

TC.
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
Patoloji Anabilim Dalı

**MİDE KANSERLERİNDE HER-2 GEN EKSPRESYONU ve
c-MET EKSPRESYONUNUN
HİSTOPATOLOJİK PROGNOSTİK PARAMETRELER ile
İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ
Dr. Ferhat Coşkun

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Semin Ayhan

Manisa, 2017

Uzmanlık eğitimim ve tez çalışmam boyunca bilgi, birikim ve tecrübeleriyle bana yol gösterici ve destek olan, enerjisi ve titizliğine hayran olduğum tez danışmanım Prof. Dr. Semin Ayhan'a; sonsuz hoşgörüsü ve sabrıyla her konuda desteğini ve emeğini esirgemeyen Prof. Dr. Aydın İşisağ'a; deneyimleri ve bilimsel bakış açısıyla eğitimime yön veren, pratiklik ve hızlı düşünmenin patolojideki önemini bize öğreten Prof. Dr. Ali Rıza Kandiloğlu'na; zorlu asistanlık süresince bilgi ve deneyimlerini esirgemeyen, şefkati ve hoşgörüsü ile eğitimime büyük katkı sağlayan Prof. Dr. Peyker Temiz'e; bilgisi, azmi ve çalışkanlığına hayran olduğum, gerektiğinde bizimle arkadaş gibi olma tevazusunu gösterebilen Prof. Dr. Nalan Neşe'ye; yoğun iş temposuna rağmen bize yardımcı olmaya çalışan, neşesi ve çalışkanlığı ile örnek tablo oluşturan Uzm. Dr. Ayça Tan'a, tezimin istatistiksel değerlendirmesinde emeği geçen Halk Sağlığı Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Beyhan Cengiz Özyurt'a;

Birlikte çok güzel hatıralar biriktirdiğim, beraber çalışmaktan büyük zevk duyduğum asistan arkadaşlarıma; asistanlığım süresince birlikte çalıştığım ve tez süresince bana yardımcı olan, laboratuvar ekibi, personel ve sekreter arkadaşlarıma; tüm eğitim hayatım boyunca bana destek veren ve haklarını hiçbir zaman ödeyemeceğim aileme, yanımda olmasından güç aldığım, her zaman desteğini hissettiğim sevgili eşime ve enerji kaynağım biricik oğluma teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Ferhat Coşkun

İÇİNDEKİLER

I.	GİRİŞ	1
II.	GENEL BİLGİLER	3
	Mide Kanseri Epidemiyolojisi	3
	İnsidans ve Mortalite	3
	Sağkalım	4
	Coğrafi Dağılım	4
	Tümör Lokalizasyonu	5
	Yaş ve Cinsiyet	5
	Etiyoloji	6
	Helikobakter Piloni Enfeksiyonu	6
	Epstein-Barr Virüs (EBV) Enfeksiyonu	7
	Beslenme Alışkanlığı	7
	Sigara	8
	Alkol	8
	İyonizan Radyasyon	8
	Sosyo-ekonomik Durum	8
	Meslek	9
	Kişisel Faktörler	9
	A Kan Grubu	9
	Parsiyel Gastrektomi	9
	Pernisyöz Anemi	9
	Aile Öyküsü ve Kalıtsal Faktörler	10
	Mide Karsinomlarının Prekürsör Lezyonları	12
	Kronik Atrofik Gastrit ve İntestinal Metaplazi	12
	Gastrik Displazi	12
	Gastrik Adenom	12
	Hiperplastik Polip	13

Fundik Bez Polibi	13
Barret Özofagusu	13
Mide Karsinomlarının Sınıflandırılması	14
Lauren Sınıflaması	15
Dünya Sağlık Örgütü Sınıflaması	16
Mide Karsinomlarının Derecelendirmesi	19
Mide Karsinomlarının Yayılımı ve Evrelemesi	19
Mide Karsinomlarında Tedavi	22
Mide Karsinomlarında Prognoza Etki Eden Faktörler	24
İnsan Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü-2 (HER-2)	25
Mezenkimal Epitelyal Dönüştürücü Faktör (c-MET)	27
III. GEREÇ VE YÖNTEM	29
IV. BULGULAR	36
V. TARTIŞMA	60
VI. SONUÇ ve ÖNERİLER	69
VII. ÖZET	73
VIII. İNGİLİZCE ÖZET (ABSTRACT)	75
IX. KAYNAKLAR	77

KISALTMALAR

ABD: Amerika Birleşik Devletleri

AJCC/UICC: American Joint Committee on Cancer/International Union
Against Cancer

CDH1: E-kaderin

CISH: Kromojen İn Situ Hibridizasyon

c-MET: Mezenkimal Epitelyal Dönüştürücü Faktör

DNA: Deoksiribonükleik asit

DSÖ: Dünya Sağlık Örgütü

EBV: Epstein-Barr virüs

EGFR: Epidermal growth faktör reseptörü

EMA: European Medicines Agency

EMK: Erken Mide Karsinomu

ERK: Ekstrasellüler Düzenleyici Kinaz

FAP: Ailesel Adenomatosis Poliposis

FDA: Food and Drug Administration

FGFR-2: Fibroblast Büyüme Faktör Reseptörü-2

FISH: Florasan İn Situ Hibridizasyon

GSK: Genel Sağlık

HDGC: Herediter Diffüz Gastrik Kanser

HER-2: İnsan Epidermal Büyüme Faktör-2

HGF: Hepatosit Büyüme Faktörü

HP: Helikobakter Piloni

İHK: İmmunhistokimya

İM: İntestinal Metaplazi

İMK: İlerlemiş Mide Karsinomu

KT: Kemoterapi

PIK3CA: Fosfatidil İnositol Trifosfat Kinaz

PSK: Progresyonsuz Sağlık

PTEN: Fosfataz ve tensin homolog

RT: Radyoterapi

RT-PCR: Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction

SISH: Silver İn Situ Hibridizasyon

TKR: Tirozin Kinaz Reseptörü

TNM: Tümör-Lenf Nodu-Metastaz

ToGA: Trastuzumab for Gastric Cancer



GİRİŞ

Yirminci yüzyılın ikinci yarısından itibaren, görülme sıklığı ve ölüm oranında belirgin bir azalma olmasına rağmen, halen mide kanserleri dünyadaki kansere bağlı ölümler arasında ilk sıralarda yer almaktadır. Cerrahi ile kombine edilmiş kemoterapi, hipertermi veya kemoradyoterapi gibi yeni tedavi modaliteleri kullanılmakla birlikte ileri evre mide kanserinin kontrol altına alınması zordur. Tedavideki bu gelişmelere karşın sağkalım oranının yine de %20 seviyelerinde olması, bilim insanlarını daha etkili yeni tedavi yöntemlerini araştırmaya yöneltmektedir.

Mide kanseri gelişimi onkogen, tümör supresör gen, deoksiribonükleik asit (DNA) onarım genleri, hücre siklus düzenleyicileri ve sinyal moleküllerindeki genetik ve epigenetik değişiklikleri içeren çok basamaklı ve karmaşık bir süreçtir. Bu basamaklardaki moleküller belirlendikçe hedefe yönelik yeni tedaviler geliştirilmekte ve kanser tedavisinde yeni yollar açılmaktadır. İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü-2 (HER-2/neu) ve mezenkimal epitelyal dönüştürücü faktör (c-MET) proto-onkogenleri bu karsinogenez basamaklarında yer alan ve pek çok çalışmaya konu olan proteinlerdir.

İnsan HER-2 geni 17. kromozomda yer almakta olup insan epidermal büyüme faktörü reseptör (EGFR) ailesinin bir üyesidir. Bir tirozin kinaz proteini olan HER-2 hücre proliferasyonu, diferansiyasyonu ve sağkalımı ile ilgili sinyalleri düzenler. Literatürde mide kanserlerinde HER-2 gen amplifikasyonu veya artmış protein ekspresyonu, olguların %7-34'ü gibi geniş bir aralıkta pozitif olarak bulunmaktadır. HER-2 overekspresyonu bulunan mide kanserli hastaların anti-HER-2 monoklonal antikoru olan Trastuzumab eklenerek tedavi edilmesinin, hastalarda yanıt oranını arttırdığı,

progresyonsuz (PSK) ve genel sağkalımı (GSK) anlamlı şekilde uzattığı bulunmuştur. Yapılan çalışmalarda yeni prediktif ve prognostik belirteçlerin bulunması, varolan tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesi açısından, HER-2 dışında c-MET yolağının da önemli bir tedavi hedefi olabileceğini göstermiştir. c-MET de tirozin kinaz reseptör ailesindendir ve hepatosit büyüme faktörünün (HGF) reseptörüdür. Bazı çalışmalarda c-MET overekspresyonu kötü prognoz ile ilişkili bulunmuş ve negatif prognostik faktör olarak rapor edilmiştir. Ayrıca c-MET overekspresyonunun lokal invazyon ve uzak metastaz ile ilişkisi olduğu belirtilmiştir. Hayvan modelleri kullanılarak yapılan prelinik çalışmalarda, MET antikorları ya da küçük molekül MET inhibitörleri, c-MET amplifikasyonu olan gastrik hücrelerde tümör hücre proliferasyonunu ve tümör progresyonunu önlemiştir. Az sayıda yayın bulunmakla birlikte HER-2 eşliğinde artmış c-MET ekspresyonu, mide karsinomlarının küçük bir kısmında gösterilmiş ve bunların daha agresif davranış sergilediği görülmüştür.

Literatürdeki bu yansımalar ışığında, anabilim dalımızda, 1996-2016 yılları arasında, ameliyat materyali değerlendirilen mide kanseri hastalarında HER-2 pozitifliğinin sıklığını saptamak, artmış HER-2 ekspresyonunun immunohistokimyasal ve silver in situ hibridizasyon (SISH) yöntemleri ile tutarlılığını değerlendirmek, histopatolojik prognostik faktörlerle ilişkisini ortaya koymak hedeflenmiştir. Ayrıca yeni tedavi yaklaşımlarına ışık tutmak açısından c-MET ekspresyon sıklığını ve HER-2 ekspresyonu ile ilişkisini belirlemek amaçlanmıştır.

GENEL BİLGİLER

MİDE KANSERİ

EPİDEMİYOLOJİ

İnsidans ve Mortalite

Mide kanserinin insidansı ve mortalitesi bazı bölgelerde dramatik olarak azalmış olmakla birlikte hala tüm dünyada akciğer, meme, kolorektum ve prostat kanserlerinden sonra en sık görülen 5. kanser türüdür. Kansere bağlı ölümlerde de 3. sırada yer almaktadır (1).

Mide kanseri Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) kanser istatistiklerine göre 20. yüzyılın başında en sık görülen kanserler arasındayken günümüzde erkeklerde 13. kadınlarda ise 9. sırada yer almaktadır (2). ABD'de 2013 yılında 21,600 yeni olgunun mide kanseri tanısı alacağı ve 10,990 kişinin öleceği tahmin edilmiştir (3). Dünya genelinde olguların %70'inden fazlası (677,000 olgu) gelişmekte olan ülkelerde görülmekte ve dünya toplamının yarısı Doğu Asya'da özellikle de Çin'de görülmektedir. 2012 yılında tüm dünyada 925,000 yeni mide kanseri olgusunun tanı aldığı ve bunların 723,000'inin mide kanserinden öleceği tahmin edilmiştir. Bu oran yıllık kanser ölümlerinin %8,8'ini oluşturmaktadır (1). Türkiye'de ise kanser daire başkanlığı 2014 yılı istatistiki verilerine göre, tüm kanserler arasında mide kanseri, 50-69 yaş arası erkeklerde %6 ile 5. sırada, kadınlarda %3,7 ile 7. sırada izlenmektedir (4).

Sağkalım

Solid tümörler içinde mide kanseri, sağkalım oranı en kötü olan kanserler arasındadır (5). Mide kanserinde tanı ve tedavideki ilerlemelere rağmen 5 yıllık sağkalım %20'lerdedir (6). Genel olarak sağkalım, mide kanseri insidansı yüksek olan ülkelerde (Japonya vb.), düşük insidans olan ülkelere göre daha iyidir. Bunun nedeninin bu ülkelerdeki tarama programlarına ve mide kanserini erken evrede yakalama şansına bağlı olduğu düşünülebilir. Kardia yerleşimli tümörlerin antrum yerleşimli tümörlere göre prognozları daha kötü, cerrahi mortaliteleri daha yüksek ve 5 yıllık sağkalım oranları daha düşüktür. Tümör invazyon derinliği mukoza-submukoza ile sınırlı ise yani erken evre bir mide karsinomu söz konusu ise 5 yıllık sağkalım %95'e kadar yükselmektedir (6, 7) .

Coğrafi Dağılım

Mide kanseri insidansı, dünyadaki coğrafi bölgeler ve etnik gruplar arasında değişkenlik göstermektedir. Doğu Asya, Doğu Avrupa ve Güney Amerika'da en yüksek insidanslar bildirilmişken Kuzey Amerika ve Afrika'da en düşük insidans verileri rapor edilmiştir (8). Mide kanseri insidansı, aynı bölgede yaşayan farklı etnik gruplar arasında da anlamlı değişiklikler göstermektedir. ABD'de yaşayan Hispanik, Afrika kökenli ve kızılderili Amerikalılar, beyaz ırka göre daha fazla etkilenmektedir. Bununla beraber mide kanserinin coğrafi dağılımı sadece etnik farklılıklarla açıklanamaz. Örneğin Singapur'da yaşayan Japon ve Çinlilerde sıklık, Hawaii'de yaşayan aynı etnik kökenli kişilere göre daha fazladır. Ayrıca Japonya gibi yüksek insidans alanlarından, ABD gibi düşük insidans bölgelerine göç eden kişilerde mide kanseri riskinin azaldığı bulunmuştur (5, 7).

Tümör Lokalizasyonu

Mide kanseri insidansının yüksek olduğu bölgelerde intestinal tip adenokarsinom görece daha sıktır, diffüz tip adenokarsinom ise düşük insidanslı alanlarda daha sıktır. Yüksek insidanslı bölgelerde antrum ve pilor kanserleri sık görülür; buna karşılık insidansın düşük olduğu yerlerde proksimal mide (kardia) tümörleri daha sıktır (9). Son yıllarda kardial adenokarsinomlarının insidansında artış, kardial dışı mide bölgelerinin adenokarsinom insidansında ise azalma saptanmıştır (10). İntestinal tip adenokarsinomlardaki azalma, mide kanseri insidansındaki genel azalmadan sorumludur (11).

Distal mide yerleşimli tümörlerin gelişmesinde beslenme alışkanlığı ve Helikobakter pilori (HP) enfeksiyonu majör risk faktörüdür. Proksimal tümörlerin gelişimindeki risk faktörleri ise gastroözofagial reflü ve obezitedir (7). Risk faktörleri açısından bakıldığında, midedeki distal yerleşimli tümörlerin görülme sıklığındaki düşüşün en olası nedenlerinden biri HP eradikasyonu olabilir. Proksimal mide tümörlerindeki artış ise reflü özofajit görülme sıklığındaki artıştan kaynaklanıyor olabilir (12).

Yaş ve Cinsiyet

Mide kanseri hemen hemen tüm ülkelerde erkeklerde kadınlara oranla 1,2-2,5 kat daha fazla görülmektedir. İntestinal tipte bu oran 2/1 iken, diffüz tipte erkek kadın oranı eşittir (13). Mide kanseri 30 yaşından daha genç olanlarda nadirdir. 5. dekada sık ortaya çıkmakla birlikte genel olarak yaşla sıklığı artar (14). Genç yaş grubunda ortaya çıkan mide kanserleri daha çok herediter olup diffüz tipte mide karsinomu morfolojisindedir (15).

ETYOLOJİ

Çevresel Faktörler

- **Helikobakter Piloni Enfeksiyonu**

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) 1994 yılında, HP'nin özellikle intestinal tip mide kanseri gelişiminde karsinojen bir bakteri olduğunu kabul etmiştir (16). Bu mikroorganizma, gram negatif, spiral şekilli, flagellalı bir basildir, üreaz, katalaz, oksidaz üretebilir ve seçici olarak midede kolonize olur (17). HP ile uzun süre (birkaç dekad) enfekte olan kişilerin bir kısmında aktif kronik gastrit, mukozal atrofi, intestinal metaplazi (İM) ve displazi basamaklarından oluşan bir dizi değişiklik görülür (9).

HP normal mide epiteli yüzeyini örten mukus tabakası içerisinde yerleşir, neoplazinin kaynaklandığı İM alanlarında ise görülmez. HP'nin karsinojenik etkileri hem çözünebilir bakteriyal ürünler, hem de enfeksiyonun neden olduğu inflamatuvar yanıt ile gerçekleşir. Hücre çoğalmasını uyaran amonyak, HP bakterisinin güçlü üreaz aktivitesi sayesinde bol miktarda üretilmektedir. Ayrıca HP, nitrik oksit sentaz izoformlarını uyarak nitrik oksit dahil oksidan ve reaktif nitrojen ara ürünlerinin devamlı üretimine neden olur. Nitrözlenmiş bileşimler deneysel çalışmalarda mide kanserojeni olarak tanımlanmıştır. Serbest radikaller, oksidanlar ve reaktif nitrojen türevleri, hep beraber DNA hasarına (genellikle nokta mutasyonu oluşturarak) sebep olurlar veya DNA onarımını ya da apoptozu provoke ederler. Ayrıca özellikle CagA pozitif olan HP suşları, IL-8 üretimini artırarak daha yoğun inflamasyona ve kanser riskinde artışa neden olmaktadır (9). Konağa ait genlerde IL-1 beta polimorfizminin saptanması da HP ile enfekte kişilerde artmış karsinom riskiyle ilişkilidir (18).

HP enfeksiyonu, kardiyak kanseri riskinde artış ile ilişkili değildir (19). HP enfeksiyonu, mide asiditesini azaltarak gastroözofajial reflü hastalığı bulgularını hafifletiyor ve bu şekilde proksimal mide adenokarsinomu gelişimini engelliyor olabilir. HP enfeksiyonunda tedavinin yeterli olarak

uygulandığı ve HP eradikasyonunun sağlandığı batı ülkelerinde proksimal mide adenokarsinomu sıklığındaki artış bu görüşleri desteklemektedir (20).

- **Epstein-Barr Virüs (EBV) Enfeksiyonu**

Lenfo-epitelyoma benzeri lenfoid stromadan zengin olan mide karsinomlarının önemli bir kısmında EBV genomu saptanmış olup bu tümörlerde EBV enfeksiyonunun mide karsinogenezinde rolü olduğu düşünülmektedir (21).

- **Beslenme Alışkanlığı**

Birçok epidemiyolojik ve deneysel çalışma göstermiştir ki mide kanseri açısından yüksek risk altında olan populasyon nişastadan zengin, proteinden fakir beslenmekte ve taze meyve-sebze tüketmemektedir. Nişastadan zengin ve proteinden fakir beslenme mide mukozasında mekanik hasara neden olabilmektedir (5).

Diyette bulunan sodyum (Na) ve nitrat bileşikleri de mide kanseri gelişiminde önemli ajanlar olarak görülmektedir (22). Buzdolabı kullanma alışkanlığının olmadığı geleneksel beslenme düzenlerinde tuzlanmış et ve gıdalar ile tütülenmiş veya işlenmiş etlerde oluşan nitrozamin bileşikleri ve hipoklorhidrinin, hem kanser gelişimini hem de HP enfeksiyon riskini arttırarak mide kanserine neden oldukları bildirilmektedir (23). Büyük miktarlarda tuz içeren salamura sebze, salamura et, tuzlanmış balık, soya sosu ve diğer tuzla hazırlanmış yiyecekler bu tür besinlerdendir (24).

Diyetteki spesifik komponentlere ek olarak pişirme yöntemleri de yüksek mide kanseri riski ile ilişkilidir. Izgara, kızartma, fazla ısıtma, kabartma gibi pişirme yöntemleri ve güneşte kurutma, tuzlama, salamura ve tütüleme gibi yöntemler karsinogenik N-nitrozo bileşik formasyonunu arttırmakta ve böylece mide kanseri riskini arttırmaktadır (25). Tersine yeşil, lifli sebzelerin alınması ve askorbat (vit C), alfa-tokoferol (vit E), beta karoten ve selenyum içeren turuncgillerin tüketilmesi, antioksidan özelliklerinden dolayı mide kanser riskini azaltmaktadır (14, 26, 27).

Beslenme alışkanlıkları özellikle intestinal tip adenokarsinom gelişme riskini arttırmaktadır (28).

- **Sigara**

Sigara mide mukoza bütünlüğünü sürdürmek için gerekli olan prostaglandinleri azaltmaktadır (29). Sigaranın gastrit, ülser ve İM gibi prekürsör mide lezyonlarının gelişimini indüklediği rapor edilmiştir. Sigara içenlerde HP enfeksiyonu ve gastroduodenal inflamasyon daha sık olarak görülür. The European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition projesinde sigara içme yoğunluğu ve süresiyle mide kanseri gelişmesi arasında anlamlı bir ilişki bulunmuştur (5).

- **Alkol**

Alkol tüketimi ile mide kanseri gelişme riski arasında çelişkili sonuçlar bulunmaktadır. Yapılmış bir çalışmada özellikle sigara ve alkolü yüksek miktarlarda birlikte tüketen kişilerde kardias dışı mide kanseri görülme riskinin kullanmayanlara göre 5 kat arttığı belirtilmiştir (30). Tam tersine 2012 yılında yayınlamış olan bir meta-analizde ise orta derecede alkol alımı ile mide kanseri arasında ilişki saptanmamıştır (31).

- **İyonizan Radyasyon**

Japonya'da atom bombasından sonra sağ kalanlarda ve üst abdomen bölgesine radyoterapi alan genç hastalarda mide kanser sıklığında artış olması, mide karsinogenezinde iyonizan radyasyonun rolü olduğunu düşündürmektedir (32).

- **Sosyo-ekonomik Durum**

Midede kanser gelişme riski, sosyo-ekonomik düzeyi düşük olan ülkelerde gelişmiş ülkelere göre daha fazladır (14).

- **Meslek**

Madencilik, çiftçilik, arıtma, balıkçılık gibi meslekler ve lastik, kereste, asbestle ilişkili meslekler ile mide kanseri riski arasında pozitif bir ilişki olduğu düşüncesi kabul görmektedir (33).

Kişisel Faktörler

- **A Kan Grubu**

A kan grubuna sahip olan kişilerde diğer kan gruplarına sahip kişilere göre mide kanseri riski daha yüksektir (26, 34, 35).

- **Parsiyel Gastrektomi**

Parsiyel gastrektomi gibi girişimler sonucu hipoklorhidri oluşmakta, bu durum midede anaerobik bakterilerin aşırı üremesine yol açmaktadır. Bu bakterilerin bir çoğu nitratları nitritlere çeviren indirgeyiciler üretmektedir. Böylece bu bakteriler mide içinde nitrit ve karsinogenik N-nitrozo bileşiklerinin konsantrasyonunda artışa neden olmaktadır (36). Ayrıca gastroduodenal reflüye bağlı olarak, sıklıkla anastomoz hattı yerleşimli olmak üzere, mide kanseri gelişme riski artmaktadır (37).

- **Pernisyöz Anemi**

Klinikte belirlenen pernisyöz aneminin altında yatan neden, anemiden daha önemlidir (38). Otoimmün gastrit ve HP gastriti, pernisyöz anemisi olan birçok hastada beraber bulunur. Bu durum kronik atrofik gastrit ve aklorhidriye neden olarak mide kanseri gelişim riskini artırır (36).

- **Aile Öyküsü ve Kalıtsal Faktörler**

Mide kanserlerinin büyük çoğunluğu sporadiktir. Olgu kontrol ve kohort analizleri mide kanserli hastaların birinci derece akrabalarında riskin 2-3 kat arttığını göstermiştir (39). Aile üyeleri genelde aynı çevreyi paylaşmakta ve benzer sosyo-ekonomik koşullarda yaşamaktadır. Bu risk faktörleri bağımsız olarak ya da genetik faktörlerle bağlantılı olarak mide kanseri riskini arttırmaktadır (5). Tüm mide kanserlerinin yaklaşık %3-5'ini herediter tümörler oluşturmaktadır (40).

Herediter Diffüz Gastrik Karsinom (HDGC): Etkilenen kişilerin yaklaşık %25'inde germline E-cadherin (CDH1) mutasyonları ile saptanan bir ailevi tümör sendromudur (41). CDH1 mutasyonu taşıyan kişilerde 80 yaşına kadar mide kanseri gelişme riski erkeklerde %67, kadınlarda %83 olarak hesaplanmıştır (42). Ancak etkilenen kişilerin tümünde CDH1 mutasyonu izlenmediğinden, sendromik kişilerde CDH1'den başka genlerde germline mutasyon bulunması olasıdır (41). CDH1 mutasyon testleri aşağıdaki durumlarda önerilmektedir:

- Birinci ve ikinci dereceden akrabalarda, yaştan bağımsız olarak, biri diffüz tipte olmak üzere 2 tane mide karsinomu olgusu bulunması
- Kişide 40 yaş öncesi diffüz tipte mide karsinomu görülmesi
- Birinci ve ikinci dereceden akrabalarda veya kişide, 50 yaşından önce tanı konmuş diffüz tipte mide karsinomu veya lobüler meme karsinomu olması

Bu ana kriterler yanı sıra 50 yaş öncesinde bilateral lobüler meme karsinomu olan hastalarda, birinci veya ikinci derece akrabalarında 50 yaş altında iki kişide lobüler tip meme karsinomu bulunan kişilerde, kendisinde veya ailesinde yarı damak/dudak hikayesi bulunan diffüz tip mide karsinomlu kişilerde de CDH1 mutasyon testlerinin yapılması önerilmektedir. Aile hikayesi olsun olmasın, herhangi bir hastanın mide biyopsisinde in situ taşlı yüzük hücreleri veya taşlı yüzük hücrelerinin pagetoid yayılımının görülmesi durumunda da CDH1 mutasyon testleri önerilmektedir (43).

Hereditör Non-polipozis Kolorektal Sendrom: DNA onarım genlerinin (MLH1, MSH2, MSH6, PMS1, PMS2) birinde germline mutasyon olması ile karakterizedir. Lynch sendromlu kişilerde mide kanseri riski %6-13 arasında değişir. Mide tümörlerinin %15'inde mikrosatellit instabilitesi görülür; bu grubun içinden Lynch sendromlu olan olguları, sporadik mutasyonları olan olgulardan ayıklamak için ayrıca genetik testler gerekir (40).

Ailesel Adenomatöz Polipozis Sendromu (FAP): Germline APC geni mutasyonlarına bağlı gelişir. Bu hastalarda osteom, desmoid tümör, epidermoid kist yanı sıra duodenum ve midede adenomlar ile midede fundik bez polipleri de görülür (44). Hastaların yaklaşık yarısında fundik bez polipleri, %10'unda ise mide adenomları bulunur (40). Bu adenomlar ve fundik bez poliplerinden mide karsinomu gelişebileceği bildirilmiştir (45, 46).

Li-Fraumeni Sendromu: Germline TP53 mutasyonları ile karakterize Li-Fraumeni sendromuna sahip ailelerde mide karsinomu %4.9 oranında saptanmıştır (47).

