



T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI

HİYALÜRONAN MODİFİKASYONUNUN MİDE
KANSERİ ETİYOPATOGENEZİNDEKİ ROLÜNÜN
ARAŞTIRILMASI

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. Ahmet Turan DURAK

KAYSERİ - 2015



**T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI**

**HİYALÜRONAN MODİFİKASYONUNUN MİDE
KANSERİ ETİYOPATOGENEZİNDEKİ ROLÜNÜN
ARAŞTIRILMASI**

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. Ahmet Turan DURAK

Danışman

Doç. Dr. Hızır Yakup AKYILDIZ

KAYSERİ - 2015

İÇİNDEKİLER

KISALTMALAR	ii
TABLO LİSTESİ	iv
ŞEKİL LİSTESİ	v
ÖZET	vi
ABSTRACT	vii
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1. MİDE KANSERİ	3
2.1.1. Risk Faktörleri	4
2.1.2. Koruyucu Faktörler	6
2.1.3. Mide Kanserine Predispozisyon Sağlayan Faktörler	6
2.1.4. Midenin Prekanseroz Lezyonları	8
2.1.5 Histopatolojik Olarak Mide Kanserlerinin Sınıflaması	8
2.1.6 Mide Kanserinde Evrelendirme	10
2.2 MİDE KANSERİ VE EKSTRASELLÜLER MATRİKS	11
3. HASTALAR VE YÖNTEM	17
4. BULGULAR	27
5. TARTIŞMA	33
6. SONUÇLAR	38
KAYNAKLAR	39
KABUL ONAY	51

KISALTMALAR

BSA	: Bovine serum albümin
DNA	: Deoksiribonükleik asit
ELİSA	: Enzyme-Linked İmmunosorbent Assay
ERÜTF	: Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi
ESM	: Ekstrasellüler Matriks
GAG	: Glikosaminoglikan
HAS	: Hiyalüronan sentaz
HC	: Heavy Chain
HCA	: Heterosiklik aminler
LMW-HA	: Düşük moleküler ağırlıklı hiyalüronan
HMW-HA	: Yüksek molekül ağırlıklı hiyalüronan
IαI	: İnter alfa inhibitör
IUCC	: Uluslararası Kanser Cemiyeti
JGCA	: Japanese Classification of Gastric Carcinoma
LN	: Lenf nodu
OA	: Osteoartrit
PAH	: Polisiklik aromatik hidrokarbonlar
RA	: Romatoid Artrit
TNM	: Tümör-Lenf nodu-Metastaz
TSG-6	: Tümör nekrozis faktör stimüle eden gen-6
PBS	: Phosphate buffered saline

HRP	: Horse peroxidase
mRNA	: Mesajcı ribonükleik asit
RNA	:Ribonükleik asit
Dntp	:Deoksinükleosid trifosfat
MgCl2	:Magnezyum klorür
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
STN	: Standart
dH2O	: Distile su

TABLO LİSTESİ

Tablo 1:	Midenin prekanseröz lezyonları	8
Tablo 2:	Dünya Sağlık Örgütü'nün yaptığı sınıflamaya göre mide kanserleri	9
Tablo 3:	6. ve 7. TNM sınıflaması	10
Tablo 4:	Plazma hiyalüronan seviyelerinin karşılaştırması	29
Tablo 5:	Hasta karakteristikleri ve ortalama ya da ortanca değerleri	30
Tablo 6:	Plazma hiyalüronan miktarı ve değişkenlerin ilişkisi	30

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1:	Yıllara göre Türkiye’deki mide kanseri lokalizasyonu.....	4
Şekil 2:	DNA hasarı oluşum şeması.....	5
Şekil 3:	Mide kanseri immünohistokimyasal boyaması	7
Şekil 4:	Hiyalüronan molekülünün yapısı	12
Şekil 5:	IαI proteininin yapısı.....	13
Şekil 6:	Hiyalüronan modifikasyonunun oluşum şeması	15
Şekil 7:	Mide kanseri hastaları ve kontrol grubu plazma hiyalüronan seviyesi karşılaştırması.....	28
Şekil 8:	Mide kanserli hastalarda plazma CA 19-9 ve HA seviyesi korelasyon grafiği.....	31
Şekil 9:	Mide kanseri ve kanserli olmayan dokulardaki TSG-6 mRNA ekspresyonu. .	32

ÖZET

Amaç: Mide kanseri yüksek morbidite ve mortalitesi olan bir kanser türüdür ve mide kanseri oluşumunda, ekstrasellüler matriksin rolü olabileceğini düşündüren çalışmalar vardır. Biz çalışmamızda ekstrasellüler matriks komponentlerinden hiyalüronanın ve hiyalüronan modifikasyonunun mide kanseri gelişimindeki etkisini araştırmayı amaçladık.

Hastalar ve Yöntem:Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Kliniğinde Ocak 2013 ve Ocak 2014 tarihleri arasında gerçekleştirilen prospektif çalışmaya 27 mide kanseri hastası ve 29 sağlıklı kontrol dahil edildi. Hastalara rutin cerrahi prosedür uygulandı. Hastaların ve sağlıklı gönüllülerin plazma hiyalüronan seviyeleri belirlendi. Hastaların kanser dokularında ve normal mide dokularında hiyalüronan modifikasyonunda kilit rol oynayan TSG-6 enzimimRNA ekspresyonu ölçüldü.

Bulgular:Mide kanseri hastaları ve kontrol grubu plazma hiyalüronan seviyesi karşılaştırması sonucunda mide kanserli hastaların plazma hiyalüronan seviyeleri sağlıklı kontrollere göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek saptandı. [Plazma hiyalüronan seviyeleri mg/dL (mean±SD);mide kanseri (n=27): 101.19±76.4, sağlıklı kontrol (n=29): 57.99±10.44 (p<0.005)].Mide kanseri dokusunda ölçülen TSG-6 enzim aktivitesi, normal mide dokusuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek saptandı. [TSG-6 mRNA ekspresyonu;mide kanseri (n=27): 7.09±1.94, sağlıklı kontrol (n=29): 3.20±0.67 (p=0.047)].

Sonuç: Bu çalışmadaki veriler ışığında; mide kanseri hastalarında hiyalüronan seviyelerinin yüksek bulunması ve muhtemel bir hiyalüronan modifikasyonunu destekleyecek şekilde mide kanseri dokusunda artmış TSG-6 enzim aktivitesi saptanması, bu anormalliğin mide kanseri oluşumunda önemli bir rolü olabileceği kanısını doğurmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Mide kanseri, ekstrasellüler matriks, hiyalüronan, tümör nekrozis faktör stimüle eden gen-6

ABSTRACT

Aim: Gastric cancer is a type of cancer with high morbidity and mortality. Previously studies have indicated extracellular matrix may have a role in cancer progression. In our study, we aimed to investigate the role of hyaluronan, as an extracellular matrix's component, and its modification in gastric cancer progression.

Patients and Methods: This prospective study was conducted between January 2013 and January 2014 at the General Surgery Department of Erciyes University Faculty of Medicine. 29 healthy controls and 27 gastric cancer patients were included to the study. The patients underwent routine procedure. The plasma hyaluronan levels of both patients and healthy volunteers were determined by ELISA. The levels of mRNA expression of TSG-6 enzyme, plays key role on the hyaluronan modification in gastric cancer, was determined in the gastric cancer tissue and normal gastric tissue by Real Time PCR.

Results: Plasma levels of hyaluronan of gastric cancer patients and control groups were compared. It has been detected that the plasma levels of hyaluronan in gastric cancer patients is statistically significant higher than the plasma levels of hyaluronan in control patients. [Plasma hyaluronan levels mg/dL (mean $\pm$ SD); gastric cancer (n=27): 101.19 $\pm$ 76.4, healthy patients (n=29): 57.99 $\pm$ 10.44 (p<0.005)]. The mRNA expression of TSG-6 enzyme in the gastric cancer tissue is detected statistically significant higher than the normal gastric tissue. [TSG-6 mRNA expression; gastric cancer (n=27): 7.09 $\pm$ 1.94, healthy controls (n=29): 3.20 $\pm$ 0.67 (p=0.047)].

Conclusion: According to the results of this study, it is believed that this abnormality in hyaluronan modification and high levels of hyaluronan in gastric cancer patients, plays a key role in gastric carcinogenesis.

Key words: Gastric cancer, extracellular matrix, hyaluronan, tumor necrosis factor-inducible gene-6

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Mide kanseri dünyadaki en yaygın dördüncü kanser türüdür. Hastalara çoğunlukla ileri hastalık evrelerinde tanı konulduğu için ve mide kanserinde sağ kalımın düşük olması nedeniyle önemli bir sağlık problemidir (1, 2).Her yıl 650.000 ölüm ile güncelliğini devam ettirmektedir.

Ekstrasellüler matriks (ESM) hücre proliferasyon ve migrasyonunda önemli role sahiptir. Mide ekstrasellüler matriksinde proteoglikanlar, elastinler, kollejenler gibi farklı komponentler mevcuttur. Proteoglikanların yapısında bulunan glikosaminoglikanlar (GAG), midede hiyalüronan, heparan sülfat, dermatan sülfat ve kondroitin sülfat olarak bulunur. Matriks komponentleri fizyolojik ve patolojik süreçlerin düzenlenmesiyle de ilişkilidirler.

Bir serum proteini olan inter alfa inhibitör (I α I) kompleksi “biküinin” denilen bir proteoglikan ve iki “heavy chain” (HC) molekülünün kovalent şekilde bir kondroitin sülfat zinciri ile bağlanmasıyla oluşur. I α I proteininde bulunan heavy chainler tümör nekrozis faktör stimüle eden gen-6 (TSG-6) enzimi yardımıyla kataliz edilerek hiyalüronan molekülü üzerine taşınırlar. Böylece hiyalüronan molekülü heavy chainlerle dekore edilmiş olur. Bu şekilde inflamasyon hücrelerini daha çok kendisine çektiği düşünülmektedir. Hiyalüronan molekülünün degrade olan ürünlerinin bazı genleri, kemokinleri, sitokinleri, büyüme faktörleri ve adhezyon moleküllerinin üretimini, anjiogenezi tetiklediği biliniyor.(3) Mide kanser dokusundaki belirgin inflamasyon, proliferasyon ve anjiyogenez oluşumda da hiyalüronanın rolünün olduğu bilinmektedir. (4)

Mide kanser dokusunun, hiyalüronan modifikasyonunda kilit rol oynayan TSG-6 enzim aktivitesi açısından incelenmesi ile bu kanser dokusundaki hiyalüronan çeşidi ve miktarı hakkında bilgi sahibi olmak amaçlandı.

Genel cerrahi kliniğine başvuran, mide kanseri tanısı alarak cerrahi tedavi uygulanan hastalar çalışmayı oluşturdu. Bu hastaların ve sağlıklı bireylerin kan örneklerinden yapılan incelemelerle; mide kanseri olan ve sağlıklı bireylerde plazma hiyalüronan seviyelerini karşılaştırılması bu çalışmanın birincil hedefini oluşturmaktadır. Rezekte edilen mide dokusundaki tümöral lezyondan alınan, midenin bütün histolojik katlarını içeren örnek ve normal mide dokusunda hiyalüronan modifikasyonunun oluşmasını sağlayan enzim olan TSG-6'nın enzim aktivitesini karşılaştırılması ise bu çalışmanın ikincil hedefini oluşturmaktadır. Bu sayede mide kanserlerinde hiyalüronan modifikasyonu hakkında bilgiye sahip olunacaktır.

Bu çalışmanın amacı kanserli hastalardaki yüksek seviyelerdeki hiyalüronan'nın mekanizmasını ve mide kanseri patobiyolojisindeki mekanistik rolünü anlamaktır. Hiyalüronan molekülünün karsinogeneizde etkili rolünün olabileceği ve bu rol ispatlandığında hiyalüronan üretim yolları bloke edilerek hastalığın oluşmasını önlemede alternatif bir yol geliştirilebileceği düşünülmektedir. Bu çalışmanın mide kanserinin patobiyolojisinin anlaşılmasının yanında hastalığın tanı, tedavi ve takibi için daha iyi yollar geliştirmekte faydalı olacağı düşünülmektedir.

Hiyalüronan modifikasyonunda önemli role sahip olan TSG-6 enziminin aktivitesinin araştırılması hastalığa farklı bir açıdan bakmaya olanak sağlayacaktır. Bu yönüyle çalışma alanında yapılmış ilk çalışma olacaktır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. MİDE KANSERİ

Mide kanseri her yıl yeni tanı konan 900.000 vaka ve 650.000 ölüm ile güncelliğini devam ettirmektedir. Literatürdeki dağılımına bakıldığında ise; uzak doğu ülkelerinde ve ülkemizin doğu kesimlerinde daha yüksek sıklıkta olduğu göze çarpmaktadır. Japonya’da 70/100.000 oranında görülmekte iken Amerika Birleşik Devletleri’nde ve batı Avrupa ülkelerinde bu oran 7/100.000 civarındadır (2).

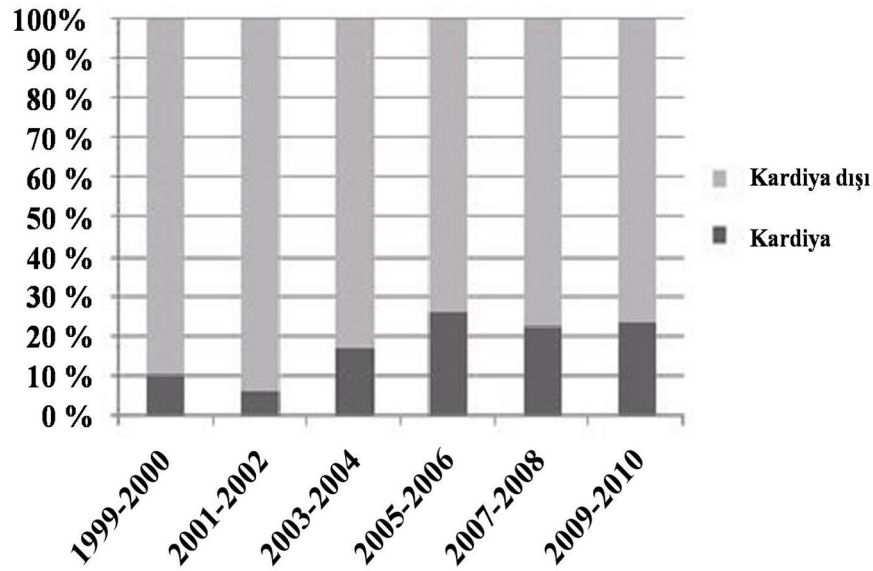
İleri evredeki hastalığın yüksek morbidite ve mortalitesiyle paralel olarak yüksek riskli popülasyonlarda güncel tarama programları ile kanserin erken evrede tespiti çabası içine girilmiştir. Japonya’da kanser tarama programına dahil edilen serum *pepsinojen-1* düzeyi tayini buna verilebilecek örneklerdendir (5). Avrupa’da kanser görülme sıklığı sıralamasında mide kanseri erkeklerde 4. ve kadınlarda ise 5. sıradadır. Kansere bağlı ölüm sıralamasında ise erkekte ve kadında 4. sırada yer almaktadır. 50 yaşından itibaren görülme sıklığı arttığı için 70 yaşında her iki cinsiyet için görülme sıklığı eşittir (2).

