



Mide Karsinomlarında HER-2 Pozitifliğinin Histopatolojik Bulgularla İlişkisi

The Relationship Between HER-2 Positivity and Histopathological Findings in Gastric Carcinomas

Ferhat COŞKUN, Semin AYHAN, Ayça TAN, M.A. Aydın İŞİSAĞ

Manisa Celal Bayar Üniversitesi, Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı, MANISA

Çalışma daha önce 27. Ulusal Patoloji Kongresinde poster olarak sunulmuştur. Çalışmanın hazırlanması sürecinde Manisa Celal Bayar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Biriminden maddi destek alınmıştır.

ÖZET

Amaç: Mide karsinomlarında HER-2 (Human epidermal growth factor-2) onkogen amplifikasyonu %7-34 arasında değişen oranlarda görülmekte olup daha çok proksimal yerleşimli, intestinal tip morfoloji sergileyen mide tümörlerinde izlendiğine ve kötü prognostik faktör olduğuna ilişkin yayınlar bulunmaktadır. Ancak literatürde bunun aksini belirten sonuçlara da rastlanılmaktadır. Bu çalışma HER-2'nin mide karsinomlarındaki sıklığını belirlemek, HER-2 ekspresyonunu immunohistokimyasal (IHK) ve silver in situ hibridizasyon (SISH) yöntemleri ile karşılaştırmalı olarak değerlendirmek, histopatolojik parametrelerle ilişkisini ortaya koymak amacıyla sunulmuştur.

Gereç ve Yöntem: Anabilim dalımızda 1996-2016 yılları arasında gastrektomi materyalinde mide kanseri tanısı alan 203 olgu çalışmaya alınmıştır. Olguların yaşı, cinsiyeti, tümörün yerleşimi, büyüklüğü, histolojik tipi, invazyon derinliği, perinöral invazyon, lenfovasküler emboli varlığı, lenf nodu metastazı, lokal invazyon veya uzak metastaz bulguları kaydedilmiştir. HER-2'nin IHK 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 olgulara, aynı lam üzerinde değerlendirme yapmayı sağlayan dual silver in situ hibridizasyon/immunohistokimya (SISH/IHK) kombinasyon yöntemi uygulanarak amplifikasyon araştırılmıştır.

Bulgular: 203 olgunun 19'ünde +3, 20'sinde +2 IHK skoru elde edildi, geri kalan olgular negatif (skor 0 ve 1) olarak değerlendirildi. IHK skoru +2 olan 20 olgunun 14'ünde (%70), skoru +3 olan 19 olgunun 18'inde (%94,7) dual SISH/IHK kombinasyon yöntemiyle HER-2 amplifikasyonu saptandı. HER-2 gen amplifikasyonu olan olguların 22'si erkek, 10'u kadın olup olguların 19'u (%59,4) <65 yaş, 13'ü (%40,6) ≥65 idi. Olguların 9'u proksimal, 22'si distal yerleşimli olup, bir tümör linitis plastikaydı. Lauren sınıflamasına göre olguların 27'si intestinal tip, 3'ü diffüz tip, 2'si mikst tipte izlenmekteydi. Olguların 20'sinde perinöral invazyon, 26'sında lenfovasküler emboli, 27'sinde bir veya daha fazla lenf nodu metastazı saptandı. TNM evrelemesine göre HER-2 pozitif olguların 19'u T4a, 5'i T3, 4'ü T2, 3'ü T1b, 1'i T1a evresindeydi.

Sonuç: Çalışmamızda HER-2 gen amplifikasyonu %19,2 olup literatürle uyumlu olarak daha çok intestinal tip morfoloji sergileyen tümörlerdeydi ve istatistiksel olarak anlamlıydı.

Anahtar Sözcükler: Mide karsinomu, HER-2, SISH/IHK, Gastrektomi

ABSTRACT

Aim: HER-2 (Human epidermal growth factor-2) gene amplification is seen in 7-34% of gastric carcinomas. It is more frequently observed in observed in tumors with proximal location and intestinal type morphology. The aim of this study was to determine the prevalence of HER-2 in gastric carcinomas, to evaluate HER-2 expression in comparison with immunohistochemical (IHC) and silver in situ hybridization (SISH) methods and to demonstrate its association with histopathological parameters.