Peutz-Jeghers Sendromu: STK11/LKB1 mutasyonları ile giden bir hereditör kanser sendromu olan Peutz-Jeghers Sendromunda gastrointestinal kanal boyunca hamartomatöz ve adenomatöz polipler izlenir; en sık görülen malign tümörler ise ince barsak, kolon ve mide karsinomlarıdır (40).

Gastrik Hiperplastik Polipozis: Otozomal dominant kalıtım gösteren hereditör bu sendrom hiperplastik polipozis, psoriazis ve diffüz tip mide kanseri insidansında artış ile karakterizedir (48).

MİDE KARSİNOMLARININ PREKÜRSÖR LEZYONLARI

Kronik Atrofik Gastrit ve İntestinal Metaplazi

Kronik atrofik gastrit ve İM uzun süren kronik inflamasyona adaptif bir yanıt olarak ortaya çıkar ve her iki lezyon da özellikle yüksek riskli bölgelerde

intestinal tip adenokarsinoma eşlik veya öncülük eder. Kronik gastrit bu olayda başlatıcı ve gerekli bir olaydır. Eğer gastrit devam ederse atrofi ve ardından da İM gelişir. Bu durum neoplaziye kadar giden zinciri başlatır (26, 49, 50). Atrofik gastrit gelişimine neden olan iki önemli etken HP ve otoimmün faktörlerdir (51). Ancak otoimmün gastrit nadir görülen bir hastalık olduğu için HP, atrofik gastrit gelişimi için en önemli faktördür (49, 51, 52). Atrofik gastrit ve İM tek başlarına premalign durumlar değildir ancak gerçek premalign durum olan displaziye giden yolu aralarlar (49).

Gastrik Displazi

Midede displazi, hem gastrik hem de intestinalize mukozadan gelişebilir. Gastrik displazi düşük dereceli (low grade) ve yüksek dereceli (high grade) olarak ikiye ayrılır.

Düşük dereceli (low grade) displazi: Düşük dereceli displazi genellikle foveolar bölgede ve yüzeyde oluşur. Normal basit tubuler foveolar yapı korunmuştur ve derin foveolar bölge ve bezler normaldir. Düşük dereceli displazi epitelde psödostratifikasyon, artmış nükleus/sitoplazma oranına sahip hücreler, mûsin kaybı, uzan-oval, hiperkromatik nükleuslar ve az sayıda tipik mitotik figürler ile karakterizedir. Nükleer polarite korunmuştur. Midede düşük dereceli displazinin önemi şüphelidir. Çok sayıda çalışmadan elde edilen sonuçlar, olguların %60-70'inin geri dönüşlü, %20-30'unun kalıcı bir lezyon olduğunu göstermektedir. Yüksek dereceli displazi ve mide kanserine progresyon riski ise düşüktür (53).

Yüksek dereceli (high grade) displazi: Yüksek dereceli displazide bezlerde artış şeklinde kalabalıklaşma ile ortaya çıkan yapısal bozukluk ve belirgin nükleer atipi mevcuttur. Sık dallanmalar ve kavımlanmalar nedeni ile tubullerin şekilleri bozuktur ancak lamina propria invazyonu yoktur. Mûsin sekresyonu minimaldir veya yoktur. Genellikle puro şeklinde, pleomorfik, hiperkromatik ve psödostratifiye nükleuslar görülür. Belirgin amfofilik nükleol sıktır. Epitel boyunca artmış proliferatif aktivite mevcuttur (9, 26). Yüksek dereceli displazinin bulunması her zaman önemlidir. Bu lezyonlar genellikle geri dönüşlü değildir ve kanser yönünde ilerlemeye eğilimlidir. Gözle görülen

bir endoskopik lezyonda saptanan yüksek dereceli displazinin tedavisi genelde bu lezyonun endoskopi, gasrektomi veya mukozal rezeksiyon ile eksizyonudur (54).

Gastrik Adenom

Adenomlar, iyi sınırlı, displazi içeren tubuller ve/veya villöz yapılardan oluşan benign lezyonlardır. Malign transformasyon sıklığı, lezyonun boyutu ve histolojik derecesine bağlıdır. Bu sıklık, 2 cm'den küçük çaptaki lezyonlarda % 2 iken, çapı 2 cm'yi aşanlarda %40-50'dir. Flat adenomlar karsinom gelişimine daha fazla eğilimlidir (26, 55).

Hiperplastik Polip

Mide poliplerinin en sık görülenlerinden biri olup genellikle HP gastriti zemininde ve antrumda yerleşen, 2 cm'den küçük çapta, pedinküllü veya sesil lezyonlardır. Nadiren İM ve displazi odakları içeren poliplerden karsinom gelişebilir (56).

Fundik Bez Polibi

Sporadik olarak ve HP gastriti ile ilişkisiz olarak ortaya çıkarlar. Sporadik olanlarda malignite potansiyeli yok iken FAP'lı hastalarda görülen sendromik formlarında displazi ve karsinom gelişebilir (56).

Barret Özofagusu

Özofagustaki İM, Barrett özofagusu olarak bilinir ve gastroözofageal reflü hastalığı ve gastroözofagial bileşke adenokarsinomuyla ilişkilidir (57, 58).

MİDE KARSİNOMLARININ SINIFLANDIRILMASI

Mide kanserleri morfolojileri ve histopatolojik özellikleri dikkate alınarak yıllar içerisinde değişik biçimlerde sınıflandırılmışlardır. Birçok sınıflama önerilmiş olmakla beraber en sık kullanılan DSÖ ve Lauren sınıflamalarıdır. Bu kadar çok sınıflama olmasının en büyük nedeni, mide karsinomlarının

gösterdiği heterojenitedir. Geçmişten günümüze gelen bu sınıflamalar şöyledir:

Borrmann Sınıflaması, 1926 (Makroskopik görünümüne göre):

Tip I (Polipoid), Tip II (Fungiform), Tip III (Ülsere), Tip IV (İnfiltratif)

Stout Sınıflaması, 1953 (Tümör Patolojisi Atlası):

Ülsero-vejetan, Penetran, Yüzeyel, Linitis plastika, Özgün olmayan tip

Ming Sınıflaması, 1977 (Büyüme patternine göre):

Ekspansif ve İnfiltratif

Gastrik Kanser Japon Topluluğu, 1981:

Papiller, Tubuler, Az Diferansiye, Müsinöz, Taşlı Yüzük Hücreli

Goseki Sınıflaması, 1992 (Histolojik özelliklerine göre):

Grup I: Tubuler diferansiyasyonu iyi, sitoplazmik müsinden fakir

Grup II: Tubuler diferansiyasyonu iyi, sitoplazmik müsinden zengin

Grup III: Tubuler diferansiyasyonu az, sitoplazmik müsinden fakir

Grup IV: Tubuler diferansiyasyonu az, sitoplazmik müsinden zengin

Nakamura Sınıflaması:

Diferansiye ve andiferansiye

Tümör Lokalizasyonuna Göre:

Proksimal ve distal

İnvazyon Derinliğine Göre:

Erken mide karsinomu (EMK): EMK, tümör büyüklüğüne bakmaksızın mukoza ve/veya submukoza ile sınırlı, lenf nodu metastazından bağımsız kanser olarak tanımlanmaktadır (9, 59, 60). Histolojik olarak EMK'lerin çoğu iyi diferansiyedir ve tubuler veya papiller yapıya sahiptir. Hastaların büyük bir çoğunluğunun cerrahi tedaviden fayda görmesi ve yaşam sürelerinin ileri

mide kanserlerinden dramatik farklılığı nedeniyle erken mide kanserlerinin ileri mide kanserlerinden ayrımı önem taşımaktadır. Erken mide kanserinde prognoz, 5 yıllık sağkalımın %90'larda olması ile mükemmeldir (61). EMK'ler, endoskopik görünümüne göre üç tipe ayrılmaktadır. Tip I; protrude, tip II; yüzeysel ve tip III; çukur görünümde olup, tip II daha sonra tip II a; elave tip, tip II b; düz tip, tip II c; deprese tip olarak üç alt gruba ayrılmaktadır (62). En sık tip II c olmak üzere, tip II %80 oranında görülür (63).

İlerlemiş mide karsinomu (İMK): Submukozadan daha derine uzanacak şekilde mide duvarına invazyon gösteren tümörler bu grup içerisinde yer alır (26, 60). Daha çok erkeklerde (erkek/kadın oranı; 2:1), beşinci ve yedinci dekadlarda ortaya çıkar (26). İleri mide kanserinde 5 yıllık sağkalım oranı %20'lerdedir (5). İleri mide kanserlerinin makroskopik olarak sınıflandırılmasında Borrmann sınıflaması kullanılmaktadır (6).

Lauren Sınıflaması, 1965 (Histolojik özelliklerine göre):

Lauren sınıflandırma sisteminde, intestinal, diffüz ve mikst (indeterminant) tip olarak üç histolojik tip tanımlamıştır. Lauren sınıflaması mide kanserlerinin çevresel risk faktörleri, öncü lezyonlar, yaşam süresi, cinsiyet ve yaş dağılımı açısından değerlendirilmesinde yardımcı bir sınıflamadır.

İntestinal tip mide karsinomu: Yüksek riskli bölgelerde ve erkeklerde kadınlara göre iki kat daha sıktır. Ortalama görülme yaşı 55 olup prognozu daha iyidir. Prekanseroz lezyonlar olan atrofik gastrit ve İM ile ilişkilidir ve HP, obezite, diyetel faktörler gibi çevresel faktörlerden etkilenmektedir (5). Kolayca tanınabilen bez yapıları oluşturan, genellikle iyi veya orta derece diferansiye, bazen de az diferansiye nitelikte olabilen tümörlerdir. DSÖ sınıflamasında yer alan papiller ve tubuler karsinomlar ile eşdeğer tümörler bu grupta yer almaktadır (60).

Diffüz tip mide karsinomu: Diffüz tipte, cinsiyet dağılımı eşit olmakta veya hafif kadın üstünlüğü görülmektedir. Hastalar intestinal tipe göre daha genç yaşta olup tanı aldıklarında ortalama yaş 48'dir. İntestinal tipe oranla HP

gastriti ve İM ile birliktelik düşüktür (64). Mide duvarını diffüz olarak infiltre eden, hiç bez yapmayan veya az yapan, kohezyonları oldukça bozulmuş hücrelerden oluşan tümörlerdir. Bu tümörler, DSÖ sınıflamasındaki taşlı yüzük hücreli karsinoma benzerdir (60).

Dünya Sağlık Örgütü Sınıflaması, 2010:

DSÖ mide karsinomlarını histolojik özelliklerine göre başlıca beş ana tip (papiller, tubuler, müsinöz, az koheziv, mikst) ve nadir varyantlar (adenoskuamöz karsinom, skuamöz hücreli karsinom, hepatoid adenokarsinom, lenfoid stroma ile birlikte olan karsinom, koryokarsinom, karsinosarkom, parietal hücreli karsinom, malign rabdoid tümör, mukoepidermoid karsinom, paneth hücreli karsinom, andiferansiye karsinom, mikst adeno-nöroendokrin karsinom, endodermal sinus tümör, embriyonal karsinom, pür mide yolk sak tümör, onkositik adenokarsinom) şeklinde sınıflandırmaktadır (Tablo-1) (9).

Mide tümörlerinde farklı histolojik patternler sıklıkla birarada izlenebilmektedir. DSÖ sınıflandırması bu farklı histolojik patternlerden baskın olan tipe göre yapılmaktadır. Bu histolojik patternlerden en sık görülenleri aşağıda belirtilmiştir:

Tubuler adenokarsinom: Makroskopik olarak fungatif ya da polipoid kitleler oluşturma eğiliminde olan ve mide karsinomlarında en sık izlenen histolojik subtiptir.

Papiller adenokarsinom: Daha yaşlı bireylerde ve midenin daha çok proksimal kısımlarında izlenen, histolojik olarak fibrovasküler korları bulunan papiller projeksiyonlar oluşturan tümörlerdir. Sıklıkla karaciğer metastazı ve yüksek oranda lenf nodu tutulumu gösterirler.

Müsinöz adenokarsinom: Mide karsinomlarının %10 kadarını oluşturlar. Histolojik olarak tümör volümünün %50'den fazlasını oluşturan ekstrasellüler müsin gölcükleri arasında saçılmış glandüler epitelyal hücreler ile taşlı yüzük hücrelerinden oluşur.

Az koheziv karsinom: Histolojik olarak tek tek ya da küçük kümeler halinde saçılmış, değişik oranlarda taşlı yüzük hücreleri ile histiositlere, lenfositlere ya da plazma hücrelerine benzeyen neoplastik hücrelerle karakterizedir. Taşlı yüzük hücreleri, tümörün %50'sinden fazlasını oluşturduğunda taşlı yüzük hücreli karsinom adını alır. Antro-pilorik bölgede görüldüğünde serozal tutulum, lenfovasküler invazyon ve lenf nodu metastazı eğilimi gösterir (61).

Lauren sınıflandırması yarım yüzyıldır dünya çapında kullanılmakta olup prognostik anlamda basit, kullanımı kolay ve birçok avantajı olan bir sınıflandırmadır. DSÖ'ye göre nadir mide karsinom tiplerinin prognozu etkileyip etkilemediği halen belirsizdir. Bununla birlikte DSÖ sınıflandırma şeması, mide kanseri gelişimine göre sürekli revize edildiğinden ve daha ayrıntılı histopatolojik tanımlama sağladığından, Lauren sınıflandırmasına göre uzun dönemde klinik ve patolojik tanı açısından daha çok avantaj oluşturmaktadır. Genomik ilerlemenin yanı sıra, transkriptomik, proteomik, metabolomik araştırmalar ile mide kanseri moleküler sınıflandırması da güncel sıcak konular haline gelmektedir (65).

Tablo-1: Mide adenokarsinomlarının sınıflandırması

DSÖ (WHO), 2010	Lauren, 1965
Papiller adenokarsinom Tubuler adenokarsinom Müsinöz adenokarsinom	İntestinal tip
Az koheziv karsinom (Taşlı yüzük hücreli ve diğer varyantlar)	Diffüz tip
Mikst adenokarsinom	İndeterminant tip
Adenoskuamöz karsinom Skvamöz hücreli karsinom Hepatoid adenokarsinom Lenfoid stroma ile birlikte olan karsinom Koryokarsinom Karsinosarkom Parietal hücreli karsinom Malign rabdoid tümör Mukoepidermoid karsinom Paneth hücreli karsinom Andiferansiye karsinom Mikst adeno-nöroendokrin karsinom Endodermal sinus tümörü Embriyonal karsinom Pür gastrik yolk sac tümörü Onkositik adenokarsinom	

MİDE KARSİNOMLARININ DERECELENDİRİLMESİ

Derecelendirme sistemi DSÖ tarafından esas olarak tubuler ve papiller karsinomlar için önerilmektedir.

İyi diferansiye karsinom: Genellikle metaplastik intestinal epiteli anımsatan, iyi biçimlenmiş bezlerden oluşan adenokarsinomlar için kullanılır.

Orta derecede diferansiye karsinom: İyi diferansiye ve az diferansiye adenokarsinomlar arasında yer alan tümörler için kullanılır.

Az diferansiye karsinom: Güçlükle fark edilebilen, oldukça düzensiz bezler yapan veya izole ya da asiner yapılar ve m sin sekretleri içerisinde kümeler halinde izlenen ya da tek tek hücrelerden oluşan adenokarsinom için kullanılır.

Derecelendirme aynı zamanda düşük dereceli (iyi ve orta derece diferansiye tümörler) ve yüksek dereceli (az diferansiye tümörler) olarak da yapılabilir (9).

MİDE KARSİNOMLARININ YAYILIMI VE EVRELEMESİ

Mide karsinomları lokal invazyon ile komşu yapılar ve peritona, hematojen yayılım sonucunda uzak organlara metastaz yaparlar. Mide kanserinde hematojen yolla metastaz ilk olarak sıklıkla karaciğere olur ancak nadir de olsa karaciğer metastazı olmaksızın uzak metastazlar gelişebilir. Uzak metastazların en sık g r ld   y rler karaciğer (%49), akciğer (%33), over (%14), kemik (%11) ile servikal ve supraklaviküler (Virchow nodülü) (%8) lenf nodlarıdır (66).

İntestinal tip karsinomlar hematojen olarak karaciğer metastazını tercih ederken, diffüz tip karsinomlar peritoneal yüzeylere metastaz yaparlar. T2 veya daha yüksek evreli tümörlerde her iki tip için de lenf nodu metastazı oranı birbirine yakındır. Mikst tümörlerde hem intestinal hem de diffüz tip karsinoma benzer metastatik patternler izlenir. Serozal tutulum gerçekleşmiş ise peritoneal yayılım kolaylaşır. Bilateral masif over tutulumu

(Krukenberg tümörü), hematojen veya transperitoneal yayılım sonucunda olur (9).

American Joint Committee on Cancer/International Union Against Cancer (AJCC/UICC) Tümör-Lenf Nodu-Metastaz (TNM) sınıflandırma sistemi 2010 (7th. edition) yılında revize edilmiştir (Tablo-2) (67). 2018 yılında uygulanması planlanan yeni revizyonda (8th. edition) TNM sınıflandırması açısından bir değişiklik bulunmamakla birlikte TNM sınıflandırmasına dayanarak oluşturulan prognostik evre grupları klinik (cTNM), patolojik (pTNM), post-neoadjuvan terapi (ypTNM) şeklinde ayrı ayrı değerlendirilmiştir. Ayrıca 7. revizyonda N3a ve N3b şeklinde değerlendirilen lenf nodu metastazı pTNM evrelemesi açısından farklılık yaratmazken 8. revizyonda farklı prognostik evre grupları içerisinde yer almıştır. Bunun dışında 8. revizyonda, proksimal yerleşimli, özofagogastrik bileşkeyi içeren tümörler modifiye edilmiştir. Buna göre bu tümörler aşağıdaki gibi değerlendirilmiştir:

- Özofagogastrik bileşke tutulumu gösteren ve orta noktası özofagogastrik bileşkeden itibaren distale doğru gidildiğinde ≤ 2 cm içerisinde kalan tümörler, özofagial kanser
- Özofagogastrik bileşke tutulumu gösteren ve orta noktası özofagogastrik bileşkeden itibaren distale doğru gidildiğinde > 2 cm dışında kalan tümörler, proksimal mide kanseri
- Özofagogastrik bileşke tutulumu göstermeyen orta noktası özofagogastrik bileşkeden itibaren distale doğru gidildiğinde ≤ 2 cm içerisinde kalan tümörler, kardial yerleşimli kanser (68).

Tablo-2: Mide karsinomları için TNM evrelemesi (AJCC/UICC - 7th. edition)

Primer Tümör (T)	
TX	Primer tümör değerlendirilemiyor
T0	Primer tümör bulgusu yok
Tis	Karsinoma in situ; lamina propriaya invazyonu olmayan tümör
T1a	Lamina propria ya da muskularis mukozaya invaze tümör
T1b	Submukozaya invaze tümör
T2	Muskularis propriaya invaze tümör
T3	Visseral periton ya da çevre yapılara invaze olmadan subserozal bağ dokusuna infiltre tümör
T4a	Serozaya (visseral periton) invaze tümör
T4b	Çevre yapılara invaze tümör
Lenf Nodları (N)	
NX	Bölgesel lenf nodları değerlendirilemiyor
N0	Bölgesel lenf nodu metastazı yok
N1	1-2 lenf nodunda metastaz var
N2	3-6 lenf nodunda metastaz var
N3a	7-15 lenf nodunda metastaz var
N3b	16 ve daha fazla lenf nodunda metastaz
Uzak Metastaz (M)	
M0	Uzak metastaz yok
M1	Uzak metastaz var

MİDE KARSİNOMLARINDA TEDAVİ

Mide kanseri tedavisinde hala en etkili yol, cerrahi olarak tümörü tamamen çıkarmaktır. Uzak metastazların bulunması veya ana vasküler yapılardan birinin (aort, hepatik arter, çölyak trunkus, splenik arter proksimali) tutulumu en önemli anrezektabilite kriterleridir. Uzak metastazı olmayan herhangi T ve herhangi N grubundaki tümör, rezektabl olarak değerlendirilebilir.

Erken mide kanserleri, belli klinikopatolojik kriterlerin varlığı halinde, deneyimli kuruluşlarda endoskopik mukozal rezeksiyon veya endoskopik submukozal diseksiyon ile tedavi edilebilirler. Daha ileri T değerlerine sahip tümörler gastrektomi ve lenf nodu diseksiyonuna yönlendirilir. Mide yakın çevresindeki lenf nodları (D1) yanı sıra sol gastrik arter, “common” hepatik arter, çölyak arter, splenik arter ve dalak hilusunda yer alan lenf nodlarının da çıkarılması (modifiye D2 diseksiyon) önerilir (39).

Mide kanserinin küratif tedavisi cerrahi rezeksiyon olmasına rağmen çoğu hastada sadece cerrahi yeterli olmamakta ve adjuvan tedavilere ihtiyaç duyulmaktadır (3, 69). T3 ve T4 tümörler ile lenf nodu pozitifliği olan T1 ve T2 tümörlerde cerrahi ve modifiye D2 diseksiyon sonrasında kemoterapi (KT) önerilir (3). Neoadjuvan sistemik KT uygulamasının, tümörde hacim azaltılmasını sağlayarak rezektabilite oranını artırması, mikrometastazları elimine etmesi, cerrahi sırasında tümör hücrelerinin abdominal kaviteye kontaminasyonunu azaltması gibi avantajları bulunmaktadır. Bununla beraber neoadjuvan tedavinin lokal kontrolü geciktirmek, rezeksiyon sınırlarının saptanmasını zorlaştırmak ve kemoterapiye dirençli klon oluşumuna yol açmak gibi olumsuz etkileri de vardır (70, 71).

Hedefe yönelik tedavilerden HER-2'ye karşı geliştirilen humanize monoklonal antikorun (Trastuzumab) diğer kemoterapötiklerle (Kapesitabin+Sisplatin veya Sisplatin+ 5-Fluorourasil) birlikte verildiği ToGA (Trastuzumab for Gastric Cancer) çalışmasında 584 hasta değerlendirilmiş olup, HER-2 ve KT'yi birlikte alan grupta ortalama GSK 13,8 ay, sadece KT alan grupta ortalama GSK 11,1 ay olarak bulunmuştur (72). Bu çalışmanın

sonuçlarına dayanarak, Food and Drug Administration (FDA) ve European Medicines Agency (EMA) tarafından HER-2 overekspresyonu olan metastatik ya da ileri mide adenokarsinomlu hastalara Trastuzumab'ın diğer kemoterapi protokolleri ile birlikte verilmesi önerilmektedir (73). Trastuzumab'tan yeteri kadar yarar görmeyen HER-2 pozitif meme kanserinde kullanılan Lapatinib (HER-1 ve HER-2 dual tirozin kinaz inhibitörü) ve buna benzer diğer ilaçlar olan Pertuzumab (HER-2 dimerizasyon inhibitörü), Trastuzumab emtansine ise klinik çalışmaları halen devam eden ve hedefi HER-2 olan ilaçlardandır (74). Önerilen hedefe yönelik yeni tedavilerde c-MET'i hedefleyen birçok molekül de erken faz klinik çalışmalarda değerlendirilmiştir. Selektif küçük kinaz inhibitörleri (Volitinib, Tivantinib), biyolojik antagonist ve monoklonal antikolar (Rilotumumab ve MetMab) ile multikinaz inhibitörler (Crizotinib, Foretinib, Cabozantinib) bu moleküllerdendir (75). Yeni geliştirilen bu hedefe yönelik tedavilerin özellikle HER-2 negatif hastalarda yeni bir tedavi seçeneği olabileceği umut edilmektedir. Ayrıca, HER-2 ekspresyonu artmış meme kanseri hücrelerinde, c-MET'in sıklıkla eksprese olduğu ve Trastuzumab'a karşı direnç gelişmesine yardımcı olduğu bildirilmektedir. Bu hastalarda HER-2 ve c-MET antikolarının birlikte kombine kullanılmasının tedaviye direnci önleyebileceği bildirilmektedir (76). Hedefe yönelik tedavilerden vasküler endotelyal growth faktör (VEGF) monoklonal antikoru Bevacizumab ve EGFR monoklonal antikoru Setuksimab'ın ise ileri evre mide kanseri tedavisinde kullanılabileceğine dair çalışma sonuçları yeterli ve rutin kullanımı destekleyecek kadar güçlü değildir (77, 78) .

MİDE KARSİNOMLARINDA PROGNOZA ETKİ EDEN FAKTÖRLER

Hastanın yaşı: İleri yaştaki hastalarda prognozun kötü olmasının nedeni, başka hastalıklarının olması ve ilerleyen yaşla birlikte yükselen perioperatif mortalite olarak belirtilmektedir (79, 80). Genç hasta grubundaki kötü prognozun nedenleri ise çoğunlukla asemptomatik oldukları için tanının geç konulması ve tümör histolojisinin daha çok diffüz tipte olmasıdır (81).

Tümör büyüklüğü: Daha küçük boyutlu tümörler daha iyi prognozludur. Ancak boyut, invazyon derinliği ile sıkı bir şekilde ilişkilidir (64).

Tümör yerleşimi: Proksimal mide yerleşimli tümörler daha derin invazyon yapması ve lenf nodu metastazının daha sık olması nedeniyle, distal tümörlere göre daha kötü prognozludur (82).

Histolojik tip: Lauren sınıflamasına göre diffüz tip tümörler, intestinal tip tümörlerden daha kötü prognoza sahiptir (83). Hücresel diferansiyasyon derecesine göre iyi diferansiye tümörlerin az diferansiye tümörlere kıyasla prognozları daha iyidir (84).

Perinöral, lenfatik ve vasküler invazyon: Bir $\geq T2$ mide karsinomu serisinde, perinöral invazyon gösteren tümörler, negatif olgulardan daha kötü prognozlu saptanmıştır (64). Lenfatik ve venöz invazyonun da kötü prognozla ilişkili olduğu gösterilmiştir (5, 85).

Lenf nodu (LN) tutulumu: LN metastazı ve metastatik lenf nodu sayısı sağkalımı çok belirgin şekilde etkilemektedir. LN tutulumu olmayan hastaların %50'den fazlasının 5 yıl yaşaması beklenebilir. LN tutulumu ile oran %10'dan daha aza düşer (64).

Tümör evresi: Prognostik faktörler içerisinde en önemlisi tümörün evresidir (86, 87). Yapılan bir çalışmada uzun sağkalımı olan grupla kısa sağkalımı olan grup arasındaki en anlamlı değişken, patolojik T ve patolojik N evresi olarak saptanmıştır (88).

İnflamatuvar reaksiyon: Peritümöral alanda, dejeneratif değişikliklerle birlikte yangısal hücre infiltrasyonunun bulunması iyi bir prognostik işarettir (64).

Cerrahi: Küratif rezeksiyon en etkili prognostik faktörlerden biri olarak düşünülmektedir. Küratif cerrahide amaç bütün tümörü çıkarmaktır (89). Öncelikle Japonya olmak üzere değişik ülkelerde yapılan non-randomize çalışmalar, D2 diseksiyonunun sağkalımda etkili olduğunu kuvvetle desteklemektedir (90).

