

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(DOKTORA TEZİ)

**MİDE KANSERLİ HASTALARDA EGF GEN
POLİMORFİZMİNİN VE SERUM EGF DÜZEYİNİN
İNCELENMESİ**

CANAN CACINA

**DANIŞMAN
PROF. DR. İLHAN YAYLIM**

**MOLEKÜLER TIP ANABİLİM DALI
MOLEKÜLER TIP PROGRAMI**

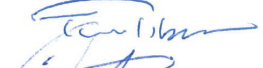
İSTANBUL-2012

TEZ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü MOLEKÜLER TIP Anabilim Dalı DOKTORA Programında CANAN CACINA tarafından hazırlanan MİDE KANSERLİ HASTALARDA EGF GEN POLİMORFİZMİNİN VE SERUM EGF DÜZEYİNİN İNCELENMESİ başlıklı Doktora tezi, yapılan tez sınavında Jürimiz tarafından başarılı bulunarak kabul edilmiştir.

20 / 09 / 2012

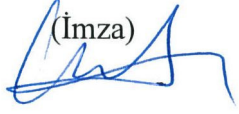
Tez Sınav Jürisi

<u>Ünvanı Adı Soyadı (Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı)</u>	<u>İmzası</u>
1.PROF.DR.TURGAY İSBİR, Yeditepe Ünv. Tıp Fak. Tıbbi Biyoloji AD	
2.PROF.DR.İLHAN YAYLIM, İst Ünv. DETAE Moleküler Tıp AD	
3.PROF.DR.AYŞEN YARAT, Marmara Ünv. Diş Hek. Fak. Biyokimya AD	
4.PROF.DR.BEDİA AĞAÇHAN, İst Ünv. DETAE Moleküler Tıp AD	
5.DOÇ.DR.ARZU ERGEN, İst Ünv. DETAE Moleküler Tıp AD	

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Canan Cacına

(İmza)


İTHAF

“ Aileme “ ithaf ediyorum

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince danışmanlığımı üstlenen ve benden desteğini esirgemeyen deneysel çalışmalarımı yapabilmem için gerekli olan tüm laboratuvar olanaklarının ve tezim için gerekli hasta örneklerinin toplanmasındaki katkılarından dolayı değerli hocam İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü (DETAE) Moleküler Tıp Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. İlhan Yaylım'a,

Çok kıymetli hocam İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Turgay İsbir'e, ve tüm Moleküler Tıp Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri ve çalışanlarına,

Tezim için gerekli hastaların seçimi, örneklerin sağlanması ile klinik değerlendirmelerindeki destek ve katkılarından dolayı Doç. Dr. Soykan Arıkan'a,

Attığım her adımda bana destek ve yardımcı olan, beni hep mutlu etmeye çalışan başta canım annem ve canım babam olmak üzere tüm aileme yürekten teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No:8941

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI.....	II
BEYAN.....	III
İTHAF.....	IV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ.....	IX
ŞEKİLLER LİSTESİ	X
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	XI
ÖZET	XII
ABSTRACT.....	XIII
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
Aile Hikayesi	7
Radyasyona Maruz Kalma	8
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	24
SEÇİLEN ÖRNEKLERİN TANIMI	24
KULLANILAN KİMYASAL MADDELER	24
KULLANILAN GEREÇLER.....	25
ÇÖZELTİLER	25
DNA İZOLASYONUNDA KULLANILAN ÇÖZELTİLER	25
Eritrosit Parçalama Tamponu (Lysis Buffer)	25
0.5 M Disodyumetilendiaminteraasetat (EDTA) (pH 8.0).....	25
4 M Sodyum Klorür (NaCl)	26
Lökositleri Parçalama Tamponu (White Blood Cell Buffer-WBL).....	26
1 M Tris Tamponu (Stok).....	26
9.5 M Amonyum Asetat	26
%10'luk Sodyum Dodesil Sülfat (SDS).....	26
Proteinaz K (20 mg/ml)	27
AGARoz JEL ELEKTROFOREZİNDE KULLANILAN ÇÖZELTİLER.....	27
Agaroz Jel Yükleme Tamponu (5X)	27

Etidyum Bromür (10 mg/ml).....	27
5X Tris-Borik Asit-Etilendiamintetraasetat (TBE)	27
KULLANILAN YÖNTEMLER.....	27
PERİFERİK KANDAN DNA İZOLASYONU	27
Elde Edilen DNA'nın Konsantrasyon ve Kalitesinin Tayini	28
EGF GEN POLİMORFİZMLERİNİN TESPİT EDİLMESİ	28
EGF (A61G) Gen Polimorfizminin Tespitinde Kullanılan Primer Dizileri	28
Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction-PCR)'da Kullanılan	
Kimyasal Maddeler ve PCR'ın Hazırlanışı	29
PCR Karışımının Hazırlanışı	29
PCR Şartları	31
Şekil 3-1: EGF (A61G) Gen Polimorfizmi PZR Koşulları.....	31
AGAROZ JEL ELEKTROFOREZİNDE KULLANILAN KİMYASAL MADDELER	
VE GEREÇLER	31
PCR Ürünlerinin %2'lik Jele Yüklenmesi:	32
PCR Ürünlerinin Kontrolü:	32
EGF (A61G) GEN POLİMORFİZMİ ENZİM KESİMİ	33
EGF (A61G) Gen Polimorfizminin Tespitinde Kullanılan Enzim ve Kimyasal	
Maddeler.....	33
EGF (A61G) Gen Polimorfizmlerinin Değerlendirilmesi ve Kontrolü	33
EGF (A61G) Gen Polimorfizminin Değerlendirilmesi	34
4. BULGULAR.....	41
PCR ÜRÜNLERİNİN KONTROLÜNE AİT BULGULAR	41
EGF (A61G) PZR Ürünlerine Ait Bulgular.....	41
Şekil 4-1: EGF (A61G) PZR Ürünlerine ait Bulgular	41
KESİM ÜRÜNLERİNİN KONTROLÜNE AİT BULGULAR	41
EGF (A61G) Ürünlerine Ait Bulgular	41
Sonuçların Değerlendirilmesinde Kullanılan İstatistiksel Hesaplar	43
İSTATİSTİKSEL ANALİZ SONRASINDA ELDE EDİLEN BULGULAR.....	43
KONTROL	44
5. TARTIŞMA.....	54
KAYNAKLAR	62
HAM VERİLER	74

FORMLAR	93
ETİK KURUL KARARI	94
PATENT HAKKI İZNİ	95
TELİF HAKKI İZNİ.....	96
ÖZGEÇMİŞ	97

TABLolar LİSTESİ

Tablo 2-1: Mide Karsinomunda Saptanan Gen Değişiklikleri

Tablo 3-1: PCR karışımının hazırlanması

Tablo 3-2: EGF (A61G) Gen Polimorfizminin Tespitinde Kullanılan Enzim ve Kimyasal Maddeler

Tablo 4-1: Çalışma Gruplarına ait Veriler

Tablo 4-3: EGF A61G Gen Polimorfizmi Allel Dağılımları ile Hastaların Klinik, Prognostik Parametrelerinin Değerlendirilmesi

Tablo 4-4: Mide kanserli hasta ve kontrol grubunda serum EGF düzeyleri

Tablo 4-5: Mide Kanserli Hasta ve Kontrol Grubunda EGF A61G Genotip ve Serum EGF düzeyleri (pg/ml)

Tablo 4-6: Mide Kanserli Hasta Grubunda EGF A61G Gen Polimorfizmi Allel Dağılımı ve Serum EGF düzeyleri

Tablo 4-7: Mide Kanserli Hastalarda EGF A61G Gen Polimorfizmi Genotip, Cinsiyet Parametreleri ve Serum EGF düzeyleri

Tablo 4-8: Mide Kanserli Hastalarda EGF A61G Allel Dağılımı, Tümör Derecesi Parametreleri ve Serum EGF Düzeyleri

Tablo 4-9: Mide Kanserli Hastalarda EGF A61G Allel Dağılımı, Lenf Nodu Tutulumu Parametreleri ve Serum EGF Düzeyleri

Tablo 4-10: Mide Kanserli Hastalarda EGF A61G Allel Dağılımı, Metastaz Durumu Parametreleri ve Serum EGF Düzeyleri

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1. Ülkelere ve Yaşa Göre Mide Kanseri İnsidansı

Şekil 2-2: Mide Kanseri Etyopatogenezi

Şekil 2-3: EGF ve EGFR Sinyal Yolağı

Şekil 3-1: EGF (A61G) Gen Polimorfizmi PZR Koşulları

Şekil 3-2: EGF (A61G) Gen Polimorfiziminin Şematik Jel Görüntüsü

Şekil 4-1: EGF (A61G) PZR Ürünlerine Ait Bulgular

Şekil 4-2: EGF (A61G) Kesim Ürünlerine ait Bulgular

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

EGF: Epidermal Büyüme Faktörü

TGF : Tümör Büyüme Faktörü

H.pylori: *Helicobacter pylori*

3'UTR: 3'kodlanmayan bölge

5'UTR:5' kodlanmayan bölge

Rb: Retinoblastoma

APC: Adenomatöz Polipozis Koli

FAP: Ailesel adenomatöz polipozis (FAP)

HNPCC: Kalıtsal polipoz olmayan kolon kanseri

HPCC: Kalıtsal polipoz kolorektal kanserler

IF: İntrinsik faktör

EBV: Epstein-Barr virüsü

LOH: Heterozigotluğun kaybedilmesi

bFGF: Temel fibroblast büyüme faktörü

OR: Risk kat sayısı

CI: Güvenirlilik aralığı

PZR: Polimeraz zincir reaksiyonu

ÖZET

Cacina, C. (2012). Mide Kanserli Hastalarda EGF Gen Polimorfizminin ve Serum EGF Düzeyinin İncelenmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Tıp A.B.D. /Doktora Tezi. İstanbul.

Mide kanseri dünyada yaygın olarak görülen kanser türlerinden biri olup mide kanserinin gelişim sebepleri hala tam olarak anlaşılamamış olmasına karşın beslenme şeklinin, mikrobik ve genetik faktörlerin bu süreci etkilediği öne sürülmüştür. Epidermal büyüme faktörü (EGF) hücre proliferasyonu ve hücre farklılaşmasında kritik bir rol oynayan tirozin kinaz reseptör ailesinin üyelerinden biri olan Epidermal büyüme faktör reseptörünün (EGFR) doğal ligandlarından birisidir. EGFR sinyal yolağında meydana gelen aksama veya düzensizliklerin bazı kanser tiplerinde etkili olduğu bildirilmiştir. Çalışmamızda EGF A61G gen polimorfizmi mide kanserli hastalarda tümör risk ve prognostik faktörü olarak incelenmiştir. Çalışmaya 84 mide kanserli hasta ve 146 sağlıklı kontrol dahil edilmiştir. EGF A61G genotiplerinin dağılımı mide kanserli hasta ile kontrol grubumuz arasında istatistiksel olarak anlamlı derecede farklılık göstermiştir ($p=0.039$). Mide kanserli hastalarda EGF A61G genotip ve allel dağılımlarına göre; serum EGF düzeyleri hastalık parametreleri ile birlikte değerlendirildiğinde klinik ve prognostik parametreler açısından istatistiksel olarak anlamlı bir veri saptanmamıştır. Çalışmamız sonuçlarının mide kanseri gelişiminde genetik risk faktörlerinin belirlenmesine ve hastalığın moleküler mekanizmasının çözümlenmesine katkı sağlayacak çalışmalara yeni bir bakış açısı getirebileceği düşüncesindeyiz.

Anahtar Kelimeler : Mide Kanseri, Epidermal Büyüme Faktörü, Gen, Serum Düzeyleri, Hücre döngüsü

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 8941

ABSTRACT

Cacina C. (2012). Investigating of EGF gene polymorphism and EGF serum level in gastric cancer patients. Istanbul University, Institute of Health Science, Istanbul University Department of Molecular Medicine, Ph.D. Thesis, Istanbul.

Gastric cancer is the more common type of cancer in the world. Although the etiology of gastric cancer is not well-understood, nutritional, microbial, and genetic factors playing important roles and multifactorial process have been suggested. Epidermal growth factor (EGF) play important roles in several signaling pathways, leading to proliferation, differentiation, and it is the natural ligand of the epidermal growth factor receptor (EGFR) which is the member of tyrosine kinase transmembrane receptor family. EGF and epidermal growth factor receptor regulate important processes in tumorigenesis, including cell survival, cell cycle progression and irregularity in this signaling pathway is frequently observed in some of the type of cancer. We have examined EGF A61G gene polymorphism as a marker of tumour risk and progression in gastric cancer. A total of 84 patients with gastric cancer and 146 control individuals were enrolled in the current study. The distribution of EGF A61G genotypes were different between gastric cancer patients and controls ($p=0.039$). According to EGF A61G genotype and allele distributions in gastric cancer patients there were no statistically significant differences between the serum EGF levels and with clinical and prognostic parameters. We are of the opinion that our study offer an insight into the other studies which will analyse the importance of this polymorphism and investigate genetic risk factors, molecular mechanism in the development of in gastric cancer etiopathogenesis.

Key Words:Gastric Cancer, Epidermal Growth Factor, Gene, Serum Level, Cell Cycle

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. 8941

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Mide kanseri dünyada yaygın olarak görülen kanser türlerinden biri olup özellikle Asya, Latin Amerika ve Avrupa'nın bazı ülkelerinde sıkça rastlanan bir kanser türüdür (1). Mide kanserinin gelişim sebepleri hala tam olarak anlaşılamamış olmasına karşın beslenme şeklinin, mikrobik ve genetik faktörlerin bu süreci etkilediği öne sürülmüştür (2).

Epidermal büyüme faktörü (EGF) hücre proliferasyonu ve hücre farklılaşmasında kritik bir rol oynayan tirozin kinaz reseptör ailesinin üyelerinden biri olan Epidermal büyüme faktör reseptörünün (EGFR) doğal ligandlarından biridir. EGFR sinyal yolağında meydana gelen aksama veya düzensizliklerin bazı kanser tiplerinde etkili olduğu ve bu sinyal mekanizmasında oluşabilen reseptör ekspresyonunda artış, genetik amplifikasyonlar ve mutasyonların tümör gelişimi ile ilişkili olabileceği bildirilmiştir (3,4). EGF ve EGFR arasındaki etkileşimin ve kordinasyonun intraselüler tirozin kinaz aktivitesini de etkilediği ve tümör gelişiminde rol oynadığı düşünülmektedir (5). Yapılan çalışmalarda mide kanserinde EGF ve EGFR ekspresyonunun arttığı bildirilmiştir (6,7). Normal fizyolojik koşullar altında plazmada az miktarda bulunan büyüme faktörlerinin yara iyileşmesi gibi bazı durumlarda görev aldığı düşünülmektedir. Kanser hücrelerinde bu faktörlerin düzenlenmesinde bozulmalar meydana geldiği ve proliferasyon durumlarında ortamda gereğinden fazla miktarda bulundukları ileri sürülmüştür (8).

Büyüme faktörleri hücre döngüsünün evrelerinden olan G_0 ve G_1 fazlarına da etki etmektedir. Erken G_1 evresinde bu faktörlerin ortamdaki uzaklaşmaları hücrelerin G_0 fazına geri dönmeleriyle sonuçlanabilir. Fakat G_1 'in sonlarına doğru hücreler sınır noktasını geçtikten sonra büyüme faktörleri ortamdaki uzaklaşsa bile hücreler tekrar G_0 noktasına geri dönmez ve döngüye devam ederek S fazına girmektedirler (9).

EGF geni 4q25-27 kromozomal bölgesinde lokalize olmuştur. 24 ekzon ve 23 introndan meydana gelmiş olup 6,045 kilodalton ağırlığında tek zincirli bir polipeptittir (10). EGF'nin Epidermal büyüme faktör reseptörüne bağlandıktan sonra ras/raf/MAPK ve fosfoinozitol 3 fosfat kinaz gibi çeşitli sinyal yollarını aktive ettiği ve epitel hücrelerin gelişimini, farklılaşmasını ve tümörleşme sürecini etkilediği bildirilmiştir (11-13).

Kanserlerde görülen genetik değişiklikler, bir nükleotid düzeyinde (tekli ya da çoklu baz değişiklikleri), kromozomal düzeyde (kromozom kayıplar) ya da DNA promotor bölge metilasyonu şeklinde oluşabilir. Kanser hücresinin büyüme ve çoğalma sürecinde meydana gelen genetik değişikliklerin, konakçı faktörleri ve tümör konakçı etkileşimi (anjiogenez, invazyon, metastaz) sonucunda geliştiği bilinmektedir (14,15)

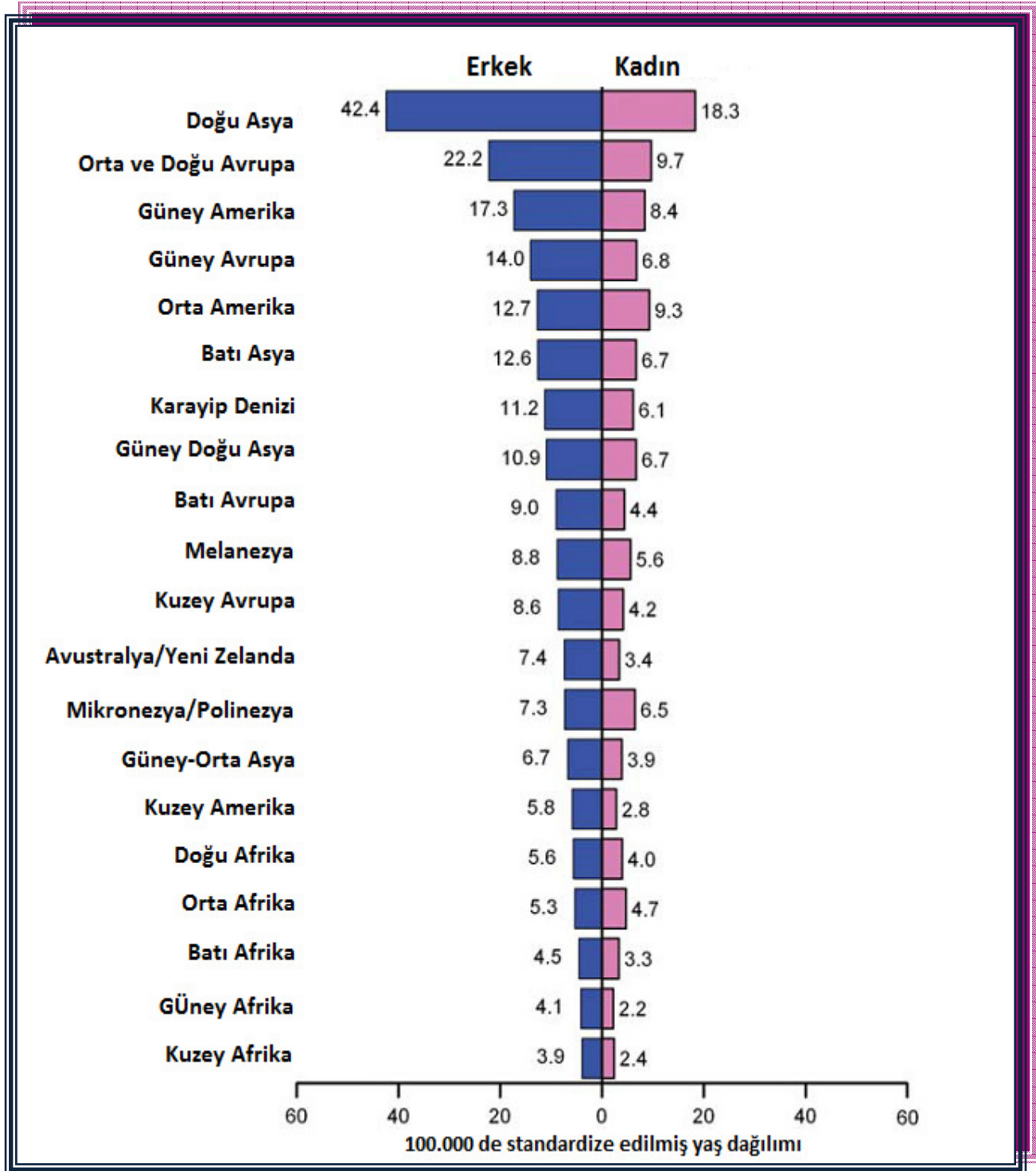
Yapılan çeşitli araştırmalarda EGF geninin 5' UTR bölgesinde görülen tek nükleotid polimorfizminin EGF geninin fonksiyonlarını etkilediği ve malign melanom ve glioblastoma formlarıyla ilişkili olduğu bildirilmiştir (16,17). Mide kanseri ve EGF polimorfizmi arasındaki ilişkiye dair yeterli miktarda bilgi bulunmamasına karşın önceki çalışmalarda EGF A-G polimorfizminin sadece hastalığın oluşumuyla ilgili değil aynı zamanda prognoz süreci ile de ilişkili olabileceği bildirilmiştir (18).

Mide kanserine ait risk durumları, EGF genotiplerinin ve serum EGF düzeylerinin klinik diğer parametrelerle ilişkileri değerlendirilmeye çalışılacaktır. Çalışmamızın mide kanseri etyopatogenezinde EGF A61G polimorfizminin önemini araştıracak çalışmalara ışık tutacağı düşüncesindeyiz.

2. GENEL BİLGİLER

Mide kanseri en sık görülen dördüncü kanser türü olup akciğer kanserini takiben kansere bağlı ölümler arasında ikinci sırada yer almaktadır. Bu kanser türüne bağlı ölüm insidansları yüksek olup pek çok ülkede % 70-90 oranında zayıf survi görülmekte ancak bu oran Japonya'da % 40 civarında izlenmektedir (19,20). Coğrafik olarak mide kanseri Japonya ve Çin gibi Doğu Asya ülkelerinde ayrıca Orta ve Güney Amerika, Doğu Avrupa ve Orta Doğu Avrupa kesimlerinde daha sık oranda görülmektedir. Mide kanseri epidemiyolojisi incelendiğinde midedeki birincil lezyonların yerleşim yerlerinin zaman içerisinde bir değişim gösterdiği saptanmıştır. Yirminci yüzyılın ilk çeyreğinde, mide kanserlerinin üçte ikisi midenin antrum ve prepilorik bölgesinde gözlenirken sadece yüzde 10'unun kardial veya özofagogastrik kavşak bölgesinde görüldüğü saptanmıştır. Bununla birlikte, 1970'li yıllardan bu yana proksimal mide adenokarsinomunun giderek daha yaygın hale geldiği bildirilmiştir (19-23). Japonya'da mide kanserinin çok sık görüldüğü bilinmektedir. Ancak olguların yaklaşık % 50'si çoğu zaman erken teşhis edilmekte ve sıklıkla yaşlı nüfusu etkilemekte ve iyi prognoz sergilemektedir (24). Dünyanın çeşitli ülkelerinde mide kanseri tanısı için farklı diyagnostik kriterler kullanılmaktadır. Örneğin batı ülkelerinde, gastrik kanserin histolojik tanısı neoplastik epitelden lamina içine invaziv büyüme şeklinde değerlendirilirken, Japonya'da ise karsinom teşhisi nükleer değişiklikler karakterize edilmektedir. Bu nedenle, birçok durumda batı ülkelerinde yüksek ve düşük dereceli displaziler, Japonya'da "kanseri" olarak değerlendirilebilmektedir (25). Çin'de, mide kanseri nedeniyle ölüm oranı Avrupa ve Amerika gibi gelişmiş kıtalara oranla 3.8-7.9 kat daha fazladır. Sosya-ekonomik gelişmeler ile yaşam tarzı, beslenme, eğitim ve sağlık sistemindeki olumlu değişimler nedeniyle son on yılda mide kanseri insidansında düşüş izlenmektedir (26-28). Mide kanserinin gelişimi çok aşamalı ve multifaktöriyel nedenlerle tetiklenen bir süreçtir. Biyolojik ve kimyasal, kanserojenlere maruz kalmak, mantarlar, H. pylori, ve Epstein-Barr gibi mikroorganizmalar gastrik epitel hücrelerinde DNA hasarı ve mutasyona yol açarak kronik gastritten multifokal atrofi, intestinal metaplazi ve genetik birikimler sonucu intraepitelyal neoplaziye sebep olarak kanser sürecini tetiklemektedirler (29-30). Bu faktörler karsinogenez sürecinde önemli bir rol oynamakta ve mide kanserinin morfolojik özelliklerinin şekillenmesine sebep olmaktadır (29-31).

MİDE KANSERİ İNSİDANSI



Şekil 2-1: Ükelere ve Yaşa Göre Mide Kanseri İnsidansı (32)

MİDE KANSERİ RİSK FAKTÖRLERİ

Yaş: Yapılan araştırmalarda mide kanseri tanısı konulan bireylerin büyük çoğunluğunun 50 yaşın üzerinde olduğu ve mide kanseri görülme olasılığının 50 yaş ve üzerindeki kişilerde arttığı tespit edilmiştir (33).

Sigara Tüketimi: Sigara kullanan kişilerin, hiç sigara içmemiş insanlara oranla 2 kat daha fazla risk altında olduğu bildirilmiştir. Sigaranın kansere neden olacak kimyasallar içerdiği bilinmektedir ve kullanımı sırasında kansere sebep olabilecek maddelerin yutulması ve solunması sebebiyle, mide kanserini de tetiklediği ileri sürülmüştür (33).

