

T.C.
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANA BİLİM DALI
TIBBİ ONKOLOJİ BİLİM DALI

Prof. Dr. Handan Onur
Tıbbi Onkoloji Bilim Dalı
Tez Danışmanı

107580

OPERABL MİDE KANSERİNDE P53, DNA PLOİDİ VE S-FAZ
FRAKSİYONUNUN PROGNOSTİK ÖNEMİ

Tıbbi Onkoloji Yan Dal Uzmanlık Tezi

107580

Dr. Abdullah Büyükçelik

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

Ankara, 2001

TEŐEKKÜR

“Tıbbi Onkoloji Yan Dal Uzmanlık” eğitimim sırasında yardımlarını hiçbir zaman eksik etmeyen değerli hocalarım, baŐta Tıbbi Onkoloji B.D. BaŐkanı Prof. Dr. Fikri İçli olmak üzere, Prof. Dr. Dilek Dinçol, Prof. Dr. Ahmet Demirkazık, Prof. Dr. H. Ali Pamir, Doç. Dr. Hakan Akbulut ve Doç. Dr. Filiz Çay Şenler’e; tezimin bütun aŐamalarında yardımını her an yanımda hissettiğim tez danıŐmanın Prof. Dr. Handan Onur’a sonsuz teŐekkür ve saygılarımı sunarım. Patoloji preparatlarının temin ve değerlendirilmesinde büyük emek sarfeden, Patoloji A.B.D. BaŐkanı Prof. Dr. Selim Ereku’la, Doç. Dr. Arzu Ensari’ye ve immünpatoloji laboratuvarı çalıŐanlarına; SSK Ankara Hastanesi, Patoloji Kliniği Őefi, Doç. Dr. Binnur Üzmez Önal’a; Tıbbi Onkoloji Bilim Dalı Laboratuvar sorumlusu Nalan Açıkgöz’e ayrıca teŐekkür ederim. Yan dal uzmanlık eğitimim sırasında birlikte çalıŐtıđım doktor, intern doktor, hemŐire ve tüm ekip personeline teŐekkürü borç bilirim...

Dr. Abdullah Büyükçelik
Ankara , 2001

İÇİNDEKİLER

	Sayfa no
GİRİŞ VE AMAÇLAR	1
GENEL BİLGİLER	3
HASTALAR VE YÖNTEMLER	12
SONUÇLAR	19
TARTIŞMA	32
ÖZETLER VE ANAHTAR KELİMELER	40
KAYNAKLAR	44

GİRİŞ VE AMAÇLAR

Mide kanseri dünyada halen önemini koruyan bir sağlık problemidir. Gelişmiş toplumlarda mide kanseri insidansında azalma olmasına rağmen ülkemizdeki insidans yüksek olarak devam etmektedir. Tarama programlarının uygulandığı Japonya gibi bazı ülkelerde erken mide kanseri tanısı koymak mümkünken, ülkemizde tanı hastalığın ileri evrelerinde konulmakta ve hastaların çoğu hastalık progresyonu nedeniyle kaybedilmektedir (1-7).

Mide kanserinin küratif tek tedavisi cerrahidir. Küratif cerrahi rezeksiyon geçiren hastaların birçoğunda, hastalığın sistemik olarak nüks etme olasılığı nedeniyle ek tedavilere ihtiyaç duyulmaktadır. Ancak sistemik nüksü azaltmak veya ortadan kaldırmak amacıyla bugüne kadar yapılmış olan adjuvan kemoterapi uygulamalarında başarılı sonuçlar alınamamıştır. Bu nedenle günümüzde mide kanseri için adjuvan kemoterapi standart olarak önerilmemekte ancak çalışma protokolleri dahilinde uygulanmaktadır (1,2,8,9). Son zamanlarda yapılan prospektif, randomize bir çalışmada, adjuvan olarak uygulanan 5-fluorourasil, folinik asit ve radyoterapi kombinasyonunun total sağkalım ve hastaliksız sağkalım avantajı sağladığı bildirilmiştir (10). Lokal ileri ve/veya metastatik mide kanserinde kemoterapi ve/veya radyoterapi ile şifa sağlamak mümkün olmamıştır. Uygulanan tedaviler palyatif amaçlıdır (1,2, 11-14).

Mide kanserinde lenf nodu metastazı, histopatolojik tip, uygulanan küratif cerrahi, cinsiyet, tümör derecesi gibi bazı faktörler prognozla ilişkili bulunmuştur (1,2). Bunun dışında; DNA ploidi, s-faz fraksiyonu, p53 mutasyonu gibi bazı genetik değişikliklerin de prognostik önemi araştırılmıştır. Ancak, konu ile ilgili çalışmaların sonuçları çelişkili bulunmuştur. Çalışmaların bir kısmında p53 bağımsız prognostik faktör olarak bulunurken (15-18) bazılarında bu ilişki bulunamamıştır (19-23). P53 ile tedavi etkinliği arasındaki ilişkinin gösterildiği çalışmalarda p53 pozitifliğinin (mutant P53) tedaviye dirençliliğe neden olduğu bildirilmektedir (24). DNA ploidi ve s-faz fraksiyonu ile ilgili yapılan çalışmalarda

anöploidi ve yüksek s-faz fraksiyonunun ileri ve agressif seyir gösteren tümörlerde belirginleşen bir bulgu olduğu ortaya konulmuştur (25-28). Bazı araştırmacılar anöploidiyi prognostik faktör olarak ortaya koyarken (25,26), diğerleri bu ilişkiyi gösterememişlerdir (27-29).

Bu çalışmada kliniğimizde takip edilen ve adjuvan kemoterapi alan operabl mide kanserli hastalarda p53, s-faz fraksiyonu ve DNA ploidi oranını belirlemeyi ve bu faktörlerin operabl mide kanserinde prognostik önemini araştırmayı amaçladık.



GENEL BİLGİLER

Mide kanseri dünyada sık görülen kanserlerdendir. Tüm dünyada insidansında azalma olmasına rağmen halen mortalitesi yüksek olan bir kanser türüdür. Mide kanseri daha çok gelişmekte olan veya az gelişmiş ülkelerin hastalığıdır. İnsidansı; coğrafya, ırk, diyet, genetik ve cinsiyete göre değişmektedir. Türkiye, mide kanserinin nispeten sık görüldüğü ülkelerden biridir (1-7).

İnsidans

Türkiyedeki kanser kayıtlarının sağlıklı olmamasına rağmen 1995 verilerine göre yeni mide kanseri sayısı 2455 ve sıklığı da %8.52'dir. On yıllık dökümanların incelemesinde, mide kanseri tüm kanserlerin %6.68'ini oluşturmaktadır. Erkek kadın oranı yaklaşık 1:1.23 olup, kanser mortalitesi açısından akciğer ve meme kanserinden sonra gelmektedir. Cinsiyet farkı gözetilmeksizin yapılan değerlendirmede gastrointestinal kanserler içinde mide kanseri kolorektal kanserlerden daha çok görülmekte ve batıdan doğuya gidildikçe mide kanseri oranı belirgin olarak kolorektal kanserlerin önüne geçmektedir. Kansere bağlı ölüm sıralamasında erkeklerde akciğer kanserinden kadınlarda da meme kanserinden sonra gelmektedir (3-7). Dünyada mide kanseri en çok Çin, Japonya ve diğer Uzak Doğu Ülkelerinde saptanırken, Doğu Avrupa ve tropikal Güney Amerika'da nispeten yüksek orandadır. Kuzey Amerika'da görülme oranı düşüktür. Ülkeler arasındaki sıklık farklılıkları diyet faktörleri ve *Helicobacter pylori* enfeksiyonunun görülme oranına bağlıdır. Gelişmekte olan ülkelerde *H.pylori* ile enfekte popülasyon oranı %80-90 ve bu bakteriye bağlı mide kanseri oranı %47'dir(1,2,7).

Gelişmiş ülkelerde; distal mide ve korpus yerleşimli kanser insidansında azalma olurken, proksimal ve özofagogastrik bileşke kanser insidansında artış vardır. Bu artış hızı, akciğer kanseri ve maliyn melanomdan sonra gelmektedir. Bu nedenle gelişmiş ülkelerde görülen mide kanserinin çoğunluğunu özofagogastrik bileşke kanserleri oluşturmaktadır (1,2 30-34).

Etyoloji

Mide kanseri etyolojisinde çevresel, genetik ve predispozan faktörler rol oynamaktadır. Diyet faktörü, mide kanseri gelişmesinde önemli bir yer tutmaktadır. Karbonhidrattan zengin diyet, salamura yiyecekler, tütülenmiş balık ve kurutulmuş gıdaların mide kanseri gelişmesiyle ilişkili olduğu bulunmuştur. Hayvan deneylerinde ve epidemiyolojik çalışmalarda diyetle alınan nitratın mide karsinogenesisindeki rolü gösterilmiştir (35,36). Taze sebze ve meyvenin zengin olduğu beslenme şekli, mide kanserine karşı koruyucu etki yapmaktadır. Buzdolabının kullanıldığı toplumlarda zamanla mide kanseri insidansının azaldığı gösterilmiştir (37). Bu ilişki, muhtemelen taze sebze ve meyvenin daha sık kullanılması, saklanmış besin maddelerinin ve besin koruyucularının daha az kullanılması ve/veya prokarsinogenlerin aktiflenmesine neden olan bakteriler ve/veya mantarlar ile kontaminasyonunun azalmasıyla ilişkili olabilir (34,37).

Kronik atrofik antral gastritin nedeni olarak bilinen *H.pylori*, artık mide kanserinin de bir nedeni olarak kabul edilmektedir. Bu görüş aşağıdaki verilerle desteklenmektedir:

- Normal mukozadan histolojik olarak elde edilen *H.pylori*, perekanseröz lezyonların veya mide kanserinin kendisinin gelişmesine neden olabilmektedir (intestinal metaplazili veya metaplazisiz atrofik gastrit). Bu da, sebebe yönelik bir delil oluşturmaktadır (38, 39).
- On üç farklı ülkeden elde edilen verilere dayanan EUROGAST çalışmasında, *H.pylori* ile infekte olan toplumlarda mide kanseri insidansının infekte olmayanlara göre 6 kat arttığı bulunmuştur (40).
- Mide kanseri ve *H.pylori* enfeksiyonu ile ilgili çalışmaların meta-analizinde, *H.pylori* ile infekte olan bireylerde infekte olmayanlara göre mide kanseri riskinin iki kat arttığı gösterilmiştir (41,42).

Sigara ile mide kanseri gelişimi arasında muhtemel bir ilişki vardır ancak doz-cevap ilişkisi gösterilememiştir. Alkol kullanımı ile mide kanseri riski arasındaki ilişki net değildir

(43-46). Obezite ile özofagogastrik bileşke ve kardiya kanser riskinde artış gösterilmiştir. Obezitenin yaygın olduğu batı toplumlarında görülen mide kanseri daha çok proksimal mide ve özofagogastrik bileşke yerleşimlidir (46,47).

Genetik faktörler mide kanseri gelişmesinde olası bir role sahiptir. Herediter non-polipozis koli kanser sendromları (Lynch sendromu II) ve daha az derecede olmak üzere familyal polipozis koli sendromuna sahip bireylerde de mide kanseri gelişme riskinin arttığı gösterilmiştir. Bu sendromlar dışında mide kanserinde aile içi yığılmalar tespit edilmiştir. Diğer taraftan ailesinde mide kanseri hikayesi olan bireylerde de mide kanseri gelişme riski 2-3 kat artmıştır (48-51). A kan grubu ile mide kanseri arasındaki ilişki genetik faktörlerin rolünü destekleyen bir başka bulgudur (34). Mide kanseri gelişmesinde rol alan predispozan durumlar ve risk faktörleri tablo 1’de özetlenmiştir.

MOLEKÜLER GENETİK

Mide kanserinde, spesifik olmayan onkogen ve tümör süpresör gen değişiklikleri tanımlanmıştır. Özellikle tümör süpresör genlerde olmak üzere, mide kanserinde meydana gelen genetik değişiklikler kolon kanserinde gözlenen genetik değişiklikler ile benzerlik göstermektedir. *MCC* (mutated in colon cancer), *APC* (adenomatous polyposis coli) ve *DCC* (deleted in colon cancer) alelik delesyonlar mide kanserinde sırasıyla %33, %34 ve %64 oranında bildirilmiştir. *DCC*’nin onkojenik rolü açık değildir. *Ras* protoonkogen mutasyonu ilginç olarak mide kanserinde az görülmektedir (52-54).

Diffüz ve intestinal tip mide kanserinde farklı genetik değişiklikler de tanımlanmıştır :

- Epidermal büyüme faktörü reseptörünü kodlayan, erbB-2 (her-2/neu) ve erbB-3 protoonkogenlerinin ekspresyonu; intestinal tip mide kanserinde sıklıkla tespit edilirken, diffüz tip mide kanserinde tespit edilememektedir (54,55).

- Epidermal büyüme faktörü reseptörünü kodlayan, erbB-2 (her-2/neu) ve erbB-3 protoonkogenlerinin ekspresyonu; intestinal tip mide kanserinde sıklıkla tespit edilirken, diffüz tip mide kanserinde tespit edilememektedir (54,55).

Tablo 1. Mide kanserinde risk faktörleri

Predispozan durumlar

- Kronik atrofik gastrit ve intestinal metaplazi
- Pernisiyöz anemi
- Midenin ülser hastalığı
- Benign hastalıklar için geçirilen mide rezeksiyonu
- H.pylori* infeksiyonu
- Menetriyer hastalığı
- Adenomatöz mide polipleri
- İmmün yetmezlik sendromları
- Baret özofagusu (proksimal tip mide kanseri)

Genetik ve çevresel faktörler

- Ailede mide kanseri öyküsü
- A kan grubu
- Hereditör non-polipozis koli sendromları
- Düşük sosyoekonomik düzey (Distal mide kanseri için)
- Yüksek sosyoekonomik düzey (Proksimal mide kanseri için)
- Yetersiz meyve ve sebze tüketmek
- Tuzlanmış, tütsülenmiş ve saklanmış gıdalar
- Sigara
- Alkol
- Obezite

-
- Fibroblast büyüme faktör reseptörü ailesinde olan anomaliler, özellikle K-sam, daha çok diffüz tip mide kanserinde meydana gelmektedir (34,56).
 - Mide kanserlerinin %20-65'inde immünohistokimyasal olarak p53 pozitifliği tespit edilmektedir. Bu pozitifliğin mide kanser tanısı, tedavisi, prognozu belirleme ve takibinde yeri halen tartışmalıdır (15,17,20,34,56).

MİDE KANSERİNDE PROGNOSTİK FAKTÖRLER

Mide kanserinde prognostik önemi gösterilen faktörler şunlardır:

1. **Cerrahi tedavi:** Mide kanserinde tedavi önemli bir prognostik faktördür. Küratif radikal cerrahi rezeksiyon yapılan hastalarda prognoz, rezeksiyon yapılamayan veya rezeksiyonun palyatif olduğu hastalara göre daha iyidir. Cerrahi rezeksiyon uygulanamayan hastalarda beklenen ortalama yaşam süresi 3-11 ay arasında değişmektedir.
2. **Tümörün evresi:** Mide kanserinde prognozu etkileyen önemli bir faktör de tümörün evresidir. Tümörün mide duvarındaki invazyon derinliği arttıkça sağkalım kısalmaktadır. Olasılıkla en güçlü prognostik faktör ise bölgesel lenf nodu metastazının varlığı ve yaygınlığıdır. Metastatik bölgesel lenf nodu sayısı arttıkça sağkalımın kısaldığı görülmektedir. Uzak organ metastazının olması da prognozu kötü yönde etkilemektedir.
3. **Tümörün histopatolojik greydi:** Kötü diferansiye veya anaplastik tümörlerde prognoz daha kötüdür.
4. **Primer tümör lokalizasyonu:** Proksimal yerleşimli tümörlerde prognoz kötüdür.

