

T. C.
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

**SAFRA KESESİ OPERASYONU GEÇİRMİŞ İNSANLARDA
MİDE MUKOZASINDAKİ MİKRO RNA (MİRNA) SEVİYE
DEĞİŞİMİ**

TIPTA UZMANLIK TEZİ
Dr. Ayşenur DÖNDÜREN

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Elmas KASAP

Tez Eş Danışmanı
Doç. Dr. Seda ÖRENAY BOYACIOĞLU

Manisa, 2023

T.C.
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

**SAFRA KESESİ OPERASYONU GEÇİRMİŞ İNSANLARDA
MİDE MUKOZASINDAKİ MİKRORNA (MİRNA) SEVİYE
DEĞİŞİMİ**

TIPTA UZMANLIK TEZİ
Dr. Ayşenur DÖNDÜREN

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Elmas KASAP

Tez Eş Danışmanı
Doç. Dr. Seda ÖRENAY BOYACIOĞLU

Manisa, 2023

ÖNSÖZ

Özellikle tez hazırlama sürecim başta olmak üzere uzmanlık eğitimim boyunca bilgi, tecrübe, babacanlığıyla moral ve motivasyon kaynağım olan Gastroenteroloji Bilim Dalı Başkanı tez danışmanım Prof. Dr. Elmas Kasap'a,

Tezimin her aşamasında desteğini kıtalararası dahi olsa yanımda hissettiren tez eş danışmanım Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'ndan Doç. Dr. Seda Örenay Boyacıoğlu'na,

Bilgilerini paylaşmayı esirgemeyen, ne zaman yardım istesem geri çevirmeyen hocam Dr. Öğr. Üyesi Tahir Buran'a,

Bıkmadan usanmadan poliklinikleri ziyaret edip motivasyonumuzu artıran hocam İç Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Timur Pırıldar'a,

Üzerimde emeği olan tüm saygıdeğer hocalarıma,

Veri istatistiklerindeki yardımlarından dolayı güler yüzlü hocam Prof. Dr. Beyhan Cengiz Özyurt'a,

Tez hastalarımı toplamamda yardımcı olan Endoskopi Ünitesi ekibine,
"Tez nasıl yazılır?"a dair bir bilgim yokken bıkmadan her soruma cevap veren ve kendisinden çok şey öğrendiğim kıdemlim Uzm. Dr. Senem Yılmaz'a,

Şu zorlu şartlarda hekimlik yapmayı bir nebze katlanılır kılan ve uzmanlık eğitimimi tamamlayacak gücü kendimde bulamadığımda bana her daim destek olan eşkıdemlerime ve akabinde tüm asistan arkadaşlarıma,

Koşulsuz şartsız her daim yanımda olan ve destekleyen canım annem, babam ve kardeşim Dr. Hatice Kübra Döndüren'e,

Ne zaman yorulduğum deyip pes edecek olsam elimden tutup kaldıran canım yol arkadaşım, gönüldaşım Dr. Muhammed Burak Alver'e

En içten teşekkür ve sevgilerimi sunarım.

Dr. Ayşenur DÖNDÜREN

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	II
KISALTMALAR	IV
TABLolar LİSTESİ	VI
ŞEKİLLER LİSTESİ	VII
I. GİRİŞ VE AMAÇ	1
II. GENEL BİLGİLER	3
2.1 Safra Kesesi ve Yolları Anatomisi	3
2.2 Safra Asitleri	4
2.3 Mide Kanseri	5
2.3.1. LAUREN SINIFLAMASI	9
2.3.2. WHO SINIFLAMASI	10
2.4 MikroRNA	12
2.5 Kolesistektomi	13
III. GEREÇ VE YÖNTEM	14
IV. BULGULAR	21
4.1. Mide Kanseri, Kolesistektomi ve Kontrol Olgularının Karşılaştırması	22
4.2. Mide Kanseri ve Kontrol Olgularının Karşılaştırılması	24
4.3. Mide Kanseri Olgularının Metastaz Durumuna Göre Karşılaştırılması	25
4.4. Kolesistektomi ve Kontrol Olgularının Karşılaştırılması	26
4.5. Tüm Olguların H. Pylori Pozitifliği Durumuna Göre Karşılaştırılması ..	27
V. TARTIŞMA	29
5.1. MiRNA-92a-1-5p Ekspresyon Düzey Değişimi	30
5.2. MiRNA-221 ve MiRNA-222 Ekspresyon Düzey Değişimi	31
5.3. MiRNA-155-5p Ekspresyon Düzey Değişimi	32
VI. SONUÇ VE ÖNERİLER	34
VII. ÖZET	36
VIII. ABSTRACT	37
IX. KAYNAKLAR	38

KISALTMALAR

RNA	Ribo Nükleik Asit
miRNA/miR	MikroRNA
mRNA	MessengerRNA (Mesajcı RNA)
chr	Chromosome (Kromozom)
NF- κ B	Nükleer Faktör Kappa B
UTR Bölge)	Untranslated Region (Translasyona Uğramamış
EBV	Epstein-Barr Virüsü
GÖRH	Gastroözofageal Reflü Hastalığı
SOX	SRY ilişkili HMG-box
CDX	Caudal Type Homeobox
FXR	Farnesoid X Reseptörü
H. Pylori	Helicobacter pylori
WHO (DSÖ)	World Health Organization (Dünya Sağlık Örgütü)
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
EDTA	Etilendiamin Tetraasetik Asit
cDNA	Complementary/Copy DNA (Tamamlayıcı DNA)
hsa	Homosapiens
COX2	Cyclooxygenase -2
TGR5/ GPBAR1	Takeda G Protein-Coupled Receptor 5 (G Proteinine Bağlı Safra Asidi Reseptörü)
HNF4α	Hepatocyte Nuclear Factor 4 alpha
HDAC6	Histone Deacetylase 6
STAT3	Signal Transducer and Activator Of Transcription 3 (Sinyal Dönüştürücü ve Transkripsiyon 3 Aktivatörü)

KLF5	Krueppel-like Factor 5 (Krueppel Benzeri Faktör 5)
EP4/ PTGER4	Prostaglandin E Receptor 4
Notch 1	Neurogenic Locus Notch Homolog Protein 1
FOXD1	Forkhead Box D 1
PTEN	Phosphatase and Tensin Homolog (Fosfataz ve Tensin Homolođu)
RECK	Reversion İnducing Cysteine Rich Protein With Kazal Motifs (Kazal Motifli Reversiyon İndükleyici Sistein Açısından Zengin Protein)
TGFβR2	Transforming Growth Factor Beta Receptor 2 (Dönüştürücü Büyüme Faktörü Beta Reseptör 2)

TABLolar LİSTESİ

Tablo 1. Dünyada Kanseri Tiplerinin Görülme Sıklığı	6
Tablo 2. Dünyada Kanseri Tiplerine Göre Ölüm Sayı ve Oranları	6
Tablo 3. Mide Kanseri Görülme Sıklığı ve Ölüm Oranlarının Coğrafi Dağılımı	7
Tablo 4. Mide Kanseri Sınıflandırmalarının Karşılaştırması	11
Tablo 5. Mide kanseri, Kolesistektomi, Kontrol Olgularının Demografik Verilerinin Karşılaştırılması	21
Tablo 6. Mide Kanseri, Kolesistektomi ve Kontrol Olguları Ekspresyon Analizi	23
Tablo 7. Mide Kanseri ve Kontrol Olguları Ekspresyon Analizi	24
Tablo 8. Mide Kanseri Metastazı Olan Olguların Ekspresyon Analizi	26
Tablo 9. Kolesistektomi ve Kontrol Olguları Ekspresyon Analizi	26
Tablo 10. H. Pylori Pozitifliği Oranları	28
Tablo 11. H. Pylori Pozitif Olguların Ekspresyon Analizi	28

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Safra Kesesi ve Safra Yolları Anatomisi	3
Şekil 2. Safra Sıvısı Dolaşımı ve Safra Reflüsü	5
Şekil 3. Mide Anatomisi	8
Şekil 4. İntestinal Tip Mide Kanserinde Patogenez	9
Şekil 5. İntestinal ve Diffüz Tip Mide Kanseri Gelişim Süreci	10
Şekil 6. Mide Kanseri, Kolesistektomi ve Kontrol Olguları Ekspresyon Sonuçları	22
Şekil 7. Mide Kanseri, Kolesistektomi ve Kontrol Olguları Ekspresyonlarının Karşılaştırılması	23
Şekil 8. Mide Kanseri ve Kontrol Olguları Ekspresyonlarının Karşılaştırılması	25
Şekil 9. Kolesistektomi ve Kontrol Olguları Ekspresyonlarının Karşılaştırılması	27

I. GİRİŞ VE AMAÇ

Kolesistektomi, safra kesesinin çıkarılması işlemidir. Açık veya kapalı yöntem (laparoskopi) ile yapılabilir. Her ne kadar hastanın durumuna, yapılma koşullarına ve işlemi yapacak kişinin deneyimine bağlı olsa da son yıllarda gelişen teknoloji ve yeni aletler sayesinde daha çok laparoskopik olarak yapılmaktadır [1]. Kolesistektomi sonrası safra salgısının depolanacağı bir kese kalmayacağından salgılanan safra sıvısına mide mukozası daha sık ve uzun süreli şekilde safra reflüsü olarak maruz kalabilir. Bu da mide mukozasında ciddi hasara sebep olabilir [2, 3].

Mide sıvısında yüksek safra asidi konsantrasyonu olan hastalarda daha şiddetli intestinal metaplazi geliştiği tespit edilmiştir [4]. Mide kanseri gelişimi ise genellikle kronik mide inflamasyonu, atrofik gastrit ve intestinal metaplazi yoluyla meydana gelir [5].

Tüm kanser türlerinde olduğu gibi mide kanserinde de zemin oluşturan risk faktörlerinin belirlenmesi, biyobelirteçler kullanılarak erken teşhis ve hedefe yönelik tedavi açısından hasta yararına olacaktır. Yapılan çalışmalarda mide kanseri sıklığı hem kolelitiazislilerde hem kolesistektomililerde kontrol gruplarına göre artmış olarak tespit edilmiştir [6, 7]. Buna sebep olabilecek yollarda safra asitlerinin mide hücrelerinde zaman ve doz bağımlı şekilde CDX2 ve intestinal belirteçlerinin ekspresyonunu indüklediği, SOX2 ekspresyonunu ise inhibe ettiği görülmüştür. Ek olarak SOX2, CDX2 'nin işlevini de baskılayabilir. Ayrıca safra asidi maruziyeti sonucu FXR yolağı üzerinden metaplazi gelişebilir [8, 9].

Bu bağlamda kolesistektominin mide kanserine zemin hazırlayışının araştırılmasında kullanılabilecek biyobelirteçlerden biri de miRNA (mikroRNA)'lardır. MiRNA'lar 3'-çevrilmemiş bölgelere (3'-UTR'ler) bağlanarak hedef mesajın translasyonunu inhibe eden veya bozunmasını tetikleyen küçük kodlanmayan RNA'lardır [10]. Son yapılan çalışmalarda

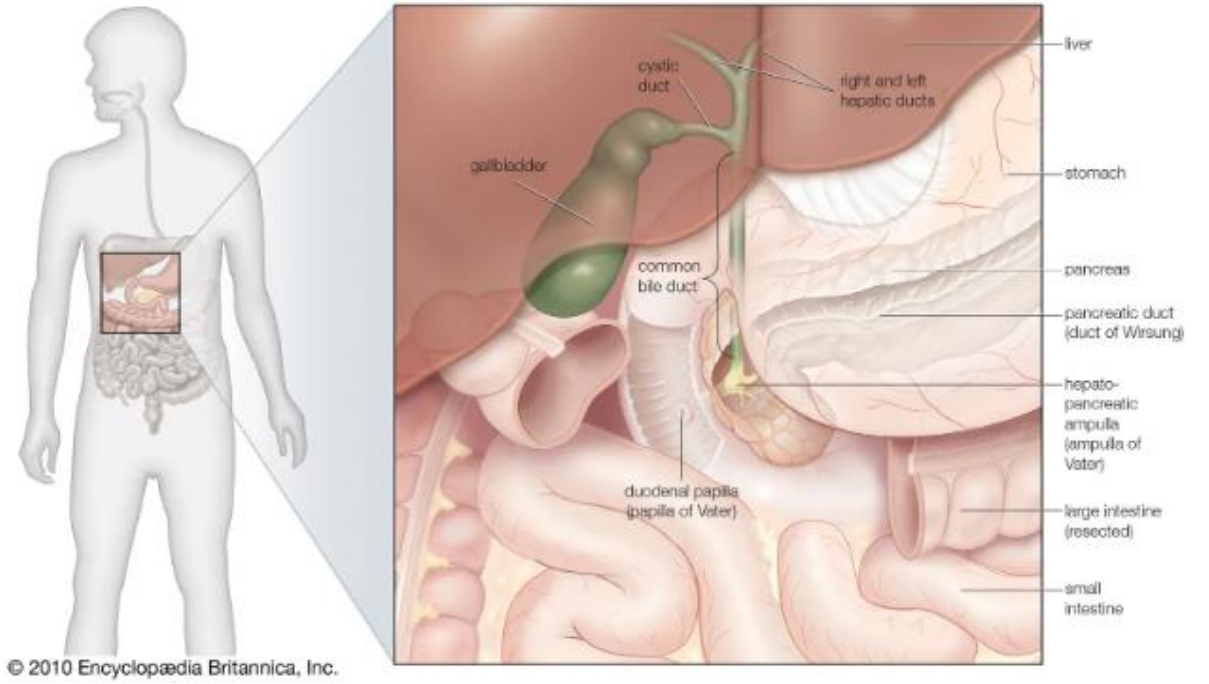
midedeki intestinal metaplazinin ve mide kanserinin patogenezinde rol oynayan birkaç dzensiz miRNA tespit edilmiştir [11,12]. Bu bilgiden yola çıkarak çalışmamızda kolesistektomi geçirmiş vakalarda ve mide kanser olgularında miRNA-92a-1-5p, miRNA-221, miRNA-222, miRNA-155' in ekspresyon değişimlerinin araştırılması amaçlanmıştır.



II. GENEL BİLGİLER

2.1 Safra Kesesi ve Yolları Anatomisi

Safra kesesi, karaciğerin fossa vesica biliaris adı verilen kısmına oturmuş vaziyette 40-70 ml hacminde olup fundus vesica biliaris, corpus vesica biliaris ve collum vesica biliaris olmak üzere 3 bölümden oluşur. Collum vesica biliaris kısmında heister adı da verilen plica spiralis' ler bulunur ve bu kısım dustus cysticus ile devam eder. Safra kesesi, karaciğerde üretilen safrayı depolar ve konsantre edilmesini sağlar. Karaciğerde üretilen safra, ductus hepaticus sinister ve dexter' in birleştiği ductus hepaticus communis' ten geçer. Ardından ductus hepaticus communis ile ductus cysticus ile birleştiği ductus choledochus' tan ilerler. Ductus choledochus genellikle caput pancreatis' in arka bölümünde ductus pancreaticus (wirsung kanalı) ile birleşerek ampulla hepatopancreatica denilen bir genişleme oluşturur ve papilla duodeni major' da (papilla vateri) pars descendes duodeni' ye açılır [13, 14, 15].