Materials and Methods: 203 cases diagnosed as gastric cancer between 1996-2016 were included in the study. Patient's age and sex, location and size of the tumor, histological type, depth of invasion, perineural invasion, lymphovascular embolism, lymph node metastasis, local invasion or distant metastasis were recorded. Evaluation of the HER-2 IHC score was 0, +1, +2, +3 and the scores +2 and +3 were accepted as positive. In these cases, amplification was investigated by applying dual silver in situ hybridization/immunohistochemistry (SISH/IHC) method.

Results: 19 of cases have IHC +3 positive and 20 of cases have +2 positive results. HER-2 amplification was detected in 14 of 20 (70%) patients with IHC score +2 and 18 of 19 (94.7%) patients with IHC score +3. 22 of 32 cases were male and 19 of 32 cases were <65 years old. 9 of cases were at proximal, 22 was at distal while one tumor was linitis plastica. According to the Lauren classification, 27 were intestinal, 3 were diffuse and 2 were mixed type. Perineural invasion was detected in 20 cases, lymphovascular invasion in 26 cases and lymph node metastasis in 27 cases. According to the TNM staging, 19 of the HER-2 positive cases were in T4a, 5 were T3, 4 were T2, 3 were T1b, 1 was T1a.

Conclusion: HER-2 gene amplification was 19.2% in the study. In concordant with the literature, it was statistically significant in tumors showing intestinal type morphology.

Key Words: Gastric carcinoma, HER-2, SISH/IHC, Gastrectomy

AMAC

Mide kanseri insidansı ve mortalitesi azalmış olmakla birlikte hâlâ tüm dünyada görülme sıklığı açısından 5. ve kansere bağlı ölümlerde 3. sırada yer almaktadır (1). Mide kanserli birçok hasta tanı anında ileri evre ve/veya metastatik evrededir. Kemoterapötik ilaçlara ek olarak yeni tedavi modaliteleri geliştirmek amacıyla yapılan çalışmalarda, ileri evre mide ve gastroözefagial bileşke kanserlerinde anti-HER-2 (Human epidermal growth factor-2) monoklonal antikoru olan trastuzumabın kemoterapiye eklenmesinin sağkalımı artırdığı gösterilmiştir (2). Ancak mide kanserlerinde HER-2/neu pozitifliğinin prognostik önemi halen tartışmalıdır.

Mide karsinomlarında HER-2 gen amplifikasyonu %7-34 arasında değişen oranlarda bildirilmekte olup daha çok proksimal yerleşimli, intestinal tip morfoloji sergileyen mide tümörlerinde izlendiğine yönelik ve kötü prognostik faktör olduğuna ilişkin yayınlar bulunmaktadır (3). Ancak literatürde bunun aksini belirten sonuçlara da rastlanılmaktadır. Bu çalışma, pozitifliği coğrafi değişkenlik gösterebilen HER-2'nin bölgemizde sıklığını belirlemek, HER-2 ekspresyonunu immunohistokimya (IHK) ve silver in situ hibridizasyon (SISH) yöntemleri ile karşılaştırmalı olarak değerlendirmek, histopatolojik parametrelerle ilişkisini ortaya koymak amacıyla sunulmuştur.

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 (Dünya Sağlık Örgütü) sınıflamasına ve Lauren sınıflamasına göre tanımlar doğrulandı. Patoloji raporunda yer alan bilgilere dayanarak olguların yaş ve cinsiyeti, ameliyat şekli, tümörün çapı, görünümü ve yerleşimiyle 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 tümör içeren, uygun preparat ve bloklar seçildi.