Bunların dışında hastanın performans statusu, yaşı (genç yaşlarda prognoz kötü), operasyon öncesi hastanın kilo kaybının olması ve uygulanan kemoterapiye alınan yanıt prognozla ilişkili bulunmuştur (1,2,34).

FLOW SİTOMETRİ VE SOLİD TÜMÖRLERDE DNA ANALİZİ

İnsan somatik hücreleri 46 kromozom içerir ve diploid olarak tanımlanır. Kromozom sayısı 46'dan farklı olan hücreler anöploid olarak adlandırılır; 46'dan fazla olanlar hiperdiploid; 46'dan az olanlar hipodiploid olarak tanımlanır. Kromozom içeriğindeki değişiklikleri belirlemenin bir yolu kromozom analizi yapmaktır. Solid tümör dokularında, lösemilerde olduğu gibi kolaylıkla kromozom analizi yapılamaz. Kromozom yapısındaki

değişiklikleri belirlemede kullanılan bir diğer yöntem ise DNA içeriğinin ölçülmesidir. Bu amaçla statik sitometri ve flow (akım) sitometri (FSM) yöntemleri kullanılmaktadır (57).

FSM, süspansiyon halindeki hücrelerin bir sıvı akım aracılığıyla floresan bir ışık kaynağı önünden geçişi esnasında hücrelerin tek tek belirli özelliklerinin ölçülmesi esasına dayanır. Bu yöntemle saniye içinde binlerce hücrenin birden fazla özelliğini incelemek ve alt grupların fiziksel olarak ayrımını yapmak (sorting) mümkündür. FSM hücrenin birçok parametresini ölçmede kullanılabilir. Pratikte en çok, hücre yüzeyi, hücre içi antijenleri ve nükleik asit içeriğinin ölçülmesinde kullanılmaktadır.

FSM'de ölçümün gerçekleşebilmesi için hücrelerin tek hücre süspansiyonu halinde bulunması gereklidir. Periferik kan ve kemik iliği ölçüm için ideal iken, solid dokulardan hücre süspansiyonları hazırlamak için çeşitli enzimler yada çözücüler kullanılmaktadır. FSM ölçümleri için önce taze doku örnekleri kullanılmıştır. Hedley ve ekibi 1983 yılında parafin bloklardaki materyalde de çalışabilecek bir yöntem tanımlamışlardır (58). Bu yöntemde parafin bloklardan elde edilen kesitler öncelikle deparafinize edilir, arkasından alkolden geçirilerek rehidratasyon sağlanır ve sonrasında enzimatik olarak doku ayrıştırılarak çekirdek süspansiyonu elde edilir. Elde edilen süspansiyon istenen parametreye özgü bir yada daha fazla flokrom işaretleyici ile boyanır. Boyamada kullanılan iki teknik vardır:

1. "Feulgen-Schiff tekniği": Asit hidrolizle pürinler DNA'dan uzaklaştırılır ve açığa çıkan deoksiriboz şekerlerinin aldehit grupları aldehit spesifik "Schiff" rejanları ile reaksiyona girerler. Bu rejanlar "pararosanilin" gibi renkli veya "acriflavin" gibi floresan boya olabilir.
2. DNA'ya doğrudan bağlanan floresan boyaların kullanılması: Bu boyalardan 'ethidium bromide' ve 'propidium iodide' çift sarmal nükleik aside bağlanır. Bu nedenle ortamdaki RNA'nın uzaklaştırılması gerekir. Diğer DNA boyaları DAPI (4'6-diaminodio-2-phenyl

indol-dichloride) ve mitramycin RNA ile etkileşmeyip DNA'nın spesifik bölümleri ile reaksiyon verir. Boyanma yoğunluğu hücrenin DNA miktarı ile orantılıdır (56).

Süspansiyonda boyanan hücrelerin laminar sıvı akımının ortasından tek tek geçerken yaydıkları floresan, argon laser veya ksenon-civa ark lambası gibi uyarı kaynağı ile güçlendirilir. Hücreden yayılan floresan bir optik sistem aracılığı ile fotodetektöre (light scatter detector) iletilir. Böylece floresan şiddeti ile orantılı bir elektriksel sinyal oluşur. Fotodetektörlerde elektriksel sinyallere dönüştürülen uyarılar çoğaltılır, dijital değerlere çevrilir ve bir bilgisayar aracılığıyla analiz edilerek ekranda histogram şeklinde gösterilir.

Flow sitometrik ölçümlerde elde edilen veriler değişik formlarda incelenebilir. En sık kullanılan ve en basit yöntem "tek değişkenli veri analizi" (univariate data analysis)'dir. Veriler iki boyutlu bir histogramla gösterilir. Vertikal eksen sıklığı, yatay eksen ise değişkenin miktarını belirtir. Yatay eksenindeki birimler kanal numaraları ile işaretlenmiştir. Histogram, farklı sinyal şiddetlerini temsil eden kanallara dağılan hücre sayısını gösterir. Pek çok durumda histogramların gözle değerlendirilmesi veya diğer histogramlarla karşılaştırılması yorum yapmak için yeterlidir (59).

Diploid olarak değerlendirilen histogramlarda tek bir G0/G1 piki vardır. Bu histogramda görülen ikinci pik, G2/M fazındaki hücelere aittir ve bu hücrelerin DNA içeriği G0/G1 fazındaki hücrelerin DNA içeriğinin iki katıdır. Bu iki hücre grubu arasında yer alan hücreler S fazındaki hücreleri oluşturur. Anöploid olarak değerlendirilen histogramlarda birbirinden tam olarak ayırt edilebilen iki G0/G1 piki vardır. Multiploid histogramlarda ise G0/G1 piklerinin sayısı ikiden fazladır (60)

Histogram dağılımları, "değişkenlik katsayısı [coefficient of variation (CV)]" ile tanımlanır. FSM cihazı kullanım için ilk açıldığında test partikülleri kullanılarak CV minimuma ayarlanır. Böylelikle boyanma ve cihaz ayarının standardizasyonu yapılarak ölçümlerin karşılaştırılması kolaylaştırılır. CV, sağlıklı cihaz ayarı ve ölçüm göstergesidir.

Yüksek CV değerleri, örnekleme ya da cihaz hatasını veya dokunun biyolojik heterojenitesini yansıtır olabilir. Standart bir CV değeri olmayıp birçok çalışmada %10 sınır değer kabul edilirken %5'e kadar düşen ve %15'e kadar yükselen CV'si olan ölçümleri değerlendirilebilir bulan çalışmalar vardır (61).

İki parametrelili FSM ölçümlerde iki değişkenli veri analizi (bivariate data analysis) yöntemleri kullanılır. Çok değişkenli analizlerde (multivariate data analysis), hücrenin ikiden fazla özelliğini aynı anda değerlendirmek olasıdır. Ancak bu tip değerlendirmelerde bazı teknik sınırlamalar söz konusudur. Bugün için en uygun yöntem, belli bir özelliğe sahip hücre grubunun heterojen grup içinden ayırt edilerek sadece alt gruptaki hücrelerin özelliklerinin ölçülmesidir.

DNA analizi, kromozom analizi ile iyi bir korelasyon göstermekle birlikte hücresel DNA içeriği, kromozom sayısındaki küçük değişiklikleri ayırt etmede yetersizdir (60). Bu nedenle de DNA analizinde ki diploid hücreler, esasında 46 ± 2 kromozom içeren hücreleri kapsamaktadır.

Neoplastik hastalıklarda DNA analizinden tanı ve prognoz belirlemede yararlanılabilir. Anöploidi sıklıkla malign hücrelerde görülmekle birlikte bazı benign durumlarda da tanımlanmıştır. Bu nedenle malinite tanısında histopatoloji esastır. Özellikle çocukluk çağı lösemilerinde ploidi bağımsız bir prognostik faktördür. Hipodiploid ve haploid olan lösemilerde prognoz kötüdür (62). Pek çok tümörde DNA'nın prognostik önemi çalışılmıştır. Mesane, prostat, over ve endometriyum kanserlerinde anöploidi kötü prognoz işaretidir. Melanom, meme kanseri, kolorektal kanser, sarkomlar, renal hücreli kanser, germ hücreli tümör, beyin tümörleri ve akciğer kanserinde ise olası bir kötü prognostik faktördür (63,64). Hodgkin dışı lenfomalarda anöploidinin yüksek greyd ile ilişkili olduğuna işaret eden çalışmalar ve aksini iddia eden karşıt çalışmalar da vardır (65). Samur ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, yumuşak doku sarkomlarında ploidin histolojik greyd ile ilişkili

olduğu gösterilmiş ve sadece cerrahi olarak tedavi edilen hastalarda DNA plooidinin sağkalım ve metastazsız sağkalımı belirlemede önemli bir prognostik faktör olduğu saptanmıştır (66).

SOLID TÜMÖRLER VE P53

Tümör süpresör genlerin, delesyon veya mutasyonlarla inaktivasyonu solid doku tümörlerinde sık karşılaşılan genetik değişikliklerdir. İnsan kanserlerinde p53 mutasyonu en sık karşılaşılan genetik anomalidir. P53 proteini, DNA bağlayıcı veya transkripsiyonel faktör olarak etki gösterip hücrelerin s-fazına girmesini kontrol eden genleri etkileyebilmektedir. P53, aynı zamanda programlı hücre ölümü olan apoptozis ve terminal diferansiyasyonda da önemli bir rol oynamaktadır. *APC* ve p53 anomalileri mide kanserlerinin %40-60'ında gözlenmektedir. P53 gen mutasyonları mide kanserinin tüm histolojik gruplarında değişen oranlarda görülebilmektedir. P53 mutasyon sıklığı, metaplaziden adenoma gidildikçe veya displazi derecesi arttıkça veya displaziden karsinoma gidildikçe artmaktadır. Transformasyon sürecinde p53 mutasyonunun zamanı ve rolü halen tartışmalıdır. Yine mide kanseri ve diğer solid tümörlerde p53 mutasyonunun klinik önemi tartışmalı olarak kalmaktadır (1, 2, 15-24, 52, 67-74).

HASTALAR VE YÖNTEMLER

Ankara Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Onkoloji Bilim Dalı'na 1989-1999 yılları arasında opere mide kanseri tanısıyla başvuran, adjuvan kemoterapi alan ve takibi olan hastalar tespit edildi. Hastalara ait demografik veriler ve klinikopatolojik özellikler hasta kayıt dosyaları incelenerek belirlendi. Sağkalım için hastalar telefon ile arandı veya adrese ulaşılarak bilgi edinildi. Operasyon materyaline ait hematoksilen-eozin boyalı preparatlar ve parafin blokları tespit edildi. Ankara Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Patoloji Ana Bilim Dalı dışında patolojik incelemesi yapılan hastaların preparatları ve parafin blokları ilgili merkezlerle irtibata geçilerek temin edildi. Takibi olan, patoloji preparat ve parafin blokları bulunabilen 41 hasta tespit edildi. Hematoksilen-eozin boyalı preparatlar tek bir patolog tarafından incelenerek, p53, FSM çalışması için uygun tümörlü bloklar ayrıldı. Bu hastalardan otuz beşi değerlendirme için uygun bulundu.

Flow sitometrik inceleme

Flow sitometrik DNA analizi, Hedley ve ekibinin tariflediği yöntem modifiye edilerek yapıldı (58). Olgulara ait hematoksilen-eozin boyalı preparatlar, hastaların kliniği hakkında bilgisi olmayan tek bir patolog tarafından incelenerek tümör içeren parafin bloklar seçildi. En az %20 tümör hücresi içeren parafin bloklardan 50µm'lik 5-6 adet kesit alındı ve 15 mililitrelik tüplerde aşağıda tariflendiği şekilde hücre (çekirdek) süspansiyonları hazırlandı.

Deparafinizasyon ve rehidratasyon işlemi

1. Her bir tüpe 10 mL xylene eklenerek oda sıcaklığında 10 dakika bekletilip xylene aspire edildi. Bu işlem iki defa tekrarlandı.
2. Tüplerin her birine %100 konsantre etanolden 10 mL ilave edilerek oda sıcaklığında 10 dakika tutuldu. Etanol aspire edilerek %100, %95, %70 ve %50'lik etanol solüsyonları ile aynı işlem tekrarlandı.

3. Etanol aspire edildikten sonra tüplere distile su konularak oda sıcaklığında bir gece enkübe edildi.

Hücre süspansiyonu hazırlama

1. Tüpler santrifüj edilerek doku parçaları çöktürüldükten sonra distile su aspire edildi.
2. Tüplere 10 mL "phosphate-buffered saline" (PBS) eklenerek 1200 rpm'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra aynı işlem tekrarlandı.
3. Doku makası kullanılarak doku parçacıkları mekanik olarak parçalara bölündü.
4. Tüplere 1 mg/mL konsantrasyonda proteaz (Sigma Tip XXIV) solüsyonundan 1 mL eklendi. Elde edilen karışım 37°C'de 30-60 dakika enkübe edildi. Enkübasyon sırasında tüpler her 5 dakikada bir elde çalkalanarak hücrelerin dokudan ayrılması sağlandı.
5. Her bir tüpe 2 mL soğuk PBS eklendi ve 37 µm filtreden süzülerek tek hücre süspansiyonu hazırlandı.
6. Tüpler 1200 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek üstte kalan sıvı aspire edildi.
7. Tüplere tekrar 2 mL PBS eklenerek birinci aşamadaki santrifüj ve aspirasyon işlemi yenilendi.
8. Tüplere 1 mL "tripsin buffer" eklenerek "Thoma" lamında hücre (çekirdek) sayımı yapılarak $5 \times 10^5 - 1 \times 10^6$ hücre olacak şekilde hücre sayısı ayarlandı.

DNA Boyaması

1. Tüpler 1200 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek üstte kalan sıvı kısmı aspire edildi.
2. DNA boyama işleminde "CycleTEST PLUS, Becton Dickinson" ticari kiti kullanıldı. Tüplerin dibindeki hücrelerin üzerine 250 µl "trypsin buffer" (A çözeltisi) eklenerek 10 dakika enkübe edildi.
3. A çözeltisini atmadan üzerine 200 µl tripsin inhibitör+ribonükleaz (B çözeltisi) eklenerek 10 dakika enkübe edildi.

4. B çözeltilisini atmadan üzerine 200 µl propidyum iyodür + spermin tetrahidroklorür (C çözeltilisi) eklendi ve buz dolabında 10 dakika bekletildi.
5. Enkübyondan sonra karışım 37 µm filtreden süzüldü ve ardından flow sitometrik analiz yapıldı.

Flow sitometrik analiz

Hücre DNA içeriği ile orantılı kırmızı nükleer floresans "Becton Dickinson FACSort" marka flow sitometri cihazı ile ölçüldü. Örnek analizinden önce floresans referans boncuklar (2 µm) ile cihaz kalibre edildi. Propidyum iyodür floresans 488 nm'de argon laser ile uyarıldı. Herbir örnekten en az 10-15 bin çekirdek sayıldı.

DNA histogramlarının yorumlanması

Histogramların yorumlanmasında CV değeri dikkate alındı. CV'si 5'den küçük olan ve tek bir G0,1 piki içeren histogramlar diploid olarak yorumlandı. CV'si 10'dan büyük histogramlar değerlendirme dışı bırakıldı.

Anöploid histogramlarda ikinci pikin toplam sayımın en az %10'unu içermesine diploid pikten net olarak ayırd edilmesine ve anöploid G0,1 pikine karşılık gelen G2-M piki bulunmasına dikkat edildi.

Ploidi değerlendirilmesinde DNA indeksi (DI) kullanıldı. DNA indeksi aşağıdaki formülle hesaplandı:

Anöploid G0,1 pikinin kanal numarası

DI= _____

Diploid G0,1 pikinin kanal numarası

DI=1.00±%10 olduğunda histogram diploid olarak değerlendirildi. Anöploid histogramlarda birinci pik diploid pik olarak kabul edildi. Histogramda birden fazla anöploid pik bulunması

durumunda multiploidi şeklinde yorumlandı. Anöploid piklerin diğer alt grupları aşağıdaki değerlerine göre tanımlandı.

