T.C
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

MİDE KANSERLİ HASTALARDA PERİFERİK KANDA TELOMERAZ mRNA EKSPRESYONUNUN REAL TİME PCR KULLANILARAK BELİRLENMESİ ve KLİNİKOPATOLOJİK ÖZELLİKLERLE İLİŞKİSİNİN SAPTANMASI

Dr. Hamdullah TURHAN

Tez Yöneticisi
Prof. Dr. Ebubekir BAKAN

Uzmanlık Tezi

Erzurum - 2008

T.C
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

MİDE KANSERLİ HASTALARDA PERİFERİK KANDA TELOMERAZ mRNA EKSPRESYONUNUN REAL TİME PCR KULLANILARAK BELİRLENMESİ ve KLİNİKOPATOLOJİK ÖZELLİKLERLE İLİŞKİSİNİN SAPTANMASI

Dr. Hamdullah TURHAN

Tez Yöneticisi
Prof. Dr. Ebubekir BAKAN

Uzmanlık Tezi

Erzurum - 2008

İÇİNDEKİLER

Onay Sayfası…….. IV

Teşekkür…….. V

Kısaltmalar…….. VI

Özet…….. VII

Abstract…….. IX

1- GİRİŞ ve AMAÇ…….. 1

2- GENEL BİLGİLER…….. 3

2.1-Kanser……..... 3

2.1.1- Kanserin Gelişimi ve Nedenleri…….. 3

2.1.2- Kanser Hücrelerinin Özellikleri …… 4

2.1.3- Kanserin Yayılma Yolları…….. 7

2.1.3.1- Vücut Boşlukları ve Yüzeyleri Yoluyla Yayılma…… 7

2.1.3.2- Lenf Damarları Yoluyla Yayılma…… 7

2.1.3.3- Kan Damarları Yoluyla Yayılma…… 9

2.1.4-Kansere Genetik Bakış ……..... 9

2.1.4.1-Onkogenler…… 9

2.1.4.2- Tümör Baskılayıcı Genler…….. 12

2.1.4.3- DNA Tamir Genleri……... 15

2.2- Mide Kanseri …… 15

2.2.1- Midenin Anatomisi, Histolojisi ve Biyokimyası…….. 15

2.2.2- Mide Kanserinin Epidemiyolojisi …… 18

2.2.3- Mide Kanserinin Etiyopatogenezi…… 19

2.2.3.1-Çevresel Faktörler ve Diyet…… 19

2.2.3.2- H.Pilori ile İnfeksiyon…… 20

2.2.3.3-İyonize Radyasyon…….. 20

2.2.3.4-Alkol ve Sigara Kullanımı …… 20

2.2.3.5-Pernisiyöz Anemi…….. 20

2.2.3.6-Düşük Sosyoekonomik Düzey…… 20

2.2.3.7-Kişisel Faktörler…… 21

2.2.3.8-Kronik Atrofik Gastrit ve İntestinal Metaplazi…….. 21

2.2.3.9-Gastrik Displazi……... 22

2.2.3.10-Kronik Peptik Ülser…… 22

2.2.3.11- Barret Özefagus…….. 22
2.2.4- Mide Kanserinin Patolojisi ve Sınıflandırması…… 22
2.2.5- Mide Kanserinin Tanısı……. 24
2.2.5.1- Klinik Bulgular…… 24
2.2.5.2- Laboratuar Bulguları…….. 24
2.2.5.3- Endoskopi (Gastroskopi)..... 24
2.2.5.4- Radyolojik Tanı Yöntemleri……. 25
2.2.6-Mide Kanserinin Moleküler Yönü ve Genetik ve Epigenetik Değişiklikleri……... 25
2.2.7- Mide Kanserinde Evreleme……. 31
2.2.8-Mide Kanserinin Tedavisi……..…….. 32
2.2.8.1-Radyoterapi…….. 32
2.2.8.2- Kemoterapi…….. 32
2.2.8.3-Cerrahi…….. 32
2.2.9- Mide Kanserinin Prognozu……. 33
2.3- Telomer ve Telomeraz ……... 34
2.3.1- Telomerler …… 34
2.3.2- Telomere Bağlanan Faktörler…… 36
2.3.3- Telomeraz Enziminin Yapısı ve Alt Birimleri…… 36
2.3.4- Telomerazın Fonksiyonu……. 39
2.3.5- Telomeraz ve Kanser…….. 41
2.3.6-Telomeraz İnhibitörleri ve Kanser Tedavisindeki Yeri…… 42
2.3.7- Telomeraza Yönelik Gen Tedavisi……... 43
2.4- PCR ve REAL TİME PCR…… 43
2.4.1-Polimeraz Zincir Reaksiyonunun (PCR) Oluşum Mekanizması. 43
2.4.2-Polimeraz Zincir Reaksiyonunun Temel Bileşenleri…… 44
2.4.3- PCR'nin İşleyişi……. 45
2.4.4- PCR Uygulama Alanları…… 46
2.4.5- PCR 'a Dayalı Yöntemlerden Bazıları…… 47
2.4.5.1-Real Time PCR:…… 47
2.4.5.2-Ters Transkriptaz PCR:…..…… 49
3-GEREÇ ve YÖNTEM…… 50
3.1-Gereçler…… 49

3.1.1-Bireyler…… 49
3.1.2-Kan Numunelerinin Alınması…… 49
3.1.3- Çalışmada Kullanılan Kimyasal Malzemeler…….. 49
3.1.4- Çalışmada Kullanılan Alet ve Cihazlar…….. . 50
3.2-Yöntemler……... 50
3.2.1- Deneylerin Yapılışı…… 50
3.2.1.1- Total RNA İzolasyonu…… 50
3.2.1.2- Total RNA Miktar tayini…….. 51
3.2.1.3- Real Time PCR ile Telomeraz mRNA Ekspresyonunun Kantitatif Olarak Belirlenmesi…… 52
3.2.2- Real Time PCR Tekniğinde TaqMan Problar ve Özellikleri…… 54
3.2.3-Real Time PCR Kantifikasyon Analizinde Kullanılan Terimler ve Data Analizi…… 56
3.3- İstatistiksel Analiz…….. 59
4- BULGULAR…….. 60
4.1-Hasta ve Kontrol Grubunda hTERT mRNA Ekspresyon Düzeylerinin Karşılaştırılması…….. 60
4.2- Mide Kanserli Hastalarda hTERT mRNA Ekspresyon Düzeylerinin Klinikopatolojik Özelliklerle İlişkisinin Karşılaştırılması…… 61
5- TARTIŞMA…… 69
6- SONUÇ VE ÖNERİLER……... 79
7- KAYNAKLAR……... 80

ONAY

Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Kurulu' nun 07.12.2006/- tarih ve bila sayılı toplantısında; "Mide Kanserli Hastalarda Periferik Kanda Telomeraz mRNA Ekspresyonunun Real Time PCR Kullanılarak Belirlenmesi ve Klinikopatolojik Özelliklerle İlişkisinin Saptanması" başlıklı konunun Dr. Hamdullah TURHAN'a uzmanlık tezi olarak verilmesine ve tez yönetiminin Prof. Dr. Ebubekir BAKAN tarafından yürütülmesine karar verildi. Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'nun 16.01.2007/2 tarih ve sayılı kararı ile ilgili tezin etik kurul onayı alındı ve Temel Tıp Bilimleri Bölümünün 12.03.2007/2 tarih ve sayılı kararı ile tez konusu olarak kabul edilmesine karar verildi.

TEŞEKKÜR

İhtisas tezi olarak sunduğum bu çalışmada, değerli bilgi, tecrübe ve deneyimlerinden yararlanıp benden her türlü desteğini, hoşgörüsünü ve emeğini esirgemeyen tez hocam Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Ebubekir BAKAN'a, İhtisas hayatım süresince, karşılaştığım her türlü sorunda benden yardımını esirgemeyen ve tez çalışmamda büyük emeği geçen Yrd. Doç. Dr. Abdulkadir YILDIRIM'a, İhtisas eğitimim boyunca her zaman yakın ilgi ve bilimsel desteklerini gördüğüm Prof. Dr. Fatih AKÇAY'a, yine ihtisas eğitimim süresince benden yardımını esirgemeyen Prof. Dr. Yaşar Nuri ŞAHİN'e, Prof. Dr. Nuri BAKAN'a, Prof. Dr. Leyla YILDIZ'a, Prof. Dr. Ahmet KIZILTUNÇ'a, Doç. Dr Hülya AKSOY'a, Doç. Dr. Zuhal UMUDUM'a ve Doç. Dr. M. Sait Keleş hocama teşekkürü bir borç bilirim.

Tez çalışmamda büyük yardımları olan İç Hastalıkları Anabilim Dalı Onkoloji Bölümü öğretim üyeleri Prof. Dr. Salim Başol TEKİN'e, Yrd. Doç. Dr. Kerim ÇAYIR'a ve Yrd. Doç.Dr. Mehmet BİLİCİ'ye ve Genel Cerrahi Anabilim Dalı öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Gürkan ÖZTÜRK'e teşekkürü bir borç bilirim.

İstatistik çalışmalarımda özverili çalışmaları ile bana büyük destek olan Tıp Eğitim Anabilim Dalı Başkanı Yrd. Doç. Dr. Hamit Acemoğlu'na teşekkür ederim.

İhtisas eğitimim boyunca desteklerini ve arkadaşlıklarını benden esirgemeyen Arş. Gör. H. Hamit ALP'e, Arş. Gör. Dr.Nurinnisa ÖZTÜRK'e, Arş. Gör. Dr. İbrahim KAPLAN'a, Arş. Gör. Dr. Çağlar BULUT'a, Arş. Gör. Dr. Vefa YANMAZ'a, Arş. Gör. Dr. Canan YİĞİT'e, Arş. Gör. Dr. Fatih KARA'ya, Arş. Gör. Ömür CENGİZ'e, Arş. Gör. Akar KARAKOÇ'a, Arş. Gör. Dr. Muhammed ÇELİK'e, Arş. Gör. Dr. Zafer BAYRAKTUTAN'a ve diğer asistan, doktora ve yüksek lisans arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Bölümümüz sekreteri Keriman ERDEN'e ve laboratuarda otoanalizördeki deneyimlerinden ve teknik bilgisinden yararlandığım Harun POLAT'a, ayrıca tüm Biyokimya Laboratuar çalışanlarına ve Anabilim Dalı çalışanlarımıza teşekkür ederim.

İhtisas eğitimim süresince bana her türlü anlayışı ve desteği gösteren sevgili eşim Hansa'ya, biricik oğlum Nail Bera'ya, biricik kızım Buket'e ve dostlarıma teşekkür ederim.

KISALTMALAR

hTERT : İnsan telomeraz ters transkriptaz
hTR : İnsan telomeraz RNA
DNA : Deoksiribonükleik asit
cDNA : Komplementer deoksiribonükleik asit
RNA : Ribonükleik asit
PCR : Polimerize zincir reaksiyonu
mRNA : Haberci ribonükleik asit
DEPC : Dietil pirokarbonat
EDTA : Etilen diamin tetraasetik asit
LOH : Allel kaybı (Heterozigotluk kaybı)
DCC : Kolorektal kanserlerde delesyon
APC :Adenomatoz polipozis koli
EGFR : Epidermal büyüme faktörü reseptörü
KGF : Keratinosit büyüme faktörü
TRF : Telomerle ilişkili faktör
GTP : Guanozin trifosfat
PDGF : Platelet kökenli büyüme faktörü
TGF : Transforme edici büyüme faktörü
CDK : Siklin bağımlı kinaz
WHO : Dünya Sağlık Örgütü
BT : Bilgisayarlı tomografi
MR : Manyetik rezonans
C_T : Threshold cycle

ÖZET

Mide kanseri en yaygın ve malign seyirli kanserlerden biri olup bölgemizde diğer bölgelerden 3-5 kat daha fazla sıklıkta görülür. Tanısı genellikle ilerlemiş olan geç evrede konur. Mide kanserinin erken tanısı mortalite oranını azaltmada önemlidir. Dokular ve vücut sıvılarındaki gizli kanser hücrelerinin klasik immunohistokimya ve patoloji ile belirlenmesi nispeten zordur. Bu sebeple mide kanserini belirlemek için alternatif bir metod hala arzu edilmektedir. Ne yazık ki mide kanserinin belirlenmesi için çok sınırlı sayıda moleküler belirteç vardır.

Telomerler kromozomların uçlarında bulunan tekrarlayıcı DNA dizileri olup kromozomları replikasyon sonu problemine ve nükleaz parçalanmasına karşı korurlar. Telomeraz ribonükleoprotein yapısında bir enzim kompleksidir. Polimerizasyon için kendi RNA'sını kalıp olarak kullanarak replikasyon sırasında kaybolan telomer dizilerini yerine koyar. Telomeraz enzim aktivasyonunun hücre ölümsüzlüğü ve karsinogenez sürecinde önemli bir rol oynadığına inanılmaktadır. Telomerazın aktivasyonu sınırsız proliferasyon ve ölümsüzlüğe yol açar ve bu suretle tümör oluşumunda bu enzimin aktivasyonu çok önemli bir basamağı oluşturur. Yapılan çalışmalarla insan telomeraz revers transkriptaz (hTERT) mRNA ekspresyonunun telomeraz aktivasyonu ile korele olduğu ispatlanmış ve prekanseroz lezyon ve insan kanserlerinin çoğunda up regüle olduğu bulunmuştur.

Bu çalışmada biz, mide kanserlerinin tanısında hTERT mRNA ekspresyonunun kantitatif belirlenmesini ve bu parametre ile mide kanserli hastaların klinikopatolojik özellikleri arasındaki ilişkiyi araştırmayı amaçladık. Bu amaçla 2 erken evre, 10 invaziv, 13 metastatik mide kanserli ve 5 kronik atrofik gastritli hasta olmak üzere toplam 30 hasta ve kontrol grubunu oluşturan 16 sağlıklı bireylerden alınan numunelerde, TaqMan floresans tekniğine dayalı Real Time kantitatif ters transkriptaz polimerize zincir reaksiyonu (PCR) yöntemi ile hTERT mRNA seviyeleri ölçüldü. Sağlıklı ve kronik atrofik gastritli, erken, invaziv ve metastatik mide kanserli hastalarda ortalama hTERT mRNA seviyeleri sırasıyla 7831.16 ± 5558.69 kopya/100 ng total RNA, 13048.36 ± 6631.44 kopya/100 ng total RNA, 62156.85 ± 31568.65 kopya/100 ng total RNA, 44407.70 ± 17493.43 kopya/100 ng total RNA ve 721399.95 ± 583319.10 kopya/100 ng total RNA idi.

Erken, invaziv ve metastatik mide kanserli hastalardaki hTERT mRNA ekspresyon seviyeleri sağlıklı bireylerden anlamlı olarak daha yüksekti (Sırasıyla istatitistiksel olarak $p<0.05$, $p<0.01$ and $p<0.05$ idi.). Kronik atrofik gastritli hastalardaki hTERT mRNA ekspresyon seviyeleri sağlıklı gruptaki bireylerden yüksek olmasına rağmen fark

istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0.05$). Mide kanserli hastalarda, hTERT mRNA ekspresyon seviyeleri ile uzak metastaz, lenf nodu metastazı, cinsiyet, tümör tutulum yeri, diferansiyon derecesi ve evre gibi klinikopatolojik özellikler arasında anlamlı bir ilişki yoktu.

Bizim sonuçlarımız, periferik kanda hTERT mRNA ekspresyonlarının eş zamanlı ölçümlerinin, mide kanserli hastalar ile sağlıklı kişileri ayırabileceğini ve mide kanserinin erken tanısı için muhtemel bir belirteç olabileceğini göstermiştir. Bununla beraber daha fazla sayıda ve uzun dönem takipli hastalarda daha ileri bir çalışma, bu moleküler belirtecin klinik uygulamasını doğrulamak için gereklidir.

Anahtar kelimeler: Mide kanseri, telomeraz, hTERT, real time ters transkriptaz-polimerize zincir reaksiyonu.

ABSTRACT

Gastric cancer is one of the most common and malign cancers, occuring 3-5 times more frequently in our region than other regions in Turkey. Gastric cancer is usually diagnosed in advanced stage. Early diagnosis of gastric cancer is important to reduce the mortality rate. It is relatively difficult to determine occult cancer cells within tissues and body fluids by classical immunohistochemistry and pathology. An alternative method to detect gastric cancer is still desirable. Unfortunately, there are only limited number of molecular markers available for stomach cancer detection.

Telomeres are repetitive DNA sequences at the ends of chromosomes, protecting them against incomplete replication and nuclease degradation. Telomerase is a ribonucleoprotein enzyme complex. It restores telomere sequences lost during replication by using its RNA component as a template for polymerization. It is believed that telomerase enzyme activation play a significant role in the cell immortalization and carcinogenesis. The telomerase activation leads to indefinite proliferation and immortalization , therefore, it is an important step in tumourigenesis. It has been found that the human telomerase revers transcriptase (hTERT) mRNA expression is correlated with telomerase activity and is up-regulated in most pre-cancerous lesions and human cancer.

In this study, we aimed to evaluate quantitative determination of hTERT mRNA expression in the diagnostic value of gastric carcinomas and to analyze the correlation between the expression level of hTERT mRNA and clinicopathological parameters in patients with gastric cancer. The level of hTERT mRNA was analyzed in 46 specimens (2 with early gastric carcinoma, 10 with invasive gastric carcinoma, 13 with metastatic gastric carcinoma, 5 with chronic atrophic gastritis, and 16 healthy individuals) by Real-Time quantative RT-PCR (RQ-PCR) based on TaqMan fluorescence methodology. The mean levels of hTERT mRNA in healthy individuals and patients with chronic atrophic gastritis,early gastric carcinoma, invasive gastric carcinoma, and metastatic gastric carcinoma were 7831.16 ± 5558.69, 13048.36 ± 6631.44, 62156.85 ± 31568.65, 44407.70 ± 17493.43 and 721399.95 ± 583319.10 copies/100 ng total RNA, respectively.

The levels of hTERT mRNA expression in early gastric carcinoma, invasive gastric carcinoma, and metastatic gastric carcinoma were significantly higher than in healthy individuals ($p<0.05$, $p<0.01$ and $p<0.05$, respectively). Although levels of hTERT mRNA expression in chronic atrophic gastritis were higher than in healthy individuals, there was

no statistically significant difference between these two groups ($p>0.05$). In patients with gastric cancer, there was no significant association between hTERT mRNA expression level and distant metastasis, lymph node metastasis, gender, location, degree of differentiation, and stage.

Our preliminary results show that real-time measurement of hTERT mRNA in peripheric blood discriminates between healthy subjects and patients with gastric cancer and that hTERT might be a potential biomarker for the early detection of gastric cancer. However, a further study with long-term followup in a larger number of patients is required to confirm the clinical application of this molecular marker.

Key Words: Gastric cancer, Telomerase, hTERT, real time revers transcriptase-polymerase chain reaction

1-GİRİŞ VE AMAÇ

Mide kanseri tüm dünyada değişik sıklıklarda görülen agresif tavırlı ve kötü prognozlu yaygın bir hastalıktır. Japonya, Kolombiya, Kostarika ve Macaristan'da oldukça sık görülmesine rağmen bir çok ülkede hem görülme sıklığında hem de mortalitede belirgin bir azalma mevcuttur. Buna rağmen Amerika Birleşik Devletlerinde tüm kanser ölümlerinin %3'ünden sorumlu olan bu tümör halen ölümcül kanserler arasında da başta gelenlerden birisidir. Bunun nedeni 5 yıllık hayatta kalım oranının %10'dan düşük olmasıdır. İleri evrede tanı konduğunda iyileşme ihtimali olmayan bir kanserdir (1-3).

Geleneksel immünohistokimyasal ve patolojik tetkikler, kanserin belirlenmesinde bazen yetersiz kalabilmektedir (4, 5). Hem biyopsinin hem de sitolojinin doğru sonuçlanmasını engelleyen temel neden yeterli veya uygun materyalin alınmamasıdır. Ayrıca ülser çevresindeki rejenerasyon alanlarındaki atipik hücrelere bağlı olarak yorumlama problemleri de neden olarak gösterilebilir (4). Kanser hastalarında dolaşan tümör hücrelerini belirlemede mRNA'yı şifreleyen tümörle ilişkili proteinlerin belirlenmesi için real time-polimerize zincir reaksiyonu (RT-PCR) kullanımının günümüzde en sensitif tanısal araçlardan biri olduğuna inanılmaktadır (5, 6). RT-PCR kullanılarak kanserli dokuda ve periferik kanda çeşitli tümör markerlerinin mRNA ekspresyonu belirlenebilir. Böylece hem hastalığın prognozu takip edilebilir hem de kanser hastalarına uygulanan tedavilerin etkinliği izlenebilir. Sonuçta bu teknoloji primer lezyonu çıkarılmış hastaların olağan gidişatını takip etmede, tedavi etkinliğini izlemek için en etkili analiz yollarını belirlemede ve çok erken aşamada nüks tümörlerin belirlenmesinde yardımcı olabilir (5). Dolaşan tümör hücreleriyle ilişkili olarak melanoma, prostat kanseri ve tiroid kanserinde yapılan bir çok çalışmada kemik iliğinin mikrometastazlarının belirlenmesinde RT-PCR'ın kullanımının spesifik olduğu gösterilmiştir (5-8).

Telomerler ökaryotik kromozomların uçlarında benzer tekrarları ve ilişkili proteinleri içeren özel yapılardır. Onlar kısa tandem DNA tekrar dizileri ve telomer bağlayan proteinlerden oluşurlar. İnsan telomerlerinin tekrarlayan dizisi TTAGGG'dir. Telomerlerin kromozom uçlarını füzyondan, degredasyondan ve kırılmalardan korumada ve ayrıca kromozomların stabilitesini sürdürmede önemli olduğu düşünülmektedir. Her replikasyon sonrası ortaya çıkan kromozom kısalması ile ilgili problemi çözmede telomerler önemli temel yapı olarak iş görürler. Telomeraz kendi RNA'sını kalıp olarak kullanarak kromozom uçlarına telomerik tekrarları ekleyen ribonükleoprotein bir komplekstir (9-13).

Aktive edilmiş telomerazlı hücreler progressif telomer kısalmasından kaçınarak sınırsız büyüme potansiyeli kazanırlar. Bu yüzden telomerazın potansiyel bir onkogen olduğu ileri sürülmüştür (5, 14, 15). Telomerler bu yüzden kanser belirlenmesinde bir belirteç olarak hizmet edebilir ve kanser için yeni tedavi gelişiminde de bir hedef olarak kullanılabilir. Son zamanlarda insan telomeraz ters transkriptaz mRNA (hTERT) ekspresyonunun meme kanserli hastalarda arttığı bildirilmiştir (16, 17). Ayrıca yapılan farklı çalışmalarda mide kanserli hastaların primer tümör dokusunda ve gastrik lavaj hücrelerinde hTERT mRNA'nın aşırı eksprese olduğu ve telomeraz aktivitesinin bulunduğu gösterilmiştir (18, 19).

Mide kanseri ve kolorektal kanserlere bağlı mortalite primer tümör kitlesine bağlı olmayıp tümör metastazının sonucudur. Kan dolaşımına giren primer tümör hücrelerinin uzak metastazı kaçınılmazdır. Ayrıca bu durumun tümör oluşumunun çok erken aşamaları sırasında da oluştuğunu bildiren kanıtlar mevcuttur (20). Geleneksel görüntüleme teknikleri ile tümör lokalize edilmeden önce kanserin tanısı moleküler metodlarla gelecekte önceden belirlenebilecektir. Kanser hücrelerinin periferik kanda tespit edilmesi hastalığın rekürrensini, metastazını ve prognozunu belirlemede yardımcı olabilir (5).

Bu çalışmada erken evre, invaziv ve metastatik mide kanseri saptanan hastalarda periferik kandan hTERT mRNA' nın ekspresyon profilinin ortaya çıkarılması ve hTERT mRNA artmış ekspresyonunun hastaların klinikopatolojik özellikleriyle korelasyonunun araştırılması amaçlandı.

2-GENEL BİLGİLER

2.1-KANSER

2.1.1- Kanserin Gelişimi ve Nedenleri

Kanser, hücrenin normal davranışlarını düzenleyen mekanizmaların bozulması sonucu, hücrelerin kontrolsüz biçimde sürekli bölünerek çoğalması, normal doku ve organları istila etmesi ve tüm vücuda yayılması ile karakterize hastalıklar grubudur. Bir başka ifadeyle kanser, klonalite, otonomi, anaplazi ve metastaz yapma özellikleri olan hastalıklar grubu olarak da tanımlanabilir. Kanser anormal çoğalan tek bir mutant hücreden gelişir. Tümörlerin klonal olması, tümör gelişmesine neden olan hücrenin başlangıçta, kanser hücresinin bütün özelliklerine sahip olduğu anlamına gelmemelidir. Çünkü kanserin gelişmesi tam aksine birbirini izleyen değişikler sonucu giderek malign şekle dönüşen çok aşamalı bir süreçtir. Bir çok kanser türünün geç yaşlarda ortaya çıkması ve geç yaşlarda kanser görülme sıklığının daha da artması kanserin çok aşamalı bir süreç olduğunu desteklemektedir (21).

Hücresel düzeyde kanser gelişimine bakılacak olursa, kanserin mutasyonları içeren çok aşamalı bir süreç sonunda çoğalma, sağ kalım, invazyon ve metastaz yetenekleri artan hücrelerin seçilmesi şeklinde ortaya çıktığı görülür. Bir tek hücrenin anormal çoğalmasına neden olan genetik bir değişiklik ve mutasyon bu çok aşamalı sürecin başlangıcını oluşturur. Bu tip mutasyon, kimyasallar, radyasyon veya virüsler gibi çevresel ajanların etkisi ile ya da kalıtsal olarak oluşabilir (21, 22).

Kansere yol açan maddelere karsinojen denir. Araştırıcılar insan kanserlerinin %70-80'inin muhtemelen çevre faktörlerinden kaynaklandığına inanmaktadırlar. Radyasyon ve bir çok kimyasal karsinojen etkilerini DNA hasarı yaparak ve mutasyonları uyararak gösterir. Kimyasal bileşiklerin pek çok çeşidi karsinojenik etkiye sahiptir. Başlıcaları polisiklik aromatik hidrokarbonlar (benzopren), aromatik aminler, nitrozaminler, muhtelif ilaçlar (alkilleyici kemoterapotik ajanlar), doğal bulunan bileşikler (Aflatoksin B) ve çeşitli inorganik bileşiklerdir (asbest, arsenik, krom, kadmiyum vb). Kişinin böyle bileşiklere maruz kalması; diyetinden (uygun koşullarda saklanmayan fıstık ve tahılları kontamine eden mantarların oluşturduğu etkin bir karaciğer karsinojeni olan aflatoksin B alımı), yaşam tarzından (sigara tiryakiliği), mesleğinden (asbest) ve diğer nedenlerden (tedavi için kullanılan dietilstilbestrol gibi bazı ilaçlar) dolayı olabilir. Östrojen gibi hormonlar ve forbol esterleri gibi bazı karsinojenler mutasyon oluşturmak yerine hücre çoğalmasını uyararak kanser gelişmesine zemin hazırlarlar. Bu tür karsinojenlere tümör kamçılayıcıları adı

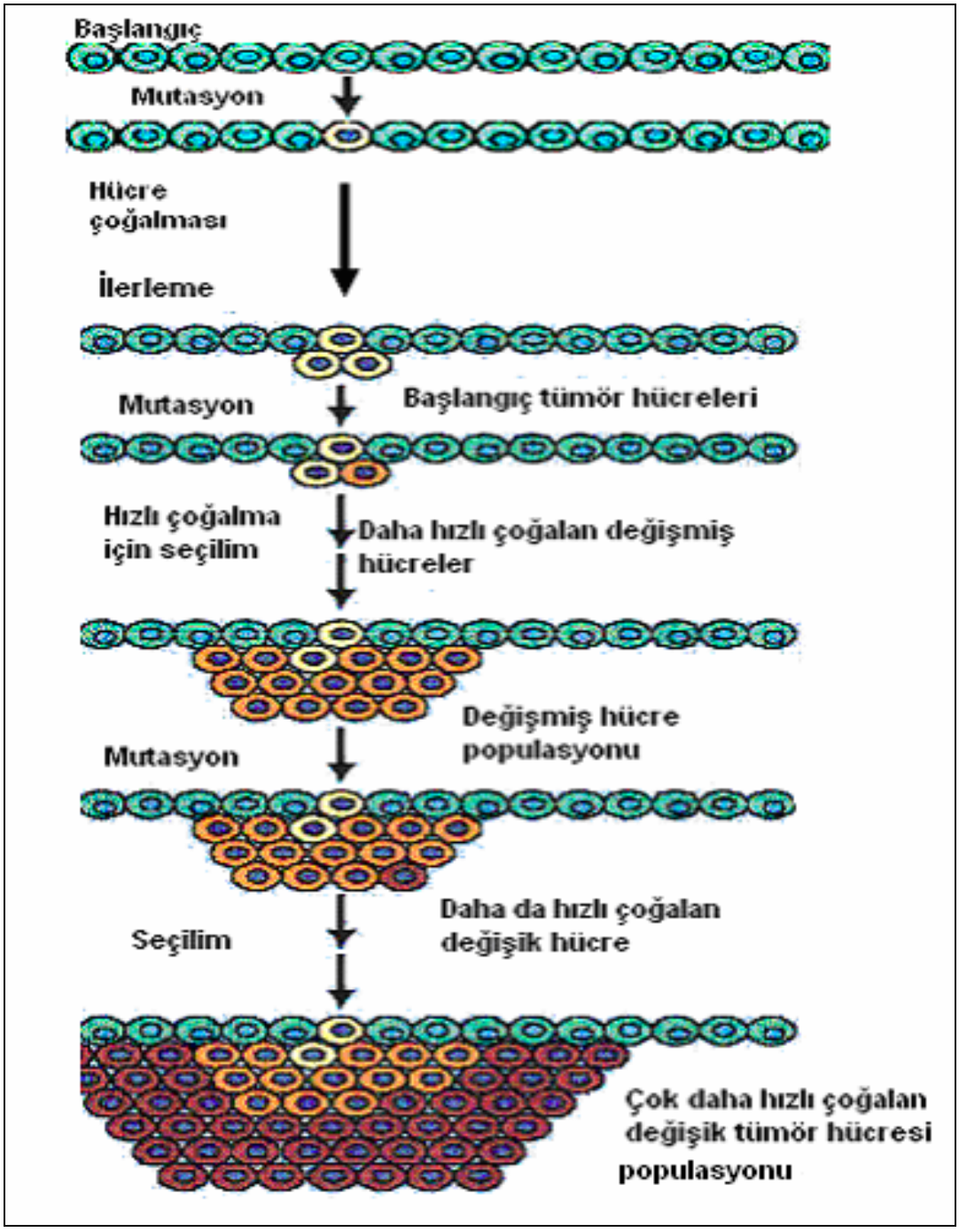
verilir. Örneğin östrojen rahimde endometrium hücrelerinin çoğalmasını uyarır. Bazı viruslar insanda kansere neden olabilir. İnsan T-hücre lösemi virusu izole edilen ilk onkogenik virustur. Virusların neden olduğu kanserlerin başında karaciğer ve serviks kanseri yer alır. Hepatit B virusu ile hepatosellüler karsinom, Epstein Barr virusu ile Burkit lenfoma ve nazofarinks kanseri, insan papilloma virusu (HPV) ile serviks kanseri ve HIV ile Kaposi sarkomu arasında ilişki tespit edilmiştir (21, 22).

Hücre çoğalmasına paralel olarak klonal tümör hücrelerinden oluşan hücre topluluğu da giderek büyür. Tümör ilerlerken bu topluluk içindeki hücrelerde yeni mutasyonlar oluşur. Bu mutasyonların bir kısmı hücreye daha hızlı çoğalma gibi belirli avantaja sahip özellikler kazandırır ve yeni hücreler tümör topluluğu içinde gittikçe daha baskın özellikler kazanırlar. Sonuçta hem çoğalma hızı hem de sağkalım, invazyon, metastaz yeteneği bakımından daha başka özellikler kazanan avantajlı yeni bir tümör hücre klonu ortaya çıkar. Bu işleme klonal seçilim adı verilir. Tümör gelişimi boyunca devam eden klonal seçilim sonucu tümörler giderek daha hızlı çoğalır ve daha malign özellikler kazanırlar (21). Şekil 2.1'de tümör gelişiminin anlatılan bu aşamaları görülmektedir.

2.1.2- Kanser Hücrelerinin Özellikleri

Kanser hücrelerinin altı önemli özelliği vardır. Bunlar sırasıyla büyüme sinyallerinde otonomi, büyümeyi engelleyen sinyallerde bozukluklar, programlı hücre ölümünde (apopitozis) bozukluklar, sınırsız replikasyon potansiyeli, anjiyogenez ve invazyon ve metastazdır (21).

Bir çok tümör hücresinin büyüme faktörlerine gereksinimi normal eşdeğer hücrelere göre daha az olduğundan ve bazı durumlarda çoğalmak için gerekli olan büyüme faktörlerini kendileride salgılayabildiğinden dolayı, kanser hücreleri çevresel faktörlerden bağımsız ve sürekli çoğalırlar (otonomi). Ayrıca kanser hücrelerinde hücre-hücre ve hücre-matriks etkileşimi de normal hücrelere göre daha düzensizdir. Bununla birlikte, yüzey adezyon moleküllerinin ekspresyonundaki azalmadan dolayı kanser hücrelerinin çoğunun tutunma yeteneği normal hücrelere göre daha düşüktür. Örneğin epitel hücrelerindeki başlıca adezyon molekülü olan E-Kadherinin ortadan kalkması karsinomların gelişiminde önemli bir rol oynar. Sonuçta kanser hücreleri diğer hücre ve doku bileşenleri ile etkileşimine bağlı kısıtlamalardan kurtulur ve kanser hücrelerinin invazyon ve metastaz yapma yeteneği artar (21-23).



Şekil 2.1- Tümör Gelişiminin Aşamaları

Kanser hücrelerinde hücre-hücre etkileşimleri açısından görülen diğer bir özellik de kanser hücreleri arasında kontakt inhibisyonun ortadan kalkmasıdır (21). Ayrıca kanser hücreleri normal farklılaşma programını takip etmezler ve sürekli çoğalmaları ile uyumlu bir

şekilde farklılaşmanın erken aşamalarında kalırlar. Bu duruma en güzel örnek lösemilerdir (21).

Genellikle normal hücreler DNA hasarına karşı apopitozis ile yok olurken, kanser hücreleri apopitotik sinyallerden kaçarlar. Bu yüzden kanser hücreleri normal hücrelerden çok daha uzun yaşarlar (21-23).

Çoğu normal hücrenin bölünme sayısı sınırlıdır. Kanser hücreleri ise sınırsız sayıda bölünürler ve bitmez tükenmez miktarda hücre oluştururlar. İmmortalitenin mekanizmalarından biri lineer olan ökaryotik kromozomların uçları olan telomerlerdir. Hücre diferansiye olurken, çoğu hücre tipinde telomerler gittikçe kısalır. Fakat kanser hücrelerinde ve kök hücrelerde telomerler telomeraz enziminin etkisiyle yenilenirler. Bu enzim normal olarak hücreler diferansiye olurken bir taraftan programlı bir şekilde gittikçe aktivitesi azalır. Tamamıyla diferansiye olmuş bir hücre istirahat durumuna girer ve sonunda çoğalma kapasitesini yitirdiğinden ölür. Halbuki bir çok kanser tipinde telomeraz etkinliğini sürdürür veya aktive edilir. Sonuçta telomerlerin uzunluğu sabit kalır ve hücre sınırsız sayıda çoğalır (21).

Kanser hastalarında ölümün ve tedavinin yetersiz olmasının en büyük nedeni tümör invazyonu ve metastazdır. Normal hücreler vücuttaki yerlerini korurlar ve genellikle göç etmezler. Oysa kanser hücreleri kaynaklandığı yerden uzağa yayılması ile karakterize edilirler. İnvazyon, malign tümörlerin komşu dokuya yayılması olayıdır. Preinvaziv dönemde tespit edilen kanserlere karsinoma in situ denir. Kanser henüz örtü epiteli içerisinde olup bazal membranı geçmemiştir (22-24). Metastaz ise, kanserin primer odakla aralarında bir devamlılık olmaksızın vücudun başka doku ve organlarına yayılması olayıdır. Metastaz primer tümörün en erken oluşum evresinden itibaren başlar ve zaman içinde tümörün büyümesine paralel olarak büyür. Tümörler histolojik tiplerine göre farklı metastaz gücüne sahiptirler (22). Pek çok epitel kökenli tümörde tümör hücresinin yayılımı tümörün damarlanmasından kısa bir süre sonra meydana gelmektedir. Metastaz oluşumunda tümör hücreleri, önce primer tümör bölgesinde çoğalır, interstisyel stromaya girer, buradaki kan damarları yoluyla dolaşıma katılırlar. Dolaşıma katılan tümör hücreleri hedef organa ulasarak, hedef organın prekapiller venüllerinde endotel bazal membranına penetre olarak metastatik kolonileri başlatırlar (25) (Şekil 2.2).

Genel olarak büyük, kötü diferansiye ve hızlı büyüyen malign tümörlerin metastaz yapma kabiliyetleri yüksektir. İnvazyon ve metastaz benign ve malign tümörler arasındaki farklılığı gösterir. Benign tümörler kanser değildir ve metastaz yapmazlar. Genellikle bir

kapsul içinde sınırlı kalırlar. Oysa malign tümörler invazyon ve metastaz özellikleri gösterirler (22).