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

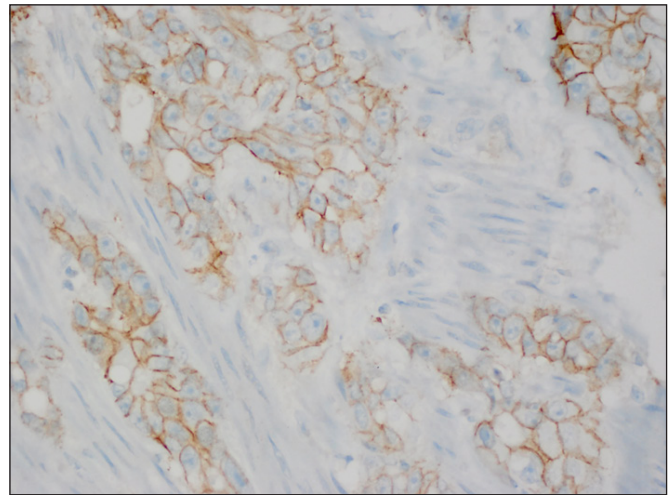
Olguların tümüne HER-2 immünhistokimya (IHK) boyası uygulandı. İHK boyama için anti-HER-2/neu (4B5) klonu rabbit monoklonal antikoru (Ventana, Katalog Numarası 790-2991; Predilüe form) kullanıldı. HER-2 (4B5 klonu) İHK değerlendirmesi için Hofmann ve ark.'nın önerdiği skorlama

sistemi kullanıldı. HER-2 İHK skoru +2 ve +3 olan olgularda pozitiflik anlamlı kabul edildi ve bu olgulara, aynı lam ve aynı kesit üzerinde değerlendirme yapmayı sağlayan dual silver in situ hibridizasyon (SISH)/IHK kombinasyon yöntemi uygulanarak amplifikasyon araştırıldı (4-6). ISH işlemleri için cihaz ile uyumlu INFORM HER2 Dual ISH DNA Probe cocktail (Ventana, Katalog numarası 780-4422) kullanıldı. Yeni geliştirilen yöntem ile preparatlar önce İHK'sal olarak ardından dual SISH ile boyandı. 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 sırasıyla kırmızı ve siyah sinyal verecek şekilde işaretli preparatlar elde edildi. Tüm preparatlar tam otomatik boyama cihazında (Ventana, Benchmark, XT İHK/ISH) boyandı.

Olgulara ait yaş, cinsiyet, makroskopik ve histopatolojik değişkenler ile bu olgulara ait HER-2 ekspresyonunun İHK'sal ve SISH sonuçları arasındaki ilişki ki kare testi ve Fisher exact testi uygulanarak değerlendirildi.

BULGULAR

HER-2 ile İHK'sal olarak 203 olgunun 19'ünde +3, 20'sinde +2 pozitiflik elde edildi, geri kalan olgular negatif (skor 0 ve 1) olarak değerlendirildi. Böylece yalnızca İHK yöntemi ile bakıldığında toplam 39 olguda (%19,2) HER-2 pozitifliği görüldü (Şekil 1-3). İHK skoru +2 ve +3 olan bu olguların da 32'sinde (%15,7) dual SISH/IHK (gen/protein) yöntemi ile amplifikasyon saptandı. İHK skoru +2 olan 20 olgunun 14'ünde (%70), İHK skoru +3 olan 19 olgunun 18'inde (%94,7) dual SISH/IHK yöntemiyle bakıldığında HER-2 amplifikasyonu saptandı (Şekil 4-6). 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 (Şekil 7). Dual SISH/IHK yönteminin pratik yararı açısından bakıldığında, aynı lam üzerinde yapılan değerlendirmede olguların tümünde SISH



Şekil 1: Orta şiddette membranöz bazolateral boyanma gösteren İHK skoru +2 tubuler adenokarsinom olgusu (x400).