DI=1.1-2.0 ise hiperdiploid,

DI=2.0 ise tetraploid,

DI>2.0 ise hipertetraploid.

Tetraploid histogramlarda DI'nin 2.0 olmasının yanısıra anöploid pikteki hücre oranının toplamın en az %20'si olmasına da dikkat edildi (59).

Hücre siklus istatistikleri

Histogramların hücre siklusuna ilişkin istatistikleri "MODFIT" yazılım programı kullanılarak hesaplandı. CV'si 8'in üzerinde olan piklerde güvenilir olmayacağı için s-faz fraksiyonları hesaplanmadı (60).

İMMÜNHİSTOKİMYASAL İNCELEME

Hematoksilen-eozin boyalı preparatlar tek bir patolog tarafından değerlendirilip tümör dokusu içeren parafin bloklar immünhistokimyasal inceleme için seçildi. Bloklardan 5 µm'lik kesitler alınarak, her blok için 2 lam ve her lamda da 2 kesit olacak şekilde preparatlar hazırlandı. Kontrol p53 preparatı olarak, p53 pozitif bir meme kanseri kesiti hazırlandı. Preparatlarda deparafinizasyon-rehidratasyon ve dokunun antijenik özelliğini ortaya çıkarma işleminden sonra, "Streptavidin Biotin Peroksidaz" yöntemi kullanılarak immünhistokimyasal boyama işlemi yapıldı.

Preparatların deparafinizasyon ve rehidratasyon işlemi:

1. Kesitler akşam 37 °C'lik etüve konuldu.
2. Kesitler sabah 70 °C'lik etüvde 45 dakika bekletildi.
3. Kesitler 5 dakika süre ile birinci ksilende bekletildi.

4. Kesitler 5 dakika süre ile ikinci ksilende bekletildi.
5. Kesitler 5 dakika süre ile havada kurutuldu.
6. Kesitler 5 dakika süre ile birinci alkolde (absolü etanol) bekletildi.
7. Kesitler 5 dakika süre ile ikinci alkolde bekletildi.
8. Kesitler 5 dakika ile distile suda bekletildi.

Dokunun antijenik özelliğinin ortaya çıkarılması

Bu işlem için ısının indüklediği antijen açığa çıkarma işlemi kullanıldı. İşlemde şu basamaklar takip edildi:

1. Preparatlar 500 mL 0.01 M “sitrat buffer” içine daldırıldı ve mikrodalga fırın içinde, 700 watta 5 dakika süreyle kaynatıldı.
2. Kaynatma işlemi 1'er dakika aralarla 4 defa tekrarlandı (toplam 20 dakika).
3. Preparatlar mikrodalga fırından çıkarılıp oda sıcaklığında 10-20 dakika süreyle soğumaya bırakıldı.
4. Soğutma işleminden sonra lam üzerinde ki kesitlerin olduğu alanlar işaretlendi.
5. Preparatlar distile suda 5 dakika tutularak yıkanması sağlandı.

İmmünohistokimyasal boyama (Streptavidin Biotin Peroksidaz yöntemi)

İmmünohistokimyasal boyama için, kullanıma hazır “Mouse anti-p53 (PAB 1801), ready-to-use” monoklonal antikoru kullanıldı (Zymed Laboratories, San Francisco, USA). Bu antikor hem wild hem de mutant tip p53'ün 32-79 amino asit epitopları arasında yer alan ısıya dayanıklı epitopu tanımaktadır. İmmünohistokimya yöntemi olarak “Streptavidin Biotin Peroksidaz” yöntemi kullanıldı. İmmünohistokimyasal boyama işleminde aşağıdaki basamaklar uygulandı:

1. Kesitler “ 10 mM phosphate-buffer solution, pH:7.5 ” (PBS) solüsyonunda 5 dakika süre ile bekletildi.
2. Kesitler üzerine %30'luk H₂O₂ damlatılarak 5 dakika enkübe edildi.

3. "Tripsinizasyon" işlemi 7 dakika uygulandı.
4. Kesitler PBS ile yıkandıktan sonra 5 dakika PBS solüsyonunda bekletildi ve kesitlerin çevresi yeniden kurulandı.
5. 15 dakika süre ile protein blok uygulandı (Zymed 2.generation Lab-sa detection system, Reagent A, ready-to-use).
6. Kullanıma hazır primer antikor (Zymed-Mouse, Anti-p53 PAB 1801, ready-to-use) uygulanıp 30 dakika inkübasyon sağlandı.
7. Preparatlar yeniden PBS ile yıkandı ve 10 dakika PBS solüsyonunda bekletildi.
8. Kullanıma hazır "sekonder antikor" (Zymed 2.generation Lab-sa detection system, biotinylated second antibody, ready-to-use, Reagent B) uygulanıp oda ısısında 15 dakika enkübe edildi.
9. PBS ile yıkanan kesitler PBS solüsyonunda 5 dakika tutuldu.
10. Kesitler 15 dakika süre ile, kullanıma hazır "enzim bağlayıcı solüsyon"da (Zymed 2.generation Lab-sa detection system, streptavidin-peroxidase-enzyme conjugate-, ready-to-use, Reagent C) enkübe edildi.
11. PBS ile yıkanan kesitler PBS solüsyonunda 5 dakika bekletildi.
12. Antikor almış dokuları renlendirmek için, substrat olarak hazırlanan ACE kromojen solüsyonu [5 mL distile su + 1 damla H₂O₂ + 1 damla ACE konsantre (3-amino 9-eti karbazol) + 1 damla Sodyum Asetat Buffer] ile 20 dakika enkübe edildi.
13. PBS ile yıkanan kesitler PBS solüsyonunda 5 dakika tutuldu.
14. Kesitler Mayer's hematoksilende 2 dakika tutuldu.
15. Musluk suyu altında 2-3 dakika yıkandı "Mounting Medium" ile kapatıldı.

P53 immünreaktivitesinin değerlendirilmesi

İmmünreaktivitenin değerlendirilmesinde öncelikle kontrol preparatları incelendi. Yöntemin çalıştığından emin olunduktan sonra çalışma preparatlarının incelemesi yapıldı.

1. Her bir preparat detaylı olarak incelenerek spesifik p53 nükleer boyanması araştırıldı. Sitoplazmik boyanmalar değerlendirmeye alınmadı.
2. P53 immünreaktivitesi, immünreaktivite şiddeti (pozitif boyanma gösteren hücrelerin boyanma şiddeti, zayıf: 1+, orta: 2+, şiddetli: 3+) ve büyük büyütmede (x40) tümör alanlarında pozitif boyanan tümör hücre %'si belirlenerek pozitif veya negatif olarak değerlendirildi. En az 2 pozitif immünreaktivite şiddeti ve %5 yaygınlık, pozitif olarak değerlendirildi.

İSTATİSTİK ANALİZ

İstatistik analiz, SPSS for Windows 8.0 paket istatistik programı kullanılarak yapıldı. Non-parametrik testlerin değerlendirilmesi için X^2 , sağkalım analizleri için Kaplan-Meier testi kullanıldı. Tek değişkenli analizlerde log-rank testi, çok değişkenli analiz için cox-regresyon testi kullanıldı. $P \leq 0.05$ değeri istatistiki olarak anlamlı kabul edildi.

SONUÇLAR

Çalışma sonunda 35 hasta değerlendirilebilir bulundu. Bir hastada s-faz fraksiyonu değerlendirilemedi. Hastalarda elde edilen DNA histogram (diploid, anöploid, multiploid) örnekleri Şekil 1-3'de gösterilmiştir. P53 immünohistokimyasal incelemelerine ait pozitif veya negatif boyanma örnekleri Şekil 11-14'de verilmiştir. Hastaların klinik ve patolojik özellikleri Tablo 2'de özetlenmiştir. Hastaların hepsinde performans status (ECOG) 0-1'dir.

Erkek/kadın oranınının 21/14 (% 60/40) ve medyan yaşın 54 (31-71) olduğu saptandı. Medyan takip süresi 21 ay (3-107), medyan sağkalım 27 ay (%95 GA:18.14 -35.86) ve medyan hastalıksız sağkalım 20 ay (%95 GA:9.21-30.79) bulundu. İki yılda total sağkalım oranınının %57.39, hastalıksız sağkalım oranınının da %47.68 olduğu belirlendi (Şekil 4,5). DNA hastaların %68.4'ünde diploid, %31.6'sında anöploid (anöploid ve multiploid) bulundu. S-faz fraksiyonu 8 hastada (%22.9) %10 ve daha fazla iken 26 hastada (%77.1) %10'un altındaydı. P53 15 hastada (%42.9) pozitif, 20 hastada (%57.1) negatif olarak saptandı (Tablo 2).

Yaş, cinsiyet, evre, performans status, diferansiyasyon derecesi, hastalık bölgesi, bölgesel lenf nodlarında metastaz varlığı, metastatik lenf nodu sayısı, hastalık nüks bölgesi ile DNA ploidi, s-faz fraksiyonu ve p53 arasındaki ilişki incelendiğinde, sadece s-faz fraksiyonu ile cinsiyet arasında anlamlı bir ilişki saptandı. Kadınların 7'sinde s-faz fraksiyonu %10'dan fazla bulunurken erkeklerin ancak birinde s-faz fraksiyonunun %10'dan fazla olduğu saptandı ($p=0.004$) (Tablo 5). Diğer parametreler arasında bir ilişki gösterilemedi ($p>0.05$) (Tablo 5).

Sağkalım (SK) ve hastalıksız sağkalım (HSK) açısından tek değişkenli analiz yapıldığında, metastatik lenf nod sayısı, hastanın aldığı kemoterapi kür sayısı ile hastalıksız sağkalım ve sağkalım arasında anlamlı bir ilişki olduğu görüldü. Yani metastatik lenf nodu sayısı arttıkça ve hastaların aldığı kemoterapi kür sayısı 4'den az olunca sağkalım ve hastalıksız sağkalımın anlamlı olarak kısaldığı saptandı. Metastatik lenf nodu sayısı 10 ve daha fazla olan hastalarda hastalıksız sağkalım 9 ay (%95 GA: 2.53 - 15.47) iken metastatik

lenf nodu sayısı 1-9 arasında olan hastalarda 42 ay idi ($p=0.0019$) (Tablo 3) (Şekil 6). Metastatik lenf nodu sayısının aynı şekilde sağkalımında önemli olarak etkilediği belirlendi. Lenf nodu sayısı 10 ve daha fazla olan hastalarda sağkalım 12 ay (%95 GA: 7.83 – 16.17) iken lenf nod sayısı 1-9 arasında olan hasta grubunda 45 ay olduğu görüldü ($p=0.0016$) (Tablo 3) (Şekil 7).

Uygulanan kemoterapi kür sayısının da sağkalım ve hastaliksız sağkalımı etkileyen bir faktör olduğu bulundu. Dört kür ve daha fazla kemoterapi alan hastalarda hastaliksız sağkalım 33 ay (%95 GA: 5.59 – 60.41) iken 4 kürden daha az kemoterapi alanlarda 7 ay (%95 GA: 3.90 - 10.10) olduğu saptandı ($p= 0.011$) (Tablo 3) (Şekil 8). Aynı şekilde dört kürden fazla kemoterapi alan hastalarda sağkalım 29 ay (%95 GA: 16.62 – 41.38) bulunurken dört kürden az tedavi alanlarda ise 10 ay (%95 GA: 8.48 – 11.52) olduğu görüldü ($p=0.0043$)(Tablo 3) (Şekil 9).

Diğer taraftan orta-iyi diferansiye, diploid, düşük s-faz fraksiyonu olan, 55 yaşının altında olan, kardiya yerleşimli tümörü olan ve hastalık evresi II olan hastalarda hastaliksız sağkalım ve sağkalımın daha iyi olmasına rağmen istatistik açıdan anlamlı fark saptanmadı ($p> 0.05$) (Tablo 3).

P53 pozitifliğinin sağkalımı anlamlı olarak kötü yönde etkilediği ve hastaliksız sağkalımı istatistiki açıdan anlamlı olmasa da kısalttığı belirlendi (Tablo 3). P53 negatif hastalarda sağkalım 36 ay (%95 GA: 17.8 – 54.8) bulunurken pozitif hastalarda 12 ay (%95 GA: 3.20 – 20.80) bulunmuştur ($p=0.0511$) (Tablo 3) (Şekil 10). P53 pozitifliği ile diğer parametreler arasında ilişki saptanmadı ($p > 0.05$) (Tablo 5).

Çok değişkenli analiz yapıldığında sağkalım için hastanın aldığı kemoterapi kür sayısı, metastatik lenf nodu sayısı, evre ve p53 immünreaktivitesinin bağımsız prognostik faktörler olduğu bulundu. Diğer taraftan, hastaliksız sağkalım için kemoterapi kür sayısı ve metastatik lenf nodu sayısının bağımsız prognostik faktörler olduğu belirlendi ($p < 0.05$) (Tablo 4).

Tablo 2. Hastaların klinik ve patolojik özellikleri.

Parametreler	Sayı (%)
Yaş (medyan)(dağılım)	54 (31-71)
Cinsiyet (Kadın/Erkek)	14/21 (40/60)
Evre	
Evre II	11(31.4)
Evre III	24 (68.6)
Tümör lokalizasyonu	
Antrum	16 (45.7)
Kardiya	5 (14.3)
Korpus	14 (40)
Kür sayısı (medyan)(dağılım)	5 (2-7)
≥ 4	24 (68.6)
2-3	11(31.4)
Bölgesel lenf nodu	
Metastatik	23 (65.7)
Non-metastatik	12 (34.3)
Metastatik lenf nod sayısı	
1-6 (N1)	12 (52.2)
7-15 (N2)	4 (17.4)
>15 (N3)	7 (30.4)
Seroza tutulumu	
Pozitif	31(88.6)
Negatif	4 (11.4)
Histopatoloji	
Adenokarsinom	21 (61)
Müsinöz adenokarsinom	8 (22.8)
Papiller adenokarsinom	3 (8.6)
Taşlı yüzük hücreli karsinom	3 (8.6)
Diferansiyasyon	
Az diferansiye	16 (45.6)
Orta-iyi diferansiye	19 (54.4)
Nüks durumu	21(%60)
Lokal veya periton nüksü	15 (76.1)
Uzak metastaz	6 (23.9)
DNA analizi	
Diploid	24 (68.6)
Anöplöid (Anöplöid+Multiplöid)	11 (31.4)
P53	
Pozitif	15 (42.9)
Negatif	20 (57.1)
S-faz fraksiyonu	
≥ %10	8 (22.9)
< % 10	26 (77.1)
CV(medyan)(dağılım)	5.40 (3-8.5)

Tablo 3. Hastaların klinik ve laboratuvar özelliklerine göre takip sonuçları.

