

**T.C.
GENELKURMAY BAŐKANLIĐI
GÜLHANE ASKERİ TIP AKADEMİSİ
HAYDARPAŞA EĞİTİM HASTANESİ
TIBBİ ONKOLOJİ SERVİS ŞEFLİĞİ**

**MİDE KANSERİNDE HLA-G,
REGULATUVAR T HÜCRELERİ
VE CD8+ T LENFOSİTLER**

**TIBBİ ONKOLOJİ
YANDAL UZMANLIK TEZİ**

**Tolga TUNÇEL
Tbp.Kd.Yzb**

**İSTANBUL
2012**

**T.C.
GENELKURMAY BAŐKANLIĐI
GÜLHANE ASKERİ TIP AKADEMİSİ
HAYDARPAŞA EĞİTİM HASTANESİ
TIBBİ ONKOLOĞİ SERVİS ŞEFLİĞİ**

**MİDE KANSERİNDE HLA-G,
REGULATUVAR T HÜCRELERİ
VE CD8+ T LENFOSİTLER**

**Tolga TUNÇEL
Tbp.Kd.Yzb**

**Gülhane Askeri Tıp Akademisi
Haydarpaşa Eğitim Hastanesi Tıbbi Onkoloji Servisi'nin
Yandal Uzmanlık Eğitimi için öngördüğü
YANDAL UZMANLIK TEĞİ olarak hazırlanmıŐtır**

**TEZ DANIŞMANI
E. Gökhan KANDEMİR
Prof.Tbp.Kd.Alb.**

**İSTANBUL
2012**

GATA Askeri Tıp Fakültesi Dekanlığı'na,

“MİDE KANSERİNDE HLA-G, REGULATUVAR T HÜCRELERİ VE CD8+ T LENFOSİTLER” konulu bu çalışma, jürimiz tarafından Tıbbi Onkoloji Yandal Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı : Prof.Tbp.Kd.Alb. E. Gökhan KANDEMİR

İmza

Üye : Doç.Tbp.Kd.Alb. Bülent KARAGÖZ

İmza

Üye : Doç.Dz.Tbp.Alb Selmin ATAERĞİN

İmza

ONAY:

Tbp.Kd.Yzb. Tolga TUNÇEL'in 23.01.2012 tarihinde savunduğu bu tez Akademi Kurulu'nca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve kabul edilmiştir.

Sadettin ÇETİNER

Prof.Tbp.Tümgeneral

GATA K. Bil. Yrd.

Askeri Tıp. Fak. Dekanı ve

Eğitim Hastanesi Baştabibi

TEŞEKKÜR

Bu tez konusu, GATA Haydarpaşa Eğitim Hastanesi Tıbbi Onkoloji Servis Şefliği'nin 15.03.2009 gün ve T.Onk.Srv.:3000-15/09 sayılı emri ile verilmiş ve çalışmaya başlanmıştır. Bu çalışmada, mide kanserli hastalarda tümör dokusunda HLA-G ekspresyonu, Foxp3+ Treg hücreleri ve CD8+ T lenfosit sayıları çalışılmış ve bunların diğer klinikopatolojik özelliklerle arasındaki ilişki araştırılmıştır.

Yandal uzmanlık eğitimim sırasında bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım İç Hastalıkları Servis Şefi Prof. Dr. Emin ÖNDE'ye saygılarımı ve teşekkürlerimi arz ederim. Uzmanlık eğitimimde ve yandal uzmanlık eğitimimde bilgi ve deneyimlerinden her zaman yararlandığım, aynı zamanda tez danışmanım olarak çalışmamın her aşamasında bana yol gösteren ve yetişmemde büyük emeği olan değerli hocam Tıbbi Onkoloji Servis Şefi Prof. Dr. E.Gökhan KANDEMİR'e saygılarımı ve teşekkürlerimi arz ederim. Çalışmam sırasında, patoloji ile ilgili bilgi ve deneyimleri ile bana yol gösteren Doç. Dr. Aptullah HAHOĞLU'na teşekkürlerimi arz ederim.

Aynı klinikte birlikte çalışmaktan gurur duyduğum ve yandal uzmanlık eğitimim boyunca her zaman yakın ilgi ve desteğini gördüğüm değerli ağabeylerim Doç .Dr. Bülent KARAGÖZ'e, Doç. Dr. Oğuz BİLGİ'ye, Dr. M. Alpaslan ÖZGÜN'e, Dr. Levent EMİRZEOĞLU'na teşekkürlerimi sunarım. Laboratuvar çalışmam sırasında bana yardım eden Patoloji servisi çalışanlarına teşekkürlerimi sunarım. Yandal uzmanlık eğitimim boyunca yardımını ve desteğini gördüğüm iç hastalıkları kliniğinin asistanlarına, kliniğimiz hemşirelerine ve hastabakıcılarına teşekkür ederim.

Yetişmemde en büyük payı olan ve beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan anneme ve babama teşekkür ederim. Bu tezi yazarken kendilerine yeteri kadar vakit ayıramadığım halde beni anlayışla karşılayan fedakar eşim Seda'ya ve biricik oğlum Doruk'a teşekkür ederim.

Dr. Tolga TUNÇEL

ÖZET

Mide Kanserinde HLA-G, Reglatuvar T Hücreleri ve CD8+ T Lenfositler

HLA-G öncelikle trofoblastlardan eksprese edilen klasik olmayan HLA sınıf I antijenidir. İmmün sistemde görevli çeşitli hücrelerle etkileşerek immünsüpresif etki göstermektedir. HLA-G eksprese eden tümörlerin daha agresif seyrettiği ve bu hastaların sağkalımlarının daha kısa olduğu bilinmektedir. Bu çalışmada mide kanserli hastaların tümör dokusunda HLA-G ekspresyonu, Foxp3+ Treg ve CD8+ T lenfosit sayıları çalışıldı ve bunların diğer klinikopatolojik özelliklerle arasındaki ilişki araştırıldı.

Çalışmaya opere olan 52 mide kanser hastası alındı. HLA-G, Foxp3+ Treg ve CD8+ T lenfosit varlığını göstermek için immünhistokimyasal yöntem kullanıldı. Bunların sağkalım üzerindeki etkisi ve klinikopatolojik bulgularla birlikteliği incelenmiştir.

16 hastada (%31'nde) tümör dokusunda HLA-G ekspresyonu gözlemlendi ve HLA-G ekspresyonu ile histolojik grad, lenf nodu metastazı, klinik evre ve histolojik tip arasında istatistiksel olarak anlamlı korelasyon vardı. HLA-G ekspresyonu olan mide kanserli hastaların tümör infiltre Treg hücre sayısı çok, CD8+ T lenfosit hücre sayısı azdı ve bu istatistiksel olarak anlamlıydı. HLA-G ekspresyonu olan, Treg hücre sayısı çok ve CD8+ T lenfosit hücre sayısı az olan mide kanserli hastalarda sağkalım süreleri daha kısaydı. Çoklu analizler sonucunda HLA-G ekspresyonunun mide kanserinde bağımsız prognostik bir faktör olduğunu bulundu.

Sonuç olarak mide kanserinde HLA-G ekspresyonu kısa sağkalım, tümör infiltre Treg fazlalığı ve CD8+ T Lenfosit az olmasıyla birlikte dir. Mide kanser dokusunda HLA-G ekspresyonu prognostik bir faktör ya da bir tedavi hedefi olabilir.

Anahtar Kelimeler : HLA-G, Foxp3, Treg, CD8, Mide kanseri

Yazar Adı : Dr. Tolga TUNÇEL

Danışman : Prof. Dr. E. Gökhan KANDEMİR

SUMMARY

HLA-G, Regulatory T cells and CD8+ T lymphocytes in Gastric Cancer

HLA-G is a non-classical HLA I class antigen primarily expressed by trophoblasts. It interacts with a variety of cells responsible for the immune system and indicates immunosuppressive effects. HLA-G expressing tumors are more aggressive and known that these patients had a shorter survival. In this study we investigated HLA-G expression, CD8+ T lymphocytes and Foxp3+ regulatory T cell numbers in patients with gastric cancer and analyzed their relationship with clinicopathologic features

Fifty two patients with operated gastric cancer were included into the study. Immunohistochemistry was used to examine HLA-G, Foxp3 Treg and CD8+ T lymphocytes expression.

HLA-G expression was observed in 31% (16 of 52) of gastric carcinomas and was correlated with histologic grade, lymph node metastasis, clinical stage of disease and histologic type. HLA-G expression was significantly correlated with high numbers of T-regs and low CD8+ T lymphocytes. Patients with HLA-G expression, high Treg, low CD8+ T lymphocytes had a significantly shorter survival time. Multivariate analysis indicated that HLA-G positive expression was an independent prognostic factor of gastric cancer.

As a result, HLA-G expression was associated with a shorter survival, high tumor infiltrating Treg and low CD8+ T lymphocytes in gastric cancer. Therefore, HLA-G expression may be evaluated as a poor prognostic factor or a good treatment target in gastric cancer.

Keywords : HLA-G, Foxp3, Treg, CD8, Gastric cancer

Author : Tolga TUNÇEL M.D.

Counsellor : E. Gökhan KANDEMİR M.D. Professor

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa no</u>
ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET.....	v
İNGİLİZCE ÖZET.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR.....	ix
ŞEKİLLER.....	x
TABLolar.....	xi
GİRİŞ.....	1
GENEL BİLGİLER	2
2.1. MİDE KANSERİ	2
2.1.1. Epidemiyoloji.....	2
2.1.2 Sağkalım.....	3
2.1.3. Etyoloji ve risk faktörleri.....	4
2.1.4. PatogeneZ.....	6
2.1.5. Histolojik sınıflama.....	7
2.1.6. Tanı.....	8
2.1.7. Evreleme.....	10
2.1.8. Tedavi.....	12
2.1.9. Prognoz.....	14
2.2. İMMÜN SİSTEMİN TÜMÖR GELİŞİMİNDEKİ ROLÜ.....	16
2.2.1. Eliminasyon fazı.....	18
2.2.2. Denge fazı.....	18
2.2.3. İmmün kaçış fazı.....	19
2.3. HLA-G VE İMMÜN SİSTEM.....	20
2.3.1. HLA-G ekspresyonunun düzenlenmesinde etkili faktörler.....	21
2.3.2. HLA-G'nin immünsüpresyon mekanizmaları.....	22

2.3.3. HLA-G ve T lenfositler arasındaki ilişki.....	24
2.3.4. HLA-G ve NK hücreleri arasındaki ilişki.....	24
2.3.5. HLA-G ve DC arasındaki ilişki.....	25
2.3.6. HLA-G ve B lenfositler arasındaki ilişki.....	26
2.3.7. HLA-G ekspresyonuna karşı tedavi seçenekleri.....	26
GEREÇ VE YÖNTEM.....	27
3.1.1. Olgu seçimi.....	27
3.1.2. İmmünohistokimyasal inceleme.....	28
3.1.3. İmmünoreaktivitenin değerlendirilmesi.....	29
3.2. İSTATİSTİKSEL ANALİZ.....	29
BULGULAR.....	30
4.1. Hastaların demografik ve klinik özellikleri.....	31
4.2. Mide kanserli hastalarda HLA-G ekspresyonu	31
4.3. HLA-G ekspresyonunu klinikopatolojik parametreler ve sağkalımla ilişkisi	33
4.4. Mide kanser dokusunda Treg ve CD8+ T lenfositlerin varlığı ve sağkalımla ilişkisi	34
4.5. Mide tümör dokusunda HLA-G ile Treg ve CD8+ T lenfosit birlikteliği.....	38
TARTIŞMA.....	39
SONUÇ VE ÖNERİLER.....	43
KAYNAKLAR.....	44

SİMGELER VE KISALTMALAR

HLA-G	: İnsan lökosit antijen G
MHC	: Major histokompabilite
NK	: Doğal öldürücü
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
Hp	: Helicobacter pylori
ARIC	: Amerikan Kanser Araştırma Enstitüsü
HR	: Risk oranı
VKI	: Vücut kitle indeksi
EBV	: Epstein-Barr virüs
HCC	: Hepatoselüler karsinoma
GİS	: Gastrointestinal sistem
ASCO	: American Society Clinical Oncology
GATA	: Gülhane Askeri Tıp Akademisi
FISH	: Florasan insitu hibridizasyon
TIL	: Tümör İnfiltrat Eden Lenfosit
DC	: Dendritik hücreler
HIF 1	: Hipoksi inducible factor 1
KIRK2DL4	: Killer cell immunoglobulin-like receptor
Treg	: Regulator T lenfositler

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1 WHO'nun 2003 yılı kanser insidansı ve mortalite oranı.....	2
Şekil 2.2 Mide kanserinde evrelere göre sağkalım oranları.....	14
Şekil 2.3 Kanser İmmüdüzenlenmesi.....	17
Şekil 2.4 HLA-G ile NK, DC, B ve T Lenfositler arasında ilişki.....	23
Şekil 4.1 HLA-G ile immünhistokimyasal (+) boyanma.....	32
Şekil 4.2 HLA-G ile imünhistokimyasal (-) boyanma.....	32
Şekil 4.3 Tümör dokusunda HLA-G ekspresyonunun sağkalım üzerine etkisi.....	34
Şekil 4.4 Foxp3+ boyanan Treg hücre sayısı çok.....	35
Şekil 4.5 Foxp3+ boyanan Treg hücre sayısı az.....	36
Şekil 4.6 Mide kanser dokusunda Treg varlığının sağkalıma etkisi.....	37
Şekil 4.7 CD8+ T lenfosit hücre sayısı çok.....	38
Şekil 4.9 CD8+ T lenfosit hücre sayısı az.....	39

TABLULAR DİZİNİ

<u>Tablo</u>	<u>sayfa</u>
Tablo 2.1 Bormann Sınıflaması	7
Tablo 2.2 WHO'nun mide kanserleri sınıflaması.....	8
Tablo 2.3 Mide kanserinde görülen semptomlar.....	9
Tablo 2.4 Mide kanserinde TNM Evreleme sistemi I.....	10
Tablo 2.5 Mide kanserinde TNM Evreleme sistemi II.....	11
Tablo 4.1 Hastaların demografik özellikleri.....	31
Tablo 4.2 HLA-G'nin klinikopatolojik özellikler ile arasındaki ilişki.....	33
Tablo 4.3 Cox regresyon analizi.....	35

I- GİRİŞ

İnsan lökosit antijen-G (HLA-G) yeni tanımlanan bir majör histokompabilite antijenidir (MHC). Klasik olmayan sınıf Ib MHC antijeni olarak kabul edilmektedir. HLA-G'nin immünsupresif etki gösterdiği bilinmektedir. İlk kez plasentada trofoblastlardan eksprese edildiği gösterilmiş ve varlığının annenin fetüsü immünolojik olarak reddetmesini engellediği ortaya konulmuştur.

HLA-G'nin fizyolojik fonksiyonun yanında özellikle jinekolojik kanserler ve mide kanserinin de içinde bulunduğu birçok kanser dokusunda eksprese edildiği ve ekspresyonun kötü sağkalımla ilişkili olduğu gösterilmiştir.

Tümör infiltrate immün hücreler karsinogenezis ve kanser immünesinde rol oynamaktadır. Tümör infiltrate lenfositlerin varlığının kanser hastasında kötü ve iyi prognostik bir bulgu olduğunu ortaya koyan çalışmalar da vardır. Mide kanser hastalarında da tümör infiltrate sitotoksik T lenfositlerin, doğal öldürücü hücrelerin ve regülatör T hücrelerin prognostik bir bulgu olduğu ortaya konulmuştur. Yine mide kanser dokusunda HLA-G ekspresyonunun varlığı da saptanmıştır ve bu kötü prognostik etki göstermektedir.

HLA-G molekülünün immün supresif etkisi tümör infiltrate eden lenfositlerin varlığı üzerinden olabilir ve kötü prognostik etkisi bu yoldan olması olasıdır.

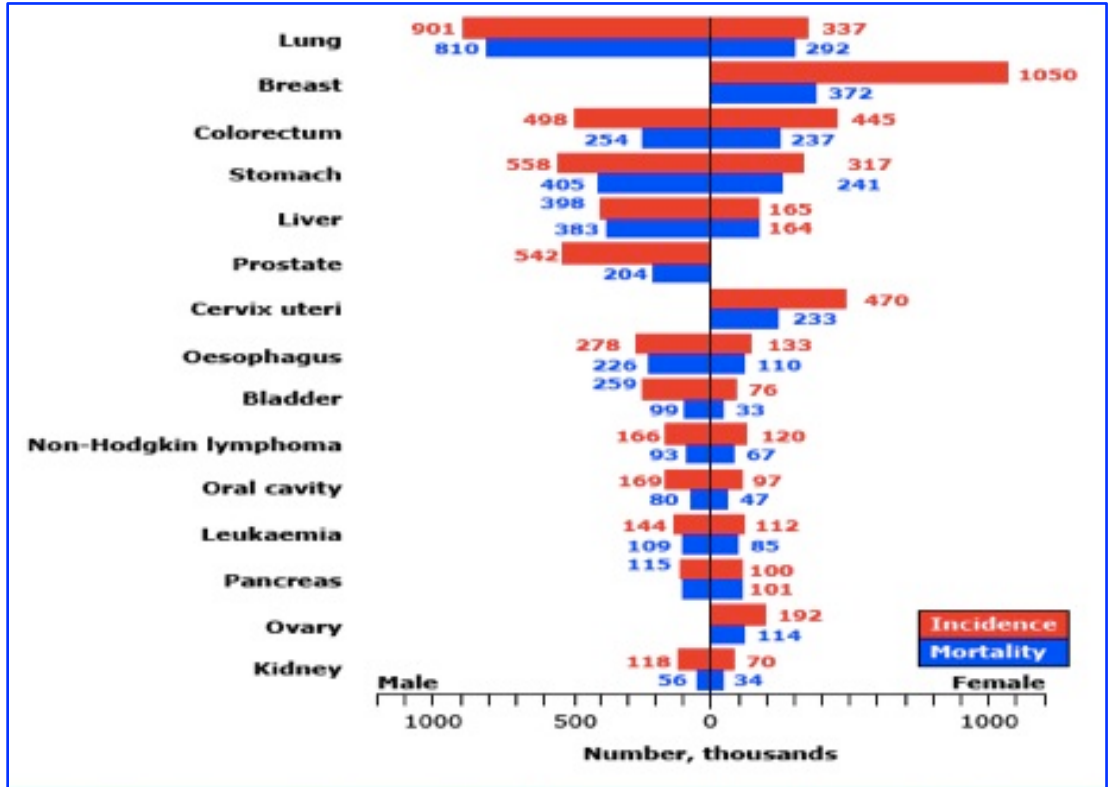
Bu nedenle mide kanserli hastalarda HLA-G ile Foxp3+ Treg ve CD8+ T Lenfosit ekspresyonları arasındaki ilişkiyi araştırdık ve bunun sağkalıma etkisini değerlendirdik.