Genetik ve biyolojik prognostik faktörler: Mide kanseri gelişimi onkogen, tümör supresör gen, DNA onarım genleri, hücre siklus düzenleyicileri ve sinyal moleküllerinin genetik ve epigenetik değişikliklerini içeren karmaşık ve çok basamaklı bir süreçtir (5). HER-2, c-MET, K-sam, c-myc ve Siklin E onkogenlerinde izlenen amplifikasyonlar, K-ras onkogeni ve CDH1, APC, p53, PTEN gibi tümör baskılayıcı genlerde görülen mutasyonlar mide kanseri ile sıklıkla ilişkilendirilmiş bu değişikliklerdendir (9). Bu basamaklarda yer alan bazı genetik değişiklikler, karsinogenez sürecinin akışı gereği mide kanseri için prognostik belirteçlerdir. Ayrıca bu moleküller belirlendikçe hedefe yönelik yeni tedaviler geliştirilmekte ve kanser tedavisinde yeni yollar açılmaktadır.

Bu çalışmada da mide kanseri gelişiminde ve prognozunda etkisi olduğu bildirilen, hedefe yönelik tedavi olarak klinik ve pre-klinik düzeyde üzerinde çalışmalar yapılan HER-2 ve c-MET onkogenleri ele alınmıştır.

İnsan Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü-2 (HER-2)

HER-2, ilk olarak rat nöroblastomundan izole edilerek rat neu gen ismiyle bilim dünyasına girmiştir. Diğer isimlendirmeler tavukta eritroblastomaya homolog (erb) genlerin ve insan büyüme faktörleri kodlayan genlerin (HER) keşfinin bir sonucudur. HER reseptör ailesinin dört üyesi, epidermal büyüme faktör reseptörü (EGFR) veya HER-1, HER-2, HER-3 ve HER-4'ü kapsar. HER-2, kromozom 17q21'de bulunan bir protoonkogendir. Basitçe HER-2, protein veya reseptör olarak adlandırılmış olan, 185 kDa molekül ağırlıklı, 1255 aminoasitli bir transmembran glikoproteini kodlar. HER reseptörleri hücre membranı üzerinde lokalize olmuştur. Reseptörlerin tümü, sisteinden zengin ekstrasellüler büyüme faktör ligandını bağlayan bir alan, lipofilik bir transmembran segmenti ve düzenleyici karboksi terminal segmentli intrasellüler tirozin kinaz alanını kapsayan benzer bir yapıyı paylaşırlar (91, 92).

HER reseptör proteinleri, monomerler ve üzerine ligand bağlanan homo veya heterodimer formundadırlar. Ligand bağlanmasını takip ederek 4 farklı reseptör, homodimerler (HER-1/HER-1) veya heterodimerler (HER-1/HER-2) şeklinde 10 farklı reseptör dimeri formunu alabilir. Genelde HER-2 heterodimerleri, homodimerlerinden daha potettir. HER-2 içeren heterodimerlerin, HER-2 içermeyenler ile karşılaştırıldığında, özellikle daha yüksek bir ligand bağlama ve sinyal iletme potansiyeline sahip oldukları görülür. HER-2'nin en potent dimerizasyon partneri HER-3'dür. Dimerizasyon, reseptörlerin sitoplazmik alanında tirozin kinaz aktivasyonuna yol açar. Daha sonra reseptörlerin intrasellüler alanındaki tirozin rezidülerinin fosforilasyonu sinyal iletimini başlatır (91, 92). Bu aktivasyon, hücre büyümesi, proliferasyonu, diferansiyasyonu, metastaz, tümör invazyonu, anti-apoptotik sinyal iletimi, kemoterapiye direnç, anjiyogenez ve hücre-hücre bağlantılarının kurulması ile ilişkili hücresel aktiviteleri tetiklemektedir (93).

HER-2 monoklonal antikoru olan Trastuzumab, HER-2'nin ekstrasellüler kısmına bağlanarak hücre içi sinyal iletimini inhibe eder ve antikor bağımlı hücresel sitotoksisite yaratır. Fosfataz ve tensin homolog (PTEN) tümör supresör geninde inaktivasyon, fosfatidil inositol trifosfat kinaz (PIK3CA mutasyon) hücre içi sinyal yolağında aberran yanıt oluşumu, Trastuzumab'a karşı direnç oluşumunda rol almaktadır. Ayrıca membran ilişkili glikoproteinlerin (MUC1 ve MUC4) Trastuzumab'ın reseptöre bağlanmasını maskeleyerek engellemesi, Trastuzumab'ın bağlandığı ekstrasellüler domaini içermeyen HER-2 reseptörü (p95HER-2) varlığı, diğer tirozin kinaz reseptörlerinin aktivasyonu (IGF-1R, c-MET) ve siklin E overekspresyonu Trastuzumab'a karşı direnç gelişiminde rol oynayan diğer faktörlerdendir (74).

HER-2, tükrük bezi, over, pankreas, akciğer, mesane, prostat karsinomlarında da overekspresyon göstermektedir (94-100). Bununla birlikte, en fazla çalışma meme karsinomları üzerine yapılmış olup, meme kanserinde hastalıktan bağımsız ve genel sağkalım oranının azalması ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (91). HER-2 amplifikasyonu meme kanserinde bulunduktan sonra mide kanserlerinde de tanımlanmıştır. Mide

adenokarsinomlarında HER-2 overekspresyon sıklığı Japonya kökenli çalışmalarda %12, daha yeni çalışmalarda %22,1 olarak belirtilmiştir (61) . HER-2 overekspresyonunun intestinal tip kanserlerde ve kardia-özofagogastrik bileşke tümörlerinde midenin diğer bölümlerine göre daha sık görüldüğü belirtilmiştir (101-103). Yapılmış olan bazı çalışmalarda HER-2'nin kötü prognostik bir belirteç olabileceği bildirilmiştir. Ancak bu konuyla ilgili sonuçlar tartışmalıdır (103, 104).

Mezenkimal Epitelyal Dönüştürücü Faktör (c-MET)

c-Met, tirozin kinaz reseptör (TKR) ailesindendir ve hepatosit büyüme faktörünün (HGF) reseptörüdür. İnsan c-MET geni 7. kromozomda (7q21-q31) lokalizedir ve 120 kb'dan (kilobit) daha büyük bir gendir.

HGF, c-MET reseptörüne yüksek afinite ile bağlanır. Hepatositler için bir büyüme faktörü olduğu gibi fibroblast kökenli hücrelerde motilite faktörü veya yayılma/saçılım faktörü olarak etki gösterdiği tanımlanmıştır. HGF/c-MET sinyal ileti yolağındaki aktivasyonun hücre proliferasyonu, hücre yaşam süresinin artışı, angiogenezis, yara iyileşmesi, doku rejenerasyonu, motilite gibi pek çok hücre sel yanıtı neden olabileceği gösterilmiştir (105, 106).

Normal hücre fonksiyonlarının düzenlenmesine ek olarak c-MET'in pek çok tümörün gelişimi ve progresyonu ile ilişkili olabileceği bildirilmektedir. Özellikle c-MET'in yapısal aktivasyonuna neden olan mutasyonlar üzerinde durulmaktadır. c-MET'i aktive eden mutasyonların çoğu intrasellüler tirozin kinaz bölgesinde bulunmaktadır. Bu mutasyonlar yanı sıra HGF ve c-MET'in overekspresyonu ve gen amplifikasyonları da HGF/c-MET sinyal ileti yolağının aktivasyonuna ve tümörde angiogenezis, proliferasyon, motilitede artma, invazyon ve metastaza neden olabilmektedir. Kolorektal, tiroid, böbrek, over, meme, pankreas, prostat, karaciğer, malign melanom ve mide kanserinin içinde bulunduğu birçok tümörde c-MET overekspresyonu ve amplifikasyonu gösterilmiştir (106-109). İnsanlardaki sporadik kanserlerde ve bunların metastazlarında, c-MET reseptörünün başta tirozin kinaz domaini

olmak üzere pek çok bölgesinde mutasyonlar saptanmış olmakla birlikte, herediter papiller renal kanserde gösterilen germ-line c-MET mutasyonu, c-MET'in insanlarda onkogenezis ile ilişkisini gösteren ilk direkt kanıt olmuştur (108).

Mide karsinomlarına yönelik immünfloresan, İHK, reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), Northern ve Southern blot analiz gibi değişik yöntemlerle yapılan birçok çalışmada, c-MET overekspresyon ve amplifikasyon sıklığı %18-82 arasında rapor edilmiştir (75, 107, 110). c-MET overekspresyonunun intestinal tip mide adenokarsinomu, lenf nodu metastazı, lokal invazyon ve uzak metastazla güçlü ilişkisi olduğu belirtilirken bazı çalışmalarda çelişkili sonuçlar da elde edilmiştir (111). Literatürdeki çalışmalara bakıldığında İHK'sal olarak farklı skorlama sistemlerinin kullanıldığı ve c-MET overekspresyonu açısından farklı sonuçlar içerdiği gözlenmektedir. c-MET'in onkogenezis ve kanser progresyonundaki öneminden dolayı antikanser tedavide önemli bir hedef olduğu düşünülmekle birlikte İHK'sal açıdan tam olarak standardize edilmiş bir değerlendirme kriteri bulunmamaktadır (75, 107, 110).

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamızda, Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı arşivinde yer alan, 1996-2016 yılları arasında mide karsinomu tanısı ile gastrektomi uygulanan 211 olgu değerlendirildi.

Olgulara ait hematoksilen-eozin boyalı preparatlar tekrar değerlendirilerek DSÖ sınıflamasına ve Lauren sınıflamasına göre tanılar doğrulandı. Patoloji raporunda yer alan bilgilere dayanarak olguların yaş ve cinsiyeti, ameliyat şekli, tümörün görünümü, yerleşimi ve çapıyla ilgili klinik ve makroskopik bulgular ile tümör invazyon derinliği, perinöral invazyon ve lenfovasküler emboli varlığı, lenf nodu metastazı, komşu organ invazyonu ve patolojik veri varsa uzak metastaz gibi histopatolojik prognostik faktörler de yeniden gözden geçirildi. Lezyonu temsil eden, en çok doku içeren, uygun preparat ve bloklar seçildi.

İncelenen 211 olgudan intramukozal karsinom tanısı alan 2 olgu, preoperatif radyoterapi (RT) alan 2 olgu, büyük çoğunluğu nöroendokrin karsinom morfolojisi sergileyen 1 olgu, gastroözofagial yerleşimli skuamöz hücreli karsinom tanısı alan 1 olgu ve yeterli tümör dokusu içermeyen 2 olgu çalışma dışı bırakıldı ve 203 olgu çalışma grubuna alındı.

Olguların tümüne HER-2 immunohistokimya boyası uygulandı. HER-2 skoru İHK'sal olarak pozitif (skor 2+ ve 3+) olan olgularda dual silver in situ hibridizasyon (SISH) yöntemiyle HER-2 gen amplifikasyonu araştırıldı. İmmunohistokimyasal olarak HER-2 pozitifliği saptanan tüm olgulara bir diğer reseptör tirozin kinaz ailesi üyesi olan c-MET ile İHK'sal boyama uygulandı. HER-2 ile c-MET arasındaki ilişkiyi ortaya koymak üzere, İHK'sal olarak HER-2 negatif (skor 1+ ve 0) değerlendirilen 40 olgu da c-MET ile boyanarak tüm sonuçlar histopatolojik verilerle karşılaştırıldı.

İmmunohistokimyasal Boyama Yöntemi

Formalin ile tespitli ve parafine gömülü dokulardan elde edilen 3,5 mikron kalınlığındaki kesitler pozitif yüklü elektrostatik lamlara (Isotherm Technical Laboratory Glass Materials) alındı, 58°C'lik etüvde 4 saat tutuldu ve ardından barkodları basılarak çalışmaya hazır hale getirildi. Elde edilen tüm kesitler tam otomatik immunohistokimyasal boyama cihazına (Ventana, Benchmark, XT İHK/İSH) yerleştirildi. İHK boyamaları için cihaz ile uyumlu Ultraview Universal DAB Detection Kit ve EZ prep, LCS, SSC, Cell Condition 1 (CC1), Amplifikasyon, Reaction Buffer Concantate solüsyonları ile Rabbit Anti-DNP Antibody, Endogenous Biotin Blocking Kit, Hematoksilen ve Blue Reagent kullanıldı.

İmmunohistokimyasal boyama için **anti-HER-2/neu (4B5) klonu** rabbit monoklonal antikoru (Ventana, Katalog Numarası 790-2991; Predilüe form, CC1 (EDTA) 60 dakika, inkübasyon süresi 32 dakika, Amplifikasyon, Hematoksilen 8 dakika, Bluing reagent 8 dakika olmak üzere), **anti-Total c-MET (SP44) klonu** rabbit monoklonal antikoru (Ventana, Katalog Numarası 790-4430; Predilüe form, CC1 (EDTA) 60 dakika, inkübasyon süresi 32 dakika, Hematoksilen 8 dakika, Bluing reagent 4 dakika olarak) uygulandı.

Cihazda boyama işlemi tamamlandıktan sonra lamlar sırası ile ılık deterjanlı su, duru su ile yıkanıp alkol serilerinden geçirildi. Şeffaflandırma işlemi için ksilolden geçirildi ve Entellan® (Merck and Co., Berlin) ile kapatıldı.

Kombine İHK ve Dual-Silver İn-situ Hibridizasyon Yöntemi

Çalışmamızda anti-HER-2/neu (4B5) klonu ile immunohistokimyasal olarak boyanan lamlar silver in situ hibridizasyon yöntemiyle (SISH) kombine edilerek HER-2 gen amplifikasyonu araştırıldı. Bunun için parafine gömülü dokulardan elde edilen 3,5 mikron kalınlığındaki kesitler pozitif yüklü elektrostatik lamlara (Isotherm Technical Laboratory Glass Materials) alındı ve 58°C'lik etüvde ortalama 4 saat parafin eriyinceye kadar tutuldu. Tüm

prepratlar tam otomatik boyama cihazında (Ventana, Benchmark, XT İHK/İSH) yeni geliştirilen metot ile önce İHK'sal olarak ardından SISH ile boyandı. ISH işlemleri için cihaz ile uyumlu **INFORM HER2 Dual ISH DNAProbe cocktail** (Ventana, Katalog numarası 780-4422, CC2 döngü 4 4 dakika, ISH proteaz 3 32 dakika, Ultraview SISH DNP Detection Kit, Ultraview Red ISH DIG Detection Kit, EZ prep, LCS, SSC, Reaction Buffer Concentrate solüsyonları, Hematoksilen II ve Blue Reagent) kullanıldı. Ayrıca İHK ve dual-SISH yöntemleri arasındaki geçişte, hibridizasyon sırasında reaksiyon gelişmesini engellemek için HybClear solüsyonu eklendi.

HER-2 geni için Ultraview SISH DNP Detection Kit uygulanarak gümüş depositleri ile siyah sinyal, kromozom 17 için Ultraview Red ISH DIG Detection Kit uygulanarak naftol ve Fast Red ile kırmızı sinyal elde edildi.

Kaynatma, deparafinizasyon, ön işlem, hibridizasyon, yıkama, sinyal saptama ve arka plan boyama işlemlerinin hepsi tek basamakta tam otomatik cihazda tamamlandı. Cihazda boyama işlemi tamamlandıktan sonra lamalar ılık deterjanlı su ile duru sudan geçirilerek kurutuldu. Şeffaflandırma işlemi için ksilolden geçirildi ve Entellan® (Merck and Co., Berlin) ile kapatıldı.

Tüm bu işlemler sonunda tek bir lam üzerinde, hem İHK'sal olarak HER-2 boyalı, hem de dual SISH yöntemiyle kromozom 17 ve HER-2 gen bölgesi işaretli prepratlar elde edildi.

İmmunohistokimyasal Sonuçların Değerlendirilmesi

Tüm değerlendirmeler standart ışık mikroskopunda yapıldı. Boyanma oranları iki çalışmacı tarafından (S.A. ve F.C.) konsensusla saptandı. Tüm olgular için pozitif kontrol olarak mide dokusu kullanıldı.

HER-2 (4B5 klonu) immunohistokimyasal boyası için Hofmann ve ark.'nın yayınladığı skarlama sistemi kullanıldı. Bu skarlama sistemine göre; boyanmanın patterni, bölgesi, şiddeti ve boyanma oranı dikkate alındı. Tümörde boyanma membranöz ve komplet/ bazolateral/ lateral olduğunda pozitif kabul edildi. Sitoplazmik, nükleer, luminal, ya da bazal boyanma

negatif olarak değerlendirildi. Sonuçlar negatif (0), zayıf (1+), orta (2+) ve güçlü (3+) olarak belirtildi (Tablo-3). Çalışmada gözlemciler arası uyumu yükseltmek ve mide HER-2 skorlamasını daha standardize hale getirmek için, İHK boyanma şiddetini değerlendirmede 'büyütmeler kuralı' kullanıldı (Tablo-4). Sonucu (3+) ve (2+) olan olgular HER-2 overekspresyonu açısından sırasıyla anlamlı ve kuşkulu pozitif olarak kabul edilerek SISH/İHK kombinasyon metoduyla amplifikasyon durumlarına bakıldı.

Tablo-3: HER-2 immunohistokimyasal boyası skarlama sistemi

SKOR	Cerrahi materyal boyanma patterni	HER-2 değerlendirme
0	Reaktivite yok veya tümör hücrelerinin <%10'unda membranöz reaktivite	Negatif
1+	%10'dan fazla tümör hücresinde zor seçilen/soluk ve kısmi membranöz reaksiyon	Negatif
2+	%10'dan fazla tümör hücresinde zayıf/orta şiddette komplet ya da bazolateral membranöz reaksiyon	Belirsiz
3+	%10'dan fazla hücrede orta/kuvvetli komplet ya da bazolateral membranöz reaksiyon	Pozitif

Tablo-4: Boyanma şiddetinin belirlenmesinde büyütmeler kuralı

Zayıf	x40 büyütmelerde görülebilen zor seçilen membranöz boyanma
Orta	x10 ve x20 büyütmelerde görülebilen zayıf-orta şiddetteki membranöz boyanma
Kuvvetli	Küçük büyütmelerde (x2 ve x5) görülebilen güçlü membranöz boyanma

c-MET (SP44 klonu) immunhistokimyasal boyası ile membranöz ve sitoplazmik boyanma pozitif kabul edildi. Hücrelerin membranöz veya sitoplazmik boyanma şiddeti ile boyanan hücrelerin oranı değerlendirilerek skorlama yapıldı (Tablo-5). İHK'sal boyanma şiddetini değerlendirmede 'büyütmeler kuralı' kullanıldı. Buna göre 2 ve üzerinde skor alan tümör örnekleri overekspresyon açısından anlamlı kabul edildi.

Tablo-5: c-MET immunhistokimyasal boyası skorlama sistemi

Skor 0	Membranöz veya sitoplazmik reaktivite yok ya da %10'dan daha az hücrede boyanma
Skor 1	%10'dan daha fazla hücrede membranöz ya da sitoplazmik soluk zayıf boyanma
Skor 2	%10'dan daha fazla hücrede membranöz ya da sitoplazmik zayıf/orta şiddette boyanma
Skor 3	%10'dan daha fazla hücrede membranöz ya da sitoplazmik orta/kuvvetli boyanma

Dual Silver İn-situ Hibridizasyon Sonuçlarının Değerlendirilmesi

İmmunohistokimyasal olarak HER-2 skoru 2+ ve 3+ olan olgulara Dual SISH/İHK kombinasyon metodu uygulanarak HER-2 gen amplifikasyonu araştırıldı. Bunun için yukarıda anlatıldığı gibi in situ hibridizasyon yöntemi olarak HER-2 genini ve kromozom 17'yi sentromerik yerinden işaretleyen, sırasıyla siyah ve kırmızı sinyal oluşumu sağlayan INFORM HER2 Dual ISH DNAProbe cocktail kullanıldı.

Belirlenen neoplastik hücre grubunda, 20 ardışık hücrede, x40 büyütmede gen ve kromozom sinyalleri sayıldı. Ortalama HER-2 gen kopya sayısı ≥ 6 üzerinde olanlar ile HER-2 gen/kromozom 17 oranı 2'nin üzerinde olan olgular pozitif kabul edildi. Ancak ilk 20 hücre sayıldığında, oran 1,8 ile 2,2 arasında olan olgular belirsiz kabul edilerek ek 20 hücrelik setler sayıldı ve oranı ≥ 2 olanlar pozitif olarak belirlendi. HER-2 gen/kromozom 17 oranı 1,8'in altında olanlar negatif olarak değerlendirildi (Tablo-6).

Tablo-6: Dual prob in situ hibridizasyon

HER-2/kromozom 17 oranı ≥ 2	Pozitif
HER-2/kromozom 17 oranı $<1,8$	Negatif
Ortalama HER-2 gen kopya sayısı ≥ 6	Pozitif

Gen ve kromozom sinyallerinin her ikisinin de izlendiği hücreler değerlendirmeye alındı. Amplifiye tümör hücrelerinde üst üste izlenen gen sinyalleri, bir normal sinyal büyüklüğü ile kıyaslanarak değerlendirildi. Birbirine dokunan ya da bir sinyal büyüklüğünden daha yakın olan sinyaller, “ikiz sinyal” olarak kabul edilip tek sinyal olarak sayıldı. İç kontrol hücrelerinde olağan sinyalin elde edildiği örneklerde, tümör hücresindeki birden fazla üst üste binen ve ayrı ayrı sayılamayan sinyaller küme olarak dikkate alındı. Bir küçük küme 6 sinyal, bir büyük küme 12 sinyal olarak

değerlendirildi. Sinyal olmayan hücreler, tek renkte sinyali olan hücreler ve hücre dışında izlenen sinyaller değerlendirilmeye alınmadı. Tüm bu sinyal sayımları aynı cam üzerine uygulanmış olan İHK boyaması ile HER-2 pozitifliği gösteren tümör hücrelerinde yapıldı.

İstatiksel Değerlendirme

Çalışma sonucunda elde edilen tüm veriler SPSS (Statistical Package for Social Sciences for Windows) 15. sürümü ile bilgisayar ortamında incelendi. Olgulara ait yaş, cinsiyet, makroskopik ve histopatolojik değişkenler ile bu olgulara ait HER-2 ve c-MET ekspresyon skorları arasındaki ilişki, HER-2 ekspresyonunun İHK'sal ve SISH sonuçları arasındaki ilişki ki kare testi ve Fisher exact testi uygulanarak değerlendirildi. Tüm karşılaştırmalarda istatistiksel anlamlılık sınırı $p < 0,05$ olarak kabul edildi.

BULGULAR

Olguların Klinikopatolojik Özellikleri

Çalışmaya alınan 203 olgunun 126'sı (%62,1) erkek, 77'si (%37,9) kadın olup yaş aralığı 32-86 (ortanca yaş 62) arasında değişmekteydi.

Olguların 112'sine (%55,2) total, 91'ine (%44,8) subtotal gastrektomi uygulanmış olup saptanan tümörlerin 31'i (%15,3) kardial, 7'si (%3,4) fundus, 103'ü (%50,7) antrum ve pilor yerleşimli, 49'u (%24,2) korpus yerleşimli idi. Dokuz (%4,4) olguda tümör linitis plastica tarzında izlenmekteydi. Olguların 4'ünde (%2) tümör anastomoz hattında izlenmekte olup bunlar korpus-antrum yerleşimli tümörlerin nüksü şeklindeydi.

Tümörlerin çapları 1-27 cm arasında değişmekte olup 69 (%34) olguda tümör çapı 5 cm≤, 134 (%66) olguda >5 cm idi. Tümörlerin makroskopik görünüşleri temelinde oluşturulan Borrmann sınıflamasına göre 7 olgu (%3,4) tip 0, 10 olgu (%4,9) tip 1 (polipoid tip), 102 olgu (%50,3) tip 2 (mantarlaşan veya ülserovejetan tip), 75 olgu (%36,9) tip 3 (ülser tip), 9 olgu (%4,4) tip 4 (infiltratif tip) olarak tespit edildi.

Mide tümörlerinde heterojenite izlenmekle birlikte baskın olan tip göz önüne alınarak DSÖ'ye göre sınıflandırma yapıldığında olguların 114'ü (%56,2) tubuler adenokarsinom, 54'ü (%26,6) az koheziv karsinom, 13'ü (%6,4) müsinöz adenokarsinom, 7'si (%3,4) tubulopapiller adenokarsinom, 5'i (%2,5) papiller adenokarsinom, 2'si (%1) medüller karsinom, 2'si (%1)

adenoskuamöz karsinom, 2'si (%1) mikst adenonöroendokrin karsinom, 3'ü (%1,5) mikst adenokarsinom, 1'i rabdoid özellikler sergileyen adenokarsinom morfolojisi göstermekteydi. Lauren sınıflamasına göre de olguların 132'si (%65) intestinal tip, 52'si (%25,6) diffüz tip, 19'u (%9,4) mikst tipte izlenmekteydi.

Olguların tümör invazyon derinliklerine göre evrelendirilmesinde; 4 olgu (%2) T1a (tümör lamina propria veya muskularis mukozaya sınırlı), 12 olgu (%5,9) T1b (tümör submukozaya sınırlı), 19 olgu (%9,4) T2 (tümör muskularis propriaya sınırlı), 37 olgu (%18,2) T3 (tümör muskularis propriayı tam kat tutmuş, subserozal bağ dokusuna infiltre, ancak visseral periton tutulumu yok), 119 olgu (%58,6) T4a (visseral peritona invaze tümör) ve 12 olgu (%5,9) T4b (tümör komşu dokulara invaze) olarak değerlendirildi.

Olgular lenf nodu metastazı açısından değerlendirildiğinde; 40 olgu (%19,7) N0 (lenf nodu tutulumu yok), 22 olgu (%10,8) N1 (tümörün 1-2 lenf noduna metastazı), 39 olgu (%19,2) N2 (tümörün 3-6 arası lenf noduna metastazı), 42 olgu (%20,7) N3a (tümörün 7-15 arası lenf noduna metastazı), 60 olgu (%29,6) N3b (tümörün 15'den çok lenf noduna metastazı) olarak tespit edilmiştir. Çıkarılan lenf nodu sayısı 1-103 arasında, metastatik lenf nodu sayısı da 0-59 arasında değişmektedir. Ayrıca olguların 165'inde (%81,3) lenfovasküler emboli, 127'sinde (%62,6) perinöral invazyon saptanmıştır.

Olguların 27'sinde (%13,3) patolojik veri olarak metastaz var olup; 6 olguda karaciğer metastazı, 19 olguda peritonitis karsinomatoza, 1 olguda kemik ve kolon metastazı, 1 olguda da ince barsak metastazı bulunmaktaydı. Olguların 12'sinde (%5,9) komşu organ invazyonu (kolon, pankreas, dalak, karaciğer, ince barsaktan birine ya da birkaçına) izlenmekteydi. Komşu organ invazyonu bulunan olguların 6'sında aynı zamanda metastaz da

görülmekteydi. Çalışmaya alınan olguların klinikopatolojik özellikleri Tablo-7’de, histopatolojik özellikleri Tablo-8’de gösterilmiştir.