Kanser hücrelerinin invazyon ve metastaz açısından önem taşıyan iki önemli özelliği; malign hücrelerin hücre dışı matriks bileşenlerini parçalayan ve böylece kanser hücresinin normal komşu dokusunun içine girmesini sağlayan proteazlar salgılaması (örneğin hücrelerden salgılanan kollajenaz karsinomların bazal laminayı parçalayıp aşarak altındaki bağ dokusuna girmeyi sağlar) ve anjiyogenezi hızlandıran büyüme faktörlerini salgılamasıdır. Yeni damarların oluşumu hem tümör büyümesi açısından hem de metastaz açısından önemlidir. Normal hücrelerin oksijen ve besleyici sağlayabilmesi için kan damarlarına gereksinimi vardır, ancak olgun bir insanda dolaşım mimarisi sabittir. Kanser hücreleri anjiyogenezi uyarır, çünkü tümör sağkalımı ve yayılımı için yeni kan damarlarının büyümesi gerekir. Anjiyogenik uyarıcılar ve engelleyiciler arasında bulunan dengedeki değişim anjiyogenik değişimi aktive eder (21-23). Anjiogenezis yeni kapiller damar gelişimi olup embriyonik gelişme, yara iyileşmesi ve organ hipertrofisi gibi fizyolojik olaylar döneminde görülmektedir (26). Anjiogenezis birçok neoplastik ve non-neoplastik hastalığın etiyopatogenezinden ve ilerlemesinden; özellikle solid tümörlerin büyüme ve metastaz yapmasından sorumlu tutulmaktadır (27, 28).

2.1.3- Kanserin Yayılma Yolları

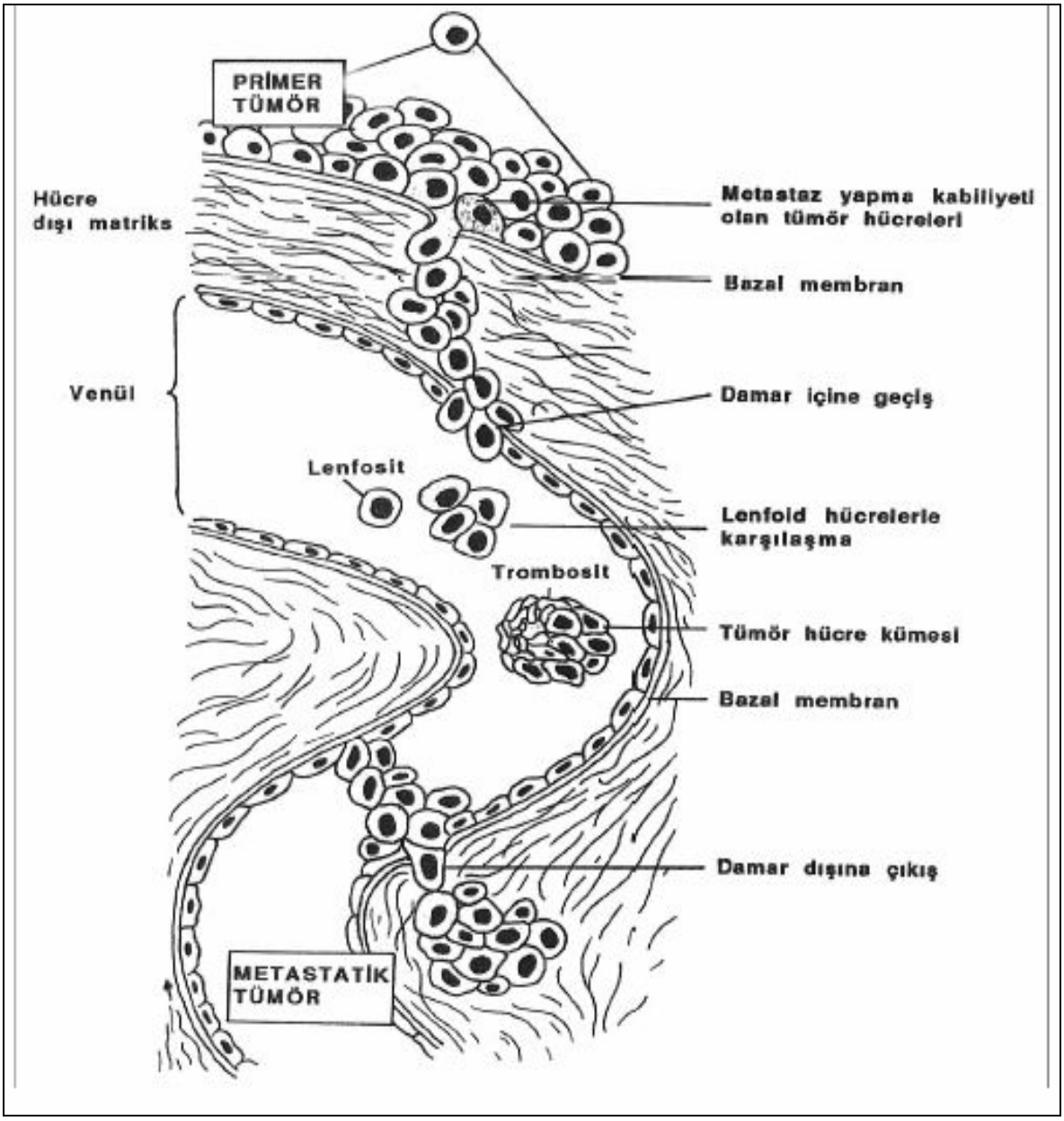
Kanserler başlıca; vücut boşlukları ve yüzeyleri, lenf damarları ve kan damarları yoluyla yayılırlar.

2.1.3.1- Vücut Boşlukları ve Yüzeyleri Yoluyla Yayılma

Malign tümörler vücut boşluklarını çevreleyen yüzeylere ulaştığında, tümörden kopan hücreler o vücut boşluğundaki komşu doku ve organlara tohum rolü görecek şekilde yayılabilir. Bu yolla yayılma en sık peritoenal boşlukta ve özellikle over kaynaklı kanserlerde görülmektedir (29).

2.1.3.2- Lenf Damarları Yoluyla Yayılma

Genellikle karsinomların yayılması bu yolla olmaktadır. Nadiren sarkomlarda lenfatiklerle yayılabilir. Lenf damarları yoluyla yayılma sırasında kan yoluyla yayılmada söz konusu olabilir. Çünkü lenf damarları ve kan damarları arasında pek çok bağlantılar vardır (29).



Şekil 2.2. Tümör Hücrelerinin Dolaşıma Katılması

Bölgesel lenf düğümlerine ulaşan kanser hücreleri burada tutulur ve kanserin yayılmasına bir süre engel oluşturulur. Ancak lenf düğümü kanser hücreleri ile dolduğunda veya lenf düğümüne ulaşan kanser hücrelerinin burada yerleşip büyümelerinden bir müddet sonra diğer lenf düğümlerine yayılma olabilir. Bölgesel lenf düğümlerinde büyüme saptanması, malign tümör varlığında bile her zaman metastaz varlığı anlamına

gelmemelidir. Çünkü tümör hücre artıkları veya tümör antijenleri de reaktif tabiatta bir büyümeye neden olabilir (23, 29).

2.1.3.3- Kan Damarları Yoluyla Yayılma

Daha çok sarkomlar bu yolla yayılırlar. Ancak karsinomlarda bu yolla yayılabilirler. Özellikle venöz damarların çeperi kanser hücreleri tarafından kolayca invaze edilebilir ve koparak kan akımına karışan kanser hücreleri başka organ ve dokulara yayılabilir. Kan dolaşımı yoluyla metastazlar en sık karaciğer ve akciğerde görülür. Tiroid folliküler karsinom, Renal hücreli karsinom ve hepatosellüler karsinom hematojen yolla yayılan kanserlerdir. Arter duvarları ise tümör invazyonuna oldukça dirençlidir (22, 23, 29).

2.1.4- Kansere Genetik Bakış

Her hücre, proliferasyon, diferansiyon, yaşlanma ve ölüm seçeneklerini belirleyen genetik programlama ile doğar ve gerektiğinde işleme koyar. Kanserde temel sorun hücre proliferasyonundaki kontrolün kaybıdır. Günümüzde tüm kanser türlerinin somatik hücrelerdeki mutasyon ya da mutasyonlar sonucu oluştuğu ve mutasyonlarında bir seri genin ekspresyonunu etkilediği artık bilinen bir gerçektir. Kanser oluşumunda etkili üç tip gen bulunmaktadır. Bunlar onkogenler, tümör baskılayıcı genler ve DNA tamir genleridir.

2.1.4.1-Onkogenler

Protoonkogenler normal hücre büyümesi ve çoğalmasını kontrol eden proteinleri kodlayan genlerdir. Eğer bir protoonkogen kendiliğinden gen içindeki bir mutasyon ya da dış kontrolun değişmesi sonucu farklılaşır ve normalden daha fazla ifade edilmeye başlarsa bu değişiklikler hücrede kontrolsüz büyüme ve malignensiye neden olur. Onkogenlerin büyük bir bölümü hücre çoğalması ve farklılaşmasının kontrolü ile ilişkili protoonkogen denen normal genlerin mutasyona uğramış formlarıdır. Onkogenler ilk gösterildiği tümör ve canlıya uygun şekilde üç harf kısaltmasıyla gösterilmektedir. Bu üç harfli şifreden önce c veya v gelir ve onkogenlerin hücresel (c) veya viral (v) karşılığına işaret etmektedir. Örneğin feline (kedi) sarkomasında bulunan viral onkogen v-fes olarak adlandırılırken, simian (maymun) sarkoma virusu onkogeni v-sis olarak adlandırılmıştır. Eşdeğer protoonkogenler öncü harf atılarak fes ve sis olarak adlandırılmaktadır (21-23).

Retroviral onkogenlerin beklenmedik bir özelliği, virus replikasyonu ile ilgili olmayışlarıdır. Bütün virüsler en etkin biçimde çoğalma üzere programlandıklarından viral onkogenlerin virusun yaşam çevrimi için gerekli olmaması çelişkili bir durumdur. Bu yüzden bilim adamları retroviral onkogenlerin nereden geldiğini ve virus genomuna nasıl

yerleştiğini araştırmış ve bunun sonunda insan kanserlerinde hücresel onkogenler tanımlanmıştır. Retroviral onkogenlerin oluşmasına öncülük eden hücresel genlere protoonkogen adı verilir. Bunlar src, ras ve raf gibi hücrede önemli rol oynayan ve genellikle hücrenin normal çoğalmasını denetleyen sinyal yollarında görev yapan genlerdir. Onkogenler ise bu protoonkogenlerin anormal eksprese olan veya mutant şekilleridir. Onkogenler protoonkogenlerden çok daha fazla miktarda ve bazende olmaması gereken hücrelerde eksprese olurlar. Bazı durumlarda gen ekspresyonundaki bu anormallikler normal çalışan bir protoonkogeni hücreyi transformasyona götüren bir onkogen haline dönüştürmek için yeterlidir (21).

Protoonkogen proteinlerin dört önemli biyokimyasal fonksiyonu olduğu saptanmıştır. Bunlar plazma membran düzeyinde protein fosforilasyonu, guanozin trifosfata (GTP) bağlanan proteinlerin metabolik regulasyonu, gen transkripsiyonu kontrolü ve DNA replikasyonunun regulasyonudur.

Onkogenler, onkoprotein adı verilen proteinleri kodlar. Onkogen proteinlerin büyük çoğunluğu büyüme faktörlerinden gelen uyarılara bağlı olarak hücre çoğalmasını ve sağ kalımını düzenleyen sinyal ileti yolaklarının birer üyesi olarak görev yaparlar. Bu proteinler arasında polipeptid büyüme faktörleri, büyüme faktörü reseptörleri, hücre içi sinyal yolaklarının üyeleri ve transkripsiyon faktörleri yer alır. Viral ve hücresel onkogenlerin araştırılması sonucunda, malign hücrelerde anormal davranışlara neden yaklaşık 100 kadar gen tanımlanmıştır. Daha önce de belirtildiği gibi, protoonkogenler tarafından kodlanan proteinlerin çoğu normal hücre çoğalmasını kontrol ederler. Bu yüzden bu proteinlerin aşırı ekspresyonu ya da aktivitelerinde artış kanser hücresinin kontrolsüz çoğalmasına neden olabilir (21).

Protoonkogenler retroviral transdüksiyonla veya in situ davranışlarını değiştirerek hücresel onkogenlere dönebilmekte ve onkogenik potansiyel kazanabilmektedir. Onkogenik potansiyel kazanan genler hücre yüzeyi, uyarı iletim yolu veya nükleusta görevli olanlardan herhangi birinde olabilir. Onkogenlerin büyük bir bölümü tirozin kinaz aktivitesi gösteren reseptörleri kodlar. Bu reseptörlerin hücre dışı büyüme faktörleri ile etkileşen amino uçlarında gerçekleşen değişiklikler bunların birer onkogen proteinine dönüşmesine neden olur. Büyüme faktörlerinin uyarmasıyla aktive olan hücre içi sinyal iletim yolakları, sonunda hücre döngüsü bileşenlerini düzenleyerek, Gı'deki kontrol noktasından geçişi sağlar. Büyüme faktörü uyarımına yanıt olarak D-tipi siklinler uyarılır ve büyüme faktörü uyarımını hücre döngüsü ilerlemesi izler (21, 22).

Tablo 2.1- İyi Karakterize Edilmiş Bazı Onkogenler, Aktivasyon Mekanizmaları ve Fonksiyonları

Onkogen	**Lokalizasyon**	**Aktivasyon mekanizması**	**Fonksiyonu**
Mitojen			
sis	Ekstrasellüler	Aşırı ekspresyon	PDGF-beta zinciri
hst-1	Ekstrasellüler	Aşırı ekspresyon	Fibroblast büyüme faktörü
int-2	Ekstrasellüler	Aşırı ekspresyon	Fibroblast büyüme faktörü
Mitojen reseptörleri			
erb-B	Transmembran	Amplifikasyon	Reseptör tirozin kinaz
fms	Transmembran	Amplifikasyon	Reseptör tirozin kinaz
İntrasellüler sinyal transuderleri			
ras	Sitoplazma	Nokta mutasyonu	GTP/GDP bağlanan protein
raf	Sitoplazma	Translokasyon	Protein serin kinaz
abl	Sitoplazma	Translokasyon	Protein tirozin kinaz
gsp	Sitoplazma	Nokta mutasyonu	G protein α alt birim
Nükleer transkripsiyon faktörler			
jun	Nukleus	Aşırı ekspresyon	Transkripsiyon faktör
fos	Nukleus	Aşırı ekspresyon	Transkripsiyon faktör
erb A	Nukleus	Aşırı ekspresyon	Steroid reseptör ailesi üyesi
Apopitozis inhibitörü			
bcl-2	Sitoplazma	Translokasyon	Kaspaz kaskadının yaygın inhibitörü

Büyüme faktörleri ile aktive olan hücre yüzey reseptörleri aktive olunca sinyaller membrandan alınıp hücre nükleusuna iletilir. Uyarı iletim sisteminde en iyi bilinen protoonkogen Ras'tır. Ras protein mutasyonu %10-20 tümörlerde olur. İnsan tümörlerinde

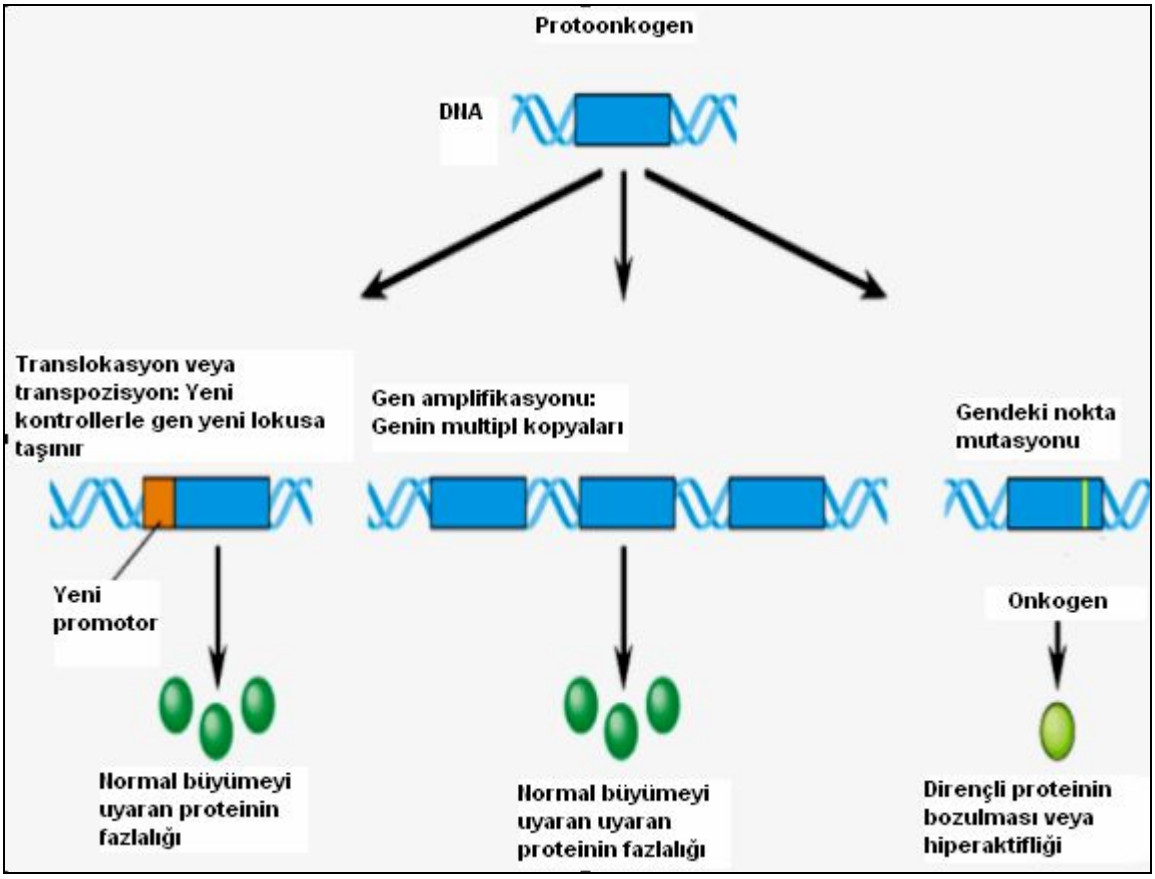
en sık dominant onkogen anormalliği ras genindeki mutasyondur. Büyüme faktörü ile indüklenen mitogenez olayında ras önemli rol oynar. Ras blokajı büyüme faktörlerinin proliferatif cevabını önler. GDP, GTP'ye dönerse Ras büyüme faktörü ile aktive olur ve raf'ı hareketlendirir. Raf MAP kinaz yolunu uyararak mitogenez başlatılır. GTP'az aktivitesi ile GTP, GDP'ye döner ve ras inaktif hale gelir. Ras'ın düzenli işlemesi GDP ile GTP arasındaki olaylara bağlıdır. Bu olaylar enzimatiktir. Daha önemli bir olay aktif ras ile ilişkisi olduğu bilinen GTPaz aktive eden protein (GAP) varlığıdır ve GAP'ın fonksiyonu ras aktivitesinin kontrol edilemeyen hareketini önlemektir. Eğer ras mutasyonu olursa GAP'ın önleyici etkisi ortadan kalkar ve GTP aşırı olur ve mitojenik sinyaller artar (21, 22).

İnsan tümörlerinde onkogenlerin aktifleşme yollarından biri de, genlerin hızlı ve yüksek düzeyde ekspresyonuna neden olan gen amplifikasyonudur. Tümör hücrelerinde, normal hücrelere kıyasla bin kattan daha fazla görülen onkogen amplifikasyonu birçok tümörün giderek daha hızlı büyümesine ve daha malign nitelikler kazanmasına neden olur. Onkogen amplifikasyonun en tipik örneklerinden biri, nöroblastomlarda (embriyonal sinir hücrelerinden gelişen bir çocukluk çağı tümörü) c-myc geninin benzeri olan N-myc genidir. Hızlı gelişen saldırgan tümörlerde, N-myc geninin kopya sayısında sıklıkla artış gözlenmesi, myc amplifikasyonunun tümörün daha malign şekle dönüşmesine eşlik ettiğini gösterir (21).

2.1.4.2- Tümör Baskılayıcı Genler

Tümör baskılayıcı genler, hücre bölünmesinin baskılanmasında sorumlu genlerdir. Bozuklukları halinde organizma genetik olarak anormal hücreleri yok edemediğinden kanser gelişir. Tümör baskılayıcı genler çoğunlukla onkogenler tarafından uyarılan aynı sinyal yollarını baskılar (21).

Hücre büyüme ve davranışını regüle eden hücre yüzeyinden salınan çeşitli tipte moleküller vardır. En önemlileri Transforme edici büyüme faktörü (TGF) beta, Kadherin ve Deleted kolon kanser geni (DCC) sayılabilir. TGF beta büyümeyi inhibe edici faktördür. Kadherin hücresel adezyonu sağlar. DCC geni ise hücre hücre ve hücre matriks ilişkisini sağlar ve çevreden aldığı uyarı ile hücre büyüme ve diferansiyasyonunu regüle eder. TGF beta büyüme inhibisyonu yapan genlerin transkripsiyonunu regüle eder. Bunu CDK inhibitörleriyle yapar ve hücre siklusu engellenir. Pek çok tümörde TGF beta'da mutasyon görülür (21-23).



Şekil 2.3- Aşırı Hücre Bölünmesine ve Kansere Yardımcı Olan Onkogenin Protoonkogenden Dönüşümü

Tümör süpresör genlerin bir diğer etkili olduğu alan büyüme sinyalini azaltmaktır. Nöröfibromin 1 (NF1) geni ile Adenomatoz polipozis geni (APC) bu kategoridedir. NF1'de ve APC'de germ çizgi mutasyonu benign tümörlerle ve karsinom prekürsörleriyle ilişkilidir. APC geni vakaları ile doğan bir kişide 1 mutant allel vardır. Yaşam sırasında yüzlerce polip gelişir. Malignite gelişmez, ancak tümör gelişimi için 2 kopyanın da kaybı gerekir. Adenomdan kanser gelişimi ek mutasyonlarla mümkündür. APC geni sitoplazmada lokalize olup beta katenin gibi diğer proteinlerle ilişkisi vardır. Beta katenin nükleusa girip transkripsiyon faktörlerini etkileyebilmektedir. APC'nin görevi katenini yıkmak ve sitoplazmada az bulunmasını sağlamaktır. APC inaktivasyonu veya kaybı katenin seviyesini arttırır ve hücresel proliferasyon olur. NF1 geni de APC gibi davranabilir. 1 mutant alleli olanda sayısız nöröfibrom gelişebilir, 2 kopyasında kayıp olunca veya ek mutasyonlarla malign tümör olabilir. NF1 geni uyarı iletimini protoonkogenlerden ras ile

yapar. NF, GTPaz aktive eden proteindir, aktif ras'ı inaktif ras'a çevirir. NF1 kaybı olunca ras aktif kalır ve sürekli sinyal iletilir (21-23).

Nükleusta lokalize olan tümör baskılayıcı genler retinoblastom (Rb), p53 ve Wilms tümör (WT1) dür. Rb ilk tanınan tümör baskılayıcı gendir. Hücre siklusunda anahtar rolü vardır. Her hücre tipinde eksprese edilir. Aktif, inaktif formu vardır. Aktif formunda hücre siklusunda G1'den S'e geçerken fren görevi vardır. Fosfarlanmamış Rb, E2F tarafından kontrol edilen genlerin transkripsiyonunu baskılamak üzere, E2F'ye bağlanır. Rb'nin G1'in sonunda Cdk 4, 6 ve siklin D kompleksleri tarafından fosforillenmesi E2F'den ayrılmasına neden olur. Hücre döngüsünün ilerlemesi için gerekli proteinleri kodlayan hedef genlerinde ekspresyonunu uyarır. Rb proteini olmazsa veya E2F'nin regülasyonu bozulursa hücre siklusunun moleküler freni bozulur ve hücreler sürekli S fazına girer (21).

p53 geni, insan tümörlerinde en sık hasara uğrayan gendir. %50'den fazla tümörlerde bu gende genetik mutasyon olur. p53'ün homozigot kaybı hemen her tip kanserde görülür. p53 kritik kapı bekçisi gibidir. Moleküler polis de denir. Nükleusta lokalizedir ve diğer genlerin transkripsiyonunu kontrol etmek, primer görevidir. Rb'un aksine hücre siklusunun bekçiliğini yapmaz. p53'ün aktif hale gelmesi ancak DNA hasarı, radyasyon, mutajenik kimyasallarla temas olduğunda söz konusudur. Genetik materyal zedelenince inaktif p53 harekete geçer. 2 ana hedefi vardır. Hücre siklusunu durdurmak ve apoptozisi indüklemek. p53 ile indüklenen siklus durması G1 fazının geç döneminde olur ve p53 bağımlı CDK inhibitörleri aracılığı ile olur. CDK inhibitörlerinden bu işte görevli olanı p21 dir. p21 geni siklin/CDK kompleksini inhibe ederek S fazına girme için gerekli Rb fosforilasyonunu engeller. Hücre siklusunda durma hoş karşılanır ve DNA hasarı tamiri için zaman tanınır. p53 aynı zamanda DNA onarımı yapan genleri (GADD-4) aktive eder. DNA hasarı başarı ile tamir edilirse p53 mdm2'ye bağlanıp etkisi sona erer. Eğer DNA hasarı tamir edilemezse son bir umutla apoptozis indükleyen Bax genini aktive eder. Bax hasarlı hücreyi apopitozisle öldürür. p53 ayrıca tümör anjiogenez inhibitörlerinden birisi olan Trombospandin-1'i aktive eder. p53 bu özellikleri ile genomun gardiyanı olarak da tanımlanır. p53 homozigot kaybı DNA'nın tamir edilememesine neden olur ve mutasyon hücrelerde birikir ve malign transformasyon oluşur (21, 22).

BRCA1ve BRCA2 geni, diğer süpresör genler gibi bu genleri kalıtsal olarak mutant biçimde taşıyan kişilerde meme kanseri gelişme riski yüksektir. Protein ürünleri nükleusta lokalizedir ve transkripsiyon faktörleri ile ilgilidir. Bazı veriler bu genlerin DNA tamiri ile ilişkili olduğunu belirtmektedir. BRCA geninde mutasyon hücre büyümesini direkt

etkilemez, DNA replikasyonunda hatalara neden olur ve hücre siklusunu etkileyen genlerin mutasyonuna yol açar (21).

2.1.4.3- DNA Tamir Genleri

DNA tamir genleri, mutajenik kimyasalların ve ışın gibi ajanların sebep olduğu DNA hasarını tamirden ve hücredeki genomik yapının korunmasından sorumludur (30). DNA tamir genlerinin fonksiyonu mutasyonel hasar veya DNA replikasyonunun her ikisinde oluşan DNA hataları ile bağlantılıdır. Hata tamir edilmezse, bu genler apopitozisi indükler veya DNA hasarını tamir eder. DNA tamir genlerinin disfonksiyonu, kardeş hücrede mutasyonların birikmesine neden olur (31).

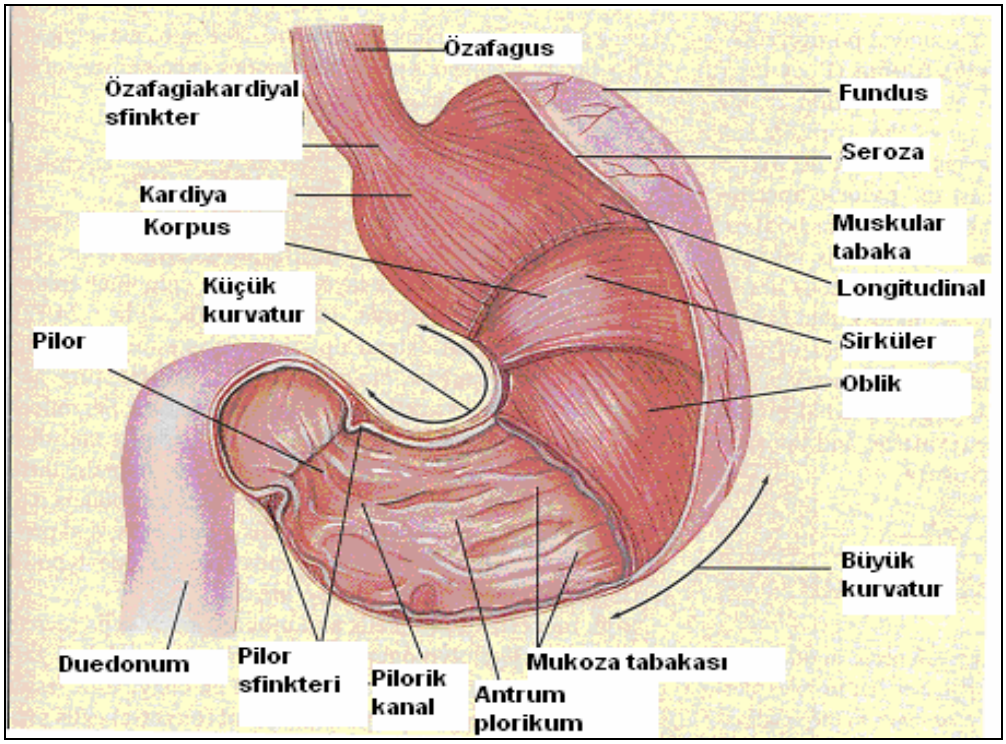
2.2- MİDE KANSERİ

2.2.1- Midenin Anatomisi, Histolojisi ve Biyokimyası

Özefagus ile duodenum arasında bulunan ve sindirim borusunun en geniş kısmını oluşturan mide, karın boşluğunun sol üst kadranında yerleşmiş J şeklinde bir organdır (32). Mide posteriordan pankreas, böbrek, dalak, kolonun splenik fleksurası, kaudat lob, retroperitoneal arter ve sinirler ile ilişkidedir. Midenin ön üst yüzünün bir kısmı karaciğer sol lobunun arkasında bulunur (32, 33). Mide şekil, büyüklük durum ve komşuluk bakımından çok büyük değişiklikler gösteren bir organdır (33, 34).

Mide proksimalden distale doğru pars kardiaka, fundus gastrikus, korpus gastrikus, pars pilorika ve pilorus olmak üzere 5 anatomik bölümden oluşur (32). Midenin kardia diye adlandırılan üst bölümü, özofagusla birleşir. Kardianın proksimali alt özofagial sfinkter ile fizyolojik bir bileşen oluşturur. Kubbe şeklinde olan fundus gastrikus genellikle gaz ile doludur ve diaphragma ile komşuluk yapar. Pilor ise midenin duodenuma yakın olan bölümüdür. Bu bölümün etrafında m. Sphinkter pilorikus düz kastan yapılmış bir sfinkter bulunur. Normal durumlarda kontraksiyon yapan bu kas, sindirim sırasında zaman zaman gevşer ve yoğrularak sindirilebilir hale getirilmiş gıda maddesinin mideden duodenuma geçmesine müsaade eder (32-35).

Mide gebeliğin 4. haftasında özafagus taslağının hemen altında primitif sindirim kanalının ön bağırsak kısmından tubuler bir yapı olarak gelişen ve mide taslağını oluşturan endodermden gelişir (36).



Şekil 2.4-Midenin Anatomisi

Mide duvarı histolojik olarak içten dışa doğru tunika mukoza, tunika submukoza, tunika muskularis ve tunika seroza olmak üzere 4 tabakadan meydana gelir (37).

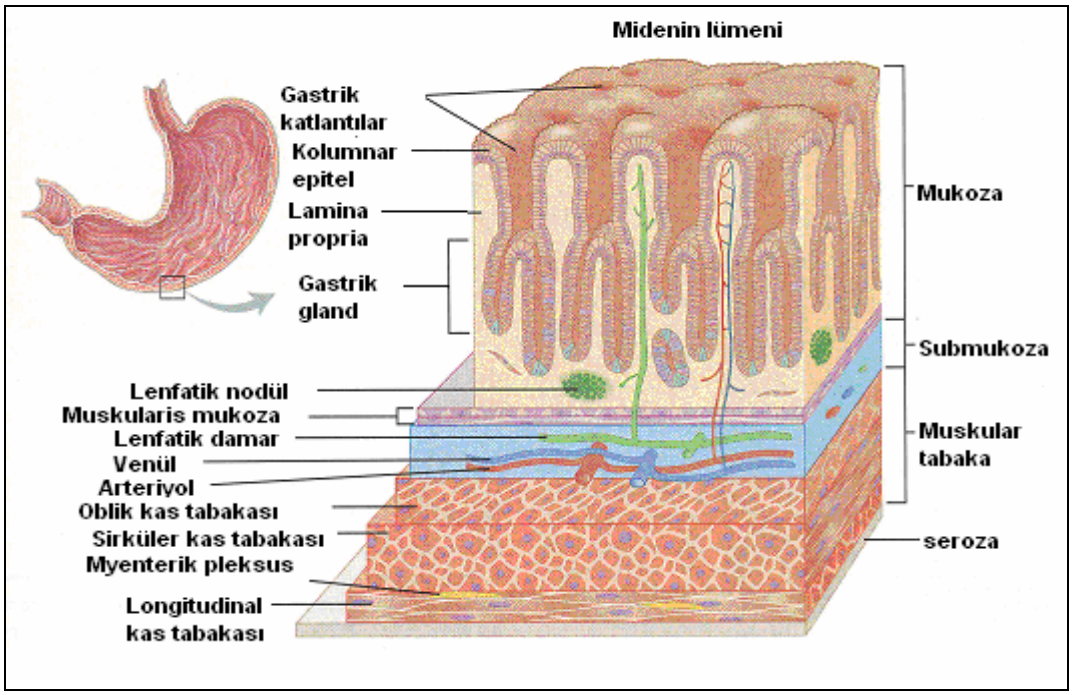
Tunika mukoza; yüzeyinde epitel tabakası daha sonra lamina propria ve muskularis mukoza olmak üzere üç tabakadan oluşmuştur. Yüzeyi ve gastrik çukurcukları örten epitel tek katlı prizmatik epiteldir ve hücrelerin tümü kalın bir tabaka oluşturacak şekilde mukus salgılar. Salgılanan bu mukus, hücreleri mide tarafından salgılanan kuvvetli asidin etkisinden korur (38). Gastrin salgılayan gastrin (G) hücreleri pilor bezinin müköz hücrelerinin arasında bulunur. Gastrin, gastrik bezlerin parietal hücrelerinden asit salgılanmasını uyarır (38, 39). Parietal hücrelerde bol miktarda mitokondri bulunması bunların metabolik süreçlerindeki enerji gereksiniminin oldukça yüksek olduğuna işaret eder (38-40). Histamin ve polipeptid yapısındaki gastrin, mide mukozasından salgılanır ve hidroklorik asit yapımını güçlü bir şekilde uyarır (38, 41). Parietal hücrelerin bir salgısı da intrinsik faktördür. İntrinsik faktör bir glikoproteindir. İntrinsik faktör B12 vitamini ile kompleks yaparak B12 vitaminin ileum tarafından absorbe edilmesini sağlar (40, 41). Esas hücreler tubuler bezlerin alt bölümünde daha fazladır (38, 40, 42). Bez hücrelerinin çoğunu oluşturduklarından esas (chief) hücre denir (41, 42). Sitoplazmalarındaki granüllerde

inaktif pepsinojen enzimi bulunur. İnaktif pepsinojen midenin asit ortamına salgılandığında bu proenzim oldukça aktif proteolitik enzim olan pepsine dönüşür (38, 41, 42).

Tunika submukoza; muskularis propria ve mukoza arasında bulunur. Kollajenden zengin olan bu tabaka mide duvarının en sağlam bölümüdür. Submukozada zengin damar, lenfatik ağı ve Meissner pleksusu bulunur (38, 40).

Tunika muskularis; üç yönde düzenlenmiş düz kas liflerinden oluşmuştur. Dış tabakada longitudinal, orta tabakada sirküler, iç tabakada ise obliktir. Orta muskuler tabaka sirküler liflerden oluşmuş olup bütünü kas olan tek mide duvarı katıdır. Bu orta sirkuler kas tabakası pilora doğru gidildikçe kalınlaşır ve gerçek anatomik sfinkter oluşur. Bu yapı midenin boşalma mekanizmasın yardım eder. Muskularis propria tabakası otonomik sinirler ve Auerbach myenterik pleksusu yönünden zengindir (38, 40, 41, 43).

Tunika seroza; mide duvarının en dış tabakasıdır. İnce gevşek bağ dokusu yapısındadır ve dıştan mezotelyum ile örtülüdür(43).



Şekil 2.5- Midenin Histolojik Yapısı

Mide yiyecek ve içecekleri sindiren ve hormon salgılayan hem ekzokrin hem de endokrin bir organdır. Mide, ağızdan alınan gıdaların zamanlı bir şekilde duodenuma aktarılmalarından önce çalkalandıkları ve öğütüldükleri bir depo görevini görür. Bu önemli

mekanik görevlerinin yanısıra, ayrıca HCl ve bunun etkisi ile proteolitik pepsin'e dönüşen pepsinojen salgılayarak protein sindirim işlemini başlatır. HCl paryetal hücrelerden, pepsinojen ise ana hücrelerden salgılanır. Her iki hücrede mide mukozasında, özellikle midenin korpus ve fundusunda bulunurlar. Gastrin midenin antrumu ve duodenumdaki G hücreleri'nden, büyük ölçüde protein sindirim ürünleri ve alkali maddeler tarafından uyarılarak salgılanır. Histamin de ana hücrelere yakın mast hücrelerinden salgılanır ve HCl salgısında artmaya neden olur. Mide ve duodenum, mukozayı mide özsuyundaki asid-pepsin karışımının etkilerinden koruma amacı ile birçok savunma mekanizması geliştirmişlerdir. İnce bir mukus tabakası sürekli olarak yapılır ve mukoza hücrelerinin üzerini koruyucu olarak örter. Ayrıca, bu hücrelerin salgıladığı visköz ve alkalin müsin, mukozayı 1 mm'den daha kalın bir jel tabakası halinde kaplayarak mideyi koruduğu gibi, besinlerin rahat hareketi için yüzeyin kayganlaşmasını da sağlar (44).