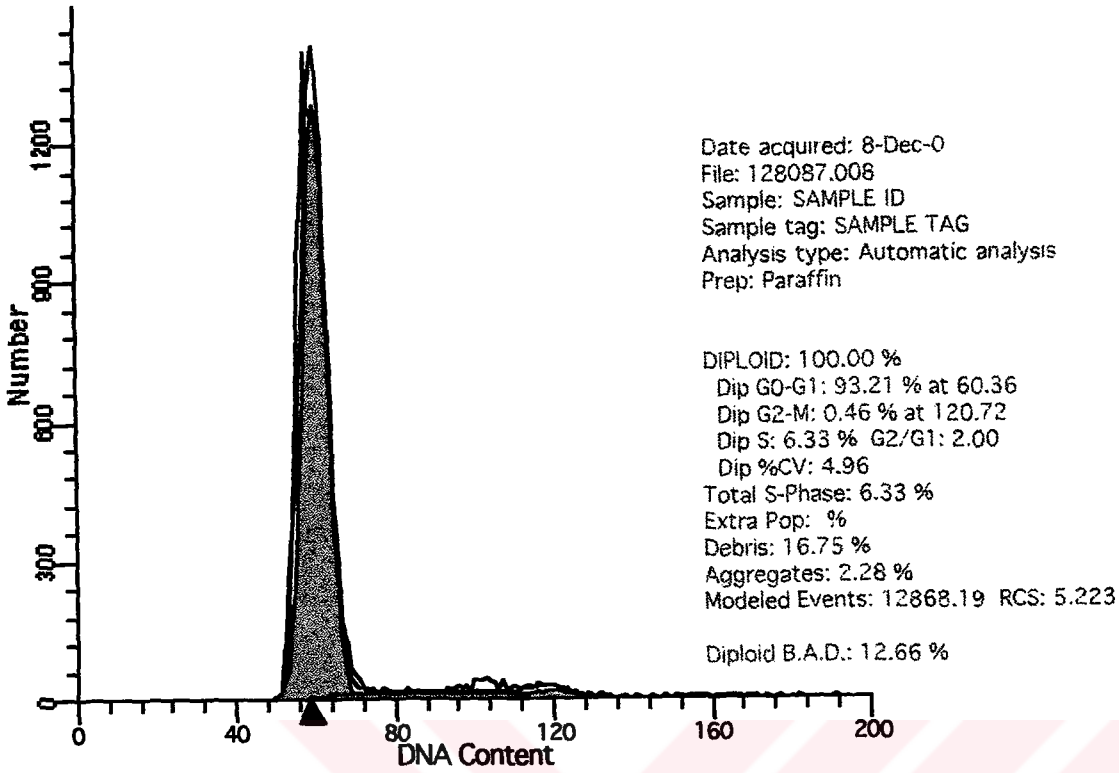
Parametre	HSK- medyan, ay (%95 GA)	p	SK- medyan, ay (%95 GA)	p
Yaş ≥ 55 < 55	18 (8.97-27.03) 42 (7.37-76.63)	0.315	27 (15.56-38.449) 45 (8.94-81.06)	0.350
Cinsiyet Kadın Erkek	20 (0.0-38.17) 19 (6.25-33.75)	0.673	28 (8.43-47.57) 24 (0.0-50.40)	0.667
Evre II III	33 15 (3.63-26.37)	0.176	36 21 (2.81-39.19)	0.169
PS 0 1	20 (9.54-30.46) 19 (0.00-43.15)	0.642	27 (18.25-35.75) 28 (11.74-44.26)	0.678
Kemoterapi kür sayısı ≥ 4 2- 3	33 (5.59-60.41) 7(3.90-10.10)	0.011	29 (16.62-41.38) 10 (8.48-11.52)	0.004
Primer tümör lokalizasyonu Antrum Korpus Kardiya	19 (0.00-45.12) 18 (11.90-24.10) 40 (34.47-46.20)	0.112	21 (0.00-45.99) 24 (18.07-29.93) 41 (37.07-45.60)	0.261
Bölgesel lenf nodu Metastatik Non-metastatik	19 (4.91-33.09) 33 (13.94-52.06)	0.364	27 (8.49-45.51) 36 (16.30-55.7)	0.321
Metastatik lenf nodu sayısı 1-6 (N1) 7-15 (N2) >15 (N3)	42 (0.42-83.58) 9 (0.00-23.7) 8 (0.00-18.26)	0.033	45 (20.88-69.12) 11 (0.00-23.74) 12 (6.14-17.86)	0.040
Metastatik lenf nodu sayısı ≥ 10 1-9	9 (2.53-15.47) 42	0.001	12 (7.83-16.17) 45	0.001
Seroza tutulumu Pozitif Negatif	33 (5.84-60.16) 7 (0.0-17.45)	0.134	29 (13.37-44.63) 10 (0.0-22.41)	0.127
Diferansiyasyon Az diferansiye Orta-iyi diferansiye	15 (2.34-20.66) 65.3+	0.076	24 (3.04-44.96) 66.2+	0.096
DNA Diploid Anöploid (Anaploid+Multiploid)	27(12.39-41.61) 18(7.10-28.90)	0.788	29(18.46-39.54) 24(16.38-31.62)	0.831
P53 Pozitif Negatif	9 (6.56-11.44) 33 (7.22-58.78)	0.082	12 (3.20-20.80) 36 (17.80-54.20)	0.051
S-faz fraksiyonu ≥ %10 < % 10	19 (0.0-43.70) 20 (17.88-22.12)	0.700	27 (20.65-33.35) 28 (11.31-44.69)	0.596

HSK: Hastalısız sağkalım, SK: Sağkalım, GA:Güven aralığı.

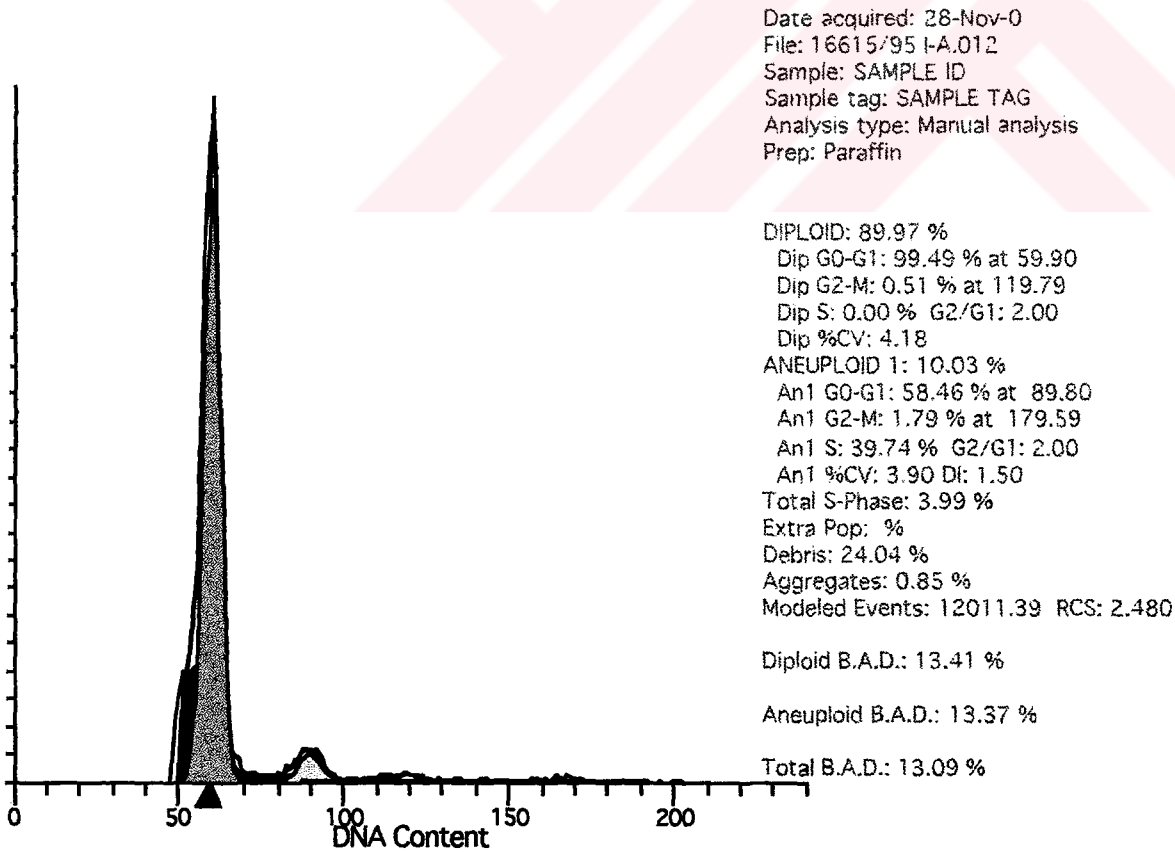
Tablo 4. Cox-regresyon analizine göre bağımsız prognostik faktörler

Parametre	P
Genel sağkalım	
Kemoterapi kür sayısı	0.0036
Metastatik lenf nodu sayısı	0.0016
P53	0.0071
Evre	0.0427
Hastaliksız sağkalım	
Kemoterapi kür sayısı	0.0196
Metastatik lenf nodu sayısı	0.0068

A.U.TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ ONKOLOJİ BİLİM DALI
ARAŞTIRMA LABORATUVARI

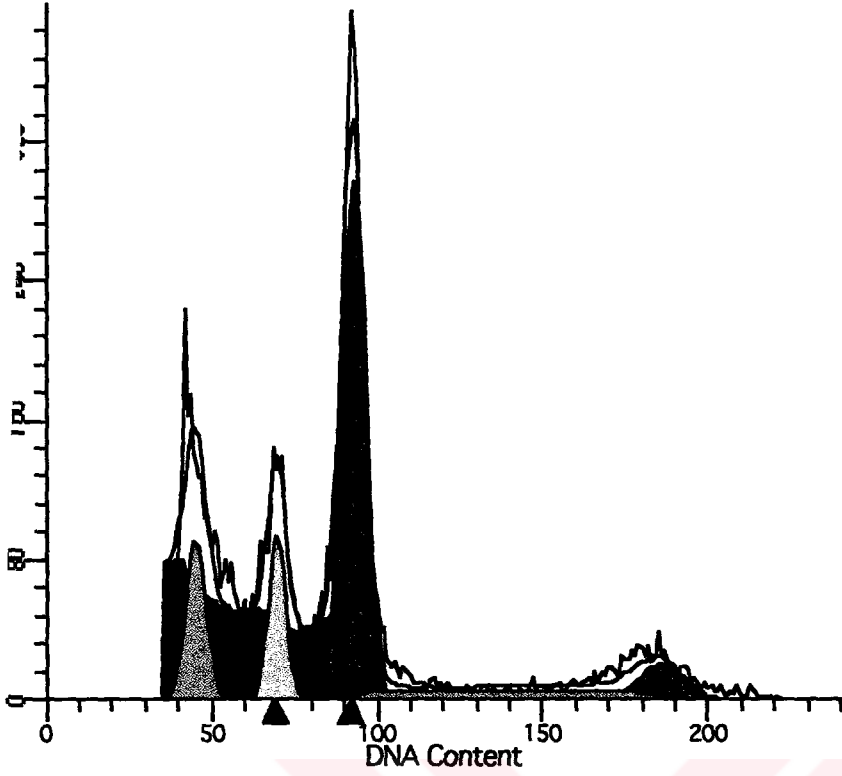


Şekil 1. FSM ile elde edilen diploid DNA histogram örneği.



Şekil 2. FSM ile elde edilen anöplid DNA histogram örneği.

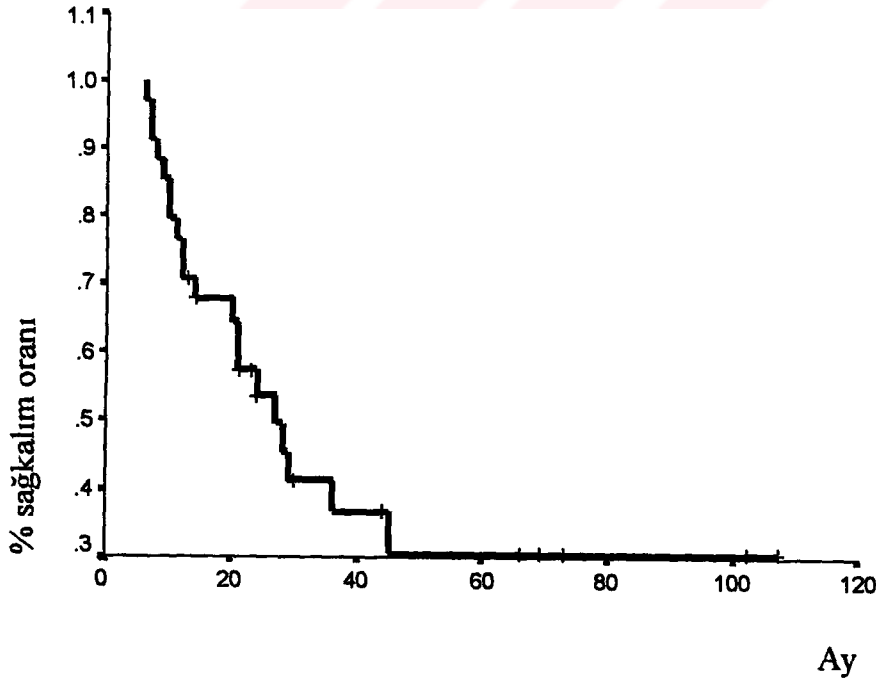
Date acquired: 8-Dec-0
File: 6153.010
Sample: SAMPLE ID
Sample tag: SAMPLE TAG
Analysis type: Manual analysis
Prep: Paraffin



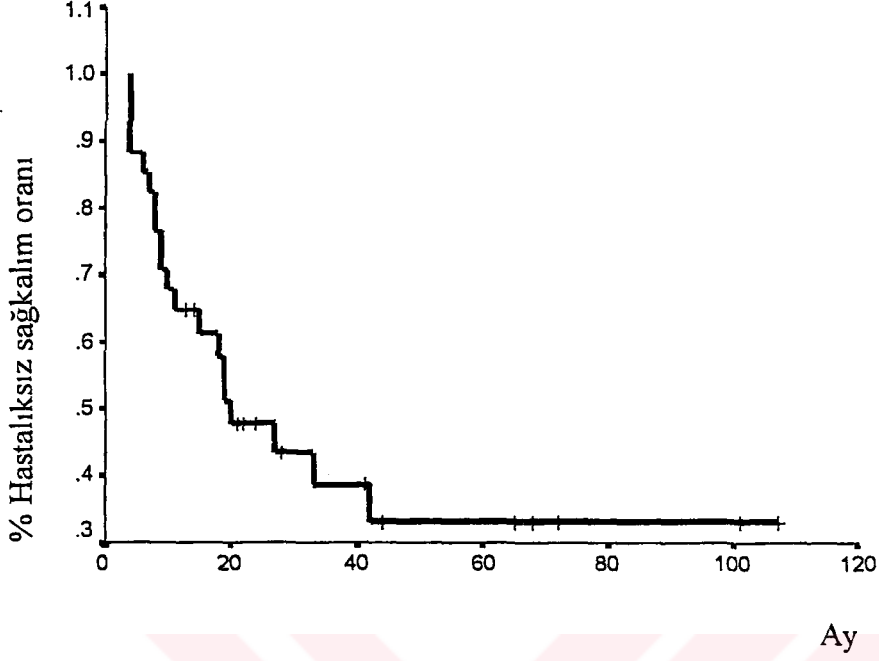
DIPLOID: 14.99 %
Dip G0-G1: 100.00 % at 45.30
Dip G2-M: 0.00 % at 90.60
Dip S: 0.00 % G2/G1: 2.00
Dip %CV: 6.65
ANEUPLOID 1: 13.00 %
An1 G0-G1: 100.00 % at 69.79
An1 G2-M: 0.00 % at 139.58
An1 S: 0.00 % G2/G1: 2.00
An1 %CV: 3.63 DI: 1.54
ANEUPLOID 2: 72.01 %
An2 G0-G1: 76.79 % at 93.00
An2 G2-M: 10.46 % at 186.01
An2 S: 12.75 % G2/G1: 2.00
An2 %CV: 3.66 DI: 2.05
Total S-Phase: 9.18 %
Extra Pop: %
Debris: 42.88 %
Aggregates: 0.21 %
Modeled Events: 8090.02 RCS: 2.254
Diploid B.A.D.: 57.86 %
Aneuploid1 B.A.D.: 27.84 %
Aneuploid2 B.A.D.: 13.70 %
Total B.A.D.: 37.58 %

Şekil 3. FSM ile elde edilen multiploid DNA histogram örneği.