Tablo-7: Olguların klinikopatolojik özellikleri

Klinikopatolojik Özellikler	Olgu Sayısı (%)
Yaş - <65 - ≥65	116 (%57,1) 87 (%42,9)
Cinsiyet - Kadın - Erkek	77 (%37,9) 126 (%62,1)
Tümör lokalizasyonu - Kardia - Fundus - Korpus - Antrum-pilor - Anastomoz hattı - Linitis plastika	31 (%15,3) 7 (%3,4) 49 (%24,2) 103 (%50,7) 4 (%2) 9 (%4,4)
Makroskopik görünüm (Borrmann) - Tip 0 - Tip 1 - Tip 2 - Tip 3 - Tip 4	7 (%3,4) 10 (%4,9) 102 (%50,3) 75 (%36,9) 9 (%4,4)
Tümör çapı - <5 cm - ≥5 cm	69 (%34) 134 (%66)

Tablo-8: Olguların histopatolojik özellikleri

Histopatolojik Özellikler	Olgu Sayısı (%)
DSÖ sınıflaması - Tubuler adenokarsinom - Az koheziv karsinom - Müsinöz adenokarsinom - Tubulopapiller adenokarsinom - Papiller adenokarsinom - Medüller karsinom - Adenoskuamöz karsinom - Mikst adenonöroendokrin karsinom - Rabdoid özellik sergileyen adenokarsinom - Mikst adenokarsinom	114 (%56,2) 54 (%26,6) 13 (%6,4) 7 (%3,4) 5 (%2,5) 2 (%1) 2 (%1) 2 (%1) 1 (%0,5) 3 (%1,5)
Lauren sınıflaması - İntestinal tip - Diffüz tip - Mikst tip	132 (%65) 52 (%25,6) 19 (%9,4)
Tümör invazyon derinliği (T) - T1a - T1b - T2 - T3 - T4a - T4b	4 (%2) 12 (%5,9) 19 (%9,4) 37 (%18,2) 119 (%58,6) 12 (%5,9)
Lenf nodu metastazı (N) - N0 - N1 - N2 - N3a - N3b	40 (%19,7) 22 (%10,8) 39 (%19,2) 42 (%20,7) 60 (%29,6)
Perinöral invazyon - Yok - Var	76 (%37,4) 127 (%62,6)
Lenfovasküler invazyon - Yok - Var	38 (%18,7) 165 (%81,3)
Komşu organ invazyonu - Yok - Var	191 (%94,1) 12 (%5,9)
Uzak organ metastazı (M) - Yok - Var	176 (%86,7) 27 (%13,3)

HER-2'nin İHK ve Dual SISH Yöntemleriyle Değerlendirilmesi

Hofmann ve ark.'nın belirlediği skorlama sistemi kullanılarak yapılan immunohistokimyasal değerlendirmede 203 olgunun 39'unda (%19,2) HER-2'nin kuşkulu ya da anlamlı pozitif (2+ ya da 3+) olduğu, 164'ünde ise negatif (0/1+) olduğu saptandı (Resim 1-6). HER-2 ekspresyonu açısından incelendiğinde, olguların 19'u (3+), 20'si (2+), 26'sı (1+) pozitiflik gösterirken geri kalan 138 olgu negatifti (Tablo-9).

Tablo-9: HER-2 İHK'sal değerlendirme sonuçları

HER-2 Boyanması	Olgu Sayısı (%)
Skor 0	138 (%68)
Skor 1	26 (%12,8)
Skor 2	20 (%9,9)
Skor 3	19 (%9,4)

İHK'sal olarak HER-2 ekspresyon düzeyi (2+) ve (3+) olan 39 olguya dual SISH/İHK (gen/protein) metodu uygulanarak gen amplifikasyonu araştırıldı. Bunun sonucunda bu grup içinde gen amplifikasyonu saptanan 32 olgu (%82,1) overekspresyon açısından pozitif kabul edilerek gerçek HER-2 pozitif grup olarak değerlendirildi (Resim 7-12). İHK skoru (2+) olan 20 olgunun 14'ünde (%70), İHK skoru (3+) olan 19 olgunun 18'inde (%94,7) dual SISH/İHK yöntemiyle bakıldığında HER-2 amplifikasyonu saptandı (Tablo-10). İHK'sal olarak (3+) olan olgular dual SISH/İHK yöntemi ile daha iyi uyum göstermekteydi, yani İHK'sal olarak 3+ olguların SISH ile pozitif çıkma oranı daha yüksekti. Bu bulgu istatistiksel olarak da sınırda anlamlılık gösteriyordu ($p \leq 0,05$).

İHK'sal olarak pozitiflik saptanan 39 olgunun 24'ünde (%61,5) tümör hücrelerinde HER-2 ile homojen boyanma elde edilirken, 15'inde (%39,5) heterojen boyanma gözlemlendi (Resim 2). İHK ile pozitif olduğu halde dual

SISH/İHK yöntemi ile negatif saptanan 7 olgu, intra-tümöral heterojenite açısından incelendiğinde, olguların 6'sında homojen boyanma, 1'inde heterojen boyanma olduğu görüldü.

Dual SISH/İHK yöntemi uygulanarak aynı cam üzerinde yapılan değerlendirmede olguların tümünde SISH ile sinyal elde edilirken, 18 olguda (%46) İHK'sal boyanma ya çok zayıftı ya da hiç yoktu. Ancak bu olguların ilk yapılan İHK'sal incelemelerinde 16'sı (2+), 2'si (3+) idi. Ayrıca bu olguların İHK'sal olarak 11'inde homojen boyanma, 7'sinde heterojen boyanma izlenmekteydi.

Tablo-10: İHK'sal HER-2 skoru (2+) ve (3+) olguların dual SISH/İHK yöntemiyle karşılaştırılması

HER-2 Durumu	İHK (+)	Dual SISH/İHK (+)	p≤0,05
HER-2 Skor (2+)	20	14 (%70)	
HER-2 Skor (3+)	19	18 (%94,7)	

HER-2 Pozitif Olguların Klinikopatolojik Özellikleri

Dual SISH/İHK yöntemiyle pozitiflik elde edilen 32 olgunun 10'u (%31,2) kadın, 22'si (%68,8) erkek olup olguların 19'u (%59,4) <65 yaş, 13'ü (%40,6) ≥65 idi. Tümör, olguların 9'unda kardial (%28,1), 11'inde korpus (%34,4), 11'inde antrum-pilor (%34,4) yerleşimliken 1'inde (%3,1) de linitis plastica tarzında izlenmekteydi. Tümör çapı 12 olguda (%37,5) <5 cm iken 20 olguda (%67,5) ≥5 cm idi. Borrmann sınıflamasına göre; 4 olgu (%12,5) tip 1 (polipoid tip), 16 olgu (%50) tip 2 (mantarlaştıran veya ülserovejetan tip), 11 olgu (%34,4) tip 3 (ülser tip) ve 1 olgu (%3,1) tip 4 (infiltratif tip) olarak tespit edildi.

Histolojik olarak DSÖ'ye göre sınıflandırma yapıldığında yapıldığında olguların 21'i (%65,6) tubuler adenokarsinom, 4'ü (%12,5) az koheziv karsinom, 2'si (%6,2) müsinöz adenokarsinom, 3'ü (%9,4) tubulopapiller adenokarsinom, 1'i (%3,1) papiller adenokarsinom, 1'i (%3,1) mikst adenonöroendokrin karsinom morfolojisi göstermekteydi. Lauren sınıflamasına göre de olguların 27'si (%84,4) intestinal tip, 3'ü (%9,4) diffüz tip, 2'si (%6,2) mikst tipte izlenmekteydi.

Olguların tümör invazyon derinliklerine göre sınıflandırmasında; 4 olgu (%12,5) erken evre (T1a ve T1b), 28 olgu (%87,5) ileri evredeydi (T2-T4a/b). Olguların 5'inde (%15,6) lenf nodu metastazı bulunmazken (N0), 27 (%84,4) olguda bir ya da daha fazla lenf nodu metastazı (N1-N3a/b) bulunmaktaydı. Olguların 26'sında (%81,2) lenfovasküler emboli, 20'sinde (%62,5) perinöral invazyon görüldü. HER-2 pozitif olan olguların yalnızca 4'ünde metastaz bildirilirken komşu organ invazyonu hiçbir olguda saptanmadı.

HER-2 pozitif olan 32 olgu ve HER-2 negatif olan 171 olgu yaş, cinsiyet, makroskopik ve histopatolojik özelliklerine göre karşılaştırıldığında; yaş, cinsiyet, Borrmann sınıflandırması, tümör çapı, tümör yerleşimi, pT evresi, pN evresi, lenfovasküler invazyon, perinöral invazyon, komşu organ invazyonu ve uzak organ metastazı açısından istatistiksel olarak bir fark görülmedi (Tablo-11 ve Tablo-12) ($p>0,05$). Erken evre mide karsinomlarında (T1a/b) HER-2 pozitifliği %25 (4/16) oranında gözlenirken ileri evre mide karsinomlarında (T2-T4a/b) bu oran %14,9 (28/187) idi. Borrmann sınıflandırmasına göre polipoid (tip1) görünüm sergileyen tümörlerin %40'ında (4/10) HER-2 pozitifliği izlenirken diğer tiplerde bu oran %0-15,7 arasında değişmekteydi. Benzer şekilde proksimal yerleşimli tümörlerde HER-2 pozitifliği %23,7 (9/38) iken, distal yerleşimli tümörlerde %14,1 (22/156) olarak izlenmekteydi. Bu sonuçlar oransal açıdan belirgin farklılık göstermekle birlikte bu fark istatistiksel açıdan anlamlı değildi ($p>0,05$).

HER-2 pozitif ve negatif gruplar arasında DSÖ'ye göre histolojik alt tipler açısından karşılaştırma yapıldığında, istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunmamakla birlikte Lauren sınıflandırmasına göre intestinal tip morfoloji sergileyen tümörlerde HER-2 pozitifliği daha sık izlenmekteydi (**p=0,039**).

Tablo-11: HER-2 (+) ve HER-2 (-) olguların klinikopatolojik özelliklerinin karşılaştırılması

Klinikopatolojik Özellikler	HER-2 (+)	HER-2 (-)	p değeri
Yaş - <65 - ≥65	19 (%59,4) 13 (%40,6)	97 (%56,7) 74 (%43,3)	0,781
Cinsiyet - Kadın - Erkek	10 (%31,2) 22 (%68,8)	67 (%39,2) 104 (%60,8)	0,396
Tümör yerleşimi - Proksimal - Distal - Diffüz	9 (%28,1) 22 (%68,8) 1(%3,1)	29 (%17,5) 134 (%77,8) 8 (%4,7)	0,198
Makroskopik görünüm (Borrmann) - Tip 0 - Tip 1 - Tip 2 - Tip 3 - Tip 4	0 (%0) 4 (%12,5) 16 (%50) 11(%34,4) 1 (%3,1)	7 (%4,1) 6 (%3,5) 86 (%50,3) 64 (%37,4) 8 (%4,7)	0,203
Tümör çapı - <5 cm - ≥5 cm	12 (% 37,5) 20 (%62,5)	57 (%33,3) 114 (%66,7)	0,803

Tablo-12: HER-2 (+) ve HER-2 (-) olguların histopatolojik karşılaştırılması

Histopatolojik Özellikler	HER-2 (+)	HER-2 (-)	p değeri
DSÖ sınıflaması - Tubuler adenokarsinom - Az koheziv karsinom - Müsinöz adenokarsinom - Tubulopapiller adenokarsinom - Papiller adenokarsinom - Medüller karsinom - Adenoskuamöz karsinom - Mikst adenonöroendokrin ca - Rabdoid özellik sergileyen ca - Mikst adenokarsinom	21 (%65,6) 4 (%12,5) 2 (%6,2) 3 (%9,4) 1 (%3,1) 0 (%0) 0 (%0) 1 (%3,1) 0 (%0) 0 (%0)	93 (%54,4) 50 (%29,2) 11 (%6,4) 4 (%2,3) 4 (%2,3) 2 (%1,2) 2 (%1,2) 1 (%0,6) 1 (%0,6) 3 (%1,8)	0,301
Lauren sınıflaması - İntestinal tip - Diffüz tip - Mikst tip	27 (%84,4) 3 (%9,4) 2 (%6,2)	105 (%61,4) 49 (%28,7) 17 (%9,9)	0,039
Tümör invazyon derinliği (T) - T1a - T1b - T2 - T3 - T4a - T4b	1 (%3,1) 3 (%9,4) 4 (%12,5) 5 (%15,6) 19 (%59,4) 0 (%0)	3 (%2,3) 9 (%5,3) 15 (%8,8) 32 (%18,7) 100 (%57,9) 12 (%7)	0,516
Tümör invazyon derinliği (T) - T1a/b (erken evre) - T2-T4a/b (ileri evre)	4 (%12,5) 28 (%87,5)	12 (%7) 159 (%93)	0,231
Lenf nodu metastazı (N) - Yok - Var	5 (%15,6) 27 (%84,4)	35 (%20,4) 136 (%79,6)	0,527
Perinöral invazyon - Yok - Var	12 (%37,5) 20 (%62,5)	64 (%37,4) 107 (%62,6)	0,994
Lenfovasküler invazyon - Yok - Var	6 (%18,8) 26 (%81,2)	32 (%18,7) 139 (%81,3)	0,996
Komşu organ invazyonu - Yok - Var	32 (%100) 0 (%0)	159 (%93) 12 (%7)	0,120
Uzak organ metastazı (M) - Yok - Var	28 (%87,5) 4 (%12,5)	148 (%86,5) 23 (%13,5)	0,574

c-MET'in İmmunohistokimyasal Olarak Değerlendirilmesi

Çalışmamızda İHK'sal boyama ile HER-2 pozitif olarak saptanan 39 olgu ile HER-2 negatif (0/1+) 40 olgu olmak üzere toplam 79 olgu c-MET ekspresyonu açısından İHK yöntemi ile değerlendirildi ve aralarındaki ilişki araştırıldı. HER-2 ile İHK'sal olarak pozitif olan ancak dual SISH/İHK metodu ile konfirmasyonunda amplifikasyon saptanmayan 7 olgu da negatif grupta ele alındı.

Dual SISH/İHK yöntemi ile HER-2 pozitifliği saptanan 32 olgunun 11'inde (%34,4) c-MET ile de pozitiflik (skor 2+ ve 3+) saptandı. HER-2 negatif 47 olgunun ise 27'sinde (%57,4) c-MET ile pozitiflik izlendi (Resim 13-18). HER-2 (-) olgularda c-MET pozitifliği daha yüksek orandaydı ve bu fark istatistiksel olarak anlamlıydı (**p=0,044**) (Tablo-13). c-MET pozitifliği olan toplam 38 olgunun 12'sinde (%31,5) skor (3+), 26'sında (%68,5) skor (2+) idi. c-MET ile negatif değerlendirilen olguların 24'ünde (%57,4) skor (1+) iken, 17'sinde (%42,6) hiçbir immunreaktivite (skor 0) gözlenmedi (Tablo-14).

Tablo-13: HER-2 (+) ve HER-2 (-) olguların c-MET (+)'liği açısından karşılaştırılması

	c-MET (+)	c-MET (-)	
HER-2 (+)	11 (%34,4)	21 (65,6)	p=0,044
HER-2 (-)	27 (%57,4)	20 (%42,6)	

Tablo-14: c-MET İHK boyamasının sonuçları

c-MET	Olgu Sayısı (%)
Skor 0	17/79 (%21,5)
Skor 1	24/79 (%30,4)
Skor 2	26/79 (%32,9)
Skor 3	12/79 (%15,2)

c-MET Pozitif Olguların Klinikopatolojik Özellikleri

İHK'sal yöntemle c-MET pozitif olarak değerlendirilen toplam 38 olgunun 13'ü (%34,2) kadın, 25'i (%65,8) erkekti. 65 yaş ve üstü ile 65 yaş altı olgu sayısı birbirine eşitti. Tümör, olguların 3'ünde kardial (%7,9), 8'inde korpus (%21,1), 23'ünde antrum-pilor (%60,5), 1'inde (%2,6) anastomoz hattında yerleşimliken, 3'ünde (%7,9) linitis plastica tarzında izlenmekteydi. Tümör çapı 14 olguda (%36,8) <5 cm iken, 24 olguda (%64,2) ≥5 cm idi. Borrmann sınıflamasına göre; 1 olgu (%2,6) tip 1 (polipoid tip), 22 olgu (%52,4) tip 2 (mantarlaşan veya ülserovejetan tip), 12 olgu (%31,6) tip 3 (ülser tip) ve 3 olgu (%7,9) tip 4 (infiltratif tip) olarak tespit edildi.

Histolojik olarak DSÖ'ye göre sınıflandırma yapıldığında yapıldığında olguların 20'si (%52,6) tubuler adenokarsinom, 12'si (%31,6) az koheziv karsinom, 1'i (%2,6) müsinöz adenokarsinom, 3'ü (%7,9) tubulopapiller adenokarsinom, 1'i (%2,6) papiller adenokarsinom, 1'i (%2,6) mikst adenokarsinom morfolojisi göstermekteydi. Lauren sınıflamasına göre de olguların 25'i (%65,8) intestinal tip, 11'i (%28,9) diffüz tip, 2'si (%5,3) mikst tipte izlenmekteydi.

Olguların tümör invazyon derinliklerine göre sınıflandırmasında; 2 olgu (%5,7) erken evre (T1a ve T1b), 36 olgu (%94,3) ileri evredeydi (T2-T4a/b). Olguların 8'inde (%21,1) lenf nodu metastazı bulunmazken (N0), 30 (%78,9) olguda bir ya da fazla lenf nodu metastazı (N1-N3a/b) bulunmaktaydı. Olguların 33'ünde (%86,8) lenfovasküler emboli, 26'sında (%68,4) perinöral invazyon saptandı. Klinik olarak metastazı olduğu bildirilen 9 olgunun 6'sında (%66,7) pozitiflik izlenirken, komşu organ invazyonu gösteren 3 olgunun 2'sinde (%66,7) pozitiflik saptandı.

c-MET pozitif ve c-MET negatif olgular yaş, cinsiyet, makroskopik ve histopatolojik özelliklerine göre karşılaştırıldığında; yaş, cinsiyet, Borrmann

sınıflandırması, tümör çapı, pT evresi, pN evresi, lenfovasküler invazyon, perinöral invazyon, komşu organ invazyonu ve uzak organ metastazı açısından istatistiksel olarak bir fark izlenmedi ($p>0,05$). Lauren sınıflamasına göre diffüz tipteki olguların %73'ünde (11/15), intestinal tipteki olguların %41,7 (25/60) c-MET pozitifliği gözlenmekle birlikte bu fark istatistiksel açıdan anlamlı değildi ($p>0,05$).

Ancak mide kansinömlarını proksimal-distal olarak kategorize ettiğimizde c-MET ile pozitiflik gösteren olguların %84,2'si (32/38) distal yerleşimliydi ve istatistiksel olarak da anlamlı farklılık oluşturmaktaydı ($p=0,038$) (Tablo-15 ve Tablo-16).

HER-2 (+/-) ve c-MET (+/-) Olguların Karşılaştırılması

Tüm İHK'sal ve dual SISH boyamaları sonucunda elde edilen veriler şöyledir:

- HER-2⁺/c-MET⁺: 11 olgu (%13,9)
- HER-2⁺/c-MET⁻: 21 olgu (%26,5)
- HER-2⁻/c-MET⁺: 27 olgu (%34,2)
- HER-2⁻/c-MET⁻ : 20 olgu (%25,4)

HER-2(+/-) ve c-MET (+/-) olguların detaylı karşılaştırması Tablo-17'de gösterilmiştir.

Tablo-15: c-MET (+) ve c-MET (-) olguların klinikopatolojik özellikler açısından karşılaştırılması

Klinikopatolojik Özellikler	c-MET (+)	C-MET (-)	p değeri
Yaş - <65 - ≥65	19 (%50) 19 (%50)	26 (%57,8) 15 (%42,2)	0,229
Cinsiyet - Kadın - Erkek	13 (%34,2) 25 (%84,2)	14 (%34,1) 27 (%65,9)	0,995
Tümör yerleşimi - Proksimal - Distal - Diffüz	3 (%7,9) 32 (%65,7) 3 (%7,9)	12 (%29,3) 28 (%68,3) 1 (%2,4)	0,038
Makroskopik görünüm (Borrmann) - Tip 0 - Tip 1 - Tip 2 - Tip 3 - Tip 4	0 (%0) 1 (%2,6) 22 (%57,9) 12 (%31,6) 3 (%7,9)	2 (%4,9) 6 (%14,6) 20 (%48,8) 13 (%31,7) 0 (%0)	0,072
Tümör çapı - <5 cm - ≥5 cm	14 (% 36,8) 24 (%63,2)	16 (%39) 25 (%61)	0,842

Tablo-16: c-MET (+) ve c-MET (-) olguların histopatolojik özellikler açısından karşılaştırılması

Histopatolojik Özellikler	c-MET (+)	c-MET (-)	p değeri
DSÖ sınıflaması - Tubuler adenokarsinom - Az koheziv karsinom - Müsinöz adenokarsinom - Tubülopapiller adenokarsinom - Papiller adenokarsinom - Medüller karsinom - Adenoskuamöz karsinom - Mikst adenonöroendokrin ca - Rabdoid özellik sergileyen ca - Mikst adenokarsinom	20 (%52,6) 12 (%31,6) 1 (%2,6) 3 (%7,9) 1 (%2,6) 0 (%0) 0 (%0) 0 (%0) 0 (%0) 1 (%2,6)	28 (%68,3) 4 (%9,8) 3 (%7,3) 2 (%4,9) 2 (%2,4) 1 (%1,2) 0 (%0) 1 (%1,2) 0 (%0) 0 (%0)	0,202
Lauren sınıflaması - İntestinal tip - Diffüz tip - Mikst tip	25 (%65,8) 11 (%28,9) 2 (%5,3)	35 (%85,4) 4 (%9,8) 2 (%4,9)	0,090
Tümör invazyon derinliği (T) - T1a - T1b - T2 - T3 - T4a - T4b	0 (%0) 2 (%5,3) 4 (%10,5) 6 (%15,8) 24 (%63,1) 2 (%5,3)	2 (%4,9) 5 (%12,1) 4 (%9,8) 9 (%22) 20 (%48,6) 1 (%2,6)	0,499
Tümör invazyon derinliği (T) - T1a/b (erken evre) - T2-T4a/b (ileri evre)	2 (%5,3) 36 (%94,7)	7 (%17,1) 34 (%82,9)	0,96
Lenf nodu metastazı (N) - Yok - Var	8 (%21,1) 30 (%78,9)	9 (%21,9) 32 (%78,1)	0,923
Perinöral invazyon - Yok - Var	12 (%31,6) 26 (%68,4)	16 (%39) 25 (%61)	0,489
Lenfovasküler invazyon - Yok - Var	5 (%13,2) 33 (%86,8)	10 (%24,4) 31 (%75,6)	0,203
Komşu organ invazyonu - Yok - Var	36 (%94,7) 2 (%5,3)	40 (%97,6) 1 (%2,4)	0,471
Uzak organ metastazı (M) - Yok - Var	32 (%84,2) 6 (%15,8)	38 (%92,7) 3 (%7,3)	0,204

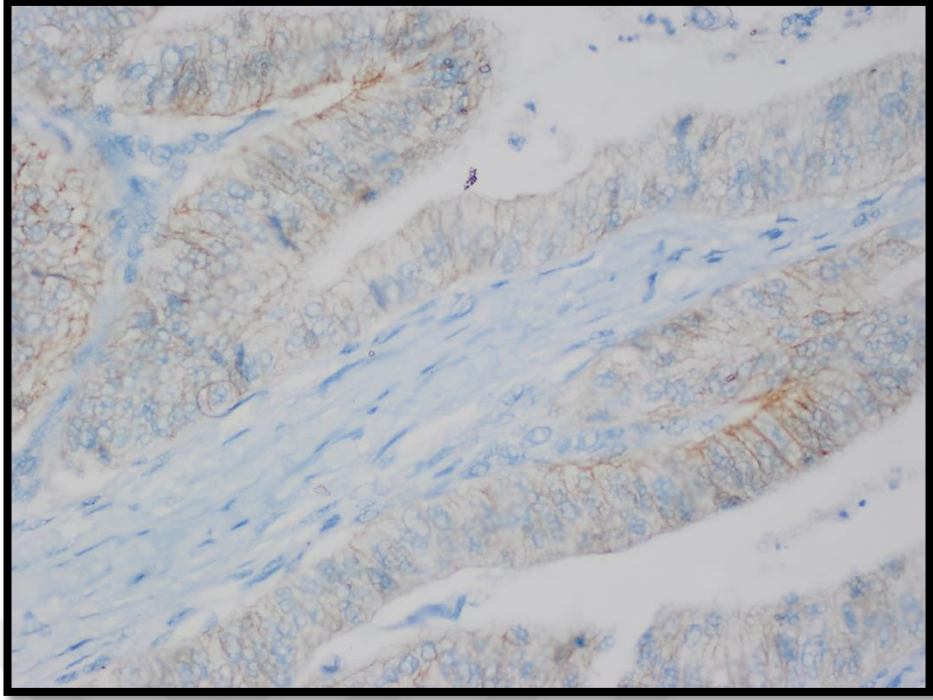
Tablo-17: HER-2 (+/-) ve c-MET (+/-) olgu gruplarının karşılaştırılması

HER-2 durumu	c-MET (+)	c-MET (-)
3+	8	10
2+	3	11
3+ (SISH ⁻)	0	1
2+ (SISH ⁻)	2	4
1+	16	10
0	9	5

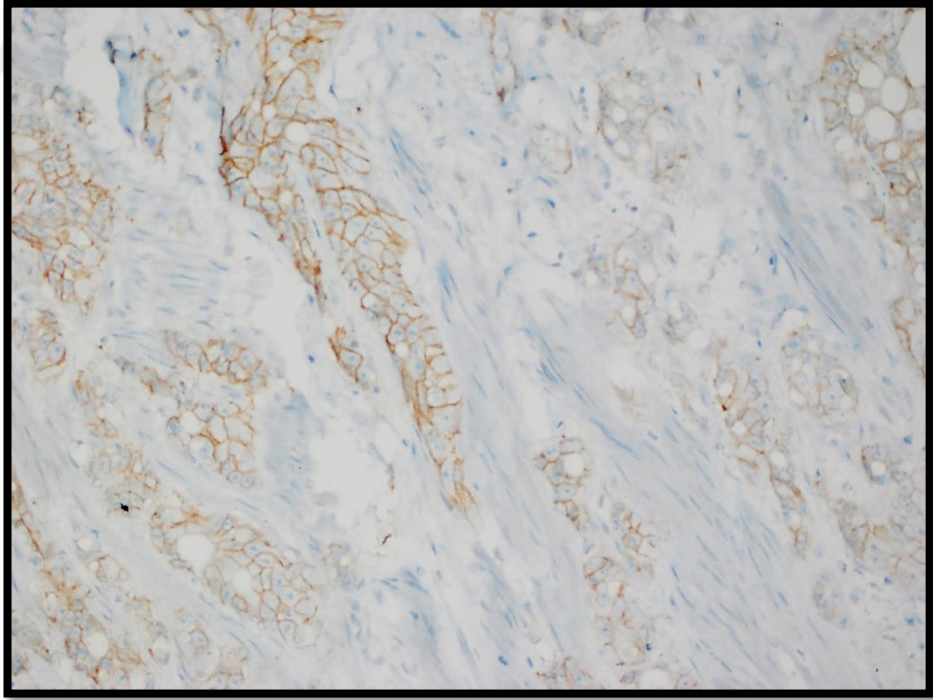
HER-2⁺/c-MET⁺ ko-ekspresyonu gösteren grup, diğer gruplar ile yaş, cinsiyet, makroskopik ve prognostik histopatolojik özellikler açısından incelendiğinde istatistiksel olarak aralarında bir fark saptanmamıştır (p>0,05).