Mide hem sekretuar hem de motor fonksiyonu ile sindirime yardımcı olur. Motor fonksiyonları üç grupta toplanabilir.

1-Sindirim borusunun daha distaline geçebilecek duruma gelinceye kadar besinlerin belli bir süre depo edilmesi

2-Besinlerin kimus adı verilen yarı sıvı bir oluşum haline gelinceye kadar mide salgıları ile karıştırılması

3-Besinlerin mideden duodenuma yavaş boşalmasını sağlamak

2.2.2- Mide Kanserinin Epidemiyolojisi

Dünya çapında görülen tüm kanserlerin yaklaşık %10'nu mide kanseri oluşturur (45-48). Son 30-50 yılda batı toplumlarında bu hastalığın hızında bir azalma gözlenmekle birlikte en çok ölüme neden olan kanserler sıralamasında ikinciliğini korumaya devam etmektedir (46, 47). Mide kanseri insidansı ülkeler arasında değişiklik göstermektedir (4). Özellikle Japonya'da hastalık epidemik boyutlardadır (4, 45). Mide kanseri hemen hemen tüm ülkelerde erkeklerde kadınlara oranla 1.5-2.5 kat daha fazla görülmektedir (1, 4, 48). Mide kanseri 30 yaşından önce nadirken beşinci dekattan sonra görülme sıklığı artar (4, 49, 50).

Birleşik Devletler'de 1930'dan 1985'e mide kanseri insidansı dramatik olarak azalmış ve şimdiye kadar sabit kalmıştır. Son birkaç dekadda mide kanserinde azalma, hemen hemen bütünüyle intestinal tip karsinom insidansındaki azalmaya bağlı olmuştur; Bunun yanı sıra diffüz tipin insidansı değişmemiştir. İntestinal tip mide kanserinin

azalmasında besin koruyucularının kullanımından daha az faydalanılması, soğutma ve taze ürünlerin daha yaygın elde edilebilirliği etkili olmuştur. Ayrıca mide kanserinin insidansındaki toplam azalma Helicobacter pylori (H. pylori) infeksiyonunun sebep olduğu distal intestinal tip mide tümörleri ile ilişkilidir (51). Son yıllarda kardiyak bölgedeki proksimal mide tümörlerinin insidansında gerçek bir artış vardır. Bu eğilime Baret özafagus insidansının artışı katkıda bulunmaktadır (48).

2.2.3- Mide Kanserinin Etiyopatogenezi

2.2.3.1-Çevresel Faktörler ve Diyet:

Mide kanseri için yüksek riskli bölgelerden düşük risk bölgelerine göç eden ırkların sonraki jenerasyonlarında mide kanseri insidansının belirgin biçimde azaldığı saptanmıştır. Buda genç yaşlardan itibaren etiyolojik faktörlere maruz kalmanın kanser oluşma riskini arttırdığını göstermektedir. Bu etiyolojik ajanın ne olduğu bilinmemekle birlikte diyetin önemi üzerinde durulmuştur (49-50). Hastalığın etiyolojisinde bir çok gıda maddesi sorumlu tutulmuştur. Özellikle süt, hayvansal protein ve vitaminlerden fakir, nişastadan zengin düşük kaliteli diyetler hastalık gelişiminden rolleri olduğu düşünülmüştür (4). Tütsülenmiş etler hastalık etiyolojisinde rol oynayabilecek benzopren gibi polisiklik hidrokarbonlar içermektedir. Nitrozaminlerinde mide mukozası için karsinojenik olduğu gösterilmiştir. Atrofik gastrit ve buna eşlik eden akloridi nitrozamin oluşumuna predispozisyon sağlar (4). Çalışmalarda karbonhidrat, turşular, tuzlanmış et ve balık mide kanseri riskini arttırdığı, öte yandan süt, taze sebzeler, vitamin C tüketiminin artışının da riski azalttığı gösterilmiştir (49).

Mide kanseri yüksek olan Kolombiya'da yüksek tuz tüketimi olduğu bildirilmiştir. Tuzun kanser yapıcı etkisi, tuzun kronik gastrit yaptığı, sonrada oradan da atrofik gastrite neden olabileceği düşünülmüştür (52-54). Tuzun etki mekanizmasına ilişkin Tannenbaum ve ark. (52), tuzdan zengin diyet altında mide epitel hücrelerinin replikasyon hızının arttığını ileri sürmüş olup, sıçanlarda tuz alımı arttıkça hücrelerin mitotik aktivitelerinin de arttığını göstermişlerdir. Mide kanserinin oluşmasında neden olduğu düşünülen diğer iki madde nitrit ve nitratlardır. Nitratlar, kurutulmuş tahıllarda ve gıda koruyucularında bulunmaktadır. Nitritler doğal rengi korumak ve botulismus toksinini önlemek amacıyla işlenmiş bir çok et ürününde katkı maddesi olarak kullanılmaktadır. Nitritler, gıdalar ile alınmakla birlikte genellikle nitratlardan oluşmaktadır. Nitritler, amin ve amidler ile birleşerek nitrozamin ve nitrozamidleri meydana getirirler. Bu bileşiklerin mitojen ve

karsinojen oldukları bilinmekte olup, bu bileşiklerin sıçanlarda mide kanserine neden oldukları gösterilmiştir (55, 56).

2.2.3.2- H.Pylori ile İnfeksiyon

H. pylori, mide epitel DNA'sının mutasyonu, serbest oksijen radikallerinin artması, interlökin düzeylerinin değişmesi, sitoprotektif maddelerin azalması ve mide mikroçevresinin değişmesi gibi bir çok basamakta rol oynayarak epitel displazisine yol açmaktadır (57, 58). H. pylori'nin gösterilen en önemli etkilerinden birisi de midenin epitelyal hücre döngüsünü değiştirmesidir ve bu değişim sonucunda mide kanseri riskinin arttığı kabul edilmektedir. Hücre döngüsündeki değişiklik, artmış apopitozis ve proliferasyon şeklindedir. Sonuçta mide epitelinde hiperproliferatif bir durum oluşmaktadır (59-61).

Hiperproliferasyonun malignite gelişimine en önemli katkılarından biri; artan proliferasyon ile DNA onarım süresinin kısalmasıdır. Çok basamaklı karsinogenezde bu olay önemli rol oynayabilmektedir (62).

2.2.3.3-İyonize Radyasyon

Bazı araştırmalar iyonize radyasyonun mide kanseri riskini 2-4 kat arttırdığını vurgulamıştır (63).

2.2.3.4-Alkol ve Sigara Kullanımı

Mide kanseri ve sigara arasındaki bağlantı çok belirgin değildir. Mide kanserine yakalanma riskinin alkol içenlerde, içmeyenlere göre 2 kat fazla olduğu söylenmiştir (63).

2.2.3.5-Pernisiyöz Anemi

Pernisiyoz anemi gibi hastalıklar ya da parsiyel gastrektomi gibi girişimler sonucu gelişen hipoklorhidri ile mide içi anaerobik bakteriler aşırı çoğalmaktadır. Bu bakterilerin bir çoğu nitratları nitritlere çevirerek mide içi nitrit, N-nitrozo bileşikleri ve safra asitlerinin konsantrasyonlarında artışa neden olmakta ve kronik gastrit zemininde displazi ve karsinom olasılığını artırmaktadır (63).

2.2.3.6-Düşük Sosyoekonomik Düzey

Düşük sosyoekonomik düzeyde çalışan ve yaşayanlarda, kötü hijyenik koşullar, çevre kirliliği mide kanserinin daha sık görülmesine neden olmaktadır (49, 50). Tablo 2'de mide kanseri için risk faktörleri liste halinde sıralanmıştır (48).

2.2.3.7-Kişisel Faktörler

Mide kanseri kan grubu A olanlarda sık olduğu gözlenmiştir (49).

Tablo 2.2- Mide Kanseri İçin Risk Faktörler

Kesin / tarama önerilen risk faktörleri
1-Familyal adenomatoz polipozis (FAP)
2-Gastrik adenom
3-Yüksek derece displazi ile uyumlu mide biyopsisi
Kesin risk faktörleri
1-Kronik atrofik gastrit
2-İntestinal metaplazi
3-Helicobacter Pylori infeksiyonu
4-Herediter nonpolipozis kolorektal kanser (Lynch II)
Olası risk faktörleri
1-Subtotal gastrektomi öyküsü (>20 yıl)
2-Pernisiyöz anemi
3-Sigara içimi (kardiyanın adenokarsinomu)
Düşük olasılıklı risk faktörleri
1-Aşırı alkol alımı
2-Hamartomalar
3-Yüksek tuz içerikli beslenme, tütsülenmiş ve kızartılmış yiyecek alımı
4-Yeşil meyve ve sebzenin az yenilmesi
5-Menetrier hastalığı
6-Peutz-Jeghers sendromu
7-Sigara içilmesi
Tartışmalı/şüpheli risk faktörleri
1-Benign mide ülserleri
2-Fundik gland polipleri
3-Hiperplastik polipler

2.2.3.8- Kronik Atrofik Gastrit ve İntestinal Metaplazi

Kronik atrofik gastritte değişik derecede inflamasyon ve sıklıkla intestinal metaplazi atrofiye eşlik eder. İntestinal metaplazi, mide mukozasının histolojik yönden ince bağırsak veya kalın bağırsak mukozasına benzeyen bir yapıyla yer değiştirmesidir. Kronik atrofik gastritli hastaların %10'unda 20 yıl içinde mide kanseri geliştiği görülmüştür. Özellikle

intestinal tip karsinomlar için kronik atrofik gastrit, mide kanseri patogenezinde prekanseröz lezyon olarak ilk sırada yer almaktadır. Mide karsinomu sıklığı gibi intestinal metaplazi sıklığı yaşla doğru orantılı olarak artmaktadır (64).

2.2.3.9-Gastrik Displazi

Displazi terimi prekanseroz lezyonu tanımlar. Mide kanseri oluşumundaki rolleri erken evre mide kanserinde %40-100 arasında ve ilerlemiş evre mide kanserinde %5-80 arasında bir ilişki ile desteklenmiştir (65).

2.2.3.10-Kronik Peptik Ülser

Yapılan çalışmalarda mide selim ülserlerinde kanser gelişme riski %1'dir (66).

2.2.3.11- Barret Özefagus

Gastroözefageal bileşke tümörlerinin artmış riskine neden olur (48, 51).

2.2.4- Mide Kanserinin Patolojisi ve Sınıflandırması

Midede oluşan tümörler arasında adenokarsinom en önemlisi ve en çok rastlananıdır (%90-95). Sıralamada daha sonra lenfomalar (%4), karsinoidler (%3) ve mezankimal iğsi hücreli tümörler (%2) gelir (1).

Tedavi ve prognostik bakımdan mide kanserinin en önemli sınıflaması, invazyon derinliğine göre yapılan erken ve geç gastrik karsinom sınıflamasıdır (51).

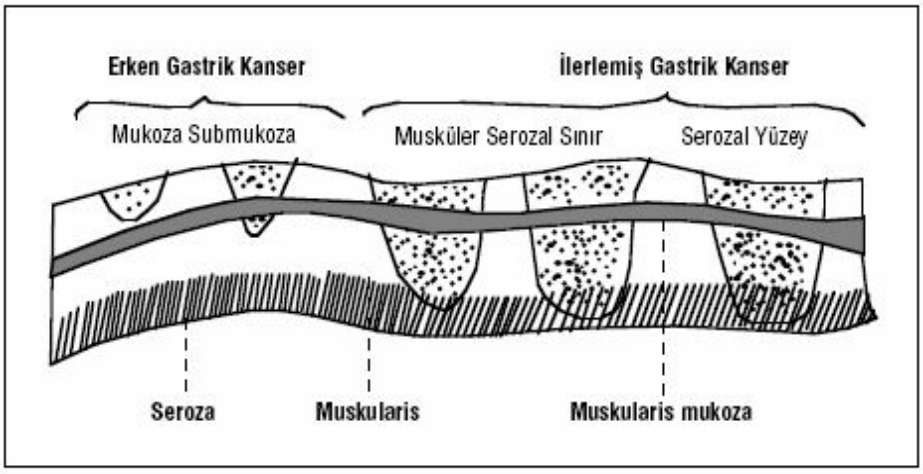
Erken gastrik karsinom deyimi, tümörün lenf ve hematojen yol ile yayılım derecesine bakmadan sadece tümörün mide duvarında mukoza ve submukozada sınırlı kaldığı durumları belirtir (4, 51, 67). Erken gastrik karsinom, ilk olarak Japonya'da mide kanseri için uygulanan büyük tarama programları sırasında saptanmıştır. Bununla birlikte daha az tespit edilmekle birlikte Birleşik Devletler'de de benzer sonuçlar elde edilmiştir (68).

Erken gastrik karsinomlar 2 kategoriye bölünür:

1. İntramukozal, bazal membranı aşan, lamina propriayı aşmayan karsinom.
2. Submukozal karsinom

İlerlemiş gastrik karsinom, 2/1'lik bir erkek/kadın oranı ile primer olarak orta yaşlıları ve daha yaşlıları etkileyen bir neoplazmdır. İlerlemiş gastrik karsinom submukoza tabakasını aşmış, muskularis eksternayı infiltre etmiş ve bu tabakayı aşmış karsinomlar için kullanılan bir terimdir. Bütün mide kanserlerinin zamanla gelişmiş lezyonları da geliştiren erken lezyonlar şeklinde başladığı düşünülmektedir (51, 67).

Mide kanserlerinin midedeki lokalizasyonları sırasıyla şöyledir. %50-60'ı pilor ve antrumda, %25'i kardiada ve geri kalanı mide korpus ve fundusundadır. Küçük kurvatur %40, büyük kurvatur %12 oranında etkilenir. Sonuçta en sık etkilenen bölge antroplorik bölgenin küçük kurvatur bölümüdür (1, 4).



Şekil 2.6- Erken ve İlerlemiş Mide Kanserinde İnvazyon Derinliklerine Göre Olan Farklar

Mide kanserleri, klinik ve patolojik özellikleri dikkate alınarak, yıllar içerisinde değişik biçimlerde sınıflandırılmışlardır (51, 67).

1- Borrmann sınıflaması: Borrmann sınıflandırılmasına göre polipoid karsinom (Tip I), ülsere karsinom (Tip II), ülsero-infiltratif karsinom (Tip III) ve diffuz infilitratif karsinom (Tip IV) olmak üzere dört tip makroskopik mide kanseri vardır (46, 51, 69).

2- Lauren Sınıflandırılması (1965): Lauren klasifikasyon sistemi, intestinal, diffüz ve miks tip olarak üç histolojik tip tanımlamıştır (70, 71). Son zamanlarda en geniş olarak bu sistem kullanılmaktadır.

3- Ming Sınıflandırılması (1977): Ming klasifikasyonu gastrik karsinomları büyüme paternine göre koheziv hücre grupları gibi büyüyen ekspansif tümör ve diffüz olarak infiltratif bir sınıra sahip infiltratif tümör olarak iki kısma ayırır (72).

4- Japon Mide Kanseri Grubu Sınıflandırılması (1981): WHO sınıflandırılmasına benzer histolojik sınıflandırmanın yanında, klinik bulgularda değerlendirme kapsamına sokulur. Papiller, tubuler, az diferansiye, müsinöz ve taşlı yüzük hücreli şeklinde ayrılır.

5- WHO (Dünya Sağlık Örgütü) sınıflandırılması (2000): Histolojik değişkenliklerine rağmen genellikle dört tipten biri baskındır. Bunlar tubuler

adenokarsinom, papiller adenokarsinom, müsinöz adenokarsinom ve taşlı yüzük hücreli karsinomdur (73).

6- İnvazyon derinliğine göre: Erken gastrik karsinom ve llerlemiş (invazif, metastatik) gastrik karsinom.

7- Differansiasyon derecesine göre: İyi diferansiye, orta derecede diferansiye ve az diferansiye.

8- Tümör lokalizasyonuna göre: Proksimal ve distal.

2.2.5- Mide Kanserinin Tanısı

2.2.5.1- Klinik Bulgular

Mide kanserinin başlangıç tanısı erken aşamalarda %80 den fazlası asemptomatik olduğundan dolayı gecikir (1, 4, 48, 73). Erken evre tümörler genellikle tarama programlarında ya da mide şikayeti sonucu yapılan endoskopik incelemeler neticesinde saptanmaktadır (48). Mide kanserinin bulunduğu yere göre şikayetler değişebilir. Kardiyada yerleşmiş tümörler yutarken takılma hissi yaratırken, prepilorik yerleşimli tümörler ise daha çok bulantı, kusma şikayeti yaratırlar. Kilo kaybı ve iştahsızlık en çok saptanan şikayetlerdir. Ağrıda görülen bir semptomdur ve peptik ülseri taklit edebilir. Ağrının sürekli olması mide tümörünün ileri evre olduğunu düşündürür. Hastalarda hematemez, melena şikayetide olabilir. Bu şikayet kanamanın şiddetine göre değişkenlik gösterir (1, 4, 68, 73). Hepatomegali de metastaz yapmış vakalarda saptanabilir. Ayrıca asit saptanmasıda peritoneal implantasyonu düşündürür (4, 73).

2.2.5.2- Laboratuar Bulguları

Yapılan kan tahlillerinde anemiye rastlanılabilir. Gaytada gizli kana da sıklıkla rastlanılır. Elektrolit, serum albumin, karaciğer fonksiyon testlerinde de bozukluklara rastlanılabilir. Karsinoembriyojenik antijenin (CEA) yüksek olmasıda hastada adenokarsinom olabileceğini düşündürür (4).

2.2.5.3- Endoskopi (Gastroskopi)

Gastroskopik inceleme, mide kanserinin tanısının konmasında tercih edilen tanısal görüntüleme işlemidir. Mide de görülen bir lezyon kanseri düşündürse bile kesin tanı patolojik incelemeler ile konulur. Biyopsi ile %80-85 oranında doğru sonuç alınmaktadır. Fırçalama ile alınan materyal ile doğruluk oranı %95 lere çıkmaktadır. Alınan biyopsi, her lezyondan 4-6 tane olmalıdır. Biyopsiler, eğer lezyon ülsere ise, ülserin tabanından ve kenarından alınmalıdır. Özafagogastroduedonoskopi özellikle endoskopik biyopsi ile

kombine edildiğinde yüksek sensitif ve spesifik tanısal testtir. Her lezyondan 10 veya daha çok sayıda biyopsi alınması ile tanısal doğruluk oranı %100'lere ulaşabilir. Biyopsilerin doğruluk oranlarının doğrudan doğruya alınan biyopsi sayısına bağlıdır (4, 48).

İlerlemiş gastrik kanser olgularında, gastrik aspirasyon ile elde edilen eksfoliye malign hücrelerin sitolojik incelemesi mümkündür, ancak doğruluk oranları %40-90 arasında değişmektedir. Şüpheli lezyonların fırçalanması ile alınan örneklerin sitolojik analizi ile de tanı konulabilir, yöntemin doğruluk oranı %80 civarındadır. Hem sitolojinin, hem de biyopsinin doğru sonuçlanmasını engelleyen temel neden yeterli materyalin alınmamasıdır. Ayrıca ülser çevresindeki rejenerasyon alanlarındaki atipik hücrelere bağlı olarak yorumlama problemleri çıkabilir (4).

2.2.5.4- Radyolojik Tanı Yöntemleri

Kontrastlı baryum grafisi daha ekonomik, non invaziv ve kolay uygulanabilir başlangıç basamağı olabilir. Bununla şayet bir gastrik lezyon mevcutsa bunun benign ya da malign bir lezyon özelliklerini gösterip göstermediğini belirlemede hekime ön sınırlı bir bilgi sağlayabilir. Baryum yutulması ile çekilen grafilerde malign özellik göstermeyen mide kanserleri %95 ekarte edilir. Ancak belirsiz sonuçlarda bildirilmiştir (48).

Bilgisayarlı Tomografi (BT) mide kanserinin başlangıç ilk tanısından sonra ileri araştırmalar, metastazı değerlendirmek ve tedavi şartlarını belirlemek için gereklidir. BT taraması 5 mm çapından daha büyük karaciğer metastazlarını belirlemek için faydalıdır. Ancak BT 5 mm'den daha küçük soliter akciğer yada karaciğer metastazlarını belirlemede güvenilir değildir (4, 48). Manyetik rezonans (MR)'ın mide karsinomunu değerlendirmedeki rolü kısıtlıdır. MR karaciğer metastazını saptamada bilgisayarlı tomografiye göre daha duyarlıdır (4).

Endoskopik ultrasonografi özellikle tümör invazyonunun derinliğini saptamada ve mide komşuluğundaki lenf düğümünü değerlendirilmesinde çok yararlıdır. Primer tanı için endoskopi, uzak lenf düğümleri ve metastazların saptanması için BT ile beraber kullanılması durumunda doğru tanı ve preoperatif evreleme oranları oldukça daha yüksek olmaktadır (48).

2.2.6-Mide Kanserinin Moleküler Yönü ve Genetik ve Epigenetik Değişiklikleri

Mide kanserleri genelde ileri evrede tanınır ve ileri evre mide kanserlerinin bilinen kesin iyileştirici bir tedavi şekli olmadığı gibi, erken evrede teşhis edilirse hayatta kalım süresi uzar. Erken evrede tanı konulması için çeşitli araştırmalarda değişik moleküler teknikler denenmektedir (48).

Mide kanserinin oluşumu ve progresyonundan sorumlu genetik ve epigenetik değişiklikler arasında telomeraz aktivasyonunun yanı sıra onkogenler, tümör supresor genler, hücre siklusu düzenleyicileri, hücre adezyon molekülleri, DNA tamir genleri ve genetik instabilitedeki değişiklikler sayılabilir (74).

Mide kanserinin iki farklı major genetik yolu DNA metilasyonu tarafından meydana gelen p16, hMLH1, Cadherin-1, RAR B2, PS2 ve RUNX3 gibi değişik genlerin inaktivasyonu ile ilgilidir. p16 ve hMLH1 promotörlerinin hipermetilasyonu intestinal tiple daha çoğunlukla ilişkili iken, diffüz tip mide kanserinde CDH-1 ve RAR B2 promotörlerinin hipermetilasyonu ile uygunluğu tespit edilmiştir. Promotör metilasyonu tarafından RUNX3 kaybı ve PS2 ekspresyon kaybı her iki tip mide kanserinde yaygındır (74, 75).

Mide kanserlerinin çoğunluğunda promotör hipermetilasyonu ve hipometilasyonuna ilaveten histon H4'ün asetillenmesi açık bir şekilde azalmıştır. H4 mide karsinogenezinin erken aşamasından geç aşamasına doğru progressif bir şekilde deasetile olmaktadır (74).

H. pilori ile enfeksiyon intestinal metaplazide hTERT pozitif kök hücrelerin hiperplazisi için güçlü bir tetikleyicidir. Genetik instabilite ve hTERT, pozitif kök hücreler olan D1S191 de replikasyon hatası, D17S5 lokusda DNA hipermetilasyonu, PS2, RAR B2, RUNX3 kaybından, CD44 anormal transkriptlerinden ve p53 mutasyonundan daha önce oluşur. Bu epigenetik ve genetik değişikliklerin tümü intestinal tip mide kanserlerinde yaygın kanıtlardır. p53 mutasyonu ve heterozigosite kaybı (LOH), RUNX3 kaybı, p27 ekspresyon azalması, Siklin E overekspresyonu ve c-met' in anormal transkripti intestinal tip mide kanserinin prekanseröz lezyonlarından malign dönüşümüne izin verir (şekil 1). DCC kaybı, APC mutasyonları, 1. kromozomun uzun kolunda heterozigotluk kaybı, p27 kaybı, TGF B reseptör azalması, nm23 azalması ve c-erbB2 gen amplifikasyonu sıklıkla intestinal tip mide kanserinin ilerlemiş evresiyle ilişkilidir (74, 76, 77).

Diğer yandan 17. kromozomun uzun kolunda heterozigotluk kaybı, p53'ün mutasyonu ya da heterozigotluk kaybı, RUNX3 kaybı ve E-Cadherinin mutasyon yada kaybı diffüz tip mide kanseri gelişmesinde öncelikli olarak etkendirler. Ayrıca bu değişikliklerden başka K-sam gen amplifikasyonu ve c-met anormal transkripti, RUN X3 kaybı, 7. kromozomun uzun kolunda heterozigotluk kaybı, siklin E gen amplifikasyonu ve p27 kaybı da nm23 azalmasının yanı sıra progresyon ve metastazda sıklıkla produktif fibrozisle ilişkili olarak görülür (74, 77).

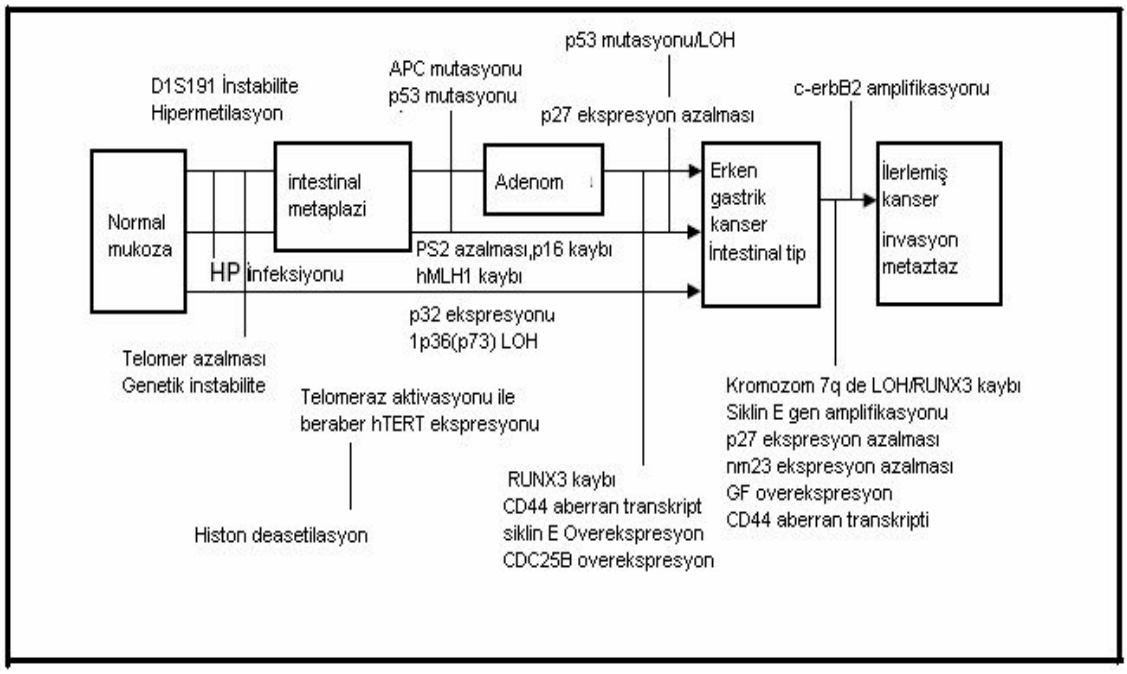
Tablo 2.3-Mide kanserinin İntestinal ve Diffüz Tipinde Bulunan Genetik ve Epigenetik Değişikliklerin Yüzde Dağılımı

	İntestinal tip (%)	**Diffüz tip (%)**
Tümör baskılayıcıları		
P 53'de LOH, mutasyon	60	75
P 73'de LOH	53	24
APC'de LOH, mutasyon	40-60	0
DCC'de LOH	50	0
Kromozom 1q de LOH	44	0
Kromozom 7q de LOH	53	33
Kromozom 17q de LOH	0	40
PS_2 ekspresyon kaybı	49	31
RAR βnin kaybı	50	73
RUNX3 ün kaybı	37	40
Hücre siklusu düzenleyicileri		
Siklin E amplifikasyonu	33	7
Siklin E overekspresyonu	26	27
CDC25'in overekspresyonu	33	73
P 16 ekspresyon kaybı	50	10
P 27 ekspresyon kaybı	46	69
Onkogenler		
K-ras mutasyonu	10	0
c-met amplifikasyonu	19	39
K-sam amplifikasyonu	0	33
c-erbB2 amplifikasyonu	20	0
Adezyon molekülleri		
E-cadherin mutasyon	0	50
CDH-1 in kaybı	55	79
CD44 aberran transkript	100	100
Mikrosatellit instabilite (hMLH1 metilasyon)	20-40 (5-20)	10-70 (0)
Histon deasetilasyon	61	82
Telomer/Telomeraz		
Telomer azalması	62	53
Telomeraz aktivitesi	100	90
TERT ekspresyonu	100	86

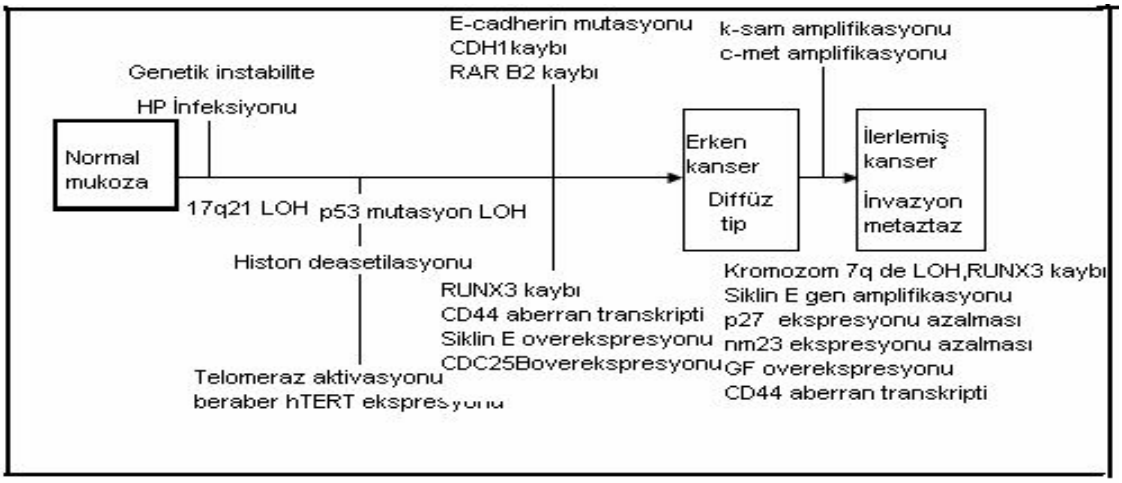
c-met, K-sam ve c-erbB2 yi kapsayan birkaç protoonkogen sıklıkla mide kanserinde aktive olmuştur. Hepatosit büyüme faktörü/yayılma faktörü (HGF/SF) için bir reseptörü şifreleyen c-met geninin amplifikasyonu mide kanserinin intestinal tipinin %19'unda ve diffüz tipin %39'unda bulunmuştur. c-met transkriptinin ekspresyonu tümör evresi, lenf nodu metastazı ve tümör invazyonunun derinliği ile iyi korelasyon gösterir. K-sam geninin en azından 4 transkripsiyonel varyantı vardır. Tip II transkript sadece karsinoma hücrelerinde eksprese edilir ve keratinosit büyüme faktörü (KGF) için bir reseptörü şifreler. K-sam daha çoğunlukla ileri evre mide kanserinin diffüz yada scirrhous tipinin %33 'ünde amplifiye olur. K-sam'a zıt olarak c-erbB2 intestinal tip mide kanserinde %20 amplifiye olur. Fakat diffüz tip kanserde amplifiye olmaz. Gen amplifikasyonu ile ilişkili c-erbB2'nin aşırı ekspresyonu kötü prognozu ve karaciğer metastazını gösterir (74, 75).

RUNX3, TGF β sinyal yolunda küçük bir transkripsiyonel bölge faktörüdür ve 1p36'da lokalize aday bir tümör baskılayıcı gendir. Mide kanserleride dahil olmak üzere insan kanserlerinin çoğunluğunda yaygın olarak bloke olan bir bölgedir. RUNX gen ailesi üç üyeden oluşur. RUNX1/AML1, RUNX2 ve RUNX3 'tür. Üç RUNX gen ailesinin tümüde hem normal gelişme sürecinde hemde karsinogenezde önemli roller oynar. RUNX1 hematopoez için gereklidir ve lösemide kromozom translokasyonlarının hedefidir. RUNX2 osteogenezis için gereklidir ve insan cleidocranial displazi hastalığında mutantdır. RUNX3 ise mide epitelinin hücre proliferasyonunun baskılanmasında, dorsal kök ganglianın nörogenesisinde ve T-hücre farklılaşmasında gereklidir. RUNX3 ü bloklanmış farelerin mide epitelinde hiperplazi gözlenir ve apopitozis hızı yavaşlar ve TGF β' ya sensitivitesi azalır. Promotor CpG kısmının hipermetilasyonu tarafından oluşturulan RUNX3 kaybı olduğu gösterilen insan kanserlerinde RUNX3 metilasyonu üzerine çalışmalar sadece mide kanserlilerin %64'ünde değil aynı zamanda hepatosellüler karsinomluların %73'ünde, safra kanalı kanserlilerin %70'inde, pankreatik kanserlilerin %75'inde, Laringeal kanserlilerin %62'sinde belirlenmiştir. RUNX3 metilasyonu forgut orijinli dokulardan kaynaklanan kanserlerde sıktır. Bu bulgular mide karsinogenezinde epigenetik gen susturulması için RUNX3'ün bir hedef olduğunu göstermektedir (77).

Hücre adezyon molekülleri de tümör baskılayıcıları olarak çalışabilir. E-Cadherin genindeki mutasyonlar diffüz tip mide kanserlerinin %50'sinde oluşur. Exon 8 ya da 9'u etkileyen E-Cadherin mutasyonları yayılma morfolojisini uyarır, hücresel adezyon azalır ve diffüz tip mide kanserlerinin hücresel motilitesi artar (74).



Şekil 2.7- İntestinal Tip İnsan Mide Karsinogenezi Sırasında Multipl Genetik ve Epigenetik Değişiklikler



Şekil 2.8- Diffüz Tip İnsan Mide Karsinogenezi Sırasında Multipl Genetik ve Epigenetik Değişiklik

Özafagial squamoz hücreli karsinomda β-Catenin ve c-met'i içeren reseptör tirozin kinaz arasındaki çapraz ilişki midedeki kanser hücrelerinde EGFR ve c-erbB2'de bulunmuştur. Bunlar Wnt sinyal yolunu uyarmak aracılığıyla midedeki kanser hücrelerinin diffüz yayılmasına yol açmaktadır. Bu sonuçlar E-Cadherin ve Catenin'lerdeki genetik ve epigenetik değişikliklerin diffüz ve scirhous tip mide kanserlerinin gelişmesinde ve progresyonunda rol aldığını göstermektedir (74-76).

Hücre siklusu regulatörlerindeki değişiklilere bakacak olursak Siklin E geninin mide kanserlilerin %15-20'sinde aşırı eksprese ile ilişkili olarak amplifiye olduğu gözlenmiştir. Siklin E'nin gen amplifikasyonu ve artmış ekspresyonu hem tümörün agresif hale gelmesinin hem de lenf nodu metastazının sebebidir. Siklin D1 gen amplifikasyonu mide kanserinde ender olarak görülürken özafagial squamoz hücreli karsinomda sıklıkla oluşur (74-76).

p27, CDK inhibitörlerinden cip/kip ailesinin bir üyesidir ve siklin/CDK komplekslerinin büyük bir çeşitliliğine bağlanır ve kinaz aktivitesini inhibe eder. p27 ekspresyonundaki azalma ileri evre mide kanserlerinde sıklıkla gözlemlenirken, gastrik adenomların %90'nında ve erken evre kanserlerin %85'inde korunmuştur. p27 ekspresyonunun azalması tümör invazyonu ve nodal metastazla korelasyon gösterir. Mide kanserinde p27'nin ekspresyonu siklin E'nin ekspresyonu ile ters korelasyon gösterir. p27 ekspresyonunun kaybı ve siklin E promotörlerin kazanılması mide kanserinde progresyon ve metastazı arttırır (74, 76).

p53 gen spektrumunun mutasyonu intestinal ve diffüz tip mide kanserinde farklılık gösterir. A/T deki p53 mutasyonu intestinal tip mide kanserinde yaygınken halbuki GC/AT geçişleri diffüz tip mide kanserinde daha dominanttır. Çoğu yiyeceklerdeki karsinogenik N-nitrozaminler GC/AT baz yerdeğiştirmelerinin ana sebebi olarak sorumlu bulunmuştur. Bu karsinojenler midenin asidik ortamında amin ve nitratlardanda oluşturulabilir.

Mide karsinogenezinde gösterilen en önemli faktör mikrosatellit instabilite ve kromozomal instabiliteyi kapsayan genetik instabilitedir. hMLH1'in epigenetik inaktivasyonundan dolayı olan MSI intestinal tip sporadik mide kanserlerinin %15-39'unda bulunmuşken %70'inin hMLH1 promotorunun hipermetilasyonu ile hMLH1'in kaybı ile ilişkili olduğu görülmüştür. MSI'lı intestinal tip mide kanserleri 73 yaşından büyük hastalarda oluşur ve sıklıkla antrum ploride oluşur. Öte yandan MSI'lı diffüz tip mide kanserleri çoğunlukla 35 yaş altında oluşur ve sıklıkla skirroz tip karsinomaya eşlik eder (74).