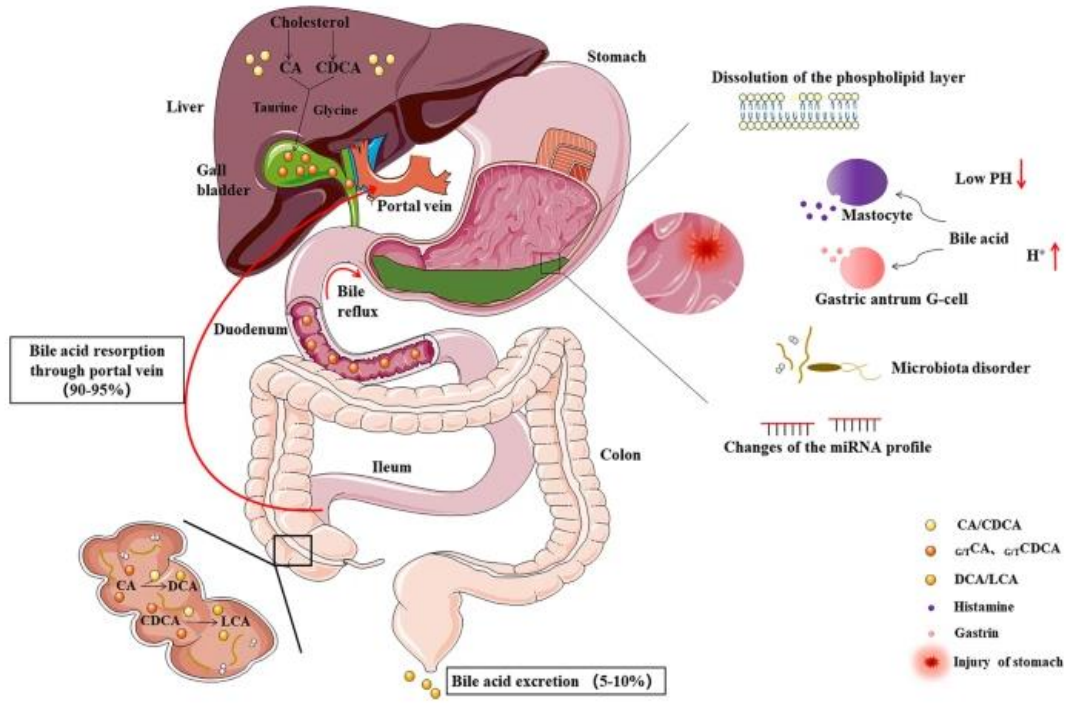


Şekil 1. Safra Kesesi ve Safra Yolları Anatomisi [16]

2.2 Safra Asitleri

Safra sıvısı yağların sindiriminde yer alır ve yapısını safra tuzları, kolesterol, lesitin, bikarbonat, safra pigmentleri, eser elementler, bilirubin, elektrolitler oluşturur [15]. Safra tuzlarının yapısını ise glisin ve taurin aminoasitleri ile konjuge edilen, hepatositlerde kolesterolden sentezlenen primer safra asidi olarak adlandırdığımız kenodeoksikolik asit ve kolik asit ile bunlara eklenen sodyum oluşturur [14, 17].

Safra asitleri primer ve sekonder olarak ikiye ayrılır. Primer safra asitleri kenodeoksikolik asit ve kolik asittir. Sekonder safra asitleri ise bu ikisinin intestinal bakterilerce dekonjuge ve dehidroksile edilmesiyle oluşturulur. Sekonder safra asitleri deoksikolik asit ve litokolik asittir [14, 15, 17]. Primer safra asitleri karaciğerde kolesterolden 7- α hidrosilaz enzimi aracılığıyla üretilir. Karaciğerde günlük yaklaşık 500 mg safra asidi üretilir. Ardından glisin ve taurin ile konjuge edilerek yapısına sodyum eklenmesiyle safra tuzları oluşur. Safra tuzları glikokolik asit, glikokenodeoksikolik asit, taurokolik asit, taurokenodeoksikolik asittir [14, 17]. Bu safra tuzları karaciğerden ductus hepaticus' lar aracılığıyla çıkarak safra kesesinde safra sıvısı içeriğine dahil olarak depolanır ve safra kesesinin kasılmasıyla ductus choledocus' tan geçerek duodenum pars descendens' teki papilla duodeni major' dan bağırsağa sekrete olur. Duodenuma gelen safra sıvısı içeriğindeki safra tuzları bakteriler tarafından glisin ve taurin' den ayrılarak dekonjuge olur. Dekonjuge olan bu safra asitleri sekonder safra asitlerini oluşturmuş olur. Safra asitlerinin büyük bir kısmı ileumdan geri emilerek enterohepatik dolaşım ile karaciğere geri döner. Enterohepatik dolaşıma katılmayan kısmı ise feçesle atılır [14, 15, 17].



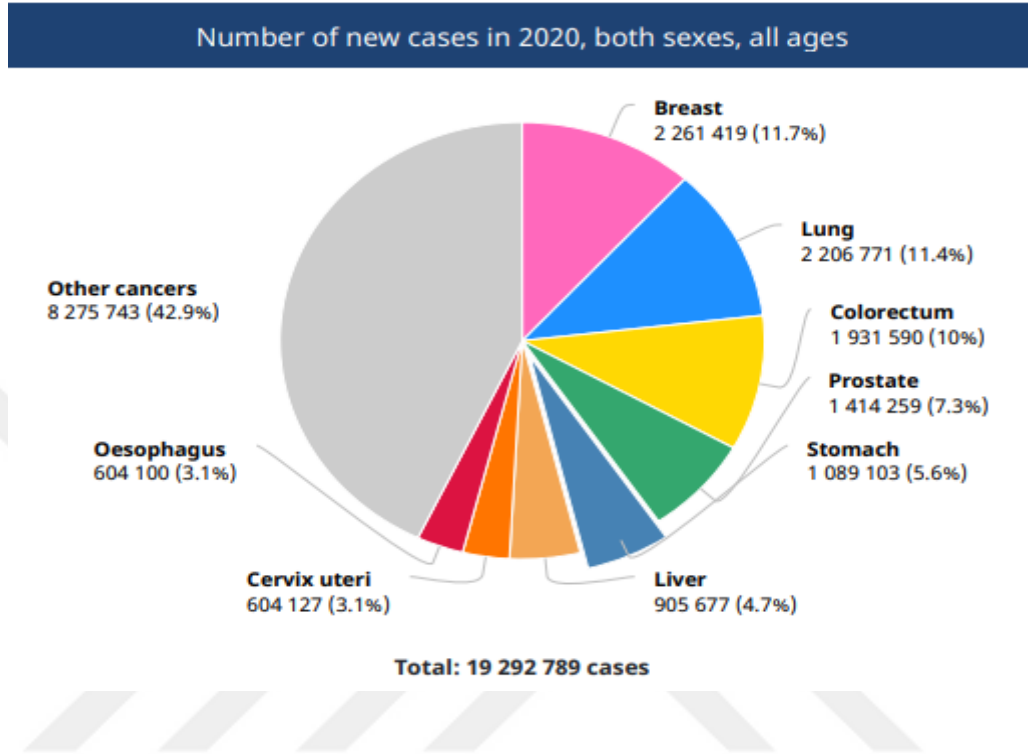
CA:Kolik asit, CDCA:Kenodeoksikolik asit, DCA:Deoksikolik asit, LCA: Litokolik asit

Şekil 2. Safra Sıvısı Dolaşımı ve Safra Reflüsü [18]

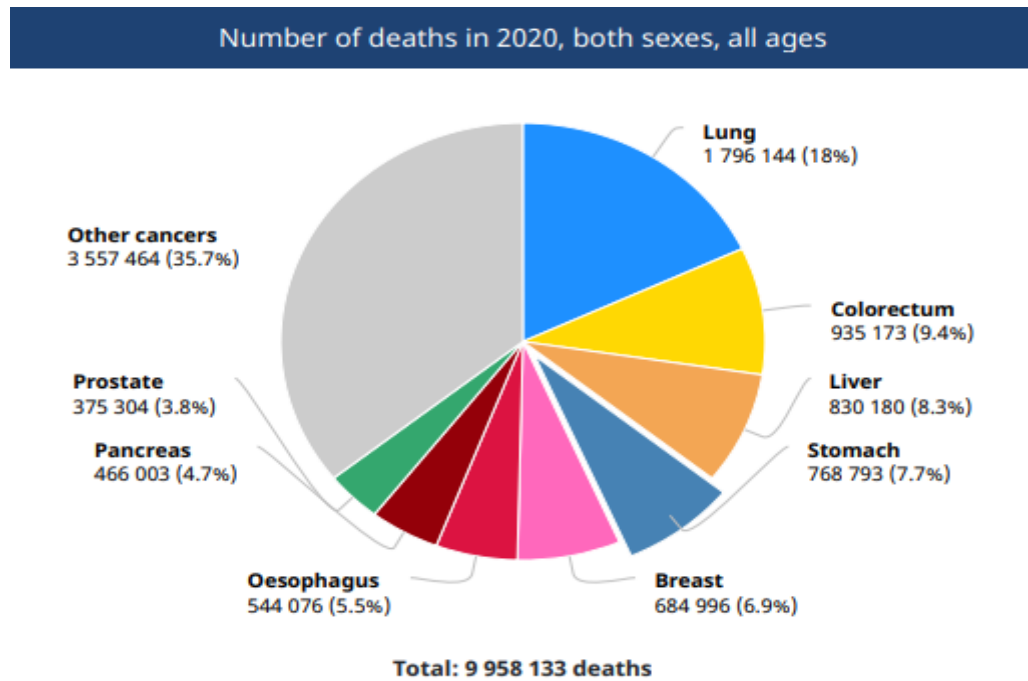
2.3 Mide Kanseri

Mide kanseri, dünyada yaygın olarak görülen multifaktöriyel ve kompleks bir malign hastalıktır [19]. Dünyada en sık teşhis edilen beşinci kanser olup kansere bağlı ölümlerin dördüncü önde gelen nedenidir. En sık Asya (%75,3), ikinci olarak da Avrupa (%12,5) kıtasında görülür. Ayrıca erkek cinsiyette görülme sıklığı daha fazladır [20].

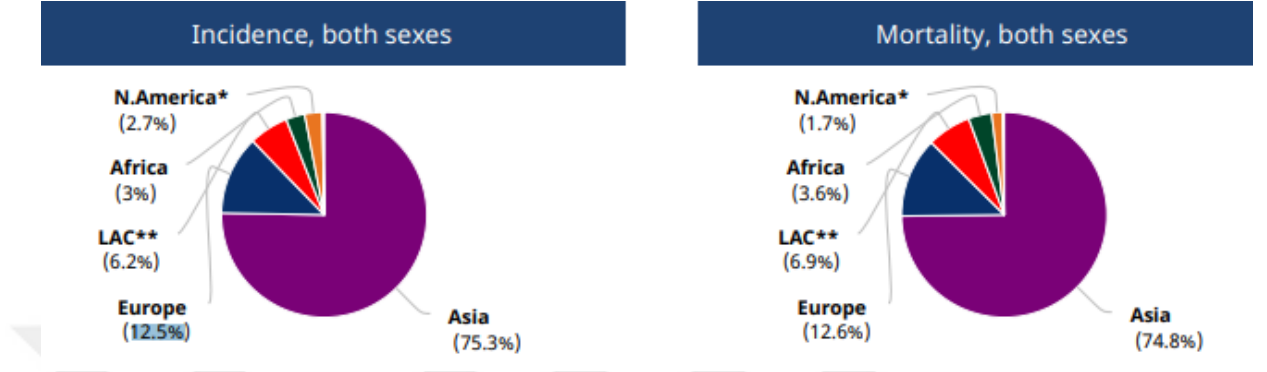
Tablo 1. Dünyada Kanser Tiplerinin Görülme Sıklığı [20]



Tablo 2. Dünyada Kanser Tiplerine Göre Ölüm Sayı ve Oranları [20]



Tablo 3. Mide Kanseri Görülme Sıklığı ve Ölüm Oranlarının Coğrafi Dağılımı [20]

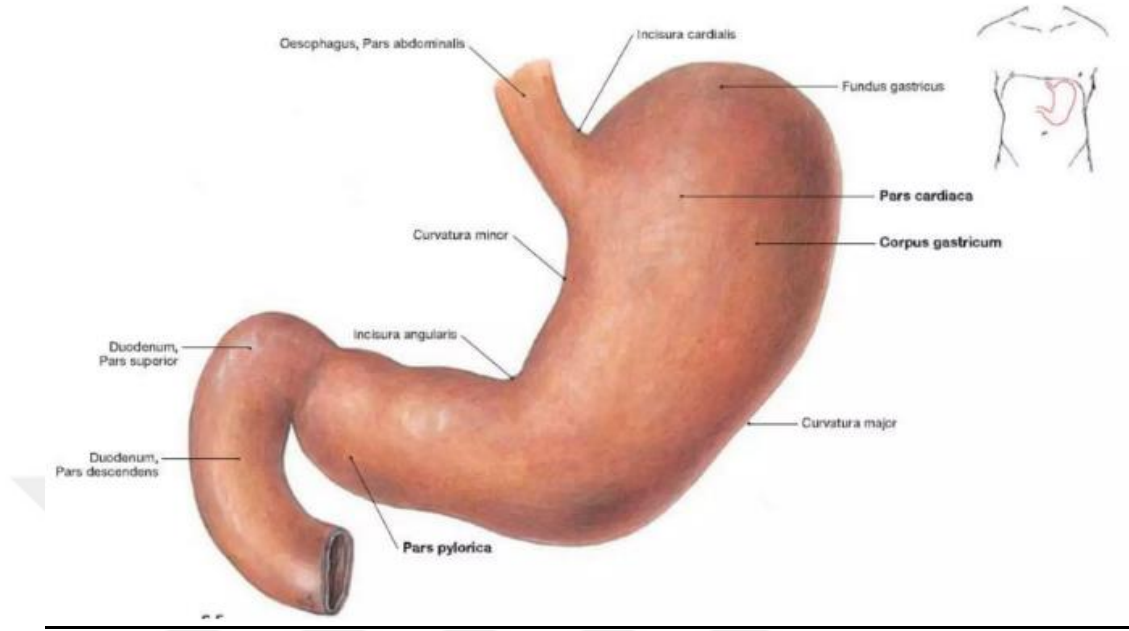


Mide kanseri görülme sıklığında H.pylori eradikasyonu, artan hijyen, bilinçli beslenme gibi faktörler sayesinde genel anlamda bir düşüş görülmektedir [21].

Mide kanseri vakalarının çoğunluğu sporadik olmakla birlikte yaklaşık %5-10 kadarında ailede mide kanseri öyküsü mevcuttur ve kalıtsal ailesel mide kanseri sendromlarından kalıtsal yaygın mide kanseri (HDGC), mide adenokarsinomu ve midenin proksimal polipozisi (GAPPS), ailesel bağırsak mide kanseri (FIGC) eşlik edebilmektedir [22].

