteristik özellik ise çekirdeğin görüntüsüdür. Oval ya da köşeli, tekdüze ve solgun çekirdek GHT için tipiktir (kahve çekirdeği görüntüsü). Farklılaşmamış karsinomların çekirdeği sıklıkla

hiperkromatik, oluksuz, eşit olmayan boy ve şekildedir. Nükleer atipi ve çoklu mitotik figürler GHT için daha az yaygınken, farklılaşmamış karsinomlarda daha fazla gözlenmektedir (70, 72, 82).

2.6.4. GHT'nin Prognostik faktörleri:

GHT için prognostik önemi olan çeşitli faktörler bildirilmiştir. GHTlerin klinik seyri ağırı vermeden büyümesi ve bu yüzden tanı sırasında büyük tümör kitlesi ile karşılaşılmasıyla karakterizedir. Evre rekürrensle ilişkili tek klinik faktördür. Granüloza hücreli tümörü olan hastalar için, toplam 10 yıllık sağkalım oranları %60 ve %90 arasında olduğu bildirilmiştir, ancak 25 yıllık sağkalım oranı sadece % 40 ile % 60 arasında değişir (70).

Yaşın prognostik önemi ile ilgili çelişkili bilgiler mevcuttur. Bazı çalışmalarda 40 yaşın altındaki GHT'li hastalarda çok iyi prognoza sahip oldukları belirtilirken diğerleri 40 yaşın üstündeki hastaların iyi prognoza sahip olduğunu belirtmiştir (75).

Tümörün yırtılması prognostik önemi belirten bir faktördür. Bir çalışmada hastaların yırtılmamış tümöre sahip olduğu durumlarda hastalığın 25 yıllık sağkalım oranı %86 iken, aynı evrede yırtılmış olan tümörlere sahip hastada, %60 hayatta kalma oranı olduğu gösterilmiştir.

Büyük tümör boyutu bazı serilerde kötü prognostik faktör olarak bildirilmiştir. Tümör boyutu 10-15 cm'den büyük olanlarda evreden bağımsız olarak hayatta kalma süresi kısalmakta ve ölüm riski artmaktadır.

Histopatolojik özelliklerinden en önemli prognostik faktör ise mitotik indekstir. Her 10 büyütme alanı mitotik indeksi 10 mitozdan fazla olanlarda ortalama yaşam süreleri anlamlı derecede azalmaktadır. Hücresel atipi ve diferansiyasyon varlığının ise prognostik değeri düşüktür.

DNA analizlerine göre granüloza hücre tümörlerinin %5-20'si anöploiddir. Bazı araştırmalara göre anöploidin rekürrensler için bir ölçü olmadığı belirtilirken diğerlerine göre rekürrens için yüksek risk oluşturmaktadır. Buna benzer çelişkili sonuçlar p53 aşırı ekspresyonu ile ilişkili olarak da bildirilmiştir (75, 70, 82).

Sitogenetik ve moleküler faktörler; hücre proliferasyon markerları ve *p-53, c-myc* ya da *HER2* genlerinin ekspresyonlarının prognostik değerleri halen tartışmalıdır. Chan ve ark. yaptıkları çalışmada cerrahi olarak evreleme yapılan ve yapılmayan hastaların

ortalama yaşam süreleri açısından anlamlı bir farklılık olmadığını, ancak evreleme yapılmayan hastalarda rekürrens oranının, evreleme yapılan hastalara göre anlamlı şekilde daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir (%64, %28) böylece ilk cerrahisinde cerrahi evreleme yapılmamış hastalarda prognostik faktörleri tespit etmek, hastalığın evresini tanımlamak ve hangi hastaların postoperatif adjuvan tedaviden fayda görebileceğini belirlemek amacıyla tamamlayıcı cerrahinin yapılması tavsiye edilmektedir (75).

Tümör inisiyasyonu ve progresyonu, normal hücrelerin yüksek kötü huylu derivatiflere dönüşümünü sağlayan genetik değişiklikler gerektirmektedir. GHT ile ilişkili morfolojik özellikler tanımlanmış olmasına rağmen GHT'lerin oluşumunu sağlayan gen ekspresyonundaki değişimler belirsizdir. GHT 'lerin sitogenetik değişiklikleri hakkındaki bilgilerin eksik olmasından dolayı prognostik önemi tam olarak belirlenememiştir. Ailesel meme kanseri genleri *BRCA1* ve *BRCA2*, ile epitelyal over kanseri ilişkili olmasına rağmen GHT'ler için bu bildirilmemiştir.

Ayrıca bilinen birçok onkogen ve tümör baskılayıcı gen GHT patogenezindeki rolü için aday olarak incelenmiştir. 32 GHT'li hastanın bulunduğu bir çalışmada *c-myc*, *p21-ras*, *HER2* ve *p53*'ün immünohistokimyasal tespitinin prognostik öneminin olmadığı bulunmuştur. *Ras* protoonkogeni ve *TP53* tümör baskılayıcı genini aktive edici mutasyonlar epitelyal over kanserlerini de içeren insan kanserlerinde tanımlanmasına rağmen bu genlerdeki aşırı ekspresyonlar ve mutasyonlar GHT'nin özelliği değildir.

Shah ve ark. yaptıkları moleküler bir çalışmada *FOXL2* geninde tek somatik yanlış anlamlı mutasyon (402C → G) meydana gelerek 134(C134W) pozisyonundaki amino asitte triptofan rezidüsü ile sistin rezidüsünün yerdeğiştirdiği tanımlanmıştır. Daha sonra GHT'den DNA'yı direkt sekanslama ile mutasyon oranları belirlenmiştir. Buna göre erişkin GHT'nin 89'unun 86'sında (% 97), 10 juvenil GHT'nin 1'inde (%10) ve tekomaların 14'ünün 3'ünde (%21) mutasyon belirlenmiştir. Tek nükleotid mutasyonunun yüksek oranı onkogenik ya da fonksiyon kazanımı mutasyonu olduğunu düşündürür. Son dönemde yapılan çalışmalar mutant *FOXL2*'nin GHT'de tümör oluşumuna neden olduğu düşünülen mekanizmaya ışık tutmaktadır. Juvenil GHT dahil olmak üzere diğer tümör tiplerinde görülmeyen bu mutasyon erişkin tip GHT için ayırıcı bir belirteç görevi görmektedir (58).

Günümüzde, tümör oluşumunun altında yatan moleküler olayları aydınlatmaya yönelik çalışmalar, single-marker çalışmalarından (apoptik ve mücadele yanlısı yolakların kilit parçalarına odaklanmış çalışmalar), tümör profillerine doğru kaymıştır. Şimdiye kadar, GHT'lerin gen ekspresyon paternlerini tanımlamak için DNA mikroarraylerinden yüksek verimlilik alınmamıştır. GHT'lerin genetik, genomik ve proteomik düzeyde kapsamlı olarak çalışılması için klinik ve biyolojik olarak insan tümörlerini tamamen yansıtan hayvan modellerinin geliştirilmesi gelecekteki çalışma hedeflerini oluşturmaktadır (83).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1.Gereç

3.1.1. Materyal

İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı'nda granüloza hücreli over tümörü tanısı alarak opere edilen, 20 hastanın, parafin kesitlerinde inceleme yapıldı. Yaş ortalaması 53 (35-84) olan ve daha önce herhangi bir tedavi almamış, çoğunlukla farklı evrelere ve tümör çapına sahip hastalara ait özellikler tablo 3-1'de görülmektedir. İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Patoloji anabilim dalında arşivlenen doku kesitlerine *HER2* gen kopya sayısının tespiti için interfaz FISH yöntemi, *HER2* gen ürününün ekspresyon tayini için de IHC yöntemi uygulandı. FISH yönteminde 17q12-21 bölgesindeki *HER2* genini işaretlemek amacıyla lokusa özgü prob kullanıldı. IHC yöntemi için ise ABC yöntemi (avidin biotin kompleks) uygulandı. IHC için pozitif kontrol olarak yine Patoloji A.B.D'dan alınan meme tümör doku kesiti kullanıldı. FISH analizleri İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı sitogenetik laboratuvarı'nda, IHC analizleri ise İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp fakültesi Patoloji A.B.D.' da gerçekleştirildi.