Kromozomal instabilite DNA anaploidisine yol açmakta olup kanserde altta yatan bir faktördür. Kromozomal stabilitenin sürdürülmesi için telomer uzunluğu gereklidir. Çoğu intestinal tip mide kanserlerinde kaydadeğer telomer kısalması söz konusudur ve yüksek telomeraz aktiviteleri düzeyleri ve hTERT'nin anlamlı artmış ekspresyonu ile ilişkilidir (74, 78).

2.2.7- Mide Kanserinde Evreleme

Tüm neoplazilerde olduğu gibi mide kanserleri içinde üniform nitelikte ve tedavi sonuçlarını karşılaştırmaya müsait bir evrelendirme sistemi gereklidir. Bu amaçla en sık TNM sınıflandırması (WHO 2000) kullanılmaktadır (73, 79, 80).

TNM kanser evreleme sistemi kanserin yaygınlığını belirlemede, tedavi seçiminde ve prognozu saptama da en önemli metoddur (79).

Primer Tümör: Kanserin mide duvarındaki derinlik derecesi T evresini belirler. Yani birincil faktör kanserin mide duvarına penetrasyonunun derecesini gösterir.

Tx: Primer tümör değerlendirilemedi.

T0: Primer tümör mevcut değildir.

Tis: Karsinoma in situ:lamina propia invazyonu olmaksızın intraepitelyal tümör.

T1: Lamina propia ya da submukozaya invaze tümör.

T2:Muskularis propiaya yada subserozayı tutar.

T2a:Tümör muskularis propriayı tutar.

T2b:Tümör subserozayı tutar.

T3: Tümör serozayı (visceral periton) aşar ancak komşu yapıları (dalak, transvers kolon, diafragma, pankreas, abdominal duvar, adrenal bez, böbrek, ince barsak, retroperitoneum) tutmaz.

T4:Tümör Komşu yapıları tutar.

Nodal Tutulum: Esas faktör metastatik lenf nodunun primer tümörden olan uzaklığıdır. Küçük kurvatur ve büyük kurvatur boyunca uzanan lenf ganlionları, sol gastrik ana hepatik çöliak arter, splenik hilus, splenik artere eşlik eden lenf ganglionları midenin bölgesel lenf ganglionlarını oluştururlar. Hepatoduodenal, paraaortik, retropankreatik, mezenterik lenf nodu gibi intraabdominal diğer lenf nodlarının tutulumu bu sınıflamada uzak metastaz olarak değerlendirilir.

NX: Bölgesel lenf nodu tutulumu değerlendirilemedi.

N0: Bölgesel lenf nodu metastazı mevcut değildir.

N1: Bölgesel lenf bezlerinden 1-6 'sında metastaz var

N2: Bölgesel lenf bezlerinden 7-15 'sında metastaz var.

N3: Bölgesel lenf bezlerinden 15'ten fazlasında metaztaz var.

Uzak Metastaz:

MX: Uzak metastaz değerlendirilemedi.

M0: Uzak metastaz mevcut değildir.

M1: Uzak metastaz mevcuttur.

Bu bilgilere göre TNM Mide karsinomu evrelemesi şöyle oluşturulmuştur;

EVRE 0: Tis N0 M0

EVRE 1A: T1 N0 M0

EVRE 1B: T1 N1 M0

EVRE II: T1 N2 M0; T2 N1 M0; T3 N0 M0

EVRE IIIA: T2 N2 M0; T3 N1 M0; T4 N0 M0

EVRE IIIB: T3 N2 M0

EVRE IV:T4 N1, N2, N3 M0; T1, T2, T3 N3 M0; Herhangi bir T Herhangi bir N M1

2.2.8-Mide Kanserinin Tedavisi

2.2.8.1-Radyoterapi

Mide kanserli hastalarda lokal bölgesel kontrollü radyoterapiye klinik yanıt az sayıda çalışmalarda gösterilmiştir. Sağ kalım üzerine anlamlı avantajı olduğu düşünülmektedir (47, 48).

2.2.8.2- Kemoterapi

Cerrahi sonrası özellikle lenf nodu tutulumu olan hastalarda hem sistemik hemde lokal nüks sıklığını azaltmak için adjuvan kemoterapi faydalıdır. Küratif cerrahi olanağının bulunmadığı ileri evre mide kanserli hastalarda değişik çoklu kemoterapi şemaları (Mitomisin C, 5-FU, Cisplatin ve Etoposid, Doxorubicin) denenir. Yapılan çalışmalar erken postoperatif kemoterapi uygulamasını desteklemektedir (48).

2.2.8.3-Cerrahi

Tanı konulan hastaların yaklaşık %15'ine hastalığın evresi yada ameliyat riski nedeniyle cerrahi uygulanamamaktadır. Geriye kalan %85 hastanın ise ancak yarısına küratif rezeksiyon yapılabilmektedir. Kalan hastalara ise palyatif cerrahi, bypass ameliyatları veya sadece biyopsi yapılabilmektedir (48). Erken mide kanserinin tedavisinde endoskopik mukozal rezeksiyon yöntemi son yıllarda giderek yaygınlaşmakta olup prognozu çok iyidir. Endoskopik mukozektomi sayesinde lezyonlar cerrahiye gitmeden küratif olarak tedavi edilebilmektedir. Tümör büyüklüğünün 2 cm'den büyük olmaması, tümörün yüzeyel olması ve tümörün diferansiye olması mukozektomi endikasyonlarını oluşturur. Bu lezyonların endoskopi

yapılmadan önce endoskopik ultrason ile submukoza dışına taşmasının olmadığı özenle araştırılmalıdır (45-48).

Mide kanserli hastalarda cerrahi prosedürün seçimi primer olarak tümörün yerleşim lokalizasyonuna göre ayarlanmalıdır. Ayrıca büyüme paterni biyopsi numunelerinde belirlenmeli ve lenf nodu metastazı beklenen lokalizasyonda görülmelidir. Proksimalde yerleşik mide tümörü olan hastalarda gastrektomi genişletilir ve distal özafagusunda dahil edilmesi gereklidir. Distalde yerleşik mide kanseri olan hastalarda şayet biyopsiler intestinal tip adenokarsinomla uyumlu ise subtotal gastrektomi yapılabilir. Şayet biyopsilerde diffüz tip karsinoma gözlenmişse total gastrektomi tavsiye edilmektedir. Orta bölgede yerleşik mide kanseri olan hastalarda daima total gastrektomi yapılmalıdır. Günümüzde operatif mortalite oranı %1-3 den daha düşük olduğu kaydedilmektedir (48).

Postoperatif en yaygın komplikasyon tümör rekürrensidir. Erken evre mide kanserinin rezeksiyonundan sonra 5 yıllık sağ kalım süresinin %90 dan fazla olduğu bildirilmiştir. Bununla beraber tümör penetrasyonu ve lenf nodu metastazına göre sağ kalım süreleri anlamlı olarak azalır. Midenin geniş ve yaygın lenfatik ağı olduğundan dolayı geleneksel cerrahi yaklaşımda primer lezyonun proksimal ve distal 5 cm kısmıda rezeksiyona katılır. Çoğu çalışmalar lenf nodu tutulumunun prognozu kötüleştirdiğini bildirmişlerdir (4, 45, 48). Japonya'daki retrospektif çalışmalar göstermiştirki geniş lenfadenektomi uygulandığında operatif mortalite ve morbidite artmaksızın ümit verici sonuçlar alınmıştır. Ayrıca izleyen prospektif çalışmalarda bu bulguları doğrulamıştır (46-48).

2.2.9- Mide Kanserinin Prognozu

Amerika'da mide kanserli hastalarda evre 2 ve 3A da 5 yıllık yaşama şansı sırasıyla %30 ve %15 iken, Almanya'da %45 ve %30, Japonya'da %75 ve %60 arasındadır (4, 69, 73). Almanya ve Amerika arasında epidemiyolojik fark olmaması nedeniyle Almanya'daki daha üstün sonuçların nedeni bu ülkede rutin olarak daha radikal cerrahi uygulanması ve yeterli lenfadenektomi yapılmasıdır (4). Japonya'nın sonuçlarının farkı ise buradaki yaklaşımın çok daha fazla radikal olmasıdır. Tümörün dağılımı, hastaların yaşı ve tümörün büyüme paterni Japonya ve Batı'da oldukça farklıdır. Dahası evre 2 ve 3 de hastalarda postoperatif kemoterapi Japonya'da standart olarak uygulanırken, Almanya ve Amerika'da nadiren uygulanır. Sonuçta Japonya'daki merkezlerden çıkan surviyal eğrileri diğer nedenlerle olan postoperatif mortalite ve ölümleri içermez sadece tümörle ilgili ölümleri kapsar. Bu gözlem

süresince olan tüm ölümleri kapsayan Batı merkezlerindeki surviyal eğrileri ile belirgin tezat gösterir (4).

2.3- TELOMER ve TELOMERAZ

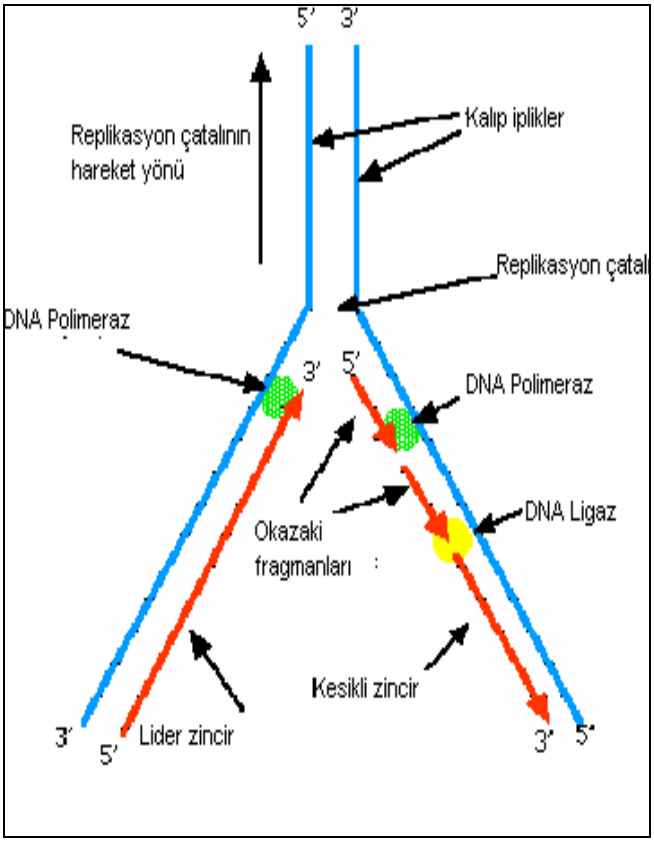
2.3.1- Telomerler

Ökaryotik hücrelerdeki DNA yapısı lineerdir. Lineer kromozomların replikasyonu, replikasyon sonu problemi olarak adlandırılan bir probleme sebep olur. Her replikasyon sonunda kromozom uçlarının yani telomerlerin biraz daha kısalmasıyla kendini gösterir. Hem kesintisiz sentezlenen dizide hem de kesintili sentezlenen dizide polimerizasyonun başlaması için bir RNA primerine ihtiyaç vardır. Kesintisiz dizide bir tane primer yeterli olurken, kesintili dizide sentezlenen her DNA parçası için bir primere ihtiyaç vardır. Kesintili dizideki DNA+primer yapısının her birine, okazaki fragmenti denir. Kesintili sentez okazaki fragmentlerinin DNA ligazla biraraya getirilmesi ile sonlanır. Kesintisiz sentezlenen dizede bir sorun olmaksızın, replikasyon tamamlanırken; kesintili sentezlenen dizede, son okazaki fragmenti ile kromozomun sonu arasındaki bölgeyi doldurabilecek bir DNA parçası yoktur. Bu yüzden kromozomun uç kısmı replike olamaz ve telomer bölgeleri kısalır. Bu problem; "replikasyon sonu problemi" olarak bilinir. Ökaryotik kromozomların sonlarında bulunan ve özel bilgi içermeyen telomerik DNA ile bu sorun çözümlenmiştir. Uçlarında telomerik DNA bulunan kromozomlara telomerler adı verilmektedir. Telomerler hücrelerin çoğalma kapasitesini ve yaşlanmalarını kontrol eden moleküler bir saat gibi fonksiyon görmektedir (81, 82).

Telomerler ilk defa 1938'de Muller tarafından tanımlanmıştır. Ökaryotik kromozomların uçlarında yer alan ve çok sayıda "TTAGGG" dizi tekrarı içeren heterokromatik yapılar olan telomerler eksonükleazlara ve ligazlara dirençlidirler (83-84). Heterokromatin yapıda olan telomerler kromozomları parçalanma, füzyon, rekombinasyon gibi olaylardan koruyarak kromozom bütünlüğünün sürdürülmesini sağlarlar. Ayrıca tümör oluşumunda, yaşlanmada ve hücre bölünmesinde de rol oynarlar (85-87).

Telomer DNA'sı subtelomerik ve esas telomerik bölge olmak üzere iki kısımdan meydana gelir. Subtelomerik bölge, çift dal halinde olup, heterojen yapıda DNA tekrarları içerir. İnsan telomerlerinde bu bölge 40-60 kb uzunluğundadır. Bu bölge 5' uçtan 3' uca doğru TTGGG ve TGAGGG tekrarlarından oluşan 30-45 kb'lık uzun blok, bunu takiben TTAGGG tekrarı olan ara blok ve 10-15 kb uzunluğunda TTGGGG ve TGAGGG tekrarı içeren kısa bloktan oluşur. Esas telomerik bölge ise subtelomerik

bölgeden sonra gelir. Kromozomun ucunu oluşturan bölgedir. Önce çift sonra tek dal halinde devam eder. Esas telomerik bölge 5' uçtan 3' uca doğru TTAGGG tekrarları içerir. İnsan telomerlerinde 5-15 kb uzunluğundadır (9, 88).



Şekil 2.9- DNA Replikasyonu

Telomerik DNA'nın hücre siklusuna bağlı olarak kaybı ve yeniden kazanılması olayına 'telomer dinamiği' denmektedir. Telomerler bu özelliğiyle kromozomun geri kalan kısımlarından ayrılırlar. Her hücre siklusunda kaybedilen telomerik DNA miktarı, yeniden sentezlenen telomerik DNA miktarından fazla olduğundan insan somatik hücrelerinde telomer dinamiği negatiftir (89). Replikasyon sonu problemini kompanse edecek moleküler mekanizmaların yokluğunda, normal somatik insan hücrelerinde her hücre bölünmesinde 50-200 nükleotidlik kayıp izlenmekte ve hücreler 40-70 PD (population doubling, hücre bölünmesi) sonrasında yaşlanmaktadır (90-93). İlk defa 1973'de Olovinikov hücrelerin her replikasyonda terminal uçlarından bir miktar DNA kaybederek kromozomlarının kısaldığını ve bununda hücresel yaşlanmaya yol açtığı hipotezini ileri sürmüştür (94, 96). Yaşlılardaki fibroblast, lökosit gibi somatik hücrelerin telomer uzunluklarının, gençlere oranla daha kısa olması da bu hipotezi

desteklemektedir. Hücrenin yaşlanmadan kurtulup ölümsüz özellik kazanabilmesi için bu kontrol mekanizmasının aşılması gerekmektedir (5, 14, 15, 93).

2.3.2- Telomere Bağlanan Faktörler

Telomerik DNA tekrarlarına tutunan dizi spesifik olan proteinler, telomere bağlanan faktörler olarak bilinmektedir. Bu proteinler telomer uzunluklarının düzenlenmesine ve telomerik stabilitenin sağlanmasına aracılık ederler. 1997'de Lange ve ark. (96), in vitro insan hücrelerinde "TTAGGG" dizisine spesifik olarak bağlanan "TRF1" ve "TRF2" proteinlerini tanımlamışlardır.

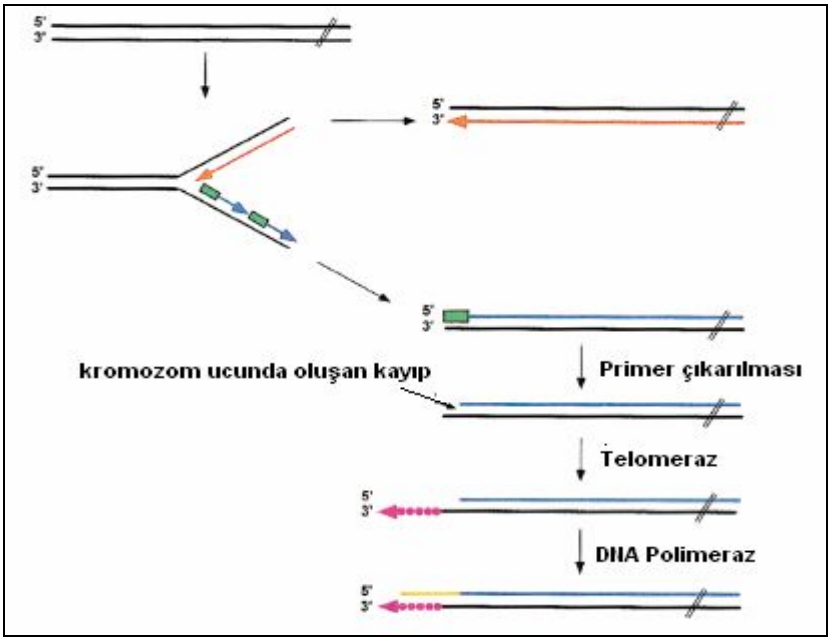
“TRF1", çift zincirli DNA'daki telomerik tekrarlara bağlanır ve telomerazın telomerlere bağlanmasını düzenleme ile telomer uzunluğu kontrolü yaparlar. Memeli telomerlerindeki TTAGGG dizilerini spesifik olarak tanıdığından dolayı TRF1, "TTAGGG tekrarına bağlanan faktör" olarakta bilinmektedir.

“TRF2", amino ucunda "TRF1"e oranla daha fazla sayıda bazik aminoasit içermekte ve G’den zengin telomerik tek iplikçiği degredasyondan korumaktadır. Aynı zamanda DNA tamir aktivitelerindende bu bölgeyi korur. Böylece kromozomların uçuca yapışmasını engelleyerek telomerlerin yapısını korumaktadır (88). İlginç olarak birkaç tamir yolağında rol alan sayısız DNA tamir proteinleri telomerlere komşu olacak şekilde bulunur. Bu DNA tamir proteinlerinin doğrudan TRF-2 kompleksi ile etkileştikleri düşünülmektedir. Telomerlerin telomer bağlayıcı proteinler ve "TTAGGG" dizi tekrarlarından oluşan kısmı ‘telezom’ olarak adlandırılmaktadır.

2.3.3- Telomeraz Enziminin Yapısı ve Alt Birimleri

Telomeraz veya diğer bir adlandırmayla telomer terminal transferaz, kendi RNA alt birimini kalıp olarak kullanarak sentezlediği hekzamerik tekrarları (TTAGGG)n telomer uçlarına ekleyen ribonükleoprotein yapıda bir ters transkriptazdır. DNA polimerazlar, primerleri sadece 5’den 3’ yönünde uzattıkları için doğrusal DNA moleküllerinin uç dizilerinin replikasyonu için özel mekanizmalara ihtiyaç vardır. Bu diziler (telomerler), basit DNA dizisi ardışık tekrarlarını içerirler. Bunlar sentezlerini DNA kalıbı olmaksızın katalizleyerek telomerleri koruyan, telomeraz olarak adlandırılan nadir bir enzim sayesinde replike olurlar (Şekil 2.10). Telomerazın, uç tekrar dizilerine tamamlayıcısı olan kendi kalıp RNA’sını, enzim kompleksinin bir parçası olarak, taşıması önemlidir. Bu RNA’nın kalıp olarak kullanılmasıyla telomeraz, uç tekrar dizilerin çoklu kopyasını oluşturabilmekte ve böylelikle geleneksel şekilde bir DNA kalıbı kullanmadan telomerleri korumaktadır. Ökaryotlarda telomer varlığı

potansiyel bir oluşumdur. Sürekli çoğalma eğilimindeki germ hücrelerinde telomeraz bulunmakta ve telomerin sürekli kısalmasını dengelemek için telomerin uzaması gerçekleşmektedir. Telomeraz reaktivasyonunun, hücrelerin sınırsız çoğalma özelliği kazanmasında rol oynayan en önemli mekanizmalardan biri olduğu ileri sürülmektedir (81, 93).



Şekil 2.10-Telomer Replikasyonu. Kromozomun Bir ucunun replikasyonu şekilde gösterilmektedir. Parental DNA zincirleri siyah renkte gösterilmiştir. Üst zincir kesiksiz zincir sentezi şeklinde DNA polimerazla tam olarak en uca kadar replike olurken (turuncu renkli), alt zincir kesikli zincir sentezi şeklinde (mavi renkli) replike olmaktadır. Kesikli zincir sentezinde yeşil renkle gösterilen RNA primeri hariç diğer bölgeler replike olmuştur. Bu RNA primerinin çıkarılması ile 8-12 bazlık bir boşluk oluşur. DNA polimerazlar sadece 5 '→ 3' yönünde sentez yaptığından bu bölgede her hücre bölünmesi ile kayıp oluşur. Ancak telomeraz bu problemi çözer. Pembe renkle gösterilen kısmı kromozom sonuna ekler. Telomer DNA eklenmesinden sonra DNA polimeraz artık bu kısmı replike edebilir.

İlk defa Greider ve Blackbum tarafından Tetrahymena'da tanımlanan telomeraz enzimi, daha sonraları insanlarda Morin tarafından HeLa hücrelerinde de gösterilmiştir. Embriyonik hücreler ve erişkin kök hücrelerinde aktif olan bu enzim, normal somatik hücrelerde belirlenememiş, immortal kanser hücrelerinde ise reaktive olduğu görülmüştür (97).

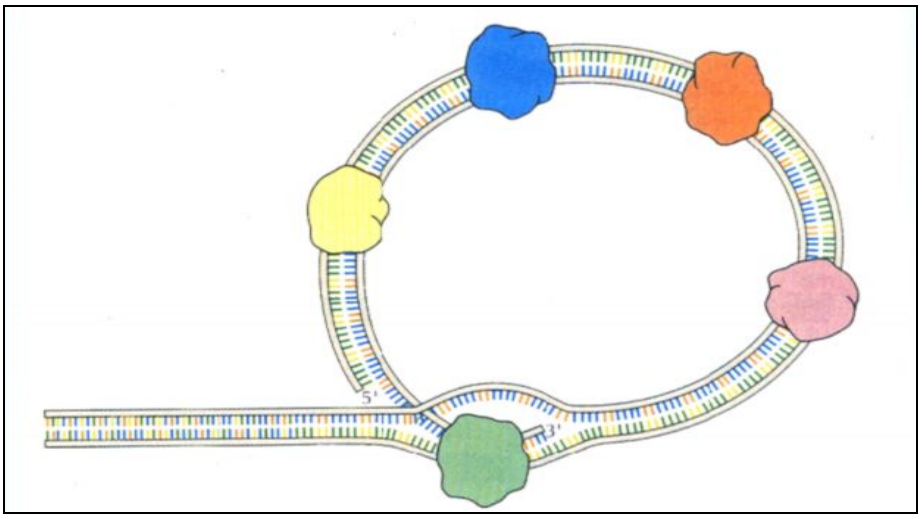
İnsan telomeraz enziminin bilinen 3 bileşeni mevcuttur (88, 98). Bunlar:

1. Telomeraz RNA alt birimi (hTR)
2. Telomerazın katalitik alt birimi (hTERT)
3. İnsan telomeraz protein komponenti (TP 1)

Telomeraz RNA alt birimi: hTR, 550 kDa boyutunda olup kendi RNA alt birimini (hTR) kalıp olarak kullandığından dolayı diğer ters transkriptaz enzimlerden ayrılır. İnsanlarda hTR, RNA polimeraz II tarafından transkripsiyona uğratılmakta ve 451 nükleotidden oluşmaktadır. 5' ucuna yakın olan 46-56. nükleotidler arasındaki bölge (5'-CUAACCCUAAC-3'), telomer DNA'sına tutunma ve revers transkripsiyon için kalıp olarak kullanılmaktadır. Bu nedenle antitelomeraz tedavi için uygun bir hedeftir. hTR mRNA ekspresyonuna hem kanserli, hem de normal dokuda rastlanmaktadır. hTR ekspresyonu, kanser hücrelerine göre daha düşük olmakla birlikte tüm somatik hücrelerde mevcuttur ve telomeraz ekspresyonu olmayan hücrelerde hTR'nin rolü kesin olarak bilinmemektedir. hTR geni 3 nolu kromozomun uzun kolunda tek kopya olarak bulunmaktadır (14, 93, 99).

Telomerazın katalitik alt birimi (hTERT): hTERT, 127 kDa'luk büyük bir proteindir. İnsan hTERT geni 16 ekson ve 15 intron içermekte olup, yaklaşık 40 kb'dır. İnsan diploid hücrelerinde hTERT geni tek kopya olarak 5. kromozom üzerinde bulunmaktadır. Telomeraz aktivitesi ile "hTERT"i kodlayan genin ekspresyon düzeyi arasında güçlü bir korelasyon saptanması, telomeraz aktivitesi regülasyonundan "hTERT"in sorumlu olduğunu düşündürmektedir (88, 100). Telomerazın katalitik bölgesinde ters transkriptaz aktivitesinden sorumlu yedi bölge olduğu bilinmektedir (93, 99, 101). Ters transkriptaz ünitesi proteinin karboksi ucunda, telomeraza özgül bölge olan "T-domain" ise amino ucunun hemen yanında yer almaktadır. N-ucu oldukça iyi korunmuş olup, "domain I, II ve III"ü içerirki bu domainlerin tümü telomerlerin uzatılması için gereklidir (93, 101).

İnsan telomeraz protein komponenti (TP 1): "TP1", telomeraz kompleksinin regülatör bileşeni olup, spesifik olarak telomerazın RNA alt birimini bağlar (24). RT-PCR ile yapılan incelemelerde, hem telomeraz (+) hem telomeraz (-) hücrelerde TP1 mRNA ekspresyonuna rastlanmıştır. Bu yüzden bu bileşenin telomeraz enzim aktivitesinin kontrolünde gerekli olmadığını düşünülmektedir (102). Oysa Nakayama ve ark. (102), önceki görüşün aksini düşünmekte ve TP1 proteininin post-translasyonel modifikasyonunun, enzimatik aktivitenin düzenlenmesinde rolü olabileceğini bildirmişlerdir.



Şekil 2.11- Bir Telomerin Yapısı: Telomer DNA'sı kendi üstüne dönerek bir dairesel yapı oluşturur ve kromozomların sonlarını koruyan bazı proteinlerle ilişkiye girer.

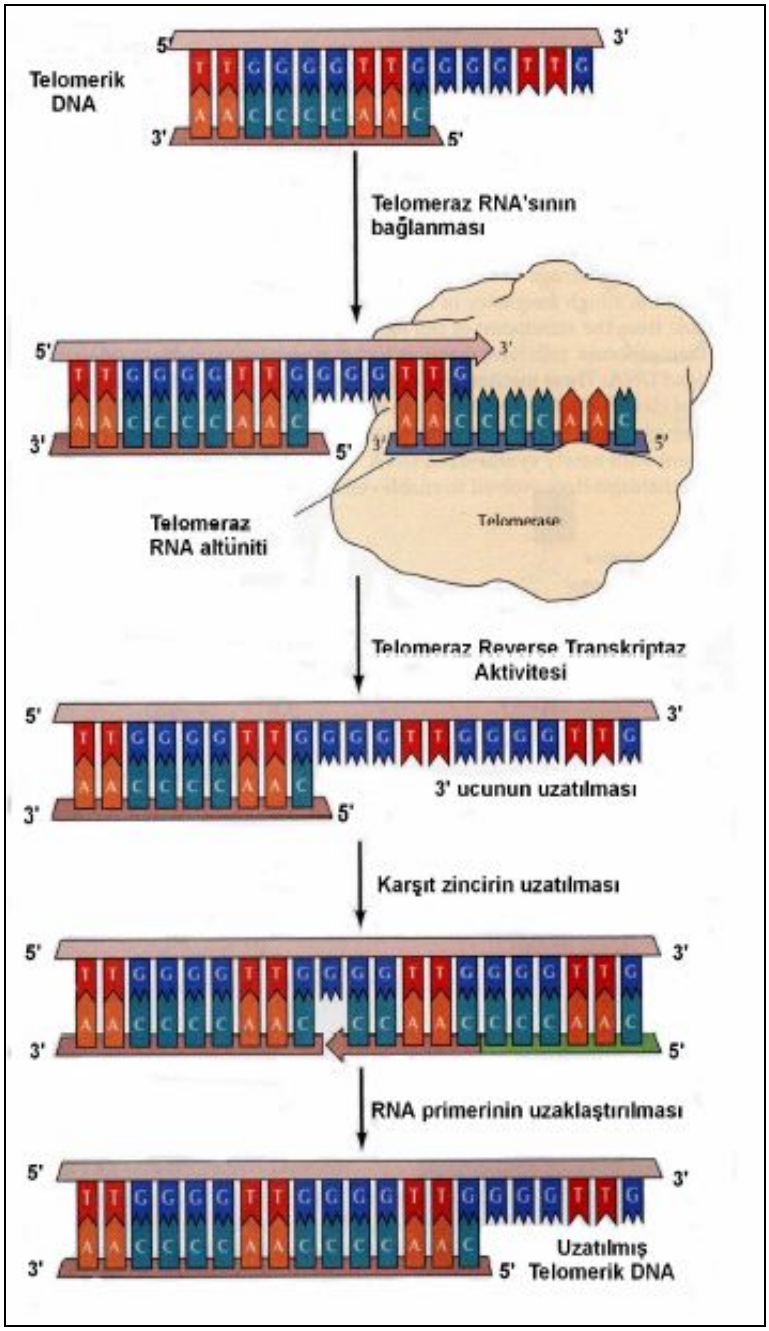
2.3.4- Telomerazın Fonksiyonu

Telomerazlar genel olarak sadece germ line hücreler (üreme hücreleri, yumurta ya da sperm hücreleri), embriyonik kök hücreler, tek hücreli ökaryotlar ve kanser hücrelerinde bulunurlar. Telomeraz enziminin aktivitesini somatik hücrelerde kaybetmiş olması evrimsel bir avantaj olarak karşımıza çıkmaktadır . Bu mekanizma hücreleri kanser hücrelerine transforme olma ve aşırı proliferasyona bağlı bozukluklardan korumaktadır. Telomeraz etki mekanizması 1985 yılında Carol Greider ve Elizabeth Blackburn'un protozoa Tetrahymena üzerinde yapmış oldukları çalışmalar ile ilk kez aydınlatılmıştır (82). Tetrahymena telomerazı 3'-AACCCCAAC-5' dizisini barındıran 159 nükleotid uzunluğunda bir RNA ile kompleks yapmıştır.

Bu dizi, Tetrahymena uç tekrarının (5'-TTAGGG-3') tamamlayıcısıdır ve telomerik DNA'nın sentezi için kalıp olarak görev yapar. Telomerazın bu RNA'yı kalıp olarak kullanarak, kromozomal DNA'nın 3' ucunu orijinal uzunluğunun bir birim ötesine uzatır. Daha sonra tamamlayıcısı iplik, polimeraz–α primaz kompleksi tarafından, geleneksel RNA primeri kullanılarak sentezlenebilir. RNA primerin uzaklaştırılması kromozomal DNA'da çıkıntılı bir 3' ucu bırakırki bu, ökaryotik kromozomların uçlarında halkalar oluşturur (82).

Telomerlerinin 3' ucunda bulunan "GT"den zengin 12-16 nükleotidlik kısım telomer uzamasında kalıp görevi görür (88). "hTERT" ise bu diziye tamamlayıcısı olan "GGTTAG" dizi tekrarlarını sentezler ve "G"den zengin olan 3' ucuna ekler. RNA kalıbı yeni sentezlenen telomerik dizinin 3' ucuna doğru kayar ve DNA polimeraz,

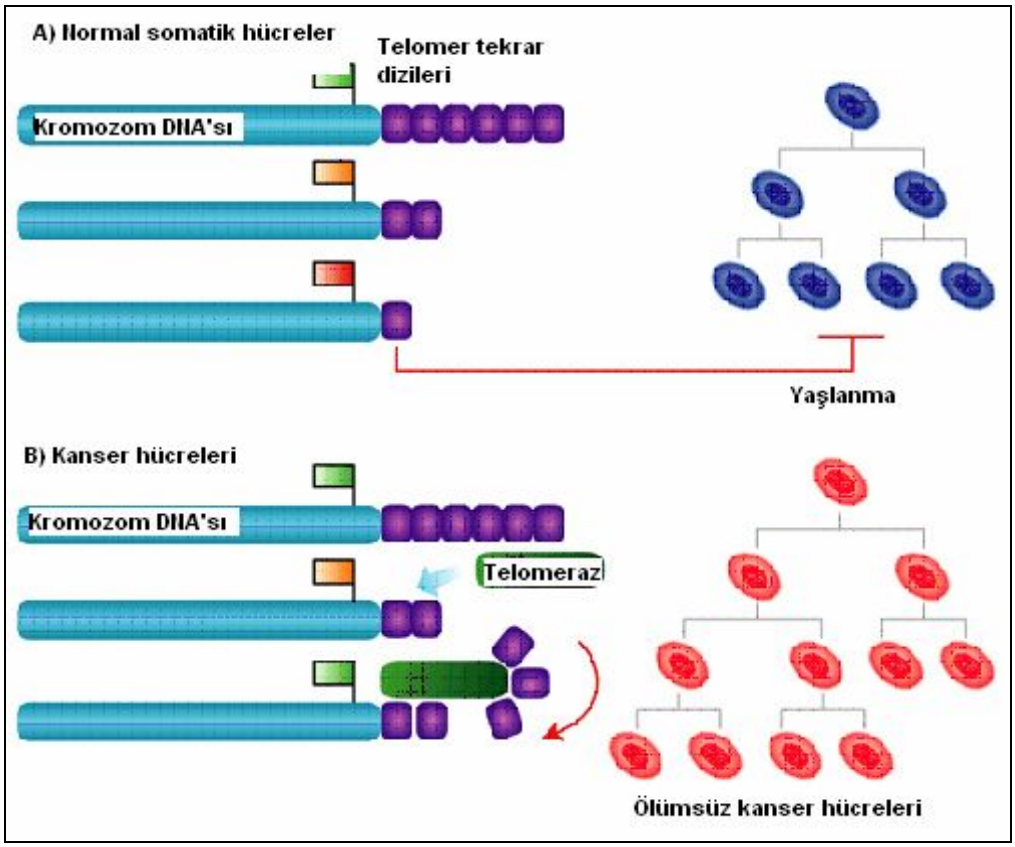
telomerazın sentezlediği bu diziyi kalıp olarak kullanarak tamamlayıcısı olan zinciri tamamlar (103).



Şekil 2.12-Telomerazın Fonksiyonu: hTR'nin kalıp DNA'daki tekrarlayan telomerik dizilerle eşleşmesi, hTERT'in telomerik DNA'nın 3' ucunu uzatması, telomerazın ilerlemesi, DNA polimerazınm karşıt zincirdeki boşluğu 5'→ 3' yönünde doldurması ve RNA primerinin uzaklaştırılması (82)

2.3.5- Telomeraz ve Kanser

Replikasyon sonu problemine bağlı olarak; çok fazla bölünen hücreler, telomerlerin boylarındaki kısalmadan en fazla etkilenecek olan hücrelerdir. En fazla lenfositler, çok fonksiyonel doku hücreleri, karaciğer, böbrek, iç organlar ve fibroblastik hücreler etkilenir. İlerleyen yaşla birlikte mitotik replikasyona bağlı olarak telomerlerde izlenen ilerleyici kısalma, bu hücrelerde hücresel yaşlanmaya yol açmaktadır. Proliferasyon gösteren hücrelerde izlenen düşük düzeydeki telomeraz ekspresyonunun, kök hücre popülasyonunun yenilenmesi için gerekli olduğu düşünülmektedir. Telomer hipotezi ile uyumlu olarak, yaşlanmadan kaçarak ölümsüz olma özelliği kazanan tümör hücreleri, genetik kararlılığın ve telomer uzunluğunun sağlanabilmesi için telomeraz aktivitesine ihtiyaç duymaktadır (Şekil 2.13) (91).



Şekil 2.13. Normal Hücrelerde ve Kanser Hücrelerinde Telomeraz Enzimi Tarafından Telomer Uzunluğunun Düzenlenmesi

Bugüne kadar incelenen farklı tip tümörlerinin %85'inden fazlasında telomeraz aktivitesinin tespit edilmesi, kanser hücrelerinde telomerazın reaktive olduğunu göstermektedir. Telomeraz tek başına normal bir hücreyi kanser hücresine transforme

edebilmek için yeterli değildir, ancak hücrelerin sınırsız büyüme kapasitesi kazanıp ölümsüz hale geçebilmeleri ve telomer uzunluklarını koruyabilmeleri için gereklidir (104).