Ülkemizde bildirim zorunlu hastalıklar arasında yer alsa da veri toplamadaki yetersizlikler göz önünde bulundurulduğunda gerçek görülme sıklığı hakkında tahminde bulunmak yanlış olacaktır. Ancak T.C. Sağlık Bakanlığı verilerine göre insidansı 1994 yılında 4,4/100.000 iken 2009 yılında 8,1/100.000’dir (6).

2009 verilerine göre ülkemizde mide kanseri; batı dünyasına göre yüksek, doğu dünyasına göre de düşük insidansa sahiptir. Erkeklerde akciğer, prostat mesane ve kolorektal kanserlerinden sonra 16,2/100.000 insidans ile tüm kanserlerin %6,2’sini

oluşturarak beşinci en sık kanser, kadınlarda ise meme, tiroid, uterus ve kolorektal kanserleri takiben 8,1/100.000 insidans ile tüm kanserlerin %4,8'ini oluşturarak beşinci en sık kanser olarak sıralamadaki yerini almaktadır(6, 7).

Ülkemiz genelinde ve özellikle batı kesimlerinde olduğu gibi batı ülkelerinde *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) eradikasyonu ve gıda hijyenine gösterilen önemden dolayı mide kanseri insidansı daha düşüktür (8). Buna karşılık bu faktörlerden bağımsız olan proksimal mide yerleşimli kanser tipinin oranı giderek artış göstermektedir (9). (Şekil 1)

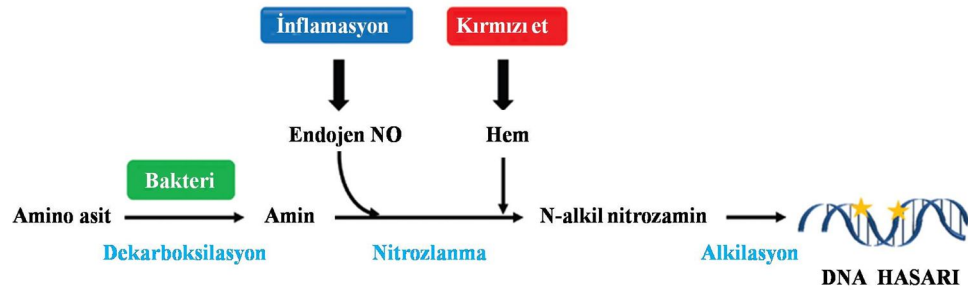


Şekil 1. Yıllara göre Türkiye’deki mide kanseri lokalizasyonu (9)

2.1.1. Risk Faktörleri

Yüksek riskli ülkelere göç eden ailelerin sonraki nesillerinde göç ettikleri ülke ile benzer risk taşıdıklarının görülmesiyle kanser gelişim riskinin coğrafyadan ziyade ortak diyet faktörleri ile ilişkili olduğu anlaşılmıştır (2). Diyetel risk faktörlerden en bilindik olanı tükülenmiş gıdalardan ağırlıklı beslenme şeklidir. Bu gıdalarda yüksek miktarda kanserojen 3,4 benzipiren bulunur. Bu molekülün deoksiribonükleik asit (DNA) sentez inhibisyonundaki görevi bilinmektedir (10). Tuzla ve nitratlarla konserve edilmiş gıdalardaki nitratlar nitritlere indirgenip kanserojen bir molekül olan N-nitroso molekülünün yapısına girerler. N-nitroso molekülü DNA metilasyonunda görev alan

elektrofilik yapılara dönüşür. Bu yapıların mutajenik ve karsinojenik potansiyelleri bilinmektedir (11). Diyetle alınan aminoasitlerin bakteriler tarafından dekarboksilasyonu sonrası oluşan aminler endojen olarak üretilen nitrik oksit sayesinde nitrozlanıp N-alkil nitrozaminlere dönüşmektedir. Bu yapıların vücutta bir çok substratı biyoaktif ederek aktif formlarına dönüştüren sitokrom P450 2E1 yardımıyla alkillenmesiyle oluşan bileşikler DNA'da baz hasarı oluşturmaktadır (11)(Şekil 2).



Şekil 2. DNA hasarı oluşum şeması

Pek çok kanserojen içermesi nedeniyle sigaranın genel olarak malignite oluşumuna zemin hazırladığı bilinen bir gerçektir. Nikotin, nitrozamin, kadminyum, nikel, vinilklorid, benzo(a)piren, dibenz(a)antrasen sigaranın içerisindeki bilinen kanserojen maddelerdir (12)..

Kırmızı etin pişirilmesi esnasında ortaya çıkan heterosiklik aminlerin (HCA) ve polisiklik aromatik hidrokarbonların (PAH) çok tüketilmesinin kanser riskini arttırdığı farelerde yapılan deneysel bir çalışma ile gösterilmiş ve bu moleküllerin karsinojenik ve potansiyel tümörojenik etkide olduğu ispatlanmıştır (13).

1982'de izole edilen *H. pylori*'nin mide kanseri ve lenfoması gelişme riskini anlamlı olarak arttırdığı, bu bakterinin eradikasyonunun ise riski azalttığı öne sürülmüştür (14). Ciddi endoskopik atrofi, anastomoz hattında gastrit, antrumda histolojik atrofi, inflamasyon ve korpusta intestinal metaplazi gibi nedenler *H.pylori* eradikasyonunu takiben mide kanseri gelişimi için risk faktörleri olarak tanımlanmıştır (14).

2.1.2. Koruyucu Faktörler

Diyette hem çözünebilir hem de çözünemeyen lif ağırlıklı gıdalarla beslenmenin mide kanserine karşı belirgin bir koruma kalkanı oluşturduğu 2009 yılında İtalya’da yapılan vaka kontrollü bir çalışmada tespit edilmiştir (15). Tahıl, baklagil, hububat, meyve ve sebze ağırlıklı diyetle beslenerek sağlanan yeterli lif alımı, proteaz inhibitör proteinlerinin kanserden koruyucu etkisi, diyetle yağ alımının azaltılması ve düşük kalori alımının önemli koruyucu faktörler olduğu tespit edilmiştir (15).

Brokolide bulunan sulforofan, sebze ve meyvelerde bolca bulunan flovan, alfa ancelikalakton, domateste bulunan likopen gibi fito-kimyasalların sitokrom P450 deaktivasyonu ve Faz II detoksifikasyon enzimlerinin biyoaktivasyonu ile kemopreventif aktivite sağlanmış olmaktadır (16).

Fiziksel aktivitenin kanser oluşumunu azaltıcı etkisi bugüne kadar 300’den fazla epidemiyolojik çalışma ile değerlendirilmiştir. Bu etkinin yağlanmada azalma, cinsel ve metabolik hormonlarda azalma, biyomarker ve insülin direnci değişiklikleri, bağışıklık fonksiyonunun geliştirilmesi ve inflamasyonun azaltılması gibi yollarla olduğu hipotez olarak öne sürülmüştür (17).

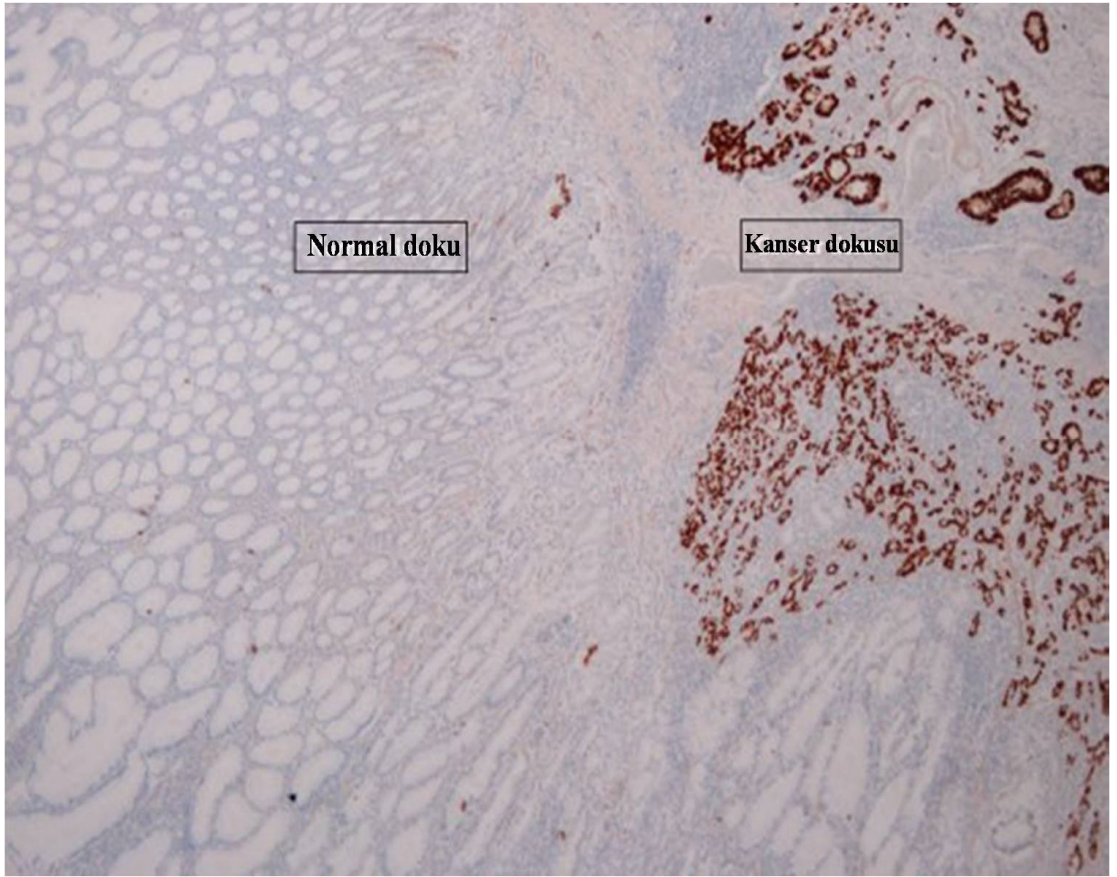
2.1.3. Mide Kanserine Predispozisyon Sağlayan Faktörler

Atrofik gastritler, 2 cm’den büyük adenomatöz polipler ve ülser nedeniyle yapılan mide rezeksiyonları mide kanserine yakınlığa neden olan faktörlerdir. Atrofik gastritte azalan asit ve pepsinojen sekresyonu sonucu oluşan alkali ortamın, bakteri kolonizasyonunun artışı ve kanserojen metabolitlerden nitrit ve nitrozamin oluşumuna neden olduğu bilinmektedir. Mide boşalmasının gecikmesiyle oluşan kronik irritasyon intestinal metaplazi ve hafif, orta ve ağır displazi gelişimine zemin hazırlamaktadır. Ağır displazi prekürsör bir lezyondur ve insitu karsinom olarak değerlendirilir (2, 18).

H. pylori bakterisi ile enfekte olmak mide kanseri gelişimi için yaygın risk faktörüdür. Enfeksiyonun yol açtığı kronik inflamasyon sırasıyla gastrit, atrofi, metaplazi, displazi, kanser oluşumuna yol açar. 6.000 erkek üzerinde yapılan kohort bir çalışmada serumpepsinojen ve *H.pylori* antikör titresi ölçümleri gibi testlerle değerlendirilip derecelendirilebilen inflamasyon ve atrofinin ilerleyişinin kanser riskini belirgin

arttırdığı tespit edilmiş. Bu serum testleriyle kanser riskinin sağlıklı bireylerde değerlendirilmesi gündeme getirilmiştir (19).

Kanser dokusunda normal dokuya göre p53 ekspresyonunun yüksek düzeyde oluşu ve *H. pylori*'ye ikincil gastritli dokularda da p53 ekspresyonunun yüksek düzeyde olduğu tespit edilmiş (Şekil 3) ve böylece *H. pylori*'nin p53 ekspresyonunu etkileyerek mide kanseri oluşumuna etkisi gösterilmiştir (20). Önerilen bu yüksek dereceli displazik alanların endoskopik ya da cerrahi yöntemle çıkarılmasıdır.



Şekil 3. Mide kanseri immünohistokimyasal boyaması: Normal mide dokusu ve *H. Pylori* pozitif mide kanseri dokusu (intestinal tip) kesitinde p53 için immünohistokimyasal boyamada 40'lık büyütmede pozitif hücrelerin nükleusunun kahverengi boyanışı (21).

2.1.4. Midenin Prekanseröz Lezyonları

1998 yılında Avrupa, Japonya ve Kuzey Amerika'daki patologların konsensusuyla oluşturulan, 2000 yılında Dünya Sağlık Örgütü tarafından da kabul edilen, Padova uluslararası mide prekanseröz lezyonları sınıflaması Tablo 1'de sunulmuştur.

Tablo 1. Midenin prekanseröz lezyonları (22)

1. Displazi / Noninvaziv neoplazi olmayan
1.1 Reaktif foveolar hiperpazi
1.2 İntestinal metaplazi
1.2.1 Komplet tip
1.2.2 İnkomplet tip
2. Belirsiz displazi/ noninvazif neoplazi
2.1 Foveolar hiperproliferasyon
2.2 Hiperproliferatif intestinal metaplazi
3. Noninvazif neoplazi
3.1. Low grade noninvazif neoplazi
3.2. High grade noninvazif neoplazi
3.2.1. İnvazyon olmadan karsinom şüphesi içeren
3.2.2. İnvazyon olmadan karsinom içeren
4. Şüpheli invazif (adeno) karsinom
5. İnvazif adenokarsinom

2.1.5 Histopatolojik Olarak Mide Kanserlerinin Sınıflaması

Mide kanserlerinin %90'ını mide mukozasının glandular epitelyumundan kaynaklanan adenokarsinomlar oluşturur (23), % 5'ini lenfomaya bağlı olarak maltoma ve geri kalan kısmı da karsinoid ve stromal tümörler oluşturmaktadır. 1965 yılında Pekka A Laurén'in yaptığı sınıflandırmayla (Lauren sınıflaması) mide adenokarsinomları; diffüz tip, intestinal tip ve miks tip olarak 3 tipe ayrılmıştır (24).

Mide kanserlerinin aynı tümöral kitlede bile yapısal ve sitolojik özelliklerine göre geniş çeşitlilik göstermesi nedeniyle histolojik tiplendirmesinde problem yaşanmaktadır. Bunun sonucu olarak mide kanseri histolojik tiplendirmesi için birden çok sınıflandırma sistemi oluşturulmuştur. Yine de bu sınıflandırma kargaşası içerisinde tatminsizlik söz konusudur. Uygulanacak en iyi tedavi seçeneği için kesin evrelemenin önemi büyüktür. Günümüzde geniş ölçüde Lauren ve Dünya Sağlık Örgütü'nün sınıflaması kullanılmaktadır (25).