Tablo 3-1: Çalışmada kullanılan hastalara ait özellikler.

Olgu	İsim	Yaş	Tümör çapı	Histolojik patern	Atipi	Mitoz/10BBA	Evre
1	A. A.	82	*	MAF,MİF	Görülmedi	0-1/10	1a
2	M. B.	44	*	MİF	hafif dereceli	3-6/10	1c
3	T. G.	51	5cm.	TRA	orta dereceli	0-2/10	1a
4	F. G.	84	18cm.	DFZ,TRA	hafif-orta dereceli	0-2/10	1c
5	S. T.	57	1,5cm.	MİF,TRA	orta dereceli	0-2/10	1a
6	A. O.	39	*	*	*	*	1a
7	B. Ö.	44	*	sarkomatöz patern	*	10-20/10	3c
8	İ.Y.	49	19cm.	GYR,TRA,MİF	hafif orta dereceli	0-5/10	1c
9	F. V. C.	44	*	*	*	15-20/10	3c
10	S. G	57	*	DFZ,	orta dereceli	3-8/10	3c
11	M. Ş.	35	*	MİF, MAF	Minimal	Görülmedi	1c
12	N. Ü.	61	16cm.	GYR, TRA, MİF	hafif dereceli	0-4/10	1c
13	N. Ş.	38	11cm.	TRA, MAF, MİF	hafif dereceli	0-2/10	1a
14	S. T.	63	*	*	hafif dereceli	0-2/10	1a
15	E. P.	47	11cm.	GYR, TRA, MİF, MAF	hafif dereceli	1-3/10	1a
16	S. K.	50	4,5cm.	GYR, TRA, MİF, MAF	hafif dereceli	0-3/10	1a
17	G. A.	60	12cm.	TRA, DFZ, MAF	hafif dereceli	3-5/10	1a
18	B. Z.	41	*	MİF	orta dereceli	4-8/10	1c
19	F. K.	54	*	MİF	hafif dereceli	0-4/10	1b
20	M. Y.	46	*	MİF	hafif dereceli	0-4/10	1c

MAF: Makrofoliküller patern, MİF: Mikrofoliküller patern, TRA: Trabeküler, SP: Sarkomatöz patern, GYR: gyriform, DFZ: diffüz, BBA: büyük büyütme alanı, *: veri yok, hastaların evreleri FIGO kriterlerine göre oluşturulmuştur.

3.1.2. Kimyasal maddeler ve malzemeler:

3.1.2.1. FISH

CYTOCELL AQUARIS HER2 AMPLİFİKASYON KİT:

Her2/cen-17 probemix 50 µL(5 test)

DAPI 150 µL (15 test)

Heat pretreatment solution 1lt.(kullanıma hazır)

Enzyme reagent (kullanıma hazır pepsin enzimi) 10ml.

Ayrıca;

Etanol (%96, %85, %70)

PBS (fosfat-buffer-salin)

SSC (salin sodyum sitrat; 20X,2X,0.4X)

3.1.2.2. IHC

C-erbB-2 Oncoprotein(HER-2) (Leica)

SPlink HRP Broad AEC (Golden bridge life science)

Simpo-Mount (WaterBased,universal)(Golden bridge life science)

Peroxide Block Solution (Scytek)

PBS (Labvision)

Citrate Buffer (Biooptica)

Haematoxylin Mayer's (Labvision)

XYLEN (Leica)

ETHANOL(%96, %99)

3.1.3. Çalışmada Kullanılan Cihazlar

Floresan mikroskobu (Nikon eclipse E600W)

Hot plate (Selecta)

Hibridizasyon cihazı (Thermobrite)

Buzdolabı (Arçelik)

Hassas Terazı (Shimadzu)

Benmari (Su Banyosu) (Köttermann)

Lam (pozitif yüklü) (Isotherm)

3.2. Yöntemler

3.2.1. FISH yöntemi

Deparafinizasyon (parafini uzaklaştırma işlemi):

- Parafine gömülü şekilde elimize ulaşan kesitlerdeki gömme mediumunu kaldırmak için deparafinizasyon işlemi 56°C de preparatların bir gece hibridizasyon cihazında bekletilmesi ile gerçekleştirilir.
- Hibridizasyon cihazından alınan preparatlar ksilol banyosuna alınarak 10 dk. bekletilir ve her seferinde ksilol banyosu tazelenerek işlem 3 kez tekrarlanır.

Rehidratasyon:

- Parafinden arındırılan preparatlar %100'lük alkol içerisine alınır ve 2 dakika bekletilir. Bu işlem alkol tazelenerek bir kez daha tekrarlanır.
- %100'lük alkolden alınan preparatlar %70'lik alkolde 2 dakika bekletilir. Bu işlemde alkol tazelenerek bir kez daha tekrarlanır.
- Preparatlar daha sonra oda sıcaklığındaki distile suya alınır ve 2 dakika bekletildikten sonra aynı işlem 2 kere daha tekrarlanır.
- Heat pretreatment uygulamasında preparatlar 98-100°C'deki su banyosundaki şale içerisinde heat pretreatment solüsyonuna alınarak 15 dakika bekletilir.
- Daha sonra oda sıcaklığındaki distile su içerisine alınarak 3 dakika bekletilir. Aynı işlem iki kez tekrarlanır.

Enzim reagent (pepsin) uygulaması:

Hücrelerdeki peptid bağlarının kırılmasını sağlayarak FISH probunun genomik hedef DNA'ya girişine olanak sağlar.

- Fazla sıvı süzildükten sonra preparatın üzerindeki doku kesitine 6-8 damla enzim damlatılarak 15 dakika bekletilir.
- Enzim uygulamasından sonra süzdürülen preparatlar distile su içerisine alınarak 2 dakika bekletilir. Aynı işlem 3 kez tekrarlanır.

Dehidratasyon:

- Preparatlar sırasıyla 2'şer dk. %70,%85,%100,%100 alkolden geçirilir ve kurumaya bırakılır.

Hibridizasyon:

İzleyen aşamalar karanlık ortamda gerçekleştirilir.

- Kuruyan preparatlardaki doku kesitlerinin üzerine daha önceden 37°C'ye getirilmiş HER2 probu bir pipet yardımıyla kesit alanının büyüklüğüne göre 5-10 µl eklenir.
- Prob eklenen lamın üzeri küçük bir lamelle altında hava kabarcığı kalmayacak şekilde kapatılır. Lamelin etrafı hava almaması ve probun zarar görmemesi için uhu benzeri bir yapıştırıcı ile yapıştırılır. Daha sonra preparatlar denatürasyon için hot plate'e alınarak burada 75 °C'de 5 dakika süre ile beklenir.
- Süre sonunda 37°C'deki nemli hibridizasyon cihazına alınarak burada 1 gece bekletilir.

Hibridizasyon Sonrası Yıkamalar:

- Ertesi gün lamellerin etrafındaki yapıştırıcı pens ile dikkatle kaldırılarak uzaklaştırılır ve üzerine kapatılan lameller yavaşça çıkarılır ve 65°C'ye getirilen benmari içinde 0,4 SSC'de preparatlar 2 dakika bekletilir.
- 25°C'deki 2SSC'ye alınır ve burada da 1 dakika bekletilir.
- SSC'den alınan preparatlar DAPI ile kapatılarak floresan mikroskobu ile incelenmeden önce +4°C' deki buzdolabında 10 dakika bekletilir. 10 dakika sonunda preparatlar mikroskopta incelemek için hazır hale gelir.