Telomerler kısa iken hücresel yaşlanma oluşmaktadır. Bu olayla ilgili mekanizmalar henüz açıklanamamış olmasına rağmen tümör supresor genler ve hücre siklusu kontrol genleri (p53 ve Rb/p16) bununla ilişkili olabilir. Hücrelerin malignleşmesi için tek bir mutasyondan ziyade daha fazla sayıda mutasyon olması gerektiği ön görüşü hakimdir. Kanser multifaktöryel bir hastalıktır. Mutasyonlar, telomerazı aktive eden telomeraz kontrol yolağında oluşmaktadır. Kanser hücrelerindeki telomeraz aktivitesi telomer uzunluğunun sağlamlığı ve hücresel ölümsüzlük ile doğru orantılıdır. Telomeraz aktivitesi veya telomer yapısını koruyan mekanizma, hücrelerin çoğalmasının devamı için gerekli ve kanser yayılmasında belkide hız kısıtlayıcı önemli bir basamaktır (104-106).

2.3.6-Telomeraz İnhibitörleri ve Kanser Tedavisindeki Yeri

Telomeraz inhibisyonu; hTR veya hTERT'nin transkripsiyonu engellenerek, hTR veya hTERT mRNA'sı parçalanarak, hTERT'nin sentezi ve sentez sonrası modifikasyonları önlenerek, enzimin aktif bölgesi bloke edilerek, hTR ile hTERT'nin birleşmesi, enzim kompleksinin çekirdeğe transfer olması veya substratı olan telomerlere tutunması engellenerek sağlanabilir (107).

Telomerleri kendi RNA'sını kalıp olarak kullanarak sentezlediğinden dolayı telomeraz enzimi, RNA kalıbının fiziksel blokajıyla inhibe edilebilir. "Peptid nükleik asit" (PNA) bu amaçla kullanılabilir. Çünkü PNA telomeraz enziminin hTR alt biriminin tamamlayıcısı olan diziyi içerir. Ayrıca PNA, negatif yüklü deoksiriboz-fosfat birimi yerine nötral N-glisin içerir. PNA'lar, nükleazlarla veya proteazlarla parçalanmaya dirençlidirler ve in vitro şartlarda efektif inhibisyon yaparlar. Bu yüzden kanserli hastaların tedavisinde umut vadetmektedir.

Telomerazın nükleotid bağlayıcı kısmının blokajı, telomeraz inhibisyonunda diğer bir hedeftir. Dideoksiguanin (ddG) ve azidotimidin (AZT) gibi ajanlar, spesifik olarak bu bölgeyi inhibe ederler. Henüz spesifik inhibitörleri bilinmemekle beraber, telomerazın nükleotid bağlayıcı kısmının blokajıda tedavide gelecekte kullanılabilir.

Dirençli kanser hücrelerinin yeniden çoğalmasını engellemek için telomeraz enzim inhibitörleri diğer tedavilerle beraber veya onları mütakiben kullanılabilir. Ancak telomeraz inhibitörlerinin telomeraz aktivitesi gösteren hücrelerde (kan hücreleri, germ

hücreleri, aktif T ve B lenfositler v.b) yan etkileri olabileceği göz önünde bulundurulmalıdır (108).

2.3.7- Telomeraza Yönelik Gen Tedavisi

Telomeraz-yönlendirilmiş gen tedavisi: Tümöre özgü telomeraz geninin promotörleri tedavide hedef gen olarak kullanılır. Telomeraz gen tedavisi kolay yönetilebilen bir stratejidir. Ve sonuçta kanser hücresinin ölümüne neden olur.

İntihar geni tedavisi: Bu yaklaşımda ön ilacı aktive eden enzimi kodlayan genin kanserli hücreye tansfer edilmesi düşünülmüştür. Daha sonra hücre ön ilaç etkisinde bırakılır. Tümöre özgü anlatım yapan genin aktif olmayan ön ilacı aktif sitotoksik ilaca çevirmesiyle ve toksik moleküllerin komşu hücrelere geçmesiyle kanserli hücreler ölür.

Onkolitik virus: Kanser hücrelerinin seçici bir şekilde öldürülmesinde sadece kanser hücrelerinde replikasyon yapabilen adenovirüslerin kullanılması yeni yaklaşımlardan biridir. Koşula bağlı replikasyon yapabilen adenovirüsü oluşturmak için tümöre özgü promotörler replikasyon için esas olan adenoviral genleri çalıştırmak için kullanılır. Örneğin, telomeraz hTR ve hTERT genlerinin promotörleri hedef tümör hücrelerde seçici bir şekilde adenoviral genlerin çalışmasında kullanılır (109).

2.4- PCR VE REAL TİME PCR

2.4.1-Polimeraz Zincir Reaksiyonunun (PCR) Oluşum Mekanizması

PCR, çift sarmal bir DNA molekülünde bulunan hedef dizilere in vitro koşullarda iki oligonükleotid primerin bağlanması ve uzaması esasına dayanan tepkimelere verilen isimdir. Kalıp DNA molekülü yüksek sıcaklık derecelerinde denatüre edildikten sonra, oligonükleotid primerler tek iplikli DNA molekülleri üzerinde kendilerine tamamlayıcı olan bölgelerle bağlanırlar. Oligonükleotid primerlerin spesifik olarak hedef dizilerine bağlanması düşük sıcaklık derecelerinde gerçekleşir. DNA polimeraz enzimi, uygun tampon ve dört çeşit deoksiribonükleozid trifosfat (dNTP) varlığında primerin 3' hidroksil ucundan uzamasını sağlar. Böylece kalıp DNA ipliğine tamamlayıcı olan yeni DNA molekülünün sentezi gerçekleşmiş olur. PCR döngüsü denaturasyon, primerin bağlanması (annealing) ve uzama (elongasyon) olmak üzere üç basamaktan oluşur. Ardarda tekrarlanan denatürasyon, primerlerin bağlanması ve primerlerin uzaması evreleriyle DNA parçaları eksponansiyel olarak artar. Bu artışın nedeni, bir döngü sonucu sentezlenen ürünün, ardışık döngüde diğer primerler için kalıp görevi yapmasıdır. Böylece her PCR döngüsü DNA molekülü üzerinde istenilen bölgenin iki

katına çıkması ile sonuçlanır. Böylece başlangıçtaki az miktarda kalıp DNA'dan yeterli miktarda DNA elde edilmesi sağlanır. Örneğin 30 döngü boyunca amplifiye edilen tek bir DNA molekülünden, teorik olarak 2^{30} adet (yaklaşık 1 milyar) yeni molekül elde edilecektir (110-112).

2.4.2-Polimeraz Zincir Reaksiyonunun Temel Bileşenleri

PCR'nin temel bileşenleri, kalıp olarak kullanılan DNA molekülü, DNA polimeraz enzimi, primerler, dNTP karışımı, tampon ve $MgCl_2$' dür.

a) Kalıp DNA: PCR'da genomik DNA'lar, plazmid ve faj DNA'ları, çeşitli genler ve hatta herhangi bir DNA parçası kalıp olarak kullanılabilir. PCR'da kalıp olarak tek ya da çift iplikli DNA'nın yanı sıra RNA' da kullanılabilir. Kalıp olarak RNA kullanılacaksa total RNA' dan önce klasik yolla cDNA elde edilir. Genomik DNA ve cDNA örneğinin elde edildiği RNA saf olarak izole edilmeli, proteinden ve alkolden çok iyi bir şekilde arındırılmış olmalıdır (110, 111).

b) Polimerazlar: DNA polimeraz enzimleri, orijinal kalıp DNA zincirindeki baz bilgisini kullanarak dört çeşit deoksiribonükleozid trifosfattan tamamlayıcısı olan DNA zincirinin sentezini kataliz ederler. DNA polimeraz enzimleri, sentezi başlatmak için kalıp molekülündeki tamamlayıcı diziye bağlanan kısa DNA parçalarına (primerler) ihtiyaç duyarlar. Sentezin yönü 5' uçtan 3' uca doğru olup, primerin serbest 3' hidroksil ucuna ortamdaki dNTPlerin nükleofilik etki yapmalarıyla fosfodiester bağlarının katalizi ve yeni DNA ipliğinin polimerizasyonu sağlanır (110).

Termostabil DNA polimerazlardan PCR'da en yaygın olarak kullanılanı Thermus aquaticus'dan elde edilen Taq DNA polimeraz'dır. Taq DNA polimerazın polimerizasyon oranı (nükleotid/saniye) enzim için en uygun sıcaklık olan 70-80 (optimum 72) ºC 'da 35-100 dür. Enzimin reaksiyondaki konsantrasyonuda önemlidir. 100 µL'lik bir reaksiyonunda polimeraz enzim konsantrasyonu 1-5 ünite arasında olmalıdır. Bu miktarlar hedef ve kalıba göre değişim gösterir (110).

c) Primerler: Genellikle kimyasal olarak sentezlenen, 15-20 bazlık DNA oligonükleotid dizileridir. Tamamlayıcı DNA ipliklerinden karşıt yönlerde DNA sentezini başlatabilmek için iki adet primer kullanılır. Primer tasarımı yapılırken hedef DNA dizisinin iki ucundaki dizisi bilinen kısımlar dikkate alınır. Bu bölgelere tamamlayıcı olan primerler tasarlanır (110).

d) dNTP karışımı: Deoksiribonükleozid trifosfatlar (dATP, dGTP, dTTP, dCTP) yüksek saflıkta ya tek tek ya da dörtlü karışım halinde ticari olarak sağlanır. Taq DNA polimeraz düşük dNTP konsantrasyonlarında (10-100 µM) kalıba uygun doğru bazları

seçmede daha başarılı olmakla birlikte, normal koşullarda PCR 100 µM dNTP konsantrasyonu ile gerçekleştirilir. Ayrıca dört dNTP nin eşit konsantrasyonda kullanılması önemlidir (110).

e) Tamponlar ve $MgCl_2$: PCR' de kullanılan çeşitli tamponlar arasında en çok kullanılanı Taq/ Amplitaq enzimlerine özgü olan 10-50 mM derişiminde 20 ºC'da pH=8,3-8,8 arasında olan tris-HCl tamponudur. Ancak hedef dizi ve amaca uygun olarak farklı tamponlarda kullanılabilir. Tampon içeriğinde bulunan KCl'ün 50 mM'a kadar olan konsantrasyonları primer yapışmasını arttırır. Ancak 50 mM üzerindeki KCl konsantrasyonlarının Taq polimeraz enzimini engellediği unutulmamalıdır. $MgCl_2$'ün reaksiyon karışımındaki final konsantrasyonu değişebilmekle birlikte genellikle 0,5-5,0 mM'lık değerler arasında çalışılır.

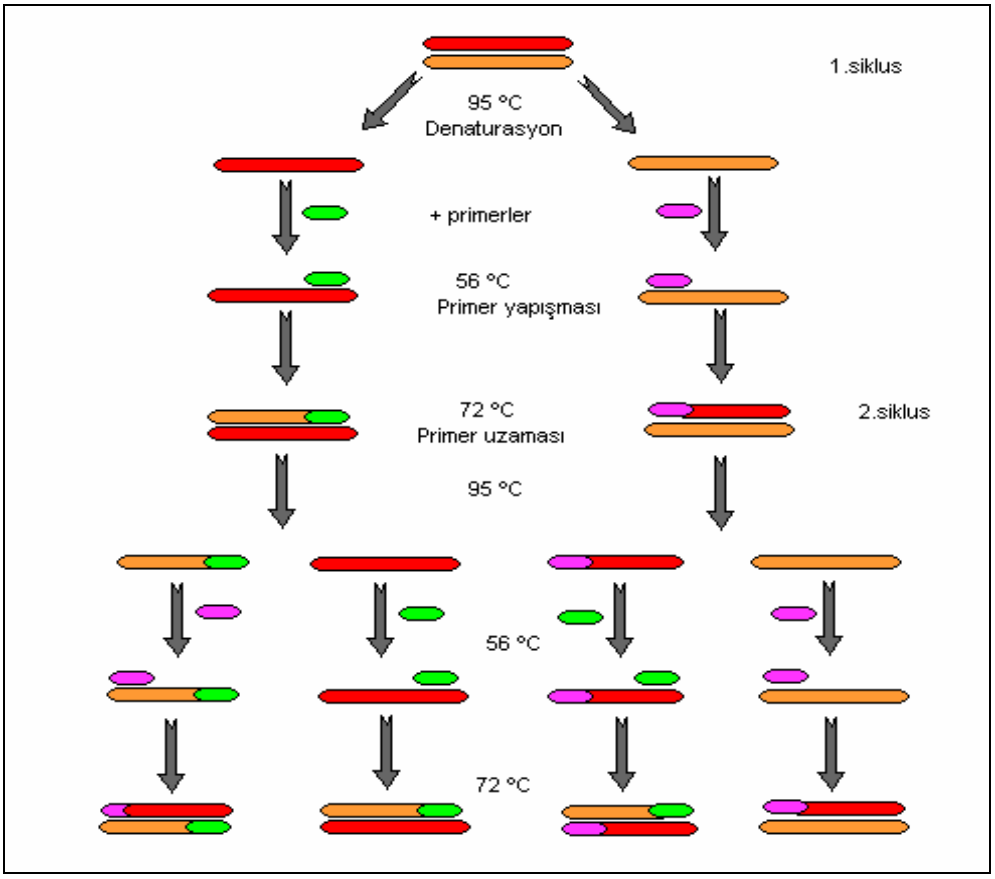
2.4.3- PCR'nin İşleyişi

Günümüzde PCR'ın verimi ve kullanımında önemli gelişmelerin yaşanmasının nedeni, termostabil DNA polimerazların ve farklı sıcaklık derecelerini istenilen süreler için otomatik olarak ayarlayabilen PCR cihazlarının (thermal cycler) kullanıma sunulmasıdır. Verimli bir PCR için; denaturasyon, primerlerin bağlanması, primerlerin uzaması, döngü sayısı ve PCR makinesinin sıcaklık iniş ve çıkış süreleri önemlidir (110).

a) Denaturasyon: Başlangıç denaturasyonu için genomik DNA gibi kompleks kalıpların denatüre olmasını sağlamak üzere yüksek sıcaklıklar (95-100 ºC) kullanılır. Ancak PCR sırasında genellikle en etkin denaturasyon sıcaklığının 92-95 ºC olduğu saptanmıştır. G+C den zengin hedefler için daha yüksek sıcaklıklar gereklidir. Denaturasyonun tam olarak gerçekleşmesi önemlidir. Tamamlanmamış denaturasyon DNA zincirlerinde kopmalara neden olarak ürün verimini azaltır. Ayrıca Taq DNA polimerazın yarı ömrüde dikkate alınmalıdır. Taq DNA polimeraz enzimi 92,5 ºC 'de 2 saatten fazla, 95 ºC 'de 40 dakika ve 97ºC'de ise 5 dakika yarı ömre sahip olduğu göz önünde bulundurulmalıdır (110, 111).

b) Primer Yapışması (Annealing): Primer yapışması için gerekli zamanın uzunluğu ve sıcaklığı primerlerin uzunluğuna, baz içeriğine ve konsantrasyonuna bağlı olarak değişir. Denaturasyonu takiben primerin bağlanması aşamasındaki Tm/bağlanma sıcaklığı oranının saptanması, PCR reaksiyonunun gerçekleşebilmesi açısından büyük bir öneme sahiptir. 55-72 ºC arası yapışma sıcaklıkları en iyi sonuçları verir (110, 111).

c) Primer Uzaması (Extensiyon): Uzama zamanı hedef dizinin uzunluğuna, konsantrasyonuna ve sıcaklığa bağlıdır. Primerlerin uzaması aşamasında genellikle Taq/Amplitaq DNA polimerazların polimerizasyon aktivitesi için en uygun sıcaklık derecesi olan 72 ºC kullanılır. Uzama aşaması için çoğu zaman 2 dakika yeterli olmakla birlikte, eğer uzun amplikonlar çoğaltılıyorsa süre arttırılır. PCR ürünü olan tüm moleküllerde reaksiyonun tamamlanmasını garanti altına almak için son döngünün uzama süresi çoğunlukla uzun (10-15 dakika) tutulur. En uygun döngü sayısı hedef DNA başlangıç konsantrasyonuna bağlı olarak değişkenlik göstermekle beraber, ideal döngü sayısı genellikle 25-35 arasındadır (110-114).



Şekil 2.14- Polimerize Zincir Reaksiyonunun İşleyişi (2 döngü gösterilmiş)

2.4.4- PCR Uygulama Alanları

Göreceli olarak yeni bir teknik olmasına rağmen PCR amplifikasyonu genetik bozuklukların tanısında, klinik örneklerdeki patogenik organizmaların nükleik asit dizilerinin belirlenmesinde, adli örneklerin ya da tek bir spermin genetik

tanımlanmasında ve etkinleşmiş onkogen mutasyonlarının ve tek gen polimorfizmlerinin analizinde yoğun uygulama bulmuştur (110, 111).

2.4.5- PCR'a Dayalı Yöntemlerden Bazıları

2.4.5.1- Real Time PCR

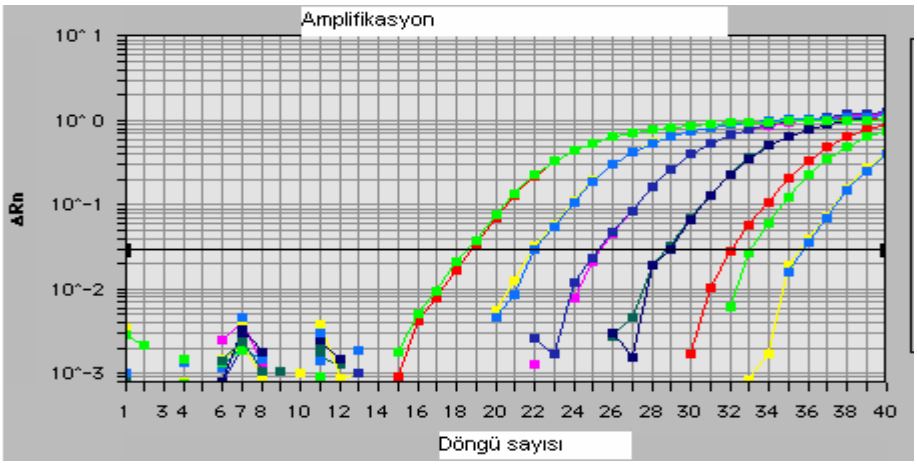
1988 yılında "thermus aquaticus" bakterisinden saflaştırılan, ısıya dayanıklı polimerazın (taq polimeraz) kullanımı ile birlikte polimeraz zincir reaksiyonları için otomatize termal siklüs cihazları geliştirilmeye başlanmıştır. Floresan ışıma tekniklerinin de kullanıma girmesiyle kinetik revers transkriptaz-PCR (RT-PCR)'da bir devrim yaşanmaktadır. Bu sayede tümör hücrelerinin ilaç dirençlerinden kemoterapi taramalarına ve tümör evrelerinin moleküler saptanmasına kadar uzanan bir çok farklı alanda gen anlatımını sayısal bir değer olarak ölçmek mümkün olmaktadır. Bu gelişim sayesinde artık gen kopya ürünlerinin düzeylerini sayısal değerlere dönüştürerek ölçmek, devam eden PCR reaksiyonunu ekranda izleyerek 'Real Time' (eşzamanlı) olarak reaksiyonun gidişine müdahale etmek ve PCR döngülerinin sayısıyla oynayabilmek de mümkündür. Birçok adlandırmayla anılan bu teknolojiye floresan okuma yapması nedeniyle yabancı yayınlarda Floresan Kantitatif RT-PCR, Kantitatif-kinetik PCR gibi çeşitli isimlendirmelere rastlamak mümkündür.

RT-PCR, PCR amplifikasyonunu görünür hale getirir, moniterize eder. PCR sonuçlarına ulaşmak için harcanan zamanı azaltmaktadır. Sistemin özellikleri tek bir reaksiyondan elde edilen bilginin miktarını en üst seviyeye çıkarabilmek üzere geliştirilmiştir. Bu şekilde sistemi kantitatif PCR için güçlü bir cihaz haline dönüştürmektedir. Sistem gen ekspresyonunun miktarını belirleme ve tek nükleotid polimorfizminin saptanması olanaklarını sağlamaktadır. Ayrıca polimeraz zincir reaksiyonunun kısa sürede tanımlamak için yeni bir hızlı sıcaklık döngüsü kullanmaktadır. PCR ürünlerini yeni erime eğrisi analiz programları kullanarak yeni sınırları araştırmamıza yardımcı olarak daha önceden ulaşılabilenin aksine daha zengin bir bilgiye sahip olmaya olanak sağlamaktadır. RT-PCR, üstün kopyalama yeteneği ve hassasiyet performansı sağlamaktadır. PCR uygulamalarında optimum performansa ulaşabilmek için geliştirilmiştir. Fluoresan işaretli problar veya interkalatör boyalar kullanılır. Oluşan DNA ile doğru orantılı floresan ışıma meydana gelir. Hızlı (1 saat) sonuç verir. Günlük numune çalışma sayısı yüksektir (~200 numune/gün). Düşük kontaminasyon riski vardır. Sensitivite yüksektir (< 5 kopya). Tekrarlanabilirliği oldukça iyidir (CV<%2.0). PCR sonuçları kantite edilebilir. PCR sonrası elektroforez gibi ilave tekniklere ihtiyaç yoktur. Multiplex PCR kullanımına uygundur. Konvansiyonel

ölçümlerden 1000 kat daha az RNA ile çalışabilir. İki kat artmış değişimi belirleyebilme hassasiyetindedir. Bu itibarla, kantitatif RT-PCR analizi ile minimal rezidüel hastalıklarla bağlantılı özgün gen düzeylerinin saptanması kliniklere büyük katkı sağlayacak potansiyeldedir.

2.4.5.2- Ters Transkriptaz PCR

Örnekte mRNA araştırılacaksa; o zaman ters transkriptaz PCR kullanılır. Önce ters transkriptaz veya bir primer yardımı ile RNA'dan cDNA üretilir. Meydana gelen mRNA/cDNA heterodupleksi polimeraz zincirinin RNAaz aktivitesi ile parçalanır. cDNA tek iplikçik haline döner. Bağlanma sıcaklığında, cDNA daki hedef diziye bağlanan primer, Taq DNA Polimeraz için hedef haline gelir ve uzamayı başlatır. Böylece 30 siklus sonunda milyonlarca mRNA üretilir.



Şekil 2.14-Real time PCR 'de Amplifikasyonun Eş Zamanlı İzlenmesi

.

3-GEREÇ ve YÖNTEM

3.1-Gereçler

3.1.1-Bireyler

Bu tez çalışmasına Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'nun onayı (16.01.2007 tarih ve 2 sayılı kararı) alındıktan sonra başlandı. Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Hastanesi Medikal Onkoloji ve Genel Cerrahi kliniklerinde mide kanseri tanısı ile takip edilen, yeni tanısı konulup kemoterapi tedavisine henüz başlanmamış olan veya cerrahi operasyon düşünülen ancak henüz ameliyat yapılmamış olan 30 hasta çalışma kapsamına alındı. Hasta ve kontrollerde solunum hastalıkları, kardiyovasküler hastalıklar ve endokrinopatiler (diabet, tiroid fonksiyon bozuklukları) olmamasına dikkat edildi ve her hangi bir ilaç kullananlar çalışmaya alınmadı.

Hastaların 13 tanesi kadın ve 17 tanesi erkek olup yaş ortalamaları 57,2±15,2 idi. Kontrol grubu 6 tanesi kadın ve 10 tanesi erkek toplam 16 tane sağlıklı bireyden oluşturuldu. Bu kontrol grubunun yaş ortalamaları 52,0±14,5 idi.

Araştırma Üniversitemiz Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Moleküler Laboratuarında yapıldı.

3.1.2-Kan Numunelerinin Alınması

Hasta ve kontrol grubu bireylerden 2 ml venöz kan örneği alınarak EDTA içeren antikoagülanlı tüplere aktarıldı.

3.1.3 Çalışmada Kullanılan Kimyasal Malzemeler

Çalışmamızda kullandığımız kimyasal maddeler ve kitlere ait bilgiler Tablo 3.1'de verilmiştir.

Tablo 3.1: Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Temin Edilen Firmalar

Kimyasal Malzeme veya Reaktif Adı	Temin Edildiği Firma ve Katalog No
Simply P Total RNA extraction kit	BioFlux Cat.No:BSC5282
hTERT mRNA RT-PCR kantifikasyon kit	Bioer Cat.No:BSB04M1
Etanol (%96–100)	Merck
Dietil Piro Karbonat DEPC (D 5758)	Sigma

3.1.4-Çalışmada Kullanılan Alet ve Cihazlar

Çalışmamızda kullandığımız alet ve cihazlara ait bilgiler Tablo 3.2'de verilmiştir.

Tablo 3.2: Kullanılan Alet ve Cihazlar

Alet/Cihaz	**Marka**
7300 Real Time PCR Sistem	Applied Biosystems, California, USA
Derin dondurucu (-80 ^{0}C)	Sanyo Ultra Low, Sanyo Electric Co Ltd, Japan
Derin dondurucu (-20 ^{0}C)	Arçelik
UV Spektrofotometre	Cecil CE 304
Laminar Flow Kabin	Nüve LN 120, Ankara
Mikro Santrifüj	Mikro 200 Hettich, Germany
Mikro otomatik pipetler	Eppendorf, Finnpipette, Medispes plus
Termomikser	Thermomixer Comfort Eppendorf, Germany
Vorteks Yellov Line TTS2	İKA, USA
Farklı boyutlarda filtreli pipet uçları	Biosphere filter tips, Nümbrecht, Germany
PCR tüpleri (DNAaz ve RNAaz free)	Axygen, Union City, USA
Pudrasız tek kullanımlık eldivenler	Aldrich, Malaysia
Real Time PCR optical 96 well-reaction plate (Barkodlu)	MicroAmp, Singapore
UV küvetler	PLASTBRAND, Germany

3.2- Yöntemler

3.2.1- Deneylerin Yapılışı

3.2.1.1- Total RNA İzolasyonu

Total RNA izolasyonu Laminar flow kabininde yapıldı. İzolasyon işlemine başlamadan önce pudrasız eldiven giyildi. Tek kullanımlık filtreli free RNAaz pipet uçları kullanıldı. Tam kandan Total RNA'ları izole etmek için Simply P total RNA extraction (BioFlux, China) kiti kullanıldı. Bu kit tam kan, bitki dokusu, hayvan, kültür hücresi ve bakteri gibi değişik kaynaklardan total RNA izolasyonu için hazır reaktifleri içermektedir. Hasta ve kontrol grubundan EDTA'lı tüplere alınan tam kandan 100 µL 1,5 mL'lik ependorf tüpe pipetlenerek üzerine kit içeriğinde bulunan Solusyon R2 yi pipetledikten sonra bu karışım 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi ve ardından bu karışım kit içeriğindeki özel spin kolonuna aktarıldı ve 12000 rpm'de 30 saniye santrifuj

edildi. Daha sonra birkaç yıkama ve elüsyon basamaklarından sonra 20 µL total RNA elde edildi. Bu total RNA'lar 10 µL olacak şekilde steril ve free RNAaz 200 µL'lik iki özel PCR eppendorf tüplerinde deney gününe kadar -80 ^{0}C' de saklandı.

Görüldüğü gibi bu kit prosedürü RNA izole etmek için basit ve hızlı bir teknik olup yüksek kalitede RNA ekonomik, saf ve çok kısa sürede elde edilmiş olur. Bu elde edilen purifiye RNA geniş ölçüde Northern Blot, Poli A seçimi, in vitro translasyon, RT-PCR analizlerinde ve cDNA kütüphanelerinin elde edilmesinde kullanılabilir.

Deneye başlamadan önce RNA'yı kesen enzimleri inhibe etmek için RNA izolasyon aşamasında kullanılacak ependorf tüpler %0,5'lik dietil piro karbonat (DEPC) içeren saf su ile muamele edildi.

3.2.1.2- Total RNA Miktar Tayini

Nükleotidlerin heterosiklik halkaları 260 nm dalga boyunda maksimum absorbsiyon özelliği gösterirler. Bu nedenle 260 nm'de ölçülen absorbsiyon değerleri oldukça saf olarak izole edilen nükleik asitlerin ng/µL veya µg/mL düzeyinde miktarlarının belirlenmesinde kullanılır. RNA'nın konsantrasyonunu saptanmasında kullanılan spektrofotometrik yöntemler DNA'nın spektral analizi ile tamamen aynıdır. Sadece tek zincirli RNA'nın miktarının belirlenmesinde kullanılan formül farklıdır.

Total RNA (ng/µl)=260 nm'deki absorbans x 40 x Dilüsyon Faktörü

RNA molekülleri için 1 optik dansitenin 40 µg/mL'ye karşılık geldiği bilinmektedir. Yukardaki formülde 40 sayısıda buradan gelmektedir.

Bununla beraber 260 ve 280 nm dalga boylarında okunan değerler arasındaki oran nükleik asitlerin saflığı hakkında bilgi vermektedir. Proteinler bilindiği gibi 280 nm'de absorbsiyon özelliği gösterirler. Bu nedenle 280 nm'de ölçülen bir değerdeki artış A_{260}/A_{280} oranında düşmeye neden olur. İzole edilen total RNA örneklerinin saflığından bahsetmek için bu oran 1.8-2.00 arasında olmalıdır. Ölçümlerde kesinlikle UV geçirgen küvet kullanılmalıdır (110).

Bu amaçla üretilmiş tek kullanımlık küvetlerden faydalanılarak 4 µL Total RNA 166 µL free RNAaz su kullanılarak dilüe edildi ve UV spektrofotometrede 260 ve 280 nm'de absorbansları ölçüldü. Ölçümün doğruluğunu arttırmak amacıyla hem havaya karşı kör alınıp free RNAaz su absorbansı, hem free RNA az suya karşı kör alınıp bu sırada küvete RNA eklenip RNA absorbansı değerleri kaydedildi, hem de havaya karşı kör alınıp RNA absorbans değerleri kaydedildi.

Hava/Su Absorbans.

Su/RNA Absorbans.

Hava/RNA Absorbans.

Örneklerin RNA konsantrasyonu yukarda bahsedilen formüle göre hesaplandı. Ayrıca A_{260}/A_{280} oranının 1.8-2.00 olup olmadığı kontrol edildi.

3.2.1.3- Real Time PCR ile Telomeraz mRNA Ekspresyonunun Kantitatif Olarak Belirlenmesi

hTERT mRNA ekspresyonu, human telomerase revers transcriptase (hTERT) mRNA one step RT-PCR Quantification kit (Hang Zhou Bioer Techn. Co, Ltd, China) kullanılarak kantifiye edildi. Amplifikasyon ve kantifikasyon işlemi 7300 Real Time PCR system (Applied Biosystems) cihazında yapıldı. Bu hTERT mRNA kantifikasyon kit Real Time PCR belirleme cihazlarının çoğu çeşitlerine adapte edilebilir özelliktedir. Bu kit proseduruna göre ilk önce hTERT şifreleyen mRNA 'dan önce ters transkripsiyon işlemi ile bir cDNA oluşturulur. Oluşturulmuş bu cDNA fragmanı bir basamaklı Real Time PCR reaksiyonuyla spesifik primerleri ile amplifiye edildi. Oluşan amplikonlar spesifik TaqMan-MGB propları kullanılarak amplifikasyon işlemi eş zamanlı moniterize edildi. Bu TaqMan-MGB proplarının 5' ucu FAM boyası ile 3' ucu ise NFQ (Non flouresans Oencher)- MGB ile işaretlendi.

hTERT mRNA one step RT-PCR Quantification kit içeriği aşağıda listelenmiştir.

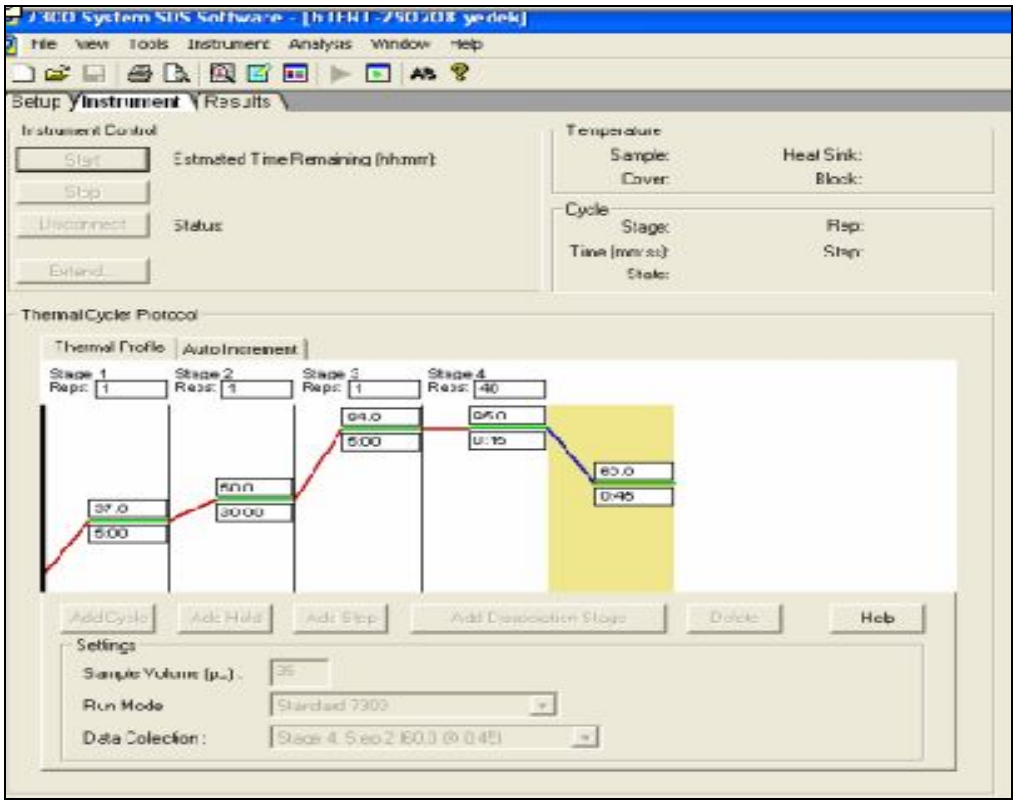
- hTERT RT-PCR mix
- Revers transcriptase
- Taq Polimerase
- RNA inhibitör
- DEPC-ddH_2O
- hTERT standartları : Standart 1: 1~9.10^7 kopya/mL
  Standart 2: 1~9.10^6 kopya/mL
  Standart 3: 1~9.10^5 kopya/mL
  Standart 4: 1~9.10^4 kopya/mL

Deneye başlamadan önce tüm kit bileşenleri ve kontrol ve hastalardan izole edilmiş total RNA'lar derin dondurucudan çıkarılarak oda sıcaklığına gelmesi beklendi. Sonra her bir kontrol, hasta ve standart numunelerine yetecek kadar hTERT master mix karışımı hazırlandı. Her bir hasta ve kontrol numunelerinde ve standartlarda hTERT master mix karışımında

36,3 µL hTERT RT-PCR mix
0,3 µL Taq Polimerase
0,4 µL Revers transcriptase
1 µL RNA inhibitör

bulunacak şekilde karışım hazırlandı. Çalışılacak her bir hasta, kontrol ve standartlar ve negatif kontrol için Real Time PCR plate tüplerine reaksiyon master mix karışımından 38 µL pipetlendi. Hasta ve kontrol tüplerine izole edilmiş RNA'lar kendilerine karşılık gelen uygun tüplere sırasıyla 2 µL, standartlar 2 µL uygun tüplerine pipetlendi. Negatif kontrol için ise RNA yerine DEPC'li sudan 2 µL pipetlendi. Bu aşamalarda Real Time PCR plate tüpü buz üstünde tutularak tüm pipetleme aşamalarının soğukta yapılması sağlandı. Kullanılan pipet, pipet uçları ve reaksiyon tüplerinin nükleaz free olmasına dikkat edildi. Tüm deney aşaması boyunca pudrasız steril eldiven giyildi. Tüm pipetleme aşamalarında filtreli taze aerosol gelmesini önleyici filtreli, nükleaz free pipet uçları kullanılarak numune, standart ve reagentlerin çapraz kontaminasyon riski azaltılmasına çalışıldı. Carry over kontaminasyon riskini minimize etmek için master mix hazırlanması ve RNA'ların Real Time PCR plate tüplerine pipetlenmesi farklı bölmelerde yapıldı.

Her bir tüp kapatıldı ve standart benctop mikrosantrifujda 700 g de 5 saniye santrifuj edildi. Daha sonra reaksiyon tüpleri 7300 Real Time PCR detection cihazına yerleştirildi. PCR siklus protokolü cihaza girildi (Şekil 3.1'de cihaza girilen PCR protokolu görülmektedir).



Şekil 3.1- Real Time PCR cihazına Girilen PCR Protokolu

Tablo 3.3'de de kullanılan PCR protokolü ve hangi basamakların olduğu görülmektedir. Numunelerin ve standartların protokoldeki siklusları tamamlaması beklendi.