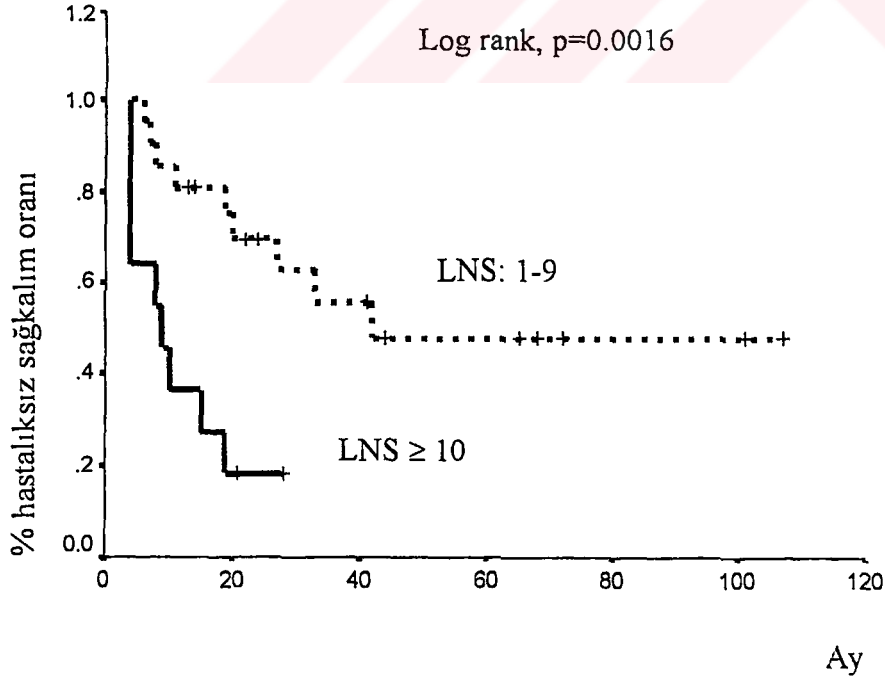
Şekil 4. Tüm hastalarda sağkalım



Şekil 5. Tüm hastalarda hastalıksız sağkalım



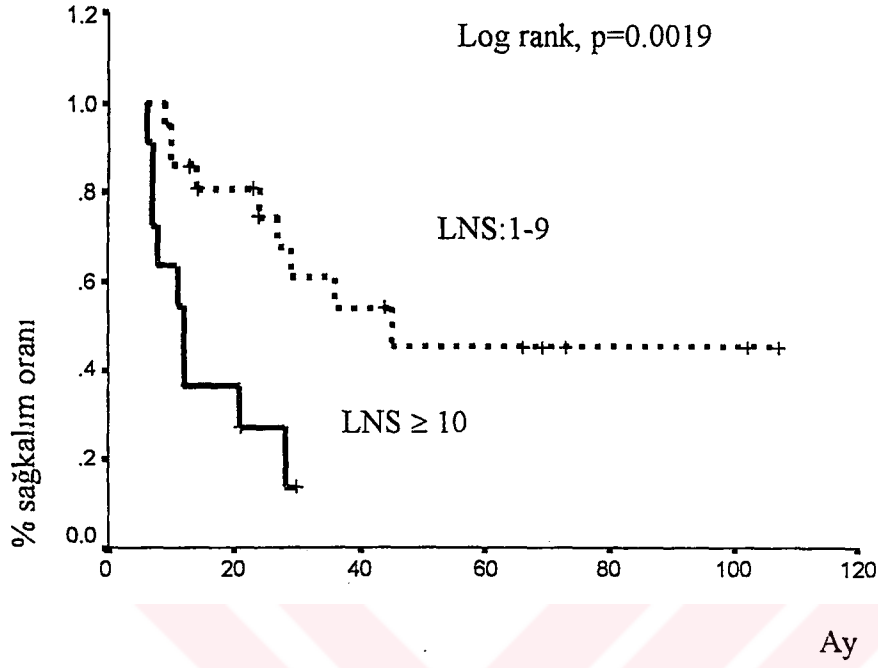
Şekil 6. Metastatik lenf nodu sayısına göre HSK



Tablo 5. Parametreler arasındaki ilişki

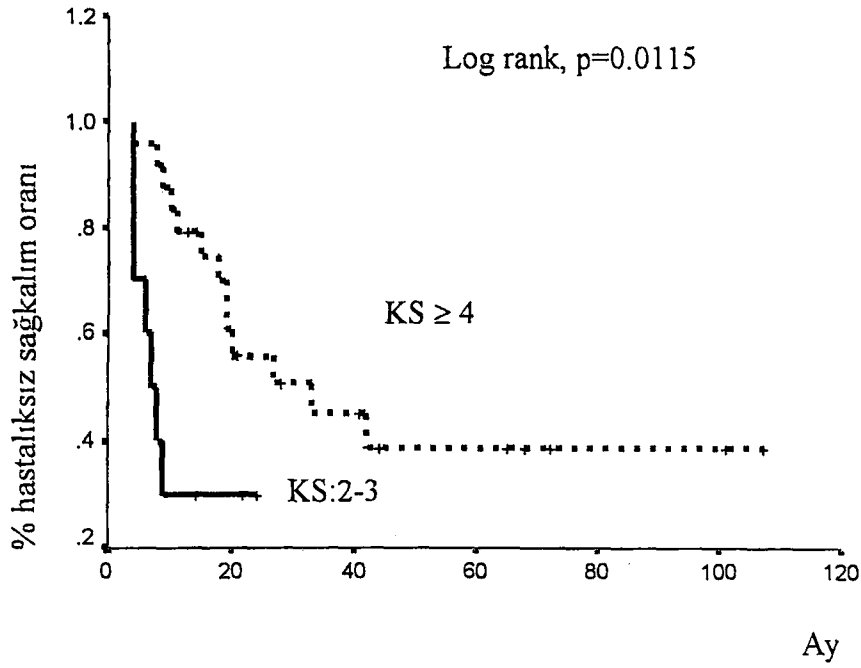
Parametre	DNA ploidi		P	S-Faz fraksiyonu		P	P53		P
	Diploid	Anöplöid		≥ %10	<%10		Pozitif	Negatif	
Yaş	≥ 55	6	0.454	3	13	0.417	8	9	0.442
	< 55	5		5	13		7	11	
Cinsiyet	Kadın	6	0.467	7	7	0.004	8	6	0.148
	Erkek	5		1	19		7	14	
Evre	II	3	0.521	3	8	0.519	5	6	0.560
	III	8		5	18		10	14	
Tümör lokalizasyonu	Antrum	8		4	12		6	10	
	Korpus	12	0.092	3	10	0.937	8	6	0.298
	Kardiya	4		1	4		1	4	
	Nüks bölgesi	8	0.366	5	9	0.172	6	8	0.444
Lokal ve periton Uzak metastaz		4		2	5		3	4	
		14	0.165	4	18	0.279	9	14	0.397
Bölgesel lenf nodu Metastatik Non-metastatik		10		4	8		6	6	
		7		2			3		
Metastatik lenf nodu sayısı	1-6 (N1)	5		2	10		3	9	
	7-15 (N2)	3	0.135	0	4	0.400	1	3	0.110
	> 15 (N3)	1		2	4		5	2	
Seroza tutulumu		9	0.550	6	24	0.367	14	17	0.351
		2		2	2		1	3	
Diferansiyasyon		6	0.451	5	11	0.343	7	9	0.580
		7		3	15		8	11	
DNA	Diploid			4	19	0.213	12	12	0.187
	Anöplöid (Anaploid+Multiplöid)			4	7		3	8	
P53	Pozitif	3	0.187	4	10	0.428	4	10	
	Negatif	8		4	16		4	16	
S-faz fraksiyonu	≥ %10	4	0.213	4			4	4	0.428
	< % 10	7					10	16	

Şekil 7. Metastatik lenf nodu sayısına göre sağkalım

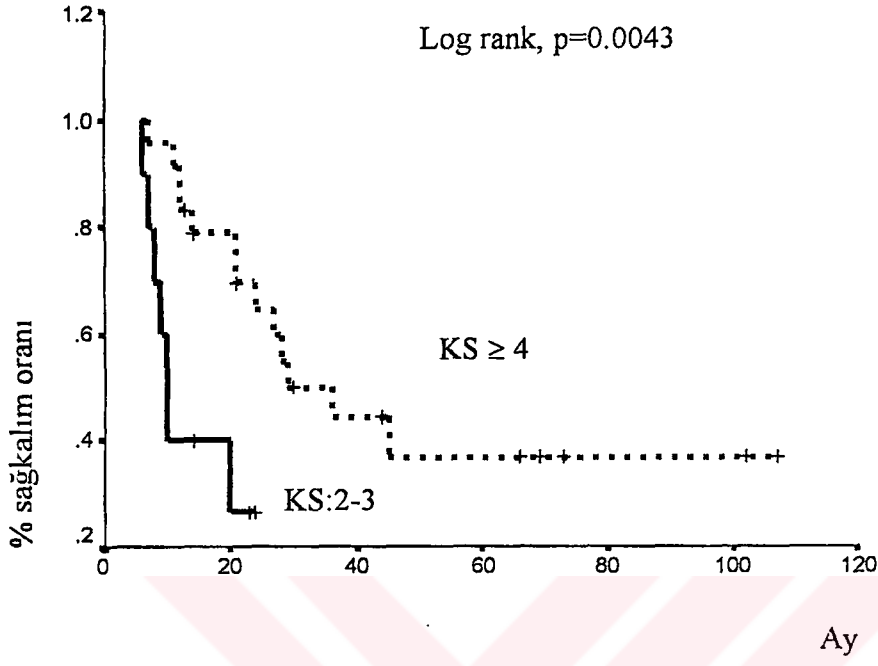


LNS: Metastatik lenf nodu sayısı

Şekil 8. Kemoterapi kür sayısına göre HSK

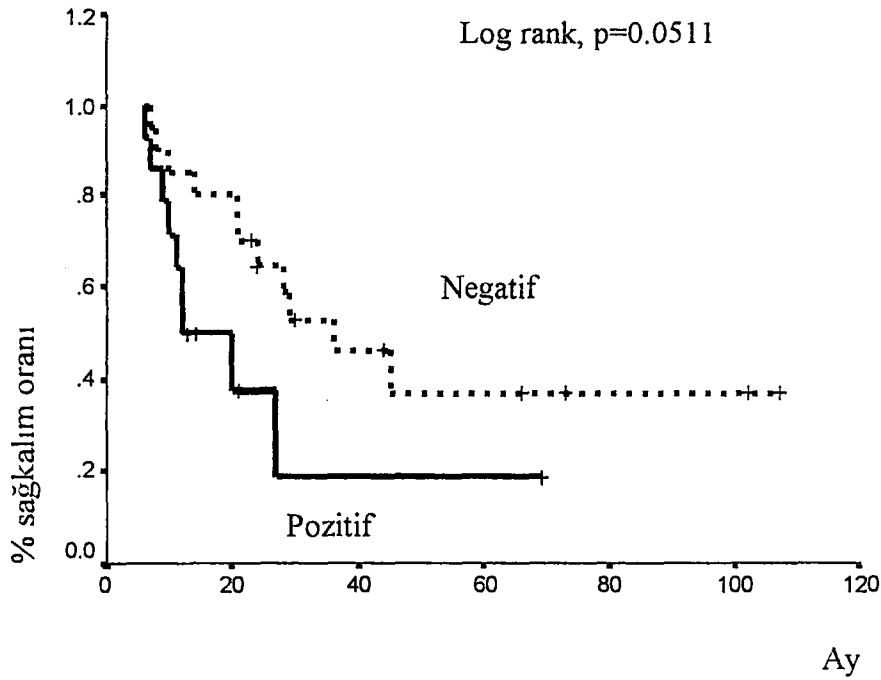


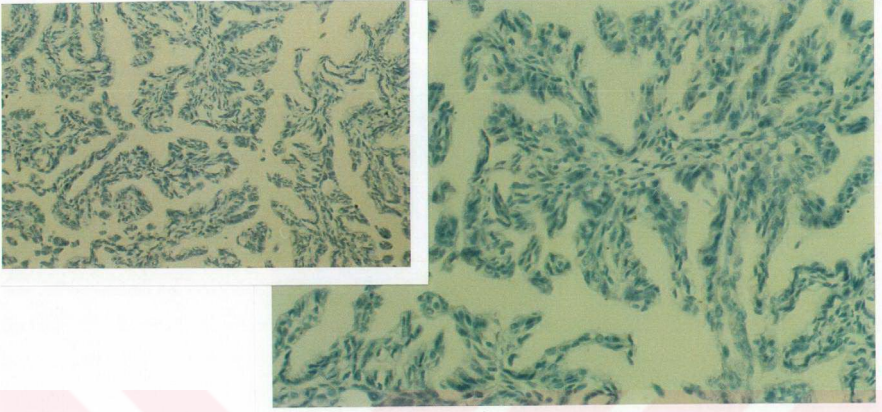
Şekil 9. Kemoterapi kür sayısına göre sağkalım



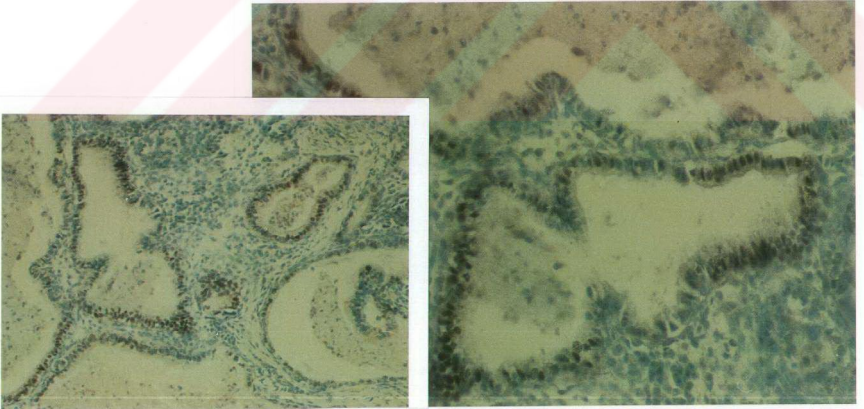
KS:Kemoterapi kür sayısı

Şekil 10. p53 pozitifliğine göre sağkalım

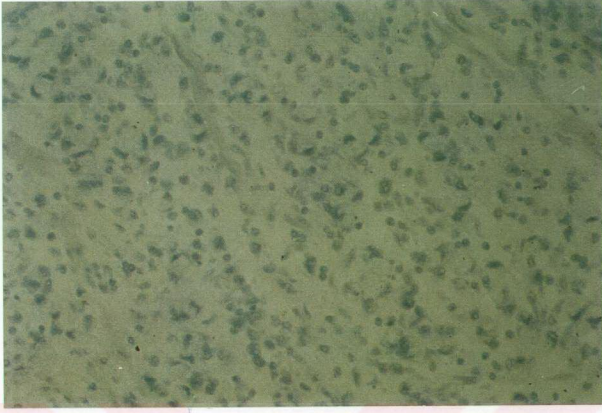




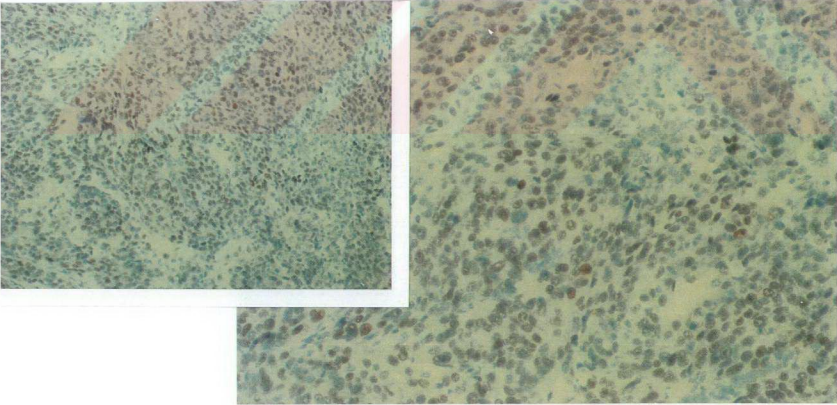
Şekil 11. P53 negatif papiller adenokarsinom (x100).