Preparatın taranması, Nikon Eclipse E600W floresan mikroskobunda DAPI/FITC/Rodamin üçlü filtre kullanılarak gerçekleştirildi ve Applied Imaging Powergene otomatik görüntüleme sistemiyle fotoğraflandı.

3.2.2. İmmünohistokimya yöntemi:

Parafine gömülü kesitlerin bulunduğu lamaların deparafinizasyonu ve kesitlerin lam üzerine tam olarak yapışmaları için bir gece boyunca 56°C sıcaklıkta etüvde bekletilir. Boyama işlemine başlamadan önce lamlar sırasıyla ksilolde 30 dakika, %99'luk alkolde 15 dakika, %96'lik alkolde 15 dakika bekletilerek distile suya alınır.

Daha sonra kesitlere sırasıyla aşağıdaki işlemler uygulanır:

- Formalin fiksasyonu ile oluşan gizlenmiş antijenik bölgelerin açığa çıkarılması amacıyla antijen Retrieval Reagent ile ön muamele yapılır. Bu işlem için Citrat Buffer solüsyonu kullanılır. Antijen retrieval işlemi mikrodalga fırında 5 dakika süreyle dört kez uygulanır ve daha sonra 20 dakika oda ısısında soğumaya bırakılır. Soğuyan lamlar distile suya alınır ve kesitlerin etrafı pappen kalem ile çizilerek 5 dakika Fosfat Buffer Salin (PBS) solüsyonunda bekletilir.
- Endojen peroksidaz aktivitesinin önlenmesi için kesitler %3'lük hidrojen peroksit ile inkübe edilir, lamlar distile su ile yıkanır ve 5 dakika PBS'te bekletilir.
- Non-spesifik zemin boyasını önlemek için kesitler 15 dakika blokaj solüsyonu ile inkübe edilir.
- Primer antikolar damlatıldıktan sonra lamlar distile su ile yıkanır ve 5 dakika PBS'te bekletilir.
- Primer antikora bağlanacak olan sekonder antikor solüsyonu damlatılır ve 25 dakika inkübe edilir. Süre sonunda lamlar distile su ile yıkanır ve 5 dakika PBS'te bekletilir.
- Sekonder antikora bağlanacak olan peroksidaz-streptavidin damlatılır ve 25 dakika inkübe edilir. Süre sonunda lamlar distile su ile yıkanır ve 5 dakika PBS'te bekletilir.
- Kesitler AEC kromojen ile 20 dakika inkübe edilerek görünür hale getirilir. Süre sonunda lamlar distile su ile yıkanır.
- Lamlar 3 dakika Mayer Hematoksilen'inde bekletildikten sonra musluk suyu ile yıkanır. Daha sonra 15 saniye amonyaklı suda bekletilerek distile suya alınır. Tüm preparatlar su bazlı kapatma malzemesiyle kapatılarak ışık mikroskopunda incelenir.

3.3. Değerlendirme

3.3.1. FISH:

FISH için inceleme Nikon Eclipse E600 W floresan mikroskopunda DAPI/FITC/Rodamin üçlü filtre ve 100X objektif kullanılarak yapıldı. Applied Imaging Powergene otomatik görüntüleme sistemiyle fotoğraflandı. Nükleus sınırları belirgin olan ve sinyalin güçlü olduğu, net görülebildiği hücreler değerlendirmeye alındı. Mikroskopun ince ayarı kullanılarak farklı derinliklerde bulunan sinyallerin görünmesi sağlandı. Bir hastada preparattaki hücre yetersizliği nedeniyle 38, 19 hastadan ise 50 nükleus sayıldı. Sinyaller yeşil ve kırmızı sinyaller olup kontrol amaçlı olan yeşil sinyal 17. kromozomun sentromer bölgesini, kırmızı sinyal ise 17q12 bölgesinde yer alan *HER2* gen bölgesini işaretlemektedir. 2 kırmızı sinyal ve 2 yeşil sinyal normal kabul edilirken kırmızı sinyal sayısının yeşil sinyal sayısının iki katından daha fazla olduğu durumlar ise amplifikasyon kabul edilecek şekilde değerlendirme yapıldı.

3.3.2. IHC:

IHC için ise ışık mikroskobu ile sitoplazmik membran boyanma özelliklerine bakıldı. Buna göre aşağıda belirtilen skor derecelerine göre ekspresyon düzeyleri belirlendi.

Skor 3 (kuvvetli pozitif): İmmünohistokimyasal yöntemde invaziv karsinom hücrelerinin en az %30'unda tüm sitoplazmik membranı çevreleyen tarzda kuvvetli immün boyanma olması durumunda (+++) kararına varılır.

Skor 2 (şüpheli pozitif): Benzer şekilde invaziv karsinom hücrelerinin en az %10'unda sitoplazmik membranı tümüyle çevreleyen ancak orta şiddette boyanma var ise ya da %30'undan daha az ama kuvvetli membranöz boyanma varlığında (++) kararına varılır.

Skor 1 (negatif): Hücrelerde membranı çevrelemeyen, varlığı zor saptanan, tam membranöz olmayan boyanmalarda (+) sonucuna varılır.

Skor 0 (negatif): Hücrelerde immün boyanma olmamasıdır.

4. BULGULAR

Çalışmada patolojik değerlendirilmeye göre granüloza hücreli over kanseri tanısı almış 20 hastadan hazırlanan parafin bloklardan elde edilen kesitlere FISH yöntemi uygulanarak *HER2* amplifikasyonuna ve IHC metodu uygulanarak *HER2* ekspresyonuna bakıldı.

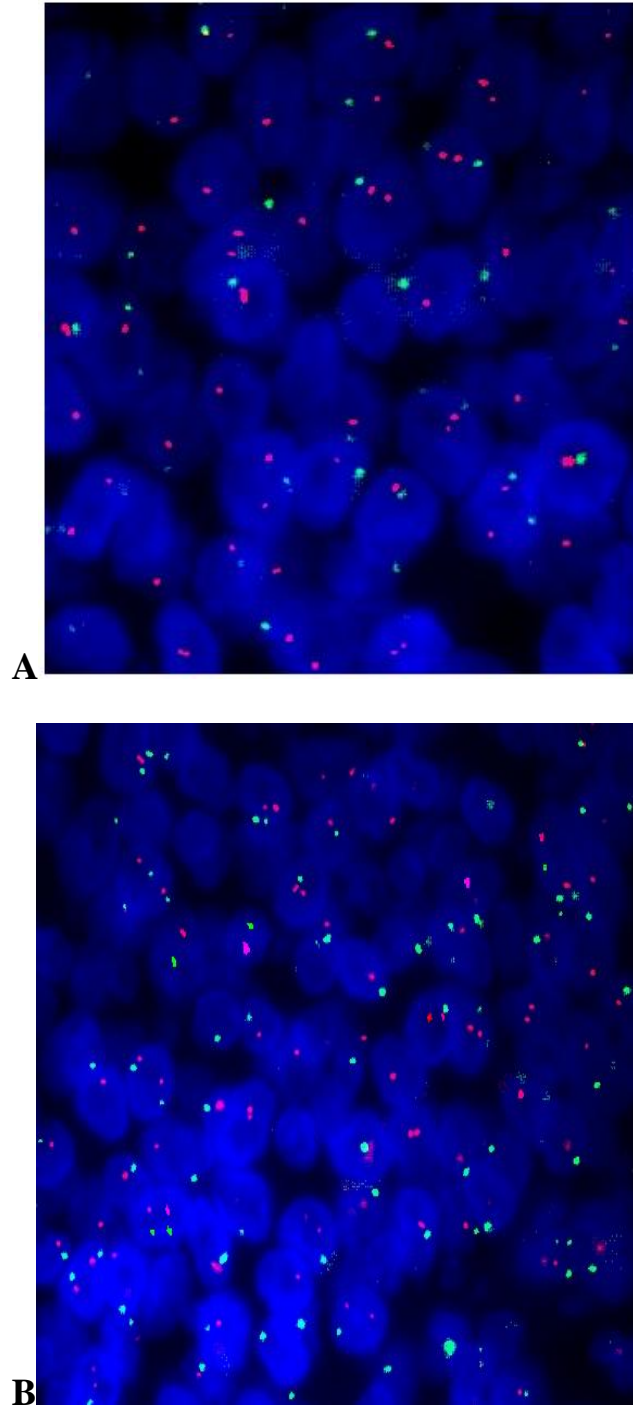
4.1. FISH:

Granüloza hücreli over tümörü dokusundan alınarak hazırlanmış parafine gömülü kesitlerde yapılan çalışmalarda FISH için 20 hastanın 19'undan 50 hücre ve 1 hastadan 38 hücre değerlendirilmiştir.