II- GENEL BİLGİLER

2.1. MİDE KANSERİ :

2.1.1. Epidemiyoloji :

Mide kanseri 1930'lu yıllarda en sık ve ölümcül kanserlerin başında yer alırken 2005 yılına kadar sıklığı giderek azalmıştır. 2008 yılında 989,600 yeni olgu ve 738,000 ölüm gözlenmiştir (1). 2010 yılında ABD'de (Amerika Birleşik Devletleri) ortalama 21,000 mide kanseri tanısı konulmuştur. Bunlardan 10,570'inde kansere bağlı ölüm beklenmektedir (2). WHO'ya (Dünya Sağlık Örgütü) göre 2003 yılında melanom dışı cilt kanserleri hariç tutulduğunda dünyada en sık akciğer, meme ve kolorektal kanser gözlenmiştir. Kansere bağlı ölümlerden ise en sık akciğer, mide ve karaciğer tümörleri sorumlu tutulmaktadır. (Şekil 2.1)



Şekil 2.1: WHO'nun 2003 yılı kanser insidansı ve mortalite oranı

Mide kanseri Avrupa'da altıncı sıklıkta gözlenirken insidansı coğrafik varyasyon göstermektedir. Doğu ve güney Avrupa'daki insidansı batı ve kuzey Avrupa'ya göre daha fazladır.

Son birkaç dekattır dünya genelinde mide kanseri insidansında düşüş gözlenmektedir. Bu düşüş Helicobacter pylori (Hp), diyet ve çevresel faktörler gibi risk faktörlerinin tanınmasına bağlanmaktadır (3). Batı toplumunda proksimal yerleşimli tümörler, Japonya gibi uzak doğu ülkelerinde ise distal yerleşimli tümörler daha sık gözlenmektedir (4,5). İnsidansın erkek kadın oranı 1,5-1'dir. Kardiya yerleşimli mide tümörleri erkeklerde kadınlara göre beş kat daha fazla gözlenmektedir (1). Mide kanseri görülme oranı siyahlarda, düşük sosyoekonomik gruplarda ve gelişmekte olan ülkelerde daha fazladır (6). T.C. Sağlık Bakanlığının 2000-2006 yıllarını kapsayan çalışmasına göre ise mide kanseri 4. sırada yer almaktadır. Sıklık Doğu Anadolu ve Güney Doğu Anadolu bölgelerinde artmaktadır

2.1.2. Sağkalım:

Mide kanserinde sağkalım oranı insidansın yüksek olduğu ülkelerde düşük olan ülkelere göre daha kötüdür (7). Bu durum kardiya yerleşimli tümörlerin insidansın yüksek olduğu toplumlarda daha sık gözlenmesinden ve prognozunun distal yerleşimli tümörlere göre daha kötü olmasından kaynaklanmaktadır. Sağkalımın kötü olmasının en önemli sebeplerinden biride mide kanserinin asemptomatik olması ve hastalığın ileri evrede yakalanmasıdır. Japonya gibi yüksek riskli ülkelerde tarama programları sayesinde mortalite azalmıştır. Avrupa ülkelerinde ve ABD'de ise mide kanserlerinin %10'nu erken evrede yakalanmaktadır. Bu nedenle 5 yıllık sağkalım oranı düşüktür (%10-20) (8). Mide kanseri sağkalım oranları açısından Avrupa'daki ülkeler arasında büyük farklılıklar vardır. İngiltere ve İrlanda'da 5 yıllık sağkalım %20'nin altındadır.

Yaş sağkalımı etkileyen faktörlerden biridir. Mide kanserinin kırk beş yaş altında görülme oranı azken 5 yıllık sağkalım oranı %35'dir (9). Yetmiş beş yaşın üzerinde sağkalım oranı ise %19'dur.

2.1.3. Etyoloji ve risk faktörleri:

a) Diyet: Yiyecek ve beslenmenin mide kanserinin gelişiminde ve önlenmesinde önemli bir rolü vardır. Amerikan Kanseri Araştırma Enstitüsü mide kanseri ve diyet ile ilgili 722 literatürün incelenmesi sonucunda şu sonuçlara varmıştır (10).

-Nişastazis yiyeceklerin özellikle sarımsak ve meyvelerin mide kanserine karşı koruyucu etkisi olduğuna yönelik güçlü kanıtlar bulunmaktadır.

-Tuz ve tuzlanmış yiyeceklerin mide kanseri yaptığına yönelik güçlü kanıtlar vardır.

-Soya veya baklagillerle selenyum içeren besinlerin mide kanserine karşı koruyucu etkisi olduğunu gösteren sınırlı kanıtlar vardır.

-Tütsülenmiş ve ızgara yapılmış hayvansal gıdaların mide kanseri yaptığına yönelik sınırlı kanıtlar vardır.

b) Sigara: Avrupa kanser ve beslenme prospektif araştırma projesinde sigara ile mide kanseri arasındaki ilişki tanımlanmıştır. Sigara kullanımı ile mide kanseri gelişimi arasındaki risk oranı 1.45'dir. Bu risk oranı sigara kullanım yoğunluğu ve süresi ile artmaktadır. Günde 20'den fazla sigara tüketimi birlikte 14 günde 5'den fazla alkol kullanımı olanlarda kardiya dışı mide kanseri gelişimi sigara kullanmayanlara göre 5 kat artmıştır (11).

c) Helicobacter pylori: Hp enfeksiyonu mide kanserinde suçlansa da tek başına mide kanseri gelişmesi için yeterli değildir. İlk defa 1982'de izole edilen Hp, 1994 yılında AICR tarafından insan karsinojeni olarak kabul edilmiştir (12). Hp enfeksiyonun tetiklediği inflamasyon mukozada atrofi ve intestinal metaplaziye neden olmaktadır. Mide kanseri insidansının yüksek olduğu ülkelerde tipik olarak Hp enfeksiyonu prevalansı yüksektir. Gelişmiş

ülkelerde Hp enfeksiyonu oranı düştükçe mide kanseri insidansı azalmaktadır (13). Hp midenin kardiya yerleşimli tümörlerinde riski arttırmazken kardiya dışı tümörlerde kanser gelişme riskini 6 kat arttırmaktadır (14).

d) Obezite: Artmış vücut ağırlığı ve obezite mide kanseri insidansı artışıyla ilişkilidir (15). 9492 mide kanserli hasta üzerinde yapılan meta analizde VKI (Vücut Kitle İndeksi) 25 üzerinde olanlarda kardiya yerleşimli mide kanseri görülme sıklığı 1.5 kat artmıştır.

e) NSAID (Non Steroidal Antiinflatuar Drugs): Düzenli NSAID kullanımı mide kanseri gelişimine karşı bağımsız koruyucu faktör olarak bulunmuştur (HR:0,79) (16). Bu koruyucu etkisi HP enfeksiyonu olanlarda daha fazladır (HR:0,52).

f) EBV (Epstein-Barr virüs) : EBV enfeksiyonu birçok malignite özellikle nazofarengiyal karsinom ile ilişkilidir. Korelilerin yaptığı bir çalışmada 89 mide kanserli hastanın 12'sinde (%13) EBV gözlenirken 27 kontrol grubunun hiçbirinde EBV'ye rastlanılmamıştır (17). Bugün dünyada mide kanserlerinin %5-10'nu EBV'a bağlıdır (18). EBV ile ilişkili mide kanserlerinin farklı klinikopatolojik özellikleri vardır. Erkeklerde daha sıktır, kardiya ve cerrahi güdük bölgesi yerleşimlidir, lenfositik infiltrasyon gözlenebilmektedir, daha iyi prognozlidir ve büyük çoğunluğu diffüz tip histolojisindedir (19,20,21).

g) Sosyoekonomik durum: Düşük sosyoekonomik toplumlarda distal mide kanseri görülme oranı iki kat artmıştır. Zıt olarak proksimal mide kanserleri yüksek sosyoekonomik toplumlarda gözlenmektedir (22,23).

h) Mide cerrahisi: Mide cerrahisi geçirmiş kişilerde 15-20 yıl sonrasında mide kanseri gelişme riskinde artış gözlenmektedir, bu risk seneler geçtikçe artmaktadır. Yapılan iki meta analizde rölatif risk yapılan cerrahiye, lokalizasyona göre değişmekle birlikte 1.5-3.0 kat artmıştır. Billroth II prosedüründe (gastrojejunostomi) Billroth I'e (gastroduodenostomi) göre risk daha fazladır. Bu durum alkali safra ve pankreatik sıvıları regürjitasyonuna bağlanmaktadır (24).

i) Ailevi mide kanseri: Mide kanserli hastaların %10-15'nde aile hikayesi vardır (25). Mide kanserli hastaların birinci derece akrabalarında mide kanseri görülme riski iki üç kat artmıştır.

2.1.4. Patogenez :

Mide adenokarsinomları diffüz ve intestinal tip olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. İntestinal tip daha sık gözlenmektedir. Morfolojisi intestinal sistemden kaynaklanan adenokarsinoma benzemesinden dolayı bu şekilde tanımlanmıştır. İntestinal tipte kanser gelişimi için kabul edilen hipotezde; kronik gastrit önce kronik atrofik gastrite, intestinal metaplaziye sonrasında displazi ve adenokarsinoma dönüşmektedir (26). Örnek verilecek olursa;

-Hp enfeksiyonu, pernisiyoz aneminin neden olduğu uzun süreli kronik superfisiyal gastrit önce kronik atrofik gastrite ve intestinal metaplaziye dönüşmektedir.

-Gastrik atrofiye eşlik eden parietal hücre kaybına bağlı olarak asit üretimi ve luminal askorbik asit seviyeleri azalmaktadır. Buna sekonder olarak gastrin seviyeleri artmaktadır buda mide epitel hücrelerini proliferasyonuna sebep olmaktadır.

-Kronik inflamasyon ve oksidatif stres ayrıca epitel hücrelerinin hasarına, serbest radikal üretiminde artışa, hücre dönüşümünde artışa ve kanser gelişimine neden olmaktadır.

Daha az sıklıkta gözlenen diffüz tip mide kanserinde ise hücreler arası adezyon olmamaktadır ve tümör komşu dokuları tübül ve gland formasyonu yapmadan invaze edebilmektedir. Diffüz tip kanserlerin metastatik potansiyelleri yüksektir, kolayca progrese olabilmektedir ve prognozaları kötüdür (27). Diffüz kanserlerde ana kanserojenik olay E-cadherin ekspresyonunun yokluğudur. E-cadherin hücreler arası adezyonu oluşturan ana proteindir (28). E-cadherini kodlayan CDH1 geninde oluşan mutasyonlar diffüz tip mide kanserlerin patogenezinin temelini oluşturmaktadır

2.1.5. Histolojik sınıflama

Adenokarsinom midenin malign tümörlerinin %95'ni oluşturmaktadır ve genellikle mide kanseri terminolojisi ifade edilen midenin adenokarsinomudur. Gastrik mukozada normal lenfoid doku bulunmamasına rağmen, mide gastrointestinal sistem lenfomalarının en sık gözleendiği organdır. Skuamoz hücreli kanser, adenoakantoma, karsinoid tümörler, leyomyosarkomlar midenin diğer tümörleridir. Midenin malign tümörleri morfolojik ve mikroskopik özelliklerine göre sınıflandırılırlar. Makroskopik sınıflamada en sık Bormann klasifikasyonu kullanılır. Bu sınıflamaya göre mide kanserleri dört tipe ayrılmaktadır. (Tablo 2.1).

Tablo 2.1: Bormann Sınıflaması

Tıp I Polipoid
Tıp II Ülseratif
Tıp III Ülsero-İnfiltratif
Tıp IV Diffüz İnfiltratif

Mide kanserlerinin mikroskopik sınıflamasında WHO sınıflaması kullanılmaktadır. WHO sınıflaması tablo 2.2'de gösterilmiştir.

Mide kanserleri sınıflamasında kullanılan diğer bir sınıflamada Lauren sınıflamasıdır. Buna göre mide kanserleri intestinal ve diffüz olmak iki gruba ayrılmaktadır. Bu sınıflama mide adenokarsinomlarını epidemiyolojik etiyolojik ve klinik davranışlarına göre ayırmaktadır (27).

Tablo 2.2: WHO'nun mide kanserleri sınıflaması

Epitelyal tümörler	Non epitelyal tümörler
Intraepitelyal neoplazi- Adenom	Leyomyoma
Karsinom	Schwannoma
Adenokarsinom	Granüler hücreli tümör
İntestinal tip	Glomus tümörü
Diffüz tip	Leyomyosarkom
Papiller adenokarsinom	Kaposi sarkom
Tubuler adenokarsinom	
Musinöz adenokarsinom	
Taşlı yüzük hücreli adenokarsinom	Malign lenfomalar
Adenoskuamoz karsinom	Marjinal zon B hücreli lenfoma
Skuamoz hücreli karsinom	Mantle hücreli lenfoma
Küçük hücreli karsinom	Diffüz büyük B hücreli lenfoma
Sınıflamayan karsinom	Diğerleri
Diğerleri	
Karsinoid tümörler	

2.1.6. Tanı :

Malesef erken evredeki mide kanserlerinin çoğu asemptomatiktir. Tanı konulduğunda hastaların %50'si lokorejyonel safhayı geçmiştir ve lokorejyonel tümörlerin ancak yarısına küratif cerrahi uygulanabilmektedir. Tanının geç konulmasının ana sebebi semptomların nonspesifik olmasıdır. 18,363 mide kanserli hastada en sık gözlenen semptomlar tablo 2.3'de gösterilmiştir Cerrahi olarak kürabl mide kanserleri daha çok tarama programlarının uygulandığı yerlerde yakalanabilmektedir. Tarama programları mide kanseri insidansının yüksek olduğu Japonya, Venezüella, Şili gibi ülkeler dışında uygulanmamaktadır. Serum pepsinojen

testi atrofik gastrit gibi kanser gelişim riski bulunanlarda kullanılan yeni bir tarama yöntemidir (29)

Tablo 2.3: Mide kanserinde görülen semptomlar

Semptom	Oran (%)
Kilo kaybı	62
Karın ağrısı	52
Bulanti	34
Disfaji	26
Melena	20
Erken doyma	18
Ülser tipi ağrı	17

Gastrik mukozanın değerlendirilmesinde endoskopi ve radyolojik görüntüleme yöntemleri kullanılmaktadır.

Üst GİS (Gastrointestinal sistem) endoskopisi gastrik mukozayı değerlendirmede etkili bir yöntemdir. Baryumlu grafilere göre motilite, dıştan bası, luminal obstrüksiyonun derecesini belirlemede daha az bilgi vermektedir. Endoskopide şüpheli bölgeden biyopsi alınarak tanı konulabilmektedir. Tek biyopsinin mide kanseri tanısında sensitivitesi %70'ken ülser sınırlarından ve tabanından alınan yedi farklı biyopsi ile sensitivite %98'in üstüne çıkmaktadır (30). Linitis plastika olarak adlandırılan diffüz tip mide kanserlerinin endoskopik olarak tanı konulması zordur. Tümör submukoza ve muskuler tabakayı invaze etme eğiliminde olduğundan yüzeysel olarak alınan biyopsiler yanlış negatifliğe neden olabilmektedir (31). Linitis plastikaya çift kontrastlı baryumlu grafilerle daha rahat tanı konulabilmektedir. Baryumlu grafilerin mide kanserinde avantajları maliyetinin düşük olması, yan etki ve komplikasyonlarının az olması, sensitivitesinin yüksek olmasıdır (%85-95) (32). Ancak bu yöntemle benign tümörlerin malign tümörlerden ve lenfomadan ayırımını yapmak zordur.

CEA, CA19.9 , CA72.4, CA50 gibi tümör belirteçleri mide kanserinin tanısında yeri yoktur. CEA ve CA19.9 mide kanserli hastaların %30-40'nda

yükselebilmektedir. Yüksek serum değerleri hastalığın ileri evrelerinde görülmektedir. Bugün tümör belirteçleri taramadan ziyade hastalığın takibinde ve tedaviye yanıtın gözlenmesinde kullanılmaktadır (33).