Şekil 12. P53 pozitif iyi diferansiye intestinal tip adenokarsinom (x100)



Şekil 13. P53 negatif taşlı yüzük hücreli adenokarsinom (x100).



Şekil 14. P53 pozitifliği gösteren diffüz infiltratif, kötü diferansiye adenokarsinom (x100)

TARTIŞMA

Mide kanserinde yapılan çalışmalarda tümörün evresi, histopatolojik greydi, uygulanan cerrahi girişimin tipi, tümörün primer lokalizasyonu, hastanın performans statüsü ve yaş prognostik faktörler olarak tespit edilmiştir. Proksimal yerleşimli ve genç hastalarda prognoz daha kötüdür. Yine metastatik lenf nodu sayısı arttıkça prognozun kötü olduğu gösterilmiştir (1,2,34). Hasta grubumuzda cinsiyet, diferansiyasyon derecesi, yaş ve seroza invazyonu ile sağkalım ve hastaliksız sağkalım arasında ilişki bulunamamıştır. İstatistik açıdan anlamlı olmasa da kadın, evre II, proksimal yerleşimli, orta-iyi diferansiye tümörlü, seroza invazyonu olan ve 55 yaşın altındaki hastalarda hastaliksız sağkalım ve total sağkalımın daha uzun olduğu saptandı (Tablo 3). Literatürde, genç, seroza invazyonu olan ve proksimal yerleşimli tümörü olan hastalarda prognozun daha kötü olduğu bildirilmiştir (1,2,34). Literatürün aksine, seroza invazyonu olan, 55 yaşın altında ve proksimal yerleşimli tümörü olan hasta grubumuzda total sağkalım ve hastaliksız sağkalımın daha uzun olduğu bulunmuştur (Tablo 3). Çalışmanın retrospektif olması, alt gruptaki hasta sayısının az olması ve seçilmiş hasta grubu olma olasılığının yüksek olması bu sonuçlarda rol almış olabilir.

Çalışma grubumuzda, adjuvan kemoterapi kür sayısı ve metastatik lenf nodu sayısı, hastaliksız sağkalım ve sağkalım açısından önemli prognostik faktörler olarak bulundu. Diğer taraftan, hastalık evresinin de total sağkalım için bağımsız prognostik bir faktör olduğu saptandı. Özellikle metastatik lenf nodu sayısı ve hastalık evresinin prognostik faktörler olarak belirlenmesi literatür bilgisi ile uyumludur. Ancak, adjuvan kemoterapi kür sayısı ile sağkalım ve hastaliksız sağkalım arasındaki ilişki bilinmemekle birlikte, Onur ve arkadaşlarının rezektabl mide kanserinde yapmış oldukları adjuvan kemoterapi çalışmasında, 1-2 kür kemoterapi alanlara göre 3-6 kür kemoterapi alanlarda sağkalım ve hastaliksız sağkalımın daha olumlu olduğu bulunmuştur ($p=0.03$ ve 0.009) (85). Bununla birlikte,

şimdiye kadar yapılan adjuvan tedavi çalışmalarında sağkalım avantajı bulunamamıştır. Son zamanlarda bildirilen prospektif randomize bir çalışmada, adjuvan 5-fluorourasil-folinik asidin radyoterapi ile kombine uygulanmasının sağkalım ve hastalıksız sağkalım avantajı sağladığı gösterilmiştir (10).

P53 anomalileri tüm kanserlerin yaklaşık %40'ında gösterilebilmektedir. En sık malign melanoma (%88), testiküler kanser (%87) ve kolorektal kanserlerde (%58) tespit edilmektedir (70). Birçok kanserde ekspresyon artışına rağmen p53'ün prognozla ilişkisi halen tartışmalıdır. Mide kanserinde değişik oranda p53 mutasyonları görülebilmektedir. Bu değişikliklerin, mide karsinogenezinin hangi aşamasında olduğu konusunda yapılan çalışmalardan çıkan sonuçlar çelişkilidir. Bazı yazarlar değişikliğin erken aşamada olduğunu ileri sürerken, diğerleri de p53 mutasyonlarının mide karsinogenezinin geç dönemlerinde ortaya çıktığını belirtmektedirler (52, 72-75).

Literatürde, mide kanserinde %20-65 oranında immünohistokimyasal olarak p53 pozitifliği tespit edilmektedir. Bu çalışmalarda kullanılan antikolar çok farklı ve pozitif değerlendirme için alınan sınır değerler çok değişkenlik göstermektedir. Yine çalışmaların bir kısmı taze dokuda yapılırken, çoğunluğu parafin bloklarda ve retrospektif olarak yapılmıştır. Pozitif değerlendirme için, tümör hücrelerinde spesifik nükleer p53 pozitif boyanma yaygınlık yüzdesi 0'a doğru yaklaştıkça pozitiflik oranı artmaktadır. Genelde %5-25 arası yaygınlık pozitif değerlendirme için sınır değer olarak kullanılmıştır. Bu çalışmaların hepsinde nükleer boyanma pozitif değerlendirme için kullanılmış, normal mide mukoza hücrelerinde pozitif nükleer boyanma tespit edilmemiştir (17-21,23,72-75,80). Hasta grubumuzda tümör hücrelerinde spesifik nükleer p53 pozitifliği (≥ 5), 15 hastada (%42.9) tespit edilmiş olup bu bulgu literatürle uyumludur. Olgularımızın hiçbirinde normal mukoza hücrelerinde p53 pozitifliği tespit edilmemiş ve sitoplazmik pozitif boyanmalar da negatif olarak değerlendirilmiştir.

Mide kanserinin gelişmesi ve ilerlemesinde hangi aşamada p53 değişikliklerinin olduğu ve bu değişikliğin prognozla ilişkisi halen tartışmalıdır. Bazı yazarlar p53 pozitifliği ile prognoz arasında ilişki gösterirken diğerleri bu ilişkiyi gösterememişlerdir (15-23). Bir grup araştırmacı p53 pozitifliğini değişen oranlarda mide kanserinin tüm evrelerinde belirlerken, diğerleri pozitifliğin sadece ileri evrede olduğunu göstermişlerdir (15-23, 67, 68, 71-75, 77).

Fonseca ve arkadaşlarının erken dönem mide kanserinde immünohistokimyasal olarak yapmış olduğu çalışmada, tümör vakalarının %22.5'inde p53 pozitifliği tespit etmişlerdir. Bu çalışmada nükleer boyanmanın yaygınlığı dikkate alınmayıp sadece pozitif veya negatif boyanma yorumu yapılmıştır. Yine bu çalışmada p53 pozitifliği ile tümör büyüklüğü ve lenf nodu metastazı anlamlı olarak ilişkili bulunmuş ve p53 pozitif hastalarda sağkalımın anlamlı olarak kısa olduğu gösterilmiştir (15). Maehara ve ekibinin 427 opere mide kanserli hastada yapmış olduğu bir başka çalışmada, immünohistokimyasal olarak hastaların %38.6'sında p53 pozitifliği tespit etmişlerdir. P53 pozitifliği ile tümör büyüklüğü, invazyon derinliği, lenfatik ve vasküler invazyon, lenf nodu metastazı arasında ilişki saptamışlar ve P53'ü bağımsız prognostik faktör olarak belirlemişlerdir (16). Endoskopik biyopsi örneklerinin retrospektif değerlendirildiği bir çalışmada ise, p53 pozitifliği ile tümör evresi, büyüklüğü arasında ilişki bulunmuş, p53 pozitif tümörlerin daha çok lenf nodu ve uzak metastaz yaptığı gösterilmiştir. Aynı çalışmada p53 pozitifliğinin daha çok proksimal mide kanserinde olduğu saptanmış ve p53 pozitifliğinin sağkalımı anlamlı olarak kısalttığı bulunmuştur. Bu verilere dayanarak yazarlar, p53 pozitifliğinin uzak metastaz yapma riskini ve sağkalımı tahmin etmede bir faktörü olabileceğini ileri sürmüşlerdir (17). İleri mide kanserinde, p53 pozitifliği ile kanserin büyüme paternini ve prognozla ilişkisini araştıran bir diğer çalışmada, damar invazyonu ve lenf nodu metastazı ile p53 pozitifliği arasında anlamlı bir ilişki tespit edilirken, kanser evresi ve invazyon derinliği ile p53 pozitifliği arasında bir ilişki gösterilememiştir. İnfiltratif tip

büyüyen tümörlerde, süperfisiyal büyüyen tümörlere göre p53 pozitifliğinin anlamlı olarak yüksek olduğu bulunmuş ve bu çalışmada da p53 pozitifliğinin bağımsız prognostik bir faktör olduğu belirlenmiştir (18).

Siklin E ve p53'ün öneminin retrospektif olarak incelendiği bir çalışmada, p53 pozitifliği ile siklin E ekspresyonu arasında anlamlı bir korelasyon bulunmuş ve bu iki faktörün mide kanseri progresyonuna katkı sağlayabileceği ileri sürülmüştür. Siklin E ve p53 ekspresyonunun sağkalımı anlamlı olarak olumsuz etkilediği gösterilmiştir (19). Bir başka çalışmada ise, p53'ün diffüz tip mide kanserinde sağkalımı anlamlı olarak kısalttığı ancak intestinal tipte etkilemediği bulunmuştur. Aynı çalışmada, p53'ün tüm hasta grubu için bağımsız prognostik faktör olmadığı saptanmıştır (20).

Gabbert ve arkadaşları 418 mide kanserli olguda, immünohistokimyasal olarak p53 pozitifliğini araştırmışlardır. Bu çalışmada, vakaların %57.5'inde p53 pozitifliği (pozitiflik ≥ 5) tespit etmişlerdir. P53 pozitifliği ile lenfatik ve kan damar invazyonu arasında sınırda anlamlı bir ilişki saptanırken, tümörün büyüklüğü, tümörün invazyon derecesi, lenf nodu metastazı, tümör diferansiyasyon derecesi arasında ilişki saptanamamış ve p53 pozitifliğinin sağkalımı etkilemediği gösterilmiştir. Ayrıca intestinal ve mikst tip histoloji gösteren tümörlerin, diffüz tip histoloji gösteren tümörlere göre daha çok p53 ekspresyonu ettiği gösterilmiştir (21). Lenf nodu metastazı ve seroza invazyonu olan, lokal olarak ileri evrede olan 93 mide kanserli olguda p53 ve p21 proteinlerinin araştırıldığı retrospektif bir çalışmada, p21 pozitif olan hastalarda sağkalımın anlamlı olarak daha iyi olduğu (5 yıllık sağkalım % 69.2 e karşın %38.1) bulunurken, p53 pozitifliği ile sağkalım arasında ilişki saptanamamıştır (22). Retrospektif olarak 242 mide kanserli hastanın incelendiği başka bir çalışmada, p53 pozitifliği ile hastalık evresi, uzak metastaz varlığı ve intestinal tip histoloji ile anlamlı ilişkili bulunurken, p53 pozitifliğinin sağkalımı etkilemediği gösterilmiştir. Yazarlar

p53 pozitifliğinin mide kanseri için bağımsız prognostik bir faktör olamayacağını ileri sürmüşlerdir (23).

Bizim çalışmamızda p53 pozitifliği ile evre, cinsiyet, yaş, primer tümör lokalizasyonu, histolojik tip, diferansiyasyon derecesi, lenf nodu metastaz varlığı ve yaygınlığı, DNA ploidi, s-faz fraksiyonu ve nüks paterni arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır. Ancak alt gruplar incelendiğinde, istatistik açıdan anlamlı olmasa da seroza invazyonu olan, evre III ve lenf nodu metastazı olan hastalarda p53 pozitifliğinin daha fazla olduğu saptandı (Tablo 5) Çalışmanın retrospektif bir çalışma olması, hasta sayısının az olması ve seçilmiş bir hasta grubu olasılığının yüksek olması sonuçların sağlıklı değerlendirilmesini engelleyen faktörler olabilir. Yukarıda belirtilen çalışmalarda da olduğu gibi tümörün klinik ve histopatolojik özellikleri ile p53 immünreaktivitesi arasında ilişki gösteren ve aksine bu ilişkiyi gösteremeyen çalışmalar da vardır. Dolayısı ile bu ilişki henüz kesinlik kazanmamıştır. Ancak birçok çalışmada p53 bağımsız bir prognostik faktör olarak gösterilmiştir. Agresif ve yaygın tümörlerde p53 immünreaktivite olasılığı yüksektir. Biz de çalışmamızda p53'ü bağımsız bir prognostik faktör olarak belirledik (Tablo 4, Şekil 10). Bu bulgu p53'ün mide kanserinde bağımsız bir prognostik faktör olabileceğini rapor eden çalışmalarla uyumludur.

P53 negatif hastalarda sağkalımın daha uzun olmasının iki nedeni olabilir. Birincisi, bu hastalarda kemoterapi duyarlılığı, pozitif olan hastalara göre daha fazla olabilir ve dolayısıyla bu hastalar kemoterapiden daha çok yarar görmüş olabilirler. İkinci ve daha yüksek bir olasılık, p53 negatif tümörlerin biyolojik davranışı ile ilişkili olabilir.

Tümör büyüme paterni ve p53 pozitifliği arasında ilişki net değildir. P53 pozitifliği ile erken mide kanserinde büyüme paternini araştıran bir çalışmada, süperfisiyal yayılım gösteren tümörlerde p53 ekspresyonunun daha az (%16 ya karşın %43) ve hastaliksız sağkalımın daha uzun (574 güne karşın 2926 gün) olduğu bulunmuştur. Brito ve arkadaşları T1 erken evre mide kanserinde tübüler histoloji gösteren, derin invazyonu ve lenf nodu metastazı olan

tümörlerde p53 pozitifliğini daha fazla bulmuşlardır. P53 ekspresyonu taşı yüzük hücreli histolojide daha düşük oranda tespit edilmiştir. P53 pozitifliği yüksek dereceli metaplazilerde de pozitif bulunurken intestinal metaplazi veya normal mukozada pozitiflik tespit edilememiştir. Otörler bu verilere dayanarak p53'ün erken evrede dahi hastalığın daha infiltratif seyir göstermesinde rol alabileceğini vurgulamışlardır (68,75). Endoskopik mide biyopsilerinde yapılan p53 çalışmalarında, rejeneratif atipik değişikliklerde p53 pozitif bulunmazken adenomların %18'inde, mide kanserlerinde ise diferansiyasyon derecesine göre %40-46 arasında p53 pozitifliği bulunmuştur. Bu verilere dayanılarak, p53 pozitifliğinin rejeneratif atipi yerine gerçek displazi veya kansere işaret edebileceği ileri sürülmüştür (80).

Mide kanserli hastaların serumunda p53 antikorlarını araştıran bir çalışmada, immünohistokimyasal olarak pozitif boyanan 32 hastanın 15'inin serumlarında ELISA yöntemi ile p53 antikorunu tespit edilmiştir. P53 antikorunu ile hastalık evresi arasında ilişki bulunmuş, evre arttıkça antikor titresinde artma olduğu tespit edilmiştir. P53 antikorunu pozitif olan hastalarda sağkalım anlamlı olarak kısa bulunmuştur (81).

İleri evre mide kanserinde p53 pozitifliği ile preoperatif kemoterapi duyarlılığını araştıran bir çalışmada, p53 pozitifliğinin kemoterapi direncine neden olduğu bildirilmiştir (kemoterapi yanıtı, p53 negatif hastalarda %71, pozitif hastalarda %12, $p=0.004$) (24).

C-erbB-2 ve p53 pozitifliğini araştıran değişik çalışmalarda, pozitifliğin infeksiyonlar (*H.pylori*) ve irksal farklılıklardan etkilenmediği bildirilmiştir (77-79).