Mide kanseri riskinin artmasıyla bağlantılı faktörler arasında N-nitroso bileşikler tüketimi, sigara kullanımı, alkol tüketimi, düşük A ve C vitamini diyeti, çok miktarda tütülenmiş veya işlenmiş gıdalar, H.pylori, EBV, GÖRH, gastrik cerrahi geçirmiş olmak gibi birçok etken bulunmaktadır [22, 23, 24]. Tüm bu etkenler genellikle mide kanseri gelişim basamaklarından olan kronik mide inflamasyonu, atrofik gastrit ve intestinal metaplaziyi tetiklemektedir [5].

Yapılan araştırmalarda görüldüğü kadarıyla proksimal (kardia) mide kanserlerinde son yıllarda artış olurken, distal kanserlerde azalma olmaktadır. Proksimal kanserler, distal kanserlere göre daha kötü prognozlu ve daha agresif seyirlidir. Proksimal kanserlerde H. pylori ve preneoplastik atrofik gastrit, intestinal metaplazi ilişkisi net değildir [21, 25].



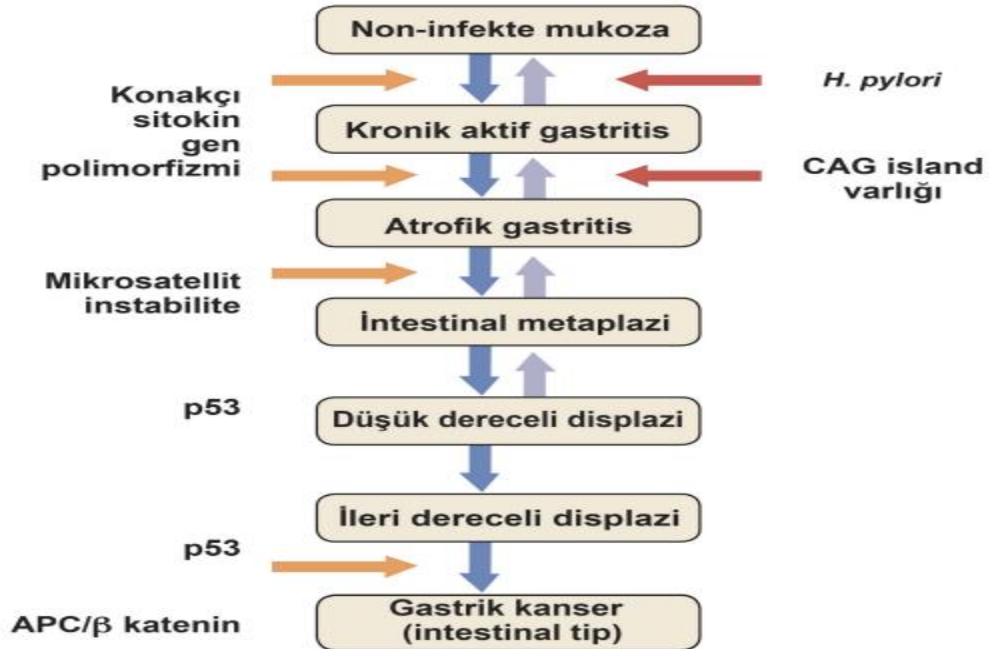
Şekil 3. Mide Anatomisi [26]

Gen ekspresyon çalışmaları neticesinde 2 farklı moleküler tip mide kanseri mevcuttur ve en yaygın kullanılan Lauren sınıflamasına göre bunlar: Diffüz tip (undifferansiye) mide kanseri ve İntestinal tip (iyi differansiye) mide kanseridir. Bu iki grup dışında kalanlar ise belirsiz tip yaygın olmayan varyantlardır [22, 27]. Ayrıca son yıllarda mide kanserlerini alt tiplerine ayırmak amacıyla kullanılan 2010 WHO sınıflaması mevcuttur. Bu sınıflamaya göre 4 ana tip mide kanseri vardır: Tübüler, papiller, müsinöz ve zayıf kohezif (taşlı yüzük hücreli karsinom dâhil), yaygın olmayan histolojik varyantlar [28, 29].

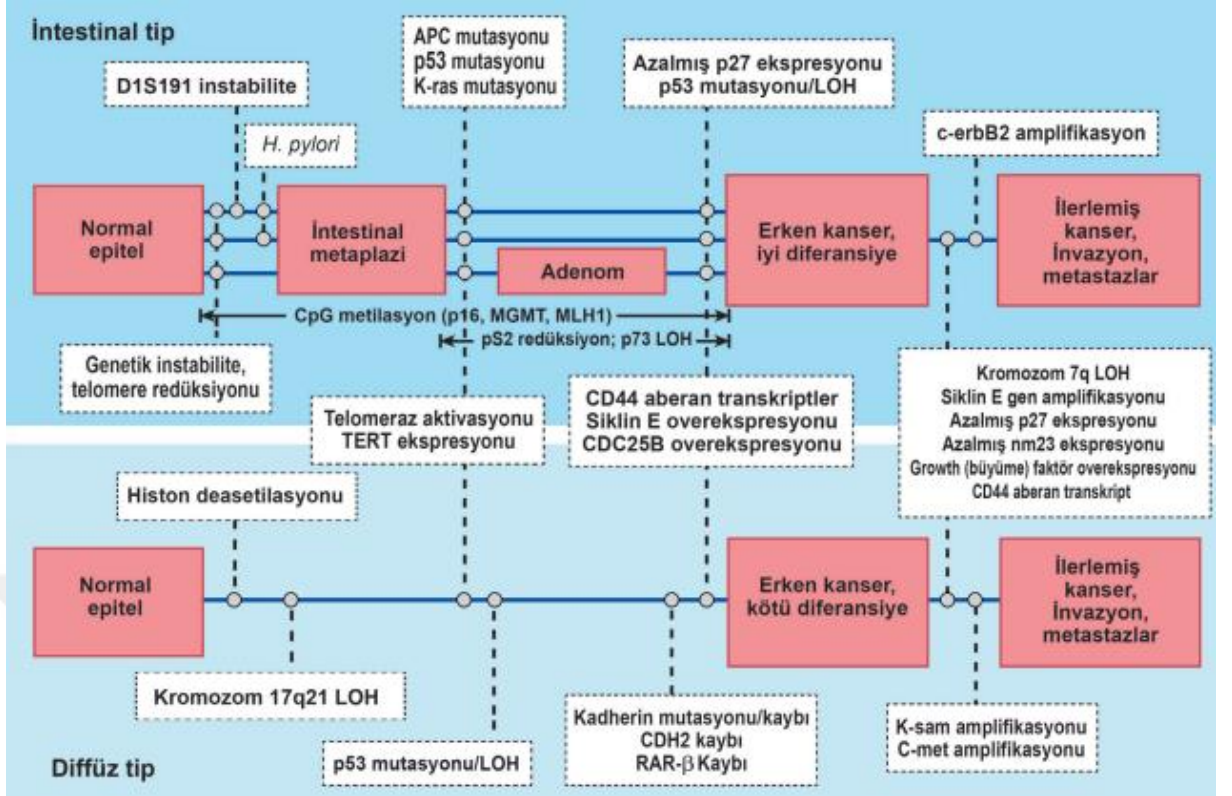
2.3.1 LAUREN SINIFLAMASI

2.3.1a Diffüz tip mide kanseri: Mide duvarında çok az bez oluşumunun olduğu veya hiç bez oluşumunun olmadığı, mideyi diffüz olarak infiltre eden zayıf kohezyonlu hücreleri kapsar. Hücreler genellikle küçük ve yuvarlaktır. Ayrıca taşlı yüzük hücresi oluşumu vardır. Temelde karsinojenik olay e-kadherinin ekspresyon kaybıdır. Daha çok genç yaşta ve iki cinsiyette eşit sıklıkta görülür. Genellikle genetikdir [28, 30].

2.3.1b İntestinal tip mide kanseri: En yaygın görülen mide kanseri tipidir. Mide mukozasının bağırsak metaplazisi ve *H. pylori* enfeksiyonu oluşumu ile ilişkili olduğuna dair araştırmalar mevcuttur. Daha çok ileri yaşta ve sıklıkla erkeklerde görülür. Genellikle çevresel faktörlere bağlı oluşur [28]. Mide distalinde, yüksek riskli bölgelerde daha sık ortaya çıkma eğilimindedir ve genellikle öncesinde uzun süredir devam eden kanser öncesi bir lezyon vardır. Yüksek riskli olarak kabul edilen Asya ve Avrupa'da daha sık görülür.



Şekil 4. İntestinal Tip Mide Kanseri Patogenez [31]



Şekil 5. İntestinal ve Diffüz Tip Mide Kanseri Gelişim Süreci [31]

2.3.2. WHO SINIFLAMASI

Nadir görülen varyantlar dışında 4 ana sınıf mevcuttur:

2.3.2a Tübüler Adenokarsinom: Erken tip mide kanserlerinin en sık görülenidir. Polipoid veya mantara benzer şeklide kitleler oluşturma eğilimindedir.

2.3.2b Papiller Adenokarsinom: Erken tip mide kanserlerinde sık görülür. Genellikle mide proksimal bölgesinde oluşur ve metastaz eğilimi yüksektir.

2.3.2c Müsinöz adenokarsinom: Hücre dışı müsinöz komponentler yaygındır ve tümör hücreleri bu müsinöz komponentlerin arasına düzensiz, dağılmış veya kümeli vaziyettedir.

2.3.2d Taşlı Yüzük Hücreli Karsinom Ve Diğer Zayıf Kohezyonlu

Karsinom: Taşlı yüzük hücreleri ve bunlar dışındaki tümör hücrelerinden oluşur [28].

Tablo 4. Mide Kanseri Sınıflandırmalarının Karşılaştırması [27]

Laurén (1965)	Nakamura (1968)	JGCA (2017)	DSÖ (2019)
İntestinal	Diferansiye	Papiller: pap Tübüler 1, iyi diferansiye: tub1 Tübüler 2, orta diferansiye: tub2	Papiller Tübüler, iyi diferansiye Tübüler, orta diferansiye
İndetermine	Andiferansiye	Zayıf 1 (solid tip): por1	Tübüler (solid), zayıf diferansiye
Diffüz	Andiferansiye	Taşlı-yüzük hücre: sig Zayıf 2 (non-solid tip): por2	Zayıf koheziv, taşlı yüzük hücre fenotipi Zayıf koheziv, diğer hücre tipleri
İntestinal/diffüz/indetermine	Diferansiye/andiferansiye	Müsinöz	Müsinöz
Mikst		Tanımlama farklı tiplerin oranlarına göre Örneğin (por2>sig>tub2)	Mikst
Tanımlanmamış	Tanımlanmamış	Özel tipler Adenoskuamöz karsinom Skuamöz hücreli karsinom Andiferansiye karsinom Lenfoid stromalı karsinom Hepatoid adenokarsinom Enteroblastik diferansiyasyonlu adenokarsinom Fundik gland tip adenokarsinom	Diğer histolojik alt tipler Adenoskuamöz karsinom Skuamöz hücreli karsinom Andiferansiye karsinom Lenfoid stromalı karsinom Hepatoid adenokarsinom Enteroblastik diferansiyasyonlu adenokarsinom Fundik gland tip adenokarsinom Mikropapiller adenokarsinom

2.4 MikroRNA

MikroRNA' lar (MiRNA) 3'-çevrilmemiş bölgelere (3'-UTR' ler) bağlanarak hedef mesajın translasyonunu inhibe eden veya bozunmasını tetikleyen 20-22 nükleotidden oluşan küçük kodlanmayan RNA' lardır [32]. MiRNA' lar kromatin düzenlenmesi, gen regülasyonu, transkripsiyon ve translasyonda önemli rol oynar. Şimdiye kadar araştırılan tüm organizmalarda toplamda yaklaşık 38.589 olgun miRNA tanımlanmıştır [33]. MiRNA' ların memeli genomunun %5' inden fazlasını oluşturduğu tahmin edilmektedir. Şimdiye kadar yalnızca yaklaşık 2654 olgun insan miRNA' sı tanımlanmış olsa da hesaplamalı genom analizi, insan genomunda 50.000 kadar miRNA' nın var olabileceğini tahmin ediyor [33, 34, 35].

MiRNA' ların sentez sürecinde olgunlaşmamış miRNA' lar RNA polimeraz 2 enzimi tarafından hücre nükleusunda önce pri-miRNA ardından pre-miRNA olarak sentezlenerek sitoplazmaya taşınırlar. Sitoplazmada geçtiği işlemlerden sonra 20-22 nükleotidlik son hallerini alırlar [36, 37]. Daha sonra sitoplazmada serbest haldeki miRNA kendi zincirine tamamlayıcı baz dizisine sahip hedef mRNA molekülünü ortadan ayırır. Ayrılan bu mRNA nükleazlar tarafından yıkıma uğratılır. Sonuçta bu mRNA' nın kalıp olarak kullanılacağı protein sentezi ve bu mRNA' yı üreten genin ekspresyonu da sona ermiş olur. Dolaşımdaki diğer hücre bağımsız kanser ilişkili nükleik asitlere benzer şekilde, miRNA' lar da kanser hastalarında periferik dolaşıma salınır ve non-invaziv gen ekspresyonunu düzenlerler. Kanser prognozu ve teşhisi için miRNA' lar hem invaziv hem non-invaziv olarak kullanılabilirler [37, 38, 39, 40, 41]. Bu bağlamda örneğin son yapılan çalışmalarda midedeki intestinal metaplazinin ve mide kanserinin patogenezinde rol oynayan birkaç düzensiz miRNA tespit edilmiştir [11, 12]. Bu miRNA' lar safra asitlerine maruziyet sonucu up regüle olan miR-21, miR-155, miR -192, miR-92a-1-5p CDX2' yi artırarak; miR-221 ve miR-222 ise CDX2' yi azaltarak karsinogenez yolağına katkıda bulunur [10, 42, 43].

MiR-92a-1-5p, kromozom 13q31.3' te (chr13), miR-221 ve miR-222 kromozom Xp11.3' te (chrX) lokalizedir [44]. MiR-155-5p kromozom 21q21.3' te (chr21) lokalizedir ve CDX2' yi artırmanın yanı sıra mide kanser patogenezinin NF- κ B aktivasyonu ile de katkıda bulunur [42].

2.5 Kolesistektomi

Kolesistektomi, safra kesesinin çıkarılması işlemidir. Açık veya kapalı yöntem (laparoskopi) ile yapılabilir. Her ne kadar hastanın durumuna, yapıma koşullarına ve işlemi yapacak kişinin deneyimine bağlı olsa da son yıllarda gelişen teknoloji ve yeni aletler sayesinde daha çok laparoskopik olarak yapılmaktadır [1]. Günümüzde kolesistektomiyi endike kılan durumlar genel olarak: Akut/kronik kolesistit, semptomatik kolelitiazis, diskinezi, akalkülöz kolesistit, safra yolu taşına bağlı pankreatit ve safra kesesi kitleleridir [1, 45].