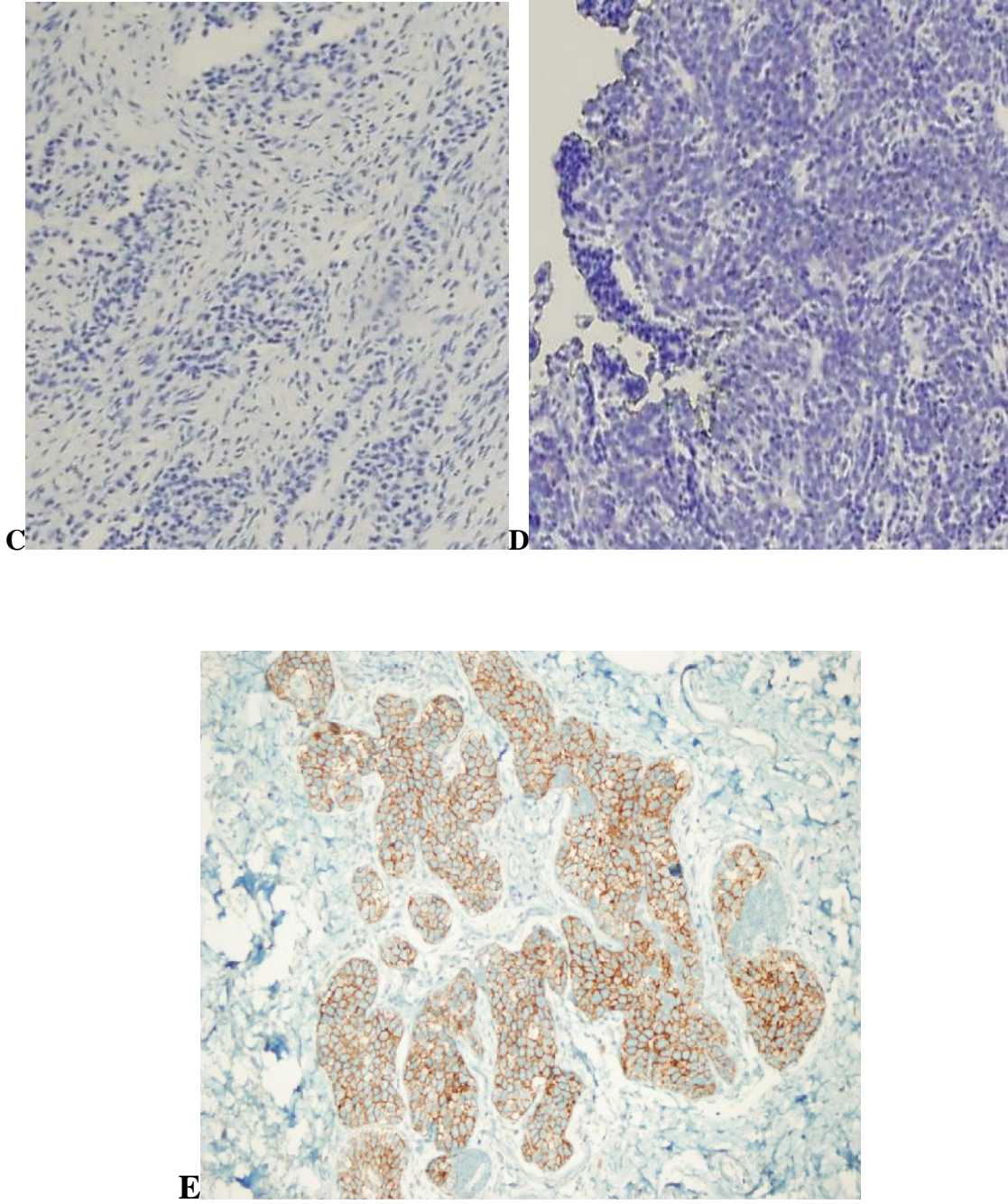
Granüloza hücreli over tümörlü hastalara ait doku kesitlerinde normal sinyal olarak kabul edilen iki yeşil iki kırmızı sinyal görüntüsü tespit edildi ve böylece hiçbir hastada amplifikasyon olmadığı sonucuna varıldı.

4.2. IHC:

IHC için ise 20 hasta kesiti ve pozitif kontrol dokusu olarak 1 meme tümörlü kesit kullanıldı. *HER2* ekspresyonunun belirlenebilmesi için membranöz boyanma dikkate alınarak boyamanın şiddetine göre ekspresyon seviyesi belirlenmeye çalışıldı. Buna göre pozitif kontrol meme kesitinde boyanma gözlenirken, 20 hastanın hiçbirinde immun boyanma olmadığı için skor 0 olarak belirlendi. Hastaların hiçbirinde ekspresyon gözlenmediği sonucuna varıldı. Elde edilen bulguların görüntüsü FISH için şekil 4-1'de IHC için şekil 4-2'de gösterilmiştir.



Şekil 4-1: Olgu 17 (A) ve olgu 15'e (B) ait interfaz FISH örnekleri (x100 büyütme).



Şekil 4-2: Olgu 17 (C) ,olgu 18 (D) ve kontrol meme doku kesitine (E) ait IHC örnekleri (x10 büyütme).

5. TARTIŞMA

Over kanseri kadın genital kanserleri içerisinde önemli bir yer tutar. Çünkü en çok ölüme neden olan genital kanser over kanseridir. Seks-kord stromal tümörler, germ hücreli tümörler ve metastatik tümörler genellikle nadirdirler; gelişim süreçleri henüz tam anlaşılammış ve hastalığın seyri ile ilgili faktörleri belirlenememiştir (84). Seks kord stromal tümörler grubunda yer alan granüloza hücreli over tümörlerinde yapılan çalışmalar oldukça azdır.

Onkogenler çeşitli tipteki hücrelerin proliferasyonunu uyarırlar. Örneğin bir tirozin kinaz olan EGFR amplifikasyonuna meme tümörlerinde rastlanmaktadır (39). *HER2* protoonkogeni EGFR reseptör tirozin kinaz ailesinin üyesi olan bir protein kodlar (24, 37, 40). *HER2* geninin amplifikasyonu invazif meme kanserlerinin %30'unda görülen önemli bir değişimdir ve erken evre meme kanserlerinde bağımsız bir prognostik faktördür. Aynı zamanda kemoterapötik ajanlara, anti östrojenlere ve terapötik anti *HER2* monoklonal antikörlerine oluşacak cevaba karşı öngörücü bir belirteçtir (84). Birçok çalışmada over karsinomlarında *HER2*'nin aşırı ekspresyonunun kötü prognozla ilişkili olduğu; bu tümörlerde *HER2* aşırı ekspresyonunun değişken oranlarda olduğu ve %30'a kadar artabildiği bildirilmiştir (40, 39, 85, 86, 87).