Lauren'in mide kanserlerini diffüz, intestinal ve miks tip olarak 3 tipe ayırmasına karşın Dünya Sağlık Örgütü sınıflaması diferansiyasyonun histopatolojik özelliklerine göre olup; papiller, müsinöztübüler ve taşlı yüzük hücreli olarak tanımlama yapılmıştır (25). (Tablo 2)

Tablo 2. Dünya Sağlık Örgütü'nün yaptığı sınıflandırmaya göre mide kanserleri

-
- 1- Adenokarsinom
 - 1.1. Tübüler
 - 1.2. Papiller
 - 1.3. Müsinöz
 - 2- Taşlı yüzük hücreli karsinom
 - 3- Adenoskuamöz karsinom
 - 4- Skuamöz hücreli karsinom
 - 5- İndiferansiye karsinom
-

1992 yılında Goseki ve arkadaşları tübüler diferansiyasyonu ve intrasellüler müsinin değerlendirilmesini baz alan bir sınıflandırma sistemi tanımlamışlardır. Bu sınıflandırmayla mide kanserlerini derecelerine göre grup 1, 2, 3 ve 4 olarak sınıflandırmışlardır (25).

2005 yılında tanımlanan MING çalışmasına göre ise tümör hücrelerinin büyüme paterni göz önünde bulundurulmuş; genişleme şeklinde büyüme paterni ve infiltre etme

şeklinde büyüme paterni olarak ikiye ayrılmıştır. Buna göre çalışılan mide kanserlerinin %67'si genişleme paterni, %33'ü infiltrate etme paterni sergilemiştir (25).

2.1.6 Mide Kanserinde Evrelendirme

Mide kanseri için iki ana evrelendirme sistemi kullanılmaktadır: Uluslararası Kanser Cemiyeti (IUCC) tarafından tanımlanan tümör-lenf nodu-metastaz (TNM) evrelemesi ve Japon Mide Kanseri Cemiyeti tarafından tanımlanan Japanese Classification of Gastric Carcinoma (JGCA) evrelemesi (Tablo 3).

Tablo 3. 6. ve 7. TNM sınıflaması: 6.yayına göre TNM sınıflaması (A), 7.yayına göre TNM sınıflaması (B), LN (lenf nodu)(26)

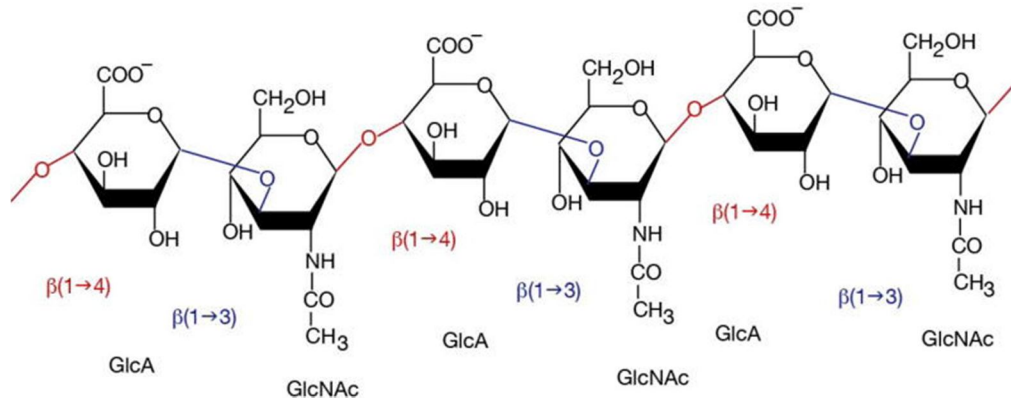
A			M0				M1
			N0	N1	N2	N3	
			0	1 ~ 6	7 ~ 15	16 ~	
M0	T1	Mukoza, submukoza	IA	IB	II	IV	IV
	T2a	Muskülaris propriya	IB	II	IIIA	IV	IV
	T2b	Subseroza					
	T3	Seroza	II	IIIA	IIIB	IV	IV
	T4	Komşu yapı	IIIA	IV	IV	IV	IV
M1			IV	IV	IV	IV	IV

B			M0					M1
			N0	N1	N2	N3a	N3b	
			0	1 ~ 2	3 ~ 6	7 ~ 15	16 ~	
M0	T1	Mukoza, submukoza	IA	IB	IIA	IIB	IIB	IV
	T2	Muskülaris propriya	IB	IIA	IIB	IIIA	IIIA	IV
	T3	Subseroza	IIA	IIB	IIIA	IIIB	IIIB	IV
	T4a	Seroza	IIB	IIIA	IIIB	IIIC	IIIC	IV
	T4b	Komşu yapı	IIIB	IIIB	IIIC	IIIC	IIIC	IV
M1			IV	IV	IV	IV	IV	IV

2.2 MİDE KANSERİ VE EKSTRASELLÜLER MATRİKS

Ekstrasellüler matriks hücre proliferasyon ve migrasyonunda önemli rollere sahiptir (27). ESM anormallikleriyle mide kanserinde içinde olduğu bazı kanser tiplerinin ilişkili olduğuna dair çalışmalar mevcuttur (27-29). Matriks anormalliklerini mide kanserinde belirlemek hastalığın sürecini anlamamıza yardım edecektir. Ekstrasellüler matriksde proteoglikan, elastin, kollajen gibi birkaç farklı komponent mevcuttur (30). Proteoglikanlar, glikosaminoglikan zinciri bağlanan bir kor proteinine sahiptirler. GAG midede hiyalüronan, heparan sülfat, dermatan sülfat ve kondroitin sülfat olarak bulunur. Organ yapısına katılmalarının yanında matriks komponentleri fizyolojik ve patolojik süreçlerin düzenlenmesiyle de ilişkilidirler. Üç adet izoformu bulunan *hiyalüronan sentaz* enzimleri (HAS1, HAS2, HAS3) tarafından sentez edilen hiyalüronan, *hiyalüronidaz* enzimi tarafından katabolize edilir (31). Farklı molekül ağırlıklı hiyalüronan moleküllerinin farklı görevleri olduğu gösteren çalışmalar mevcuttur (32). Düşük molekül ağırlıklı hiyalüronanın çeşitli sitogenleri stimüle ettiği; yüksek molekül ağırlığına sahip olanların ise tam tersi bir şekilde anti-inflamasyon etkisine sahip olduğu ve doku onarımına katkıda bulunduğu rapor edilmiştir (33-37). Bu yüzden hiyalüronan molekülü inflamasyonun boyut bağımlı bir mediatörü olarak tanımlanmıştır (38). Normalde dokularda hiyalüronan, HMW-HA olarak bulunur ve moleküler ağırlığı yaklaşık olarak 10^7 Da'dur. HMW-HA glikokaliksin önemli bileşenlerinden birisidir ve diğer molekülleri ve hücreleri dışlayarak anti-angiogenik faktör fonksiyonu görür (38). Pek çok çalışma HMW-HA'nın endotel hücrelerinde hem proliferasyon hemde migrasyonu azaltarak anjiyogenezi inhibe ettiğini göstermiştir (39-41). HMW-HA ekstrasellüler yüzeyde hücre yüzey reseptörleriyle etkileşerek immün hücrelerce tanınmayı engeller ve makrofajların fagositozunu bloke eder (42, 43).

Hiyalüronan, β -D-(1→3) glukuronik asit ve β -D-(1→4)-N-asetilglukosaminin tekrarlayan disakkarit ünitlerinden oluşmaktadır (44) (Şekil 4). Diğer glikozaminoglikanlardan farklı olarak hiyalüronan, proteoglikanları oluşturmak için proteinlere bağlanmaz.



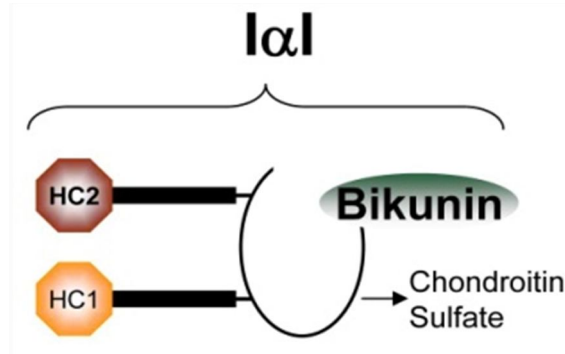
Şekil 4. Hiyalüronan molekülünün yapısı

Yüksek molekül ağırlıklı hiyalüronanın HAS1 ve HAS2 enzimleri; düşük molekül ağırlıkta olanın ise HAS3 enzimi tarafından sentez edildiği bilinmektedir. Doku hasarını müteakip inflamasyon sürecinde ekstrasellüler matrikste hiyalüronan birikiminin artması 25 yıldır bilinen bir bilgidir. Romatoid artrit (RA) eklem dokusunda (31, 45); hem insanlarda hem de hayvan deney modellerinde oluşturulan akciğer hastalıklarında (46); inflamatuvar karaciğer hastalığında (47); vasküler hastalık sırasında (48); reddedilen böbrek nakli hastalarında (49) ve diyabetik nefropatide (50); inflamatuvar bağırsak hastalığında (51) ve deneysel kolit modellerinde (52) inflamasyon sürecinin hakim olduğu tablolarda artmış hiyalüronan birikimi gösterilmiştir. Hiyalüronan molekülünün degrade olan ürünlerinin bazı genleri, dokudaki sitokinleri, büyüme faktörleri ve adezyon moleküllerinin üretimini tetiklediği biliniyor (53). Bunun dışında hiyalüronan molekülünün degrade ürünleri anjiogenezi de stimüle ederler (54, 55). Son 15 yılda tanımlanan yollar hiyalüronanı doğal ve kazanılmış immünitinin regülatörü olarak göstermektedir. Hasarlı ESM'deki hiyalüronan'ın çevre hücrelerin koruyucu cevabının düzenlenmesinde etkili olduğunu göstermektedir. Ancak ESM'in ya da hiyalüronan fragmanlarının aşırı üretimi olan romatoid artrit, iltihaplı bağırsak hastalığı, ateroskleroz, diyabet ve hipertansiyon gibi düzensiz durumlarda,hiyalüronan'ın kronik inflamatuvar durumlara katkıda bulunması olasıdır (56). hiyalüronan, in vivo olarak hem pro-inflamatuar hem de anti-inflamatuar etkili bir moleküldür. Ve bu aykırı fonksiyonları polimer uzunluğu ile oligosakkaridin hangi reseptörlere bağlandığına bağlıdır. HMW-HA akciğer epitelyum hücrelerini apoptozise karşı koruyucu olarak görev yaparken karaciğer hücrelerinde T hücre aracılı hasar modelinde pro-inflamatuar sitokinleri azaltarak hasara karşı koruyucu etki yapar (38).

Regülatör T hücrelerde HMW-HA, CD44 üzerinden STAT-5 sinyalinin stimüle ederek devamlılıklarını sağlar ve hücre proliferasyonunu inhibe eder. HMW-HA tarafından uyarılan T hücre öncülleri IL-10 üretir ve bu hücrelerin farelerde kolitis modelinde hastalık seyrini hafiflettiği gösterilmiştir (57, 58).

Hiyalüronan oligosakkaritlerinin tekrarlayan yapısı ve hyalüronana bağlanan proteinin spesifitesi, hiyalüronan'ı pro- ya da anti-inflamatuar bir molekül olarak dikte etmektedir. ESM baskın olarak proteoglikanlar, glikoproteinler ve kollajenden oluşmaktadır ki bunların hem yapısal hem de regülatuar rolleri bulunmaktadır. Sonuç olarak hiyalüronanın pro- ya da anti-inflamatuar fonksiyon gösterebilmesi yeteneği onun boyutuna, mikro çevresine, lokalizasyonuna ve spesifik bağlanan partnerlerinin uygunluğuna bağlıdır (59, 60).

Bir serum proteini olan inter alfa inhibitör kompleksi “bikünin” denilen bir proteoglikan ve iki “heavy chain” molekülünün kovalent şekilde bir kondroitin sülfat zinciri ile bağlanmasıyla oluşur (38)(Şekil 5). Serum proteoglikan ailesinin serum proteaz inhibitörü olarak görev yapan bir üyesidir. İlk olarak tripsin inhibitörü olarak idrar ve serumda bulunmuştur (61). Karaciğer tarafından yüksek konsantrasyonlarda (0.15-0.5 mg/ml) kana salgılanır ve bu da total proteaz inhibitör aktivitesinin %5'ini oluşturur ki bu oranın inflammatuar patolojilerde artış gösterdiği raporlamıştır(62, 63).



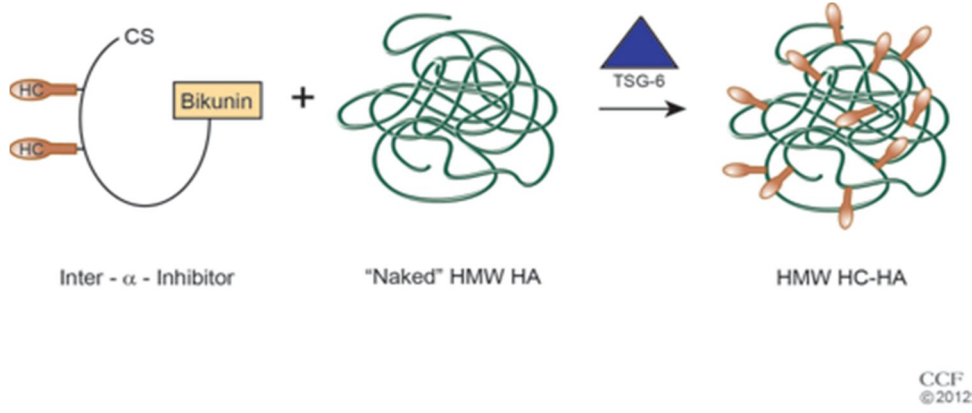
Şekil 5. IαI proteinin yapısı: Bir bikünine kondroitin sülfat yardımıyla iki heavy chain molekülün bağlanması sonucu oluşan yapıdır.

IαI, bir serin proteaz inhibitörü olan bikunine kovalent bağlanmış tek bir kondroitin sülfat zincirine sahip sıra dışı bir proteoglikandır ve heavy chain olarak tanımlanan başka bir protein ailesi (HC1, HC2, HC3) kondroitin sülfat zincirine C terminalindeki

aspartat ile N-asetilglukozaminin 6-hidroksili arasında bir ester bağı ile kovalent olarak bağlanmıştır (64, 65). IaI'a bağlanan heavy chainlerin fonksiyonları hala aydınlatılmış değildir. Altı farklı çeşidi bulunan heavy chain molekülünün sadece bu üç formunun IaI ve hyalüronan ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir (66-68).

TSG-6 enziminin kofaktörlüğünde bu heavy chain molekülleri hyalüronan molekülüne bağlanarak bir iskelet oluşturmakta ve bu oluşan yapı inflamatuvar hücrelerin çağrılmasında görev almaktadır (Şekil 6). Hem IaI hem de hyalüronan bağlanma kapasitesi olan TSG-6, IaI'ın kondroidin sülfat zincirindeki HC'lerin hyalüronan molekülüne HC-HA oluşturmak için trans-esterifikasyon reaksiyonu ile transferini katalizler, bu ovülasyonda belirgin kanıtlanmıştır (66).