Tüm bu gruplar histopatolojik faktörler açısından birbirleriyle karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlılık göstermemekle birlikte en çarpıcı bulgular şunlardı;

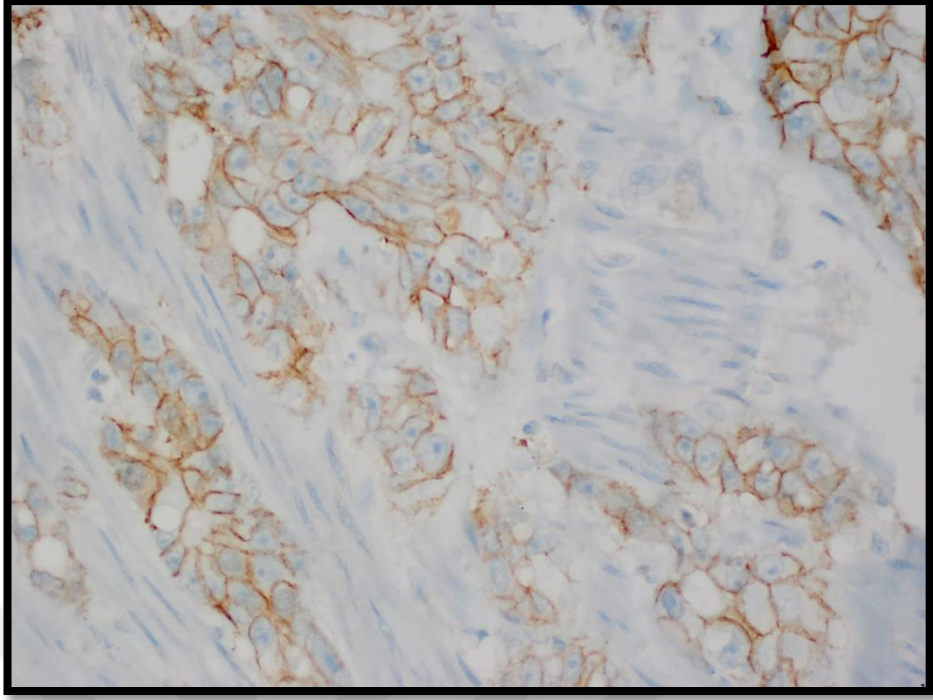
- Proksimal yerleşimli tümörlerin %53,3'ü (8/15) HER-2⁺/c-MET⁻, distal yerleşimli tümörlerin ise %38,3'ü HER-2⁻/c-MET⁺ şeklinde ekspresyon göstermekteydi.
- Lauren sınıflamasına göre diffüz tip morfoloji sergileyen tümörlerin %53,3'ü (8/15) HER-2⁻/c-MET⁺ şeklinde ekspresyon göstermekteydi.
- HER-2⁺/c-MET⁻ şeklinde ekspresyon sergileyen olguların %95,2'si (20/21) Lauren sınıflamasına göre intestinal tip morfoloji gösteriyordu.
- Erken evre olguların %44,4'ünde (4/9) HER-2⁻/c-MET⁻ şeklinde ekspresyon izlenmekteydi. Bu olguların sadece 2'sinde c-MET overekspresyonu görülmekteydi.



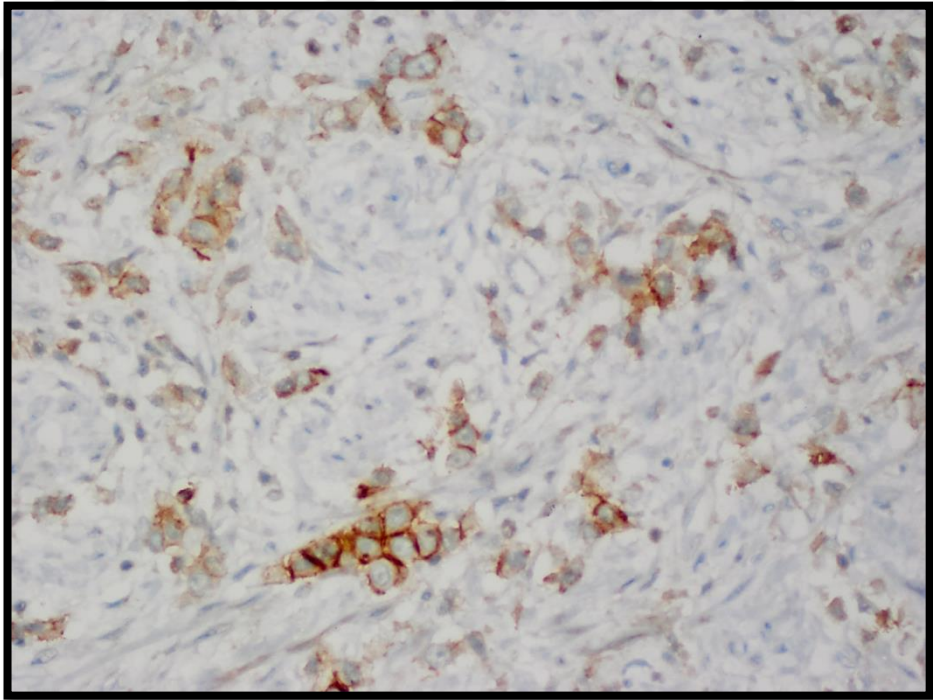
Resim 1. Zayıf, belli belirsiz, inkomplet bazolateral boyanma gösteren HER-2 (1+) tubuler adenokarsinom olgusu (x400)



Resim 2. Aynı olgudaki HER-2 (2+) intra-tümöral heterojenite alanları, tubuler adenokarsinom olgusu (x200)



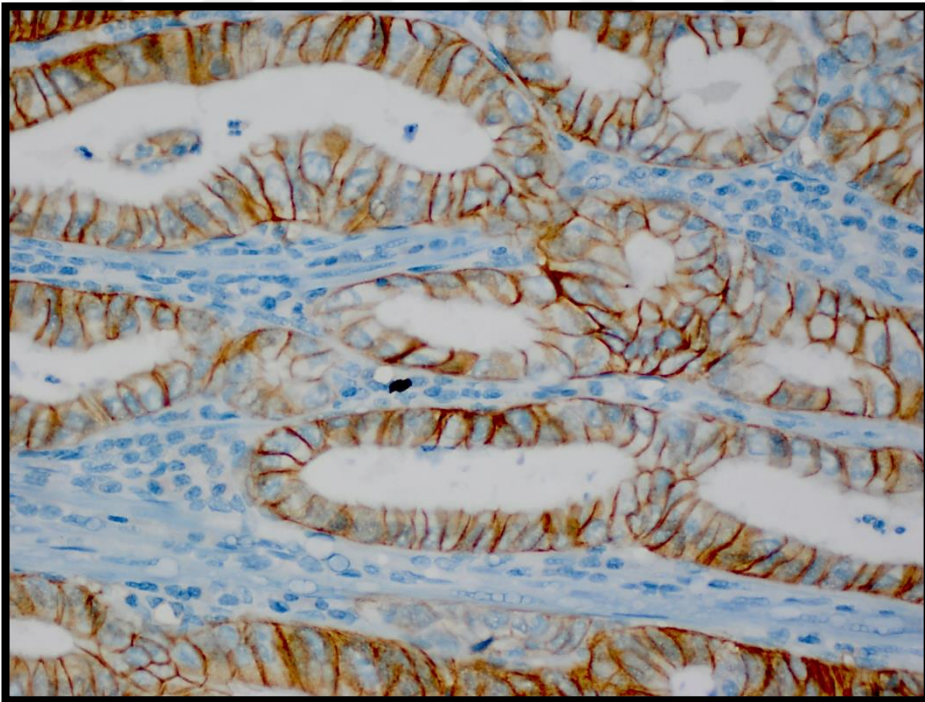
Resim 3. Orta şiddette membranöz bazolateral boyanma gösteren (2+) tubuler adenokarsinom olgusu (x400)



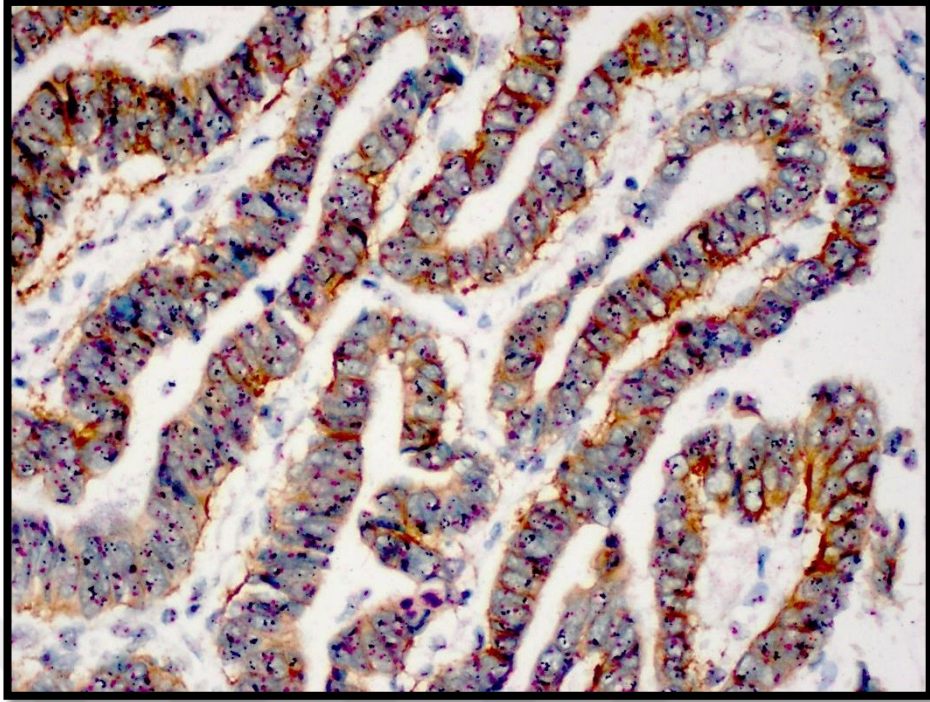
Resim 4. HER-2 (2+) az koheziv karsinom olgusu (x400)



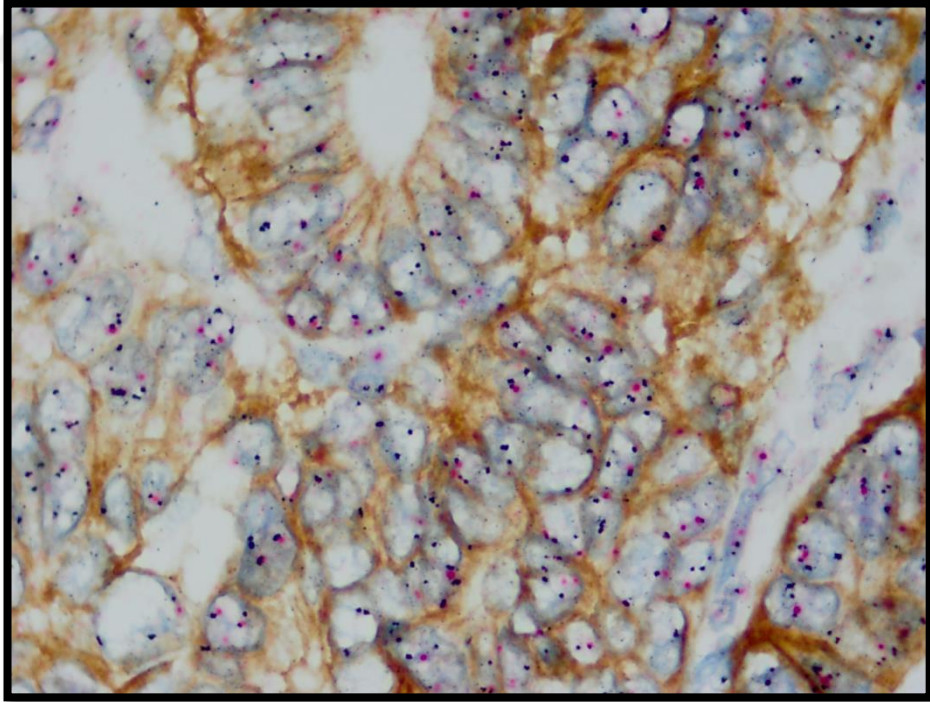
Resim 5. HER-2 (3+) tubulopapiller adenokarsinom olgusu (x40)



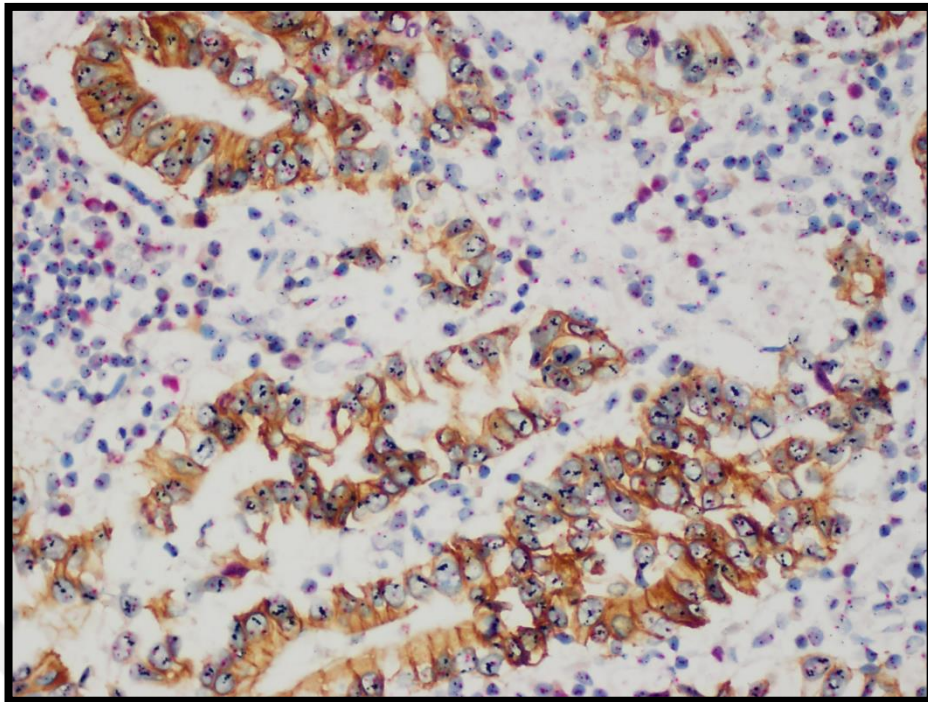
Resim 6. Kuvvetli membranöz bazolateral boyanma gösteren HER-2 (3+) tubuler adenokarsinom olgusu (x400)



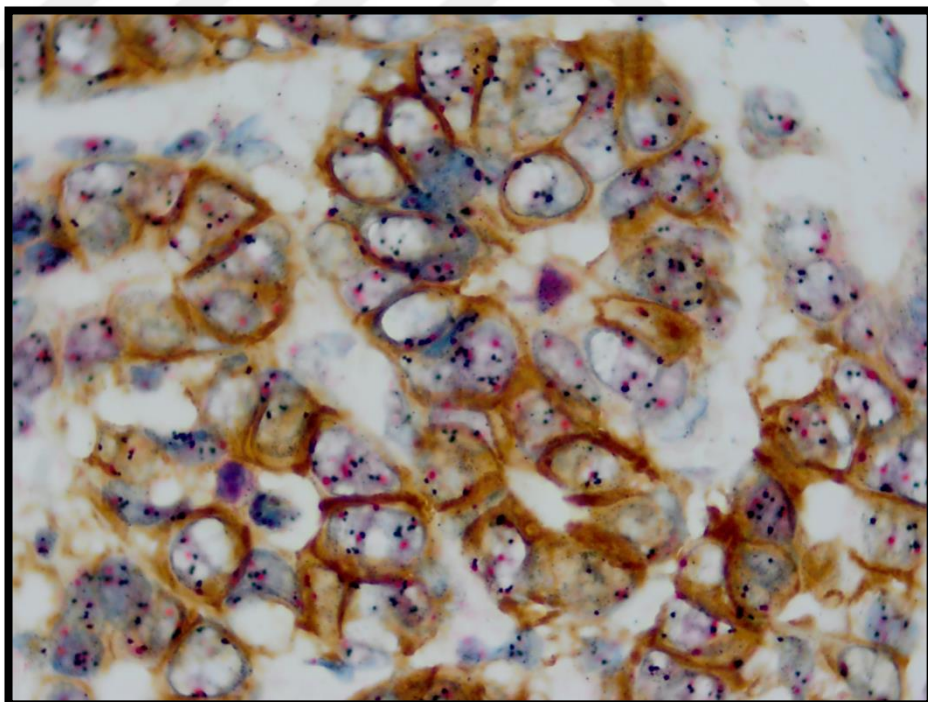
Resim 7. Dual SISH/IHK metodu ile amplifikasyon saptanan HER-2 (2+) tubuler adenokarsinom olgusu (x400)



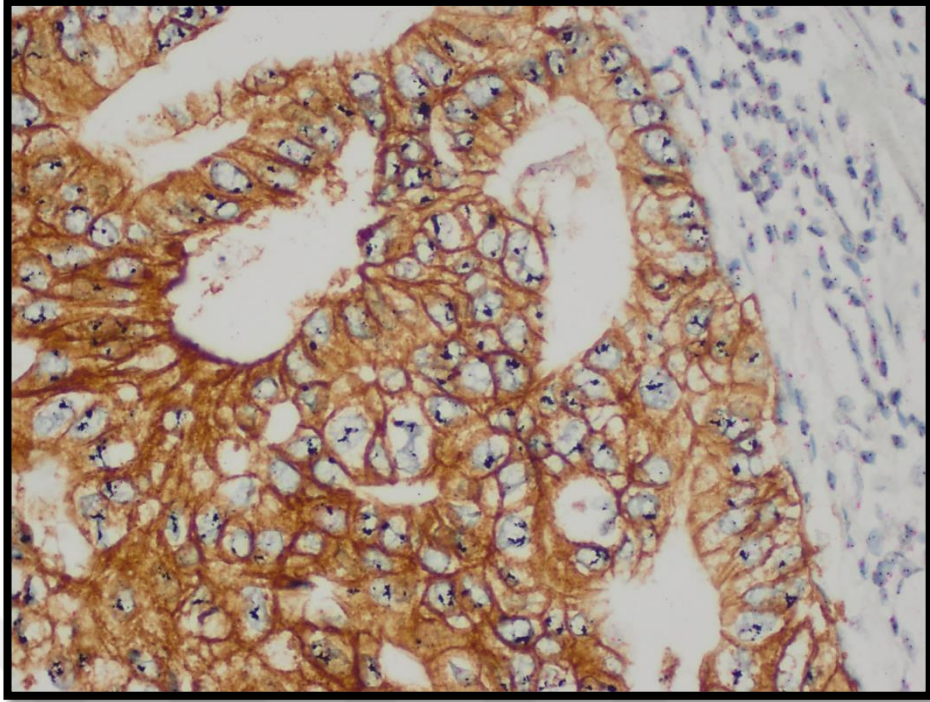
Resim 8. Dual SISH/IHK metodu, HER-2/kromozom17 $\geq$ 2, HER-2 (2+) (X1000)



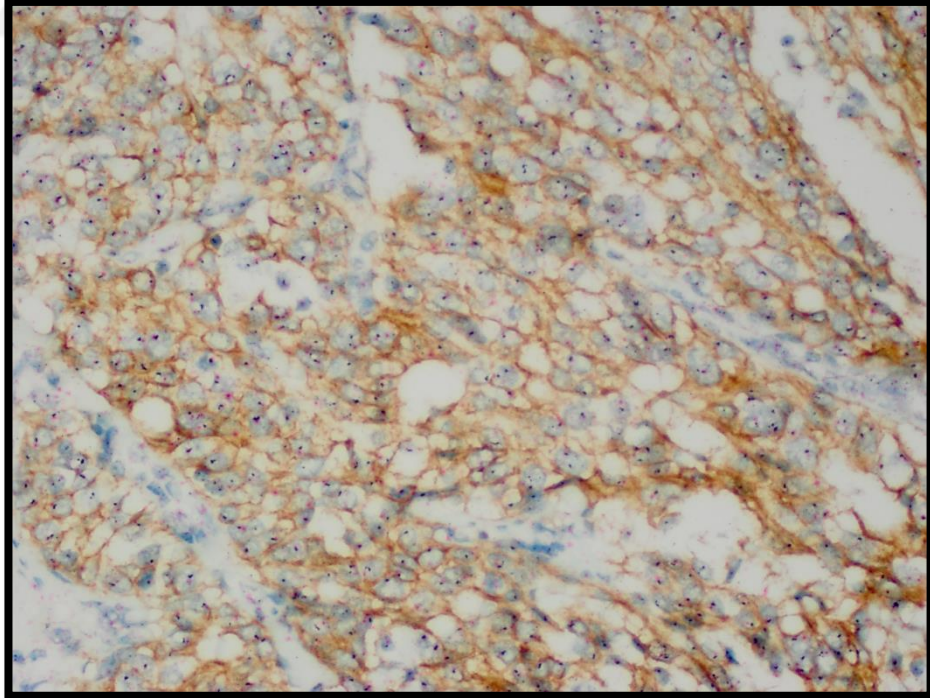
Resim 9. Dual SISH/IHK metodu, HER-2/kromozom17 $\geq$ 2, HER-2 (3+)
(X400)



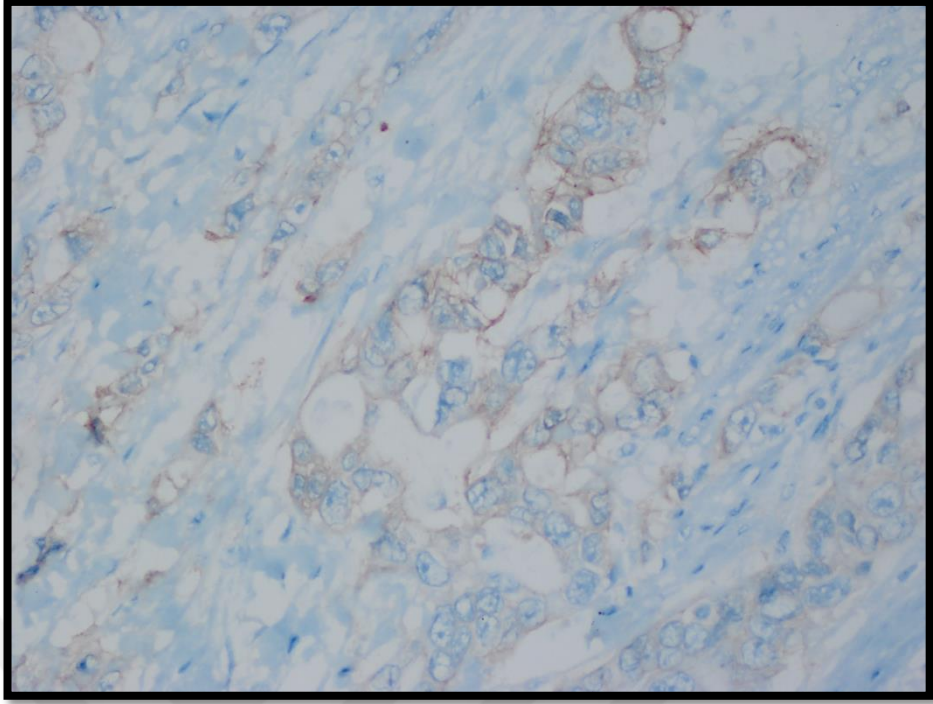
Resim 10. Dual SISH/IHK metod, HER-2/kromozom17 $\geq$ 2, HER-2 (3+)
(X1000)



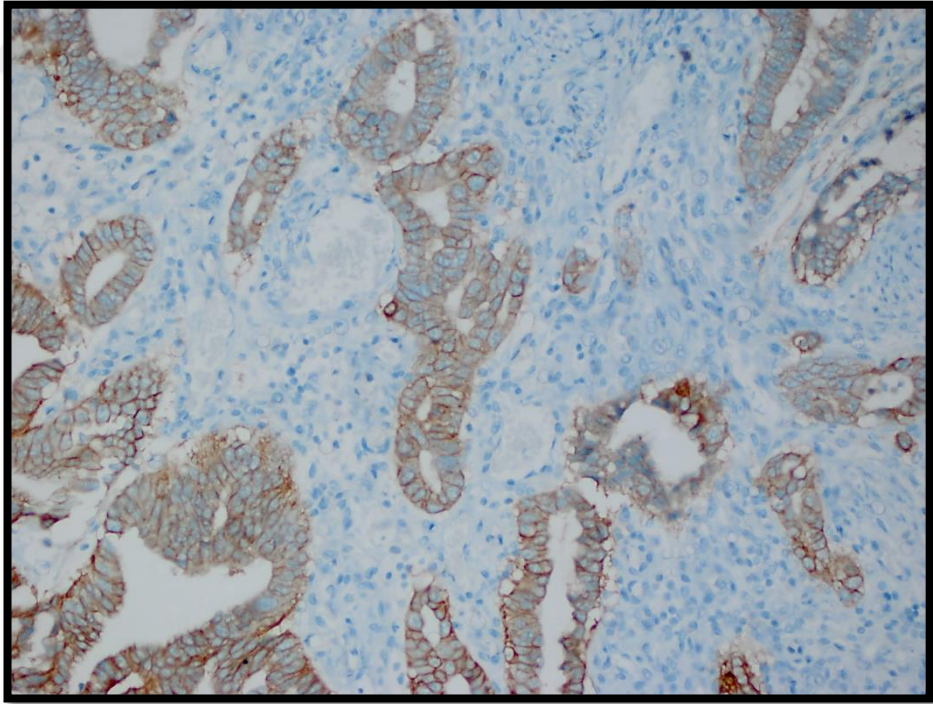
Resim 11. Dual SISH/IHK metodu, kümelenme gösteren HER-2 gen sinyalleri (x400)