2.1.7. Evreleme :

Tedavinin planlanması ve prognozun belirlenmesinde evreleme çok önemlidir. Mide kanseri evrelemesinde; anatomik lokalizasyon ve lenf nodu istasyonlarını kullanan Japon evreleme sistemi ile dünyada daha yaygın olarak kullanılan en son 2010 yılında Amerikan Birleşik Kanser Komitesi tarafından yayınlanan TNM evreleme sistemi (AJCC Cancer Staging Manual, Seventh Edition, 2010) kullanılır (34).

Tablo 2.4: Mide kanserinde TNM Evreleme sistemi I

Primer Tümör (T)	
TX	Primer tümör değerlendirilemedi
T0	Primer tümör mevcut değil
Tis	İnsutu karsinom, lamina propria invazyonu yok
T1	Lamina propia, muskularis mukoza, submukoza invaze
T1a	Lamina propia, muskulari mukoza invaze
T1b	Submukoza invaze
T2	Muskularis propia invaze
T3	Subseroza invaze, visseral periton, komşu doku invazyonu yok ^{*^}
T4	Seroza (Visseral periton) veya komşu dokuya invaze
T4a	Seroza (Visseral periton) invaze
T4b	Komşu dokuya invaze
Lenf nodu (N)	
NX	Regional lenf nodu değerlendirilemedi
N0	Regional lenf nodu metastazı yok
N1	Metastazlı lenf nodu sayısı 1-2
N2	Metastazlı lenf nodu sayısı 3-6
N3	Metastazlı lenf nodu sayısı 7 ve daha fazla
N3a	Metastazlı lenf nodu sayısı 7-15
N3b	Metastazlı lenf nodu sayısı 16 ve daha fazla
Uzak Metastaz (M)	
M1	Uzak metastaz yok
M2	Uzak metastaz var

- *Komşu dokular dalak, transvers kolon, karaciğer, diyafram, pankreas, karın duvarı, böbrek ince bağırsak, retroperitondur.
- ^Tümör muskuler propia penetre edip gastrokolik, gastrohepatik ligamanlara doğru uzanabilir. Eğer visseral periton sağlamısa T3, omentum ve gastrik ligamanları örten visseral periton perforasyon olursa T4 tümör olarak değerlendirilir.

Tablo 2.5: Mide kanserinde TNM Evreleme Sistemi II

Evre 0	Tis	N0	M0
Evre IA	T1	N0	M0
Evre IB	T2	N0	M0
	T1	N1	M0
Evre IIA	T3	N0	M0
	T2	N1	M0
	T1	N2	M0
Evre IIB	T4a	N0	M0
	T3	N1	M0
	T2	N2	M0
	T1	N3	M0
Evre IIIA	T4a	N1	M0
	T3	N2	M0
	T2	N3	M0
Evre IIIB	T4b	N0	M0
	T4b	N1	M0
	T4a	N2	M0
	T3	N3	M0
Evre IIIC	T4b	N2	M0
	T4b	N3	M0
	T4a	N3	M0
Evre IV	Herhangi bir T	Herhangi bir N	M1

2.1.8. Tedavi:

Tedavi hastalığın evresine göre planlanır. Tedavide cerrahi, kemoterapi, kemoradyoterapi, hedefe yönelik tedaviden oluşan multi-disipliner bir tedavi yaklaşımı uygulanır.

Cerrahi tedavi, küratif veya palyatif amaçlarla yapılabilmektedir. Küratif cerrahide total veya subtotal mide rezeksiyonu ile birlikte bölgesel lenf nodları çıkarılmaktadır. Total gastrektomi midenin proksimal, orta yerleşimli ve diffüz tip kanserlerinde uygulanmaktadır (35). Distal yerleşimli tümörlerde uygulanan total gastrektominin subtotal gastrektomiye sağkalım açısından avantaj sağlamadığı ve morbidite, mortaliteyi arttırdığı gözlenmiştir (36,37). Lenf nodu disseksiyonu olarak D1, D2, D3 disseksiyon uygulanabilmektedir. D1 disseksiyonda perigastrik, D2 disseksiyonda hepatik, sol gastrik, çölyak, splenik arter ve splenik hilus bölgesindeki lenf nodları çıkarılmaktadır. D3 disseksiyonu ise D2 disseksiyona ilaveten porta hepatik ve periaortik lenf nodlarının çıkarılmasıdır (38). Genişletilmiş lenf nodu disseksiyonunun sağkalımı uzattığına dair birçok retrospektif yayınlar bulunsa da (39) Asya ve batı toplumunda yapılan prospektif randomize çalışmalarda D2 disseksiyonunun D1 disseksiyona, D3 disseksiyonun D2 disseksiyona sağkalım avantajı sağladığı gösterilememiştir (40-42) Bunun yanında metastatik mide kanserinde semptomatik amaçla palyatif cerrahi girişimler de uygulanabilmektedir.

Sadece cerrahi uygulanan hastalarda mide kanseri rekürrens riski oldukça yüksektir. Rekürrensi azaltmak için adjuvan tedaviler denenmiştir. Radyoterapinin adjuvan kullanımı ile yapılan iki randomize çalışmada vardır. Bu çalışmalarda cerrahiye ilaveten radyoterapi vermenin sağkalıma katkısı bulunamamıştır (43). Neoadjuvan radyoterapi kullanımı ile ilgili yapılan çalışmada cerrahi öncesi radyoterapi tek başına cerrahi ile karşılaştırılmıştır. İki kol arasında sağkalım açısından fark bulunamamıştır (44).

Mide kanserinde adjuvan kemoterapi kullanımı ile ilgili otuzdan fazla randomize çalışma vardır. Bunlarının çoğunun sonucu olumsuz olarak

bulunmuştur. Mide kanserinde sağkalım avantajının gösterildiği çalışmalar INT-0116, MAGIC ve CLASSIC çalışmalarıdır.

INT-0116 çalışmasında cerrahi rezeksiyon uygulanan 556 hasta iki kola ayrılmıştır. Bir grup tedavisiz izlenirken diğer gruba kombine kemoradyoterapi verilmiştir. Çalışmaya alınan hastaların %68'inde tümör T3-T4'dür ve %85'inde oranında nodal tutulum vardır. 3 yıllık hastalıksız sağkalım izlem kolunda %31, tedavi kolunda %48'dir. Genel sağkalım tedavi kolunda %50, izlem kolunda %41'dir. Medyan sağkalım 27 aya karşılık 36 ay olarak tedavi kolunun lehine bulunmuştur (45).

MAGIC çalışmasında rezektabl 503 hasta (mide %74, distal özefagus %11, özefagogastrik bileşke adenokarsinomları %15 oranında) tek başına cerrahi ile cerrahi öncesi ve sonrası ECF (Epirubicin, Cisplatin, 5-Fluorouracil) kemoterapisi kollarına ayrılmıştır. Tedavi kolunda izlem koluna göre küratif cerrahi %79'a %70 oranında uygulanmıştır. Bu çalışmada tedavi genelde iyi tolere edilmiş. Nötropeni %23 oranında, ciddi toksite %12 oranında gözlenmiş. 5 yıllık sağkalım oranı tedavi kolu lehine %36'ya %23' olarak bulunmuştur (46).

2011 ASCO'da (American Society Clinical Oncology) sunulan CLASSIC çalışmasında D2 diseksiyon yapılmış evre II-IIIB hastalar izlem koluyla XELOX (Capecitabine-Oxaliplatin) kemoterapisi kollarına ayrılmıştır. 3 yıllık hastalıksız sağkalım kemoterapi kolunda izlem koluna göre daha iyi bulunmuştur (%74,'e karşın %60).

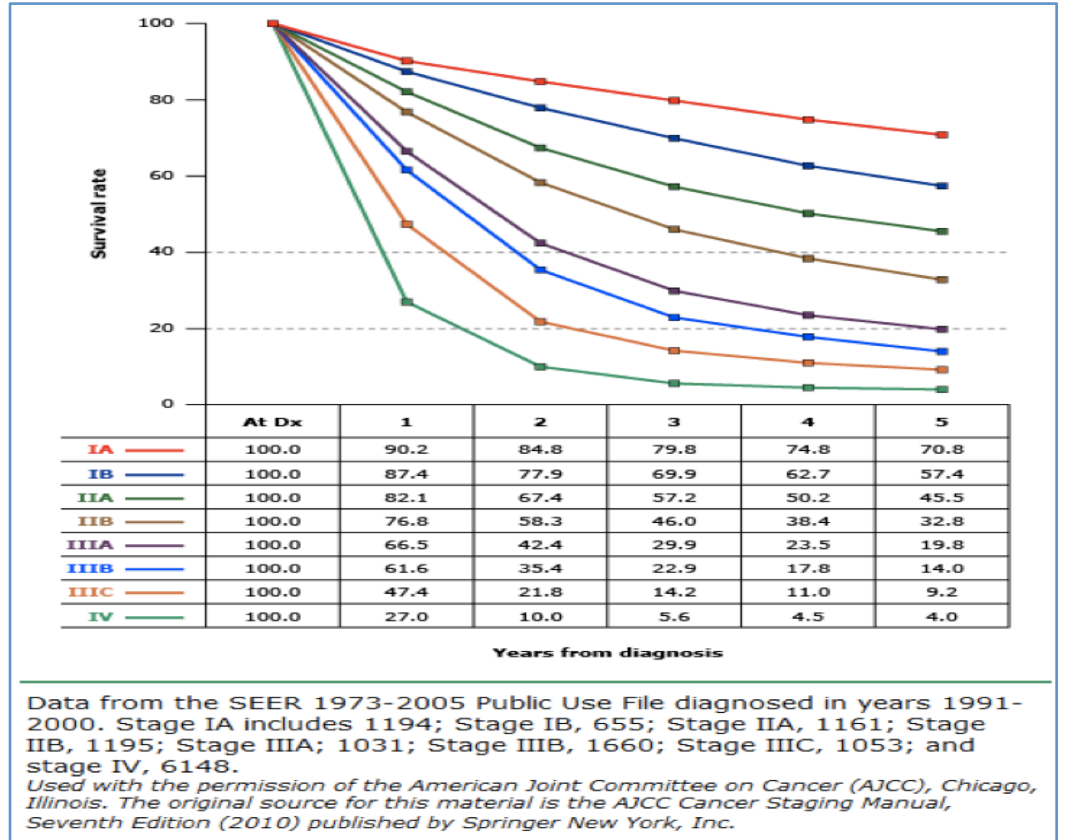
Metastatik hastalıkta uygulanan kemoterapi daha çok palyasyon, sağkalımın uzatılması ve yaşam kalitesinin artırılması amaçlıdır. Üç meta-analiz sonucunda kemoterapi en iyi destek bakım tedavisine göre hastalıksız sağkalımı 6 ay daha fazla süre uzattığı görülmüştür (47). Kullanılan kemoterapi rejimlerine örnek olarak DCF (dosetaksel, cisplatin, infuzyonel 5-FU), ECF (epirubisin, cisplatin, 5-FU), ELF (etoposid, 5-FU, leucovorin), Irinotekanın cisplatin veya 5-FU kombinasyonları verilebilmektedir.

Mide kanserinin tedavisinde son yıllarda hedefe yönelik tedavi de kullanıma girmiştir. Trastuzumab HER2 pozitif mide kanserinde hedef yönelik tedavide kullanılan bir monoklonal antikordur. Mide kanserinde HER2

ekspresyonu ortalama %25 oranında gözlenmektedir (48). Intestinal tipte diffüz tip mide kanserine göre HER2 ekspresyon oranı daha fazladır (%32'ye %6) TOGA çalışmasında FISH (florasan insitu hibridizasyon) yöntemiyle HER-2 pozitif metastatik mide kanserli hastalarda kemoterapiye trastuzumab eklenen grupta medyan sağkalım 13.8 ay bulunurken sadece kemoterapi alan grupta sağkalım 11.1 ay bulunmuştur (49).

2.1.9. Prognoz:

Gelişmiş ülkelerde son üç dekattır mide kanseri insidansında azalma olmasına rağmen halen dünyada mide kanseri en sık görülen kanserlerden biridir. Prognozu kötüdür ve 5 yıllık sağkalım oranı ortalama %20'dir (50). Mide kanserinin evrelere göre sağkalım oranı gösterilmiştir (Şekil 2.2).



Şekil 2.2: Mide kanserinde evrelere göre sağkalım oranları

Cerrahi sonrası rekürrens ana problem olup, sağkalımla ilişkili olduğu düşünülen birçok prognostik faktör tanımlanmıştır.

Mide kanserinde cerrahi sonrası geride kalan rezidual tümör dokusu R olarak sınıflandırılır. R0'da mikroskopik veya makroskopik olarak rezidual tümör yoktur. R1'de mikroskopik, R2'de makroskopik olarak rezidual tümör bulunmaktadır. Rezidual tümör dokusu önemli bir prognostik faktördür.

Diğer önemli iki prognostik faktör lenf nodu tutulumu ile tümörün mide duvarı boyunca penetrasyonudur. Japonya, Avrupa, ABD'den gelen birçok raporda ileri T evresinde sağkalım daha kötü bulunmuştur (51). Geçmişte N sınıflaması lenf nodlarının anatomik lokalizasyonlarına göre yapılmıştır. Bu sınıflamanın prognostik önemi bulunsada pratik bir yöntem olarak bulunmamıştır. 1997 yılında AJCC N değerlendirilmesini tutulan lenf nodu sayısına göre belirlemiştir (52). Yapılan birçok çalışmada lenf nodu oranının (metastatik lenf nodunun diseke edilen total lenf nodlarına oranı) prognostik faktör olduğu görülmüştür (53).

Nadir görülen midenin küçük hücreli ve taşlı yüzük hücreli kanseri dışında diğer histolojik tiplerin prognostik önemi bulunmamıştır. Lauren (intestinal, diffüz) sınıflaması, tümörün gradı önemli diğer histolojik prognostik faktörlerdir. Bormann tarafından tanımlanan tümörün makroskopik sınıflamasının prognostik önemi birçok çalışmada gösterilmiştir. Bormann tip I, II (polipoid, ülser kanserler) tümörlerin prognozu tip III, IV'e (infiltratif kanserler) göre daha iyi bulunmuştur (54).

Tümör boyutunun prognozla ilişkisi tartışmalıyken, tümör volümü prognostik olarak önemli bulunmuştur. Tümörün yerleşim bölgesi de prognostik olarak önemlidir. Proksimal (kardiya, gastroözefagiyal) tümörlerin prognozu distal yerleşimli tümörlere göre daha kötüdür. Lenfatik, venöz ve perinöral invazyon kötü olarak bulunan prognostik faktörlerdir.

Maehara ve arkadaşlarının yayınladığı bir raporda invazyon derinliği, lenf nodu metastazı, lenf nodu disseksiyonu, tümör boyutu, karaciğer metastazı, peritoneal yayılım, lenfatik ve vasküler yayılım bağımsız prognostik faktör olarak bulunmuştur (55).

Genç yaş birçok çalışmada kötü prognostik faktör olarak gösterilse de bir çalışmada genç hastaların prognozunun yaşlı hastalardan farklı olmadığı gösterilmiştir (56). Bir çalışmada kadın hastaların prognozu erkeklerden daha

iyi bulunurken diğerk çalışmalar bunu desteklememiştir (57). Çoğu çalışmada genç hastalarda prognoz yaşlı hastalara göre daha kötü bulunmuştur (51). Preoperatif CEA değerleri yüksek olan hastaların prognozu düşük değerli hastalara göre daha kötü bulunmuştur (58).

Son dekatta birçok çalışmada genetik değişikliklerin mide kanseri gelişiminde ve progresyonunda rolü olduğu gösterilmiştir. Moleküler patoloji hastalığın patogenezinin anlamamıza yardımcı olması dışında bize birçok prognostik belirteç tanımlamıştır. Azalmış alfa catenin artmış p53 ekspresyonu lenf nodu metastazı için prediktif bulunmuştur (59). Rezektabl mide kanserli hastalarda tümör içi artmış Foxp3+ Treg (Regülatör T hücreleri) ve Foxp3+/CD8+ oranı kötü prognostik bulgu olarak bulunmuştur (60). Yie S ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada mide kanserli hastalarda HLA-G ekspresyonu yüksek olanların prognozu düşük olanlara göre daha kötüdür (61).