Biz de ender rastlanan, az çalışılmış ve çalışmaların sonunda çelişkili sonuçlar alınmış olduğundan granüloza hücreli tümörlerde *HER2* ekspresyonunu ve amplifikasyonunu incelemeyi ve bu grupta *HER2* geninin klinik öneminin belirlenmesindeki çalışmalara katkıda bulunmayı amaçladık. Çalışmamızda FISH ve IHC yöntemi ile incelediğimiz 20 olgunun hiçbirinde *HER2* amplifikasyonu ve ekspresyonu gözlemedik. GHT'lerde *HER2* amplifikasyonu ve ekspresyonu ile ilgili bizim yaptığımız çalışma ve diğer çalışmalar Tablo 5-1'de verilmiştir.

Tablo 5-1: GHT ile yapılan ekspresyon ve amplifikasyon çalışmalarının sonuçları

Yazar adı	Over tümörlü hasta sayısı	GHT'li over tümörlü hasta sayısı	FISH (+)	FISH (-)	IHC (+)	IHC (-)	REF. NO	YIL
Uzun N.	20	20	0	20	0	20	-	2012
Mayr D.	262	20	0	20	0	20	39	2006
Menczer J.	20	12	-	-	0	12	23	2007
Kusamura S.	18	18	-	-	0	18	88	2003
Leibl S.	40	40	-	-	0	40	89	2006
Furger C.	12	12	-	-	6	6	90	1998
King LA.	32	32	-	-	31	1	23	2007
Zheng J.	25	?	8	17	-	-	91	1991
Tuefferd M.	320	?	41	24	31	279	24	2007

Mayr ve ark. FISH ve IHC metodunu karşılaştırmalı olarak incelemiş ve yaptıkları çalışmada 1 den 3'e kadar dereceleri bulunan 262 over tümörlü (173 invazif over karsinomlu, 12 müsinöz, 5 berrak hücre karsinomlu), 36 borderline tümör (79 seröz, 16 müsinöz ve 1 endometrioid), 20 granüloza hücre tümörlü, 14 karsinosarkoma, 11 kistadenoma ve 8 diğer pelvik tümörlü hastada HER2 ekspresyonuna ve amplifikasyonuna bakarak ve sonuçları hastaların tümör tipleri, evreleri, klinikleri ile karşılaştırmalı olarak değerlendirmişlerdir. 5 invazif karsinomada güçlü ekspresyona rastlarken GHT'lerin ve selim tümörlerin hiçbirinde *HER2* ekspresyonuna rastlanmamıştır. İnvazif karsinomların 6'sında (3 seröz, 2 müsinöz, 1 endometrioid) güçlü amplifikasyona rastlanırken GHT'lerin ve selim tümörlerin hiçbirinde *HER2* amplifikasyonuna rastlanmamıştır. Histolojik tümör tipi, tümör seviyesi ya da evresinin gen amplifikasyonu ve ekspresyonuyla ilişkili olmadığını belirtmişlerdir ve meme kanserlerinin aksine over kanserlerinde HER2 analizlerinin prognozu ve tedaviyi tanımlamada kısıtlı bir rol oynadığını öne sürmüşlerdir (39). Mayr ve ark.'ının bu çalışması ile bizim sonuçlarımız uyumluluk göstermektedir. Evreleri farklı olan hasta grubumuzda (9 hasta evre 1a, 7 hasta evre 1c, 3 hasta evre 3c, 1 hasta evre 1b) biz de *HER2* ekspresyonuna ya da amplifikasyona rastlamadık. Bizim çalışmamız da Mayr ve ark.'nın ileri sürdükleri, HER2 amplifikasyon ve ekspresyon seviyelerinin tümör evresi ile ilişkisi olmadığı düşüncesini desteklemektedir.

Bizim çalışmamızla benzer sonuçlar elde edilen IHC yöntemi ile HER2 ekspresyonunu inceleyen çalışmalar şöyledir:

Menczer ve ark.'nın, 20 hastaya ait (12'si granüloza hücreli tümör ve 8'i germ hücre tümörlü) parafine gömülü doku kesitlerini immunohistokimyasal boyayarak yaptıkları bir çalışmada, granüloza hücre tümörlü ve germ hücre tümörlü hastaların hiçbirinde HER2 için immunohistokimyasal boyanmaya rastlanmamıştır yani HER2 ekprese ettikleri saptanmamıştır. Yazarlar, buna örnek sayılarındaki yetersizliğin neden olabileceği gibi, çalışmadaki hastaların çoğunun erken evrelerde tanı alması ile ilişkili olabileceğini belirtmişlerdir (23).

Kusamura ve ark. farklı atipilerdeki hücrelere, mitotik sayılara ve evrelere sahip (12 hasta evre I, 5 hasta evre III ve 1 hasta evre IV) 18 granüloza hücre tümörü ile yaptıkları çalışmada hastaların hiçbirinde HER2 ekspresyonuna rastlamamışlardır (88).

Yine Leibl ve ark.'nın, 40 granüloza (38 erişkin tip GHT ve 2 juvenil tip GHT) hücre tümörlü hastada yaptıkları çalışmada, belirli oranlarda HER1,HER3, HER4 ekspresyonuna rastlanırken, hiçbir hastada HER2 için sitoplazmik ya da membranöz boyanmaya rastlanmamıştır (89).

Bunların yanı sıra GHT'nin HER2 ekprese ettiğini belirten çalışmalar da vardır.

King ve ark.'nın inceledikleri 32 GHT'li vakanın 31'inde HER2 ekspresyonu (%97) tespit edilmiştir (23).

Furger ve ark. tarafından GHT'de HER1-4 ekspresyonlarını ayrı ayrı inceleyerek yapılan bir çalışmada; HER4 ekspresyonuna 12 vakanın 10'unda rastlanırken, 12 vakanın 6'sında HER2 ekspresyonu tespit edilmiştir. HER2'nin GHT oluşumu ve gelişmesindeki etkisinin daha fazla çalışılması gerektiği belirtilmiştir (90).

Daha sonra bulunan sonuçlardaki çelişkiler metodlardaki farklılığa ve IHC hassasiyetine karşı olan çeşitliliğe, farklı anti-her-2 klonlarına ve fiksasyon prosedürlerinden kaynaklanan kayıplara dayandırılmıştır (23,88, 89).

Metot farklılıklarından birine örnek verirsek; Leibl kendi çalışmasında, yukarıda bahsedilen Furger'in çalışmasını sadece sitoplazmik boyanma gösteren hücreleri HER2 pozitif kabul ederek yaptığını, bu tarz bir çalışmanın genellikle diğer araştırmacılar tarafından kabul görmediğini ve alınan pozitif sonuçların yanıltıcı olabileceğini belirtmiştir.

HER2, meme ve over kanserli hastaların yaklaşık %20'sinde amplifiye olmaktadır (25). Birçok kanser türünde FISH yöntemi ile *HER2* geninin amplifikasyonunu inceleyen çok sayıda çalışma vardır. GHT'lerde ise FISH yöntemi kullanılarak yapılan amplifikasyon çalışmaları yok denecek kadar azdır. Bu şekilde GHT konusundaki verilerin ve yapılan çalışmaların az olması nedeniyle verilerimizi yorumlamamız zorlaşmaktadır.

Biz çalışmamızda FISH yöntemi ile *HER2* amplifikasyonunu incelediğimiz hiçbir olguda amplifikasyona rastlamadık. over kanserlerinde FISH ile yapılan *HER2* amplifikasyon çalışmaları şu şekildedir:

Zheng ve ark. FISH yöntemi ile baktıkları over tümörlü 25 hastanın 8'inde *HER2* gen amplifikasyonu gözlemlemişlerdir (91).

Tuefferd ve ark.'nın 320 over tümörlü hastanın 65'inde FISH yöntemi ile bakılarak 41'inde *HER2* amplifikasyonuna rastlanırken 24'ünde amplifikasyon olmadığı tespit edilmiştir.