Birçok inflamatuvar hastalıkta örneğin Crohn, astım, osteoartrit (OA) ve romatoid artritte hyalüronan üretimindeki artış hyalüronan'a kovalent bağlanan serum IaI heavy chain seviyelerindeki artış ile orantılıdır. Crohn hastalığında IaI heavy chainleri hyalüronan yapıları ile özellikle ilişkilidir ve inflamatuvar reseptörlerle rekabet halinde olarak aktive olmamış genç lökositler için yüksek derecede adezivlerdir (69, 70). Ayrıca, HC1 ve pentraxin 3 içeren solübl hyalüronan aktive olmuş nötrofil ve makrofajların apoptozisini tetiklemektedir. RA ve OA hastalarında sinovyal sıvıda IaI ve heavy chainler yüksek miktarda bulunur ve hyalüronan'a bağlı heavy chain komplekslerinin hastalığın ciddiyetiyle korele olarak inflame dokularda biriktiği gösterilmiştir (52, 71). OA'de sinovyal sıvıdaki TSG-6 aktivitesi OA progresyonunu ve sinovyal sıvı replasman ihtiyacını gösteren bir biyomarker olarak gösterilmiştir (72, 73). HC'lerin hyalüronan'a transferi substratların uygunluğundan etkilenen irreversible ve dinamik bir olaydır; küçük hyalüronan fragmanları (oligosakkaridler) irreversible HC akseptörleri gibi davranarak HC ile hyalüronan bağlanmasını bozabilir (74). Bikuninden yoksun IaI oluşturmamayan genetik defekt oluşturulan farelerle yapılan çalışmalar IaI heavy chainlerinin kompleman aktivasyonundaki inhibitör rolünü ortaya koymuştur. IaI yokluğu fare serumunda yüksek kompleman aktivasyonuna neden olmuştur ve solübl IaI içeren HC enjeksiyonundan sonra bu durumun reversible olduğu görülmüştür (75). IaI insanlarda kompleman aktivasyonunun potent bir inhibitörü olarak görülmez, sadece erken evrelere etkilidir (76). RA gibi kronik inflamatuvar koşullarda IaI heavy chainleri ve hyalüronan fragmanlarının birikimi yüksek seviyelerde olur ve etkileri çok daha belirgindir.



Şekil 6. Hiyalüronanmodifikasyonu oluşum şeması: IaI proteininde bulunan HC'ler TSG-6 enzimi yardımıyla katalize edilerek hiyalüronan molekülü üzerine taşınırlar. Bu şekilde hiyalüronan molekülü heavy chainlerle dekore edilmiş olur ki bu şekilde inflamasyon hücrelerini daha çok kendisine çektiği düşünülmektedir (61).

TSG-6 ekspresyonu, pek çok durumda hiyalüronan sentezi ile koordineli olarak TNF- α , IL-1 β , TNF- β ve lipopolisakkarit gibi birçok faktörden etkilenir (77). İnflamatuvar stimulus ile uyarılmasına rağmen TSG-6'nın, IaI'nın anti-plazmin aktivitesini arttırmak ve matriks metalloproteinazların ve kıkırdak doku agrekanazlarının inhibisyonu dahil pek çok koruyucu özelliği vardır (78). TSG-6 ve IL-8'in glikozaminoglikan bağlayıcı bölgesinin direkt etkileşiminin, IL-8'in endotel hücre yüzeyindeki heparan sülfat ile etkileşimini bloke ederek nötrofil migrasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (79, 80). hiyalüronan'a TSG-6 eklenmesinin CD-44 bağımlı hiyalüronan'a lenfosit hücre adezyonunu arttırdığı gösterilmiştir (81). İlginç olarak, bağımsız hiyalüronan ve IaI'nın anti-inflamatuvar etkileriyle TSG-6 link modülü tek başına nötrofil migrasyon ve adezyonunun inhibe edebilir (82). Güncel çalışmalar göstermektedir ki; 1) TSG-6 link modülü hem hiyalüronan hem de bikunin C4S için bağlanma bölgesine sahiptir. 2) TSG-6; HC1,HC2 ve HC3'e non-kovalent olarak hiyalüronan'dan daha yüksek afinite ile bağlanma kapasitesine sahiptir. 3) TSG-6 tek başına hiyalüronan'a çapraz bağlanma kapasitesi yüksek olsa da yoğunlaşma ve adezyon derecesi HC1 ve HC2 içeren IaI eklenmesi ile reversible saptandı (83). TSG-6 yoksun farelerde yapılan astım

alışmasında bu farelerin hava yolu cevapsızlığına dirençli olduğu ve azalmış hiyalüronan depozitleri gösterdiği ve HC-HA kompleksi yokluğu ve azalmış eozinofilik inflamasyon olduğu görüldü (84).

İnflamasyon sürecinde etkili olan hiyalüronan molekülünün proliferasyon ve anjiogenezi tetikleme özelliği mevcuttur (85). Bu durumun karsinogenezde de etkili rolünün olabileceğine ve şayet bu rol ispatlandığında hiyalüronan üretim yolları bloke edilerek hastalığın oluşmasını önlemede alternatif bir yol geliştirilebileceğini düşünülmektedir.

Hastaların kan örneklerinde de yüksek seviyelerde hiyalüronan bulunması, bu hastalığın patobiyolojisinde önemli rolü olduğunu kuvvetli bir şekilde gösteriyor. Bu gözlemler temel alınarak projemizin amacı yüksek seviyelerdeki hiyalüronan'nın mekanizmasını ve mide kanseri patofizyolojisindeki hiyalüronan'nın mekanistik rolünü açığa çıkarmaya çalışmaktır. Kanserın gelecekteki tedavisi bu hastalıktaki hücre proliferasyonu ve anjiogenezi hedef alabilme kabiliyetimize bağlıdır. Bu sebeple, bu çalışmada mide kanserinde sellüler proliferasyon ve yenilenmenin patobiyolojisinin anlaşılmasının yanında; tanı, takip ve hastalığın tedavisi için daha iyi yollar geliştirmesinde etkin bilgiler sağlanması hedeflenmiştir.

3. HASTALAR VE YÖNTEM

Bu prospektif çalışma Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi (ERÜTF) Genel Cerrahi Anabilim Dalı bünyesinde 01.01.2013 ve 01.01.2014 tarihleri arasında gerçekleştirildi. Çalışma öncesinde ERÜTF Etik Kurulu onayı (Tarih: 08-11-2013; Etik kurul karar no: 2013/580) alındı. Bu çalışma 114S156 Nolu 3001 Tübitak projesi tarafından desteklenmektedir.

Mide kanseri tanısı ile ERÜTF Genel Cerrahi Kliniğine başvuran hastalar çalışmaya alındı. Çalışmaya dahil edilmeden önce hastaların kendisine ve birinci dere yakınlarına çalışma ile ilgili bilgilendirme yapıldı. Bilgilendirme sonrası bilgilendirilmiş onam formu hasta veya yakını tarafından dolduruldu.

Hastaların çalışmaya dahil edilme endikasyonlarından en önemlisi; histolojik olarak mide kanseri tanısı alması ve buna yönelik planlanan küratif tedavi içerisinde cerrahi tedavinin bulunmasıdır. Ayrıca hematolojik tabloda ve çalışılan kriterlerde farklılığa neden olacağı için hematolojik malignite tanısı, senkron tümörü, gebelik durumu, nüks mide kanseri veya daha önce neoadjuvant kemo-radyoterapi almış olan hastalar çalışmaya dahil edilmedi.

Doku çalışmalarımız için 8 gönüllü dahil edildi. Kan örnekleri ise 27 mide kanserli hasta ve 29 sağlıklı kontrollerden temin edildi. Çalışmanın temel aldığı materyal olan mide kanser dokusunun ve sağlam dokunun elde edileceği rezeksiyon materyali hastanın tedavisinin vazgeçilemez bir parçası olan cerrahi prosedür sonucunda elde edildi.

Rezeke edilen mide dokusunda yeterli büyüklükte makroskopik tümöral lezyonu olan hastalarda, tümörden 1x1'cmlik, midenin bütün histolojik katlarını içeren parça alındı, bunu takiben rezeke edilen mideden, tümöral lezyondan en uzaktaki sağlam mide dokusundan karşılaştırma amacıyla tam kat mide dokusunu içeren başka bir örnek daha alındı. Çıkarılan mide kesiminde sağlam dokunun alınmasına izin verecek kadar sağlam mide dokusu bulunmalıdır. Bu yüzden linitis plastika (matara mide) vakaları bu sağlam mide dokusu bulunmadığı için çalışma dışına alındı. Ayrıca sağlam olduğu düşünülen alandan alınan parçada tümöral infiltrasyon saptanan hastalar da çalışmaya dahil edilmedi.

Cerrahi teknikte, ameliyat öncesi görüntüleme yöntemlerinin bulguları ameliyat bulgularıyla örtüşüyor ve küratif rezeksiyon planlanıyorsa D2 diseksiyon, küratif değil de palyatif rezeksiyon planlanıyorsa D1 rezeksiyon yapıldı. Mideden parça alınması işlemlerinin hepsi çalışma ekibimizin üyesi olan patoloji uzmanı tarafından piyes çıktıktan hemen sonra patolojik inceleme ve evrelemenin zarar görmesine engel olacak şekilde alındı.

HEDEF 1

Mide kanseri olan ve sağlıklı bireylerde plazma hyalüronan seviyelerini tespit etmek.

Kan örneklerinin toplanması ve saklanması:

27 mide kanserli hastadan ve 29 sağlıklı gönüllüden elde edilen kan örnekleri etilendiamin tetraasetik asitli (EDTA) tüplere alındıktan sonra 1500 rpm'de 15 dakika santrifüj edilerek kanın plazma kısmı -80 °C'de tüm örneklerin hepsi toplanıp çalışma başlayana kadar saklandı.

Plazma hyalüronan seviyelerinin Enzyme-Linked İmmunosorbent Assay (ELİSA) yöntemi ile ölçülmesi:

Plazma hyalüronan düzeyine bakmak için, gönüllülerden alınan kanlar yukarıda belirtildiği gibi muamele edilip saklandı. Plazma hyalüronan seviyeleri R&D firmasının DY3614 katalog numaralı ELİSA kiti ile belirlendi. Testler alınan kitin protokolüne göre yapıldı. Kitten çıkan bütün ürünler kullanmadan önce 30 dakika oda ısısında tutuldu. Serum örnekleri 450 nm dalga boyunda SpectraMax Gemini XPS

marka mikropate okuyucuda okundu ve sonuçlar ng/ml olarak ifade edilerek Soft Max Pro ver. 6.2 programında analiz edildi.

Özetle yapıış ekli:

Gerekli Materyaller

- Tween20
- PBS
- 0,2 um filtre kağıdı
- Mikropate
- Capture Reagent
- Detection Reagent
- HA Standart
- Streptavidin HRP
- Color Reagent A
- Color Reagent B
- Stop Solution
- dH₂O
- Sealing film
- Folyo kağıdı
- 10 adet falkon tüp
- 100 adet 1,5 ml ependorf
- 500 ml beher
- 1000 ul pipet ucu ve pipet
- 100 ul pipet ucu ve pipet
- 200 ul Multi channel pipet
- Cam yazar kalem

- Phmeter
- Manyetik karıştırıcı
- Shaker
- Vortex
- Santrifüj
- ELİSA Washer
- ELİSA Reader

Solüsyonların Hazırlanması

Wash Buffer (Yıkama tamponu): %0,05 Tween20 in PBS, pH: 7,2-7,4

500 ml wash buffer için 250ul Tween20, 500 ml PBS ile manyetik karıştırıcıda karıştırılır.

Reagent Diluent: %5 Tween20 in PBS, pH: 7,2-7,4

100 ml reagent diluent için 500 ul tween20, 100 ml PBS ile manyetik karıştırıcıda karıştırılır. 0,2 um filtre kağıdından geçirilir.

Capture Reagent: 50 ul stok capture reagent, 12 ml Pbs'te çözündürülür.

Block Buffer: 1500 ul tween20, 30 ml PBS' te çözündürülür. Vortexlenir.

Hiyalüronan Standart: Kite hazır gelen toz haldeki standarta 500 ul reagent diluent eklenince konsantrasyon 1720 ng/ml olur.

En yüksek standart 270 ng/ml olacak şekilde hazırlanır.

STN1 (270ng/ml) = 94 ul stok standart + 506 ul Reagent diluent=600ul

STN2 (90ng/ml) = 200 ul stn1 + 400 ul Reagent diluent

STN3 (30ng/ml) = 200 ul stn2 + 400 ul Reagent diluent

STN4 (10ng/ml) = 200 ul stn3 + 400 ul Reagent diluent

STN5 (3,3ng/ml) = 200 ul stn4 + 400 ul Reagent diluent

STN6 (1,1ng/ml) = 200 ul stn5 + 400 ul Reagent diluent

STN7 (0,36ng/ml) = 200 ul stn6 + 400 ul Reagent diluent

Detection Reagent: Kitle hazır toz halde gelir.

50 ul detection reagent + 12 ml Reagent diluent ile karıştırılır. 50 ul ler halinde ependorf içinde -20 C saklanabilir.

Streptavidin HRP: Kitte hazır olarak bulunur. 1/200 oranında seyreltilir. 60 ul streptavidin HRP 12 ml Reagent diluent ile karıştırılır.

Substrat Hazırlama: Kullanımdan hemen önce hazırlanır.

6 ml Color Reagent A + 6 ml Color Reagent B karıştırılıp vortexlenir.

Platelerin Hazırlanması: Hazırlanan Capture Reagent'tan 100 ul plate kuyucuklarına dağıtılır. Sealing film ile kapatılır. Oda sıcaklığında overnight bırakılır.

Capture reagent plateden çırpılarak uzaklaştırılır. Wash buffer ile 3 kez yıkama yapılır.

Yıkamadan sonra boş olan plate'in her bir kuyucuğuna 300 ml block buffer dağıtılır. Sealing filmle kapatılıp, oda sıcaklığında 1 saat bekletilir

Block bufeer plateden çırpılarak uzaklaştırılır. Wash buffer ile 3 kez yıkama yapılır.

Prosedür:

Hazır olan platelere hazırlanan standartlar ve örnekler 100 ul ler halinde yüklenir. Blank kuyucuğuna yalnız Reagent diluent konur. 2 saat inkübasyona alınır.

Uzaklaştırma ve yıkama işlemi yapılır (3 kez).

Her bir kuyucuğa 100 ul Detection reagent dağıtılır. 2 saat oda sıcaklığında inkübasyona alınır.

Uzaklaştırma ve yıkama işlemi yapılır (3 kez).

Streptavidin HRP 100 ul ler halinde kuyucuklara yüklenir. Alüminyum folyo ile kapatılıp 20 dakika oda sıcaklığında inkübasyona alınır.