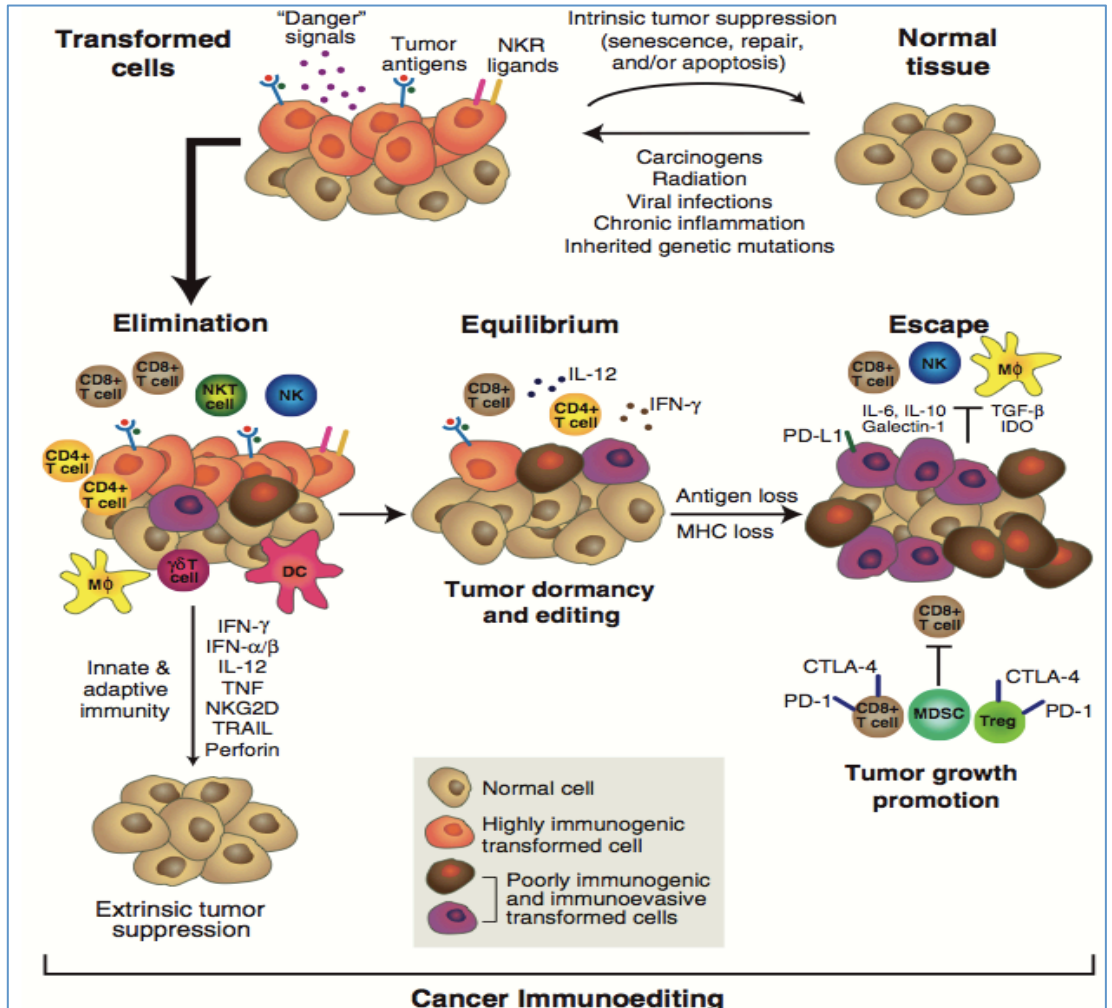
2.2. İMMÜN SİSTEMİN TÜMÖR GELİŞİMİNDEKİ ROLÜ:

İmmün sistem tümör gelişim sürecinde önemli bir role sahiptir. İmmünsüpresif hastalar ve immünsüpresif tedavi gören transplantasyon hastalarındaki malignite görülme sıklığındaki artışın görülmesiyle tümör-antitümör yanıt arası ilişki dikkat çekmiştir. Bu hastalarda Kaposi sarkomu, Hodgkin Lenfoma gibi maligniteler artmıştır. İmmün sistemin tümör gelişimi ve ona karşı defansta rol aldığının bir diğerk göstergesi de TIL'rin tümör dokusunda bulunmasıdır. Meme, mide, kolon, melanoma, over, rektum kanseri gibi birçok kanserde TIL varlığının sağkalım verileriyle birlikte olduğu gösterilmiştir.

T lenfositler tümöre karşı immün yanıtta ana hücre grubudur. CD4+ T lenfositler aracılığı ile, CD8+ T lenfositler hedef tümör hücrelerinin öldürülmesinde ana rolü oynamaktadır. Timomektomi yapılan farelerde spontan ve kimyasal uyarılmış kanser gelişiminde beklenildiği kadar artış

görülmemiştir. Bu noktada başka hücrelerin de rol aldığı bulunmuştur. Bu hücrelerden en iyi tanımlananı NK hücreleridir (62).

Tümöre karşı immünolojik yanıtta görev alan süreçler tümörün immün gözetimini (immunosurveillance) olarak tanımlanabilir ancak tümör varlığında gelişen immünolojik olayların tümü bununla açıklanamaz. Tümöre karşı savunma yanında immünitenin tümör gelişimini artırıcı ve şekillendirici etkisi de olmaktadır. Bu nedenle bu iki kavramı da içeren kanser immüdüzenlenmesi (immunoediting) kavramı ortaya atılmıştır. Kanser immüdüzenlenmesi üç faz içermektedir. Bunlar eliminasyon, denge ve kaçış fazıdır (Şekil 2.3). HLA-G bu üç fazın düzenlenmesinde rol almaktadır (63).



Şekil 2.3: Kanser İmmüdüzenlenmesi

2.2.1. Eliminasyon fazı:

Doğal ve adaptif immün sistemin birlikte çalışarak tümörün gelişiminin engellenebildiği fazdır. Normal dokular tümöral hücrelere dönüşürken yüzeyinde taşıdıkları tümör antijenleri, NKR ligandları, NK hücresi, makrofajlar, dendritik hücreler, $\gamma\delta$ T lenfositler gibi doğal immün hücreleri aktive etmektedir. Bu hücrelerden salınan IFN- γ , IL-12, perforin gibi sitokinler tümör spesifik adaptif immün sistem yanıtını kolaylaştırmaktadır (64) ve tümör hücrelerin ölümüne neden olmaktadır.

Dendritik hücreler (DC) ölü tümör dokularını temizleyip antijen sunumu için direne lenf nodlarına göç etmektedir. Daha fazla makrofaj ve NK hücreleri sürece katılmaktadır. Bu hücrelerce sekrete edilen maddeler tarafından tümör hücreleri apoptoza yönlendirilir ya da yapılan serbest radikaller ile tümör ölümü gerçekleşmektedir. Lokal drenajı alan lenf nodunda dendritik hücreler tümör antijenlerini MHC denen moleküllerle beraber lenfositlere sunmaktadır. Th1 hücrelerin aracılığı ve MHC sınıf I molekülü ile CD8+ lenfositlere antijen sunularak CD8+ sitotoksik T lenfositlerin uyarılması mümkün olmaktadır. Bu tümör spesifik immün yanıtın en önemli noktasıdır. MHC sınıf II molekülü ile de CD4+ lenfositlerin sürece katılması sağlanmaktadır (62).

2.2.2. Denge fazı:

Tümör hücre varyantları nadir olarak eliminasyon fazında hayatta kalır ve denge fazına girer. Denge fazı tümör immüdüzenlenmesinin en uzun fazıdır, hatta yaşam boyu sürebilmektedir. Denge fazında eliminasyon fazından farklı olarak tümör hücrelerini uyur halde bulunmaktadır. IL-12, IFN- γ , CD4+ ve CD8+ T lenfosit adaptif immüniteden sorumludur.

2.2.3. İmmün kaçış fazı:

Bu fazda tümör hücreleri immün hücrelerin kendilerini tanımasına ve yok etmesine karşı yetenek geliştirmiştir. Artık tümör hızlıca gelişip görünür hale gelmektedir. Tümör hücrelerinin immün sistemden kaçışı birçok mekanizma ile olabilmektedir.

a)Tümör antijen sunumunda değişiklik yaparak immün sistemden kaçabilmektedir. Tümör antijenlerinin dendritik hücrelerce tanınması ko-stimulatör moleküllerce başarılır. Bu moleküllerden B7-1 (CD80), B7-2 (CD86) ve CD40 genellikle tümör hücrelerince eksprese edilemezler. Bu sürecin defektif olması CD4 ve CD8+ T lenfositlerce tanınmamasına ve sonuçta T lenfosit anerjisine neden olmaktadır (62).

b)Tümör BCL-2, STAT3 gibi anti-apoptotik moleküllerin ekspresyonunu arttırarak immün sistemin sitotoksik etkilerinden korunabilmektedir.

c)VEGF, galectin, IL-10, indoleamine 2,3-dioksijenaz (IDO) gibi inhibitör sitokinler immün sistemde supresif etki göstermektedir. VEGF'ün in vitro çalışmalarında hemopoetik kök hücre, NFkB süpresyonu ile dendritik hücre maturasyon ve diferansiyasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir. Akciğer, meme, ve baş-boyun kanserli hastalarda plazma VEGF artmış düzeyi ile matür dendritik hücre sayısında azalma saptanmıştır. IL-10 dendritik hücre maturasyonunu inhibe etmektedir. Başlıca monositlerden sekrete edilmekle beraber CD4+ CD8+ regülatör T hücrelerin bir grubunda eksprese edilmektedir.

d)Regülatör T hücreleri ve myeloid kökenli süpreser hücreler (MDSC) tümör hücrelerinin konak immün sisteminin immün yanıtından kurtulmasında etki gösteren lenfosit grubudur. CD4+ Treg hücreleri, CD25 ve Foxp3 eksprese ederler. Bu hücreler tarafından salınan IL-10, TGF-B immün sistemi indirekt olarak baskılamaktadır. Ayrıca Treg direkt hücre-hücre arası kontağı inhibe etmektedir.

e)NK hücre fonksiyonunda bozukluk olduğunda tümör immün sistemden kaçabilmektedir. NK hücreleri iki alt gruba ayrılmaktadır. Bunların yaklaşık %90'ı CD56 yüzey molekülünü düşük düzeyde eksprese etmektedir. Bu NK hücre grubu daha sitotoksiktir ve yüksek oranda CD16, düşük düzeyde CD25 eksprese etmektedir. %10 oranındaki bir NK hücre topluluğu ise yüksek CD25, CD56 ekspresyonu ve düşük CD16 ekspresyonu yapmaktadır. Bu hücre grubu daha çok IL-2 stimülasyonuna yanıtta ve immünregulasyonda görev almaktadır.

2.3. HLA-G VE İMMÜN SİSTEM:

HLA-G trofoblastik hücreler, timik epitel dışında normal dokulardan eksprese edilmemektedir. Gebelikte fetüsün maternal hücreler tarafından reddini HLA-G tarafından sağlandığının gösterilmesinden sonra benzer stratejiyle tümör hücrelerinin de immün sistem tarafından yok edilmesinin HLA-G aracılığıyla olabileceği araştırılmaya başlanmıştır. HLA-G'nin melanoma, akciğer kanseri, over kanseri, mide kanseri, endometriyal kanser, meme kanseri, kolon kanseri, mesane kanseri, mide kanseri gibi birçok kanser türünde eksprese edildiği gösterilmiştir.

HLA-G'nin immünsüpresif etkisini gösteren en önemli iki kanıt hamilelikte ve organ transplantasyonunda konağın kendinden olmayan dokulara karşı yanıt oluşturmamasıyla ilgili yapılan çalışmalara dayanmaktadır. Hamilelerde plasental trofoblast hücreleri yüksek düzeyde HLA-G eksprese edip anne ile fetüs arasındaki immün reaksiyonu engellemektedir. İn vitro fertilizasyonda implantasyonun başarı şansını göstermede çözümlü (soluble-s) HLA-G kullanılmaya başlanmıştır (65).

HLA-G non-klasik (klas Ib) MHC klas I molekülüdür. HLA-G geni 6ncı kromozoma lokalizedir, diğer MHC klas I moleküllerine benzer özellikler gösterse de ekspresyon paterni, peptit bağlayıcı bölgeleri, immünolojik fonksiyonları farklıdır. HLA-A, HLA-B ve HLA-C gibi MHC klas Ia moleküllerin tümörde ekspresyonları genellikle azalmıştır. Bu da kanser gelişiminde

çeşitli MHC moleküllerinin farklı ekspresyon paternlerinin sorumlu olduğunu göstermektedir (66).

HLA-G'nin dört membrana bağlı (mHLA-G), üç soluble (çözünebilir sHLA-G) olmak üzere toplam yedi farklı izoformu vardır. Malign tümörlerde membrana bağlı formlara ilave olarak sHLA-G'ninde plazma seviyeleri yüksektir. Bu bulgular HLA-G'nin immün yanıtı hücrelere direkt temas ve sekrete edilen sHLA-G vasıtasıyla düzenlediğini göstermektedir. Klinik çalışmalar serum, effüzyon gibi vücut sıvılarında tespit edilen monomerik ve dimerik sHLA-G'nin mHLA-G'ye benzer biyolojik fonksiyon taşıdığını göstermektedir. Buda bize bazen tümör dokusunda HLA-G boyanması gösterilemese de sekrete edilen sHLA-G vasıtasıyla tümörün immün sistemden kaçabileceğini ortaya koymaktadır.

2.3.1. HLA-G ekspresyonunun düzenlenmesinde etkili faktörler:

Tümör hücrelerinde HLA-G ekspresyonunun düzenlenmesiyle ilgili mekanizmalar karışıktır. Epigenetik ve hipoksi, stres, hormon, sitokin, viral enfeksiyon gibi çevresel faktörler bu düzenlemede görevlidir.

HLA-G gen transkripsiyon aktivitesi DNA metilasyonu ve histon asetilasyonunu içeren cis-akting epigenetik mekanizmasıyla olmaktadır (67). HLA-G ekspresyonu düşük olarak kültüre edilmiş tümör hücreleri histon deasetilaz inhibitörü veya DNA demetilasyon ajanları ile tedavi edildiğinde HLA-G ekspresyonu artmaktadır. Hipoksi inducible factor 1 (HIF 1) hipoksik ortamda salgılanmaktadır. HLA-G ve birçok genin ekspresyonunun regülasyonunda görev almaktadır. Gazit ve arkadaşları hipoksiye bağlı EBV dönüştürdüğü B hücre serilerinde HLA-G ekspresyonunu arttığını göstermiştir. Buda onkojenik virüslerin hipoksiyle ilişkili HLA-G up-regulasyonunda rolünün olduğunu göstermektedir (68).

Tümör infiltre eden lenfositler tarafından salgılanan sitokinler tümörün mikro çevresini zenginleştirmektedir. Tümör hücrelerini infiltre eden sitotoksik

T lenfositler tarafından salgılanan granülosit makrofaj koloni situmulating faktör (GM-CSF) ve interferon gama tümör hücrelerinde HLA-G ekspresyonunu arttırmıştır. Ayrıca tümör hücrelerinden salgılanan IL-10 parakrin ve otokrin mekanizmalarla HLA-G ekspresyonunu arttırmaktadır. HLA-G ayrıca immün hücrelerden IL-10, IL-4 ve IL-3'ün ekspresyonunu arttırmaktadır. IL-10 ekspresyonunun yüksek olduğu tümörlerde antitümör yanıtı düşüktür (69).

Indoleamin 2,3 dioksijenaz (IDO) esansiyel aminoasit olan triptofanı tüketerek immün hücrelerin fonksiyonu bloke etmektedir. Plasenta ve tümör dokusunda gözlenen IDO ve HLA-G ekspresyonu tümörün immünsistemden kaçmasını ve fetüse karşı annenin toleransını sağlamaktadır. 1 metil kriptodan IDO fonksiyonunu bloke ederek HLA-G'nin tümör dokusundaki ekspresyonunu arttırmaktadır (71).

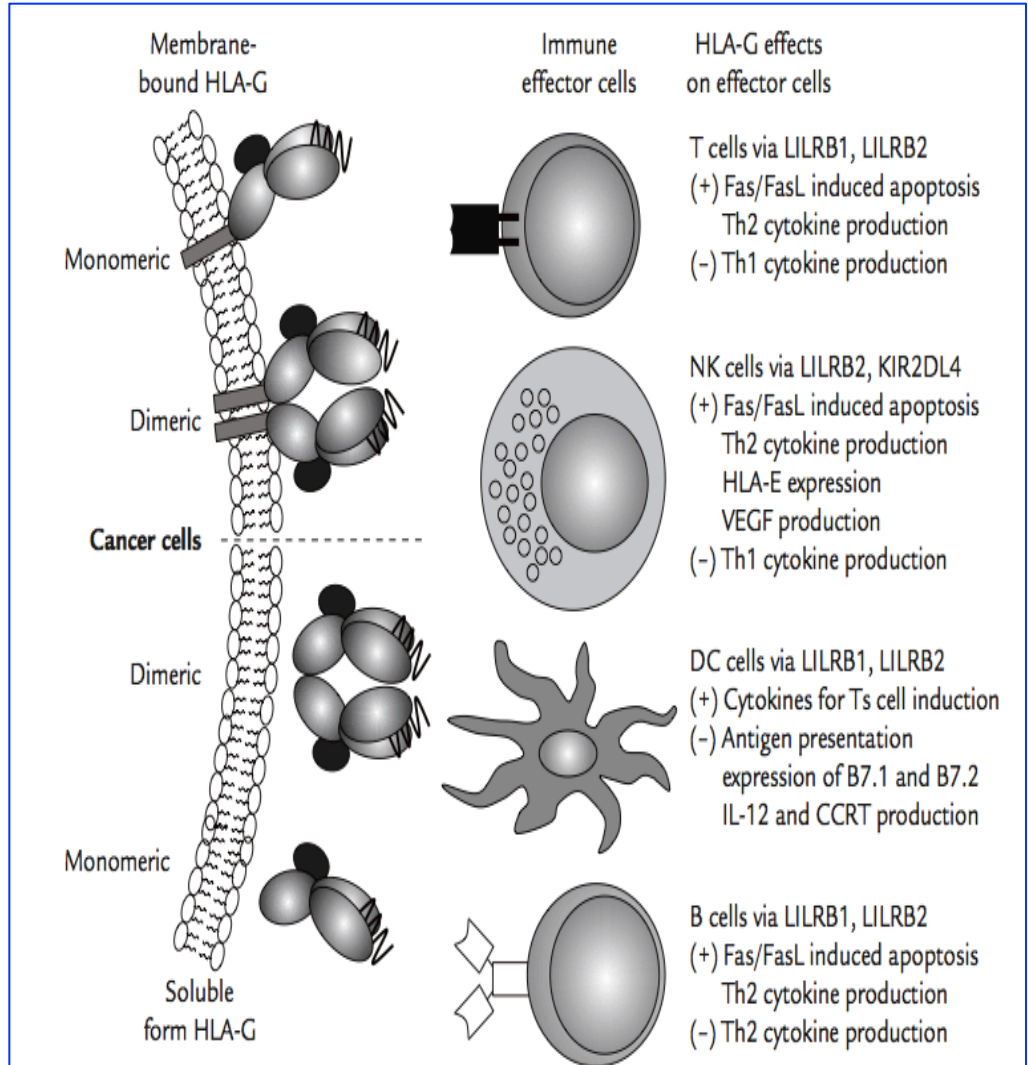
2.3.2. HLA-G'nin immünsüpresyon mekanizmaları:

Tümör gelişimindeki en önemli hücreler sitotoksik T Lenfositler, makrofajlar ve NK hücreleridir. İmmünoterapi tedavisindeki ilk çalışmalar tümör spesifik sitotoksik T Lenfositlere yönelik yapılmıştır. Preklinik ve klinik çalışmalarda T hücre bazlı yaklaşımlar bugüne kadar çok başarılı olamamıştır. Çünkü tümör klonlarının immün sisteminden kaçmaya yönelik yetenekleri vardır. Buda tümörün rekürensi ve önceki immünoterapiye direnç gelişimiyle sonuçlanmıştır.