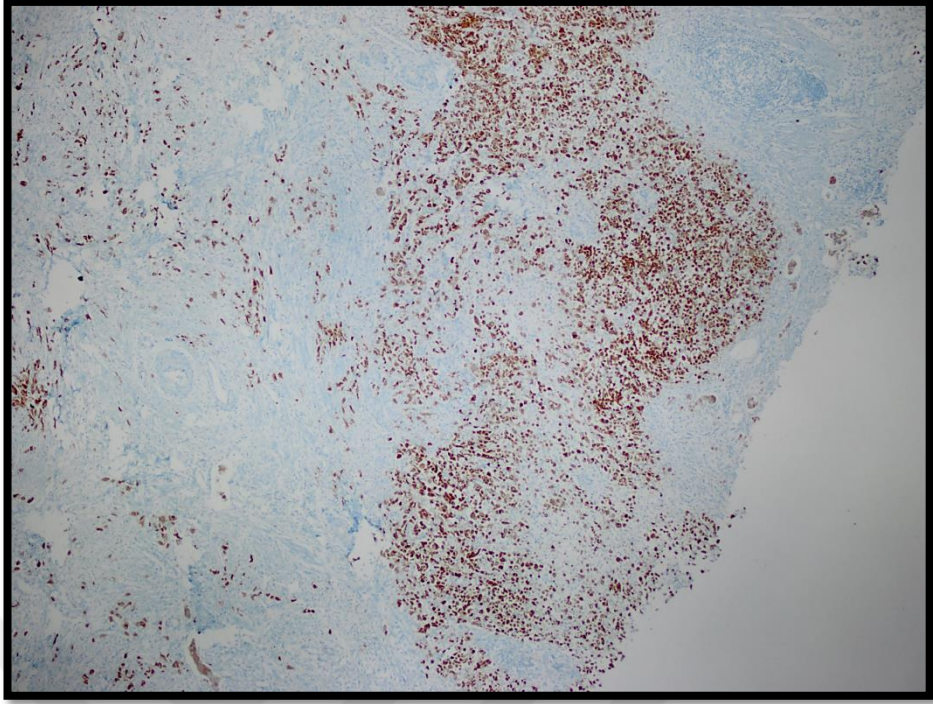
Resim 12. Dual SISH/IHK metodu, HER-2/kromozom17<2, HER-2 (3+) (X400)



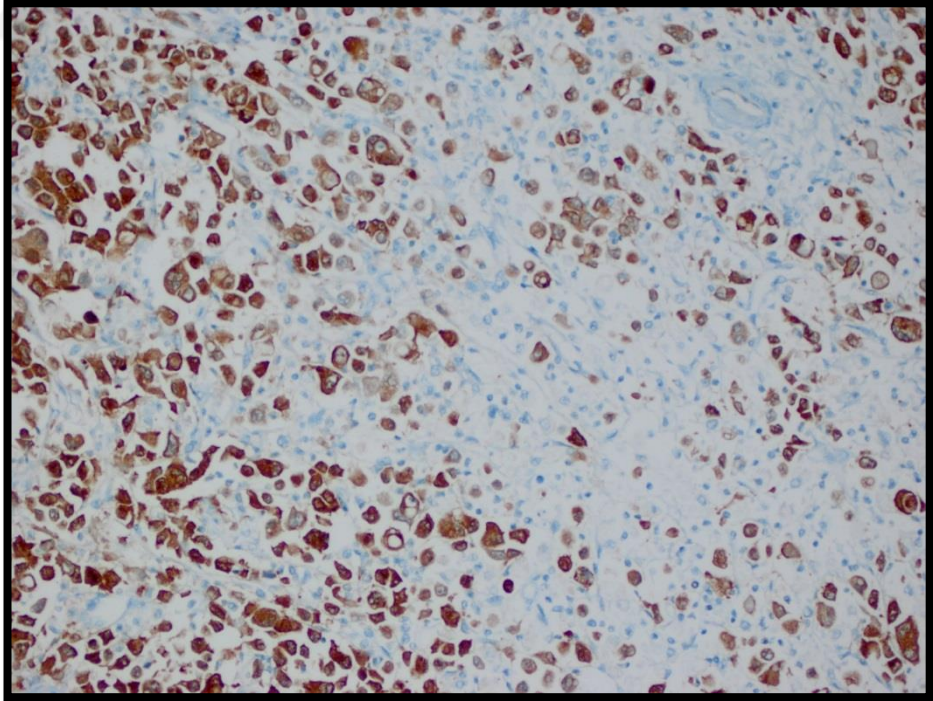
Resim 13. Zayıf, belli belirsiz membranöz boyanma, c-MET (1+)
(x400)



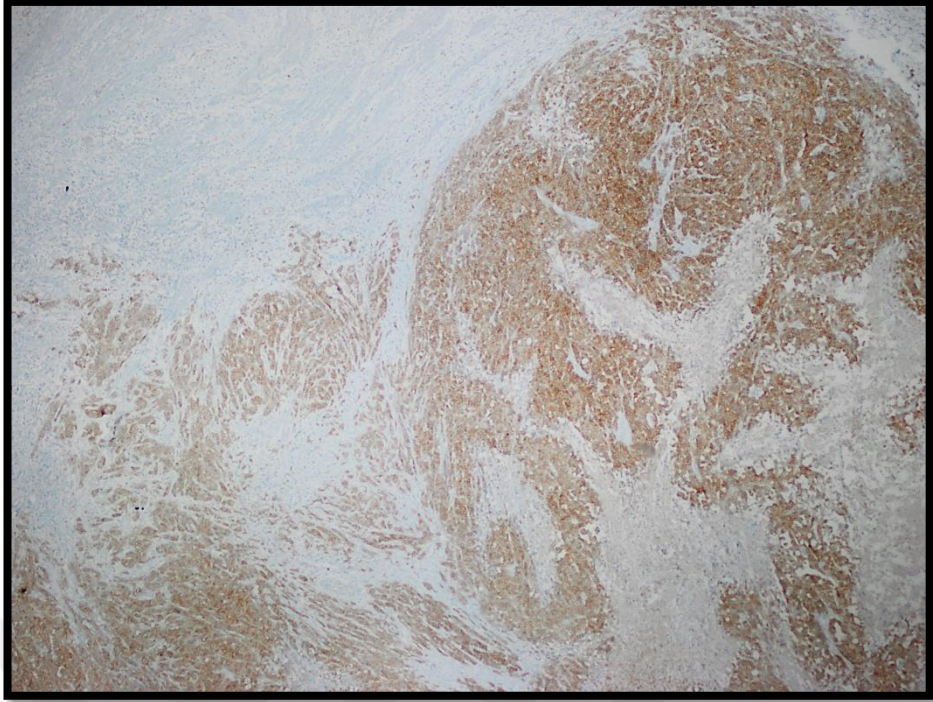
Resim 14. Orta şiddette membranöz boyanma, c-MET (2+) (x200)



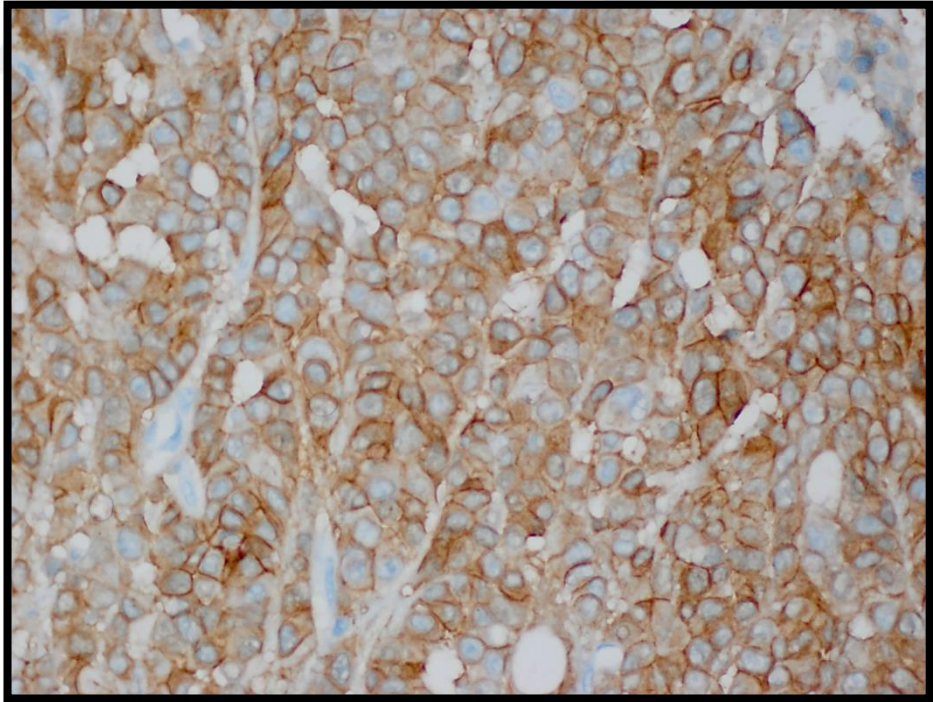
Resim 15. Kuvvetli boyanma gösteren az koheziv karsinom olgusu, c-MET (3+), (x40)



Resim 16. Kuvvetli sitoplazmik ve membranöz boyanma gösteren az koheziv karsinom olgusu, c-MET (3+) (x200)



Resim 17. Kuvvetli boyanma gösteren tubuler adenokarsinom olgusu, c-MET (3+) (x40)



Resim 18. Kuvvetli sitoplazmik ve membranöz boyanma gösteren tubuler adenokarsinom olgusu, c-MET (3+) (x400)

TARTIŞMA

Mide kanseri insidansı ve mortalitesi azalmış olmakla birlikte hala tüm dünyada görülme sıklığı açısından 5. ve kansere bağlı ölümlerde dünyada 3. sırada yer almaktadır (1) . Mide kanserli birçok hasta tanı anında ileri evre ve/veya metastatik evrededir (112). Özellikle bu hastalarda kombine kemoterapötik ajanların, tekli ajanlara göre genel sağkalımı arttırdığı izlenmiştir (113). Bunlara rağmen sağkalım oranlarının %20 seviyelerinde olması yeni etkin tedavilere gereksinimi doğurmuştur (114). Bu gereksinimden yola çıkarak 24 ülkeden 122 merkezin katılımıyla gerçekleştirilen ToGA (Trastuzumab for gastric cancer) çalışmasında, mide karsinomlarında HER-2 pozitifliği araştırılmış ve anti-HER-2 monoklonal antikoru olan Trastuzumab'ın ileri evre mide ve gastro-özofagial bileşke kanserlerinde kemoterapiye eklenmesinin sağkalımı arttırdığı gösterilmiştir (72). Trastuzumab tedavisi ilk olarak primer ve metastatik meme kanserlerinde kullanılmaya başlanmıştır ve HER-2 pozitifliği meme kanserlerinde kötü prognostik kriter olarak kabul edilmektedir (115). Ancak mide kanserlerinde HER-2 pozitifliğinin prognostik önemi halen tartışmalıdır (72). Benzer şekilde HER-2 gibi TKR ailesinin bir üyesi olan c-MET'in overekspresyonu ya da gen amplifikasyonunun da mide karsinomlarında progresyon ve sağkalım ile ilişkili olduğuna yönelik çalışmalar bulunmaktadır. Hayvan modelleri kullanılarak yapılan pre-klinik çalışmalarda, MET antikoru ya da küçük molekül MET inhibitörleri, c-MET amplifikasyonu olan gastrik hücrelerde tümör hücre proliferasyonunu ve tümör progresyonunu önlemiştir. Ayrıca c-MET yolağının aktivasyonu ile Trastuzumab tedavisine direnç geliştiği de bazı yayınlarda bildirilmektedir (111). Az sayıda yayın bulunmakla birlikte HER-2 eşliğinde artmış c-MET ekspresyonu gastrik karsinomların küçük bir kısmında gösterilmiş ve bunların daha agresif davranış sergilediği

görülmüştür (116). Bu veriler doğrultusunda Trastuzumab dışında yeni geliştirilecek olan hedefe yönelik tedavilerin, mide kanserli hastalarda yeni bir tedavi seçeneği olabileceği ya da tedaviye direnç gelişimini önleyebileceği düşünülmektedir.

Bu çalışmada mide kanseri ile ilişkili onkogenlerden HER-2'nin amplifikasyon/overekspresyon (dual SISH ve İHK ile) sıklığı, c-MET'in overekspresyon durumu ve bunların klinikopatolojik verilerle ilişkisi incelenmiştir. Tüm mide kanseri olgularında İHK'sal olarak HER-2 overekspresyonu %19,2 (39/203) olarak bulunmuş, bu olguların 32'sinde de (%82) gen amplifikasyonu saptanmıştır. Terashima M. ve ark.'nın yaptığı, 829 mide dokusunun incelendiği bir çalışmada İHK ve SISH kullanılarak HER-2 ekspresyonu %13,6 olarak bulunmuştur (117). Xu CC. ve ark.'nın yaptığı çalışmada HER-2 overekspresyonu %11,9; Zhou F. ve ark.'nın yaptığı çalışmada %11,89 olarak bulunmuştur (118, 119). Bu çalışmalarda ToGA klinik çalışmasına göre Hoffman tarafından uyarlanmış HER-2 skorlama sistemi kullanılmış ve HER-2 (2+) olan olgulara FISH (florasan in situ hibridizasyon) uygulanmıştır. FISH sonucuna göre amplifikasyon konfirme edilirse overekspresyon olarak kabul edilmiştir. Literatürde mide kanserlerinde HER-2 gen amplifikasyonu veya artmış protein ekspresyonu primer tümörlerin %7-34'ü gibi geniş bir aralıkta pozitif olarak bulunmaktadır (120). Aynı değerlendirme kriterlerine göre yapılan Kore, Hindistan, Mısır, İspanya ve Brezilya kökenli çalışmalarda HER-2 overekspresyonu sırasıyla %10,8, %24,5, %27, %7,5, %10,5 gibi değişik oranlarda bulunmuştur (120-124). Çalışmamızda, mide kanserlerinde SISH ile konfirme HER-2 pozitiflik oranı %15,7 olup literatürde bildirilen oranlarla uyumlu izlenmiştir. Çalışmalar arasında HER-2 pozitifliği açısından görülen farklılıklar, coğrafi özelliklere, tümör heterojenitesine ve inceleyen patoloğa bağlanabilir. Bunun dışında HER-2 overekspresyonunun değerlendirilmesinde pre-analitik koşullar büyük önem taşır. Biyopsi veya cerrahi materyalin hızlı bir şekilde ve yeterli miktarda %10 nötral tamponlu formalin içerisinde, patoloji laboratuvarına gönderilmesi sağlanmalıdır. Patoloji laboratuvarında gastrektomi materyali bir an önce açılarak en kısa zamanda mide lümenine fiksatifin ulaşması

sağlanmalıdır. Fiksatifte girene kadar geçen soğuk iskemi süresi 1 saati aşmamalıdır. Fiksasyon süresi, meme materyalleri için önerildiği gibi, küçük ya da büyük tüm materyallerde 6 ile 72 saat arasında tutulmalıdır. Doku takibinde 60 derece üzerinde sıcaklık uygulanmamalı, alkol fiksasyonu ve hızlı takip yapılmamalıdır (125). Tüm bu özellikler göz önüne alındığında, çalışmamızda, pre-analitik sürecini bilemediğimiz daha eski yıllara ait olgularımızda tespit edemediğimiz HER-2 ekspresyon kayıpları yaşamış olabiliriz.

Pyo JS ve ark. yaptıkları bir meta-analizde, 45 çalışmadan 12,679 mide karsinomu olgusunu ele almış ve HER-2 pozitifliği açısından İHK ve in situ hibridizasyon yöntemlerini karşılaştırmıştır. Bu çalışmada tüm HER-2 skor (0/1+, 2+, 3+) gruplarında SISH ile, FISH ve CISH'e (kromojenik in situ hibridizasyon) göre daha yüksek pozitiflik oranları elde edilmiştir. Bununla birlikte ISH yöntemleri arasında tanısal açıdan anlamlı bir fark saptanmamıştır. Ayrıca bu çalışmada HER-2 İHK skoru (0/1+) ya da (3+) olan olguların ISH yöntemleriyle konfirmasyonunda uyumun çok yüksek olduğu, HER-2 İHK skoru (2+) olanlarda ise bu uyumun daha düşük olduğu (95% confidence interval [CI] 0.331-0.458) belirtilmektedir (126). Bizim olgularımız da benzer özellik sergilemekte olup HER- 2 skoru (+2) olanlarda uyum %70 ve (3+) olanlarda uyum %94,7 olarak saptanmıştır.

İHK ve ISH yöntemini (ISH/İHK kombinasyon yöntemi) aynı preprat üzerinde değerlendiren az sayıda çalışma bulunmaktadır. Werner D. ve ark.'nın yaptıkları bir çalışmada mide karsinomlarında SISH/İHK kombinasyon yöntemi, İHK ve SISH'in ayrı ayrı değerlendirilmesi ile karşılaştırılmış ve Altmann'ın kappa değeri yorumlamasına göre uyum yüksek bulunmuştur (127). Emily S. ile ark.'nın CISH/İHK kombinasyon yöntemiyle yaptıkları çalışmada ve Hirschmann A. ile ark.'nın SISH/İHK kombinasyon yöntemiyle yaptıkları çalışmada da benzer şekilde %95'in üzerinde uyum gözlenmiştir. Ancak her iki çalışmada da İHK'sal açıdan bazı olgularda daha zayıf boyanma gözlenmiştir (128, 129). Bizim olgularımızın da HER-2 skoru (2+) olanların 16'sında, skoru (3+) olanların 2'sinde SISH/İHK kombinasyon yöntemiyle İHK'sal açıdan boyanma çok az görülmüş ya da negatif olarak

saptanmıştır. Bizim gözlemlerimize göre SISH/İHK kombinasyon yönteminin çok önemli bir dezavantajı da immunhistokimya boyanma şiddetinin optimize edilememesine bağlı olarak sinyallerin maskelenmesi ve bu nedenle değerlendirilmesinde yaşanan güçlölüttür. Ancak bu yöntemin doku yetersizliklerini görece ortadan kaldıracıebileceği, intra-tümöral heterojeniteye bağlı yanlış negatiflikleri azaltabileceği ve daha kısa zamanda sonuç vermeyi sağlayabileceği açıktır. Bu nedenlerle yöntemin daha iyi bir şekilde optimize edilmesi ve daha fazla çalışma ile avantajlarının kanıtlanmasına gereksinim duyulmaktadır.

Öte yandan HER-2 pozitifliğinin anlamını araştıran, klinik ve histopatolojik verilerle karşılaştıran pek çok çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalardan oluşan bir meta-analizde 17,494 mide karsinomu olgusu değerlendirilmiş ve HER-2 overekspresyonunun erkek cinsiyet, proksimal tümör yerleşimi, intestinal tip morfoloji, lenf nodu metastazı, uzak metastaz ve ileri evre ile korele olduğu saptanmıştır. Bununla birlikte yaş, tümör çapı, lenfovasküler invazyon ve perinöral invazyon açısından istatistiksel olarak bir fark gözlenmemiştir (130). Benzer şekilde Trastuzumab tedavisinin mide karsinomlarında kullanılmasının temelini oluşturan ToGA çalışmasında HER-2 ekspresyon oranı proksimal tümörlerde %34, distal yerleşimli tümörlerde %20 olarak bulunmuştur. Ayrıca intestinal tip tümörlerde %32,2, diffüz tip tümörlerde %6,1, mikst tümörlerde %20,1 oranında HER-2 pozitifliği saptanmıştır (72). Ancak HER-2 pozitifliği açısından farklı, birbirleriyle çelişkili sonuçlar da bulunmaktadır. Zhou F. ve ark.'nın yaptığı çalışmada HER-2 overekspresyonu lenf nodu metastazı yanı sıra tümör büyüklüğü ile de ilişkili bulunmuş ancak yaş, cinsiyet, tümör yerleşimi, TNM evrelemesi ve damar invazyonu açısından bir ilişki bulunamamıştır (119). Yıldız ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada HER-2 overekspresyonu olan ve olmayan gruplar arasında yaş, cinsiyet, tümör yerleşimi, uzak metastaz varlığı, lokal invazyon, omental tutulum, pT evresi, lenfovasküler invazyon ve sağkalım arasında ilişki saptanmamıştır (131). Jia YX ve ark.'nın yaptıkları bir çalışmada HER-2 overekspresyonu pT evresi ve lenf nodu metastazı ile ilişkili bulunurken tümör tipi ve diferansiyasyonu ile ilişki saptanmamıştır (132). Moelans ve

ark.'nın yaptıkları bir çalışmada ise daha genç yaşta (<45 yaş) mide karsinomu tanısı alan olgularda HER-2 overekspresyonu/amplifikasyonu oranı daha düşük saptanırken, geç başlangıçlı (>45 yaş) mide karsinomlarında daha yüksek saptanmıştır. Moelans ve ark.'nın çalışmasında bu sonucu açıklayabilecek bir diğer bulgu, erken başlangıçlı olguların tümör histolojik tiplerinin ağırlıklı olarak diffüz tipte olmasıdır (133).

Literatürde birbirinin tersini savunan farklı sonuçlar bulunmakla birlikte, çalışmalarda ağırlıklı olarak HER-2 pozitif tümörlerin Lauren sınıflamasına göre intestinal tip morfoloji sergilediği, iyi-orta derece diferansiye olduğu, proksimal yerleşim gösterdiği, lenf nodu metastazı ve ileri pT evresi ile ilişkili olduğu göze çarpmaktadır (119, 134-137). Bizim çalışmamızda da HER-2 overekspresyonu gösteren tümörler daha çok intestinal tip morfoloji sergilemektedir ($p<0,05$). Ancak HER-2 overekspresyonu diğer histopatolojik parametreler ile karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan anlamlı bir ilişki saptanmamıştır.

Çalışmamızda İHK'sal açıdan HER-2 pozitif olgularımızı aynı zamanda tirozin kinaz reseptör (TKR) ailesinin bir başka üyesi olan c-MET ile İHK'sal açıdan değerlendirerek aralarındaki ilişkiyi ortaya koymaya çalıştık. Bunun için HER-2 negatif (skor 0/1+) 40 olgu da c-MET immunohistokimyasal boyası ile boyanarak karşılaştırma amaçlı kontrol grubu olarak değerlendirilmiştir. İHK'sal yöntemle pozitif olarak değerlendirilen, fakat SISH ile konfirmasyonunda amplifikasyon saptanmayan 7 olgu da negatif olarak ele alınarak kontrol grubuna dahil edilmiştir. Ancak İHK'sal sonuçları değerlendirme yöntemi için literatüre bakıldığında, daha önce yapılmış olan çalışmalarda c-MET pozitifliğini yorumlamada özgün, standardize edilmiş kriterler bulunmadığı görülmektedir. Biz de çalışmamızda genel yaklaşımlar doğrultusunda, %10'dan fazla tümör alanında orta ya da kuvvetli sitoplazmik/membranöz boyanma gösteren olguları, sırasıyla skor (2+) ve (3+) olarak değerlendirerek pozitif kabul ettik. Bu yöntemle değerlendirmede olgularımızın %48,1'inde (38/79) c-MET pozitifliği saptanmıştır. HER-2 pozitif 32 olgunun 11'inde (%34,3) c-MET pozitifliği izlenirken, HER-2 negatif 47 olgunun 27'sinde (%57,4) c-MET pozitifliği gözlenmiştir. HER-2 ve c-MET

arasındaki bu ters ilişki istatistiksel olarak da anlamlılık göstermektedir ($p<0,05$). c-MET pozitifliğini yaş, cinsiyet ve histopatolojik veriler açısından incelediğimizde; c-MET (+) olguların daha çok distal yerleşim gösterdiği görülmüştür ($p<0,05$). Diğer histopatolojik parametrelerde istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. HER-2⁺/c-MET⁺, HER-2⁺/c-MET⁻, HER-2⁻/c-MET⁺, HER-2⁻/c-MET⁻ şeklinde elde edilen tüm kombinasyon grupları histopatolojik veriler açısından birbirleriyle karşılaştırıldığında, istatistiksel açıdan anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p>0,05$). Ancak HER-2⁺/c-MET⁻ şeklinde ekspresyon gösteren tümörlerin daha çok proksimal yerleşim gösterdiği ve intestinal tip morfoloji sergilediği görülmüştür.

Bulgularımızı literatürdeki verilerle karşılaştırdığımızda; Lee HE. ve ark.'nın mide kanserli 438 hastayla yaptığı bir çalışmada 104 (%23,7) olguda c-MET overekspresyonu saptadığı görülmektedir. Bu çalışmada protein ekspresyonunun gösterilmesi için İHK yöntemi kullanılmış ve tümör hücrelerinin membranöz boyanma yüzdelerine göre skorlama sistemi oluşturulmuştur (138). Nakajima M. ve ark.'nın mide kanserli 128 hastayla yaptığı bir çalışmada c- MET overekspresyon sıklığı %46,1 olarak bulunmuştur (139). Janjigian YY. ve ark.'nın yaptığı çalışmada da yine İHK yöntemi kullanılmış ve sitoplazmik boyanma derecelerine göre değerlendirilmiştir. Bu çalışmada c- MET overekspresyon sıklığı %63 olarak saptanmıştır (140). Drebber U. ve ark.'nın yaptığı çalışmada da İHK yöntemi kullanılmış ancak c-MET pozitifliği sitoplazmik ve membranöz boyanma derecelerine göre değerlendirilmiş ve %73,7 olarak bulunmuştur (141). Sotoudeh K. ve ark.'nın sadece kuvvetli sitoplazmik ya da membranöz boyanmayı c-MET overekspresyonu olarak kabul ettikleri çalışmalarında %71 oranında pozitiflik saptamışlardır (107). Pyo JS ve ark.'nın yaptıkları 37 farklı çalışmayı içeren bir meta-analizde, 8,395 mide karsinomu olgusu ele alınmış, çalışmalarda c-MET pozitifliğinin İHK'sal olarak %1,8-%82,5 arasında değiştiği ve ortalama c-MET overekspresyonunun %31,5 (2,641/8,395) olduğu gözlenmiştir (126). Literatürdeki tüm bu çalışmalara bakıldığında, çalışmalar arasında c-MET overekspresyon sıklığı açısından büyük farklılıklar bulunduğu görülmektedir. Bu fark, c-MET ekspresyon pozitifliği için

kullanılan değerlendirme yöntemlerinin değişik olmasından kaynaklanıyor gibi görülmektedir. Çalışmamızda hem membranöz, hem de sitoplazmik boyanma pozitif kabul edilerek değerlendirme yapılmış olmasına karşın, elde edilen pozitiflik oranı diğer çalışmalarla kıyaslandığında, en düşük ve en yüksek pozitiflik oranları arasında median bir değerde bulunduğu görülmektedir. Yukarıda sözü edilen çalışmalar da dahil olmak üzere literatürdeki çalışmaların bazılarında sadece sitoplazmik boyanma, bazılarında membranöz boyanma, bazılarında ise hem sitoplazmik hem de membranöz boyanma dikkate alınmış, boyanan alanı değerlendirme açısından kesme değeri olarak %5, %10, %25, %50 gibi farklı yüzdelere göre sonuç belirtilmiştir. Ayrıca çalışmalar arasında skorlama kriterleri açısından da fark olduğu görülmüştür. Bu nedenle İHK yöntemi ile c-MET ekspresyonunu belirlemede standart bir skorlama kriteri olmaksızın verileri karşılaştırmak mümkün gözükmemektedir. Ancak yine de c-MET'in pozitiflik oranlarındaki bu geniş skala, tek başına İHK ile c-MET overekspresyonunu değerlendirmenin sakıncalı olduğunu düşündürmektedir.