Mide kanserinde DNA içeriği ve s-faz fraksiyonunun önemi halen tartışmalıdır. Rugge ve arkadaşlarının yaptığı retrospektif bir çalışmada, evre I, II ve III 76 hastanın parafin bloklarında DNA ploidi incelenmiştir. Patolojik evrelemeden sonra DNA ploidinin en önemli prognostik faktör olduğu gösterilmiştir (25). Ronaldi ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, erken evre mide kanseri ile ileri evre mide kanseri arasında proliferasyon indeksi açısından fark bulunamamış, ancak agresif seyir gösteren erken evre mide kanserinin daha yüksek s-

fazı içerdiği saptanmış ve yüksek s-faz fraksiyonunun evreye bağlı olmaksızın sağkalımı kötü yönde etkilediği belirlenmiştir (26). Mide cerrahisi geçiren 73 hastada yapılan flowsitometrik incelemede, diploid tümörlerde seroza, vasküler, lenfatik invazyon ve lenf nodu metastazının, anöploid tümörlere göre anlamlı olarak daha az olduğu gösterilmiştir (27). Omejc ve arkadaşlarının yaptığı flow sitometrik bir başka çalışmada, potansiyel olarak küratif rezeksiyon geçiren mide kanserli hastalarda DNA içeriğinin önemi incelenmiştir. Anöploidinin, diffüz tip, taşlı yüzük hücreli, andiferansiye, greyd. III tümörlerde ve 50 yaşının altında ki hastalarda anlamlı olarak düşük olduğu bulunmuş ancak sağkalımı etkilemediği gösterilmiştir (28). Cerrahi rezeksiyon geçirmiş 43 linitis plastika olgusunda retrospektif olarak DNA içeriğinin incelendiği bir çalışmada, anöploid tümörlerin % 93'ünde lenf nodu metastazı tespit edilmiştir. Sağkalım açısından sadece lenf nodu metastazının bağımsız prognostik faktör olduğu, ancak DNA ploidiinin sağkalımı etkilemediği gösterilmiştir (29). Süperfisiyal özofagus kanserinde, DNA heterojenitesinin tümör büyüklüğü ile ilişkili olarak arttığı gösterilmiştir (83).

Mide ve duodenal ülserli hastalardan alınan mide biyopsilerinde *H.pylori* ve DNA ploidiinin incelendiği bir çalışmada, *H.pylori* pozitif antrum mukozalarında proliferasyon indeksinin 27.88 olduğu bulunurken *H.pylori* negatif hastalarda 14.17 bulunmuştur. Yine duodenum ülserli hastalarda *H.pylori* enfeksiyonu ile proliferasyon indeksi arasında anlamlı ilişki saptanmıştır. *H.pylori* enfeksiyonu olan hastalarda histolojiye bakılmaksızın proliferasyon indeksinde artış tespit edilmiştir. Bu sonuçlara dayanılarak *H.pylori* enfeksiyonunun proliferasyon indeksini artırdığı ve mide kanseri patogenezinde rol aldığı ileri sürülmüş ve bu parametrenin kullanılmasıyla daha iyi bir takibin sağlanabileceği belirtilmiştir (84).

Bizim çalışmamızda, DNA ploidi ve s-faz fraksiyonu ile diğer klinik ve patolojik parametreler arasında ilişki bulunamamıştır. İlginç olarak kadın hastalarda s-faz fraksiyonu

anlamli olarak yu'kse'k c'ıkmış ancak bu hastalarda sağkalım ve hastalıksız sağkalım ile ilişkisi g'osterilememiştir. S-fazı %10'dan fazla olan hastaların 5'inde (5/8) az diferansiye t'um'ur olduğu g'oru'm'uştu'ru'. Olasılıkla, hasta sayısı daha fazla olsaydı diferansiyasyonla s-faz fraksiyonu arasında bir ilişki saptanabilirdi. Literat'urde bildirilen c'alışmalarda s-faz fraksiyonu ile cinsiyet arasında bir ilişki bildirilmemiştir (25-29,83,84). Alt grub incelemesi yapıldığında, istatistik a'c'ıdan anlamlı olmasa da, s-faz fraksiyon y'u'kse'kliğinin ($\geq\%10$) seroza invazyonu olan, az diferansiye, evre III ve 55 yaşın altındaki hastalarda daha y'u'kse'k olduğu saptandı (Tablo 5). Yine DNA ploidi a'c'ısından bakıldığında, seroza invazyonu olan, evre III ve b'olgesel lenf nodu metastazi olan hastalarda an'oploidinin daha belirgin olduğu bulundu (Tablo 5). Bununla birlikte, s-faz fraksiyonu ve an'oploidi sağkalımı ve hastalıksız sağkalımı etkilememektedir (Tablo 3)

YORUM

Hasta grubumuzda p53 imm'unreaktivitesi, uygulanan kemoterapi k'ur sayısı, metastatik lenf nodu sayısı ve t'um'ur evresinin bağımsız prognostik fakt'orler olduğu saptanmıştır. P53 imm'unreaktivitesi, s-faz fraksiyonu ve DNA i'ceriği ile diğer klinik ve patolojik parametreler arasında ilişki bulunamamıştır. Bu bulguların prospektif, yeterli hasta sayısına sahip ve iyi d'uzenlenmiş c'alışmalarla desteklenmesi gereklidir.

ÖZET

OPERABL MİDE KANSERİNDE P53, S-FAZ FRAKSİYONU VE DNA PLOİDİNİN PROGNOSTİK ÖNEMİ

Amaç: Bu çalışma adjuvan tedavi alan opere mide kanserli hastalarda p53 (mutant), DNA ploidi ve s-faz fraksiyonunun prognostik önemini araştırmak amacıyla yapılmıştır.

Hastalar ve yöntem: Çalışmaya, en az 2 kür adjuvan kemoterapi alan, takipleri olan ve patoloji parafin blokları bulunabilen 35 hasta alındı. S-faz fraksiyonu ve DNA ploidi flow sitometri ile, p53 parafin bloklarda immünohistokimyasal [mouse anti-p53 (PAB 1801) antikoru kullanılarak, Zymed Laboratories, Inc., USA] olarak çalışıldı.

Sonuçlar: Erkek/kadın oranının 21/14, medyan yaşın 54 (31-71) ve performans statusun (ECOG) hastaların tümünde 0-1 olduğu bulundu. Hastaların %31.4'ü evre II, %68.6'sı evre III idi. Bölgesel lenf nod (LN) metastazı hastaların %65.7'sinde saptandı. Tümör diferansiyasyon derecesinin olguların %45.6'sında az, %54.4'ünde orta-iyi diferansiye olduğu belirlendi. DNA hastaların %68.6'sında diploid, %31.2'sinde anöploid (2 multiploid); p53 hastaların %42.9'unda pozitif, %57.1'inde negatif; S-faz fraksiyonu hastaların %22.9'sinde %10'dan fazla, %77.1'ünde %10'un altında bulundu. Medyan takip süresinin 21 (3-107), medyan hastalıksız sağkalımın (HSK) 20 ay (%95 GA: 9.21 – 30.79), medyan total sağkalımın (SK) 27 ay (%95 GA:18.14 – 35.86) olduğu saptandı. İki yılda total sağkalımın %57.39, hastalıksız sağkalımın da %47.68 olduğu bulundu. Nüks oranı %60 olup, %23.9'inde uzak metastaz, %76.1'inde de lokorejional nüks saptandı. Yaş, cinsiyet, evre, performans status, primer hastalık bölgesi, LN sayısı, diferansiyasyon derecesi, seroza tutulumu, aldığı kemoterapi kür sayısı (KS), nüks bölgesi, p53, s-faz fraksiyonu ve DNA ploidi durumuna göre tek yönlü analiz yapıldı. Bu analizde anlamlı olan sonuçlar tabloda özetlendi.

	LN sayısı			KS			P53		
	≥10	1-9	p	≥4	2-3	P	Pozitif	Negatif	P
HSK ay (%95 GA)	9 (2.5-15.5)	42	0.001	33 (3.6-60.4)	7 (3.9-10.1)	0.011	9 (6.6-11.4)	33 (7.2-58.8)	0.082
SK ay (%95 GA)	12 (7.8-16.2)	45	0.001	29 (16.6-41.4)	10 (8.5-11.5)	0.004	12 (3.2-20.8)	36 (17.8-54.2)	0.051

Çok değişkenli analizde hastaliksız sağkalım için, kemoterapi kür sayısı ($p=0.0196$) ve metastatik lenf nodu sayısı ($p=0.0068$); Total sağkalım için, kemoterapi kür sayısı ($p=0.0036$), metastatik lenf nodu sayısı ($p=0.0016$), p53 ($p=0.0071$) ve hastalık evresinin ($p=0.0427$) bağımsız prognostik faktörler olduğu bulundu. DNA ploidi, p53 ve s-faz fraksiyonu ile diğer parametreler arasında ilişki gösterilemedi ($p>0.05$).

Yorum: Hasta grubumuzda, metastatik lenf nodu sayısı, hastanın aldığı kemoterapi kür sayısı, p53 ve hastalık evresi bağımsız prognostik faktörlerdir.

Anahtar kelimeler: Mide kanseri, p53, s-faz fraksiyonu, DNA ploidi.

SUMMARY

THE PROGNOSTIC VALUE OF P53, S-PHASE FRACTION AND DNA PLOIDY IN PATIENTS WITH OPERABLE GASTRIC CARCINOMA

Aim of the study: In this study, we evaluated the prognostic value of p53, s-phase fraction and DNA ploidy in patients with operable gastric carcinoma.

Patients and methods: Patients treated with at least 2 cycles of adjuvant chemotherapy were included in this study, retrospectively. The s-phase fraction and DNA content were studied by the flow cytometric analysis and p53 by immunohistochemical methods in paraffin embedded tumor tissues.

Results: Thirty five patients with a median age of 54 (31-71) (men/women ratio: 21/14) were included in the study. Performance status (ECOG) were 0-1 in all patients. Stages II and III disease were in 31.4 % and 68.6% of patients, respectively. Regional lymph node metastases were documented in 65.7% of patients. Primary tumors were poorly differentiated in 45.6%, and moderate and well-differentiated in 54.4% of the patients. DNA contents were diploid in 68.6% and aneuploid (2 multiploid) in 31.2% of the patients. P53 was immunohistochemically reactive in 42.9% of the samples. S-phase fraction was higher than 10% in 22.9% of the patients. Median follow-up was 21 months (3-107 months). Median overall survival (OS) and disease free survival (DFS) were 27 (95% Confidence Intervale, CI: 18.14 - 35.86) and 20 (95% CI: 9.21 – 30.79) months, respectively. The 2-years DFS and OS were 47.68%, 57.39%, respectively. Tumor recurrence was observed in 60% of the patients (23.9% distant and 76.1% locoregional). According to the results of univariate analysis, significant associations among the parameters of sex, stage, performance status, the primary tumor location, the number of metastatic lymph nodes (LN), differentiation of tumors, invasion of serosa, relaps sites, p53, s-phase fraction, DNA ploidy were shown on the table

	Number of LN			Number of chemotherapy cycles			P53		
	≥10	1-9	P	≥4	2-3	P	Positive	Negative	P
DFS (95% CI)	9 (2.5-15.5)	42	0.001	33 (3.6-60.4)	7 (3.9-10.1)	0.011	9 (6.6-11.4)	33 (7.2-58.8)	0.082
OS (95% CI)	12 (7.8-16.2)	45	0.001	29 (16.6-41.4)	10 (8.5-11.5)	0.004	12 (3.2-20.8)	36 (17.8-54.2)	0.051

In the Cox-regration analysis, the number of chemotherapy cycles ($p=0.0196$) and LN ($p=0.0068$) were independent prognostic factors for DFS. The number of chemotherapy cycles ($p=0.0036$), and LN ($p=0.0016$), p53 ($p=0.0387$) and stage of the disease ($p=0.0427$) were independent prognostic factors for OS.

Conclusions: We found that the number of LN and chemotherapy cycles, stage of the disease and p53 immunreactivity were independent prognostic factors for the patients with operable gastric carcinoma.

Key words: Gastric carcinoma, p53, s-phase fraction, DNA ploidy.

KAYNAKLAR

1. Brucner HW, Morris JC, Mansfield P. Neoplasms of the stomach. *In: Bast RC, Kufe DW, Pollock RE, Weichselbawn RR, Holland JF, Frei E (eds): Cancer medicine 5th ed.* Hamilton, London: BC Decker, 2000: 1355-1391.
2. Alexander HR, Kelsen DG, Tepper JC. Cancer of the stomach. *In: DeVita VT Jr, Hellman S, Rosenberg AS (eds): Cancer, principles and practice of oncology 5th ed.* Lipincot-Raven, 1997:
3. Karaoğuz H, İçli F. Cancer problem in Türkiye. *Journal of Ankara Medical School* 1993; 15:547-558.
4. Onur H. Türkiye’de kanser sorunu: Bir epidemiyolojik analiz. *XIII.Ulusal Kanser Kongresi, Kongre Kitapçığı, sayfa :27, P1, 27 Nisan-1 Mayıs 1999, Belek, Antalya.*
5. Kanser Bildirimlerinin değerlendirilmesi:1993-1994, *T.C.Sağlık Bakanlığı Kanser Savaş Daire Başkanlığı no:582, Ankara, 1997.*
6. Fırat D, Çalik İ. Cancer statistics in Turkey and in the World (1993-1995). 1st ed. *Turkish Association for Cancer Research and Control, Ankara, Turkey, 1998.*
7. Onur H. Kanser Epidemiyolojisi. İliçin G, Ünal S, Biberoglu K, Akalın S, Süleymanlar G (eds). *Temel İç Hastalıkları, 2.baskı, 2001 baskıda.*
8. Hermans J, Bonenkamp JJ, Boon MC, Bunt AM, Ohyama S, Sasako M, Van de Velde CJ. Adjuvant therapy after curative resection for gastric cancer: meta-analysis of randomized trials. *J Clin Oncol* 1993;11(8):1441-1447.
9. Sautner T, Hofbauer F, Depisch D, Schiessel R, Jakesz R. Adjuvant intraperitoneal cisplatin chemotherapy does not improve long-term survival after surgery for advanced gastric cancer. *J Clin Oncol* 1994;12(5):970-974.
10. Mcdonald JS, Smalley S, Benedetti J, Estes N, Haller DG, Ajani JA, Gunderson LL, Jessup M, Martenson JA Jr. SWOG, ECOG, RTOG, CALGB, NCCTG. Postoperative

- combined radiation and chemotherapy improves disease free survival and overall survival in resected adenocarcinoma of stomach and gastroesophageal junction. Results of Intergroup study INT-0116 (SWOG 9008). *Proc Am Soc Clin Oncol* abstract no:1, May 20-23, 2000, New Orleans LA.
11. Budach VG. The role of radiation therapy in the management of gastric cancer. *Ann Oncol 5 Suppl* 1994;3:37-48.
 12. Cullinan SA, Moertel CG, Fleming TR, Rubin JR, Krook JE, Everson LK, Windschitl HE, Twito DI, Marschke RF, Foley JF, et al. A comparison of three chemotherapeutic regimens in the treatment of advanced pancreatic and gastric carcinoma. Fluorouracil vs fluorouracil and doxorubicin vs fluorouracil, doxorubicin, and mitomycin. *JAMA* 1985;12;253(14):2061-2067.
 13. Wils JA, Klein HO, Wagener DJ, Bleiberg H, Reis H, Korsten F, Conroy T, Fickers M, Leyvraz S, Buyse M, et al. Sequential high-dose methotrexate and fluorouracil combined with doxorubicin--a step ahead in the treatment of advanced gastric cancer: a trial of the European Organization for Research and Treatment of Gastrointestinal Tract Cancer Cooperative Group. *J Clin Oncol* 1991;9(5):827-831.
 14. Kelsen D, Atiq OT, Saltz L, Niedzwiecki D, Ginn D, Chapman D, Heelan R, Lightdale C, Vinciguerra V, Brennan M. FAMTX versus etoposide, doxorubicin, and cisplatin: a random assignment trial in gastric cancer. *J Clin Oncol* 1992;10(4):541-548.
 15. Fonseca L, Yonemura Y, Aretxabala XD, Yamaguchi A, Miwa K, Miyazaki I. P53 detection as a prognostic factor in early gastric cancer. *Oncology* 1994;51:485-490.
 16. Maehara Y, Tomoda M, Hasuda S, Kabashima A, Tokunaga E, Kakeji Y, Sugimachi K. Prognostic value of p53 protein expression for patients with gastric cancer-a multivariate analysis. *Br J Cancer* 1999;79 (7/8):1255-1261.