Diyet

Yapılan araştırmalarda İngiltere'de mide kanseri insidansının 1930'lu yıllardan bu yana giderek azaldığı tespit edilmiştir. Bu sonucun daha iyi bir diyet alışkanlığı kazanımı ile ilişkili olabileceği bildirilmiştir. Mide kanseri insidansı dünyada ülkeden ülkeye farklılık göstermektedir. Bu durum ülkeler arasındaki farklı diyet ve beslenme alışkanlıkları ile açıklanmıştır. Örneğin Japonya'da çok tuzlu salamura gıdaların tüketimi yüksek oranda olduğu için mide kanserine yakalanma oranı diğer ülkelere göre daha yüksektir.

Çeşitli çalışmalarda pastırma, sucuk ve jambon gibi işlenmiş et ürünlerinin içerdikleri nitrozamin ve benzer kimyasal maddeler nedeniyle mide kanseri riskini arttırdığı bildirilmiştir. Bu riskin özellikle *Helicobacter pylori* bakterisi ile enfekte kişilerde arttığı tespit edilmiştir.

Taze meyve ve sebze tüketiminin mide kanseri riskini azalttığı düşünülmektedir. Taze meyve ve sebze gibi gıdalar yüksek oranda C vitamini ve antioksidan içerdiği için mide duvarının zarar görmesinin önlenmesinde koruyucu rol oynamaktadır (33).

Helicobakter Piloni Enfeksiyonları

Son birkaç yıl içinde *Helicobakter pilori* bakterisi ile ilgili yapılan araştırmalar oldukça artış göstermiştir. Milyonlarca insanın bu bakteri ile enfekte olduğu tespit edilmiş olup diyet ve sigara kullanımının eşlik ettiği *Helicobakter pilori* enfeksiyonlarının mide kanseri riskini arttırdığı belirtilmektedir (33). Özellikle kronik atrofik gastrit adı verilen iltihabi durumun bu süreci hızlandığı düşünülmektedir. Uzun süreli mide enfeksiyonlarında bu bakteri iltihaba (kronik atrofik gastrit) ve kanser öncesi midenin iç zarında değişikliklere yol açabilir (33). Atrofik gastritlerin %15'inde 15 yıl içinde mide kanseri gelişebilmektedir. Bu nedenle atrofik gastrit prevalansının yüksek olduğu bölgelerde mide kanseri prevalansı da yüksektir (34).

H.pylori, gram (-), unipolar, kıvrımlı veya spiral, hareketli, kunt ve yuvarlak uçlu, 4-6 unipolar kirpiğe sahip, mikroaerofilik, 0.5-1 mikrometre genişliğinde, 2.5-4 mikrometre boyunda bir bakteridir (35). *H.pylori* koloni halinde ve asidik mide ortamında yaşar, pH 6 ile 8 arasında olduğunda en iyi şekilde gelişim gösterir (36). *H.pylori* gastrik asit sekresyonunu arttırarak gastrite ve ülser neden olan bir bakteridir (34).

H.pylori virulansı *cagA*, *vacA*, *iceA* ve *babA* genleri ile ilişkilidir. *cag* adaları, *H.pylori* virülans faktörünü en iyi karakterize eden *cag* patojenite adasıdır (CAG-PAI), 40kb kromozomal DNA, yaklaşık 31 gen içerir (37,38). *H.pylori* suşları *cag*-PAI varlığına/yokluğuna göre 2 gruba ayrılabilir; -tip 1 suşları *cag*-PAI'ya sahipken, -tip 2 suşları *cag*-PAI'ya sahip değildirler. Tip 1 suşları şiddetli gastrit, peptik ülser hastalığı, gastrik atrofi ve non-kardia mide kanseri ile ilişkili olup PAI varlığı ile virülansın arttığı ortaya konulmuştur (39,40,41). Tüm *H.pylori* suşları *vacA* genine sahip olmasına rağmen, suşların sadece yaklaşık %50'si *vacA* proteinini ifade eder. Ekspresyondaki değişiklikler gen dizilerinin varyasyonundan kaynaklanmaktadır (42). *babA* gen ekspresyonu ile *H.pylori* suşları mide epitel hücrelerine daha sıkı bağlanır ve *babA* gen ekspresyonunun hastalık şiddetini etkilediğine dair önemli kanıtlar bulunmaktadır. *H.pylori* suşlarından *babA*, *vacA* ve *cagA* genlerine sahip olanların mide kanseri olma riski daha fazladır (43). *iceA* geninin iki ana varyantı bulunur (*iceA1* ve *iceA2*). *iceA1*'in ekspresyonu *H.pylori*'nin insan mide epitel hücreleri ile temasta olması ile düzenlenir ve bazı popülasyonlarda peptik ülser hastalığı ile ilişkilidir (44).

Mide kanserli hastalarda, mide kanserli olmayan hastalara göre enfeksiyon daha yüksek bir oranda görülür. H.pylori enfeksiyonu bazı mide lenfoması tiplerine bağlıdır. Buna rağmen, bu bakteriyi midesinde taşıyan çoğu insanda kanser gelişmeyebilir (33). Genellikle Helikobakter pilori enfeksiyonları antibiyotik ile tedavi edilmektedir. Ancak bu tedavinin ne kadar faydalı olduğu tartışmalıdır. Ayrıca tedavi sonrasında da kişilerin yaygın olan bu bakteri türüyle tekrar enfekte olma olasılıkları yüksektir (33).

Sindirim Sistemindeki Polipler

Nadir görülen bir durum olan ailesel adenomatöz polipozis FAP”in mide kanseri riskini arttırdığı bildirilmiştir. Kalıtsal olan bu sendromda sindirim sistemine yerleşmiş pek çok polip görülmektedir. Poliplerin özellikle kolon kanseri gelişiminde önemli olduğu bilinmektedir. Aslında poliplerin çoğu ciddi bir önem teşkil etmez zararsızdır ve kansere sebep olmaz. Ama adenomatöz adı verilen polip türünün ciddi bir risk faktörü oluşturduğu tespit edilmiştir (33).

Diğer Medikal Durumlar

Mide kanseri riskini arttıran faktörlerden birisi de reflü sorunudur. Reflü durumunda mide asidi yemek borusuna doğru çıkarak yemek borusu iltihabına (özofajit) neden olabilmektedir. Özofajit ise mide kanseri riskini artırmaktadır. Pernisiyöz anemi (vagotomi) (kısmi gastrektomi) gibi hastalık ve operasyonlar sonrasında midenin ürettiği asit salgısında bir azalma meydana gelir ve bu durum bakterilerin yaşaması için uygun bir ortam oluşmasına sebep olmaktadır. Bakterilerin ürettiği nitrit ve nitrozamin gibi kimyasallar mide kanseri riskini artırabilmektedir (33).

Aile Hikayesi

Aile öyküsü mide kanseri açısından bir risk faktörü olarak değerlendirilmektedir. Birinci derece yakınlarında mide kanseri öyküsü bulunan kişilerin bu kanser türüne yakalanma olasılıkları diğer bireylere oranla daha fazla artmaktadır. Bu durumun kalıtsal köken teşkil edebileceği gibi H. pylori gibi farklı çevresel nedenlerden kaynaklanabilme olasılığı henüz açıklığa kavuşturulamamıştır(33).

Diğer Kanserler

Yapılan istatistiki araştırmalarda geçmişte prostat kanseri, mesane ya da testis kanseri geçirmiş erkeklerde ve meme yumurtalık veya rahim ağzı kanserine yakalanmış kadınlarda mide kanseri görülme olasılığının biraz daha yüksek olduğu görülmüştür. Ayrıca hem erkek hem kadınlarda yemek borusu melanom bağırsak kanseri veya non Hodgkin lenfoma geçirmenin riski ciddi oranda arttırdığı bildirilmiştir(33).

İmmün Sistem Disfonksiyonu

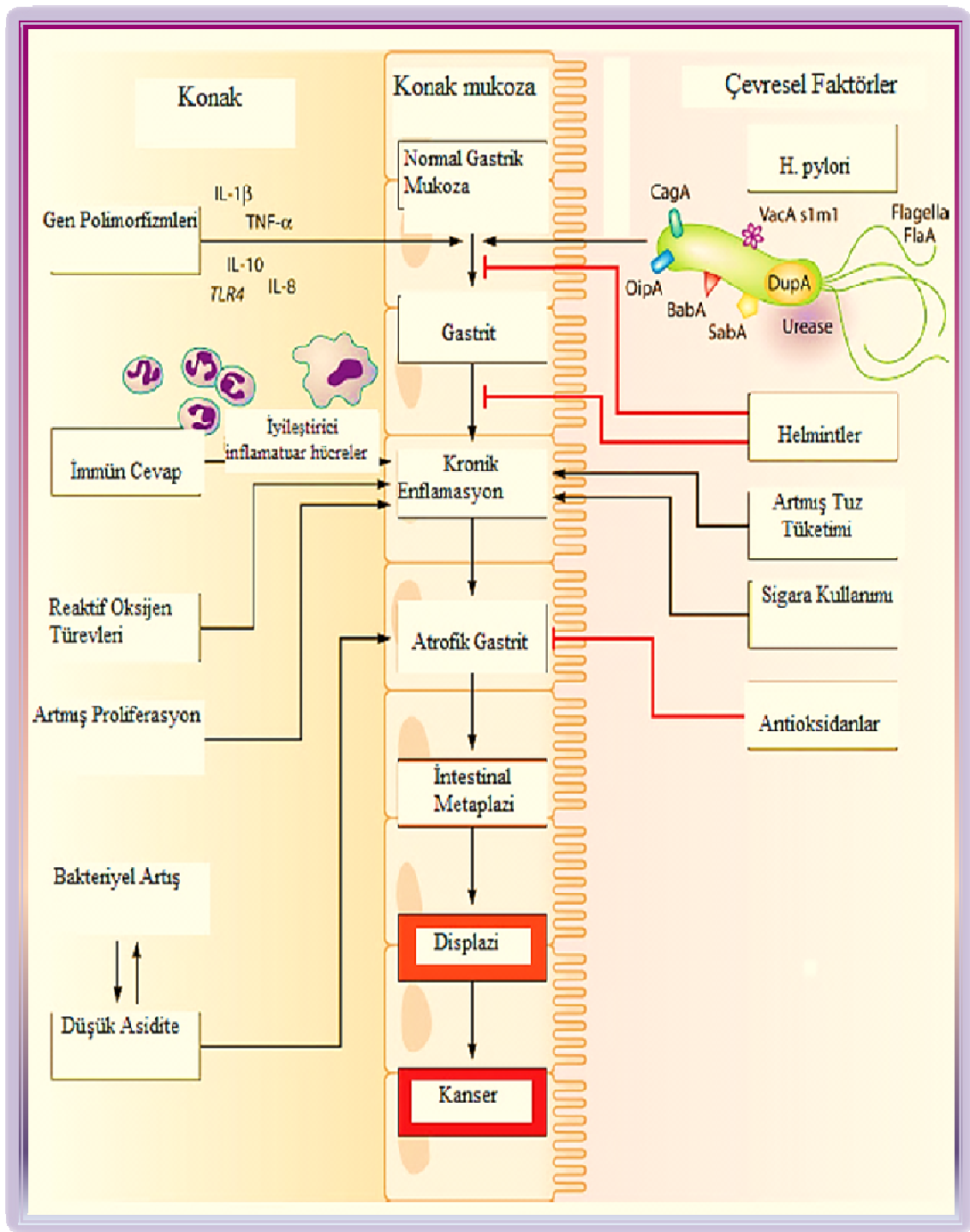
İmmün sistemi baskılanmış HIV gibi tehlikeli virüslerle enfekte olan AIDS gibi bağışıklık sistemine ciddi şekilde zarar veren hastalıklara maruz kalan veya organ nakilleri sonucu ilaç kullanan bireylerin diğer bireylere oranla iki kat daha fazla mide kanserine yakalanma riski taşıdıklarına dair kanıtlar bulunmaktadır (33).

Radyasyona Maruz Kalma

2. Dünya Savaşı sırasında atom bombası nedeniyle radyasyona aynı zamanda tıbbi X-ray ışınına maruz kalan bireylerde mide kanserine yakalanma oranı artmıştır (33).

Kimyasal Ajanlara Maruz Kalma

Çeşitli araştırmalarda taş ocağı işçilerinde maden ve metal tozlarına maruz kalan bireylerde mide kanseri riskinin arttığı bildirilmiştir (33).



Şekil2-2:Mide Kanseri Etyopatogenezi (45)

MİDE KANSERİ PATOGENEZİNDE GENETİK VE MOLEKÜLER BİYOLOJİ

Multifaktöryel etyolojiye, çok basamaklı histogeneze sahip mide kanserinin temelinde bir çok moleküler mekanizma mevcuttur. Mide kanserli hastalarda yapılan araştırmalarda daha az sıklıkta genetik geçiş tanımlanmıştır. Moleküler biyoloji açısından patogenezi en iyi tanımlanmış tümörlerden biri kolorektal karsinomlardır. Herediter adenomatöz polipozis sendromlu hastalarda adenom ve karsinom gelişiminde saptanan bir çok değişiklik sporadik kolorektal karsinomlarda ve midenin özellikle iyi diferansiye (intestinal tip) karsinomlarında da görülmektedir. Özellikle kan grubu A olan kişilerde normal popülasyona göre mide karsinomu riskinin yedi kat fazla olduğu bildirilmektedir. Bu kişilerde genellikle diffüz tip (az diferansiye) mide karsinomu görülmektedir. Ailevi kanser sendromu ve herediter nonpolipozis kolorektal karsinom izlenmektedir. Lynch Tip II sendromlu ailelerde kardial tümörleri daha sıktır (46).

Mide karsinogenezinin erken evresinde genetik kararsızlık (instabilite), tümör supressör genlerinin inaktivasyonu ve telomeraz reaktivasyonu rol oynarken; mide karsinomunun ilerlemesinde onkogenlerin aktivasyonu, büyüme (growth) faktörlerinin ve sitokinlerin aşırı artışı (ekspresyonu) rol oynamaktadır. Metastazın gelişmesi için de bir takım genetik değişikliklerin eklenmesi gerekmektedir (46).

Genetik kararsızlık, telomeraz aktivitesi, CD44'ün değişik kopyaları, p53 ve c-met genlerindeki değişiklikler her iki karsinom tipinde ortak olan özelliklerdir ve erken karsinom tanısında önemli yardımcı bulgulardır. Bunlara ek olarak, iyi diferansiye adenokarsinomlarda APC gen inaktivasyonu, K-ras mutasyonu karsinomu oluşumunda; c-erbB2 amplifikasyonu, DCC lokusunda LOH ve 1q kromozomunda LOH tümörün ilerlemesini sağlar. İnkomplet tip intestinal metaplaziler (İM) ve mide adenomları da p53 mutasyonları, APC gen mutasyonları veya kaybı, telomeraz aktivitesi ve CA tekrar kararsızlığı gösterir. Bu bulgular IM ve adenomların karsinom için öncü lezyonlar olduğunu destekler. Bu süreçte ilk olay, muhtemelen, CA tekrar kararsızlığıdır. Az diferansiye karsinomların genezinde de genetik kararsızlık ilk basamak olabilir. Cadherin ve catenin'lerin mutasyonu veya azalması az diferansiye karsinomlarda erken dönemde görülmektedir. K-sam gen amplifikasyonu az diferansiye tipte seçici olarak görülmekte, iyi diferansiye tipte görülmemektedir. Tümör hücrelerinde apoptozis oranı iyi diferansiye tipte anlamlı olarak yüksektir. Az

diferansiye tipte de bcl-2 aşırı dışavurumu görülür. HGF/c-met sistemi ve adezyon molekülleri düzenlenen karsinom hücreleri/stroma ilişkisi her iki tip mide karsinomunun morfogenezinde rol oynar. Yoğun olarak devam eden moleküler araştırmaların sonuçları mide karsinomu genozini daha iyi aydınlatacaktır (46).

Genetik Kararsızlık:

DNA replikasyon hataları ile oluşan mikrosatellit kararsızlığa bağlı somatik mutasyonlar, genetik kararsızlığın dışavurumunu gösterebilir. Az diferansiye mide karsinomlarının %64'ünde, iyi diferansiye mide karsinomlarının ise %17'sinde mikrosatellit kararsızlığı saptanmıştır. 25 mide karsinomu üzerinde yapılan bir araştırmada, iyi diferansiye karsinomların %33'ünde, az diferansiye karsinomların ise %18'inde CA (sitozin-adenin çifti) tekrar kararsızlığı gösterilmiştir. İyi diferansiye mide karsinomunda preküröz lezyon ve durum olarak kabul edilen mide adenomlarında ve intestinal metaplazide de CA tekrar kararsızlığı saptanmış ve mikrosatellit kararsızlığının mide karsinogenezinde erken belirteçlerden biri olduğu düşünülmüştür (46).

Mide, kolon, safra kesesi gibi birçok primer organ karsinomunda birçok lokusta replikasyon hatası sık görülen bir durumdur. DNA yanlış eşleşme (mismatch) tamir genlerindeki germline mutasyonlar büyük bir olasılıkla mide karsinomunda da genetik kararsızlığa neden olmaktadır .

Replikasyon hatalarına ek olarak telomer kısalması kromozom kararsızlığına yol açabilir. Normal somatik hücrelerde telomerler progressif olarak kısalır. Telomerlerdeki bu kısalma mitotik bir saat gibi görev görür ve telomeraz aktive yokluğu ile doğru orantılıdır. Normal mide mukozasındaki telomer tekrar sıralarının uzunluğu ile karşılaştırıldığında mide karsinomu ve intestinal metaplazide telomerler daha kısadır. Hücre immortalitesi için telomeraz aktivitesi gereklidir ve bu aktivite mide karsinomlu primer tümör dokularında, hücre kültürlerindeki tümör hücre dizilerinde ve metastatik tümörlerde saptanmıştır. Oysa, normal mide mukozasında telomeraz yoktur. Telomeraz bir ribonükleoprotein enzimidir. Germline dokularda ve immortal tümör hücrelerinde telomerik DNA tarafından üretilir. Normal somatik hücrelerde baskılanır. Bu yüzden telomeraz reaktivasyonu telomerlerin stabilizasyonunu bozarak tümör hücrelerindeki immortaliteyi sağlayabilir. İnkolet İM'de %23 oranında, mide adenomlarında %50 oranında telomeraz aktivitesinin

saptanması mide telomeraz reaktivasyonunun mide karsinogenezinin erken döneminde gerçekleştiğini destekler (46).

Tümör Supressör Genleri:

Mide karsinomlarının %60'ında p53 geninde mutasyon ve allel kaybı vardır. Mide karsinomu hücre dizilerinde ve mide adenomlarında da p53 geninde değişiklikler bulunmuştur. İnkomplet İM'de de hem p53 geninde missens (yanlış anlamlı) mutasyon hem de p53 protein dışavurumu izlenmiştir. Bazı çalışmalarda İM'lerin %14'ünde p53 geninin 3'-untranslated bölgesinde heterozigozite kaybı (LOH) saptanmış ve aynı bulgu mide karsinomlarının %22'sinde gözlemlenmiştir (46).

Midenin iyi diferansiye karsinomlarında adenomatöz polipozis koli (APC) geninde allel kaybı ve mutasyon %50 oranın görülür iken, az diferansiye karsinomlarda böyle bir bulgu hiç saptanmamıştır. İyi diferansiye mide karsinomlarında APC geninde görülen tipi ile Familial Adenomatöz Polipozis sendromunda ve sporadik kolorektal karsinomlarda görülen mutasyon tipi farklıdır. Mide karsinomlarında yanlış anlamlı mutasyonlar baskın iken, kolorektal karsinomlarda nonsense (anlamsız) mutasyon daha sık görülmektedir. İnkomplet İM'de %6; mide adenomlarında %42 oranında APC geninde somatik mutasyon saptanmıştır. Aynı midede hem inkomplet İM'de hem de iyi diferansiye adenokarsinomda APC geninde identik mutasyonların saptanması her iki lezyonun tek bir klonal orijinden olduğunu desteklemektedir. Bu bulgular iyi diferansiye mide karsinomu oluşum sürecinde APC ve p53 gen mutasyonlarının erken evrede rol oynadıklarını desteklemektedir (46).

Hücrelerdeki adezyon molekülleri tümör süpressör proteinleri gibi fonksiyon görebilmektedir. Az diferansiye mide karsinomlarında adhezyon moleküllerinden E-cadherin, P-cadherin, alfa-catenin dışavurumunun iyi diferansiye karsinoma oranla anlamlı olarak düşük olduğu gözlenmiştir. Az diferansiye karsinomların %50'sinde E-cadherin geninde mutasyon saptanmıştır. Buna ek olarak, bu tip karsinomlarda alfa ve beta catenin genlerinde de anormallik bildirilmiş olup cadherin ve catenin genlerinin dışavurumunun azalması ile invazyon gelişimi arasında kuvvetli bir ilişki olduğu vurgulanmaktadır.

Tümör süpressör genlerinden biri olan DCC (deleted in colon cancer) lokusundaki LOH ve bcl-2 geninde LOH, hem kolorektal karsinomlarda hem de iyi diferansiye mide karsinomlarında büyük oranda görülmektedir (46-48).

Tablo 2-1: Mide Karsinomunda Saptanan Gen Değişiklikleri (46)

Genler ve Değişiklikler	İyi Diferansiye Mide Karsinomu (%)	Az Diferansiye Mide Karsinomu (%)
Genetik Kararsızlık	33	18
Telomeraz Aktivitesi	100	90
K-ras (mutasyon)	9	-
c-met		
-Amplifikasyon	19	39
-6.0kb Mrna	50	82
K-sam (amplifikasyon)	-	33
c-erb B-2 (amplifikasyon)	20	-
bcl-2 (LOH)	43	-
Cyclin-E (amplifikasyon)	33	7
p53 (LOH, mutasyon)	60	76
APC (LOH, mutasyon)	40-60	--
DCC (LOH)	50	-
Cadherin (mutasyon)	-	-
CD44 (anormal kopya)	100	50
1p (LOH)	25	100
1q (LOH)	44	-
7q (LOH)	53	33

Hücre Döngüsü Düzenleyicileri

Hücre döngüsü, hücrenin büyüme ve farklılaşmasını DNA hasar tamir mekanizmalarının düzenlenmesini, yaralanmalara karşı doku cevabını ve kanser gibi çeşitli hastalıkları içeren karmaşık bir süreçte yer almaktadır (49). Hücre döngü düzenleyicilerinin gastrointestinal karsinomların patogeneğinde önemli rolleri vardır. Mide karsinomu dokularının büyük bir kısmında siklin-E geninde 3-10 kez arasında değişen amplifikasyonlar bulunmuştur. Mide karsinomu hücre dizilerinde gen amplifikasyonu olmasa da çok miktarda siklin-E mRNA'sı ve anormal protein dışavurumu gözlenmiştir (46).

Hücre döngüsü başlıca siklin bağımlı kinaz (cdk) ve siklin komplekslerini içeren mekanizmalar aracılığıyla düzenlenir. Siklin bağımlı kinazlar (cdk) döngüdeki spesifik noktaları aktive eden bir serin /treonin protein kinaz ailesidir (50). Bu aile, sürecin işlemesi açısından kritik bir öneme sahiptir ve inaktivasyonları mitozu engeller (51-53). Siklin bağımlı kinaz (Cdk) ailesinin işlevleri çeşitli mekanizmalarla düzenlenmektedir. Bunlardan biri treonin ve tirozin kalıntılarının fosforillenmesidir (54). Hücre bölünmeye hazır olduğunda, cdc25 belli bölgelerinden cdk1'i defosforile etmekte, bunun sonucunda cdk1 kinaz aktive olmaktadır (51,55-57).

Siklinler ise çeşitli düzenleyici fonksiyonları yerine getirirler. Buna ek olarak cdk ailesinin fosforillenme durumunda görev alırlar. Siklin bağımlı kinaz ailesi (cdk) aktivitelerini yerine getirmek için siklin proteinlerine bağlanmak zorundadır. Siklinler, cdk ailesini nukleusa doğru yönlendirir ve siklin bağımlı kinaz ailesinde bulunmayan nükleer lokalizasyona sahiptir (58). Bazı cdk ailesi üyeleri, birden fazla siklin bağlayabilir (50). Bu proteinlerin siklin olarak isimlendirilmelerinin nedeni hücre döngüsü boyunca eksprese olmalarıdır (59,60). Siklin bağımlı kinazlar ,belli siklinlerin hücre döngüsü süresince ekspresyonları dolayısıyla döngünün belli zamanlarında aktive edilebilir. Siklinlerin ekspresyonlarının düzenlenmesi, onların parçalanması ve yıkımı hücre döngüsü boyunca çeşitli şekillerde kontrol altında tutulmaktadır .Siklinler yüksek miktarda prolin ,glutamat,serin ve treonin içeren protein motifleri ve sekanslara sahiptirler. Bu motifler siklinlerin belirli zamanlarda ubiquitine bağlanma suretiyle parçalanmalarına sebep olurlar (59,61-63).