Tümörün immün sistemden kaçışında mekanizmalardan biride HLA-G ekspresyonudur. HLA-G'nin LILRB1 (LIR1/ILT2/CD85J olarak bilinir) LILRB2 (LIR2/ILT4/CD85) ve KIR2DL4 (killer cell immunoglobulin-like receptor ,CD158D) gibi lökosit immünoglobulin benzeri reseptörlerle ilişkisi vardır (70). LILRB1 ve LILRB2'nin T ve B hücreleri, makrofaj, myeloid dendritik hücreler (DC) ve NK hücrelerinin yüzeyinde immünoresseptörleri bulunmaktadır. Bu ligandlara bağlandığında immün hücreleri baskılayabilmektedir. Ayrıca KIR2DL4 killer cell inhibitör ailesindedir ve HLA-G bu reseptöre bağlanarak

NK aracılıklı sitolitik aktiviteyi bloke etmektedir. Bu immünglobin benzeri reseptörler diğer HLA klas I ligandlarla etkileşse de en fazla HLA-G'ye afinitesi vardır.

HLA-G bağlayıcı ligandlar, sitoplazmik tirozin benzeri inhibitör reseptör taşımaktadır. HLA-G bu reseptöre bağlanınca protein tirozin fosfotazı aktive eder inhibitör kaskadı başlatır. Bunun sonucunda immün sistemde görevli hücreler ve bunların salgıladıkları sitokinler azalır. Tümör immünolojisi kanser hücreleri ile immün hücrelerin tümör mikroçevresinde kompleks diyaloglarını içermektedir. HLA-G'nin T lenfositler, NK hücreleri, DC, B Lenfositler arasındaki ilişki şekilde gösterilmiştir (Şekil 2.4).



Şekil 2.4: HLA-G ile NK, DC, B ve T Lenfositler arasında ilişki

2.3.3. HLA-G ve T Lenfositler arasındaki ilişki:

Hücre bağımlı imünite antijen sunan hücrelerin spesifik CD4+ T hücrelerini aktive etmesi ile başlar. Aktive CD4+ T hücreleri CD8+ T hücrelerini sitotoksik T hücrelerine dönüştürür. Fakat tümör hücreleri HLA-G eksprese ettiklerinde T hücre bağımlı tümör rejeksiyonu olmaz. Yapılan çalışmalarda HLA-G pozitif veya HLA-G transfer edilmiş tümör hücreleri CD4+ T hücreleri tarafından daha az tanınır ve CD8+ T hücreleri tarafından daha az sitolize edilir. HLA-G bağımlı T hücre immünitesinin inaktivasyonunda birçok mekanizma sorumludur. HLA-G ile CD4+ T hücreleri arasında LILRB1 ve LILRB2 reseptörleri üzerinden IFN- γ , IL-2, TNF- α gibi T-Helper 1 (Th1) sitokinlerin üretimini azaltırken IL-3, IL-4 ve IL-10 gibi T-helper 2 (Th2) sitokinlerin üretimin artırır. Bunun sonucunda sitotoksik T hücreleri inaktive olur ve anti-tümör antikor üretimi azalır (72). sHLA-G ayrıca CD8 T lenfositlere bağlanarak Fas/FasL yolağı üzerinden apoptozusu artırır. HLA-G'nin T hücrelerinde hücre siklusunun G1 fazından G2/M fazına geçişini bloke ettiği gösterilmiştir. HLA-G'nin immünsüpresif regülatör T hücrelerini artırıp immün tolerans geliştirdiği birçok çalışmada gösterilmiştir. Treg hücreleri T hücre aktivasyonunu bloke eder, T hücre ölümüne neden olup başlangıçta immün baskılamaya neden olsa da uzun dönemde immün kaçış ve toleransa neden olur. Son olarak HLA-G ekspresyonu sitotoksik T hücre ilişkili sitolizi HLA-E ve CD94/NKG kompleksi üzerinden bloke edebilmektedir. Bütün bunlar immün yanıtın kalkmasına ve tümör hücrelerinin T hücre saldırılarından korunmasına neden olmaktadır (73).

2.3.4. HLA-G ve NK hücreleri arasındaki ilişki:

NK hücreleri periferik kandaki lenfositlerin %3-5'ni oluşturur ve malign dönüşüme uğrayan hücrelerin tespit edilip eliminasyonundan sorumludur. NK hücrelerinin çoğu sitoplazmalarında büyük granül bulundurmaktadır ve sitotoksik etkilerini spesifik antikor olmadan gösterebilmektedir. Perforin ve granzim bu granüllerde bulunur ve hedef hücreyle karşılaştıklarında ortama

salınır. Perforin hedef hücrede endozomal trafiği bozarken, granzim hedef hücre içine girer ve bu hücrenin apoptoza uğramasını aracılık eder. FasL ve TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) NK hücrelerinden eksprese edilir. Bunlar tümör hücrelerinin reseptörlerine bağlanarak hedef hücrenin apoptoza uğramasını sağlamaktadır.

NK hücrelerinin aktivitesi üzerinde bulunan inhibe ve aktive edici reseptörler aracılığıyla olmaktadır. HLA-G LIR-2 ve KIR2DL4 reseptörleri aracılığıyla NK hücrelerinin inhibe eder. Ayrıca HLA-G HLA-E'yi attırıp indirekt olarak NK aracılıklı sitolizi bloke edebilmektedir (74).

2.3.5. HLA-G ve DC arasındaki ilişki:

Lokalizasyonuna göre farklı olarak adlandırılabilen DC (derideki DC Langerhans hücreleri olarak adlandırılır) lenfoid organların T bağımlı bölgelerinde daha bol bulunur. Mono nükleer hücrelerin %0,1-1'ni oluşturur. İmmün sistemin önemli bir parçasını oluşturan DC antijen sunumunda görevlidir. Normalde immatürdür. Virüs, bakteri, fungus ile temas ettiğinde matür DC hücrelere dönüşür. Yardımcı hücrelerdir, antijenlerin işlenip T hücrelerine sunumunda görevlidir. Primer T hücrelerine bağımlı bağışıklık yanıtının oluşmasında en etkili hücrelerdir (75).

HLA-G, DC hücreleri, LILRB1 ve LILRB2 reseptörleri üzerinden bloke ederler. Bunun sonucunda MHC klas II sunum yolağı ve CD80, CD86 salınımı bloke olur. DC hücrelerdeki kemokin reseptör CCR7 ekspresyonu ve IL-12 üretimi inhibe edilir. Bütün bunların sonucunda DC maturasyonu olmaz, aktivasyonu ve tümör antijenine karşı situmulasyon gerçekleşmez (73).

2.3.6. HLA-G ve B Lenfositler arasındaki ilişki:

B hücreleri edinsel bağışıklıkta ana rolü oynamaktadır. Antijen, anormal hücrelere karşı antikor yapımından sorumludur. HLA-G ile B

hücreleri arasında direkt ilişki tanımlanmamıştır. Muhtemelen B hücrelerinin yüzeyinde bulunan LILRB1 ve LILRB2 üzerinden etkileşim olabilmektedir.

2.3.7. HLA-G ekspresyonuna karşı tedavi seçenekleri:

Yapılan birçok çalışmada HLA-G eksprese eden tümörlerin prognozları daha kötü bulunmuştur. Bundan dolayı kanser hastalarında HLA-G'nin tedavide önemli bir hedef olabileceği düşünülmüştür. HLA-G immün supresif etkisini gösterdiği lenfosit immunglobin benzeri reseptörlere karşı antikolar tedavide kullanılmıştır. Kanser hücrelerine FasL karşı antikor uygulandığında Fas/FasL yolağı üzerinden HLA-G'nin inhibitör etkisini ortadan kaldırmaktadır.

5-aza-2'-deoxycytidine kanser hastalarında epigenetik terapide kullanılan demetilizasyon ajandır. Bu hastalarda HLA-G ekspresyonu artıp tümör hücreleri konağın immün sisteminden kaçabilmektedir. Malignitelerde immünoterapide kullanılan IFN HLA-G ekspresyonunu arttırarak immün kaçışa neden olmaktadır (73).

III- GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmaya mide kanseri nedeniyle hastanemizde opere olmuş, tıbbi onkoloji kliniğinde tedavi ve takibi yapılan hastanemiz patoloji laboratuvarında patoloji preparatları bulunan hastalar alınmıştır. Hastaların patoloji preparatları HLA-G, Foxp3, CD8+ T lenfosit çalışması için immünohistokimyasal analiz yapılmıştır. Hastaların klinik ve patolojik bulguları hastane otomasyon sistemi, patoloji ve tıbbi onkoloji klinik kayıtları araştırılarak elde edilmiştir.

Mide kanserinde HLA-G, Regulator T hücre ve CD8 T lenfosit birlikteliği ve tümör hücrelerinin immün sistemden hangi mekanizmayla kaçtığı daha önce hiç çalışılmamıştır. Bu çalışmada HLA-G ekspresyonu, Treg hücreleri ve CD8 T lenfosit sayılarının genel sağkalıma etkisi ve patolojik bulgular ile arasındaki ilişki araştırılmıştır.

Retrospektif bu tez çalışma için Gülhane Askeri Tıp Fakültesi Ankara'nın 29.04.2011 tarih ve 1491-1490-11/1539 sayılı yazısı ile etik kurul onayı alınmıştır.

3.1.1. Olgu seçimi:

Bu tez çalışmasına GATA Haydarpaşa Eğitim Hastanesinde 2003-2010 yılları arasında mide kanseri tanısı konmuş hastalar alındı. Çalışmaya alınan hastalar, mide kanseri nedeniyle opere olmuş hastalar idi. Hastaların hiçbirisi operasyon öncesi kemoterapi ve radyoterapi tedavisi almamıştı. Alınan patolojik örneklemelerin hepsi primer olarak mide dokusundan alınmıştı. Metastatik bölgeden örnekleme yapılan hastalar çalışmaya dahil edilmedi. Bu şartlara uyan ve hastanemiz patoloji servisinde patoloji blokları bulunan 52 hasta çalışmaya alındı. Evreleme sistemi olarak 2010 yılında Amerikan Birleşik Kanser Komitesi tarafından yayınlanan ve halen geçerliliğini koruyan

TNM Evreleme Sistemi (*AJCC Cancer Staging Manual, Seventh Edition, 2010*) kullanıldı.

Tıbbi onkoloji kliniği kayıtlarından ve hastane otomasyon sisteminden hastaların yaş, grad, histolojik tip, uygulanan cerrahi tip, lenf nodu tutulumu, tutulan lenf nodu sayısı, tümör çapı, evre, tanı tarihi, son kontrol tarihi, ölüm tarihi gibi parametreler kaydedildi.

3.2. İmmünohistokimyasal inceleme:

Çalışmaya alınan hastaların patolojide mevcut olan, formalignle fikse edilmiş ve parafine gömülmüş (*formalign-fixed and paraffin-embedded: FFPE*) dokuları (parafin blokları), patoloji arşivinden çıkarıldı. Mide rezeksiyon vakalarında tümör alanı içeren en uygun 1 ya da 2 parafin blok seçildi. Aşağıda belirtilen şekilde immünohistokimyasal uygulama yapıldı.

- Mikrotom ile tümörden dokusuna ait parafin bloktan ve normal dokuya ait parafin bloktan “poly-L-Lysine” ile kaplanmış lam üzerine 4 mikron kalınlığında kesitler alındı.
- 56 *C derece etüvde bir gece boyunca bekletilerek deparafinize edildi.
- Deparafinizasyon işleminde 3 kez 10’ar dakika ksilen ve ardından 3 kez 10’ar dakika alkolde bekletme şeklinde devam edildi.
- Lamlar distile su ile yıkandı.
- Antijen geri kazanımı için 90 ml distile suya 10 ml EDTA buffer solüsyonu eklenerek hazırlanan solüsyon kullanıldı.
- Kesitler bu solüsyon içerisine konularak mikrodalga fırında 700 watta 2 kez 5’er dakika ve 350 watta 2 kez 5’er dakika olmak üzere kaynatıldı.
- Kesitler dışarıda oda sıcaklığına gelinceye kadar 20 dakika bekletildi.
- Distile su ile yıkanan lamlardaki kesitlerin etrafı reaktiflerin kesit dışına taşmasını engellemek için hidrofobik kalemle ile çizildi.
- Dokudaki endojen peroksidaz aktivitesini önlemek için kesitler üzerine %3’lük hidrojen peroksit çözeltisi damlatılıp 20 dakika beklendi.
- Fosfat tampon solüsyonunda (PBS) 10 dakika bekletilen lamların üzerine antikor blokajı için Ultra V Blok (“Blocking Reagent-ultra v

blok, Labvision) damlatıldı ve 10 dakika bekletildi. Sonra solüsyon lam üzerinden uzaklaştırıldı.

- Oda ısısında, nemli ortamda 60 dakika süre ile Foxp3 (Abcam, 1:300) HLA-G (Abcam, 1:100) CD8 (Abcam 1:100) antikoruna inkübe edildi.
- PBS solüsyonunda 10 dakika bekletildi.
- Sekonder antikor ("Biotinylated goat Anti-polyvalent, Labvision") solüsyonu damlatıldı ve 20 dakika bekletildi ve PBS ile yıkandı.
- "Streptavidin peroksidaz" (Labvision) damlatıldı ve 20 dakika bekletildi, ardından PBS ile yıkandı.
- Kromojen ile inkübe edildi. (UltraVision Detection System Large Volume AEC Substrate System) 15 dakika bekletildi.
- Distile su ile yıkanan lamlar Mayer's Hematoksilen solüsyonunda 30 saniye tutularak zıt boyama yapıldı.
- Musluk suyunda yıkandı.
- Lamlar "Aqueous medium" ile kapatıldı.

3.1.2. İmmunoreaktivitenin değerlendirilmesi:

Bütün patolojik bloklar hastaların klinikopatolojik özelliklerini ve sonuçlarını bilmeyen patolog tarafından incelendi. Çalışmaya alınan vakaların Foxp3 ekspresyonu boyanma paterninin skorlanmasında Yie ve arkadaşlarının (76) yaptığı çalışmadan yararlanılmıştır. Buna göre Foxp3 pozitif boyanma oranı en yüksek olan mikroskop sahasına bulundu. Bu sahada Foxp3 boyanan hücre sayısı 5 den fazlaysa tümör infiltrate Treg sayısı yüksek 5 den düşük ise tumor infiltrate Treg sayısı az olarak raporlandı. CD8 boyanma paternini belirlemede CD8 boyanma oranı en yüksek olan mikroskop sahasındaki pozitif boyanan hücre sayısı kullanıldı. Pozitif boyanan hücre sayısı 5'den fazlaysa CD8 boyanma sayısı yüksek 5 den düşük ise CD8 boyanma sayısı az olarak rapor edildi. Tümör dokusu ve normal mide dokusu HLA-G ile boyandı. HLA-G ekspresyonu var yada yok olarak kaydedildi.

3.2. İSTATİKSEL ANALİZ:

Tüm istatistiksel analizler için SPSS 19.0 (SPSSFW, SPSS Inc., Chicago, IL., USA) istatistik paket programı kullanıldı. Klinokopatolojik özellikler ile immunhistokimyasal boyanma arasındaki ilişki Pearson ki kare testi ile bakıldı. Genel sağkalımı Kaplan Meier metodu, sağkalım farklılıkları log-rank testi ile belirlendi. Parametrelerin sağkalım üzerine toplu halde etkilerinin incelenmesinde cox regresyon analizi kullanıldı. $P < 0,05$ değeri anlamlı olarak kabul edildi.