Uzaklaştırma ve yıkama işlemi yapılır(3 kez).

Her bir kuyucuğa 100 ul substrat solution dağıtılır. Alüminyum folyo ile sarılıp 20 dakika oda sıcaklığında inkübasyona alınır. Mavi renk oluşumu gözlenir.

Substrat solution uzaklaştırılmaz. Üzerine 50 ul stop solution dağıtılır. Plate 20 dakika içerisinde okutulmalıdır.

HEDEF2

Mide kanseri olan bireylerden elde edilecek kan ve mide dokusu örneklerinden TSG-6mRNA ekspresyonunu belirlemek.

Doku örneklerinin toplanması ve saklanması:

Cerrahi sonrası elde edilen dokular trizol içerine eklenerek homojenizatör ile homojenize edildikten sonra mRNA izolasyonu için -80 C’de saklandı.

mRNA izolasyonu:

Gerekli Malzemeler

- 1) Trizol (Ambion RNA Cat #15596-026)
- 2) Homojenizatör
- 3) 1,5 ml eppendorf tüpler
- 4) Kloroform
- 5) %100 izopropanol
- 6) %75 alkol (-20 °C’de bekletilmiş)
- 7) dH₂O

Prosedür:

Örneklerin Hazırlanması

- 1) 50-100 mg doku örneğine 1 ml Trizol eklenir.
- 2) Homojenizatör yardımıyla doku homojenize edilir. Homojenizatörün ayarı önce 5'e sonra yavaş yavaş 11'e getirilir.
- 3) Her örnekten sonra homojenizatör temizlenir.
- 4) **Alternatif adım:** Eğer doku yüksek miktarda yağ içeriyorsa bu adım uygulanır. Homojenize örnek +4°C'de 12000 g de 10 dk santrifüj edilir. En üst tabaka yağ tabakasıdır ve pipetle çekilip atılır. Alttaki tabaka yeni bir tüpe aktarılır.
- 5) Homojenize örnekler oda sıcaklığında 5 dk bekletilir.
- 6) Homojenize örnekler cryo tüplerde olduğu için bu şekilde santrifüj edilemez. Bu nedenle yeni eppendorf tüplere aktarılır.
- 7) Her bir örneğin üzerine 200 ul kloroform eklenir.
- 8) Tüpler 15 sn nazikçe çalkalanır.
- 9) 2-3 dk oda sıcaklığında bekletilir.
- 10) +4°C'de 12000g de 15 dk santrifüj edilir.
- 11) Renksiz üst faz, 100'er ul çekilerek yeni tüplere aktarılır. Diğer fazları çekmemeye dikkat

RNA İzolasyonuna başlanması

RNA Çöktürme

- 1) Yeni tüpe aktarılan renksiz üst faza 500 ul %100 izopropanol eklenir.
- 2) Oda sıcaklığında 10 dk bekletilir.

3) +4°C'de 12000g de 10 dk santrifüj edilir.

RNA Yıkama

- 1) Santrifüjden sonra üst faz dökülür.
- 2) Alttaki pellet (RNA) 1 ml %75'lik etanol (-20 °C'de bekletilmiş) ile yıkanır.
- 4) Kısaca vortekslenir. +4°C'de 7500g de 5 dk santrifüj edilir.
- 3) Alkol pipetle çekilerek uzaklaştırılır. Kısa bir up-down yapıldıktan sonra kalan alkol de pipetle çekilir.
- 4) Kabinde 5-10 dk kurutulur.

RNA'nın Resüspense Edilmesi

- 1) RNA pelletine 30 ul dH₂O eklenir. Pipetaj yapılarak çözündürülür.
- 2) 55-60 °C'de 10-15 dk bekletilir. RNA ölçüme hazırdır.

RNA miktarının ölçülmesi:

Kullanılan Cihaz: Biospec-Nano (Shimadzu)

- 1) İlk olarak H₂O-1 yazılır, 2 ul H₂O eklenir ve BLANK seçilir.
- 2) Sonra H₂O-2 yazılır, 2 ul H₂O eklenir ve START ile okuma başlatılır.
- 3) Her bir örnek için isim yazılır. 2'ser ul yüklenir ve START ile teker teker okutulur. Nükleik asit konsantrasyonunu ng/ul olarak verir.

OD 260/280 oranı 2'ye yakın olması beklenir.

=2 mükemmel

>2 genomik DNA kontaminasyonu

<2 protein kontaminasyonu

Bu evreden sonra RNA cDNA sentezi için hazırdır.

cDNA sentezi:

Real-time kantitatif PCR ile TSG-6 enziminin mRNA ekspresyonları hem mide kanseri hem de sağlıklı bireylerden elde edilecek mide dokularından da ölçülecektir. RNA doku ve hücrelerden Trizol yöntemi ile izole edilecek ve herhangi bir DNA kontaminasyonunun olmaması için elde edilen RNA'ya *DNase I* eklenecektir. Total RNA'dan (maximum 1 µg RNA kullanılacaktır) RT-PCR ile SuperScript First-Strand Synthesis System kullanılarak üretici firma önerisine göre cDNA elde edilecektir. Aşağıdaki protokol uygulanacaktır:

1 µg RNA + 1 µl Oligo (dT) + 1 µl 10 mM dNTP karışımı 10 µl'ye tamamlanarak 65 °C'de denaturasyon amacıyla 5 dakika inkübe edilerek, primerlerin bağlanması amacıyla buza alınacaktır. Sonrasında bu karışıma 10 µl cDNA sentez karışımı (10X RT buffer 2 µl, 25 mM MgCl₂ 4 µl, 0.1 M DTT 2 µl, RNaseOUT. (40 U/µl) 1 µl SuperScript. III RT (200 U/µl) 1 µl) eklenerek 50 °C'de 50 dakika inkübe edilecektir. Reaksiyon 85 °C'de 5 dakika inkübasyonla sonlandırılacak ve elde edilen 20 µl cDNA reaksiyon karışımı 10 kat dilüe edilerek Real-time PCR'da kullanılacaktır.

mRNA ekspresyonu için Real Time RTQ-RT PCR:

Bütün Real-Time PCR'lar için SYBR green teknolojisi aşağıdaki kondüksiyon ile kullanılacaktır.

Real-Time PCR için aşağıdaki 50 µl'lik veya 25 µl'lik karışım hazırlanacak:

25 µl SYBR Green Master Mix (2x)

1 µl cDNA 2 µl primer çift karışımı (5 pmol/ml her bir primer)

22 µl H₂O

Total volüm 50 µl

96 kuyucuklu platelere yerleştirilecek olan PCR reaksiyon miksleri Roche cihazının imkan sağladığı 2 adımlı hızlı PCR protokolü kullanılarak çoğaltılacak ve amplifikasyon grafikleri cihaz software'i kullanılarak analiz edildikten sonra gen ekspresyon kuantifikasyonu $\Delta\Delta C_t$ hesaplama metodu ile yapılacaktır (86).

İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME

Tüm istatistik analizleri JMP versiyon: 5.0.1.2 programı ile gerçekleştirildi. Devamlı değişkenler bağımsız iki-tailed student t test ile karşılaştırıldı. $P \leq 0.05$ anlamlı farklılık olarak göz önünde bulunduruldu.

4. BULGULAR

ERÜTF Genel Cerrahi Kliniğinde gerçekleştirilen çalışmaya mide kanseri tanısı olan 27 hasta ve kontrol grubunu oluşturan 29 sağlıklı gönüllü dahil edildi. Hastaların 20'si (% 74,0) erkek ve 7'si (% 25,9) kadındı. Çalışmaya alınan hastaların yaş ortalaması 58,9 ($\pm 14,1$) saptandı. Hastaların 15'inde (% 55,5) ilk başvuru şikayeti ağrı idi.

4.1. Uygulanan Cerrahi

Mide kanseri tanısıyla cerrahi tedavisi planlanan hastalara diseksiyon şekli D1 ya da D2 yapılmasına karar verilirken; operasyon anındaki batın içi bulguları, tümör invazyonu, görülebilen uzak metastaz varlığı, hastanın performans statüsü ve yaşına dikkat edilerek karar verildi; 15 (% 55,5) hastaya D1 ve 12 (% 44,4) hastaya D2 diseksiyon yapıldı. Tümörün midedeki yerleşim yerine göre 14 (% 51,8) hastaya total rezeksiyon, 13 (% 48,1) hastaya subtotal rezeksiyon yapıldı.

4.2. Rezeke edilen mide kanser dokusunun özellikleri

Mide kanseri tanısıyla operasyona alınan hastaların lezyonun midedeki yerleşimine bakıldığında: 11 (% 40,7) hastada küçük kurvatur, 6 (% 22,2) hastada antrum, 6 (% 22,2) hastada kardiya, 4 (% 14,8) hastada korpusta olduğu görüldü. Cerrahi prosedür uygulandıktan sonra ERÜTF Patoloji Anabilim Dalı Laboratuvarında yapılan değerlendirmelere göre hastaların 19 (% 70,3)'ünün tümör boyutu 5 cm ve üzerinde iken 8 (% 29,6)'inin tümör boyutu 5 cm'nin altındaydı.

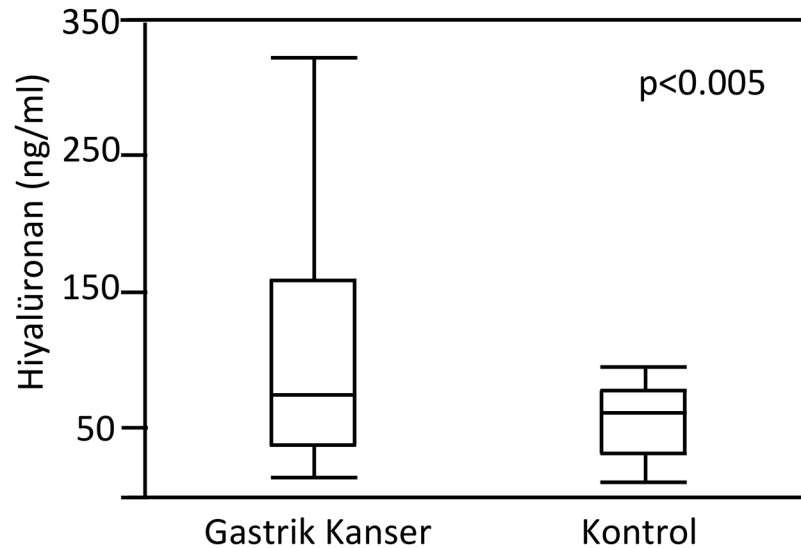
Patolojik incelemeler sonucunda; 21 (% 77,7) hastanın adenokarsinom histolojik tipinde, 5 (% 18,5) hastanın taşlı yüzük hücreli karsinom tipinde ve 1 tanesinin ise indifferansiye karsinom tipinde olduğu görüldü.

Histolojik incelemelerde patolojik grade derecelendirmesi sonrası; 4 (% 14,8) hastanın grade 2, 10 (% 37,0) hastanın grade 3, 13 (% 48,1) hastanın da grade 4 olduğu görüldü.

TNM sınıflamasına göre sınıflandırıldığında; 5 (% 18,5) hastanın evre 1-2 ve 22 (% 81,4) hastanın da evre 3-4 olduğu görüldü. 10 (%37,0) hastada metastatik hastalık olduğu tespit edildi. Hastaların demografik verileri ve mide kanseri dokusunun patolojik özellikleri ile hastaların periferik kandaki hiyalüronan miktarları karşılaştırıldığında elde edilen sonuçlar Tablo 4’te görüldüğü gibidir.

4.3. Mide kanserinde plazma hiyalüronan değerlerinin sağlıklı kontroller ile ilişkisi.

27 mide kanseri hastası ve 29 sağlıklı gönüllünün plazma hiyalüronan seviyeleri karşılaştırıldığında mide kanseri grubunda plazma hiyalüronan seviyesi, istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek saptandı ($p<0,05$). (Şekil 7)



Şekil 7. Mide kanseri hastaları ve kontrol grubu plazma hiyalüronan seviyesi karşılaştırması: Plazma hiyalüronan seviyeleri mg/dL (mean±SD); mide kanseri (n=27): 101.19±76.4, sağlıklı kontrol (n=29): 57.99±10.44 ($p<0.005$).

4.4. Plazma hiyalüronan seviyeleri ile kanser dokusunun özelliklerinin karşılaştırılması.

Tablo 4. Plazma hiyalüronan seviyelerinin karşılaştırması

Değişken	Kategori	Sayı	HA	<i>p değeri</i>
Cinsiyet	Erkek	20	75 (16-323)	0,935
	Kadın	7	87,2 (20-176)	
Histolojik tip	Adenokarsinom	21	76,8 (16-323)	0,439
	Taşlı yüzük hücreli karsinom	5	91,6 (20-204)	
Evre	I-II	5	117 (38-176)	0,650
	III-IV	22	75 (16,5-323)	
Grade	II	4	102 (77-176)	0,460
	III	10	95,2 (16,5-323)	
	IV	13	60,8 (17,2-241)	
T	I-II	5	71,1 (16,4-232)	0,208
	III-IV	22	117 (37,5-204)	
Met(+) LN	<10	21	87,2 (16,5-323)	0,887
	10 ve üzeri	6	67 (17,2-241)	
M	0	17	77 (16,5-232)	0,802
	I	10	80,3 (17-161)	
Tümör boyutu	<5 cm	8	71,6 (19-204)	0,696
	5 cm ve üzeri	19	76,8 (16-323)	

4.5. Hastaların biyokimyasal değerleri

Biyokimyasal parametreler ameliyat öncesi yatış anında, ameliyat sonrası ilk gün ve taburculuk öncesi son gün kaydedildi. Elde edilen değerlerin ortalama ya da ortanca değerleri Tablo 5'teki gibi saptandı.