Böylece döngü sırasında belirli siklinlerin yıkım ve sentez miktarına bağlı olarak hücrelerin döngüsüne giriş ve farklı fazlara geçiş aşamaları belirlenmektedir. Genel olarak hücre bir faza girmeden önce, önceki faza özgü siklinler parçalanıp, bir sonraki

faza özgü siklinler sentezlenerek döngü yönlendirebilmektedir. Siklin bağımlı kinazlar ise çeşitli substrat moleküllerini fosforilleyerek hücre bölünme sürecini katalizlerler. Cdk'ların, G₂ ve M fazlarında, nükleer laminler, mikrotübüller nükleer hücre iskeletini hedef aldığı (64,65), G₁ fazında ise en önemli hedefinin Rb proteini olduğu bilinmektedir. Böylece, G₁ fazında, siklin-cdk kompleksleri tarafından Rb proteininin çeşitli aminoasit kalıntıları fosforillenmektedir (66). Hipofosforile durumda olan Rb proteini, E2F transkripsiyon faktörünü bağlamakta, böylece transkripsiyon gerçekleşmemektedir. Siklin ve siklin bağımlı kinazlar Rb proteinini fosforillediğinde E2F serbest kalır ve böylece transkripsiyon ve döngünün devamı için gerekli proteinlerin sentezi gerçekleşir (67-68).

Rb proteini döngünün geri kalan kısmı boyunca hiperfosforile halde kalır. SiklinA ve SiklinB bağımlı kinaz cdk2 ve cdk1'in döngünün devam etmesi için Rb proteinini hiperfosforile bir halde tuttuğu düşünülmektedir (69). Hücre döngüsünde G₁ ve S fazında en fazla araştırılan ve en önemli gibi görünen p16 ve p21 aileleridir. p16 ailesinin p16, p15, p18 ve p19 gibi üyeleri vardır ve cdk4, cdk6 gibi siklin bağımlı kinazları inaktive ettikleri bilinmektedir (70-73). Bu aile, siklin bağımlı kinazlarla bu siklin proteinleri birleşmeden önce, stabil kompleksler oluştururlar ve siklinlerin aşırı ekspresyonu durumunda bile cdklardan ayrılmazlar. p16 ailesi üyeleri cdk4 ve cdk6'yı bağlamak suretiyle Rb proteininin fosforilasyonunu ve aktivasyonunu engellerler (70-73). Özellikle p16'nın metilasyonu veya mutasyonu %1 dolaylarında bildirilmiştir (74-75). p16'nın promotor bölgelerindeki hipermetilasyonlar protein ekspresyonunda kayıp ile sonlanmaktadır (75,76). p16 inaktivasyonu, daha çok p53 mutasyonu bulunmayan hastalarda saptanmıştır ve homozigot delesyonu yüksek Ki-67 proliferatif indeks ile uyumlu bulunmuştur (77).

p16 inaktivasyonu ile epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) geni amplifikasyonu beraberliği dikkat çekmiştir (78). Bu birliktelik daha yaşlı hastalarda ve daha kötü prognozla uyumlu bulunmuştur (75). p16 inaktivasyonu hücre proliferasyonunu arttırmakta ve malignitenin gelişimine katkıda bulunmaktadır (79,80). p16'nın kodlanma ve 3'UTR bölgelerindeki polimorfizmlerin kanser gelişimi ve prognozu ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. Bazı polimorfizmlerin p16'nın fonksiyonlarını değiştirdiği, bazılarının ise fonksiyonları üzerine etki etmediği gözlemlenmiştir (81,82).

p21 ailesi, p21(cip1), p27(kip1), p57(kip2) gibi üyeleri kapsamaktadır (83,84). Bu aile, G₁ fazının düzenlenmesinde birincil derecede önemlidir (85). Bu proteinlerin büyük olasılıkla cdk1 dışında çoğu cdk üyelerini inhibe ettiği düşünülmektedir (86,87).

p21 ailesinin üyeleri siklinlere bağlanarak cdkların Rb proteininin fosforilemelerini ve retinoblastoma proteininin E2F transkripsiyon faktöründen ayrılmasını engeller (88,89). Diğer ailenin üyelerinden farklı olarak hücre ortamında siklin düzeyindeki artış, p21 fonksiyonlarını inhibe etmektedir. p21 'nin proliferasyon hücre nükleer antijenini (PCNA) bağladığı, DNA replikasyonu ve tamir mekanizmalarında rol oynayan DNA polimerazın alt birimlerinden olan DNA polimeraz α 'yı da bağlayarak fonksiyonlarını engellediği öne sürülmüştür (90). P53'ün, p21 ekspresyonunu uyarması, p53'ün hücre döngüsünü kitleme metodlarından biri olduğu bilinmektedir (91).

Siklin D1

Siklin D1, hücre döngüsü ilerleyişinde gerekli bir düzenleyici proteindir. Siklin D1'in aşırı ekspresyonunun normal hücre döngü kontrolünü ve çeşitli kanser tiplerinin progresyon ve gelişimine neden olduğu öne sürülmüştür (92-94). Siklin D1'in primer lezyonlardan daha yüksek sıklıkta lenf nod tümörlerinde aşırı eksprese olduğu bildirilmiştir. Böylelikle siklin D'nin metastaz işleminde bir role sahip olabileceği de ileri sürülmüştür. Artmış siklin D1'nin, büyüme avantajı sağlayarak hücre döngü ilerleyişini yönetebileceği ileri sürülmüştür (95). Diğer hücre döngü proteinlerine zıt olarak siklin D'nin miktarının azalması oldukça önem arz etmektedir. Bunun öneminin G1 fazı siklinler özellikle D tipi siklinlerin hücre döngüsünün G1 fazı aracılığıyla güçlü bir şekilde hücre progresyonunu kontrol etmesi dolayısıyla olduğu işaret edilmektedir (96,97). Ayrıca siklin D1'in hücre döngü makinesinin potansiyel onkogenik elementleri arasında en güçlü aday olabileceği deneysel olarak kanıtlanmıştır (98). Siklin D1, 11q13 de lokalizedir ve birkaç nedenden dolayı kanserde modifiye lokus için iyi bir aday gen olup siklin D1'i kodlamaktadır. Bu nedenlerden ilki, hem normal hem de neoplazili hücrelerde hücre döngü kontrolünde önemli role sahip bir proteini kodlamasıdır (99). Siklin D1 siklin-bağımlı kinazlar tarafından regüle edilen G1 den S'e geçişte rol oynayan başlıca siklindir (92,100).

Bir diğ er neden ise, siklin D1 mRNA' sının alternatif splicing (alternatif ekleme) göstermesi ve farklı transkriptlerinin translasyonu sonucu transkript a ve b denilen COOH u  domainleri farklı olan ve olası fonksiyonel farklılıklara sahip protein ürünleri üretebilmesidir (101,102).

RAS

Yapılan immünohistokimyasal araştırmalarda RAS aşırı ekspresyonunun mide adenokarsinomlarında %60 oranında g zlendiğı bildirilmiştir. Mide kanserlerinde RAS mutasyonlarının ülkelere göre farklı bir dağılım gösterdiği saptanmıştır. Örneğın Asya  lkelerinde daha yüksek oranda saptanan bu mutasyonların Avrupa ve Kuzey Amerika'da daha az oranda görüldüğü ancak bu anlamlı değışimin sebebin henüz tam olarak anlaşılamadığı rapor edilmiştir (103).

Büyüme Faktörleri

Büyüme faktörleri ilk olarak G_0 ve G_1 fazındaki hücelere etki ederler. Erken G_1 'de bu faktörlerin ortamdan uzaklaşmaları hücrelerin G_0 fazına geri dönmeleriyle sonuçlanabilir. Fakat G_1 'in sonlarına doğru hücreler sınır noktasını geçtikten sonra büyüme faktörleri ortamdan uzaklaşsa bile hücreler tekrar G_0 noktasına geri dönmezler ve döngüye devam ederek S fazına girerler (104). Hücre döngüsünün kontrol noktaları, biyokimyasal olarak birbirleriyle ilişkisi olmayan aşamalar arasında bağlantı kuran biyokimyasal yollar olarak tanımlanmaktadır (105). Döngünün kilitlenmesi ya da ertelenmesi, ekstrinsik veya intrinsik olabilen çeşitli faktörler tarafından oluşturulabilen ve farklı kontrol noktalarını etkileyebilen bir durumdur. İntrinsik faktörler olarak hücrenin hacmi, büyüklüğü söz konusu olup, bu faktörler memeli hücrelerinde diğer canlılara göre daha az önem taşımaktadır (106). Tüm hücreler için önemli olan, hücrenin döngüdeki ilerleyiş oranını ve kararlılığını etkileyen hücre beslenmesi ise, ekstrinsik faktörlerdendir. Hücreler açlık durumunda bırakılarak kültür ortamına alındıklarında hücre döngüsünden çıktıkları ve G_0 fazına girdikleri görülmüştür. Tüm hayvan deneylerinde açlık durumunun, kayıplara bağlı olarak organ ve doku atrofisini uyardığı gözlemlenmiştir. Bu hücrelerin döngüye tekrar katılmaları sadece beslenme durumu tekrar iyileştirildikten sonra mümkün olmaktadır (107-108).

Mide karsinomunda da tirozin-kinaz reseptörlerini kodlayan proto-onkogenler içinde en sık görüleni hepatosit büyüme faktörü (HGF) reseptörünü kodlayan c-met genidir. İlerlemiş mide karsinomlarında, özellikle skiröz karsinomlarda c-met geninde amplifikasyon sık görülür. Mide karsinomlarında c-met geninin 7.0 kb ve 6.0 kb kopyalarının dışavurumu sıklıkla görülen bir bulgudur. Özellikle 6.0 kb kopyası hem tümör dokusunda hem de hücre dizilerinde saptanmıştır. Tümör hücrelerinde c-met'in aşırı dışavurumunu, stromal hücrelerin ürettiği HGF ile birlikte mide karsinomu morfogenezini ve tümörün ilerlemesini etkiler. Tümörün parenkimal (epitelyal) hücrelerinin ürettiği büyüme faktörleri veya interlökin-1a (IL-1a) stromal hücreleri aktive ederek bunlardan HGF salgılanmasını sağlar.

HGF bir kolondaki tümör hücrelerinin tübüler yapılar oluşturmalarını sağlar ve böylece iyi diferansiye mide karsinomları gelişir. Tübüler yapıları oluşturan tümör hücrelerinde E-cadherin ve catenin dışavurumu mevcuttur. Aksine, eğer bir hücre klonunda E-cadherin veya catenin'ler azalmış ise veya hiç üretilmiyorsa bu hücreler belirgin bir yapı oluşturmaz ve stroma içinde dağınık olara bulunur. Bu da az diferansiye veya skiröz karsinomların gelişmesine yol açar. TMK-I mide karsinomu hücre dizilerinde de HGF ile birlikte E- cadherin yoluyla, mide karsinomlarında hücre adhezyonunu düzenleyen bir faktör olduğunu desteklemektedir.

K-sam geni keratinosit büyüme faktörü için uygun olan hücre reseptörlerini kodlar. Az diferansiye ve skiröz mide karsinomlarında K-sam geninde amplifikasyon olduğu gözlenmiştir. Skiröz karsinomlarda K-sam genindeki amplifikasyon c-met genindeki amplifikasyondan bağımsız olarak ortaya çıkmaktadır. En az 4 farklı tipte K-sam cDNA'sı tanımlanmıştır. K-samI ve K-samII cDNA'ları membran bağımlı reseptörleri; K-samIII ve IV ise sekresyon yapan tipte reseptörleri kodlar. K-samII dışavurumu sadece karsinom hücre dizilerinde saptanmıştır, sarkom hücre dizilerinde böyle bir dışavurum gözlenmemiştir. Ayrıca, mide karsinomlarının sadece iyi diferansiye tipinde c-erbB2 amplifikasyonu saptanmıştır ve c-erbB2 aşırı dışavurumunun karaciğer metastazı ile yakın ilişkisi olduğu bildirilmektedir. c-Ki-ras nokta mutasyonu iyi diferansiye karsinomlarda %9-18 oranında görülür iken az diferansiye karsinomlarda bu bulgu yoktur (46).

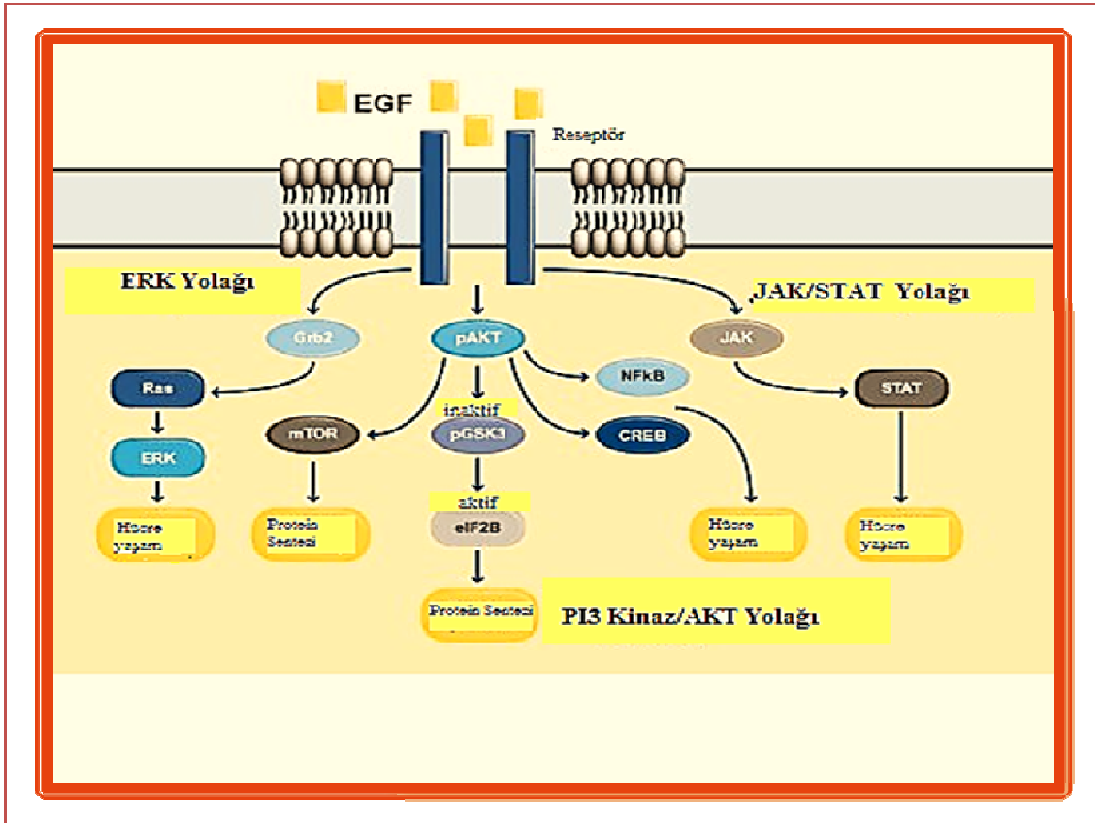
Mide karsinom hücrelerinde çok sayıda büyüme faktörü dışavurumu vardır. Bunlar çeşitli barsak hormonları, sitokinler, TGF-alfa, EGF, amfiregulin, TGF-beta, trombosit köken alan büyüme faktörü (PDGF), insülin benzeri büyüme faktörü (IGF) temel fibroblast büyüme faktörü (bFGF), İnterlökin (IL) IL-1alfa ve IL-6 gibi büyüme faktörleridir. Bunların içinde ilişkili peptidlerden olan amfiregulin, her iki tip mide karsinomu için ortak olan büyüme uyaranlarından. Gen amplifikasyonu olmaksızın, TGF-alfa ve EGF reseptörlerinde senkranoz bir aşırı ekspresyon gözlenebilir. Bu, bir hücrede biyolojik olarak maligniteyi gösteren bir bulgudur. Tümör hücrelerinde bu moleküllerin aşırı ekspresyonu ile mide karsinomu arasında sıkı bir ilişki olduğu gösterilmiştir.

Birçok mide karsinomunda TGF-beta tipI reseptörlerinde azalma görülür ve TGF-beta'yı inhibe eden elemanları bağlayan protein düzeyinde de azalma vardır. TGF-beta reseptör genlerindeki değişiklikler, mide karsinomunda hücre üreyişini inhibe edecek olan TGF-beta etkisini ortadan kaldırır. TGF-beta reseptörlerindeki değişiklikler hem EGF ve IL-1alfa birikimi ile hem de EGF-ilişkili peptid/reseptör kompleksiyle yakın ilişki gösterir. Bu ilişkinin mide karsinomunun ilerlemesini kolaylaştırdığı düşünülmektedir. Mide karsinomu hücrelerinde TGF-alfa, amfiregulin, TGF-beta ve IL-alfa'nın dışavurumunu sağlarken; IL-1alfa da bu dışavurumu arttırır.

EGF GENİ, YAPISI, EGF A61G POLİMORFİZMİ

Epidermal büyüme faktörü (EGF), ilk kez 1959 yılında Cohen ve Levi-Montalcini tarafından yılan zehirli özleri sinir büyüme faktörü (NGF) araştırılırken bulunmuştur (109).

EGF geni 4. kromozomun uzun kolunun 25-27 segmentinde lokalize olmuştur. 24 ekzon ve 23 intron içermektedir. EGF 6.045 dalton ağırlığında tek monomerli bir polipeptiddir. 110 kb'lık genden sentezlenen 4.8 kb ağırlığında mRNA bölgesi tarafından kodlanmaktadır. EGF Ras/Raf/MAPK veya fosfoinozitol 3 kinaz (PI3K) gibi sinyal yollarını reseptörüne bağlanarak aktive etmekte ve böylece proliferasyonu, farklılaşmayı ve epitel dokulardaki tümörogenezi tetikleyebilmektedir (10-13).



Şekil 2-3:EGF ve EGFR Sinyal Yoluğu (110)

Fizyolojik koşullar altında plazmada sınırlı miktarda büyüme faktörü bulunmaktadır (111). EGF çeşitli vücut sıvıları ve dokularında önemli miktarda tükürük, safra, pankreas suyu, amniyotik sıvı, meme sıvı ve salgılar, mide ve duodenum içeriği ve idrarda görülmektedir (112-113).

EGF birçok doku tipinin büyümesini uyaran bir büyüme faktörüdür, in vivo ve in vitro ortamda hedef dokulara bağlı olarak çok çeşitli biyolojik fonksiyonlara katkı sağlamaktadır. İn vivo olarak, EGF anjiogenez, karaciğer rejenerasyonu, epitel gelişimi, ve gastrik asit sekresyonunu inhibe edebilmektedir. Büyüme faktörlerinin fonksiyon mekanizması kanser hücrelerinde bozulmakta ve sıklıkla proliferasyon açısından uyarılmaktadırlar. EGF hücre yaşam döngüsünde kilit rol oynayan en önemli ekstraselüler moleküllerden bir tanesidir (114-115).

Büyüme faktörü EGF; DNA sentezini, hücresel farklılaşmayı ve çoğalmayı, sinirsel ve glial hücrelerin fonksiyonlarını ve EGFR'ye bağlanarak sinir sistemine ait yolları etkileyebilmektedir (116). Çeşitli çalışmalarda EGF'nin glial malign tümörlerde, meme, pankreas ve karaciğer kanserinde aşırı eksprese olduğu ve malign hücrelere dönüşümü hızlandırarak, hücre bölünmesini teşvik ederek tümör oluşumu ve gelişiminin hayati rol oynadığı bildirilmiştir (117).

Tek nükleotid polimorfizmleri insanlarda genetik çeşitliğinin en yaygın kaynağıdır, ve bireyin kansere yatkınlığını etkileyebilir (118). Ayrıca otokrin/parakrin mekanizmalara ek olarak gen amplifikasyon ve aktivasyonu ile ilgili bazı EGF ve EGFR'deki bazı mutasyonları (EGF A61G, EGFR vIII) tümör invazyonu ve tümör habisleşmesi ile ilişkili EGF/EGFR fonksiyonlarını etkileyebilmektedir (116-117). EGF 5' UTR bölgesinde yer alan fonksiyonel EGF +61 A-G SNP ilk kez Shahbazi ve arkadaşları tarafından bildirilmiştir (16). Bu çalışmada aynı zamanda G allelinin gen transkripsiyonunu arttırarak artan EGF protein ekspresyonu ile ilişkili olduğu ifade edilmiştir. Genel populasyona bakıldığında malign melanomlarda da G allelinin çok yüksek sıklıkta görüldüğü rapor edilmiştir (17).

Bir çok moleküler epidemiyolojik çalışma çeşitli toplumlarda EGF A61G polimorfizm ve kanser riski arasındaki ilişkiyi değerlendirmek amacıyla yürütölmeye devam etmektedir. (16-17). Ancak literatürlerde, EGF A61G polimorfizmi ve kanser riski arasındaki ilişki açısından çelişkili sonuçlar bildirilmektedir. Çalışmamızda da mide kanserinde EGF A61G gen polimorfizminin önemi araştırılacaktır. Mide kanserine ait risk durumları, EGF A61G allel ve genotip dağılımlarının, serum EGF düzeylerinin, klinik diğör parametrelerle ilişkileri değeriendirilmeye çalışılacaktır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

SEÇİLEN ÖRNEKLERİN TANIMI

Bu çalışmaya iki örnek grubu dahil edilmiştir. Birinci grupta, 146 kişiden oluşan herhangi bir malignite bulgusu ve tercihen ailede kanser hikayesi olmayan sağlıklı bireyler kontrol grubuna alınmıştır.

İkinci grupta İkinci grup ise, İstanbul Eğitim ve Araştırma Hastanesi Genel Cerrahi Kliniği tarafından takip edilen mide kanseri tanısı konmuş 84 hastayı kapsamaktadır. Projemize dahil edilen, mide kanseri tanısı konmuş hastalarımızın, klinik, histopatolojik değerlendirmeleri ve örnek alımları yukarıda belirtilen klinik tarafından gerçekleştirilmiştir. Polimorfizm çalışması için sağlıklı ve mide kanserli bireylerin kan örnekleri EDTA'lı tüpe alınıp, DNA izolasyonu yapılmış ve 84 mide kanserli hasta, ve 146 sağlıklı kontrolde EGF (A61G) gen polimorfizm ve serum EGF düzeyleri analizleri yapılmıştır.

Mide kanserli hasta ve normal bireylerden sağlanan kan örneklerinden DNA izolasyonu amonyum asetat ve proteinaz K'nın kullanıldığı tuz çöktürme metoduyla elde edilmiştir (119).

KULLANILAN KİMYASAL MADDELER

Agaroz(Promega MBG), Amonyum asetat(Sigma A-8920), Amonyum klorür(Sigma A-5666), Amonyum sülfat, Asetik asit(MECK K-04134156), Borik asit(Sigma B-6768), Bromfenol blue(Sigma B-6896), DNA marker(Fermentas), EDTA(Merck K-90602121), Etanol(%99 Tekel), Etidyum Bromid(Sigma E-8751), Hidroklorik asit(% 37 Merck K-13190114), İzopropanol, Potasyum bikarbonat(Merck

K-126223552), Potasyum hidroksit(Sigma P 1767) Primerler(Fermentas), Proteinaz K(Stratagene 300-141) Sodyum dodesil (lauryl) sülfat(Sigma L-5750), Sodyum hidroksit(Merck C754962), Sodyum klorür(Carlo Erba 368257), Trizma baz(Sigma T-1503), Taqpolimeraz(Promega), Xylene blue(Fermentas).

KULLANILAN GEREÇLER

Elektroforez için güç kaynağı(Titan plus Helena Laboratories), Elektroforez sistemi(LKB 2013 miniphor electrophoresis, LKB 2012 maxiphor electrophoresis), Hassas terazi (Mettler) , Isıticılı manyetik karıştırıcı(Elektromag) , Mikrodalga fırın(Philco) ,Mikrosantrifüj(TDX) , PCR cihazı (MJ Research Techne) , pHmetre(Hanna), Pipet takımı(Brand), Santrifüj(Heraeus), Spektrofotometre(Shimadzu UV-1208), Su banyosu (Elektromag) , UV transilluminator(Stratagene UV/White light Transilluminator),Vorteks karıştırıcı (Nuve mix), nanodrop (ND-1000 spectrophotometer).

ÇÖZELTİLER

DNA İZOLASYONUNDA KULLANILAN ÇÖZELTİLER

Eritrosit Parçalama Tamponu (Lysis Buffer)

8.74 gram Amonyum klorür, 1 gram Potasyum bikarbonat, 200 µl 0.5 M Etilen diaminetetraasetat (EDTA)'ın tartımları yapılarak erlen içine alındı. 900 mililitre distile su eklendi ve çözeltinin pH'sı 1N NaOH ile 7.4'e ayarlandı.Daha sonra balon joje içine alınarak 1 litreye tamamlandı.Çözelti ısıya dayanıklı cam şişelere aktararak 120°C'de 15 dakika otoklavlandı ve +4°C'de saklandı.