Zheng ve Tuefferd'in yaptıkları çalışmalarda over tümörlerini yalnız evrelerine göre ayrılmış, tiplerine göre herhangi bir ayırım yapılmadan amplifikasyon oranları belirlenmiştir. Dolayısıyla, Zheng'in yaptığı çalışmada *HER2* amplifikasyonu gözlenen 8 olgunun, Tuefferd'in yaptığı çalışmada ise amplifikasyon gözlenen 41 olgunun GHT dışı tümör tiplerine dahil olabilecekleri düşünülebilir.

Over kanserlerinde *HER2* amplifikasyonunun görüldüğünü belirten çok sayıda çalışma bulunmakla birlikte, bu çalışmalarda rastgele olarak seçilmiş over kanserli hastalarda *HER2* düzeyleri belirlenmeye çalışılmıştır (24, 23, 36, 40). Biz çalışmamızda seks kord stromal tümörlerin bir alt kolu olan GHT'leri spesifik olarak ayırarak hastalarımızın tamamında *HER2* negatifliğini gösterdik. Over kanserlerinin %20-30'unda *HER2* pozitifliğinin görüldüğünü belirten çalışmalarda da bu şekilde bir sınıflamanın mevcut olması durumunda daha farklı sonuçların alınacağı fikri öne sürülebilir.

GHT'lerin genellikle düşük dereceli maligniteye sahip olmaları ve hastalarımızın büyük çoğunluğunun erken bir safhada iken teşhis alması çalışmamızdaki negatif *HER2* amplifikasyon/ekspresyonun sonuçlarının nedenlerinden birini oluşturabilir.

Bu çalışmada GHT'nin pozitif HER2 durumu göstermemesi, over kanserinde çalışılmış olan trastuzumab ve perstuzumab gibi anti-HER2 terapötikleri yani HER2 hedefleyen tedavilerin bu tümörlerde uygun olamayacağını düşündürmekle birlikte, çalışılan hasta sayısının yetersizliği nedeni ile bu konuda daha fazla çalışma yapılmasına gerek duyulmaktadır

Sonuç

Bu çalışmada, seks-kord stromal tümörlerinin alt kollarından birini oluşturan granüloza hücreli over tümörleri ile ilgili yapılan çalışmalardaki çelişkili ve az sayıdaki verilere katkıda bulunulmuştur. Yaptığımız çalışmanın sonuçları özellikle erken evrelerde GHT'de HER2 amplifikasyonun/ekspresyonun olmadığı ve GHT'li hastalarda HER2 durumunun, tümör tipi ve çapı ile herhangi bir ilişkisi bulunmadığı görüşünü desteklemektedir. Ayrıca granüloza hücreli over tümörlerinin anti-HER2 terapötiklerinden yarar sağlayamayacağını düşündürmektedir. Sonuçlarımız meme kanserlerinin aksine granüloza hücreli over tümörlerinde HER2 analizlerinin hastalığın izlenmesinde bir öneme sahip olmadığını destekler nitelikte olmakla birlikte bu konu ile ilgili daha fazla çalışma gereklidir.

KAYNAKLAR

1. Edson MA, Nagaraja AK, Matzuk MM. The Mammalian Ovary From Genesis Revelation Mark A. Edson. *Endocr Rev.* 2009 Oct;30 (6):624-712.
2. Kumar V. Cotran RS. Robbin SL. Çeviri editörü; Prof Dr. U. Çelikbaş. Basic pathology. Nobel tıp kitabevleri :2000. ISBN975-420-044.
3. Carlos Junquivera. Çeviri editörü; Prof. Dr. Yener Aytekin. Temel Histoloji. Barış kitabevi: 8. Baskı. 1998.
4. Abraham I. Kierszenbaum. Histology and cell biology. USA. 2002. ISBN 0-323-01639-1.
5. Kumar V. Cotran RS. Robbins SL. Basic Pathology.Philedelphia: Wb saunders camp 1992. ISBN 0-7216-37329.
6. Alican F. Kanser. İkinci baskı. İstanbul,1997.
7. FIGO Committee on Gynecologic Oncology.: Current FIGO staging for cancer of the vagina, fallopian tube, ovary, and gestational trophoblastic neoplasia. *Int J Gynaecol Obstet* 2009; 105 (1): 3-4.
8. Shimizu Y, Kaomi S, Amada S. Toward the development of an universal grading systems for ovarian epithelial carcinoma. Testing of a proposed system ina series of 461 patients with uniform treatment and follow up. *Cancer* 1998,82:893-901.
9. Güner H. Jinekolojik Onkoloji. Ankara; Rota tıp kitabevi: 2010. ISBN 978-605-4089-32-3.
10. Kruh GD, Tew KD. Basic Science of Cancer. Philadelphia: Current Medicine, Inc., 2000.
11. Janice G. Hoboken NJ.Biology of cancer (2snd edition) ,USA: 02/2008 wiley pages:220.
12. Prober David A, Edgar Bruce A. Growth regulation by oncogenes-new insights from model organism. *Current Opinion in Genetics & Development* 2001; 11:19–26.
13. Borrello Maria G, Degl’Innocenti D, Pierotti Marco A. An inflammation and cancer: The oncogene-driven cconnection. *Cancer Letters* 267 2008; 262–270.
14. Brandt R, Paul W. Oncogenes and oncoproteins in occupational carcinogenesis. *Scand J Work Environ Health* 1992;18 Suppl 1:27-30.

15. Diamandis Eleftherios P. Clinical applications of tumor suppressor genes and oncogenes in cancer. *Clinica Chimica Acta* 1997; 157-180.
16. Turgut Ulutin. Temel genetik Genetik. İstanbul. 2009 Cerrahpaşa tıp fakültesi yay.ISBN 978-975-404-826-1.
17. Alberts B. Johnson A. Hücrenin moleküler biyolojisi. Ankara: Tüba 2000.
18. Telkoparan P, Tazebay Uygur H. Ras Protein Ailesi: Hücresel işlevi, moleküler kontrolü,onkogenezdaki rolü. *Türk Biyokimya Dergisi* 2011; 36 (4) ; 367–373.
19. Knowles M. Selby P. Introduction To The Cellular And Molecular Biology of Cancer. Newyork: Oxford Uni. Press 2005.
20. Moasser MM. The oncogene HER2: its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis. *Oncogene*. 2007 Oct 4;26(45):6469-87.
21. Reesedavid M, Slamon Dennis J. Her-2/neu Signal transduction in human breast and ovarian cancer. *Stem cells* 1997; 15:1-8.
22. McAlpine Jessica N, WiegandKimberly C,VangRussell. HER2 overexpression and amplification is present in a subset of ovarian mucinous carcinomas and can be targeted with trastuzumab therapy. *BMC Cancer* 2009; 9:433.
23. Menczer J, Schreiber L, Czernobilsky B, Berger E, Golan A, Levy T. Is her-2 neu expressed in nonepithelial ovarian malignancies? *Am J Obstet Gynecol*. 2007 Jan;196(1):79.e1-4.
24. Tuefferd M, Couturier J, Penault-Llorca F, Vincent-Salomon A, Broët P, Guastalla JP, Allouache D, Combe M, Weber B, Pujade-Lauraine E, Camilleri-Broët S. HER-2 status in ovarian carcinomas: A multicenter GINECO study of 320 patients.*PLoS One* 2007 Nov 7;2(11):e1138.
25. Gutierrez C, Schiff R. Her2 biology, detection and clinical implications. *Arch Pathol Lab Med*. 2011 Jan; 135(1):55-62.
26. William S Klug. Genetik. Ankara palme yayıncılık. 6. baskı, 2009.
27. Stass SA, Mixson J. Oncogenes and tumor suppressor genes: Therapeutic implications. *Clin Cancer Res*.1997; Dec;3(12 Pt 2):2687-95.
28. Soussi T, Legros Y, Lubin R, Ory K, Schlichtholz B. Multifactorial analysis of p53 alteration in human cancer: a review. *Int J Cancer* 1994 Apr; 1;57(1):1-9.
29. Bellati F, Napoletano C,GasparriLuisa M,Visconti V, ZizzariGrazia I,Ruscito I,Caccetta J,Rughetti A, Benedetti-Panici P,NutiM. Monoclonal Antibodies in