Tablo 5. Hasta karakteristikleri ve ortalama ya da ortanca değerleri

Değişken	Ortalama yada ortanca değerler
Hiyalüronan (ng/mL)	76,8 (16,5-323,3)
Yaş (yıl)	58,9 (±14,1)
Tümör boyutu (cm)	5 (2,5-17)
Total protein (g/dL)	6,7 (±0,7)
Albümin (g/dL)	3,41 (±0,6)
ALT (u/L)	11 (6-37)
AST (u/L)	16 (9-33)
LDH (u/L)	254,5 (±57,8)
Kreatinin (mg/dL)	0,8 (0,5-1,4)
WBC (x10 ³ /µL)	6,35 (3,9-39,4)
HGB (g/dL)	12,0 (±2,5)
PLT (x10 ³ /µL)	301 (±63)

4.6. Hastaların biyokimya değerleri ile plazma hiyalüronan değerleri arasındaki ilişki.

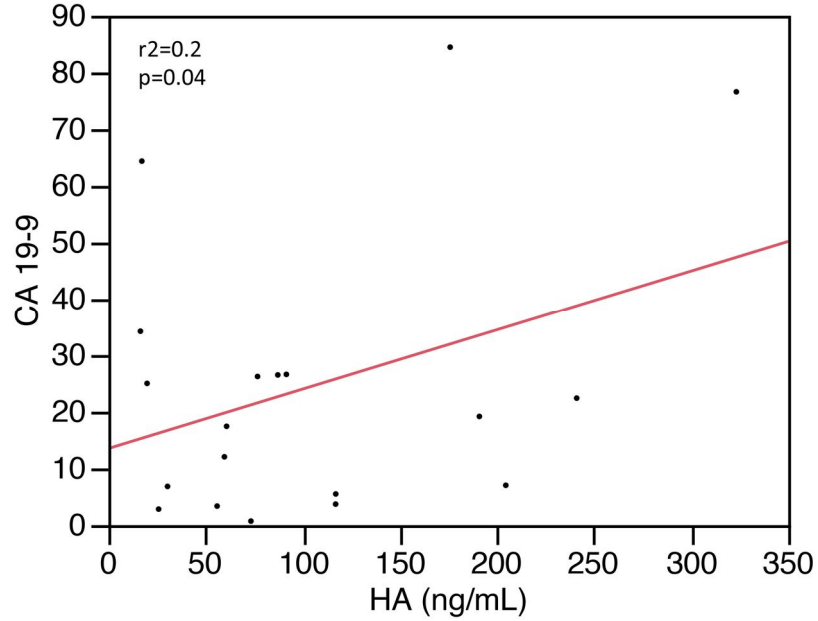
Hasta serum biyokimyasal değerleri ve karakteristiklerinden oluşan değişkenler ile plazma hiyalüronan seviyeleri karşılaştırılarak aralarında anlamlı ilişki olup olmadığına bakıldı(Tablo 6).

Tablo 6. Plazma hiyalüronan miktarı ve değişkenlerin ilişkisi

Değişken	<i>rho</i>	<i>P değeri</i>
Yaş (yıl)	0,113	0,575
Tümör boyutu (cm)	0,228	0,252
Total protein (g/dL)	-0,164	0,415
Albümin (g/dL)	-0,185	0,357
ALT (u/L)	0,159	0,428
AST (u/L)	0,225	0,258
LDH (u/L)	0,172	0,390
Kreatinin (mg/dL)	0,025	0,901
WBC (x10 ³ /µL)	0,057	0,778
HGB (g/dL)	0,051	0,802
PLT (x10 ³ /µL)	0,038	0,852

Kanser antijen 19-9 (CA 19-9) değerleri hiyalüronan değerleri ile karşılaştırıldığında iki parametrenin birbiri ile korele olduğu görüldü(Şekil 8).

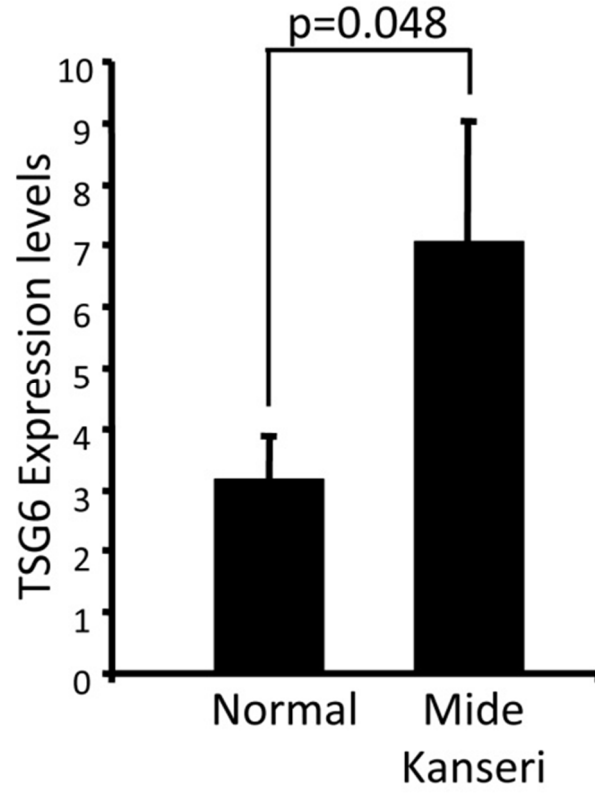
4.7. Tümör belirteçleri ile hiyalüronanın ilişkisi.



Şekil 8. Mide kanserli hastalarda plazma CA 19-9 ve hiyalüronan seviyeleri korelasyon grafiği.

4.8. TSG-6 mRNA ekspresyonlarının kanser dokusunda ve normal dokuda karşılaştırılması.

Cerrahi prosedür sonrası rezeke edilen spesmenden elde edilen kanser dokusunda ve kansere en uzaktaki normal mide dokusunda TSG-6 mRNA ekspresyonları karşılaştırıldığında; mide kanseri dokusunda, normal mide dokusuna oranla istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu görüldü (Şekil 9).



Şekil 9. Mide kanseri ve kanserli olmayan dokulardaki TSG-6 mRNA ekspresyonu

5. TARTIŞMA

Ülkemiz şartlarında hastaların mide kanseri farkındalığının düşük olması, kolay uygulanan tarama yöntemi bulunmayışı, lümenli bir organ olan midenin tıkanmaya neden olan bir kitle oluşmadan bulgu vermemesi ya da seroza invazyonu gelişmeden hastada ağrı hissi oluşamaması nedeniyle, mide kanseri vakaları genellikle hastalığın ileri evrelerinde tanı alıp, tedavi edilmeye çalışılmaktadır.

Hastalığın tanısındaki gecikme, uygulanacak tedavinin şeklini değiştirdiği gibi daha uzun operasyon süresi, daha yüksek perioperatif morbidite, uzayan hastanede kalış süresi ve daha yüksek mortaliteye neden olmaktadır.

Kanser gelişiminde kanser hücresinin mikro çevresi önemli bir rol oynamaktadır. Belirgin fiziksel, biyokimyasal ve biyomekanik özellikleri olan makro moleküllerin kompleks ağından oluşan ekstrasellüler matriks bu mikro çevrenin en büyük bileşenidir. Embriyonik dönemden beri sıkı bir denetim içerisinde olan ekstrasellüler matriks kanser gibi hastalıklarda düzensizleşir ve dağınık bir hal alır. Daha da önemlisi ekstrasellüler matriks anormallikleri stromal hücrelerin davranışını düzensizleştirmenin yanı sıra tümör ilişkili anjiyogenezi ve inflamasyonu kolaylaştırarak tümörojenik mikrocevre oluşumunu kolaylaştırır.(87)

Literatürde pulmoner hipertansiyonda damar yapısındaki düz kas hücrelerinde oluşan inflamasyon ve proliferasyona düşük molekül ağırlıklı hiyalüronanın (LMW-HA) eşlik ettiğini ve proliferasyonu tetiklediğini gösteren yayınlar mevcuttur (45). Ağızda gelişen skuamöz hücreli kanser dokularında hiyalüronan için hücre yüzey reseptörünün

upregülasyonunun malignite durumuyla korele olduğu ve artmış yada anormal proliferasyonla ilişkili olduğu gösterilmiştir (88). Mide kanser dokusunda hiyalüronan molekülünün sağlıklı mide dokusuna göre daha yüksek miktarda saptandığı da daha önce yapılan çalışmalarla tespit edilmişti (89). Bu iki literatür bilgisi birleştirildiğinde mide kanserinde oluşan aşırı proliferasyonun hiyalüronan molekülüyle de ilişkili olabileceği fikrini akla getirmektedir.

Hiyalüronan molekülünün proliferasyonu ve anjiyogenezi tetiklediği, proliferasyonda hücre göçünü arttırdığı bilinmektedir(90). Doku hasarını müteakip inflamasyon sürecinde ekstrasellüler matrikste hiyalüronan birikiminin artması 25 yıldır bilinen bir bilgidir (32).

Daha önce yapılan çalışmalarda da kanıtlanan kanserli hastalarda plazma hiyalüronan seviyelerinin sağlıklı bireylerden yüksek olarak bulunması mide ekstrasellüler matriksinde de bulunan hiyalüronan molekülünün kanser dokusundaki proliferasyon sonucunda periferik kandaki miktarının arttığı ve hastalığın oluşum mekanizmalarından birinde rol aldığını ve de oluşan aşırı proliferatif doku yükünün periferik kana yansması sonucu periferik kanda yüksek miktarlara ulaştığını düşündürmektedir (46-53).

Bu çalışmada mide kanseri dokusundaki aşırı proliferasyonun hiyalüronan molekülü ile ilişkisini aydınlatmak amaçlı, mide kanserli hastalardan alınan kan örneklerindeki hiyalüronan miktarı ile sağlıklı kontrollerden alınan kan örneklerindeki miktar karşılaştırıldığında mide kanserli hastalarda daha yüksek olması bu ilişkiyi destekleyen en önemli bulgulardandır. Bu çalışmaya dahil edilen mide kanserli hastaların kanlarındaki plazma hiyalüronan seviyeleri sağlıklı kontroller ile kıyaslandığında istatistiksel olarak önemli derecede yüksek bulunmuş ve önceki yapılan çalışmaları desteklemiştir ($p<0.005$). Bu hastaların kan örneklerinde de yüksek seviyelerde hiyalüronan bulunması, hastalığın patogenezinde önemli rolü olduğunu kuvvetli bir şekilde göstermektedir.

Bu bilgilere dayanarak mide kanseri hücrelerinin kontrol dışı çoğalmasına, ekstrasellüler matriksin destek görevinden ziyade hastalığın patogenezinde görev aldığı hipotezi öne sürülebilir. Bu konuda sınırlı sayıda yapılmış yayınlar bu hipotezi destekler mahiyettedir. Literatürde ekstrasellüler matriksin mide kanseri patogenezi üzerine

etkilerini inceleyen çalışmalar son yıllarda artış göstermesine rağmen hala rolü tam olarak belirlenememiştir.

Farklı molekül ağırlıklı hiyalüronan moleküllerinin farklı görevleri olduğu gösteren çalışmalar mevcuttur. Bu çalışmalara göre LMW-HAeşitli sitogenleri stimüle ettiğibununla birlikte hücre proliferasyon, anjiogenez ve hücre migrasyonunu tetiklediği, yüksek molekül ağırlığına sahip olanların ise tam tersi bir şekilde anti-inflamasyon etkisine sahip olduğu ve doku onarımına katkıda bulunduğu rapor edilmiştir (88). Bu yüzden hiyalüronan molekülü inflamasyonun boyut bağımlı bir mediatörü olarak tanımlanmıştır (33-37).

Çalışmamızda hiyalüronan periferik kandaki miktarının tümör yüküyle ilişkili olabileceği düşünülerek tümör boyutu ve periferik kan hiyalüronan miktarları arasında korelasyon değerlendirildi. Tümör boyutu çalışmada 5 (2,5-17) cm olarak tespit edildi. Hiyalüronan ile pozitif yönde zayıf ilişkide olduğu ancak bunun istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edildi (Tablo 5-Tablo 6).

Mide kanserinin farklı histolojik tiplerinde farklı periferik kan hiyalüronan miktarı olabileceği düşünülerek; histolojik tipi, hastalığın ileri evrelerinde daha çok hiyalüronan sentezleneceği düşünülerek; evresi, yüksek gradeli hastalıkta yüksek miktarlarda hiyalüronan sentezleneceği düşünülerek; grade'i, tümör boyutu arttıkça sentezlenen hiyalüronan miktarı artacağı düşünülerek; tümör buyutu serum hiyalüronan miktarı ile karşılaştırıldı. Ancak hiçbirinde anlamlı korelasyon saptanamadı (Tablo 3). Korelasyon saptanmamasının ana sebebi olarak hasta sayısının yetersiz olduğu dşnld.

Son yapılan çalışmalar hiyalüronan modifikasyonunun da birçok hastalığın patogenizinde rolü olabileceğini göstermiştir. Hiyalüronan molekülünün modifikasyonu ise HC'lerin hiyalüronan molekülüne bağlanmasıyla gerçekleşmekte ve bu şekilde farklı fonksiyonlar edinmektedir. Bu modifikasyonun oluşmasında IaI proteini ve TSG-6 enziminin rolü büyüktür. IaI proteini kendisine bağlı iki heavy chain ve bir bikunin bağlanmasıyla oluşan yapıdır. IaI proteininde bulunan HC'ler TSG-6 enzimi yardımıyla katalize edilerek hiyalüronan molekülü üzerine taşınırlar. Bu şekilde hiyalüronan molekülü heavy chainlerle dekore edilmiş olur ki bu şekilde inflamasyon hücrelerini daha çok kendisine çektiği bilinmektedir (91, 92). Çıplak hiyalüronanın TSG-6

enzimiyle dekore edildikten sonra modifikasyona uğramış olan halinin çok daha farklı biyolojik olaylara eşlik ettiği bilinmektedir (38).

Bu çalışmamızın çıkış noktalarından birisi ise karsinogenezde hiyalüronan modifikasyonunun etkili rolünün olabileceği hipotezidir. Şayet hiyalüronan modifikasyonunun kanser üzerindeki potansiyel rolü ispatlanabilirse hiyalüronan üretim yolları bloke edilerek hastalığın oluşmasını veya ilerlemesini önlemede alternatif bir yol geliştirilebileceği düşünülmektedir.

Bu yüzden bu çalışmada literatürde ilk kez mide kanseri dokusunda TSG-6 enzim mRNA ekspresyonu tespit edilerek mide kanseri dokusunda hiyalüronan modifikasyonu olup olmadığı konusunda fikir edinilmiştir. Böylelikle bu çalışma, mide kanserinde hastalığın sürecini anlamamıza yardım edeceğini düşündüğümüz hiyalüronan molekülü anormalliklerini ve modifikasyonun mide kanseri patogenezindeki rolünü belirlemekte diğer çalışmalar için ön veriler elde edilmiş oldu.

Literatürde ilk olarak yapılan mide kanseri ve normal mide dokusunda yapılan TSG-6 enzim mRNA ekspresyonu ölçümleri sonucunda TSG-6 mRNA ekspresyonunun mide kanseri dokusunda normal mide dokusuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek miktarda olduğu görüldü ($p < 0.005$). Mide kanseri dokusunda normal mide dokusuna göre TSG-6 mRNA seviyesinin yüksekliğinin saptanması muhtemel hiyalüronan modifikasyonun varlığının önemli bir göstergesidir. Bunu ispatlamak için daha geniş serilerde yapılacak çalışmalarca mide kanser ve sağlıklı dokularda IαI protein ekspresyonuna bakılarak hiyalüronan modifikasyonun teyit edilmesi amaçlanmalıdır.

Daha önceki çalışmalarda hiyalüronan molekülünün bu formunun anjiyogenezi, proliferasyonu ve migrasyonu tetiklediği bilinmektedir. Mide kanserinde meydana gelen aşırı proliferasyonun hiyalüronanın proliferasyonu tetikleyen formunun yüksek bulunmasıyla ilişkili olduğunu düşünmekteyiz. Kanserin gelecekteki tedavisi bu hastalıktaki hücre proliferasyonu ve anjiogenezi hedef alabilme kabiliyetimize bağlıdır. Literatürde son yapılan çalışmalar özellikle ekstrasellüler matriks komponenti olan hiyalüronan molekülünün de hastalığı oluşturan etkenler arasında olabileceğini düşündürmektedir (86). Elde edilen primer sonuçlar ise bu konuda mide kanserinde

hiyalüronanın oluşumunun engellenmesiyle kanserdeki aşırı proliferasyonun engellenip engellenemeyeceği sorusunu akla getirmektedir.