0.5 M Disodyumetilendiaminteraasetat (EDTA) (pH 8.0)

186.1 gram Etilendiamintetraasetat (EDTA) tartılarak beher içine alındı ve 800 ml distile su eklendi.Manyetik karıştırıcı yardımıyla çözündürüldü ve pH'sı NaOH çözeltisi ile 8.0'e ayarlanarak distile su ile 1 litreye tamamlandı. 120°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildi.

4 M Sodyum Klorür (NaCl)

233.6 gram NaCl tartılarak erlene alındı. Üzerine 800 mililitre distile su ilave edildi ve manyetik karıştırıcı yardımıyla iyice çözündürüldü. Balon jojeye aktarılarak 1 litreye tamamlandı. 120°C’de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildi.

Lökositleri Parçalama Tamponu (White Blood Cell Buffer-WBL)

25 mililitre 4 M NaCl ve 50 mililitre 0.5 M Etilendiaminasetat (EDTA) balon jojeye konularak 1 litreye tamamlandı. 120°C’de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildi. Oda ısısında saklandı.

1 M Tris Tamponu (Stok)

121.1 gram Tris baz tartılarak bir behere alındı.Üzerine 42 µl hidroklorik asit (HCl) ile yaklaşık 800 mililitre distile su eklenerek manyetik karıştırıcı yardımıyla çözündürüldü. Daha sonra balon jojeye aktarıldı ve 1 litreye tamamlandı. 120°C’de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildi.

9.5 M Amonyum Asetat

73.22 gram amonyum asetat tartılarak beher içine alındı. Üzerine 80 mililitre distile su eklenerek manyetik karıştırıcıda çözündürüldü. Balon jojeye aktarıldı ve distile su ile 100 mililitreye tamamlandı. 0.22 mikronluk filtreden geçirilerek sterilize edildi ve +4°C’de saklandı.

% 10’luk Sodyum Dodesil Sülfat (SDS)

10 gram Sodyum dodesil sülfat tartıldı. Beher içine alınarak üzerine 80 mililitre distile su eklendi. Manyetik karıştırıcı yardımı ile çözündürüldü ve pH’sı 7.2’ye ayarlandı. 0.22 mikronluk filtreden geçirilerek sterilize edildi ve oda ısısında saklandı.

Proteinaz K (20 mg/ml)

20 miligram Proteinaz K tartılarak steril bir tüp içinde steril distile su ile 1 mililitreye tamamlandı. -20 °C’de saklandı.

AGARUZ JEL ELEKTROFOREZİNDE KULLANILAN ÇÖZELTİLER

Agaroz Jel Yükleme Tamponu (5X)

20 gram Ficoll 400, 1 gram SDS, 0.2 mililitre 0.5 M ,etilendiamintetraasetat, 1 mililitre 1M Tris (pH 8.0), 200 miligram Bromfenol blue, 200 miligram xylene cyanol tartılarak steril distile su ile 100 mililitreye tamamlandı. Oda ısısında saklandı.

Etidyum Bromür (10 mg/ml)

1 gram Etidyum bromür tartılarak steril distile su ile 10 mililitreye tamamlandı.

5X Tris-Borik Asit-Etilendiamintetraasetat (TBE)

54 gram Tris baz ve 27,5 gram borik asit tartılarak beher içine aktarıldı. Üzerine 20 mililitre 0.5 M EDTA (pH 8.0) ve 800 ml. distile su ilave edilerek manyetik karıştırıcıda çözüldürüldü.Çözelti balon jojeye aktararak 1 litreye tamamlandı ve 120°C’de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildi. Oda ısısında saklandı.

KULLANILAN YÖNTEMLER

PERİFERİK KANDAN DNA İZOLASYONU

10 ml periferik kan örneği steril EDTA’lı tüplere alındıktan sonra çalışma için falkon tüpüne aktarıldı. Üzerine 1:3 oranında (30 ml) eritrosit parçalama çözeltisi eklenerek karıştırıldı ve +4°C’de 15 dakika bekletildi. +4°C’den çıkarılan örneklerin 1500 rpm’de 10 dakika santrifüj edilerek süpernatant kısımları atıldı ve pelletleri tamamen süspanse edilerek üzerlerine tekrar 15-20 ml. eritrosit parçalama çözeltisi eklendi. Örnekler +4°C’de 15 dakika bekletildikten sonra 1500 rpm’de 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatantları atılarak süspanse edildi. Süspanse olan pellet üzerine

500 µl %10'luk SDS, 75 µl proteinaz K (20mg/ml) ve 9.4 ml lökosit parçalama çözeltisi (WBL) eklenerek 56 °C su banyosunda 1 gece inkübe edildi. İnkübasyon sonrası her 1 ml. örnek başına 0.37 ml. olacak şekilde 9.5 M Amonyum asetat çözeltisi eklendikten sonra yavaşça karıştırıldı ve 3000 rpm'de 25 dakika santrifüj edilerek proteinler çöktürüldü (119).

Elde Edilen DNA'nın Konsantrasyon ve Kalitesinin Tayini

Spektrofotometrik olarak, 260 nm ve 280 nm dalga boylarında yapılan ölçümlerle DNA'nın saflığı ve konsantrasyonu belirlendi. 50µg/ml çift iplikçikli DNA içeriğinin 260 nm dalga boyunda 1 optik densite (OD) verdiği kabul edilmektedir. 260 nm'deki ölçüm değeri aşağıdaki formüle uygulanarak DNA konsantrasyonu hesaplandı.

$$\text{DNA Konsantrasyonu: } OD_{260} \times 50\mu\text{g/ml}$$

DNA örneklerinin saflığı OD_{260}/OD_{280} oranı kullanılarak belirlendi. Yeterince iyi saflıkta kabul edilen DNA'nın OD_{260}/OD_{280} değeri yaklaşık 1.8'dir. Ortamda fenol veya protein mevcutsa bu oran 1.8'den küçük olacaktır. OD_{260}/OD_{280} değeri 2'den büyükse ortamda RNA bulunduğu anlamına gelir.

EGF GEN POLİMORFİZMLERİNİN TESPİT EDİLMESİ

EGF (A61G) Gen Polimorfizminin Tespitinde Kullanılan Primer Dizileri

EGF (A61G) ilgili gen bölgesinin çoğaltılmasında kullanılan primerlerin nükleotid dizisi aşağıda verildiği şekildedir. Bu primerler uluslar arası yayınlarda doğrulanmış primer dizileridir (120).

İleri primer: 5' - TGTCATAAAGGAAAGGAGGT- 3'

Geri primer: 5' - TTCACAGAGTTTAACAGCCC -3'

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction-PCR)'da Kullanılan Kimyasal Maddeler ve PCR'ın Hazırlanışı

DNA Taq polimeraz enzimi (5U/ μ l) (Fermentas EPO402)

PCR reaksiyonundaki son konsantrasyonu 1 unite olacak şekilde 25 μ l lik PCR reaksiyonuna eklendi.

dNTP'ler (100 μ mol/ml) (Fermentas R0171)

100 mM'lık dNTP'lerden (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) 10' ar μ l alınıp (toplam 40 μ l) 1 μ l'lık tüpe kondu ve üzerine 960 μ l distile su eklenerek (d₂H₂O) 1000 μ l 1mM 'lık dNTP karışımı hazırlandı ve -20 °C derin dondurucuda saklandı. PCR reaksiyonuna bu stoktan alınan dNTP karışımı kullanıldı.

PCR Karışımının Hazırlanışı

Toplam reaksiyon hacmi 25 μ l olacak şekilde, Tablo3-1'deki bileşenler sırası ile 0,2 ml'lik steril tüpe konuldu. 10 örnek çalışılacak ise pozitif ve negatif kontrol için birer tane ve pipetleme hataları için de bir tane olmak üzere toplam 13 üzerinden reaksiyon karışımı hazırlandı.PCR karışımının hazırlanma işlemlerinin hepsi buz üzerinde soğukta ve steril kabin içerisinde yapıldı.

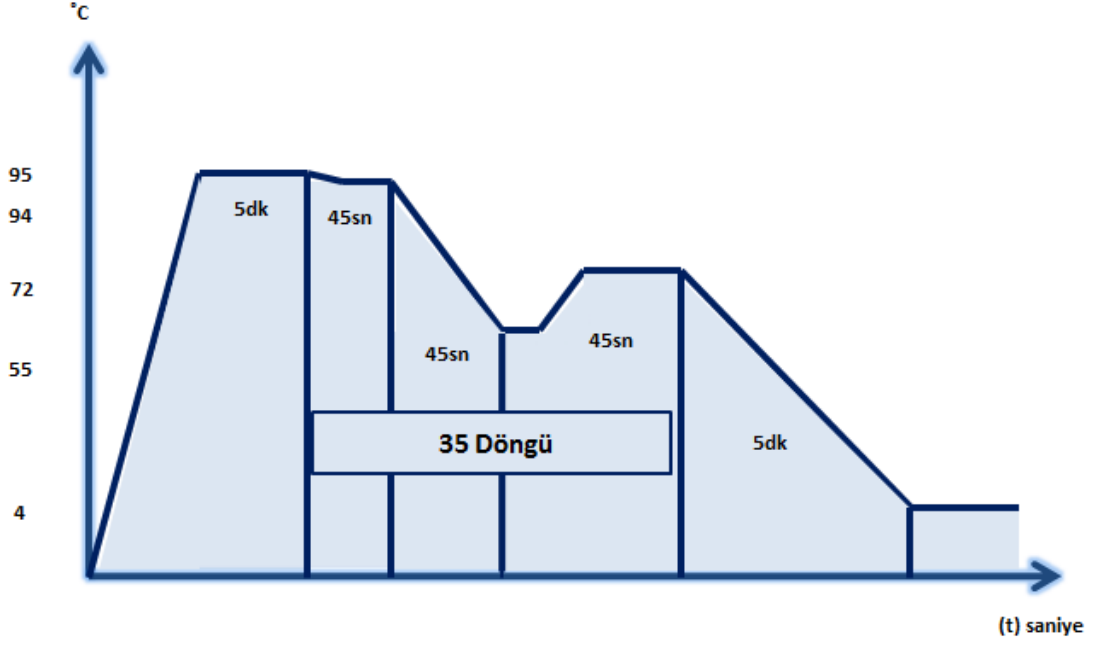
Tablo 3-1 : PZR Karışımının Hazırlanması :

Malzemeler	İlk konsantrasyon	Son konsantrasyon	Kullanılan hacim	10 + 3' lük reaksiyon
PCR Tamponu	10 X	1X	3 µl	39µl
Dntp	1mM	200 µM	3 µl	39µl
İleri primer	100pmol/µl	4 pmol/µl	1.2µl	15.6 µl
Geri primer	100pmol/µl	4 pmol/µl	1.2 µl	15.6 µl
MgCl ₂	25 Mm	-	1,2 µl	15.6µl
Taq polimeraz	5U/ µl	1 U	0,5 µl	6.5 µl
Distile su	-	-	12.9Sµl	167.7µl
DNA	-	150-200 ng.	2 µl	-

Taq polimeraz eklendikten sonra hiç vakit kaybetmeden tüp içine konan bileşenlerin iyice karışması için pipetleme işlemi yapıldı. Örnek sayısı kadar 0,2 ml'lik tüplere 23 µl reaksiyon karışımı dağıtıldı. Daha sonra her tüpe 2 µl DNA eklenerek yeniden pipetleme yapıldı ve daha önceden 95 °C sıcaklığa çıkarılmış PCR cihazına(Techne Mini Termal Cyler)örnekler yerleştirildi ve PCR işlemi başlatıldı.

PCR Şartları

EGF (A61G) gen polimorfizmini tespit etmek için kullanılan ileri ve geri primerler için annealing derecesi optimize edilerek 60 °C sıcaklık seçilmiştir (Şekil 3-1).



Şekil 3-1: EGF (A61G) Gen Polimorfizmi PZR Koşulları

AGARUZ JEL ELEKTROFOREZİNDE KULLANILAN KİMYASAL MADDELER VE GEREÇLER

5X TBE (Tris Buffer EDTA) Stok Tampon Hazırlanışı :

54gr Tris base (Sigma, T-8524) ve 27,5 gr. Borik asit (Sigma, B-6768) tartılarak 800 ml distile suda çözüldü. Üzerine 20 ml 0,5 M EDTA (pH :8,0) ilave edildikten sonra 1000 ml'ye tamamlandı. Elektroforezde stok 5X TBE tamponundan hazırlanan 1 X TBE kullanıldı.

Yükleme Tamponu (Loading Buffer : 6X)

Yükleme tamponu (loading buffer) olarak %40 sükröz + %0,25 bromfenol mavisi karışımı kullanıldı.

% 2'lik AgaroZ Jel Hazırlanması:

- 4 gr. agaroz (Sigma) tartılarak erlen içine konuldu. Üzerine son hacim 200 ml. olacak şekilde 1X TBE tamponu eklenerek, mikrodalga fırında kaynatma yolu ile çözündürüldü.
- Erlenin sıcaklığı elle tutulabilecek sıcaklığa düştüğünde (50-55°C) çözünmüş agaroz jel içine 4,5 µl etidyum bromür (10mg/ml) ilave edildi.
- Hazırlanan jel yatay jel yatağı içine dökülerek, yükleme kuyucuklarının oluşması için tarak yerleştirilerek donmaya bırakıldı.
- Jel donduktan sonra tarak dikkatlice çıkarıldı ve jel örnek yüklenmesi için hazır duruma geldi.

PCR Ürünlerinin % 2'lik Jele Yüklenmesi:

- %2'lik jel hazırlandıktan sonra 1X TBE tamponu içeren jel tankı içine uygun şekilde konuldu.
- AgaroZ jelin üzerini 2-3 ml gelecek şekilde 1X TBE tamponu jel üzerine eklendi.
- 7 µl PCR ürününe, 3 µl yükleme tamponu (6X) eklenip pipetleme yapılarak karıştırıldı. 10 µl'lik örnek karışımı kuyucuklara sırasıyla yüklendi.

Yükleme işleminden sonra jel tankının kapağı kapatıldı. Güç kaynağı (E-C apparatus Corporation, E-C4000P) 250 miliamper 120 volt elektrik gücüne ayarlanarak elektroforez jel yürütülmesi gerçekleştirildi.

PCR Ürünlerinin Kontrolü:

EGF (A61G) ilgili gen bölgeleri ile ilgili PCR ürünlerinin oluşup oluşmadığını kontrol etmek amacıyla PCR tüplerinden alınan 7 µl örnek 3 µl yükleme tamponu ile karıştırılarak yukarıda tanımlanan elektroforez sisteminde yürütüldü. Yürütme işleminden sonra jel UV ışık altında (304 nm dalga boyunda) PCR ürünleri incelendi ve fotoğrafı UV transillüminator düzeneğinde çekildi.

EGF (A61G) GEN POLİMORFİZMİ ENZİM KESİMİ

EGF (A61G) Gen Polimorfizminin Tespitinde Kullanılan Enzim ve Kimyasal Maddeler

Amplifiye olan PCR ürünleri AluI enzimi 37°C’de 16 saat kesilmiştir. Kesim işleminde bir örnek için 10 µl PCR amplifikasyon ürünü, 9 ul distile su, 1µl 10x buffer kullanılmıştır.

Tablo 3-2 : EGF (A61G) Gen Polimorfizminin Tespitinde Kullanılan Enzim ve Kimyasal Maddeler

Malzemeler	İlk konsantrasyon	Son konsantrasyon	Eklenen hacim
PCR ürünü			10 µl
Distile su			9µl
10X Buffer R Tamponu	10 X	0,8 X	1µl
Blp I enzimi	10 U/µl	5 U/µl	0,5 µl

Toplam: 20,5 µl

EGF (A61G) Gen Polimorfizmlerinin Değerlendirilmesi ve Kontrolü

- %3’lük agaroz jel hazırlandı.
- İlgili kesim enzimleri ile kesilen PCR ürünlerinden 8 µl ve yükleme tamponundan 2 µl alınarak karıştırılıp %2’lik agaroz jeldeki kuyulara yükleme yapıldı.
- Kesim ürünleri (Fermentas 50 bp) DNA moleküler marker ile birlikte yürütüldü.
- Yürütme sonrası jel üzerindeki bantlar, UV ışık (304 nm) altında incelendi.

EGF (A61G) Gen Polimorfiziminin Değerlendirilmesi

242 bç'lik PCR ürünleri uygun koşullar altında AluI enzimi ile kesilmiştir. Uygulanan işlem sonrası kesim ürünleri AA genotipinde 15, 34, 92, 101 bç GG genotipinde 15, 34, 193 bç heterozigot AG genotipinde ise 15, 34, 92, 101, 193 bç olarak değerlendirilmiştir (Şekil 3-2). Ancak jel görüntüsünde 15 ve 34 bç'lik bantlar gözlenemediğinden ayırım diğer bantların büyüklüklerine göre yapılmıştır.

AA: 15 bç	GG: 15 bç	AG: 15 bç
34 bç	34 bç	34 bç
92 bç	193bç	92 bç
101 bç		101 bç
		193 bç

Şekil 3-2 : EGF (A61G) Gen Polimorfiziminin Şematik Jel Görüntüsü

SERUM EGF DÜZEYİNİN ELİSA YÖNTEMİ İLE TAYİNİ

Deneyimizde kullanılan Serum EGF (ELISA) kitinde kuyular önceden insana özgü poliklonal antikor EGF ile kaplanmıştır. Örnekler (bilinen insan EGF içeriğinin standartları dahil), kontrol numuneleri ve bilinmeyenler bu kuyulara pipetlenir.

İlk inkübasyon sırasında, EGF antijeni sabit antikorlara tek bir bölgeden bağlanırlar. Yıkamadan sonra, EGF'ye özgü biyotinile monoklonal antikorlar eklenir. İkinci inkübasyon sırasında bu antikorlar ilk inkübasyon sırasında ele geçirilen sabit EGF'lere bağlanır.

Yabancı antikorların ortamdan uzaklaştırılmasından sonra Streptavidin-Peroksidaz (enzim) eklenir. Bu enzim, sandviçin dördüncü üyesini tamamlamak için biyotinile antikora bağlanır. Üçüncü bir inkübasyon ve bağlanmamış enzimleri uzaklaştırmak için yapılan yıkamadan sonra substrat solüsyonu eklenir. Bu solüsyon, bağ enzimi üzerinden renk üretmek için çalışır. Bu renkli ürünün yoğunluğu orijinal numunede mevcut EGF konsantrasyonu ile doğrudan orantılıdır.

SAĞLANAN REAKTİFLER

Reaktifler	96 Test Kiti	192 Test Kiti
<i>EGF Standardı.</i> E.coli'den alınarak saflaştırılmış rekombinant EGF. %0.1 sodyum azid içerir. Miktarı ve sulandırma hacmi için flakondaki etikete bakın.	2 flakon	4 flakon
<i>Standart Seyreltici Tampon.</i> %0.1 sodyum azid içerir. Her şişede 25 Ml	1 şişe	2 şişe
<i>Antikor kaplı kuyular.</i> 12×8 Kuyu Şeridi	1 plate	2 plate
<i>EGF Biotin Konjugat</i> (Biotin-etiketli anti-EGF). %0.1 sodyum azid içerir. Her şişede 11 mL	1 şişe	2 şişe
<i>Streptavidin-HRP (100X).</i> 3.3 mM timol içerir. Her flakonda 0.125 mL	1 flakon	2 flakon
<i>Streptavidin-HRP</i> <i>Seyreltici.</i> 3.3 mM timol içerir. Her şişede 25 mL	1 şişe	1 şişe
<i>Yıkama Tamponu</i> <i>Konsantresi (25X).</i> Her şişede 100 mL	1 şişe	1 şişe
<i>Stabilize Kromojen,</i> <i>Tetrametilbenzidin (TMB).</i> Her şişede 25 mL	1 şişe	1 şişe
<i>Durdurucu Solüsyon</i> Her şişede 25 mL	1 şişe	1 şişe
<i>Plate Kapakları.</i> Yapışkan bantlar.	3	6

REAKTİF HAZIRLAMA VE DEPOLAMA

A. İnsan EGF Standardının Sulandırılması ve Seyreltilmesi

- Standardlar, Standart Seyreltme Tamponuyla sulandırıldı. Talimatları için standart flakon etiketi bakıldı. Döndürüldü, hafifçe karıştırıldı ve tam sulandırmayı sağlamak için 10 dakika beklenildi. Sulandırıldıktan sonra 1 saat içinde standart kullanıldı.
- 0.570 mL Standart Seyreltme Tamponu içeren bir tüpe sulandırılmış standarttan 0.030 mL eklendi. 250 pg/mL Hu EGF şeklinde etiketlendi. Karıştırıldı.
- 125, 62.5, 31.2, 15.6, 7.8 ve 3.9 pg/mL Hu EGF etiketli her 6 tüpe 0.300 mL Standart Seyreltme Tamponu eklendi.
- Aşağıdaki seyreltme tablosunda açıklandığı gibi standartların seri seyreltmeleri oluşturuldu. Adımlar arasında iyice karıştırıldı.

B. İnsan EGF Standart Seyreltilmesi.

Standart	Ekle:	İçine:
250 pg/Ml	2. adımda açıklandığı gibi hazırlayın.	
125 pg/Ml	0.300 mL, 250 pg/mL standarttan	0.300 mL Seyreltme Tamponundan
62.5 pg/Ml	0.300 mL, 125 pg/mL std.tan	0.300 mL Seyreltme Tamponundan
31.2 pg/mL	0.300 mL, 62.5 pg/mL std.tan	0.300 mL Seyreltme Tamponundan
15.6 pg/mL	0.300 mL, 31.2 pg/mL std.tan	0.300 mL Seyreltme Tamponundan
7.8 pg/mL	0.300 mL, 15.6 pg/mL std.tan	0.300 mL Seyreltme Tamponundan
3.9 pg/mL	0.300 mL, 7.8 pg/mL std.tan	0.300 mL Seyreltme Tamponundan
0 pg/mL	0.300 mL, Seyreltme Tamponundan	Boş bir tüp

C. Streptavidin-HRP (100X)'in Seyreltmesi

Streptavidin-HRP (100X) %50 gliseroldür. Bu solüsyon viskozdur. Doğru seyreltme sağlamak için, Streptavidin-HRP (100X)'in oda sıcaklığına erişmesi beklendi. Hafifçe karıştırıldı. Streptavidin-HRP (100X)'i yavaşça pipetlendi. Temiz emici kağıt ile pipet ucunda kalan atık konsantre solüsyonu hafifçe silindi. Seyreltme aşağıdaki şekilde uygulanmıştır.

8-Kuyulu Şeritlerden # Tane	Streptavidin-HRP (100X)'in Hacmi	Seyrelticinin Hacmi
2	20 µL solüsyon	2 mL
4	40 µL solüsyon	4 mL
6	60 µL solüsyon	6 mL
8	80 µL solüsyon	8 mL
10	100 µL solüsyon	10 mL
12	120 µL solüsyon	12 mL

D. Yıkama Tamponunun Seyreltilmesi

Yıkama Tamponu konsantresinin (25X) oda sıcaklığına gelmesi beklendi ve çöken tuzların eridiğinden emin olmak için karıştırıldı. 24 hacim deiyonize su ile 1 hacim Yıkama Tamponu konsantresi (25X) seyreltildi (örneğin; 50 mL 1,25 litreye seyreltilebilir, 100 mL 2,5 litreye seyreltilebilir). Konsantre ve seyreltilmiş yıkama tamponlarını buzdolabında saklandı.

METODUN UYGULANIŞI

1. Test için gerekli olan 8-kuyulu şerit sayısı belirlendi.
2. Standart Seyreltici Tampon ile serum örnekleri 1:20 oranında seyreltildi (örneğin; 180 µL Standart Seyreltici Tampona 20 µL örnek eklendi, daha sonra seyrelttiğimiz örneğin 20 µL'si 380 µL Standart Seyreltici Tampona eklendi.).
3. Kuyuları sıfırlamak için 100 µL Standart Seyreltici Tampon eklendi. Kromojen boşluk için ayrılan kuyular boş bırakılmalıdır.
4. Standartlardan, kontrollerden ve örneklerden uygun mikrotiter kuyularına 100 µL eklendi. Karıştırmak için plate'in bir tarafından hafifçe vuruldu.
5. Plate kapatıldı ve **2 saat oda sıcaklığında** inkübe edildi.
6. Solüsyonu kuyulardan boşaltıldı , aspire edildi ve sıvı kuyulardan atıldı. Kuyular 4 kez yıkandı.
7. *Biyotinile Hu EGF Biyotin Konjugat* solüsyonundan 100 µL pipetlendi ve kromojen boşluk dışındaki tüm kuyulara koyuldu. Karıştırmak için plate'in bir tarafından hafifçe vuruldu.
8. Plate kapatıldı ve **1 saat oda sıcaklığında** inkübe edildi.
9. Solüsyon kuyulardan boşaltıldı, aspire edildi ve sıvı kuyulardan atıldı. Kuyular 4 kez yıkandı.
10. Kromojen boşluk dışındaki tüm kuyulara 100 µL Streptavidin-HRP Çalışma Solüsyonu eklendi.
11. Plate kapatıldı ve 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
12. Solüsyon kuyulardan boşaltıldı, aspire edildi ve sıvı kuyulardan atıldı. Kuyular 4 kez yıkandı.
13. Her kuyuya 100 µL Stabilize Kromojen eklendi. Kuyulardaki sıvılar mavi olmaya başlayacaktır.
14. Karanlıkta ve oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi.
15. Her kuyuya 100 µL Durdurucu Solüsyon eklendi. Karıştırmak için plate'in bir tarafından hafifçe vuruldu. Kuyulardaki solüsyonların rengi maviden sarıya dönmelidir.
16. 100 µL Stabilize Kromojen ve 100 µL Durdurucu Solüsyondan oluşan kromojen boşluğa karşılık plate okuyucuda da boşluk bırakarak 450 nm'de her kuyunun absorbanı okundu. Durdurucu solüsyonu ekledikten 2 saat sonra okuma yapıldı.
17. Milimetrik kağıda standartların absorbanı – standart konsantrasyonu grafiği çizildi. (Grafik çizilmeden önce arka plan absorbanı; standartları, bilinmeyenleri ve kontrolleri içeren tüm veri noktalarından çıkarılmış olabilir.). Standart eğri oluşturmak için bu noktalar

aracılığıyla pürüzsüz bir eğri çizildi. Eğri uydurma yazılımı kullanılıyor ise, algoritmanın dört parametresi en iyi eğri uyumunu sağlar.