Literatürde c-MET overekspresyonu ile klinikopatolojik değişkenler arasındaki ilişkiyi gösteren tartışmalı sonuçlar bulunmaktadır. Retterspitz MF ve ark.'ları diffüz tip karsinomların %51'inde (45/88) c-MET overekspresyonu saptamıştır. Aynı şekilde Ma J ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada da c-MET overekspresyonu Lauren sınıflamasına göre diffüz tip ile korele bulunmuş olsa da çalışmaların daha büyük bir kısmında c-MET pozitifliği intestinal tip karsinomlarda görülmektedir (107, 138, 140, 142-144). Pyo JS ve ark. da c-MET overekspresyonunu erkek cinsiyeti, kötü diferansiyasyon, lenf nodu metastazı, yüksek TNM evresi ile ilişkili bulmuş ve GSK üzerine kötü prognostik etkili olarak saptamışlardır (126). Benzer şekilde bazı çalışmalarda c-MET overekspresyonu tümör invazyon derinliği, lenf nodu metastazı, uzak metastaz, rekürrens, perinöral invazyon ile ilişkili ve bağımsız prognostik faktör olarak bulunmuşken, bazı çalışmalarda da hiçbir klinikopatolojik faktörle ilişki saptanmamıştır (111). Bizim çalışmamızda ise literatüre ek olarak c-MET (+)'liği ile distal yerleşim arasında anlamlı bir ilişki saptanmıştır. Olgularımızda morfolojik olarak diffüz tip mide karsinomlarında

c-MET pozitifliği daha çok görülmekle birlikte distal yerleşim dışında hiçbir histopatolojik faktörle istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmamıştır.

Genel olarak bakıldığında, TKR ailesinin EGFR, c-MET, FGFR-2 (fibroblast growth faktör reseptör-2), HER-2 gibi farklı üyelerinin ko-ekspresyonları görülebilmektedir (116, 132). Pyo JS ve ark.'nın yaptığı çalışmada c-MET (+) olan olguların HER-2 (+)'liği ile korelasyon gösterdiği bildirilmiştir (126). Yıldız Y ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada HER-2 (+) olan grupta %84,6 c-MET (+)'liği, HER-2 (-) olan grupta %56,2 c-MET (+)'liği saptanmıştır (131). Jia YX ve ark.'larının mide karsinomlarında c-MET, FGFR-2, HER-2 ekspresyonlarını araştırdıkları çalışmalarında ise olguların sadece %7'sinde HER-2+/c-MET+'liğini beraber saptamışlardır. TKR ko-ekspresyonunun önemli ölçüde kötü klinik sonuçlarla ilişkili olduğunu; en kötü sağkalım sonuçlarının da üçlü pozitif mide karsinomlarında izlendiğini belirtmişlerdir (132). Fuse ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada Japon kökenli olgularda HER-2+/c-MET+ ko-ekspresyonu %8 olarak saptanmıştır (145). Bizim çalışmamızda da HER-2 (+) olguların %34,3 'ünde (11/32) c-MET (+)'liği, HER-2 (-) olguların %57'sinde (27/47) c-MET (+)'liği saptanmıştır. Çalışmamızda literatürdekinin aksine HER-2(-) olan olgularda c-MET (+)'liği daha yüksek oranda saptanmıştır ($p<0,05$). Literatürde HER-2+/c-MET+ pozitif olguların farklı oranlarda gözlenmesi c-MET'in İHK'sal olarak farklı kriterlerle değerlendirilmesinden kaynaklanıyor olabilir. Klinik açıdan HER-2 pozitif mide karsinomlu olguların %50'sinde tedaviye primer direnç gözlenmektedir. Başlangıçta yanıt veren olguların çoğunda da ilk yıl içinde sekonder direnç gelişmektedir. TKR'lerin ortak hücre içi sinyal yollarını kullandıkları göz önüne alındığında, c-MET ve diğer TKR'lerin alternatif aktivasyonları ya da beraber ko-ekspresyonları, çapraz yollardan hücre içi sinyalin sürekli aktive olmasına neden olmaktadır. Bu da HER-2 ile hedefe yönelik tedavilerin bir kısmında direnç gelişmesine neden olabilmektedir (132).

Fuse ve ark.'nın ileri evre mide karsinomlarında sağkalım üzerine yaptığı bir çalışmada HER-2, c-MET ve EGFR TKR'lerin ko-ekspresyonlarının GSK üzerine istatistiksel olarak bir etkisi bulunmadığı görülmüştür. Ancak HER-

2⁺/c-MET⁺ ko-ekspresyonu gösteren grup ile yalnızca HER-2⁺/c-MET⁻ ekspresyonu gösteren grup arasında sağkalım açısından istatistiksel olarak fark saptanmıştır (p=0,043). Buna dayanarak c-MET pozitifliğinin kötü prognostik faktör olarak rol oynadığını belirtmişlerdir (145). Ha ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada 1,589 gastrektomi yapılmış mide karsinomlu olgunun doku mikro-array örnekleri, HER-2, c-MET ve EGFR ile İHK'sal olarak boyanmış ve FISH ile konfirme edilmiştir. Bunun sonucunda 169 HER-2 (+) olgunun 15'inde (%9) üçlü pozitiflik (HER-2⁺/c-MET⁺/EGFR⁺), 37'sinde (%22) c-MET ile beraber pozitiflik ve 29'unda (%17) EGFR ile beraber pozitiflik izlenmiştir. Olguların 88'inde (%52) sadece HER-2 (+)'liği görülmüştür. Ortalama GSK, üçlü pozitiflik gösteren grupta 63 ay, üçlü negatif olan grupta 113 ay olarak saptamışlardır. Artmış sayıda TKR ko-ekspresyonunun genç yaş, daha büyük tümör boyutu, intestinal morfoloji ile ilişkili olduğu izlenmiştir (p<0,05). Ayrıca HER-2⁺/c-MET⁺ mide karsinomlu olgunun perikardiyal efüzyonundan izole edilen tümör hücreleri kullanılarak tedaviye yanıtı incelenmiştir. Bu yöntemle elde edilen tümör hücrelerinde, yalnızca HER-2 inhibitörü (Lapatinib) kullanımına kıyasla Lapatinib + MET inhibitörü (PHA665752) kombinasyonunun ERK(ekstrasellüler düzenleyici kinaz)/AKT yolunda ve hücre çoğalmasında daha ciddi bir inhibisyon sağladığını saptamışlardır (116). Bizim çalışmamızda ise HER-2⁺/c-MET⁺ ko-ekspresyon gösteren grup ile HER-2⁺/c-MET⁻, HER-2⁻/c-MET⁺, HER-2⁻/c-MET⁺ olan gruplar arasında histopatolojik prognostik veriler açısından istatistiksel anlamlı bir fark izlenmemiştir. Bu sonucun, çoğu olgunun ileri evrede tanı almış olması ve gruplarımızın sınırlı sayıda olgu içermesi ile ilişkili olması olasıdır.

SONUÇ

Bu çalışmada, anabilim dalımızda, 1996-2016 yılları arasında, ameliyat materyali değerlendirilen mide kanseri olgularında HER-2 pozitifliğinin sıklığı, artmış HER-2 ekspresyonunun immunohistokimyasal ve silver in situ hibridizasyon (SISH) yöntemleri ile tutarlılığı, histopatolojik prognostik faktörlerle ilişkisi değerlendirilmiştir. Ayrıca yeni tedavi yaklaşımlarına ışık tutmak açısından mide kanseri olgularında c-MET ekspresyonunun histopatolojik prognostik faktörler ve HER-2 ekspresyonu ile ilişkisi incelenmiştir.

Tüm olgular İHK'sal olarak HER-2 ile boyanmış ve %19,2 (39/203) oranında pozitiflik elde edilmiştir. SISH ile korelasyon sonucu bu oran %15,7 (32/39) saptanmış olup literatürde bildirilen oranlarla uyumlu izlenmiştir.

HER-2 ekspresyonunu doğru değerlendirebilmek için pre-analitik koşulların uygun olması gerekmektedir. Sağlıklı bir değerlendirme için materyalin fiksatife girene kadar geçen süresi 1 saati aşmamalıdır. Aynı şekilde tespit süresi de 6-72 saat arasında olmalıdır. Tüm bu süreçlerdeki aksamalar yanlış değerlendirmelere neden olabilmektedir. Çalışmamızda eski yıllara ait olgularımız da olduğu için tespit edemediğimiz ekspresyon kayıpları yaşamış olabiliriz.

Uygulanan dual SISH/İHK yöntemi ile HER-2 İHK skoru (2+) 20 olgunun 14'ünde (%70), skoru (3+) olan 19 olgunun 18'inde (%94,7) pozitiflik saptanmıştır. HER-2 skoru (3+) olanların, HER-2 skoru (2+) olanlara göre SISH yöntemi ile daha iyi uyumluluk gösterdiği izlenmiştir. Literatürde de benzer şekilde İHK'sal olarak (2+) olgularda SISH ile pozitiflik daha az görülmektedir. Bunun nedenleri; gözlemciler arasındaki uyumsuzluk, intra-

tümöral heterojenite, doku kayıplarına bağlı yanlış değerlendirmeler ve (2+) olguların değerlendirme kriterlerinin yeterli olmayışıdır.

Dual SISH/İHK kombinasyon yönteminin teorik olarak doku yetersizliklerini görece ortadan kaldıracabileceği, intra-tümöral heterojeniteye bağlı yanlış negatiflikleri azaltabileceği ve daha kısa zamanda sonuç vermeyi sağlayabileceği gibi avantajları bulunmakla birlikte pratikte (2+) olgularımızın %80'inde (16/20) bu yöntem ile İHK'sal boyanma ya çok zayıftı ya da hiç bulunmamaktaydı. Ayrıca bazı (3+) olgularda İHK'sal olarak kuvvetli membranöz boyanmadan dolayı sinyal sayımı maskelenmekteydi. Literatürde dual SISH/İHK metodu ile ilgili az sayıda çalışma bulunmakta olup, yöntemin avantajları gösterilmiş, ancak daha iyi optimize edilmesi ve daha fazla çalışma yapılması gerektiği belirtilmiştir. Bizim çalışmamız da bilim dünyasındaki bu gereksinime hizmet etmektedir.

Literatürde HER-2 pozitifliği, tersini belirten çalışmalar da bulunmakla birlikte, intestinal tip morfoloji sergileyen, proksimal yerleşimli, lenf nodu metastazı gösteren ileri evre tümörlerde daha sık izlenmektedir. Çalışmamızda HER-2 gen ekspresyonu gösteren 32 olgu ile HER-2 gen ekspresyonu göstermeyen 171 olgu histopatolojik prognostik faktörler açısından karşılaştırıldığında sadece intestinal tip morfoloji sergileyen tümörlerde HER-2 ekspresyonu açısından anlamlı farklılık saptanmıştır ($p=0,039$).

Çalışmamızda İHK'sal olarak HER-2 (+) 39 olgu ile HER-2 negatif 40 olguyu c-MET ile İHK'sal olarak boyanarak aralarındaki ilişki değerlendirilmiştir. Tüm olguların %48,1'inde (38/79) c-MET overekspresyonu saptanmıştır. Literatürdeki çalışmalar incelendiğinde, c-MET pozitifliğinin İHK'sal olarak %1,8-%82,5 arasında değiştiği ve bu farkın temelde c-MET ekspresyon pozitifliği için kullanılan skorlama kriterlerinin farklı olmasından kaynaklandığı gözlenmektedir. Bu yüzden İHK yöntemi ile c-MET ekspresyonunu belirleme açısından standart skorlama kriterlerine ihtiyaç duyulmaktadır.

Literatürde genel olarak HER-2 (+) olgularda c-MET (+)'liği daha çok görülmesine karşın çalışmamızda HER-2 (+) olguların %34,4'ünde, HER-2 (-) olguların ise %57,4'ünde c-MET (+)'liği saptanmıştır (**p=0,044**).

Ayrıntılı incelendiğinde literatürde c-MET (+)'liği ile ilgili olarak birbiriyle çelişkili sonuçlar bulunduğu görülmektedir. Bazı çalışmalarda c-MET overekspresyonu tümör invazyon derinliği, lenf nodu metastazı, uzak metastaz, rekürrens, perinöral invazyon ile ilişkili ve bağımsız prognostik faktör olarak bulunmuşken, bazı çalışmalarda hiçbir klinikopatolojik faktörle ilişkisi saptanmamıştır. Bizim çalışmamızda ise c-MET pozitifliği, distal yerleşimli tümörlerde daha sık görülmüştür (**p=0,038**).

Mide karsinomlarında TKR ailesinin EGFR, c-MET, FGFR2, HER-2 gibi farklı üyelerinin ko-ekspresyonları görülebilmektedir ve çalışmaların çoğundan elde edilen sonuçlarda TKR'lerin birlikte ekspresyonu daha agresif klinik seyir ve daha kısa sağkalım sürelerine neden olmaktadır. Ayrıca TKR'lerin ko-ekspresyonları ya da alternatif aktivasyonları, ortak hücre içi sinyal yollarını kullandıkları için Trastuzumab tedavisinde direnç gelişimine neden olabilmektedir. Çalışmamızda HER-2 (+) 11 olgunun (%34,4) c-MET overekspresyonu gösterdiği saptanmıştır. HER-2⁺/c-MET⁺ ko-ekspresyon gösteren grubu, HER-2⁺/c-MET⁻, HER-2⁻/c-MET⁺ ve HER-2⁻/c-MET⁻ gruplarla karşılaştırdığımızda, gruplarımız sınırlı sayıda olgu içerdiği ve çoğu olgu ileri evrede olduğu için histopatolojik prognostik faktörler açısından anlamlı sonuçlar elde edilememiştir.

HER-2 overekspresyonu mide karsinomlarının az bir kısmında izlenmektedir ve Trastuzumab tedavisinden sadece ileri evre olgular yararlanabilmektedir. Olguların çoğunda başlangıçta ya da ilk bir yıl içerisinde tedaviye direnç gelişmektedir. Bu durum, cerrahi ve çeşitli kemoterapötik tedavi protokollerine rağmen sağkalım oranlarının düşük olduğu mide karsinomlarında, hedefe yönelik yeni tedavilere ihtiyaç doğurmaktadır. HER-2 ekspresyonu olanlarda hiç de azımsanmayacak (%34,4) c-MET pozitifliğinin izlenmesi, bu olgularda Trastuzumab tedavisine karşı gelişen direncin bir kısmından sorumlu olabileceğini göstermiştir. Ancak c-MET'in histopatolojik

prognostik faktörlerle ilişkisini daha iyi açıklayabilmek ve c-MET'i hedef alan tedavi modelleri geliştirebilmek için skorlama kriterlerinin standardizasyonu öncelikli olmak üzere daha fazla çalışmaya gereksinim vardır.



ÖZET

AMAÇ: Bu çalışmada mide karsinomlu olgularda HER-2 pozitifliğinin sıklığını saptamak, artmış HER-2 ekspresyonunun immunohistokimyasal ve silver in situ hibridizasyon (SISH) yöntemleri ile tutarlılığını değerlendirmek, histopatolojik prognostik faktörlerle ilişkisini ortaya koymak hedeflenmiştir. Ayrıca yeni tedavi yaklaşımlarına ışık tutmak açısından c-MET ekspresyon sıklığını, histopatolojik prognostik faktörlerle ve HER-2 ekspresyonu ile ilişkisini belirlemek amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM: Anabilim dalımızda 1996-2016 yılları arasında gastrektomi materyalinde mide kanseri tanısı alan 203 olgu çalışmaya alınmıştır. Olguların yaş ve cinsiyeti, tümörün yerleşimi ve büyüklüğü, histolojik tipi, invazyon derinliği, perinöral invazyon, lenfovasküler emboli varlığı, lenf nodu metastazı, lokal invazyon ya da uzak metastaz bulguları kaydedilmiştir. HER-2'nin immunohistokimya (İHK) skorunun değerlendirmesi literatür verilerine göre 0, 1+, 2+ ve 3+ olarak yapılmıştır. HER-2 skoru 2+ ve 3+ olan olgularda pozitiflik anlamlı kabul edilmiş, bu olgularda dual silver in situ hibridizasyon (SISH)/İHK metodu uygulanarak amplifikasyon araştırılmıştır. Ayrıca HER-2 İHK'sal boyasıyla pozitiflik elde edilen tüm olgular ile HER-2 İHK'sal skoru negatif (0/1+) olarak değerlendirilen 40 olgu, bir diğer TKR ailesinin üyesi olan c-MET ile boyanarak bulguların histopatolojik verilerle ilişkisi karşılaştırılmıştır.

BULGULAR: Tüm olgular İHK'sal olarak HER-2 ile boyanmış ve pozitiflik %19,2 olarak bulunmuştur. Dual SISH/İHK metodu ile İHK HER-2 skoru (2+) olguların %70'inde, (3+) olguların %94,7'sinde amplifikasyon saptanmıştır ($p \leq 0,05$). İHK'sal olarak skor (2+) olan olgularımızın %80'inde (16/20) dual SISH/İHK metodu ile İHK'sal boyanma ya çok zayıf izlenmiş ya da hiç gözlenmemiştir. HER-2 pozitifliği histopatolojik prognostik faktörlerden

sadece intestinal tip morfoloji sergileyen tümörlerde istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (**p=0,039**). c-MET pozitifliği 79 olgu üzerinden değerlendirilmiş olup %48,1 olarak bulunmuştur. HER-2 (-) olguların daha fazla c-MET (+)'liği (%57,4) gösterdiği saptanmıştır (**p=0,044**). c-MET pozitifliği histopatolojik prognostik faktörlerle karşılaştırıldığında sadece distal yerleşimli tümörlerde daha sık izlenmiştir (**p=0,038**). HER-2⁺/c-MET⁺ ko-ekspresyonu %34,4 olarak saptanmıştır. Bu grubu yalnız c-MET (+), yalnız HER-2 (+) ve HER-2⁺/c-MET⁻ gruplar ile karşılaştırdığımızda histopatolojik prognostik faktörler açısından anlamlı sonuç bulunamamıştır.

SONUÇ: Çalışmamızdan elde ettiğimiz bulgularda HER-2 pozitif tümörlerin daha çok intestinal morfoloji sergilediği, c-MET pozitif tümörlerin ise daha çok distal yerleşim gösterdiği saptanmıştır. Dual SISH/IHK metodunun optimize edilmesi halinde kullanım kolaylığı sağlayabileceği gösterilmiştir. HER-2 ekspresyonu olanlarda hiç de azımsanmayacak (%34,4) c-MET pozitifliğinin görülmesi, bu olgularda c-MET'in Trastuzumab tedavisine karşı gelişen direncin bir kısmından sorumlu olabileceğini göstermiştir. Ayrıca c-MET'in histopatolojik prognostik faktörlerle ilişkisini daha iyi açıklayabilmek ve hedefe yönelik tedavi geliştirebilmek için skrolama kriterlerinin standardize edilmesi gerektiği ortaya konmuştur.

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE RELATION OF HER-2 GENE EXPRESSION AND c-MET EXPRESSION IN GASTRIC CANCERS WITH HISTOPATHOLOGICAL PROGNOSTIC PARAMETERS

AIM: In this study, it was aimed to determine the frequency of HER-2 positivity in gastric carcinoma cases, to evaluate the consistency of increased HER-2 expression with immunohistochemical and silver in situ hybridization (SISH) methods and to show the relation with histopathological prognostic factors. Additionally, in the light of recent treatment approaches, we aimed to determine the expression frequency of c-MET, its relation with histopathological prognostic factors and HER-2 expression.

MATERIALS AND METHODS: In our department, 203 cases with gastric cancer diagnosed in gastrectomy materials between 1996-2016 were included in the study. The findings included in the pathology report such as age and sex, location and size of the tumor, histological type, invasion depth, perineural invasion, lymphovascular embolism, lymph node metastasis, local invasion or distant metastasis were recorded. The evaluation of HER-2 immunohistochemistry (IHC) score was done as 0, 1+, 2+ and 3+ according to the scientific literature. HER-2 score of 2+ and 3+ cases were considered positive. In these cases, amplification was investigated by applying dual silver in situ hybridization (SISH)/IHK method. In addition, 40 cases evaluated as negative (0/1 +) with HER-2 and all cases with positive (2/3+) HER-2 immunohistochemically were stained with c-MET; the findings were compared with histopathologic factors and HER-2 positivity.

RESULTS: All cases were stained with HER-2 as IHC and the positivity was found in 19.2% of them. Amplification was detected in 70% of 2+ cases and in 94.7% of 3+ cases by Dual SISH / IHC method ($p \leq 0.05$). With Dual

SISH/IHC method, 80% of our HER-2 2+ cases (16/20) were weakly stained or unstained immunohistochemically. Statistically, HER-2 positivity was found associated only with intestinal type morphology ($p=0,039$). c-MET positivity was found in 19.2% of 79 cases. HER-2 (-) cases were found to show more c-MET (+) (57.4%) than HER-2 (+) (%34,4) cases and this was statistically significant ($p=0,044$). Statistically, c-MET positivity was found associated only with distal localization ($p=0,038$). HER-2⁺/c-MET⁺ co-expression was observed in %34,4 (11/32) of the cases. Comparisons were made between HER-2⁺/c-MET⁺ co-expression group and the remaining expression groups (HER-2⁺/c-MET⁻, HER-2⁻/c-MET⁺ and HER-2⁻/c-MET⁻ groups respectively) for histopathological factors, but no statistically significant association were observed probably as a consequence of limited cases.

CONCLUSIONS: In our study, it was determined that HER-2 positive tumors showed more intestinal morphology and c-MET positive tumors showed more distal localization. It has been shown that the Dual SISH/IHK method can provide ease of use if optimized. The presence of c-MET positivity (34.4%) observed in cases with HER-2 expression, suggests that c-MET may be responsible for some of the resistance to Trastuzumab treatment in these cases. Furthermore, it has been suggested that scoring criteria should be standardized in order to make a better explain the relation between c-MET and histopathologic prognostic factors, and to develop targeted therapies.

KAYNAKLAR

1. Ferlay J. GLOBOCAN 2012 v1.0, cancer incidence and mortality worldwide. IARC CancerBase 11.
2. Yalcin S. Gastric cancer in Turkey-a bridge between west and East. *Gastrointest Cancer Res*, (2009) 3 (1), 29-32.
3. Ajani JA, Bentrem DJ, Besh S, D'Amico TA, Das P, Denlinger C, et al. Gastric Cancer, Version 2. *J Natl Compr Canc Netw*, (2013) 11 (5), 531-546.
4. Türkiye halk sağlığı kurumu daire başkanlığı 2014 yılı Türkiye kanser istatistikleri. Available at:<http://kanser.gov.tr/daire-faaliyetleri/kanser-istatistikleri/2106-2014-yili-turkiye-kanser-istatistikleri.html>
5. Nagini S. Carcinoma of the stomach: A review of epidemiology, pathogenesis, molecular genetics and chemoprevention. *World J Gastrointest Oncol*, (2012) 4 (7), 156-169.
6. Catalano V, Labianca R, Beretta GD, Gatta G, de Braud F, Van Cutsem E. Gastric cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*, (2009) 71 (2), 127-164.
7. Crew KD, Neugut AI. Epidemiology of gastric cancer. *World J Gastroenterol*, (2006) 12 (3), 354-362.
8. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*, (2011) 61 (2), 69-90.
9. Bosman FT, Carneiro F, Hruban RH, Theise ND. World Health Organisation Classification of Tumors of the Digestive System. Lyon, IARC 2010.
10. Ahn HS, Lee HJ, Yoo MW, et al. Changes in clinicopathological features and survival after gastrectomy for gastric cancer over a 20-year period. *Br J Surg*. (2011);98:255-260.
11. Correa P, Chen VW. Gastric cancer. *Cancer Surv*. 1994;19-20:55-76.
12. Bertuccio P, Chatenoud L, Levi F, Praud D, Ferlay J, Negri E, et al. Recent patterns in gastric cancer: a global overview. *Int J Cancer*, (2009) 125 (3), 666-673.
13. Landis SH, Murray T, Bolden S, Wingo PA. Cancer statistics, *Cancer J Clin* 1999.49:78-80
14. Kelley JR, Duggan JM. Gastric cancer epidemiology and risk factors ,*Journal of Clinical Epidemiology*,(2003) Jan 56(1):1–9.
15. Miyahara R, Niwa Y, Matsuura T, Maeda O, Ando T, Ohmiya N, et al. Prevalence and prognosis of gastric cancer detected by screening in a large Japanese population: data from a single institute over 30 years. *J Gastroenterol Hepatol* (2007) 22: 1435-1442

16. Neubauer A, Thiede C, Morgner A, et al. Cure of *Helicobacter pylori* infection and duration of remission of low grade gastric mucosa associated lymphoid tissue lymphoma. *J Natl Cancer Inst.*(1997);89,1350-55
17. Wroblewski LE, Peek RM Jr, Wilson KT. *Helicobacter pylori* and gastric cancer: factors that modulate disease risk. *Clin Microbiol Rev.* (2010);23:713-739
18. Amieva MR, El-Omar EM. Host-bacterial interactions in *Helicobacter pylori* infection. *Gastroenterology* (2008) 134: 306-323
19. *Helicobacter and Cancer Collaborative Group*. Gastric cancer and *Helicobacter. pylori*: a combined analysis of 12 case control studies nested within prospective cohorts, *Gut.* (2001);49:347-353.
20. Wang T, Fox J, Giraud A (edi). *The Biology of Gastric Cancers*. Springer; (2009).
21. Matsunou H, Konishi F, Hori H, Ikeda T, Sasaki K, Hirose Y, et al. Characteristics of Epstein-Barr virüs- associated gastric carcinoma with lymphoid stroma in Japan. *Cancer.* (1996);77:1998-2004
22. Li K, Zhang YL, Dan Z, Zhaxi CM, Nie J. Risk factors for the gastric cancer: a case -control study in Tibet. *Dig Liver Dis.* (2009) Jan;41(1):78-79.
23. Lochhead P, El-Omar EM. Gastric cancer. *Br Med Bull.* (2008); 85: 87-100.
24. Wang XQ, Terry PD, Yan H. Review of salt consumption and stomach cancer risk: epidemiological and biological evidence. *World J Gastroenterol,* (2009);15 (18), 2204-2213.
25. Wogan GN, Hecht SS, Felton JS, Conney AH, Loeb LA. Environmental and chemical carcinogenesis. *Semin Cancer Biol,* (2004) 14 (6), 473- 486.
26. Cecilia M. Fenoglio- Preiser. *Gastrointestinal Pathology An Atlas and Text, Third Edition,* (2008), 135–269.
27. You W, Zhang L, Gail M, Chang Y. Gastric Dysplasia and Gastric Cancer: *Helicobacter pylori*, Serum Vitamin C, and Other Risk Factors, *J Natl Inst* (2000);92:1607–12).
28. Shikata K, Kiyohara Y, Kubo M, Yonemoto K, Ninomiya T, Shirota T et al. A prospective study of dietary salt intake and gastric cancer incidence in a defined Japanese population: the Hisayama study. *Int J Cancer.* (2006) 119:196-201
29. McCready DR, Clark L, Cohen MM. Cigarette smoking reduces human gastric luminal prostaglandin E2. *Gut,* (1985); 26 (11), 1192-1196.
30. Sjødahl K, Lu Y, Nilsen TI, Ye W, Hveem K, Vatten L, et al. Smoking and alcohol drinking in relation to risk of gastric cancer: a population-based, prospective cohort study. *Int J Cancer,* (2007); 120 (1), 128-132.
31. Tramacere I, Negri E, Pelucchi C, Bagnardi V, Rota M, Scotti L, et al. A meta-analysis on alcohol drinking and gastric cancer risk. *Ann Oncol,* (2012); 23 (1), 28-36.