IV- BULGULAR

4.1. Hastaların demografik ve klinik özellikleri :

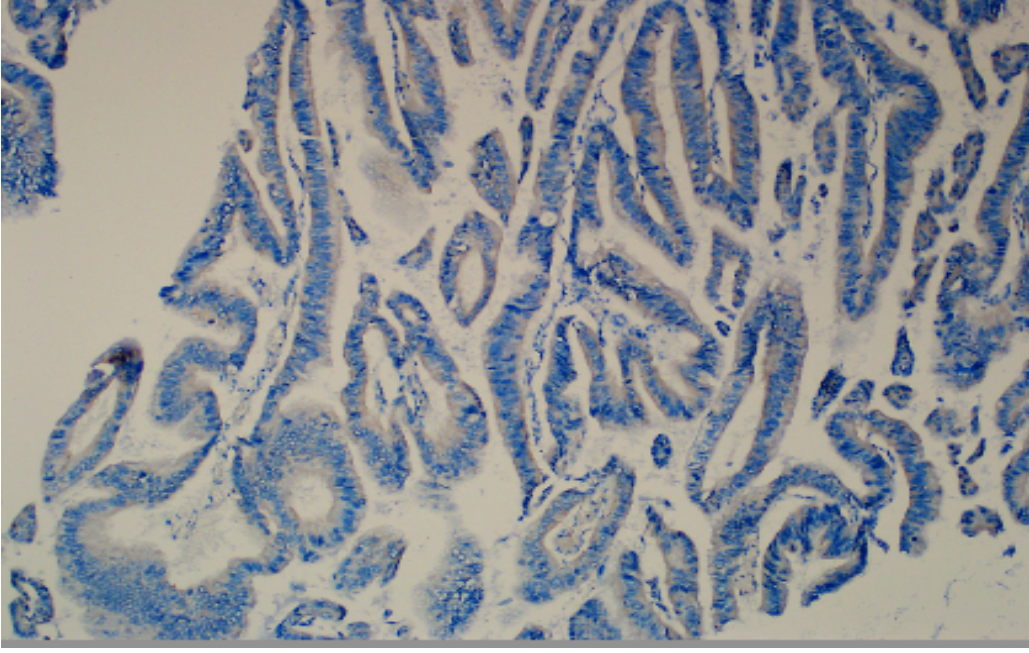
Çalışmaya mide kanseri nedeniyle 2003-2010 yılları arasında kliniğimize müracaat eden ve opere olmuş 52 hasta alındı. Hastaların genel özellikleri tablo 4.1'de gösterilmiştir.

Tablo 4.1: Hastaların demografik özellikleri

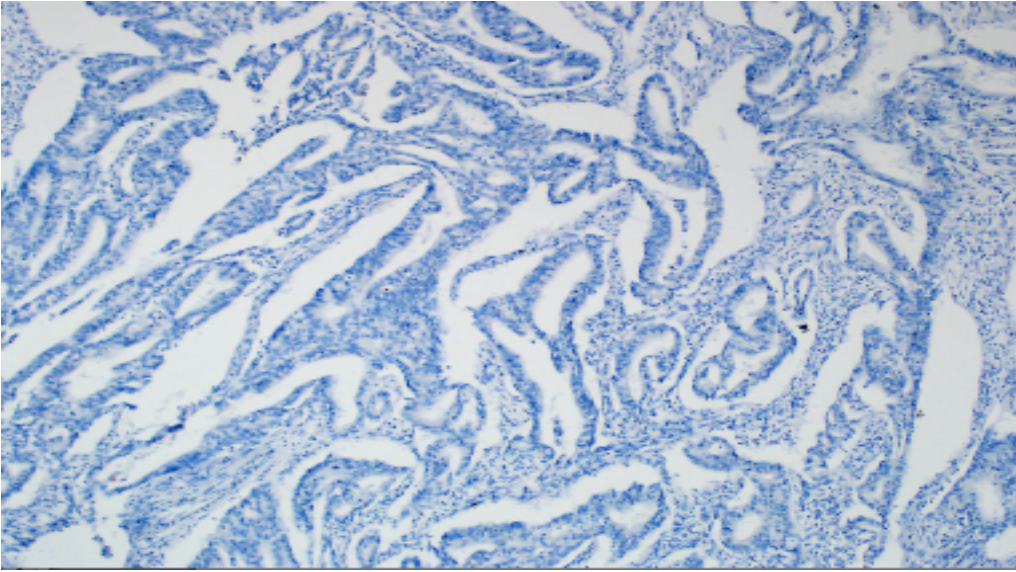
Özellikler	Sayı	Özellikler	Sayı
Yaş (Yıl)		Lenf Nodu	
En büyük	87	Pozitif	26
En küçük	33	Negatif	26
Ortanca	63	Cerrahi Tip	
Cinsiyet		Total	34
Kadın	21	Subtotal	18
Erkek	31	Evre AJCC 7th	
Histolojik Grad		Evre I	4
İyi	10	Evre II	15
Orta	24	Evre III	23
Kötü	18	Evre IV	10

4.2. Mide kanserli hastalarda HLA-G ekspresyonu :

HLA-G'nin varlığı immünohistokimyasal boyanma ile gösterildi (Şekil 4.1). Çalışmaya alınan hastaların patolojik bloklarının hiçbirinde normal mide dokusunda HLA-G ekspresyonu saptanmadı (Şekil 4.2). 52 hastanın 16'sında (%31) tümör dokusunda HLA-G (+) olarak boyandığı saptandı. 36 hastada (%69) HLA-G ekspresyonu olmadığı görüldü.



Şekil 4.1: HLA-G ile immünohistokimyasal (+) boyanma



Şekil 4.2: HLA-G ile imünohistokimyasal (-) boyanma

4.3. HLA-G ekspresyonunun klinikopatolojik parametreler ve sağkalımla ilişkisi:

HLA-G ekspresyonunun mide kanserinde rolünü belirlemek için yaş, cinsiyet, grad, lenf nodu tutulumu, histolojik tip, evre gibi birçok

klınkopatolojik parametreyle arasındaki ilişki araştırıldı (Tablo 4.2). Histolojik grad, nodal tutulum, histolojik tip, evre ile HLA-G ekspresyonu arasında istatıksel olarak anlamlı bir birliktelik bulundu. HLA-G ile yaş yada cinsiyet arasında ise istatıksel anlamlı bir ilişki saptanmadı.

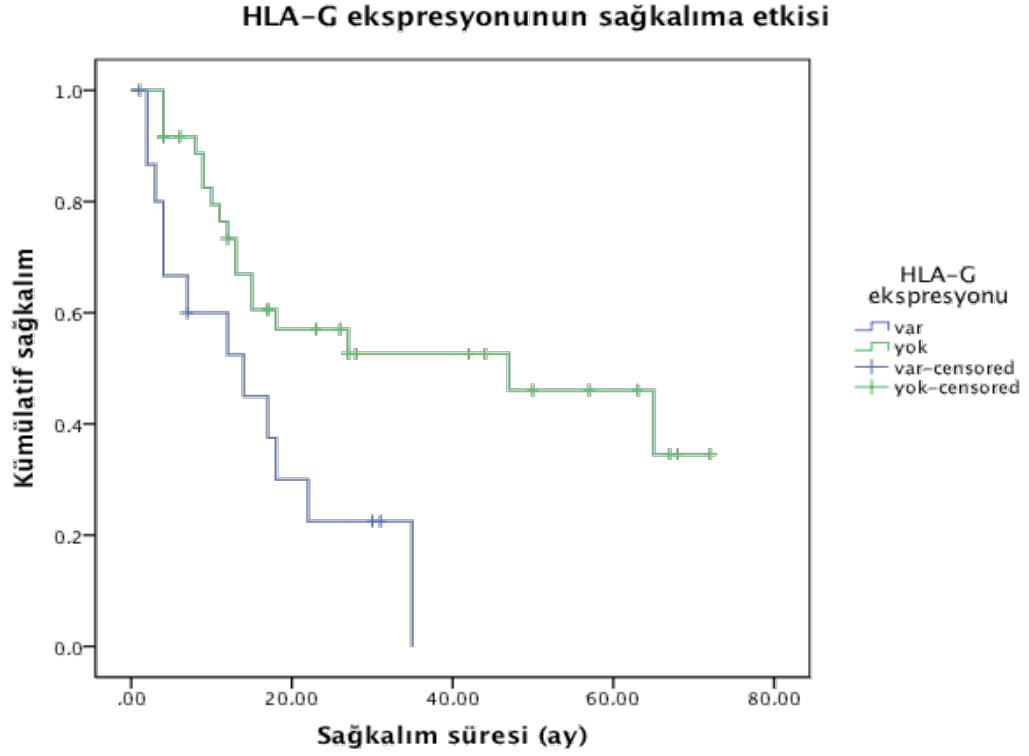
Tablo 4.2: HLA-G'nin klınkopatolojik özellikler ile arasındaki ilişki

Klınkopatolojik özellikler	Sayı	HLA-G		P değeri
		Negatif	Pozitif	
Yaş				
<63	26	19	7	0.48 (AD)
≥63	26	17	9	
Cinsiyet				
Erkek	31	19	12	0.13 (AD)
Kadın	21	17	4	
Nodal Tutulum				
Var	26	14	12	0.01
Yok	26	22	4	
Histolojik Grad				
İyi+Orta	34	29	5	0.001
Kötü	18	7	11	
Histolojik Tip				
Diffüz	19	9	10	0.01
İntestinal	33	27	6	
Evre AJCC 7th				
I+II	19	17	2	0.01
III+IV	33	19	14	

AD: İstatıksel olarak anlamlı değil

60 aylık takip periyodunda 52 hastanın 29'unda (%56) kansere bağlı ölüm gözlemlendi. HLA-G'nin prognostik önemini belirlemek için tek değişkenli (Kaplan Meier) analiz yapıldı. HLA-G ekspresyonu gözlenen mide kanserli hastaların sağkalımı ekspresyonun gözlenmediği hastalara göre daha

kötüydü ve bu istatistiksel olarak anlamlıydı ($P=0.008$) (Şekil 4.3). HLA-G ekspresyonu olan hastalarda medyan sağkalım 14 aydı. HLA-G ekspresyonu gözlenmeyen hastaların medyan sağkalım ise 47 aydı.



Şekil 4.3: Tümör dokusunda HLA-G ekspresyonunun sağkalım üzerine etkisi

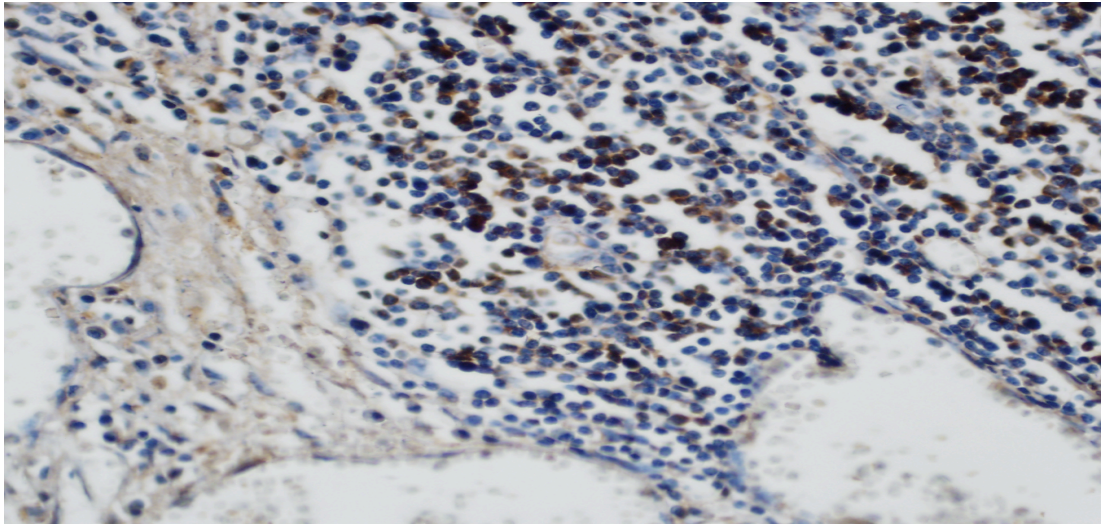
Cox regresyon analizinde HLA-G ekspresyonunun ve evrenin bağımsız prognostik faktörler olduğu bulundu. Yaşın, cinsiyetin, CD8+ T lenfosit ve Foxp3+ Treg hücrelerin sayısal miktarının, ise prognostik önemi olmadığı saptandı (Tablo 4.3)

Tablo 4.3: Cox regresyon analizi

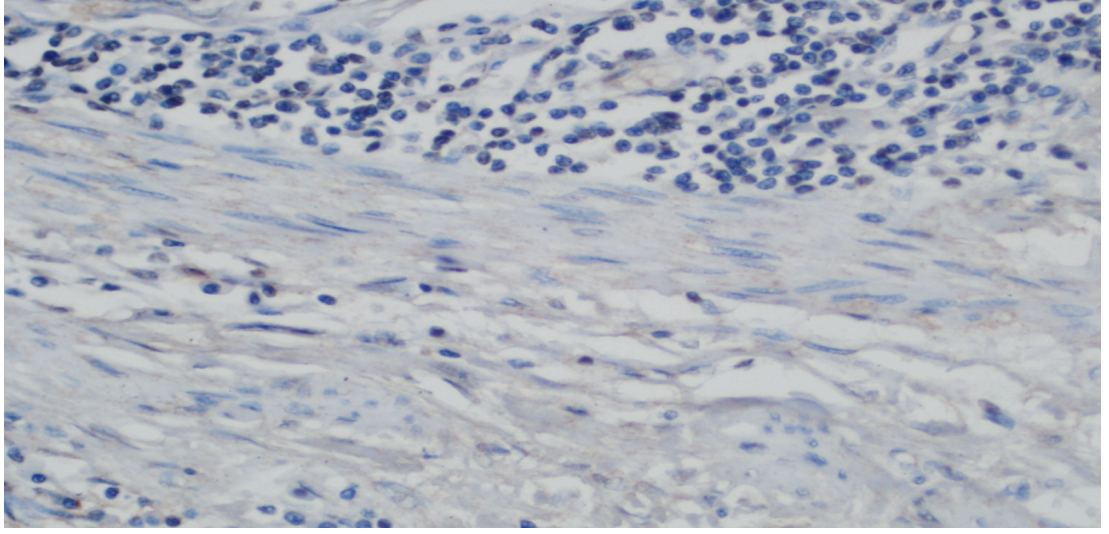
Değişken	P	HR	%95 CI
HLA-G	0.012	2.662	1.242-5.723
Foxp3	0.73	2.088	0.934-4.670
CD8	0.94	0.475	0.199-1.134
Yaş	0.234	0.629	0.294-1.349
Cinsiyet	0.560	1.266	0.573-2.798
Evre	0.041	2.012	1.112-3.715

4.4. Mide kanser dokusunda Treg ve CD8+ T lenfositlerin varlığı ve sağkalımla ilişkisi:

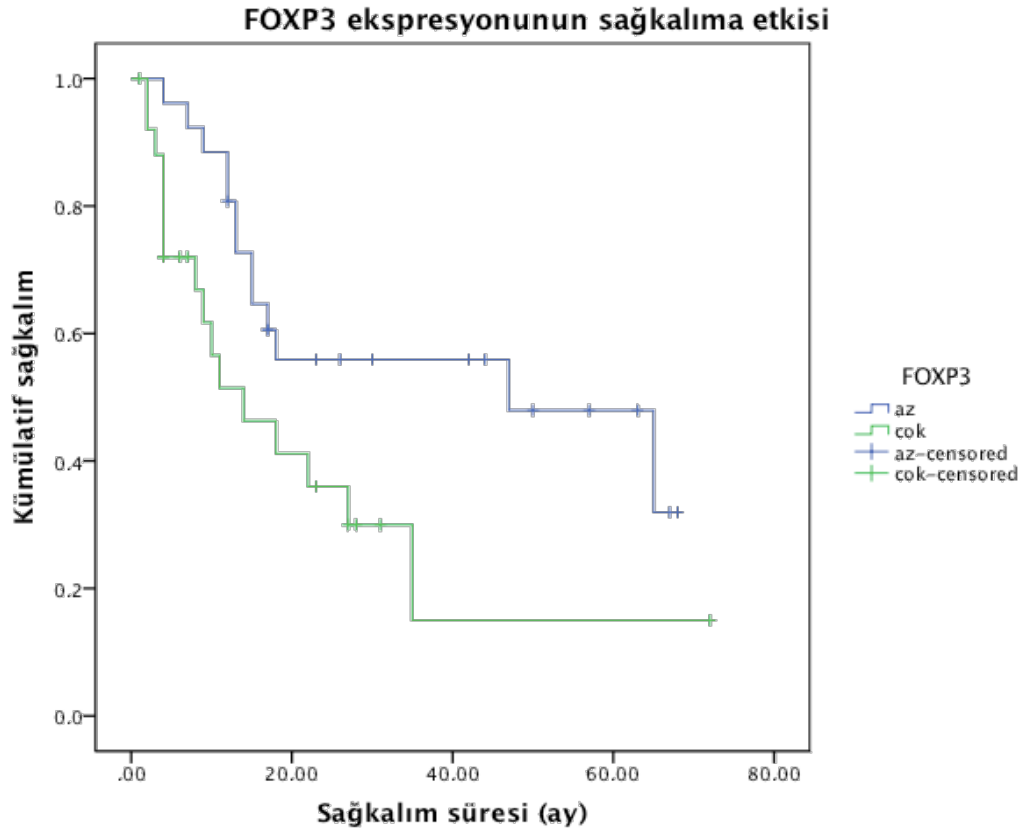
Mide kanserli hastaların tümör dokusunda Foxp3+ boyanan Treg hücre sayısı çok ve az olarak şekil 4.4 ve 4.5'de gösterildi. 52 hastanın yarısında Treg hücre sayısı az diğer yarısında Treg hücre sayısı çok olarak bulundu. Tümör dokusunda Treg hücre sayısı yüksek olan grubun sağkalımı Treg hücre sayısı az olana göre daha kötüydü ve bu istatistiksel olarak anlamlıydı (P=0.034) (Şekil 4.6). Treg sayısı yüksek olan grubun medyan sağkalımı 14 ay, Treg sayısı az olan grubun medyan sağkalımı ise 47 ay idi.