18. 17. Adımda çizilen standart eğriden bilinmeyen örneklerin ve kontrollerin Hu EGF değerleri okundu. 2. Adımda yapılan serum örneğindeki 1:200 seyreltmeyi düzeltmek için değerleri 200 ile çarpıldı (Yüksek standarda (250 pg / mL) göre daha fazla sinyal üreten örnekler, Standart Seyreltici Tampon ile seyreltilerek tekrar analiz edilmelidir ve bulunan konsantrasyon, uygun seyreltme faktörü ile çarpılmalıdır.).

TİPİK VERİ

Aşağıdaki veri 0-250 pg / ml Hu EGF aralığı üzerinde çeşitli standartlardan elde edildi.

Standart EGF (pg/mL)	Optik yoğunluk (450 nm)
0	0.025 0.027
3.9	0.074 0.079
7.8	0.126 0.128
15.6	0.236 0.241
31.2	0.480 0.473
62.5	0.836 0.835
125	1.578 1.600
250	2.499 2.549

4. BULGULAR

PCR ÜRÜNLERİNİN KONTROLÜNE AİT BULGULAR

EGF (A61G) PZR Ürünlerine Ait Bulgular

EGF (A61G) gen bölgesinin polimorfizmine ait pcr ürünleri %2'lik agaroz jelde yürütülerek kontrol edildi. Agaroz jelde ilgili gen varyasyonunun tespiti için 242 bç'lik özgül PCR ürününe ait bantlar elde edildiği gözlemlendikten sonra bu pcr ürünlerinin AluI enzimi kullanılarak kesimi gerçekleştirildi (Şekil 4-2).

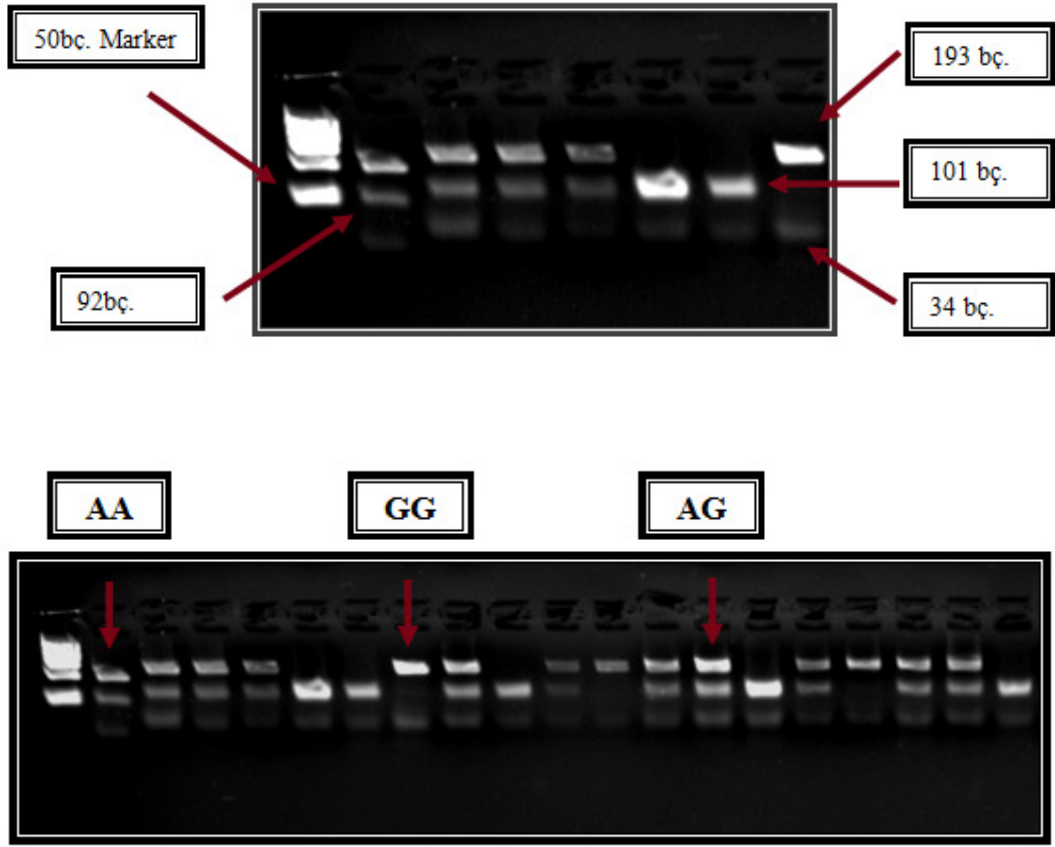


Şekil 4-1: EGF (A61G) PZR Ürünlerine ait Bulgular

KESİM ÜRÜNLERİNİN KONTROLÜNE AİT BULGULAR

EGF (A61G) Ürünlerine Ait Bulgular

EGF (A61G) PZR ürünleri %2'lik agaroz jele yüklenip kontrol edildikten sonra pcr ürünlerine AluI enzimiyle kesim uygulandı. Kesim sonrası elde edilen ürünler %2'lik agaroz jel elektroforez yöntemiyle yürütüldü. EGF (A61G) polimorfizminde AluI enzim kesimi uygulandıktan sonra gözlenen 15, 34, 92, 101 bç'lik bantlar doğal (wild) tip AA genotip olarak değerlendirilirken 15, 34, 193 bç olmak üzere üç bant veren örnekler ise mutant GG genotipi olarak saptanmıştır. Heterozigot mutant AG genotipinde ise 15, 34, 92, 101, 193 bç büyüklüğündeki bantlar izlenmiştir (Şekil 3-1). Ancak jel görüntüsünde 15 ve 34 bç'lik bantlar gözlenemediğinden ayırım diğer bantların büyüklüklerine göre yapılmıştır (Şekil 4-2).



Şekil 4-2: EGF (A61G) Kesim Ürünlerine ait Bulgular

Sonuçların Değerlendirilmesinde Kullanılan İstatistiksel Hesaplar

Bu çalışmanın istatistiksel analizleri SPSS 7,5 paket programı kullanılarak yapılmıştır. İstatistiksel anlamlılık sınırı $p < 0,05$ olarak alınmış olup EGF (A61G), genotip ile allellerinin görülme sıklığının, gruplar arası farklılıklarla beraber değerlendirilmesinde Ki kare (χ^2), sayısal verilerin analizi için ise student-t testi kullanılmıştır.

İSTATİSTİKSEL ANALİZ SONRASINDA ELDE EDİLEN BULGULAR

Çalışmamıza dahil edilen mide kanserli hasta ve kontrol grubuna ait özellikler Tablo 4.1’de verilmiştir. Buna göre mide kanserli hastalar ile kontrol grubu arasında yaş, kilo, boy, VKI, ailede kanser hikayesi, alkol kullanımı açısından istatistiksel anlamlılık mevcut değildi. Yaş parametresine göre yapılan değerlendirme sonucunda kontrol grubunun yaş ortalaması $53,06 \pm 9,58$ hasta grubunun yaş ortalaması $56,94 \pm 13,78$ şeklinde bulunmuştur.

Tablo 4- 1: Çalışma Gruplarına ait Veriler

ANALİZ VERİLER	EDİLEN KONTROL n= 146	MİDE KANSERLİ HASTALAR n=84	p Değeri
Cins			
Kadın, n (%)	55 (37,7)	19(22,6)	0,019
Erkek, n(%)	91(62,3)	65(77,4)	
Yaş Ortalamaları (yıl)	53,06±9,58	56,94±13,78	
Sigara Kullanımı			
İçenler, sayı (%)	55(37,7)	12(14,3)	0,001
İçmeyenler , sayı (%)	91(62,3)	72(85,7)	

n:birey sayısı; tablodaki değerler $X \pm SE$ olarak verilmiştir; gruplararası analiz student t testi ve Kikare (χ^2) ile gerçekleştirilmiştir.

Çalışma grubumuza dahil edilmiş olan mide kanserli hastaların %77,4'ü erkek, %22,6'sı kadınlardan oluşmaktaydı. Hasta grubu boy, kilo ve VKI parametreleri açısından değerlendirildiğinde erkek hastaların boy, kilo, VKI parametreleri ile kadın hastaların boy, kilo ve VKI parametreleri arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunmamıştır.

Mide kanserli hastaların tümör evreleri incelendiğinde, %3,1'i T1, %25'i T2 %32,8'i T3, %39,1'i T4 olarak saptandı. Hastalar lenf nodu tutulumu açısından incelendiğinde, N0 %18,8, N1 %39,1, N2 %26,6, N3 %15,6 olarak değerlendirildi. Hastaların %34,4'ünde uzak metastaz, %57,1'inde perinöral invazyon, %57,1'inde tümör nekrozu, %50'sinde kan damarı invazyonu varlığı durumu saptandı.

Tümör lokalizasyonu, %8,3'ünde antrum büyük kurvartür, %16,7'sinde antrum küçük kurvartür, %12,5'inde kardia, %25'inde antrum korpus, %12,5'inde antrum pilor, %12,5'inde korpus ve %12,5'inde ise antrum bölgesinde yer almaktaydı. Tümör tipleri, %20'sinde tübüler, %13,3'ünde intestinal, %60'inde diffüz taşlı yüzük ve %6,7'sinde müsinöz adeno ca şeklindeydi.

Tablo 4- 2: Mide kanserli hastalarda EGF A61G gen polimorfizmlerine ait genotip ve allel dağılımları

Genotipler ve Alleller	Mide Kanserli Hastalar n(%)	Kontroller n(%)	OR: %95 Güven Aralığı (CI)	P
AA	17(20,2)	48 (32,9)	0,616(0,380-0,998)	P=0,040*
AG	45(53,6)	76(52,1)	1,029(0,799-1,325)	P=0,824
GG	22(26,2)	22(15,1)	1,738(1,027-2,943)	p=0,039*
A Alleli	79(47,02)	172(58,9)	Tablo Kikare (χ^2) =2,36 ^a p değeri: 0.305	
G Alleli	89(52,9)	120(41,09)		

N: birey sayısı; gruplararası analiz Kikare (χ^2) testi ile gerçekleştirilmiştir.

^a Hasta ve kontrol grubu arasında genotip dağılımları ve allel frekanslarının kontrol grubu ile karşılaştırılma sonrası analiz Kikare (χ^2) ile gerçekleştirilmiştir. . * p<0.05.

Tabloda seçilen genotipin, diğer tüm genotiplere karşı OR'si verilmiştir.

EGF A61G gen polimorfizmi sonuçları değerlendirildiğinde AA, AG, GG genotip frekansları hasta grubunda sırasıyla %20,2, %53,6, %26,2, ve kontrol grubunda %32,9, %52,1, %15,1, olarak gözlenmiş olup genotip dağılımı açısından kontrol grubu ve mide kanserli hastalar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır.

EGF A61G gen polimorfizminde AA genotipi mide kanserli hastalarda (%20,2), kontrol grubuna göre düşük frekansta gözlenmiş (%32,9) olup, aradaki fark istatistiksel olarak anlamlılığa ulaşmıştır ($p=0,040$, OR:0,616, %95CI: 0,380-0,998). GG mide kanserli hastalarda (%26,2), kontrol grubuna göre yüksek frekansta gözlenmiş (%15,1) olup, aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0,039$, OR: 1,738, %95CI: 1,027-2,943). AG genotipi mide kanserli hastalarda (%53,6), kontrol grubuna göre daha yüksek frekansta gözlenmiş (%52,31) olup, aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır ($p=0,824$, OR:1,029, %95CI:0,799-1,325).

EGF A61G gen polimorfizmine ait allel frekansları değerlendirildiğinde G allel frekansının mide kanserli hastalarda (%52,9) kontrol grubuna göre (%41,09) yüksek olduğu, A allel frekansının ise hasta grubunda (%20,2) kontrol grubuna (%32,9) göre düşük olduğu gözlenmiş ancak istatistiksel olarak anlamlılık saptanmamıştır. ($\chi^2 2,36$ $p= 0.305$) (Tablo 4.2).

Tablo 4- 3: EGF A61G Gen Polimorfizmi Allel Dağılımları ile Hastaların Klinik ,Prognostik Parametrelerinin Değerlendirilmesi

EGF A61G genotipleri	AA N(%)	AG+GG N(%)	N	P	GG N(%)	AG+AA (%)	N	P
Cins								
Kadın	2(10,5)	17(89,5)	19	0,336	8(42,1)	11(57,9)	19	0,73
Erkek	15(23,1)	50(76,9)	65		14(21,5)	51(78,5)	65	
Tümör Derecesi								
T3+T4	8(17,8)	37(82,2)	45	0,438	9(20)	36(80)	45	1,00
T1+T2	5(26,3)	14(73,7)	19		4(21,1)	15(78,9)	19	
Lenf nodu tutulumu								
N(+)	12(23,1)	40(76,9)	52	0,759	4(18,2)	18(81,8)	52	0,728
N(-)	1(8,3)	11(91,7)	12		9(21,4)	33(78,6)	12	
Uzak metastaz								
Var	4(18,2)	18(81,8)	22	1,00	8(18,2)	18(81,8)	22	1.00
Yok	9(21,4)	33 (78,6)	42		9(21,4)	33(78,6)	42	

n:birey sayısı; gruplararası analiz Kikare (χ^2) testi ile gerçekleştirilmiştir.

Mide kanserli hastalarda EGF A61G genotipleme sonrası A ve G allel frekansları ile hasta grubumuzun yaş ve cinsiyet, ailede kanser hikayesi, sigara kullanımı parametreleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir bulgu saptanmamıştır.

Hasta grubumuzda EGF A61G genotipleme sonuçları sonrası, G alleli T3 veya T4 evresinde olan hastalarda (%82,2) T1 veya T2 de olanlara göre (%73,7) daha yüksek frekansta gözlenmiştir. AA genotipi ise T1 veya T2 evresinde olan hastalarda(%26,3) T3 veya T4 evresinde olan hastalara (%17,8) göre daha yüksek oranda izlenmiş ancak herhangi bir istatistiki anlamlılık bulunmamıştır.

Ayrıca A alleli açısından da yine T3 veya T4 evresinde olanlarda (%80) T1 veya T2 olanlarda (%78,9) oranları gözlenmiş, aradaki farklar ise istatistiksel anlamlılık göstermemiştir.

EGF A61G gen polimorfizmi bölgesel lenf nod metastaz parametresiyle değerlendirildiğinde AA genotipi taşımanın lenf nod pozitif olan hastalarda (%23,1), lenf nod negatif olanlara göre (%8,3) daha yüksek olduğu gözlenmiş olup, G allel frekansı ise lenf nodu negatif hastalarda (%91,7) lenf nod pozitif olan hastalara göre daha yüksek (%76,9) olarak saptanmış olup istatistiki olarak anlamlı bir bulgu elde edilememiştir. A alleli taşıma açısından da lenf nod pozitif hastalar ile (%81,8), negatif olanlar (%78,6) arasında fark gözlenmemiştir ($p=0.728$).

EGF A61G genotipleme sonrasında EGF A61G genotip dağılımı ile uzak metastaz varlığı incelemesinde, uzak metastaz varlığı tüm hastaların allel frekansları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir bulgu mevcut değildir ($P=1.00$).

EGF A61G genotipleme sonrası A ve G allel dağılımları ile perinöral invazyon parametresi arasında herhangi bir ilişki bulunamamıştır.

Mide kanserli hastalarda serum EGF düzeyleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında mide kanserli hastalarda EGF serum düzeyleri ($27,2 \pm 4,9$) kontrol grubuna göre ($29,7 \pm 3,9$) daha düşük oranda tespit edilmiş olup ancak aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır. Gruplar arası dağılım Mann-Whitney U analizi ve Kruskal-Wallis Testi ile saptanmıştır ($p=0.092$) (Tablo 4-4).

Tablo 4-4: Mide Kanserli Hasta ve Kontrol Grubunda Serum EGF Düzeyleri

Hasta/Kontrol Grup	(N)	Ortalama Değer Standart Sapma	p değeri*
Mide Kanserli Hasta Grubu	79	$27,2 \pm 4,9$	0,092
Kontrol Grubu	84	$29,7 \pm 3,9$	

Tablodaki değerler $X \pm SE$ (Standard Hata) olarak verilmiştir.

*Çalışma grupları arasında serum egf düzeyi karşılaştırılması Kruskal-Wallis Testi analizi ve Mann-Whitney U analizi ile gerçekleştirilmiştir.

Tablo 4-5: Mide Kanserli Hasta ve Kontrol Grubunda EGF A61G Genotip ve Serum EGF düzeyleri (pg/ml)

EGF Genotip	Hasta Grubu (N)	Ortalama Değer Standart Sapma	P değeri	Kontrol Grubu (N)	Ortalama Değer Standart Sapma	P değeri
AA	15	$17,107 \pm 8,1415$	0,204	28	$40,446 \pm 8,87$	0,094
AG	42	$35,464 \pm 5,6169$		43	$27,081 \pm 4,73$	
GG	22	$18,400 \pm 8,1487$		13	$15,392 \pm 4,19$	

Tablodaki değerler $X \pm SE$ (Standard Hata) olarak verilmiştir.

*Çalışma grupları arasında serum egf düzeyi karşılaştırılması Kruskal-Wallis Testi analizi ve Mann-Whitney U analizi ile gerçekleştirilmiştir.

Mide kanserli hasta ve kontrol gruplarında EGF A61G genotipleri gözetilerek EGF serum düzeyleri (pg/ml) değerlendirildiğinde grup içi istatistiksel anlamlı fark saptanmamıştır. Gruplararası analiz sonrasında GG genotipli hastalarda EGF serum düzeyi ($18,400 \pm 8,1487$) pg/ml kontrol grubuna ($15,392 \pm 4,19$) pg/ml göre daha yüksek miktarda saptanmış ancak istatistiksel anlamlılığa ulaşamamıştır (Tablo 4-5).

Tablo 4-6: Mide Kanserli Hasta Grubunda EGF A61G Gen Polimorfizmi Allel Dağılımı ve Serum EGF düzeyleri (pg/ml)

EGF ELISA	(N)	Ortalama Değer Standart Sapma	p değeri
AA	28	$24,368 \pm 3,80$	0,122
AG+GG	56	$40,446 \pm 8,87$	
GG	13	$15,392 \pm 4,55$	0,055
AG+AA	71	$32,352 \pm 4,19$	

Tablodaki değerler $X \pm SE$ (Standard Hata) olarak verilmiştir.

*Çalışma grupları arasında serum egf düzeyi karşılaştırılması Kruskal-Wallis Testi analizi ve Mann-Whitney U analizi ile gerçekleştirilmiştir.

Hasta grubumuzda G alleli taşıyan (AG+GG) hastalarda serum EGF düzeyleri ($40,446 \pm 8,87$) AA genotipini taşıyan hastalara göre ($24,368 \pm 3,80$ pg/ml) daha yüksek oranda bulunmuş ancak istatistiksel olarak anlamlılığa ulaşamamıştır ($p=0,122$). Yine A alleli taşıyan (AG+AA) hastalarda serum EGF düzeyleri ($32,352 \pm 4,19$ pg/ml) GG genotipi taşıyan hastalardakine göre ($15,392 \pm 4,55$ pg/ml) daha yüksek oranda izlenmiş ancak aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0,055$).

Tablo 4-7: Mide Kanserli Hastalarda EGF A61G Gen Polimorfizmi Genotip, Cinsiyet Parametreleri ve Serum EGF düzeyleri (pg/ml)

EGF Genotipler	Kadın (n)	Erkek (n)	p değeri
AA	19,00±12,90 (2)	16,81±9,32 (13)	0,931
AG	36,09±23,73 (8)	35,32±8,58 (34)	0,937
GG	18,92±9,29 (8)	18,10±7,31 (14)	0,946

Tablodaki değerler $\bar{X} \pm SE$ (Standard Hata) olarak verilmiştir.

*Çalışma grupları arasında serum egf düzeyi karşılaştırılması Kruskal-Wallis Testi analizi ve Mann-Whitney U analizi ile gerçekleştirilmiştir.

Mide kanserli hastalarda EGF A61G gen polimorfizmi genotip dağılımları ile serum EGF düzeyleri hastalık parametreleri ile birlikte değerlendirildiğinde cinsiyet parametresi ile bir ilişki saptanmamıştır. Aynı şekilde yaş, sigara kullanımı, aile hikayesi gibi parametrelerde de herhangi bir anlamlı bulguya rastlanmamıştır.

Tablo 4-8: Mide Kanserli Hastalarda EGF A61G Allel Dağılımı, Tümör Derecesi Parametreleri ve Serum EGF Düzeyleri (pg/ml)

Tümör Derecesi	AA (n)	AG+GG (n)	p değeri	GG (n)	AA +AG (n)	p değeri
T3+T4	23,85±17,3 (7)	34,48±7,7 (34)	0,577	22,55±8,5 (9)	35,51±8,6 (32)	0,453
T1+T2	12,02±6,6 (4)	8,92±3,7 (14)	0,697	5,27±0,67 (4)	10,85±4,04 (14)	0,482

Tablodaki değerler $\bar{X} \pm SE$ (Standard Hata) olarak verilmiştir.

*Çalışma grupları arasında serum egf düzeyi karşılaştırılması Kruskal-Wallis Testi analizi ve Mann-Whitney U analizi ile gerçekleştirilmiştir.

Mide kanserli hastalar tümör derecelerine göre I+II ve III+IV olarak gruplandırıldığında, EGF A61G AA, AG ve GG genotiplerine göre sırasıyla serum sürvivin düzeyleri I. ve II.derece tümörler için $(12,02 \pm 6,6)$, $(10,38 \pm 5,2)$, $(5,27 \pm 0,67)$ ve III. veya IV.derece tümörlerde ise $(23,85 \pm 17,3)$, $(38,77 \pm 10,07)$, $(22,55 \pm 8,5)$ pg/ml olarak saptanmıştır.

Tablo 4-9: Mide Kanserli Hastalarda EGF A61G Allel Dağılımı, Lenf Nodu Tutulumu Parametreleri ve Serum EGF düzeyleri (pg/ml)

Lenf nodu tutulumu	AA (n)	AG+GG (n)	p değeri	GG (n)	AG+AA (n)	p değeri
$n_1+n_2+n_3$	$21,14 \pm 12,1$ (10)	$27,26 \pm 6,7$ (37)	0,674	$19,2 \pm 7,3$ (11)	$28,02 \pm 7,3$ (36)	0,532
n_0	3,7 (1)	$26,21 \pm 12,02$ (11)	0,601	$6,35 \pm 0,45$ (2)	$27,9 \pm 13,15$ (10)	0,496

Tablodaki değerler $\bar{X} \pm SE$ (Standard Hata) olarak verilmiştir.

*Çalışma grupları arasında serum egf düzeyi karşılaştırılması Kruskal-Wallis Testi analizi ve Mann-Whitney U analizi ile gerçekleştirilmiştir.

Mide kanserli hastalar lenf nodu tutulumlarına göre gruplandırıldığında, EGF A61G GG genotipini taşıyan bireylerin serum EGF düzeylerinin lenf nodu tutulumu pozitif olan hastalarda $(19,2 \pm 7,3)$ lenf nodu tutulumu negatif olan hastalara $(6,35 \pm 0,45)$ oranla daha yüksek oranda tespit edilmiş olup aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Tablo 4-10: Mide Kanserli Hastalarda EGF A61G Allel Dağılımı, Metastaz Durumu Parametreleri ve Serum EGF Düzeyleri (pg/ml)

Metastaz Durumu	AA	AG+GG	p değeri	GG	AG+AA	p değeri
Var	4,7±0,37	18,43±6,7	0,373	7,07±1,67	18,62±7,31	0,752
Yok	25,32±14,98	30,93±7,88		21,75±8,75	32,11±8,52	

EGF A61G A ve G allel frekansları, serum EGF düzeyleri metastaz varlığı ile birlikte değerlendirildiğinde anlamlı bir bulguya ulaşılamamıştır.

Mide kanserli hastalarda EGF A61G allellerine göre serum EGF düzeyleri hastalık parametreleri ile birlikte değerlendirildiğinde klinik ve prognostik parametreler açısından herhangi bir anlamlı bulguya rastlanmamıştır.