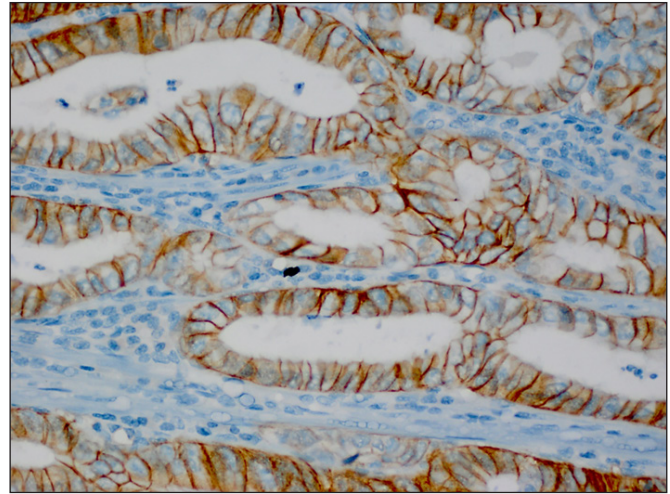
Tablo I: HER-2 gen amplifikasyonu olan ve olmayan olguların klinikopatolojik özelliklerinin karşılaştırılması

Klinikopatolojik Özellikler	HER-2 (+) (Dual SISH/İHK)	HER-2 (-) (Dual SISH/İHK)	p değeri
Yaş			
- <65	19 (%59,4)	97 (%56,7)	0,781
- ≥65	13 (%40,6)	74 (%43,3)	
Cinsiyet			
- Kadın	10 (%31,2)	67 (%39,2)	0,396
- Erkek	22 (%68,8)	104 (%60,8)	
Tümör yerleşimi			
- Proksimal	9 (%28,1)	30 (%17,5)	0,198
- Distal	22 (%68,8)	133 (%77,8)	
- Diffüz	1 (%3,1)	8 (%4,7)	
Makroskopik görünüm (Borrmann)			
- Tip 0	0 (%0)	7 (%4,1)	0,203
- Tip 1	4 (%12,5)	6 (%3,5)	
- Tip 2	16 (%50)	86 (%50,3)	
- Tip 3	11 (%34,4)	64 (%37,4)	
- Tip 4	1 (%3,1)	8 (%4,7)	
Tümör çapı			
- <5 cm	12 (%37,5)	57 (%33,3)	0,803
- ≥5 cm	20 (%62,5)	114 (%66,7)	
Toplam	32	171	

HER-2: Human epidermal growth factor-2, **SISH:** Silver in situ hibridizasyon, **İHK:** Immunohistokimya



Şekil 2: HER-2 İHK skoru +3 tubulopapiller adenokarsinom olgusu (x40).



Şekil 3: Kuvvetli membranöz bazolateral boyanma gösteren HER-2 İHK skoru +3 tubuler adenokarsinom olgusu (x400).

ile sinyal elde edilirken, 18 olguda (%46) İHK'sal boyanma ya çok zayıftı ya da hiç yoktu. Bunların 16'sı HER-2 İHK skoru +2 olan olgular, 2'si ise HER-2 İHK skoru +3 olan olgulardı.

HER-2 gen amplifikasyonu saptanan olguların 22'si erkek, 10'u kadın olup olguların 19'u (%59,4) <65 yaş, 13'ü (%40,6) ≥65 idi. Olguların 9'u proksimal, 22'si distal mide

yerleşimli olup, bir tümör linitis plastika görüntüsündeydi. HER-2 gen amplifikasyonu saptanan ve saptanmayan olguların diğer histopatolojik ve evreleme özellikleri Tablo I ve II'de görülmektedir. Histolojik olarak DSÖ'ye göre müsinöz adenokarsinom olarak değerlendirilen 2 olgu, Lauren sınıflamasına göre intestinal alt grupta ve mikst adeno-nöroendokrin karsinom tanısı alan 1 olgu ile az