Kolesistektomi sonrası safra salgısının depolanacağı bir kese kalmayacağından salgılanan safra sıvısına mide mukozası daha sık ve uzun süreli şekilde safra reflüsü olarak maruz kalabilir. Bu da mide mukozasında ciddi hasara sebep olabilir [2, 3]. Özellikle safra asitleri arasında hidrofobikliği en yüksek olan sekonder safra asitleri litokolik asit ve deoksikolik asit oksidatif DNA hasarı, enflamasyon ve NF- κ B aktivasyonu yoluyla epitelyal hasara ve sonuçta metaplaziye sebep olabilir [46, 47].

Mide sıvısında yüksek safra asidi konsantrasyonu olan hastalarda daha şiddetli intestinal metaplazi geliştiği tespit edilmiştir [4]. Ayrıca mide kanseri gelişme sürecinin intestinal metaplaziden geçtiği bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda mide kanseri sıklığı hem kolelitiazislielerde hem kolesistektomililerde kontrol gruplarına göre artmış olarak tespit edilmiştir [6, 7].

III. GEREÇ VE YÖNTEM

Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Gastroenteroloji Bilim Dalına Kasım 2021 ile Mart 2023 arasında başvuran 62 kişi çalışmaya dâhil edildi. Bu çalışma ile ilgili etik kurul onayı, Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı Bilimsel Araştırmalar Etik Kurul Başkanlığının 16.09.2021 tarihli ve 94062 sayılı onayı ile gerçekleştirilmiştir. Olgular; endoskopide mide kanseri saptanan hastalar (n=20), kolesistektomi geçirmiş hastalar (n=22) ve kontrol hasta grubu (n=20) olarak üç gruba ayrıldı.

Çalışmaya alınacak hastalar işlem öncesinde bilgilendirilip hasta gönüllü onam formu ve sonrasında periferik kandan 1 adet EDTA' lı tüp alındı. Tüm kan örnekleri çalışma protokolüne uygun olarak testler çalışılincaya kadar -80 °C' de saklandı. Çalışma Helsinki Deklarasyonu prensipleri doğrultusunda yürütüldü. Çalışmaya katılmayı kabul eden olgulara, klinisyen tarafından oluşturulmuş sosyodemografik veri formu uygulandı. Çalışmanın deneysel aşamaları Aydın Adnan Menderes Üniversitesi'nde gerçekleştirildi. İstatistiksel değerlendirme için Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Halk Sağlığı Anabilim Dalı'ndan destek alındı.

Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Gastroenteroloji polikliniğine başvuran endoskopi ile alınan örneğin patoloji sonucuna göre mide kanseri tanısı alan 18 yaş üzeri olgular ve kolesistektomi öyküsü bulunan olgular hasta grubu olarak dâhil edildi. Mide kanseri tanısı ya da başka bir malignite nedeni ile herhangi bir zamanda kemoterapi ya da radyoterapi alanlar, herhangi bir malignite tanısı almış olanlar çalışmanın dışında bırakıldı. Sağlıklı kontrol grubuna ise polikliniğe başvuran rutin olgulardan mide kanseri dışında farklı bir sebeple endoskopisi yapılmış, patoloji sonucuna göre sonucu olağan olarak sonuçlanmış ve kolesistektomi öyküsü olmayan 18 yaş üzeri olgular dâhil edildi. Çalışmaya katılmayı kabul etmeyen ve onam formunu imzalamayan olgular çalışmanın dışında bırakıldı.

MiRNA İzolasyonu

Araştırmamızda olguların taze biyopsi örneklerinden miRNA izolasyonu ticari olarak sağlanacak miRNA izolasyon kiti kullanılarak yapıldı.

CDNA Hazırlanması

Aşağıdaki karışım hazırlanır. Bu karışım 62 örneğin cDNA reaksiyonu için yeterlidir

85.0µl 5x Reaction Buffer 42.5µl

Enzyme mix 21.25

µl Spike in Kontrol Karışımı

RT

TOPLAM

148.75 µl

Bu karışım bir 8 li strip tüpün tüm kuyularına 18 er µl olarak transfer edildi. Buradan 8 kanallı pipet yardımı ile 1.75 er µl alınarak temiz bir 96 lık Plate'in tüm kuyularına pipetlendi. RNA örnekleri de her kuyuya, yukarıda transferi yapılan karışımların üzerine 3.25 er µl olmak üzere pipetlendi. Plate film ile kaplanarak, plate karıştırıcıda elle bastırılarak 10 saniye karıştırıldı. Plate santrifüj de 1 dakika santrifüj edildi ve Thermal Cycler da aşağıdaki program çalıştırıldı.

42° C 60 dakika

95 °C 5 dakika

4 °C □

Thermal programın sonunda plate' in oda sıcaklığına gelmesi beklenerek (deney bitiminde yüzeyi sıcak olabilir) plate santrifüj de 1 dakika santrifüj edildi.

PreAmplifikasyon Hazırlanması

Preamplifikasyon primer karışımı (Pool Primer Mix) tüm assayler için bir kez aşağıdaki şekilde hazırlandı.

Primer tüpleri) mikro santrifüjde maksimum hızda 2 dakika santrifüj edildi. Tüpler açılarak her tüpe 55 µl DNase, RNase Free su eklendi. Tüpler kapatılıp sallanarak karıştırıldı. Tüpler 4 °C de 30 dakika bekletilerek mikro santrifüjde maksimum hızda 2 dakika santrifüj edildi. Temiz bir tüp içerisine her bir primerden 4,5 er µl primer konularak hepsi birbirine karıştırıldı. Primer sayısı ile 4,5 çarpılınca elde edilen rakam 450 den çıkarılarak elde edilen rakam kadar DNase, RNase Free su bu karışıma eklendi. İyice karıştırılıp 150 şer µl olacak şekilde 3 ayrı SafeLock Eppendorf tüpüne konularak uygun şekilde etiketlendi. Bu tüplerin her biri 1 adet 96 lık örneğin preamplifikasyonu için yeterlidir. Primer tüpleri Dynamic Array hazırlanması kısmına kadar 4 °C de saklandı.

cDNA plate' i bir plate taşıyıcı üzerine konularak (plate'in kaymaması ve kırılmaması için gereklidir) film açıldı. Piko plate in tüm kuyularından 1 er µl yeni temiz bir Piko plate' e cDNA konuldu. Bir rezervuara 5 mL kadar DNase, RNase-free su konuldu ve bu yeni Piko Plate' in her kuyusuna 9 ar µl bu sudan eklendi. Yeni bir film ile plate kaplanarak plate karıştırıcıda 2000 rpm de 3 dakika karıştırıldı ve plate santrifüjde 1 dakika santrifüj edildi.

Preamplifikasyon deneyi için aşağıdaki karışım hazırlandı. Bu karışım 62 örneğin PreAmplifikasyon reaksiyonu için yeterlidir.

Pre Amp Master Mix Reagent Kit	85.0 µl
(Fluidigm, 100-5580 veya 100-5581)	
Pool Primer Mix	106.25 µl
DNase, RNase Free su	127.50 µl
TOPLAM	318.75 µl

Bu karışım bir 8 li strip tüpün tüm kuyularına 39 ar µl olarak transfer edildi. Buradan 8 kanallı pipet yardımı ile 3.75 er µl alınarak temiz bir Piko plate' in tüm kuyularına pipetlendi. Sulandırılmış olan cDNA örneklerinden her kuyuya 1.25 er µl olmak üzere pipetlendi. Plate, film ile kaplanarak plate karıştırıcıda 3000 rpm de 3 dakika karıştırıldı. Plate santrifüjde 1 dakika

santrifüj edilerek Plate Thermal Cyclers a yerleştirildi ve aşağıdaki PreAmp Protokolü çalıştırıldı.

PreAmp Protokolü

95 °C	10 dakika	Başlangıç Dentürasyonu
95 °C	15 saniye	
60 °C	4 dakika	15 döngü
4 °C	□	

Thermal programın sonunda plate'in oda sıcaklığına gelmesi beklenerek (deney bitiminde yüzeyi sıcak olabilir) plate santrifüjde 1 dakika santrifüj edildi.

Dynamic Array İle MiRNA Ekspresyonlarının Tespiti

Exonuclease Adımı

Aşağıdaki karışım hazırlandı. Bu karışım 70 örneğin exonuclease reaksiyonu için yeterlidir.

Exonuclease I Reaction Buffer	17 µl
Exonuclease I	34 µl
Nuclease Free Water	119 µl
TOPLAM	170 µl

Bu karışım bir 8 li strip tüpün tüm kuyularına 20 şer µl olarak transfer edildi. Buradan 8 kanallı pipet yardımı ile 2,0 şer µl alınarak preamplifiye örnek plate in tümüne pipetlendi. Plate, film ile kaplanarak karıştırıcıda 3000 rpm de 3 dakika karıştırıldı. Plate santrifüjde 1 dakika santrifüj edilerek 384 lük Thermal Cyclers da aşağıdaki Exonuclease Protokolü çalıştırıldı.

Exonuclease Protokolü

37 ° C	30 dakika
80 ° C	15 dakika
4°C	∞

Thermal programın sonunda plate'in oda sıcaklığına gelmesi beklenerek (deney bitiminde yüzeyi sıcak olabilir) plate santrifüjde 1 dakika santrifüj edildi. Her kuyuya 18 er µl µl DNase, RNasefree su eklendi. Yeni bir film ile plate kaplanarak karıştırıcıda 3000 rpm de 3 dakika karıştırıldı ve santrifüjde 1 dakika santrifüj edildi.

Dynamic Array Hazırlanması

Bu aşama da 6 ayrı adım vardır;

1. Dynamic Array' in PRIME edilmesi,
2. Assay Plate' inin hazırlanması,
3. Örneklerin hazırlanması,
4. Dynamic Array' e pipetlemelerin yapılması,
5. IFC Controller da Dynamic Array' in Load edilmesi,
6. Dynamic Array' in BioMark da çalışılması.

Dynamic Array' in PRIME Edilmesi

Bir adet Dynamic Array' e control fluid lar enjekte edilerek Dynamic Array IFC Controller da PRIME edildi. Bu işlem tam 20 dakika sürdü ve PRIME işlemi devam ederken aşağıdaki aşamaya geçildi.

Assay Plate' inin Hazırlanması

Her bir primerden boş bir Piko plate in kuyularına 1.75 µl pipetlenerek üzerine 3.50 µl Assay Loading Reagent (Fluidigm, PN: 100-7611) ve 1.75 µl DNase, RNase Free su eklendi. Plate film ile kaplanarak karıştırıcıda 2000 rpm de 3 dakika karıştırıldı

ve santrifüjde 1 dakika santrifüj edildi. Hazırlanan bu karışım chipe pipetlemeye hazırdır ve 1 adet Flexsix chip için yeterlidir.

Örneklerin Hazırlanması

Aşağıdaki karışım hazırlanır. Bu karışım bir set (62 örnek) için yeterlidir

2x TaqMan Gene Expression Master Mix (Cat.No:4369016,Thermo Fisher)	255 µl
20x DNA Binding Dye Sample Loading Reagent (Cat.No:100-7609, Fluidigm) 20x EvaGreen 25.5 µl (Cat.No: 31005, Biotium)	25.5 µl
RNase-free water	76,5 µl

TOPLAM 382,5 µl

Bu karışım bir 8 li strip tüpün tüm kuyularına 47 şer µl olarak transfer edilerek bu karışımdan 4,5 er µl temiz bir Piko plate in tüm kuyularına pipetlendi. Sulandırılmış olan preamplifiye ürünlerin üzerindeki film açıldı. Her bir preamplifiye örnekten 1,5 er µl bu plate' e transfer edildi. Plate yeni bir film ile kaplanarak karıştırıcıda 2000 rpm de 3 dakika karıştırıldı. Plate santrifüjde 30 saniye santrifüj edildi.

Dynamic Array' e Pipetlemelerin Yapılması

Assay pipetlemeleri için Viaflo Voyager (12.5 µl) de şu program yapıldı:
Aspirate

4.75 µl, Dispense 4.50 µl. Tüm kuyularda ki Assayler bu şekilde Dynamic Array e transfer edildi. Örnek pipetlemeleri için Viaflo Voyager (12,5 µl) de Assay için yapılan program kullanıldı. Tüm kuyularda ki örnekler bu şekilde Dynamic Array e transfer edildi.

IFC Controller da Dynamic Array' in Load Edilmesi

Dynamic Array IFC Controller'a yerleştirilerek LOAD seçeneği seçildi ve LOAD işlemi başlatıldı. Bu işlemi başlattıktan sonra BioMark Data Collection yazılımı başlatılarak "Double Click to Turn Lamp On" kısmına çift tıklanarak BioMark'ın lambası çalıştırıldı.

Dynamic Array'in BioMark' da Çalışılması

Dynamic Array IFC Controller dan alınarak Dynamic Array altındaki mavi filmin uzaklaştırıldığından emin olundu. Chip yüzeyinin temiz olup olmadığı kontrol edilerek Dynamic Array BioMark'a barcode kısmı dışarı bakacak şekilde yerleştirildi.

BioMark Data Collection yazılımı yardımı ile Dynamic Array çalıştırıldı ve verilerin kaydedileceği yer ile dosya adı seçildikten sonra diğer sayfada "Gene Expression" seçildi. Passive Reference Dye olarak "ROX" seçildi. "Probe Type" kısmında "EvaGreen" seçildi. Sonraki ekranda protokoller arasından "Exiqon miRNA Protokol" seçilerek program başlatıldı.

Data Analiz ve İstatistik Analiz

Data analiz BioMark Gene Expression Data Analysis software kullanılarak yapıldı. (Her bir miRNA ekspresyonu için ortalama Ct değerleri ve T test ile bir P değeri hesaplandı. Ct>33 olanlar hesaplamaya dahil edildi. Fold-change and fold-regulation değerleri 2 ve üzeri olan genler up regüle genler, Fold- change değeri 0,5' in altında ve Fold-regulation değeri -2' nin altında olan genler down regüle genler olarak değerlendirildi. P değeri otomatik olarak Student T Test kullanılarak hesaplanıp $p < 0,05$ olanlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi).

Hastaların demografik verileri SPSS 21.0 programı yardımıyla ki-kare, T test ve tek yönlü varyans analizi (ANOVA) istatistik yöntemleriyle hesaplandı.

IV. BULGULAR

Endoskopide mide kanseri saptanan hastalar (n=20), kolesistektomi geçirmiş hastalar (n=22) ve kontrol grubu (n=20) hastaları olmak üzere üç ayrı grupta toplamda 62 hasta çalışmaya dâhil edildi.

Mide kanseri tespit edilen olguların yaş ortalaması $69,2 \pm 9,9$, kolesistektomili olguların yaş ortalaması $60,5 \pm 10,2$, kontrol olgularının yaş ortalaması $52,9 \pm 14,5$ saptandı. Yaş ortalamaları üç grup arasında karşılaştırıldığında mide kanseri hastalarının belirgin şekilde daha ileri yaş olması nedeniyle anlamlı fark ($p<0,001$) saptandı.