5. TARTIŞMA

EGF sinyal molekülü EGFR adı verilen reseptörüne bağlanarak intraselüler sinyal yolağının aktivasyonuna sebep olmaktadır. Bu sinyal yolağı hücre poliferasyonu, hücre göçü ve hücre farklılaşmasında rol oynamaktadır. EGFR ve ligandları tümör hücrelerinde yüksek oranda ekspre edilmektedir ve yapılan çalışmalarda EGFR ve EGFR ligandlarının birlikte gerçekleşen ekspresyon artışının zayıf survi ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. EGFR'nin aşırı ekspresyonuna bağlı olarak tetiklenen proliferasyon kapasitesinin tümör prosesini etkilediği öne sürülmektedir. Çeşitli araştırmalarda kanser progresyonu ile ilişkili EGFR aracılı sinyal mekanizmalarının anjiyogenez, metastatik yayılım ve apoptoz inhibisyonu ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir (121).

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda EGF geninin 5'- (UTR) bölgesinde 61. pozisyonunda yer alan A-G değişimiyle sonuçlanan tek nükleotid polimorfizminin (SNP) mide kanseri ve diğer kanser tipleriyle, EGF'nin farklı ekspresyon seviyeleriyle ilişkili olduğu bildirilmiştir. Japon populasyonunda yapılan 200 mide kanserli hasta ve 230 sağlıklı kontrol bireyi kapsayan bir çalışmada A alleli hasta grubunda kontrol grubuna göre anlamlı derecede daha düşük frekansta saptanmıştır. AA veya AG genotipini taşıyan bireylerin mide kanserine yakalanma riskinin GG genotipine sahip bireylere oranla önemli ölçüde düşük olduğu izlenmiştir. Buna karşın aynı allelin kanser prognozu ile ilgili derin tümör invazyonu, artan lenf nodu metastazı ve mide kanseri ileri klinik evre ve histolojik sınıflandırma gibi parametrelerle de ilişkili olduğu bildirilmiştir (18). Çalışmamız sonucunda A61G gen polimorfizmi sonuçları değerlendirildiğinde AA, AG, GG genotip frekansları hasta grubunda sırasıyla %20,2, %53,6, %26,2, ve kontrol grubunda %32,9, %52,1, %15,1, olarak gözlenmiştir. GG genotipi mide kanserli hastalarda (%26,2), kontrol grubuna göre yüksek frekansta gözlenmiş (%15,1) olup, aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0,039$).

Japon popülasyonunda yapılan 202 mide kanserli hasta ve 454 sağlıklı bireyi kapsayan bir diğer çalışmada AA genotipi AG ve GG genotiplerine oranla daha düşük frekansta tespit edilmiş olup AA genotipinin mide kanseri gelişiminde koruyucu etki gösterdiği ileri sürülmüştür ancak bu bulgular istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Ayrıca hasta grubundaki bireylerde tümör gelişimi diferansiye (farklılaşmış) ve indiferansiye (farklılaşmamış) olarak değerlendirildiğinde AA ve AG genotipleri GG genotipine oranla farklılaşmanın zayıf olduğu tümörlerde farklılaşmanın iyi olduğu tümörlere oranla daha düşük frekansta gözlenmiş ancak anlamlılık saptanmamıştır. Ancak malignite durumu ile birlikte çevresel ve kişisel faktörlerde hastalığın gelişiminde ve polimorfizmin etki mekanizmasında önemli rol oynamaktadır. Bu sonuçlar EGF geninin fonksiyonlarının karsinogenez sürecindeki önemine işaret ederken tek başına yeterli olmadığını göstermektedir. Ayrıca EGF polimorfizminde etnik heterojenitenin etkili olduğu düşünülmektedir. Goto ve arkadaşlarının yaptığı bu çalışma sonucunda EGF gen polimorfizmi ile mide kanseri arasında herhangi bir anlamlı ilişki bulunamamıştır (122).

Arajua ve arkadaşları beyaz ırkta yaptıkları 383 meme kanserli hasta ve 500 sağlıklı bireyi kapsayan çalışmalarında EGF 61A/G genotip dağılımını sağlıklı bireylerde sırasıyla AA, AG, GG %29.8 %47.2, %23 şeklinde tespit etmiş olup GG genotipi taşıyan bireylerde meme kanserine yakalanma riskinin daha az olduğunu bildirilmişlerdir. Aynı zamanda G allel frekansı kontrol gruplarında hasta gruplarına nazaran daha yüksek oranda gözlemlenmiş ve bu bulguda istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (120).

Vauleon ve arkadaşları Fransız popülasyonunda yaptıkları çalışmada EGF /EGFR aracılı sinyal yolağının glioma tümör gelişimindeki en önemli yolaklardan biri olduğu bildirilmiştir. 209 glioblastoma olgusu ve 214 kontrolü kapsayan bu çalışmada sağlıklı bireylerde AA, AG, GG genotip dağılımı %29,5 %56,1 %14,5 olarak saptanmış aynı zamanda 61G allelilinin 61A allelinden daha etkin olduğu ve 61G allelilinin yüksek oranda plazma EGF düzeyi ile ilgili ilişkili olduğu bildirilmiştir (123).

EGF aralarında tümör büyüme faktörü alfa heparin bağlayan EGF benzeri büyüme faktörü epiregülin, beta selülin alfa regülin gibi büyüme faktörlerin de bulunduğu geniş EGF ailesinin bir üyesidir (124). EGF DNA sentezi ve epidermal dokularda mitozu aktifleyebilmektedir. Çeşitli çalışmalarda EGF A61G 5' UTR polimorfizminin melanoma glioblastoma ve mide kanseri gibi çeşitli tümör tipleriyle ilişkili olduğu bildirilmiştir. Melanoma hastalarında G alleli frekansının ve GG genotipini taşıyan bireylerin normal popülasyona oranla daha yüksek oranda risk taşıdığı bildirilmiştir. Glioblastoma ve mide kanserinin G allelinin karsinogenez riskini arttırdığı rapor edilmiştir (16). Çalışmamız sonucunda A61G gen polimorfizmine ait allel frekansları değerlendirildiğinde G allel frekansının mide kanserli hastalarda (%52,9) kontrol grubuna göre (%41,09) yüksek olduğu, A allel frekansının ise hasta grubunda (%20,2) kontrol grubuna (%32,9) göre düşük olduğu gözlenmiş ancak istatistiksel olarak anlamlılık saptanmamıştır.

Kang ve arkadaşları 168 servikal kanser ve 169 kontrol bireyi kapsayan çalışmalarında AA, AG, GG genotip dağılımlarını %8.3; %40.2; %51,5 ve A alleli frekansını 28,4 G alleli frekansını 71,6 oranında tespit etmişlerdir ve hasta ve kontrol grubu arasında genotip dağılımı ve allel frekansı açısından anlamlı bir farklılığa rastlanmamışlardır. Çeşitli çalışmalarda EGF polimorfizminin tümör invazyonu ve progresyonu ile ilişkili olabileceği bildirilmiştir. Kang ve arkadaşları yaptıkları çalışmada EGF polimorfizmi ile tümör evresi ve lenf nodu metastazı açısından da anlamlı bir farklılığa rastlanmamıştır. Hasta grubumuzda da EGF A61G genotipleme sonuçları sonrası, tümör derecesi, lenf nodu tutulumu, uzak metastaz varlığı gibi prognostik parametrelerle herhangi bir ilişki bulunmamıştır (124).

EGF A61G polimorfizmi farklı etnik gruplar da incelenmiş olup beyaz ırkta yapılan çalışmalarda kontrol gruplarında AA genotipinin daha yüksek frekansta olduğu görülürken Kore ve Japon popülasyonunu içeren Doğu Asya kökenli sağlıklı kontrol bireylerde ise AA genotipinin daha düşük frekanslar gösterdiği ve GG genotipinin daha yüksek oranda görüldüğü saptanmıştır (124). Çalışmamız sonucunda da EGF A61G GG genotipi hasta grubumuzda AA genotipi de kontrol grubunda daha yüksek oranda saptanmıştır.

Çin’de yapılan 180 kolon kanseri hastası ve 180 kansersiz sağlıklı kontrol bireyini kapsayan bir çalışmada kolon kanserli hastalarda GG genotip frekansı kontrollerden çok daha yüksek sıklıkta saptanmıştır. Ancak aynı çalışmada tümör lokalizasyonu, tümör boyutu, büyüme şekli, farklılaşması ve tumor derecesi, lenf nodu tutulumu, metastaz gibi prognostik parametrelerle EGF A61G polimorfizmi arasında istatistiki açıdan anlamlı sonuçlar bulunamamıştır. Çalışmanın sonucunda Çin nüfusunda EGF A61G GG genotipinin yüksek kolon kanseri riskiyle ilişkili olabileceği kanısına varılmıştır (125).

Zhang ve arkadaşları EGF A61G polimorfizmi kolorektal kanserli hasta grubunda araştırmış ve ilgili polimorfizmin hastaların survisinde önem taşıdığını rapor etmiştir. Ayrıca bu çalışmanın sonucunda EGF A61G ve siklin D A870G polimorfizmlerinin kombine analizlerinin kolorektal kanser hastalarının prognoz evresinde ve ilaç etkileşimlerinde önemli markerlar olabileceği öne sürülmüştür (126).

Cui ve arkadaşlarının yaptıkları 158 yemek borusu kanseri ve 212 kontrolden oluşan çalışmalarında AG GG AA genotiplerini hasta ve sağlıklı bireylerde %7, %35.4, %57.6, %9, %43.9, %47.2 oranında tespit etmişlerdir. Ayrıca G ve A allel frekanslarını sağlıklı bireylerde 69.1 ve 30.9 hastalarda ise 75.3, 24.7 olarak saptamışlardır. A allel taşıyıcılığını GG genotip taşıyıcılığına oranla kontrol gruplarında daha yüksek frekansta saptamışlardır (127).

Ayrıca aynı çalışmada yaş, cinsiyet ve sigara kullanımı ile EGF polimorfizmi arasında herhangi bir anlamlı bulgu saptanmamıştır (127). Çalışmamız sonucunda da A61G gen polimorfizmi mide kanserli hastalarda cinsiyet, sigara kullanımı, alkol tüketimi, ailede kanser hikayesi gibi parametrelerin hiç biri ile ilişkili bulunmamıştır.

Bhowick ve arkadaşları da 61G allelinin EGF ekspresyonu artışı ile ilgili olduğunu ve artmış EGF ekspresyonunun glioma gelişiminde ve prognozunda önemli rol oynadığını rapor etmişlerdir. Yapılan çeşitli çalışmalarda EGF G allelinin hem meme kanseri hem glial tümörlerde A allele göre daha yüksek frekansta olduğu tespit edilmiştir (17).

Yapılan çeşitli araştırmalarda düşük plazma EGF konsantrasyonunun endometrium kanseri riskini arttırdığı (128) ve mide kanseri riskini azalttığı yönünde bulgular bildirilmiştir (129). Wang ve arkadaşları 604 meme kanserli hasta ve 654 sağlıklı bireyde yaptıkları araştırmada EGF plazma düzeyini hasta grubunda kontrol grubuna oranla düşük miktarda saptamışlardır. Ancak gruplar arası genotip dağılımı ve allel frekansları açısından herhangi bir anlamlı bulguya rastlamamışlardır (130). Bizim çalışmamızda da mide kanserli hastalarda serum EGF düzeyleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında mide kanserli hastalarda EGF serum düzeyleri ($27,2 \pm 4,9$) kontrol grubuna göre ($29,7 \pm 3,9$) daha düşük oranda tespit edilmiş olup aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır.

Spindler ve arkadaşları 81 kolorektal kanserli hastayı kapsayan çalışmalarında AA genotipini %33, AG genotipini %48, ve GG genotipini %19 oranında saptamışlardır. Çalışmalarının sonucunda AA genotipine sahip bireylerin GG genotipini taşıyan bireylere göre diagnoz yaşının daha genç olduğunu tespit etmişlerdir. EGF gen ekspresyonunu normal kolonda GG genotipinde daha yüksek oranda ve AA genotipini taşıyan bireylerde daha düşük oranlarda saptamışlardır (131).

Spindler ve arkadaşlarının yaptıkları bu çalışmada EGF A61G polimorfizminin kolon dokularında EGF ekspresyonunu etkilediği saptanmış ve bu sonuçlar Shahbazi ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmadaki sonuçlarla uyumlu bulunmuştur. Fakat EGF A61G polimorfizminin EGF ekspresyonuna hangi mekanizmalar aracılığıyla etki ettiği hala bilinmemektedir. Ancak bu polimorfizmin konumlandığı 5'UTR bölgesinin kritik bir öneme sahip olduğu düşünülmektedir (131).

Çeşitli araştırmalarda gastroözofageal reflüye eşlik eden EGF A61G homozigot varyant genotipinin yemek borusu kanseri riskini arttırdığı bildirilmiştir. Cheung ve arkadaşları gastroözofageal reflüsü olan 309 yemek borusu kanserli hasta ve 275 kişiden oluşan kontrol grubunda yaptıkları araştırmada EGF A61G GG genotipindeki gastroözofageal reflüsü bulunan kişilerin EGF serum düzeylerinin gastroözofageal reflüsü olmayan bireylere oranla yüksek oranda olduğunu tespit etmişlerdir. Bu çalışmada uzun süre gastroözofageal reflüye maruz kalan bireylerde EGF polimorfizmi ve özofagus kanseri arasında anlamlı korelasyon olduğu gözlenmiştir. Özellikle EGF GG genotipine sahip ve uzun süre GERD bulgusuna sahip bireylerde yemek borusu kansere yakalanma riskinin 20 kat daha fazla olduğunu tespit

etmişlerdir (132). Çeşitli araştırmalarda EGF'nin yemek borusu metaplazisinden displaziye ve adenokarsinomlara geçiş sürecinde önemli rol oynadığı bildirilmiştir. Aynı zamanda çeşitli kanser tiplerinde EGF A61G gen varyasyonunun invazyonda ve kötü tümör prognozunda etkin olduğu öne sürülmüştür. Ancak bu polimorfizmini taşıyan ve EGF ekspresyonu fazla olan tüm hastalarda aynı etkinin görülmediği saptanmıştır (132).

Çeşitli kanser türlerinde gen ve çevresel faktörler arasındaki ilişki tanımlanmıştır. Sigara kullanımı ile DNA tamir genlerinin polimorfizmleri arasında bir bağlantı kurulmuş olup sigara kullanımının bu varyasyon aracılığıyla akciğer kanserinin gelişiminde rol oynadığı tespit edilmiştir. Cheung ve arkadaşları EGF AG/G polimorfizminin GERD sendromuna sahip bireylerde yemek borusu kanseri gelişimini tetiklediğini bildirmişlerdir (132).

Lanuti ve arkadaşlarını yaptıkları 312 özofagus kanserli hasta ve 447 sağlıklı bireyi kapsayan çalışmada AA, AG, GG genotiplerini kontrol gruplarında oranıyla %39, %45, ve %16 arasında saptamış ve anlamlı sonuçlar elde etmişlerdir. Ayrıca GG genotipi taşıyan hastaların 2 kat daha fazla risk taşıdıklarını tespit etmişlerdir. EGF serum düzeylerinin ve GG genotipinin gastroözofageal reflüsü olan hastalarda özofagus kanserini tetikleyici bir faktör olabileceği kanısına varılmıştır. Çünkü EGF ve EGF ile ilişkili sinyal yollarının Barrett's epitelinde metaplaziden displazi ve displaziden de özofagus kanseri gelişimine neden olabileceği düşünülmektedir. EGF polimorfizmi GG genotipinin EGF serum düzeyleri ile ilişkili olabileceği ve özofagus kanseri açısından risk oluşturduğu rapor edilmiştir. Ayrıca GG genotipinin erken evre ile ilişkili olabileceği bildirilmiştir. Glioma ve mide kanserli hastalarda yapılan araştırmaların aksine özofagus kanserinde EGF polimorfizminin agresif fenotip veya zayıf prognoz ile herhangi bir ilişkisinin olmadığı bildirilmiştir. Bunun sonucunda EGF A61G polimorfizminin özofagus kanserinde prognostik bir parametreden çok prediktif bir parametre olabileceği rapor edilmiştir. Ayrıca Lanuti ve arkadaşları çalışmalarının sonucunda farklı etnik gruplarda EGF A61G polimorfizmine ait farklı sonuçlar elde edilebileceği kanısına varmıştır (133).

Lanuti ve arkadaşlarının 312 özafagus adenokarsinomlu hasta ve 447 kontrol bireylerini kapsayan çalışmaları EGF A61G polimorfizmi ve özafagus adenokarsinomu arasındaki ilişkiyi gösteren ilk çalışmadır. Bu araştırmada EGF polimorfizmi GG genotipini taşıyan bireylerin adenokarsinom riskinin 2 kat arttığı rapor edilmiştir. Aynı çalışmada gastroözafagial reflüsü olan ve GG genotipi taşıyan hastalarda serum EGF düzeylerinin yüksek olduğu gözlenmiş olup bu durumun özafagus adenokarsinomu için öncü bir durum teşkil ettiği gözlenmiştir (133).

Wu ve arkadaşları 157 kolorektal kanserli hasta ve 117 kontrol bireyini dahil ettikleri çalışmalarında GG genotipini hasta grubunda % 33,1 kontrol grubuna % 11,1 oranla daha yüksek frekansta gözlemlemişlerdir. Tümü beyaz ırkı kapsayan bu çalışmada G allel frekansı hasta grubunda 51.3 kontrol grubuna 33.3 göre daha fazla oranda saptanmış olup G allelinin kolorektal kanserle ilişkili olabileceği kanısına varılmıştır (134).

Zhu ve arkadaşları Çin popülasyonda yaptıkları 345 böbrek tümörlü hasta ve 346 sağlıklı kontrol bireyini kapsayan çalışmalarında hasta grubunda GG genotipine kıyasla AA genotipini 1,8 kat daha riskli olarak saptamışlardır. Bunun yanında egf serum düzeylerini hasta grubunda kontrol grubuna oranla daha düşük konsantrasyonda tespit etmişlerdir. Ayrıca AA genotipini taşıyan bireylerde serum EGF düzeylerini AG GG genotiplerini taşıyan bireylere oranla daha düşük oranda saptamışlardır (135).

Yang ve arkadaşlarının yaptığı 207 mide kanserli hasta 318 sağlıklı bireyi kapsayan bir çalışmada da EGF A61G gen polimorfizmi allel dağılımlarına göre A alleli mide kanseri hastalarında kontrollerden daha az sıklıkta bulunmuş ve EGF A61G polimorfizmi A allelinin mide kanseri riskini azaltığı ileri sürülmüştür (136). Çalışmamız sonucunda da EGF A61G gen polimorfizmine ait allel frekansları değerlendirildiğinde G allel frekansının mide kanserli hastalarda kontrol grubuna göre yüksek olduğu, A allel frekansının ise hasta grubunda kontrol grubuna göre düşük olduğu gözlenmiş ancak istatistiksel olarak anlamlılık saptanmamıştır.

Sonuç olarak;

Çalışmamız Türk Toplumunda EGF A61G gen polimorfizlerine ait genotip ve allel frekanslarının, serum EGF düzeylerinin araştırıldığı ve hastalığın klinik ve prognostik parametreleri ile bir arada değerlendirildiği ilk çalışmadır.

EGF A61G gen polimorfizmi sonuçları değerlendirildiğinde, EGF A61G genotip dağılımı mide kanserli hasta ile kontrol grubumuz arasında istatistiksel olarak anlamlı derecede farklılık göstermiştir. GG genotipi mide kanserli hastalarda (%26,2), kontrol grubuna göre yüksek frekansta gözlenmiş (%15,1) olup, aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0,039$).

Mide kanserli hastalarda EGF A61G gen polimorfizmi değerlendirmesi sonrası genotip dağılımı ve allel frekansları ile hasta grubumuzun yaş, cinsiyet, kilo, boy, VKI, ailede kanser hikayesi, sigara, alkol kullanımı parametreleri arasında istatistiksel açıdan anlamlılık mevcut değildi. Ayrıca tümör evresi, lenf nodu tutulumu, uzak metastaz gibi prognostik parametreler açısından da herhangi bir anlamlı bulguya rastlanmamıştır.

Mide kanserli hastalarda EGF A61G genotip ve allel dağılımlarına göre; serum EGF düzeyleri hastalık parametreleri ile birlikte değerlendirildiğinde klinik ve prognostik parametreler açısından istatistiksel olarak anlamlı bir veri saptanmamıştır.

Çalışmamız EGF A61G genotip dağılımları, allel frekansları, serum EGF düzeylerine ait Türk Toplumundaki ilk verileri sağlayan bir araştırmadır. Çalışmamız sonucunda da EGF A61G polimorfizmi GG genotipinin mide kanserine yatkınlığı etkileyebileceği kanısına varılmıştır.

KAYNAKLAR

- 1.Parkin DM, Pisani P, Ferlay J.(1999).Global cancer statistics,*CA Cancer J Clin*,49,33–64.
- 2.Correa P.(1992).Human gastric carcinogenesis:a multi step and multifactorial process.First American Cancer Society award lecture on cancer epidemiology and prevention.*Cancer Res*,52,6735–40.
- 3.Yarden Y,Sliwkowski MX.(2001).Untangling the ErbB signalling network.*Nat Rev Mol Cell Biol*,2,127-37.
- 4.Lockhart C, Berlin J D.(2005).The epidermal growth factor receptor as a target for colorectal cancer therapy.*Semin Oncol*,32,52-60.
- 5.Gleave ME, Hsieh JT, Wu HC, Hong SJ, Zhau HE,Guthrie PD, et al.(1993).Epidermal growth factor receptor-mediated autocrine and paracrine stimulation of human transitional cell carcinoma.*Cancer Res*,53,530-07
- 6.Yasui W, Hata J, Yokozaki H et al.(1988).Interaction between epidermal growth factor and its receptor in progression of human gastric carcinoma.*Int J Cancer*,4,211–17.
- 7.Tokunaga A, Onda M, Okuda T et al.(1995).Clinical significance of epidermal growth factor (EGF), EGF receptor, and c-erbB-2 in human gastric cancer.*Cancer*,75,1418–25.
- 8.Goustin, A.S., Leof, E.B., Shipley, G.D., and Moses, H.L.(1986).Growth factors and cancer.*Cancer Res*,46,1015–1029.
- 9.Zetterberg A, Larsson O, Wiman KG.(1995).What is the restriction point?*Curr Opin Cell Biol*,7,835-842,
- 10.Salomon DS, Brandt R, Ciardiello F, Normanno N.(1995).Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies.*Crit Rev Oncol Hematol*,19,183–232.
- 11.FisherDA, Lakshmanan J.(1990).Metabolism and effects of epidermal growth factor and related growth factors in mammals.*Endocr. Rev*,11,418–442.
- 12.Groenen LC, Nice EC, Burgess AW.(1994).Structure-function relationships for the EGF/TGF- α family of mitogens.*Growth Factors*,11,235–257.

- 13.Jorissen RN, Walker F, Pouliot N, Garrett TP, Ward CW, Burgess AW.(2003).Epidermal growth factor receptor:mechanisms of activation and signalling.*ExpCellRes*,84,31–53.
- 14.Akbulut H, Akbulut KG.(1997).Karsinogenez In:İçli F, ed. Tıbbi Onkoloji Ankara,*ANTIP Afi Tıp Kitapları ve Bilimsel Yayınlar*,23-38.
- 15.Lecture GFF.(1996).Molecular mechanisms of lung cancer. Interaction of environmental and genetic factors.*Chest*,109(Suppl),14S-19S.
- 16.Shahbazi M, Pravica V, Nasreen N,et al.(2002).Association between functional polymorphism in EGF gene and malignant melanoma.*Lancet*,359,397–401.
- 17.Bhowmick DA, Zhuang Z, Wait SD, Weil RJ.(2004).A functional polymorphism in EGF gene is found with increased frequency in glioblastoma multiforme patients and isassociated with more aggressive disease.*Cancer Res*,64,1220–3.
- 18.Hamai Y, Matsumura S, Matsusaki K,et al.(2005).A single nucleotide polymorphism in the 5'untranslated region of the EGF gene is associated with occurrence and malignant progression of gastric cancer. *Pathobiology*,72,133–8.
- 19.1. Kelley JR, Duggan JM.(2003).Gastric cancer epidemiology and risk factors.*J Clin Epidemiol*,56,1-9.
- 20.2. Zheng HC, Takahashi H, Murai Y, Cui ZG, Nomoto K, Miwa MS, et al.(2006). Upregulated EMMPRIN/ CD147 might contribute to growth and angiogenesis of gastric carcinoma: a good marker for local invasion and prognosis.*Br J Cancer* ,95,371-8.
- 21.Crew KD, Neugut AI.(2006).Epidemiology of gastric cancer.*World J Gastroenterol*,12,354-62.
- 22.Fayçal J, Bessaguet C, Nousbaum JB, Cauvin JM, Cholet F, Bideau K, et al.(2005). Epidemiology and long term survival of gastric carcinoma in the French district of Finistere between 1984 and 1995. *Gastroenterol Clin Biol*,29,23-32.
- 23.Leung WK, Wu MS, Kakugawa Y, Kim JJ, Yeoh KG, Goh KL, et al.(2008).Screening for gastric cancer in Asia: current evidence and practice.*Lancet Oncol*,9,279-87.
- 24.Inoue M, Tsugane S.(2005).Epidemiology of gastric cancer in Japan.*Postgrad Med J*,81,419-24.