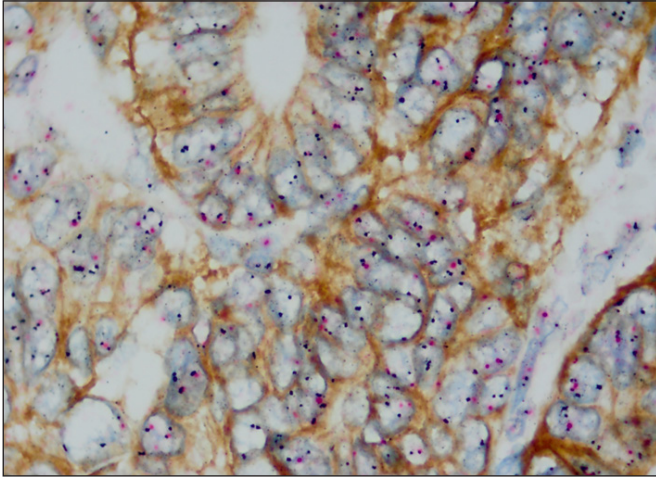
Tablo II: HER-2 gen amplifikasyonu olan ve olmayan olguların histopatolojik özelliklerinin karşılaştırılması

Histopatolojik Özellikler	HER-2 (+) (Dual SISH/IHK)	HER-2 (-) (Dual SISH/IHK)	p değeri
DSÖ sınıflaması			
Tubuler adenokarsinom	21 (%65,6)	93 (%54,4)	0,301
Az koheziv karsinom	4 (%12,5)	50 (%29,2)	
Müsinöz adenokarsinom	2 (%6,2)	11 (%6,4)	
Tubulopapiller adenokarsinom	3 (%9,4)	4 (%2,3)	
Papiller adenokarsinom	1 (%3,1)	4 (%2,3)	
Medüller karsinom	0 (%0)	2 (%1,2)	
Adenoskuamöz karsinom	0 (%0)	2 (%1,2)	
Mikst adenonöroendokrin karsinom	1 (%3,1)	1 (%0,6)	
Rabdoid özellik sergileyen karsinom	0 (%0)	1 (%0,6)	
Mikst adenokarsinom	0 (%0)	3 (%1,8)	
Lauren sınıflaması			
İntestinal tip	27 (%84,4)	105 (%61,4)	0,039
Diffüz tip	3 (%9,4)	49 (%28,7)	
Mikst tip	2 (%6,2)	17 (%9,9)	
Tümör invazyon derinliği (T)			
- T1a	1 (%3,1)	4 (%2,3)	0,516
- T1b	3 (%9,4)	9 (%5,3)	
- T2	4 (%12,5)	15 (%8,8)	
- T3	5 (%15,6)	32 (%18,7)	
- T4a	19 (%59,4)	99 (%57,9)	
- T4b	0 (%0)	12 (%7)	
Tümör invazyon derinliği (T)			
- T1a/b (erken evre)	4 (%12,5)	12 (%7)	0,231
- T2-T4a/b (ileri evre)	28 (%87,5)	159 (%93)	
Lenf nodu metastazı (N)			
- Yok	5 (%15,6)	35 (%20,4)	0,527
- Var	27 (%84,4)	136 (%79,6)	
Perinöral invazyon			
- Yok	12 (%37,5)	64 (%37,4)	0,994
- Var	20 (%62,5)	107 (%62,6)	
Lenfovasküler invazyon			
- Yok	6 (%18,8)	32 (%18,7)	0,996
- Var	26 (%81,2)	139 (%81,3)	
Komşu organ invazyonu			
- Yok	32 (%100)	159 (%93)	0,120
- Var	0 (%0)	12 (%7)	
Uzak organ metastazı (M)			
- Yok	28 (%87,5)	148 (%86,5)	0,574
- Var	4 (%12,5)	23 (%13,5)	
Toplam	32	171	

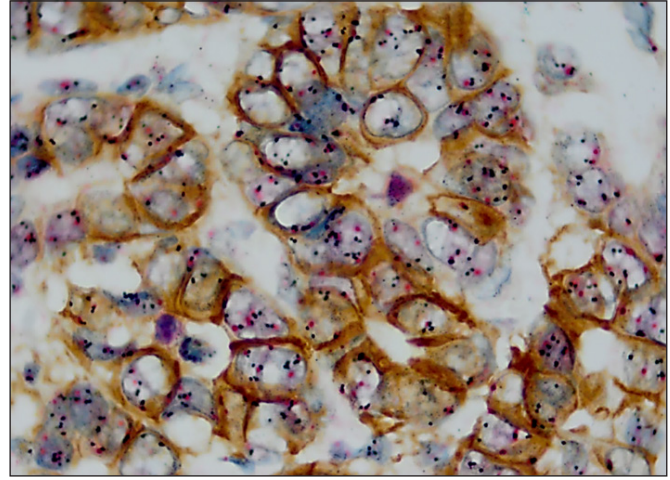
DSÖ: Dünya Sağlık Örgütü, HER-2: Human epidermal growth factor-2, SISH: Silver in situ hibridizasyon, İHK: İmmunohistokimya