17. Starzynska T, Markiewski M, Domagala W, Marlicz K, Mietkiewski J, Roberts SA, Stern PL. The clinical significance of p53 accumulation in gastric carcinoma. *Cancer* 1996;77 (10):2005-2012.
18. Ichiyoshi Y, Oiwa H, Tomisaki S, Sakaguchi Y, Ohno S, Maehara Y, Sugimachi K. Overexpression of p53 is associated with growth pattern and prognosis in advanced gastric carcinoma. *Hepatogastroenterol* 1997;44:546-553.
19. Sakaguchi T, Watanabe A, Sawada H, Yamada Y, Yamashita J, Matsuda M, Nakajima M, Miwa T, Hirao T, Nakano H. Prognostic value of cyclin E and p53 expression in gastric carcinoma. *Cancer* 1998;82 (7):1238-1243.
20. Lee WJ, Shun CT, Hong RL, Wu MS, Shang KJ, Chen KM. Overexpression of p53 predicts shorter survival in diffuse type gastric cancer. *Br J Surg* 1998;85 (8):1138-1142.
21. Gabbert HE, Müller W, Schneiders A, Meier S, Hommel G. The relationship of p53 expression to the prognosis of 418 patients with gastric carcinoma. *Cancer* 1995;76(5):720-726.
22. Gomyo Y, Ikeda M, Osaki M, Tatebe N, Tsujitani S, Ikeguchi M, Kaibara N, Ito H. Expression of p21 (waf1/cip1/sdi1), but not p53 protein, is a factor in the survival of patients with advanced gastric carcinoma. *Cancer* 1997;79 (11):2067-2072.
23. Victorzon M, Nordling S, Haglund C, Lundin J, Roberts PJ. Expression of p53 protein as a prognostic factor in patients with gastric cancer. *Eur J Cancer* 1996;32A(2):215-220.
24. Cascinu S, Graziano F, Ferro E, Staccioli, Ligi M, Carnevalli A, Muretto P, Catalano G. Expression of p53 protein and resistance to preoperative chemotherapy in locally advanced gastric carcinoma. *Cancer* 1998;83 (9):1917-1922.
25. Ruge M, Sonogo F, Panozzo M, Baffa R, Rubio J, Farinati F, Nitti D, Ninfo V, Ming SC. Pathology and ploidy in the prognosis of gastric cancer with no extranodal metastasis. *Cancer* 1994;73 (4):1127-1133.

26. Ranaldi R, Santinelli G, Fabris G, Mannello B, Natoli C, Tinari N, Bearzi I. A flow cytometric study of early gastric cancer. *Path Res Pract* 1996;192:1202-1205.
27. Kimura H, Kanno M, Takamura H, Arakawa H, Maeda K, Uogishi M, Sodani H, Kawashima T. Implication of flow cytometry in preoperative detection of biologic variables of gastric cancer and malignant condition of gastric remnant cells obtained by endoscopic biopsy. *Oncology* 1994;51:479-484.
28. Omejc M, Repse S, Bracko M. DNA flow cytometry in gastric carcinoma: Implication in patients with potentially curative resection. *J Surg Oncol* 1997;65:237-241.
29. Candel A, Green L, Castelli M, Abraham K, Aranha G, Gattuso P. Flow cytometry as a prognostic predictor in gastric linitis plastica. *J Surg Oncol* 1994;56:233-235.
30. Blott WJ, Devesa SS, Kneller RW, Fraumeni JF Jr. Rising the incidence of adenocarcinoma of esophagus and gastric cardia. *JAMA* 1991;265(10):1287-1296.
31. Powell J, McConkey CC. Increasing incidence of adenocarcinoma of the gastric cardia and adjacent site. *Br J Cancer* 1990;62(3):440-443.
32. Craanen ME, Dekker W, Blok P, Ferwerda J, Tytgat GN. Time trends in gastric carcinoma: changing patterns of type and location. *Am J Gastroenterol* 1992;87(5):572-579.
33. Golematis B, Tzardis P, Hatzikostas P, Papadimitriou P, Haritopoulos N. Changing pattern of distribution of gastric carcinoma of the stomach. *Br J Surg* 1990;77(1):63-67.
34. Fuchs CS, Mayer RJ. Gastric carcinoma. *N Engl J Med* 1995;333(1):32-41.
35. Mirvis SS. The etiology of gastric cancer. Intra-gastric nitrosamide formation and other theories. *J Natl Cancer Inst* 1983;71(3):629-647.
36. Forman D. Gastric cancer, diet and nitrate exposure (editorial). *Br Med J (Clin Res Ed)* 1987;294(6571):528-529.
37. La Vecchia C, Negri E, D'Avanzo E, Franceschi S. Electric refrigerator use and gastric cancer risk. *Br J Cancer* 1990;62(1):136-137.

38. Parsonnet J, Vandersteen D, Goates J, Sibley RT, Pritikin J, Chang Y. Helicobacter pylori infection in intestinal-and diffuse-type gastric adenocarcinomas. *J Natl Cancer Inst* 1991;83(9): 640-643.
39. Guarner J, Mohar A, Parsonnet J, Halperin D. The association of Helicobacter pylori with gastric cancer and preneoplastic gastric lesions in Chiapas, Mexico. *Cancer* 1993;71(2):297-301.
40. The EUROGAST Study Group. An international association between Helicobacter pylori and gastric cancer. *Lancet* 1993;341(8857):1359-1362.
41. Huang JQ, Sridhar S, Chen Y, Hunt RH. Meta-analysis of relationship between Helicobacter pylori seropositivity and gastric cancer. *Gastroenterology* 1998;114(6):1169-1179.
42. Eslick GD, Lim LL, Byles JE, Xia HH, Talley NJ. Association of Helicobacter pylori infection with gastric carcinoma: a meta-analysis. *Am J Gastroenterol* 1999;94(9): 2373-2379.
43. Correa P, Fontham E, Piele LW, Chen V, Line YP, Haenszel W. Dietary determinants of gastric cancer in South Louisiana inhabitants. *J Natl Cancer Inst* 1985;75(4):645-654.
44. Nomura A, Grove JS, Stemmerman GN, Severson RK. A prospective study of stomach cancer and its relation to diet, cigarettes and alcohol consumption. *Cancer Res* 1990;50(3):627-631.
45. Kneller RW, You WC, Chang YS, Liu WD, Zhang L, Zhao L, Xu GW, Fraumeni JF Jr, Blot WJ. Cigarette smoking and other risk factors for progression of precancerous stomach lesion. *J Natl Cancer Inst* 1992;84(16):1261-1266.
46. Vaughan TL, Davis S, Kristal A, Thomas DB. Obesity, alcohol and tobacco as risk factors for cancers of the esophagus and gastric cardia: adenocarcinoma versus squamous cell carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers and Prev* 1995;4(2):85-92.

47. Lagergren J, Bergström R, Nyrén O. Association between body mass and adenocarcinoma of the esophagus and gastric cardia. *Ann Intern Med* 1999;130(11):883-890.
48. Lynch HT, Smyrk TC, Watson P, Lanspa SJ, Lynch JF, Lynch PM, Cavalieri RJ, Boland CR. Genetics, natural history, tumor spectrum and pathology of hereditary nonpolyposis colorectal cancer:an updated review. *Gastroenterology* 1993;104(5):1535-1549.
49. Watanabe H, Enjoji M, Yao T, Ohsato K. Gastric lesions in familial adenomatosis coli: Their incidence and hystologic analysis. *Hum Pathol* 1978;9(3):269-283.
50. La Vecchia C, Negri E, Franceschi S, Gentile A. Familial history and the risk of stomach and colorectal cancer. *Cancer* 1992;70(1):50-55.
51. Zanghieri G, DiGregorio C, Sacchetti C, Fante R, Sassatelli R, Cannizzo G, Carriero A, Ponz de Leon M. Familial occurrence of gastric cancer in the 2-year experience of a population-based registry. *Cancer* 1990;66(9):2047-2051.
52. Rhyu MG, Park WS, Jung YJ, Choi SW, Meltzer SJ. Allelic deletions of *MCC/APC* and p53 are frequent late events in human gastric carcinogenesis. *Gastroenterology* 1994;106(6):1584-8.
53. Fazeli A, Dickinson SL, Hermiston ML, Tighe RV, Steen RG, Small CG, Stoeckli ET, Keino-Masu K, Masu M, Rayburn H, Simons J, Bronson RT, Gordon JI, Tessier-Lavigne M, Weinberg RA. Phenotype of mice lacking functional Deleted in colorectal cancer (*DCC*) gene. *Nature* 1997;386 (6627):796-804.
54. Nanus DM, Kelsen DP, Mentle IR, Altorki N, Albino AP. Infrequent point mutations of ras oncogenes in gastric cancers. *Gastroenterology* 1990;98(4):955-960.
55. Wright PA, Williams GT. Molecular biology and gastric carcinoma. *Gut* 1993;34(2):145-147.
56. Yoshida T, Sakamoto H, Terada M. Amplified genes in cancer in upper digestive tract. *Semin Cancer Biol* 1993;4(1):33-40.

57. Koss LG. Image cytophotometry and flow cytometry. *In: JS, Weinstein RS eds. Diagnostic flow cytometry*, Williams & Willkins, Baltimore, 1991;147-163.
58. Hedley DW, Friedlander ML, Taylor IW. Method for analysis of cellular DNA content of paraffin-embedded pathological material using flow cytometry. *J Histochem Cytochem* 1983;31:1333-1338.
59. Dressler LG. Controls, standarts and histogram interpretation in DNA flow cytometry. *In: Darzynkiewicz J, Crissman HA, eds. Methods in Cell Biology*. Academic Press, Inc, 1990;157-171.
60. Shankey TV, Rabinovitch PS, Bagwell B, et al. Guidelines for implementation of clinical DNA cytometry. *Cytometry* 1993;14:472-477.
61. Wersto RP, Liblit RL, Koss LG. Flow cytometric DNA analysis of human solid tumors:A review of interpretation of DNA histograms. *Human Pathol* 1991;22(11):1085-1098.
62. Kirsh IR. Molecular biology of leukemias. *Ped Clin North Am* 1988;35:4 683-722.
63. Akbulut H, Dinçol D, Aydınтуğ O et al. The prognostic significance of flow cytometric cellular DNA content determination in patients with colorectal carcinoma. *Turkish J Cancer* 1998;28(2):51-59.
64. Merkel DE, Mc Guire WL. Ploidi, proliferative activity and prognosis: DNA flow cytometry of solid tumors. *Cancer* 1990;65:1194-1205.
65. Paydas S, Dinçol D, Sachs-Gilman A et al. Flow cytometric DNA analysis in primary gastrointestinal lymphoma. *J Exp Clin Cancer Res* 1994;13(3):229-232.
66. Samur M, Pamir A, Akbulut H, Erekuş S, Sağlık Y, Yıldız Y, Dinçol D, İçli F. The clinical value of flow cytometric DNA content analysis in patients with soft tissue sarcomas. *Sarcoma* 1999;3:171-175.
67. Ochiai A, Yamauchi Y, Hirohashi S. P53 mutations in the non-neoplastic mucosa of the human stomach showing intestinal metaplasia. *Int J Cancer* 1996;69 (1):28-33.

68. Brito MJ, Williams GT, Thompson H, Filipe MI. Expression of p53 in early (T1) gastric carcinoma and precancerous adjacent mucosa. *Gut* 1994;35:1697-1700.
69. Tahara E. Molecular mechanism of stomach carcinogenesis. *J Cancer Res Clin Oncol* 1993;119:265-272.
70. Hussain S.P, Harris C.C. Molecular epidemiology of human cancer. Recent Results. *Cancer Res* 1998;58:22-36.
71. Craanen M.E, Blok P, Dekker W, Offerhaus G.J, Tytgat G.N. Chronology of p53 protein accumulation in gastric carcinogenesis. *Gut* 1995;36:848-852.
72. Martin H, Filipe M.I, Morris R.W, Lane D.P, Silvestre F. P53 expression and prognosis in gastric carcinoma. *Int J Cancer* 1992;50:859-862.
73. Miracco, C., Spina, D., Vindigni, C., Filipe, M.I. Taso, P. Cell proliferation patterns and p53 expression in gastric dysplasia. *Int J Cancer* 1995;62:149-154.
74. Joypaul B.V, Newman E.L, Hopwood D, Grant A. et al. Expression of p53 protein in. Dowell SP, Hall PA. The clinical relevance of the p53 tumour suppressor gene. *Cytopathology* 1994;5:133-145.
75. Oiwa H, Maehara Y, Ohno S, Sakaguchi Y, Ichiyoshi Y, Sugimachi. Growth pattern and p53 overexpression in patients with early gastric cancer. *Cancer* 1995;75(6 Suppl):1454-1459.
76. Lu CD, Alteri CD, Tanigawa N. Expression of a novel antiapoptosis gene, surviving, correlated with tumor cell apoptosis and p53 accumulation in gastric carcinomas. *Cancer Res* 1998;58: 1808-1812.
77. Shun TC, Wu MS, Lin JT, Chen SY, Wang HP, Lee WJ, Wang TH, Chuang SM. Relationship of p53 and c-erbB-2 expression to histopathological features, helicobacter pylori infection and prognosis in gastric cancer. *Hepatogastroenterol* 1997;44:604-609.

78. McCulloch P, Ochiai A, Dowd GM, Nash JRG, Sasako M, Hirohashi S. Comprasion of the moleculer genetics of c-erb-B2 and p53 expression in stomach cancer in Britain and Japan. *Cancer* 1995;75 (4):920-925.
79. McCulloch P, Taggart T, Ochiai A, Dowd GO, Nash J, Sasako M. C-erbB2 and p53 expression are not associated with stage progression of gastric cancer in Britain or Japan. *Eur J Surg Oncol* 1997;23:304-309.
80. Imatani A, Sasano H, Asaki S, Toyota T, Saito M, Masuda T, Nagura H. Analysis of p53 abnormalities in endoscopic gastric biopsies. *Anticancer Res* 1996;16:2049-2056.
81. Würl P, Weigmann F, Meye A, Fittkau M, Rose U, Berger D, Rath FW, Dralle H, Taubert H. Detection of p53 autoantibodies in sera of gastric cancer patients and their prognostic relevance. *Scand J Gastroenterol* 1997;32(11):1147-1151.
82. Wahab MA, Attallah AM, Elshal MF, Raouf MA, Zalata KR, Ghawalby NE, Ezzat F. Cellular proliferation and ploidy of gastric mucosa: the role of *Helicobacter Pylori*. *Hepato-gastroenterol* 1997;44:880-885.
83. Haraguchi Y, Baba M, Takao S, Yoshinaka H, Hase S, Aikou T. Flow cytometric analysis of DNA heterogenity in superficial carcinoma of the esophagus. *Cancer* 1995;75(4):914-919.
84. Kubota K, Kajiura N, Konishi T, Teruya M, Tsushima H, Nakao K, Arizono S, Oka T, Makuuchi M. Effects of preoperative chemotherapy on DNA ploidy patterns, cell cycle and histological findings in gastric and colonic cancer patients. *J Surg Oncol* 1994;57:222-229.
85. Onur H, İçli F, Büyükçelik A, Akbulut H, Dinçol D, Demirkazık A, Çay Şenler F. Rezektable mide kanserinde adjuvant EAP tedavisi. *XIII.Ulusal Kanser Kongresi, Kongre Kitapçığı*, Bildiri no : S77, sayfa 20, 27 Nisan-1 Mayıs 1999, Belek, Antalya.