Tablo 3.3-Deneyde Kullanlan Real Time PCR Protokolu

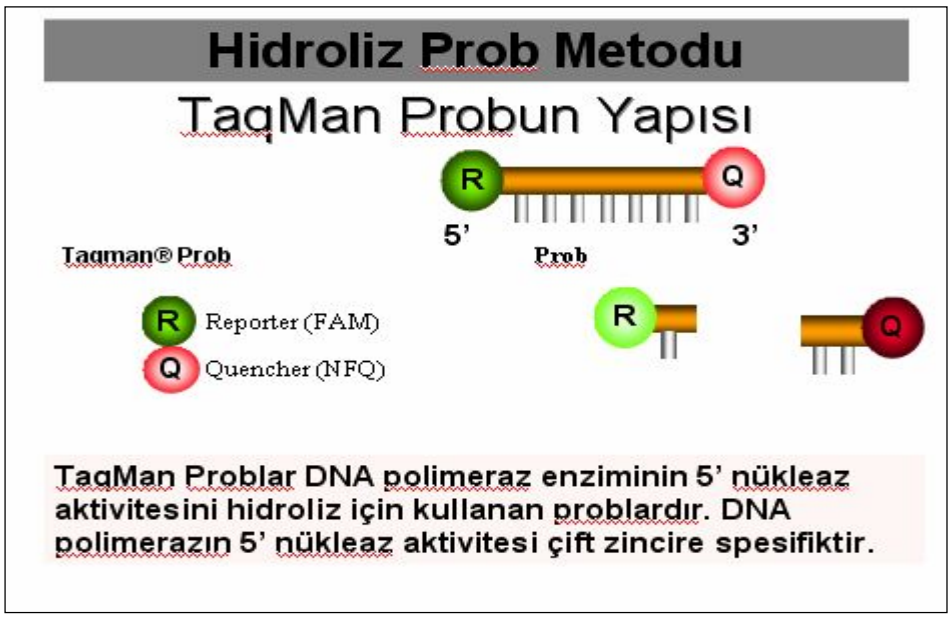
Vial	Program	Siklus program data	Value
1	İnkubasyon	Sikluslar Analiz modu Temperature target Target temperature İnkubasyon zamanı (saat:dak:sn) Analiz modu	1 None Segment 1 37 ^{0}C 0:05:00 None
2	Ters transkripsiyon	Sikluslar Analiz modu Temperature target Target temperature İnkubasyon zamanı(saat:dak:sn) Analiz modu	1 None Segment 1 50 ^{0}C 0:30:00 None
3	Denaturasyon	Sikluslar Analiz modu Temperature target Target temperature İnkubasyon zamanı(saat:dak:sn) Analiz modu	1 None Segment 1 94 ^{0}C 0:05:00 None
4	PCR amplifikasyon	Sikluslar Analiz modu Temperature target Target temperature İnkubasyon zamanı(saat:dak:sn) Analiz modu	40 Kantifikasyon Segment 1 Segment 2 95^{0}C 60 ^{0}C 0:00:15 0:00:45 None Single (FAM)

3.2.2- Real Time PCR Tekniğinde TaqMan Problar ve Özellikleri

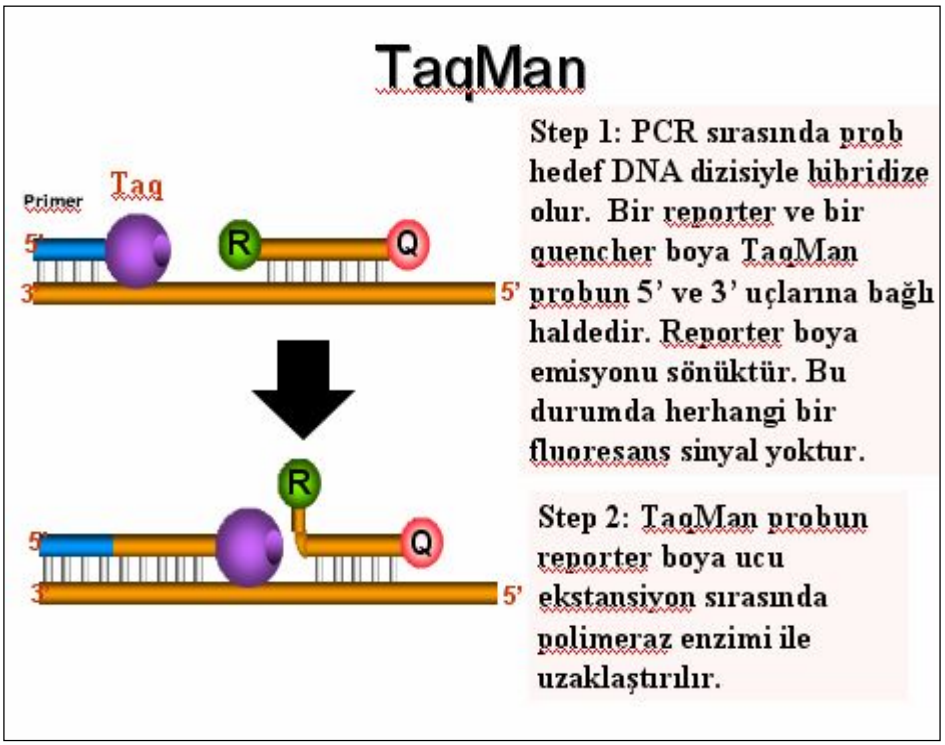
TaqMan prob yöntemi PCR siklusları esnasında oluşan spesifik PCR ürününü belirlemek ve eş zamanlı moniteze etmek amacıyla flurogenik bir prob kullanır. Prob

ve hedef bölge arasındaki hibridizasyon floresans bir sinyal oluşturur. Taqman Probu ile spesifite artar. Mevcut ölçümler optimize edilebilir.

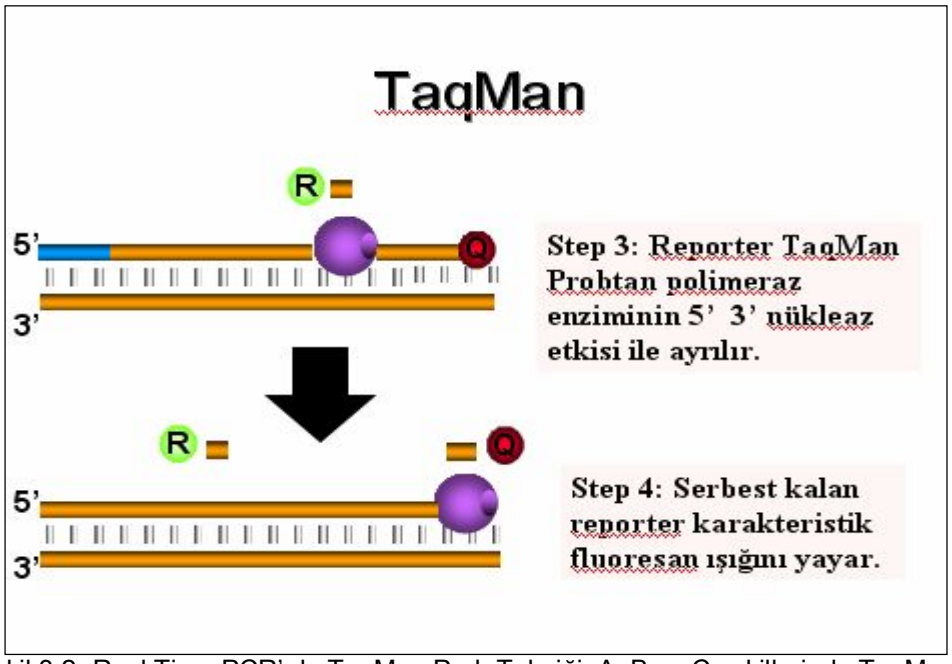
A)



B)



C)



Şekil 3.2- Real Time PCR' da TaqMan Prob Tekniği. A, B ve C şekillerinde TaqMan Probunun PCR Aşamasında Uğradığı Değişimler Görülmektedir.

3.2.3- Real Time PCR Kantifikasyon Analizinde Kullanılan Terimler ve Data Analizi

Baseline: Fluoresans sinyalde az değişikliğin olduğu PCR sikluslarının başlangıcı.

Threshold: Real time ölçümlerde C_T belirlenmesi için kullanılan SDS Software 1.3.1 ayarlanma ile otomatik olarak belirlenen veya manuel olarak ayarlanabilen ΔRn' nin bir seviyesi

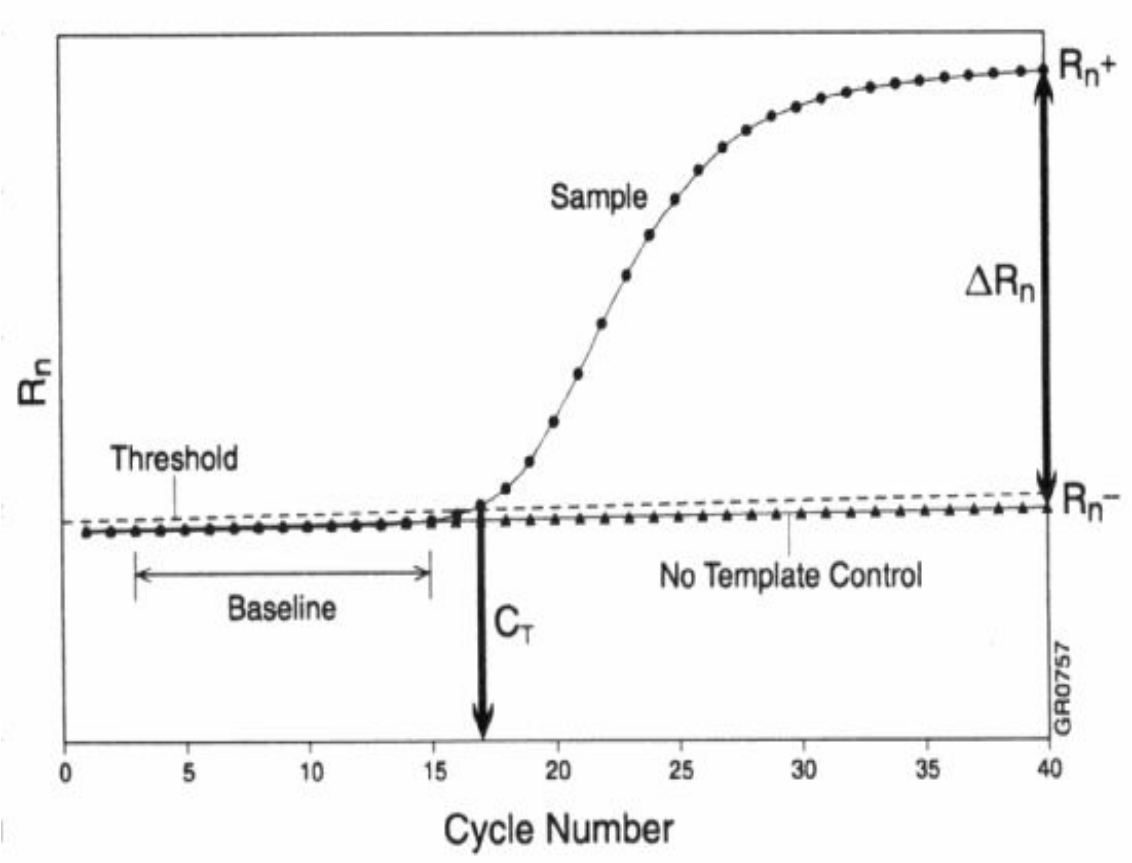
Threshold cycle (C_T): Threshold'u geçen fluoresans fraksiyonel siklus sayısı

No template control (NTC): Kalıp içermeyen bir numune. Amplifikasyon kalitesini doğrulamada kullanılır.

Nucleic acid target (Template): Belirlenmesi yada kantifiye edilmesi istenen nükleotid dizisi

Passive reference: Data analizi esnasında reporter boya sinyalini normalize edebilen ve bir internal fluoresans referans sağlayan boya. Normalizasyon konsantrasyon veya hacimdeki değişikliklerin sebep olduğu flouresans fluktuasyonları için doğrulama ve düzeltmede gereklidir.

Reporter dye: TaqMan probun 5' ucuna eklenmiş boya. Bu boya spesifik amplifikasyonu gösteren bir sinyal sağlar



Normalized reporter (Rn): Reporter boyanın flouresans emisyon yoğunluğunun passive referans boyanın flouresans emisyon yoğunluğuna oranıdır.

Delta Rn (ΔRn): PCR koşullarının kurulması ile spesifik olarak oluşmuş sinyalin büyüklük şiddetini gösterir (ΔRn=Rn-baseline).

Standart: Standart bir eğriyi oluşturmada kullanılan bilinen miktardaki numune.

Unknown sample: Kantifiye edilmek istenen ve kalıbın bilinmeyen miktarını içeren numunedir.

Data analizi: Real-time PCR sırasında amplifikasyon farklı evreler meydana getirir. Bunlar:

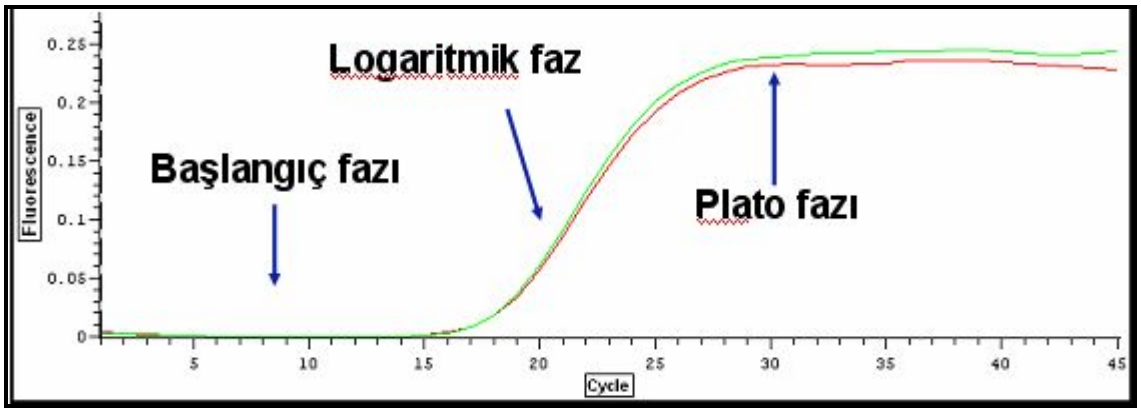
Başlangıç fazı

Logaritmik faz

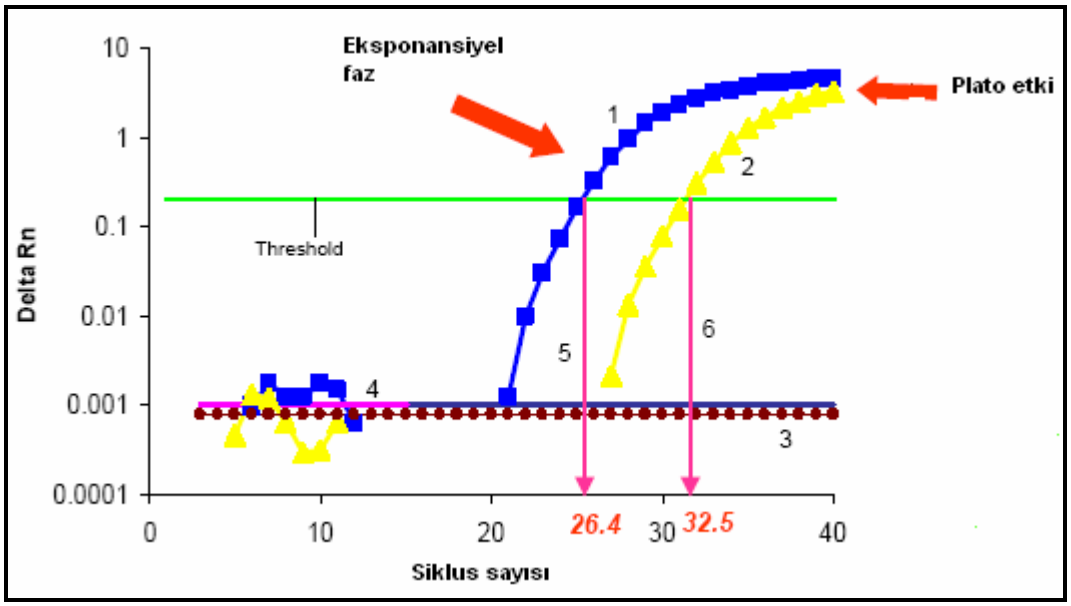
Plato fazı

Başlangıç fazında, ürün oluşmakta, ancak floresans background seviyesinin altında kalmaktadır. Logaritmik fazda, ürünün eksponansiyel birikimiyle floresans background seviyesinin üzerine çıkmaktadır. Fluoresans amplifiye olan ürün miktarıyla

direkt orantılı olarak yükselmektedir. Plato fazında, DNA veya fluoresans miktarında reaksiyon bileşenlerinin (primer, taq polimeraz vs.) tükenmesine dolayı anlamlı artış yoktur (Ginzinger, 2002).



Şekil 3.3- Real-time PCR Sırasında Amplifikasyonun Meydana Getirirdiği Farklı Evreler



Şekil 3.4- Data Analizi İçin Bir Referans Örnek Verilmiştir. 1-Yüksek DNA Konsantrasyonlu Bir Numune (örneğin 10 ng/µL). 2-Düşük DNA Konsantrasyonlu Bir Numune (örneğin 41 pg/µL). 3- Non-Template Control (NTC). 4-Baseline (3-15 arası sikluslar). 5 ve 6- Sırasıyla 1 ve 2 Numaralı Numuneye Ait Cycle Threshold (C_T) Değerleri.

3.3- İstatistiksel Analiz

Çalışmalarımız sonucunda elde edilen bulgular istatistiksel olarak değerlendirildi. Bulguların ortalama değerleri (X) ve standart hataları (SE) bulundu. İstatistiksel değerlendirmeler, bilgisayarda SPSS 11.5 paket programında, anlamlılık sınırı $p<0,05$ alınarak yapıldı. Bulgularımız normal dağılım göstermediği için karşılaştırmalarda nonparametrik bir test olan Kruskal Wallis testi kullanıldı ve karşılaştırmalarda önemli bulunan gruplarda Mann-Whitney U testi kullanıldı. Bulgularımız arasındaki korelasyon için Sperman koralasyon testi uygulandı.

4-BULGULAR

Bu çalışmada erken evre , invaziv ve metastatik mide kanserli hastalardan kemoterapiye başlanmadan veya ameliyat yapılmadan önce alınan periferik tam kan örneklerinde hTERT mRNA ekspresyonu düzeyleri araştırıldı. Real Time PCR ile hTERT mRNA standartları kullanılarak Şekil 4.10'da gösterildiği gibi bir kalibrasyon eğrisi elde edildi. Bu kalibrasyon eğrisinden faydalanılarak bu parametrenin mide kanserli hastalardaki ekspresyon değerleri belirlendi. Ayrıca kronik atrofik gastritli hastalarda ve sağlıklı bireylerden oluşturulan kontrol grubunda da hTERT mRNA ekspresyonu değerleri ölçüldü. Hasta ve kontrol gruplarında hTERT mRNA ekspresyon düzeyleri arasında bir farkın olup olmadığı araştırıldı. Ayrıca hTERT mRNA ekspresyon düzeylerinin mide kanserli hastaların metastaz tutulumu, lenf nodu tutulumu, diferansiyon derecesi, evre, invazyon derinliği ve tümör tutulum yeri gibi klinikopatolojik özelliklerle bir ilişkisi olup olmadığı araştırıldı.

4.1-Hasta ve Kontrol Grubunda hTERT mRNA Ekspresyon Düzeylerinin Karşılaştırılması

Hasta ve kontrol gruplarına ait hTERT mRNA ekspresyon ortalama değerleri ve standart hataları Tablo 4.1'de verilmiştir

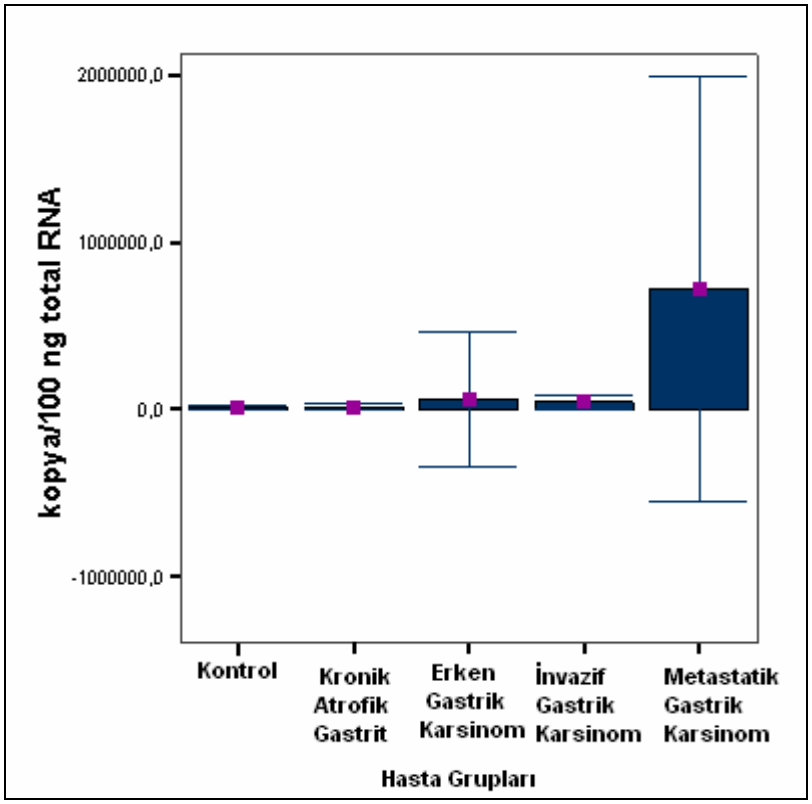
Erken evre, invaziv ve metastatik mide kanserli hastalarda hTERT mRNA ekspresyon düzeyleri (kopya/100 ng total RNA) kontrol ve kronik atrofik gastritli gruba göre daha yüksekti. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında erken, invaziv ve metastatik mide kanserli gruplarda fark istatistiksel olarak anlamlıydı (Sırasıyla $p<0.05$, $p<0.01$ ve $p<0.05$).

Tablo 4.1-Hasta ve Kontrol Grubuna hTERT mRNA Ekspresyon Ortalama Değerleri ve Standart hataları

Hasta Grupları	hTERT (kopya/100 ng total RNA)		
	Mean	S.E	p
Kontrol (n=16)	7831,16	5558,69	0,005*
Kronik atrofik gastrit (n=5)	13048,36	6631,44	
Erken Gastrik Karsinom (n=2)	62156,85	31568,65	
İnvasif Gastrik Karsinom (n=10)	44407,70	17493,43	
Metastatik Gastrik Karsinom (n=13)	721399,95	583319,1	

***:** Bulgularımız normal dağılım göstermediği için karşılaştırmalarda nonparametrik bir test olan Kruskal Wallis testi kullanıldı. Kruskal Wallis testine göre anlamlılık sınırı $p<0,01$ olduğundan mevcut gruplarda karşılaştırmalardan her hangi bir grupla diğerlerinin herhangi biri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark var demekti. Bu anlamlı farkı tespit etmek için daha ileri düzey istatistik testi olarak nonparametrik Mann Whitney U testi kullanıldı.

Kronik atrofik gastritli hastalarda hTERT mRNA ekspresyon düzeyleri (kopya/100 ng total RNA) kontrol grubuna göre daha yüksekti. Fark istatistiksel olarak anlamlı değildi (p>0.05). Kronik atrofik gastritli hastalarda erken, invaziv ve metastatik mide kanserli hastalarla karşılaştırıldığında hTERT mRNA ekspresyon düzeyleri daha düşüktü. Fark istatistiksel olarak anlamlı değildi (p>0.05).



Şekil 4.1- hTERT mRNA Ekspresyon Ortalama Değerlerinin Gruplar Arasındaki Dağılımı

Metastatik mide kanserli hastalardaki hTERT mRNA ekspresyon düzeyleri (kopya/100 ng total RNA) erken ve invaziv mide kanserli hastalardakinden daha yüksekti. Fark istatistiksel olarak anlamlı değildi (p>0,05).

4.2-Mide Kanserli Hastalarda hTERT mRNA Ekspresyon Düzeylerinin Klinikopatolojik Özelliklerle İlişkisinin Karşılaştırılması

4.2.1-Uzak Metastaz

Uzak metastazı bulunan mide kanserli hastalarda hTERT mRNA ekspresyon düzeyleri (kopya/100 ng total RNA) metastazı olmayanlardan daha yüksekti. Fark istatistiksel olarak anlamlı değildi (p>0.05).

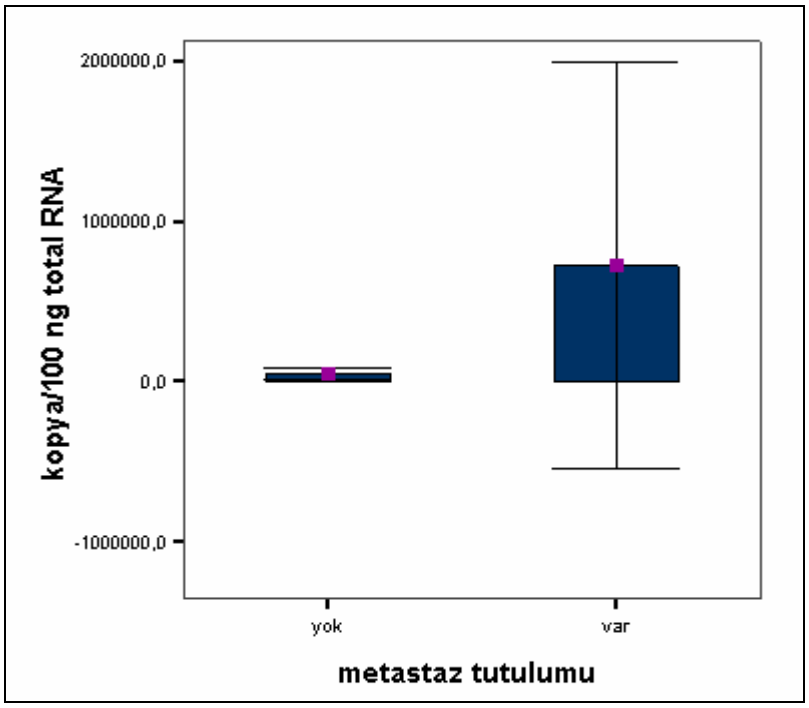
Tablo 4.2- Mide Kanserli Hastaların Klinikopatolojik Özelliklerine Göre hTERT mRNA Ekspresyon Ortalama Değerleri ve Standart hataları

Klinikopatolojik özellikler		hTERT (kopya/100 ng total RNA)		p*
		Mean	S.E	
Uzak metastaz	Yok (n=12)	47365,89	15090,64	0,2
	Var (n=13)	721399,95	583319,1	
Lenf Nodu Tutulumu	Yok (n=2)	62156,85	31568,65	0,4
	Var (n=23)	427055,50	331778,0	
Diferansiyon Derecesi	İyi (n=2)	62156,85	31568,65	0,5
	Az (n=7)	47835,10	24978,25	
	Orta (n= 6)	18413,35	10012,60	
	Kötü (n=10)	937695,06	753167,1	
Evre	Evre 1 (n=2)	62156,85	31568,65	0,3
	Evre2 (n=2)	123205,90	62823,35	
	Evre3 (n= 6)	23666,32	10500,59	
	Evre4 (n= 15)	628924,45	506694,9	
Cinsiyet	Erkek (n= 14)	638008,75	543432,3	0,4
	Kadın (n= 11)	92224,33	57432,21	
Tümör Tutulum Yeri	Proksimal (n=7)	152263,39	135552,6	0,4
	Distal (n=10)	866123,85	756104,3	
	Orta (n=8)	27438,49	12670,89	
İnvazyon Derinliği	T0 (n=2)	62156,85	31568,65	0,3
	T1 (n= 0)	.	.	
	T2 (n= 2)	123205,90	62823,35	
	T3 (n=10)	112500,65	94923,28	
	T4 (n=11)	768259,83	690357,2	

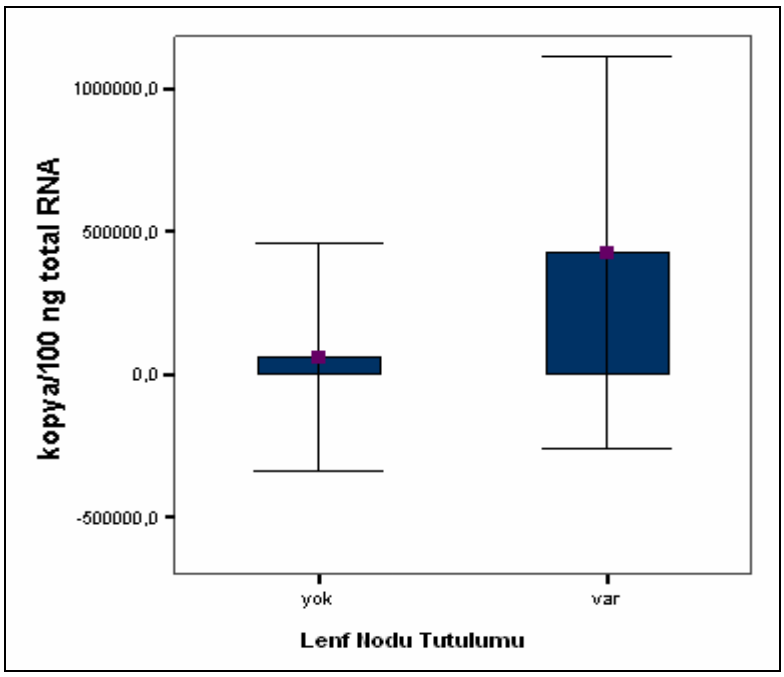
*: Bulgularımız normal dağılım göstermediği için karşılaştırmalarda nonparametrik bir test olan Kruskal Wallis testi kullanıldı..

4.2.2- Lenf Nodu Tutulumu

Lenf nodu metastazı bulunan mide kanserli hastalarda hTERT mRNA ekspresyon düzeyleri (kopya/100 ng total RNA) lenf nodu tutulumu olmayanlardan daha yüksekti. Fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0.05$).



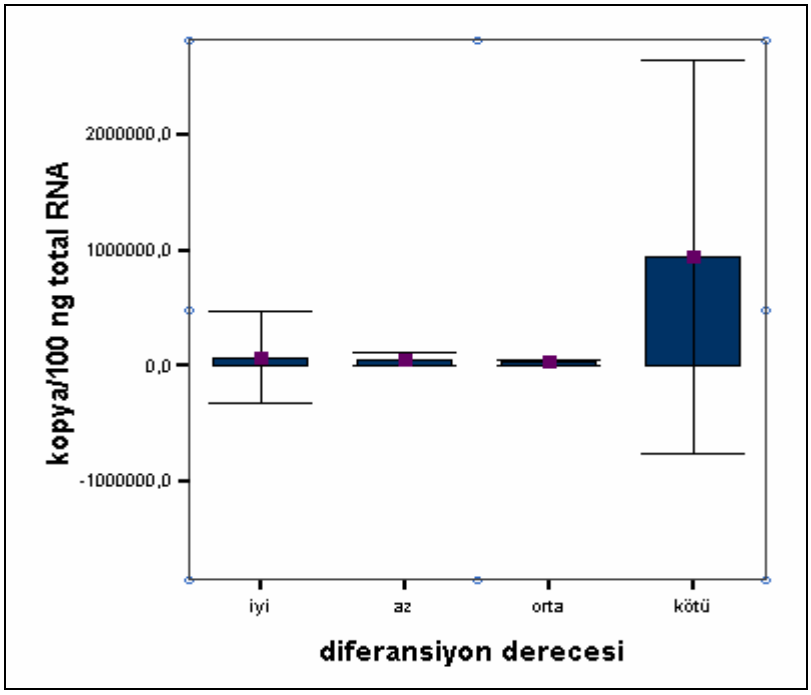
Şekil 4.2- hTERT mRNA Ekspresyon Ortalama Değerlerinin Metastazı Olanlarla Olmayanlar Arasındaki Dağılımı



Şekil 4.3- hTERT mRNA Ekspresyon Ortalama Değerlerinin Mide Kanserli Hastalarda Lenf Nodu Metastazı Olanlarla Olmayanlar Arasındaki Dağılımı

4.2.3- Diferansiyon Derecesi

En yüksek hTERT mRNA ekspresyon düzeyleri (kopya/100 ng total RNA) kötü diferansiyonlu mide kanserli hastalarda tespit edildi. Ancak diğer diferansiyon dereceli mide kanserleri ile karşılaştırıldığında fark istatistiksel olarak anlamlı değildi (p>0.05).



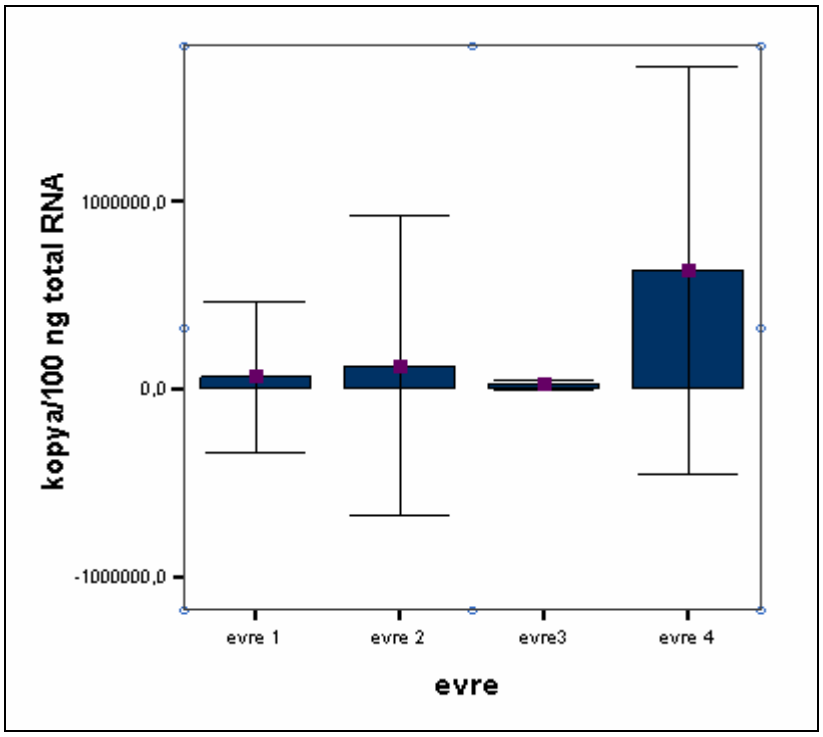
Şekil 4.4- hTERT mRNA Ekspresyon Ortalama Değerlerinin Tümörün Diferansiyon Derecesi ile İlişkisinin Grafiksel Karşılaştırılması

4.2.4- Tümör Evresi

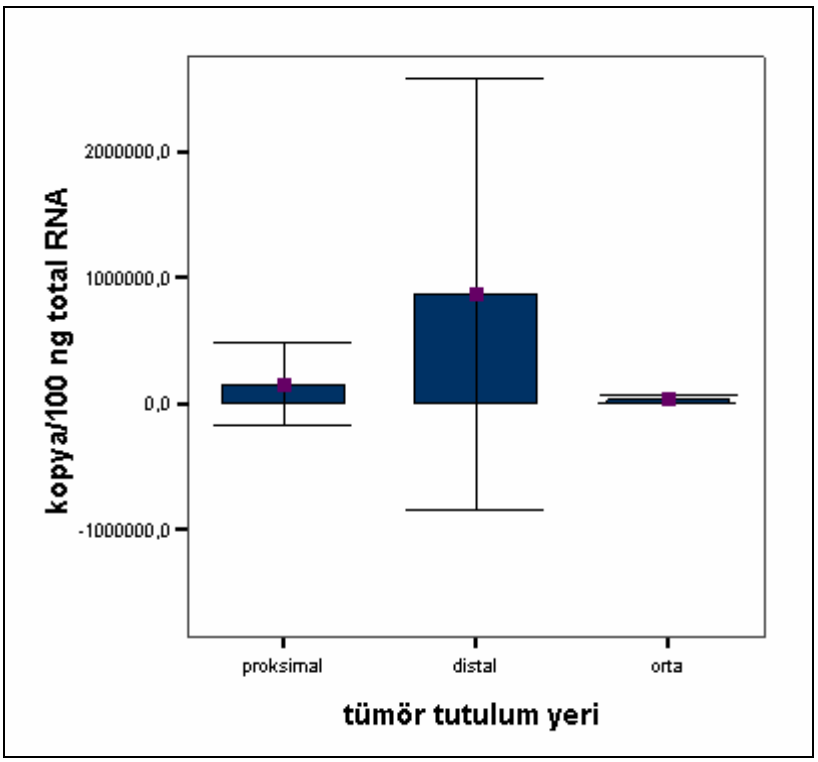
En yüksek hTERT mRNA ekspresyon düzeyleri (kopya/100 ng total RNA) Evre IV mide kanserli hastalarda tespit edildi. Ancak Evre I, II ve III olan mide kanserleri ile karşılaştırıldığında fark istatistiksel olarak anlamlı değildi (p>0.05).

4.2.5-Tümör Tutulum Yeri

En yüksek hTERT mRNA ekspresyon düzeyleri (kopya/100 ng total RNA) distalde tümörü olan mide kanserli hastalarda tespit edildi. Ancak proksimal ve orta bölgelerinde tümörü olan mide kanserleri ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak fark anlamlı değildi (p>0.05).