koheziv karsinom tanısı alan 1 olgu da Lauren'e göre mikst alt grupta değerlendirildi. Histopatolojik olarak bakıldığında çalışmamızda HER-2 gen amplifikasyonu saptanan tümörler daha çok intestinal tip morfoloji sergilemekteydi ($p<0,05$). HER-2 gen amplifikasyonu saptanan taşlı yüzük morfolojisine

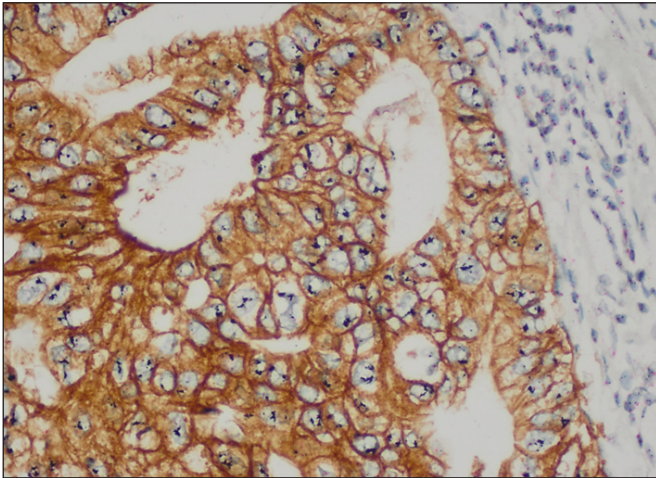
sahip 4 az koheziv karsinom olgusunun ise 3'ünde HER-2 İHK skoru +2 olarak izlenirken birisinde HER-2 İHK skoru +3 olarak saptandı (Şekil 8). HER-2 gen amplifikasyonu saptanan mikst adenonöroendokrin karsinom olgusunda amplifikasyon saptanan komponent ise adenokarsinom komponentiydi.



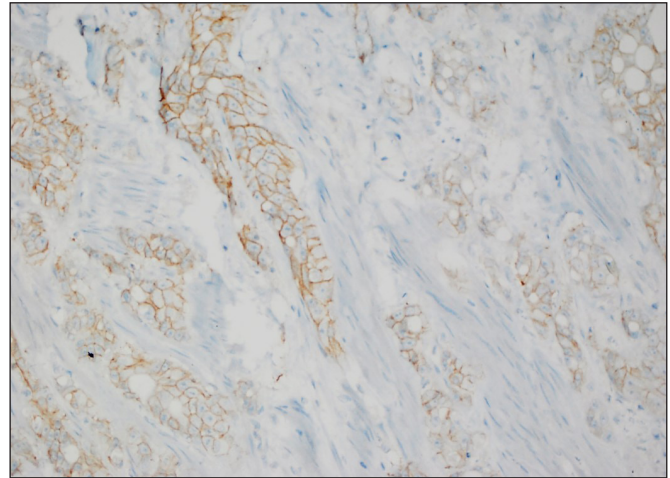
Şekil 4: Dual SISH/IHK yöntemi, HER-2/kromozom17 \geq 2, HER-2 IHK skoru +2 (X1000).