Ayrıca sağlıklı bireylerle kanserli hastalar arasında hiyalüronan seviyesi arasında ileri derecede anlamlı fark varken, kanser boyutu ve evresi ile hiyalüronan seviyesinin ve modifikasyonunun ilişkisini gösterilememesi, bu etkenlerin kanser ilerlemesine değil de oluşumuna katkı sağlıyor olabileceğini de düşündürmektedir.

Hiyalüronanın idrar ve kandaki miktarının prostat kanseri, kandaki miktarının ise meme kanseri hastalarının tedavi ve takibinde kullanıldığı gibi(90, 93), bu çalışma sayesinde mide kanserinde de kanda yüksek oranda saptanan hiyalüronanın, mide kanseri tanı ve tedavi takibinde tümör belirteci olarak kullanılmasına yönelik araştırmaların gerekliliğini vurgulamaktadır.

Çalışmamızın sonuçları, mide kanseri hastalığında sellüler proliferasyon ve yenilenmenin patofizyolojisinin anlaşılmasına yönelik ileri çalışmalar için öncü bir çalışma niteliğindedir. Özellikle hiyalüronan modifikasyonu ile ilgili daha geniş seriler içeren çalışmalarla mide kanseri patogenezinin açıklanmasında önemli bir adım atılacağını düşünmekteyiz.

6. SONUÇLAR

Mide kanseri tanılı hastalarda ve sağlıklı kontrollerde; periferik kan, kanser dokusu ve normal mide dokusunda yapılan hiyaluronan seviyeleri ve hiyalüronan modifikasyonu araştırmaları sonucunda:

- 1- Mide kanseri hastaları ve sağlıklı gönüllülerin plazma hiyalüronan seviyeleri karşılaştırıldığında, mide kanseri grubunda plazma hiyalüronan seviyesi istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek saptandı.
- 2- Mide kanseri dokusunda ve normal mide dokusunda TSG-6 mRNA ekspresyonları karşılaştırıldığında, mide kanseri dokusunda istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu saptandı.
- 3- CA 19-9 değerleri ile hiyalüronan değerleri karşılaştırıldığında; iki parametrenin birbiri ile korele olduğu görüldü.

Mide kanseri olan hastalarda; kan ve mide kanseri dokusundaki hiyalüronan anormallikleri, hiyalüronan molekülünün kanser dokusuyla ilişkili bir molekül olduğunu göstermiştir. Ayrıca CA19-9 ile olan korelasyonu da göz önünde bulundurularak mide kanseri tanı ve takibinde kullanılabileceği düşünülmüştür.

KAYNAKLAR

1. Atlas of cancer mortality in the European Union and the European Economic Area 1993-1997. IARC Sci Publ. 2008 (159):1-259. PubMed PMID: 19517976. Epub 2008/01/01. eng.
2. İ S. Temel Cerrahi. Mide Tümörleri. 2013;4.(105):1278.
3. Bourguignon LY. Hyaluronan-mediated CD44 activation of RhoGTPase signaling and cytoskeleton function promotes tumor progression. Semin Cancer Biol. 2008 Aug;18(4):251-9. PubMed PMID: 18450475. Epub 2008/05/03. eng.
4. Rooney P, Kumar S, Ponting J, Wang M. The role of hyaluronan in tumour neovascularization (review). Int J Cancer. 1995 Mar 3;60(5):632-6. PubMed PMID: 7532158. Epub 1995/03/03. eng.
5. Lu YL, Li Y, Liu GS, Wu Q, Liu WD, Li SJ, et al. [Comparison of two gastric cancer screening schemes in a high-risk population]. Zhonghua Zhong Liu Za Zhi. May;35(5):394-7. PubMed PMID: 24054020. Epub 2013/09/24. chi.
6. Köse MR. T.C. Sağlık Bakanlığı Sağlık İstatistikleri Yıllığı. Ankara: Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı Sağlık Araştırmaları Genel Müdürlüğü; 2013.
7. Yalcin S. Gastric cancer in Turkey-a bridge between west and East. Gastrointest Cancer Res. 2009 Jan;3(1):29-32. PubMed PMID: 19343135. Epub 2009/04/04. eng.
8. McColl KE, El-Omar E. How does H. pylori infection cause gastric cancer? Keio J Med. 2002 Dec;51 Suppl 2:53-6. PubMed PMID: 12528939. Epub 2003/01/17. eng.
9. Selcukbiricik F, Tural D, Bilici A, Uzel EK, Ozguroglu M, Demirelli F, et al. Clinicopathological features and localization of gastric cancers and their effects on survival in Turkey. Asian Pac J Cancer Prev.14(1):553-6. PubMed PMID: 23534793. Epub 2013/03/29. eng.
10. Mukherjee JJ, Kumar S. DNA synthesis inhibition in response to benzo[a]pyrene dihydrodiol epoxide is associated with attenuation of p(34)cdc2: Role of p53. Mutat Res. Jul 4;755(1):61-7. PubMed PMID: 23692869. Epub 2013/05/23. eng.

11. Fahrer J, Kaina B. O6-methylguanine-DNA methyltransferase in the defense against N-nitroso compounds and colorectal cancer. *Carcinogenesis*. Sep 26. PubMed PMID: 23929436. Epub 2013/08/10. Eng.
12. Kılıçkap S. Kanserde Birincil Korunma. *Dahili Tıp Bilimleri Dergisi*. 2006;13(2):57-71.
13. Jamin EL, Riu A, Douki T, Debrauwer L, Cravedi JP, Zalko D, et al. Combined genotoxic effects of a polycyclic aromatic hydrocarbon (B(a)P) and an heterocyclic amine (PhIP) in relation to colorectal carcinogenesis. *PLoS One*.8(3):e58591. PubMed PMID: 23484039. Epub 2013/03/14. eng.
14. Kodama M, Murakami K, Okimoto T, Abe H, Sato R, Ogawa R, et al. Histological characteristics of gastric mucosa prior to *Helicobacter pylori* eradication may predict gastric cancer. *Scand J Gastroenterol*. Sep 30. PubMed PMID: 24079881. Epub 2013/10/02. Eng.
15. Bravi F, Scotti L, Bosetti C, Bertuccio P, Negri E, La Vecchia C. Dietary fiber and stomach cancer risk: a case-control study from Italy. *Cancer Causes Control*. 2009 Aug;20(6):847-53. PubMed PMID: 19247788. Epub 2009/02/28. eng.
16. Abdull Razis AF, Noor NM. Cruciferous vegetables: dietary phytochemicals for cancer prevention. *Asian Pac J Cancer Prev*.14(3):1565-70. PubMed PMID: 23679237. Epub 2013/05/18. eng.
17. Kruk J, Czerniak U. Physical Activity and its Relation to Cancer Risk: Updating the Evidence. *Asian Pac J Cancer Prev*.14(7):3993-4003. PubMed PMID: 23991944. Epub 2013/09/03. Eng.
18. Ohata H, Kitauchi S, Yoshimura N, Mugitani K, Iwane M, Nakamura H, et al. Progression of chronic atrophic gastritis associated with *Helicobacter pylori* infection increases risk of gastric cancer. *Int J Cancer*. 2004 Mar;109(1):138-43. PubMed PMID: 14735480. Epub 2004/01/22. eng.
19. Yoshida T, Kato J, Inoue I, Yoshimura N, Deguchi H, Mukoubayashi C, et al. Cancer development based on chronic active gastritis and resulting gastric atrophy as assessed by serum levels of pepsinogen and *Helicobacter pylori*

- antibody titer. *Int J Cancer*. Sep 5. PubMed PMID: 24009139. Epub 2013/09/07. Eng.
20. Salih BA, Gucin Z, Bayyurt N. A study on the effect of *Helicobacter pylori* infection on p53 expression in gastric cancer and gastritis tissues. *J Infect Dev Ctries*.7(9):651-7. PubMed PMID: 24042100. Epub 2013/09/18. eng.
 21. Salih A. A study on the effect of *Helicobacter pylori* infection on p53 expression in gastric cancer and gastritis tissues. 2013.
 22. Rugge M, Capelle LG, Cappellesso R, Nitti D, Kuipers EJ. Precancerous lesions in the stomach: from biology to clinical patient management. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. Apr;27(2):205-23. PubMed PMID: 23809241. Epub 2013/07/03. eng.
 23. Kumar; et al. *Pathologic Basis of Disease*. 8. ed: Saunders Elsevier; 2010.
 24. Lauren P. Pekka Lauren and histological classification of gastric carcinoma. Interview and comment by Timo J Nevalainen. *Gut*. Aug;62(8):1230-1. PubMed PMID: 23426894. Epub 2013/02/22. eng.
 25. Luebke T, Baldus SE, Grass G, Bollschweiler E, Thiele J, Dienes HP, et al. Histological grading in gastric cancer by Ming classification: correlation with histopathological subtypes, metastasis, and prognosis. *World J Surg*. 2005 Nov;29(11):1422-7; discussion 8. PubMed PMID: 16222448. Epub 2005/10/14. eng.
 26. Edge SB, Compton CC. The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Ann Surg Oncol*. Jun;17(6):1471-4. PubMed PMID: 20180029. Epub 2010/02/25. eng.
 27. Vargova V, Pytliak M, Mechirova V. Matrix metalloproteinases. *EXS*.103:1-33. PubMed PMID: 22642188. Epub 2012/05/31. eng.
 28. Polyak K, Kalluri R. The role of the microenvironment in mammary gland development and cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. Nov;2(11):a003244. PubMed PMID: 20591988. Epub 2010/07/02. eng.

29. Ko MS, Marinkovich MP. Role of dermal-epidermal basement membrane zone in skin, cancer, and developmental disorders. *Dermatol Clin.* Jan;28(1):1-16. PubMed PMID: 19945611. Epub 2009/12/01. eng.
30. Lun S, Irvine SM, Johnson KD, Fisher NJ, Floden EW, Negron L, et al. A functional extracellular matrix biomaterial derived from ovine forestomach. *Biomaterials.* 2010 Jun;31(16):4517-29. PubMed PMID: 20226520. Epub 2010/03/17. eng.
31. Itano N, Sawai T, Yoshida M, Lenas P, Yamada Y, Imagawa M, et al. Three isoforms of mammalian hyaluronan synthases have distinct enzymatic properties. *J Biol Chem.* 1999 Aug 27;274(35):25085-92. PubMed PMID: 10455188.
32. Viola M, Vigetti D, Karousou E, D'Angelo ML, Caon I, Moretto P, et al. Biology and biotechnology of hyaluronan. *Glycoconj J.* May;32(3-4):93-103. PubMed PMID: 25971701. Epub 2015/05/15. eng.
33. McKee CM, Penno MB, Cowman M, Burdick MD, Strieter RM, Bao C, et al. Hyaluronan (HA) fragments induce chemokine gene expression in alveolar macrophages. The role of HA size and CD44. *J Clin Invest.* 1996 Nov 15;98(10):2403-13. PubMed PMID: 8941660. Epub 1996/11/15. eng.
34. Hill AT, Bayley DL, Campbell EJ, Hill SL, Stockley RA. Airways inflammation in chronic bronchitis: the effects of smoking and alpha1-antitrypsin deficiency. *Eur Respir J.* 2000 May;15(5):886-90. PubMed PMID: 10853853.
35. Maier LA. Clinical approach to chronic beryllium disease and other nonpneumoconiotic interstitial lung diseases. *J Thorac Imaging.* 2002 Oct;17(4):273-84. PubMed PMID: 12362066.
36. Moreland LW. Intra-articular hyaluronan (hyaluronic acid) and hylans for the treatment of osteoarthritis: mechanisms of action. *Arthritis Res Ther.* 2003;5(2):54-67. PubMed PMID: 12718745. Epub 2003/04/30. eng.
37. Noble PW, Jiang D. Matrix regulation of lung injury, inflammation, and repair: the role of innate immunity. *Proc Am Thorac Soc.* 2006 Jul;3(5):401-4. PubMed PMID: 16799081. Epub 2006/06/27. eng.

38. Petrey AC, de la Motte CA. Hyaluronan, a crucial regulator of inflammation. *Front Immunol*.5:101. PubMed PMID: 24653726. Epub 2014/03/22. eng.
39. Slevin M, Krupinski J, Gaffney J, Matou S, West D, Delisser H, et al. Hyaluronan-mediated angiogenesis in vascular disease: uncovering RHAMM and CD44 receptor signaling pathways. *Matrix Biol*. 2007 Jan;26(1):58-68. PubMed PMID: 17055233. Epub 2006/10/24. eng.
40. Feinberg RN, Beebe DC. Hyaluronate in vasculogenesis. *Science*. 1983 Jun 10;220(4602):1177-9. PubMed PMID: 6857242. Epub 1983/06/10. eng.
41. Deed R, Rooney P, Kumar P, Norton JD, Smith J, Freemont AJ, et al. Early-response gene signalling is induced by angiogenic oligosaccharides of hyaluronan in endothelial cells. Inhibition by non-angiogenic, high-molecular-weight hyaluronan. *Int J Cancer*. 1997 Apr 10;71(2):251-6. PubMed PMID: 9139851. Epub 1997/04/10. eng.
42. McBride WH, Bard JB. Hyaluronidase-sensitive halos around adherent cells. Their role in blocking lymphocyte-mediated cytolysis. *J Exp Med*. 1979 Feb 1;149(2):507-15. PubMed PMID: 762499. Epub 1979/02/01. eng.
43. Forrester JV, Balazs EA. Inhibition of phagocytosis by high molecular weight hyaluronate. *Immunology*. 1980 Jul;40(3):435-46. PubMed PMID: 7429537. Epub 1980/07/01. eng.
44. Jiang D, Liang J, Noble PW. Hyaluronan as an immune regulator in human diseases. *Physiol Rev*. Jan;91(1):221-64. PubMed PMID: 21248167. Epub 2011/01/21. eng.
45. Aytekin M, Caylak E. [Pulmonary arterial hypertension: past, present and future]. *Tuberk Toraks*.58(1):100-7. PubMed PMID: 20517738. Epub 2010/06/03. Pulmoner arteryel hipertansiyon: dunu, bugunu ve yarini. tur.
46. Dahl LB, Dahl IM, Engstrom-Laurent A, Granath K. Concentration and molecular weight of sodium hyaluronate in synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis and other arthropathies. *Ann Rheum Dis*. 1985 Dec;44(12):817-22. PubMed PMID: 4083937. Epub 1985/12/01. eng.