32. Jacob P, Walsh L, Eidemuller M. Modeling of cell inactivation and carcinogenesis in the atomic bomb survivors with applications to the mortality from all solid, stomach and liver cancer. *Radiat Environ Biophys* (2008);47(3):375.
33. Nardone G, Rocco A, Malfertheiner P. Review article: *Helicobacter pylori* and molecular events in precancerous gastric lesions, *Aliment Pharmacol Ther* (2004); 20: 261–270.
34. Stadlander CT, Waterbor JW. Molecular epidemiology, pathogenesis and prevention of gastric cancer. *Carcinogenesis* (1999); 20(12):2195–2207.
35. Nardone G. Role of *Helicobacter pylori* in Gastric Cancer. *Handbook of Immunohistochemistry and in situ Hybridization of Human Carcinomas*, volume 4, edited by M.A.Hayat. Elsevier Inc, 2006; 205–220.
36. Göksel S. Mide Kanserinde etyoloji, patogenezi ve patoloji. Topuz E, Aykan NF (edi) Sindirim sistemi kanserleri, İstanbul Onkoloji Enstitüsü Yayınları, İstanbul (1998):181-86.
37. Sinning C, Schaefer N, Standop J, Gastric stump carcinoma - epidemiology and current concepts in pathogenesis and treatment. *Eur J Surg Oncol.* (2007); 33:133-139.
38. Lahner E, Annibale B. Letter: gastric cancer and pernicious anaemia—often *Helicobacter pylori* in disguise--authors' reply. *Aliment Pharmacol Ther.* (2013);37:765-766.
39. Bevan S, Houlston RS. Genetic predisposition to gastric cancer. *QJM*, (1999); 92 (1), 5-10.
40. Chun N, Ford JM, Genetic testing by cancer site: stomach. *Cancer J.* (2012); 18:355-363.
41. Fitzgerald RC, Hardwick R, Huntsman D, Carneiro F, Guilford P, Blair V, et al. Hereditary diffuse gastric cancer: updated consensus guidelines for clinical management and directions for future research. *J Med Genet.* (2010); 47:436-444.
42. Pharoah PD, Guilford P, Caldas C, International Gastric Cancer Linkage Consortium. Incidence of gastric cancer and breast cancer in CDH1 (E-cadherin) mutation carriers from hereditary diffuse gastric cancer families. *Gastroenterology.* (2001); 121:1348-1353.
43. van der Post RS, Gullo I, Oliveira C, Tang LH, Grabsch HI, Fitzgerald RC, et al. Histopathological, molecular, and genetic profile of hereditary diffuse gastric cancer: current knowledge and challenges for the future. *Adv Exp Med Biol* (2016); 908:371-91.
44. Sternberg's Diagnostic Surgical Pathology. Lippincott Williams & Wilkins; Mills SE (edi), (2015). Six edition, p: 1409-1446, 1533
45. Zwick A, Munir M, Ryan CK, Gian J, Burt RW, Leppert M, et al. Gastric adenocarcinoma and dysplasia in fundic gland polyps of a patient with attenuated adenomatous polyposis coli. *Gastroenterology.* (1997); 113:659-663.

46. Hofgartner WT, Thorp M, Ramus MW, Delorefice G, Chey WY, Ryan CK, et al. Gastric adenocarcinoma associated with fundic gland polyps in a patient with attenuated familial adenomatous polyposis. *Am J Gastroenterol.* (1999); 94:2275-2281.
47. Masciari S, Dewanwala A, Stoffel EM, Lauwers GY, Zheng H, Achatz MI, et al. Gastric cancer in individuals with Li-Fraumeni syndrome. *Genet Med.* (2011); 13:651-657.
48. Odze RD, Goldblum JR, Caword JM. *Surgical Pathology of the GI Tract, Liver, Biliary Tract and Pancreas.* Saunders, (2009) Second edition, p:573-576
49. Cyrus R. Kapadia, Gastric Atrophy, Metaplasia, and Dysplasia, A Clinical Perspective. *J Clin Gastroenterol* (2003); 36; 29-36
50. Correa P. Human Gastric Carcinogenesis: A multistep and Multifactorial Process – First American Cancer society Award Lecture on Cancer Epidemiology and Prevention. *Cancer Research* (1992); 52:6735–6740.
51. Ito M, Tanaka S, Kamada T, Haruma K, Chayama K. Casual role of *Helicobacter pylori* infection and eradication therapy in gastric carcinogenesis, *World J Gastroenterol* (2006); 12(1) :10–16.
52. Kawaguchi H, Haruma K, Komoto K, Yoshihara M, Sumii K, Kajiyama G. *Helicobacter pylori* infection is the major risk factor for atrophic gastritis. *Am J Gastroenterol* (1996); 91:959–962.
53. Sclemper RJ, Itebashi M, Kato Y, Lewin KJ, Riddell RH, Shimoda T, et.al. Differences in diagnostic criteria for gastric carcinoma between Japanese and Western pathologist. *The Lancet* (1997), Vol 349, 1725-1729.
54. Rubio CA, Jaramillo E, Suzuki G, Lagergren P, Nesi G. Antralization of the Gastric Mucosa of the Incisura Angularis and its Gastrin Expression. *Int J Clin Exp Pathol* (2009); 2: 65–70.
55. Goldstein NS, Lewin KJ. Gastric epithelial dysplasia and adenomas: historical review and histological evidence for grading. *Hum Pathol*, (1997); 28: 127.
56. Park do Y, Lauwers G.Y. Gastric polyps: classification and management. *Arch Pathol Lab Med* (2008); 132:633-640.
57. Lord R, Brabender J, Wickramasinghe K, DeMeester SR, Holscher A, Schneider PM, et al. Increased CDX2 and decreased PITX1 homeobox gene expresiion in Barrett's esophagus and Barrett'sassociated adenocarcinoma. *Surgery* (2005);138:924–931.
58. Vallböhmer D, DeMeester SR, Peters JH, Oh DS, Kuramochi H, Shimizu D, et al. Cdx–2 expression in squamous and metaplasitc columnar epithelia of the esophagus. *Diseases Esop* 2006; 19:260–266.
59. Riddell R, Lewin K.J, Weinstein W.M Jain D. *Gastrointestinal Pathology and Its Clinical Implications (second eds.)*, (2014) Chap. 14, p: 705-794

60. Berlth F, Bollschweiler E, Drebber U, Hoelscher AH, Moenig S. Pathohistological classification systems in gastric cancer: Diagnostic relevance and prognostic value *World J Gastroenterol* (2014); 20(19): 5679-5684
61. Hu B, El Hajj N, Sittler S, Lammert N, Barnes R, Meloni-Ehrig, A. Gastric cancer: Classification, histology and application of molecular pathology. *J Gastrointest Oncol*, (2012); 3 (3), 251-261.
62. Morales TG, Bhattacharyya A, Johnson C. Is Barrett's esophagus associated with intestinal metaplasia of the gastric cardia?. *Am J Gastroenterol* (1997); 92:1818-22.
63. Japanese Research Society for Gastric Cancer. Group classification of gastric biopsy specimens. In: Nishi M, Omori Y, Miwa K (Eds.). *Japanese Classification of Gastric Carcinoma*. Tokyo: Kanehara; (1995). p.74–6.
64. Rosai J. Carcinoma, Stomach. In: Rosai J, editor. *Rosai and Ackerman's Surgical Pathology* 10th ed. Mosby, (2011).p: 615-672.
65. Yu Y. Evaluation of traditional classification at molecular classification era for gastric cancer; *Chin J Gastrointest Surg*, 2014 Jan;17(1):
66. Metin Kapan. Mide Kanseri: Tanı ve Cerrahi Tedavi, İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Surekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri Gastrointestinal Sistem Hastalıkları Sempozyumu 11-12 Ocak (2001), istanbul, s. 253-269.
67. American Joint Commitee on Cancer (AJCC) TNM Staging Classification for Carcinoma of the Stomach (7th eds.) (2010)
68. American Joint Commitee on Cancer (AJCC) TNM Staging Classification for Carcinoma of the Stomach (8th ed.) (2017)
69. Jackson C, Cunningham D, Oliveira J, Group E.G.W. Gastric cancer: ESMO clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow up. *Ann Oncol*, (2009) 20 Suppl 4, 34-36.
70. Ott K, Lordick F, Blank S, Buchler M. Gastric cancer: surgery in 2011. *Langenbecks Arch Surg*, (2011); 396 (6), 743-758.
71. Labianca, R, Sburlati P, Quadri A, Garassino M.C. Perioperative or postoperative therapy for resectable gastric cancer? *Ann Oncol*, (2008) 19 Suppl 5, v99-102.
72. Bang YJ, Van Cutsem E, Feyereislova A, Chung HC, Shen L, Sawaki A, et al. Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomised controlled trial. *Lancet*, (2010); 376 (9742), 687-697.
73. Davison JM, Pai RK. Her-2 assessment in upper gastrointestinal tract adenocarcinoma. A practical, algorithmic approach. *Surg Pathol Clin* (2013); 6:391
74. Luis M, Tavares A, Carvalho LS, Lara-Santos L, Araujo A, de Mello RA. Personalizing therapies for gastric cancer: Molecular mechanisms and novel targeted therapies. *World J Gastroenterol* (2013) October 14; 19(38):6383-6397.
75. Sierra JR, Tsao MS. C-MET as a potential therapeutic target and biomarker in cancer. *Ther Adv Med Oncol*, (2011); 3 (1 Suppl), S21-35.

76. Shattuck DL, Miller JK, Carraway KL, Sweeney C. Met receptor contributes to trastuzumab resistance of Her-2 overexpressing breast cancer cells. *Cancer Res* (2008); 68(5): 1471- 4.
77. Shah MA, Ramanathan RK, Ilson DH, Levnor A, D'Adamo D, O'Reilly E, et al. Multicenter phase II study of irinotecan, cisplatin, and bevacizumab in patients with metastatic gastric or gastroesophageal junction adenocarcinoma. *J Clin Oncol*, (2006); 24 (33), 5201-5206.
78. Pinto C, Di Fabio F, Siena S, Cascinu S, Rojas Llimpe FL, Ceccarelli C, et al. Phase II study of cetuximab in combination with FOLFIRI in patients with untreated advanced gastric or gastroesophageal junction adenocarcinoma (FOLCETUX study). *Ann Oncol*, (2007); 18 (3), 510-517.
79. Moriguchi S, Maehara Y, Korenaga D, Sugimachi K, Nose Y. Relationship between age and the time of surgery and prognosis after gastrectomy for gastric cancer. *J Surg Oncol*, (1993); 52 (2), 119-123.
80. Damhuis RA, Tilanus HW. The influence of age on resection rates and postoperative mortality in 2773 patients with gastric cancer. *Eur J Cancer*, (1995); 31A (6), 928-931.
81. Akoh JA, Macintyre IM. Improving survival in gastric cancer: review of 5-year survival rates in English language publications from 1970. *Br J Surg*, (1992); 79 (4), 293-299.
82. Talamonti MS, Kim SP, Yao KA, Wayne JD, Feinglass J, Bennett CL, et al. Surgical outcomes of patients with gastric carcinoma: the importance of primary tumor location and microvessel invasion. *Surgery*, (2003); 134 (4), 720-727; discussion 727-729.
83. Salvon-Harman JC, Cady B, Nikulasson S, Khettry U, Stone MD, Lavin P. Shifting proportions of gastric adenocarcinomas. *Arch Surg*, (1994); 129 (4), 381-388; discussion 388-389.
84. Moghimi-Dehkordi B, Safaee A, Zali MR. Survival rates and prognosis of gastric cancer using an actuarial life-table method. *Asian Pac J Cancer Prev*, (2008); 9 (2), 317-321.
85. Bunt AM, Hogendoorn PC, van de Velde CJ, Bruijn JA, Hermans J. Lymph node staging standards in gastric cancer. *J Clin Oncol*, (1995); 13 (9), 2309-2316.
86. Haugstvedt TK, Viste A, Eide GE, Soreide O. Norwegian multicentre study of survival and prognostic factors in patients undergoing curative resection for gastric carcinoma. The Norwegian Stomach Cancer Trial. *Br J Surg*, (1993); 80 (4), 475-478.
87. Roder JD, Bottcher K, Siewert JR, Busch R, Hermanek P, Meyer HJ. Prognostic factors in gastric carcinoma. Results of the German Gastric Carcinoma Study 1992. *Cancer*, (1993); 72 (7), 2089-2097.
88. Park JM, Ryu WS, Kim JH, Park SS, Kim SJ, Kim CS, et al. Prognostic factors for advanced gastric cancer: stage-stratified analysis of patients who underwent curative resection. *Cancer Res Treat*, (2006); 38 (1), 13-18.
89. Bozzetti F. Principles of surgical radicality in the treatment of gastric cancer. *Surg Oncol Clin N Am*, (2001); 10 (4), 833-854, ix.

90. Maehara Y, Kakeji Y, Koga T, Emi Y, Baba H, Akazawa K, et al. Therapeutic value of lymph node dissection and the clinical outcome for patients with gastric cancer. *Surgery*, (2002); 131 (1 Suppl), S85-91.
91. Yarden Y, Biology of HER2 and Its Importance in Breast Cancer. *Oncology* (2001); 61 supp 2: 1-13.
92. Ritter CA and Arteaga CL. The Epidermal Growth Factor Receptor-Tyrosine Kinase: A Promising Therapeutic Target in Solid Tumors. *Seminars in Oncology*, Vol 30, No 1, Supp 1 (February), (2003); pp 3-11
93. Ross JS, Slodkowska EA, Symmans WF, Pusztai L, Ravdin PM, Hortobagyi GN. The HER-2 receptor and breast cancer: ten years of targeted anti-HER-2 therapy and personalized medicine. *Oncologist* (2009); 14: 320–368.
94. Meden H, Marx D, Rath W, et al. Overexpression of the oncogene c-erbB-2 in primary ovarian cancer. Evaluation of the prognostic value in a Cox proportional hazards multiple regression. *Int J Gynecol Pathol*. (1994), 13: 45-53.
95. Seidman JD, Frisman DM, Norris HJ. Expression of the HER-2/neu protooncogene in serous ovarian neoplasms. *Cancer* (1992), 70: 2875-2880.
96. Day JD, Di Giuseppe JA, Yeo C, Lai-Goldman M, Anderson SM, Goodman SN, Kern SE, Hruban RH, Immunohistochemical evaluation of HER-2/neu expression in pancreatic adenocarcinoma and pancreatic intraepithelial neoplasms. *Hum Pathol* (1996); 27: 119-124.
97. Apple SK, Hecht JR, Lewin DN, Jahromi SA, Grody WW, Nieberg RK. Immunohistochemical evaluation of K-ras, P53 and HER-2/neu expression in hyperplastic, dysplastic, and carcinomatous lesions of the pancreas: evidence for multistep carcinogenesis. *Hum Pathol* (1999), 30: 123-129.
98. Kern JA, Schwartz DA, Nordberg JE, Weiner DB, Greene MI, Torney L, et al. P185/neu expression in human lung adenocarcinomas predicts shortened survival. *Cancer Res* (1990) 50: 5184-5189.
99. Sato K, Moriyama M, Mori S, Saito M, Watanuki T, Terada K et al. An immunohistologic evaluation of c-erbB-2 gene product in patients with urinary bladder carcinoma. *Cancer* (1992); 70: 2493-2498.
100. Ross JS, Sheehan C, Hayner-Buchan AM, Ambros RA, Kallakury BV, Kaufman R, et al. HER-2/neu gene amplification status in prostate cancer by fluorescence in situ hybridization. *Hum Pathol* (1997), 28:827-833.
101. Polkowski W, van Sandick JW, Offerhaus GJ, ten Kate FJ., Mulder J, Obertop H, et al. Prognostic value of Lauren classification and c-erbB-2 oncogene overexpression in adenocarcinoma of the esophagus and gastroesophageal junction. *Ann Surg Oncol*, (1999); 6 (3), 290-297.
102. Liu W, Zhong S, Chen J, Yu Y. HER-2/neu overexpression is an independent prognostic factor for intestinal-type and early-stage gastric cancer patients. *J Clin Gastroenterol*, (2012); 46 (4), e31-37.

103. Gravalos C, Jimeno A. HER2 in gastric cancer: a new prognostic factor and a novel therapeutic target. *Ann Oncol*, (2008); 19 (9), 1523-1529.
104. Song Y, Huang J, Wang JW. Relationship between HER2/neu gene amplification and protein expression and prognosis in patients with advanced gastric carcinoma. *Chin J Cancer*, (2010); 29 (1), 76-81.
105. Parr C, Hiscox S, Nakamura T, Matsumoto K, Jiang WG. Nk4, a new HGF/SF variant, is an antagonist to the influence of HGF/SF on the motility and invasion of colon cancer cells. *Int J Cancer*, 85 (4), (2000); 563-570.
106. Jiang WG, Martin TA, Parr C, Davies G, Matsumoto K, Nakamura T. Hepatocyte growth factor, its receptor, and their potential value in cancer therapies. *Crit Rev Oncol Hematol*, (2005); 53 (1), 35-69.
107. Sotoudeh K, Hashemi F, Madjd Z, Sadeghipour A, Molanaei S, Kalantary E. The clinicopathologic association of c-MET overexpression in Iranian gastric carcinomas; an immunohistochemical study of tissue microarrays. *Diagn Pathol*, (2012); 7.
108. Ma PC, Maulik G, Christensen J, Salgia R. C-Met: structure, functions and potential for therapeutic inhibition. *Cancer Metastasis Rev*, (2003); 22 (4), 309-325.
109. Matsumoto K, Nakamura T. Hepatocyte growth factor and the Met system as a mediator of tumor-stromal interactions. *Int J Cancer*, (2006); 119 (3), 477-483.
110. Tang Z, Zhao M, Ji J, Yang G, Hu F, He J, et al. Overexpression of gastrin and c-met protein involved in human gastric carcinomas and intestinal metaplasia. *Oncol Rep*, (2004); 11 (2), 333-339.
111. Inokuchi M, Otsuki S, Fujimori Y, Sato Y, Nakagawa M, Kojima K. Clinical significance of MET in gastric cancer; *World J Gastrointest Oncol* (2015) November 15; 7(11): 317-327
112. Uprak TK, Attaallah W, Ataizi Celikel C, Ayrancı G, Yeğen C. HER-2 incidence in gastric cancer, its association with prognosis and clinicopathological parameters, *Ulus Cerrahi Derg* 2015; 31: 207-13.
113. Wagner AD, Grothe W, Haerting J, Kleber G, Grothey A, Fleig WE. Chemotherapy in advanced gastric cancer: a systematic review and meta-analysis based on aggregate data. *J Clin Oncol* 2006; 24: 2903-2909.
114. Cunningham SC, Kamangar F, Kim MP, Hammoud S, Haque R, Maitra A, et al. Survival after gastric adenocarcinoma resection: eighteen- year experience at a single institution. *J Gastrointest Surg* 2005; 9: 718-725.
115. Ross JS, Fletcher JA, Linette GP, Stec J, Clark E, Ayers M, et al. The Her-2/neu gene and protein in breast cancer 2003: biomarker and target of therapy. *Oncologist* 2003; 8: 307-325.
116. Ha SY, Lee J, Jang J, Hong JY, Do IG, Park SH et al. HER2-positive gastric cancer with concomitant MET and/or EGFR overexpression: A distinct subset of patients for dual inhibition therapy. (2015) *International Journal of Cancer* 136, 1629–1635.

117. Terashima M, Kitada K, Ochiai A, Ichikawa W, Kurahashi I, Sakuramoto S, et al. Impact of expression of human epidermal growth factor receptors EGFR and ERBB2 on survival in stage II/III gastric cancer. *Clin Cancer Res* (2012); 18: 5992-6000.
118. Xu CC, Yue L, Wei HJ, Zhao WW, Sui, A.H., Wang, X.M. ve diğerleri. (2013) Significance of TFF3 protein and Her-2/neu status in patients with gastric adenocarcinoma. *Pathol Res Pract*.
119. Zhou F, Li N, Jiang W, Hua Z, Xia L, Wei Q. Et al. Prognosis significance of HER-2/neu overexpression/amplification in Chinese patients with curatively resected gastric cancer after the ToGA clinical trial. *World J Surg Oncol*, (2012), 10, 274.
120. Gupta P, Rao S, Bhalla S. Human epidermal growth factor receptor 2 expression ingastric carcinoma and its association with histopathological parameters in Indian population. *Indian Journal of Cancer*, (2016), Volume 53 Issue 4.
121. Hadi AA, Hindawi AE, Hareedy A, Khalil H, Ashiry RA, Elia S et al. Her2/neu Protein Expression and Oncogene Amplification in Gastric Carcinoma with Clinico-Pathological Correlation in Egyptian Patients. *Maced J Med Sci*. (2016) Dec 15; 4(4):535-542.
122. Seo KW, Jeon T, Kim S, Kim SS, Kim K, Suh BJ et al. Epidemiologic Study of Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Expression in Advanced/Metastatic Gastric Cancer: an Assessment of Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Status in Tumor Tissue Samples of Gastric and Gastro-Esophageal Junction Cancer. *J Gastric Cancer*. (2017), Mar;17(1):52-62 .
123. Laboissiere RS, Buzelin MA, Balabram D, Brot MD, Nunes2 CB, Rocha RM et al. Association between HER2 status in gastric cancer and clinicopathological features: a retrospective study using whole-tissue sections. Laboissiere et al. *BMC Gastroenterology* (2015) 15:157.
124. Cidon EU, Centeno RG, Lagarto EG, Peral JI. HER-2 Evaluation in a Specific Gastric Cancer Population with the Highest Rate of Mortality in Spain. *Journal of Oncology*, (2011), Article ID 391564, 6 pages.
125. Irkkan SÇ. HER2 Assessment in Gastric Carcinoma. *ACTA ONCOLOGIA TURCICA*. (2014) Doi: 10.5505/aot.2014.24633.
126. Pyo JS, Sohn JH, Kim WH. Concordance rate between HER2 immunohistochemistry and in situ hybridization in gastric carcinoma: systematic review and meta-analysis. *Int J Biol Markers* (2016); 31(1): e1-e10.
127. Werner D, Battmann A., Steinmetz K, Jones T, Lamb T, Martinez M et al. The validation of a novel method combining both HER2 immunohistochemistry and HER2 dual-colour silver in situ hybridization on one slide for gastric carcinoma testing *Journal of Translational Medicine* (2014), 12:160.

- 128.** Reisenbichler ES, Horton D, Rasco M, Andea A, Hameed O. Evaluation of Dual Immunohistochemistry and Chromogenic In Situ Hybridization for HER2 on a Single Section. *Am J Clin Pathol* (2012);137:102-110.
- 129.** Hirschmann A, Lamb TA, Marchal G, Padilla M, Diebold J. Simultaneous Analysis of HER2 Gene and Protein on a Single Slide Facilitates HER2 Testing of Breast and Gastric Carcinomas. *Am J Clin Pathol* (2012);138:837-844.
- 130.** Lei YY, Huang JY, Zhao QR, Jiang N, Xu HM, Wang ZN. The clinicopathological parameters and prognostic significance of HER2 expression in gastric cancer patients: a meta-analysis of literature. *World Journal of Surgical Oncology* (2017) 15:68.
- 131.** Yildiz Y, Sokmensuer C, Yalcin S. Evaluation of c-Met, HGF, and HER-2 expressions in gastric carcinoma and their association with other clinicopathological factors. *OncoTargets and Therapy* (2016);9:5809–5817.
- 132.** Jia YX, Li TF, Zhang DD, Fan ZM, Fan HJ, Yan J et al. The coexpression and prognostic significance of c-MET, fibroblast growth factor receptor 2, and human epidermal growth factor receptor 2 in resected gastric cancer: a retrospective study. *OncoTargets and Therapy* (2016);9:5919–5929.
- 133.** Moelans CB, Milne AN, Morsink FH. Low frequency of HER2 amplification and overexpression in early onset gastric cancer. *Cell Oncol* (2011); 34(2): 89-95.
- 134.** Park DI, Yun JW, Park JH et al. HER-2/neu amplification is an independent prognostic factor in gastric cancer. *Dig Dis Sci* (2006); 51: 1371–1379.
- 135.** Yan SY, Hu Y, Fan JG et al. Clinicopathologic significance of HER-2/neu protein expression and gene amplification in gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* (2011); 17(11): 1501–1506..
- 136.** Barros-Silva JD, Leitão D, Afonso L et al. Association of ERBB2 gene status with histopathological parameters and disease-specific survival in gastric carcinoma patients. *Br J Cancer* (2009); 100: 487–493.
- 137.** Pinto-de-Sousa J, David L, Almeida R et al. c-erb B-2 expression is associated with tumor location and venous invasion and influences survival of patients with gastric carcinoma. *Int J Surg Pathol* (2002); 10(4): 247- 56.
- 138.** Lee HE, Kim MA, Lee HS, Jung EJ, Yang HK, Lee BL et al. MET in gastric carcinomas: comparison between protein expression and gene copy number and impact on clinical outcome. *Br J Cancer*, (2012), 107 (2), 325-333.

- 139.** Nakajima M, Sawada H, Yamada Y, Watanabe A, Tatsumi M, Yamashita J et al. The prognostic significance of amplification and overexpression of c-met and c-erb B-2 in human gastric carcinomas. *Cancer*, (1999), 85 (9), 1894-1902.
- 140.** Janjigian YY, Tang LH, Coit DG, Kelsen DP, Francone TD, Weiser MR. Et al. MET expression and amplification in patients with localized gastric cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, (2011), 20 (5), 1021-1027.
- 141.** Drebber U, Baldus SE, Nolden B, Grass G, Bollschweiler E, Dienes HP, et al. The overexpression of c-met as a prognostic indicator for gastric carcinoma compared to p53 and p21 nuclear accumulation. *Oncol Rep*, (2008), 19 (6), 1477-1483.
- 142.** Ma J, Meng Q, Zhao ZS, Xu WJ. Prognostic value and clinical pathology of MACC-1 and c-MET expression in gastric carcinoma. *Pathol Oncol Res* (2013); 19: 821-832 [PMID: 23812675 DOI: 10.1007/s12253-013-9650-0].
- 143.** Ha SY, Lee J, Kang SY, Do IG, Ahn S, Park JO et al. MET overexpression assessed by new interpretation method predicts gene amplification and poor survival in advanced gastric carcinomas. *Mod Pathol* (2013); 26: 1632-1641 [PMID: 23807774 DOI: 10.1038/modpathol.2013.108].
- 144.** Retterspitz MF, Mönig SP, Schreckenberger S, Schneider PM, Hölscher AH, Dienes HP, Baldus SE. Expression of {beta}-catenin, MUC1 and c-met in diffuse-type gastric carcinomas: correlations with tumour progression and prognosis. *Anticancer Res* (2010); 30: 4635-4641 [PMID: 21115917].
- 145.** Fuse N, Kuboki Y, Kuwata T, et al. Prognostic impact of HER2, EGFR, and c-MET status on overall survival of advanced gastric cancer patients. *Gastric Cancer*. (2016);19:183–191.