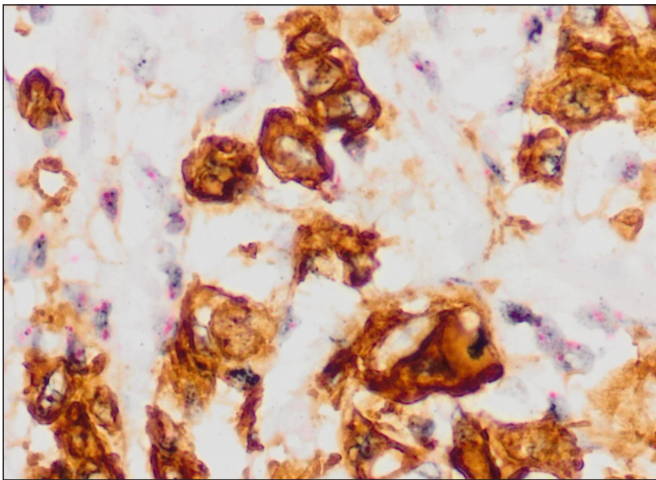
Şekil 5: Dual SISH/IHK yöntemi, HER-2/kromozom17 \geq 2, HER-2 IHK skoru +3 (X1000).



Şekil 6: Dual SISH/IHK yöntemi, kümelenme gösteren HER-2 gen sinyalleri (x400).



Şekil 7: HER-2 IHK skoru +2 olan ve intra-tümöral heterojenite alanları içeren tubuler adenokarsinom olgusu (x200).



Şekil 8: Dual SISH/IHK yöntemi, HER-2 IHK skoru +3 olan az koheziv karsinomda (taşlı yüzük hücreli karsinom) HER-2 gen sinyalleri (x1000).

TARTIŞMA

Çalışmamızda tüm mide kanseri olgularımızda IHK'sal olarak HER-2 overekspresyonu %19,2 (39/203) olarak bulunmuş, bu olguların 32'sinde de (%82) gen amplifikasyonu saptanmıştır. Literatürde mide kanserlerinde HER-2 gen amplifikasyonu veya artmış protein ekspresyonu primer tümörlerin %7-34'ü gibi geniş bir aralıkta pozitif olarak bulunmaktadır (7). Terashima M. ve ark.'nın yaptığı, 829 mide dokusunun incelendiği bir çalışmada IHK ve SISH kullanılarak HER-2 ekspresyonu %13,6 olarak bulunmuştur (8). Xu CC. ve ark.'nın yaptığı çalışmada HER-2 overekspresyonu %11,9; Zhou F. ve ark.'nın yaptığı çalışmada ise %11,89 olarak bulunmuştur (9, 10). Bu çalışmalarda ToGA klinik çalışmasına göre Hoffman tarafından uyarlanmış HER-2 skorlama sistemi kullanılmış ve HER-2 IHK skoru +2 olan olgulara FISH (florasan in situ hibridizasyon) uygulanmıştır. FISH sonucuna göre amplifikasyon konfirme edilirse overekspresyon olarak kabul

edilmiştir. 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 (11-14). Bizim 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 bilindiği gibi 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 fiksasyonun sağlanması sağlanmalıdır. Fiksatif ile temas edinceye kadar geçen soğuk iskele 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 (15). Tüm bu özellikler göz önüne alındığında, çalışmamızda, pre-analitik sürecini ayrıntılı olarak değerlendiremediğimiz daha eski yıllara ait olgularımızda tespit edemediğimiz HER-2 ekspresyon kayıpları yaşamış olabiliriz.

Trastuzumab tedavisinin mide karsinomlarında kullanılması 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 (2). 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 (10, 16-19). 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.

IHK ve ISH yöntemini (ISH/IHK kombinasyon yöntemi) aynı preparat üzerinde değerlendiren az sayıda çalışma bulunmaktadır. Werner D. ve ark.'nın yaptıkları bir çalışmada mide karsinomlarında SISH/IHK kombinasyon yöntemi, IHK ve SISH'in ayrı ayrı değerlendirilmesi ile karşılaştırılmış ve Altmann'ın kappa değeri yorumlamasına göre uyum yüksek bulunmuştur (4). Emily S. ile ark.'nın CISH/IHK kombinasyon yöntemiyle yaptıkları çalışmada ve Hirschmann A. ile ark.'nın SISH/IHK kombinasyon yöntemiyle yaptıkları çalışmada IHK'sal açıdan bazı olgularda daha zayıf boyanma gözlenmiştir