25. Riddell RH, Iwafuchi M.(1998).Problems arising from eastern and western classification systems for gastrointestinal dysplasia and carcinoma: are they resolvable?*Histopathology*,33,197-202.
26. You WC, Li JY, Zhang L, Jin ML, Chang YS, Ma JL, et al.(2005).Etiology and prevention of gastric cancer: a population study in a high risk area of China.*Chin J Dig Dis*,6,149-54.
27. Wong BC, Lam SK, Wong WM, Chen JS, Zheng TT, Feng RE, et al.(2004).Helicobacter pylori eradication to prevent gastric cancer in a high-risk region of China: a randomized controlled trial. *JAMA*,291,187-94.
28. Yang L.(2006). Incidence and mortality of gastric cancer in China. *World J Gastroenterol*,12,17-20.
29. Tahara E.(2004).Genetic pathways of two types of gastric cancer.*IARC Sci Publ*,153,27-49.
30. Murai Y, Zheng HC, Abdel Aziz HO, Mei H, Kutsuna T, Nakanishi Y, et al.(2007). High JC virus load in gastric cancer and adjacent non-cancerous mucosa.*Cancer Sci*,98,25-31.
31. Yu M, Zheng HC, Xia P, Takahashi H, Masuda S, Takano Y, Xu HM.(2010).Comparison in pathological behaviours & prognosis of gastric cancers from general hospitals between China & Japan. *Indian J Med Res*,132,295-302.
32. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D.(2011).Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*. 2011 Mar-Apr,61(2),69-90. Epub 2011 Feb 4.
33. <http://www.cancer.org/Cancer/StomachCancer/DetailedGuide/stomach-cancer-risk-factors>.Erişim tarihi : 01.06.2012
34. Wagner S, Beil W, Westermann J.(1997).Regulation of gastric epithelial cell growth by helicobacter pylori.*Gastroenterology*,113,1836 – 1847.
35. Goodwin CS, Worsley BW.(1993).Microbiology of H.Pylori. *Gastroenterol Clin N*, 22,15-19.
36. Segal ED, Lange C, Covacci A, Tompkins LS, Falkow S.(1997).Induction of host signal transduction pathways by Helicobacter pylori.*Proc Natl Acad Sci USA*,94,7595-7599.
37. Tomb JF, White O, Kerlavage AR, Clayton RA, Sutton GG, Fleischmann RD, Ketchum KA, Klenk HP, Gill S, Dougherty BA, Nelson K, Quackenbush J, Zhou L, Kirkness EF, Peterson S, Loftus B, Richardson D, Dodson R, Khalak HG, Glodek A,

McKenney K, Fitzgerald LM, Lee N, Adams MD, Hickey EK, Berg DE, Gocayne JD, Utterback TR, Peterson JD, Kelley JM, Cotton MD, Weidman JM, Fujii C, Bowman C, Watthey L, Wallin E, Hayes WS, Borodovsky M, Karp PD, Smith HO, Fraser CM, Venter JC.(1997).The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature*,388,539-547.

38.Alm RA, Ling LS, Moir DT, King BL, Brown ED, Doig PC, Smith DR, Noonan B, Guild BC, DeJonge BL, Carmel G, Tummino PJ, Caruso A, Uria-Nickelsen M, Mills DM, Ives C, Gibson R, Merberg D, Mills SD, Jiang Q, Taylor DE, Vovis GF, Trust TJ. Genomic-sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature*,397,176-180.

39.Parsonnet J, Friedman GD, Orentreich N, Vogelman H.(1997).Risk for gastric cancer in people with CagA positive or CagA negative *Helicobacter pylori* infection.*Gut*,40,297-301.

40.Cover TL, Dooley CP, Blaser MJ.(1990).Characterization of and human serologic response to proteins in *Helicobacter pylori* broth culture supernatants with vacuolizing cytotoxin activity. *Infect Immun*,58,603-610.

41.Peek RM, Miller GG, Tham KT, Perez-Perez GI, Zhao X, Atherton JC, Blaser MJ. (1995).Heightened inflammatory response and cytokine expression in vivo to cagA+ *Helicobacter pylori* strains. *Lab Invest*,73,760-770.

42.Peek RM.(2002).*Helicobacter pylori* strain-specific modulation of gastric mucosal cellular turnover: implications for carcinogenesis. *J Gastroenterol*,37 Suppl 13,10-16.

43.Everhart JE(2000).Recent developments in the epidemiology of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterol Clin N*,29,559-578.

44.Peek RM, Thompson SA, Donahue JP, Tham KT, Atherton JC, Blaser MJ, Miller GG.(1998).Adherence to gastric epithelial cells induces expression of a *Helicobacter pylori* gene, *iceA*, that is associated with clinical outcome. *Proc Assoc Am Physicians*,110,531-544.

45.Wroblewski LE, Peek RM Jr, Wilson KT.(2010).*Helicobacter pylori* and gastric cancer: factors that modulate disease risk. *Clin Microbiol Rev*,23(4),713-39.

46.Mide Kanserde Etiyoloji ve Patogenezi (Prof. Dr. Süha Gökse) içindeTopuz E.(1998). İstanbul Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü, Dizdaroğlu F. İ.T.F Patoloji A.B.D. Sindirim Sistemi Kanseri, İstanbul Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Yayınları.

47. Correa P. Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process--First American Cancer Society Award Lecture on Cancer Epidemiology and Prevention. *Cancer Res.* 1992 Dec 15;52(24),6735-40.
48. Tahara E. (1995). Molecular biology of gastric cancer. *World J Surg*, 19(4), 484-8; discussion 489-90. Review.
49. 34-Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. (1983). *Molecular Biology of the Cell.* Garland, New York, NY.
50. Pines J. (1995). Cyclins and cyclin-dependent kinases: theme and variations. *Adv Cancer Res*, 66, 181-212.
51. Devault A, Cavadore JC, Fesquet D, Labbe JC, Lorca T, Picard A, Strausfeld U, Doree M. (1991). Concerted roles of cyclin A, cdc25+ mitotic inducer, and type 2A phosphatase in activating the cyclin B/cdc2 protein kinase at the G₂/M phase transition. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol*, 56, 503-513.
52. Parker LL, Piwnicka-Worms H. (1992). Inactivation of the p34cdc2/cyclin B complex by the human WEE1 tyrosine kinase. *Science*, 257, 1955-1957.
53. Van den Heuvel S, Hartwell L. (1993). Distinct roles for cyclin-dependent kinases in cell cycle control. *Science*, 262, 2050-2054.
54. Drapkin R, LeRoy G, Cho H, Akoulitchiev S, Reinberg D. (1996). Human cyclin-dependent kinase-activating kinase exists in three distinct complexes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93, 6488-6493.
55. Honda R, Ohba Y, Nagata A, Okayama H, Yasuda H. (1993). Dephosphorylation of human p34cdc2 kinase on both Thr-14 and Tyr-15 by human cdc25B phosphatase. *Fed Eur Biochem Soc Lett*, 318, 331-334.
56. Sebastian B, Kakizuka A, Hunter T. (1993). Cdc25M2 activation of cyclin-dependent kinases by dephosphorylation of threonine-14 and tyrosine-15. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90, 3521-3524.
57. Villa-Moruzzi E. (1993). Activation of the cdc25C phosphatase in mitotic HeLa cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 196, 1248-1254.
58. David-Pfeuty T, Nouvian-Dooghe Y. (1996). Human cyclin B1 is targeted to the nucleus in G₁ phase prior to its accumulation in the cytoplasm. *Oncogene*, 13, 1447-1460.
59. Darzynkiewicz Z, Gong JP, Juan G, Ardelet B, Traganos F. (1996). Cytometry of cyclin proteins. *Cytometry*, 25, 1-13.

60. Pines J: Cyclins.(1991).Wheels within wheels.*Cell Growth Differ*,2,305-310.
61. Luca FC, Shibuya EK, Dohrmann CE, Ruderman JV.(1991).Both cyclin A-delta-60 and B-delta-97 are stable and arrest cells in M-phase, but only cyclin B-delta-97 turns on cyclin destruction.*Eur Mol Biol Organ J*,10,4311-4320.
62. Markiewicz DA, McKenna WG, Flick MB, Maity A, Muschel RJ.(1994).The effects of radiation on the expression of a newly cloned and characterized rat cyclin B mRNA.*Int J Radiat Oncol Biol Phys*,28,135-144.
63. Rechsteiner M, Rogers SW.(1966).PEST sequences and regulation by proteolysis.*Trends Biochem Sci*,21,267-271.
64. Kill IR, Hutchison CJ.(1995).S-phase phosphorylation of lam in B2. *Fed Eur Biochem Sot Lett*,377,26-30.
65. Lyttle DJ, Fraser KM, Fleming SB, Mercer AA, Robinson AJ.(1994).Homologs of vascular endothelial growth factor are encoded by the poxvirus orf virus. *J Virol*,68,84-92.
66. Kato J, Matsushime H, Hiebert SW, Ewen ME, Sherr CJ.(1993).Direct binding of cyclin-D to the retinoblastoma gene product (pRb) and pRb phosphorylation by the cyclin D-dependent kinase cdk4. *Genes Dev*,7,331-342.
67. Arroyo M, Raychaudhuri P.(1992).Retinoblastoma-repression of E2F-dependent transcription depends on the ability of the retinoblastoma protein to interact with E2F and is abrogated by the adenovirus E1A oncoprotein. *Nucleic Acids Res*,20,5947-5954,
68. Mudrak I, Ogris E, Rotheneder H, Wintersberger E.(1994).Coordinated trans-activation of DNA synthesis- and precursor-producing enzymes by polyomavirus large T antigen through interaction with the retinoblastoma protein. *Mol Cell Biol*,14,1886-1892.
- 69- Weinberg, R. A.(1995).The retinoblastoma protein and cell cycle control.*Cell*,81,323-330.
- 70- Guan KL, Jenkins CW, Li Y, Nichols MA, Wu XY, O'Keefe CL, Matera AG, Xiong Y.(1994).Growth suppression by ~18, a p16(INK4/MTS1)- and p14(INK4B/MTS2)-related CDK6 inhibitor, correlates with wild-type pRb function.*Genes Dev*,8,2939-2952.
- 71- Hirai H, Roussel ME, Kato JY, Ashmun RA, Sherr CJ.(1995).Novel INK4 proteins, p19 and ~18, are specific inhibitors of the cyclin D-dependent kinases cdk4 and cdk6.*Mol Cell Biol*,15,2672-2681.

- 72-Kamb A, Gruis NA, Weaver-Feldhaus J, Liu Q, Harshman K, Tavitigian SV, Stockert E, Day RS III, Johnson BE, Skolnick MH..(1994).A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types.*Science*,264,436-440,
- 73-Washimi O, Nagatake M, Osada H, Ueda R, Koshikawa T, Seki T, Takahashi T, Takahashi T.(1995).In vivo occurrence of p16 (MTS 1) and ~15 (MTS2) alterations preferentially in non-small cell lung cancers. *Cancer Res*,55,514-517.
- 74.Costello JF, Berger MS, Huang HS, Cavennee WK.(1996).Silencing of p16/CDKN2 expression in human gliomas by methylation and chromatin condensation. *Cancer Res*,5,2405- 2410.
- 75.Ueki K, Ono Y, Henson JW, Efird JT, Von DA, Louis DN.(1996).CDKN2/p16 or RB alterations occur in the majority of glioblastomas and are inversely correlated.*Cancer Res*,56,50- 153.
- 76.Herman JG, Merlo A, Mao L, Lapidus RG, Issa JP, Davidson NE, Sidransky D, Baylin SB.(1995).Inactivation of the CDKN2/p16/MTS1 gene is frequently associated with aberrant DNA methylation in all common human cancers.*Cancer Res*,55,4525–4530.
77. Ono Y, Yamiya T, Ichikawa T, Kunishio K, Matsumoto K, Furuta T, Ohmoto T, Ueki K, Louis DN.(1996).Malignant astrocytomas with homozygous CDKN2/p16 gene deletions have higher Ki-67 proliferation indices.*J Neuropathol Exp Neurol*,55,1026–1031.
- 78.Hegi ME, Zur HA, Ruedi D, Malin G, Kleihues P.(1997).Hemizygous or homozygous deletion of the chromosomal region containing the p16INK4a gene is associated with amplification of the EGF receptor gene in glioblastomas. *Int J Cancer*,73,57-63.
- 79.Fombonne J, Devouassoux SM, Bouvier R, Droz JP, Benahmed M, Krantic S.(2005). Analysis of p16INK4A gene promoter in male germ-cell tumors: identification of a new point mutation. *Cancer Detect Prev*,29,1–7.
- 80.Abbaszadegan MR, Raziee HR, Ghafarzadegan K, Shakeri MT, Afsharnezhad S, Ghavamnasiry MR.(2005).Aberrant p16 methylation, a possible epigenetic risk factor in familial esophageal squamouscell carcinoma.*Int J Gastrointest Cancer*,36,47–54.

81. Debnjak T, Scott RJ, Huzarski T, et al.(2005).CDKN2A common variants and their association with melanoma risk: a population-based study.*Cancer Res*,65,835–9.
82. McCloud JM, Sivakumar R, Greenhough A, et al.(2004).p16INK4a polymorphism: associations with tumour progression in patients with sporadic colorectal cancer. *Int J Oncol*, 25,1447–52.
83. Toyoshima H, Hunter T.(1994).~27, a novel inhibitor of Glycyclin-cdk protein kinase activity, is related to p21. *Cell*,78,67-74.
84. Xiong Y.(1996).Why are there so many cdk inhibitors? *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*,1288,1-5.
85. Deng CX, Zhang PM, Harper JW, Elledge SJ, Leder P.(1995).Mice lacking p21(C/PI/WAF1) undergo normal development, but are defective in G₁ checkpoint control. *Cell*,82,675-684.
86. Harper JW, Elledge SJ, Keyomarsi K, Dynlacht B, Tsai LH, Zhang P Dobrowolski S, Bai C, Connell-CrowleyL, Swindell E, Fox MP, Wei N.(1995).Inhibition of cyclin-dependent kinases by ~21. *Mol Biol Cell*, 6,387-400.
87. Resnitzky D, Hengst L, Reed SI.(1995).Cyclin A-associated kinase activity is rate limiting for entrance into S phase and is negatively regulated in G₁, by p27Kip1. *Mol Cell Biol*, 15,4347-4352,
88. Chen JJ, Saha P Kornbluth S, Dynlacht BD, Dutta A.(1996).Cyclin-binding motifs are essential for the function ofp21 (CIP1). *Mol Cell Biol*,16,4673-4682.
89. Hall M, Bates S, Peters G.(1995).Evidence for different modes of action of cyclin-dependent kinase inhibitors: ~15 and p16 bind to kinases, p21 and p27 bind to cyclins. *Oncogene*,11,1581-1588.
90. Pan ZQ, Reardon JT, Li L, Flores-Rozas H, Legerski R, Sancar A, Hurwitz J.(1995).Inhibition of nucleotide excision repair by the cyclin-dependent kinase inhibitor~21. *J Biol Chem*,270,22008-22016.
91. Waldman T, Kinzler KW, Vogelstein B.(1995).p21 is necessary for the p53-mediated G₁ arrest in human cancer cells.*Cancer Res*,55,5187-5190.
92. Sherr CJ.(1996). Cancer cell cycles. *Science*,274,1672 – 7.
93. Zhou P, Jiang W, Weghorst CM, Weinstein IB.(1996).Overexpression of cyclin D enhances gene amplification.*Cancer Res*,5,36 – 9.

94. Wang TC, Cardiff RD, Zukerberg L, Lees E, Arnold A, Schmidt EV.(1994). Mammary hyperplasia and carcinoma in MMTV-cyclin D1 transgenic mice. *Nature*,369,669 – 71.
95. Judith A. McKay, Joy J. Douglas, Val G. Ross, Stephanie Curran, Fareeda Y. Ahmed, Joseph F. Loane, Graeme I. Murray, and Howard L.(2000). McLeod Expression of Cell Cycle Control Proteins in Primary Colorectal Tumors Does Not Always Predict Expression in Lymph Node Metastases. *Clinical Cancer Research*,6,1113–1118.
96. Fantl V, Smith R, Brookes S, Dickson C, Peters G.(1993). Chromosome 11q13 abnormalities in human breast cancer. *Cancer Surv.*,18,77–94
97. Lammie GA, Fantl V, Smith R, Schuurin E, Brookes S, Michalides R, Dickson C, Arnold A, Peters G.(1991). D11S287, a putative oncogene on chromosome 11q13, is amplified and expressed in squamous cell and mammary carcinomas and linked to BCL-1. *Oncogene*,6(3),439-44.
98. Michalides R, van Veelen N, Hart A, Loftus B, Wientjens E, Balm A.(1995). Overexpression of cyclin D1 correlates with recurrence in a group of forty-seven operable squamous cell carcinomas of the head and neck. *Cancer Res.*,55(5),975–978.
99. Donnellan, R., and Chetty, R.(1998). Cyclin D1 and human neoplasia. *Mol. Pathol.*,51,1–7, 1998.
100. Betticher, D. C., Thatcher, N., Altermatt, H. J., Hoban, P., Ryder, W. D. J., and Heighway, J.(1995). Alternate splicing produces a novel cyclin D1 transcript. *Oncogene*,11, 1005–1011.
101. Sawa, H., Ohshima, T. A., Ukita, H., Murakami, H., Chiba, Y., Kamada, H., Hara, M. and Saito, I.(1998). Alternatively spliced forms of cyclin D1 modulate entry into the cell cycle in an inverse manner. *Oncogene*, 16,1701–1712.
102. Sawa, H., Ohshima, T. A., Ukita, H., Murakami, H., Chiba, Y., Kamada, H., Hara, M. and Saito, I.(1998). Alternatively spliced forms of cyclin D1 modulate entry into the cell cycle in an inverse manner. *Oncogene*, 16,1701–1712.
103. Machdonald F., Ford C.H.J., Casson A. G.(2005). *Molecular Biology of Cancer*,140.
104. Zetterberg A, Larsson O, Wiman KG.(1995). What is the restriction point? *Curr Opin Cell Biol*,7,835-842,

- 105.Elledge SJ.(1996).Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis. *Science*,274~1664-1672.
- 106.Hayles J, Nurse P.(1986).Cell cycle regulation in yeast. *J Cell Sci*,4,155-170.
- 107.Hirst K, Fisher E McAndrew PC, Goding CR.(1994).The transcription factor, the cdk, its cyclin and their regulator:directing the transcriptional response to a nutritional signal. *Eur Mol Biol Organ J*,13,5410-5420.
- 108.Shambaugh GE III, Lee RJ, Watanabe G, Erfurth E Karnezis AN, Koch AE, Haines GK III, Halloran M, Brody BA, Pestell RG(1996).Reduced cyclin D1 expression in the cerebella of nutritionally deprived rats correlates with developmental delay and decreased cellular DNA synthesis. *J Neuropathol Exper Neurol*,55,1009-1020.
109. Levi-Montalcini.(1960)R. et al. *Ann. NY Acad. Sci.*,85,324.
- 110.<http://www.abcam.com/index.html?pageconfig=resource&rid=10723&pid=10628>
Erişim tarihi:06.08.2012
- 111.Oka, Y. et al. (1983) *J Clin. Invest*,72,249.
- 112.Massage, J. (1990) *J. Biol. Chem.* ,265(35),2139
113. Carpenter, G. et al. (1990) Peptide Growth Factors and Their Receptors I, M.B Sporn eds. *Springer-Verlag, New York*, p. 69
114. Cohen S. (1962) *J. Biol Chem.* 237,1555.
115. Das, M. et al. (1992) Human Cytokines. *Blackwell Scientific Pub., Boston*, p.365.
- 116 Xian CJ, Li L, Deng YS, Zhao SP, Zhou XF. (2001).Lack of effects of transforming growth factor-alpha gene knockout on peripheral nerve regeneration may result from compensatory mechanisms. *Exp Neurol*,172(1),182-8.
117. Zhu Y, Parada LF.(2002) The molecular and genetic basis of neurological tumours. *Nat Rev Cancer*,2(8),616-26. Review.
- 118.Wu GY, Hasenberg T, Magdeburg R, Bo'nninghoff R, Sturm JW, Keese M. (2009).Association between EGF, TGF-b1, VEGF gene polymorphism and colorectal cancer. *World J Surg*,33,124-9.
119. Miller ,S.A., Dykes ,D.D., Polesky, H.F.(1988) .A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*,16,1215.
120. Araújo AP, Ribeiro R, Pinto D, Pereira D, Sousa B, Mauricio J, Lopes C, Medeiros R.(2009).Epidermal growth factor genetic variation, breast cancer risk, and waiting time to onset of disease. *DNA Cell Biol.*,28(5),265-9.

121. Fisher DA, Lakshmanan J. (1990). Metabolism and effects of epidermal growth factor and related growth factors in mammals. *Endocr Rev.*, 11, 418–42.
122. Goto Y, Ando T, Goto H, Hamajima N. (2005). No association between EGF gene polymorphism and gastric cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*, 14(10), 2454–6.
123. Vauleon E, Auger N, Benouaich-Amiel A, Laigle-Donadey F, Kaloshi G, Lejeune J, Delattre JY, Thillet J, Sanson M. (2007). The 61 A/G EGF polymorphism is functional but is neither a prognostic marker nor a risk factor for glioblastoma. *Cancer Genet Cytogenet.*, 172(1), 33–7.
124. Kang S, Kim JW, Park NH, Song YS, Park SY, Kang SB, Lee HP. (2007). Epidermal growth factor 61 A/G polymorphism and uterine cervical cancer. *Int J Gynecol Cancer.*, 17(2), 492–6.
125. Lin L, Li G, Zhang Z, Wen M, Xu W, Cai J, Zhou B, Liu J. (2012). Association of Epidermal Growth Factor +61 A/G Polymorphism in Chinese Patients with Colon Cancer. *Genet Test Mol Biomarkers.*
126. Zhang W, Gordon M, Press OA, Rhodes K, Vallböhmer D, Yang DY, Park D, Fazzone W, Schultheis A, Sherrod AE, Iqbal S, Groshen S, Lenz HJ. (2006). Cyclin D1 and epidermal growth factor polymorphisms associated with survival in patients with advanced colorectal cancer treated with Cetuximab. *Pharmacogenet Genomics*, 16(7), 475–83.
127. Cui L, Pan XM, Ma CF, Shang-Guan J, Yu HB, Chen GX, Wang J. (2009). Association between epidermal growth factor polymorphism and esophageal squamous cell carcinoma susceptibility. *Dig Dis Sci.*, 55(1), 40–5.
128. Tomaszewski J, Miturski R, Kotarski J. (1996). Concentration of epidermal growth factor (EGF) in serum of women with endometrial cancer. *Ginekolog Pol.*, 67, 248–253
129. Pawlikowski M, Cieslak D, Stepień H, Berner J, Rybin'ski K. (1989). Elevated blood serum levels of epidermal growth factor in some patients with gastric cancer. *Endokrynol Pol.*, 40, 149–153
130. Wang Y, Tian T, Hu Z, Tang J, Wang S, Wang X, Qin J, Huo X, Gao J, Ke Q, Jin G, Ma H, Wang X, Shen H. (2007). EGF promoter SNPs, plasma EGF levels and risk of breast cancer in Chinese women. *Breast Cancer Res Treat.*, 111(2), 321–7.

131. Spindler KL, Nielsen JN, Ornskov D, Brandslund I, Jakobsen A.(2007).Epidermal growth factor (EGF) A61G polymorphism and EGF gene expression in normal colon tissue from patients with colorectal cancer. *Acta Oncol.*,46(8),1113-7.
132. Cheung WY, Zhai R, Kulke MH, Heist RS, Asomaning K, Ma C, Wang Z, Su L, Lanuti M, Tanabe KK, Christiani DC, Liu G. (2009).Epidermal growth factor A61G gene polymorphism, gastroesophageal reflux disease and esophageal adenocarcinoma risk. *Carcinogenesis*,30(8),1363-7.
133. Lanuti M, Liu G, Goodwin JM, Zhai R, Fuchs BC, Asomaning K, Su L, Nishioka NS, Tanabe KK, Christiani DC.(2008).A functional epidermal growth factor (EGF) polymorphism, EGF serum levels, and esophageal adenocarcinoma risk and outcome. *Clin Cancer Res.*,14(10),3216-22.
134. Wu GY, Hasenberg T, Magdeburg R, Bönninghoff R, Sturm JW, Keese M.(2009). Association between EGF, TGF-beta1, VEGF gene polymorphism and colorectal cancer. *World J Surg*,33(1),124-9.
135. Zhu J, Meng X, Yan F, Qin C, Wang M, Ding Q, Li P, Yang J, Ju X, Zhang Z, Wang S, Yin C. (2010).A functional epidermal growth factor (EGF) polymorphism, EGF serum levels and renal cell carcinoma risk in a Chinese population. *J Hum Genet*,55(4),236-40.
136. Yang G, Rao L, Tian L, Cai X.(2012).An Association between EGF and EGFR Gene Polymorphisms with Gastric Cancer in a Chinese Han Population. *Hepatogastroenterology*,59(120),doi: 10.5754/hge12152.