Şekil 4.4: Foxp3+ boyanan Treg hücre sayısı çok

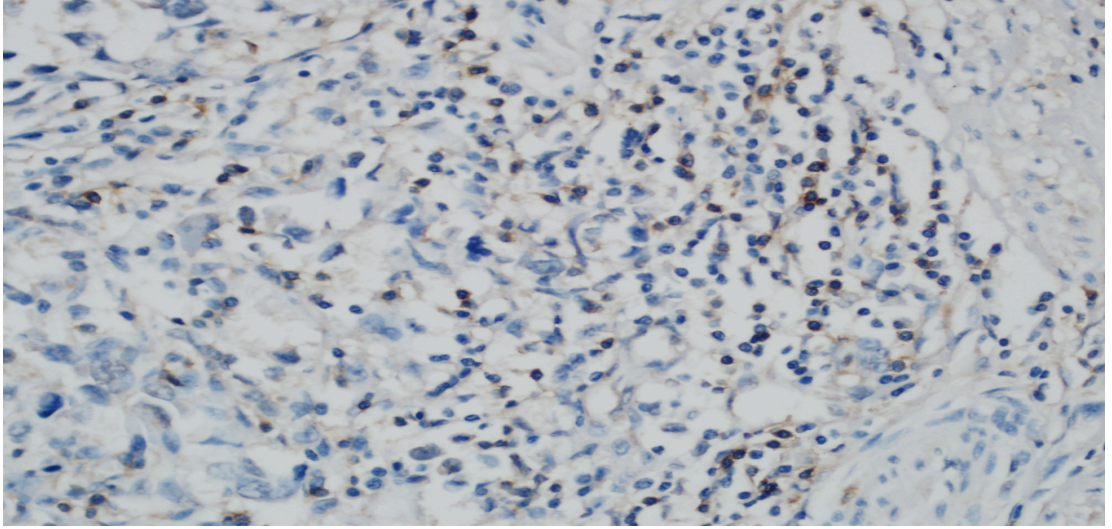


Şekil 4.5: Foxp3+ boyanan Treg hücre sayısı az

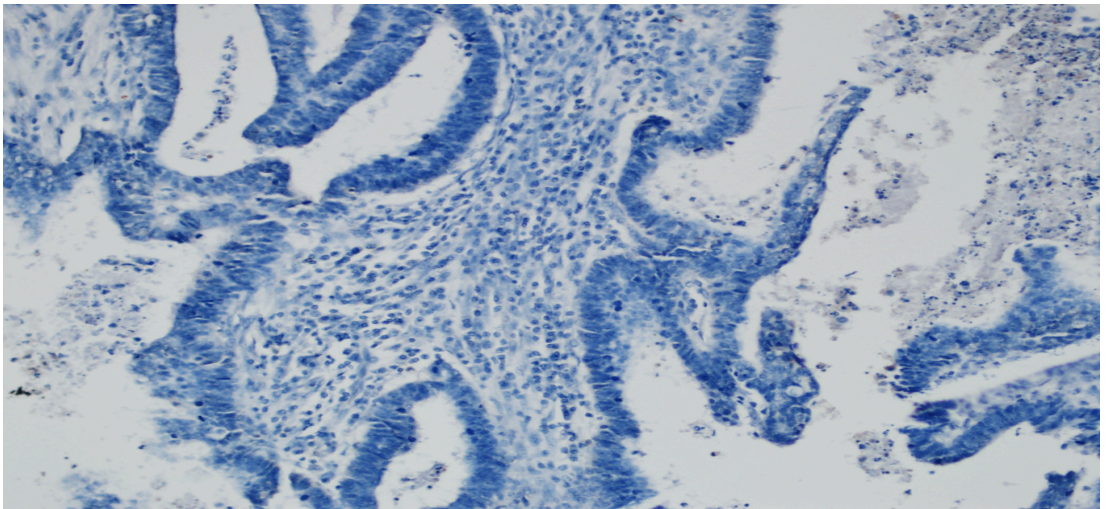


Şekil 4.6: Mide kanser dokusunda Treg varlığının sağkalıma etkisi

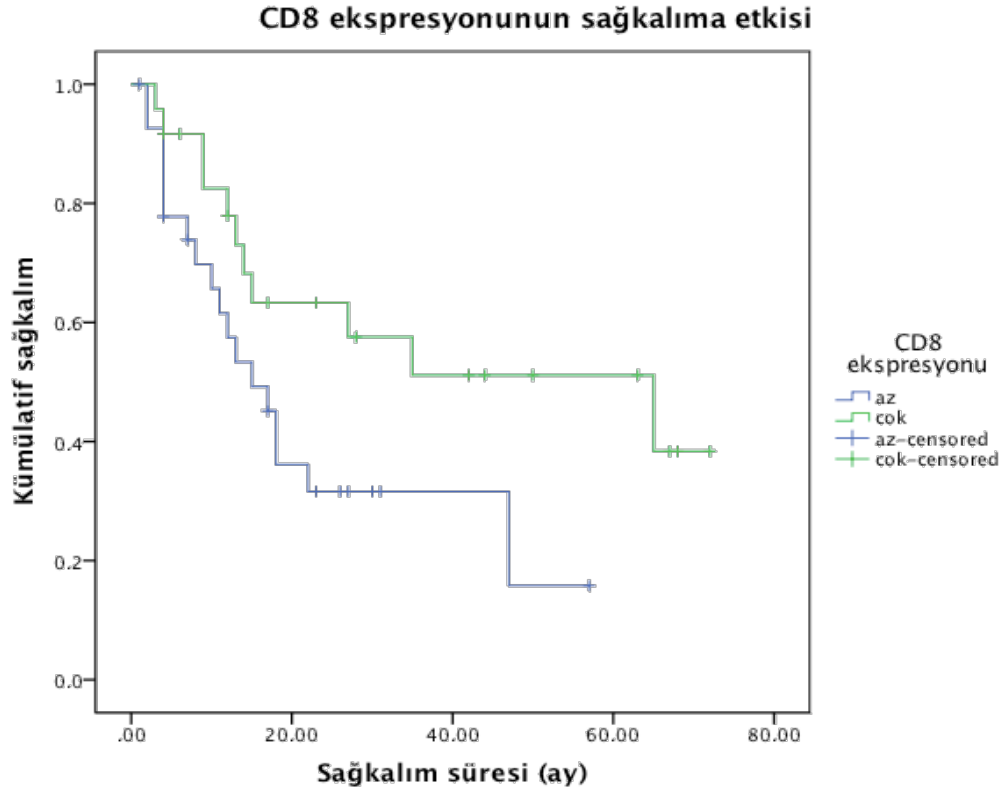
Tümör dokusunda CD8+ T lenfosit hücre sayısı az ve çok olarak şekil 4.7 ve 4.8'de gösterildi. Yirmi dört (%46,2) hastanın tümör dokusunda CD8+ T lenfosit hücre sayısı çok , yirmi sekiz (%53,8) hastanın CD8+ T lenfosit hücre sayısı az olarak bulundu. CD8+ T Lenfosit hücre sayısı az olanların sağkalımı çok olanlara göre kötüydü ve bu istatikselsel olarak anlamlıydı (P=0.043) (Şekil 4.9). CD8+ T lenfosit hücre sayısı çok olan grubun medyan sağkalımı 65 ay, CD8+ T lenfosit hücre sayısı az olan grubun medyan sağkalımı ise 15 ay idi.



Şekil 4.7: CD8+ T lenfosit hücre sayısı çok



Şekil 4.8: CD8+ T lenfosit hücre sayısı az



Şekil 4.8: CD8 ekspresyonunun sağkalım eğrisi

4.5. Mide tümör dokusunda HLA-G ile Treg ve CD8+ T lenfosit birlikteliği:

Mide kanserinde HLA-G ekspresyonun, Treg hücre sayısı yüksekliğinin, CD8+ T lenfosit sayısı düşüklüğünün kötü prognostik faktör oldukları bulunduktan sonra HLA-G ekspresyonuyla tümör infiltrate Treg ve CD8+ T Lenfositler arasındaki ilişki araştırıldı.

HLA-G ekspresyonu olanlarda tümör infiltrate Treg hücre sayısı daha fazlaydı ve bu istatikselsel olarak anlamlıydı ($P=0.01$). HLA-G ekspresyonu ile CD8+ T lenfosit arasındaki ilişkiye bakıldığında HLA-G ekspresyonu olanlarda CD8+ T lenfosit hücre sayısı daha düşüktü ve bu istatikselsel olarak anlamlıydı ($P=0.041$)

V- TARTIŞMA

HLA-G normalde timik epitel ve trofoblastik hücrelerden eksprese edilen ve 1998 yılında ilk defa melanomda tespit edilen MHC sınıf Ib proteindir. Bugün birçok solid ve hematolojik malignitede HLA-G ekspresyonu saptanmıştır. Normal dokuda nadiren ekspresyonu gözlenir. HLA-G çözümlü halde veya membrana bağlı olarak eksprese edilebilir. Kanserde ekspresyon oranları %0 ile %100 arasında değişebilmektedir. Mol hidatiformda %100 oranında eksprese edilirken, uveal melanomlarda ekspresyon gözlenmemiştir.

Kanserde immünsüpresyon ve tümör kaçış mekanizmaları oldukça karışık, kompleks bir süreçtir. HLA-G'nin immünsüpresyonda rol aldığını gösteren birçok çalışma vardır. Yie ve arkadaşları HLA-G ekspresyon oranı yüksek olan mide kanserli hastaların immün sistemden kaçtığını ve prognozunun kötü olduğunu bildirmişlerdir (61). Du ve arkadaşları mide kanserli hastalarda HLA-G ekspresyonu gösterenlerin immünsistemden Treg üzerinden kaçabileceğini göstermişlerdir. (77) Mide kanserinde tümör hücrelerinin immün sistemden hangi mekanizmayla kaçtığı tam olarak belirlenememiştir. Çalışmamızda mide kanserli hastalarda HLA-G'nin Foxp3+ Treg , CD8+ T lenfositler üzerindeki etkisi araştırıldı.

Bu çalışmada Elliott L.R. ve arkadaşlarına benzer şekilde tümör dokusunda HLA-G ekspresyonu izlenirken normal mide dokusunda ekspresyon gözlenmemiştir (63). Paul ve arkadaşları melanomlu hastaların primer ve metastatik lezyonlarında HLA-G ekspresyonu saptarken sağlıklı cilt dokusunda ekspresyonun olmadığını göstermişlerdir. Midenin benign adenomlarında ve normal mide dokusunda ekspresyonunun gözlenmemesi HLA-G'nin malign değişimde oldukça yüksek spesifik bir belirteç olduğunu göstermektedir. Çalışmamızda mide kanserli hastaların %30,8'nde HLA-G ekspresyonu gözlemlendi. Du ve arkadaşları hastaların %35'nde, Elliott ve arkadaşları hastaların %58'nde, Yie ve arkadaşları ise hastaların %73'nde

HLA-G ekspresyonu saptadılar. Mide ve diğer kanser tiplerinde farklı ekspresyon oranlarının elde edilmesi tümör biyolojisindeki ve HLA-G antijeninin tespit edilmesinde kullanılan yöntem farklılıklarından kaynaklanabilir.

Bu çalışmada HLA-G ekspresyonu ile mide kanserinin evreleri arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulundu. Evre I-II hastaların %10'unda, evre III-IV hastaların ise %42'sinde immün boyanma gözlemlendi. Mide kanserli hastaların evresi arttıkça ekspresyon sıklığı artıyordu. Ayrıca HLA-G ekspresyonu ile tümörün nodal durumu, histolojik gradı, histolojik tipi (intestinal, diffüz) gibi klinikopatolojik özellikler arasında ilişki bulundu. Yaş, cinsiyet gibi faktörlerle ise ilişki saptanmadı. Benzer şekilde He ve arkadaşları da meme kanserli hastalarda HLA-G ekspresyonu ile tümörün nodal tutulumu, boyutu, evresi arasında ilişki olduğunu göstermişlerdi. Yie ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada kolorektal kanserli hastalarda HLA-G ekspresyonu ile histolojik grad arasında korelasyon saptamışlardı. Kleinberg ve arkadaşları ise meme kanserinin gradı ve evresi arttıkça HLA-G ekspresyonunun arttığını bildirdiler (78). Kanserlerin agresifliği arttıkça ekspresyonun artması agresif tümörlerde genetik instabilitenin artmasının sonucu olabilir.

Ayrıca He ve arkadaşları mide kanserli hastalarda HLA-G ekspresyon oranı yüksek olanların düşük olanlara göre sağkalımının daha kötü olduğunu bildirmişlerdi. Cai ve arkadaşları HLA-G ekspresyonu gözlenen HCC (Hepatocellular carcinoma) hastalarda nüksün daha erken gözlemlendiğini ve genel sağkalımlarının daha kısa olduğunu bildirmişlerdir (79). Bizim çalışmamızda HLA-G ekspresyonu gözlenen mide kanserli hastaların genel sağkalım sürelerinin ekspresyon olmayanlara göre daha kısa olduğu görüldü. Tek ve çok değişkenli analizlerde HLA-G'nin lenf nodu tutulumu, evre, CD8, Foxp3+ Treg hücreleri gibi sağkalım avantajı gösteren faktörlerden bağımsız prognostik faktör olduğunu bulundu. Son yıllarda HLA-G ekspresyonunun kanserlerde kötü prognoz bulgusu olması dışında hastalığın nüks ve takibinde kullanılabileceği gösterilmiştir. Sayed ve arkadaşları sHLA-G'nin

meme kanserli hastaların nüks ve metastazların saptanmasında kullanılabileceğini göstermişlerdi. Bir başka çalışma sHLA-G yüksek olan nöroblastom hastalarında nükslerin daha erken olduğunu tespit etmiştir. Cao ve arkadaşları plazma sHLA-G'nin kolorektal, mide, akciğer, özefagus kanserlerinin tanısında kullanılabilen bir belirteç olduğunu göstermiştir (80). Bütün bunlar HLA-G ekspresyonunun tümörlerde kötü prognostik bir belirteç olduğunu desteklemektedir.

Tümör infiltrate lenfositler (TIL) konağın kansere karşı gösterdiği immün yanıtın göstergesidir. Solid tümörlerdeki TIL'in çoğu CD3+ T-Lenfosit fenotibindedir. Bunlar CD4+ Treg ve CD8+ sitotoksik T Lenfositler olarak ayrılmaktadır. CD4+ CD25+ Treg hücreleri T hücre bağımlı immünitinin düzenlenmesinde rol almaktadır. Treg hücreleri yüzelelerinde CD25, CD103, OX-40, CTLA-4 gibi birçok antijen taşımamaktadır. Foxp3, CD4+ CD25+ Treg hücrelerini gösteren en önemli belirteçtir (60). Bizde Treg hücrelerini belirlemede Shen ve arkadaşlarının yaptığı çalışmadaki gibi Foxp3'ü kullandık. Çalışmamızda normal mide dokusunda Foxp3+ Treg hücrelerinin ekspresyonu gözlenmedi. Foxp3+ Treg hücreleri immünsistemin kanser hücrelerini tanıyıp yok etmesini engelleyen tümör infiltrate lenfositlerdir. Andre M ve arkadaşları çoklu analizler sonucunda meme kanserinde Foxp3+ Treg hücre sayısının bağımsız prognostik faktör olduğunu göstermişlerdir. Foxp3+ Treg hücre sayısı düşük olan meme kanserli hastaların yüksek olanlara göre genel sağkalımın daha iyi olduğunu bulmuşlardır (81). Shen Z ve arkadaşları rezekte edilebilir mide kanserli hastalarda Foxp3+ Treg sayısı düşük olan ve Foxp3+/CD8 oranı yüksek olan hastaların prongozunun daha iyi olduğunu göstermişlerdir. Bizde Du L ve arkadaşlarına benzer şekilde Treg hücre sayısı yüksek olan mide kanseri hastalarında prognozu daha kötü bulduk. Du L ve arkadaşları mide kanser hücre kültürlerinde HLA-G'nin direkt hücre teması yoluyla Foxp3+ Treg lenfositlerin ekspresyonunu arttırdığını gösterdiler. Çalışmamızda immünohistokimyasal olarak HLA-G ekspresyonu olan hastalarda Foxp3+ Treg Lenfosit sayısının daha yüksek olduğunu bulduk. Buda HLA-G'nin tümör infiltrate Treg hücre üzerinden kanser hücrelerinin immünsistemden kaçabileceği savını desteklemektedir. Li F ve

Xin W birçok tümörde tümör infiltrate Treg hücre sayısı artışının kötü prognozla ilişkili olduğunu ve Treg hücreleri hedef alan ilaçların kanser immünoterapisinde kullanılabileceğini göstermişlerdir (82).

Tümör hücreleri sıklıkla lenfosit ve makrofojaj gibi inflamatuvar hücreler tarafından infiltrate edilir. CD8+ sitotoksik T lenfositler tümör hücrelerinin ortadan kaldırılmasında rol oynayan inflamatuvar hücrelerden biridir. Küçük hücreli akciğer kanseri, uveal melanom, endometriyum, özefagus, kolon kanseri gibi birçok kanser tipinde CD8+ T Lenfosit varlığının iyi prognozla ilişkili olduğu gösterilmiştir. Çalışmamızda tümör infiltrate CD8+ T lenfosit sayısı yüksek olan mide kanserli hastaların genel sağkalımı düşük olana göre daha iyi bulundu. HLA-G ekspresyonuyla CD8+ T lenfosit sayısındaki yükseklik arasında istatikselsel olarak anlamlı ilişki vardı. HLA-G ekspresyonu olanlarda CD8+ T lenfosit sayısı daha azdı. Bu da mide kanserli hastalarda HLA-G'nin CD8+ T lenfositleri azaltarak immün sistemden kaçmasını sağlayabileceğini düşündürmektedir.