- Gynecological Cancer: A Critical Pointview. *Clinical and Developmental Immunology* 2011; 2011:890758.
30. Wheeler Deric L , Dunn Emily F , and Harari Paul M. Understanding resistance to EGFR inhibitors-impact on future treatment strategies. *Nat Rev Clin Oncol*. 2010 September; 7(9): 493–507.
 31. Eccles SA. The epidermal growth factor receptor/erb-b/ Her family in normal and malignant breast biology. *Int J Dev Biol*. 2011;55(7-9):685-96.
 32. Steffensen KD, Waldstrøm M, Andersen RF, Olsen DA, Jeppesen U, Knudsen HJ, Brand slund I, Jakobsen A. Protein levels and gene expressions of the epidermal growth factor receptors, HER1, HER2, HER3 and HER4 in benign and malignant ovarian tumors. *International journal of oncology* 2008;33:195-204
 33. Sheng Q , Liu J . The therapeutic potential of targeting the EGFR family in epithelial ovarian cancer. *Br J Cancer* 2011 April 12; 104(8): 1241–1245.
 34. Gene database: erişim 13.09.2012 .http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/location/view?g=ENSG00000141736;r=17:37844167.
 35. Rubin I, Yarden Y. The basic biology of HER2. *Ann Oncol*. 2001;12 Suppl 1:S3-8.
 36. Tai W, Mahato R, Cheng K. The role of her2 in cancer therapy and targeted drug delivery. *J Control Release*. 2010 September 15; 146(3): 264–275.
 37. Hellstrom I, Goodman G. Overexpression of her-2 in ovarian carcinomas. *Cancer research* March 15, 2001. 2420–2423.
 38. Bartsch R, Wenzel C, Zielinski CC, Steger GG. HER-2-positive breast cancer: hope beyond trastuzumab. *BioDrugs*. 2007;21(2):69-77.
 39. Mayr D. Her-2 neu gene amplification in ovarian tumours: a comprehensive immunohistochemical and FISH analysis on tissue microarrays. *Histopathology* 2006 Jan;48(2):149-56
 40. Estrid V. S. Høgdall. Distribution of her2 overexpression in ovarian carcinoma tissue and its prognostic value in patients with ovarian carcinoma. *Cancer*. 2003 Jul 1; 98(1):66-73.
 41. Kearney L. The impact of the new FISH Technologies on the cytogenetics of haematological malignancies. *Br J Haematol*. 1999 Mar;104(4):648-58.
 42. Interphase cytogenetics in pathology: principles, methods and applications of fluorescence in situ hybridization (FISH). *Histochem Cell Biol*. 1997 Oct-Nov;108(4-5):381-90.

43. Cuneo A, Bigoni R, Roberti MG. Detection of numerical aberrations in hemological neoplasias by fluorescence in situ hybridization. *Haematologica*. 1997 Jan-Feb;82(1):85-90.
44. Wan TS, Ma ES. Molecular cytogenetics: an indispensable tool for cancer diagnosis. *Chang Gung Med J*. 2012 Mar-Apr;35(2):96-110.
45. Au WY, Ma SK, Wan TS, Man C, Kwong YL. Pentasomy 8q in therapy-related myelodysplastic syndrome due to cyclophosphamide therapy for fibrosing alveolitis. *Cancer Genet Cytogenet* 2003;141:79-82.
46. Barlett JM, Forsyth A. Detection of HER2 gene amplification by fluorescence in situ hybridization in breast cancer. *Methods Mol Med* 2006;120:309-22.
47. Idikio HA. Immunohistochemistry in diagnostic surgical pathology: contributions of protein life-cycle, use of evidence-based methods and data normalization on interpretation of immunohistochemical stains. *Int J Clin Exp Pathol*. 2009 Nov 25;3(2):169-76.
48. Haines DM, Chelack BJ. Technical considerations for developing enzyme immunohistochemical staining procedures on formalin-fixed paraffin-embedded tissues for diagnostic pathology. *J Vet Diagn Invest*. 1991 Jan;3(1):101-12.
49. Temizkan G. Moleküler biyolojide kullanılan yöntemler. İstanbul; Nobel tıp kitabevi 2004.
50. Arıkan, İ. Epitelyal ve Nonepitelyal Malign Over Tümör. İstanbul Tıp Dergisi, 2004; 4:20-22.
51. Ferlay J, Autier P, Boniol M, Heanue M, Colombet M, Boyle P. Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. *Ann Oncol* 2007;18:581-92.)
52. Rosen DG, Yang G, Liu G. Ovarian Cancer: Pathology, Biology, and Disease models. *Front Biosci*. 2009 Jan 1;14:2089-102.
53. Hippisley J. Identifying women with suspected ovarian cancer in primary care: derivation and validation of algorithm. *BMJ* 2012; 4;344:d8009.
54. Ovarian cancer: the recognition and initial management of ovarian cancer. *National Collaborating Centre for Cancer (UK)*; April 2011. ISBN-13: 978-0-9558265-5-9.
55. Runnebaum IB, Stickeler E. Epidemiological and molecular aspects of ovarian cancer risk. *J Cancer Res Clin Oncol* 2001;127:73-79.

56. Yancik R. Ovarian Cancer. Age contrasts in incidence, histology, disease stage at diagnosis, and mortality. *Cancer* 1993;71:517-523.
57. Gilks, Blake C. Molecular Abnormalities in Ovarian Cancer Subtypes Other than High-Grade Serous Carcinoma. *Journal of Oncology* 2010, Article ID 740968, 7 pages doi:10.1155/2010/740968.
58. Jamieson S, Fuller PJ. Molecular Pathogenesis of Granulosa Cell Tumors of the Ovary . *Endocr Rev.* 2012 Feb;33(1):109-44. Epub 2012 Jan 12.
59. Decruze S.B., Kirwan J.M.. Ovarian cancer. *Current obstetrics&gynaecology* 2006, volume 16, issue 3, pages 161-167.
60. Colombo N, Van Gorp T, Parma G. Ovarian cancer. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2006 Nov;60(2):159-79.
61. Jamieson S, Fuller Peter J. Molecular Pathogenesis of Granulosa Cell Tumors of the Ovary. *Endocrine Reviews*, February 2012, 33(1):109–144.
62. Tanaka YO, Saida TS. MR findings of ovarian tumors with hormonal activity, with emphasis on tumors other than sex cord-stromal tumors. *Eur J Radiol.* 2007 Jun;62(3):317-27.
63. Pearson D. Gynecological cancer management:identification,diagnosis and treatment.Wiley-blackwell 2009 ISBN:1405190795.
64. Mehdi T, et al. Rare recurrence of a rare ovarian stromal tumor with luteinized cells: a case report. *Journal of Medical Case Reports* 2011, 5:350.
65. Gershenson DM. Current advances in the management of malignant germ cell and sex cord-stromal tumors of the ovary. *Gynecol Oncol.* 2012 Jun;125(3):515-7.
66. Chan JK, Zhang M, Kaleb V, et al. Prognostic factors responsible for survival in sex-cord stromal tumours of the ovary: a multivariate analysis. *Gynecol Oncol* 2005; 96:204-209.
67. Yim GW, Kim YT. Granulosa cell tumour of the ovary: time lunch a new prospective trial. *J Gynecol Oncol* 3143-144.
68. Lee I. Clinicopathologic characteristics of granulosa cell tumors of the ovary: a multicenter retrospective study. *J Gynecol Oncol* Vol. 22, No. 3:188-195.
69. Shah SP, Ko bel M, Senz J. Mutationof FOXL2 in granulosa-cell tumors of the ovary. *N EnglJ Med* 2009 Jun 25;360(26):2719-29.