HAM VERİLER

Crosstab

			EGFA		Total
			AA+AG	GG	
grupcanan	mide	Count	62	22	84
		% within grupcanan	73,8%	26,2%	100,0%
	kontrol	Count	124	22	146
		% within grupcanan	84,9%	15,1%	100,0%
Total		Count	186	44	230
		% within grupcanan	80,9%	19,1%	100,0%

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	4,263 ^b	1	,039	,055	,031
Continuity Correction ^a	3,575	1	,059		
Likelihood Ratio	4,146	1	,042		
Fisher's Exact Test					
Linear-by-Linear Association	4,245	1	,039		
N of Valid Cases	230				

a. Computed only for a 2x2 table

b. 0 cells (,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 16,07.

Risk Estimate

	Value	95% Confidence Interval	
		Lower	Upper
Odds Ratio for grupcanan (mide / kontrol)	,500	,257	,972
For cohort EGFA = AA+AG	,869	,752	1,004
For cohort EGFA = GG	1,738	1,027	2,943
N of Valid Cases	230		

Crosstab

			EGFAG		Total
			AG	AA+GG	
grupcanan	mide	Count	45	39	84
		% within grupcanan	53,6%	46,4%	100,0%
	kontrol	Count	76	70	146
		% within grupcanan	52,1%	47,9%	100,0%
Total		Count	121	109	230
		% within grupcanan	52,6%	47,4%	100,0%

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	,049 ^b	1	,824		
Continuity Correction ^a	,007	1	,933		
Likelihood Ratio	,049	1	,824		
Fisher's Exact Test				,891	,467
Linear-by-Linear Association	,049	1	,825		
N of Valid Cases	230				

a. Computed only for a 2x2 table

b. 0 cells (,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 39,81.

Risk Estimate

	Value	95% Confidence Interval	
		Lower	Upper
Odds Ratio for grupcanan (mide / kontrol)	1,063	,621	1,820
For cohort EGFAG = AG	1,029	,799	1,325
For cohort EGFAG = AA+GG	,968	,728	1,288
N of Valid Cases	230		

Crosstab

			EGFG		Total
			AG+GG	AA	
grupcanan	mide	Count	67	17	84
		% within grupcanan	79,8%	20,2%	100,0%
	kontrol	Count	98	48	146
		% within grupcanan	67,1%	32,9%	100,0%
Total		Count	165	65	230
		% within grupcanan	71,7%	28,3%	100,0%

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	4,201 ^b	1	,040		
Continuity Correction ^a	3,601	1	,058		
Likelihood Ratio	4,341	1	,037		
Fisher's Exact Test				,048	,028
Linear-by-Linear Association	4,183	1	,041		
N of Valid Cases	230				

a. Computed only for a 2x2 table

b. 0 cells (,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 23,74.

Risk Estimate

	Value	95% Confidence Interval	
		Lower	Upper
Odds Ratio for grupcanan (mide / kontrol)	1,930	1,024	3,641
For cohort EGFG = AG+GG	1,188	1,016	1,390
For cohort EGFG = AA	,616	,380	,998
N of Valid Cases	230		

T-Test

Group Statistics

grupcanan	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
ELISA mide	79	27,227	43,6975	4,9164
kontrol	84	29,727	36,2419	3,9543

Independent Samples Test

	Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
	F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
								Lower	Upper
ELISA Equal variance assumed	1,226	,270	-,399	161	,691	-2,5008	6,2734	14,8895	9,8879
Equal variance not assumed			-,396	151,844	,692	-2,5008	6,3093	14,9661	9,9645

Crosstabs

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
grupcanan * GESKsiagaradegeri	230	100,0%	0	,0%	230	100,0%

grupcanan * GESKsiagaradegeri Crosstabulation

			GESKsiagaradegeri		Total
			sýgara içme (+)	sigara içme (-)	
grupcanan	mide	Count	12	72	84
		% within grupcanan	14,3%	85,7%	100,0%
	kontrol	Count	55	91	146
		% within grupcanan	37,7%	62,3%	100,0%
Total		Count	67	163	230
		% within grupcanan	29,1%	70,9%	100,0%

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	14,125 ^b	1	,000	,000	,000
Continuity Correction ^a	13,015	1	,000		
Likelihood Ratio	15,196	1	,000		
Fisher's Exact Test					
Linear-by-Linear Association	14,064	1	,000		
N of Valid Cases	230				

a. Computed only for a 2x2 table

b. 0 cells (,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 24,47.

Risk Estimate

	Value	95% Confidence Interval	
		Lower	Upper
Odds Ratio for grupcanan (mide / kontrol)	,276	,137	,554
For cohort GESKsiagaradegeri = sýgara içme (+)	,379	,216	,666
For cohort GESKsiagaradegeri = sigara içme (-)	1,375	1,180	1,603
N of Valid Cases	230		

Crosstabs

Crosstabs

grupcanan * ESKailedecadegeeri Crosstabulation

			ESKailedecadegeeri		Total
			ailedede ca var	ailedede ca yok	
grupcanan	mide	Count	3	28	31
		% within grupcanan	9,7%	90,3%	100,0%
	kontrol	Count	4	34	38
		% within grupcanan	10,5%	89,5%	100,0%
Total		Count	7	62	69
		% within grupcanan	10,1%	89,9%	100,0%

grupcanan * Gtumortip Crosstabulation

			Gtumor tip				Total	
			tubuler	intestinal	diffüz tip tablý yuzuk	müsinöz adeno ca		
grupcanan	mide	Count	3	2	9	1	15	
		% within grupcanan	20,0%	13,3%	60,0%	6,7%	100,0%	
Total		Count	3	2	9	1	15	
		% within grupcanan	20,0%	13,3%	60,0%	6,7%	100,0%	

grupcanan * Gmidetumtipmide Crosstabulation

			Gmidetumtipmide		Total	
			adeno	tablý yuzuk		
grupcanan	mide	Count	20	11	31	
		% within grupcanan	64,5%	35,5%	100,0%	
Total		Count	20	11	31	
		% within grupcanan	64,5%	35,5%	100,0%	

grupcanan * Gtumorlokalizasyonmide Crosstabulation

		Gtumorlokalizasyonmide							Total
		antrum buyuk kurvatür	antrum küçük kuvatur	kardia	antrum korpus	antrum plo korpus	antrum		
grupcanı	mide Count	2	4	3	6	3	3	3	24
	% within grupcanı	8,3%	16,7%	12,5%	25,0%	12,5%	12,5%	12,5%	100,0%
Total	Count	2	4	3	6	3	3	3	24
	% within grupcanı	8,3%	16,7%	12,5%	25,0%	12,5%	12,5%	12,5%	100,0%

grupcanan * Gtumornekrozumide Crosstabulation

			Gtumornekrozumide		Total
			var	yok	
grupcanan	mide	Count	8	11	19
		% within grupcanan	42,1%	57,9%	100,0%
Total		Count	8	11	19
		% within grupcanan	42,1%	57,9%	100,0%

grupcanan * Gperinöralinvide Crosstabulation

			Gperinöralinvide		Total
			var	yok	
grupcanan	mide	Count	12	9	21
		% within grupcanan	57,1%	42,9%	100,0%
Total		Count	12	9	21
		% within grupcanan	57,1%	42,9%	100,0%

grupcanan * Ghistolojikgrade Crosstabulation

			Ghistolojikgrade		Total
			II	III	
grupcanan	mide	Count	7	14	21
		% within grupcanan	33,3%	66,7%	100,0%
Total		Count	7	14	21
		% within grupcanan	33,3%	66,7%	100,0%

grupcanan * Gkandamarinv Crosstabulation

			Gkandamarinv		Total
			var	yok	
grupcanan	mide	Count	7	7	14
		% within grupcanan	50,0%	50,0%	100,0%
Total		Count	7	7	14
		% within grupcanan	50,0%	50,0%	100,0%

Crosstabs

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
grupcanan * GESKmetdegeri	57	24,8%	173	75,2%	230	100,0%

grupcanan * GESKmetdegeri Crosstabulation

			GESKmetdegeri		Total
			met var	met yok	
grupcanan mide	Count		22	35	57
	% within grupcanan		38,6%	61,4%	100,0%
Total	Count		22	35	57
	% within grupcanan		38,6%	61,4%	100,0%

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		ELISA	Gyap
N		163	147
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	28,515	54,8571
	Std. Deviation	39,9237	11,83621
Most Extreme Differences	Absolute	,267	,112
	Positive	,247	,112
	Negative	-,267	-,076
Kolmogorov-Smirnov Z		3,410	1,363
Asymp. Sig. (2-tailed)		,000	,049

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

NPar Tests**Kruskal-Wallis Test****Ranks**

grupcanan		N	Mean Rank
ELISA	mide	79	72,45
	kontrol	84	90,98
	Total	163	

Test Statistics^{a,b}

	ELISA
Chi-Square	6,281
df	1
Asymp. Sig.	,012

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: grupcanan

Descriptives

ELISA

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
mide	79	27,227	43,6975	4,9164	17,439	37,014	3,7	195
kontrol	84	29,727	36,2419	3,9543	21,862	37,592	4,0	168
Total	163	28,515	39,9237	3,1271	22,340	34,690	3,7	195

Warnings

Post hoc tests are not performed for ELISA because there are fewer than three groups.

Descriptives

ELISA

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
mide	15	17,107	31,5318	8,1415	-,355	34,568	3,7	128
kontrol	28	40,446	46,9536	8,8734	22,240	58,653	4,1	168
Total	43	32,305	43,3055	6,6040	18,977	45,632	3,7	168

Kruskal-Wallis Test**Ranks**

grupcanan		N	Mean Rank
ELISA	mide	15	17,43
	kontrol	28	24,45
	Total	43	

Test Statistics^{a,b}

	ELISA
Chi-Square	3,049
df	1
Asymp. Sig.	,081

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: grupcanan

Kruskal-Wallis Test

Ranks

	grupcanan	N	Mean Rank
ELISA	mide	42	38,95
	kontrol	43	46,95
	Total	85	

Test Statistics^{a,b}

	ELISA
Chi-Square	2,234
df	1
Asymp. Sig.	,135

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: grupcanan

Kruskal-Wallis Test

Ranks

	grupcanan	N	Mean Rank
ELISA	mide	22	16,95
	kontrol	13	19,77
	Total	35	

Test Statistics^{a,b}

	ELISA
Chi-Square	,618
df	1
Asymp. Sig.	,432

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: grupcanan

Crosstabs

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
grupcanan * GTE3	64	27,8%	166	72,2%	230	100,0%
grupcanan * ESKn	64	27,8%	166	72,2%	230	100,0%
grupcanan * GESKmetdegeri	63	27,4%	167	72,6%	230	100,0%

Crosstab

			GTE3				Total
			T1	T2	T3	T4	
grupcanan mide	Count		2	16	21	25	64
	% within grupcanan		3,1%	25,0%	32,8%	39,1%	100,0%
Total	Count		2	16	21	25	64
	% within grupcanan		3,1%	25,0%	32,8%	39,1%	100,0%

Chi-Square Tests

	Value
Pearson Chi-Square	. ^a
N of Valid Cases	64

a. No statistics are computed because grupcanan is a constant.

Risk Estimate

	Value
Odds Ratio for grupcanan (mide / .)	. ^a

a. No statistics are computed because grupcanan is a constant.

Crosstab

			ESKn				Total
			N0	N1	N2	N3	
grupcanan mide	Count		12	25	17	10	64
	% within grupcanan		18,8%	39,1%	26,6%	15,6%	100,0%
Total	Count		12	25	17	10	64
	% within grupcanan		18,8%	39,1%	26,6%	15,6%	100,0%

Crosstabs

Warnings

No measures of association are computed for the crosstabulation of grupcanan * GESKmetdegeri. At least one variable in each 2-way table upon which measures of association are computed is a constant.

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
grupcanan * GESKmetdegeri	64	27,8%	166	72,2%	230	100,0%

grupcanan * GESKmetdegeri Crosstabulation

			GESKmetdegeri		Total
			met var	met yok	
grupcanan mide	Count		22	42	64
	% within grupcanan		34,4%	65,6%	100,0%
Total	Count		22	42	64
	% within grupcanan		34,4%	65,6%	100,0%

Chi-Square Tests

	Value
Pearson Chi-Square	. ^a
N of Valid Cases	64

a. No statistics are computed because grupcanan is a constant.

Risk Estimate

	Value
Odds Ratio for grupcanan (mide / .)	. ^a

a. No statistics are computed because grupcanan is a constant.

Crosstabs

Crosstab

			EGFA		Total
			AA+AG	GG	
GESKtdegeri	T3+T4	Count	36	9	45
		% within GESKtdegeri	80,0%	20,0%	100,0%
	T1+T2	Count	15	4	19
		% within GESKtdegeri	78,9%	21,1%	100,0%
Total		Count	51	13	64
		% within GESKtdegeri	79,7%	20,3%	100,0%

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	,009 ^b	1	,924	1,000	,585
Continuity Correction ^a	,000	1	1,000		
Likelihood Ratio	,009	1	,924		
Fisher's Exact Test					
Linear-by-Linear Association	,009	1	,924		
N of Valid Cases	64				

a. Computed only for a 2x2 table

b. 1 cells (25,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 3,86.

Risk Estimate

	Value	95% Confidence Interval	
		Lower	Upper
Odds Ratio for GESKtdegeri (T3+T4 / T1+T2)	1,067	,284	4,004
For cohort EGFA = AA+AG	1,013	,770	1,333
For cohort EGFA = GG	,950	,333	2,711
N of Valid Cases	64		

Crosstab

			EGFAG		Total
			AG	AA+GG	
GESKtdegeri	T3+T4	Count	28	17	45
		% within GESKtdegeri	62,2%	37,8%	100,0%
	T1+T2	Count	10	9	19
		% within GESKtdegeri	52,6%	47,4%	100,0%
Total		Count	38	26	64
		% within GESKtdegeri	59,4%	40,6%	100,0%

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	,509 ^b	1	,475		
Continuity Correction ^a	,189	1	,663		
Likelihood Ratio	,506	1	,477		
Fisher's Exact Test				,580	,330
Linear-by-Linear Association	,501	1	,479		
N of Valid Cases	64				

a. Computed only for a 2x2 table

b. 0 cells (,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 7,72.

Risk Estimate

	Value	95% Confidence Interval	
		Lower	Upper
Odds Ratio for GESKtdegeri (T3+T4 / T1+T2)	1,482	,502	4,381
For cohort EGFAG = AG	1,182	,729	1,917
For cohort EGFAG = AA+GG	,798	,436	1,460
N of Valid Cases	64		

Crosstab

			EGFG		Total
			AG+GG	AA	
GESKtdegeri	T3+T4	Count	37	8	45
		% within GESKtdegeri	82,2%	17,8%	100,0%
	T1+T2	Count	14	5	19
		% within GESKtdegeri	73,7%	26,3%	100,0%
Total		Count	51	13	64
		% within GESKtdegeri	79,7%	20,3%	100,0%

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	,602 ^b	1	,438		
Continuity Correction ^a	,190	1	,663		
Likelihood Ratio	,581	1	,446		
Fisher's Exact Test				,503	,324
Linear-by-Linear Association	,592	1	,442		
N of Valid Cases	64				

a. Computed only for a 2x2 table

b. 1 cells (25,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 3,86.

Risk Estimate

	Value	95% Confidence Interval	
		Lower	Upper
Odds Ratio for GESKtdegeri (T3+T4 / T1+T2)	1,652	,461	5,914
For cohort EGFG = AG+GG	1,116	,826	1,508
For cohort EGFG = AA	,676	,253	1,800
N of Valid Cases	64		

Crosstab

			EGFA		Total
			AA+AG	GG	
Gndegeri	n1, n2, n3	Count	41	11	52
		% within Gndegeri	78,8%	21,2%	100,0%
	n0	Count	10	2	12
		% within Gndegeri	83,3%	16,7%	100,0%
Total		Count	51	13	64
		% within Gndegeri	79,7%	20,3%	100,0%

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	,121 ^b	1	,728	1,000	,540
Continuity Correction ^a	,000	1	1,000		
Likelihood Ratio	,126	1	,723		
Fisher's Exact Test					
Linear-by-Linear Association	,119	1	,730		
N of Valid Cases	64				

a. Computed only for a 2x2 table

b. 1 cells (25,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 2,44.

Risk Estimate

	Value	95% Confidence Interval	
		Lower	Upper
Odds Ratio for Gndegeri (n1, n2, n3 / n0)	,745	,142	3,911
For cohort EGFA = AA+AG	,946	,708	1,264
For cohort EGFA = GG	1,269	,323	4,993
N of Valid Cases	64		

Crosstab

			EGFAG		Total
			AG	AA+GG	
Gndegeri	n1, n2, n3	Count	29	23	52
		% within Gndegeri	55,8%	44,2%	100,0%
	n0	Count	9	3	12
		% within Gndegeri	75,0%	25,0%	100,0%
Total		Count	38	26	64
		% within Gndegeri	59,4%	40,6%	100,0%

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	1,495 ^b	1	,221		
Continuity Correction ^a	,804	1	,370		
Likelihood Ratio	1,570	1	,210		
Fisher's Exact Test				,331	,186
Linear-by-Linear Association	1,472	1	,225		
N of Valid Cases	64				

a. Computed only for a 2x2 table

b. 1 cells (25,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 4,88.

Risk Estimate

	Value	95% Confidence Interval	
		Lower	Upper
Odds Ratio for Gndegeri (n1, n2, n3 / n0)	,420	,102	1,733
For cohort EGFG = AG	,744	,495	1,117
For cohort EGFG = AA+GG	1,769	,634	4,938
N of Valid Cases	64		

Crosstab

			EGFG		Total
			AG+GG	AA	
Gndegeri	n1, n2, n3	Count	40	12	52
		% within Gndegeri	76,9%	23,1%	100,0%
	n0	Count	11	1	12
		% within Gndegeri	91,7%	8,3%	100,0%
Total		Count	51	13	64
		% within Gndegeri	79,7%	20,3%	100,0%

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	1,309 ^b	1	,253		
Continuity Correction ^a	,557	1	,456		
Likelihood Ratio	1,537	1	,215		
Fisher's Exact Test				,432	,237
Linear-by-Linear Association	1,289	1	,256		
N of Valid Cases	64				

a. Computed only for a 2x2 table

b. 1 cells (25,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 2,44.

Risk Estimate

	Value	95% Confidence Interval	
		Lower	Upper
Odds Ratio for Gndegeri (n1, n2, n3 / n0)	,303	,035	2,592
For cohort EGFG = AG+GG	,839	,669	1,052
For cohort EGFG = AA	2,769	,398	19,290
N of Valid Cases	64		

Crosstab

			EGFA		Total
			AA+AG	GG	
GESKmetdegeri	met var	Count	18	4	22
		% within GESKmetdegeri	81,8%	18,2%	100,0%
	met yok	Count	33	9	42
		% within GESKmetdegeri	78,6%	21,4%	100,0%
Total		Count	51	13	64
		% within GESKmetdegeri	79,7%	20,3%	100,0%

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	,094 ^b	1	,759	1,000	,517
Continuity Correction ^a	,000	1	1,000		
Likelihood Ratio	,095	1	,758		
Fisher's Exact Test					
Linear-by-Linear Association	,093	1	,761		
N of Valid Cases	64				

a. Computed only for a 2x2 table

b. 1 cells (25,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 4,47.

Risk Estimate

	Value	95% Confidence Interval	
		Lower	Upper
Odds Ratio for GESKmetdegeri (met var / met yok)	1,227	,331	4,550
For cohort EGFA = AA+AG	1,041	,809	1,340
For cohort EGFA = GG	,848	,294	2,446
N of Valid Cases	64		

Crosstab

			EGFAG		Total
			AG	AA+GG	
GESKmetdegeri	met var	Count	14	8	22
		% within GESKmetdegeri	63,6%	36,4%	100,0%
	met yok	Count	24	18	42
		% within GESKmetdegeri	57,1%	42,9%	100,0%
Total		Count	38	26	64
		% within GESKmetdegeri	59,4%	40,6%	100,0%

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	,252 ^b	1	,615		
Continuity Correction ^a	,055	1	,815		
Likelihood Ratio	,254	1	,614		
Fisher's Exact Test				,789	,410
Linear-by-Linear Association	,248	1	,618		
N of Valid Cases	64				

a. Computed only for a 2x2 table

b. 0 cells (,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 8,94.

Risk Estimate

	Value	95% Confidence Interval	
		Lower	Upper
Odds Ratio for GESKmetdegeri (met var / met yok)	1,313	,454	3,796
For cohort EGFAG = AG	1,114	,739	1,679
For cohort EGFAG = AA+GG	,848	,441	1,632
N of Valid Cases	64		

Crosstab

		EGFG		Total
		AG+GG	AA	
GESKmetdegeri met var	Count	18	4	22
	% within GESKmetdegeri	81,8%	18,2%	100,0%
met yok	Count	33	9	42
	% within GESKmetdegeri	78,6%	21,4%	100,0%
Total	Count	51	13	64
	% within GESKmetdegeri	79,7%	20,3%	100,0%

FORMLAR

MİDE KANSERİ ARAŞTIRMA FORMU

Form No:	Protokol No :	Tarih :
Adı Soyadı :	Yaş :	Cinsiyet :
Boy / Kilo :	Meslek :	Kan Grubu:
Memleket:	Yaşadığı yer:	

Öyküsü:

Yakınmanın başlangıç zamanı:

Öz geçmişi:

Sigara tüketimi (süre, miktar)
 Alkol kullanımı
 İlaç kullanımı
 Transfüzyon

İskemik kalp hastalığı
 Kronik Böbrek Yetersizliği
 Steroid kullanımı
 Kronik Karaciğer Hastalığı
 Diğer

Diabetes Mellitus
 Malign hastalık
 Kemoterapi
 Radyoterapi

Meyve tüketimi az orta bol
 Sebze tüketimi az orta bol
 Yağ tüketimi zeytinyağı bitkisel yağ(çiçek yağı vs) Hayvansal

Yağ

Öz geçmişinde mide ile ilgili yakınma / hastalık:

Polip (tipini yazınız)
 Adenom (tipini yazınız)

Soy geçmişi:

Mide Ca
 Diğer malign hastalıklar
 Diabetes Mellitus
 Kronik Karaciğer Hastalığı

Ameliyat öncesi Kan Biyokimyası:

Glukoz	BUN	Prot	Alb
ALT	AST	ALP	GGT
LDH	T Kolest	Ca	P
LDL	HDL	Löko	Tromb
Hb	Htc		

Ameliyat öncesi tanı :

Yapılan Ameliyat :

Histopatolojik incelemeye ait veriler.

Ek belgeler:

ETİK KURUL KARARI



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI
ETİK DEĞERLENDİRME KOMİSYONU



Sayı : 280

Tarih : 15/06/2010

Konu: Doç.Dr. İlhan Yaylım ERALTAN hk,

Sayın Doç.Dr. İlhan Yaylım ERALTAN
Deneyisel Tıp Araştırma Enstitüsü
Moleküler Tıp Anabilim Dalı Öğretim Üyesi
İlgil : 10.11.2009 tarihli yazınız

Sorumlu araştırmacılığını üstlendiğiniz ve doktora öğrencisi Canan CACINA'nın yürüteceği 2009/2900-95 dosya numaralı "Mide Kanseri Hastalarda EGF Gen Polimorfizminin ve Serum EGF Düzeyinin İncelenmesi" başlıklı doktora tez çalışması İstanbul 2' Nolu Klinik Araştırmalar Etik Kurulunun 02.12.2009 tarihli 06 sayılı toplantısında onaylanmış olup, Etik Kurulun 13.01.2010 tarihinde durdurulmasından dolayı onay yazısı, yeni kurulan Etik Değerlendirme Komisyonu tarafından yazılmıştır.
Bilgilerinize saygılarımla rica ederim.

Prof.Dr. A. Yağız ÜRESİN
İstanbul Tıp Fakültesi Dekanlığı
Etik Değerlendirme Komisyon Başkanı

Eki: Tutanak

PATENT HAKKI İZNİ

TELİF HAKKI İZNİ

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Canan	Soyadı	Cacina
Doğ.Yeri	İstanbul	Doğ.Tar.	06.01.1980
Uyruğu	T.C	TC Kim No	25904351324
Email	canancacina@gmail.com	Tel	0554203 20 80

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora		
Yük.Lis.	İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ DETAE MOLEKÜLER TIP ANABİLİM DALI	2008
Lisans	MARMARA ÜNİVERSİTESİ FEN-EDEBİYAT FAKÜLTESİ BİYOLOJİ BÖLÜMÜ	2006
Lise	YABANCI DİL AĞIRLIKLI ATAKÖY HASAN POLATKAN LİSESİ	1998

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Ar. Gör.	İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ DETAE MOLEKÜLER TIP ANABİLİM DALI	2008-
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı			
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

Özel İlgi Alanları (Hobileri):