Çalışmamızdaki kadın cinsiyet oranı %61 (n=38), erkek cinsiyet oranı %39 (n=24) olarak saptandı. Gruplar arasında kolesistektomili olgularda kadın cinsiyette anlamlı fark ($p=0,021$) saptandı.

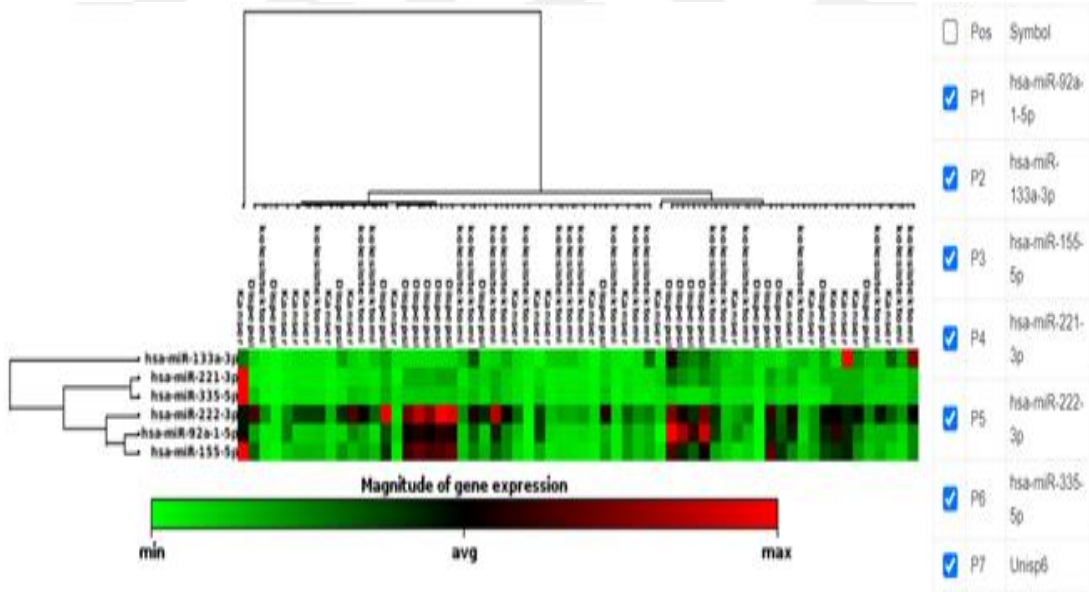
Tablo 5. Mide Kanseri, Kolesistektomi, Kontrol Olgularının Demografik Verilerinin Karşılaştırılması

		Mide Kanseri	Kolesistektomi	Kontrol
Yaş Ortalaması		$69,2 \pm 9,9$	$60,5 \pm 10,2$	$52,9 \pm 14,5$
Cinsiyet	Kadın n (%)	8 (%40)	18 (%81)	12 (%60)
	Erkek n (%)	12 (%60)	4 (%19)	8 (%40)

4.1. Mide Kanseri, Kolesistektomi ve Kontrol Olgularının Karşılaştırması

Çalışmamızda mide kanseri olguları, kolesistektomi olguları ve kontrol grubu olmak üzere üç grupta miR-221, miR-222, miR-155-5p, miR-92a-1-5p ekspresyon seviyelerine bakılarak gruplar arası ve kendi içinde istatistiksel analiz yapılmıştır. Bu bölümde mide kanseri ve kolesistektomi olguları grup 1 olarak, kontrol olguları grup 2 olarak temsil edilmiştir.

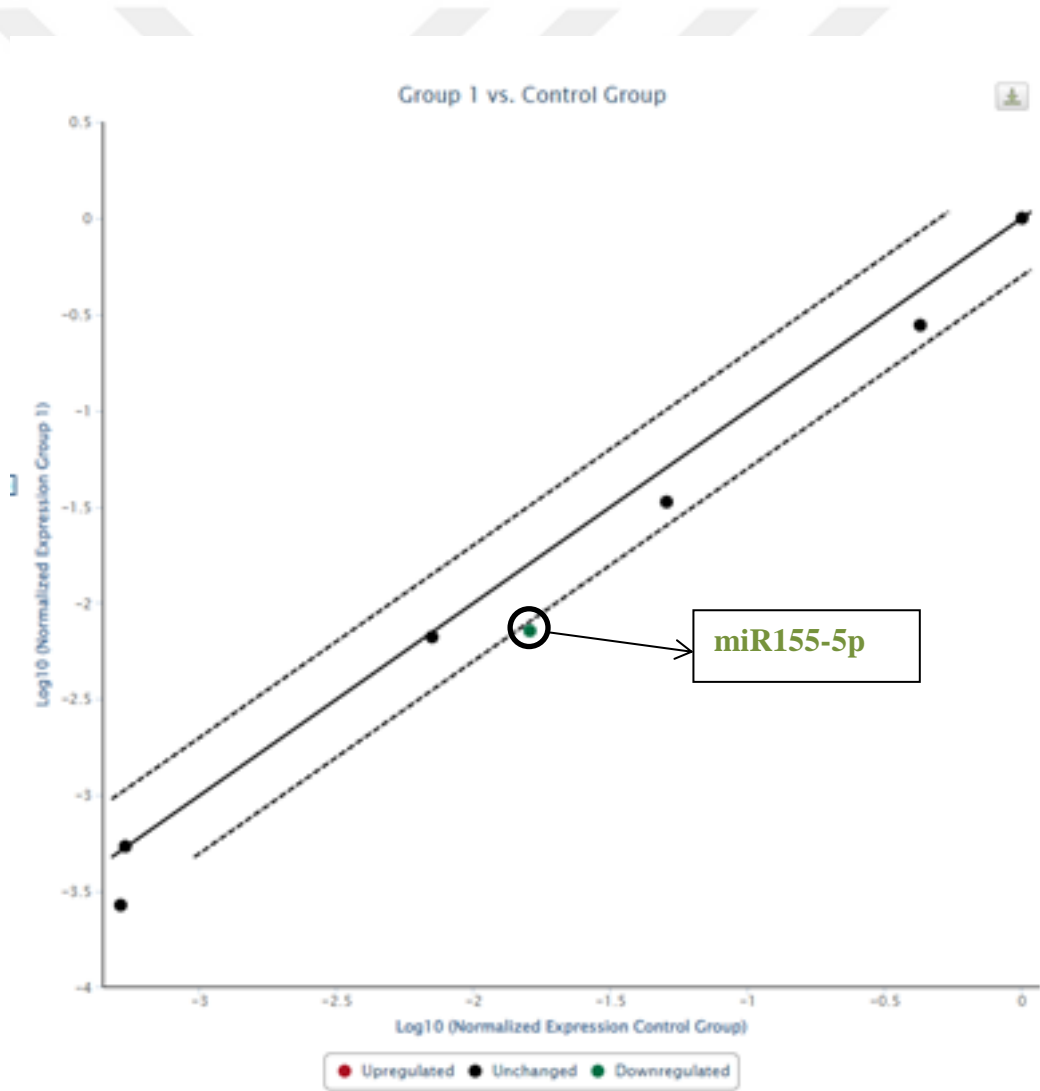
Mide kanseri (n=20) ve kolesistektomi (n=22) olgularında hsa-miR-155-5p' nin down regüle olduğu (fold değeri < -2) izlendi. Ayrıca kontrol grubu (n=20) ile karşılaştırıldığında da hsa-miR-155-5p' nin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde down regüle olduğu izlendi. Hsa-miR-92a-1-5p, hsa-miR-221-3p ve hsa-miR-222-3p' nin ekspresyonunda (fold değişikliği < 2 / > -2, p>0,05) istatistiksel olarak anlamlı farklılık izlenmedi.



Şekil 6. Mide Kanseri, Kolesistektomi ve Kontrol Olguları Ekspresyon Sonuçları

Tablo 6. Mide Kanseri, Kolesistektomi ve Kontrol Olguları Ekspresyon Analizi

Pozisyon	Gen	Fold Up/Down Regülasyon	P değeri
P1	hsa-miR-92a-1-5p	-1.92	0.000078
P2	hsa-miR-133a-3p	1.02	0.877803
P3	hsa-miR155-5p	-2.23	0.000014
P4	hsa-miR-221-3p	-1.51	0.326506
P5	hsa-miR-222-3p	-1.53	0.000061
P6	hsa-miR-335-5p	-1.06	0.779344



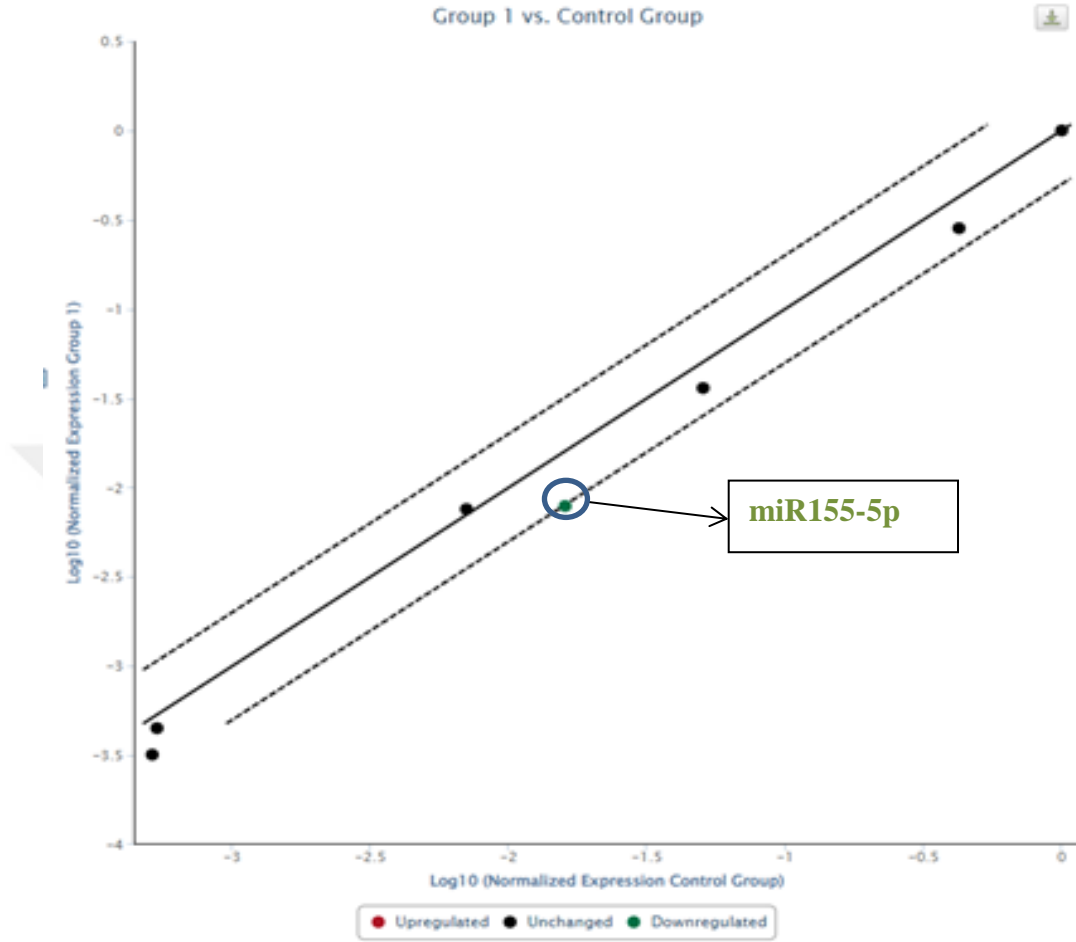
Şekil 7. Mide Kanseri, Kolesistektomi ve Kontrol Olguları Ekspresyonlarının Karşılaştırılması (Mide kanseri ve kolesistektomi olguları, kontrol olgularında her bir miRNA' nın ekspresyon seviyesi log 10 tabanlı dağılık plato şeklinde görülmektedir. Yatay eksen kontrol grubunu, dikey eksen mide kanseri ve kolesistektomi grubunu temsil etmektedir.)

4.2. Mide Kanseri ve Kontrol Olgularının Karşılaştırılması

Mide kanseri (n=20) olgularında kontrol grubu (n=20) ile karşılaştırıldığında hsa-miR-155-5p' nin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde down regüle olduğu izlendi. Hsa-miR-92a-1-5p, hsa-miR-221-3p ve hsa-miR-222-3p' nin ekspresyonunda (fold değışikliği <2 / >-2, p>0,05) istatistiksel olarak anlamlı farklılık izlenmedi.

Tablo 7. Mide Kanseri ve Kontrol Olguları Ekspresyon Analizi

Pozisyon	Gen	Mide Kanseri Olguları	
		Fold Up/Down Regülasyon	P değeri
P1	hsa-miR-92a-1-5p	-1.61	0.014990
P2	hsa-miR-133a-3p	-1.19	0.979073
P3	hsa-miR155-5p	-2.03	0.006119
P4	hsa-miR-221-3p	-1.40	0.844775
P5	hsa-miR-222-3p	-1.50	0.001629
P6	hsa-miR-335-5p	1.08	0.451581



Şekil 8. Mide Kanseri ve Kontrol Olguları Ekspresyonlarının Karşılaştırılması (Mide kanseri olguları, kontrol olgularında her bir miRNA' nın ekspresyon seviyesi log 10 tabanlı dağınık plato şekilde görülmektedir. Yatay eksen kontrol grubunu, dikey eksen mide kanseri grubunu temsil etmektedir.)

4.3. Mide Kanseri Olgularının Metastaz Durumuna Göre Karşılaştırılması

Mide kanseri olgularının (n=20) %30' unda (n=6) metastaz varlığı saptanmıştır. Metastaza sahip hastaların 3' ü kadın 3' ü erkektir. Metastazı olan ve olmayan mide kanseri hastalarının miRNA ekspresyonları arasında anlamlı fark saptanmadı ($p>0,05$).