70. Koukourakis G. Granulosa cell tumour of the ovary: tumor review. *Integr Cancer Ther.* 2008 Sep;7(3):204-15.
71. Willemsen W, Kruitwagen R. Ovarian stimulation and granulosa-cell tumour. *Lancet.* 1993 Apr 17;341(8851):986-8.
72. Roth LM. Recent Advances in the Pathology and Classification of Ovarian Sex Cord Stromal Tumors. *Int J Gynecol Pathol.* 2006 Jul;25(3):199-215.
73. Segal R, DePetrillo AD, Thomas G. Clinical review of adult granulosa cell tumors of the ovary. *Gynecol Oncol* 1995;56(3): 338–44.
74. Pectasides D, Pectasides E, Psyrris A. Granulosa cell tumor of the ovary. *Cancer Treat Rev.* 2008 Feb;34(1):1-12. Epub 2007 Oct 22.
75. Bharwani N, Reznick Rodney H, Rockall Andrea G. Review Ovarian Cancer Management: The role of imaging and diagnostic challenges. *European Journal of Radiology* 2011; 41–51.
76. Rey RA, Lhomme C, Marcillac I. Antimüllerian hormone as a serum marker of granulosa cell tumors of the ovary : comparative study with serum alpha inhibin and estradiol. *Am J Obstet Gynecol* 1996;174:958-965.
77. Jobling T, Mamers P, Healy DL, et al: a prospective study of inhibin in granulosa cell tumors of the ovary. *Gynecol Oncol* 1994;55:285-289
78. La Marca A, Volpe A. The Anti-Müllerian hormone and ovarian cancer. *Hum Reprod Update.* 2007 May-Jun;13(3):265-73.
79. Cupisti S, Dittrich R, Mueller A, Strick R, Stiegler E, Binder H et al. Correlation between anti-müllerian hormone inhibin B and activin A in follicular fluid in VF/CS patients for assessing the maturation and developmental potential of oocytes. *E J Med Res* 2007; 12(12) 604–608.
80. Van Rooij IA, Broekmans FJ, te Velde ER, Fauser BCJM, Banesi LF, de Jong FH et al. Serum Anti-müllerian Hormone levels. a novel measure of ovarian reserve. *Hum Reprod* 2002; 17: 3065 – 3071.
81. Karkanaki A, Vosnakis C, Panidis D. The clinical significance of anti-Müllerian hormone evaluation in gynecological endocrinology. *Hormones* 2011, 10(2):95-103.

82. Geetha P, Nair M K. Granulosa cell tumor of the ovary. *Obstetrics and Gynaecology* 2010; 50: 216–22.
83. Colombo N, Parma G, Zanagnolo V, Insinga A. Management of Ovarian Stromal Cell Tumors. *J Clin Oncol*. 2007 Jul 10;25(20):2944-51.
84. Press MF, Slamon JD. Evaluation of HER2 gene amplification and overexpression: comparison of frequently used assay methods in a molecularly characterized cohort of breast cancer specimens. *Journal of clinical oncology* 2002, vol 20 no 14 pp: 3095-3105.
85. Verri E, Guglielmini P, Puntoni M, et al. HER2/neu oncoprotein overexpression in epithelial ovarian cancer: evaluation of its prevalence and prognostic significance. Clinical study. *Oncology* 2005;68:154-61.
86. Cirisano FD, Karlan BY. The role of the HER-2/neu oncogene in gynecologic cancers. *J soc gynecol investing* 1996;3(3):99-105.
87. Bookman MA, Darcy KM, Clarke-Pearson D, Boothby RA, Horowitz IR. Evaluation of monoclonal humanized anti-HER2 antibody, trastuzumab, in patients with recurrent or refractory ovarian or primary peritoneal carcinoma with overexpression of HER2: a phase II trial of the Gynecologic Oncology Group. *J Clin Oncol* 2003;21:283-90.
88. Kusamura S, Derchain S, Alvarenga M, Gomes CP, Syrjanen KJ, Andrade LA. Expression of p53, c-erbB-2, Ki-67, and CD34 in granulosa cell tumor of the ovary. *Int J Gynecol Cancer* 2003;13:450-7.
89. Leibl S, Bodo K, Gogg-Kammerer M, et al. Ovarian granulosa cell tumors frequently Express EGFR (Her-1), Her-3, and Her-4: an immunohistochemical study. *Gynecol Oncol* 2006;101:18-23.
90. Furger C, Fiddes RJ. Granulosa Cell Tumors Express erbB4 and Are Sensitive to the Cytotoxic Action of Heregulin-32/PE401. *Cancer Res*. 1998 May 1;58(9):1773-8.
91. Zheng Jianping, Robinson William R., Ehlen Thomas. Distinction of Low Grade from High Grade Human Ovarian Carcinomas on the Basis of Losses of Trimble

CL, Kosary C. Long-term survival and patterns of care in women with ovarian tumors of low malignant potential. *gynecol ocol.* 12002;86:34-37.

ETİK KURUL KARARI



Sayı : 16416
Konu :

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ
DEKANLIĞI



İstanbul / /

Temel Tıp Bilimleri Bölümü
Başkanlığına

09 Mayıs 2011

İLGİ: 18.03.2011 tarihli, 413 sayılı yazınıza:

Bölümünüze bağlı Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi **Prof.Dr.Seniha HACIHANEFİOĞLU'nun** danışmanlığında **Yüksek Lisans Öğrencisi Neslihan UZUN'un** yürüttüğü "Granüloz Hücreli Over Tümörlerinde Her-2 amplifikasyonunun FISH, ekspresyonun IHC metodu ile gösterilmesi" başlıklı **Yüksek Lisans Tezi** hakkında ilgi yazınız ve ekleri **03 Mayıs 2011** tarihinde toplanan Fakültemiz Klinik Araştırmalar Etik Değerlendirme Kurulunca müzakere edilmiş olup, etik açıdan uygun olduğuna karar verilmiştir.

Bilgilerinizi, durumun adı geçen anabilim dalı başkanlığına bildirilmesini saygılarımla rica ederim.

Eki:
1 dosya

Prof.Dr.Fatih ALTINDAŞ
Dekan Yardımcısı ve Klinik Araştırmalar
Etik Değerlendirme Kurulu Başkanı

Not: Yanıtlarda yazımın gün sayısının belirtilmesi rica olunur. Tel(0212)4143000

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	NESLİHAN	Soyadı	UZUN
Doğ.Yeri	İZMİR	Doğ.Tar.	18.10.1985
Uyruğu	T.C.	TC Kim No	
Email	neslihanuzun01@gmail.com	Tel	5324885524

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora		
Yük.Lis.	İ.Ü Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi biyoloji programı	2012
Lisans	Celal Bayar üniversitesi	2009
Lise	Haydarpaşa anadolu lisesi	2004

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.			-
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	iyi	iyi	İyi	60	
Almanca	iyi	iyi	İyi		

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı	81	80	89
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft office	İyi

Yayımları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

Neslihan Uzun, Dilhan Kuru, Şükriye Yılmaz, Yelda Tarkan Argüden, Ayşe Çırakoğlu, Ayşe Salihoğlu, Emine Gültürk, Ahmet Emre Eşkazan, Şeniz Öngören Aydın, Zafer Başlar, Teoman Soysal, Ayhan Deviren, Seniha Hacıhanefioğlu. Polisitemia Vera Olgularında Gözlenen Sitogenetik Düzensizlikler. Bildiri