T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

MİDE KANSERİNİN ERKEN TANI VE TAKİBİNDE YENİ BİR HEDEF OLARAK GANKYRİN VE CDO GENLERİ PROMOTER METİLASYON DEĞİŞİKLİKLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Selin YÜKSEL

DANIŞMAN
Prof. Dr. Yıldız DİNÇER

Biyokimya Anabilim Dalı

Biyokimya Programı

Temmuz, 2022

TEZ KABUL VE ONAYI

Selin YÜKSEL tarafından, **Prof. Dr. Yıldız DİNÇER** danışmanlığında hazırlanan **" Mide Kanserinin Erken Tanı ve Takibinde Yeni Bir Hedef Olarak Gankyrin ve CDO Genleri Promoter Metilasyon Değişikliklerinin Değerlendirilmesi"** başlıklı bu çalışma, jürimiz tarafından **11/08/2022** tarihinde yapılan sınav sonucunda **oy birliği** ile başarılı bulunarak **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

		İmza	**Sonuç**
DANIŞMAN	Prof. Dr. Yıldız DİNÇER İstanbul Üniversitesi- Cerrahpaşa Üniversitesi Biyokimya Anabilim Dalı		☒ Kabul ☐ Ret
ÜYE	Prof. Dr. Hüseyin SÖNMEZ İstanbul Üniversitesi- Cerrahpaşa Üniversitesi Biyokimya Anabilim Dalı		☒ Kabul ☐ Ret
ÜYE	Prof. Dr. İlhan ONARAN İstanbul Üniversitesi- Cerrahpaşa Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı		☒ Kabul ☐ Ret
ÜYE	Prof. Dr. Hafize UZUN Atlas Üniversitesi Biyokimya Anabilim Dalı		☒ Kabul ☐ Ret
ÜYE	Prof. Dr. Elif ÖZKÖK İstanbul Üniversitesi Sinir Bilim Anabilim Dalı		☒ Kabul ☐ Ret

Yolda olana, yola çıkana ve bekleyene..……

BÜTÇE DESTEKLERİ

Mide Kanserinin Erken Tanı ve Takibinde Yeni Bir Hedef Olarak Gankyrin ve CDO Genleri Promoter Metilasyon Değişikliklerinin Değerlendirilmesi

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi - Cerrahpaşa Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje numarası: 35156

TEŞEKKÜR

Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'nda doktora eğitimim süresince katkılarından dolayı Anabilm Dalı Başkanlarımız sayın Prof. Dr. Hafize UZUN ve Prof. Dr. Hüseyin SÖNMEZ başta olmak üzere tüm hocalarıma, tez konusunun belirlenmesi ve tamamlanmasında büyük desteğini ve yardımını gördüğüm değerli hocam Prof. Dr. Yıldız DİNÇER'e, çalışmam süresince her türlü desteğini ve yardımlarını esirgemeyen diğer hocalarım Prof. Dr. Matem TUNÇDEMİR ve Prof. Dr. İlhan ONARAN'a ve Tıbbi Biyoloji Doktora öğrencisi sevgili Metehan KARATAŞ'a,

Her an bilimsel ve akademik desteğini esirgemeyen dostum Dr. Öğr. Üyesi Zülal KAPTAN'a

Ve beni bugünlere getiren sevgili AİLEME

Teşekkür ederim

Temmuz 2022 Selin YÜKSEL

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

TEZ KABUL VE ONAYI ..... **ii**
BEYAN ..... **iii**
BÜTÇE DESTEKLERİ ..... **v**
TEŞEKKÜR ..... **vi**
İÇİNDEKİLER ..... **vii**
ŞEKİL LİSTESİ ..... **ix**
TABLO LİSTESİ ..... **x**
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ ..... **xi**
ÖZET ..... **xii**
ABSTRACT ..... **xiv**
1. GİRİŞ **1**
2. KAVRAMSAL ÇERÇEVE **3**
2.1. Mide 3
2.2. Mide Histolojisi 5
2.2.1. TunikaMukoza 5
2.2.2. Tunika Submukoza 6
2.2.3. Tunika Muskularis 6
2.2.4. Tunika Seroza 7
2.3. Mide Kanseri 7
2.3.1. Epidemiyoloji 7
2.3.2. Etiyoloji 8
2.3.3. Patoloji 10
2.3.4. Sınıflama 11
2.3.5. Mide Kanseri Tedavi Protokolü 16
2.4. Epigenetik Düzenlemeler 18
2.4.1. DNA Metilasyonu (DNA düzeyindeki modifikasyonlar) 20
2.4.2. Histonların post-translasyonel modifikasyonu (Kromatin düzeyindeki Modifikasyonlar) 21

2.4.3. miRNA aracılı düzenlemeler 23
2.5. DNA Metilasyon Düzeyleri ve Kanser İlişkisi 23
2.5.1. Global DNA Hipometilasyonu 24
2.5.2. Gen spesifik anormal metilasyon 25
2.5.3. Gankyrin (PSMD10) Promoter Metilasyon Düzeyleri ve Mide Kanseri 27
2.5.4. CDO1 Promoter Metilasyon Düzeyleri ve Mide Kanseri 27
2.5.5. Epigenetik Kanser Terapisi 30
2.5.6. DNA Metilasyonu Analiz Yöntemleri 31
3. YÖNTEM 33
3.1. Gereçler 33
3.2. Kimyasallar 33
3.3. Kontrol ve Hasta Gruplarının Özellikleri 33
3.4. Yöntemler 34
3.4.1. Çalışmada kullanılacak laboratuar ve klinik değerlendirme yöntemleri : 34
3.4.2. Tümör dokusu ve iyi huylu mide lezyonlarından DNA Eldesi 34
3.4.3. Gankyrin ve CDO1 genlerinin promoter metilasyon profilinin belirlenmesi 37
3.4.4. İmmunositokimyasal Gankyrin ve CDO1 Analizi 41
3.4.5. Çalışmada kullanılması öngörülen istatistiksel yöntemler 41
4. BULGULAR 44
5. TARTIŞMA 51
6. SONUÇ VE ÖNERİLER 55
KAYNAKLAR 56
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI 66
ETİK KURUL İZİN YAZISI 67
KURUM İZNİ YAZILARI 69
ÖZGEÇMİŞ 70

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2-1: Midenin Bölümleri. 4

Şekil 2-2: Midenin Histolojik Tabakaları. 5

Şekil 2-3: Mide Hücreleri. 7

Şekil 2-4: Epigenetik Mekanizmalar. 19

Şekil 2-5: DNA Metilasyonu ve Gen İfadesi ile İlişkisi. 20

Şekil 2-6: Asetilasyon Reaksiyonları ile Gen İfadesinin Regülasyonu. 22

Şekil 2-7: Karsinogenezde Anormal DNA Metilasyonu. 26

Şekil 2-8: Hücrede Sistein Metabolik Yolakları ve Karsinogenez ile İlişkisi. 29

Şekil 2-9: DNA Metilasyonu Analiz Yöntemleri. 31

Şekil 2-10: Bisülfit Modifikasyonu. 32

Şekil 2-11: DNA Metilasyon Statülerinin Belirlenmesi. 32

Şekil 4-1: Gankyrin proteini immünohistokimyasal boyama mikroskop görüntüleri 48

Şekil 4-2: CDO1 proteini immünohistokimyasal boyama mikroskop görüntüleri 48

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2-1: AJCC 2017 Sınıflamasında pTNM Değerlerine Göre Evreleme.....12

Tablo 2-2: Gastrik adenokarsinom sınıflandırma sistemlerinin karşılaştırılması.....16

Tablo 2-3: DNA metiltransferazlar ve hücredeki aktiviteleri.....21

Tablo 4-1: Mide tümörü grubuna ait demografik ve patolojik veriler.....44

Tablo 4-2: Kronik gastrit ve mide tümörü gruplarında CDO1 ve Gankyrin metilasyon statülerinin ve immünpozitifliğin değerlendirilmesi. 45

Tablo 4-3: Kronik gastrit ve mide tümörü gruplarında cinsiyete bağlı olarak Gankyrin ve CDO1 metilasyon ve immünpozitiflik düzeylerinin değerlendirilmesi.....46

Tablo 4-4: Kronik gastrit ve mide tümörü gruplarında düşük, orta ve yüksek düzeylerde Gankyrin ve CDO1 ekspresyonuna bağlı olarak Gankyrin ve CDO1 promoter metilasyon statülerinin değerlendirilmesi.....47

Tablo 4-5: Mide tümörü gruplarında klinik evreye göre Gankyrin ve CDO1 metilasyon statülerinin değerlendirilmesi 49

Tablo 4-6: Mide tümörü gruplarında patolojik T ve N faktöre göre Gankyrin ve CDO1 metilasyon statülerinin ve immünpozitifliğinin değerlendirilmesi.....50

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Kısaltmalar	Açıklama
EMK	: Erken mide kanseri
AJCC	: American Joint Committee on Cancer
UICC	: Union for International Cancer Control
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
CG	: Sitosin-Guanin
DNMT'	: DNA metiltransferaz
HAT	: Histon asetilaz Histon deasetilaz enzimleri
HDAC	: Histon deasetilaz
PK	: Protein kinaz
PP '	: Protein fosfataz
NO '	: Nitrik oksit
SUMO	: Small ubuquitin like modifier
miRNA	: Mikro RNA
mRNA	: Mesajcı RNA
PSMD10	: Gankyrin
CDO1	: Sistein dioksijenaz1

ÖZET

DOKTORA TEZİ

Mide Kanserinin Erken Tanı ve Takibinde Yeni Bir Hedef Olarak Gankyrin ve CDO Genleri Promoter Metilasyon Değişikliklerinin Değerlendirilmesi

Selin YÜKSEL

İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Biyokimya Anabilim Dalı

Biyokimya Programı

Danışman : Prof. Dr. Yıldız DİNÇER

Anormal DNA metilasyonu tümör baskılayıcı genler ve onkogenlerin ekspresyonlarını değiştirmek yoluyla karsinogenezde önemli rol oynayan bir faktördür. DNA metilasyonun geri dönüşümlü olması, promoter hipermetilasyonu nedeniyle susturulmuş olan tümör baskılayıcı genlerin tekrar aktive edilmesine olanak sağlar. Bu nedenle DNA metilasyonunu modifiye eden ajanlar epigenetik tedavi yaklaşımında ön planda yer almaktadır. Kronik gastrit nedeniyle oluşan prekanseröz lezyonların gastrik kanser için risk faktörü olduğu bilinse de bu lezyonlar DNA metilasyon statüsü açısından mide tümörleri ile karşılaştırmalı olarak incelenmemiştir. CDO1 ve gankyrin hücre içi karsinojenik yolakları etkileyen ve ekspresyonları temel olarak DNA metilasyonu ile düzenlenen genlerdir. Bu tez çalışmasında kronik gastrit dokuları ve primer mide tümörlerinde gankyrin ve CDO1 genlerinin ekspresyonlarının promoter bölgelerinin metilasyon statüleri ile birlikte incelenmesi, gen ekspresyonları ve promotör metilasyon statülerinin klinik evre, tümör boyutu, lenf nodu tutulumu gibi klinikopatolojik verilerle ilişkisi belirlenerek, mide kanserinde gankyrin ve/veya CDO1'in erken tanı, prognoz ve terapötik hedef olarak potansiyelinin değerlendirilmesi amaçlandı. gankyrin ve CDO1 ekspresyonları immünohistokimyasal olarak, promoter bölge metilasyon statüleri bisülfit dönüşümü sonrasında DNA dizileme yöntemi ile belirlendi. Elde edilen verilerin istatistiksel analizi IBM SPSS Statistics 22 programı ile yapıldı. Gruplar arasında gankyrin ekspresyonu ve promoter metilasyon statüleri açısından anlamlı fark saptanmazken, CDO1 promoter metilasyon düzeyleri mide tümörü grubunda

kronik gastrit grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu. Klinik evre, tümör büyüklüğü ve lenf nodu tutulumu arttıkça CDO1 promoter metilasyon düzeylerinin anlamlı olarak arttığı belirlendi. Çalışma gruplarında CDO1 ekspresyon düzeyleri ve metilasyon statüleri arasında anlamlı bir ilişki saptanmadı. Mide kanserli hastalarda gankyrin ekspresyonu ve promoter metilasyon statüsü arasında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde bir ilişki bulunmadığı gibi, bu parametreler ve klinikopatolojik veriler arasında da herhangi bir ilişki belirlenmedi. CDO1 promoter metilasyon statüsünün mide kanseri için prediktif ve prognostik potansiyele sahip olduğu ve mide karsinomunda epigenetik tedavi hedefi olabileceği sonucuna varıldı.]

Temmuz 2022 , | 71 . | sayfa.

[Anahtar Kelimeler: Mide kanseri, DNA Metilasyonu, Epigenetik, PCR, İmmünohistokimya |

ABSTRACT

Ph.D. THESIS

EVALUATION OF GANKYRIN AND CDO GENES PROMOTER METHYLATION CHANGES AS A NEW TARGET FOR EARLY DIAGNOSIS AND FOLLOW-UP OF GASTRIC CANCER

Selin YÜKSEL

İstanbul University-Cerrahpaşa

Institute of Graduate Studies

Department of Biochemistry

Biochemistry Program

Supervisor : Prof. Dr. Yıldız DİNÇER

Abnormal DNA methylation is a factor that plays an important role in carcinogenesis by altering the expression of tumor suppressor genes and oncogenes. Reversibility of DNA methylation allows for the re-activation of tumor suppressor genes that are silenced by promoter hypermethylation. Therefore, agents that modify DNA methylation are at the foreground of epigenetic therapy. Although it is known that precancerous lesions caused by chronic gastritis are risk factors for gastric cancer, these lesions have not been compared with gastric tumors in terms of DNA methylation status so far. CDO1 and gankyrin are genes that affect intracellular carcinogenic pathways and their expressions are mainly regulated by DNA methylation. In this thesis study, the expressions of gankyrin and CDO1 genes in chronic gastritis tissues and primary gastric tumors were examined together with the methylation status of their promoter regions, it was aimed to evaluate the potential of gankyrin and CDO1 genes as a marker of early diagnosis, prognosis, and therapeutic target by investigating the relationship between gene expressions and promoter methylation status and

clinicopathological data such as clinical stage, tumor size, lymph node involvement. gankyrin and CDO1 expressions were determined immunohistochemically, promoter region methylation statuses were determined by DNA sequencing after bisulfite conversion. Statistical analysis of the obtained data was done with IBM SPSS Statistics 22 program. While there was no significant difference between the groups in terms of gankyrin expression and promoter methylation status, CDO1 promoter methylation levels were found to be significantly higher in the gastric tumor group than in the chronic gastritis group. It was determined that CDO1 promoter methylation levels are significantly increased depending on the increase in clinical stage, tumor size and lymph node involvement. There was no significant relationship between CDO1 expression levels and methylation status in the study groups. There was no statistically significant relationship between gankyrin expression and promoter methylation status in patients with gastric cancer, and no relationship was found between these parameters and clinicopathological data. It was concluded that CDO1 promoter methylation status has a predictive and prognostic potential for gastric cancer and may be a target for epigenetic treatment of gastric tumors.

January 2021, 71 pages.

Keywords: Gastric cancer, DNA Methylation, Epigenetics, PCR, Immunohistochemistry

1. GİRİŞ

Mide kanseri tüm malign tümörler arasında yüksek morbidite ve mortaliteye sahip olan bir kanser türüdür. Vakaların çoğu, tedavinin büyük ölçüde etkisiz olduğu geç dönemlerde teşhis edildiğinden, mide kanseri dünyada kanserden meydana gelen ölümlerin başında yer almaktadır. Teşhis ve tedavide ilerlemeler kaydedilse de, sadece erken tanı alan hastalarda iyileştirici etki sağlanabilmektedir. Kanserin orta ve ileri aşamalarında küratif etki gerçekleştirilememekte, güncel tedavi yaklaşımları mide kanseri hastalarının sağkalım sürelerini uzatamamaktadır. Diğer taraftan tanı ve tadivi için gerekli olan endoskopik muayene hastalar için oldukça zorlayıcı olabilmektedir. Ayrıca uygulanan kemoterapi ve radyoterapi gibi güncel tedavi yaklaşımları hastayı aşırı derecede yoran ve yıpratan süreçleri içermektedir. Bu nedenle erken tanı ve takibi kolaylaştıracak ve tedavi hedefi olabilecek biyobelirteçlere ihtiyaç oldukça fazladır.

Karsinogenezde tümör baskılayıcı genlerin ve onkogenlerin normal metilasyon profilleri değişmektedir. Bu değişiklikler erken tanı için belirteçtir. DNA metilasyonu geri dönüşümlü olduğundan anormal metilasyonun restorasyonu prognozun iyileştirilebilmesine de olanak sağlar. Gerek riskli kişilerde tarama, gerekse tanı almış hastalarda prognozu iyileştirecek alternatif tedavi planları oluşturulabilme açısından her kanser türü ve kişi için kritik genlerin anormal metilasyon statüsünün ve gen ekspresyon düzeyi ile promoter metilasyonu arasındaki ilişkinin aydınlatılması önemlidir.

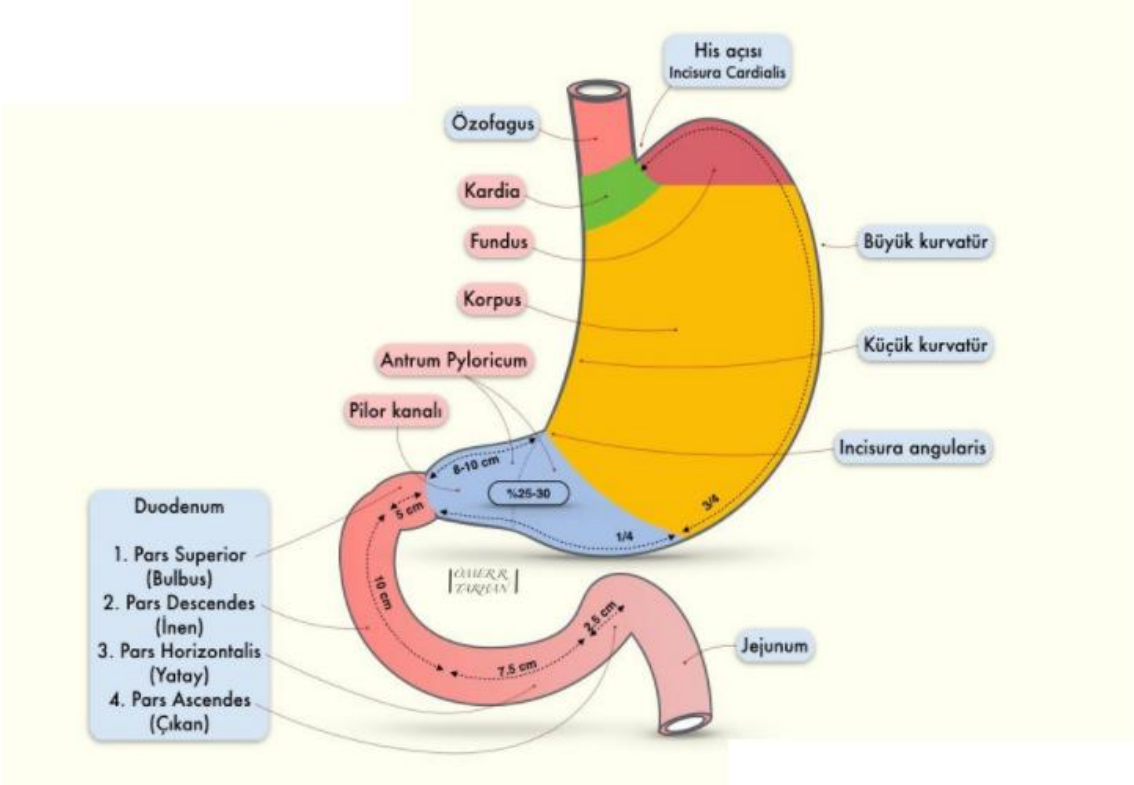
Gankyrin ve CDO1 gen ekspresyon değişikliklerinin gastrik karsinogenezde rol oynayabildiği düşünülmektedir. Bu genlere ait ekspresyon değişiklikleri promotör bölgelerindeki metilasyon statülerinin değişiminden kaynaklanabilir. Bu çalışmanın amacı, mide kanseri oluşumu ve ilerlemesinde CDO1 ve gankyrin ekspresyonlarının promoter bölgelerindeki metilasyon statüsü ile ilişkisini belirlemek, bu genlerin ekspresyon ve promoter metilasyon statülerinin klinikopatolojik verilerle ilişkisini saptamak ve böylece bu genlerin (ayrı veya ikili olarak) mide kanserinin erken tanı (özellikle risk grubundaki kişilerde) ve takibinde (tedavi yanıtının izlenmesi, rekürans ve metastazların teşhisinde) belirteç olarak kullanım potansiyelini değerlendirerek literatüre katkı sunmaktır. Riskli kişilerde hastalığın henüz oluşmadan öngörülerek, önlenebilmesi noktasında ciddi girişimlere

temel oluşturacak veriler elde etmek, bu alanda yapılacak yeni çalışmalara kaynak oluşturmak bu tez çalışmasının diğer hedefidir.

2. KAVRAMSAL ÇERÇEVE

2.1. Mide

Mide sindirim sisteminin abdomen içindeki ilk parçası olup en geniş kısmıdır (Chaudhry ve diğ., 2020) İntraperitoneal boşlukta sol üst kadranda epigastrik bölge, sol hipokondriyal bölge ve umblikal bölgede bulunur. Ağızdan anüse kadar bir kanal şeklinde uzanan sindirim sistemi hiyerarşisinde; mide, önünde özefagus, ardında ise ince bağırsağın ilk kısmı olan duodenumun arasında kalmaktadır. Yiyecek tutma kapasitesi olan geniş, kaslı ve içi boş bir organdır. Anterior ve posterior olmak üzere iki yüzü bulunur. Büyük kurvatur ve küçük kurvatur olmak üzere iki kenarı vardır. Kardia, fundus, korpus, antrum ve pilor olmak üzere 5 ana bölgeden oluşur. Midenin özefagus ile birleştiği kısmı kardiya olarak adlandırılır. Kardiya ve özofagus bileşkesinde anatomik olarak var olmayan ama fonksiyonel olarak bulunan alt özefagus sfinkteri (gastroözefageal sfinkter) bulunur. Kardiyanın sol üst kısmına denk gelen ve gastroözefageal bileşkeden çekilen hayali transvers çizginin üstünde kalan kısım ise “fundus” adını alır. Gastroözofageal bileşkeden geçen horizontal planda fundusun alt komşuluğundaki kısım “korpustur”. Korpusun medialindeki kenara “küçük kurvatur”, lateralindeki kenara “büyük kurvatur” olarak adlandırılır. Küçük kurvaturun sağa doğru yaptığı ani dönüşe “incisura angularis” denir ve bu hizadan itibaren korpus yerini “antruma” bırakır. Antrum ve duodenum arasındaki bağlantıya “pilor” olarak adlandırılır, burada “pilorik sfinkter” bulunur (Şekil 2-1).



Şekil 2-1: Midenin Bölümleri.

Mide, besinlerin fiziksel ve kimyasal sindirimini gerçekleştirir. Midenin proksimal kısmı (fundus, korpus) besinlerin depolanmasından sorumlu iken, distal kısmı (antrum) karırştırma ve öğütme işlevlerine sahiptir. Sonuçta besinler kimus adı verilen boza kıvamına getirilir. Alt özefageal sfinkter istirahat halinde kapalı durumdadır ve midedeki içeriğin özefagusa geri kaçışını engeller. Bu sfinkter peristaltizm ile açılır ve özefagustan gelen besin ve salgının mideye geçişini sağlar. Pilorik sfinkter ise duodenumdaki içeriğin mideye geri kaçmasını engeller ve mide içeriğinin midedeki optimal bekleme süresinin ardından duodenuma geçişinden sorumludur.