Tablo 8. Mide Kanseri Metastazı Olan Olguların Ekspresyon Analizi

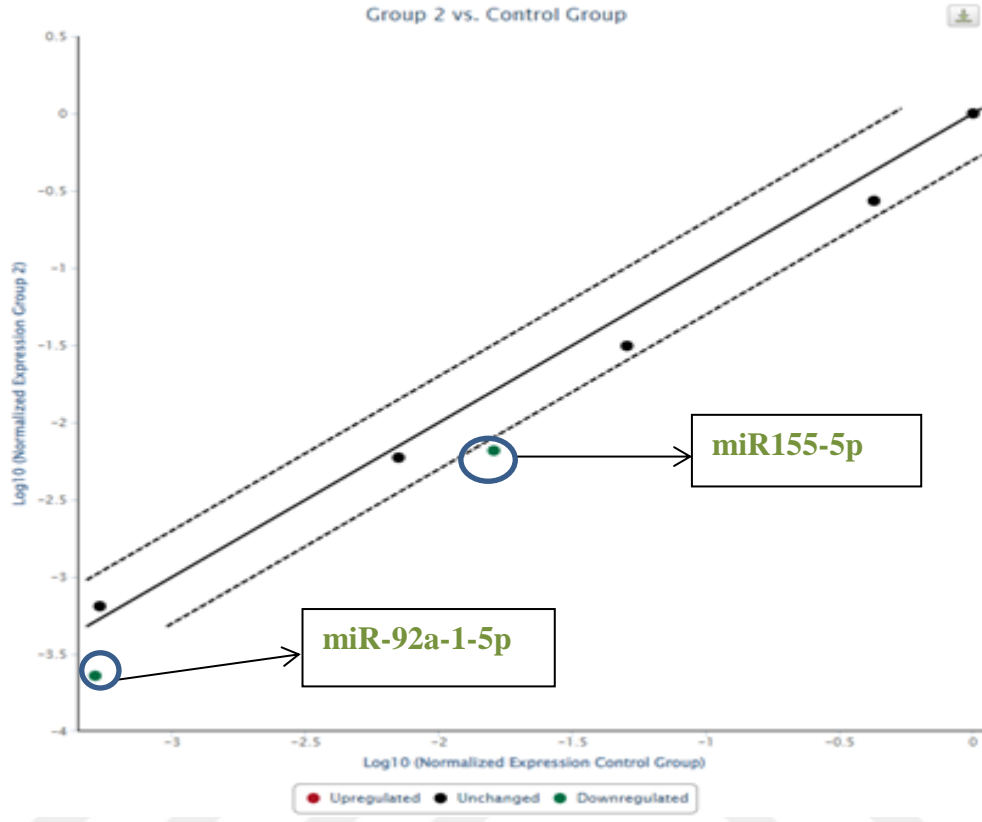
Pozisyon	Gen	Mide Kanseri Metastazı Olan Olgular	
		Fold Up/Down Regülasyon	P değeri
P1	hsa-miR-92a-1-5p	1.11	0.370823
P2	hsa-miR-133a-3p	1.22	0.140065
P3	hsa-miR155-5p	-1.00	0.451832
P4	hsa-miR-221-3p	-1.15	0.258137
P5	hsa-miR-222-3p	1.01	0.494428
P6	hsa-miR-335-5p	-1.11	0.279103

4.4. Kolesistektomi ve Kontrol Olgularının Karşılaştırılması

Kolesistektomi (n=22) olgularında kontrol grubu (n=20) ile karşılaştırıldığında hsa-miR-155-5p ve hsa-miR-92a-1-5p' nin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde down regüle olduğu izlendi. Hsa-miR-221-3p ve hsa-miR-222-3p' nin ekspresyonunda (fold değişikliği $<2 / >-2$, $p>0,05$) istatistiksel olarak anlamlı farklılık izlenmedi.

Tablo 9. Kolesistektomi ve Kontrol Olguları Ekspresyon Analizi

Pozisyon	Gen	Kolesistektomili Olgular	
		Fold Up/Down Regülasyon	P değeri
P1	hsa-miR-92a-1-5p	-2.24	0.000217
P2	hsa-miR-133a-3p	1.21	0.784221
P3	hsa-miR155-5p	-2.44	0.000008
P4	hsa-miR-221-3p	-1.61	0.003400
P5	hsa-miR-222-3p	-1.56	0.001111
P6	hsa-miR-335-5p	-1.19	0.242622



Şekil 9. Kolesistektomi ve Kontrol Olguları Ekspresyonlarının Karşılaştırılması (Kolesistektomi olguları, kontrol olgularında her bir miRNA'nın ekspresyon seviyesi log 10 tabanlı dağınık plato şeklinde görülmektedir. Yatay eksen kontrol grubunu, dikey eksen kolesistektomi grubunu temsil etmektedir.)

4.5. Tüm Olguların H. Pylori Pozitifliği Durumuna Göre Karşılaştırılması

Tüm hastaların (n=62) %22' sinde (n=14) h. pylori pozitif olarak saptanmıştır. Üç grup arasında h. pylori pozitifliği açısından anlamlı fark (p=0,061) saptanmamıştır.

Tablo 10. H. Pylori Pozitifliği Oranları

	Mide Kanseri n (%)	Kolesistektomi n (%)	Kontrol n (%)	Total
H. Pylori Pozitif	2 (%10)	5 (%22)	7 (%35)	14 (%22)
H. Pylori Negatif	18 (%90)	17 (%78)	13 (%65)	48 (%78)
Total	20	22	20	62

H. pylori pozitif ve negatif hastaların miRNA ekspresyonları arasında anlamlı fark saptanmadı ($p>0,05$).

Tablo 11. H. Pylori Pozitif Olguların Ekspresyon Analizi

Pozisyon	Gen	H. Pylori Pozitif Olgular	
		Fold Up/Down Regülasyon	P değeri
P1	hsa-miR-92a-1-5p	-1.10	0.230886
P2	hsa-miR-133a-3p	1.25	0.342459
P3	hsa-miR155-5p	1.14	0.287236
P4	hsa-miR-221-3p	-1.03	0.395195
P5	hsa-miR-222-3p	1.10	0.109063
P6	hsa-miR-335-5p	-1.11	0.156094

V. TARTIŞMA

Çalışmamızdaki mide kanseri olgularında tümör %55' inde (n=11) corpus, %30' unda (n=6) antrum , %15 ' inde (n=3) kardia bölgesinde olacak şekilde Şahintürk Y ve arkadaşlarının yaptığı çalışmadakine benzer saptanmıştır [48]. Fakat son yıllarda distal bölge kanserlerinde azalma, proksimal bölge kanserlerinde artış görülmesine rağmen çalışmamızda distal kanser oranı halen yüksektir. Ayrıca olguların patolojileri yine literatürle uyumlu şekilde; %75' i (n=15) tübüler adenokarsinom, %25' i (n=5) taşlı yüzük hücreli ve az koheziv karsinom olarak sonuçlanmıştır.

Mide kanseri genellikle kronik inflamasyon, atrofik gastrit ve intestinal metaplazi yoluyla gelişmektedir [5]. Kolesistektomi sonrası mide mukozasının safra sıvısına daha sık ve uzun süreli maruz kalması sonucu da mide mukozasında daha şiddetli intestinal metaplazi geliştiği tespit edilmiştir. Bu da mide kanseri gelişimini kolaylaştırmaktadır [2, 3, 49, 50]. Fracchia M ve arkadaşlarının 1999 yılında yayımladığı çalışmada sekonder safra asitleri kanserojen kabul edilmesine karşılık mide kanseri hastalarında kontrol grubuna göre safra asidi bileşenleri açısından anlamlı fark bulunmamıştı [51]. Safra reflüsünün mide kanserine zemin hazırlayabileceğine dair sonrasında yıllar içinde yeni çalışmalar yapıldı ve farklı sonuçlar elde edildi. 2008 yılında Min Jung Park ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada deoksikolik asidin CDX1 aracılığıyla COX2 ekspresyonunu artırarak mide kanseri gelişim sürecine katkıda bulunduğu tespit edilmiş. Yine aynı çalışmada kenodeoksikolik asidin ekspresyonda herhangi bir değişikliğe yol açmadığı saptanmış [52]. Aydın MF ve arkadaşlarının 2020' de 134' ü safra reflüsü bulunan toplam 217 gastrit tanılı hasta üzerinde yaptığı çalışmada safra reflüsü bulunan ve bulunmayan gastrit hastaları arasında H. Pylori pozitifliği, intestinal metaplazi ve gastrik atrofi oranlarının benzer olduğu saptanmıştır. Fakat patolojik olarak doğrulan safra reflüsüne bağlı gastriti bulunan hastalarda H. Pylori, metaplazi ve atrofi sıklığının daha az olduğu saptanmıştır [53]. Çalışmamızda Aydın MF ve arkadaşlarının çalışmasına benzer şekilde mide kanseri,

kolesistektomi ve kontrol olgularında h. Pylori pozitifliği açısından anlamlı fark saptanmamıştır. Li D ve arkadaşlarının 2020' de 27. 807' si kronik gastrit, 1.943' ü prekanseröz lezyon, 715' i mide kanseri olan toplam 30.465 hasta üzerinde yaptığı çalışmada mide kanseri olan hastalarda safra reflüsü mevcudiyet oranı daha yüksek ve safra reflüsü daha ileri derecede saptandı [54]. 2020 yılında Ni Z ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada TGR5/HNF4α yolağı, 2021 yılında Wang N ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise HDAC6/HNF4α yolağı aracılığıyla safra asitlerinden deoksikolik asidin intestinal metaplaziye artırdığı saptanmış. 2022 yılında ise Duochen Jin ve arkadaşlarının yayımladığı çalışmada deoksikolik asidin TGR5/STAT3/KLF5 yolağını aktive ettiği ve bu yolağın intestinal metaplaziye gidişi kolaylaştırdığı saptanmıştır [55, 56, 57].

Bu bağlamda kolesistektominin metaplaziye zemin hazırlayarak mide kanseri gelişimine sebep olmasının araştırılmasında kullanılabilecek biyobelirteçlerden biri de miRNA (mikroRNA)' lardır. Son yapılan çalışmalarda midedeki intestinal metaplazinin ve mide kanserinin patogenezinde rol oynayan birkaç düzensiz miRNA tespit edilmiştir [11, 12]. Bu bilgiden yola çıkarak çalışmamızda kolesistektomi geçirmiş vakalarda ve mide kanser olgularında miR-92a-1-5p, miR-221, miR-222, miR-155-5p' nin ekspresyon değişimlerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Çalışmamıza katılan 62 olgudan %61'i (n=38) kadın, %39'u (n=24) erkekti. Olguların 20'si mide kanseri, 22'si kolesistektomili, 20'si ise kontrol grubuydu.

5.1. MiRNA-92a-1-5p Ekspresyon Düzey Değişimi

MiR-92a-1-5p, kromozom 13q31.3' te (chr13) lokalizedir [44]. Safra asitlerine maruziyet sonucu yukarı regüle olan miR-92a-1-5p CDX2' yi artırarak karsinogenez yolağına katkıda bulunur [10, 42, 43].

2018'de Vivian Yvonne Shin ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada EP4/Notch 1 sinyal yolağı aracılığıyla mide kanseri olgularında miR-92' nin

aşağı regüle, NF-κB yolağı aracılığıyla ise miR-92' nin yukarı regüle olduğu saptanmıştır [58]. Ting Li ve arkadaşlarının 2019'da yayımladığı çalışmada safra asidi maruziyetiyle miR-92a-1-5p'nin yukarı regülasyonu, CDX2' nin yukarı regülasyonu ve gastrik hücrelerde FOXD1' in baskılandığı görülmüş. Ayrıca intestinal metaplazili dokularda da bu duruma rastlanmıştır [10]. Çalışmamızda, Ting Li ve arkadaşlarının yaptığı çalışmanın aksine miR-92a' nın kolesistektomili olgularda kontrol grubuna göre aşağı regüle olduğu saptandı. 2021 yılında Hanxu Guo ve arkadaşlarının yaptığı meta-analiz çalışmasında mide kanseri olgularında miR-92a' nın yukarı regüle olduğu, sağkalımın daha kısa olduğu saptanmıştır [43]. Wang M ve arkadaşlarının 2023 Şubat' ta yayımladığı çalışmada miRNA-92a-1-5p' nin hem mide kanseri hem intestinal metaplazili dokularda hem de safra asiti maruziyeti sonrası yukarı regüle olduğu saptanmıştır [59]. Çalışmamızda mide kanseri olgularında miR-92a-1-5p' nin anlamlı ekspresyon değişimi olmadığı görüldü. Bu durum, Vivian Yvonne Shin ve arkadaşlarının yaptığı çalışmadaki gibi farklı yolların farklı gen ekspresyon değişimlerine sebep olmasından kaynaklanıyor olabilir. Ek olarak çalışmamızda h. pylori pozitifliğinin ve mide kanseri olgularında metastaz varlığının miR-92a-1-5p' nin ekspresyonlarında anlamlı fark oluşturmadığı saptanmıştır.

Sonuç olarak yapılan çalışmalar gösteriyor ki; miR-92a-1-5p' nin kolesistektominin mide kanserine zemin hazırlayabileceğine ve miRNA' ların mide kanserinde belirteç olarak kullanılabilmesine dair daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

5.2. MiRNA-221 ve MiRNA-222 Ekspresyon Düzey Değişimi

MiR-221 ve miR-222 kromozom Xp11.3' te (chrX) lokalizedir [44]. Safra asitlerine maruziyet sonucu yukarı regüle olan miR-221 ve miR-222 CDX2' yi azaltarak karsinogenez yolağına katkıda bulunur [10, 42, 43].

2010 yılında Zhang Chun-zhi ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada miR-221 ve miR-222' nin PTEN geni üzerinde etkin rol oynadığı ve PTEN ekspresyonunu baskılayarak mide kanseri gelişimini kolaylaştırdığı, aynı

zamanda radyoterapiye direnci artırdığı görülmüş [60]. K Liu ve arkadaşlarının 2012' de yayımladığı çalışmaya göre miR-221' nin yüksek ekspresyon değerleri mide kanseri prognozunda lokal invazyon, lenf nodu ve uzak metastaz açısından kötü prognoz göstergesi olarak bulunmuş [61]. Çalışmamızda mide kanseri hastalarında metastaz varlığına göre miRNA ekspresyonlarında anlamlı fark saptanmamıştır. Yine 2012' de N. Li ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada h.pylori ile enfekte mide dokusunda miR-222' nin yukarı regüle olduğu, ayrıca RECK genini baskıladığı ve mide kanseri olgularında yüksek seviyelerde eksprese edildiği görülmüştür [62]. Ek olarak çalışmamızda h. pylori pozitifliğinin ve mide kanseri olgularında metastaz varlığının miR-221 ve miR-222' nin ekspresyonlarında anlamlı fark oluşturmadığı saptanmıştır.

Yapılan çalışmalar gösteriyor ki; miR-221 ve miR-222' nin kolesistektominin mide kanseri ne zemin hazırlayabileceğine ve miRNA' ları mide kanserinde belirteç olarak kullanılabilmesine dair daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır [63].

Çalışmamızda yapılan değerlendirmelerde miR-221 ve miR-222 açısından anlamlı bir sonuç saptanmamasının nedeni doku yerine periferik kan örneklerinin kullanılmasına, çalışmaya katılan kişi sayısının azlığına bağlanmıştır. Olgu sayısının artırıldığı daha geniş çaplı çalışmalarla daha anlamlı verilere ulaşabileceğimiz düşünmekteyiz.

5.3. MiRNA-155-5p Ekspresyon Düzey Değişimi

MiR-155-5p kromozom 21q21.3' te (chr21) lokalizedir ve CDX2' yi artırmanın yanı sıra mide kanser patogenezinin NF- κ B aktivasyonu ile de katkıda bulunur [42]. Safra asitlerine maruziyet sonucu up regüle olan miR-155 CDX2' yi artırarak karsinogenez yolağına katkıda bulunur [10, 42, 43].