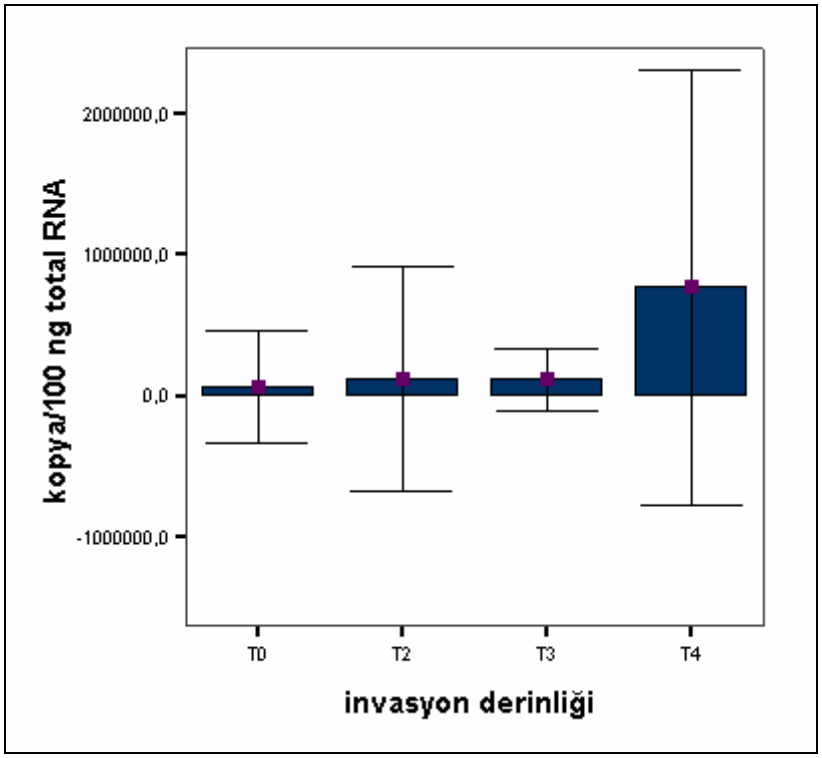
Şekil 4.5- hTERT mRNA Ekspresyon Ortalama Değerlerinin Tümörün Evresi İle İlişkisinin Grafiksel Karşılaştırılması



Şekil 4.6- hTERT mRNA Ekspresyon Ortalama Değerlerinin TümörünTutulum Yeri İle İlişkisinin Grafiksel Karşılaştırılması

4.2.6- Tümör İnvazyon Derinliği

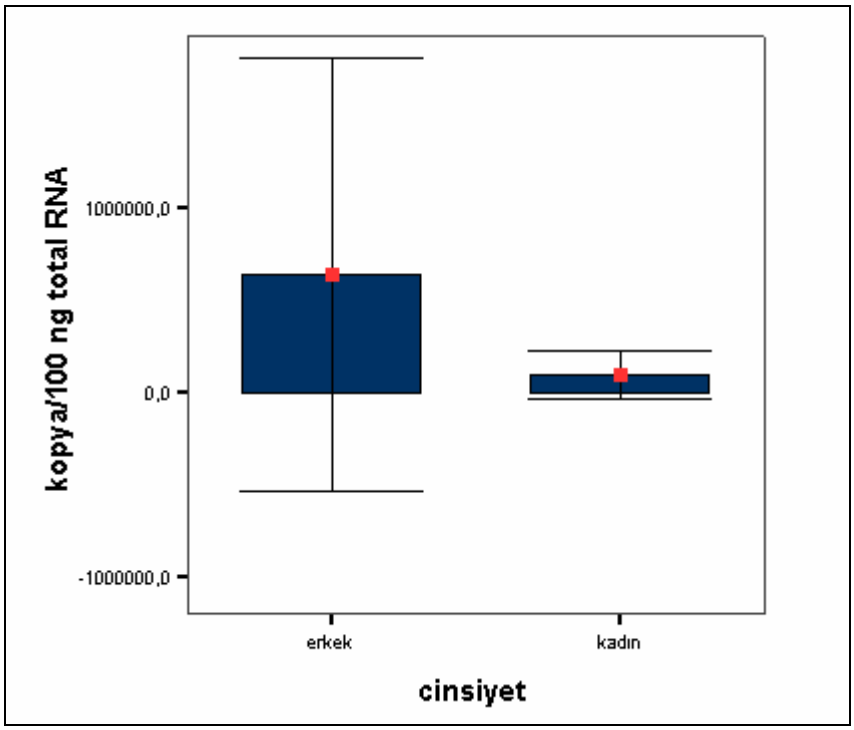
En yüksek hTERT mRNA ekspresyon düzeyleri (kopya/100 ng total RNA) T4 derecede invazyon derinliği olan mide kanserli hastalarda tespit edildi. Ancak T0, T1, T2 ve T3 derecede invazyon derinliği olan mide kanserleri ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak fark anlamlı değildi (p>0.05).



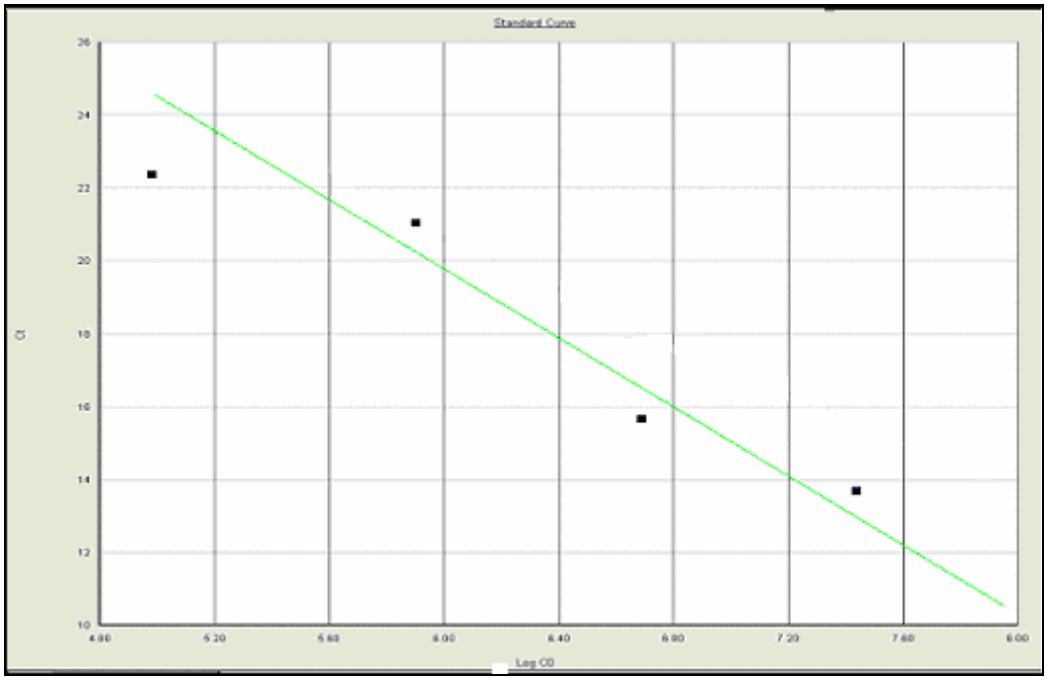
Şekil 4.7-hTERT mRNA Ekspresyon Ortalama Değerlerinin Tümörün İnvazyon Derinliği İle İlişkisinin Grafiksel Karşılaştırılması

4.2.7- Cinsiyet

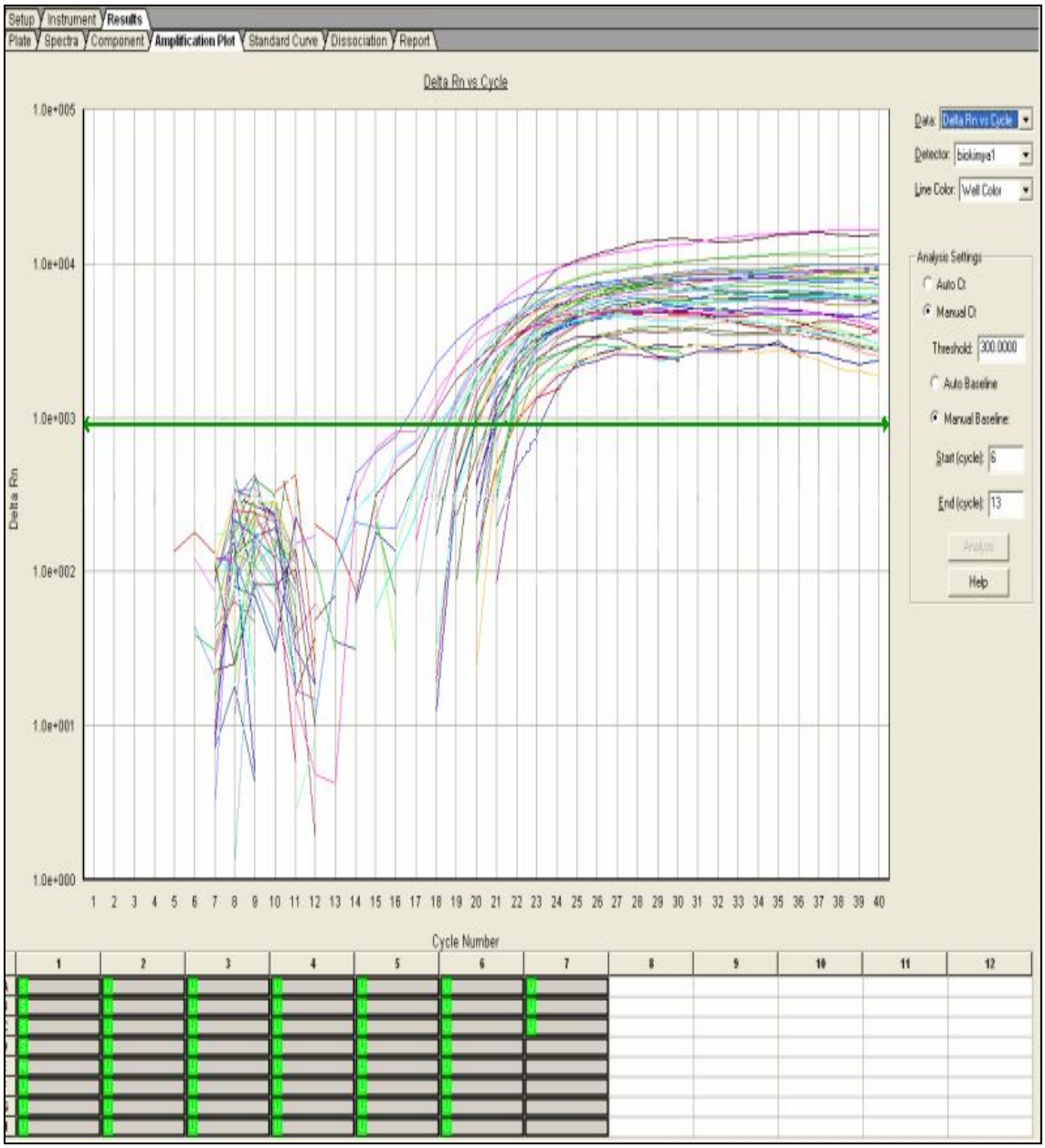
En yüksek hTERT mRNA ekspresyon düzeyleri (kopya/100 ng total RNA) erkek mide kanserli hastalarda tespit edildi. Ancak kadın mide kanserli hastalarla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak fark anlamlı değildi (p>0.05).



Şekil 4.8-hTERT mRNA Ekspresyon Ortalama Değerlerinin mide kanserli hastalarda cinsiyet İle İlişkisinin Grafiksel Karşılaştırılması



Şekil 4.9- Real Time PCR cihazında hTERT Standartlarına Ait Kalibrasyon Eğrisi



Şekil 4.10- Real Time PCR Cihazında Deney Sonucu Elde Ettiğimiz Amplifikasyonun Eş Zamanlı Görüntüsü

5-TARTIŞMA

Mide kanseri dünyada kansere bağlı ölüm nedenlerinden biri olarak yerini koruyan en yaygın malign seyirli tümörlerden birisidir. En sık görüldüğü yerler Japonya, Çin ve Güney Amerika ülkeleridir. Ülkemizde gastrointestinal kanserler arasında ilk sırada, tüm kanserlerde ikinci sırada yer alan mide kanseri, Sağlık Bakanlığı'nın son istatistiklerine göre Erzurum'da erkeklerde birinci sırada, kadınlarda ise ikinci sırada yer almaktadır. Erzurum bölgesindeki üst gastrointestinal sistem kanser sıklığı ülkemizin diğer bölgelerine göre 3-5 misli daha fazladır (114).

Erken evrede semptomların yokluğu, sıklıkla mide kanserinin tanısını geciktirmektedir. Bunun sonucunda batılı ülkelerde bile mide kanserli vakaların %80-90'ı tedavi oranı düşük olan ileri evre tümör varlığında cerraha gelir. Erken tanı bu hastalığın mortalite hızını azaltmada hayati bir öneme sahiptir. Baryum çalışması ve üst gastrointestinal endoskopi mide kanserini belirlemek için kullanılan iki yaygın tarama metodudur. Bununla beraber bu iki tanı aracı da hastalar için zahmetli ve invaziv yöntemlerdir. Bu nedenle mide kanserini teşhis etmek için alternatif bir metod hala arzu edilmektedir. Genel olarak kanserin erken tanısının konması için; kanser üzerindeki araştırmalar son yıllarda özellikle moleküler genetik alanında yoğunlaşmıştır. Moleküler biyolojinin kanserden korunma ve erken tanı konusunda başlıca uygulama alanı, kalıtsal olarak kanser gelişmesine yatkınlık taşıyan bireylerin belirlenebilmesidir. Bu tür kalıtsal yatkınlık tümör baskılayıcı genlerde, onkogenlerde ya da kalıtımsal polipozis bağırsak kanserinde olduğu gibi onarımdan sorumlu genlerde meydana gelen mutasyonlar sonucu görülür. Bu genlerdeki mutasyonların genetik testlerle saptanmasıyla, yüksek riskli bireylerin, hastalık ortaya çıkmadan önce belirlenmesi mümkün olmaktadır. Yeni kansere yatkınlık genlerinin izolasyonu klinik uygulamaları etkileyen önemli bir konu olup tümörlerin kolayca tedavi edilebildikleri erken evrede saptanabilmesi için önemli bir araç olabilir (21). Son yıllarda kanserin moleküler araştırmasında telomerler ve telomeraz enzimi ilgi odağı haline gelmiştir. Günümüzde kullanılan modern teknikler sayesinde telomeraz enzim aktivitesi dokunun eser miktarlarında bile belirlenebilmektedir. Örneğin ince iğne aspirasyon sitolojisi veya kanser hastalarının vücut sıvılarında telomeraz enzim aktivitesinin belirlendiğini bildiren çalışmalar vardır (16, 19, 94, 95, 97, 115).

Farelerde tümör üzerine yapılan çalışmalar sonucunda tümör hücresinin %15 kadarının kan damarları yoluyla dolaşıma geçtiği raporları insanlara uyarlanırsa, mide kanserli hastaların periferik kanında hTERT mRNA'nın ekspresyonundaki artış dolaşımdaki tümör hücrelerinin varlığını gösterebilir (5, 20). Bu hipotezden yola çıkarak

ve daha önce dokularda ve gastrik yıkama numunelerinde yapılan hTERT mRNA ekspresyonu ve telomeraz aktivitesini belirleme çalışmalarının olumlu sonucunu da dikkate alarak mevcut çalışmada bu parametrenin periferik kanda belirlenmesinin mide kanserinin erken tanısı, çok erken aşamada nükslerin belirlenmesi ve mikrometastazların saptanması için bir belirteç olup olmayacağını araştırmayı amaçladık.

Telomeraz enziminin keşfinden sonra çoğu araştırmacı, yaptıkları çalışmaların sonuçlarına dayanarak telomeraz aktivitesinin insan kanserlerinin belirlenmesi için en genel moleküler belirteç olduğu görüşünde hem fikirdirler (8, 13-19, 95, 97). Çünkü telomeraz aktivitesi tüm tümörlerin %85'inde tespit edilebildiği halde çoğu sağlıklı dokuda çok az ya da hiç tespit edilememiştir (116). Bu çalışma sonuçlarına dayanarak araştırıcılar, telomeraz aktivitesi artmış hücrelerin progressif telomer kısalmasından kaçınarak sınırsız büyüme potansiyeli kazandıklarını bildirmişler ve telomerazın potansiyel bir onkogen olduğunu ileri sürmüşlerdir (5, 14, 15). Protoonkogenler promotor ilavesi, arttırıcıların ilavesi, kromozomal translokasyonlar, gen amplifikasyonu ve tek nokta mutasyon mekanizmaları ile onkogen aktivitesi kazanmakta ve bu mekanizmalardan ilk dördü onkogen ürününün yapısında bir değişiklik olmaksızın artmış transkripsiyona bağlı olarak yani ekspresyonun artışı sonucu onkogen ürün miktarında bir artışa sebep olmaktadır. Buradan da anlaşılıyor ki bir onkogene ait ürünün artmış miktarları bir hücreyi malign olmaya doğru itmede yeterli olabilmektedir. erb-B2 onkogeninin amplifikasyonuyla meme, over ve mide kanserlerinin arasındaki ilişki örnek verilebilir (117). hTERT mRNA ekspresyonunun artışı da benzer bir yolla bir hücreyi malign olmaya iterek karsinogenezise ve hücre immortalizasyonuna neden olabilir.

Telomeraz enzimi üç alt birimden oluşur. Birincisi insan telomeraz RNA komponenti olup hTR geni tarafından kodlanır. Bu bileşen telomer sentezi sırasında kalıp olarak kullanılır. İkincisi hTERT alt birimi olup hTERT geni tarafından kodlanır. Bu alt bileşen enzimin katalitik fonksiyonundan sorumlu olup ters transkriptaz aktivitesine sahiptir. Son zamanlarda bulunan ve telomeraz enziminin üçüncü alt bileşeni ise telomerazla ilgili proteinler olup kısaca TP1 olarakta adlandırılmaktadır. Bu bileşenin telomeraz enziminin regulasyonunda rolü olduğu düşünülmektedir. Bunlardan özellikle hTERT mRNA ekspresyonunun kanserlerle ilişkisinin olduğu, son zamanlarda yapılan bir çok araştırmada ortaya konulmuştur (93, 99-105).

Son yıllarda hücre immortalizasyonunun karsinogenezde çok önemli bir kanıt olduğu düşünülmüştür. Hücre immortalizasyonu, telomer uzunluğunun kararlı bir

şekilde sürdürülmesi ile sağlanabilir. Bunun için de telomeraz enzim aktivitesine gereksinim vardır. Telomer uzunluğu somatik hücrelerde hücresel yaşlanmayı gösteren mitotik bir saat gibidir. Normal insan somatik hücreleri her bir replikasyon döngüsü ile terminal DNA'nın 50-100 baz çiftini kaybederler. Bu yüzden çoğu somatik hücreler sınırlı bir replikatif kapasiteye sahiptirler. Telomer kısalması kromozom dayanıksızlığına yol açar ve hücre büyümesini inhibe eder (116, 118). Sonuçta represe olmuş kısalmış telomer uzunluğunun tümör baskılayıcı mekanizmada rol oynadığını söyleyebiliriz. Oysa kanser hücreleri telomeraz enziminin aktivasyonu sayesinde bu engeli aşarlar. Jinping ve ark. (116), 58 gastrik kanser dokusundan 49'unda (%84) telomeraz enzim aktivitesinin pozitif olduğunu ve telomeraz aktivitesi pozitif olan gastrik kanserli hastalarının sağ kalım sürelerinin telomeraz aktivitesi negatif olan hastalardan istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşük olduğunu bildirmişlerdir. Bu sonuçlar Hiyama ve ark. (119) 'ının bulduğu sonuçlarla benzerdi. Bu her iki sonuç kanser hücrelerinde telomer stabilitesinin sürdürülmesi ve telomeraz ekspresyonu sayesinde immortalizasyonun sağlandığı ve ilerlemiş kanserlerin devamlı proliferasyonu için telomeraz enziminin aktivitesine gereksinim olduğunu göstermektedir. Sonuçta bu da ancak hTERT mRNA up regulasyonuyla mümkün olabilir.

Bizim sonuçlarımız periferik kanda hTERT mRNA ekspresyonunun mide kanserinin erken evresinde yükselmeye başladığını ve ilerlemiş metastatik karsinom aşamasında ise düzeylerinin daha da arttığını göstermiştir. Bu sonuç hTERT mRNA ekspresyonunu up regulasyonun mide kanserinin çok basamaklı sürecinde erken evreden başlamak üzere bir rolü olabileceğine işaret etmektedir. Bizim çalışmamızda 16 sağlıklı kontrolün 2'sinde ve 5 kronik atrofik gastritli hastaların 1'inde erken evre ve invaziv gastrik karsinomdaki ortalama hTERT mRNA ekspresyon değerlerine yakın sonuçlar tespit edildi. Bunun nedeni dolaşımda replikasyon gösteren hematopoetik kök hücrelerindeki veya aktif T ve B lenfositlerdeki zayıf telomeraz aktivitesi olabilir. Şöyleki embriyogenez sonrasında somatik hücrelerin çoğunda telomeraz aktivitesinin kaybolduğu halde germ hücreleri, saç folliküleri, özafagus, serviks ve endometrium epiteli gibi rejenere olabilen dokular ile hematopoetik kök hücreler ve aktif lenfositlerde telomeraz aktivitesinin düşük düzeyde devam ettiğini gösteren çalışmalar vardır (6, 15, 93). Ayrıca kronik atrofik gastritli hastada beraberinde intestinal metaplazinin varlığı bir sebep olabilir. Yapılan başka bir çalışmada 40 yaş altındaki sağlıklı bireylerin periferal kan mononükleer hücrelerinin orta düzeyde telomeraz aktivitesine sahip olduğu oysa 40 yaş üstündeki bireylerde çok daha düşük seviyelerde veya hiç telomeraz aktivitesi

olmadığı bulunmuştur (120). Dolayısıyla bahsedilen son çalışma telomeraz aktivitesi ile sıkı korelasyonu bulunan hTERT mRNA ekspresyonunun 40 yaş altındaki bireylerde daha yüksek olabileceğine işaret etmektedir. Bizim çalışmamızda da hTERT mRNA seviyeleri yüksek çıkan 2 sağlıklı bireyde 40 yaş altındaydı.

Kanserle mücadelenin en etkili yolu hastalığın ortaya çıkmasını önlemektir. İkinci ve etkili bir başka alternatif de, tümör gelişimini daha malign şekle dönüşmeden önce, kolayca tedavi edilebileceği aşamada saptamaktır. Vücuda yayılıp metastaz yapmadan önce saptandığında, kanserlerin bir çoğu ameliyat ya da radyasyon gibi lokal tedavi girişimleri ile iyileştirilebilir. Örneğin barsak kanseri malignite öncesi erken aşamalarda (adenomlar) genellikle küçük sayılabilecek cerrahi girişimlerle tamamen iyileşir. Oluştuğu bölgeden başka yere yayılmamış olan erken evre karsinomlarda da iyileşme oranı (%90) oldukça yüksektir. Buna karşılık kanser çevre dokulara ve lenf düğümlerine yayıldığında sağ kalım oranı %50'lere, metastatik barsak kanserli hastalarda ise %10'lara kadar düşer. Bu yüzden erken tanı, sağ kalım açısından çok önemli bir faktördür (20, 21). Mide kanserinin tanısı ve prognostik değerlendirmesi için çok sınırlı sayıda moleküler belirteç mevcuttur. Günümüzde kanser hastalarında dolaşan tümör hücrelerini belirlemek için Real-Time PCR kullanılarak tümörle ilişkili proteinleri şifreleyen mRNA'ların belirlenmesinin oldukça sensitif bir araç olduğuna inanılmaktadır (121, 122).

Mide kanserlerine bağlı mortalite, primer tümör kitlesinden ziyade metastazının bir sonucudur. Lenf ve kan dolaşımına girdikten sonra primer tümör hücrelerinin uzak metastazı kaçınılmazdır. Üstelik tümör oluşumunun çok erken evrelerinde de bu olayın olduğunu bildiren kanıtlar vardır (20). Bu kanıtları ortaya koyan yayınlar birkaç farklı tümör modellerinde malignensi ve metastazın hakim olan görüşün bir modifikasyonu olan geçikmiş bir anjiogenik destek şeklinde avasküler kitleler şeklinde olduğunu düşündürmektedir (20, 123, 124). Bu görüşe göre tümör hücreleri damarlanmadan önce dolaşıma girerler. Normal konak savunmasının bir parçası olarak endotel hücrelerinin ve düz kas hücresi etkileşimlerinin bozulması sonucu endotel hücreleri başlangıçta apopitozise uğrar ve tümör hücresinde anjiogenez geriler. Damarlanmanın gerilemesi tümörün merkez kısmında nekrozla sonuçlanır. Daha sonra anjiyogenez tümör kenarında yeniden başlar, sağ kalan tümör hücreleri kurtulur ve ileri büyüme devam eder. Sonuçta anjiogenezis başlangıçta geriler, ancak tümör hücreleri fazla çoğalmadan erken evrelerde bile nekroze tümör dokusunun kenarlarında devam eden anjiyogenezis vasıtasıyla kana invazyonu söz konusu olabilir (20). Bu nedenle gelecekte hTERT mRNA ekspresyonu gibi kanda tümör hücrelerinin varlığını

gösteren moleküler metodlar, geleneksel görüntüleme tekniklerinden önce kanserin tanısına yardımcı olabilir. Bizim sonuçlarımızda da erken gastrik kanserde kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek hTERT mRNA ekspresyon değerleri, dolaylı olarak bunu doğrular tarzdadır.

Son çalışmalar mide kanserlerinin %85-89'unda telomeraz aktivitesinin, %90'nında da hTERT mRNA ekspresyonunun arttığını göstermiştir (118-120, 125). hTERT mRNA'nın mide kanserinin yanı sıra prekanseröz durumlarda da eksprese olduğunun gösterilmesi, hTERT mRNA ekspresyonunun mide kanserinin çok erken bir aşamasında rol alan önemli bir faktör olabileceğini düşündürmüştür (125). Maruyuma ve ark. (125), intestinal metaplazi, adenoma ve mide kanserli hastaların mukoza hücrelerinden alınan biopsi numunelerinde hem telomeraz aktivitesini hem de telomer uzunluğunu inceleyerek telomeraz aktivitesi kazanan tümör hücrelerinde malign progresyonun aşamalarını değerlendirmeyi hem de bu üç tip hasta grubu arasında telomeraz aktivitesi ile telomer uzunluğu arasındaki korelasyonu incelemişlerdir. Bu çalışmada sırayla telomeraz aktivitesi, hastaların %15, %45 ve %89 'unda mevcut olduğu bulunmuştur. Ayrıca metaplaziden adenomaya doğru gidildikçe telomer uzunluğunun kısaldığı tespit edilmiştir. Bu sonuçlar mide karsinogenezinin erken fazı esnasında telomeraz ekspresyonun artmaya başladığının delilleridir. Çoğu yayınlar mide karsinogenezinde çok basamaklı genetik değişikliklerin varlığı üzerine yoğunlaşmıştır (120, 125, 126). Sözkonusu yayınlar mide karsinogenezinin çok erken aşamasında telomeraz aktivitesi ekspresyonun bu değişikliklerden biri olduğunu bildirmişlerdir. Shay ve Barchotti (127), yaptıkları çalışmada 2031 insan primer tümörünün 1734 (%85)'ünde ve 690 tümörün bitişik hücre örneklerinin 77 (%11)'sinde telomeraz aktivitesi olduğunu buldular. Bu kanıtlar malign tümörlerin başlangıç döneminde telomerazın rol oynadığına dair ipuçlarıdır. Jinping ve ark. (116), yaptıkları çalışmada telomeraz aktivitesini 58 gastrik kanser dokusunun 49'unda pozitif, kontrol grubu normal dokuların tümünde ise negatif olarak bulduklarını bildirmişlerdir. Bizim sonuçlarımızda bu çalışmalardaki sonuçları destekler nitelikte idi. Çünkü kontrol grubu ile karşılaştırıldığında erken gastrik karsinom, invazif gastrik karsinom ve metastatik gastrik karsinomlu hastalarda istatistiksel olarak anlamlı hTERT mRNA ekspresyon artışı değerleri saptanmıştır. Ayrıca en yüksek ortalama hTERT mRNA ekspresyon değerleri metastatik gastrik karsinomlu hastalarda bulundu.

DNA anaploidisine yol açan kromozomal instabilite, kanser patogenezinde rol oynayan bir faktördür. Kromozomal stabilitenin sürdürülmesi için telomer uzunluğu gereklidir. Son araştırmalar telomer yokluğu ve telomer kısalığının hem DNA kırılmaları

hem de kromozom kazanılması ya da kaybı sonucu telomer disfonksiyonu meydana getirebildiğini göstermiştir (74-76, 116). Tersine telomeraz kromozomal instabiliteyi inhibe edebilir. Çoğu intestinal tip mide kanserlerinde kaydadeğer kısalmış telomer uzunluğu mevcuttur ve yüksek telomeraz aktiviteleri düzeyleri ve hTERT'nin anlamlı artmış ekspresyonu ile ilişkilidir. Daha da önemli olarak mide kanserleri ile karşılaştırıldığında adenomanın yanı sıra intestinal metaplazilerin %50'sinden fazlasında telomeraz aktivitesi daha düşük seviyelerdedir (74-76). Suzuki ve ark. (118), mide kanserinin etiyopatogenezinden suçlanan bir ajan olan H. pilori infeksiyonunun, intestinal metaplazide hTERT pozitif hücrelerin hiperplazisi için güçlü bir tetikleyici olduğu fikrinden yola çıkarak bir çalışma yaptılar ve telomeraz aktivitesinin bu hastalarda arttığını ve takiben telomerlerin ise kısaldığını buldular. Bu son çalışma, telomer kısalması ve telomeraz aktivasyonunun mide karsinogenezinin başlangıç aşamalarında çok önemli kritik roller oynadığını desteklemektedir.

Kısa telomerli tümöral hücrelerin yaşam süresinin telomeraz inhibitörleri ile kısalması, immortalizayon ve kanser patogenezinde telomeraz reaktivasyonunun rol aldığına işaret etmektedir (13-15). Bununla beraber bazı insan tümörleri ve immortal hücreler, telomeraz aktivitesi göstermezler. Ancak buna rağmen uzun telomerlere sahip olmaları, telomer uzunluğunun regulasyonunu sağlayan alternatif mekanizmaların bulunduğunu düşündürmektedir (93). Telomeraz aktivitesini regüle eden genlerin keşfedilmesi ve telomerazın dışında immortalizasyona yol açan diğer mekanizmaların aydınlatılmasıyla kanser tedavisinde sürpriz gelişmelerin olması beklenmektedir.

Primer mide kanserlerinde telomeraz ekspresyon analizi çalışmaları, moleküler seviyede mide kanserinin karsinogenez sürecinin daha iyi anlaşılmasına yardımcı olacaktır. Böylece telomeraz mRNA ekspresyon analizi mide kanseri için bir belirteç olarak kullanılabilir. Shin ve ark. (5), yaptıkları çalışmada 45'i ileri evre ve 20'si erken evre olmak üzere toplam 65 mide kanserli hasta ve 46 kontrol hastasında cerrahiden birkaç gün önce EDTA'lı tüplere aldıkları periferik kanda hTERT mRNA ekspresyon seviyelerini araştırdırdılar. Bu araştırıcılar periferik kanda eritrositleri uzaklaştırdıktan sonra poli A (+) RNA 'yı ekstrakte ettiler ve bunu takiben önce RT-PCR yaptılar ardından da %2'lik agaroz jel kullanarak elektroforez ile hTERT mRNA ekspresyonunu belirlediler. İleri evre mide kanserli hastaların %51'inde, erken evre mide kanserli hastaların %46'sında ve kontrol grubu hastaların ise %4'ünde hTERT mRNA ekspresyonunu pozitif olarak buldular (5). Sonuçlardan da anlaşılacağı gibi bu araştırıcılar hTERT ekspresyonunu kalitatif olarak belirlemiş oldular. Bu çalışma her ne

kadar bizim çalışma ile benzerlik gösterse de, biz çalışmamızda hTERT mRNA standartları kullanıp kantitatif ölçüm yapan TaqMan prob tekniğine dayalı Real Time PCR metodunu kullandığımızdan dolayı çalışma sonuçlarımız daha değerlidir. Çünkü biz kantitatif bir yöntem kullanmanın yanında ayrıca sonuçları normalize hale getirmek için total RNA miktarını spektrofotometrik yöntemle absorbanslarını ölçerek belirledik ve sonuçlarımızı hTERT mRNA kopya/100 ng total RNA cinsinden hesap ettik. Shin ve ark. (5) ise, sonuçları sadece pozitif veya negatif olarak vermişlerdir. Bizim sonuçlarımıza göre en yüksek ortalama hTERT mRNA ekspresyon seviyelerini metastatik mide kanserli hastalarda belirledik ve ayrıca 3 metastatik mide kanserli hastada değerler diğer gruplardaki değerlerle karşılaştırıldığı zaman çok daha yüksekti. Kronik atrofik gastritli ve erken, invaziv ve metastatik mide kanserli hastalardaki ekspresyon düzeyleri kontrol grubuna göre daha yüksekti. Kontrol grubuna göre kronik atrofik gastritli hastalardaki fark istatistiksel olarak anlamlı değilken, erken, invaziv ve metastatik mide kanserli hastalardaki fark istatistiksel olarak anlamlıydı. Shin ve ark. (5), hTERT mRNA ekspresyonu ile hastaların evre, uzak metastaz ve lenf nodu tutulumu gibi klinikopatolojik özellikleri arasında bir korelasyon bulmuşlardı. Bizim çalışma sonuçlarına göre ise hTERT mRNA ekspresyon sonuçları ile hastaların yaş, evre, invazyon derinliği, lenf nodu tutulumu, uzak metastaz ve tutulum yeri gibi klinikopatolojik özellikleri arasında arasında bir korelasyon yoktu. Bu farklılığın nedenleri arasında sözü geçen araştırmada sonucun kalitatif olarak değerlendirilmesi ve bizim erken evre mide kanserli hastalarımızın sayısının çok düşük olması olabilir.

Telomeraz aktivitesi mide, meme, mesane, kolon, prostat ve karaciğer gibi insan kanserlerinin %85'inde belirlenmiştir (5-8, 16, 17, 127). Ayrıca ölümsüz hücre hatlarında da belirlenmiştir. Ancak hasta olmayan ve tümör dokusu bulunmayan normal dokularda tespit edilememiştir (6, 10, 11, 18). Bu suretle telomerazın hücresel yaşlanmanın yanı sıra karsinogenez basamaklarının birisinde hücresel ölümsüzlüğün kazanılması ile sıkı bir ilişkisinin olduğu düşünülmektedir (6). Telomeraz aktivitesi ve ilişkili genlerin ekspresyonunun karşılaştırılması telomeraz aktivitesinin düzenlenmesinin açıklanmasına yardımcı olacaktır. Bununla beraber hTR ve hTERT ekspresyonu tümörlü hastaların tümörlü dokularının yanı sıra tümöre bitişik normal dokularda da belirlenmiştir ve bu nedenle her iki ölçümün kantitatif ölçümlerinin geliştirilmesi gereklidir. Telomeraz aktivitesinin, malign tümörlerin gelişimiyle ilişkili olduğuna dair pek çok çalışma yapılmıştır (13, 120, 125, 128). Bu çalışmalar telomerazın kanserin erken tanısında potansiyel bir belirteç olabileceği üzerine odaklanmıştır. Özellikle de invaziv olmayan metodlarla elde edilen numunelerde

kanserin başarılı bir şekilde teşhis edilmesi önemlidir. Örneğin PCR'a dayalı TRAP yöntemi ile telomeraz aktivitesi, idrar ve mesane yıkamalarında, bronkoalveolar lavaj sıvılarında, pankreatik sıvıda ve kolonik lüminal numunelerde belirlenmiştir (19, 94-98). Bununla beraber TRAP yöntemi fonksiyonel nükleoproteine ihtiyaç duyduğundan dolayı ortamda çeşitli inhibitörlerin varlığı, proteazlar, RNAazlar belirlemeyi zorlaştırabilir ve beraberinde sensitiviteyi düşürebilir (128).

hTERT mRNA ekspresyonu analizi için doğru, güvenilir, sensitivite, spesifisite ve pozitif prediktif değeri yüksek bir metod gereklidir. Son zamanlarda hTERT mRNA ekspresyonunun analizi için TaqMan teknolojisine dayalı real time PCR yöntemi kullanılmaktadır. Bu yöntemde hTERT mRNA ekspresyonunun kantifikasyonu mümkün olduğu için farklı tür kanser ve prekanseröz lezyonlarda bir cut-off değeri belirleyip ona göre değerlendirme yapılabilmektedir. Yeni geliştirilen ve son zamanlarda hizmete sunulan TaqMan Proba dayalı Real Time PCR metodunun TRAP yöntemi ile karşılaştırıldığında bir çok avantajı vardır. RT-PCR'a göre, TRAP yöntemi fonksiyonel ribonükleoproteine ihtiyaç duyduğundan, proteazlar ve RNAaz kontaminasyonu analizi zorlaştırmaktadır. Ayrıca sensitivitesi daha düşüktür. Real Time PCR daha ileri teknik metot olmasının yanında kantifikasyon imkanıda sağlamaktadır. Bu teknik sadece 144 baz fragmanlı bir hTERT mRNA'ya ihtiyaç duymaktadır. Ayrıca diğer teknik yanında proteaz ve protein inhibitörlerinden daha az etkilenir. Üstelik bu metotta kullanılan endojen kontrol, hTERT ekspresyonunu normalize etmede kullanılır. Real Time kantitatif PCR metodunun deneyler arasında tekrarlanabilirliğinin daha iyi olması, kullanılan kalibrasyon eğrilerinin slop eşitliği ve farklı konsantrasyonlarda tekrarlanabilirliğinin deneyler arasında iyi olması diğer avantajlarıdır. Hisatomi ve ark. (128), hTERT mRNA ekspresyon analizi ile benign ve malign hepatosellüler dokuları birbirinden ayırmak için Real Time PCR kantifikasyon metodunu kullanarak bir cut-off konsantrasyonu belirlemişlerdir. Real time PCR tekniği ile hTERT mRNA ekspresyon kantifikasyonu yapılmadan önceki çalışmalarda telomeraz aktivitesi ve ilişkili genlerin ekspresyonu sadece pozitif ve negatif olarak belirlenmekteydi. Ancak Real Time PCR tekniğinde internal standart kullanılması bu metodu kantitatif bir ölçüm tekniği haline getirmiştir. PCR'ın eksponansiyel fazında her bir sinyali kolayca seçen fluorogenik sistem sayesinde başlangıç RNA miktarı doğru olarak belirlenebilir ve eş zamanlı amplifikasyonlar izlenebilir. Çok az miktarlardaki mRNA' dan sonuçlar elde edilebildiği gibi hTERT mRNA ekspresyonu tek bir tüpte ve yaklaşık 3 saatte belirlenebilir. Diğer yöntemlerdeki gibi elektroforez, mRNA hazırlama ve otoradyografi gibi ölçümün süresini uzatacak işlemlere gereksinim yoktur (129). Şu ana kadar yapılan çalışmalar

hTERT mRNA ekspresyon analizinin, pankreas, akciğer, özafagus ve mesanenin sağlıklı ve malign dokuları arasında eş zamanlı ölçümünün, bu ikisi arasında ayrım yapabildiğini göstermiştir (128). Şayet tümör hücrelerinin yüzdesi, seçilen dokularda yüksekse daha kesin ayrım yapabilir. Gelecekteki çalışmalarda yüksek oranda tümör hücrelerini bulunduran neoplazmlarda ve sağlıklı doku numunelerinde her bir doku tipi için sensitivite ve spesifisite belirlemesi için doğru cut-off konsantrasyonları belirleyip seçilme gereği ortaya çıkmıştır (128).