Mide, hareketli ve esnek bir organdır. Yüksek metabolik hızlarda çalışan 5 farklı hücre tipi içerir ve çok sayıda kas katmanına sahiptir. Bu nedenlerden dolayı zengin kan dolaşımı gerektiren bir organdır. Mide kanlanmasının ve venöz drenajı oldukça iyidir. Bu klinik açıdan oldukça önemlidir. Mide lenfatikleri arterio-venöz anatomiyle paralellik gösterir. Mide geniş bir lenfatik ağa sahiptir. Mukozadan başlayan lenfatik ağ, mide dışına çıktıktan sonra en yakın arter trasesini takip ederek çölyak pleksusa ulaşır. Mide lenfatik drenajında nihai hedef çölyak

lenf nodlarıdır. Geniş lenfatik ağın oluşturduğu anastomozlar nedeniyle lenf nodu metastazlarının çıkacağı bölge ekseriyetle tahmin edilemez. Bu tahmin edilemezlik ve lenfatik ağın karışıklığı, mide kanseri cerrahisinde "lenfadenektominin" öneminin altını çizer.

2.2. Mide Histolojisi

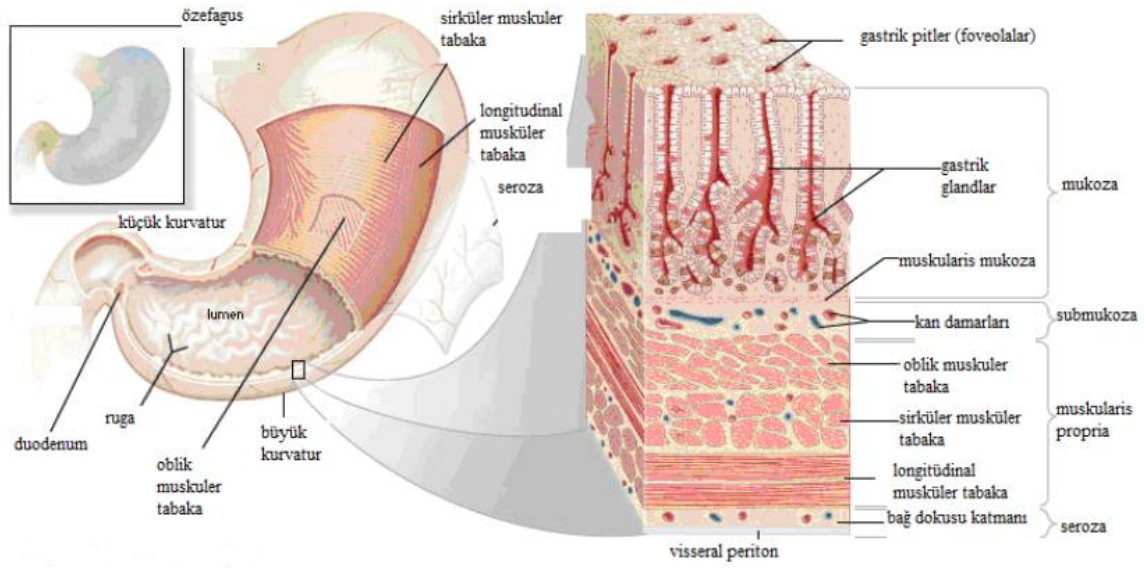
Mide makroskopik olarak kardia, fundus, korpus ve pilor olmak üzere dört ana kısımdan oluşur. Ancak korpus ve fundus bölümleri mikroskopik olarak aynı olduğundan histolojik bakımdan üç bölgeye ayrılarak incelemek mümkündür.

1.Kardia: Özofagogastrik sfinktere yakın kardiak bezlerin bulunduğu kısım,

2.Pilor: Pilorik sfinkterin proksimalinde plorik bezlerin bulunduğu kısım,

3.Fundus: Kardia ve pilor arasında fundik veya gastrik bezleri içeren midenin en geniş kısmı.

Mide histolojik olarak "içten dışa" doğru tunika mukoza, tunika submukoza, tunika muskularis ve tunika seroza olmak üzere 4 tabakadan meydana gelir (Şekil 2-2).



Şekil 2-2: Midenin Histolojik Tabakaları.

2.2.1. TunikaMukoza

Mide mukozası midenin en iç kısmını örten oldukça kalın bir tabakadır ve mide boş iken mukoza yüzeyinde çok sayıda "plika gastrika" (ruga) adı verilen kalın plikalar (mukoza

katlanmaları) bulunur. Bu plikalar midenin uzun eksenine paralel olup mide besinlerle dolduğu zaman yassılaşarak kaybolurlar. Böylece mide genişleyerek hacmini arttırabilir. Midenin her bölümünde değişik bir yapı gösteren "dallanmış tubuler bezler" mide çukurcuklarına açılır (Junquiera ve diğ., 1993) Mide mukozası üç bölümde incelenir; lamina epitelyalis, lamina propria ve lamina muskularis mukoza (D.Hacıoğlu ve diğ.,2021).

Lamina Epitelyalis

Gastrik çukurcukları örten prizmatik mukus salgılayan tek sıralı epitel hücrelerinden oluşur. Mukus salgısı; mide hücrelerini yine mide tarafından salgılanan kuvvetli asidin etkisinden korur. Gastrik bezlerde; müköz boyun hücreleri, kök hücreler, parietal (okzintik) hücreler, zimojen hücreler, enteroendokrin hücreler gibi farklı görevleri olan hücre tipleri bulunur. Parietal hücreler hidroklorik asit, potasyum klorür, intrensek faktör salgılayan hücrelerdir. Zimojen hücrelerin diğer adı "şef" hücreler olup "pepsinojen" ve "gastrik lipaz" salınımından sorumludurlar. Enteroendokrin hücreler ise "gastrin" hormonu salgılayarak parietal hücrelerden HCl salınmasını uyarırlar (Şekil 2-3).

Lamina Propria

Gastrik bezler ile Lamina Muskularis Mukoza arasını dolduran gevşek bağ dokusudur. Kollajen, retiküler ve az miktarda elastik lifler içerir. Lamina propriada lenfositler, eozinofiller, kapillerler ve lenfatikler bulunur.

Lamina Muskularis Mukoza

Lifli ince düz kas tabakasıdır. Lamina propriadaki bezlerin arasına da uzanır. Bu uzantılar bezlerin salgılarını boşaltmasını kolaylaştırır.

2.2.2. Tunika Submukoza

Bu tabaka, gevşek bir kollajenöz bağ dokusundan oluşur. Bu tabaka çok sayıda damar ve lenf ağına sahip olup zengin bir sinir ağına (Meissner pleksusu) sahiptir. Bu pleksus glandüler sekresyonun kontrolünden sorumlu olup enterik sinir sisteminin bir parçasıdır.

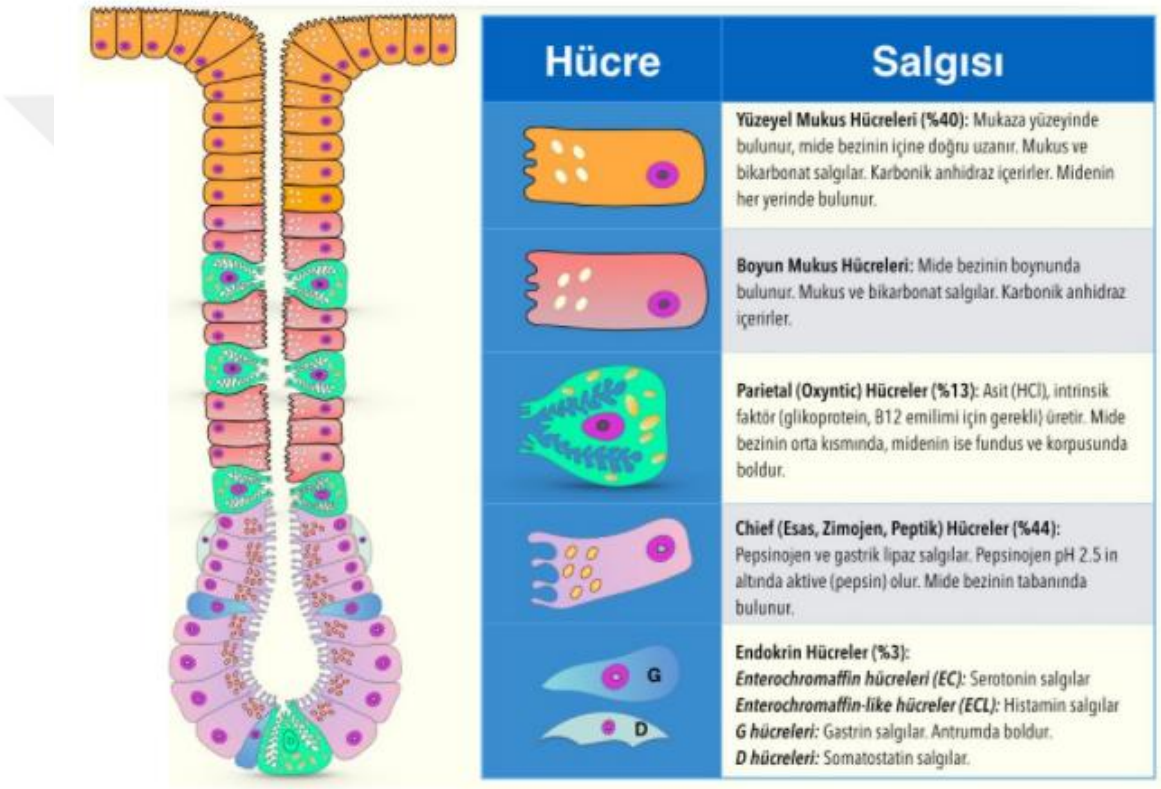
2.2.3. Tunika Muskularis

Dışta longitidunal, ortada sirküler, içte oblik olmak üzere 3 tabakadan oluşan kas tabakasıdır. Ortadaki sirküler lifler midenin pilor bölgesinde kalınlaşarak pilorik sfinkteri meydana getirirler. Pilor sfinkteri mideden duodenuma besin geçişi açısından çok kritik bir

kapıdır. Tunica muskulariste sirküler ve longitudinal kas tabakası arasında yerleşmiş parasempatik sinir ağı olan “Myenterik pleksus” bulunur.

2.2.4. Tunika Seroza

En dışta bulunan histolojik tabakadır. İnce gevşek bağ dokusu yapısına sahip olan bu tabaka hemen dışından tek tabakalı yassı epitel (mezotelyum) ile örtülüdür.



Şekil 2-3: Mide Hücreleri.

2.3. Mide Kanseri

2.3.1. Epidemiyoloji

Mide kanseri tüm malign tümörler arasında yüksek morbidite ve mortaliteye sahip olan bir kanser türüdür. Tahmini olarak yılda 1 milyondan fazla yeni vaka mide kanseri tanısı almaktadır. Dünya çapında en çok teşhis edilen beşinci, en ölümcül üçüncü malignitedir. Sıklıkla ileri evrede tanı alması nedeniyle, mide kanserinden ölüm oranı bu kadar yüksektir.

Mide kanserinin insidansı erkeklerde kadınlara oranla iki kat daha fazladır (Bray ve diğ., 2018)

Mide kanseri insidansı özellikle Uzakdoğu olmak üzere belirgin coğrafi değişimler göstermektedir. Doğu Asya, Doğu Avrupa ve Güney Amerika gibi sosyoekonomik düzeyi düşük bölgelerde mide kanseri insidans ve ölüm oranları belirgin derecede yüksektir.

Yaşam koşullarının iyileşmesi nedeniyle tüm dünyada mide kanseri insidansı ve ölüm oranlarında bir düşüş yaşanmaktadır (Zhu ve diğ., 2012). Mide kanserinin en önemli sebebi olan *Helicobacter pylori* insidansının azalması, bu düşüşün ana sebebi olarak gösterilmektedir (Hooi ve diğ.,2017). Japonya ve Kore gibi bölgelerde uygulanan tarama programlarının başarısı da mide kanseri insidansının gerilemesinde etkili olmuştur (Kim ve diğ.,2018). İnsidansın giderek azalmasına rağmen "gastroözefagial bileşke" kanserlerinde artış görülmektedir. Son yıllarda yüksek gelirli ülkelerde yaşayan genç nüfusta gözlemlenen mide kanseri artışı, mide kanseri hastalık riski ve epidemiyolojisinde bir değişiklik olduğunu göstermektedir. Buna bağlı olarak toplumların yaş ortalamasının arttığı da göz önüne alınırsa gelecekte daha çok mide kanseri görüleceği düşünülmektedir. Bu konu önümüzdeki yılların önemli araştırma konularından birisidir (Arnold ve diğ.,2020).

Tüm mide malignitelerinin %95'ini oluşturan adenokarsinom mide kanserinin en çok görülen formudur. (D.Hacıoğlu ve diğ.,2021).

2.3.2. Etiyoloji

Multifaktoriyel bir hastalık olan mide kanserinin etiyolojisinde, hem çevresel hem de genetik faktörler rol oynar (Correa ve diğ., 1992; D.Hacıoğlu ve diğ.,2021).Çoğu mide kanseri sporadik olmasına ragmen %5-10 kadarı ailesel olarak görülmektedir.

Çevresel Faktörler

Pernisiyöz anemi, A kan grubu ve ailede mide kanseri öyküsünün bulunması mide kanseri için başlıca risk faktörleridir. Epidemiyolojik ve prognostik özelliklerine göre–mide kanseri diffüz tip ve intestinal tip olarak iki farklı şekilde değerlendirilir. Çevresel faktörler daha çok intestinal tip ile ilişkilendirilmektedir (Brunicardi ve diğ., 2014).

Kardiya dışı mide kanserleri için en iyi tanımlanmış risk faktörü *H. pylori* enfeksiyonudur. *H. pylori* enfeksiyonuna bağlı mide kanseri, bakteriyel virülans, konakçıların genetik polimorfizmi ve çevresel faktörlerle ilişkilidir (Hatakeyama ve diğ., 2019) Kronik *H. pylori* enfeksiyonu sonucu, mide mukozasının, atrofik gastrit ve intestinal metaplaziden

karsinoma doğru aşamalı değişimi sözkonusudur (WHO, 2019). *H. pylori* ile enfekte olan kişilerin çoğu asemptomatiktir. Kronik *H. Pylori* enfeksiyonu gösteren hastalarda mide kanseri riski üç kat daha fazladır (Brunicardi ve diğ., 2014). Güncel literatüre göre, mide kanserinden korunma amaçlı olarak *H. pylori'*nin eradikasyonu aşağıdaki risk gruplarında yapılmalıdır: pan-gastrit ve korpus baskın gastrit sahibi olanlar, mide kanserli hastaların birinci derece akrabaları ve mide neoplazisi öyküsü olanlar (Malfertheiner ve diğ., 2017). Ayrıca gastroözofegal reflü hastalığı ile proksimal (kardia tipi) mide kanseri arasında pozitif bir ilişki bulunduğu da gösterilmiştir (Velanovich ve diğ., 2002).

H. pylori dışında, ileri yaş, düşük sosyoekonomik durum, sigara kullanımı, alkol tüketimi, ailevi yatkınlık, geçirilmiş mide ameliyatı, pernisiyöz anemi "non-kardiya mide kanseri" için yüksek risk faktörleri olarak sayılabilir (Yaghoobi ve diğ., 2017).

Mide kanseri salamura, tuzlu, tütsülü ve nitrat içerikli gıdalarla beslenen bireylerde daha sık görülür. Bu gıdalar *H. pylori* enfeksiyonu riskini artırır. Gastrik kanserlerin %18'i sigara içimi ile ilişkili bulunmuştur (González ve diğ., 2003).

Düşük sosyoekonomik statüye sahip popülasyonlarda distal mide kanseri riski, yaklaşık iki kat daha fazladır. (Wynder ve diğ. 1963). Proksimal mide kanserleri ise daha yüksek sosyoekonomik statü ile ilişkilendirilmiştir (Powell ve diğ., 1990).

Dünya çapında mide kanserlerinin % 5 ila 10' unun Epstein-Barr virus (EBV) ile ilişkili olduğu tahmin edilmektedir (Takada ve diğ., 2000; Boysen ve diğ.,2009). EBV ile ilişkili mide kanserleri, çeşitli genlerin ekspresyonunu susturan kanserle ilişkili genlerin promoter bölgelerinin DNA metilasyon statüleri ile karakterize edilir (Chang ve diğ., 2006).

İlk ameliyatın nedenine ve rekonstrüksiyon türüne bağlı olarak; mide ameliyatından sonra mide kanseri riski zamanla artmaktadır (Takeno ve diğ., 2014). İlk mide cerrahisi ile remnant mide kanserinin gelişimi arasındaki süre, eğer ilk ameliyat benign hastalık için yapılmışsa ve mide rekonstrüksiyonu Billroth I prosedürüne uygun ise daha uzundur; eğer ameliyat malign hastalık için yapılmışsa veya Billroth II rekonstrüksiyon uygulanmışsa bu süre daha kısadır (Komatsu ve diğ., 2012; D.Hacıoğlu ve diğ.,2021).

Genetik Faktörler

Çoğu mide kanseri sporadik olmasına ragmen %5-10 kadarı herediter olarak görülmektedir. Üç ana sendrom herediter mide kanseri için karakteristiktir: Herediter Diffüz Gastrik Kanser (HDGC), Gastrik Adenokarsinom ve Midenin Proksimal Polipozu (GAPPS)

ve Familyal İntestinal Gastrik Kanser (FIGC). Bu hastalıkların görüldüğü ailelerin diğer bireylerinde mide kanserine yakalanma riski yüksektir, ancak sadece HDGC genetik olarak açıklanabilmektedir (Oliveira ve diğ., 2015).

Mide kanserinin ayrıca, Lynch sendromu (herediter non polipozis kolorektal kanser), Familyal Adenomatöz Polipozis (FAP), Li-Fraumeni sendromu, Peutz-Jeghers sendromu, Juvenil Polipozis, herediter meme ve over kanseri sendromu dahil olmak üzere bazı diğer kalıtsal kanser sendromları ile bağlantısı tanımlanmış olsa da bunlar mide kanserinin oldukça nadir görülen nedenleridir.

2.3.3. Patoloji

H. pylori enfeksiyonu genellikle bebeklik veya erken çocukluk döneminde başlar. Ancak kanserler klinik olarak dört veya daha fazla dekad sonra teşhis edilir. Bu sırada, ardışık histopatolojik aşamalardan oluşan bir "kaskad" ile temsil edilen uzun bir kanser öncesi dönem bulunur: Kronik aktif nonatrofik gastrit, multifokal atrofik gastrit, intestinal metaplazi (komplet, daha sonra inkomplet), gastrik displazi ve invaziv karsinom (Correa ve diğ.,1992).

Nonatrofik gastrit: Kronik H. pylori enfeksiyonunun ilk aşamasında görülür. Antrumda yoğundur. Lenfositlerin, makrofajların ve plazma hücrelerinin bol olması ve bant benzeri infiltrasyon göstermesi ile karakterize atrofik olmayan gastrittir. İntestinal metaplazili atrofi gelişmesiyle adenokarsinom ile sonuçlanabilecek bir dizi olayın tetiklenmesine neden olur. Atrofik gastrit / intestinal neoplaziye ilerleme oranı büyük çaplı kohort çalışmalarda yüzde 0,1 ila 0,9 olarak gösterilmiştir (De Vries ve diğ., 2008).

Atrofik gastrit: Orijinal mide “gland” yapılarının multifokal kaybı ile karakterize olan, ileri bir gastrittir. Çoğu hastada aktif gastrit “gland” kaybına yol açmaz. Fakat gland kaybı varsa, bu H. pylori ile ilişkili “preneoplastik” kaskadın ilk histopatolojik lezyonudur.

İntestinal metaplazi: Mide mukozasını içeren multifokal atrofinin ardından, mide hücrelerinin intestinal hücrelere benzeyecek glandlar geliştirmesi intestinal metaplazi olarak bilinir. İntestinal metaplazide nötr bir pH'a sahip orijinal mide müsinleri, siyalik veya sülfatlanmış olabilen asit müsinlere dönüşmüştür (Filipe ve diğ., 1994). Mikroskobik görüntüsü itibariyle 3 tipe ayrılır: Tip I intestinal metaplazi (komplet), Tip II intestinal metaplazi (inkomplet), Tip III intestinal metaplazi (inkomplet).

H. pylori ile enfekte hastaların yaklaşık %1'inde intestinal metaplazi ve hipo- veya aklorhidri ile birlikte multifokal gastrik atrofili “korpus dominant gastrit” gelişir. Mide

pH'ındaki yükselmenin bir sonucu olarak florada değişiklik olur. Mide, anaerobik bakteriler tarafından kolonize edilir (El-Omar ve diğ., 2000; Sanduleanu ve diğ.,2001). Ve bu bakteriler kanserojen nitrozaminlerin oluşumundan sorumludur.

Gastrik Displazi: Gastrik displazi, mide adenokarsinomunun net bir öncülüdür. En sık antrum bölgesinde görülür. Neoplastik bir lezyondur ve çoğunlukla atrofik gastrit zemininden gelişir. Gastrik displazi batı toplumlarında %0,5 - 3,75 oranlarında görülürken Kolombiya ve Çin gibi yüksek insidanslı bölgelerde bu oran %9 – 20'ye kadar çıkabilmektedir (Sung, 2016). American Joint Committee on Cancer [AJCC] tümör, nod, metastaz [TNM] evreleme kriterlerine göre Tis veya karsinoma in situ olarak evrelendirilir. Endoskopik olarak düz, polipoid veya depresif bir lezyon olarak ortaya çıkabilir (Lauwers ve Riddell, 1999). Hastaların ortalama yaşı gastrik adenokarsinom sahiplerine göre bir dekat daha azdır (61 yaş vs 70 yaş) (Jeon, 2010). WHO tarafından düşük dereceli displazi ve yüksek dereceli displazi olarak iki şekilde sınıflandırılır (WHO,2019). Düşük dereceli displazi zamanla kendiliğinden gerileyebilir ve karsinoma dönüşme olasılığı düşüktür. Yüksek dereceli displazi tespit edildiğinde ise, doğuda ve batıda, genelde endoskopik rezeksiyon önerilmektedir çünkü yüksek dereceli displazinin rezeksiyon materyalinin içinde "invaziv odaklar" görülebilmektedir (de Vries ve diğ., 2007).Yüksek dereceli displazinin malign adenokarsinoma dönüşme hızı 4 yıl içinde %60 – 85 gibi oldukça yüksek bir orana sahiptir (Yamada ve diğ., 2004).

2.3.4. Sınıflama

Mide kanserleri; bu güne kadar anatomik konum, hastalık kapsamı, histomorfolojik görünüm ve moleküler alt tipler dahil olmak üzere çeşitli şekillerde sınıflandırılmıştır.

2.3.4.1. Anatomik Sınıflama

American Joint Committee on Cancer (AJCC) / Union for International Cancer Control (UICC) 'nin "tümör", "lenf nodu", "metastaz" şeklinde sınıflandırdığı ve bu kelimelerin baş harfleri ile isimlendirilen "TNM sınıflandırma ve evreleme sistemleri" mide kanseri için evrensel olarak kullanılan en yaygın sınıflama sistemidir (Tablo 2-1).