(5, 6). Bizim olgularımızın da IHK'sal olarak HER-2 skoru +2 olanların 16'sında, skoru +3 olanların 2'sinde SISH/IHK kombinasyon yöntemiyle immün boyanma çok az görülmüş ya da negatif olarak saptanmıştır. Bu sonuç, IHK skoru yüksek olan olgularda kombine yöntemin iyi sonuç verebileceğini düşündürse de yöntemin standardize edilmesi gerekliliğini göstermektedir. Çalışmamızda zayıf IHK boyanmasına çözüm amacıyla inkübasyon süreleri uzatılarak yapılan denemelerde bir sonuç elde edilememesi, olasılıkla dokuların pre-analitik süreçlerindeki farklılıklardan kaynaklanmaktadır. Öte yandan bizim gözlemlerimize göre bu problemin devamı niteliğinde, SISH/IHK kombinasyon yönteminin çok önemli bir dezavantajı da immunhistokimya boyanma şiddetinin optimize edilememesine bağlı olarak bazı olgularda, özellikle IHK skoru +3 olgularda gen sinyallerinin IHK boyama ile maskelenmesi ve bu nedenle değerlendirilmesinde yaşanan güçlülüdür. Çalışmamız dual SISH/IHK yöntemi için bir örnek oluşturmakla birlikte yöntemin daha iyi optimize edilmesi için yeni çalışmalara ve yaklaşımlara gereksinim vardır. Ancak bu yöntemin doku yetersizliklerini görece ortadan kaldıracığı, intra-tümöral heterojeniteye bağlı yanlış negatiflikleri azaltabileceği ve daha kısa zamanda sonuç vermeyi sağlayabileceği açıktır.

Çalışmamızdan elde ettiğimiz bulgular, HER-2 gen amplifikasyonu gösteren mide tümörlerinin daha çok intestinal morfoloji sergilediğini göstermektedir. Optimize edilmesi halinde, HER-2 gen amplifikasyonunu saptamada dual SISH/IHK yönteminin zaman ve doku kaybını önleyebilecek avantajlar sağlayacağı görülmüştür.

KAYNAKLAR

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015;136(5):E359-86.
2. 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;376:687-697.
3. 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.
4. 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. *J Transl Med*. 2014;12:160.
5. 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.

6. 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.
7. 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 J Cancer*. 2016;53(4): 505-511.
8. 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 ERB-B2 on survival in stage II/III gastric cancer. *Clin Cancer Res*. 2012;18:5992-6000.
9. Xu CC, Yue L, Wei HJ, Zhao WW, Sui, AH, Wang XM, et. al. Significance of TFF3 protein and Her-2/neu status in patients with gastric adenocarcinoma. *Pathol Res Pract*. 2013;209(8):479-85.
10. Zhou F, Li N, Jiang W, Hua Z, Xia L, Wei Q, Wang L. 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.
11. 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;15(4):535-542.
12. 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;17(1):52-62.
13. 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. *BMC Gastroenterol*. 2015;15:157.
14. 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. *J Oncology*. 2011;2011:391564.
15. Baykara M, Benekli M, Ekinci O, Irkkan SC, Karaca H, Demirci U, et.al. Clinical significance of HER-2 overexpression in gastric and gastroesophageal junction cancers. *J Gastrointest Surg*. 2015;19(9):1565-71.
16. Park DI, Yun JW, Park JH, Oh SJ, Kim HJ, Cho YK et al. HER-2/neu amplification is an independent prognostic factor in gastric cancer. *Dig Dis Sci*. 2006;51:1371-1379
17. Yan SY, Hu Y, Fan JG, Tao GQ, Lu YM, Cai X et al. Clinicopathologic significance of HER-2/neu protein expression and gene amplification in gastric carcinoma. *World J Gastroenterol*. 2011;17(11):1501-1506.
18. Barros-Silva JD, Leitão D, Afonso L Vieira J, Dinis-Ribeiro M, Fragoso M 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.
19. Pinto-de-Sousa J, David L, Almeida R, Leitão D, Preto JR, Seixas M 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.