2014 yılında Li H ve arkadaşlarının, 2018' de Shiqing Li ve arkadaşlarının 14 mide kanseri olgusu üzerinde yaptığı çalışmada miR-155-5p' nin aşağı regüle olduğu gösterilmiştir [64, 65]. 2018' de Qu Y ve arkadaşlarının yaptığı

çalışmada mide kanseri olgularında TGFβR2' nin aşağı regüle olduğu, buna karşılık miR-155' in yukarı regüle olduğu saptanmış. MiR-155' in hücre proliferasyonu, migrasyonu ve invazyonunu artırdığı tespit edilmiş [66]. 2019'da Zare A ve arkadaşlarının 29 normal mide dokusu, 45 mide displazisi ve 39 mide kanseri dokusu üzerinde yaptığı araştırmada miR-155-5p' nin mide kanseri dokularında belirgin şekilde aşağı regüle olduğu saptanmış. Çalışmamızda Li H ve arkadaşlarının, Shiqing Li ve arkadaşlarının, Zare A ve arkadaşlarının çalışmalarına benzer şekilde miR-155-5p' nin mide kanseri ve kolesistektomi olgularında aşağı regüle olduğu saptanmıştır. Ayrıca Zare A ve arkadaşlarının çalışmasında mide kanseri evresi ilerledikçe ekspresyon düzeyinin daha da azaldığı tespit edilmiş. H.pylori pozitif olgularda da miR-155-5p' nin aşağı regüle olduğu bulunmuş [67]. 2020' de Yin L ve arkadaşlarının, 2022' de Nana Su ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalarda mide kanseri dokularında miR-155' in ekspresyon düzeyinin arttığı tespit edilmiş [68, 69]. Chakraborty ve arkadaşlarının 2023 Haziran' da yayımladığı çalışmada miR-155' in yukarı regüle olmasının nüks, metastaz ve kanser tedavisine dirençte rol oynadığı saptanmıştır [70]. Çalışmamızda h.pylori pozitifliğinin ve mide kanseri hastalarında metastaz varlığının miRNA ekspresyonlarında anlamlı fark oluşturmadığı saptanmıştır.

Yapılan çalışmalar gösteriyor ki altta yatan mekanizmaları anlayıp tanı ve tedavide ilerleyebilmek için bu konuda daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

VI. SONUÇ VE ÖNERİLER

Son yıllarda yapılan çalışmalarda biyobelirteç olarak kullanılabileceği düşünülen miRNA ekspresyon değişimlerini, kolesistektominin mide kanserine zemin hazırlayabileceğini araştırmak amacıyla çalıştık.

Mide kanseri olgularının yaş ortalaması kolesistektomi ve kontrol olgularına göre anlamlı derecede ileri saptandı. Bu da endoskopik taramaların daha ileri yaşlarda yapılarak tanı konduğunu düşündürmektedir.

MiR-92a-1-5p ekspresyon düzeylerinde mide kanseri ve kontrol grubu arasında anlamlı fark saptanmadı fakat kolesistektomili hastalarda kontrol grubuna göre ekspresyonun azaldığı görüldü.

MiR-133a-3p ekspresyon düzeylerinde mide kanseri, kolesistektomi ve kontrol grubu arasında anlamlı fark saptanmadı.

MiR155-5p ekspresyon düzeylerinin mide kanseri ve kolesistektomililerde kontrol grubuna göre anlamlı derecede azaldığı görüldü. Bu da kolesistektominin mide kanserine zemin hazırlıyor olabileceğini düşündürmektedir. Yapılan yurt dışı çalışmalarda miR-155-5p' nin yukarı regüle olması, hasta grubunun etnik kökenine bağlı olarak veya farklı sinyal yolları olması nedeniyle farklı sonuçlar ortaya çıkarabileceğini düşündürmektedir.

MiR-221-3p ekspresyon düzeylerinde mide kanseri, kolesistektomi ve kontrol grubu arasında anlamlı fark saptanmadı.

MiR-222-3p ekspresyon düzeylerinde mide kanseri, kolesistektomi ve kontrol grubu arasında anlamlı fark saptanmadı.

MiR-335-5p ekspresyon düzeylerinde mide kanseri, kolesistektomi ve kontrol grubu arasında anlamlı fark saptanmadı.

Çalışmamızda H.pylori pozitifliğinin ve mide kanseri hastalarında metastaz varlığının miRNA ekspresyonlarında kontrol gruplarına göre anlamlı fark oluşturmadığı saptanmıştır.

Yapmış olduğumuz çalışmada kullanılan veriler ülkemizde ilk kez kullanıldığı için alanında öncü bir çalışmadır. Geniş sayılı ve birkaç merkezin ortak çalışması ile daha anlamlı verilere ulaşabileceğimizi düşünmekteyiz.



VII. ÖZET

Safra Kesesi Operasyonu Geçirmiş İnsanlarda Mide Mukozasındaki MikroRNA (MiRNA) Seviye Değişimi

Giriş ve Amaç: Mide kanseri gelişiminde miRNA' ları içeren yolları ve safra asitleriyle bağlantısını anlamak mide kanseri patogenezi için daha fazla bilgi sahibi olmamızı sağlayacaktır. Bu ve benzeri çalışmalarla mide kanseri gelişim riski yüksek bir hastayı tanımlamak için yeni bir marker keşfedilebilir. Bu sebeple projemizde kolesistektomili hastalarda ve mide kanser olgularında miRNA ekspresyon değişimlerinin mide kanseri patogenezi ile ilişkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: 20 Mide kanseri hastası, 22 kolesistektomili hasta ve 20 kontrol hastası olmak üzere toplamda 62 kişi çalışmaya dâhil edildi. Olguların periferik kan örnekleri EDTA' lı tüpe alındı. Alınan kan örneklerindeki miRNA' lar *miR-92a-1-5p*, *miR-221*, *miR-222* ve *miR-155-5p* ekspresyon değişimleri Biomark 96.96 Dynamic Array kullanılarak saptandı. Data analiz BioMark Gene Expression Data Analysis software kullanılarak yapıldı. Hastaların demografik verileri SPSS 21.0 programı yardımıyla ki-kare, T test ve tek yönlü varyans analizi (ANOVA) istatistik yöntemleriyle hesaplandı.

Bulgular: Mide kanseri olgularında *miR-155-5p*' nin ($p=0,006119$) kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde down regüle olduğu izlendi. *miR-92a-1-5p*, *miR-221* ve *miR-222*' de ise kontrol grubuna göre anlamlı fark saptanmadı ($p \geq 0,05$).

Kolesistektomi olgularında *miR-155-5p* ($p=0,000008$) ve *miR-92a-1-5p*' nin ($p=0,000217$) kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde down regüle olduğu izlendi. *miR-221*, *miR-222*' de ise kontrol grubuna göre anlamlı fark saptanmadı ($p \geq 0,05$).

Sonuç: *miR-155-5p*' nin hem mide kanseri hem kolesistektomi olgularında kontrol grubuna göre anlamlı şekilde down regüle olması kolesistektominin mide kanserine zemin hazırlıyor olabileceğini düşündürmektedir. 62 hasta ile yapılan bu çalışma, bu noktada yeterli olmayıp altta yatan mekanizmaların anlaşılması, tanı ve tedavide ilerleme sağlanması için daha fazla hasta ile yapılan çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: Mide kanseri, safra asitleri, miRNA, kolesistektomi

VIII. ABSTRACT

The Level Change Of MicroRNA (MiRNA) In Gastric Mucosa In People Having Undergone Gallbladder Surgery

Introduction and Aims: Understanding the pathways containing miRNAs and their connection with bile acids in gastric the progression of cancer will provide us with more information about gastric cancer pathogenesis. In this study and similar studies, a new marker can be discovered to identify a patient at high risk of having gastric cancer. Therefore, this project aimed to investigate the relationship between the expression on changes of miRNA in gastric cancer pathogenesis in patients with cholecystectomy and gastric cancer.

Materials and Methods: In this study, 62 people, including at least 20 gastric cancer patients at least 22 cholecystectomy patients and 20 control cases, were included. Peripheral blood samples of the all cases were taken into EDTA tube. MiRNA's in the blood samples, including *miRNA-92a-1-5p*, *miRNA-221*, *miRNA-222* and *miRNA-155-5p* were analysed using Biomak 96.96 Dynamic Array . Data analysis was made using BioMark Gene Expression Data Analysis Software. Demographic data of the patients were calculated by the SPSS 21.0 program, using chi-square, T test an done-way analysis of variance (ANOVA) statistical methods.

Results: It was observed that *miR-155-5p* ($p=0,006119$) was significantly down-regulated in gastric cancer cases when compared with the control group statistically. There was no significant difference in *miR-92a-1-5p*, *miR-221* and *miR-222* compared to the control group ($p\geq 0,05$).

It was observed that *miR155-5p* ($p=0,000008$) and *miR-92a-1-5p* ($p=0,000217$) were significantly down-regulated in cholecystectomy cases when compared with the control group statistically. There was no significant difference in *miR-221* and *miR-222* compared to the control group ($p\geq 0,05$).

Conclusions: The significant down regulation of *miR-155-5p* in both gastric cancer and cholecystectomy cases compared to the control group suggests that cholecystectomy may predispose to gastric cancer. This study with 62 cases are not sufficient at this point and studies with more cases are needed in order to understand the underlying mechanisms and advance in diagnosis and treatment.

Key Words: Gastric cancer, bile acids, miRNA, cholecystectomy

IX. KAYNAKLAR

1. Kapoor T, Wrenn SM, Callas PW, Abu-Jaish W. Cost Analysis and Supply Utilization of Laparoscopic Cholecystectomy. *Minim Invasive Surg.* 2018 Dec 10;2018:7838103. doi: 10.1155/2018/7838103
2. Kellosalo J, Alavaikko M, Laitinen S. Effect of biliary tract procedures on duodenogastric reflux and the gastric mucosa. *Scand J Gastroenterol.* 1991 Dec;26(12):1272-8. doi: 10.3109/00365529108998624
3. Aydın S, Akın Mİ, Karakaya M, Et Al. Alkalen Reflü Gastrit Ve Tanı Problemleri. *Çağdaş Cerrahi Dergisi* 1997;11:36-9
4. Tatsugami M, Ito M, Tanaka S, Yoshihara M, Matsui H, Haruma K, Chayama K. Bile acid promotes intestinal metaplasia and gastric carcinogenesis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2012 Nov;21(11):2101-7. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-12-0730. Epub 2012 Sep 25.
5. Sue S, Shibata W, Maeda S. Helicobacter pylori-Induced Signaling Pathways Contribute to Intestinal Metaplasia and Gastric Carcinogenesis. *Biomed Res Int.* 2015;2015:737621. doi: 10.1155/2015/737621. Epub 2015 May 10
6. Fall K, Ye W, Nyrén O. Risk for gastric cancer after cholecystectomy. *Am J Gastroenterol.* 2007 Jun;102(6):1180-4. doi: 10.1111/j.1572-0241.2007.01169.x. Epub 2007 Mar 13
7. Kang SH, Kim YH, Roh YH, Kim KW, Choi CJ, Kim MC, Kim SJ, Kwon HJ, Cho JH, Jang JS, Lee JH. Gallstone, cholecystectomy and risk of gastric cancer. *Ann Hepatobiliary Pancreat Surg.* 2017 Aug;21(3):131-137. doi: 10.14701/ahbps.2017.21.3.131. Epub 2017 Aug 31
8. Yuan T, Ni Z, Han C, Min Y, Sun N, Liu C, Shi M, Lu W, Wang N, Du F, Wu Q, Xie N, Shi Y. SOX2 interferes with the function of CDX2 in bile acid-induced gastric intestinal metaplasia. *Cancer Cell Int.* 2019 Jan 31;19:24. doi: 10.1186/s12935-019-0739-8
9. Wang N, Wu S, Zhao J. Et al. Bile acids increase intestinal marker expression via the FXR/SNAI2/miR-1 axis in the stomach. *Cell Oncol.* 44, 1119-1131 (2021).<https://doi.org/10.1007/s13402-021-00622-z>
10. Li T, Guo H, Li H, Jiang Y, Zhuang K, Lei C, Wu J, Zhou H, Zhu R, Zhao X, Lu Y, Shi C, Nie Y, Wu K, Yuan Z, Fan DM, Shi Y. MicroRNA-92a-1-5p increases CDX2 by targeting FOXD1 in bile acids-induced gastric intestinal metaplasia. *Gut.* 2019 Oct;68(10):1751-1763

11. Fassan M, Volinia S, Palatini J, Pizzi M, Fernandez-Cymering C, Balistreri M, Realdon S, Battaglia G, Souza R, Odze RD, Zaninotto G, Croce CM, Rugge Md Facg M. MicroRNA Expression Profiling in the Histological Subtypes of Barrett's Metaplasia. *Clin Transl Gastroenterol*. 2013 May 16;4(5):e34. doi: 10.1038/ctg.2013.5
12. Matsuzaki J, Suzuki H, Tsugawa H, Watanabe M, Hossain S, Arai E, Saito Y, Sekine S, Akaike T, Kanai Y, Mukaisho K, Auwerx J, Hibi T. Bile acids increase levels of microRNAs 221 and 222, leading to degradation of CDX2 during esophageal carcinogenesis. *Gastroenterology*. 2013 Dec;145(6):1300-11. doi: 10.1053/j.gastro.2013.08.008. Epub 2013 Aug 8
13. Sobotta İnsan Anatomisi Atlası (Ed: Alaittin Elhan ve S.Tuna Karahani, Çev.)Elsevier GmbH, Urban & Fischer, Beta Yayıncılık, İstanbul, 2011 7.Türkçe baskı, İç Organlar, sayfa 117
14. Harrison's Principles Of Internal Medicine (Ed: Jameson J.Jarry, S. Fauci Anthony, L. Kasper Dennis, L.Hauser Stephen, L.Longo Dan, Loscalzo Joseph) Mc Graw Hill Education, U.S, 2018, 20th Edition Volume 2, pg. 2422,2423
15. Hundt M, Basit H, John S. Physiology, Bile Secretion. [Updated 2022 Sep 26]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan
16. Britannica, The Editors of Encyclopaedia. "gallbladder". *Encyclopedia Britannica*, 28 Apr. 2023, <https://www.britannica.com/science/gallbladder>. Accessed 16 June 2023.
17. Harrison's Principles Of Internal Medicine (Ed: Jameson J.Jarry, S. Fauci Anthony, L. Kasper Dennis, L.Hauser Stephen, L.Longo Dan, Loscalzo Joseph) Mc Graw Hill Education, U.S, 2018, 20th Edition Volume 2, pg. 2245
18. He, Q., Liu, L., Wei, J. *et al*. Roles and action mechanisms of bile acid-induced gastric intestinal metaplasia: a review. *Cell Death Discov*. **8**, 158 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41420-022-00962-1>
19. Yusefi AR, Bagheri Lankarani K, Bastani P, Radinmanesh M, Kavosi Z. Risk Factors for Gastric Cancer: A Systematic Review. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2018 Mar 27;19(3):591-603. doi: 10.22034/APJCP.2018.19.3.591
20. World Health Organization, International Agency for Research on Cancer, GLOBOCAN 2020: stomach cancer fact sheet, 2020, Accessed July 9, 2021
21. Sitarz R, Skierucha M, Mielko J, Offerhaus GJA, Maciejewski R, Polkowski WP. Gastric cancer: epidemiology, prevention, classification, and treatment. *Cancer Manag Res*. 2018 Feb 7;10:239-248. doi: 10.2147/CMAR.S149619