Tablo 2-1: AJCC 2017 Sınıflamasında pTNM Değerlerine Göre Evreleme

Patoloji Raporunda TNM (pTNM)			
T	**N**	**M**	**EVRE**
Tis	N0	M0	0
T1	N0	M0	IA
T1	N1	M0	IB
T2	N0	M0	IB
T1	N2	M0	IIA
T2	N1	M0	IIA
T3	N0	M0	IIA
T1	N3a	M0	IIB
T2	N2	M0	IIB
T3	N1	M0	IIB
T4a	N0	M0	IIB
T2	N3a	M0	IIIA
T3	N2	M0	IIIA
T4a	N1	M0	IIIA
T4a	N2	M0	IIIA
T4b	N0	M0	IIIA
T1	N3b	M0	IIIB
T2	N3b	M0	IIIB
T3	N3a	M0	IIIB
T4a	N3a	M0	IIIB
T4b	N1	M0	IIIB
T4b	N2	M0	IIIB
T3	N3b	M0	IIIC
T4b	N3b	M0	IIIC
T4b	N3a	M0	IIIC
T4b	N3b	M0	IIIC
AnyT	AnyN	M1	IV

T (Tümör) kategorisi, tümörün mide duvarının katmanlarında ne kadar büyüdüğü ve yakındaki yapılara veya organlara ulaşıp ulaşmadığı da dahil olmak üzere birincil tümörün kapsamını tanımlar.

N (Nod=Lenf Nodu)kategorisi, yakındaki lenf düğümlerine yayılan herhangi bir kanseri tanımlar.

M (Metastas) kategorisi, karaciğer veya akciğerler gibi vücudun uzak bölgelerine herhangi bir yayılmayı (metastaz) tanımlar.

En erken evre mide kanserleri evre 0 (karsinoma in situ) olarak adlandırılır ve daha sonra evre I (1) ile IV (4) arasında değişir. Sayı ne kadar düşükse, kanser o kadar az yayılır.

AJCC evreleme sınıflandırmasının en son (2017, sekizinci baskı) revizyonuna göre (Ajani ve diğ., 2017), özefagogastrik bileşkeye uzanan mide tümörlerinden merkezi özefagogastrik bileşkeye "2 cm ya da daha yakın" mesafede olanlar "özefagus kanseri" olarak kabul edilir. Bunun tam tersi; orta noktası özefagogastrik bileşkeye "2 cm'den daha uzak" olan tümörler özefagogastrik bileşkeyi içerseler dahi "mide kanseri" olarak sınıflandırılır. Özefagogastrik bileşkeye uzanmayan tüm kardiya tümörleri mide kanseri olarak sınıflandırılır. Siewert sınıflamasına göre gastroözefajiyal bileşkeye sirayet eden tümörler üç gruba ayrılır.

Siewert tip 1 tümörler: Özefagusun intestinal metaplazi alanından köken alır ve gastroözefajiyal bileşkeye yukarıdan uzanır.

Siewert tip 2 tümörler: Gastroözefajiyal bileşkeden direkt köken alır.

Siewert tip 3 tümörler: Mide mukozasından köken alır ve gastroözefajiyal bileşkeye alttan uzanır. Siewert tip 3 tümörlerin kötü prognozlu büyük lezyonlar olduğu gösterilmiştir.

Tümör yerleşimi, özellikle özofagogastrik bileşkede prognoz ve tedavinin planlanması bakımından büyük önem taşır (Curtis ve diğ. 2014).

Mide kanseri çeşitli organlara yayılabilir. Burada direkt invazyon, uzak metastaz veya peritonal saçılma söz konusudur. Mide içindeki primer odağa bağlı olarak, serozanın penetrasyonu kanserin pankreas, karaciğer, dalak, transvers kolon ve/veya omentuma yayılmasına neden olabilir ve sıklıkla erken transperitonal yayılıma yol açar (Fernet ve diğ., 1965). Hematojen yolla yayılmada en sık etkilenen organ karaciğerdir. Bunu akciğer ve ardından periton izler. Genç hastalarda periton tutulumu daha sık görülür.

Mide kanserinde "kötü prognoz" lenfatik ve vasküler invazyon gerçekleşmesi demektir. Tümör invazyonunun derinliği arttıkça lenf noduna metastaz yapmış olan hastalığın insidansı da artar (Maruyama ve diğ., 1989). Patolojik evrelemenin doğruluğu, incelenen bölgesel lenf nodlarının sayısı ve bunların kanser odağına göre anatomik konumları ile orantılıdır.

2.3.4.2. Erken ve İleri Mide kanseri

Erken mide kanseri (EMK) kavramı ilk defa Japonya'da ortaya çıkmıştır. EMK ameliyatla başarılı bir şekilde tedavi edilebilen bir neoplazm olarak tanımlanmakta iken

sonradan daha spesifik olarak, lenf nodu metastazından bağımsız, mukoza veya submukozayla sınırlı bir adenokarsinom olarak tanımlanmıştır (T1, herhangi N). Bu kanserler, daha iyi prognoza (5 yıllık sağkalım oranı yaklaşık %90) sahiptir.

EMK hastalarında çok az da olsa lenf nodu metastazı görülebilir (Gotoda , 2006). Lenf nodu metastazının varlığı EMK hastlarının tedavi şemasını etkiler. Eğer nihai patoloji sonucunda lenf nodu metastazı varsa bu hastalar "adjuvan kemoterapi" alırlar. Lenf nodu metastazı şüphesi taşımayan EMK mümkünse "endoskopik rezeksiyon" ile tedavi edilmektedir. Lenf nodu tutulumu olan EMK'li hastalar ve/veya endoskopik rezeksiyon için standart kriterleri karşılamayan diğer hastalar için "gastrektomi" uygun bir tedavi yöntemi olarak kullanılır.

İleri Mide Kanseri, gelişmiş (advanced) mide kanserleri olarak da bilinir ve çeşitli dış görünümler sergilerler. Bormann'ın sınıflandırması mide kanserini dört farklı morfolojik tipe ayırır (Luo ve diğ., 2016):

Tip 1: polipoid tümörler

Tip 2: Fungatif tümörler

Tip 3: Ülsere tümörler

Tip 4: Yaygın infiltratif tümörler

Ülsere tümörler, iyi huylu ülserlerden farklı görünümdedirler. Sınırları yüksek ve düzensiz., çevre mukozası kalınlaşmış, düzensiz ve enduredirler. Ülser tabanı nekrotik, tüylü ve genellikle nodülerdir. Kraterden yayılan mukozal kıvrımlar düzensizdir, kalınlaşma ve füzyon gösterir (Dekker ve Tytgat, 1977). Az koheziv neoplastik hücrelerden oluşan invaziv adenokarsinom, mukoza ve submukozada yüzeysel olarak yayılabilir ve rugal kıvrımların düzleşmesi ile plak benzeri lezyonlara yol açabilir. İnfiltrasyon duvar kalınlığınca olabilir ve "linitis plastica" görünümünü oluşturabilir. Bazı müsinöz adenokarsinomlar önemli miktarlarda müsin salgılayarak tümöre jelatinimsi bir görünüm verebilirler.

2.3.4.3. Histolojik Sınıflama

- Dünya Sağlık Örgütü (WHO) sınıflaması
- Lauren sınıflaması

1965 yılında oluşturulmuş olan Lauren sınıflandırması bu alanda yapılmış olan en eski sınıflandırmadır. Lauren sınıflandırmasına göre, mide adenokarsinomları iki farklı

histomorfolojik alt tipte incelenir: “intestinal” (örneğin, gland yapısı oluşturan) ve farklı bir morfolojik görünüme, epidemiyolojiye, patogeneze ve genetik profile sahip “diffüz” (kohezi olmayan hücrelerden oluşan) tip (Lauren,1965; D.Hacıoğlu ve diğ.,2021). Daha sonraları “indeterminate” tip de belirsiz histolojiyi karakterize edebilmek için bu sınıflandırmaya dahil edilmiştir (Machlowska ve diğ., 2020).

İntestinal tip: Tümör hücrelerinin arasında bulunan görünür bezler ve kohezyon ile karakterizedir. Tümör hücreleri birbirine yapışıktır ve bağırsak yolunda başka yerlerde ortaya çıkan adenokarsinomlara benzer şekilde kendilerini tübüler veya glandüler oluşumlarla düzenleme eğilimindedir (dolayısıyla intestinal tipi olarak adlandırılırlar). İntestinal tip erkeklerde ve ileri yaş gruplarında daha yaygındır ve daha iyi prognoza sahiptirler.

Diffüz tip: Az veya hiç bez oluşumu olmadan mide duvarını diffüz olarak infiltre eden, adhezyon molekülleri eksik, az kohezif hücreleri kapsar. Hücreler genellikle küçük ve yuvarlaktır, ayrıca “taşlı yüzük hücresi” oluşumuna sahiptir. İntestinal alt tipinin mide mukozasının bağırsak metaplazisi ve H. pylori enfeksiyonu oluşumu ile ilişkili olduğuna dair kanıtlar vardır. Bu tümörler daha eşit bir erkek/kadın oranı gösterir ve genç bireylerde daha sıktır.

İntestinal tip en yaygın mide kanseri tipi olup diffüz tip ikinci derecede yaygındır. İndeterminate tip ise en seyrek görülen gastrik kanser türüdür (Lauren,1965). Bazı çalışmalar ayrıca diffüz alt tipinin insidansının kadınlarda ve genç hastalarda daha yüksek olduğunu ve bu tip GC'nin normal mide mukozasından kaynaklandığını ortaya koymuştur (Hu ve diğ. 2012).

2010 yılında yayınlanan Dünya Sağlık Örgütü (WHO) sınıflandırması, daha detaylı bir sınıflandırma sistemi sunmaktadır. WHO sınıflandırması, mide adenokarsinomlarından ayrı alır ve diğer mide tümörlerini de detaylı olarak tanımlar (Fléjou, 2011).WHO sınıflaması intestinal ve diffüz tip ayrımını içermemektedir. Mide adenokarsinom tipi, Lauren sınıflandırma sistemine göre indeterminate tipe benzeyen tübüler, müsinöz, papiller ve miks karsinom gibi çoklu alt grupları içerir. Zayıf kohezyonlu karsinom tipi, taşlı yüzük hücreli karsinomu içerir. Sınıflandırılmış mide karsinomlarının geri kalanı, esas olarak düşük klinik önemlerinden dolayı, yaygın olmayan olarak tanımlanmaktadır. WHO sınıflandırmasını takiben, en yaygın GC alt tipi tübüler adenokarsinom, ardından papiller ve müsinöz tiplerdir. Taşlı yüzük hücreli karsinom, GC'lerin yaklaşık %10'unu kapsar ve taşlı yüzük hücrelerinin tümörün %50'den fazlasında görülmesiyle tanımlanır (Werner ve diğ.,2001).

Tablo 2-2: Gastrik adenokarsinom sınıflandırma sistemlerinin karşılaştırılması

WHO (2010)	Lauren (1965)
Papiller adenokarsinom Tubular adenokarsinom Mukonöz adenokarsinom	İntestinal tip
Taşlı yüzük hücreli karsinom Diğer zayıf koheziv karsinom	Diffüs tip
Adenosukuamöz karsinom	İndeterminant tip
Sukuamöz karsinom Hepatoid karsinom Lenfoid stromalı karsinom Koryokarsinom Karsinosarkom Parietal hücre karsinomu Malin rabdoid tümör Mukoepidermoid karsinom Panet hücre karsinomu Andiferensiye karsinom Miks adeno-nöroendokrin karsinom Endodermal sinüs tümörü Embriyonal karsinom Pure mide yolk kesesi tümörü Onkositik adenokarsinom	

2.3.5. Mide Kanseri Tedavi Protokolü

Mide kanseri tanısını takiben tedavi protokolü başlar. Mide kanserlerinin tedavisinde genel yaklaşım olarak T.C. Sağlık Bakanlığı Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü tarafından hazırlanan "Mide Kanseri Klinik Protokolü" uygulanır (Ankara,2020). Bu protokole göre tedavi protokolünde patoloji, endoskopik tedavi, cerrahi, medikal (tıbbi) onkoloji ve radyasyon onkolojisi planları yer almaktadır.

Erken evre mide kanserlerinde, endoskopik rezeksiyon yöntemleri öncelikli tedavi olarak uygulanmaktadır. Endoskopik tedavi, minimal invaziv bir yöntem olup, hastanın tüm midesini ve yaşam kalitesini korumayı hedefler. Midedeki lezyonun konumuna bağlı olarak endoskopik rezeksiyonun zorluk dereceleri farklıdır. Arka duvara ve küçük kurvatura yerleşmiş olan lezyonların çıkartılması daha zor bir müdahaleyi gerektirmektedir. Endoskopik rezeksiyon Ablatif tedavi yöntemleri ile

karşılaştırıldığında doku örneklerinin değerlendirilmesine de izin verdiği için daha çok tercih edilen bir yöntemdir. Bu nedenle EMK için en uygun evreleme yöntemi olması bakımından değerli bir yöntemdir. Diğer taraftan endoskopi, gerekli olması durumunda yapılacak olan cerrahi bir müdahaleye engel teşkil etmez.

Mide kanseri ameliyatları ciddi cerrahi girişimler olup majör morbidite ve mortalite ile seyredebilir. Cerrahi operasyon öncesinde hasta ile ameliyatın riskleri paylaşılmalı ve mutlaka "imzalı aydınlatılmış onam formu" doldurulup imzalatılmalıdır. bir alternatiftir Kriterlere uymayan erken evre mide kanser olan hastalar, gastrektomi ile tedavi edilmek zorundadır ancak uygun kriterleri karşılayan hastalar için endoskopik rezeksiyon teknikleri bir alternatif sunar. Ameliyat öncesi yapılan patolojik evreleme sırasında yüksek oranda şüpheli lenf nodu tutulumu tespit edilmiş olan erken evre mide tümörlü hastalara genellikle gastrektomi ile birlikte lenf nodları disseksiyonu yapılması da önerilmektedir. Bu hastalarda Lenf nodlarının çıkartılması önemli prognostik faktörlerdendir. "İleri evre mide kanserleri" uzak metastazı saptanmamış ancak submukozayı aşmış olan epitelyal tümörlerdir. Uzak bir metastas olmaması durumunda ileri evre mide kanserlerinin temel tedavisi cerrahi olarak tümörün çıkartılması yönündedir. Küratif amaçla yapılan bir cerrahi rezeksiyon işleminde proksimal, distal ve lateral cerrahi sınırların temiz olması beklenir. Genel cerrahi yaklaşıma göre; proksimal gastrik tümörlerde total gastrektomi ve bölgesel lenfadenektomi uygulanırken, mide ortasındaki tümörlerde bölgesel lenfadenektomi ve total gastrektomi, distal lezyonlarda ise standart ameliyata bağlı olarak lenfadenektomi ve distal subtotal gastrektomi uygulanmaktadır. Gastrik kanser rezeksiyonunda gerekli görülmesi durumunda dalak ve pankreasa yapılan cerrahi girişimlerin sağkalım oranlarını değiştirmemektedir. Buna karşılık; morbidite ve mortaliteyi arttırdığı ifade edildiği için bu işlemlerin rutine eklenmesi de doğru bir yaklaşım olarak görülmemektedir. Ancak dalak ve ya pankreasa metastaz varsa bu organların kısmen veya tamamının çıkartılması hekim tarafından değerlendirilmelidir.

Erken evre mide kanserlerinde lenf nodu metastazı varsa ve evre olarak lokal ve ileri evre ise multimodalite yaklaşım düşünülmelidir. Bu gibi durumlarda doğrudan "radikal cerrahi" uygulanıp ardından "adjuvant tedavi" veya "neoadjuvant kemoterapi" ve gerekli ise ardından "radikal cerrahi" yaklaşımlar düşünülebilir. Mide kanserinde kemoterapi tedavi yaklaşımları neoadjuvant, indüksiyon adjuvan ve

palyatif olarak uygulanabilir. Kemoterapiden önce hastanın değerlendirilmesi gerekir. Kemoterapi tercihinde tümörün evresi, fiziksel koşulları, tedavinin riskleri ve hastanın yaşam kalitesi ile konforu göz önünde bulundurulmalıdır.

Lokalize mide kanserinin primer tedavisi cerrahi olmak ile birlikte T3-T4 olgularda ve lenf nodu metastazı olan olgularda, "adjuvan radyoterapi"nin küratif cerrahi rezeksiyon sonrası, hastalıksız sağkalım ve genel sağkalım oranlarını arttırdığı bildirilmiştir. Cerrahi rezeksiyon yapılabilen ve kardiya yerleşimli olmayan gastrik kanserlerde "kemoterapi" "adjuvan kemoradyoterapi", veya "perioperatif kemoterapi" uygulanması ile ilgili bilimsel çalışmalar bulunmaktadır. Submukozayı aşan ve uzak metastaz gerçekleşmesi olasılığı yüksek tümörlerde "neoadjuvan kemoterapi" ile tedaviye başlamak bir seçenek olabilir. Avrupa'da genellikle hastalara perioperatif kemoterapi önerilirken Amerika gibi ülkelerde cerrahi operasyon sonrası (T3-T4 hastalık ve /veya lenf nodu metastazı olması durumunda veya tümör cerrahi sınırlarda ise) "adjuvan kemoradyoterapi" önerilmektedir. Minimum 16 lenf nodu rezekte edildikten sonra pT3N0M0 karsinom tespit edilen vakalarda standart tedavi kemoradyoterapi ve kemoterapi olsa da radyoterapinin tedaviden tamamen çıkartılması ve hastaya yalnız başına kemoterapi tedavisi verilmesi tartışmalı bir konudur.

2.4. Epigenetik Düzenlemeler

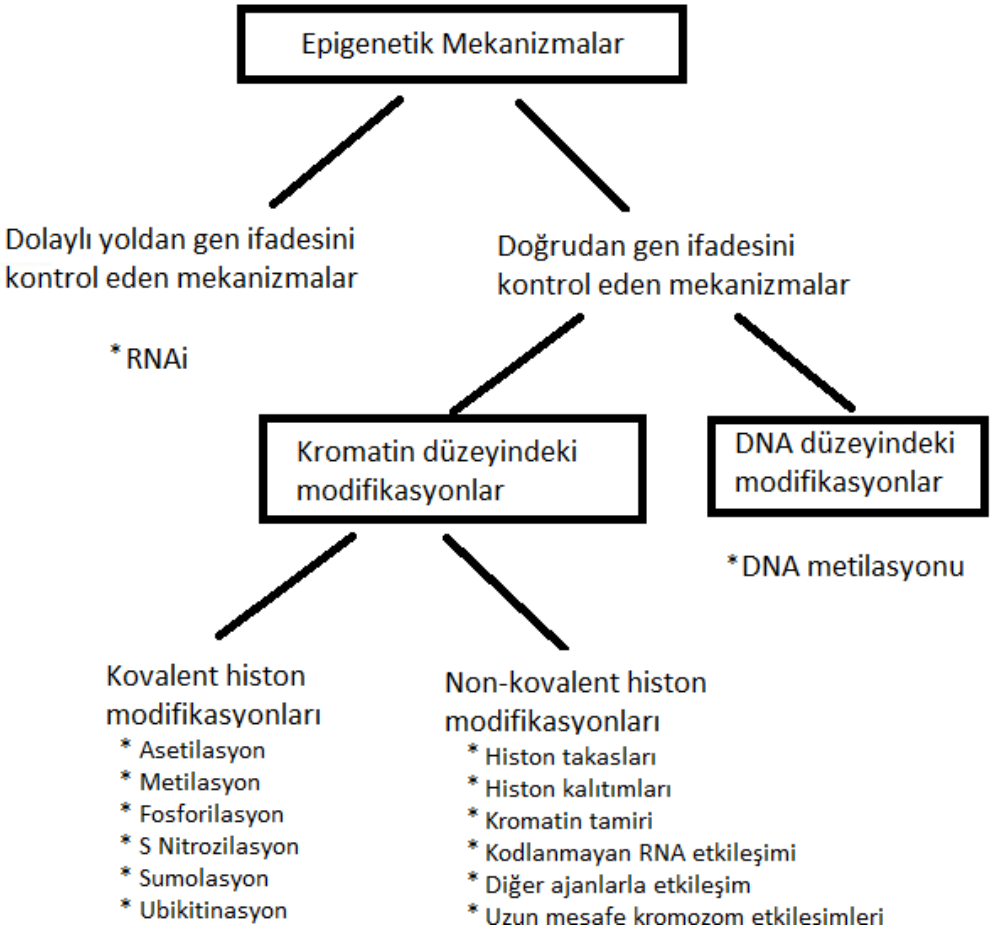
"Epigenetik", DNA baz dizilerinde herhangi bir değişiklik olmaksızın gen ifadesini değişitiren modifikasyonların incelenmesi olarak tanımlanır. Kalıtımla bir sonraki nesile aktarılabilen epigenetik modifikasyonlar DNA metilasyonu, histon modifikasyonu ve kodlama yapmayan mikroRNA'ların aktivitelerini içerir (Baylin ve Herman, 2000; Feinberg ve diğ, 2001; Jones ve Aylin, 2002). DNA metilasyonu, CpG dinükleotidlerinde sitozinin 5-pozisyonunda bir metil grubunun bağlanması şeklinde gerçekleşir (Feinberg ve diğ., 2001; Laird ve Jaenisch, 1996). CpG adaları, yoğun CpG dinükleotitleri içeren genomik bölgelerdir ve tüm genlerin yaklaşık yarısının promoter bölgelerinde bulunurlar. DNA metilasyonu gen ifadesini düzenleyen önemli mekanizmalardan biridir. Genlerin promoter bölgesinde yer alan CpG adalarının DNA metil transferazların katalizlediği bir reaksiyonla metillenmesi transkripsiyon faktörlerinin bu bölgeye bağlanmalarını engeller ve sonuçta gen ifadesi

baskılanır (susturulur). DNA metilasyonu geri dönüşümlüdür, metil grubu uzaklaştırıldığında gen tekrar ifade edilir.

Gen ekspresyonu epigenetik düzenlemeler aracılığı ile aktive edilebilir veya susturulabilir. Epigenetik kalıpların bozulması genlerin transkripsiyonal aktivitelerini etkileyerek çeşitli hastalıklara zemin oluşturabilir. Bu mekanizmalar tüm yaşantımız süresince etkilidir. Diyet, kimyasallar, yaşam tarzı gibi çevresel değişkenler genlerin epigenetik regülasyonunu etkiler (Şekil 2-4).

Epigenetik düzenlemeler temel olarak üç farklı mekanizma ile gerçekleşir.

1. DNA metilasyonu (DNA düzeyindeki modifikasyonlar)
2. Histonların post-translasyonel modifikasyonu (Kromatin düzeyindeki Modifikasyonlar)
3. miRNA aracılı düzenlemeler (Transkripsiyon sonrası modifikasyonlar)

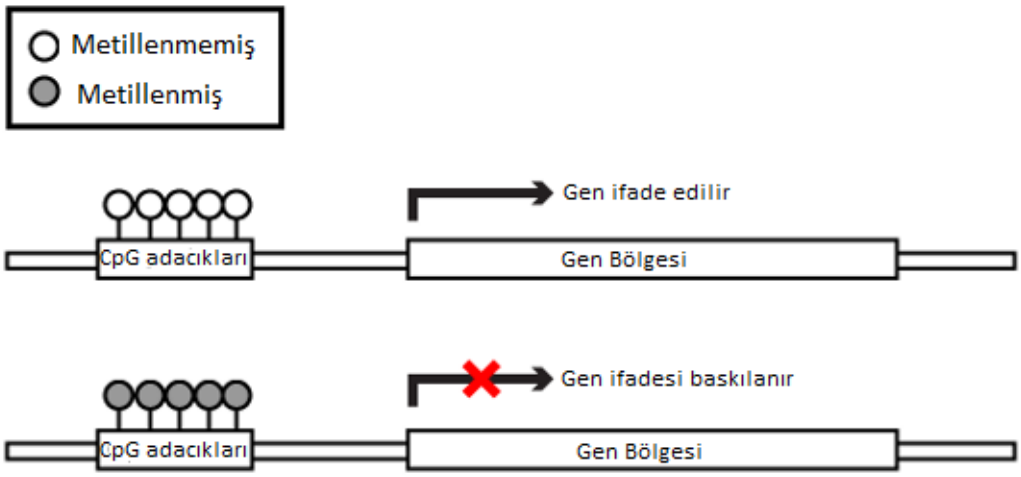


Şekil 2-4: Epigenetik Mekanizmalar.

2.4.1. DNA Metilasyonu (DNA düzeyindeki modifikasyonlar)

DNA metilasyonu, DNA sekansında bulunan sitozin rezidülerinin C5 pozisyonuna bir metil grubunun kovalent olarak bağlanmasıdır. DNA metilasyonu genellikle genomda CpG adacıkları olarak bilinen ve yüksek miktarda Sitosin-Guanin (CG) dinükleotidi içeren genomik bölgelerde meydana gelir. CpG adacıkları ise genellikle genlerin promoter bölgelerinde bulunur.

CpG adacıkları, yoğun CpG dinükleotitleri içeren genomik bölgelerdir ve tüm genlerin yaklaşık yarısının promoter bölgelerinde bulunurlar. DNA metilasyonu gen ifadesini düzenleyen önemli mekanizmalardan biridir. Genlerin promoter bölgesinde yer alan CpG adacıklarının DNA metil transferazların katalizlediği bir reaksiyonla metillenmesi transkripsiyon faktörlerinin bu bölgeye bağlanmalarını engeller ve sonuçta gen ifadesi baskılanır. Hipometillenmiş DNA ise, aktif kromatin ile ilişkilidir (Şekil 2-5).



Şekil 2-5: DNA Metilasyonu ve Gen İfadesi ile İlişkisi.

DNA metiltransferazlar (DNMT'ler) metil grubunun DNA'ya eklenmesini katalizleyen enzimlerdir (Tablo 2-3).

Tablo 2-3: DNA metiltransferazlar ve hücredeki aktiviteleri.

ENZİM	AKTİVİTE
DNA metiltransferaz 1 (DNMT1)	Metilasyonun sürdürülmesini sağlayan majör metiltransferaz
DNA metiltransferaz 2 (DNMT2)	De novo metiltransferaz ve tRNA metiltransferaz olarak etki gösterir
DNA metiltransferaz 3A (DNMT3A)	De novo metiltransferaz
DNA metiltransferaz 3B (DNMT3B)	De novo metiltransferaz

DNMT2 (TRDMT1-tRNA aspartik asit metiltransferaz) hem ribonükleik asit (RNA) metiltransferaz aktivitesine hem de 5-sitozin DNA metiltransferaz aktivitesine sahiptir. (Albert ve diğ., 2017). Önceki çalışmalar, DNMT2'nin tRNA'nın aspartik asidinde sitozin-38'i metilleyerek tRNA metiltransferaz olarak işlev gördüğünü göstermiştir.

DNA metilasyonu; birçok hücresel olayda rolü olan önemli bir epigenetik mekanizmadır. Bunlardan bazıları; embriyonik gelişim, protein sentezi, transkripsiyon, kromatin yapısının yeniden düzenlenmesi, X kromozomu inaktivasyonu, genomik "imprinting" ve kromozom stabilitesinin sağlanması olarak sayılabilir. Metilasyonun birçok kritik süreçte rol alması, bu süreçlerin çok sıkı bir şekilde kontolünü gerektirir. Birçok hastalığın temelinde, epigenetik kontrol sistemindeki anormal değişimler yatmaktadır. Epigenetik modifikasyonlarda ki anormal düzenlemeler, patolojik sonuçlara neden olabilmektedir.

2.4.2. Histonların post-translasyonel modifikasyonu (Kromatin düzeyindeki Modifikasyonlar)

Bu tip modifikasyonlar kovalent ve/veya nonkovalent olabilir. Histonlar üzerindeki modifikasyonlar kromatin yapısını farklılaştırırlar ve transkripsiyonu düzenleyen komplekslerin DNA'ya bağlanmasını değiştirerek etkili olurlar. Birçok histon modifikasyonu geri dönüştürülebilir. Bu nedenle modifikasyon seviyesi transkripsiyon seviyesi ile sıkı bir ilişki içerisindedir.

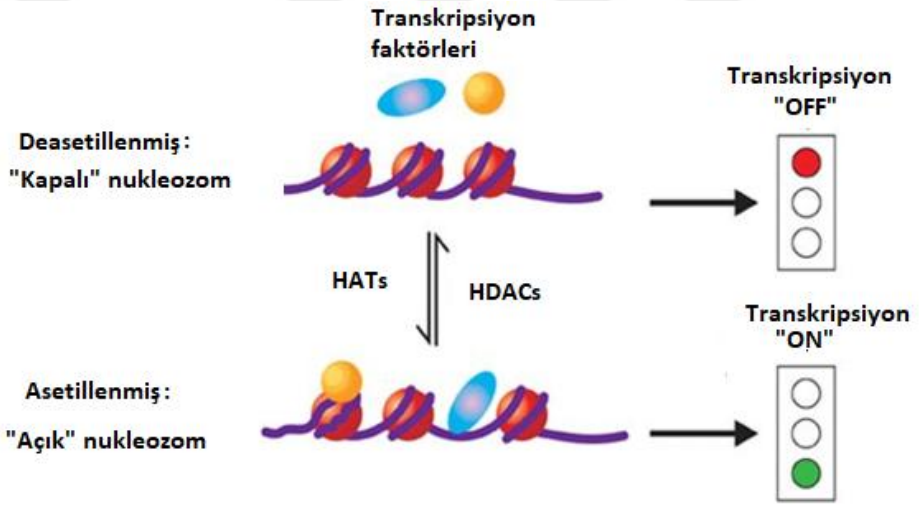
2.4.2.1. Kovalent Histon Modifikasyonları

Genin transkripsiyonal yolaklarının düzenlenmesini yöneten faktörlerdir. Modifikasyonlar gendeki histon proteinlerinin elektrostatik yükünü etkiler ve kromatin yapısını değiştirir böylece protein kompleksleri için tanıma bölgeleri oluşturur. Histon

uzantıları, histon modifiye edici enzimlerle metilasyon / demetilasyon ve asetilasyon / deasetilasyon gibi mekanizmalar ile translasyonel olarak modifiye edilir. Başlıca Metilasyon , Asetilasyon, Fosforilasyon , Ubikitinasyon , S-nitrosilasyon ve Sumolasyon gibi mekanizmaları içerir.

Asetilasyon:

Asetilasyon, histon proteinlerinin lizin kalıntılarına asetil gruplarının bağlanmasıdır. Asetilasyonu taklit eden mutasyonların varlığı posttranslasyonel modifikasyonları ve deasetilaz aktivitesini etkilemektedir. Histon asetilaz (HATs) ve Histon deasetilaz enzimleri (HDACs) ile çift yönlü olarak kontrol edilir. Metilasyonun aksine; asetilasyon gen ifadesini aktive ederken, deasetilasyon baskılar (Şekil 2-6).



Şekil 2-6: Asetilasyon Reaksiyonları ile Gen İfadesinin Regülasyonu.

Metilasyon: Histon metiltransferaz enzimleri katalizörlüğünde histon yapısında bulunan amino asitlere 1 ila 3 metil grubunun (tri-metilasyon) eklenmesi olayıdır. Bu şekilde gerçekleşen modifikasyonlar bir genin ifade edilip edilmeyeceğini yani o genin açık veya kapalı konumunu (switch on / switch off) ifade eder. Bir genin Açık/Kapalı konumda oluşu o hücrenin tipine göre farklılık gösterir.

Fosforilasyon: Histon deasetilaz enzimlerine fosfat gruplarının geri dönüşümlü olarak bağlanmasıdır. Fosfatlar histon deasetilazlara serin, treonin ve tirozin kalıntıları üzerinden bağlanır. Fosforilasyon reaksiyonları protein kinazlar (PK) ve protein fosfatazlar (PP) tarafından gerçekleştirilen reaksiyonlardır.

S nitrozilasyon: Histon deasetilazlara sisteinkalıntılarında nitrik oksit (NO) grubunun bağlanmasıdır. Bu olay enzimin katalitik aktivitesini etkileyerek korepresörlerin kromatinden ayrılamamasına neden olur.

Ubukitinasyon: Ubukitin lizin kalıntısına bağlanabilen küçük bir proteindir. Üç aşamalı enzimatik bir reaksiyonun oluşumuna neden olarak proteinlerin yıkılma yolu olan proteosom yolağına girmesine ve degrade olmasına neden olur. Bu reaksiyonlar, E1, E2, E3 enzimleri ile katalizlenir.

Sumolasyon: SUMO (small ubuquitin like modifier) 1,2 ve 3 proteinlerinin ubukitin ile kondensasyonudur. SUMO proteinleri ubukutine benzer ve lizin kalıntılarından proteinlere bağlanır. Ancak sonuçta protein degradasyonu engellenir.

2.4.2.2. Nonkovalent Histon Modifikasyonları

Histon alış-verişleri, histon kalıtımları, kromatinin tamiri, kodlanmayan RNA'lar ile etkileşim, virüsler ve farklı protein grupları ile etkileşimler, uzun mesafe kromozom etkileşimleri (hem kromozom içi hem kromozomlar arası) ve nonkovalent histon modifikasyonları şeklinde gerçekleşen olaylardır.

2.4.3. miRNA aracılı düzenlemeler

Post transkripsiyonel süreçte, kodlanmayan RNA'ların mesajcı RNA (mRNA) üzerinden protein sentezini engellemesi şeklinde gerçekleşen modifikasyonlardır. miRNA'lar kodlama yapmayan, 19-22 oligonükteotid uzuluğunda küçük RNA molekülleridir. Hedef mRNA'ların 3'ucuna bağlanarak translasyonu engelleyen miR'lar mRNA'ların yıkımına yol açarlar. Bunlar spesifik gen düzenleyicileridir ve gen ifadesini kontrol ederler. miRNA'lar hedef genin ifadesini mRNA'nın posttranslayonel parçalanmasını veya protein sentezinin translasyon aşamasında baskılanmasını sağlayarak durdurmaktadır (Kim ve diğ.,2008). miRNA'ların üretimi, DNA metilasyonları ve histon modifikasyonları aracılığıyla transkripsiyonel olarak düzenlenir. miRNA'lar kromatinin yapılanmasını ve histon modifikasyonunu kontrol eden anahtar enzimler aracılığı ile dolaylı yoldan gen ifadesini etkilerler.

2.5. DNA Metilasyon Düzeyleri ve Kanser İlişkisi

DNA metilasyonu ve kanser ilişkisi ilk kez 1983 yılında yapılan bir çalışmada kanser hücre genomlarının normal hücrelere göre hipometile olduğunun bulunması ile ortaya

konmuştur. Normal hücrelerde önemli düzenleyici rolü olan epigenetik modifikasyonlar karsinogenez sırasında bozulmaktadır. Kanserde anormal DNA metilasyonu iki şekilde ortaya çıkmaktadır:

"Genom-genel hipometilasyon"

Kanserlerde, tekrarlı diziler anormal hipometilasyon gösterir, bu da genomik kararlılığı bozar ve kanser oluşumunu teşvik eder (Chen ve diğ., 1998; Yamada ve diğ., 2005).

"Gen spesifik anormal metilasyon"

Promoter CpG adalarının normal metilasyon profilinin dışında hipermetilasyonu veya hipometilasyonu gen ekspresyonunda anormal değişimlere neden olur. Promoter CpG adalarının hipermetilasyonu uygun olmayan transkripsiyonel susturmaya yol açar. Buna karşılık promoter CpG adalarının hipometilasyonu gen ekspresyonunu uyarır ve bu durum onkogenlerin aşırı ekspresyonuna neden olur (Feinberg ve Tyoko, 2004).

Sağlıklı dokularda tümör baskılayıcı genlerin promoter bölgeleri hipometillenmiş, onkogenlerin ise promoter bölgeleri hipermetillenmiş durumdadır Tümör baskılayıcı genlerin promoter bölgelerinin hipermetilasyon sonucu susturulduğu, promoter bölgeleri hipometile durumda olan onkogenlerin ise ifadesinin arttığı tümör hücrelerinde gösterilmiştir (Feinberg ve Tyoko, 2004; Vogelstein ve diğ., 2013; Matsusaka ve diğ., 2014).

2.5.1. Global DNA Hipometilasyonu

Kanser hücreleri normal hücrelere kıyasla tüm genom boyunca azalmış metilasyon seviyeleri sahiptirler. DNA'daki tekrarlı diziler, sentromerik bölgede ve gen body bölgelerindeki CpG lerde global DNA metilasyon kaybı ile; kromozal instabiliteye neden olarak veya transpozon aktivitesi, impriting kaybı (örnek; IGF-2 geni impriting kaybı sonucu akciğer, kolon, karaciğer, over kanserleri ve Wilms' tümörü gelişmesi), inaktif doku spesifik genlerin aktivasyonu ve protoonkogenlerin aktivasyonu sonucu hücreleri kansere yönlendirir.

Genomik metilasyon kaybı, kanserin erken evrelerinde daha sık gerçekleşir. Prognozu etkileyen ve birçok tümör tipinde metastatik potansiyel oluşturan bir durumdur. Sağlıklı hücrelerde hipermetilasyon durumunda olması beklenen, tekrar bölgelerince zengin perisentrik heterokromatin bölgeler, kanser hücrelerinde hipometilasyon durumuna geçerek onkogenlerin ve metastaz ile ilişkili genlerin ekspresyonunun artmasına neden olmaktadır. Bu

durum, proliferasyon artışı ve genomik kararsızlık gibi kanserleşmiş hücreleri diğer hücrelerden ayıran karakteristik özelliklerin ortaya çıkmasını sağlamaktadır.

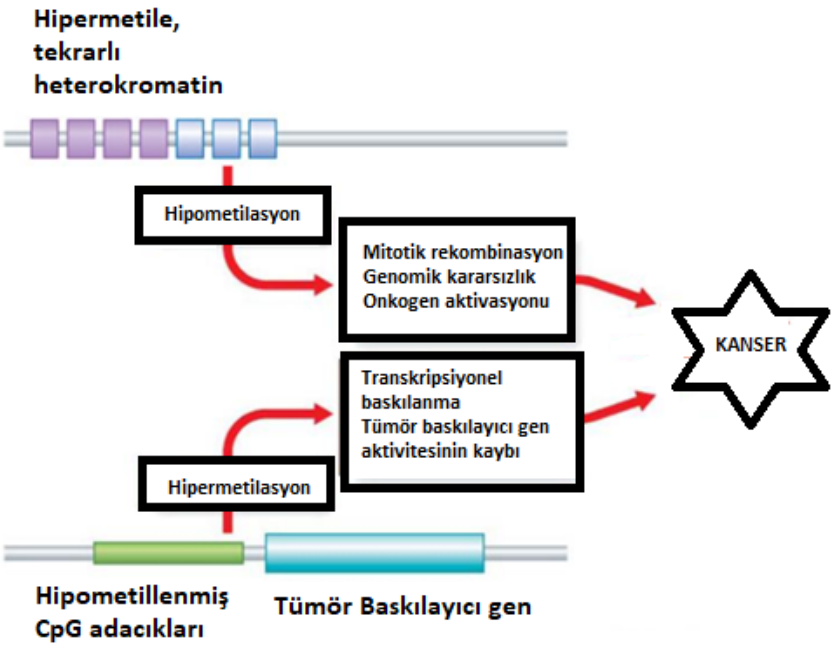
Global hipometilasyon birçok tümör tipinde DNA metiltransferaz (DNMT) aktivitesini arttırır. Bu artışın malignant hücrelerin çoğalma hızı ile ilgili olabileceği düşünülmektedir.. (Robertson, 2005).

2.5.2. Gen spesifik anormal metilasyon

Tümör Süpressör genlerde hipermetilasyon

Kanserleşmiş hücrelerde tümör baskılayıcı genlerin promoter bölge CpG adacıklarının metillenmesi sonucu çok sayıda tümör supressor gen susar ve kontrolsüz hücre bölünmesi engellenemez, hücre karsinogeneze yönlendirilmiş olur (Şekil 2-7). Çift vuruş hipotezine göre mutasyonla susan tümör supressor genlerin diğer aleli metilasyonla sustuğunda kanser gelişir (Kim, 2003). Tümörün tipine bağlı olarak hipermetile olan tümör supressor gen miktarı ve metilasyon statüleri değişir. RASSF1A ve p16 gibi bazı tümör supressor genleri çoğu kanser tipinde ortak olarak hipermetile durumdadır. Kanser tiplerine göre tümör supressor genlerin metilasyon durumu farklılık göstermektedir. Örneğin GSTP1 geni prostat kanserlerinde %90 oranında metile iken akut miyeloid lösemide çoğunlukla metillenmemiştir. Tümör supressor genlerde bu mekanizma ile susturma genetik mutasyonlardan sıktır. Karsinogenezin erken evrelerinde ortaya çıkabilir ve her hasta bu durumdan farklı etkilenir.

DNA metilasyonunun geri dönüşümlü olması kanser tedavisine yeni bir yaklaşım getirmiş ve bazı DNA metiltransferaz inhibitörleri klinik kullanıma girmiştir (Bourc'his, 2001).



Şekil 2-7: Karsinogenezde Anormal DNA Metilasyonu.

Onkogenlerde Hipometilasyon:

Tekrarlı dizilerde anormal hipometilasyon genomik kararlılığı bozar ve kanser oluşumunu teşvik eder (Chen ve diğ. 1998; Yamada ve diğ. 2005). Promoter bölgeleri hipometile olan onkogenlerin ifadesinin arttığı tümör hücrelerinde gösterilmiştir. Gen spesifik hipometilasyon ya da genomik metilasyon kaybı, karsinogenezin erken evrelerinde oldukça sık gerçekleşen, prognozu etkileyen ve birçok kanser tipinde metastatik potansiyele sahip bir durumdur. Normal hücrelerde hipermetile durumda olması beklenen, tekrar bölgelerince zengin perisentrik heterokromatin bölgeler, karsinogenezde hipometilasyona uğrayarak onkogenlerin ve metastaz ile ilişkili genlerin ekspresyonlarının artmasına neden olmaktadır. Bu durum, proliferasyon ve genomik kararsızlık gibi kanser hücrelerini diğer hücrelerden ayıran karakteristik özelliklerin ortaya çıkmasına neden olmaktadır. İnsan genomunun yaklaşık %18 kadarını oluşturan LINE 1 tekrar elementi, mesane kanserlerinin %70'inde hipometillenmiş olup, MET onkogeninin aktivasyonu ile ilişkili bulunmuştur (Wolff ve diğ. 2010). Genomdaki en yaygın tekrar dizisi olan «Alu tekrar dizisi» ile yapılan bir çalışmada sağlıklı bireylerde bu dizilerin düşük oranda hipometile olduğu, kolon kanserli vakalarda ise hipometilasyon oranının arttığı gösterilmiştir (Jordà ve diğ., 2017).

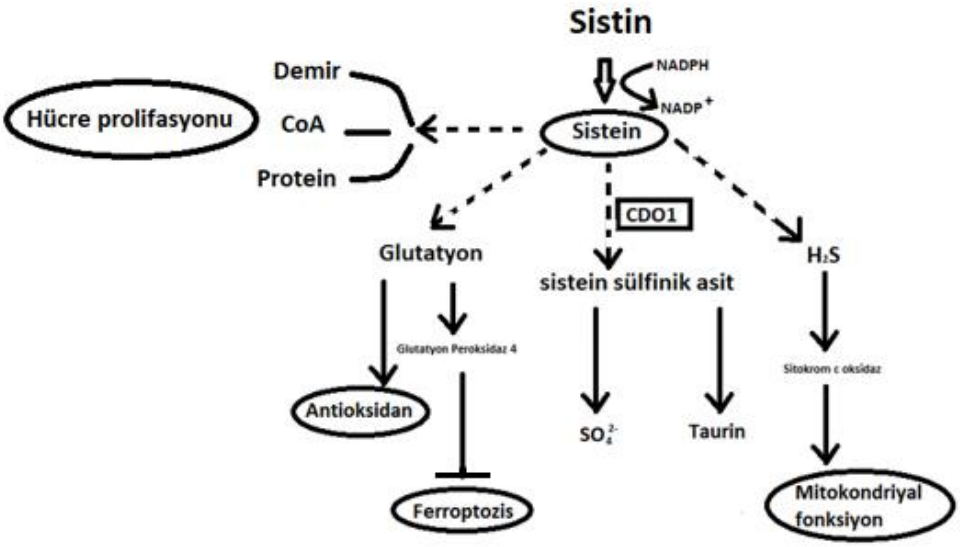
2.5.3. Gankyrin (PSMD10) Promoter Metilasyon Düzeyleri ve Mide Kanseri

Gankyrin (PSMD10 veya p28GANK olarak da adlandırılır) PSDM10 geni tarafından kodlanan bir enzim olup, 26S proteozomun 19S düzenleyici bölümünün altbirimidir (altbirim 10). Protein-protein etkileşimini sağlayarak hücre döngüsü kontrolünde ve protein yıkımında önemli rol oynar. Gankyrin siklin bağımlı kinaz CDK4, tümör baskılayıcı retinoblastoma (Rb) proteini ve Mdm2 proteini ile kompleks oluşturur (Mdm2, bir tümör baskılayıcı olan P53'ün yıkımında görev alan E3 ubikuitin ligaz'dır). Gankyrin aşırı ekspresyonu Rb proteininin hiperfosforilasyon ve yıkımı ile korele bulunmuştur (Krzywda ve diğ., 2004). Ayrıca gankyrin anti-apoptotik etkiye sahiptir ve hepatoselüler karsinom gibi belirli tümör tiplerinde aşırı eksprese edildiği belirlenmiştir (Higashitsuji ve diğ., 2005). Moleküler düzeydeki çalışmalar gankyrin aşırı ekspresyonunun hücre döngüsü, hücre büyümesi ve apoptoz gibi süreçleri kontrol eden çeşitli sinyal yollarını etkileyerek tümör başlangıcında ve ilerlemesinde rol oynadığını, gankyrin ekspresyon azalmasının ise hücre büyümesi, proliferasyon ve metastazı önemli ölçüde inhibe ettiğini ortaya koymuştur (Su ve diğ., 2015). Ayrıca gankyrin aşırı ekspresyonunun mide kanserinde çoklu ilaç direnci ile ilişkili olduğunu gösteren bulgular da vardır (Li ve diğ.,2018; Li ve diğ., 2009). Bu nedenle, gankyrinin kanser takibinde iyi bir potansiyel belirteç olduğu öngörülmektedir.

2.5.4. CDO1 Promoter Metilasyon Düzeyleri ve Mide Kanseri

Sistein deoksijenaz tip 1 (CDO1), demir içeren non-hem formunda bir enzimdir. Sistein metabolizması direkt veya indirekt olarak CDO1 tarafından düzenlenir. Sistein hücrede CDO1 tarafından katabolize edilirken diğer taraftan glutatyon sentezine ve desülfanizasyon reaksiyonları ile H_2S üretimine katılan önemli bir aminoasittir. Bu yolakların düzenlenmesinde CDO1 anahtar bir role sahiptir. Sistein metabolizmasında sistein'inin sistein sülfinik aside yıkılmasını katalizler. Sistein sülfinik asit de sülfat ve taurin'e dönüşür böylece hücrede sistein birikimi engellenir. Hücrede sistein birikmesi nörotoksisiteye ve sitotoksisiteye neden olur. CDO1 bu mekanizma üzerinden lipid metabolizması, adipogenez, osteoblastik farklılaşma, redoks homeostazı, fertilite, safra asidi metabolizması, sülfür metabolizması ve organizmanın büyüme ve gelişmesi dahil olmak üzere bir çok fizyolojik sürece katılır. Patofizyolojik süreçte hücrede CDO1 miktarını belirleyen en önemli düzenleyici faktör epigenetik modifikasyonlardır. CDO1geninin hipermetilasyonu sonucu hücrede düşük CDO1 seviyeleri karsinogenez ile ilişkili iken yüksek CDO1 ekspresyon

düzeyleri kanser hücrelerinin ferroptozisi ile ilişkilidir. Ferroptosis demir bağımlı apoptotik olmayan hücre ölümü olup, lipid onarım enzimi olan glutatyon peroksidaz 4'ün (GPX4) aktivitesinin kaybı ile karakterizedir. Glutatyon bağımlı bir enzim olarak GPX4, ROS üretimini inhibe ederek hücrelerin ferroptozunu inhibe eder (Conrad ve diğ.,2015). Brait ve ark.'nın (2012) meme, yemek borusu, akciğer, mesane ve mide kanseri dokularında yaptıkları çalışmalarda CDO1 gen promotörü yüksek oranda metile bulunmuştur. Ayrıca yapılan çeşitli çalışmalarda CDO1 promotörü metilasyon seviyelerinin kanserin progresyonu ve prognozu ile yakından ilişkili olduğu ifade edilmiştir (Jeschke ve diğ., 2013; Ooki ve diğ. 2017; Wang ve diğ., 2020). CDO1 geninin karsinogenezdeki rolü bir kaç mekanizma ile açıklanabilir (Şekil 2-8). CDO1, sistein katabolize ederek hücre içi sistein seviyesini azalmaktatır. CDO1'in baskılanması sistein katabolizmasını azaltarak hücre içi sistein seviyesini arttırır. Ek olarak, CDO1'in epigenetik olarak susturulması, SO_3^{2-} üretimini azaltabilir ve sistinin SO_3^{2-} ile reaksiyonundanu engelleyerek sistein-S-sülfat üretimini azaltabilir. Sistin, hücre içi sistein için kaynak olduğundan, sistein-S-sülfat'ın azaltılmış oluşumu, serbest sistin düzeyini artıracak ve böylece dolaylı olarak hücre içi sistein düzeyi artacaktır. Hücre içi sistein, kanser hücresi proliferasyonu için önemli olan proteinlerin, CoA ve Fe-S bileşiklerinin sentezinde yer alır. Diğer taraftan, hücre dışı sistin, taşıyıcı protein aracılığı ile hücre içine girdikten sonra elektron vericisi olarak NADPH'ın kullanıldığı bir reaksiyonla sisteine dönüşür. Bu reaksiyon sırasında büyük miktarda NADPH tüketilir. CDO1'in susturulması sisteinin hücre içi seviyesini artıracak ve bu da sistinin hücre dışı alandan taşınması ihtiyacını azaltarak NADPH tüketiminin azalmasına ve $NADPH/NADP^+$ oranının artmasına neden olacaktır. Hücre içinde $NADPH/NADP^+$ oranının artmasının kanser hücrelerinde proliferasyonu arttırdığı bilinmektedir (Chen ve diğ., 2021). CDO1'in promotör metilasyonunun artması (genin susturulması) CDO1 gen ekspresyonunun azalması ile sonuçlanır, bu durum kanserin malignitesini arttırır. Kanser hücrelerinde, CDO1 susturulması, Glutatyon üretimini teşvik edebilir ve ardından kanser hücrelerinin oksidatif strese adaptasyonunu iyileştirebilir (Dominy ve diğ., 2007). Ayrıca CDO1 inhibe edildiğinde, Glutatyon sentezi artar, bu da GPX4'ün aktivitesini arttırır ve kanser hücrelerinin ferroptozunu inhibe eder (Conrad ve diğ., 2015). Diğer taraftan, CDO1 susturulması, H_2S üretiminin artmasına ve mitokondriyal fonksiyonu engellenerek kanser hücrelerinde Warburg etkisinin desteklenmesine yol açar. Bu nedenlerden dolayı, CDO1'in , bir tümör baskılayıcı gen olarak işlev gördüğü kabul edilmektedir (Chen ve diğ., 2021).



Şekil 2-8: Hücrede Sistein Metabolik Yolakları ve Karsinogenez ile İlişkisi.

Fare deneylerinde CDO1'in protein fonksiyonunun düzenlenmesinde ve antioksidan savunma mekanizmalarında rol oynadığı düşünülmekte ve yeni bir tümör baskılayıcı gen olduğu ileri sürülmektedir (Kwon ve diğ., 2015). İnsan CDO1 geni, ilerlemiş akciğer kanserinde sık sık silinmiş olan 5 q23.2 kromozomunda bulunur (Ueno ve diğ., 1998). CDO1'in yer aldığı kromozomal bölgenin (5 q23.2) silinmesi veya epigenetik olarak susturulması kolorektal tümör oluşumuna katkıda bulunan bir mekanizma olarak ileri sürülmektedir (Ushiku., ve diğ., 2017). Agresif kutanöz T hücreli lenfoma olan Sézary sendromunda CDO1'in aşırı eksprese edildiği belirlenmiştir (Booken ve diğ., 2008). Öte yandan CDO1 kemoterapi direnci ile de ilişkilendirilmiştir. CDO1 sisteinden glutatyon üretimini baskılar ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumunu indükleyerek apoptozu teşvik eder (Cho ve diğ., 2011). CDO1 geni susturulduğunda hücrenin reaktif oksijen türlerini inaktive etme kapasitesinin arttığı ve bunun sonucunda ROS üreten kemoterapi ajanlarına karşı direnç geliştiği belirlenmiştir (Jeschke ve diğ., 2013; Kwon ve diğ., 2015). CDO1 geninin susturulması sonucu aktiflenen ve hücreleri karsinogeneze götüren bu yolaklar nedeni ile kanser hücrelerinde CDO1'in aşırı ekspresyonunu hedef alan epigenetik yaklaşımlar kanser tedavisi için alternatif bir yöntem sunabilir.

2.5.5. Epigenetik Kanser Terapisi

DNA metilasyon değişiklikleri erken dönemde olduğundan kanserin erken teşhisi için önemli bir parametredir. Epigenetik süreçlerin hedef alındığı tedavi yaklaşımlarında Histon Deasetilaz (HDAC) İnhibitörleri ve/veya DNA Metiltransferase (DNMT) İnhibitörleri kullanılarak "tümör supressör genlerin" yeniden aktivasyonu amaçlanmaktadır.

Bir bireydeki tüm hücreler aynı DNA sekansına sahip olsa da, belirli hücrelerde, spesifik gen lokuslarında çeşitli epigenetik düzenlemeler gerçekleşir. Kanserde, bu spesifik genlerde meydana gelen metilasyon değişikliklerinin belirlenmesinin, promoter metilasyonu ile ilgili bu değişikliklerin hastalığa ait patolojik verilerle (tümör tipi, grade, klinik evre, lokal invazyon, metastaz) ilişkisinin ortaya konmasının hastalığın erken tanı almasında, tedavinin planlanmasında, hastanın takibinde yararlı olabileceği, ve ilaç geliştirme çalışmalarına katkı sağlayabileceği düşünülmektedir.

Günümüzde yapılan çalışmalarda çok sayıda spesifik gen ve tümör tipi, genlerin anormal metilasyon seviyeleri ile ilşkilendirilmiştir (Yüksel ve Dinçer, 2020).

Beyin tümörlerinin sınıflandırılmasında DNA metilasyon profillerinin belirlenmesi en önemli unsuru oluşturmaktadır. Ayrıca, metilasyon profillerinin çeşitli algoritmalar kullanılarak değerlendirilmesinin tanısal önemi yüksektir (Pickles ve diğ., 2020).

Meme kanserinde 229 CpG adası tümör evresi ve tedavi ile ilişkili bulunmuş ve bunlardan 8 tanesinin potansiyel bir biomarker olabileceği ifade edilmiştir (Li ve Li, 2020).

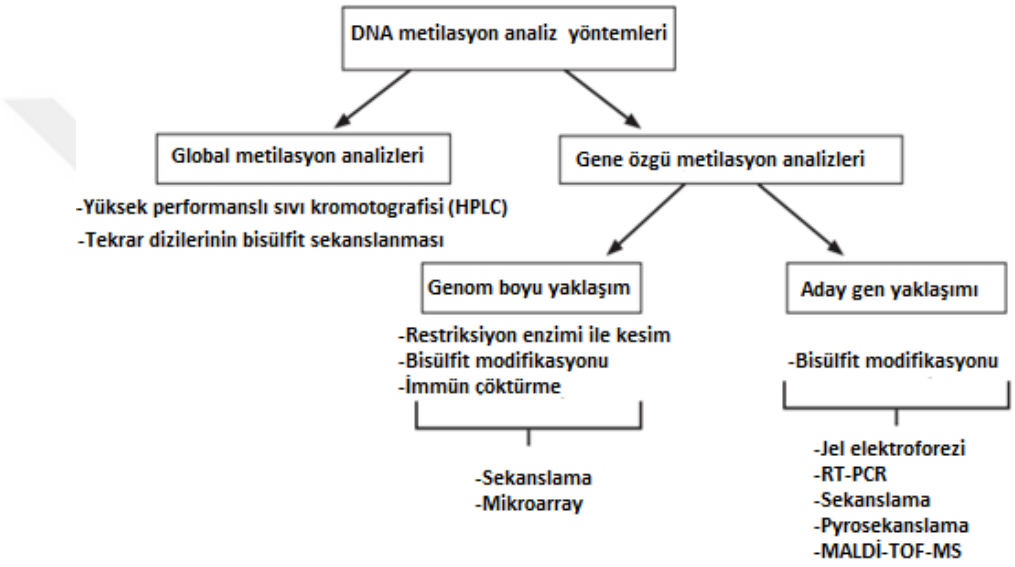
2.5.5.1. Kanser tedvisinde DNA metil transferaz inhibitörleri

Kanserde epigenetik terapi çalışmalarının başında DNA metiltransferaz ve histon deasetilaz inhibitörlerinin kullanımı gelmektedir. Bazı DNA metilasyon ve histon deasetilaz inhibitörleri anti kanser ilaçlar olarak Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi tarafından onaylanmıştır. DNA metiltransferaz inhibitörleri, genin promoter bölgesindeki metilasyonu inhibe ederek susturulmuş tümör baskılayıcı genin yeniden aktive olmasını sağlarlar. DNA metiltransferaz inhibitörleri kanser türüne özgü olmadıkları için bir çok kanser türünün tedavisinde güvenli bir şekilde kullanılabilirler. DNA metiltransferaz inhibitörlerini içeren ilaçlar geliştirilirken nükleozid ve non-nükleozid analogları içeren DNA metiltransferaz inhibitörlerine odaklanılmıştır. İlk geliştirilen ve en sık kullanılan DNA metiltransferaz inhibitörü ilaç olan 5-azacytidine FDA onaylıdır ve birçok solid tümör tipinin tedavisinde kullanılmaktadır. Sonrasında 5'-Aza-2' Deoxycytidine, 5'-Fluoro-2' Deoxycytidine, Zebularine gibi birçok DNA metiltransferaz inhibitörü ilaç geliştirilmiştir. Ancak bu ilaçların yan etkileri olarak

kromozom yeniden düzenlenmesine bağlı sitotoksisite görülebildiğinden bu olasılık hekim tarafından değerlendirilmelidir.

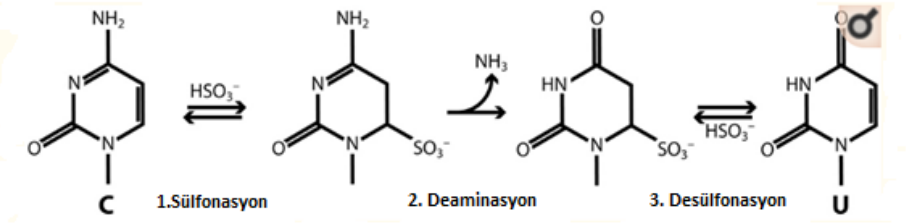
2.5.6. DNA Metilasyonu Analiz Yöntemleri

DNA Metilasyon statülerinin ölçümü için birçok yöntem kullanılmaktadır (Şekil 2-9). Yeni yöntemler aracılığı ile gen bölgesi bazında ve/veya bütün bir genom boyunca metilasyon düzeylerini ölçmek mümkündür. Bu amaçla geliştirilen birçok teknik «sodium bisülfit treatment» yöntemiyle bisülfit modifikasyonu yapılmış DNA örneklerini kullanmaktadır.



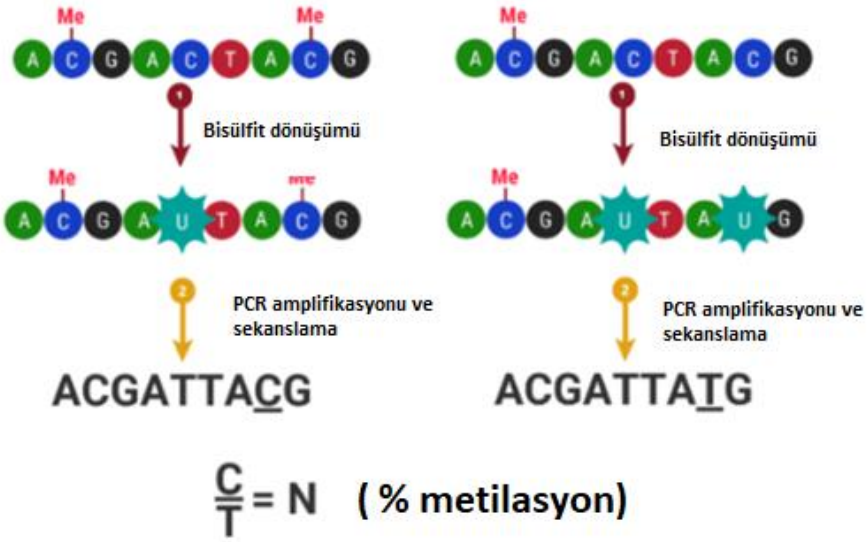
Şekil 2-9: DNA Metilasyonu Analiz Yöntemleri.

Metilasyon ölçümü için bisülfit modifikasyonu yöntemi "altın standart" olarak kabul edilmektedir. Bu yönteme göre DNA baz diziliminde **metillenmemiş** olan bütün sitozin bazları kimyasal bir reaksiyonla urasil'e dönüştürülür. Metile sitozinler etkilenmez, sitozin olarak kalır (Şekil 2-10).



Şekil 2-10: Bisülfit Modifikasyonu.

Dönüşüm işlemi bittikten sonra DNA PCR ile çoğaltılır ve sekanslama işlemi uygulanarak DNA'nın metilasyon seviyeleri belirlenir. Sekanslama işlemi sırasında Urasile çevrilmiş olan metillenmemiş sitozinler timin olarak ölçülürken, metillenmiş sitozinler ise sitozin olarak ölçülür (Şekil 2-11).



Şekil 2-11: DNA Metilasyon Statülerinin Belirlenmesi.

Bisülfit dönüşümü yapılan DNA; PCR, RtPCR, MSP, VCOBRA, SNuPE, Qmsp, HRM, MassArray gibi farklı teknikler ile kullanılmak üzere uygundur.

3. YÖNTEM

3.1. Gereçler

- Derin dondurucu (- 80 0C) (Rua Instruments)
- Santrifüj (Bifuge stratus Heraeus Instruments)
- Ependorf santrifüjü (Hettich Mikro 200R)
- Real-time Pcr System - Real Time PCR Thermal Cycler (Roche Diagnostics)
- Brand Transferpette® S 0.1-1 Ul Ayarlanabilir Otomatik Pipetler
- PCR microtüpleri (Merc)

3.2. Kimyasallar

- Xylene (Cas No. 1330-20-7 - Buy Online at Sigma-Aldrich)
- Etil alkol (MERCK 100986 Ethanol Absolute Extra Pure Ph Eur,Bp,Usp)
- Distile su (HPLC grade 7732-18 - SigmaAldrich.com)

3.3. Kontrol ve Hasta Gruplarının Özellikleri

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar etik kurulu'nun onayı alınarak gerçekleştirildi. Çalışmaya katılmayı kabul eden tüm vakalara bilgilendirme formu verildi ve imzalı onay alındı.

Olguların çalışmaya Alınma Ölçütleri:

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Hastanesi Genel Cerrahi Anabilimdalı'nda tedavi edilen, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Hastanesi Patoloji Anabilim Dalı tarafından patolojik evrelemesi yapılan primer gastrik karsinom tanılı 60 hastadan (Yaş 61,31 ± 10,78 olan 36 erkek, yaş 59,54 ± 15,02 olan 24 kadın) alınan tümör dokusu örnekleri kullanılarak prospektif olarak yapıldı. Kronik gastrit tanılı hastalardan alınan biyopsi örnekleri ile 40 kişilik (Yaş 64,68 ± 9,67 olan 19 erkek, Yaş 60,24 ± 10,67 olan 21 kadın) kontrol grubu oluşturuldu. Çalışmaya 2010-2020 yılları arasında İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Hastanesi'nde cerrahi tedavi uygulanan primer gastrik kanserli olgular dahil edildi.

Çalışmaya alınan hastaların demografik (yaş, cinsiyet) ve patolojik (tümör tipi, klinik evre, tümör lokalizasyonu, tümör boyutu, histolojik grade, diferansiyasyon, lokal invazyon, metastaz) özellikleri Genel Cerrahi Anabilimdalı tarafından oluşturulan dosya ve Patoloji Anabilim Dalı tarafından arşivlenen kayıtlardan alındı Çalışmaya uygun 100 vakaya ait formalinle fikse edilmiş parafin bloklar (tümör dokusu ve kronik gastrit dokuları) Patoloji Anabilim Dalı arşivinden sağlandı.

Çalışmadan Dışlanma Ölçütleri:

Cerrahi tedavi öncesi kemoterapi/radyoterapi alan olgular çalışmaya dahil edilmemiştir.

3.4. Yöntemler

3.4.1. Çalışmada kullanılacak laboratuar ve klinik değerlendirme yöntemleri :

Doku örneklerinden DNA izole edildikten sonra gankyrin ve CDO1 genlerinin promoter metilasyon profili bisülfit dönüşümü, genomik dizileme yöntemi (Kaneda ve diğ., 2004) ile belirlenmiştir. Gankyrin ve CDO1 ekspresyonu immunositokimyasal analizle (Remmele ve Stegner, 1987) araştırılmıştır.

3.4.2. Tümör dokusu ve iyi huylu mide lezyonlarından DNA Eldesi

Tümör dokusu ve iyi huylu mide lezyonlarından DNA Eldesi için Ticari kit (ZymoResearch Quick-DNA Miniprep Plus Kit Cat no: D4068) kullanıldı.

Prensip:

Formalinle fikse edilmiş, parafine gömülü dokulardan DNA izolasyonu, bu tipte dokular için özel olarak tasarlanmış Quick-DNA FFPE Kiti (Zymo Research, Orange, CA, USA) kullanılarak yapılmıştır. İlk aşamada dokulardaki parafin uzaklaştırılmış ve proteinaz K ile yıkım işlemi gerçekleştirilmiştir. Daha sonra kitteki Fast-Spin kolonu ile DNA saflaştırılmıştır. İzole edilen DNA örneklerinin konsantrasyon ve saflık değerleri NanoDrop ScientificTM 1000 (Thermo Fisher, Delaware, USA) cihazı ile ölçülmüştür.

Gereç ve Kimyasallar:

- Proteinase K & Storage Buffer
- Solid Doku Tamponu
- Genomik Bağlama Tamponu
- DNA Ön Yıkama Tamponu
- g-DNA Yıkama Tamponu
- DNA Elüsyon Tamponu
- Zymo-Spin™ IIC-XLR Kolonları
- Toplama Tüpleri

Protokol

- Parafinize Dokulardan Parafinin Uzaklaştırılması

1. Mikrosantrifüj tüplerinde bulunan örneklere 750 µl ksilen eklendi.
2. Numuneler vortekslenerek 1 saat boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi.
3. 1 dakika boyunca 12.000 x g'de santrifüj uygulandı ve ksileni numuneden çıkartılarak tekrardan 750 µl ksilen eklendi.
4. Bekleme süresinin ardından ksilen numuneden uzaklaştırıldı ve 1 ml etanol (%100) ile yıkandı, kısaca vortekslendi ve hafifçe sallanarak 5 dakika inkübe edildi. 1 dakika

boyunca ≥ 12.000 x g'de santrifüj uygulandı, süpernatant atıldı ve bu basamak tekrarlandı.

5. Ardından 1 ml etanol (%95) ile yıkandı, kısaca vortekslendi ve hafifçe sallanarak 5 dakika inkübe edildi. 1 dakika süreyle ≥ 12.000 x g'de santrifüj uygulandı, süpernatant atıldı ve bu basamak tekrarlandı.
6. Ardından 1 ml etanol (%75) ile yıkandı, kısaca vortekslendi ve hafifçe sallanarak 5 dakika inkübe edildi. 1 dakika süreyle ≥ 12.000 x g'de santrifüj uygulandı, süpernatant atıldı ve bu basamak tekrarlandı.
7. 1 ml ddH_2O ile yıkandı, kısaca vortekslendi ve hafifçe sallanarak 5 dakika inkübe edildi. 1 dakika süreyle ≥ 12.000 x g'de santrifüj uygulandı ve numuneden su çıkartıldı.

- DNA İzolasyonu

1. Proteinaz K sindirimi için deparafinize olmuş dokular 45 µl ddH2O, 45 µl Solid Doku Tamponu ve 10 µl Proteinaz K ile iyice karıştırıldı veya 10-15 saniye vortekslendi ve 55°C'de 12-16 saat inkübe edildi. Daha sonra tüpler 94ºC'de 20 dakika daha inkübe edildi.
2. Tüpe 6 hacim Genomik Bağlama Tamponu eklendi ve 15 saniye vorteksleyerek iyice karıştırıldı. Çözünmeyen kalıntıları çöktürmek için 1 dakika süreyle ≥ 12.000 x g'de santrifüj uygulandı.
3. Karışımı (süpernatan) bir Toplama Tüpünde bir Zymo-Spin™ IIC-XLR kolonuna aktarıldı. 1 dakika süreyle ≥ 12.000 x g'de santrifüj uygulandı. İçi sıvı dolan Toplama Tüpünü atıldı ve kolonlar yeni toplama tüplerine yerleştirildi.
4. Kolonlara 400 µl DNA Ön Yıkama Tamponu eklendi. 1 dakika boyunca ≥12.000 x g'de santrifüjlendi. Toplama Tüpünü boşaltıldı.
5. Kolonlara 700 µl g-DNA Yıkama Tamponu eklendi. 1 dakika süreyle ≥ 12.000 x g'de santrifüj uygulandı. Toplama Tüpü boşaltıldı.
6. Doğrudan kolonun matrisi üzerine 200 µl g-DNA Yıkama Tamponu ilave edildi. 1 dakika süreyle ≥ 12.000 x g'de santrifüj uygulandı. Toplama Tüpleri atıldı.
7. Kolonlar temiz bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. Doğrudan matris üzerine ≥ 50 µl DNA Elüsyon Tamponu eklendi. 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi, ardından

DNA'yı elüe etmek için en yüksek hızda 1 dakika süreyle soğutmalı santrifüj uygulandı. Elüe edilen DNA ileride kullanılmak üzere ≤ -20ºC'de saklandı.

DNA konsantrasyonunun belirlenmesi: DNA konsantrasyonunun ve saflığının tespit edilmesi için Nano Drop cihazında 260 ve 280 nm dalga boyunda ısığı soğurma (OD) ölçümleri yapıldı. Spektrofotometrik olarak 260 nm ve 280 nm dalga boylarında yapılan ölçümlerle DNA'nın saflığı ve konsantrasyonu belirlendi. 50µg/ml çift iplikçikli DNA içeriğinin 260 nm dalga boyunda 1 optik densite (OD) verdiği kabul edilmektedir. 260 nm'deki ölçüm değeri aşağıdaki formüle uygulanarak DNA konsantrasyonu hesaplandı. DNA örneklerinin saflığı OD260/ OD280 oranı kullanılarak belirlendi. Yeterince iyi saflıkta kabul edilebilir DNA'nın OD260/ OD280 değeri yaklaşık olarak 1.8'dir. Fenol veya protein varlığında bu oran 1.8'den küçük olacaktır. OD260/ OD280 değeri 2'den büyükse, ortamda RNA bulunduğu anlamına gelir.

3.4.3. Gankyrin ve CDO1 genlerinin promoter metilasyon profilinin belirlenmesi

Gankyrin ve CDO1 genlerinin promoter metilasyon profilinin belirlenmesinde ticari kit kullanıldı. (ZymoResearch EZ DNA Methylation-Gold™ Kit Cat No: D5005)

Prensip:

Parafin bloklardan izole edilen DNA örneklerinde (1 µg), EZ DNA Methylation Kit yardımıyla bisülfit modifikasyonu yapılmıştır. DNA'nın metilasyon statüsünü belirlemede altın standart olarak kabul edilen bu yöntem ile DNA'daki metillenmemiş tüm sitozinler kimyasal reaksiyonla urasile çevrilir. DNA'daki metillenmiş olan sitozinler reaksiyon süresince değişmeden kalır. Dönüşüm işlemi bittikten sonra DNA, PCR ile amplifiye edilir. Sekanslama esnasında urasile çevrilen metillenmemiş sitozinler timin olarak, metillenmiş sitozinler ise sitozin olarak ölçülür. DNA'nın bisülfit modifikasyonu yapıldıktan sonra, her bir gen için uygun primer çiftleri kullanılarak, QuantStudioTM 5 Real-Time PCR Sistemi (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) cihazında genlerin promoter bölge metilasyon yüzdeleri kantite edilmiştir. Doğru bir PCR amplifikasyon ölçümün göstergesi olarak cihazın CT (cycle threshold) değeri oluşturması gerekmektedir. Kabul edilebilen CT değeri 10-45 aralığı olarak değerlendirilmiştir. Bu işlemler için gerekli primer çiftleri Zymo Research Bisulfite Primer Seeker programı yardımı ile tasarlanmıştır. (Kaneda ve diğ., 2004).

Gereç ve Kimyasallar:

- CT Dönüştürme Reaktifi
- Sulandırma Tamponu
- Çözünen Tamponu
- Bağlama Tamponu
- Yıkama Tamponu
- Desulfonasyon Tamponu
- Elüsyon Tamponu
- Zymo-Spin™ IC Kolonları
- Toplama Tüpleri

Protokol

- Reaktiflerin Hazırlanması

CT Dönüştürme Reaktifinin Hazırlanması

1. CT Dönüştürme Reaktifinin bulunduğu tüpe 900 µl su, 300 µl M-Sulandırma Tamponu ve 50 µl Çözünme Tamponu eklendi.
2. Oda sıcaklığında sık sık vorteksleyerek 10 dakika karıştırıldı.

Yıkama Tamponunun Hazırlanması

Konsantre haldeki 6 ml M-Yıkama Tamponuna 24 ml %100 etanol eklendi.

- DNA Örneklerinde CT Dönüştürme işleminin gerçekleştirilmesi (Bisülfit dönüştürme işleminin basamakları)

Çift Sarmallı DNA Şablonlarının Bisülfit Dönüşümü: Bisülfit dönüşümünün bir DNA şablonunda nasıl gerçekleştiği örnek olarak anlatılmıştır. Örneklerde metillenmiş "C"nin altı çizilmiştir. Bisülfit dönüşümünün ardından, iplikler artık tamamlayıcı değildir.

Template: **A:** 5′-GACCGTTCCAGGTCCAGCAGTGCGCT-3′
B: 3′-CTGGCAAGGTCCAGGTCGTCACGCGA-5′
Bisulfite Converted: **A:** 5′-GATCGTTTTAGGTTTAGTAGTGCGTT-3′
B: 3′-TTGGCAAGGTTTAGGTTGTTATGCGA-5′

1. 20 µl DNA örneklerinin üzerine 130 µl CT Dönüştürme Reaktifi eklenerek pipetleme yapıldı.
2. Plate bir termal cycler cihazına yerleştirildi ve PCR (98^0C'de 10 dk, 64^0C'de 2,5 saat) gerçekleştirildi.
3. Bir Zymo-Spin™ IC kolonuna 600 µl Bağlama Tamponu eklenerek ve kolonlar toplama tüpüne yerleştirildi.
4. Numuneler Bağlama Tamponu içeren Zymo-Spin™ IC kolonuna yüklendi ve kapağı kapatılarak birkaç kez ters çevirerek karıştırıldı.
5. 30 saniye boyunca tam hızda (>10.000 x g) santrifüjlendi ve toplama tüpüne geçen sıvı boşaltıldı.
6. Kolona 100 µl yıkama tamponu eklendi. 30 saniye boyunca tam hızda santrifüjlendi.
7. Kolona 200 µl Desulfonasyon Tamponu eklendi ve oda sıcaklığında (20-30°C) 15-20 dakika bekletildi İnkübasyondan sonra tam hızda 30 saniye santrifüjlendi.
8. Kolonlara 200 µl Yıkama tamponu eklendi. 30 saniye boyunca tam hızda santrifüjlendi. 200 µl Yıkama tamponu daha eklendi ve 30 saniye daha santrifüjlendi.
9. Kolonlar 1.5 ml'lik bir mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildi. Doğrudan kolon matrisine 10 µl Elution Buffer eklendi. DNA'yı ayrıştırmak için tam hızda 30 saniye santrifüjlendi.
10. DNA daha sonra kullanılmak üzere -20°C'de metilasyon analizlerinin yapılacağı güne kadar saklandı.

- DNA Metilasyon Profillerinin Belirlenmesi

1. Bisülfit dönüşümü gerçekleştirilen DNA örnekleri -20°C'den alınarak oda sıcaklığına getirildi.
2. Herbir 5 µl DNA örneğinin üzerine numunenin üzerine kit içerisinde bulunan 2,5 µl Zymo Taq qPCR Premix eklendi.
3. Daha sonra bu karışıma analizi yapılacak genin metilasyon analizi için önceden özel olarak tasarlanmış Forward ve reverse Primerlerin her birinden (10µM) 2,5 µl ilave edildi.
4. Son olarak toplam hacim 50 µl olacak şekilde 15 µl dH_2O ilave edilerek tüpler pipetlendi.

PCR koşulları 30-40 döngü olacak şekilde aşağıdaki protokole uygun olarak hazırlandıktan sonra sırasıyla 465 ve 510 nm dalga boylarında analizler gerçekleştirildi.

PCR Koşulları:

İlk denatürasyon: 95 °C 10 dak.

Denatürasyon: 94 - 96 °C 30 sn.

Tavlama Değişkeni: 30-40 sn.

Uzatma: 72 °C 30-60 sn.

Son uzatma: 72 °C 7 dak.

PCR Primer Tasarımı: Genel olarak, bisülfit dönüştürülmüş DNA'nın amplifikasyonu için 26 ila 32 baz uzunluğunda primerler gereklidir. Çalışmada kullanılan primerler www.zymoresearch.com/tools/bisulfite-primer-seeker programı kullanılarak tasarlanmıştır.

Gankyrin primer sekansı:

- Methylated forward: 5'-GGGTTTTTGATTTGTAGTGGTAGGC-3'
- Methylated revers: 5'-AAAAAATAACCACAATCACCGATTCG-3'

CDO1 primer sekansı:

- Methylated forward: 5'-TTTGGGACGTCGGAGATAAC-3'
- Methylated revers: 5'-CCAACATTAAAATACCGAAACGTA-3'

3.4.4. İmmunositokimyasal Gankyrin ve CDO1 Analizi

İmmunositokimyasal gankyrin ve CDO1 Analizi için (LEICA/Novocastra IHC-Bond) immunohistokimyasal test kiti kullanıldı.

Prensip:

İşaretlenmiş poliklonal ve monoklonal antikorlar kullanarak hücre antijenlerini bulundukları yerde göstermek amacıyla Streptavidin-Biotin-Peroksidaz yöntemi ile immunositokimyasal boyama uygulanmıştır. Formalinle fikse edilen ve parafine gömülü dokular immünositokimyasal analiz için 5 μm kalınlıkta kesilmiştir. Daha sonra İnvitrogen Histostain-Plus Bulk Kit (85-9043) ile tavşan monoklonal gankyrin [CUSABIO CSB-PA575331- PSMD10 (Gankyrin) [Polyclonal] Conc. 0.1ml (1:30-150)] antikoru ve tavşan poliklonal sistein dioksigenaz 1 [CUSABIO CSB-PA438445 Cysteine Dioxygenase, Type I [Polyclonal] Conc. 0.1ml (1:25-100)] antikoru kullanılarak immunositokimyasal boyama yöntemi ile gankyrin ve CDO1 düzeyleri belirlenmiştir. İmmünoreaktif ürünler 3,3-diaminobenzidine katalizi ile görüntülenmiştir. Gankyrin ve CDO1 düzeyleri immünoreaktif-skor (IRS) sistemi kullanılarak değerlendirilmiştir (hem pozitif hücre sayıları belirlendi hem de boyanma yüzdesine bakıldı) gankyrin ve CDO1'in immünohistokimya sonuçları boyanan alanın yüzdeleri esas alınarak skorlama yapıldı. Pozitif hücrelerin yüzdesi daha sonra şu şekilde puanlandı: Boyama yok 0 (negatif), 1 (düşük [%1-40]), 2 (orta [%40-60]), 3 (yüksek [%60-100]) olarak yapılmıştır (Remmele ve Stegner, 1987).

3.4.5. Çalışmada kullanılması öngörülen istatistiksel yöntemler

Veri analizleri IBM SPSS Statistics 22 programı ile yapıldı.

Verilerin normal dağılıma uyup uymadıkları Kolmogorov Smirnov testi ile belirlendi. Normal dağılıma uyan veriler için parametrik, normal dağılıma uymayan veriler için non-parametrik testler kullanılarak analizler gerçekleştirildi.

Normal dağılıma uyan verilerin sonuçları aritmetik ortalama ± standart sapma olarak; normal dağılıma uymayan verilerin sonuçları Medyan (min-maks) olarak verildi. Anlamlılık düzeyi $P < 0.05$ olarak dikkate alındı.

Kronik gastrit ve mide tümörü dokularının metilasyon statüleri bakımından karşılaştırıldı.

- Gankyrin metilasyon statüleri kronik gastrit ve mide tümörü dokularında non-parametrik test olan Mann-Whitney U testi ile karşılaştırıldı.
- CDO1 metilasyon statüleri kronik gastrit ve mide tümörü dokularında parametrik test olan Student-T testi ile karşılaştırıldı.

Kronik gastrit ve mide tümörü dokularının immünpozitiflik düzeyleri bakımından karşılaştırıldı.

- Gankyrin immünpozitiflik düzeyleri kronik gastrit ve mide tümörü dokularında Mann-Whitney U testi ile karşılaştırıldı.
- CDO1 immünpozitiflik düzeyleri kronik gastrit ve mide tümörü dokularında Student-T testi ile karşılaştırıldı.

Kronik gastrit ve mide tümörü dokularımım cinsiyete bağlı olarak Gankyrin ve CDO1 metilasyon ve immünpozitiflik düzeyleri bakımından karşılaştırıldı.

- Gankyrin metilasyon statüleri bakımından gruplar Mann-Whitney U testi ile karşılaştırıldı.
- Gankyrin immünpozitifliği Mann-Whitney U testi ile karşılaştırıldı.
- CDO1 metilasyon statüleri bakımından gruplar Student-T testi ile karşılaştırıldı.
- CDO1 immünpozitifliği bakımından gruplar Student-T testi ile karşılaştırıldı.

Kronik gastrit ve mide tümörü dokuları immünpozitiflik düzeyleri bakımından kendi içinde gruplara ayrıldıktan sonra (düşük,orta,yüksek), gruplar kendi içinde immünpozitiflik düzeyleri ile metilasyon statüleri bakımından karşılaştırıldı.

- Gankyrin metilasyon statüleri bakımından gruplar her bir grup non-parametrik test olan Kruskal Wallis testi ile karşılaştırıldı.
- CDO1metilasyon statüleri bakımından gruplar her bir grup parametrik test olan One-way ANOVA (Tukey) testi ile karşılaştırıldı.

Kronik gastrit ve mMide tümörü dokuları immünpozitiflik düzeyleri bakımından kendi içinde gruplara ayrıldıktan sonra (düşük,orta,yüksek), mide tümörü ve kronik gastrit grupları immünpozitiflik düzeyleri ile metilasyon statüleri bakımından birbirleri ile karşılaştırıldı.

- Gankyrin metilasyon statüleri bakımından gruplar gruplar Kruskal Wallis testi ile karşılaştırıldı.
- CDO1metilasyon statüleri bakımından gruplar One-way ANOVA (Tukey) testi ile karşılaştırıldı.

Mide tümörü dokuları hastalığın evresine göre gruplara ayrıldıktan sonra (eEvre1, Evre2, Evre3) immünpozitiflik düzeyleri ve metilasyon statüleri ayrı ayrı karşılaştırıldı.

- Gankyrin metilasyon statüleri gruplar Kruskal Wallis testi ile karşılaştırıldı.
- CDO1 metilasyon statüleri gruplar One-way ANOVA (Tukey) testi ile karşılaştırıldı.
- Gankyrin ve CDO1 immünpozitifliği gruplar Kruskal Wallis testi ile karşılaştırıldı.

Mide tümörü dokuları patolojik T ve N faktörlerine göre alt gruplara ayrıldıktan sonra immünpozitiflik düzeyleri ve metilasyon statüleri bakımından alt gruplar karşılaştırıldı.

- Gankyrin metilasyon statüleri ve gankyrin immünpozitifliği Kruskal Wallis testi kullanıldı
- CDO1 metilasyon statüleri ve CDO1 immünpozitifliği One-way ANOVA testi kullanıldı

Kronik gastrit ve mide tümörü dokuları metilasyon statüleri ve immünpozitiflik düzeyleri arasında korelasyon analizi yapıldı.

- Gankyrin metilasyon statüleri ile gankyrin immünpozitifliği ve bu iki parametre arasındaki ilişki Spearman korelasyon analizi ile saptandı.
- CDO1 metilasyon statüleri ile CDO1 immünpozitifliği bakımından bu iki parametre arasındaki ilişki Pearson korelasyon analizi ile saptandı.

4. BULGULAR

Mide tümörü grubuna ait demografik ve patolojik veriler Tablo 4-1' de gösterilmiştir.

Tablo 4-1: Mide tümörü grubuna ait demografik ve patolojik veriler.

	MideTümörü Grubu (n:60)
Yaş Ortalaması	
Kadın (n:24)	59,54 ± 15,02
Erkek (n:36)	61,31 ± 10,78
Evre	
Evre 1	9
Evre 2	18
Evre 3	33
Patolojik T Faktör	
T1	9
T2	5
T3	8
T4	38
Patolojik N Faktör	
N0	18
N1	9
N2	12
N3	21

Kronik gastrit ve mide tümörü grupları CDO1 ve gankyrin metilasyon statüleri bakımından karşılaştırıldığında CDO1 metilasyon düzeyleri mide tümörü grubunda anlamlı derecede yüksek bulundu (p= 0,00) (Tablo 4-2).

Kronik gastrit ve mide tümörü grupları CDO1 ve gankyrin genlerinin immünpozitiflik düzeyleri bakımından karşılaştırıldığında hiçbir gen için gruplar arasında anlamlı fark bulunmadı (Tablo 4-2).

Tablo 4-2: Kronik gastrit ve mide tümörü gruplarında CDO1 ve gankyrin metilasyon statülerinin ve immünpozitifliğin değerlendirilmesi.

	Kronik gastrit grubu (n=40)	**Mide tümörü grubu (n=60)**	**P**
Gankyrin promoter metilasyon	2,48 (0,00-100,00)	3,89 (0,00-100,00)	0,65
Gankyrin İmmünpozitiflik	3,00(1,00-4,00)	2,93 (1,00-4,00)	0,33
CDO1 promoter metilasyon	7,40 (±) 4,49	13,48***** (±) 5,66	0,00
CDO1 İmmünpozitiflik	2,52 (±) 0,88	2,87 (±) 0,94	0,055

** Kronik gastrit grubuna göre*

Kronik gastrit ve mide tümörü grupları, cinsiyete bağlı olarak, gankyrin ve CDO1 metilasyon ve immünpozitiflik düzeyleri bakımından değerlendirildiğinde anlamlı fark bulunmadı (Tablo 4-3).

Tablo 4-3: Kronik gastrit ve mide tümörü gruplarında cinsiyete bağlı olarak gankyrin ve CDO1 metilasyon ve immünpozitiflik düzeylerinin değerlendirilmesi

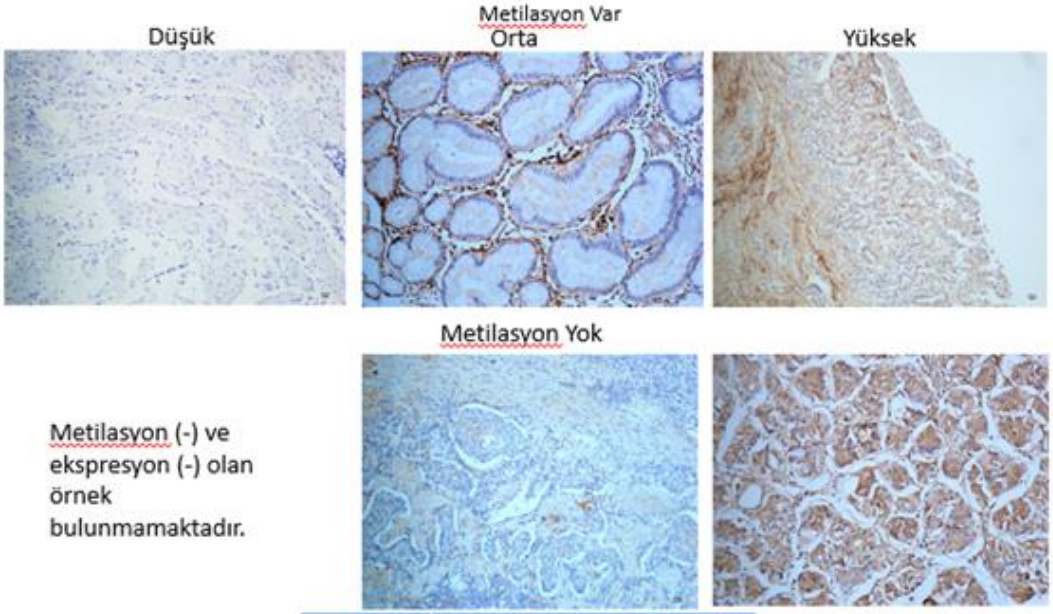
Kronik gastrit grubu (n=40)	Gankyrin promoter metilasyon	Mide tümörü grubu (n=60)	Gankyrin promoter metilasyon	p
Erkek (n= 19)	1,11 (0,00-15,80)	**Erkek (n= 36)**	1,19 (0,00-100,00)	0,89
Kadın (n= 21)	7,80 (0,00-100,00)	**Kadın (n= 24)**	13,05 (0,00-100,00)	0,11
	Gankyrin İmmünpozitiflik		**Gankyrin İmmünpozitiflik**	
Erkek (n= 19)	2,83 (1,57-4,00)	**Erkek (n= 36)**	2,92 (1,57-4,00)	0,85
Kadın (n= 21)	2,50 (1,00-4,00)	**Kadın (n= 24)**	3,00 (1,00-3,83)	0,81
	CDO1 promoter metilasyon		**CDO1 promoter metilasyon**	
Erkek (n= 19)	7,55 (±) 5,35	**Erkek (n= 36)**	14,18 (±) 5,66	0,08
Kadın (n= 21)	12,99 (±) 4,88	**Kadın (n= 24)**	12,43 (±) 5,61	0,87
	CDO1 İmmünpozitiflik		**CDO1 İmmünpozitiflik**	
Erkek (n= 19)	3,43 (±) 0,66	**Erkek (n= 36)**	3,01 (±) 0,92	0,65
Kadın (n= 21)	2,70 (±) 1,07	**Kadın (n= 24)**	2,78 (±) 0,81	0,66

Kronik gastrit ve mide tümörü grupları immünpozitiflik düzeyleri bakımından kendi içinde alt gruplara ayrıldıktan sonra (düşük, orta, yüksek), alt gruplar immünpozitiflik düzeyleri ile metilasyon statüleri bakımından karşılaştırıldığında, kronik gastrit ve tümör grubu içinde gankyrin immünpozitifliği farklı olan dokular arasında promoter metilasyonu açısından anlamlı fark bulunmadı (Şekil 4-1). Kronik gastrit grubunda yüksek düzeyde CDO1 immünpozitifliği olan grupta CDO1 metilasyon statülerinin, orta düzeyde CDO1 immünpozitifliği olan gruba göre yüksek olduğu bulundu (p= 0,000) (Tablo 4-4).Mide tümörü grubunda farklı düzeylerde CDO1 ekspresyonu olan alt gruplar arasinda promoter metilasyon bakımından anlamlı fark bulunmadı (Şekil 4-2).

Tablo 4-4: Kronik gastrit ve mide tümörü gruplarında düşük, orta ve yüksek düzeylerde gankyrin ve CDO1 ekspresyonuna bağlı olarak gankyrin ve CDO1 promoter metilasyon statülerinin değerlendirilmesi.

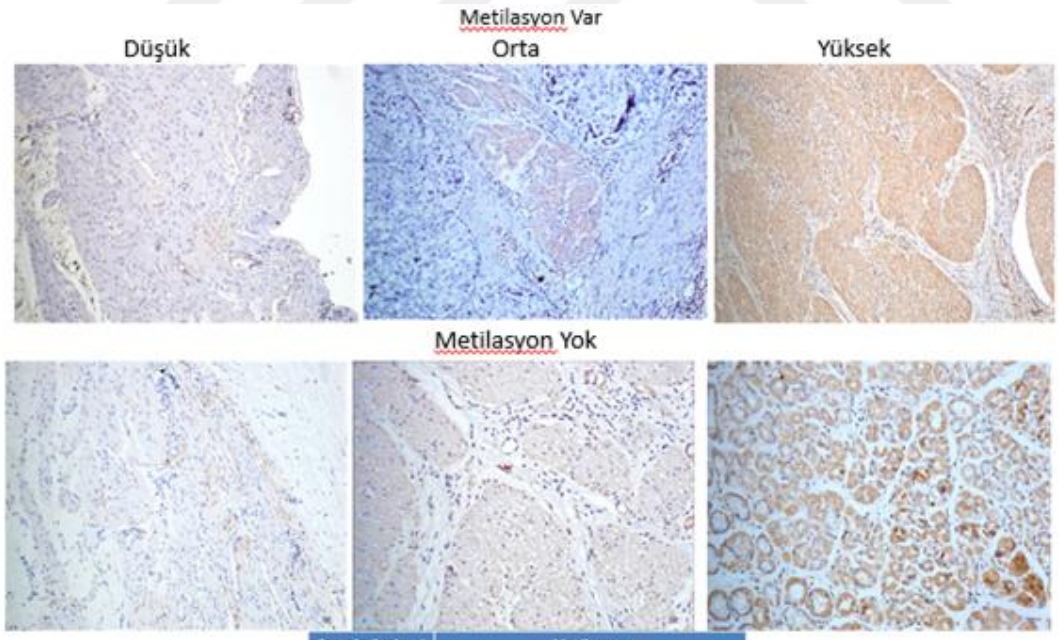
Gankyrin İmmünpozitiflik düzeyi	Gankyrin promoter metilasyon	P
Kronik gastrit (n=40)		
Düşük (n=3)	9,00 (5,00-15,80)	
Orta (n=27)	2,35 (0,00-16,60)	0,55
Yüksek (n=10)	1,75 (0,00-100,00)	
Mide tümörü (n=60)		
Düşük (n=0)		
Orta (n=16)	6,90 (0,00-36,20)	0,69
Yüksek (n=44)	3,53 (0,00-100,00)	
CDO1 İmmünpozitiflik	**CDO1 promoter metilasyon**	
Kronik gastrit (n=40)		
Dusuk (n=6)	7,45 (±) 3,99	0,45 0,14
Orta (n=22)	5,34 (±) 2,99	0,45 0,00
Yuksek (n=12)	11,14* (±) 4,85	0,14 0,00
Mide tümörü (n=60)		
Dusuk (n=8)	14,76 (±) 4,95	0,91 0,64
Orta (n=8)	15,91 (±) 6,73	0,91 0,33
Yuksek (n=44)	12,81 (±) 5,54	0,64 0,33

**CDO1 immünpozitifliği orta olan gruba göre*



Protein Seviyesi	Metilasyon	
	Var	Yok
DÜŞÜK	+	-
ORTA	++	++
YÜKSEK	+++/++++	+++/++++

Şekil 4-1: Gankyrin proteini immünohistokimyasal boyama mikroskop görüntüleri



Protein Seviyesi	Metilasyon	
	Var	Yok
DÜŞÜK	+	+
ORTA	++	++
YÜKSEK	+++/++++	+++/++++

Şekil 4-2: CDO1 proteini immünohistokimyasal boyama mikroskop görüntüleri

Gastrik kanserler 2017 AJCC evrelemesine göre evre1, evre 2 ve evre 3 olarak klinik evrelerine ayrıldı (Amin ve diğ.,2017). Evre 1, evre 2 ve evre 3 mide tümörü grupları gankyrin ve CDO1 promoter metilasyon statüleri bakımından değerlendirildiğinde CDO1 metilasyon statülerinin ileri evre kanser hastalarında artmış olduğu belirlendi (Tablo 4-5).

Evre 1, evre 2 ve evre 3 mide tümörleri gankyrin ve CDO1 immünpozitiflik düzeyleri bakımından değerlendirildiğinde iki gen için de anlamlı fark bulunmadı (Tablo 4-5).

Tablo 4-5: Mide tümörü gruplarında klinik evreye göre gankyrin ve CDO1 metilasyon statülerinin değerlendirilmesi

	Gankyrin promoter metilasyon	**Gankyrin İmmünpozitiflik**	**CDO1 promoter metilasyon**	**CDO1 İmmünpozitiflik**
Evre 1 (n=9)	11,40 (0,00-100,00)	2,43 (1,00-3,83)	4,1 (±) 1,46	2,43 (1,00-3,83)
Evre 2 (n=18)	4,15 (0,00-100,00)	2,89 (1,83-4,00)	11,2 * (±) 2,86	2,99 (1,83-4,00)
Evre 3 (n=33)	3,16 (0,00-37,30)	3,14 (1,57-4,00)	17,29 ** (±) 3,70	3,00 (1,17-4,00)

* p=0,000 evre1 ile karşılaştırıldığında

** p=0,000 evre1 ve evre 2 ile karşılaştırıldığında

Mide tümörleri, sırasıyla tümör büyüklüğü ve lenf nodu tutulumunu ifade eden patolojik T faktör ve N faktöre göre alt gruplara ayrıldıktan sonra gankyrin immünpozitiflik düzeyleri ve metilasyon statüleri açısından yapılan alt grup karşılaştırmalarında T ve N faktör'e bağlı olarak gankyrin promoter metilasyon statüsü ve immunpozitifliğinin değişmediği belirlendi (Tablo 4-6).

Mide tümörleri, sırasıyla tümör büyüklüğü ve lenf nodu tutulumunu ifade eden patolojik T faktör ve N faktöre göre alt gruplara ayrıldıktan sonra CDO1 immünpozitiflik düzeyleri ve promoter metilasyon statüleri açısından yapılan alt grup karşılaştırmalarında, T faktör'e bağlı olarak CDO1 promoter metilasyon statüsünün arttığı, CDO1 immunpozitifliğinin değişmediği belirlendi. N3 faktör tümörlerde CDO1 metilasyon statüsünün N0, N1 ve N2 faktör tümörlere göre daha yüksek olduğu belirlendi (Tablo 4-6).

Tablo 4-6: Mide tümörü gruplarında patolojik T ve N faktöre göre gankyrin ve CDO1 metilasyon statülerinin ve immünpozitifliğinin değerlendirilmesi

	Gankyrin promoter metilasyon	Gankyrin İmmünpozitiflik	CDO1 Promoter metilasyon	CDO1 İmmünpozitiflik
T faktör				
T1 (n=9)	0,09 (0,00-100,00)	3,14 (2,00-3,38)	4,86*'** (±) 2,38	3,42 (±) 0,75
T2 (n=5)	4,40 (0,00-13,60)	3,29 (1,00-4,00)	9,54 ** (±) 4,33	2,70 (±) 0,45
T3(n=8)	2,02 (0,00-14,00)	2,50 (1,83-3,50)	11,34 *** (±) 3,22	2,54 (±) 1,30
T4 (n=38)	3,89 (0,00-100,00)	3,16 (1,57-4,00)	16,50 (±) 3,92	2,83 (±) 0,93
N faktör				
N0 (n=18)	4,98 (0,00-100,00)	2,72 (1,00-4,00)	7,96 (±) 4,34	3,03 (±) 0,96
N1 (n=9)	7,60 (0,00-36,20)	2,63 (1,83-4,00)	12,18 (±) 2,40	3,08 (±) 0,92
N2 (n=12)	1,63 (0,00-100,00)	3,24 (1,57-4,00)	13,21 (±) 2,80	3,12 (±) 0,62
N3 (n=21)	3,89(0,00-37,30)	2,86 (1,75-4,00)	18,93 # (±) 3,53	2,49 (±) 1,03

*p=0,003 T3'e göre

**p=0,001 T4'e göre

***p=0,004 T4'e göre

p=0,000 N0,N1 ve N2 'ye göre

Kronik gastrit ve mide tümörü gruplarında metilasyon statüleri ve immünpozitiflik düzeyleri arasında korelasyon analizi yapıldığında anlamlı bir ilişki bulunmadı.

5. TARTIŞMA

Normal hücrelerde önemli düzenleyici rolü olan epigenetik modifikasyonlar karsinogenez sırasında bozulmaktadır (Yang ve diğ., 2010). Kanser hücrelerinin genomunda normal metilasyon statüsünün değiştiği gözlenmiştir. Kanserde anormal DNA metilasyonu sıklıkla "Genom-genel hipometilasyon" ve "Gen spesifik hipermetilasyon" olmak üzere iki şekilde ortaya çıkmaktadır. DNA metilasyonunun geri dönüşümlü olması kanser tedavisine yeni bir yaklaşım getirmiş ve bu bağlamda pek çok gen terapötik hedef olarak araştırılmıştır.

Brait ve arkaşları 2012 yılında çeşitli insan kanserlerinde yapmış oldukları bir araştırmada meme, akciğer, mide, kolon, mesane, karaciğer kanseri hücre soylarında ve primer tümörlerinde CDO1 promoter metilasyon değişiklikleri saptamışlardır (Brait ve diğ., 2012). Tümör dokusunun bitişiğindeki kanserli olmayan dokuya kıyasla, CDO1 ekspresyonunun çalışılan 10 adet mide tümöründen altısında azalmış, birinde artmış, üçünde ise değişmemiş olduğu belirlenmiş, ancak bu değişikliklerin hastalığa ait patolojik verilerle (tümör tipi, grade, klinik evre, lokal invazyon, metastaz) ve sağkalım süresi ile ilişkisi incelenmemiştir. Çeşitli insan kanserlerini içeren bir başka çalışmada 25 adet mide tümörünün %88'inde CDO1 geni promoter metilasyonu saptanmış, metilaston düzeyi ile mRNA ekspresyon düzeyleri arasında korelasyon bulunmamıştır (Vedeld ve diğ., 2014). Peritonal yıkama sıvısında mikroskopik sitoloji testinde CY1 şeklinde teşhis edilen minimal residuel peritonal hastalık evre 4 gastrik kanseri gösterir. Ushuki ve ark. peritonal lavaj sıvısında residuel peritonal hastalık saptanan (CY1+) primer mide kanseri hastaların tamamında peritonal lavaj sıvısında CY1 sitolojisinde CDO1 promoter hipermetilasyonu bulunduğunu bildirmişlerdir (Ushiku ve diğ., 2017). Yeni çalışmalarda CDO1 promoter bölge hipermetilasyonunun mide kanseri için bağımsız bir prognostik faktör (Harada ve diğ., 2019) ve ilk cerrahi müdahale sonrasında remnant gastrik kanser gelişimi için prediktif olduğu (Kojima ve diğ., 2019) ileri sürülmektedir. Bu öncü araştırmalar CDO1 anormal promoter metilasyonunun mide kanseri gelişimi ile ilişkili olduğunu düşündürmekle birlikte, CDO1'in anormal metilasyonunun karsinogenezin hangi aşamasında ortaya çıktığı ve gen ekspresyonunu ne düzeyde etkilediği konusunda yetersizdir.

Bu tez çalışmasında, mide tümörü olan vakalar ile malign bir neoplazma içermeyen kronik gastrit hastalarından elde edilen biyopsi örnekleri CDO1 geni promoter metilasyon statüleri ve immünohistokimyasal analiz yöntemi ile CDO1 geni ekspresyon seviyeleri bakımından incelenmiştir. Kronik gastrit pre-kanseröz lezyonlara neden olduğundan kontrol grubu olarak değerlendirilmiştir. Kronik gastrit ve mide tümörü grupları promoter metilasyon statüleri bakımından karşılaştırıldığında CDO1 promoter metilasyon düzeyleri mide tümörü grubunda anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Ayrıca klinik evre, tümör büyüklüğü ve lenf nodu tutulumu arttıkça CDO1 promoter metilasyon düzeyleri anlamlı olarak artmaktadır. Bu durum yeni tanı almış hastalarda CDO1 promoter metilasyonu analizinin prediktif ve prognostik potansiyeli olduğunu ortaya koymaktadır. Genel bir kural olarak promoter bölgesinde hipermetilasyon saptanan genlerin ekspresyon düzeylerinde azalma beklenir. Çalışmamızda beklenenin tersine, CDO1 promoter metilasyonu artmış olduğu halde CDO1 ekspresyonunda azalma belirlenmedi. Bunun birkaç nedeni olabilir: 1)Vaka sayılarımızın sınırlı olması, daha geniş çalışma gruplarında bu ilişkiyi göstermek daha olasıdır, 2)Gen ekspresyonunun mRNA düzeyinde değil sadece immünohistokimyasal olarak belirlenmiş olması, 3) Hücre içi sistein miktarı, CDO1 proteininin yarı ömrünü önemli ölçüde etkilemektedir (Dominy Jr ve diğ., 2006). Düşük sistein düzeylerinde ubiquitin-26S sistemi, CDO1'in ubikutinasyonu ve bozulmasına hızlı bir şekilde aracılık edebilir. Sistein konsantrasyonu yüksek olduğunda ise, CDO1'in ubikutinasyonu engellenir. Bu nedenle CDO1'in aktivite ve ekspresyon seviyesi, promoter metilasyonuna ilave olarak başka sistemler tarafından da sistein konsantrasyonuna bağlı olarak düzenlenmektedir. Bu nedenle karsinogenezde CDO1 geninde hipermetilasyon görülse dahi hücrenin ihtiyaçlarına ve hücre içi sistein miktarına bağlı olarak protein seviyeleri beklenenden yüksek/düşük seyredebilir (Leva ve diğ., 2020). Nitekim son yıllarda yapılan çalışmalar sonucunda genlerin içerisinde bulunduğu sinyal yolaklarındaki rolü ve bu yolakta etkileştiği diğer genlerle olan aralarındaki mekanizmaya bağlı ifade durumuna bağlı olarak hipermetilasyona uğramış bir genin ifadesi artabileceği bildirilmiştir (Leva ve diğ., 2020; Jiao ve diğ., 2019) 4) DNA metilasyonu, CpG dizileri dışındaki bölgelerde de bulunur. Bu tip metilasyon, CpG dışı metilasyon olarak adlandırılır ve metillenmiş sitozinler CpG olmayan bölgelerde de (CpA, CpT ve CpC) bulunur. Çeşitli insan ve hayvan deneylerinde çalışılmış olan CpG dışı metilasyonun kesin mekanizmaları tam olarak anlaşılmamakla birlikte, gen ifade düzeyini etkilediği düşünülmektedir (Sik Jang ve diğ.,2017).

Kronik gastrit ve mide tümörü grupları immünohistokimyasal olarak belirlenen CDO1 ekspresyon düzeyi bakımından karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark belirlenmemiştir. Çalışma gruplarında CDO1 geni promoter metilasyon statüleri ve gen ekspresyon düzeyleri arasında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır. Kronik gastrit ve mide tümörü grupları kendi içlerinde düşük, orta ve yüksek CDO1 immünpozitiflik düzeyleri şeklinde gruplandırılıp, bu gruplar metilasyon statüleri bakımından karşılaştırıldığında, sadece kronik gastrit grubunda CDO1 immünpozitifliği yüksek olan grupta CDO1 metilasyon statülerinin de beklenenin tersine yüksek olduğu gözlenmiştir. Kronik gastrit grubu ile mide tümörü grubu arasında CDO1 ekspresyonu açısından anlamlı bir fark tespit edilmediğinden, vakaların immünskorlarının metilasyon statüleri ile tam bir eşleşme göstermemesi olağandır. Kanserde özellikle tümör baskılayıcı genlerin promoter bölgesindeki metilasyona bağlı ekspresyon azalışı genin biyobelirteç olarak potansiyelini gösterir. Benzeri çalışmalarda bu potansiyelin değerlendirilebilmesi amacıyla tümör dokusu ve yakınındaki normal doku karşılaştırılır. Başta beslenme alışkanlığı olmak üzere pek çok kişisel ve çevresel faktöre bağlı olarak DNA metilasyon statüsü değişiklik gösterebilir. Biz çalışmamızda CDO1'in anormal metilasyonunun karsinogenezin hangi aşamasında ortaya çıktığı ve gen ekspresyonunu ne düzeyde etkilediğini belirleyebilmek için mide tümörü ve pre-kanseröz mide lezyonlarını karşılaştırarak farklı bir bakış açısıyla yaklaştık. Bulgularımız–mide tümörleri ile prekanseröz mide lezyonları arasında CDO1 ekspresyon düzeyleri açısından anlamlı bir fark olmadığını gösterdi.

Gastrik tümörlerde gankyrin ekspresyonu ile ilgili araştırma sayısı son derece sınırlı olmakla birlikte bulgular gastrik tümör oluşumunun yüksek gankyrin ekspresyonu ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. In vitro çalışmalarda gastrik kanser hücre soylarında gankyrin ekspresyonunun artmış olduğu saptanmıştır. Benzer olarak, primer mide tümörlerinde gankyrin ekspresyonunun, tümörün yakınındaki normal mukoza hücrelerindekine kıyasla daha fazla olduğu belirlenmiş ve gankyrin'in mide kanseri prognozu için prediktif bir belirteç olabileceği ileri sürülmüştür (Feinberg ve Tyoko, 2004; Zheng ve diğ., 2018). Ancak gastrik tümörlerde gankyrin ekspresyonunu arttıran mekanizmalar bilinmemektedir. Gankyrin geninin promoter bölgesinin hipometilasyonu gen ifadesini arttırmış olabilir. Literatürde gastrik tümörlerde gankyrin geninin promoter metilasyon statüsü ile ilgili tek bir çalışma bulunmaktadır. Gastrik kanser metastazı için epigenetik belirteç araştırmak amacıyla yapılmış olan bu çalışmada, metastatik ve metastatik olmayan gastrik tümörler ve bitiğişindeki kanser olmayan dokuda genom-genel metilasyon profili belirlenmiş

ve gankyrin de dahil olmak üzere bir çok gene ait CpG adalarında anormal metilasyon saptanmıştır (Liu ve diğ., 2014). Ancak bu metilasyon değişikliğinin gankyrin ekspresyonu üzerine etkisi araştırılmamıştır.

Bu çalışmada; mide tümörü olan vakalar ile malign neoplazma içermeyen kronik gastrit hastalarından elde edilen biyopsi örnekleri gankyrin geni promoter metilasyon statüleri ve immünohistokimyasal analiz yöntemi ile gankyrin geni ekspresyon seviyeleri bakımından incelendiğinde kronik gastrit ve mide tümörü grupları arasında hem promoter metilasyon statüleri hem de gen ekspresyonları arasında anlamlı bir fark bulunmamış; her iki grupta da promoter metilasyon statüsü ve gen ekspresyonu arasında anlamlı bir korelasyon saptanmamıştır. Bununla birlikte istatistiksel olarak anlamlı düzeyde olmasa da gankyrin promoter metilasyon statüleri ile immünskorlar arasında kısmi uyum bulunmaktadır (Tablo 4-2). Beklenildiği gibi gen ekspresyonu düşük olan vakalarda promoter metilasyonunun yüksek olduğu, ekspresyon düzeyi arttıkça promoter metilasyonunun azaldığı tespit edilmiştir. Mide tümörü grubunun %73,33'ünde yüksek immünskorlara rastlanırken, 60 kanserli hasta içerisinde immünskoru düşük olan vaka sayısına rastlanmamıştır. Kronik gastrit grubunda ise sadece %25 oranında yüksek immünskorlu vaka bulunurken, vakaların %67,5 kadarı orta, %7,5 kadarı ise düşük immünskora sahipti. Bu veriler Liu (2014) ve arkadaşlarının mide karsinomalarında gankyrin ekspresyonunun arttığı bilgisi ile uyumludur. Diğer taraftan kronik gastrit lezyonlarında düşük bir oranda da olsa artmış gankyrin ekspresyonu prekanseröz lezyonların tümöre dönüşümünde rol oynayan patojenik mekanizmalardan biri olarak düşünülebilir.

Kanserin evresi ilerledikçe ve tümör büyüklüğü ve lenf nodu tutulumu arttıkça gankyrin metilasyon statülerinde istatiksel olarak anlamlı fark görülmemiştir. İstatiksel bir fark bulunamamasının sebebi vaka sayılarının sınırlı olması ve evre dağılımlarının homojen olmaması olarak düşünülmektedir. Daha önce de bahsedildiği üzere CpG ve CpG dışı metilasyon, tekrarlayan diziler, promotörler ve gen gövdeleri dahil olmak üzere tüm genom boyunca bulunur. CpG dışı metilasyonun genel işlevi, metillenmiş bölgelere bağlı olarak gen susturma veya aktivasyonunu sağlamak olabilir. Bizim çalışmamızda sadece promoter bölgede belirli bir dizide metilasyon statüleri değerlendirilmiştir. Farklı primerler kullanılarak farklı bölgelerdeki metilasyon düzeylerinin değerlendirilmesinin yanısıra vaka sayılarının arttırılması ve tümör karakteristikleri bakımından alt gruplar arası homojen dağılımların sağlanması ile istatistiksel olarak anlamlı verilerin elde edilmesi mümkündür.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Mide kanserinin erken tanısı ve tanı almış kanserlerin takibinde biyo-belirteç olma potansiyeline sahip olduğu ileri sürülen CDO1 ve gankyrin genlerinin promoter metilasyon statüsü ve gen ekspresyonu açısından değerlendirildiği bu tez çalışmasında, CDO1 promoter metilasyon statüsünün mide kanseri için prediktif, prognostik ve terapötik potansiyele sahip olduğu belirlenmiştir. Ancak promoter metilasyon statüsü ile gen ekspresyon düzeyi arasında ilişki gözlenmemiştir. Daha fazla vaka sayısı, klinik evre ve patalojik T ve N faktör açısından daha homojen çalışma gruplarıyla bulguları daha da anlamlı hale getirmek mümkündür. Diğer taraftan bulgularımız kronik gastrit lezyonlarının mide tümörlerine dönüşüm ihtimalini değerlendirmek açısından bakıldığında fikir vermede yetersizdir. Tamamen sağlıklı mide dokusundan oluşan ikinci bir kontrol grubunda bu parametreler çalışılmış olsaydı yorum yapmak mümkün olabilecekti. Tez projesi bütçesinin kısıtlı olması nedeniyle bu çalışma yapılamamıştır. Çalışmayı kısıtlayan bir diğer faktör CDO1 aktivitesinin ölçülmemiş olmasıdır. Çeşitli posttranskripsiyonel modifikasyonlar nedeniyle sadece gen ekspresyon düzeyinin belirlenmiş olması gen ürünü proteinin fonksiyonel olup olmadığını tam olarak yansıtmayabilir.

Gankyrin geni için mide kanseri açısından prediktif veya prognostik bir özellik belirlenmemiştir. Gankyrin geninin mide kanserindeki rolünü anlayabilmek için promoter bölgedeki farklı dizilere spesifik primerler kullanarak ve CpG adacıkları dışındaki metilasyon sekanslarını da hedef alarak çalışmak doğru bir yaklaşım olabilir. Diğer taraftan hem CDO1 hem de gankyrin geni için her vakanın kendi içerisinde değerlendirilerek kişiye özel bir planlama dahilinde bu parametrelerin uzun vadelerde sürekli takip ile değerlendirilmesi daha anlamlı olacaktır. Yaşam koşulları ve hücrelerin maruz kaldıkları iç çevre, gen boyutunda bireyler arası karşılaştırma yapmayı öngörülemez düzeyde etkilemektedir. Bu nedenle her vaka gerek metilasyon statüsü gerekse ekspresyon seviyeleri bakımından hastalığın seyri içerisinde sürekli takip edilerek değerlendirilmelidir. Kanser tedavisinde epigenetik yaklaşımların büyük önem kazandığı günümüzde bulgularımız literatüre önemli katkı sağlayacak, gelecekte yapılacak olan araştırmalara ve yeni tedavi yaklaşımlarına ışık tutacaktır.

KAYNAKLAR

1. Ajani, J.A., In, H., Sano, T. ve diğ., 2017, Stomach. In: AJCC Cancer Staging Manual, 8th ed, AJCC, 203.

2. Amin, M.B., Greene, F.L., Edge, S.B., Compton, C.C., Gershenwald, J.E., Brookland, R.K., Meyer, L., Grees, D.M., Byrd, D.R., Winchester, D.P., 2017. The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a population-based to a more "personalized" approach to cancer staging, CA Cancer J Clin, 67(2), 93-99.

3. Arnold, M., Park, J.Y., Camargo, M.C., Lunet, N., Forman, D., Soerjomataram, I. 2020, Is gastric cancer becoming a rare disease? A global assessment of predicted incidence trends to 2035, Gut; 69, 823–29.

4. Baylin, S.B., Herman, J.G., 2000. DNA hypermethylation in tumorigenesis: Epigenetics joins genetics, Trends in Genetics, 16, 168–74.

5. Booken, N., Gratchev, A., Utikal, J., Weiss, C., Yu, X., Qadoumi, M., Schmuth, M., Sepp, N., Nashan, D., Rass, K., Tüting, T., Assaf, C., Dippel, E., Stadler, R., Klemke, C. D., Goerdt, S., 2008. Sézary syndrome is a unique cutaneous T-cell lymphoma as identified by an expanded gene signature including diagnostic marker molecules CDO1 and DNM3, Leukemia, 22(2), 393-9.

6. Bourc'his, D., Xu, G.L., Lin, C.S., Bollman, B., Bestor T.H., 2001, Dnmt3L and the establishment of maternal genomic imprints. Science 294, 2536–9.

7. Boysen, T., Mohammadi, M., Melbye, M., ve diğ., 2009, EBV-associated gastric carcinoma in highand low-incidence areas for nasopharyngeal carcinoma. Br J Cancer, 101(3):530-3.

8. Brait, M., Ling, S., Nagpal, J.K., Chang, X., Park, H.L., Lee, J., Okamura, J., Yamashita, K., Sidransky, D., Kim, M.S., 2012, Cysteine dioxygenase 1 is a tumor suppressor gene silenced by promoter methylation in multiple human cancers, PLoS One, 7(9), e44951.

9. Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R.L., Torre, L.A., Jemal, A,. Global cancer statistics,, 2018, GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA Cancer J Clin, 68, 394–424.

10. Brunicardi, F.C., Andersen, D.K., Billiar, T.R., Dunn, D.L., Hunter, J.G., 2014, Schwartz's Principles of Surgery. 10th ed., Mc Graw Hill, London, ISBN: 978-0-07-180092-1.

11. Chang, M.S., Uozaki, H., Chong, J.M., Ushiku, T., Sakuma, K., Ishikawa, ve diğ., 2006, CpG island methylation status in gastric carcinoma with and without infection of Epstein-Barr virus. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research, 12(10), 2995–3002.

12. Chaudhry, S.R., Liman, M.N.P., Peterson, D.C., 2020, Anatomy, Abdomen and Pelvis, Stomach, https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482334/ , [Ziyaret tarihi: 30 Haziran 2022].

13. Chen, M., Zhu, J.Y., Mu V.J., Guo. L., 2021, Cysteine dioxygenase type 1 (CDO1): Its functional role in physiological and pathophysiological processes, Genes & Diseases, Available online 17 February 2022.

14. Chen, R.Z., Pettersson, U., Beard, C., Jackson-Grusby, L., Jaenisch, R. 1998, DNA hypomethylation leads to elevated mutation rates, Nature, 395(6697), 89–93.

15. Cho, Y.G., Chang, X., Park, I.S., Yamashita, K., Shao, C., Ha, P.K., Pai, S. I., Sidransky, D., Kim, M.S., 2011, Promoter methylation of leukemia inhibitory factor receptor gene in colorectal carcinoma, Int J Oncol, 39(2), 337–44.

16. Conrad, M., Friedmann Angeli, J.P., 2015, Glutathione peroxidase 4 (Gpx4) and ferroptosis: what’s so special about it? Mol Cell Oncol, ;2(3), e995047.

17. Correa, P., 1992, Diet modification and gastric cancer prevention. Journal of the National Cancer Institute Monographs, (12), 75-8.

18. Correa, P., 1992, Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process--First American Cancer Society Award Lecture on Cancer Epidemiology and Prevention. Cancer research, 52(24), 6735–40.

19. Curtis, N.J., Noble, F., Bailey, I.S., Kelly, J.J., Byrne, J.P., Underwood, T.J., 2014, The relevance of the Siewert classification in the era of multimodal therapy for adenocarcinoma of the gastrooesophageal junction. J Surg Oncol, 109(3), 202–7.

20. Dekker, W., Tytgat, G.N, 1977, Diagnostic accuracy of fiberendoscopy in the detection of upper intestinal malignancy. A follow-up analysis, Gastroenterology, 73(4 Pt 1), 710–4.

21. de Vries, A.C., Haringsma, J., Kuipers, E.J., 2007, The detection, surveillance and treatment of premalignant gastric lesions related to Helicobacter pylori infection, Helicobacter, 12(1), 1–15.

22. De Vries, A.C., Van Driel, H.F., Richardus, J.H., Ouwendijk, M., Van Vuuren, A.J., De Man, R.A., Kuipers, E. J., 2008, Migrant communities constitute a possible target population for primary prevention of Helicobacter pylori-related complications in low incidence countries, Scandinavian journal of gastroenterology, 43(4), 403–9.

23. Dominy Jr, J.E., Hirschberger, L.L., Coloso, R.M., Stipanuk, M.H., 2006, Regulation of cysteine dioxygenase degradation is mediated by intracellular cysteine levels and the ubiquitin-26 S proteasome system in the living rat, Biochem J, 394(Pt 1), 267e273.

24. Dominy Jr, J.E., Hwang, J., Stipanuk, M.H., 2007, Overexpression of cysteine dioxygenase reduces intracellular cysteine and glutathione pools in HepG2/C3A cells. Am J Physiol Endocrinol Metab, 293(1), E62eE69.

25. El-Omar, E.M., Carrington, M., Chow, W.H., McColl, K.E., Bream, J.H., Young, H.A., Herrera, J., Lissowska, J., Yuan, C.C., Rothman, N., Lanyon, G., Martin, M., Fraumeni, J.F., Jr, Rabkin, C.S., 2000, Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer, Nature, 404(6776), 398–402.

26. Wolff, E.M., Byun, H.M., Han, H.F., Sharma, S., Nichols, P.W., Siegmund, K.D., Yang, A.S., Jones, P.A., 2010, Gangning Liang Hypomethylation of a LINE-1 Promoter Activates an Alternate Transcript of the MET Oncogene in Bladders with Cancer. PLoS Genet, 6(4), e1000917.

27. Feinberg, A.P., 2001, Cancer epigenetics takes center stage, Proc Natl Acad Sci, 98(2), 392–4.

28. Feinberg, A.P., Tycko, B., 2004, The history of cancer epigenetics, Nat Rev Cancer, 4(2), 143–53.

29. Fernet, P., Azar, H.A., Stout, A.P., 1965, Intramural (tubal) spread of linitis plastica along the alimentary tract. Gastroenterology, 48, 419–24.

30. Filipe, M.I., Muñoz, N., Matko, I., Kato, I., Pompe-Kirn, V., Jutersek, A., Teuchmann, S., Benz, M., & Prijon, T., 1994, Intestinal metaplasia types and the risk of gastric cancer: a cohort study in Slovenia, International journal of cancer, 57(3), 324–9.

31. Fléjou, J.F. WHO Classification of digestive tumors: The fourth edition. Ann. Pathol. 2011, 31, S27–S31.

32. González, C.A., Pera, G., Agudo, A., ve diğ., 2003, Smoking and the risk of gastric cancer in the European Prospective Investigation Into Cancer and Nutrition (EPIC), Int J Cancer, 107(4), 629-34.

33. Gotoda, T., 2006, Endoscopic resection of early gastric cancer: the Japanese perspective, Current opinion in gastroenterology, 22(5), 561–9.

34. Hacıoğlu, D., 2021, mide kanseri tanısı almış hastalarda rezeksiyon öncesi ve sonrasında alınan batın içi sitoloji sonuçlarının retrospektif karşılaştırılması, Tez (Uzmanlık Tezi), Ege Üniversitesi.

35. Harada, H., Hosoda, K., Moriya, H., Mieno, H., Ema, A., Ushiku, H. 2019, Cancer-specific promoter DNA methylation of Cysteine dioxygenase type 1 (CDO1) gene as an important prognostic biomarker of gastric cancer, PLoS One, 14(4), e0214872.

36. Hatakeyama, M., 2019, Malignant Helicobacter pylori-associated diseases: gastric cancer and MALT lymphoma, Adv Exp Med Biol, 1149: 135–49.

37. Higashitsuji, H., Liu, Y., Mayer, R. J., Fujita, J. 2005, The oncoprotein gankyrin negatively regulates both p53 and RB by enhancing proteasomal degradation, Cell Cycle, 4(10), 1335–7.

38. Hooi, J.K.Y., Lai, W.Y., Ng, W.K., ve diğ., 2017, Global prevalence of Helicobacter pylori infection: systematic review and meta-analysis, Gastroenterology, 153: 420–29.

39. Hu, B., El Hajj, N., Sittler, S., Lammert, N., Barnes, R., Meloni-Ehrig, A., 2012, Gastric cancer: Classification, histology and application of molecular pathology. J Gastrointest Oncol, 3, 251–61.

40. Jeltsch, A., Ehrenhofer-Murray, A., Tomasz, P., 2017, Jurkowski,a Frank Lyko,c Gunter Reuter,d Serge Ankri,e Wolfgang Nellen,f Matthias Schaefer,g and Mark Helmh. Mechanism and biological role of Dnmt2 in Nucleic Acid Methylation, NA Biol, 14(9): 1108–23.

41. Jeon, S.W., 2010, Endoscopic management of gastric dysplasia: Cutting edge technology needs a new paradigm. World journal of gastrointestinal endoscopy, 2(9), 301–4.

42. Jeschke, J., O'Hagan, H.M., Zhang, W., ve diğ., 2013, Frequent inactivation of cysteine dioxygenase type 1 contributes to survival of breast cancer cells and resistance to anthracyclines, Clin Cancer Res, 19(12), 3201e3211.

43. Jessica, C., Pickles, Stone, T., Jacques, T.S., 2020, Methylation-based algorithms for diagnosis: experience from neuro-oncology. Journal of Pathology, J Pathol, 250:510–517.

44. Jones, P.A., Aylin, S.B., 2002, The fundamental role of epigenetic events in cancer, Nat Rev Genet, 3(6), 415–28.

45. Jordà, M., Díez-Villanueva, A., Mallona, I., Martín, B., Barrera,1S.L.V., Vavouri, M.E.T., Peinado, M.A., 2016, The epigenetic landscape of Alu repeats delineates the structural and functional genomic architecture of colon cancer cells, Genome Res, 27, 118-32.

46. Junquiera L.C., Corneiro J., Keley, R.O., 1995, Basic Histology (7th ed.) Appleton & Lange, England, ISBN-10-0838505767.

47. Kaneda, M., Okano, M., Hata, K., Sado, T., Tsujimoto, N., Li, E., Sasaki, H., 2004, Essential role for de novo DNA methyltransferase Dnmt3a in paternal and maternal imprinting, Nature, 429(6994), 900-3.

48. Kim. H., Hwang, Y., Sung, H., ve diğ., 2018, Effectiveness of gastric cancer screening on gastric cancer incidence and mortality in a community-based prospective cohort, Cancer Res Treat, 50: 582–9.

49. Kim, D.H., Sætrom, P., Snøve, O., Rossi, J.J., 2008, MicroRNA-directed transcriptional gene silencing in mammalian cells, Proc Natl Acad Sci U S A, 105 (42) 16230-5.

50. Kim, J.S., 2003, Aberrant CpG island hypermethylation of chronic gastritis, in relation to aging, gender, intestinal metaplasia, and chronic inflammation. Am J Pathol, 163, 1551-6.

51. Kojima, K., Minatani, N,. Ushiku, H., Ishii, S., Tanaka, T., ve diğ., 2019, Prediction of onset of remnant gastric cancer by promoter DNA methylation of CDO1/HOPX/Reprimo/E-cadherin, Oncotarget, 29, 10(25), 2423-34.

52. Komatsu, S., Ichikawa, D., Okamoto, K., ve diğ., 2012, Progression of remnant gastric cancer is associated with duration of follow-up following distal gastrectomy, World J Gastroenterol, 18(22), 2832-6.

53. Krzywda, S., Brzozowski, A. M., Higashitsuji, H., Fujita, J., Welchman, R., Dawson, S., Mayer, R.J., Wilkinson, A.J. 2004, The crystal structure of gankyrin, an oncoprotein found in complexes with cyclin-dependent kinase 4, a 19 S proteasomal ATPase regulator, and the tumor suppressors Rb and p53, J Biol Chem, 279(2), 1541–52.

54. Kwon, J., Park, M., Kim, J.H., Lee, H.W., Kang, M.C., Park, J.H., 2015., Epigenetic regulation of the novel tumor suppressor cysteine dioxygenase 1 in esophageal squamous cell carcinoma, Tumor boil, 36(10), 7449-56.

55. Laird, P.W., Jaenisch, R., 1996, The role of DNA methylation in cancer genetic and epigenetics, Annu Rev Genet, 30(1), 441–64.

56. Lauren, P., 1965, The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. an attempt at a histo-clinical classification, Acta pathologica et microbiologica Scandinavica, 64, 31–49.

57. Lauwers, G.Y., Riddell, R.H., 1999, Gastric epithelial dysplasia. Gut, 45(5), 784–90.

58. Li, H., Zhang, J., Zhen, C., Yang, B., Feng, L., 2018, Gankyrin as a potential target for tumor therapy : evidence and perspectives, Am J Transl Res, 10(7), 1949–60.

59. Li , J., Li, X., 2020, Comprehensive analysis of prognosis- related methylated sites in breast carcinoma, Mol Genet Genomic Med, 8(4): e1161.

60. Li, X., Zhang, Y., Xiong, C., Jin, H., Jing, B., Zhang, Y., Fan, D., 2009, Overexpression of a new gene P28GANK confers multidrug resistance of gastric cancer cells, Cancer Invest, 27(2), 129–39.

61. Liu, Z., Zhang, J., Gao, Y., Pei, L., Zhou, J., Gu, L., Zhang, L., Zhu, B., Hattori, N., Ji, J., Yuasa, Y., Kim, W., Ushijima, T., Shi, H., Deng, D.,2014, Large-Scale Characterization of DNA Methylation Changes in Human Gastric Carcinomas with and without Metastasis Clin Cancer Res, 20 (17), 4598–612.

62. Luo, Y., Gao, P., Song, Y., Sun, J., Huang, X., Zhao, J., Ma, B., Li, Y., Wang, Z., 2016, Clinicopathologic characteristics and prognosis of Borrmann type IV gastric cancer: a meta-analysis, World journal of surgical oncology, 14(1), 49.

63. Machlowska, J., Baj. J., Sitarz, M., Maciejewski, R., Sitarz, R., 2020, Gastric Cancer: Epidemiology, Risk Factors, Classification, Genomic Characteristics and Treatment Strategies, International Journal of Molecular Sciences, Int J Mol Sci, 21, 4012.

64. Malfertheiner, P., Megraud, F., O'Morain, C.A., ve diğ. 2017, Management of Helicobacter pylori infection—the Maastricht V/Florence consensus report, Gut, 66: 6–30.

65. Maruyama, K., Gunvén, P., Okabayashi, K., Sasako, M., & Kinoshita, T., 1989, Lymph node metastases of gastric cancer, General pattern in 1931 patients, Annals of surgery, 210(5), 596–602.

66. Oliveira, C., Pinheiro, H., Figueiredo, J., Seruca, R., Carneiro, F., 2015, Familial gastric cancer: genetic susceptibility, pathology, and implications for management, The Lancet, Oncology, 16(2), e60–e70.

67. Ooki, A., Maleki, Z., Tsay, J.J., ve diğ., 2017, A panel of novel detection and prognostic methylated DNA markers in primary non-small cell lung cancer and serum DNA, Clin Cancer Res, 23(22), 7141e7152.

68. Powell, J., McConkey, C.C., 1990, Increasing incidence of adenocarcinoma of the gastric cardia and adjacent sites, Br J Cancer, 62(3), 440-3.

69. Rauluseviciute, L., Drabløs, F., Rye M.B., 2020, DNA hypermethylation associated with upregulated gene expression in prostate cancer demonstrates the diversity of epigenetic regulation, BMC Medical Genomics, 13,6.

70. Remmele, W., Stegner, H.E. 1987, Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue, Pathologe, 8(3), 138-40.

71. Robertson, K.D., 2005, DNA methylation and human disease. Nature Reviews Genetics, 6, 597-610. 9.

72. Kim, J.S., 2003, Aberrant CpG island hypermethylation of chronic gastritis, in relation to aging, gender, intestinal metaplasia, and chronic inflammation, Am J Pathol, 163,1551-6.

73. Sökmensüer, C., Oğuz, D., Bostancı, E.B., Hürmüz, P., Ökten, S., Öcal, S., Öztürk, Ş., Yalçın, Ş., Öter, V., Özoğul, Y., 2020, Sağlık bakanlığı mide kanseri tedavi protokolü, Ankara 2020, ISBN: 978-975-590-783-3.

74. Sanduleanu, S., Jonkers, D., de Bruïne, A., Hameeteman, W., Stockbrügger, R.W., 2001, Changes in gastric mucosa and luminal environment during acid-suppressive therapy: a review in depth. Digestive and liver disease : official journal of the Italia Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver, Dig Liver Dis, 33(8), 707–19.

75. Sik Jang, H., Shin, W.J., Lee J.E., Do, T.J., 2017, CpG and Non-CpG Methylation in Epigenetic Gene Regulation and Brain Function, Genes, 8(6), 148.

76. Su, B., Luo, T., Zhu, J., Fu, J., Zhao, X., Chen, L., Zhang, H., Ren, Y., Yu, L., Yang, X., Wu, M., Feng, G., Li, S., Chen, Y., Wang, H., 2015, Interleukin-1β/Iinterleukin-1 receptor-associated kinase 1 inflammatory signaling contributes to persistent Gankyrin activation during hepatocarcinogenesis, Hepatology, 61(2), 585–97.

77. Sung, J.K., 2016, Diagnosis and management of gastric dysplasia. The Korean journal of internal medicine, 31(2), 201–9.

78. Takada, K., 2000, Epstein-Barr virus and gastric carcinoma. Mol Pathol, 53(5):255 61.

79. Takeno, S., Hashimoto, T., Maki,K., ve diğ., 2014, Gastric cancer arising from the remnant stomach after distal gastrectomy: a review, World J Gastroenterol, 20(38), 13734-40.

80. Ueno, K., Kumagai, T., Kijima, T., Kishimoto, T., Hosoe, S., 1998, Cloning and tissue expression of cDNAs from chromosome 5q21-22 which is frequently deleted in advanced lung cancer, Hum Genet, 102(1), 63–8.

81. Ushiku, H., Yamashita, K., Ema, A., Minatani, N., Kikuchi, M., Kojo, K., Yokoi, K., Tanaka, T., Nishizawa, N., Ishii, S., Hosoda, K., Moriya, H., Mieno, H., Katada, N., Kikuchi, S., Katoh, H., Watanabe, M., 2017, DNA diagnosis of peritoneal fluid cytology test by CDO1 promoter DNA hypermethylation in gastric cancer, Gastric Cancer, 20(5), 784–92.

82. Vedeld, HM., Andresen, k., Eilertsen, IA., Nesbakken, A., Seruca, R., Ivar P., 2015, The novel colorectal cancer biomarkers CDO1, ZSCAN18 and ZNF331 are frequently methylated across gastrointestinal cancers, Int J Cancer, 15; 136(4), 844–53.

83. Velanovich, V., Hollingsworth, J., Suresh, P., Ben-Menachem, T., 2002, Relationship of gastroesophageal reflux disease with adenocarcinoma of the distal esophagus and cardia, Dig Surg, 19, 349–53.

84. Vogelstein, B., Papadopoulos, N., Velculescu, V.E., Zhou, S., Diaz, L.A., Kinzler, K. W., 2013, Cancer genome landscapes, Science, 339(6127), 1546–58.

85. Wang, P., Zhao, H., Shi, R., ve diğ., 2020, The role of plasma CDO1 methylation in the early diagnosis of lung cancer, Zhongguo Fei Ai Za Zhi, 23(5), 314e320.

86. Werner, M., Becker, K., Keller, G., Höfler, H., 2001, Gastric adenocarcinoma: Pathomorphology and molecular pathology, J Cancer Res Clin Oncol, 127, 207–16.

87. WHO., 2019, WHO classification of tumours: digestive system tumours, World Health Organization: International Agency for Research on Cancer, 5th ed, IARC Publications, USA, ISBN-13-978-92-832-4512-4.

88. Wynder, E.L., Kmet, J., Dungal, N., Segi,M., 1963, An epidemiological investigation of gastric cancer, Cancer, 16,1461-96.

89. Jiao, X., Zhang, S., Jiao, J., Zhang, T., Qu1, W., Muloye, G.M., Kong, B., Zhang, Q., Cui, B., 2019, Promoter methylation of SEPT9 as a potential biomarker for early detection of cervical cancer and its overexpression predicts radioresistance, Clinical Epigenetics, 11:120

90. Yaghoobi, M., McNabb-Baltar, J., Bijarchi, R., Hunt, R.H., 2017, What is the quantitative risk of gastric cancer in the first-degree relatives of patients? A meta-analysis, World J Gastroenterol, 23: 2435–42.

91. Yamada, H., Ikegami, M., Shimoda, T., Takagi, N., & Maruyama, M., 2004, Longterm follow-up study of gastric adenoma/dysplasia, Endoscopy, 36(05), 390-6.

92. Yamada, Y., Jackson-Grusby, L., Linhart, H., Meissner, A., Eden, A., Lin, H., ve diğ., 2005, Opposing effects of DNA hypomethylation on intestinal and liver carcinogenesis, Proc Natl Acad Sci U S A, 102(38), 13580–5.

93. Yang, X., Lay, F., Han, H., Jones, P.A., 2010, Targeting DNA methylation for epigenetic therapy, 31(11), 536-46.

94. Yüksel, S., Dinçer, Y., 2020, Relationship between Exposure to Low Dose of x-ray and DNA Hypomethylation in Solid Tumors and Hematological Malignancies, Biomed Environ Sci, 33(7): 528-37.

95. Zheng, J.Y., Hu, H., Du, J.J., Li, X.H., Zhao Q.C., 2014, P28GANK is a novel marker for prognosis and therapeutic target in gastric cancer, Mol Biol, 48(1), 99–106.

96. Zhu, A.L., Sonnenberg, A., 2012, Is gastric cancer again rising?, Journal of clinical gastroenterology, 46(9):804.

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

MİDE KANSERİNİN ERKEN TANI VE TAKİBİNDE YENİ BİR HEDEF OLARAK GANKYRİN VE CDO GENLERİ PROMOTER METİLASYON DEĞİŞİKLİKLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

ORIGINALITY REPORT

17%	14%	4%	9%
SIMILARITY INDEX	INTERNET SOURCES	PUBLICATIONS	STUDENT PAPERS

PRIMARY SOURCES

1	Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) Student Paper	3%
2	acikbilim.yok.gov.tr Internet Source	2%
3	Submitted to Sivas Cumhuriyet Universitesi Student Paper	1%
4	ardimed.com Internet Source	1%
5	docplayer.biz.tr Internet Source	1%
6	www.oncologiamedica.hc.edu.uy Internet Source	1%
7	nek.istanbul.edu.tr:4444 Internet Source	1%
8	www.ardimed.com Internet Source	<1%

ETİK KURUL İZİN YAZISI

Uyarı: Canlı denekler üzerinde yapılan tüm araştırmalar için Etik Kurul Belgesi alınması zorunludur.

☒ **Etik Kurul izni gerekmektedir.**

☐ **Etik Kurul izni gerekmemektedir.**

Selin YÜKSEL
(İmza)

KURUM İZNİ YAZILARI

Uyarı: Canlı ve cansız deneklerle yapılan tüm çalışmalar için kurum izin belgelerinin eklenmesi zorunludur. Gizlilik ve mahremiyet içeren durumlarda kurum adı kapatılmalıdır.

☐ **Kurum izni gerekmektedir.**

☒ **Kurum izni gerekmemektedir.**

Selin YÜKSEL
(İmza)