Günümüzde bu konuyla ilgili diğer bir ilgi odağıda telomeraz mRNA ekspresyonun ya minimal invaziv ya da tamamen invaziv olmayan tekniklerle elde edilen numunelerde çalışabilme olanağıdır. Özellikle vücut sıvıları, dışkılar, gastrik ve kolonik yıkamalar, bronkoalveolar fırçalama numuneleri, idrar, plazma, serum ve tam kan gibi biyolojik örnekler bu amaçla kullanılmaktadır. Örneğin, Ito ve ark. (130), mesane kanserinde idrar örneklerinden tümör hücrelerine ait hTERT ekspresyonunun kantitatif ölçümünü yapmışlar ve bu çalışma konu ile ilgili diğer araştırmacıları cesaretlendirmiştir. Yapılan çalışmalar kanser tanısı için tümör hücrelerinden köken alan mutant DNA'nın feçes, idrar, balgam, pankreatik sıvı, safra, serebrospinal sıvı, plazma ve serumda tespit edilebildiğini göstermiştir (131-137). Bunlardan bazılarının günümüzde kanserin erken tanısında, prognozunda, malign progresyonun gidişatını takip etme aşamalarında faydalı olabileceğini gösteren çalışmalar vardır (5, 19, 94, 131, 133). Ne yazık ki tümörlerin tümünde DNA hasarları, k-ras mutasyonları gibi kolayca belirlenememektedir. Aksine bu tür tümörlerde gen üzerinde dağılmış mutasyonlar, mikrosatellit instabilite ve heterozigozite olabilmektedir. Bu tür değişikliklerin belirlenmesinin daha zor olduğu aşikardır. İşte bu yüzden DNA hatalarının belirlenmesi için alternatif bir metod olarak doku numunelerinden dökülen hücrelerde gen ekspresyonunun kantifikasyonunun bir tümör belirteci olarak kullanılabileceği düşünülmüş ve yapılan çalışmalar bunu doğrulamıştır (19,128). Genel olarak tümör dokuları ve sağlıklı dokular arasındaki farklı hTERT ekspresyon aralıkları pankreatik sıvı, bronkoalveolar fırçalama, özafagial, gastrik ve mesane yıkama numunelerinde tümör hücrelerinin belirlenmesi için arzu edilir uygulamalar olarak düşünülmüştür. De Kok ve ark. (128), yaptıkları çalışmada yüzeyel mesane karsinomu için transüretral rezeksiyonu planlanan 9 hastanın sabah idrarını toplayıp RNA'yı izole ettiler ve hTERT ekspreyonunu belirlediler. 9 idrar numunesinde hTERT ekspresyonunu belirlediklerini ve en yüksek hTERT ekspresyonunu ise agresif tümörlerde bulduklarını bildirdiler.

Mide kanserinde normal hücrelerin kanser hücrelerine dönüşümü çok aşamalı bir süreçte olmaktadır. Epidemiyolojik ve patolojik çalışmalar sonucunda mide karsinogenezindeki olaylar dizisinin; kronik atrofik gastrit, intestinal metaplazi, displazi ve karsinom şeklinde olduğu kabul edilmektedir. Bu süreçte sırasıyla protoonkogenlerin ve tümör baskılayıcı genlerinin ürünleri olan inhibitör ve stimülatör faktörler tarafından sağlanır. Son zamanlarda p53 genindeki mutasyonların pek çok kanserde olduğu gibi mide kanserinin oluşumunda da rol oynadığı düşünülmektedir (139). p53 tümör baskılayıcı geninin yanı sıra mide kanseri etiyolojisinde yeri olan diğer genler ve kromozomal anomaliler şunlardır: Onkogenlerden c-Ki-ras, c-erbB-2/neu, y-erb-B, K-sam, hst/int-2, c-met ve c-myc genlerindeki mutasyonlar ve ve tümör supresör genlerden Rb, DCC (deleted in colorectal carcinomas), APC ve erb-A genlerindeki mutasyonlar ve 1q, 1p, 5p, 7q, 7p, 12 q ve 13 q kromozom bölgelerinde allel kayıplarıdır (140-142). Ayrıca 17. kromozomun p kolundaki heterozigozite kaybı (LOH)'nın mide kanserinin histolojik tipi ve evresi ile ilişkisiz bir şekilde yaygın olduğu saptanmıştır (114, 142, 143).

Tüm bu sonuçlar hTERT'nin up regulasyonunun gastrik karsinogenezisin erken bir kanıtı olabildiğine işaret ettiğini göstermektedir. hTERT gastrik karsinogenezde kritik bir rol oynar ve gastrik kanserin erken belirlenmesi için telomeraz ekspresyonunu yansıtan potansiyel bir belirteçtir. Kanserli hastaların dokularında, kanlarında ve plazma veya serumlarındaki hTERT mRNA'nın eş zamanlı analizi, kanser tanısının erken konulmasında ve primer tümör çıkarıldıktan sonra nükslerin erken belirlenmesine yardımcı olacaktır. Ayrıca cerrahi, kemoterapi ve radyoterapi sonrası analiz edilmesi sayesinde ise terapotik etkiler izlenebilir ve hastalığın prognozunu tahmin etmede hekime bilgi sağlayabilir.

Sonuç olarak, bizim sonuçlar periferik kanda hTERT mRNA ekspresyonunun TaqMan Real Time PCR ile kantitatif analizinin, mide kanseri için spesifik olmayan muhtemel bir moleküler belirteç olarak kullanılabileceğini göstermektedir. Ancak bu bulgular daha fazla sayıdaki mide kanserli hastalarda doğrulanmalıdır. Şayet hTERT mRNA ekspresyonu analizi, mide yıkama ve mide endoskopisi sırasında alınan biopsi numunelerinde kantitatif olarak yapılabilirse mide kanserinin erken tanısı için spesifik bir moleküler belirteç olabilir ve mide kanserinin erken tanısı için kullanılabilir. Kanserlerde telomeraz mRNA ekspresyonunun artışı olan hastalarda telomeraz inhibitörleri, tedavi seçeneği olarak kullanılabilir ve bu konu üzerinde çalışmalar yoğunlaştırılabilir.

6-SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda 2 erken evre, 10 invaziv ve 13 metastatik mide kanserli ile 5 kronik atrofik gastritli hasta olmak üzere toplam 30 hasta ve kontrol grubunu oluşturan 16 sağlıklı bireylerden periferik kan alındı. Mide kanserli hastalardan periferik kanlar, ameliyattan birkaç gün önce veya kemoterapiye başlanmadan önce alındı. Kanlar EDTA'lı tüplere alındı ve bekletilmeden Total RNA'lar izole edildi. Total RNA'ları izole etmek için "Simply P total RNA extraction" kiti kullanıldı. hTERT mRNA ekspresyonu, "human telomerase revers transcriptase mRNA one step RT-PCR Quantification kit" kullanılarak analiz edildi. Amplifikasyon ve kantifikasyon işlemi 7300 Real Time PCR system (Applied Biosystems) cihazında yapıldı. Çalışma sonucunda elde edilen ortalama hTERT mRNA ekspresyon değerlerinin gruplarla karşılaştırılması yapıldı.

Bulgularımız,

1-Sağlıklı ve kronik atrofik gastritli, erken, invaziv ve metastatik mide kanserli hastalarda ortalama hTERT mRNA seviyeleri sırasıyla 7831.16 ± 5558.69 kopya/100 ng total RNA, 13048.36 ± 6631.44 kopya/100 ng total RNA, 62156.85 ± 31568.65 kopya/100 ng total RNA, 44407.70 ± 17493.43 kopya/100 ng total RNA ve 721399.95 ± 583319.10 kopya/100 ng total RNA idi.

2- Erken, invaziv ve metastatik mide kanserli hastalardaki hTERT mRNA ekspresyon seviyeleri sağlıklı bireylerden anlamlı olarak daha yüksekti (Sırasıyla $p<0.05$, $p<0.01$ and $p<0.05$ idi).

3- Kronik atrofik gastritli hastalardaki hTERT mRNA ekspresyon seviyeleri sağlıklı gruptaki bireylerden yüksek olmasına rağmen farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü ($p>0.05$).

4- Mide kanserli hastalarda, hTERT mRNA ekspresyon seviyeleri ile uzak metastaz, lenf nodu metastazı, cinsiyet, tümör tutulum yeri, diferansiasyon derecesi ve evre gibi klinikopatolojik özellikler arasında anlamlı bir ilişki olmadığı görüldü.

Sonuç olarak, bu çalışma periferik kanda hTERT mRNA ekspresyonlarının eş zamanlı ölçümlerinin, mide kanserli hastalar ile sağlıklı kişileri ayırabileceğini ve mide kanserinin erken tanısı için spesifik olmayan muhtemel bir belirteç olabileceğini göstermiştir. Bununla beraber daha fazla sayıda ve uzun dönem takipli hastalarda daha ileri çalışmalarla bu moleküler belirtecin klinik uygulaması doğrulanmalıdır. TaqMan Prob tekniğine dayalı kantitatif floresans Real Time PCR hTERT ekspresyonunun ölçümü için hızlı ve güvenilir bir metottur.

7-KAYNAKLAR

1 – Robbins, KC. Basic Pathology. Çeviri: Çevikbaş U. Temel Patoloji. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Şti., 2000:487-489.

2 - Erikoğlu M, Yol S, Tavlı Ş, Belviranlı M, Özer Ş, Pekin C, Kaynak A. Mide kanserleri: On beş yıllık deneyimlerimiz. Genel Tıp Dergisi 2005;15 (2): 71-75

3 - Fuchs CS, Mayer RJ. Gastric carsinoma. N Engl J Med. 1995; 333: 32-41

4 - Kapan M. Mide kanseri. Tanı ve cerrahi tedavi. Gastrointestinal sistem hastalıkları sempozyomu. 11 -12 Ocak 2001, İstanbul, sayfa 253-269

5- Shin J.H., Chung J, Kim H.O, Kim Y.H, Hur Y.M, Rhim J.H, Chung H.K, Park S.C, Park J.G, Yang H.K. Detection of cancer cells in perpheral blood of stomach cancer patients using RT-PCR amplification of tumour specific mRNAs. Aliment Pharmacol Ther 2002;16 (Suppl. 2): 137-144

6- Li-Hua Hu, Feng-Hua Chen, Yi-Rong Li, Lin Wang. Real-time determination of human telomerase reverse transcriptase mRNA in gasrtric cancer. World J Gastroenterol 2004; 10 (23) 3514-3517.

7- Kirkpatrick KL, Mokbel K: The significance of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) in cancer. Eur J Surg Oncol 2001, 127: 754-60.

8- Novakovic S, Hocevar M, Zgajnar J, Besic N, Stegel V: Detection of telomerse RNA in the plasma of patients with breast cancer, malignant melanoma or thyroid cancer. Oncol Rep. 2004, 11: 245-252.

9- Blackburn, E.H. Structure and function of telomeres. Nature 1991; 350: 569-573

10- De Lange T. Activation of telomerase in a human tumor. Proc Natl Acad Sci USA 1994; 91: 2882-2885

11- Collins K, Mitchell JR. Telomerase in the human organism. Oncogene 2002; 21: 564-579

12- Morin GB: The human telomere terminal transferase enzyme is aribonucleoprotein that synthesises TTAGGG repeats. Cell 1989, 59:521-9.

13- Shay JW. Telomerase in human development and cancer. J Cell Physiol 1997; 173: 266– 270.

14- Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, et al.: Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. Science 1994, 266: 2011-15.

15-Greider CW. Telomerase activity, cell proliferation , and cancer. Proc Natl Acad Sci USA 1998; 95: 90-92

16 -Chen XQ, Bonnefoi H, Pelte MF, et al. Telomerase RNA as a detection marker in

the serum of breast cancer patients. Clin Cancer Res 2000; 6: 3823-3826

17- Hiyama E, Gollahon L, Kataoka T, Koroi K, Yokoyama T, Gazdar AF, Hiyama K, Piatyszek MA, Shay JW. Telomerase activity in human breast tumors. J Natl Cancer Inst 1996; 88: 116-122

18- Yao XX, Yin L, Sun ZC. The expression of hTERT mRNA and cellular immunity in gastric cancer and precancerosis. World J Gastroenterol 2002; 8 (4): 586-590

19- Wong SC, Yu H and Jimmy B.Y. Detection of telomerase activity in gastric lavage fluid : a novel method to detect gastric cancer. Journal of Surgical Research 2006; 131: 252-255

20- Holash J , Wiegand SJ, Yancopoulos GD. New model of tumor angiogenesis : dynamic balance between vessel regression and growth mediated by angiopoietins and VEGF. Oncogene 1999; 18: 5356-5362

21- Geoffrey M. Cooper, Robert E. Hausman. The Cell: A Moleculer Approach, Third edition.Hücre: moleküler yaklaşım. Çeviri editörleri Meral Sakızlı, Neşe Atabey Üçüncü baskı.İzmir Tıp Kitapevi, İzmir,2006 Bölüm 15, 631-668.

22- Cotran, S.R., Kumar, V., Robbins, S.L.: Robbins Pathologic Basis of Disease, Chapter: 6, pp.239-306, W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1989.

23- Kazancıgil, A. : Anderson Patoloji, Cilt: I, (Anderson, W.A.D., Kissane, J.M.; Pathology Seventh Ed. Çevirisi. Güven Yayıncılık San. ve Tic. A.Ş., Ankara, 1982.

24- Yenerman, M.: Genel Patoloji, İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Yayın No: 118, İstanbul, 1980.

25- Ataergin A. Kanser tedavisinde Anjiyogenez inhibitörlerinin Yeri. Türkiye Klinikleri J Med Sci 1999, 19:100-105.

26-Nie D, Tang K, Diglio C, Kennth VH. Eicosanoid regulation of angiogenesis: role of endothelial arachidonate 12-lipoxygenase. Blood 2000; 95: 2304-2311.

27-Mangi MH, Newland AC. Angiogenesis and angiogenic mediators in haematological malignancies. Br J Haematol 2000; 111: 43-51.

28-Bruyn PP, Breen PC, Thomas TB, et al. The microcirculation of the bone marrow Anat Rec 1970; 168: 55-68.

29- Walter, J.B., Israel, M.S.: General Pathology, 4th Edition, Churchill Livingstone Longman, Edinburg and London, 1974. pp. 305-375.

30-Wyllie, A. et al. Apopitosis and carcinogenesis, Eur J Cell Biol., December, 1997, Vol 73, pp.189-197.

31- Hendon, S.E and Dipalma, J.A. “U.S. practices for colon cancer screening.”, Division of Gastroenterology, University of South Alabama College of Medicine,

Mobile, AL, USA, December, 2005,Vol. 54 (4), pp. 179-183.

32- Orhan Kuran. Systema Digestorum- Sindirim Sistemi, Ventriculus Gaster- Mide, Sistematik Anatomi .Filiz kitapevi, Prof. Dr. Orhan Kural, editör 1983, sayfa: 388-396.

33- Dere F. Anatomi Atlası ve Ders kitabı, II Cilt, Adana, Nobel Tıp Kitapevi, 1999: 881-894

34-Odar N. Anatomi Ders Kitabı. Elif matbaacılık. 12.baskı, Ankara 1979 ss: 280-285

35- Arıncı K, Elhan A. Anatomi I.Cilt , Güneş kitapevi, Ankara 2001, ss: 241-245

36-Sadler TW. Longman's Medical Embriology (7th ed.). W.W.A. Waverly Company, London 1990, pp: 239-242

37- Victor P. Eroschenko. Digestive System; Esophagus and Stomach In: Di Fiore's Atlas of Histology with Functional Correlations, Middle East Edition, 8th ed. Mass Publishing CO; 1996 Chapter Twelve :171-191

38- Junquiera L-C, Corneiro J, Keley R.O, Basic Histology (7th ed). Ed. Aytekin Y., Barış Kitapevi, İstanbul 1993, ss: 346-356

39- Cormack D.H. Clinically İntegrated Histology, Lippincott-Raven, New York 1998:192-196

40-Fawcett D.WA. Textbook of Histology (12th ed.) Chapman Hall, London 1994, pp: 599-615

41- Çetin H. Sıçan Sindirim kanalının Onkogenezisi ve Gastrin Hücreleri, Doktora Tezi, Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kayseri 1997

42- Grep R.O., Weiss L. Histology Mc Grow-Hill Book Company, London 1973, pp: 565-575

43- Arey L.B. Human Histology A Textbook in Outline Form (4th ed.) W.B. Saunders Company, London 1974, pp: 216-229

44-Öztürk F. Vagotomi Yapılan ve H2 reseptör Antagonisti Verilen Ratlarda Midede Gastrin ve Somatostatin Salgılayan Hücrelerde Oluşan Değişiklikler, Uzmanlık Tezi, Erciyes Üniversitesi Tıp Fak. Patoloji Anabilimdalı, Kayseri 1991

45-Chan AO, Wong BC, Lam SK. Gastric cancer: Past, present and future. Can J Gastroenterol 2001; 15: 469-474.

46- Wang TL, Koh TJ. Tumors of the stomach. In: Feldman M, Friedman LS, Sleisenger MH (eds). Sleisenger and Fortdran's Gastrointestinal and liver disease. 7th. Edition, Elsevier Sciense, 2002, pp. 829-848.

47- Süha Göksel. Mide kanseri. In: Topuz E, Aykan F, Demir C (ed), Sindirim sistemi kanserleri.. İstanbul, İ.Ü. Onkoloji Enstitüsü Yayınları, 1998, pp. 216-229

48-John C. Layke, Peter P. Lopez. Gastric cancer: Diagnosis and treatment. Am Fam Physician 2004; 69: 1133-1140

49-Alican F. Mide tümörleri: Cerrahi dersleri. Cilt II. İstanbul, Afa matbacılık, 1995, s: 201-202

50-Akbayır N. Etiyoloji ve patogenez, Mihmanlı M. (Ed) Mide kanseri ve cerrahi tedavisi, İstanbul, Avrupa tıp kştapçılık. 2004, s: 61-63

51-Roger Der and Parakrama Chandrasoma. Gastric Neoplasms İn: Parakrama Chandrasoma, editor. Gastrointestinal Pathology 1st ed. Applition and Lange;1999, Chapter 5: 105-144

52-Charnley G, Tannenbaum SR. Flow cytometric analysis of the effect of sodium chloride on gastric cancer risk in the rat. Cancer Res 1985; 45: 5608-16.

53-Ji B, Chow W, Yang G, et al. Dietary habits and stomach cancer in Shanghai, China. Int J Cancer 1998; 76: 659-64.

54- Palli D. Epidemiology of gastric cancer: an evaluation of available evidence. J Gastroenterol 2000; 35 (Suppl. 12): 84-90.

55-Mowat C, Carswell A, Wirz A, et al. Omeprazole and dietary nitrate independently affect levels of vitamin C and nitrite in gastric juice. Gastroenterology 1999; 116: 813-22.

56-Fong LY, Lee JS, Chan WC, et al. Zinc deficiency and the development of esophageal and forestomach tumors in Sprague-Dawley rats fed precursors of N-nitroso-N-benzylmethylamine. J Natl Cancer Inst 1984; 72: 419-25.

57-Asghar RJ, Parsonnet J. Helicobacter pylori and risk for gastric adenocarcinoma. Semin Gastrointest Dis 2001; 12: 203-208

58-Talley NJ, Zinsmeister AR, Weaver A, Di Mongo EP. Gastric adnocarcinoma and Helicobacter pylori infection. J. Natl. Cancer. Inst. 1991; 83: 1734-1739.

59-The Eurogast Study Group. An International association between Helicobacter pylori infection and gastric cancer. Lancet 1993; 341: 1359-1362.

60-Correa P. A human model of gastric carcinogenesis. Cancer Res. 1988, 48: 3554-3560.

61-Smoot DT. How does Helicobacter pylori cause mucosel damage? Direkt mechanisms. Gastroenterology 1997; 113 (suppl): S31- S34.

62-Honig A, Witte F, Mirecka J et al. Helicobacter pylori induced hyperproliferation: relevance for gastric cancer development in connection with mutagenic factors. Anticancer Res 2000; 5-6; 20 (3A): 1641-1648

63-Kelley JR, Duggan JM. Gastric cancer epidemiology and risk factors. Journal of

Clinical Epidemiology 2003, 56: 1-9

64-Erdem L. Öncül lezyonlar,Mihmanlı M.(ed) Mide kanseri ve cerrahi tedavisi. İstanbul, Avrupa Tıp Kitapçılık. 2004, s: 45-47.

65-Lauwers GY. Defining the Pathologic Diagnosis of Metaplasia, Atrophy, Dysplasia and Gastric adenocarsinoma. J Clin Gastroenterol 2003; 36 (Suppl. 1): s: 37-43

66-Dinçtürk C. Mide kanserinin prekürsörleri: Cerrahi Onkoloji Mide kanseri. Ankara, Türk Tarih Kurumu Basımevi, 1989; 63-69.

67-David N. Lewin and Klaus J. Lewin. Malignant: Adenocarsinoma, Stomach In: Weidner N, Cote RJ, Suster S, Weiss LM, editor. Modern Surgical Pathology 1st ed. Saunders; 2003. p: 672-680.

68-Sclemper RJ, Itebashi M. et al. Differences in diagnostic criteria for gastric carsinoma between Japanese and Western pathologist. The LANCET 1997, Vol 349; 1725-1729.

69-Borrmann R. Geschweslte des magens und duedonums: Handbuch der Spezieller Pathologischen Anotomie und Histologie. Henke F, Lubarsch(eds). Springer, Berlin 1926. S: 4-865

70-Lauren P. The two histological main types of gastric carcinoma. Acta Pathol Microbiol Scand 1965, 64: 31-49

71-Rosai J. Carsinoma, Stomach. In: Rosai J, editor. Rosai and Ackerman's Surgical Pathology 9th ed. Mosby; 2004. 662-672

72-Ming SC. Gastric carcinoma. A pathobiological classification. Cancer 1977; 39: 2475-2485

73-Fenoglio-Preiser C, Carneiro F, Correa P, Gulford P, Lambert R, Megraud F. Gastric Carcinoma. Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System, World Health Organization Classification of Tumours, Edited by Stanley R. Hamilton, Lauri A. Aaltonen 2000 No:3, page: 37-66

74-Tahara, E. Growth factors and oncogenes in gastrointestinal cancers:Genetic and epigenetic alterations and abnormal growth factor, cytokine network in gastric cancer. Mol. Cell Bio. And M. Medicine, 2nd ed. Vol 6 . Edited by Robert A. Meyers, 2005. Wiley-VCH Verlag GmbH&Co-KGaA, Weinheim

75- Tahara, E.,Yokozaki, H., Yasui, W. Stomach-Genetic and Epigenetic Alterations of preneoplastic and neoplastic Lesions, in:Srivastava , S. Henson, D.E. Gazdar, A.(Eds.) . Molecular Pathology of early cancer, IOS Pres, Amsterdam, Netherlands, 1999, pp: 341-361

76- Yokozaki, H., Yasui, W. Tahara, E. Genetic and Epigenetic Changes in Stomach

cancer, in: Jeon, K.W. (Ed.). İnternational Review of Cytology Vol.20: A survey of Cell Biology, Academic pres, New York, 2001, pp. 49-95.

77- Ito, Y. Oncogenic potential of the RUNX gene family: 'overview' , Oncogene 23; 2004, pp. 4198-4208

78- Tahara, H., Tahara, E. Jr., Tahara, E., Ide, T. Telomeres and Telomerase in Gastrointestinal Cancer, in: Tahara, E. (Ed.). Molecular Pathology of Gastroenterological Cancer, Springer –Verlag, Tokyo, Japon, 1997, pp. 245-259.

79-Kranenbarg EK, Hermans J, Krieken JHJM van, Velde CJH van de. Evaluation of the 5th edition of the TNM classification for gastric cancer: Improved prognostic value. British Journal of Cancer 2001, 84 (1), 64-71

80-Katai H, Yoshimura K, Maruyama K, Sasako M, Sano T. Evaluation of the new international Union Against Cancer TNM Stating for gastric carcinoma. Cancer 2000, 88: 1796-1800

81- Taner Onat, Kaya Emerk, Eser Y. Özmen. (Ed.) İnsan Biyokimyası: Nükleik asitler. Palme yayıncılık, Ankara 2002, s.355-435

82- Geoffrey M. Cooper, Robert E. Hausman. The Cell: A Moleculer Approach, Third edition.Hücre: moleküler yaklaşım. Çeviri editörleri Meral Sakızlı, Neşe Atabey Üçüncü baskı.İzmir Tıp Kitapevi, İzmir, 2006, s.191-193

83- Lundblad V, Wright WE. Telomeres and telomerase: a simple picture becomes complex. Cell 1996; 87 (1): 369-75.

84-Wellinger RJ, Sen D. The DNA structures at the ends of eukaryotic chromosomes. Eur J Cancer 1997; 33 (5): 735-49.

85-Holt SE, Wright WE, Shay JW. Multiple pathways for the regulation of telomerase activity. Eur J Cancer 1997; 33 (5): 761-6.

86-Sun D, Lopez-Guajardo CC, Quada J, et al. Regulation of catalytic activity and processivity of human telomerase. Biochemistry 1999; 38: 4037-44.

87- Mayerson M. Role of telomerase in normal and cancer cells. Journal of Clinical Oncology 2000; 18 (13): 2626-34.

88-Colgin LM, Reddel R. Telomere maintenance mechanisms and cellular immortalization. Current Opinion in Genetics & Development 1999; 9: 97-103

89-Slijepcevic P. Telomere length regulation-A view from the individual chromosome perspective. Experimental Cell Research 1998; 244: 268-74.

90-Cong Y, Wright WE, Shay JW. Human telomerase and its regulation.Microbiol Mol Biol Rev 2002; 66: 407-25.

91- Lindsey J, McGill NI, Lindsey LA, et al. In vivo loss of telomericrepeats with age

in humans. Mutat Res 1991; 256: 45-8.

92-Muniyappa K, Kironmai KM. Telomere structure, replication and length maintenance. Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology 1998; 33: 297-336.

93-Z. Günnur Dikmen, Erkan Dikmen, Pakize Doğan. Kanserde telomeraza yönelik tedavi stratejileri. Hacettepe Tıp Dergisi 2006; 37: 49-55

94-Kavaler E, Landman J, Chang Y, et al. Detecting human bladder carcinoma cells in voided urine samples by assaying for the presence of telomerase activity. Cancer 1998; 82: 708-14.

95-Brian C.-S Liu, Kevin R. Loughlin. Telomerase in human bladder cancer. Urologic Clinics of North America 2000; 27(1): 115-23

96-Muniyappa K, Kironmai KM. Telomere structure, replication and length maintenance. Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology 1998; 33 (4): 297- 336.

97-Yoshida K, Sugino T, Tahara H, et al. Telomerase activity in bladder carcinoma and its implication for noninvasive diagnosis by detection of exfoliated cancer cells in urine. Cancer 1997; 79: 362-9.

98-Chadeneau C, Hay K, Hirte HW, et al. Telomerase activity associated with acquisition of malignancy in human colorectal cancer. Cancer Res 1995; 55: 2533-6.

99-Simon R. W. L. Chan and Elizabeth H. Blackburn. Telomeres and telomerase. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B (2004) 359, 109–121

100- Zakian VA. Telomeres: Beginning to understand the end. Science 1995; 270: 1601-6.

101- Lingner J, Hughes TR, Shevchenko A, et al. Reverse transcriptase motifs in the catalytic subunit of telomerase. Science 1997; 276: 561-7.

102- Nakayama T, Kyo S, Takakura M, et al. hTERT is a critical determinant of telomerase activity in renal-cell carcinoma. Int J Cancer 1998; 78: 539-43.

103- Zakian VA. Life and cancer without telomerase. Cell 1997; 91 (October 3): 1-3.

104-Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, et al. Extension of lifespan by introduction of telomerase into normal human cells. Science 1998; 279: 349-52

105- Kim NW. Clinical implication of telomerase in cancer. Eur J Cancer 1997; 33 (5): 781-6.

106- Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, et al. Spesific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. Science 1994; 266: 2011-5.

107- Lichtsteiner SP, Lebkowski JS, Vasserot AP. Telomerase: A Target for

Anticancer Therapy. Ann NY Acad Sci 1999; 886: 1-11.

108- Oshimura M, Barret JC. Multiple pathways to cellular senescence: role of telomerase repressors. Eur J Cancer 1997; 33 (5): 710-5.

109- W. Nicol Keith, Alan Bilsland, Maryon Hardie, TR Jeffry Evans. Drug Insight: cancer cell immortality—telomerase as a target for novel cancer gene therapies. Nature Clinical Practice Oncology (2004) 2, 88-96

110-Güler Temizkan, Nazlı Arda. (Ed.) Moleküler Biyolojide kullanılan yöntemler. Genişletilmiş 2. baskı. Nobel Tıp Kitapevi, 2004, s.90-120

111-Erlich H. A(1990). 'PCR Technology. Molecular Biology and Biotechnology' (Edited by Robert A. Meyers), VCH Publishers, USA,641-648

112-Newton C. R. And Graham A. (1994) . ''PCR'',Bios Scientific Publishers Limited, Oxford, UK

113-White B.A.(1993). PCR protocols: Current methods and Aplications for DNA amplification, IRL Press at Oxford University Pres, UK

114-Kanserle savaş politikası ve kanser verileri 1995-1999. Ankara: T.C. Sağlık Bakanlığı Kanserle Savaş Dairesi Başkanlığı, 2002: Bakanlık Yayını No: 618

115-Hiyama E, Hiyama K. Clinical utility of telomerase in cancer. Oncogene 2002; 21:643.

116-Jinping MA, Wenhua Z, Shirong C, Junsheng P and Jianping W. Telomerase activity in gastric cancer. Chinese Journal of Digestive Diseases 2000; 1; 13-16

117-Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW. Harper's Biochemistry. Twenty three edition. California, Lange Medical Publications 1993; 710-729.

118- Suzuki K, Kashimura H, Ohkawa J, Itabashi M, Watanabe T, Sawahata T, Nakahara A, Muto H, Tanaka N. Expression of human telomerase catalytic subunit gene in cancerous and precancerous gastric conditions. J Gastroenterol Hepatol. 2000 Jul; 15 (7): 744-51.

119-Hiyama E, Yokoyama T, Tatsumoto N, et al. Telomerase activity in gastric cancer. Cancer Res 1995; 55; 3258-3263

120-Shibuya K, Fujisawa T, Hoshino H, Baba M, Saitoh Y, Iizasa T, Sekine Y, Suzuki M, Hiroshima K, Ohwada H. Increased telomerase activity and elevated hTERT mRNA expression during multistage carcinogenesis of squamous cell carcinoma of the lung. Cancer. 2001 Aug 15; 92 (4): 849-55

121-Ghossein RA, Carusone L, Bhattacharya S. Review polymerase chain reaction detection of micrometastases and circulating tumor cells: application to melanoma, prostate, and thyroid carcinomas. Diagnostic Mol Pathol 1999; 8:165- 75.

122-Burchill SA, Selby PJ. Molecular detection of low-level disease in patients with cancer. J Pathol 2000; 190: 6–14.

123-Holash J, Maisonpierre PC, Compton C, Boland P, Alexander CR, Zagzag D, Yancopoulos GD and Wiegand SJ. Vessel cooption, regression, and growth in tumours mediated by angiopoetins and VEGF. Science 1999; 284; 1994-1998.

124-Nagano N, Sasaki H, Aoyagi M and Hirakawa K. İnvasion of experimental rat brain tumour: early morphological changes following microinjection of C6 glioma cells. Acta Neoropathol 1998, 86; 117-125.

125-Maruyama Y, Hanai H, Fujita M and Kaneko E. Telomere length and telomerase activity in carcinogenesis of the stomach. Jpn J Clin Oncol. 1997 Aug; 27 (4): 216-220.

126- Wang W, Luo HS, Yu BP. Expression of NF-kappaB and human telomerase reverse transcriptase in gastric cancer and precancerous lesions. World J Gastroenterol. 2004 Jan 15;10 (2): 177-81.

127-Shay JW, Bacchetti S.A survey of telomerase activity in human cancer. Eur J Cancer. 1997 Apr; 33 (5): 787-91.

128-de Kok JB, Ruers TJ, van Muijen GN, van Bokhoven A, Willems HL, Swinkels DW. Real-time quantification of human telomerase reverse transcriptase mRNA in tumors and healthy tissues. Clin Chem. 2000 Mar; 46 (3): 2441-5.

129-Yajima T, Yagihashi A, Kameshima H, Kobayashi D, Furuya D, Hirata K, Watanabe N. Quantitative reverse transcription-PCR assay of the RNA component of human telomerase using the TaqMan fluorogenic detection system. Clin Chem. 1998 Dec; 44 (12): 2441-5.

130-Ito H, Kyo S, Kanaya T, Takakura M, Inoue M, Namiki M. Expression of human telomerase subunits and correlation with telomerase activity in urothelial cancer. Clin Cancer Res 1998;4 :1603-1608.

131-Sidransky D, Tokino T, Hamilton SR, Kinzler KW, Levin B, Frost P, Vogelstein B. Identification of rasoncogene mutations in the stool of patients with curable colorectal tumors. Science 1992;256:102–5.

132-Steiner G, Schoenberg MP, Linn JF, Mao L, Sidransky D. Detection of bladder cancer recurrence by microsatellite analysis of urine.Nat Med 1997;3:621–4.

133-Takeda S, Ichii S, Nakamura Y. Detection of K- ras mutation in sputum by mutant-allele-specific amplification (MASA). Hum Mutat 1993;2:112–7.

134-Kondo H, Sugano K, Fukayama N, Kyogoku A, Nose H, Shimada K, et al. Detection of point mutations in the K- rasoncogene at codon 12 in pure pancreatic

juice for diagnosis of pancreatic carcinoma. Cancer 1994;73:1589–94.

135-Lee JG, Leung JW, Cotton PB, Layfield LJ, Mannon PJ. Diagnostic utility of K-rasmutational analysis on bile obtained by endoscopic retrograde cholangiopancreatography. Gastrointest Endosc 1995; 42:317–20.

136-Swinkels DW, de Kok JB, Hanselaar A, Lamers K, Boerman RH. Early detection of leptomeningeal metastasis by PCR examination of tumor-derived K- ras DNA in cerebrospinal fluid [Letter]. Clin Chem 2000;46:132–3.

137-Yamada T, Nakamori S, Ohzato H, Oshima S, Aoki T, Higaki N, et al. Detection of K- ras gene mutations in plasma DNA of patients with pancreatic adenocarcinoma: correlation with clinicopathological features. Clin Cancer Res 1998;4:1527–32.

138-de Kok JB, van Solinge WW, Ruers TJM, Roelofs RH, van Muijen GN, Willems JL, Swinkels DW. Detection of tumour DNA in serum of colorectal cancer patients. Scand J Clin Lab Investig 1997;57: 601–4.

139-Ali Karaman. Mide kanserinde p53 tümör supresör geninin rolü. T Klin Tıp Bilimleri 2003, 23: 67-73.

140. Setsuo Hirohashi and Takashi Sugimura. Genetic Alterations in Human Gastric Cancer. National Cancer Center Research Institute 1991; 49-52.

141- Jeong – Hee Cho, Masayuki Noguchi, Atsushi Ochiai, Loss of Heterozygosity of Multiple Tumor Suppressor Genes in Human Gastric Cancers by Polymerase Chain Reaction. Laboratory Investigation 1996; 74: 835-41.

142- Toshiaki Sano, Tetsuhiro Tsujino, Kazuhiro Yoshida, Hirofumi Nakayama, Ken Haruma. Frequent Loss of Heterozygosity on Chromosomes 1q, 5q, and 17p in Human Gastric Carcinomas. Canser Research 1991; 51: 2926-31.

143-Becker KF, Keller G, Hoefler. The use of molecular biology in diagnosis and prognosis of gastric cancer. Surgical Oncology. 2000; 9: 5-11.