22. Mukkamalla SKR, Recio-Boiles A, Babiker HM. Gastric Cancer. [Updated 2023 Jan 15]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-
23. Kim J, Cho YA, Choi WJ, Jeong SH. Gene-diet interactions in gastric cancer risk: a systematic review. *World J Gastroenterol*. 2014 Jul 28;20(28):9600-10. doi: 10.3748/wjg.v20.i28.9600
24. Takeno S, Hashimoto T, Maki K, Shibata R, Shiwaku H, Yamana I, Yamashita R, Yamashita Y. Gastric cancer arising from the remnant stomach after distal gastrectomy: a review. *World J Gastroenterol*. 2014 Oct 14;20(38):13734-40. doi: 10.3748/wjg.v20.i38.13734
25. Yang L, Ying X, Liu S, Lyu G, Xu Z, Zhang X, Li H, Li Q, Wang N, Ji J. Gastric cancer: Epidemiology, risk factors and prevention strategies. *Chin J Cancer Res*. 2020 Dec 31;32(6):695-704. doi: 10.21147/j.issn.1000-9604.2020.06.03
26. Sobotta İnsan Anatomisi Atlası (Ed: Alaittin Elhan ve S.Tuna Karahani, Çev.)Elsevier GmbH, Urban & Fischer, Beta Yayıncılık, İstanbul, 2011 7.Tükçe baskı, İç Organlar, sayfa 75 şekil 6.5
27. Kats-Uğurlu G., Doğanavşargil Yakut B., Mide Kanseri Patolojisi ve Yeni Sınıflamalar, Türkiye Kanseri Savaş Vakfı, Kanseri Gündemi Dergisi, Ocak 2022, Volume 10/1 Sayfa 16
28. Hu B, El Hajj N, Sittler S, Lammert N, Barnes R, Meloni-Ehrig A. Gastric cancer: Classification, histology and application of molecular pathology. *J Gastrointest Oncol*. 2012 Sep;3(3):251-61. doi: 10.3978/j.issn.2078-6891.2012.021
29. Fléjou JF. Classification OMS 2010 des tumeurs digestives: la quatrième édition [WHO Classification of digestive tumors: the fourth edition]. *Ann Pathol*. 2011 Nov;31(5 Suppl):S27-31. French. doi: 10.1016/j.annpat.2011.08.001. Epub 2011 Sep 3
30. Graziano F, Humar B, Guilford P. The role of the E-cadherin gene (CDH1) in diffuse gastric cancer susceptibility: from the laboratory to clinical practice. *Ann Oncol*. 2003 Dec;14(12):1705-13. doi: 10.1093/annonc/mdg486
31. GÖRAL V. , Mide Kanseri Etyopatogenezi, Türkiye Gastroenteroloji Vakfı Güncel Gastroenteroloji Dergisi, Mart 2015, Cilt 19 Sayı 1 sayfa 48-56
32. Harrison's Principles Of Internal Medicine (Ed: Jameson J.Jarry, S. Fauci Anthony, L. Kasper Dennis, L.Hauser Stephen, L.Longo Dan, Loscalzo Joseph) Mc Graw Hill Education, U.S, 2018, 20th Edition Volume 2, pg. 3415
33. miRBase, Release 22.1

34. Allegra A, Alonci A, Campo S, Penna G, Petrunaro A, Gerace D, Musolino C. Circulating microRNAs: new biomarkers in diagnosis, prognosis and treatment of cancer (review). *Int J Oncol*. 2012 Dec;41(6):1897-912. doi: 10.3892/ijo.2012.1647. Epub 2012 Oct
35. Sohel MMH. Circulating microRNAs as biomarkers in cancer diagnosis. *Life Sci*. 2020 May 1;248:117473. doi: 10.1016/j.lfs.2020.117473. Epub 2020 Feb 27
36. Bartel DP, Chen CZ. Micromanagers of gene expression: the potentially widespread influence of metazoan microRNAs. *Nat Rev Genet*. 2004 May;5(5):396-400. doi: 10.1038/nrg1328
37. Matsuyama H, Suzuki HI. Systems and Synthetic microRNA Biology: From Biogenesis to Disease Pathogenesis. *Int J Mol Sci*. 2019 Dec 24;21(1):132. doi: 10.3390/ijms21010132
38. Harrison's Principles Of Internal Medicine (Ed: Jameson J.Jarry, S. Fauci Anthony, L. Kasper Dennis, L.Hauser Stephen, L.Longo Dan, Loscalzo Joseph) Mc Graw Hill Education, U.S, 2018, 20th Edition Volume 1, pg. 469
39. Garzon R, Fabbri M, Cimmino A, Calin GA, Croce CM. MicroRNA expression and function in cancer. *Trends Mol Med*. 2006 Dec;12(12):580-7. doi: 10.1016/j.molmed.2006.10.006. Epub 2006 Oct 30
40. Calin GA, Croce CM. MicroRNA-cancer connection: the beginning of a new tale. *Cancer Res*. 2006 Aug 1;66(15):7390-4. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-0800
41. Macfarlane LA, Murphy PR. MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer. *Curr Genomics*. 2010 Nov;11(7):537-61. doi: 10.2174/138920210793175895
42. Sasaki CT, Vageli DP. miR-21, miR-155, miR-192, and miR-375 Deregulations Related to NF-kappaB Activation in Gastroduodenal Fluid-Induced Early Preneoplastic Lesions of Laryngeal Mucosa In Vivo. *Neoplasia*. 2016 Jun;18(6):329-38. doi: 10.1016/j.neo.2016.04.007. Epub 2016 May 25
43. Guo H, Wang Y, Wang Z, Wang Z, Xue S. The diagnostic and prognostic value of miR-92a in gastric cancer: A systematic review and meta-analysis. *Open Med (Wars)*. 2021 Sep 16;16(1):1386-1394. doi: 10.1515/med-2021-0347
44. National Library of Medicine, National Center for Biotechnology Information, Genome Data Viewer, Sequence Viewer Version 3.47, 2023 Feb(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/gdv/browser/gene/?cfg=NCID_1_69056777_130.14.22.10_9146_1679516359_2293605848), <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/407048>)

45. Harrison's Principles Of Internal Medicine (Ed: Jameson J.Jarry, S. Fauci Anthony, L. Kasper Dennis, L.Hauser Stephen, L.Longo Dan, Loscalzo Joseph) Mc Graw Hill Education, U.S, 2018, 20th Edition Volume 2, pg. 2427
46. Di Ciaula A, Wang DQ, Molina-Molina E, Lunardi Baccetto R, Calamita G, Palmieri VO, Portincasa P. Bile Acids and Cancer: Direct and Environmental-Dependent Effects. *Ann Hepatol.* 2017 Nov;16(Suppl. 1: s3-105.):s87-s105. doi: 10.5604/01.3001.0010.5501
47. Kundu, S., Kumar, S. and Bajaj, A. (2015), Cross-talk between bile acids and gastrointestinal tract for progression and development of cancer and its therapeutic implications. *IUBMB Life*, 67: 514-523. <https://doi.org/10.1002/iub.1399>
48. Şahintürk Y, Taskoparan M, Uyar S, Köker G, Taş Z, Özçelik G, Harmandar F, Cekin A. (2017). Mide kanserinde güncel durum: Lokalizasyon, patoloji ve yaş. *Endoskopi Gastrointestinal.* 24. 61-64. 10.17940/endoskopi.466516.
49. Qu, Xiaodong; Shi, Yongquan. Bile reflux and bile acids in the progression of gastric intestinal metaplasia. *Chinese Medical Journal* 135(14):p 1664-1672, July 20, 2022. | DOI:10.1097/CM9.0000000000002290
50. Xiaolan Shi, Zijiao Chen, Yi Yang, Su Yan, "Bile REflux Gastritis: Insights into Pathogenesis, Relevant Factors, Carcinomatous Risk, Diagnosis and Management", *Gastroenterology Research and Practice*, vol.2022, Article ID 2642551, 7 pages, 2022. <https://doi.org/10.1155/2022/2642551>
51. Fracchia M, Pellegrino S, Secreto P, Calgaro M, Taraglio S, Pera A, Galatola G. Biliary bile acid composition in gastric cancer. *Int J Clin Lab Res.* 1999;29(1):46-8. doi: 10.1007/s005990050062.
52. Min Jung Park and others, Bile acid induces expression of COX-2 through the homeodomain transcription factor CDX1 and orphan nuclear receptor SHP in human gastric cancer cells, *Carcinogenesis*, Volume 29, Issue 12, December 2008, Pages 2385–2393, <https://doi.org/10.1093/carcin/bgn207>
53. Aydın MF, Namlı Koç Ş, Aydın MA, et al. Gastric mucosal atrophy, intestinal metaplasia, and Helicobacter pylori status in patients with gastritis with or without bile reflux: Is the presence of bile reflux good or bad? *The Turkish Journal of Academic Gastroenterology* 2020;19:49-56. DOI: 10.17941/agd.800877
54. Li D, Zhang J, Yao WZ, Zhang DL, Feng CC, He Q, Lv HH, Cao YP, Wang J, Qi Y, Wu SR, Wang N, Zhao J, Shi YQ. The relationship between gastric cancer, its precancerous lesions and bile reflux: A retrospective study. *J Dig Dis.* 2020 Apr;21(4):222-229. doi: 10.1111/1751-2980.12858. Epub 2020 Apr 21.

55. Wang N, Chen M, Ni Z, Li T, Zeng J, Lu G, Wang J, Zhang J, Wu S, Shi Y. HDAC6/HNF4 α loop mediated by miR-1 promotes bile acids-induced gastric intestinal metaplasia. *Gastric Cancer*. 2021 Jan;24(1):103-116. doi: 10.1007/s10120-020-01108-x. Epub 2020 Jul 23.
56. Ni, Z., Min, Y., Han, C. *et al.* TGR5-HNF4 α axis contributes to bile acid-induced gastric intestinal metaplasia markers expression. *Cell Death Discov*. **6**, 56 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41420-020-0290-3>
57. Duochen Jin, Keting Huang, Miao Xu, Hongjin Hua, Feng Ye, Jin Yan, Guoxin Zhang & Yun Wang (2022) Deoxycholic acid induces gastric intestinal metaplasia by activating STAT3 signaling and disturbing gastric bile acids metabolism and microbiota, *Gut Microbes*, 14:1, DOI: [10.1080/19490976.2022.2120744](https://doi.org/10.1080/19490976.2022.2120744)
58. Shin VY, Siu MT, Liu X, Ng EKO, Kwong A, Chu KM. MiR-92 suppresses proliferation and induces apoptosis by targeting EP4/Notch1 axis in gastric cancer. *Oncotarget*. 2018 May 11;9(36):24209-24220. doi: 10.18632/oncotarget.24819
59. Wang M, Lou E, Xue Z. The role of bile acid in intestinal metaplasia. *Front Physiol*. 2023 Feb 20;14:1115250. doi: 10.3389/fphys.2023.1115250.
60. Chun-Zhi Z, Lei H, An-Ling Z, Yan-Chao F, Xiao Y, Guang-Xiu W, Zhi-Fan J, Pei-Yu P, Qing-Yu Z, Chun-Sheng K. MicroRNA-221 and microRNA-222 regulate gastric carcinoma cell proliferation and radioresistance by targeting PTEN. *BMC Cancer*. 2010 Jul 12;10:367. doi: 10.1186/1471-2407-10-367.
61. Liu K, Li G, Fan C, Diao Y, Wu B, Li J. Increased Expression of MicroRNA-221 in gastric cancer and its clinical significance. *J Int Med Res*. 2012;40(2):467-74. doi: 10.1177/147323001204000208
62. N. Li, B. Tang, E.-D. Zhu et al., "Increased miR-222 in *H. pylori*-associated gastric cancer correlated with tumor progression by promoting cancer cell proliferation and targeting RECK," *FEBS Letters*, vol. 586, no. 6, pp. 722–728, 2012
63. Qian Song, Quanlin An, Bing Niu, Xiaoling Lu, Ning Zhang, Xin Cao, "Role of miR-221/222 in Tumor Development and the Underlying Mechanism", *Journal of Oncology*, vol. 2019, Article ID 725013, 15 pages, 2019
64. Li S, Zhang T, Zhou X, Du Z, Chen F, Luo J, Liu Q. The tumor suppressor role of miR-155-5p in gastric cancer. *Oncol Lett*. 2018 Aug;16(2):2709-2714. doi: 10.3892/ol.2018.8932. Epub 2018 Jun 8

65. Li H, Xie S, Liu M, Chen Z, Liu X, Wang L, Li D, Zhou Y. The clinical significance of downregulation of mir-124-3p, mir-146a-5p, mir-155-5p and mir-335-5p in gastric cancer tumorigenesis. *Int J Oncol*. 2014 Jul;45(1):197-208. doi: 10.3892/ijo.2014.2415. Epub 2014 May 6.
66. Qu Y, Zhang H, Sun W, Han Y, Li S, Qu Y, Ying G, Ba Y. MicroRNA-155 promotes gastric cancer growth and invasion by negatively regulating transforming growth factor- β receptor 2. *Cancer Sci*. 2018 Mar;109(3):618-628. doi: 10.1111/cas.13472. Epub 2018 Feb 14. Erratum in: *Cancer Sci*. 2020 Jul;111(7):2656
(Correction. *Cancer Sci*. 2020 Jul;111(7):2656. doi: 10.1111/cas.14522. Erratum for: *Cancer Sci*. 2018 Mar;109(3):618-628.)
67. Zare A, Alipour B, Omrani MD, Zali MR, Malekpour Alamdari N, Ghaedi H. Decreased miR-155-5p, miR-15a, and miR-186 Expression in Gastric Cancer Is Associated with Advanced Tumor Grade and Metastasis. *Iran Biomed J*. 2019 Sep;23(5):338-343. doi: 10.29252/23.5.338. Epub 2019 May 19
68. Yin, L., Liu, T., Li, C. *et al*. The MRTF-A/miR-155/SOX1 pathway mediates gastric cancer migration and invasion. *Cancer Cell Int* **20**, 303 (2020)
69. Nana Su, Lanlan Li, Erle Zhou, Hong Li, Shuhua Wu, Zhang Cao, "Resveratrol Downregulates miR-155-5p to Block the Malignant Behavior of Gastric Cancer Cells", *BioMed Research International*, vol 2022, Article ID6968641, 10 pages, 2022
70. Chakraborty, A.; Patton, D.J.; Smith, B.F.; Agarwal, P. miRNAs: Potential as Biomarkers and Therapeutic Targets for Cancer. *Genes* 2023, *14*, 1375. <https://doi.org/10.3390/genes14071375>