Bu tez çalışmasının bazı limitasyonları vardır. Çalışmamızda HLA-G ekspresyonu immünohistokimyasal olarak gösterilmiş olup mRNA düzeyinde çalışılmamıştır. Hasta sayısı çok yüksek olmamakla beraber istatikselsel anlama ulaşan verilere ulaşılmıştır. Bunun yanı sıra HLA-G molekülü için inhibitör reseptör taşıyan NK hücreler teknik nedenlerle çalışılmamıştır.

Sonuç olarak mide kanser hastalarının %30'nda HLA-G ekspresyonu saptanmıştır ve kötü prognozla ilişkilidir. HLA-G ekspresyonunun evre, histolojik grad, lenf nodu tutulumu, histolojik tip gibi parametrelerle birlikteliği vardır. Yine HLA-G ekspresyonu olan mide tümörleri hastalarda Treg hücre sayısı fazlayken CD8+ T Lenfosit sayısı azdır.

HLA-G molekülünün mide kanser hastalarında prediktif prognostik bir faktör olarak kullanılması ve mide kanser tedavisinde bir hedef olduğunu ortaya konulabilmesi için daha ileri çalışmalara gereksinim vardır.

VI- SONUÇ VE ÖNERİLER

- 1) HLA-G normal mide dokusunda eksprese edilmezken mide kanser dokusunda %30 oranında eksprese edilmektedir. HLA-G ekspresyonu mide kanserli hastalarda kötü prognozla birlikte. HLA-G ekspresyonu ile evre, lenf nodu tutulumu, histolojik grad, histolojik tip arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki vardır.
- 2) Foxp3+ Treg hücre oranı yüksek olan mide kanser hastaları kötü prognozla birlikte.
- 3) CD8+ T lenfositlerin sayısal olarak düşük olduğu tümörlerin prognozu daha kötüdür.
- 4) HLA-G ekspresyonu olan hastalarda tümör infiltrate Treg hücre sayısı daha yüksek, CD8+ T lenfosit sayısı daha azdır. Bu HLA-G'nin mide kanserinde tümör hücrelerini immün sistemden Treg hücreleri arttırıp CD8+ T lenfositleri azaltarak kaçabileceği literatür verilerini desteklemektedir.
- 5) HLA-G molekülü mide kanser hastasında prognostik bir belirteçtir ve kanser tedavisinde bir hedef olabilir.

VIII- KAYNAKLAR

1. Jemal A, Bray F, Center M.M. Global cancer statistics. CA Cancer J Clin. 2011;61(2):69.
2. Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics, 2010. CA Cancer J Clin. 2010;60(5):277.
3. Hirayama T. Epidemiology of cancer of the stomach with special reference to its recent decrease in Japan. Cancer Res. 1975;35(11):3460.
4. Powell J, McConkey CC. Increasing incidence of adenocarcinoma of the gastric cardia and adjacent sites. Br J Cancer 1990;62:440-3
5. Liu Y, Kaneko S, Sobue T. Trends in reported incidences of gastric cancer by tumour location, from 1975 to 1989 in Japan. Int J Epidemiolgy. 2004;33:808-15.
6. Parkin DM, Whelan DL, Ferlay J. Cancer incidence in five continents, vol VII. Lyon, France: International agency for research on cancer; 1997.p 822-23.
7. Jemal A, Thomas A, MurrayV T, Thun M. Cancer statistics, 2002. CA Cancer J Clin 2002;52:23-47.
8. Faivre J, Forman D, Esteve J, Gatta G. Survival of patients with oesophageal and gastric cancers in Europe. Eur J Cancer 1998;34:2167-75.

9. Verdecchia A, Francisci S, Brenner H, et al. Recent cancer survival in Europe: a 2000-2002 period analysis of EURO CARE-4 data. *Lancet Oncology* 2007;8:784-96.
10. WCRF & AICR. Food, nutrition, physical activity and the prevention of cancer: global perspective. Washington, DC: AICR; 2007.
11. Sjøhodal K, Lu Y, Nilsen TI, et al. Smoking and alcohol drinking in relation to risk of gastric cancer: a population-based, prospective cohort study. *Int J Cancer* 2007;120:128-32.
12. Helicobacter and Cancer Collaborative Group. Gastric cancer and Helicobacter pylori: a combined analysis of 12 case control studies nested within prospective cohorts. *Gut* 2001;49:347-53.
13. Parsonnet J. The incidence of helicobacter pylori infection. *Aliment Pharmacol Ther* 1995;9:45-51.
14. Laheij RJ, Straatman H, Verbeek AL, Jansen JB. Mortality trend from cancer of the gastric cardia in The Netherlands, 1969-1994. *Int J Epidemiol* 1999;28:391-5.
15. Yang P, Zhou Y, Chen B, et al. Overweight, obesity, and gastric risk: result from a meta-analysis of cohort studies. *Eur J Cancer* 2009;45:2867.

16. Wu CY, Wu MS, Kuo KN, et al. Effective reduction of gastric cancer risk with regular use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in Helicobacter pylori infected patients. *J Clin Oncol* 2010;28:2952.
17. Shin WS, Kang MW, Kang JH, et al. Epstein-Barr virus-associated gastric adenocarcinomas among Koreans. *Am J Clin Pathol* 1996;105-174.
18. Takada K. Epstein-Barr virus and gastric carcinoma. *Mol Pathol* 2000;53-255.
19. Chang MS, Uozaki H, Chong JM, et al. CpG island methylation status in gastric carcinoma with and without infection of Epstein-Barr virus. *Clin Cancer Res* 2006;12:2995.
20. Kusano M, Toyota M, Suzuki H, et al. Genetic, epigenetic, and clinicopathologic features of gastric carcinomas with the CpG island methylator phenotype and an association with Epstein-Barr virus. *Cancer* 2006;106-1467.
21. Murphy G, Pfeiffer R, Camargo C, Rabkin CS. Meta-analysis shows that prevalence of Epstein-Barr virus-positive gastric cancer differs based on sex and anatomic location. *Gastroenterology* 2009;137:824.
22. Haensel W. Variation in incidence of and mortality from stomach cancer, with particular reference to the United States. *J Natl Cancer Inst* 1958;21:213.

23. Barker DJ, Coggon D, Osmond C, Wickham C. Poor housing in childhood and high rates of stomach cancer in England and Wales. *Br J Cancer* 1990;61:575.
24. Stalnikowicz R, Benbassat J. Risk of gastric cancer after gastric surgery for benign disorders. *Arch Intern Med* 1990;150:2022-2026.
25. Barber M, Fitzgerald RC, Caldas C. Familial gastric cancer aetiology and pathogenesis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2006;20:721-34.
26. Stemmermann GN. Intestinal metaplasia of the stomach. A status report. *Cancer* 1994;74:556-64.
27. Lauren P. The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal type carcinoma. An attempt at a histo clinical classification. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1965;64:31.
28. Piessen G, Messager M, Leteurte E, et al. Signet ring cell histology is an independent predictor of poor prognosis in gastric adenocarcinoma regardless of tumoral clinical presentation. *Ann Surg* 2009;250:878.
29. Miki K. Gastric cancer screening using the serum pepsinogen test method. *Gastric cancer* 2006;9:245-53.
30. Graham DY, Schwartz JT, Cain GD, Gyorkey F. Prospective evaluation of biopsy number in the diagnosis of esophageal and gastric carcinoma. *Gastroenterology* 1982;82:228.

31. Karita M, Tada M. Endoscopic and histologic diagnosis of submucosal tumors of the gastrointestinal tract using combined strip biopsy and bite biopsy. *Gastroenterology Endosc* 1994;40:749.
32. Halvorsen Jr RA, Yee J, McCornick VD. Diagnosis and staging of gastric cancer. *Semin Oncol* 1996;23:325-35.
33. Hakama M, Stenman UH, Knekt P, et al. Tumour markers and screening for gastrointestinal cancer: a follow up study in Finland. *J Med Screen* 1994;1:60-4.
34. Edge SB, Byrd DR, Compton CC, et al, American Joint Committee on Cancer Staging Manual, 7th. Springer New York 2010.p.117.
35. Maruyama K, Sasako M, Kinoshita T, Sano T et al. Surgical treatment of gastric cancer : the Japanese approach. *Semin Oncol* 1996;23:360-368.
36. Bozetti F, Marubini E, Bonfati G, et al. Total versus subtotal gastrectomy: surgical morbidity and mortality rates in a multicenter Italian randomized trial. Italian Gastrointestinal Tumor Study Group *Ann Surg* 1997;226:613-20
37. Bozetti F, Marubini E, Bonfati G, et al. Subtotal versus total gastrectomy for gastric cancer: five year survival rates in a multicenter randomized Italian trial. Italian Gastrointestinal Tumor Study Group *Ann Surg* 1999;230:170-8.

38. Sasako M, Sano T, Yamamoto S, Kurokawa Y et al. D2 lymphadenectomy alone or with para-aortic nodal dissection for gastric cancer. *N Engl J Med*. 2008;359(5):453.
39. Noguchi Y, Imada T, Mastumoto A, et al. Radical surgery for gastric cancer. A review of the Japanese experience. *Cancer* 1989;64:2053.
40. Dent DM, Madden MV, Price SK. Randomized comparison of R1 and R2 gastrectomy for gastric carcinoma. *Br J Surg* 1988;75:110.
41. Cuschieri A, Fayers P, Fielding J, et al. Postoperative morbidity and mortality after D1 and D resection for gastric cancer: preliminary results of the MRC randomised controlled surgical trial. The surgical cooperative group. *Lancet* 1996;347:995.
42. Sano T, Sasako M, Yamamoto S, et al. Gastric cancer surgery: morbidity and mortality results from a prospective randomized controlled trial comparing D2 and extended para-aortic lymphadenectomy, Japan Clinical Oncology Group study 9501. *J Clin Oncol* 2004;22:2767.
43. Hallissey MT, Dunn JA, Ward LC, et al. The second British stomach cancer group trial of adjuvant radiotherapy or chemotherapy in resectable gastric cancer: five year follow up. *Lancet* 1994;343:1309-12.
44. Skoropad V, Berlov B, Zagrebin V. Concentrated preoperative radiotherapy for resectable gastric cancer: 20 years follow up of a randomized trial. *J Surg Oncol* 2002;80:72-8.

45. Macdonald JS, Smalley SR, Benedetti J, et al. Chemoradiotherapy after surgery compared with surgery alone for adenocarcinoma of the stomach or gastroesophageal junction. *N Engl J Med.* 2001;345(10):725.
46. Cunningham D, Allum WH, Stenning SP, et al. Perioperative chemotherapy versus surgery alone for resectable gastroesophageal cancer. *SCN Eng J Med.* 2006;355(1):11.
47. Wagner AD, Grothe W, Haerting J, et al. Chemotherapy in advanced gastric cancer: a systematic review and meta-analysis based on aggregate data. *J Clin Oncol.* 2006;24(18):2903
48. Liang Z, Zeng X, Gao J, et al. Analysis of EGFR, HER2, and TOP2A gene status and chromosomal polysomy in gastric adenocarcinoma from Chinese patients. *BMC Cancer* 2008;8:363.
49. Bang YJ, Van Cutsem E, Feyereislova A et al. TOGA Trial Investigators. *Lancet.* 2010;376(9742):687.
50. Allum WH, Powell DJ, McConckey CC, et al. Gastric cancer: a 25-year review. *Br. J Surg.* 1989;76:535-40.
51. Catalano V, Labianca R, Giordano D, et al. Gastric cancer. *Critical Reviews in Onc-Hem.* 2009;71:127-164.
52. Sobin LH, Wittekind CH. *TNM classification of malignant tumours.* 5th edition New York. 1997.

53. Takagane A, Terashima M, Abe K, et al. Evaluation of the ratio lymph node metastasis as a prognostic factor in patients with gastric cancer. *Gastric Cancer* 1999;2:122-8.
54. Bunt AM, Hogendoorn PC, van de Velde CJ, et al. Lymph node staging standards in gastric cancer. *J Clin Oncol* 1995;13:2309-16.
55. Maehara Y, Kakeji Y, Oda S, et al. Time trends of surgical treatment and the prognosis for Japanese patients with gastric cancer. *Br J Cancer* 2000;83:986-91.
56. Moriguchi Y, Maehara Y, Korenaga D, et al. Relationship between age and the time of surgery and prognosis after gastrectomy for gastric cancer. *J Surg Oncol* 1993;52:119-23.
57. Maehara Y, Watanabe A, Kakeji Y, et al. Prognosis for surgically treated gastric cancer patients is poorer for women than men in all patients under age 50. *Br J Cancer* 1992;65:417-20.
58. Nakane Y, Okamura S, Akehira K, et al. Correlation of preoperative carcinoembryonic antigen levels and prognosis of gastric cancer patients. *Cancer* 1994;73:2703-8.
59. Xiangming C, Hokita S, Natsugoe S, et al. Cooccurrence of reduced expression of alpha-catenin and overexpression of p53 is a predictor of lymph node metastasis in early gastric cancer. *Oncology*. 1999;57(2):131.

60. Shen Z, Zhou S, Wang Y, et al. Higher intratumoral infiltrated foxp3+ Treg numbers and foxp3+/CD8+ ratio are associated with adverse prognosis in resectable gastric cancer. *J cancer res clin oncol* 2010;136:1585-1595.
61. Yie S, Yang H, Ye S, et al. Expression of HLA-G correlates with poor prognosis in gastric carcinoma. *Annals of Surg Oncol* 14(10):2721-29.
62. Karagöz B. İmmün kaçış ve immün tolerans. *Turkiye Klinik. J Med Oncol-Special Topics*. 2010;3(2):11-6.
63. Elliott R, P. Jiang X, Philips J, et al. Human leukocyte antigen G expression in breast cancer: role in immunosuppression. *Cancer Bioth. And Radio*. 2011;26-2.
64. Schreiber R.D, Old L.J, Smyth M. J. Cancer immunoediting: Integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science* 2011;331:1565-70.
65. Rizzo R, Melchiorri L, Stignani M, et al. HLA-G expression is a fundamental prerequisite to pregnancy. *Hum Immunol* 2007;68:244-50.
66. Algarra I, Garcia-Lora A, Cabrera T, et al. The selection of tumor variants with altered expression of classical and non classical MHC class I molecules: implication for tumor immun escape. *Cancer Immunol* 2004;53:904-10.

67. Mouillot G, Marcou C, Rousseau P, et al. HLA-G gene activation in tumor cells involves cis-acting epigenetic changes. *Int J Cancer* 2005;113:928-36.
68. Gazit E, Sherf M, Balbin E, et al. HLA-G expression is induced in EBV transformed B cell lines by culture conditions. *Hu Immunol* 2007;68:463-8
69. Ibrahim EC, Guerra N, Lacombe MJ, et al. Tumor-specific up-regulation of nonclassical class I HLA-G antigen expression in renal carcinoma. *Cancer Res* 2001;61:6838-45.
70. Freiss NR, Moreau P, Menier C, et al. Expression of tolerogenic HLA-G molecules in cancer prevents antitumor responses. *Semin in Cancer* 2007;17:413-21.
71. Rajagopalan S, Long EO. A human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-G specific receptor expressed on all natural killer cells. *J Exp Med* 1999;189:1093-1100.
72. Kanai T, Fujii T, Uno N, et al. HLA-G expressing cells differently modulate the release of cytokines from mononuclear cells present in the decidua versus peripheral blood. *Am J Reprod Immunol* 2001;45:94-9.
73. Sheu J, Shih LM. HLA-G and Immune evasion in cancer cells. *J of Form Med Assoc* 2010;109:248-57.

74. Adrian F, Moreau P, Riteau B, et al. HLA-G expression in human melanoma cells: protection from NK cytotoxicity. *J Reprod Immunol* 1999;43:183-93.
75. Söker S. Dendritik hücreler. *Dicle tıp dergisi* 2005;32(3):158-160.
76. Ye S, Yang H, Li K, et al. HLA-G expression as a significant prognostic indicator for patients with colorectal cancer. *Modern Pathol* 2007;20:375-383.
77. Du L, Xiao X, Wang C, et al. Human leukocyte antigen-G is closely associated with tumor immune escape in gastric cancer by increasing local regulatory T cells. 2004;23:212-16.
78. Kleinberg, V.A. Flørenes, M. Skrede, et al. Expression of HLA-G in malignant mesothelioma and clinically aggressive breast carcinoma, *Virchows Arch.*;2006;449;31–39.
79. Cai, Y.F. Xu, S.J. Qiu, et al. Human leukocyte antigen-G protein expression is an unfavorable prognostic predictor of hepatocellular carcinoma following curative resection, *Clin. Cancer Res.* 2009; 15;4686–4693.
80. Cao M, Yie S, Liu J, et al. Plasma soluble HLA-G is a potential biomarker for diagnosis of colorectal, gastric, esophageal and lung cancer. *Tissue Antigens* 2011: 0001-2815.
81. Merlo A, Casalini P, Carcangiu ML, et al. FOXP3 Expression and overall survival in breast cancer. *Journal of Clinical Oncology* 2009;27:1746-1752.

82. Li-li F, Xin W. Targetin foxp3+ regulatory T cells-related immunosuppression for cancer immunotherapy. Chin Med J 2010;123(22):3334-3342.