47. Hallgren R, Samuelsson T, Laurent TC, Modig J. Accumulation of hyaluronan (hyaluronic acid) in the lung in adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis.* 1989 Mar;139(3):682-7. PubMed PMID: 2923370. Epub 1989/03/01. eng.
48. Waldenstrom A, Martinussen HJ, Gerdin B, Hallgren R. Accumulation of hyaluronan and tissue edema in experimental myocardial infarction. *J Clin Invest.* 1991 Nov;88(5):1622-8. PubMed PMID: 1939649. Epub 1991/11/01. eng.
49. Evanko SP, Raines EW, Ross R, Gold LI, Wight TN. Proteoglycan distribution in lesions of atherosclerosis depends on lesion severity, structural characteristics, and the proximity of platelet-derived growth factor and transforming growth factor-beta. *Am J Pathol.* 1998 Feb;152(2):533-46. PubMed PMID: 9466580. Epub 1998/02/18. eng.
50. Wells AF, Larsson E, Tengblad A, Fellstrom B, Tufveson G, Klareskog L, et al. The localization of hyaluronan in normal and rejected human kidneys. *Transplantation.* 1990 Aug;50(2):240-3. PubMed PMID: 2382292. Epub 1990/08/01. eng.
51. Lewis A, Steadman R, Manley P, Craig K, de la Motte C, Hascall V, et al. Diabetic nephropathy, inflammation, hyaluronan and interstitial fibrosis. *Histol Histopathol.* 2008 Jun;23(6):731-9. PubMed PMID: 18366011. Epub 2008/03/28. eng.
52. de la Motte CA, Hascall VC, Drazba J, Bandyopadhyay SK, Strong SA. Mononuclear leukocytes bind to specific hyaluronan structures on colon mucosal smooth muscle cells treated with polyinosinic acid:polycytidylic acid: inter-alpha-trypsin inhibitor is crucial to structure and function. *Am J Pathol.* 2003 Jul;163(1):121-33. PubMed PMID: 12819017.
53. Kessler S, Rho H, West G, Fiocchi C, Drazba J, de la Motte C. Hyaluronan (HA) deposition precedes and promotes leukocyte recruitment in intestinal inflammation. *Clin Transl Sci.* 2008 May;1(1):57-61. PubMed PMID: 20443819. Epub 2008/05/01. eng.

54. Chen WY, Abatangelo G. Functions of hyaluronan in wound repair. *Wound Repair Regen.* 1999 Mar-Apr;7(2):79-89. PubMed PMID: 10231509. Epub 1999/05/07. eng.
55. Pearson RB, Thomas G. Regulation of p70s6k/p85s6k and its role in the cell cycle. *Prog Cell Cycle Res.* 1995;1:21-32. PubMed PMID: 9552351. Epub 1995/01/01. eng.
56. Teichtahl H, Buckmaster N, Pertnikovs E. The incidence of respiratory tract infection in adults requiring hospitalization for asthma. *Chest.* 1997 Sep;112(3):591-6. PubMed PMID: 9315789. Epub 1997/10/07. eng.
57. Jiang D, Liang J, Fan J, Yu S, Chen S, Luo Y, et al. Regulation of lung injury and repair by Toll-like receptors and hyaluronan. *Nat Med.* 2005 Nov;11(11):1173-9. PubMed PMID: 16244651. Epub 2005/10/26. eng.
58. Nakamura K, Yokohama S, Yoneda M, Okamoto S, Tamaki Y, Ito T, et al. High, but not low, molecular weight hyaluronan prevents T-cell-mediated liver injury by reducing proinflammatory cytokines in mice. *J Gastroenterol.* 2004;39(4):346-54. PubMed PMID: 15168246. Epub 2004/05/29. eng.
59. Bollyky PL, Wu RP, Falk BA, Lord JD, Long SA, Preisinger A, et al. ECM components guide IL-10 producing regulatory T-cell (TR1) induction from effector memory T-cell precursors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* May 10;108(19):7938-43. PubMed PMID: 21518860. Epub 2011/04/27. eng.
60. Bollyky PL, Falk BA, Wu RP, Buckner JH, Wight TN, Nepom GT. Intact extracellular matrix and the maintenance of immune tolerance: high molecular weight hyaluronan promotes persistence of induced CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Leukoc Biol.* 2009 Sep;86(3):567-72. PubMed PMID: 19401397. Epub 2009/04/30. eng.
61. Okroj M, Holmquist E, Sjolander J, Corrales L, Saxne T, Wisniewski HG, et al. Heavy chains of inter alpha inhibitor (IalphaI) inhibit the human complement system at early stages of the cascade. *J Biol Chem.* Jun 8;287(24):20100-10. PubMed PMID: 22528482. Epub 2012/04/25. eng.

62. Balduyck M, Hayem A, Kerckaert JP, Mizon C, Mizon J. Isolation of a human urinary trypsin inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun*. 1982 Dec 31;109(4):1247-55. PubMed PMID: 6820282.
63. Shulman NR. A proteolytic inhibitor with anticoagulant activity separated from human urine and plasma. *J Biol Chem*. 1955 Apr;213(2):655-71. PubMed PMID: 14367326.
64. Potempa J, Kwon K, Chawla R, Travis J. Inter-alpha-trypsin inhibitor. Inhibition spectrum of native and derived forms. *J Biol Chem*. 1989 Sep 5;264(25):15109-14. PubMed PMID: 2475494. Epub 1989/09/05. eng.
65. Zhuo L, Hascall VC, Kimata K. Inter-alpha-trypsin inhibitor, a covalent protein-glycosaminoglycan-protein complex. *J Biol Chem*. 2004 Sep 10;279(37):38079-82. PubMed PMID: 15151994. Epub 2004/05/21. eng.
66. Zhuo L, Kimata K. Structure and function of inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chains. *Connect Tissue Res*. 2008;49(5):311-20. PubMed PMID: 18991084. Epub 2008/11/11. eng.
67. Milner CM, Tongsoongnoen W, Rugg MS, Day AJ. The molecular basis of inter-alpha-inhibitor heavy chain transfer on to hyaluronan. *Biochem Soc Trans*. 2007 Aug;35(Pt 4):672-6. PubMed PMID: 17635118. Epub 2007/07/20. eng.
68. Enghild JJ, Thøgersen IB, Cheng F, Fransson LA, Roepstorff P, Rahbek-Nielsen H. Organization of the inter-alpha-inhibitor heavy chains on the chondroitin sulfate originating from Ser(10) of bikunin: posttranslational modification of IalphaI-derived bikunin. *Biochemistry*. 1999 Sep 7;38(36):11804-13. PubMed PMID: 10512637. Epub 1999/10/08. eng.
69. Jessen TE, Odum L. Role of tumour necrosis factor stimulated gene 6 (TSG-6) in the coupling of inter-alpha-trypsin inhibitor to hyaluronan in human follicular fluid. *Reproduction*. 2003 Jan;125(1):27-31. PubMed PMID: 12622693. Epub 2003/03/08. eng.
70. Rugg MS, Willis AC, Mukhopadhyay D, Hascall VC, Fries E, Fulop C, et al. Characterization of complexes formed between TSG-6 and inter-alpha-inhibitor that act as intermediates in the covalent transfer of heavy chains onto

- hyaluronan. *J Biol Chem.* 2005 Jul 8;280(27):25674-86. PubMed PMID: 15840581. Epub 2005/04/21. eng.
71. Bandyopadhyay SK, de la Motte CA, Kessler SP, Hascall VC, Hill DR, Strong SA. Hyaluronan-mediated leukocyte adhesion and dextran sulfate sodium-induced colitis are attenuated in the absence of signal transducer and activator of transcription 1. *Am J Pathol.* 2008 Nov;173(5):1361-8. PubMed PMID: 18818378. Epub 2008/09/27. eng.
 72. Mateos J, Lourido L, Fernandez-Puente P, Calamia V, Fernandez-Lopez C, Oreiro N, et al. Differential protein profiling of synovial fluid from rheumatoid arthritis and osteoarthritis patients using LC-MALDI TOF/TOF. *J Proteomics.* Jun 6;75(10):2869-78. PubMed PMID: 22245418. Epub 2012/01/17. eng.
 73. Yingsung W, Zhuo L, Morgelin M, Yoneda M, Kida D, Watanabe H, et al. Molecular heterogeneity of the SHAP-hyaluronan complex. Isolation and characterization of the complex in synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis. *J Biol Chem.* 2003 Aug 29;278(35):32710-8. PubMed PMID: 12799384. Epub 2003/06/12. eng.
 74. Wisniewski HG, Colon E, Liublinska V, Karia RJ, Stabler TV, Attur M, et al. TSG-6 activity as a novel biomarker of progression in knee osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage.* Feb;22(2):235-41. PubMed PMID: 24333293. Epub 2013/12/18. eng.
 75. Lauer ME, Glant TT, Mikecz K, DeAngelis PL, Haller FM, Husni ME, et al. Irreversible heavy chain transfer to hyaluronan oligosaccharides by tumor necrosis factor-stimulated gene-6. *J Biol Chem.* Jan 4;288(1):205-14. PubMed PMID: 23166324. Epub 2012/11/21. eng.
 76. Garantziotis S, Hollingsworth JW, Ghanayem RB, Timberlake S, Zhuo L, Kimata K, et al. Inter-alpha-trypsin inhibitor attenuates complement activation and complement-induced lung injury. *J Immunol.* 2007 Sep 15;179(6):4187-92. PubMed PMID: 17785858. Epub 2007/09/06. eng.
 77. Lord MS, Day AJ, Youssef P, Zhuo L, Watanabe H, Caterson B, et al. Sulfation of the bikunin chondroitin sulfate chain determines heavy chain.hyaluronan

- complex formation. *J Biol Chem.* Aug 9;288(32):22930-41. PubMed PMID: 23801333. Epub 2013/06/27. eng.
78. Maier R, Wisniewski HG, Vilcek J, Lotz M. TSG-6 expression in human articular chondrocytes. Possible implications in joint inflammation and cartilage degradation. *Arthritis Rheum.* 1996 Apr;39(4):552-9. PubMed PMID: 8630102. Epub 1996/04/01. eng.
 79. Bardos T, Kamath RV, Mikecz K, Glant TT. Anti-inflammatory and chondroprotective effect of TSG-6 (tumor necrosis factor- α -stimulated gene-6) in murine models of experimental arthritis. *Am J Pathol.* 2001 Nov;159(5):1711-21. PubMed PMID: 11696432. Epub 2001/11/07. eng.
 80. Mahoney DJ, Mulloy B, Forster MJ, Blundell CD, Fries E, Milner CM, et al. Characterization of the interaction between tumor necrosis factor-stimulated gene-6 and heparin: implications for the inhibition of plasmin in extracellular matrix microenvironments. *J Biol Chem.* 2005 Jul 22;280(29):27044-55. PubMed PMID: 15917224. Epub 2005/05/27. eng.
 81. Dyer DP, Thomson JM, Hermant A, Jowitt TA, Handel TM, Proudfoot AE, et al. TSG-6 inhibits neutrophil migration via direct interaction with the chemokine CXCL8. *J Immunol.* Mar 1;192(5):2177-85. PubMed PMID: 24501198. Epub 2014/02/07. eng.
 82. Lesley J, Gal I, Mahoney DJ, Cordell MR, Rugg MS, Hyman R, et al. TSG-6 modulates the interaction between hyaluronan and cell surface CD44. *J Biol Chem.* 2004 Jun 11;279(24):25745-54. PubMed PMID: 15060082. Epub 2004/04/03. eng.
 83. Getting SJ, Mahoney DJ, Cao T, Rugg MS, Fries E, Milner CM, et al. The link module from human TSG-6 inhibits neutrophil migration in a hyaluronan- and inter- α -inhibitor-independent manner. *J Biol Chem.* 2002 Dec 27;277(52):51068-76. PubMed PMID: 12401803. Epub 2002/10/29. eng.
 84. Baranova NS, Foulcer SJ, Briggs DC, Tilakaratna V, Enghild JJ, Milner CM, et al. Inter- α -inhibitor impairs TSG-6-induced hyaluronan cross-linking. *J Biol Chem.* Oct 11;288(41):29642-53. PubMed PMID: 24005673. Epub 2013/09/06. eng.

85. Swaidani S, Cheng G, Lauer ME, Sharma M, Mikecz K, Hascall VC, et al. TSG-6 protein is crucial for the development of pulmonary hyaluronan deposition, eosinophilia, and airway hyperresponsiveness in a murine model of asthma. *J Biol Chem*. Jan 4;288(1):412-22. PubMed PMID: 23118230. Epub 2012/11/03. eng.
86. Aytekin M, Comhair SA, de la Motte C, Bandyopadhyay SK, Farver CF, Hascall VC, et al. High levels of hyaluronan in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2008 Nov;295(5):L789-99. PubMed PMID: 18776053. Epub 2008/09/09. eng.
87. Lu P, Weaver VM, Werb Z. The extracellular matrix: a dynamic niche in cancer progression. *J Cell Biol*. Feb 20;196(4):395-406. PubMed PMID: 22351925. Epub 2012/02/22. eng.
88. Shigeishi H, Fujimoto S, Hiraoka M, Ono S, Taki M, Ohta K, et al. Overexpression of the receptor for hyaluronan-mediated motility, correlates with expression of microtubule-associated protein in human oral squamous cell carcinomas. *Int J Oncol*. 2009 Jun;34(6):1565-71. PubMed PMID: 19424574. Epub 2009/05/09. eng.
89. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻($\Delta\Delta C(T)$) Method. *Methods*. 2001 Dec;25(4):402-8. PubMed PMID: 11846609. Epub 2002/02/16. eng.
90. Setälä LP, Tammi MI, Tammi RH, Eskelinen MJ, Lipponen PK, Agren UM, et al. Hyaluronan expression in gastric cancer cells is associated with local and nodal spread and reduced survival rate. *Br J Cancer*. 1999 Mar;79(7-8):1133-8. PubMed PMID: 10098747. Epub 1999/03/31. eng.
91. Delpech B, Chevallier B, Reinhardt N, Julien JP, Duval C, Maingonnat C, et al. Serum hyaluronan (hyaluronic acid) in breast cancer patients. *Int J Cancer*. 1990 Sep 15;46(3):388-90. PubMed PMID: 2394505. Epub 1990/09/15. eng.
92. Vizoso FJ, del Casar JM, Corte MD, Garcia I, Corte MG, Alvarez A, et al. Significance of cytosolic hyaluronan levels in gastric cancer. *Eur J Surg Oncol*. 2004 Apr;30(3):318-24. PubMed PMID: 15028316. Epub 2004/03/19. eng.

93. Wang C, Tammi M, Guo H, Tammi R. Hyaluronan distribution in the normal epithelium of esophagus, stomach, and colon and their cancers. *Am J Pathol.* 1996 Jun;148(6):1861-9. PubMed PMID: 8669472. Epub 1996/06/01. eng.

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI'NA

Dr. Ahmet Turan DURAK'a ait “Hyalüronan Modifikasyonunun Mide Kanseri Etiyopatogenezindeki Rolünün Araştırılması”adlı çalışma, jürimiz tarafından Genel Cerrahi Anabilim Dalı'nda Tıpta Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tarih :

İmza

Başkan

:

Üye

:

Üye

: