

**T.C.
CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
İç Hastalıkları Anabilim Dalı**

**MİDE ADENOKANSERİ İLE HP (+), HP (-) İNTESTİNAL METAPLAZİ
ARASINDAKİ MOLEKÜLER PATOLOJİ**

**İÇ HASTALIKLARI TIPTA UZMANLIK BİTİRME TEZİ
Dr. UFUK DEMİRCİ**

**Tez Danışmanı
Doç. Dr. ELMAS KASAP**

Manisa 2016

ÖNSÖZ

Hekimlik mesleğinin öğrenilmesinin en önemli kademesi olan ve meslek hayatımın bundan sonraki kısmını yönlendirecek uzmanlık eğitimimin sonuna gelmiş bulunuyorum. Mesleki eğitimimin burada sonlanmayıp, aslında yeni başladığının farkında olarak;

Çalışmalarım sırasında öneri ve yardımlarıyla tezimin şekillenmesini, oluşmasını sağlayan; engin bilgi ve deneyimlerinden her zaman yararlandığım tez danışmanım değerli hocam Doç. Dr. Elmas KASAP' a;

Asistanlık eğitimim boyunca bilgi ve deneyimleriyle eğitimimde çok büyük emekleri olan, yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen, kendilerini daima örnek alacağım tüm değerli hocalarıma,

Tez çalışmamın yürütülmesinde her türlü desteği gösteren başta Dr. Fahri Bilgiç, Uzm. Dr. Emre Gerçeker, Yrd. Doç. Dr. Seda Örenay Boyacıoğlu olmak üzere tüm tez ekibine ve Endoskopi Ünitesinde çalışan meslektaşlarıma,

Bu süreçteki iyi kötü her anımı paylaştığım, keyifle çalışmama vesile olan tüm asistan arkadaşlarıma,

Tüm hayatım boyunca her zaman yanımda olan ve varlıkları ile bana güç veren canım aileme

Yürekten teşekkür ve sevgilerimi sunarım.

Dr. Ufuk DEMİRCİ

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER LİSTESİ	I
TABLO LİSTESİ	V
ŞEKİL LİSTESİ	VI
GRAFİK LİSTESİ	VI
KISALTMALAR	VII
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Mide Kanseri	4
2.1.1. Midenin Anatomisi	4
2.1.2. Midenin Histolojisi	5
2.1.3. Midenin Embriyolojisi	6
2.2. Mide Kanserinde Etiyoloji ve Risk Faktörleri	6
2.2.1. Helikobakter Piloni	6
2.2.1.1. Helikobakter Piloni Tanı Yöntemleri	7
2.2.1.2. Helikobakter Piloni Patogenezi	10
2.2.1.3. Helikobakter Piloni ile İlişkili İntestinal Metaplazi Hastalıkları	Dışı 11
2.2.2. İntestinal Metaplazi	12
2.2.2.1. İntestinal Metaplazi Tipleri	13
2.2.3. Diyet	14
2.2.3.1. Tuz	14
2.2.3.2. Sebze ve Meyveler	15
2.2.3.3. Vitamin ve Mineraller	15
2.2.3.4. Nitrat, Nitrit ve Nitrozamin	15
2.2.4. Sigara ve Alkol	16
2.2.5. Genetik Polimorfizm	16
2.2.6. Ailesel Mide Kanseri	16
2.3. Mide Kanserinde Patoloji	17
2.4. Erken Mide Kanseri	18
2.5. Mide Kanserinde Yayılım ve Evreleme	20
2.6. Mide Kanserinde Prognoz ve Prognostik Faktörler	23
2.7. Mide Kanserinde Tümör Beliteçleri	23
2.8. Mide Kanseri Patogenezi	24
2.9. Mide Kanserinde Prekanseroz Lezyonlarda Takip	25
2.10. Mide Kanserinde Tedavi Yaklaşımları	26
2.11. Mide Kanseri ve Genetik	27
2.12. Sinyal Yolakları	29
2.12.1. Notch Sinyal Yolağı	29
2.12.2. Jak-STAT Sinyal Yolağı	29
2.12.3. RAS-MAPK Sinyal Yolağı	30

2.12.4.	Wnt Sinyal Yolağı	30
2.12.4.1.	Noncanonical (Kuralsız) Wnt Sinyal Yolağı	32
2.12.4.2.	Canonical (Standart) Wnt/ β -katenin Sinyal Yolağı	33
2.12.4.3.	Wnt Sinyal Yolağı İle İlişkili Hastalıklar	33
2.12.4.4.	Wnt/ β -katenin Sinyal Yolağının Kanser Oluşumda Rolü	33
3.	GEREÇ VE YÖNTEM	35
3.1.	Çalışma Dizaynı ve Hasta Grupları	35
3.2.	Endoskopi ve Doku Örneklemesi İşlemi	36
3.3.	RT – PCR ile WNT Yolağı Genlerinin İfade Profili	37
3.3.1.	Hazırlanan solüsyonlar	40
3.3.2.	Dokulardan RNA İzolasyonu	40
3.3.3.	cDNA Sentezi	42
3.3.4.	RT-PCR array yükleme	42
3.3.5.	Real-Time PCR	43
3.4.	Veri Analizi ve İstatistik	44
4.	SONUÇLAR	45
4.1.	Hasta Grupları	45
4.1.1.	Mide Kanseri Hastalar ve Alt Grupları	46
4.1.2.	İntestinal Metaplazili Hastalar ve Alt Grupları	49
4.2.	WNT Sinyal Yolağı Gen Ekspresyon Analizi	50
4.2.1.	Mide Kanseri Alt Grup Gen Ekspresyon Analizi	56
4.2.1.1.	Midede Tutulum Yeri Göre Gen Ekspresyon Analizi	56
4.2.1.2.	Metastaz Yapmasına Göre Gen Ekspresyon Analizi	58
4.2.1.3.	Mide Kanseri Hastalarında Sağkalıma Göre Gen Ekspresyon Analizi	60
4.2.2.	İM Hastalarının Alt Grup Gen Ekspresyon Analizi	62
4.2.2.1.	HP Görülmesine Göre Gen Ekspresyon Analizi	62
5.	TARTIŞMA	64
6.	SONUÇ	82
7.	ÖZET	83
8.	SUMMARY	84
9.	KAYNAKLAR	85

TABLO LİSTESİ

Tablo 1	Helikobakter Piloni Tanı Yöntemleri	9
Tablo 2	Erken Mide Kanseri Endoskopik Sınıflaması	18
Tablo 3	Mide Kanseri TNM Evreleme Sistemi	21
Tablo 4	Mide Kanseri TNM Evreleme Sistemi	22
Tablo 5	Araştırılacak WNT Sinyal Yolağı Genleri	39
Tablo 6	Hasta Grupları ve Genel Parametreler	45
Tablo 7	Mide Kanseri WNT Sinyal Yolu Gen Ekspresyon Analizi	52
Tablo 8	İM' de WNT Sinyal Yolu Gen Ekspresyon Analizi	54
Tablo 9	Mide Kanseri ve İM Gruplarının Gen Ekspresyonlarının Karşılaştırılması	54
Tablo 10	Diffüz Mide Kanseri ile Kontrol gruplarının Gen Ekspresyonlarının Karşılaştırılması	56
Tablo 11	Diffüz Tutulum Göstermeyen Mide Kanseri ile Kontrol gruplarının Gen Ekspresyonlarının Karşılaştırılması	57
Tablo 12	Diffüz Mide Kanseri ile Diffüz Tutulum Göstermeyen Mide Kanseri gruplarının Gen Ekspresyonlarının Karşılaştırılması	57
Tablo 13	Metastatik Mide Kanseri Hastalarında Kontrol Grubuna Göre Gen Ekspresyon Analizi	58
Tablo 14	Metastatik Olmayan Mide Kanseri Hastalarında Kontrol Grubuna Göre Gen Ekspresyon Analizi	59
Tablo 15	Metastatik Mide Kanseri Hastalarının Metastatik Olmayan Mide Kanseri Grubuna Göre Gen Ekspresyon Analizi	59
Tablo 16	Exitus olan Mide Kanseri Hastalarının Kontrol Grubuna Göre Gen Ekspresyon Analizi	60
Tablo 17	Yaşayan Mide Kanseri Hastalarının Kontrol Grubuna Göre Gen Ekspresyon Analizi	61
Tablo 18	Exitus Olan Mide Kanseri Hastalarının Yaşayan Hasta Grubuna Göre Gen Ekspresyon Analizi	61

Tablo 19	HP Pozitif IM Hastaları ile Kontrol Grubu Göre Gen Ekspresyon Analizi	62
Tablo 20	HP Negatif IM Hastaları ile Kontrol Grubu Göre Gen Ekspresyon Analizi	63
Tablo 21	HP Pozitif IM Hastaları ile HP Negatif IM Hasta Grubu Göre Gen Ekspresyon Analizi	63

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1	Correa Hipotezi	11
Şekil 2	İntestinal Metaplazi Tipleri	14
Şekil 3	Erken Mide Kanseri Endoskopik Sınıflaması	19
Şekil 4	Mide Kanseri TNM Evreleme Sistemi	22
Şekil 5	Mide Kanseri Moleküler Genetik	28
Şekil 6	Wnt Sinyal Yolu	31
Şekil 7	Noncanonical (Kuralsız) Wnt Sinyal Yolu	32
Şekil 8	Wnt Sinyal Yolu ve Kanseri Tedavi Çalışmaları	34
Şekil 9	Mide Kanseri Overekspresyon Olan Genler	51
Şekil 10	IM' de Overekspresyon Olan Genler	53

GRAFİK LİSTESİ

Grafik 1	Mide Kanseri Hastalarında Tümörün Lokalizasyonu	46
Grafik 2	Mide Kanseri Hastalarında Metastaz Varlığı	47
Grafik 3	Mide Kanseri Hastalarında Metastaz Lokalizasyonu	47
Grafik 4	Mide Kanseri Hastalarının Exitus Oranı	48
Grafik 5	Mide Kanseri Hastalarında Canlılık Oranları	48
Grafik 6	İntestinal Metaplazili Hastalarda HP Prevalansı	49
Grafik 7	Mide Kanseri ve IM Hastalarında Gen Ekspresyonu Karşılaştırılması	55
Grafik 8	Mide Kanseri ve IM Hastalarında Gen Ekspresyonu Karşılaştırılması	55

KISALTMALAR LİSTESİ

CagA	: Cytotoxin-associated gene A
VacA	: Vacuolating cytotoxin
CagPAI	: Pathogenicity island cytotoxin-associated gene
CDX	: Caudal-related homeobox gene
NOCs	: N – nitroz compound
IL	: İnterlökin
IL-1RN	: İnterlökin 1 Reseptör Antagonisti
TNF	: Tümör nekrozis faktör
İM	: İntestinal Metaplazi
HP	: Helikobakter Piloni
HpSA	: Helikobakter Stool Antijen
PML	: Polimorfonükleer lökosit
H&E	: Hematoxylin & eosin
CEA	: Karsinoembriyjenik Antijen
JAK – STAT	: Jansin Kinaz Signal Transducer and Activator of Transcription
MAPK	: Mitogen activated protein kinase pathway
APC	: Adenomatous Polyposis Coli
GSK3	: Glycogen Synthase Kinase 3
CK1	: Casein Kinase 1
FZD	: Frizzled
LRP	: Low Density Lipoprotein Reseptor Related Protein
PLC	: Fosfolipaz C
PDE	: Fosfodiesteraz E
PKC	: Protein Kinase C
CAMKII	: Calcium/calmodulin dependent kinase II
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu

I. GİRİŞ

Tüm dünyada önemli bir komorbidite ve mortalite nedeni olan mide kanserinin son yüzyıl içerisinde sıklığı azalma göstermekle birlikte kansere bağlı ölümler içerisinde dünyada 2. sırada yer almaktadır. 1930 yıllarında mide kanseri Amerika Birleşik Devletlerinde kansere bağlı ölümler içerisinde erkekler için en sık 1. sırada, kadınlar için en sık 3. ölüm nedeni olarak gösterilirken son yıllarda her iki cins içinde 7. ölüm nedenidir. Mide kanseri erkeklerde kadınlara oranla yaklaşık iki kat fazla görülmektedir. Coğrafi dağılıma bakıldığında mide kanserinin en yüksek insidansı uzakdoğu ülkelerinde saptanmıştır. Uzakdoğu kadar olmamakla birlikte Doğu Avrupa, Orta ve Güney Amerika'da insidans yüksektir; Kuzey Amerika, Kuzey Afrika, Güney Asya ve Avusturalya'da insidans düşük izlenmektedir. Ülkemizde mide kanseri bronş kanserlerinden sonra 2. sık kanser türüdür. Geçmişte mide kanseri sanayileşmiş ülkelerde yaygın olarak görülmekteydi. Ancak son yıllarda bulunan epidemiyolojik verilerde yeni vakaların %60' ından fazlasının gelişmekte olan ülkelerde olduğu gösterilmiş ve gelişmiş ülkelerde bu oranın hızla düştüğüne işaret edilmiştir.

Mide kanseri açısından risk faktörleri; Helikobakter pilori enfeksiyonu, intestinal metaplazi, displazi, kronik atrofik gastrit, adenomatöz paternde gastrik polip, sigara kullanımı, gastrik cerrahi öyküsü (özellikle billroth 2), genetik-epigenetik faktörler, 1. derece akrabalarda mide kanseri öyküsü, ailesel adenomatozis polipozis, ailesel nonpolipozis kolorektal kanser, Peutz-Jeghers sendromu ve juvenile polipozis 'dir.

Geri dönüşebilir bir süreç olan metaplasi çevresel uyaranlara uyum için bir hücre grubunun başka bir hücre grubuna farklılaşmasıdır. Mide mukozasında oksintik ve antral bölgedeki hücrelerde goblet hücrelerinin görülmesiyle kolaylıkla tanınabilen ve hücrelerin barsak hücreleriyle yer değiştirmesiyle gözlenen olaya İntestinal metaplazi (İM) denir. Mide kanserinin insidansının yüksek olduğu bölgelerde İM insidansıda yüksek izlenmektedir. İM gelişiminde en çok suçlanan ajan Helikobakter pilori (HP) olmakla birlikte, sigara ve yüksek oranda tuz içeren besinler de etyolojide önemli rol oynarlar.

Karsinogenezis, tümör supresör genlerin inaktivasyonu ve protoonkogenlerin aktivasyonu sonucu, klonal ekspansiyonele uğrayan ve selektif olarak proliferasyon yeteneği kazanan hücrelerde, karsinojenlerin indüklediği genetik ve epigenetik hasar ile sürdürülen çok basamaklı ve multifaktoriyel bir süreçtir. Karsinogenezise neden olan çok sayıda gen tanımlanmış ve birçok gen üzerinde çalışılmaktadır. Bundan dolayı çeşitli mekanizmaların ve yolakların insan kanserlerine sebep olduğu düşünülmektedir. Bu yolakların aktivitesinin artması veya inaktive olması karsinogenezise neden olabilir. Bazı "kanser yolakları" spesifik bir kanser türüne dahil olurken, bazıları kötü huylu tümörlerin geniş bir aralığında kritik rollere sahip olabilirler.

Wnt sinyal yolu, birçok canlı türünde organ gelişimi, hücre adezyonu, hücre polaritesi, hücre bölünmesi ve hücre göçü gibi pek çok biyolojik aşamada rol oynar. Fakat normal fonksiyonunun dışında anormal bir şekilde aktive olduğunda kanser oluşumu ile ilişkili roller üstlenir. Örneğin kolorektal kanserlerin % 90'ından daha fazlası bu sinyal yolunda ortaya çıkan mutasyonlardan kaynaklanmaktadır. Wnt ailesine ait genler sinyal molekülleri olarak görev yapan bir grup glikoproteinleri kodlamaktadırlar. Genellikle 350-400 aminoasit uzunluğundaki bu glikoproteinleri kodlayan Wnt genleri memelilerden nematotlara (*C.elegans*) kadar pek çok canlı türünde homolog genler olarak bulunmaktadır. Wnt ailesi sistein aminoasidi bakımından zengin olan en az 19 tane glikoprotein içermektedir. Bunlar genellikle hücreye bağlı olarak bulunurlar, çok azı ekstraselüler olarak bulunur. Wnt proteinlerinin doğrudan neoplastik transformasyon ile ilişkili oldukları görülmüştür.

Wnt sinyal yolu kanonikal ve non-kanonikal Wnt sinyal yolu olmak üzere ikiye ayrılır. Kanonikal Wnt sinyal yolu Wnt/ β -katenin sinyal yolu olarak da ifade edilir. Kanonikal Wnt sinyal yolunun kanser oluşumu ile ilişkisi olduğu bilinirken, non-kanonikal Wnt sinyal yolunun kanser oluşumu ile ilişkisi henüz tam olarak anlaşılmamıştır.

Wnt/ β -katenin sinyal mekanizmasında görev alan genlerin görevleri ile ilgili olarak başta çeşitli kanser tipleri olmak üzere birçok ciddi hastalığın oluşumunda rol oynayan bu sinyal yolunun mekanizması yapılmış birçok

Çalışma ile aydınlatılmaya çalışılmıştır. Buna rağmen, özellikle mide karsinogenezinde sitoplazmada gerçekleşen mekanizma tam olarak ortaya konulamamıştır. Bu nedenle, çalışmamızda, mide kanseri ve İM de Wnt sinyalinin hücrenin sitoplazmasında gerçekleşen reaksiyonlarda görev alan genlerin ekspresyon profillerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Mide kanserinde hem tedavi kolaylığı hem de maliyet etkinliği açısından erken mide kanseri tanısı önemlidir. Yüksek mortalite ve morbidite nedeniyle bu genlerin ekspresyon profillerinin çıkartılması sinyal yolunun kontrolsüz aktivasyonuna bağlı olarak oluşan mide karsinomlarının erken tanısında ve tam bir prognoz değerlendirmesinde yeni fırsatlar sağlayacaktır .

II. GENEL BİLGİLER

2.1. Mide Kanseri

Mide kanseri tüm dünyada önemli bir morbidite ve mortalite nedenidir. Son yüzyıl içerisinde sıklığında azalma gözlenmekle birlikte mide kanseri dünyada en sık görünen 4. kanser ve kansere bağlı ölümler içerisinde 2. sırada yer almaktadır [1-2]. Dünyada 2008 yılında yeni tanı mide kanseri sayısı 989600 kişidir ve yaklaşık olarak 2008 yılında 73800 kişinin mide kanseri nedeniyle öldüğü düşünülmektedir. Bu sayı da total kanser vakalarının %8'i ve kansere bağlı ölümlerin %10'u etmektedir [3]. Erkeklerde mide kanserinin görülmesi kadınlara oranla yaklaşık iki kat fazladır [4]. Coğrafi dağılıma bakıldığında mide kanserinin en yüksek insidansı uzakdoğu ülkelerinde saptanmıştır. Uzakdoğu kadar olmamakla birlikte Doğu Avrupa, Orta ve Güney Amerika'da insidans yüksektir; Kuzey Amerika, Kuzey Afrika, Güney Asya ve Avustralya'da insidans düşük izlenmektedir [5]. Dünya çapında batı ülkelerinde sıklığı son üç dekadta giderek azalmaktadır [3]. Mide kanseri Türkiye'de bronş kanserlerinden sonra en sık kanser türüdür. Ülkemizde de insidans olarak Güneydoğu ve Doğu Anadolu bölgelerinde daha sık izlenir [4].

2.1.1. Midenin Anatomisi

Sindirim sisteminin en geniş kısmını oluşturur. Özofagus ve duodenum arasında bulunan bu organ J şeklindedir. Karın boşluğunun sol üst kadranında yer alır. Superomedial sınırı küçük kurvatur, inferolateral sınırı büyük kurvaturdur. Ön üst yüzünün bir kısmı karaciğer sol lobunun arkasında bulunur. Posterior olarak pankreas, böbrek, dalak, kolonun splenik fleksurası, kaudat lob, retroperitoneal arter ve sinirler komşuluğundadır [6].

Kardiya, fundus, korpus, antrum ve pilor olarak 5 bölüme ayrılır. Korpus midenin en büyük bölümünü oluşturur ve insisura angularise kadar uzanır. Pilor ise midenin duodenuma yakın olan bölümüdür ve distal sfinkteri oluşturur.

Küçük kurvatur sol gastrik arter (çölyak trunkus dalı) ve sağ gastrik arter (ana hepatik arter dalı); büyük kurvatur ise sağ gastroepiploik arter (gastroduodenal arter dalı) , sol gastroepiploik arter ve kısa gastrik arter (splenik arterin dalları) tarafından beslenir. Midenin innervasyonu sempatik ve parasempatik sinirler aracılığıyla olur. Parasempatik lifleri vagal sinirden, sempatik sinir lifleri çölyak pleksusdan kaynaklanmaktadır [6].

2.1.2. Midenin Histolojisi

Mide duvarı histolojik olarak 4 kısımdan oluşur.

Tunika Mukoza: Üç kısma ayrılır.

1. Epitel tabakası: Yüksek kolumnar epitel ile döşelidir. Mukus ve bikarbonat sekrete eden hücreler bulunur. Mukus asidin yıkıcı etkisinden mukozayı korur. Epitel tabakasında yüzey ve foveolar hücrelerin etrafında sıkı bağlantılar bulunur. Bu bağlantılar aside karşı mukozayı koruyan diğer bir faktördür.
2. Lamina Propria: Kollajen ve elastik lifler ile oluşan ve yapısal destek sağlayan kısımdır. Kapillerler, arterioller ve nonmyelinize sinir lifleri bulunur. Lenfatikler derin lamina propriada yerleşmiştir.
3. Muskularis Mukoza: Mukozanın alt kısmında, düz kaslardan oluşan kısımdır.

Tunika submukoza: Kollajenden zengin bir tabakadır. Mide duvarının en sağlam bölümünü oluşturur. Parasempatik sistem için önemli olan Meissner pleksusunu barındırır.

Tunika muskularis: Düz kas liflerinden oluşur ve 3 tabakadır. Dış tabaka longitudinal, orta tabaka sirküler, iç tabaka oblik kaslardan oluşmuştur. Orta muskuler tabaka tamamı kaslardan oluşan tek mide duvarı katıdır, pilora doğru gidildikçe kalınlaşır ve sfinkteri oluşturur. Muskularis propria tabakasında otonomik sinirler ve Auerbach myenterik pleksusu bulunmaktadır.

Tunika seroza: Mide duvarının en dış tabakasıdır. Dıştan mezotelyum ile örtülür. Devamını periton oluşturmaktadır [7].

2.1.3. Midenin Embriyolojisi

Mide primitif sindirim kanalının ön bağırsak kısmından tübüler bir yapı olarak gelişen bir organdır ve endodermden oluşur. Gebelikte 4. Haftada ön barsağın fusiform genişlemesi sonucunda belirir. Uzun eksen etrafında saat yönünde 90 derece dönmesi büyük ve küçük kurvaturların oluşumuyla sonuçlanır. Enzim ve asit üretimi ilk olarak fetal hayatın 4. ayında başlar. Yenidoğandaki mide tamamen erişkininkine benzer [8].

2.2. Mide Kanseri Etiyoloji ve Risk Faktörleri

Mide kanseri multifaktöriyel bir hastalıktır. Gelişimini etkileyen muhtemel nedenler helikobakter pilori enfeksiyonu, intestinal metaplazi, displazi, kronik atrofik gastrit, adenomatöz paternde gastrik polip, sigara kullanımı, gastrik cerrahi öyküsü (özellikle billroth 2), genetik-epigenetik faktörler, 1. derece akrabalarda mide kanseri öyküsü, ailesel adenomatozis polipozis, ailesel nonpolipozis kolorektal kanser, Peutz-Jeghers sendromu ve juvenile polipozisdir.

2.2.1. Helikobakter Pilon

Barry Marshall ve Robin Warren tarafından 1984 yılında peptik ülserde keşfedilen Helikobakter pilori (HP) o dönemde bu buluşla Fizyoloji ve Tıp dalında onlara Nobel ödölünün kazandırmıştır. O dönemde Camplyobakter Pilon (CP) olarak adlandırılrsa da 1989 yılında kendine has toksinleri nedeniyle Helikobakter Pilon adını almıştır [9,10]. O dönemden sonra 30 yılı aşkın bir süre boyunca güncel olarak araştırma konusu olma özelliğini korumuş olan helikobakter pilori birçok alanda bulunmasına rağmen esas konaklama alanı midedir.

HP'nin modern insana geçişi 58.000 yıl önce Doğu Afrikadan modern insanın göçü sırasında olduğu düşünülmektedir. Dünya nfsunun neredeyse yarısını etkileyen HP gram negatif bir bakteridir ve peptik ülser, gastrik kanser gibi önemli patolojiler için risk faktörüdür [11].

Doğu Asya ve Latin Amerika gibi gelişmekte olan ülkelerde sıklığı fazladır. Diğer yandan Fransa, Amerika Birleşik Devletleri, Avustralya gibi gelişmiş ülkelerde hem çocukluk çağında hemde erişkinlerde enfekte olma oranı düşük izlenmektedir [12]. Prevelansı sosyo ekonomik koşulların kötü olması, kalabalık ortamda yetişme ve düşük eğitim düzeyi ile yakından ilişkilidir. Ayrıca genetik özellikler, hijyen durumu, aile içi yaşam alışkanlıkları, cinsiyet dağılımında etkili diğer faktörlerdir [13,14]. Ülkemizde yapılan bir çalışmada da aile içinde anne ve babada HP bulunması ocuklarda HP sıklığını artırmaktadır. Bu sonuçta aile içi alışkanlıkların ve hijyenin önemini göstermektedir [15]. Ülkemizde en son yapılan TURHEP çalışmasına göre HP prevelansı %81,6 saptanmış ve erkeklerde kadınlara oranla daha sık gözlenmiştir [16].

2.2.1.1 Helikobakter Pilon Tanı Yöntemleri

Hp 'nin endoskopik olarak spesifik bir görüntüsü yoktur. Tanıda invaziv ve non-invaziv yöntemler kullanılır. HP tanısında kullanılan yöntemlerin birlikte kullanımları doğruluk oranını artırmaktadır.

Non-invaziv testler serolojik testler, dışkıda helokobakter pilori antijeni ve üre-nefes testini içerir. Serolojik yöntemlerle hasta serumunda IgG antikorları bakılır. Tedavi olan hastalarda bile antikorların pozitifliği en az 1 yıl devam ettiği için kullanımı sınırlıdır [17,18]. Son yıllarda immunoassay yöntem ile hastaların dışkısında HP antijeni (HP Stool antijen - HpSA) bakısı kullanılmaya başlanmıştır. Tedaviden önce ve sonrasında HP testipi için sensitivitesi ve spesivitesi %90'nın üzerinde bulunmuştur. Girişimsel yöntem kullanılmaması, ucuz olması ve güvenilir olması nedeniyle epidemiyolojik çalışmalarda sık tercih edilmektedir [19]. Diğer bir non-invaziv yöntem ise üre-nefes testidir. Üre nefes testinde hastaya C13 ve C14 işaretili üre ağız

yoluyla verilir. HP'nin üreaz enzimi ile tepkimeye girerek CO₂ açığa çıkar. Solunum yoluyla atılan CO₂ ölçülerek HP tespit edilir. Subtotal gastrektomili hastalarda test önerilmemektedir [19].

Hp tanısı için invaziv yöntemler içinde histopatoloji, üreaz testleri ve kültür bulunur. Aynı zamanda polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemi de kullanılmaktadır fakat pahalı, ulaşılabilirliği az olması nedeniyle sık tercih edilmemektedir. Histopatolojik çalışma için HP'nin en sık bulunduğu alandan; antrumdan örnek alınır. En büyük avantajı HP beraberinde intestinal metaplazi, atrofik gastrit, kanser gibi patolojilerin varlığını saptamaya yardımcı olmasıdır. Pahalı olması, invaziv işlem gerektirmesi, inceleyen kişilerin yorumlama farklılıkları ve uzun sürede sonuç vermesi dezavantajlarıdır [20]. Üreaz testi ürenin HP tarafından üreaz enzimi ile NH₃ ve CO₂ ayırmasına dayanır. HP ayrıca mideden biopsi ile alınan dokudan kültür yöntemi ile izole edilebilir. Alınan biopsi örneğinin transportunun zor olması, yöntemin pahalı olması bu yöntemin kullanılabilirliğini azaltmaktadır [21].

Tablo 1: Helikobakter Piloni Tanı Yöntemleri [20]

Test	Duyarlılık (%)	Özgüllük (%)	Avantajları	Dezavantajları
Non-invaziv Yöntemler :				
Seroloji	76-84	79-90	Ucuz, ulaşılabilir	Tedavi sonrasında pozitif sonuç anlamlı değil
Üre – Nefes	>95	>95	Tedavi öncesi ve sonrasında kullanışlı	Testi yapacak kaynak ve personel gerekli Antibiotik, bizmur ve PPI kullanımından etkilenir
Dışkıda Antijen Testi	96	97	Tedavi öncesi ve sonrasında kullanışlı	Dışkı örneği vermek hasta için zor olabilir Antibiotik, bizmur ve PPI kullanımından etkilenir
İnvaziv Yöntemler :				
Histopatoloji	95	99	Mide mukozası hakkında ek bilgi sağlar	Pahalı Eğitimli personel gerektirir Bakan kişinin yorumlamasına bağlı PPI ve antibiyotikten etkilenir
Üreaz Testi	90	93	Hızlı cevap verir PPI ve antibiyotik kullanımından etkilenmez	Endoskopi gerektirir Tedavi sonrasında ya da PPI kullananlarda etkisi daha az
Kültür	58.1	100	Özgüllük %100	Eğitimli personel Donanımlı tesisler

2.2.1.2 Helikobakter Piloni Patogenezi

HP genetik değişkenliği ve tür içi çeşitliliği fazla olan bir bakteridir. Bu farklılıklar virölansı da etkiler. Önceki çalışmalarda da izlendiği üzere sitotoksin ilişkili gen A (CagA) ve vakoulizasyon ilişkili sitotoksin (VacA) ' in peptik ülser, prekanseröz lezyonların gelişiminde önemi büyüktür [22,23].

HP intestinal tip gastrik kansere iki önemli mekanizma ile neden olabilir. Bunlarda birincisi birkaç dekat içinde oluşan artmış hücre döngüsü ve mitotik hataların birikimi sonucunda oluşan inflamasyon sonucunda indirekt yolla oluşur. Correa hipotezi adı verilen bu yolda öncelikle atrofik gastrit, sonrasında sırasıyla intestinal metaplazi, kolonik metaplazi, displazi oluşur ve mide kanserine yol açar. Diğer mekanizma ise direkt hasarla ilişkilidir. Hayvan alışmalarında HP ile enfekte edilmiş mide mukozasında artmış mutasyon oranları saptanmıştır. Hayvan alışmalarında HP ile enfekte gastrik mukozada mutasyon oranının arttığı gösterilmiştir. Çalışmalarda CagA+ suşların bulunduğu lezyonlarda atrofik gastrit ve mide kanseri oluşumuna neden olabilecek inflamatuvar süreçler daha fazla gözlenmektedir. Bakterinin Cag patojenik adacık (cagPAI) tarafından kodlanan sekresyon sistemi ile CagA ve peptidoglikan mide epitel hücresine giriş yapar. Bu yolla birçok sinyal yolağını (mitojen aktive eden protein kinaz, NF-kB, phosphoinositide-3 kinase) aktive eder. Ayrıca cagPAI direkt olarak gastrik epitel hücresinde immunglobulin sentezini sağlayan aktivasyonu indükleyen deaminazı (AID) etkiler. VacA ise T-hücreleri baskılar, hücre içi sinyal yolağını etkiler, direkt olarak mitokondriyi hedef alır ve programlanmış hücre ölümünü etkiler [24, 25, 26]. Ayrıca BabA, DupA, FlaA, SabA and OipA gibi diğer virölans faktörler üzerinde çalışılmaktadır. Hücreler arası bağlantıda rolü olan E-kadherinin hipermetilasyonunun da HP infeksiyonunda rolü gösterilmiştir [27].

ŞEKİL -1 Correa Hipotezi [24]



2.1.1.3 Helikobakter Piloni ile İlişkili İntestinal Metaplazi Dışı Hastalıklar

Gastrit, duodenal ülser, gastrik ülser, mide kanseri, mukoza ile ilişkili lenfoid doku kaynaklı B hücreli lenfomalar, otoimmün hastalıklar ile ilişkilendirilen HP güncel olarak birçok hastalıkta suçlanmaya ve araştırılmaya devam edilmektedir [28,29]. Yıllık ortalama %1-3 oranında gastrit atrofik gastrite ilerleyebilir. Atrofiye gidiş korpus dominant tipte %31, antrum dominant tipte %45' lere varan oranlarda olabilmektedir [30,31].

Atrofik gastrit midenin değişik bölümlerinde normalde olması gereken bezlerin kaybı ve bunların yerini başka doku ve bezlerin almasıdır. Bunlar, ekstrasellülmatriks, fibroblast, kollajen, psödopilorik ya da intestinal bezlerdir. Atrofik gastritin en sık iki nedeni otoimmün ve HP enfeksiyonudur. Otoimmün kaynaklı olanda antral mukoza korunmuşken HP gastritinde multifokal atrofi söz konusudur [32]. Atrofik gastrit intestinal metaplazi alanlarıyla sıklıkla birlikte ve gastrik kanser yönünden artmış risk taşır [33].

Patolojik olarak tariflemek gerekirse muskularis mukozaya kadar uzanan doku kaybına ülser denilir [34]. Duodenal ülser oluşumunda HP etkisini gastrik asit salgılamasında artış ve bunlara bağlı olarak uyarılmış olan immun yanıt ile gösterir. HP eradikasyonu sonrasında gastrik asit oluşumunun azalması bunu destekler niteliktedir.

Mide mukozasında önemli oranda lenfoid doku bulunmamakla birlikte HP enfeksiyonu sonrasında mide lamina propria bölümünde CD4 lenfosit ve

B lenfosit birikimi oluşur. Antijen sunumu ile T lenfosit aktivasyonu artar, B lenfosit hücre proliferasyonu gözlenir. Sonuçta midede lenfoid folikül oluşur. Gastrik MALT lenfoma (Lymphoma, Mucosa-Associated Lymphoid Tissue) HP ile yakın ilişkili olduğu gözlenmiştir [35,36].

Graves ve hashimoto hastalarında HP rolü birçok çalışma ile araştırılmıştır. HP seroprevelansının bu hastalarda kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğu gözlenmiştir. Yine güncel bir konu olan immun trombositopenik hastalarda HP oranının yüksek olduğu gözlenmiştir [37,38].

2.2.2. İntestinal Metaplazi

Normal mide dokusunun yerine kriptik intestinal fenotipte hücrelerin geçmesine intestinal metaplazi denir. Midede en sık görülen metaplazi tipidir. Bu durumun mide epitelinin mide asidinden korunmak amacıyla oluşturduğu bir mekanizma olduğu düşünülmektedir. Midede ince bağırsak mukozasına benzer hücrelerin tespiti ilk defa 19. yüzyılda olmuştur [39].

Mide kanseri için prekanseröz bir lezyon olan intestinal metaplazi dünyada bireylerin yaklaşık ¼' ünde saptanır. Atrofik gastritin HP ile progresyonu sonucunda, atrofik gastritin bir basamak sonrasında olduğu sürülmektedir [40,41]. Mide de ilk olarak ağırlıkla incisura angularis kısmında gözükür daha sonrasında korpus ve antrumda ki komşu dokulara yayılır.

Mide kanseri için yüksek oranda risk taşıdığı için intestinal metaplazinin bu potansiyel dönüşüm yolu merak konusu olmuştur. Bir kısım çalışmalarda HP eradikasyonu ile intestinal metaplazinin geri döndürülebildiği gösterilse de, son yapılan çalışmalarda hasta grubunun çoğunda intestinal metaplazi varlığının devam ettiği gösterilmiştir [41].

İntestinal metaplazi sürecinde ortaya çıkan kronik inflamasyon sonucunda karsinogenezisin çok farklı yolları tetiklenebilir. Karsinogenezisin başlaması, ilerlemesi ve metastazında bu inflamatuvar sürecin, reaktif oksijen moleküllerinin ve nitrojenlerin rolü açıkça gösterilmiştir. DNA, RNA ve protein üretiminde oluşan defektler sonucunda hücrede bazı mutasyonlar oluşabilir.

Correa hipotezi de intestinal metaplazinin bu nedenlerle süreçte displaziden önceki basamağı oluşturduğunu öne sürmektedir [24,42].

Mide kanseri ve intestinal metaplazide inflamatuvar sürecin bir kanıtı olarak anormal CDX1 ve CDX2 ekspresyonları da gösterilmiştir [43].

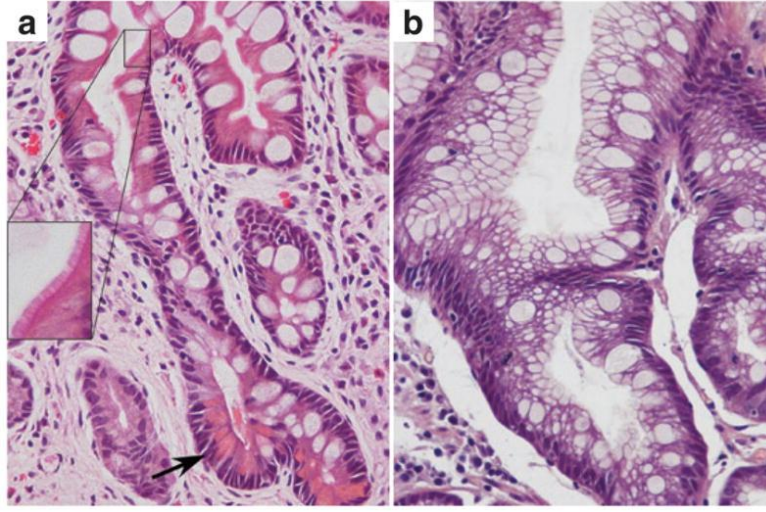
2.2.2.1 İntestinal Metaplazi Tipleri

İM temel olarak histopatolojik ve histokimyasal özelliklere göre sınıflandırılmaktadır.

Tip I (Komplet Tip): Gastrik mukoza neredeyse tamamen ince barsağa benzemiştir. Fırçamsı karakterde, absorbtif hücreler bulunur. Villüs ve kript yapısı bile gelişebilir. Paneth hücreleri izlenir. Goblet hücreleri N-acetyl sialomüsin nadiren sülfomüsin sekrete edebilir. Absorbtif hücreler sekresyon yapmazlar. Mide mukozası endoskopik biopsi örneklerinde duodenum mukozasından güç ayrılır.

TipII ve Tip III (İnkomplet Tip): Paneth ve absorbtif hücreler bulunmaz. Kolumnar ve goblet hücrelerindeki sialomüsin ve sülfomüsin içeriğine göre “ İnce barsak tipi ” ya da “ Kalın barsak tipi ” olarak iki şekilde izlenirler. Kolonik tip mide kanseri ile ilişkilendirilmiştir [44].

ŞEKİL -2 İntestinal Metaplazi Tipleri [44]



- a) Komplet Tip : Eozinofilik enterositler ile değişen iyi tanımlanmış goblet hücreleri (kutu içinde) / Fırçamsı kenar ve Paneth hücreleri (ok)
- b) İnkomplet Tip : Değişik boyut ve şekilde; çok sayıda musin damlacıkları / Fırçamsı kenar yokluğu H&S

2.2.3. Diyet

Birçok epidemiyolojik çalışma, hayvan deneyleri ve invivo çalışmalar diyetin kanserle ilişkisini kanıtlamıştır. Sağlıklı beslenme ve fiziksel aktivitenin kanser sıklığını azalttığını gösteren çalışmalarda sıkça bulunmaktadır. Fakay bilinen bu bilgiler günlük hayatta düzenli kullanılamamaktadır.

Tuz ve tuzlu gıdalar mide kanserini artırmak ile en çok suçlanan diyet faktörleridir. Nişastasız beslenmek, soğan-sarımsak gibi sebzelerin ve meyve tüketiminin artırılması mide kanseri riskini azaltmaktadır [45].

2.2.3.1. Tuz

İnflamatuvar süreci ve hücre proliferasyonunu artırarak, direkt etki ile karsinogenezi etkilediği düşünülmektedir. HP varlığında bu riskin arttığı düşünülmektedir. Yapılan in vitro çalışmalarda yüksek tuz varlığında HP'nin yüksek oranda CagA salgıladığı gösterilmiştir [46].

2.2.3.2. Sebzeler ve Meyveler

Yeterli meyve ve sebze alımının intestinal kanserler dahil birçok kanserin riskini azalttığı düşünülmektedir. Latin Amerika da vaka-kontrollü yapılan bir çalışmada sebze ve meyvelerin bu riski orta derecede azalttığı gösterilmiştir [47].

2.2.3.3. Vitamin ve Mineraller

Bazı mikrobelerin ve minerallerin mide kanseri riskini azalttığı gösterilmiştir. Özellikle mineraller içinde selenyumun bu mineraller içinde göz önüne çıkmaktadır. Aynı şekilde selenyumdan fakir beslenen bölgelerde mide kanseri prevalansı daha yüksek saptanmıştır. Antiinflamatuvar ve antiangiogenezisde rol aldığı, serbest oksijen radikalleri üzerinden etki ettiği düşünülmektedir. C vitamininin HP etkinliğini azalttığı düşünülmektedir. Çinko, karotenoid ve E vitamininin de mide kanserinin azalttığı gösterilmiştir [48].

2.2.3.4. Nitrat, Nitrit ve Nitrozamin,

Diyetle alınan nitratlar lahana, karnıbahar, havuç, kereviz, turp, pancar ve ıspanakta doğal olarak ya da koyucu madde amacıyla eklenmiş olarak bulunabilir. Ayrıca gübre ve sulama yoluyla da besinlerin nitrat oranı artabilir. Vücut içerisinde ise nitrit, nitrat ve nitrozamin bakteriler ya da aktifleşmiş makrofajlar yoluyla sentezlenebilir.

Diyetle alınan nitrat mide asidi tarafından karsinogenik olan N-nitroz bileşikleri (NOCs) haline dönüştürülür. NOC aynı zamanda salamurlarda, etlerde, ateşte direkt kurutulmuş kahvede, hazır çorbalarda bulunur [49,50].

2.2.4. Sigara ve Alkol

Siagara içmenin mide kanseri riskini artırdığı gösterilmişse de alkol alımının etkisi ise tartışmalıdır. Ağır bir şekilde alkol kullananlarda mide kanseri arttığı gösterilmiş olsada bu kişilerin sigara içilen ortamda fazla bulunması ve alkolün yanında sigara kullanımının sık olması faktörü göz ardı edilmemelidir [51].

2.2.5. Genetik Polimorfizm

Genetik polimorfizmin mide kanserinde geniş temelleri olup ağırlıklı olarak inflamatuvar ilişkili genler (IL-1 β , IL-1RN, IL-10, TNF, vb.) ile ilgili bulunmuştur.

İnterlökin (IL) 1 β ve tümör nekrozis faktör (TNF) α 'nın gastrik asidi baskıladığı gösterilmiştir ve bu sitokinler proinflamatuvar etkileri ile mide antrum ve korpusunda HP 'nin etkisini artırarak mide kanseri patogeneğinde suçlanmakla birlikte IL – 10 ' nun ise antiinflamatuvar etkisi ile koruyucu yönde yer almaktadır [46,52,53].

2.2.6. Ailesel Mide Kanseri

Mide kanseri olgularında aile öyküsü %20 bulunmaktadır [54]. Ailesel olguların büyük bir kısmı sporadik olarak kabul edilir. Buna neden olarak da aynı sosyoekonomik kültür, benzer beslenme şekli ve HP gibi ortak çevresel faktörlere maruz kalma gösterilebilir.

Mide kanserinin bir kısmı ise ailesel kanser sendromları şeklinde izlenebilir. Bunlara örnek olarak kalıtsal diffüz mide kanseri sendromu, Lynch sendromu, ailesel adenomatöz polipozis, Peutz-Jeghers sendromu ve Li-Fraumeni sendromu verilebilir.

Kalıtsal diffüz mide kanseri sendromu nadir rastlanır ve otozomal dominant seyreder. Ailesel mide kanserlerinin %1-3 'nü oluşturur. Adhezyon

molekölü rolü olan E-kadherin mutasyonu sonucunda ortaya çıkar. Bu hastalarda 20 'li yaşlarda profilaktik gastrektomi gereklidir [55].

Lynch sendromu otozomal dominant seyreden diğer nadir nedenlerden biridir. Hastalık ağırlıklı olarak kolon kanseri ile seyreder ve endometrium kanseri, mide kanseri, over kanseri olgularda eşlik edebilir [56].

Peutz-Jeghers sendromu gastrointestinal sistemde polipler ve hiperpigmentasyon ile seyreden otozomal dominant bir hastalıktır. Adenomatöz değişiklikler için yüksek risk taşır [57].

2.3. Mide Kanserinde Patoloji

Mide kanseri; genetik predispozisyon ve çevresel faktörlerin karmaşık etkileşimi sonucu ve bir dizi moleküler olay sonrası neoplastik değişiklikler ile ortaya çıkar. Mide kanserlerinin % 90' nını adenokarsinomlar oluşturur. Geri kalan kısmı lenfomalar, sarkomlar ve karsinoid tümörler oluşturur. En sık antrumda (%50) gözlenir. Sonra sırasıyla korpus, fundus ve gastroözefageal bölgede izlenir.

Makroskopik görünüm olarak ilk kez 1926 yılında Borrmann tarafından sınıflandırılmıştır ve Borrmann sınıflandırılması günümüzde hala kullanılmaktadır [58].

Tip 1 Polipoid Tip: En sık görünüm olarak (%40-50) polipoid kitle şeklindedir.

Tip 2 Yüzeyel Yaygın Tip: En az sıklıkta görülür.

Tip 3 Ülser Tip: 2. sıklıkta görülür [59].

Mikroskopik olarak sınıflandırılması adenokarsinomlar için geçerlidir. 1965 yılında kullanılmaya başlanan, Lauren sınıflaması olarak adlandırılan bu sınıflamada 3 alt tip bulunur. Tip 1 intestinal tip, Tip 2 diffüz tip olarak adlandırılırken miks tip olan Tip 3 Tip 2 'nin alt tipidir [60].

İntestinal Tip; Tip 1 mide kanserinde diskrete bezler konnektif doku etrafında bulunur ve barsak kanserini andırır. İntestinal metaplaziden köken alır. Yüksek riskli kişilerde bulunur. Erkeklerde ve yaşlılarda görülmesi daha sıktır.

Diffüz Tip; Kötü prognoza sahiptir. Daha az diferansiye ve yoğun müsin içeriği vardır. Yoğun müsin nedeniyle taşlı yüzük hücre (signet ring cell) görünümü verir. Gençlerde ve kadınlarda daha sık rastlanır [61].

2.4. Erken Mide Kanseri

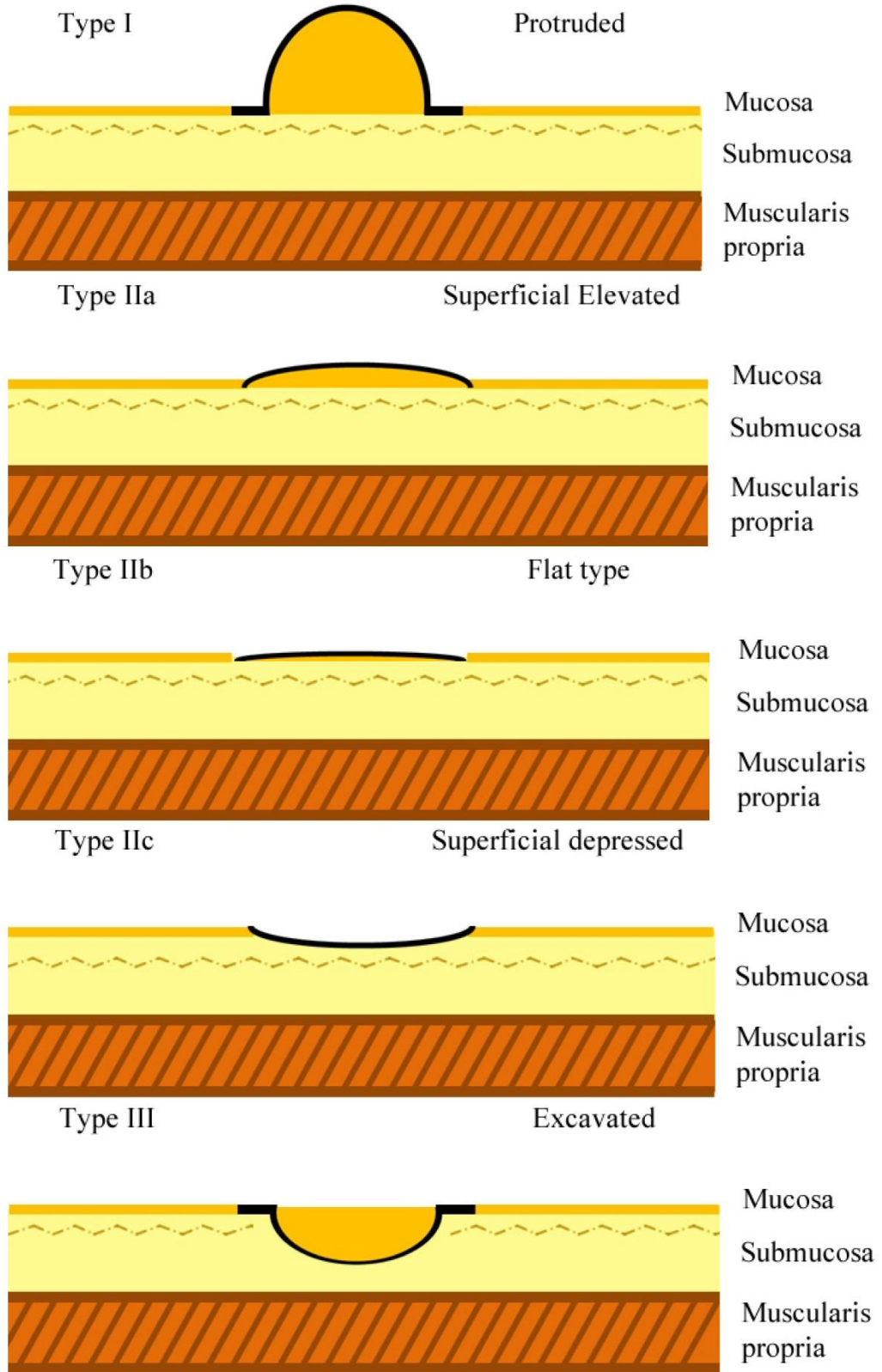
Erken mide kanseri 1963 yılında Japon Mide Kanseri Araştırma Cemiyeti tarafından tanımlanmıştır. Bu tanıma göre lenf nodu tutulumuna bakılmaksızın mukoza veya submukozaya sınırlı mide adenokarsinomuna erken mide kanseri denir [62,63].

Metastatik mide kanserinin sitotoksik kemoterapi sonrasında yaşam süresi 1 yılın altındadır [64]. Mortalite ve morbiditenin fazla olması nedeniyle bazı ülkelerde erken tarama programları yapılmaktadır. Erken mide kanserinde endomukozal rezeksiyon ile sağkalım artmış ve 5 yıllık yaşam şansı % 96.8 olarak gösterilmektedir [65].

Tablo 2: Erken Mide Kanserinde Endoskopik Sınıflaması [66]

Tip 1 - Polipoid tip (Protruted) :	Pedünküllü Ip Sessil Is
Tip 2 – Yüzeyel tip (superficial) :	Biraz Yüksek (Superfisial elevated) Ila Düz (Flat tip) Ilb Yüzeyel Deprese (Superfisial Depressed) Ilc
Tip 3 – Ülsere tip (Excavated) :	Ülsere Tip III

Şekil - 3 Erken Mide Kanseri Endoskopik Sınıflaması [66]



2.5. Mide Kanserinde Yayılım ve Evreleme

Mide kanseri erken dönemde nadiren semptomla neden olur. Kilo kaybı gözlenebilmekle birlikte sıklıkla ileri evrede gözükür. Hastalar ya katabolizma nedeniyle kaybettikleri enerjiyi karşılayamazlar ya da hastalarda disfaji, karın ağrısı nedeniyle oral alımda azalma gözlenir. Disfaji sıklıkla özofagus mide bileşiminde, proksimal mide tutulumunda gözlenir. Hastalarda mide bulantısı çoğunlukla linitis plastica gibi ileri evrede ya da distal tutulumu olan büyük kitlelerde saptanabilir. İleri evrede kitleden kanama gözlenmekteyse de her evrede karşılaşılabilmektedir. Hastalarda evrenin ilerlemesine bağlı Myenterik plexusun tutulması ve sonrasında akalazya benzeri semptomlar oluşabilir [67,68].

Hastalarda şiddetli semptomların ileri evrede görülmesi çoğunlukla tanının gecikmesinde faktördür. Ayrıca mide kanserine özel biomarkerların bulunmaması, kişiye özgü kemoterapi rejiminin yokluğu da düşük yaşam süresine yol açmaktadır [69].

Kanser 3 şekilde yayılım gösterebilir.

Vücut Boşlukları ve Yüzeyleri Yoluyla Yayılma: Malign tümörlerde tümör kitlesinden kopan hücreler vücut boşluklarını çevreleyen yüzeylere ulaşarak vücut boşluğundaki komşu doku ve organlara yayılabilmektedir.

Lenf Damarları Yoluyla Yayılma: Karsinomlar genellikle bu yolla yayılım gösterirler. Bölgesel lenf düğümlerine ulaşan kanser hücreleri burada tutulur. Lenf düğümleri yayılımı engellemeye çalışırlar, ancak bir süre sonra kanser hücreleri burada yerleşip büyümeye neden olur.

Kan Damarları Yoluyla Yayılma: Sarkomlar sıklıkla bu yolla yayılırlar. Özellikle venöz damarların çeperi kanser hücreleri tarafından kolayca invaze edilebilirler. Kopan tümör hücreleri kan akımına karışır. Kan dolaşımı yoluyla metastazlar en sık karaciğer ve akciğerde görülür. Tiroid folliküler karsinom, Renal hücreli karsinom ve hepatosellüler karsinom hematogen yolla yayılan kanserlere iyi birer örnektirler [70,71].

Mide kanserinde en sık uzak metastaz karaciğer, peritona ve bölgesel olmayan ya da uzak lenf noduna olur. Daha az sıklıkla over, santral sinir sistemi, kemik, akciğer ve yumuşak dokuya metastaz gözlenir.

Lenfatik yolla yayılmaya başlayan mide tümöründe fizik muayenede en sık bulgu sol supraklavikuler lenf nodu (Virchow nodülü) tutulumudur. Ayrıca umbilikal bölge etrafında nodüler tutulum (Sister Marry Joseph) ve sol aksiller lenf nodu (İrish nodülü) tutulumu görülebilir.

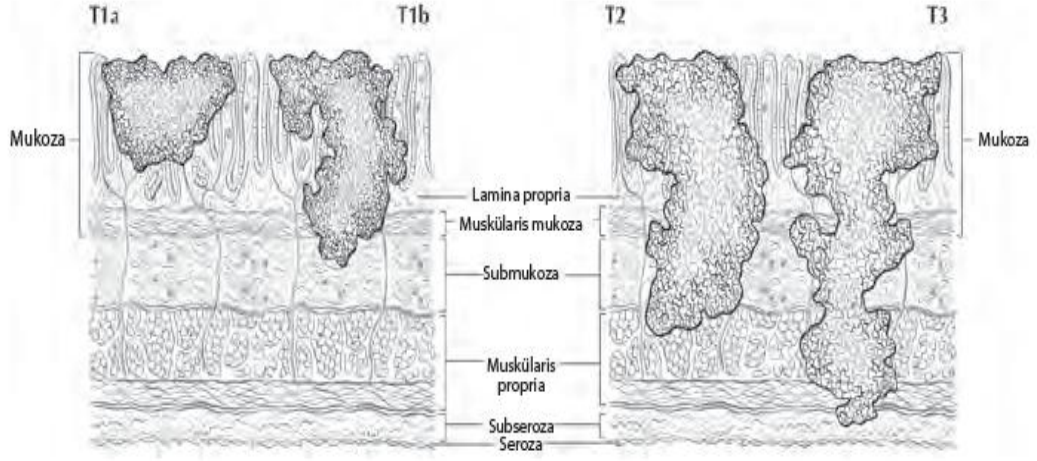
Hastalarda periton yayılımına bağlı olarak over tutulumu (Krukenberg tümörü) ve rektum tutulumu (Blummer shelf) görülebilir. Diğer organların over metastazı da benzer görünüm verebilir.

Asit oluşan hastalarda peritoneal kasrinomatozis düşünülmeli. Sarılık gelişen ve alkelen fosfataz düzeyi yükselen hastalarda karaciğer metastazı düşünülmelidir [59].

Tablo 3: Mide Kanserinde TNM Evreleme Sistemi [72]

Primer tümör (T)	
Tx	Primer tümör saptanamadı
TO	Primer tümöre ait bulgu yok
Tis	Karsinoma in situ
T1	Tümör lamina propria-muskularis mukoza-submukozayı tutmuştur
T1a	Tümör lamina propria veya muskularis mukozayı tutmuştur
T1b	Tümör submukozayı tutmuştur
T2	Tümör muskularis propriayı tutmuştur
T3	Subserozayı tutmuştur,visseral periton, komşu organ tutulumu yok
T4	Tümör seroza (visseral periton), komşu organları tutmuştur
T4a	Tümör serozayı (visseral periton) tutmuştur
T4b	Tümör komşu organları tutmuştur
Lenf Nodu Metastazı (N)	
Nx	Bölgesel lenf nodları saptanamadı
N0	Bölgesel lenf nodu metastazı yok
N1	1-2 lenf nodu metastazı
N2	3-6 lenf nodu metastazı
N3	7 veya daha çok lenf nodu metastazı

Şekil - 4 : Mide Kanserinde TNM Evreleme Sistemi [73]



Tablo 4: Mide Kanseri TNM Evreleme Sistemi [59]

Evre	T	N	M
I	T1	N0	M0
	T1	N1	M0
	T2	N0	M0
II	T1	N2	M0
	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
III	T2	N2	M0
	T3	N2	M0
	T4	N0	M0
IV	T4	N2	M0
	Tx	Nx	M1

2.6. Mide Kanserinde Prognoz ve Prognostik Faktörler

Mide kanserinde en önemli prognostik faktör hastalığın evresidir. Bu yüzden Doğu Asya ülkelerinin bir kısmında erken tanı için tarama programları erken yaşlarda yapılmaktadır. Amerika da tüm mide kanseri hastalarında 5 yıllık sağkalım %29 iken Japonya da bu rakam %60 ' lara ulaşmaktadır. Bunun nedeni olarak erken yaşta başlayan geniş taramalar gösterilmektedir. Hastalıkta yaşam süresini tek uzatan faktörün erken saptanması olduğu gösterilmiştir [74].

Mide kanserinde histolojik yapıdaki değişikliklerin tek başına prediktif bir faktör olmadığı düşünülmektedir [59].

Cinsiyet ve yaş üzerine yapılan çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Daha sıklıkla ileri yaşlarda görülmekle birlikte erken yaşta mide kanserinin prognozu daha kötü seyretmektedir. Cinsiyetin prognozdaki rolü belli değildir [59].

2.7. Mide Kanserinde Tümör Belirteçleri

Tümör belirteçlerinin içinde net belirleyici bir marker tespit edilememiştir. Erken tespitin prognoz için önemli olduğu mide kanserinde bu yönden dolayı tümör markerları araştırma konusu olarak hep gündemde kalmıştır.

Serum karsinoembriyolik antijen (CEA) mide kanseri hastalarında yükselebilmektedir. CEA yüksekliği hastaların %15.8-5 'inde saptanmaktadır. Diğer belirteçlerin oranına bakıldığında ise CA19-9 %23.1-50 arasında ve güncel bir çalışma konuş olan CA72-4 %18.6-58 arasında saptanmıştır [75].

CEA değerindeki yükseklik sıklıkla lenf nodu tutulumu olan hastalarda gözlenmektedir [75]. CA19-9 ve CA72-4 pozitifliği olan hastaların ortak olduğu görülmüştür. CA72.4 pozitifliği olan hastalar çoğunlukla ileri evrede ve hastaların lenf nodu tutulumu, uzak organ metastaz varlığı bulunmaktadır [75,76].

Erken tanı ve tedavi amacıyla güncel olarak yeni birçok marker ve bazı onkogenler üzerinde de çalışılmaktadır. Akciğer kanserinde rolü açık olarak

bilinen bir aday onkogen olan PRR11 'nin mide kanseri için yapılan çalışmaları da tanı için umut verici olmuştur [77].

2.8. Mide Kanseri Patogenezi

Hücre ve tümör gelişimindeki genetik bilgilerimizin kısıtlı olmasına rağmen mide kanseri gelişimi ile ilgili olarak bazı genetik ön bilgiler saptanmıştır. Mide kanseri ile ilgili olan moleküler ve biyolojik çalışmalar sonucu kanser patogenezi hakkındaki bilgiler hızla artmaktadır. Kanser; genetik yatkınlık, enfeksiyöz etkenler ve çevresel etkiler arasındaki etkileşim sonucu uzun sürede ortaya çıktığı düşünülmektedir.

Enfeksiyöz etkenler arasında en önemli rolü HP ve EBV (Ebstain-Barr Virüsü) oynamaktadır [78,79]. Özellikle SabA, BabA, CagA ve VacA pozitif olan HP suşları mide kanseri için suçlanmış ve birçok çalışmada ilişkisi gösterilmiştir. CagA (+), VacA s1-m1 varyantları bulunan HP mide kasnerinin şiddeti ve prognozu ile ilişkilendirilmiştir [80]. HP enfeksiyonu apoptozdan ve profilerasyondan sorumlu bulunan p120 proteini ve B- kateninin çekirdek içine translokasyonunu bozar. Böylece proliferasyon ve apoptoz süreci hasarlanır [80]. EBV monoklonal ekspresyonu ile RNA hasarı ve viral kapside karşı oluşan antikör seviyesi yükseltir. Mide kanseri hastalarında kronik EBV oranı %10-20 bulunmuştur [81,82,83]. EBV enfeksiyonu düşük TNM evrelemesi ve uzun sağkalımla ilişkili bulunmuş ve olumlu katkısı olduğu düşünülmüştür[84,85]. Bunlarla birlikte IL-1 β , TNF- γ ve IL-10 gibi genetik faktörlerde kanser gelişimi ile ilgilidir. Ayrıca sigara, beslenme şekilleri gibi birçok çevresel faktör de bulunmaktadır. Tüm bunlara rağmen kanser patogenezinin net olmaması akıllara kodlanmayan genetik faktörlerin olabileceğini akıla getirmektedir. Kodlamayan genetik faktörler transkripsiyonel faktörleri kontrol ettiği düşünülmektedir. Kodlanamayan genetik faktörlere tek nükleotid polimorfizmi (SNPs), DNA metilasyonu, düzenleyici miRNA' lar, histon modifikasyonu ve hücre çoğalmasında görevli diğer organizasyonlardan sorumlu kodlanmayan RNA'lar örnek olarak gösterilebilir [86,87].

2.9. Mide Kanserinde Prekanseröz Lezyonlarda Takip

Mide kanserinin mevcut bir tarama sistemi bulunmamaktadır. Ancak sekonder koruma yöntemleri ile prekanseröz lezyonların tespiti ile erken tanı şansı artırır. Erken tanı ile uzun survi ve kaliteli bir yaşam sağlanır.

Son yıllara kadar prekanseröz lezyonlar olan intestinal metaplazi ve atrofik gastrit için belirgin bir takip diagramı bulunmamaktaydı. Son zamanlarda Avrupa klavuzlarında intestinal metaplazi ve atrofik gastrit hastaları için 3 yıllık takipler önerilmektedir. Ancak antruma sınırlı intestinal metaplazi ve atrofik gastrit hastalarında endoskopik ve veya histolojik takip gerekli olmadığı savunulmaktadır [88,89].

Bu bilgiler ışığında yapılan son yıllardaki çalışmalarda bazı hasta gruplarında 3 yıllık izlemlerin yetersiz olduğu düşünülmektedir. Hastaların eşlik eden çevresel faktörleri, birinci derece akrabalarında mide kanseri öyküsü bulunması, sigara içmeleri, beslenme şekilleri ve IM tipi gibi birçok faktör mide kanseri gidişini etkilediği için her hastada prekanseröz lezyonlar aynı şekilde seyretmeyebilir. Sonuç olarak sekonder koruma açısından bu tip hastalarda 3 yıllık izlemler yetersiz kalabilir [90].

İleri evre mide kanseri tespiti için yeterli olarak görülen standart endoskopi IM tanısı için yeterli görülmemektedir. Yüksek çözünürlüklü büyüklükte özelliği olan kromoendoskopi IM ve displazi tanısı için daha değerlidir. IM için kromoendoskopinin duyarlılığı % 76 ve özgüllüğü % 84 ' tür. Displazi için bakıldığında ise kromoendoskopinin duyarlılığı % 97 ve özgüllüğü % 81 ' dir. Ancak kromoendoskopi pahalı bir yöntem olup; zaman, eğitilmiş teknik ekip ve donanımlı bir çalışma alanı gerektirmektedir. Diğer bir önemli ve kullanımı giderek artan tanı yöntemi de narrow band görüntülemesidir. Malign ve malign olmayan lezyonları ayırt etmede duyarlılığı % 97 ve özgüllüğü % 84' dür [91].

2.10. Mide Kanserinde Tedavi Yaklaşımları

Mide kanserinde primer tedavi halen cerrahi tedavi olarak görülmektedir. Cerrahi yöntemini belirlemede ve tedavi kararında kanserin lokalizasyonu, lokal yayılımı, evresi, uzak organ metastazı önemlidir.

Tarihsel sürece bakıldığında mide kanseri tedavisinde ilk cerrahi yöntem 1881 yılında Theodore Billroth tarafından Therese Heller isimli 43 yaşındaki bir hastaya Viyana da gastroduodenoskopi şeklinde uygulanmıştır. Daha sonra bu operasyona Billroth-I adı verilmiştir. Hastanın operasyon sonrasında 4 ay yaşamıştır [59].

Cerrahi tedavi küratif ve palyatif olarak 2 kısımda incelenebilir. Evre T1/2 olan hastalarda küratif tedavi uygulanabilir. Evre T3 ve daha ileri evrelerde palyatif cerrahi tedavi düşünülmelidir [92].

Erken mide kanseri tanısı ile mortalite ve morbidite belirgin oranda azalmaktadır. Evre IA tümörlerde submukozal rezeksiyon lenf nodu tutulumu oranı belirgin düzeyde az olduğu için yeterli olmaktadır. Ancak çıkarılan patoloji preperatında submukoza tutulumu varsa hastalar dikkatli değerlendirilmelidir. Submukoza invazyonu olan hastalarda lenf nodu tutulum oranı artmaktadır. Evre IB hasatlarda segmental gastrektomiler ve lokal eksizyonlar daha güvenilirdir [93].

Midenin geniş ve yaygın lenfatik ağı nedeniyle ileri evre mide kanserinde cerrahi yaklaşımda diffüz tipte primer lezyonun proksimal ve distal 6-8 cm; intestinal tipte proksimal ve distal 3 cm cerrahi sınır yeterlidir [92,93].

Operasyon sonrasında rezidüel tümör dokusu yoksa R0, mikroskopik rezidüel tümör varlığında R1 ve makroskopik rezidüel tümörde R3 olarak isimlendirme yapılır [93].R2

İleri evre, cerrahi tedavi ile survi uzatma şansı olmayan hastalarda inatçı ağrı, beslenme bozukluğu, kanama ve tıkanma gibi problemlerde palyatif cerrahi gündeme gelebilir. Hastalara bu amaçla palyatif rezeksiyon, gastrojejunostomi, endoskopik stent yerleştirilmesi gibi işlemler uygulanır [93].

Radyoterapi kemoterapiye ek olarak hastalarda uygulanır. 4500-5000 radlık ışınlama hastalarda önerilmektedir. Işın alanına giren böbrek, spinal kord ve ince barsakların radyosensitif olması nedeniyle doz sınırlandırılması yapılmalıdır. Sorviye belirgin katkısı yoktur [92,93].

Son yıllarda tedavi yöntemleri arasında kemoterapide önemli gelişme görölmüştür. Adjuvan ve neoadjuvan olarak uygulanabilir. Adjuvan kemoterapinin sağkalımı uzattığı ve relapsı azalttığı gösterilmiştir. Küratif cerrahi olanağının bulunmadığı ileri evre mide kanserlilerde tek ajan kemoterapiye göre çoklu tedavilerin daha yararlı olduğu belirtilmektedir [92,93].

2.11 Mide Kanseri ve Genetik

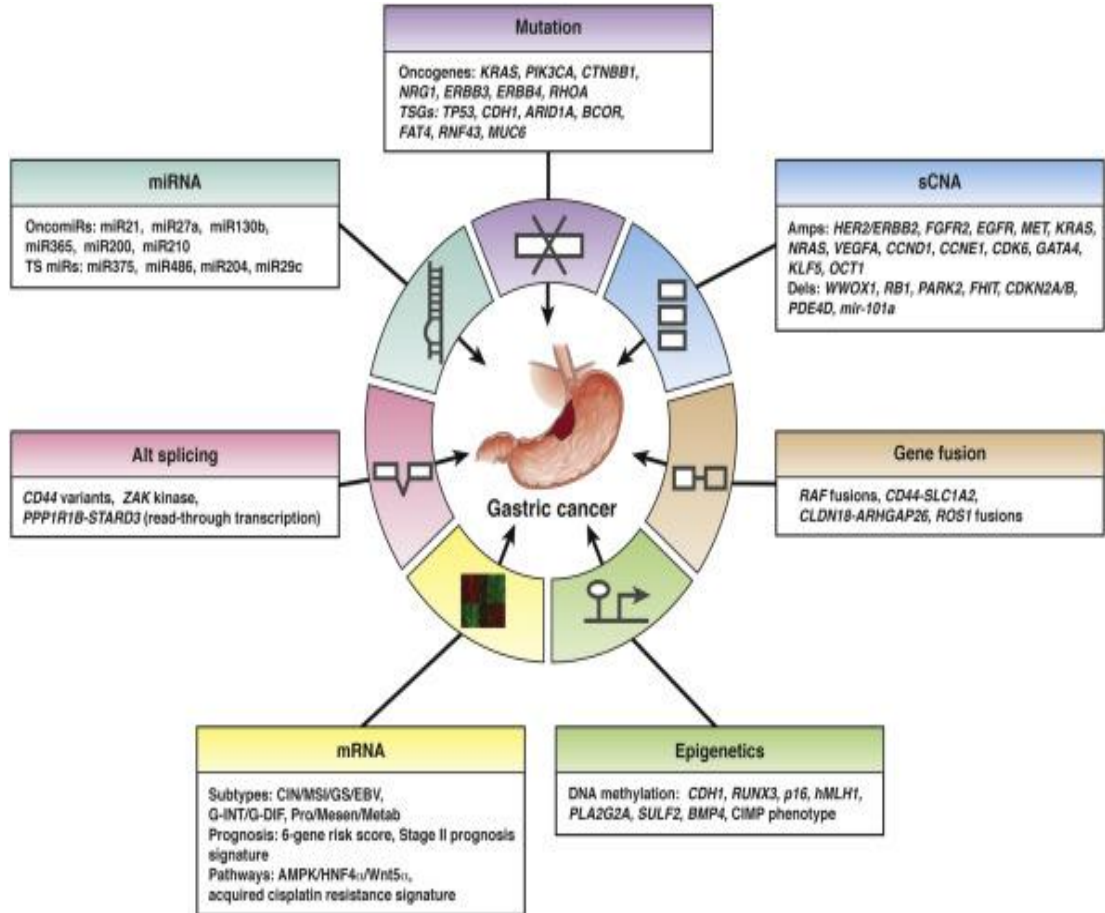
Mide kanserinde çevresel faktörlerin yanı sıra genetik unsurlar da önem arz eder. Bu genetik faktörlerden en önemlilerinden birisi proinflamatuvar genlerden olan IL-1b' nin polimorfizmidir [94]. Güncel bir çalışmada ise bir çok tek nükleotid polimorfizm (SNPs) kombinasyonunun [interleukin 1- β (IL-1 β), interleukin 1 reseptör antagonist (IL-1RN), tümör nekrosis faktör- α (TNF- α) ve interleukin 10 (IL-10)] HP pozitif saptanan hastalarda mide kanseri riski arttırdığı gösterilmiştir [95]. HP pozitif hastalarda bu riskin artması inflamasyonun bu süreçteki önemini göz önüne çıkartmaktadır.

Mide kanserinde genetik faktörlerin rolünü kanıtlayan yeni güncel çalışmalardan birisi de prostat kök hücre antijeni (PSCA)' dir. PSCA pozitif hastalar da mide epitelyal hücre proliferasyonuna ve diffüz mide kanserine yatkınlık olduğu saptanmıştır [96,97,98].

Hereditör mide kanseri sendromuna nadir rastlanılmaktadır. Yaklaşık olarak %1-3 izlenir. 3 tip olarak incelenebilir. Bu tipler hereditör diffüz mide kanseri, proksimal mide de poliposis ile seyreden gastrik mide kanseri ve ailesel intestinal mide kanseridir [99]. Hereditör mide kanseri sıklıkla E-kadherin mutasyonu ile ilişkilendirilmiştir.

Güncel çalışmalar mide kanserinde moleküler yollar üzerine yoğunlaşmıştır. Moleküler yolların anlaşılması hastalığın tedavisi için önemli bir yol katedilmesini sağlamıştır. Bunun en önemli göstergesi TOGA (Trastuzumab for Gastric Cancer) çalışmasında transtuzumabın (HER2 hedef alan antikor) Her2/neu reseptör tirozin kinaz pozitif hastalarda etkili olması gösterilebilir [100]. Bu moleküler genetik çalışmalar içinde epigenetik çalışmalar, mRNA mutasyonları, gen füzyonları, alt splicing, mikrosatellit instabilite ve miRNA mutasyonları gibi konu başlıkları ağırlık kazanmaktadır. Örneğin mikrosatellit instabilite; DNA yanlış onarımına yol açan bu hasar yeni kuşak sıralamalı çalışmalarda mide kanseri hastalarında %15-20 oranında pozitif saptanmıştır [99].

Şekil - 5 : Mide Kanserinde Moleküler Genetik [99]



2.12 Sinyal Yolakları

Sinyal yolakların hücrelerin nükleuslarında bilgi transformasyonunda rol oynarlar. Bu bilgi aktarımı ile gen transkripsiyonu son bulur ve birçok hücreyel süreç etkilenir. Sinyal yollarının güncel araştırmalarla ortaya çıkması ile biyolojik süreç daha iyi anlaşılmıştır. Hasarında kanser oluşumu ile ilişkilendirilen sinyal yolaklarına Wnt, JAK-STAT, MAP-KİNAZ, Notch örnek verilir.

2.12.1 Notch Sinyal Yolağı

Notch sinyal yolu gen regülasyonunu etkileyerek embriyonik ve erişkin çağda hücre diferansiyasyonuna neden olan önemli sinyal yollarından biridir. Endokardium ve miyokardium arasında iletişim, nöronal sistem ve hematopoetik kök hücre çoğalması gibi önemli yollarda rol alır.

Notch proteinleri yüzeyde çeşitli proteinlere bağlanır. DSL ligandına bağlanan proteinler ile Notch reseptörleri aktive olur. Notch reseptörlerinin aktive olması ile γ -secretase (presenilin) salgınır. Gen regülasyonunu sağlayan çekirdek içindeki Notch aktive olur [101].

Transgenomik farelerde Notch4 aktive olduğı zaman adenokarsinom geliştiğı gösterilmiştir. Notch1' in aktivasyonu sonucunda RAS onkogeni baskılanmaktadır [102].

2.12.2 JAK-STAT Sinyal Yolağı

JAK-STAT (jasus kinaz sinyal transducer and aktivator of transcription) sinyal yolağı hücre döngüsünde önemli rol oynar. Memelilerde 4 çeşittir (JAK1, JAK2, JAK3 ve TYK2).

JAK ve STAT interlökinlerden, büyüme faktörlerinden ve sitokinlerden gelen sinyalleri aktaran transmembran proteinleridir. JAK reseptörünün uyarılması ile otofosforilasyon oluşur. Aktive olan fosfotirozine STAT bağlanır. Memelilerde 7 çeşit STAT geni (STAT 1-4, STAT5A, STAT5B ve

STAT6) bulunmaktadır. Uyarılan STAT dimerleri sitoplazmadan nükleusa geçer. Nükleusta DNA' ya bağlanarak transkripsiyonu başlatırlar. STAT geninin mutasyon ya da deregülasyonunda immun yetmezlik sendromları ya da kansere neden olabilirler [103].

2.12.3 RAS-MAPK Sinyal Yolağı

Kan şekeri glukoz konsantrasyonu ve gen ekspresyonunu etkileyen birçok mekanizmada etkilidir. RAS ve GDP kompleksinin RAF ile aktive olması ile reseptör sinyali hücre içine aktarılır. Aktive olan MEK MAK' ı aktive eder. Yolağın inhibe olması ile nasofaringeal karsinom arasında bağlantı gösterilmiştir [104].

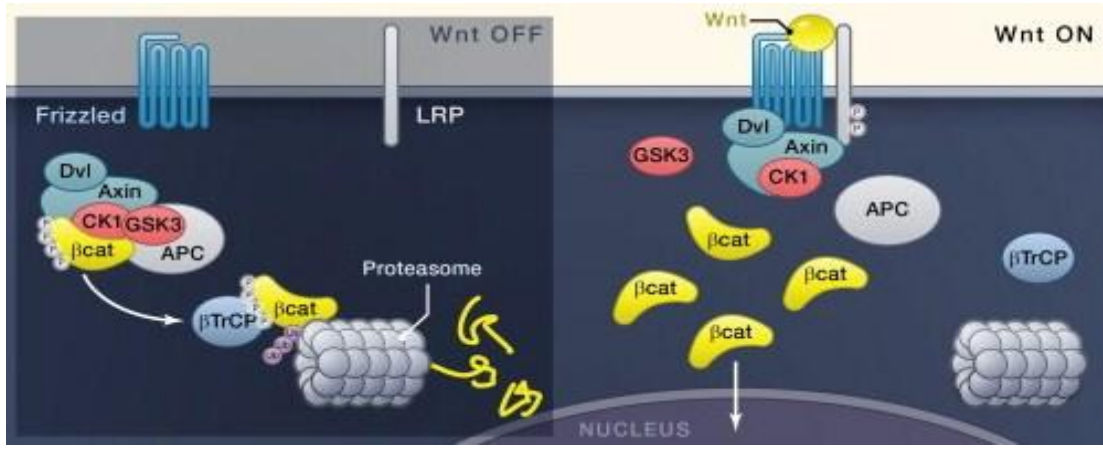
2.12.4 Wnt Sinyal Yolağı

Wnt sinyal yolağı evrim süresinde korunmuş ve geliştirme, farklılaşma, hücre çoğalması, morfoloji, motilite gibi önemli süreçlerde rol almıştır. Wnt sinyal yolağının kanserde önemi Axin/APC ve β -katenin araştırılması ile artmıştır [105].

19 tane Wnt sinyal yolu bulunmaktadır. Wnt1, Wnt3a ve Wnt8 Wnt/ β -kateninde rol oynayan Wnt proteinlerine örnek olarak verilir. 7 adet transmembran protein ile bağlanırlar. Sinyal iletimi için LRP-5 ve LRP-6 koreseptör olarak görev alır [106]. Aktive olan Wnt sinyal yolağı dağınık bir şekilde, muhtemelen fosfolipidlerle ilişki içinde plazma membranında bulunur. Bu aktivitenin β -katenini etkilediği düşünülmektedir [106]. Sitoplazmada multiprotein kompleksi tarafından konsantrasyonu ayarlanan β -katenin, proteosomlar içinde degrade olur. Bu kompleks Axin iskeletine monte olur. Oluşan kompleks β -katenin, APC (adenomatous polyposis coli) serine/threonine kinases GSK3 ve casein kinase 1 α/ϵ için bağlayıcı alanlar içerir [107,108,109,110]. Bu kompleks oluşumu β -kateninin fosforilasyonu ve degrade olmasını destekler.

Wnt ligandının yokluğunda β -katenin yıkım kompleksi gibi davranır. Bu yıkım APC, AXIN, fosforilasyonu destekleyen GSK3 (glukoz sentetaz kinaz 3) ve CK1 (casein kinaz 1)' i de içerir. Yıkım nedeniyle ubiquitylation ve degradesyon engellenir. Fosforilenmemiş β -katenin TCF (T hücre faktörün) ' ye bağlanır [111].

Şekil - 6: Wnt Sinyal Yolu [112]



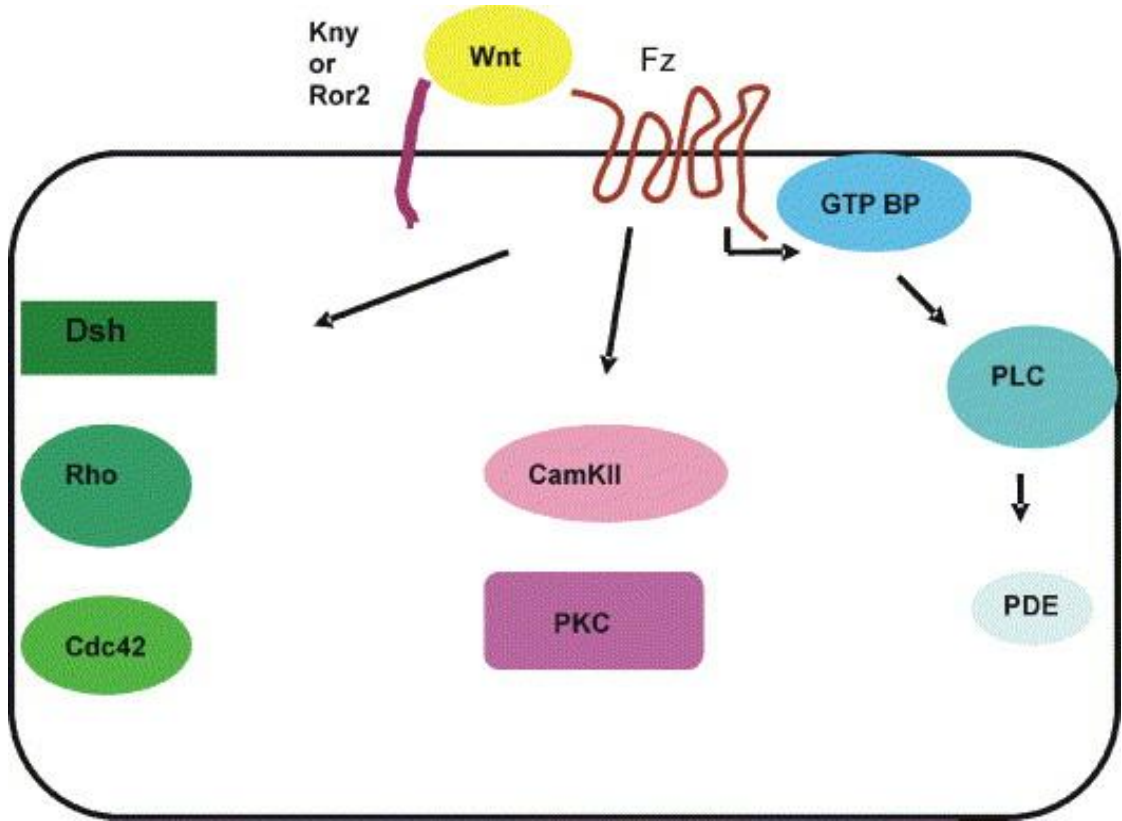
Kolorektal kanserlerin %70-80' ninde APC mutasyonu bulunmaktadır. Bazı wild-tip APC mutasyonlarını β -katenin mutasyonu içerir. Güncel koşullarda kolorektal kanser gelişimi için 4 adet gen mutasyonu gerekli olduğu düşünülmektedir. Bu 4 genin içinde APC' de önemli rol oynar. Hepatoselüler karsinomda da Wnt sinyal yolunun deregülasyonuna yol açan Axin ve β -katenin mutasyonu %20-30 oranında bulunmaktadır [113].

Çoğu Wnt ligandı Frizzled (FZD) reseptörüne bağlanır. Koreseptör olan LRP-5 ve LRP-6 düşük dansiteli lipoprotein reseptör ilişkili protein ailesindendir. İki reseptöründe hasarında sinyalde belirgin azalma olur [114].

2.12.4.1 Noncanonical (Kuralsız) Wnt Sinyal Yolağı

Noncanonical (Kuralsız) Wnt sinyal yolağı ile canonical (Standart) Wnt sinyal yolağı arasındaki temel fark her iki yolunda kendine özel ligandlarının olmasıdır. Noncanonical (Kuralsız) Wnt sinyal yolunu Wnt4, Wnt5a ve Wnt11 ligandları aktive eder. Wnt ligandı FZD reseptörüne bağlanır. Bu bağlanmayı koreseptör olan Knypek (Kny) ya da Ror2 destekler.

Şekil - 7 : Noncanonical (Kuralsız) Wnt Sinyal Yolağı [115]



Bu bağlanma hücre içinde birden fazla önemli değişiklikle sonuçlanabilen CamKII (Kalsium-kalmodulin bağımlı kinaz II) ve PKC (Protein kinaz C) aktivasyonuna neden olur. Ayrıca bu yollara alternatif olarak membranı 7 kez geçen FZ reseptörüne bağlanan ve sinyallerin aktarımını sağlayan G protein ilişkili bir yol daha bulunmaktadır. Böylece fosfolipaz C (PLC) ve fosfodiesteraz E (PDE) aktive olur [115].

2.12.4.2 Canonical (Standart) Wnt/ β -katenin Sinyal Yolağı

Wnt sinyal yolları içinde en iyi anlaşılan ve hakkında en iyi bilgi sahibi olunandır. Bu yolda en önemli rol β -kateninidir. Membran üzerinde E-kaderine bağlı olarak ya da sitoplazmada serbest olarak bulunur [116]. Wnt/ β -katenin sinyal yolu Wnt ligandının FZD' ye LRP5-6 koreseptörleri aracılığı ile bağlanmasıyla başlar. Oluşan sinyal ile Axin, APC ve β -kateninin tarafından oluşan kompleks uyarıyı iletir ve proteolizis oluşur.

2.12.4.3 Wnt Sinyal Yolağı İle İlişkili Hastalıklar

Wnt sinyal yolağı birçok hastalık ile ilişkilendirilmiştir. Örnek olarak kanser, alzheimer, osteoartrit, kalp ve göz hastalıklarının bir bölümünde Wnt sinyal yolağının hasarı gösterilmiştir. Bu yüzden her zaman araştırma konusu olarak güncelliğini korumuştur [117]. İlaç araştırmaları bu yolağın iyi tanınmasına rağmen ağırlıklı olarak potansiyel hedef ilaçlar üzerine olmuştur. Güncel çalışmalar ise reseptör ligand ilişkisine yönelik ilaçlar üzerine seyretnmektedir.

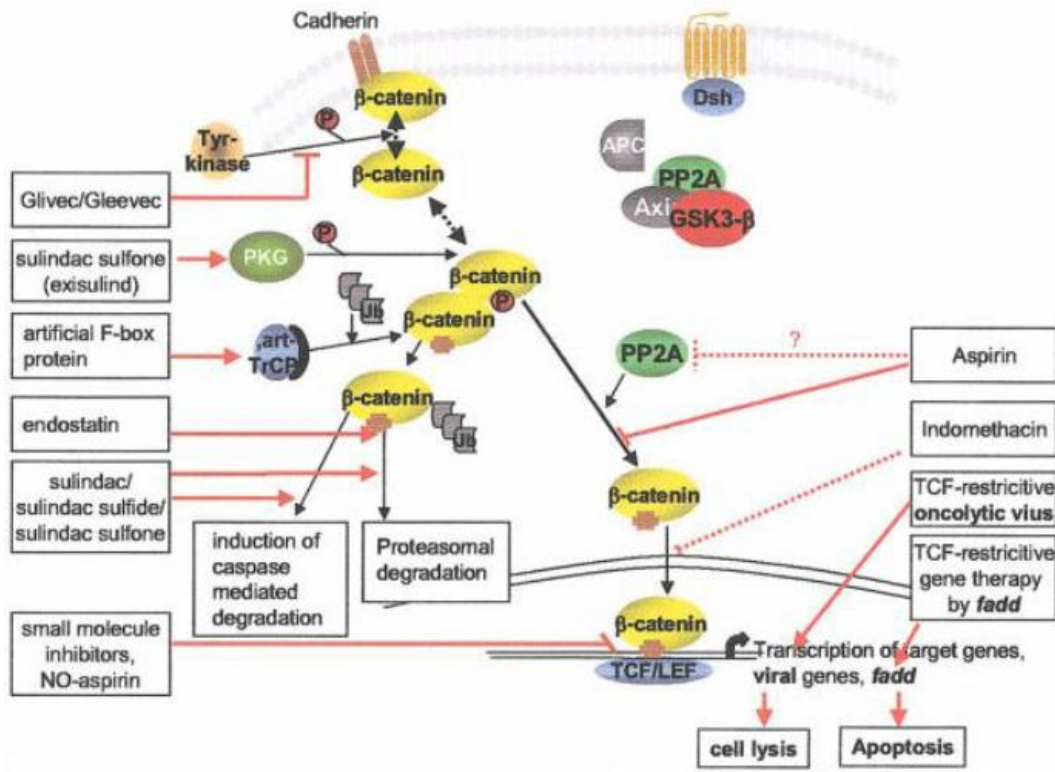
2.12.4.4 Wnt/ β -katenin Sinyal Yolağının Kanser Oluşumda Rolü

Wnt sinyal yolundaki mutasyonlar farklı kanser türlerine neden olabilmektedir. Sinyal yolundaki birçok molekül farklı kanser türleri ile ilişkilendirilmiştir. Bunlar içinde β -katenin en sık göze çarpanıdır.

GSK' nın fosforilasyon ve ubiquitinasyonuna dirençli mutant β -katenin suşları overan, deri ve ince barsak kanserleri ile ilişkilendirilmiştir [118]. APC ve β -kateninin kolon kanserindeki rolü net olarak bilinmektedir [119]. Over, uterin kanserleri ve melanomda sitoplazmik ya da çekirdekteki β -kateninin rolü olduğu görülmüştür [120]. Hepatoselüler karsinomlu olgularda da β -katenin mutasyonu sıklığı bilinmektedir [121].

Wnt sinyal yolu kanserle ilişkisi net olarak gösterildiği ve birçok kanser mekanizmasında rol aldığı için ilaç çalışmalarında da güncelliğini korumuş bir konudur. Bu çalışmalar ağırlıklı olarak potansiyel hedef tedavisi şeklindedir.

Şekil - 8: Wnt Sinyal Yolu ve Kanser Tedavi Çalışmaları [122]



III. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma Mayıs 2014 ve Eylül 2015 tarihleri arasında Manisa Celal Bayar Üniversitesi Gastroenteroloji Bilim Dalı ve Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilmiştir. Çalışmaya Celal Bayar Üniversitesi Gastroenteroloji Bilim Dalı'na başvuran hastalar dahil edilmiştir. Bu çalışma ile ilgili etik kurul onayı, Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı Bilimsel Araştırmalar Etik Kurul Başkanlığının 16.04.2014 tarih ve 161 sayılı onayı ile gerçekleştirilmiştir.

3.1. Çalışma Dizaynı ve Hastalar

Eylül 2014 ve Eylül 2015 tarihleri arasında Celal Bayar Üniversitesi Gastroenteroloji Bilim Dalı'na müracaat eden toplam 104 hasta çalışmaya dahil edildi. Olgular mide kanseri grubu, intestinal metaplazi grubu ve kontrol grubu olmak üzere 3 gruba ayrıldı. Endoskopi yapılan ve biyopsi alınan 34 Mide kanser'li olgu, 45 İntestinal Metaplazi'li olgu ve üst gastrointestinal sistem yakınması olan, Dispepsi yakınması ya da demir eksikliği anemisi nedeni ile rutinde endoskopik biyopsisi yapılan; biyopsi-endoskopi sonucu normal olan 25 olgu kontrol grubu olmak üzere, aşağıda bahsedilen çalışmaya dahil edilme ve dışlanma kriterlerine göre çalışmaya dahil edildi.

Araştırmaya Dahil Edilme Kriterleri:

1. Mide kanseri tanısı olan, kemoterapi ya da radyoterapi tedavisi almamış yeni tanılı 18 yaş üzeri erişkin hastalar
2. İntestinal metaplazi tanısı olan ve displazi açısından kontrol endoskopisi yapılan, 18 yaş üzerindeki erişkin hastalar
3. Dispepsi yakınması ya da demir eksikliği anemisi nedeni ile rutinde endoskopik biyopsisi yapılan, endoskopide normal görünümde olan ve biyopsi patoloji sonucu normal olan 18 yaş üzeri erişkin sağlıklı gönüllüler

Araştırmadan Dışlama Kriterleri:

1. Mide kanseri tanısı ya da başka bir malignite nedeni ile herhangi bir zamanda kemoterapi ya da radyoterapi almak
2. Mide kanser dışında başka bir malignite tanısı almış olmak
3. Endoskopi sırasında biyopsiyi kabul etmeyen olgular
4. Herhangi bir nedenle subtotal ya da total gastrektomi yapılan olgular

Tüm olguların yaş, cinsiyet, özgeçmiş/soygeçmiş hastalıkları sorgulanarak kaydedildi.

İntestinal Metaplazi hastalarında endoskopide, rutin değerlendirme ve tetkiklerinde saptanan; hastalığın yaygınlığı, süresi veri olarak kaydedildi. İntestinal metaplazi hasta grubunda geçmişte mide malignite araştırılması amaçlı yapılan endoskopik taramalarındaki tüm patoloji değerlendirme bulguları retrospektif olarak araştırıldı ve kaydedildi. Yine çalışmaya dahil edildiğinde yapılan endoskopi taramasında alınan patoloji değerlendirmesi için alınan biyopsi materyalinde malignite kontrolü yapıldı ve veriler kaydedildi.

Mide kanser tanısı alan hastaların hepsinde evreleme amaçlı BT ya da PET/BT çekildi. Opere olmayan hastalar da BT ya da PET/BT, opere olan hastalarda da BT, PET/BT ve operasyon sonrası patolojik değerlendirmesi yapılarak AJCC' nin TNM sınıflamasına göre hastalık evrelemesi yapıldı. Mide kanserli hastaların biyopsi örnekleri ve opere oldu ise kolon rezeksiyon materyallerinde tümör diferansiyasyonu, tümör tipi değerlendirildi ve sonuçları kaydedildi.

3.2. Endoskopi ve Doku Örnekleme İşlemi

Tüm hastaların endoskopi tetkikleri Celal Bayar Üniversitesi Gastroenteroloji Bölümünde çalışmayıda gerçekleştiren beş gastroenterolog tarafından (EK, HY, EE, EG, AB) tarafından yapıldı. Endoskopi işlemi Olympus Lucera CLV260SL marka cihaz ile gerçekleştirildi. Kontrol grubu ve

intestinal metaplazi tanısı olan hastaların hepsinde tam endoskopik değerlendirme yapıldı. Mide kanserli olgularda ise tümör proksimaline geçilebilindi ise tüm endoskopik değerlendirmesi yapıldı. Tümör proksimaline geçilemeyen mide kanserli olgularda ise tümör proksimali abdominal BT ile değerlendirildi. Mide kanseri hasta grubunda tümör dokusundan, intestinal metaplazi hasta grubunda aktif inflamasyonun izlendiği mide mukozasından ve kontrol grubunda rutin tarama amaçlı antrum mukozalarından patolojik değerlendirme amaçlı mukozal biyopsi örneği olympus biyopsi forsepsi kullanılarak mukozal biyopsi örnekleri alındı. Tüm biyopsi örneklerinin patoloji değerlendirmeleri Celal Bayar Üniversitesi Patoloji Anabilim Dalı'nda yapıldı ve sonuçlarındaki verileri kaydedildi.

Mide kanserli olgularda tümör dokusundan, intestinal metaplazili olgularda aktif inflamasyonunda izlendiği mide dokusundan, kontrol hasta grubunda da normal görünümlü mukozadan WNT sinyal modifikasyon gen analizi için ayrıca ikişer mukozal biyopsi örneği olympus biyopsi forsepsi kullanılarak alındı. Bu örnekler hemen RNAlater RNA stabilizasyon solüsyonu (Qiagen, Germany) solüsyonuna alınarak ve -80 ° C'de RNA ekstraksiyonuna kadar saklandı.

3.3. RT – PCR ile WNT Yolağı Genlerinin İfade Profili

Tüm 104 olgunun mide mukozal biyopsi materyallerinden RNA izolasyonu yapıldı. Olgulardan elde edilen RNA'dan cDNA sentez kiti kullanılarak 104 olguya ait cDNA'lar elde edildi. İlk aşamada rastgele seçilen 3 İntestinal metaplazi, 3 mide kanser tanılı olan ve 3 kontrol olgusuna ait cDNA'lar RT-PCR-array platelerine yerleştirilerek 84 adet Wnt sinyal yolağı genleri (araştırılacak 84 gen aşağıda tablo 3'te belirtilmiştir) çalışıldı. İlk aşamada rastgele seçilen bu 9 olguda 84 adet Wnt sinyal yolağı genlerinin ekspresyonları değerlendirildi. Bahsedilen 9 olguda değerlendirilen 84 gen içinde özellikle eksprese olan ve literatür taraması yapılarak mide kanser dokusunda overeksprese olan 8 gen belirlendi. Bu değerlendirme sonucunda RHOA, CXADR, CSNK1A1, CCND2, DVL2, FZD8, NFACT1, LRP5 Wnt

sinyal yolağı genleri ve housekeeping gen olarak HPRT1 geni, geriye kalan 45 İntestinal Metaplazi' li, 34 Mide kanser' li ve 25 kontrol olgu olmak üzere toplam 104 bireyde çalışıldı. Bu aşamaların hepsi Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakóltesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarında gerçekleştirildi. İstatistiksel ölçümler SPSS 21.0 programı ile Kikare ve ANOVA testleri kullanılarak yapılmıştır.

Tablo 5: Araştırılacak WNT Sinyal Yolağı Genleri

WNT Signaling Pathways:

Canonical: APC, AXIN1, AXIN2, CSNK1A1, CTBP1, CTNNB1, CTNNBIP1 (ICAT), DKK1, DKK3, DVL1, DVL2, EP300, FRAT1, FZD1, FZD2, FZD3, FZD4, FZD5, FZD6, FZD7, FZD8, FZD9, GSK3B, LEF1, LRP5, LRP6, NKD1, PORCN, RUVBL1, SFRP1, SFRP4, SKP2, SOX17, TCF7, TCF7L1, WIF1, WNT1, WNT10A, WNT2, WNT2B, WNT3, WNT3A, WNT4, WNT6, WNT7A, WNT7B, WNT8A.

Planar Cell Polarity (PCP): DAAM1, DVL1, DVL2, MAPK8 (JNK1), NKD1, PRICKLE1, RHOA, VANGL2, WNT9A.

WNT/Ca²⁺: FZD2, NFATC1, WNT1, WNT10A, WNT11, WNT2, WNT2B, WNT3, WNT3A, WNT4, WNT5A, WNT5B, WNT6, WNT7A, WNT7B, WNT8A, WNT9A.

WNT Signaling Negative Regulation: APC, AXIN1, AXIN2, BTRC (bTrCP), CCND1, CTBP1, CTNNBIP1 (ICAT), DKK1, DKK3, FBXW11, FRZB (FRP-3), KREMEN1, LRP6, NLK, NKD1, SFRP1, SFRP4, SOX17, WIF1.

WNT Signaling Target Genes: AXIN2, BTRC (bTrCP), CCND1, CCND2, DAB2, FOSL1 (FRA-1), JUN, MMP7, MYC, PITX2, PPARD, WISP1.

Developmental Processes:

Cell Fate: CTNNB1, DKK1, WNT1, WNT3, WNT3A.

Tissue Polarity: AXIN2, FZD2, FZD3, FZD5, FZD6, VANGL2.

Cell Growth & Proliferation: APC, CCND1, CCND2, CTBP1, CTNNB1, CTNNBIP1 (ICAT), DAB2, EP300, FGF4, FOSL1, FZD3, JUN, LRP5, MMP7, MYC, PPARD, WISP1, WNT3A.

Cell Migration: APC, DKK1, LRP5, LRP6, RHOA, WNT1.

Cell Cycle: APC, BTRC (bTrCP), CCND1, CCND2, CTNNB1, EP300, FOSL1, JUN, MYC, RHOA, RUVBL1, TCF7L1.

Cellular Homeostasis: APC, FZD2, JUN, MYC.

Pathway Activity Signature Genes: BOD1, CALM1, CCND1, CCND2, CHSY1, CXADR, CYP4V2, HSPA12A, LEF1, MT1A, MTFP1, MTSS1, MYC, NAV2, PRMT6, SKP2.

3.3.1. Hazırlanan Solüsyonlar

- 1) RTL Solüsyonu: 1ml RTL solüsyonuna 10 µl β merkaptotanol eklenerek hazırlandı.
- 2) Buffer RPE: RNA izolasyon kitinin konsatre olarak sağladığı RPE solüsyonuna 4 volüm etanol eklenerek hazırlandı.
- 3) %70'lik Etanol: 70 ml Etanol distile su ile 100 ml'ye tamamlanarak hazırlandı.
- 4) Dnase I Solüsyonu: Liyofilize DNase I' i 550 µl RNase-free suda çözüldü. Şişeyi alt üst ederek yavaşça karıştırıldı. Vortekslenmedi.
- 5) DNase I İnkübasyon Miksi: 70 µl Buffer RDD 'ye 10 µl DNase I stok solüsyonundan eklendi. Yavaşça tübü alt üst edilerek karıştırıldı. Tübün yanlarında kalan sıvıları toplamak için kısa bir santrifüj edildi.

3.3.2. Dokulardan RNA İzolasyonu

- 1) Dokudan RNA izolasyonu ticari olarak sağlanan RNeasy Mini Kit (Qiagen, Germany) kullanılarak yapıldı.
- 2) Doku örnekleri depolandıkları -80 derin dondurucudan çıkarıldı. Dokunun büyüklüğü tartılarak tanımlandı. 30 mg dan daha fazla doku kullanılmadı.
- 3) Her bir hasta dokusu ependorf tüpün içine alındı. Tüpün içine 20-30 mg doku için 600 µl Buffer RLT ve mekanik parçalamayı sağlayıcı 7mm çapında metal bilyeler eklendi.
- 4) Ependorf tüpler TissueLyser homojenizatörüne yüklendi. 25.000 hertz' de 5 dakika homojenizatörde homojenize edildi.
- 5) Oluşan lizat 3 dk full hızda santrifüj edildi. Dikkatlice süpernatant kısmı uzaklaştırıldı ve onu yeni bir ependorf tüpüne transfer edildi.
- 6) Temizlenmiş lizata 1 hacim %70' lik etanol eklenerek, pipetle hemen karıştırıldı. Santrifüj yapılmadı.
- 7) 2 ml'lik toplama tüpü içerisine yerleştirilmiş bir RNeasy spin kolonuna 700 µl örnek transfer edildi. Kapak nazikçe kapatılarak ≥8000 g (≥

10000 rpm) de 15 saniye santrifüj edildi. Altta toplanan sıvı atıldı. Sonraki adım için yeni bir toplama tüpü yerleştirildi.

- 8) Eğer örnek hacmi 700 µl yi aşarsa aynı RNeasy spin kolonunda birbirini izleyen aliquatları santrifüj edildi. Her santrifüjden sonra altta toplanan sıvı atıldı.
- 9) DNA kontaminasyonunu ortadan kaldırmak için bu adımdan sonra kolonda DNA kesimi yapıldı.
- 10) RNeasy spin kolonuna 350 µl Buffer RW1 eklendi. Kapağı nazikçe kapatılarak kolon zarını yıkamak için ≥ 8000 g (≥ 10000 rpm) de 15 saniye santrifüj edildi. Altta toplanan sıvıyı atılarak yerine yeni toplama tüpü yerleştirildi.
- 11) DNase I inkübasyon miksini (80 µl) direkt olarak RNeasy spin kolon zarına eklenerek 15 dakika (20-30°C) inkübe edildi.
- 12) 350 µL Buffer RW1 'i RNeasy spin kolona eklendi. Kapağı nazikçe kapatıldı. Kolon zarını yıkamak için ≥ 8000 g (≥ 10000 rpm) de 15 saniye santrifüj edildi. Altta toplanan sıvı atıldı. Toplama tüpü yeniden yerleştirildi.
- 13) 350 µL Buffer RW1 'i RNeasy spin kolona eklendi. Kapak nazikçe kapatılarak kolon zarını yıkamak için ≥ 8000 g (≥ 10000 rpm) de 15 saniye santrifüj edildi. Altta toplanan sıvı atıldı. Toplama tüpü yeniden yerleştirildi.
- 14) 500 µL Buffer RPE 'i RNeasy spin kolona eklendi. Kapak nazikçe kapatılarak kolon zarını yıkamak için ≥ 8000 g (≥ 10000 rpm) de 15 saniye santrifüj edildi. Altta toplanan sıvı atıldı. Toplama tüpü yeniden yerleştirildi.
- 15) 500 µL Buffer RPE 'i RNeasy spin kolona eklendi. Kapak nazikçe kapatılarak kolon zarını yıkamak için ≥ 8000 g (≥ 10000 rpm) de 2 dakika santrifüj edildi. Altta toplanan sıvı atıldı. Toplama tüpü yeniden yerleştirildi.
- 16) Yeni bir 2 ml toplama tüpünü RNeasy spin kolon yerleştirildi ve altta kala sıvıyı içeren eski toplama tüpü atıldı. Kapağı nazikçe kapatıldı ve full hızda 1 dk santrifüj edildi.

- 17) RNeasy spin kolonu yeni bir 1,5 ml 'lik toplama tüpüne yerleştirildi. 30-50 µl RNase free suyu direkt olarak spin kolon zarına eklendi. Kapağı nazikçe kapatılarak RNA 'yı dilue etmek için ≥ 8000 g (≥ 10000 rpm) de 1 dakika santrifüj edildi.

3.3.3. cDNA Sentezi

- 1) cDNA sentez için RT First Strand Kit(C-03) kiti kullanıldı. Bir PCR tüpüne 8 µl RNA örneği, 2 µl GE (5XgDNAElimination buffer) konularak PCR cihazına yüklendi.
- 2) 42 °C da 5 dk. inkübe edildi.
- 3) Başka bir PCR tüpünde 4 µl BC3(5XRT Buffer 3), 1 µl P2 (Primer X External Control mix), 2 µl RE3(RT Enzyme Mix 3), 3 µl H2O den oluşan PCR kokteyli hazırlandı.
- 4) PCR kokteyli ısı döngü cihazından çıkan PCR tüpüne eklendi ve PCR tüpü tekrar cihaza yüklendi.
- 5) 42 °C da 15 dak, 95 °C da 5 dakika inkübe edildi. Elde edilen cDNA örnekleri dilue edildi.

3.3.4. RT-PCR Array Yükleme

1. RT- PCR array yükleme için toplam hacim 2300 µl olacak şekilde ; 102 µl dilue cDNA , 1150 µl 2X RT2 SYBR Green ROX FAST Master mixi , 1048 µl H2O den oluşan array kokteyli hazırlandı.
2. Array kokteyli her bir kuyucuğa 20 µl olacak şekilde 96 kuyucuklu Human Epigenetic Chromatin Modification Enzymes RT² Profiler™ PCR Arrayine yüklendi.
3. Arraylar Rotor-Gene RG-3000 (Corbett Research, Qiagen, Germany) cihazına konuldu. Aktivasyon için 95 °C 10 dak, 40 döngü olacak şekilde 95 °C 15 sn ve 60 °C 30 sn da inkübe edildi.
4. <http://www.sabiosciences.com/pcrarraydataanalysis.php> web sitesindeki yazılım kullanılarak array data analizleri yapıldı.
5. Array data analizleri sonucu yüksek ve düşük eksprese olan genlerden 8 gen Real-Time PCR çalışması için seçildi.

3.3.5. Real-Time PCR

1. Array data analizleri sonucu yüksek ve düşük eksprese olan genlerden 8 gen için (RHOA, CXADR, CSNK1A1, CCND2, DVL2, FZD8, NFACT1, LRP5 genleri + housekeeping gen HPRT1 geni) c-DNA örnekleri Real-Time PCR çalışmasına alındı.
2. 8 gene ait primer ve SYBR Green Master Mix ticari olarak karşılandı.
3. Bunun için her bir örnek başına SYBR green Master Mix'den 12,5 µl, Primer (10 pmol)'den 1 µl alındı ve 2,2 µl cDNA eklenerek reaksiyon karışımı hazırlandı. Bu karışıma toplam volüm 25 µl'ye tamamlanacak şekilde dH₂O eklendi. Tüm karışım hazırlama işlemleri buz üzerinde gerçekleştirildi. Her bir örnek için hazırlanan bu PCR karışımları amplifikasyon için Rotor-Gene RG-3000 (Corbett Research, Qiagen, Germany) cihazının platine yüklenerek amplifikasyon programı başlatıldı. Amplifikasyon programı 95°C'de 5 dakika, 94°C'de 1 dakika, 61°C'de 40 saniye, 72°C'de 1 dakika ve son üç sikusun 40 kere tekrarlanması ve son uzama 2°C'de 2 dakika olarak uygulandı. PCR şartları çalışmaya göre optimize edildi. Reaksiyonda HPRT1 geni endojen kontrol ve RNase free su negatif kontrol olarak kullanıldı.
4. Real-Time PCR reaksiyonu sonunda elde edilen CT değerleri REST 2009 (Relative Expression Software Tool V. 2.0.13) programında standart mod'da referans gen (HPRT1) normalizasyonu ile değerlendirildi ve sonuçlar bir excel dosyasında toplandı.
5. Tüm çalışılan genlerdeki CT değerlerinin data analizleri on-line <http://www.sabiosciences.com/pcrarraydataanalysis.php> web sitesindeki yazılım kullanılarak yapıldı.

3.4. Veri Analizi ve İstatistik

İntestinal Metaplazi, mide kanser ve kontrol gruplarının gen ekspresyonları karşılaştırıldı. Mide kanseri hastalarında prognostik belirteçler olan hastalık evresi, tümör difensiyasyonu, CEA düzeyine göre alt gruplara ayrılarak gen ekspresyon analizi yapıldı. İntesitinal Metaplazi hastalarında mide kanser gelişimi için risk faktörü olan hastalık yaygınlığı, süresi ve inflamasyon şiddetine göre alt gruplara ayrılarak gen ekspresyon analizi yapıldı.

Wnt sinyal yolağı genlerinin veri analizi RT2 Profiler PCR array data analizi ile <http://www.sabiosciences.com/pcrarraydataanalysis.php> sitesinde online ve ücretsiz olarak yapıldı. Bu analizde her bir PCR verisi için Excell formatında tablo oluşturuldu. Bu veriler bahsedilen online sisteme yüklendi. Bu veriler ışığında her PCR reaksiyonu için ortalama Ct değerleri ve T test ile bir P değeri hesaplandı. Ct>33 olanlar hesaplamaaya dahil edildi. Fold-change and fold-regulation değerleri 2 ve üzeri olan genler over regüle genler, Fold-change değeri 0.5'in altında ve Fold-regulation değeri -2'nin altında olan genler down regüle genler olarak değerlendirildi. P değeri otomatik olarak Student T Test kullanılarak hesaplanıp $p<0.05$ olanlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

IV. SONUÇLAR

4.1. Hasta Grupları

Endoskopi bulguları ve patoloji sonucu ile mide kanseri teşhisi konmuş 34 hasta, intestinal metaplazi tanısı almış 45 hasta ve normal saptanan 25 hasta olmak üzere toplam 104 kişi çalışmaya alındı.

Çalışma grubundaki hastaların yaş ortalaması 56.09 ± 10.1 olarak saptandı. Mide kanseri hasta grubunun yaş ortalaması $58,85 \pm 7.5$, intestinal metaplazi hasta grubunun yaş ortalaması $54,71 \pm 12.5$ ve kontrol grubunun yaş ortalaması $54,84 \pm 7.4$ olarak saptandı. Bu üç grup yaş olarak birbirleri ile karşılaştırıldığı zaman ise anlamlı bir farklılık saptanmadı ($p=0,152$) (Tablo 6)

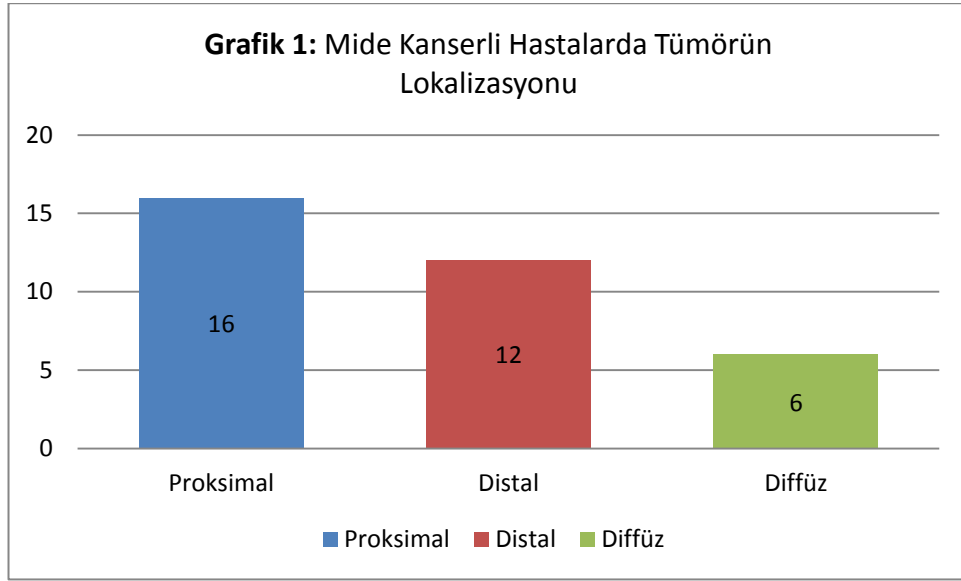
Çalışma grubundaki toplam 104 olgu içinde erkek cinsiyet oranı % 64.4 ($n=67$) olarak saptandı. Mide kanseri, intestinal metaplazi ve kontrol grupları cinsiyet açısından birbirleri ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı (Mide Kanseri E/K: 23/11; IM E/K: 29/16, Kontrol E/K: 14/11 ve $p: 0,583$) (Tablo 6).

Tablo 6: Hasta Grupları ve Genel Parametreler

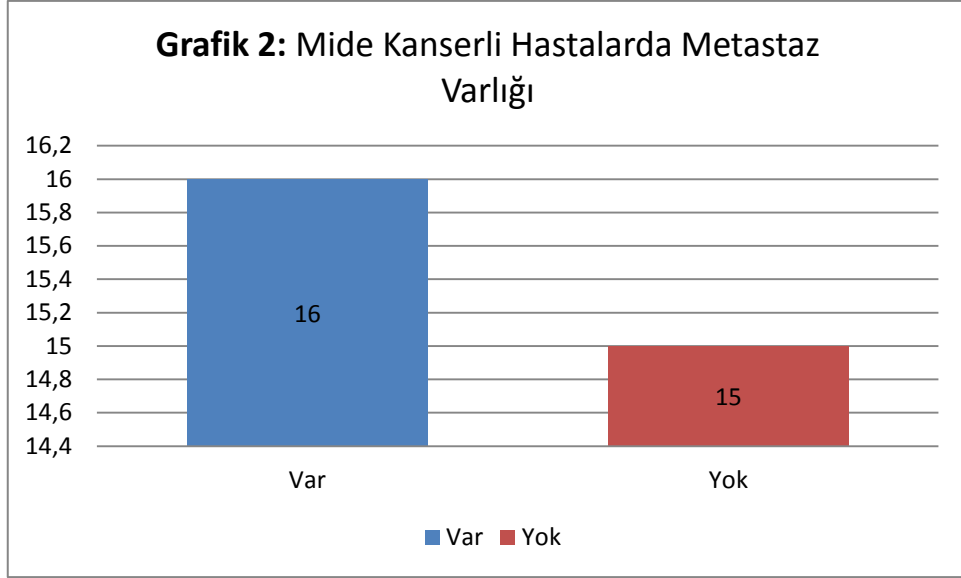
		Mide Kanseri (n=34)	İntestinal Metaplazi (n=45)	Kontrol (n=25)	P
Yaş		$58,85 \pm 7.5$	$54,71 \pm 12.5$	$54,84 \pm 7.4$	<i>0.152</i>
Cinsiyet	Erkek	% 68 (n=23)	% 64 (n=29)	% 60 (n=14)	<i>0.583</i>
	Kadın	% 32 (n=11)	% 36 (n=16)	% 40 (n=11)	

4.1.1. Mide Kanserli Hastalar ve Alt Grupları

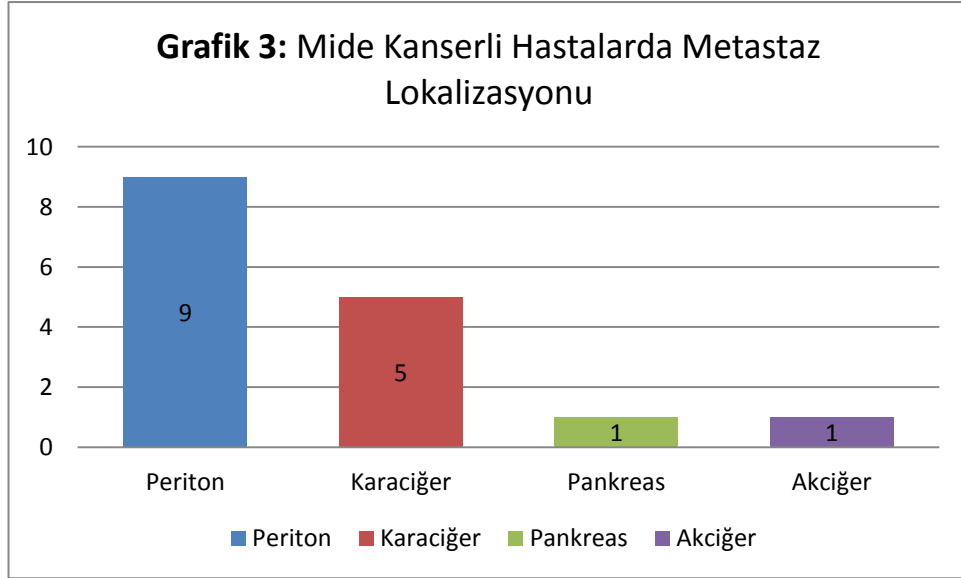
Mide kanserli hastalarda tümörün ağırlıklı olarak proksimal midede lokalize olduğu izlendi. Lokalizasyonuna göre dağılım oranları Proksimal Mide: % 47 (n=16), Distal Mide: % 35 (n=12) ve Diffüz Mide tutulumu: % 18 (n=6) olarak saptandı (Grafik 1).



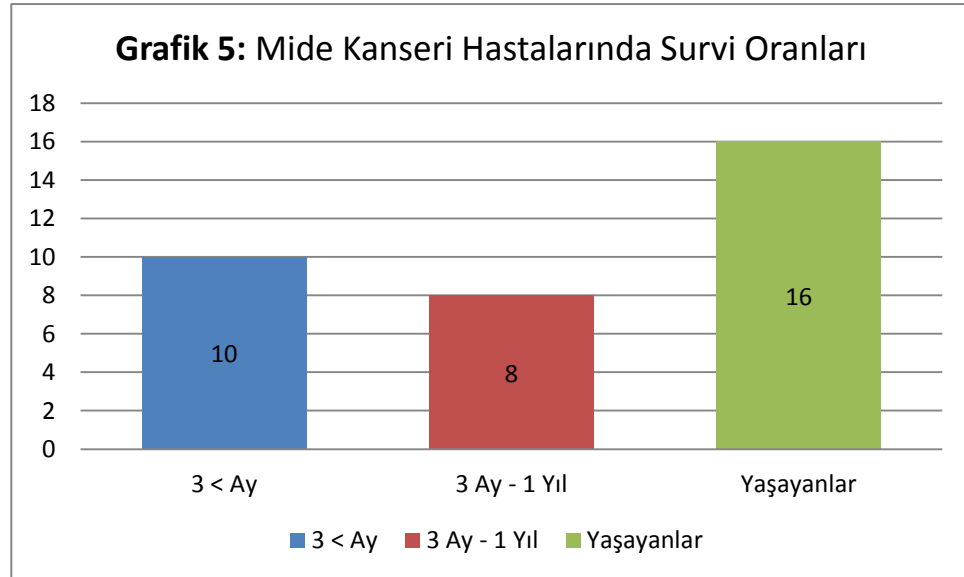
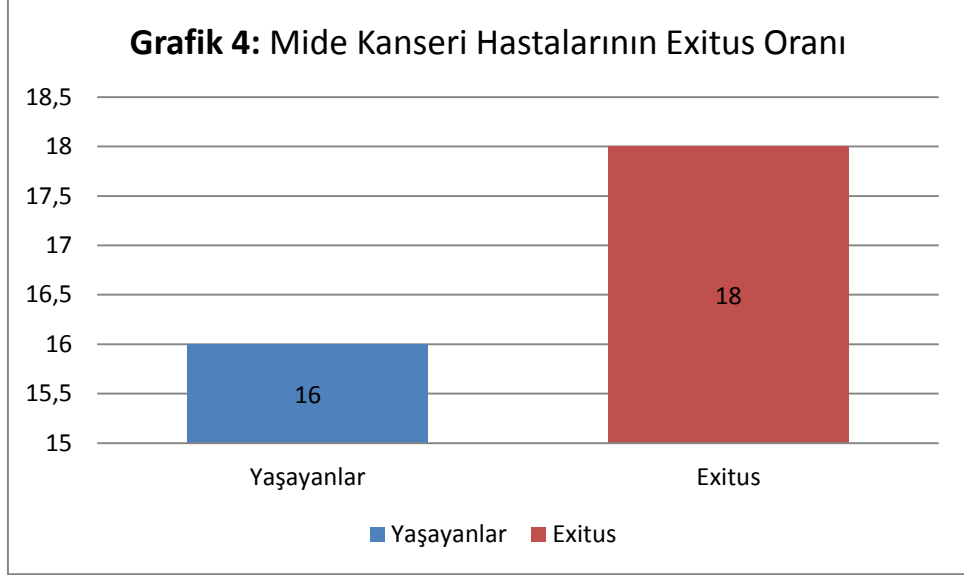
34 mide kanserli olguların 31'inin tüm vücut bilgisayarlı tomografi görüntüleri olduğu görüldü. 31 hastanın %52'sinde (n=16) tanı anında uzak metastazı saptandı (Grafik 2).



Uzak metastazı olan hastaların % 56 (n=9)'sında periton metastazı olduğu görüldü. Diğer uzak metastazlar %32 (n=5) karaciğer, %6 (n=1) pankreas ve %6 (n=1) akciğer olarak saptandı (Grafik 3).

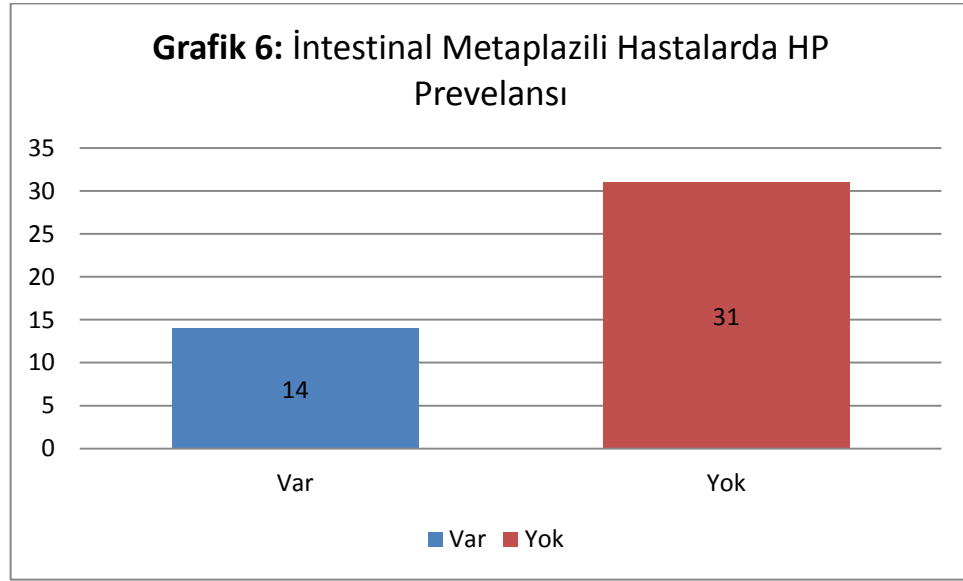


Mide kanserli hastaların tanı sonrası 34 hastanın %53 (n=16) exitus olduğu saptandı (Grafik 4). Survi oranlarına bakıldığında hastaların %29'nun (n=10) 3 aydan daha az, %24'nün (n=8) 3 ay ile 1 yıl arasında olduğu görüldü (Grafik 5).



4.1.2. İntestinal Metaplazili Hastalar ve Alt Grupları

İntestinal Metaplazili hastalarının %31'inde (n=14) HP pozitif saptandı (Grafik 6).



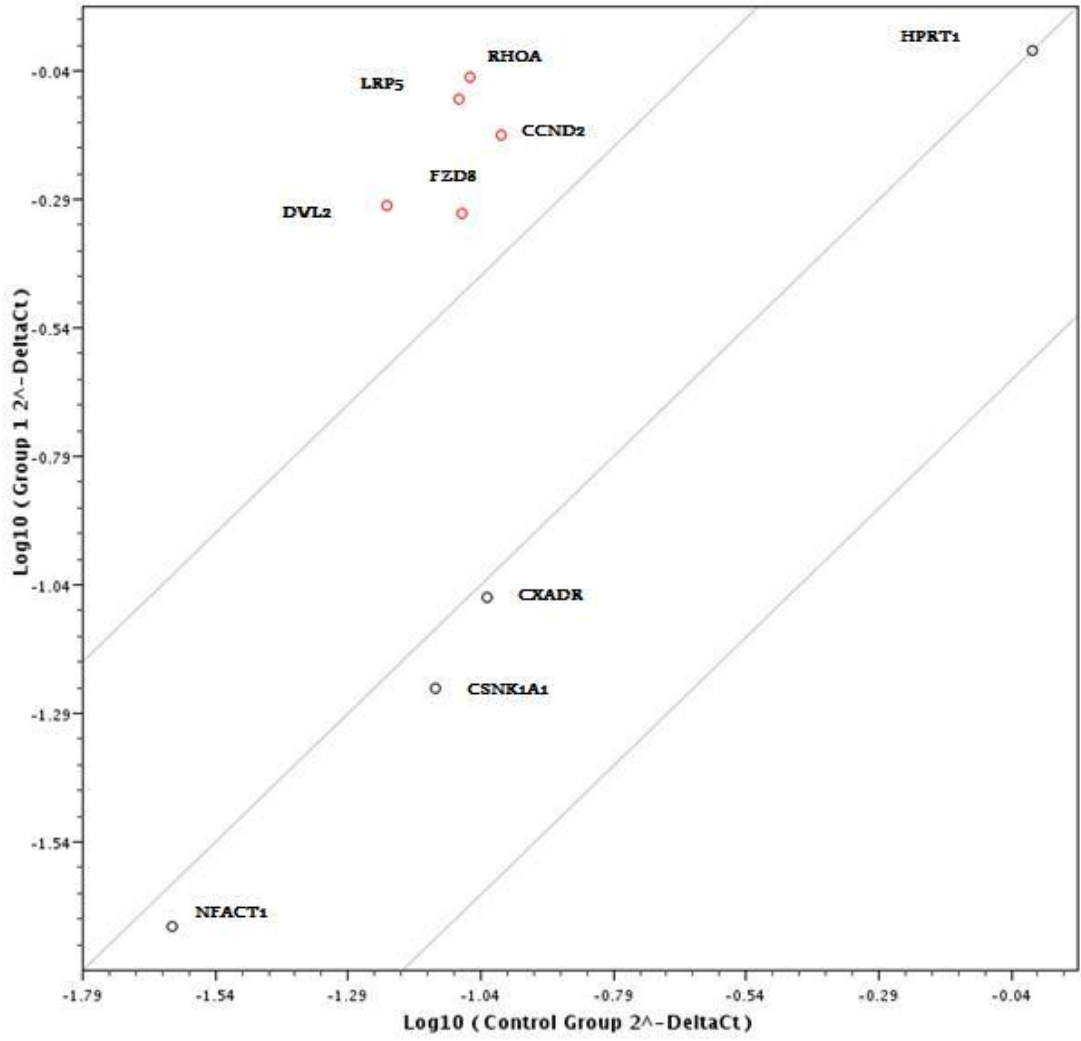
4.2. WNT Sinyal Yolağı Gen Ekspresyon Analizi

İlk aşamada rastgele seçilen 9 olguda (3 Mide kanseri, 3 İM ve 3 kontrol) 84 adet WNT sinyal yolu ile ilgili genin ekspresyonları değerlendirildi. Bahsedilen 9 olguda değerlendirilen 84 gen içinde özellikle eksprese olan ve literatür taraması yapılarak mide kanseri dokusunda yüksek ya da düşük eksprese olması beklenen 8 gen belirlendi. Bu değerlendirme sonucunda RHOA, CXADR, CSNK1A1, CCND2, DVL2, FZD8, NFACT1 ve LRP5 WNT sinyal yolu genlerinin ve housekeeping gen olarak HPRT1 geni, geriye kalan 31 Mide Kanseri, 42 İntestinal Metaplazi' li ve 22 kontrol olgu olmak üzere toplam 95 bireyde çalışıldı. Mide Kanseri (n=34), İM (n=45) ve kontrol grubu (n=25) olmak üzere toplam 104 hastada belirlenen bu 8 genin ve 1 kontrol geninin analizleri yapıldı.

Mide kanseri hastaları, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında (n=34); RHOA, CCND2, DVL2, FZD8 ve LRP5 genlerinin overeksprese (fold değişikliği >2) olduğu izlenmiştir (Şekil 9). Ancak bu karşılaştırmada RHOA, CCND2, DVL2, FZD8 ve LRP5 genlerinin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha fazla overeksprese olduğu saptandı. Mide Kanseri ve kontrol grubu karşılaştırıldığında; CXADR, CSNK1A1, NFACT1 genlerinin ve kontrol geni olan HPRT1 (Housekeeping gen) geninin ekspresyonunda (fold değişikliği <2, p>0.05) istatistiksel olarak anlamlı farklılık izlenmedi (Tablo 7).

Şekil 9: Mide Kanseriinde Overeksprese Olan Genler

MİDE KANSERİ VE KONTROL GRUPLARININ GEN EKSPRESYONUNUN KARŞILAŞTIRILMASI



Mide Kanseri ve kontrol grubunda her bir genin ekspresyon yoğunluğu, log 10 tabanlı dağılık plato şeklinde görülmektedir. X-ekseni kontrol kontrol grubunu, Y-ekseni Mide Kanseri grubunu temsil etmektedir

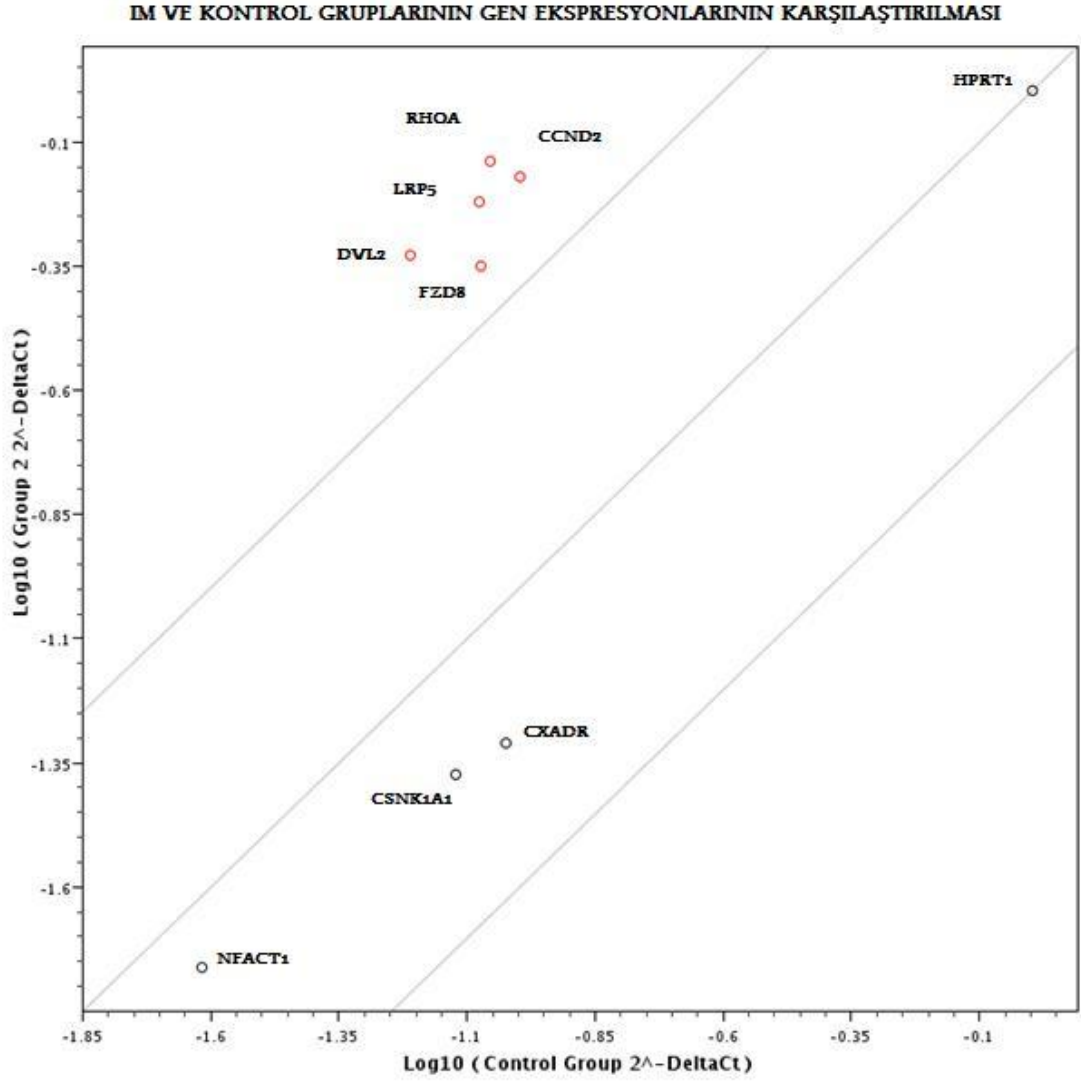
Tablo 7: Mide Kanseriinde WNT Sinyal Yolu Gen Ekspresyon Analizi

WNT Sinyal	Fold Değişikliği	95% CI	P Değeri
LRP5	9,6509	(3.51, 15.79)	0,006289
RHOA	10,2056	(3.83, 16.58)	0,005675
CXADR	0,9219	(0.32, 1.52)	0,205876
DVL2	8,1802	(3.42, 12.94)	0,003121
NFACT1	0,8275	(0.42, 1.24)	0,230587
FZD8	5,7467	(2.66, 8.83)	0,004477
CCND2	6,8701	(2.88, 10.86)	0,005418
CSNK1A1	0,7665	(0.43, 1.11)	0,311112
HPRT1	1	(1.00, 1.00)	0

Not: Mide Kanseri grubu, kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır.

IM (n=45) hastalarında RHOA, CCND2, DVL2, FZD8 ve LRP5 genlerinin overeksprese (Fold değişikliği >2) olduğu izlendi (Şekil 10). Ancak bu karşılaştırmada RHOA, CCND2, DVL2, FZD8 ve LRP genlerinin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha fazla over eksprese olduğu saptandı. IM ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, CXADR, CSNK1A1, NFACT1 genlerinin ve kontrol geni olan HPRT1 geninin (Housekeeping gen) ekspresyonunda (fold değişikliği <2, p>0.05) istatistiksel olarak anlamlı farklılık izlenmedi (Tablo 8).

Şekil 10: IM' de Overeksprese Olan Genler



IM ve kontrol grubunda her bir genin ekspresyon yoğunluğu, log 10 tabanlı dağılık plato şeklinde görülmektedir. X-ekseni kontrol grubunu, Y-ekseni IM grubunu temsil etmektedir

Tablo 8: İM' de WNT Sinyal Yolu Gen Ekspresyon Analizi

WNT Sinyal	Fold Değişikliği	95% CI	P Değeri
LRP5	7,2016	(3.32, 11.08)	0,009031
RHOA	8,2857	(4.01, 12.56)	0,005518
CXADR	0,5209	(0.19, 0.85)	0,070321
DVL2	7,6439	(3.43, 11.85)	0,007901
NFACT1	0,7198	(0.39, 1.05)	0,08344
FZD8	5,2712	(2.80, 7.75)	0,02197
CCND2	6,7486	(3.62, 9.88)	0,003016
CSNK1A1	0,5639	(0.31, 0.82)	0,628316
HPRT1	1	(1.00, 1.00)	0

Not: İM grubu, kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır.

Mide kanseri hastaları İntestinal Metaplazi hastaları ile karşılaştırıldığında Mide kanseri grubunda İntestinal metaplazi hastalarına oranla istatistiksel olarak anlamlı bir overeksprese olan gen saptanmadı (fold değişikliği <2, p>0.05) (Tablo 9).

TABLO 9: Mide Kanseri ve İM Gruplarının Gen Ekspresyonlarının Karşılaştırılması

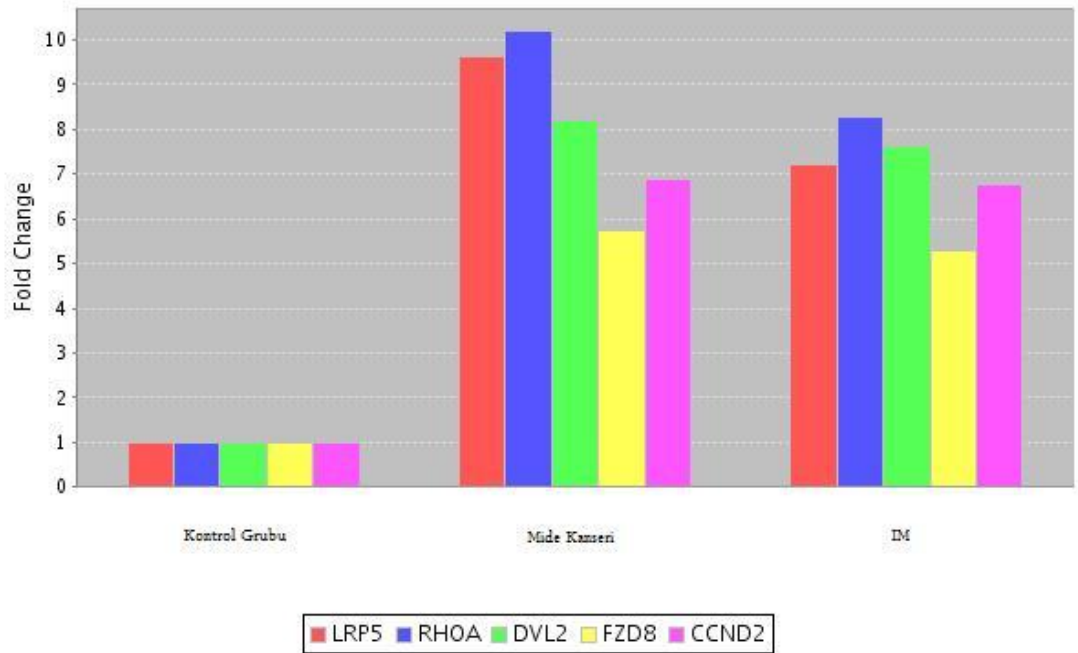
WNT Geni	Fold Değişikliği	95% CI	P Değeri
LRP5	1,3401	(0.48, 2.20)	0,199783
RHOA	1,2317	(0.44, 2.02)	0,239453
CXADR	1,7698	(0.99, 2.55)	0,098744
DVL2	1,0702	(0.34, 1.80)	0,761036
NFACT1	1,1496	(0.69, 1.61)	0,532761
FZD8	1,0902	(0.49, 1.69)	0,743856
CCND2	1,018	(0.42, 1.61)	0,326736
CSNK1A1	1,3592	(0.78, 1.93)	0,787307
HPRT1	1	(1.00, 1.00)	0

Not: Mide Kanseri hasta grubu, İM hasta grubu ile karşılaştırılmıştır.

Grafik 7: Mide Kanseri ve IM Hastalarında Gen Ekspresyonu Karşılaştırılması



Grafik 8: Mide Kanseri ve IM Hastalarında Gen Ekspresyonu Karşılaştırılması



4.2.1 Mide Kanseri Alt Grup Gen Ekspresyon Analizi

4.2.1.1 Midede Tutulum Yerine Göre Gen Ekspresyon Analizi

Mide kanserli hastalarda midede diffüz tutulum gösteren hastalar (n=6, %18) ile kontrol grubu karşılaştırıldığında RHOA, CCND2, DVL2, FZD8 ve LRP5 genlerinin overekspresyonunun istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu saptandı (Tablo 10).

TABLO 10: Diffüz Mide Kanseri ile Kontrol gruplarının Gen Ekspresyonlarının Karşılaştırılması

WNT Geni	Fold Değişikliği	95% CI	P Değeri
LRP5	44,8655	(0.00001, 100.26)	0
RHOA	44,2846	(0.00001, 95.75)	0
CXADR	1,5092	(0.05, 2.96)	0,74477
DVL2	34,9172	(0.00001, 78.48)	0
NFACT1	1,4815	(0.36, 2.60)	0,585447
FZD8	16,5046	(0.00001, 39.65)	0,000003
CCND2	31,1278	(0.00001, 65.54)	0,000001
CSNK1A1	1,1062	(0.25, 1.96)	0,988447
HPRT1	1	(1.00, 1.00)	0

Not: Diffüz Mide Kanseri ile Kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır.

Mide kanserli hastalarda midede diffüz tutulum göstermeyen hastalar (n=28, %82) ile kontrol grubu karşılaştırıldığında da diffüz tutulum benzer olarak RHOA, CCND2, DVL2, FZD8 ve LRP5 genlerinin overekspresyonunun istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu saptandı (Tablo 11). Diffüz Mide kanserli hastalar diffüz tutulum göstermeyen Mide kanserli hastalar ile kendi aralarında karşılaştırıldığında ise diffüz tutulum gösteren grupta RHOA, CCND2, DVL2, CXADR, NFACT1, FZD8, CSNK1A1 ve LRP5 genlerinin diffüz tutulum göstermeyen gruba göre overeksprese olduğu gözlenmiştir. Bu sonuçlara bakıldığında gen

overekspresyonlarından CXADR, DVL2, NFACT1, FZD8 ve CCND2' nin istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlenmiştir (Tablo12).

TABLO 11: Diffüz Tutulum Göstermeyen Mide Kanseri ile Kontrol gruplarının Gen Ekspresyonlarının Karşılaştırılması

WNT Geni	Fold Değişikliği	95% CI	P Değeri
LRP5	6,9433	(2.60, 11.28)	0,027837
RHOA	7,4516	(2.79, 12.11)	0,032304
CXADR	0,8295	(0.28, 1.38)	0,212343
DVL2	5,9939	(2.59, 9.40)	0,003378
NFACT1	0,7304	(0.35, 1.11)	0,085914
FZD8	4,5839	(2.23, 6.93)	0,009108
CCND2	4,9699	(2.15, 7.79)	0,010679
CSNK1A1	0,7085	(0.38, 1.03)	0,250673
HPRT1	1	(1.00, 1.00)	0

Not: Diffüz Tutulum Göstermeyen Mide Kanseri ile Kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır.

TABLO 12: Diffüz Mide Kanseri ile Diffüz Tutulum Göstermeyen Mide Kanseri gruplarının Gen Ekspresyonlarının Karşılaştırılması

WNT Geni	Fold Değişikliği	95% CI	P Değeri
LRP5	3,5591	(0.00001, 9.69)	0,089259
RHOA	3,6029	(0.00001, 9.72)	0,085802
CXADR	2,2	(0.00001, 4.88)	0,035322
DVL2	3,3648	(0.00001, 9.49)	0,013789
NFACT1	2,4603	(0.12, 4.80)	0,002398
FZD8	1,9684	(0.00001, 5.91)	0,040292
CCND2	3,8211	(0.00001, 10.00)	0,018442
CSNK1A1	1,7063	(0.00001, 3.62)	0,138358
HPRT1	1	(1.00, 1.00)	0

Not: Diffüz Mide Kanseri ile Diffüz Tutulum Göstermeyen Mide Kanseri grubu ile karşılaştırılmıştır.

4.2.1.2 Metastaz Yapmasına Göre Gen Ekspresyon Analizi

Mide kanseri olguları metastaz yapmasına göre (31 hastanın sistemik görüntülemesi var); uzak metastaz yapan grupta (%52, n=16) kontrol grubuna göre RHOA, CCND2, DVL2, FZD8 ve LRP5 genlerinin overekspresyonunun istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu saptandı (Tablo 13, $p<0.05$).

TABLO 13: Metastatik Mide Kanseri Hastalarında Kontrol Grubuna Göre Gen Ekspresyon Analizi

WNT Geni	Fold Değişikliği	95% CI	P Değeri
LRP5	29,3533	(9.61, 49.09)	0,000089
RHOA	32,0922	(11.44, 52.75)	0,000069
CXADR	0,9735	(0.24, 1.70)	0,416138
DVL2	23,9562	(10.04, 37.87)	0,000034
NFACT1	0,8953	(0.36, 1.43)	0,548266
FZD8	15,5334	(6.89, 24.18)	0,000031
CCND2	20,4273	(8.38, 32.47)	0,000053
CSNK1A1	0,8498	(0.40, 1.30)	0,503345
HPRT1	1	(1.00, 1.00)	0

Not: Metastatik Mide Kanseri Hastaları ile kontrol grubu karşılaştırılmıştır.

Metastaz yapmayan Mide kanserli olgularda da (%48, n=15) kontrol grubuna göre metastatik olanlara benzer olarak RHOA, CCND2, DVL2, FZD8 ve LRP5 genlerinin overekspresyonunun istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu saptandı (Tablo 14, $p<0.05$).

TABLO 14: Metastatik Olmayan Mide Kanseri Hastalarında Kontrol Grubuna Göre Gen Ekspresyon Analizi

WNT Geni	Fold Değişikliği	95% CI	P Değeri
LRP5	3,5905	(1.33, 5.85)	0,007514
RHOA	3,686	(1.43, 5.94)	0,002931
CXADR	0,8782	(0.25, 1.50)	0,330182
DVL2	3,1475	(1.23, 5.06)	0,016352
NFACT1	0,7716	(0.32, 1.22)	0,213632
FZD8	2,3744	(1.20, 3.55)	0,00692
CCND2	2,6079	(1.14, 4.07)	0,003182
CSNK1A1	0,6993	(0.33, 1.07)	0,402474
HPRT1	1	(1.00, 1.00)	0

Not: Metastatik Olmayan Mide Kanseri Hastaları ile kontrol grubu karşılaştırılmıştır.

Metastatik Mide kanseri hastalar metastatik olmayan hastalar ile karşılaştırıldığında RHOA, CCND2, DVL2, FZD8 ve LRP5 genlerinin istatistiksel olarak daha fazla overeksprese olduğu gözlenmiştir (Tablo 15, $p<0.05$).

TABLO 15: Metastatik Mide Kanseri Hastalarının Metastatik Olmayan Mide Kanseri Grubuna Göre Gen Ekspresyon Analizi

WNT Geni	Fold Değişikliği	95% CI	P Değeri
LRP5	8,1752	(2.01, 14.34)	0,002189
RHOA	8,7064	(2.30, 15.11)	0,001781
CXADR	1,1085	(0.38, 1.84)	0,624571
DVL2	7,6112	(2.08, 13.14)	0,001984
NFACT1	1,1603	(0.42, 1.90)	0,482637
FZD8	6,542	(2.68, 10.40)	0,00091
CCND2	7,8327	(2.57, 13.10)	0,001375
CSNK1A1	1,2152	(0.52, 1.92)	0,81519
HPRT1	1	(1.00, 1.00)	0

Not: Metastatik Mide Kanseri Hastaları ile Metastatik Olmayan Mide Kanseri grubu karşılaştırılmıştır.

4.2.1.3. Mide Kanseri Hastalarında Sağkalıma Göre Gen Ekspresyon Analizi

Mide kanseri olguları sağkalıma göre bakıldığında hastaların %53'ünün (n=16) exitus olduğu görülmüştür. Exitus olan hastalarda kontrol grubuna göre RHOA, CCND2, DVL2, FZD8 ve LRP5 genlerinin overekspresyonunun istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu saptandı (Tablo 16, $p<0.05$). Yaşayan hastalara bakıldığında da exitus olan hastalara benzer şekilde RHOA, CCND2, DVL2, FZD8 ve LRP5 genlerinin overekspresyonunun istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu saptandı (Tablo 17, $p<0.05$). Exitus olan hastalar yaşayan hastalar ile karşılaştırıldığında overeksprese olan genlerde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmedi (Tablo 18, $p>0.05$).

TABLO 16: Exitus Olan Mide Kanseri Hastalarının Kontrol Grubuna Göre Gen Ekspresyon Analizi

WNT Geni	Fold Değişikliği	95% CI	P Değeri
LRP5	10,5218	(1.65, 19.39)	0,003423
RHOA	11,2343	(1.97, 20.50)	0,001559
CXADR	0,9775	(0.25, 1.71)	0,39209
DVL2	7,4831	(1.51, 13.45)	0,005167
NFACT1	0,774	(0.27, 1.28)	0,481489
FZD8	4,858	(1.42, 8.30)	0,011708
CCND2	6,6122	(1.46, 11.76)	0,009248
CSNK1A1	0,8123	(0.35, 1.27)	0,680382
HPRT1	1	(1.00, 1.00)	0

Not: Exitus olan Mide Kanseri Hastaları ile Kontrol grubu karşılaştırılmıştır.

TABLO 17: Yaşayan Mide Kanseri Hastalarının Kontrol Grubuna Göre Gen Ekspresyon Analizi

WNT Geni	Fold Değişikliği	95% CI	P Değeri
LRP5	8,7571	(1.72, 15.79)	0,017323
RHOA	9,1603	(1.75, 16.57)	0,022412
CXADR	0,8631	(0.25, 1.47)	0,348279
DVL2	9,0424	(2.33, 15.76)	0,002489
NFACT1	0,8922	(0.44, 1.34)	0,241208
FZD8	6,9424	(2.32, 11.57)	0,00196
CCND2	7,1722	(1.85, 12.50)	0,003149
CSNK1A1	0,718	(0.38, 1.06)	0,244836
HPRT1	1	(1.00, 1.00)	0

Not: Yaşayan Mide Kanseri Hastaları ile Kontrol grubu karşılaştırılmıştır.

TABLO 18: Exitus Olan Mide Kanseri Hastalarının Yaşayan Hasta Grubuna Göre Gen Ekspresyon Analizi

WNT Geni	Fold Değişikliği	95% CI	P Değeri
LRP5	1,1769	(0.00001, 2.45)	0,765832
RHOA	1,1772	(0.00001, 2.46)	0,959996
CXADR	1,1692	(0.39, 1.95)	0,602021
DVL2	0,8398	(0.00001, 1.72)	0,971036
NFACT1	0,8808	(0.33, 1.43)	0,663203
FZD8	0,5991	(0.09, 1.11)	0,65438
CCND2	0,8454	(0.00001, 1.70)	0,989053
CSNK1A1	1,1597	(0.49, 1.83)	0,300045
HPRT1	1	(1.00, 1.00)	0

Not: Exitus olan Mide Kanseri Hastaları ile Yaşayan Hasta grubu karşılaştırılmıştır.

4.2.2. IM Hastalarının Alt Grup Gen Ekspresyon Analizi

4.2.2.1 HP Görülmesine Göre Gen Ekspresyon Analizi

IM hastaların (n=45) % 31'inde (n=14) HP pozitif olduğu gözlenmektedir. HP pozitif hastalar ile kontrol grubu karşılaştırıldığında HP pozitif hastalarda RHOA, CCND2, DVL2, FZD8 ve LRP5 genlerinin overekspresyonunun istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu saptandı (Tablo 19, $p<0.05$). HP negatif hastalar (%69, n=31) ile kontrol grubu karşılaştırıldığında HP pozitif hastalara benzer şekilde RHOA, CCND2, DVL2, FZD8 ve LRP5 genlerinin overekspresyonunun istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu saptandı (Tablo 20, $p<0.05$).

HP pozitif IM hastaları ile HP negatif IM hastalarının gen analizleri karşılaştırıldığında overekspresyona uğrayan RHOA, CCND2, DVL2, FZD8 ve LRP5 genlerinin overekspresyonunun HP pozitif IM hastalarında istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu saptandı (Tablo 21, $p<0.05$).

TABLO 19: HP Pozitif IM Hastaları ile Kontrol Grubu Göre Gen Ekspresyon Analizi

WNT Geni	Fold Değişikliği	95% CI	P Değeri
LRP5	25,0555	(8.84, 41.27)	0,000071
RHOA	29,164	(11.99, 46.34)	0,000025
CXADR	0,571	(0.11, 1.03)	0,376146
DVL2	35,0153	(11.62, 58.41)	0,000017
NFACT1	0,7962	(0.32, 1.27)	0,393241
FZD8	16,6277	(6.94, 26.31)	0,000564
CCND2	16,8164	(7.33, 26.30)	0,00009
CSNK1A1	0,8756	(0.35, 1.40)	0,818795
HPRT1	1	(1.00, 1.00)	0

Not: HP Pozitif IM Hastaları ile Kontrol Grubu Karşılaştırılmıştır.

TABLO 20: HP Negatif IM Hastaları ile Kontrol Grubu Göre Gen Ekspresyon Analizi

WNT Geni	Fold Değişikliği	95% CI	P Değeri
LRP5	4,101	(1.95, 6.25)	0,010893
RHOA	4,6937	(2.35, 7.04)	0,006455
CXADR	0,4997	(0.17, 0.83)	0,109806
DVL2	3,8444	(1.81, 5.88)	0,014281
NFACT1	0,6878	(0.35, 1.02)	0,086571
FZD8	3,1376	(1.75, 4.53)	0,004871
CCND2	4,4682	(2.34, 6.59)	0,00033
CSNK1A1	0,4623	(0.23, 0.70)	0,610698
HPRT1	1	(1.00, 1.00)	0

Not: HP Negatif IM Hastaları ile Kontrol Grubu Karşılaştırılmıştır.

TABLO 21: HP Pozitif IM Hastaları ile HP Negatif IM Hasta Grubu Göre Gen Ekspresyon Analizi

WNT Geni	Fold Değişikliği	95% CI	P Değeri
LRP5	6,1096	(2.18, 10.04)	0,000244
RHOA	6,2134	(2.54, 9.88)	0,000127
CXADR	1,1428	(0.37, 1.91)	0,28881
DVL2	9,1082	(2.36, 15.85)	0,000039
NFACT1	1,1575	(0.52, 1.79)	0,582991
FZD8	5,2996	(2.26, 8.34)	0,000893
CCND2	3,7636	(1.59, 5.94)	0,000995
CSNK1A1	1,8939	(0.71, 3.07)	0,800904
HPRT1	1	(1.00, 1.00)	0

Not: HP Pozitif IM Hastaları ile HP Negatif IM Hasta Grubu Karşılaştırılmıştır.

V. TARTIŞMA

Mide Kanserinin moleküler ve biyolojik özellikleri hakkındaki bilgilerin hızla artması patogeneze ışık tutmaktadır. Mide Kanserinin genetik yatkınlık ve çevresel faktörler arasındaki etkileşim sonucu oluştuğu düşünülmektedir. Bu çerçevede sinyal yolları önemli bir yolu oluşturmaktadır. Bu yolların her birinde; patogenetik mekanizmayı farklılaştıran, birden fazla mutasyonun aşamalı olarak birikimi söz konusu olabilir.

Sinyal yolları hücrelerin nükleuslarında bilgi transformasyonunda rol oynarlar. Bilgi aktarımı ile gen transkripsiyonu oluşur ve sonuç olarak birçok hücresel süreç etkilenir. Sinyal yollarına WNT, JAK-STAT, MAP-KİNAZ, NOTC Sinyal yolları örnek verilebilir. WNT sinyal yolağı evrim sürecinde korunmuş ve geliştirme, farklılaşma, hücre çoğalması, morfoloji, motilite gibi önemli süreçlerde rol almaktadır. Bu nedenle WNT sinyal yolunda görev alan genler karsinogenezde önem arz ederler. Çalışmamızda kullandığımız RHOA, CXADR, CSNK1A1, CCND2, DVL2, FZD8, NFACT1 ve LRP5 genler WNT sinyal yolunda görev alır. Bu genler dahil WNT sinyal yolu birçok kez karsinogenezis patofizyolojisi açısından araştırma konusu olmuştur.

Mide kanseri için WNT sinyal yolunun etkinliği bilinmektedir. Çalışmamızda IM hastalarında da mide kanseri oluşumu öncesinde WNT sinyal yolağının etkinliğinin olup olmadığını saptamak için çeşitli karşılaştırmalar yapılmıştır. Böylece IM hastalarında bu genlerin bir marker olarak değeri olup olmadığı sorgulanmıştır.

WNT sinyal yolunda önemli bir basamağı oluşturan RHOA (Ras homolog gene family member A) çeşitli kanser oluşumlarında (Özofagus, Mide, Kolon, HCC, Prostat, Baş boyun, Hematolojik) rolü olduğu düşünülen, hücre sinyal iletiminde GTPase üzerinden etkin olan RHO ailesinin bir üyesidir [123]. Tüm ökaryot hücrelerde bulunmaktadır. RHO ailesi RHO A-B ve C gruplarını içerir. RHOA GTPase ailesi 20 küçük G proteini içerir. Hücre döngüsü, polarizasyonu ve göçü gibi durumlarda görev alır. GTPase GTP nin GDP ye hidrolize olması ile inaktive olur. Bu inaktivasyon zayıftır ve devamlılığı için GTPase aktive edici enzimler önemlidir. Bu enzimlerinde oluşacak bir mutasyon sinyal aktivasyonuna neden olabilir. Tümör

dokusunda RHOA GTPase aktivasyonu mutasyon nedeniyle değişmiş olabilir. Bunun sonucunda hücre döngüsünde GTPase etkili olduğu G1-S fazı hızlanıp ve yavaşlayabilir. Karrlson ve arkadaşları yaptıkları ilk çalışmada insan tümör dokusunda mutant RHOA gsterememişse de in vitro ortamda hücre fonksiyonlarını etkilediğini kanıtlamış ve sonraki çalışmalarında tümör dokusunda RHOA mutasyonunu birçok kez saptamışlardır [124]. Zhang ve arkadaşları hücre kültüründe mide kanserinde RHOA mutasyonu elde etmişler. Bu mutasyonlarda hücre bölünmesinin G1-S fazında rol alan RhoA-specific siRNA saptamışlardır [125]. Bu da RHOA nın hücre proliferasyonundaki önemini gösteren başka bir kanıt olmuştur.

RHOA ekspresyonu kötü prognoz ve progresyon ile ilişkilendirilmiştir [126]. Pan ve arkadaşları RHO ailesinin ekspresyonlarını hücre kültüründe değerlendirdikleri çalışmada RHOA ekspresyonun yüksekliğinin az diferansiye mide kanseri ile ilişkili olduğu ve ekspresyon oranı arttıkça TNM sınıflamasının da arttığı gösterilmiştir [127].

Ushiku ve arkadaşlarının 87 mide kanseri hastası ile yaptıkları çalışmada 22 RHOA mutant hastanın 18' inde taşlı yüzük hücreli görünüm saptanmıştır. Hastalarda sıklıkla miks ve diffüz tutulum grlmştr. İntestinal tip mide kanseri RHOA mutant hastalarda nadir rastlanmıştır. RHOA mutasyonu anlamlı bir prognostik değer olarak değerlendirilmemiştir [128]. Kakiuchi ve arkadaşlarının 87 diffüz mide kanseri hastasında yaptığı bir analizde de %25.3 (22/87) RHOA mutasyonu saptanmıştır [129]. Wang ve arkadaşlarının yaptığı diğer bir çalışmada da benzer bulgulara rastlanmaktadır. İntestinal tip mide kanseri hastalarında RHOA mutasyonu saptanmazken diffüz tipte mide kanseri hastalarında %14.3 (14/98) oranında RHOA mutasyonu saptanmıştır [130]. Son olarak Röcken ve arkadaşlarının 415 hastanın patolojik preperatlarını geriye doğru tarayarak RHOA mutasyonu olan olguların klinik ve patolojik durumlarını değerlendirmişler. Mutasyon saptanan olgularda kadın cinsiyete daha sık rastlanmaktadır. Olgular az diferansiye, ağırlıkla distal mide kanserini oluşturmaktadır. İlginç olarak mutasyon saptanan olguların T evresi düşük ve olgularda uzak metastaz saptanmamıştır. Lauren sınıflamasına göre bakıldığında da diffüz

mide kanserinin daha sık olduğu gözlenmiştir. Metastaz ile ilişkisinin aydınlatılması için daha fazla çalışma gerektiği düşünölmüştür [131].

Çalışmamızda Mide kanseri hastalarında; RHOA geni kontrol grubuna göre anlamlı derecede overeksprese olduğu saptanmıştır. Diffüz tip mide kanseri hastalarında hem kontrol grubuna oranla hem de diffüz tutulum göstermeyen hastalara oranla istatistiksel olarak anlamlı derecede overekspresyon saptanmıştır. Tutulum yerlerine göre mide kanseri hastaları incelendiğinde diffüz tutulum yapan 6 hastanın tamamında, proksimal tutulum yapan 16 hastanın 10' unda ve distal tutulum gösteren 12 hastanın 8' inde istatistiksel olarak anlamlı RHOA gen overekspresyonu görölmüştür. Yine uzak metastazı bulunan hastalarda RHOA gen ekspresyonu metastaz göstermeyen hastalara göre istatistiksel olarak anlamlı derecede overekspresyon göstermektedir. Metastaz yapan 16 hastanın tamamında, metastaz yapmayan 15 hastanın 8' inde RHOA gen overekspresyonu istatistiksel olarak anlamlı saptanmıştır. Sağ kalım ile karşılaştırıldığında exitus olan hastalarda yaşayan hastalara göre RHOA gen ekspresyonu daha fazla olmakla birlikte bu overekspresyon istatistiksel olarak anlamlı değildir. Bu genin overekspresyonunun hastalarda kontrol grubuna göre, hem de metastaz varlığında metastaz olmayan gruba göre anlamlı derece yüksek saptanması ve diffüz tutulum yapan hastalar ile metastaz yapan hastalar tamamında overeksprese olması tümör yükü ile ilişkili olduğunu gösterdiği düşünölmektedir. Mide kanseri grubunda exitus olanlar ile sağ kalanlar arasında anlamlı olarak fark görölmemesi prognozla ilişkisinin olmayacağını düşündörmektedir. Daha çok hasta ile diğer faktörlerinde göz önünde bulundurularak analiz edilmesi sağ kalıma etkisi açısından bize daha çok bilgi verebilir.

Literatürde RHOA ve IM ile yapılan bir çalışmaya rastlanmamıştır. Çalışmamızda IM hastalarında RHOA genine baktığımızda; kontrol grubuna göre anlamlı derecede overeksprese olduğu saptanmıştır. HP pozitif ve veya negatif IM hastalarında kontrol grubuna göre RHOA gen overekspresyonu istatistiksel olarak anlamlı olarak saptanmakla birlikte; HP pozitif IM hastalarında HP negatif IM hastalarına oranla RHOA gen ekspresyonu

istatistiksel olarak daha yüksek bulunmuştur. Mide kanseri hastaları ile karşılaştırıldığında gen ekspresyonunun mide kanseri hastalarında IM hastalarına oranla anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p>0.05$). Bu bulgular ile RHOA gen ekspresyonunun IM zamanında başladığı düşünülebilir. HP pozitif ve negatif hastalarda RHOA gen overekspresyonu saptanmıştır. Bu bulgu ile HP' nin gen ekspresyonunda önemli bir yeri olmadığını düşündürse de HP pozitif hastalarda negatif hastalara göre anlamlı olarak ekspresyonun yüksek bulunmuş olması HP' nin inflamasyonu artırarak gen ekspresyonunu etkilediğini düşündürmektedir. Bu bulguların daha geniş çalışmalar ile desteklenmesi gerekmektedir. Çalışmamızdaki bulgular eşliğinde mide karsinogenezinde anahtar role sahip RHOA' nın tümör yükü ile ilişkili olduğu, inflamasyon ile tetiklendiği ve HP gibi çevresel faktörler ile etkilendiği düşünülebilir.

Canonical ve non-canonical yollar ile aktive olan WNT sinyal yolağında noncanonical yolda sinyal Frizzled (FZD) reseptörleri ve PTK7/ROR2/Ryk koreseptörleri aracılığı ile RHOA/RHO/RAC/CDC42, JNK, PKC, NFAT ve NLK kaskadına aktarılır. LRP (Low-density lipoprotein-related receptor) reseptörlerinin rolü ise canonical yolda ortaya çıkar. Bu yolda FZD reseptörleri LRP5/LRP6 koreseptörler ile MYC, CCND1, FGF20, JAG1, WISP1 ve DKK1 genlerinin upregüle olmasını sağlarlar [132,133,134].

LRP5 ve LRP6 karsinogenezis dışında da birçok hastalıkta güncel bir araştırma konusudur. Osteoporozis, alzheimer, koroner arter hastalığı, osteoartrit, kalsifik kalp kapağı ve paratiroid tümörü gibi birçok hastalıkta etken olarak over ekspresyonu ya da mutasyonu gösterilmiştir. Bu yolların inhibisyonu için Dkk1, antisklerostin ve anti-LRP6 üzerinde ilaç çalışmaları yapılmaktadır [134,135]. Güncel bir araştırma konusu olan bu yol bazı kanserlerde de ilgi odağıdır. Björklund ve arkadaşları meme kanserinde yaptığı bir analizde 17 duktal meme kanseri hastasının 15 inde ve 2 lobuler meme kanseri hastasının 1 inde LRP5 reseptör overekspresyonu göstermiştir [136]. Hoang ve arkadaşları LRP5 mutasyonu ile ilgili osteosarkom hastalarında yaptığı bir çalışma LRP5 gen mutasyonunun malignite ile ilişkisini göstermiştir. Çalışmada LRP5 mutasyonu metastatik osteosarkom

hastalarında ($p = 0.005$) ve agresif bir tip olan kondroblastik tipinde ($p = 0.045$) istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yüksek saptanmıştır. Aynı çalışmada tanı anında metastazı bulunmayan osteosarkom hastalarında LRP5 mutasyonunun negatif saptanması, mutasyonun metastaz ve progresyonla ilişkili olabileceğini akla getirmektedir [137]. Adenokanserler ile ilgili çalışmalar literatürde sınırlıdır. Liu ve arkadaşlarının ileri evre mide kanserinde yaptığı bir çalışmada LRP5 mutasyonu saptanan olgularda mutasyonun varlığı hastalısız ve ortalama sağ kalım ile ters orantılı olarak bulunmuştur. Bu çalışmada LRP5 mutasyonunun Mide Kanseri için prognostik bir değer olabileceği idda edilmiş; ancak geniş kapsamlı çalışmalara ihtiyaç duyulduğu bilgisi vurgulanmıştır [138].

Çalışmamızda mide kanseri hastalarında; LRP5 geni kontrol grubuna göre anlamlı derecede overeksprese olduğu saptanmıştır. Diffüz tip mide kanseri hastalarında hem kontrol grubuna oranla hem de diffüz tutulum göstermeyen hastalara oranla istatistiksel olarak anlamlı derecede overekspresyon olduğu görülmüştür. Tutulum yerlerine göre mide kanseri hastaları incelendiğinde diffüz tutulum yapan 6 hastanın tamamında, proksimal tutulum yapan 16 hastanın 10' unda ve distal tutulum gösteren 12 hastanın 8' inde istatistiksel olarak anlamlı LRP5 gen overekspresyonu görülmüştür. Uzak metastazı bulunan hastalarda LRP5 gen ekspresyonu metastaz göstermeyen hastalara göre overekspresyon göstermektedir ($p < 0.05$). Metastaz yapan 16 hastanın tamamında, metastaz yapmayan 15 hastanın 12' sinde LRP5 gen overekspresyonu istatistiksel olarak anlamlı saptanmıştır. Sağ kalım ile karşılaştırıldığında exitus olan hastalarda yaşayan hastalara göre LRP5 gen ekspresyonu daha fazla olmakla birlikte istatistiksel olarak anlamlı değildir. Bu genin de overekspresyonunun hastalarda kontrol grubuna göre, hem de metastaz varlığında metastaz olmayan gruba göre anlamlı derece yüksek saptanması ve diffüz tutulum yapan hastalar ile metastaz yapan hastaların tamamında overeksprese olması tümör yükü ile ilişkili olduğunu gösterdiği düşünülmektedir. Mide Kanseri grubunda exitus olanlar ile sağ kalanlar arasında anlamlı olarak fark görülmemesi prognozla ilişkisinin olmayacağını düşündürmektedir. Daha çok hasta ile diğer

faktörlerinde göz önünde bulundurularak analiz edilmesi sağ kalıma etkisi açısından bize daha çok bilgi verebilir.

IM hastalarında LRP5 genine ekspresyonu kontrol grubuna göre anlamlı derecede daha fazla overeksprese olduğu saptanmıştır. Bu oran mide kanseri ve IM için önemli bir predispozan faktör olan HP pozitifliğinde de benzerdir. HP pozitif IM hastalarında hem kontrol grubuna oranla hem de HP negatif IM hastalarına oranla LRP5 gen ekspresyonu istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Bu bulgular ile LRP5 gen ekspresyonunun IM zamanında başladığı düşünülebilir. HP pozitif ve negatif hastalarda LRP5 gen overekspresyonu saptanmıştır. Bu bulgu ile HP' nin gen ekspresyonunda önemli bir yeri olmadığını düşündürse de HP pozitif hastalarda negatif hastalara göre anlamlı olarak ekspresyonun yüksek bulunmuş olması HP' nin inflamasyonu artırarak gen ekspresyonunu etkilediğini düşündürmektedir. Bu bulguların daha geniş çalışmalar ile desteklenmesi gerekmektedir. Çalışmamızdaki bulgular eşliğinde mide karsinogenezinde anahtar role sahip LRP5' in tümör yükü ile ilişkili olduğu, inflamasyon ile tetiklendiği ve HP gibi çevresel faktörler ile etkilendiği düşünülebilir.

Frizzled (FZD) Wnt-FZD-LRP5-LRP6 komponentinin bir parçası olup, Wnt sinyal yolunda reseptör görevindedir. Beta-katenin kompleksinin aktive olmasını sağlar. Bu reseptörler hücre membranını 7 kez kat ederler. Bu sinyal yolunun tetiklenmesi sonucunda disheveled (DVL) proteinleri aktive olur, GSK-3 kinase inhibe olur, beta-kateninin nükleer birikimi gerçekleşir ve WNT hedef genler aktifleşir. FZD nin diğer rol aldığı sinyal yolu protein kinaz C ile ilişkilidir ve bu yolda GSK-3 kinase inhibe olması ile sonuçlanır. Bu benzer sonlanıma sahip olan ikinci yolun canonical WNT sinyal yolunun bir parçası olduğu düşünülmektedir [139]. FZD reseptörleri son yıllarda karsinogenezisde güncel olarak araştırılmaktadır. Janssens ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada 11 böbrek hücreli kanser hastasının 7 sinde FZD8 'in ekspresyon profili yüksek saptanmış ve FZD nin renal hücreli kanser için bir biomarker olabileceği düşünülmüştür [140]. Hematolojik maligniteler içinde araştırma konusu olan FZD reseptörlerinin Khan ve arkadaşlarının yaptığı

çalışmada B hücrelili akut lenfositler lösemili hastalarda FZD7 ve FZD8 ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir [141]. Wang ve arkadaşları akciğer kanserli hastalarda FZD8 in hedefe yönelik tedavide ileride önemli bir yere sahip olacağı sonucuna vardıkları çalışmada Real Time-PCR yöntemi ile FZD8 ekspresyonuna bakmışlar. Yapılan çalışmada FZD8 ekspresyonu akciğer kanseri hastalarında %85 (17/20) oranında saptanmıştır [142]. Mide adenokarsinomu ile ilgili bilgiler literatürde sınırlıdır. Diğer kanserler ile ilgili çalışmaları daha fazla olan FZD reseptörleri mide kanserinde Kirikoshi ve arkadaşlarının yaptığı bir analizde değerlendirmişlerdir. Çalışmada FZD ailesi FZD1, FZD2, FZD3, FZD4, FZD5, FZD6, FZD7, FZD8 ve FZD10 olarak klonlamışlar ve mide adenokarsinomu hastalarında ekspresyon profillerine bakılmıştır. Yapılan analizde 10 mide kanseri hastasının 4 ünde FZD2 ve FZD8' in arttığı saptanmıştır. Yapılan çalışma sonucunda FZD2 ve FZD8' in mide kanseri için potansiyel bir biomarker olabileceği vurgulanmıştır. HP ile ilişkisi incelendiğinde FZD8 geni ekspresyonu ile HP arasında bir ilişki saptanmamıştır [143]. Bu çalışmada hasta sayısının 10 kişiden oluşması HP için böyle bir yorum yapılması açısından yeterli olmayabilir.

Çalışmamızda mide kanseri hastalarında; FZD8 geni kontrol grubuna göre anlamlı derecede overeksprese olduğu saptanmıştır. Diffüz tip mide kanseri hastalarında hem kontrol grubuna oranla hem de diffüz tutulum göstermeyen hastalara oranla istatistiksel olarak anlamlı derecede overekspresyon olduğu görülmüştür. Tutulum yerlerine göre mide kanseri hastaları incelendiğinde diffüz tutulum yapan 4 hastada, proksimal tutulum yapan 16 hastanın 12' sinde ve distal tutulum gösteren 12 hastanın 8' inde istatistiksel olarak anlamlı FZD8 gen overekspresyonu görülmüştür. Metastaz yapan 16 hastanın tamamında, metastaz yapmayan 15 hastanın 9' unda FZD8 gen overekspresyonu istatistiksel olarak anlamlı saptanmıştır. Uzak metastazı bulunan hastalarda FZD8 gen ekspresyonu metastaz göstermeyen hastalara göre overekspresyon göstermektedir ($p<0.05$). Sağ kalım açısından değerlendirildiğinde exitus olan hastalarda yaşayan hastalara göre FZD8 gen ekspresyonu istatistiksel olarak anlamlı değildir. Bu genin de overekspresyonunun hastalarda kontrol grubuna göre, hem de metastaz

varlığında metastaz olmayan gruba göre anlamlı derece yüksek saptanması ve metastaz yapan tüm hastalarda overeksprese olması tümör yükü ile ilişkili olduğunu gösterdiği düşünülmektedir. Mide Kanseri grubunda exitus olanlar ile sağ kalanlar arasında anlamlı olarak fark görülmemesi prognozla ilişkisinin olmayacağını düşündürmektedir. Daha çok hasta ile diğer faktörlerinde göz önünde bulundurularak analiz edilmesi sağ kalıma etkisi açısından bize daha çok bilgi verebilir.

IM hastalarında FZD8 gen ekspresyonunun kontrol grubuna göre anlamlı derecede overeksprese olduğu saptanmıştır. Bu oran mide kanseri ve IM için önemli bir predispozan faktör olan HP pozitifliğinde de benzerdir. HP pozitif IM hastalarında hem kontrol grubuna oranla hem de HP negatif IM hastalarına oranla FZD8 gen ekspresyonu istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Bu bulgular ile FZD8 gen ekspresyonunun IM zamanında başladığı düşünülebilir. HP pozitif ve negatif hastalarda FZD8 gen overekspresyonu saptanmıştır. Bu bulgu ile HP' nin gen ekspresyonunda önemli bir yeri olmadığını düşündürse de HP pozitif hastalarda negatif hastalara göre anlamlı olarak ekspresyonun yüksek bulunmuş olması HP' nin inflamasyonu artırarak gen ekspresyonunu etkilediğini düşündürmektedir. Bu bulguların daha geniş çalışmalar ile desteklenmesi gerekmektedir. Çalışmamızdaki bulgular eşliğinde mide karsinogenezinde anahtar role sahip FZD8' in tümör yükü ile ilişkili olduğu, inflamasyon ile tetiklendiği ve HP gibi çevresel faktörler ile etkilendiği düşünülebilir.

Dishevelled Segment Polarity Protein 2 (DVL2) Wnt sinyal yolunda önemli bir basamağı oluşturmaktadır. Frizzled reseptörünün sitoplazmik C terminale kısmına bağlanır ve sinyalin aşağı doğru iletilmesini sağlar. Canonical ve non-canonical Wnt sinyal yollarının her ikisinde de rol alır. DVL2 β -katenin sinyal yolunun downregülasyonuna neden olan Axin-Apc kompleksine bağlanır ve sinyal yolunun aktivasyonu sağlar[144,145,146].

Gastrik kanser ve malign melanomda görev aldığı bilinen WNT sinyal yolu meme kanserinde de yaygın bir araştıma konusudur. Meme kanserinde Wnt sinyal yolunda oluşan disregülasyon otokrin mekanizmalarla ortaya çıkar [147]. Buradan yola çıkan Zhu ve arkadaşları meme kanseri hücre dizlerinde

yaptıkları çalışmalarda Wnt sinyal yolunun aktivitesinin artarak DVL2 yi fosforile ettiği ve bu sayede sinyalin hücre içinde iletilmesini sağladığını ortaya koymuşlardır [148]. Metcalfe ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada kolorektal adenokanser hücrelerinde DVL2 yüksek ekprese saptanmıştır. DVL2' nin siRNA tarafından inhibe edildiğinde β -katenin sinyal yolunun aktivitesinin azaldığı görüşü ile yola çıkarak kolorektal adenokanserli hastalarda DVL2 aktivasyonunun β -katenin sinyal yolu hiperaktivasyonuna neden olduğu düşünülmüştür. 24 kolorektal kanserli hastada yapılan değerlendirmede DVL2 düzeyi kolorektal kanserli hücrelerin 1/3 ünde tümör cerrahi sınırındaki normal dokuya oranla yüksek saptanmıştır. Çalışmaya devam edilerek hasta sayısı 393'e çıkarılmış. Hasta grupları normal mukoza, hiperplastik ve adenomatoz polip ve kolorektal karsinomlu hastalar olarak seçilmiştir. Yapılan çalışmada β -katenin pozitif saptanan çekirdeklerin normal dokudan karsinom dokuya doğru sıralandığında hücre gruplarında ekspresyon oranının arttığı gözlenmiştir. Bu yükseklik Axin ve DVL2 için de aynı şekilde saptanmıştır. Değişik tümör evrelerinde bu oranın korunması APC kaybına cevap olarak kolorektal tümörlü hastalarda DVL2 ve Axin geninin upregülasyonu neden olduğunu düşünülmüştür. Aynı çalışmada DVL2'nin upregülasyonun Wnt stimülasyonu sonucunda postraskripsiyonel olarak da olabileceği gösterilmiştir. Bunun üzerine APC mutant farelerde DVL2 değerlendirilmiştir. DVL 2'nin azlığı ile tümör yükü azalması orantılı bulunmuş ve DVL2 azalmasında ince barsak kısalması, kript sayı ve çapında azalma saptanmıştır [149]. Chong ve arkadaşlarının yaptığı çalışma sonucunda DVL2 ve ETS1 proteinlerinin intestinal tip mide kanserine göre diffüz ve miks tip mide kanserinde daha spesifik olduğu saptanmıştır. Her iki gen de normal doku ve intestinal tip mide kanserlerinde benzer metilasyon gösterirken mix tip ve diffüz tip mide kanserinde metilasyon oranı yüksek bulunmuştur. Bu sonuçlar da anormal metilasyonun mix ve diffüz tip mide kanserinde karsinom dışı normal dokudan başladığını düşündürmektedir [150].

Çalışmamızda mide kanseri hastalarında; DVL2 geninin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede overeksprese olduğu

saptanmıştır. Diffüz tip mide kanseri hastalarında hem kontrol grubuna oranla hem de diffüz tutulum göstermeyen hastalara oranla istatistiksel olarak anlamlı derecede overekspresyon olduğu görülmüştür. Tutulum yerlerine göre mide kanseri hastaları incelendiğinde diffüz tutulum yapan 6 hastanın tamamında, proksimal tutulum yapan 16 hastanın 8' inde ve distal tutulum gösteren 12 hastanın 8' inde istatistiksel olarak anlamlı DVL2 gen overekspresyonu görülmüştür. Mide kanseri grubunda uzak metastazı bulunan hastalar ile metastaz göstermeyen hastalar karşılaştırıldığında uzak metastazı bulunan hastalarda DVL2 gen overekspresyonu istatistiksel olarak anlamlı derecede daha fazla görülmektedir ($p<0.05$). Metastaz yapan 16 hastanın 15' inde, metastaz yapmayan 15 hastanın 10' unda DVL2 gen overekspresyonu istatistiksel olarak anlamlı saptanmıştır. Sağ kalım açısından değerlendirildiğinde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında yaşayan hastalarda overekspresyon saptanmaktadır. Kontrol grubuna göre hem exitus olan hastalarda hem de yaşayan hastalarda overekspresyon anlamlı derecede yüksek olmakla birlikte her iki grup birbiri ile karşılaştırıldığında anlamlı bir değişiklik saptanmamıştır. Mide kanseri hastalarında hem kontrol grubuna göre, hem de metastaz varlığında metastaz olmayan gruba göre bu genin ekspresyonunun anlamlı derece yüksek saptanması, diffüz tutulum gösteren hastaların tamamında overekspresyon görülmesi tümör yükü ile ilişkili olduğunu gösterdiği düşünülmektedir. Mide kanseri grubunda exitus olanlar ile sağ kalanlar arasında anlamlı olarak fark görülmemesi prognozla ilişkisinin olmayacağını düşündürmektedir. Daha çok hasta ile analiz edilmesi sağ kalıma etkisi açısından bize daha çok bilgi verebilir. Mide kanseri hastaları ile mide kanseri için predispozan bir faktör olan IM grubu hastaları karşılaştırıldığında gen ekspresyonunun mide kanseri hastalarında istatistiksel olarak anlamlı olmayacak şekilde yüksek saptanmıştır ($p>0.05$).

IM hastalarında DVL2 gen ekspresyonu kontrol grubuna göre anlamlı derecede overeksprese gözlenmektedir. Bu oran mide kanseri ve IM için önemli bir risk faktörü olan HP pozitifliğinde de benzerdir. HP negatif IM hastalarında kontrol grubuna oranla DVL2 gen ekspresyonu anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Ancak HP pozitif IM hastalarında hem kontrol

grubuna oranla hem de HP negatif IM hastalarına oranla DVL2 gen ekspresyonu istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksek saptanmıştır. Bu bulgular eşliğinde DVL2 gen ekspresyonunun IM zamanında başladığı düşünülebilir. HP pozitif ve negatif hastalarda her iki grupta da DVL2 gen overekspresyonu saptanması HP' nin gen ekspresyonunda önemli bir yeri olmadığını düşündürse de HP pozitif hastalarda negatif hastalara göre anlamlı olarak ekspresyonun yüksek bulunmuş olması HP' nin inflamasyonu artırarak gen ekspresyonunu etkilediğini düşündürmektedir. Bu bulguların daha geniş çalışmalar ile desteklenmesi gerekmektedir. Çalışmamızdaki bulgular eşliğinde mide karsinogenezinde anahtar role sahip DVL2' nin tümör yükü ile ilişkili olduğu, inflamasyon ile tetiklendiği ve HP gibi çevresel faktörler ile etkilendiği düşünülebilir.

CyclinD2 (CCND2) siklin ailesinin bir üyesidir. CCND2 CDK kinazı düzenlemekle görevlidir. CDK4 ve CDK6 ile kompleks oluşturur. Bu kompleksin düzenleyicisi CCND2' dir. Hücre siklusunun G1 fazından S fazına geçmesini sağlar. Tümör supresör bir protein olan Rb (Retinoblastoma ilişkili protein)' nin fosforilasyonunda görev alır [151]. Hücre proliferasyonu tümörögenizde en önemli basamağı oluşturur. CDK/Siklin kompleksinin aktivasyonu bu yüzden karsinogenezisde önem kazanabilir [152]. Nitekim CDK4 inhibisyonunda rol oynadığı bilinen INK4 ile yapılan çalışmalar bu hipotezi kanıtlar niteliktedir. Serrano ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada INK4a lokusunu inhibe ettikleri farelerde kısa latent süreli spontan tümör dokusu olduğu rapor edilmiştir [153, 154].

Bu bilgiler ışığında Sakuma ve arkadaşları ise overyan kanserli hastalarda CyclinD2 rolünün araştırdıklarında benzer bulgular saptamışlardır. CyclinD2 metilasyonunda artış cerrahi sonrası hastalıksız sağ kalımın azalması ve ileri evre overyan kanser ile ilişkilendirilmiştir. Ancak overyan kanserli hastalarda prognostik bir faktör olarak gösterilememiştir [155]. Cole ve arkadaşlarının fareler üzerinde yaptığı çalışmada kolorektal adenokanser hastalarında WNT sinyal yolunun inhibisyonun tedavi için bir seçenek olabileceğini öne sürmüştür. Çalışmada APC geni negatif farelerde

intestinal dokuda (invivo ortamda) Cyclin D/CDK4-6 kompleksinin arttığı gösterilmiştir. APC + farelerde ise intestinal dokuda tümör dokusunda CyclinD2 düzeyi düşük saptanmıştır. En önemli varılan sonuçlar ise Cyclin D2 knockout edilmiş farelerde normal enterosit gelişimini etkilememesi ve CDK4/6 inhibisyonunun adenomatöz dokuyu baskılamasıdır [156]. Shi ve arkadaşlarının mide kanseri hastalarında retrospektif olarak yaptığı bir çalışmada tümör dokusundan alınan dokuda normal dokuya göre CyclinD2 (CCND2) anlamlı derecede artmış olduğu gösterilmiştir ($P < 0.001$). Aynı analizde CCND2 artmış ekspresyonunun invazyonun derinliği ($P= 0.02$), lenf nodu pozitifliği ve uzak metastaz ($p= 0.01$) ve ileri TNM evrelemesi ($P= 0.02$) ile ilişkili olduğu saptanmıştır. Bu çalışmada CCND2 artmış ekspresyonunun prognostik bir faktör olabileceği öne sürülmüştür [157].

Çalışmamızda mide kanseri hastalarında; CCND2 geninin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede overeksprese olduğu saptanmıştır. Diffüz tip mide kanseri hastalarında hem kontrol grubuna oranla hem de diffüz tutulum göstermeyen hastalara oranla istatistiksel olarak anlamlı derecede overekspresyon olduğu görülmüştür. Tutulum yerlerine göre mide kanseri hastaları incelendiğinde diffüz tutulum yapan 6 hastanın tamamında, proksimal tutulum yapan 16 hastanın 8' inde ve distal tutulum gösteren 12 hastanın 9' unda istatistiksel olarak anlamlı CCND2 gen overekspresyonu görülmüştür. Mide kanseri grubunda uzak metastazı bulunan hastalar ile metastaz göstermeyen hastalar karşılaştırıldığında uzak metastazı bulunan hastalarda CCND2 gen overekspresyonu istatistiksel olarak anlamlı derecede daha fazla görülmektedir ($p<0.05$). Metastaz yapan 16 hastanın 15' inde, metastaz yapmayan 15 hastanın 12' sinde CCND2 gen overekspresyonu istatistiksel olarak anlamlı saptanmıştır. Sağ kalım açısından değerlendirildiğinde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında yaşayan hastalarda overekspresyon saptanmaktadır. Kontrol grubuna göre hem exitus olan hastalarda hem de yaşayan hastalarda overekspresyon anlamlı derecede yüksek olmakla birlikte her iki grup birbiri ile karşılaştırıldığında anlamlı bir değişiklik saptanmamıştır. Bu genin de overekspresyonunun hastalarda kontrol grubuna göre, hem de metastaz varlığında metastaz

olmayan gruba göre anlamlı derece yüksek saptanması ve diffüz tutulum gösteren hastalar ile metastaz yapan hastaların tamamında overekspresye olması tümör yükü ile ilişkili olduğunu gösterdiği düşünülmektedir. Mide kanseri grubunda exitus olanlar ile sağ kalanlar arasında anlamlı olarak fark görülmemesi prognozla ilişkisinin olmayacağını düşündürmekle birlikte; bu yorum için daha fazla hasta ile yapılacak çalışmalarla ihtiyaç bulunmaktadır.

IM hastalarında CCND2 gen ekspresyonu kontrol grubuna göre anlamlı derecede overekspresye gözlenmektedir. Bu oran mide kanseri ve IM için önemli bir risk faktörü olan HP pozitifliğinde de benzerdir. HP negatif IM hastalarında kontrol grubuna oranla CCND2 gen ekspresyonu anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Ancak HP pozitif IM hastalarında hem kontrol grubuna oranla hem de HP negatif IM hastalarına oranla CCND2 gen ekspresyonu istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksek saptanmıştır. Bu bulgular ile CCND2 gen ekspresyonunun IM zamanında başladığı düşünülebilir. HP pozitif ve negatif hastalarda CCND2 gen overekspresyonu saptanmıştır. Bu bulgu ile HP' nin gen ekspresyonunda önemli bir yeri olmadığını düşündürse de HP pozitif hastalarda negatif hastalara göre anlamlı olarak ekspresyonun yüksek bulunmuş olması HP' nin inflamasyonu artırarak gen ekspresyonunu etkilediğini düşündürmektedir. Çalışmamızdaki bulgular eşliğinde mide karsinogenezinde anahtar role sahip CCND2' nin tümör yükü ile ilişkili olduğu, inflamasyon ile tetiklendiği ve HP gibi çevresel faktörler ile etkilendiği düşünülebilir. Bu bulguların daha geniş çalışmalar ile desteklenmesi gerekmektedir.

Casein kinase (CK) proteininin fosforile bir şekilde cAMP aktivitesi ilk kez 1970' li yıllarda açığa çıkmıştır. CD1 ve CD2 olarak iki kasein proteini saflaştırılmıştır. Casein kinase I (CK1) serin ve treonin yapısında monomerik bir proteindir. 7 isoformu bulunur: alpha, beta, gamma1, gamma2, gamma3, delta ve epsilon [158]. DNA tamiri, hücre bölünmesi, nüklear yerleşme ve membran transportu gibi görevlerde yer alır. CK1 ayrıca WNT ve Hedgehog sinyal yollarının gelişiminde önemli yere sahiptir. Wnt reseptörüne (Frizzled) bağlı değilken, CK1alphanın beta-katenini fosforillediği ve degradasyon işleminde rol oynadığı düşünülmektedir. WNT reseptörüne bağlandığı zaman

CK1epsilon hücre içi sinyal proteinini, Dishevelled ve CK1gamma ise LRP5/6 koreseptörlerini fosforile eder [159]. Tümöregenez üzerine etkileri bakıldığında CSNK1A1 ile ilgili çalışmalarda veriler değişkendir. CSNK1A1'in tümör süpresör genler üzerinde negatif bir etkisi olduğunu gösteren çalışmalarda bulunmaktadır [160]. Örneğin Huart ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalarda CSNK1A1 murine double minute chromosome 2 (Mdm2) onkogene ile iletişime girerek p53 ün degradasyonuna neden olduğu gösterilmiştir [161]. Malignite yönünde çalışmalar özellikle hematolojik sistemle ilişkilidir. Burdaki verilerde de genin hem overekspresyonun hemde inhibisyonun malignitede etkili olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Yapılan analizlerde CSNK1A1 nın ekspresyonu yeni tanı multiple myelom hastalarında önemi belirlenmemiş monoklonal gamapati hastarına göre artmış olarak saptanmıştır [162, 163]. Özellikle CSNK1A1 nın baskılanması β -katenin stabilleşmesi ve WNT sinyal yolağı tarafından transkripsiyona uğrayan hedef genlerin artmasına neden olur [164]. Sun ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada malign melanom hastalarında ve benign nevüslü hastalarda CSNK1A1 ekspresyonuna bakılmıştır. Yapılan çalışmada CSNK1A1'in malign melanomda over eksprese olduğu saptanmıştır [165]. Hematolojik sistemle ilgili diğer çalışmalara bakıldığında Järås ve arkadaşları akut myeloid hücrelerin sağkalım için CSNK1A1' e ihtiyaç duyarken sağlıklı hematolojik hücrelerde bu ekspresyon olmadan sağkalımın devam ettiği gösterilmiştir. Aynı zamanda bu çalışmada CSNK1A1 inhibisyonu sonucunda Rps6 fosforilasyonunda azalma ve p53 ekspresyonunda artma saptanmıştır [166].

Çalışmamızda CSNK1A1 geninde mide kanserli hastalarda ve IM hasta gruplarında kontrol grubuna oranla anlamlı bir overekspresyon saptanmamıştır. Tümör süpresör genler ile ilişkisi ve WNT sinyal yolundaki önemi bilinen bu gen ile ilgili çalışmalar ağırlıklı olarak hematolojik malinitelerle ilişkilidir. Bulunan veriler çelişkilidir. Elde ettiğimiz veriler ve literatür eşliğinde CSNK1A1 geninin adenokarsinom patogenezinde etkili olmadığını düşünmekteyiz. Mide adenokarsinom ve veya diğer

adenokarsinom çeşitlerinde patogeneziindeki rolünü aydınlatmak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

Northrop ve arkadaşları ilk kez 1994 yılında NFATC (Nuclear factor of activated T cells)' ı siğir domuzundan arıtmış ve bu proteininin kararlı sekanslarını kullanarak insan cDNA'sını izole etmişler [167]. NFATC cDNA 716 amino acid içeren ve tahmini ağırlığı 77,870 Da olan bir protein kodlar. NFACT kompleksinin tanımlanmış iki kısmı bulunur. Bu kısımlar TCR aktivasyonu sonrası nükleusa doğru hareket eden sistolik komponent ve indüklenabilen nükleus komponentinden oluşmaktadır. Bu transkripsiyonel aileye ait olan proteinler özellikle immun sistemde önemli role sahiptirler. Antijen spesifik immün yanıt T hücre antijen reseptörünün (TCR) antijen sunan hücrelerdeki major histocompatibility komplekse (MHC) bağlanması ile başlar [168]. TCR sitümlasyonu sonrasında aktive olan IL-2 promotörün analizi 2 homolog bölge göstermiştir; bu bölgeler TCR situmilasyonu ile indüklenir ve bunun indüksiyonu immunsupresif ajanlarla (cyclosporin A ve FK506) inhibe olur. Bu bağlanma T hücre fonksiyonlarında etkili olan transkripsiyonel genlerin aktivasyonuna neden olur [169]. Bu bağlanma T hücre tarafından aktive edilmiş nükleer faktör (NFACT) tarafından kontrol edilir. Bu gene ait farklı şekilde kodlanan birçok isoform tespit edilmiştir. Bu isomformlar farklı sitokin genlerinin uyarılmasına neden olabilir. Özellikle fonksiyonunda belirgin etkisi bulunduğu bilinen sitokin genler IL-2 ve IL-4 dür [170, 171]. Park ve arkadaşlarının burkit lenfoma hücrelerinden elde edilen cDNA klonlarında yaptığı çalışmada NFATC-beta geçici olarak eksprese olduğunda IL-2 NFAT ilişkili bildirici gen (reporter gene) aktive olur, fakat TNF – alpha promotör proteininin kappa-3 elementine (NFAT-bağlanma bölgesi) bağlanmaz ve TNF-alpha promotörünü aktive etmediği gösterilmiştir. Bundan yola çıkarak NFACT' ın diğer sitokin genlerini aktive eden birçok isoformunun olduğunu tahmin etmişlerdir [172]. NFAT proteinlerinin aktivasyonu kalmodulin bağımlı fosfatlar ve kalsinörin kontrolünde olur. Aramburu ve arkadaşları NFACT1 de kalsinörin hedef aldığı kısa bir sekans ortaya çıkarmayı başarmışlardır [173]. Bu dizide meydana gelebilecek en ufak bir mutasyonda kalsinörin bağımlı defosforilasyon ve NFACT2' nin nükleer

translokasyonu bozulur. Açıklıktaki proteinler kalsinörinin bağlanma ve NFAT'ı defosforile etme özelliğini, diğer substratlara karşı fosfataz aktivitesinin etkilemeden inhibe eder. Hücre içinde eksprese olduğunda ilişkili peptid NFAT defosforilasyonunu, nuklear translokasyonunu ve sitümilasyona cevap olarak oluşan NFAT-ilişkili ekspresyonu inhibe eder. Böylelikle kalsinörin NFAT ilişkisini hedef alan enzim substrat bağlantısının kesilmesi NFAT bağlantılı fonksiyonları efektif olarak inhibe eder. H. Piloni VacA salgılayarak epitel hücrelerinde vakoulizasyona neden olurlar. Gebert ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada VacA' nın etkin bir şekilde G1/S hücre siklusunu etkileyerek T hücre hücre proliferasyonunu engellediği gösterilmiş [174]. Bu etkisini T hücre reseptör/IL-2 sinyal yolunun kalsiyum-kalmodulin bağımlı fosfotaz noktasında yapar. NFAT' ın nukleer translokasyonu iptal edilir ve IL-2' nin transkripsiyonu downregüle olur. H. Piloninin kronikleşmesini açıklamada VacA' nın FK506' nın lokal immunsuoresyon etkisini taklit etmesi gösterilmektedir. Winslow ve arkadaşlarının fareler üzerinde yaptığı bir çalışmada konstitütif şekilde nukleer NFATC1 varyantı (NFATC1-nük) eksprese edenlerde anormal derecede yüksek kemik kütlesi geliştiği gösterilmiştir. NFATC1-nük farelerde osteoblastların aşırı büyümesi, geliştirilmiş osteoblast proliferasyonu ve WNT sinyal bileşenleri ifadesinde koordineli değişiklikler saptanmıştır. Buna karşın kalıcı NFATC1 eksikliği gösteren farelerde kafatası kemik oluşumunda kusurlar ve bozulmuş osteoklast gelişimi gösterilmiştir. NFATC1-nük farelerde RANKL ve OPG normal seviyelerine rağmen osteoklastojenezin artması nedeniyle bu mekanizmayı etkileyen ek bulguların olduğu düşünülmektedir [175].

Çalışmamızda NFACT1 geninde Mide Kanseri hastalarda ve IM Hasta gruplarında kontrol grubuna oranla anlamlı bir overekspresyon saptanmamıştır. Literatürde daha ağırlıklı olarak osteositler üzerinde çalışmalar mevcuttur ve adenokarsinom üzerine çalışmalar bulunmamaktadır. Her ne kadar literatürde ilgili çalışmalar bulunmamakla birlikte elde ettiğimiz veriler desteklemese de literatürde HP' nin NFACT inhibisyonuna yol açarak kronikleştigiğine dair verilerin olması bu genin adenokarsinom ile ilişkisinin olabileceği konusunda düşündürmektedir. Mide

adenokarsinom patogenezindeki rolünü aydınlatmak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

CXADR (Coxsackie virüs ve Adeno virüs reseptörü) geni tarafından adeno virüsü C subgrubu ve coksaki B virüs için tip 1 membran reseptör proteinini kodlanır. Bergelson ve arkadaşları 1997 yılında immunoaffinitite kromatografisi kullanarak coksakivirüs ve adenovirüs reseptör görevi gören bu proteini arındırmışlar ve CAR (Coxsaki ve Adenovirüs reseptörü) olarak adlandırmışlar. CAR cDNA tek bir transmembran bölgesi içeren ve immunglobulin süperaillesine ait olan tahmini 365 aminoasitli bir polipeptit kodlamaktadır. Bergelson ve arkadaşlarının bu çalışmasında farelere CAR cDNA' sı enjekte edildiğinde farelerin coksaki virüse B3 ve B4 enfeksiyonuna duyarlı hale geldiklerini saptamışlar [176]. Tomko ve arkadaşları aynı yıl bu çalışmadan bağımsız olarak yaptıkları çalışmada fareleri kullanarak HeLa hücrelerinden CXADR klonlamayı başarmışlar. Northern blot analizi ile CXADR' nin yüksek oranda ekspre olduğu yerler pankreas, beyin, kalp, ince barsak, testis ve prostat olarak saptanmış. Daha düşük ekspresyonu karaciğer ve akciğer saptanırken; böbrek, plasenta, periferik kanda lökositlerde, timusta ve dalakta ekspresyonu saptanmamıştır [177]. PCR amplifikasyonu ile monokromozomal hibrid paneli ile, Bowles ve arkadaşları (1999) fonksiyonel CXADR genini 21. kromozom ve pseudo CXADR genini 15, 18 ve 21. Kromozomda haritalandırmışlardır. FISH analizi ile 21q11 bölgesinde bulunmuştur [178]. Epitelyal dokudaki gama-delta T hücreleri enfeksiyon, travma ve malignite gibi çevresel faktörlere karşı savunmada kritik bir rol alırlar. Witherden ve arkadaşlarının 2010 yılında yaptığı bir çalışmada epitelyal gama-delta T hücre spesifik costimulatör molekül, junctional adhesyon molekülü benzeri protein tanımlamışlardır (JAML). JAML' ın ligandı CAR a bağlanımı hücre proliferasyonu; sitokin ve büyüme faktörü üretimine neden olan kostitümilasyonu sağlar. JAML kostimulasyonun inhibisyonu azalmış gama-delta T hücre aktivasyonu ve gama-delta T hücrenin yokluğundakine benzeyen gecikmiş yara kapanmasına neden olur. Witherden ve arkadaşlarının yaptığı çalışmanın sonucunda JAML gama-delta

T hücre biyolojisinde, CAR ve JAML ın doku hemostazı ve tamirinde hayati bir önemi olduğunu göstermiştir [179].

Çalışmamızda bulunan CXADR geninin daha önce pankreas ve ince barsak dokusunda izole edilmesi ve hücre proliferasyonunda sitokinler aracılığı ile etkin olduğunun gösterilmesi bu genin GIS adenokarsinomlarında etkin olabileceğini düşündürmektedir. Ancak elde ettiğimiz verilerde CXADR geni Mide Kanseri hastalarda ve IM Hasta gruplarında kontrol grubuna oranla anlamlı bir overekspresyon saptanmamıştır. Mide adenokarsinom patogenezindeki rolünü aydınlatmak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

VI. SONUÇ

Çalışmamızda mide kanseri hastalarında, hücre siklusunda önemi bilinen WNT sinyal yoluna ait RHOA, CXADR, CSNK1A1, CCND2, DVL2, FZD8, NFACT1 genlerinin ekspresyonu araştırılmıştır. Ekspresyon oranları IM hastaları ve kontrol grubuyla karşılaştırılmıştır. Ayrıca HP' nin IM hastalarında bu genlerin ekspresyonlarına etkisi değerlendirilmiştir.

Mide kanserli hastalarda RHOA, CSNK1A1, DVL2, FZD8 ve LRP5 genlerinin kontrol grubuna oranla anlamlı derecede overeksprese olduğu saptanmıştır. Diffüz tip mide kanseri hastalarında diffüz tip olmayan mide kanseri hastalarına oranla RHOA, CSNK1A1, DVL2, FZD8 ve LRP5 genlerinde overekspresyon görülmüştür. Metastatik mide kanseri hastalarında ise hem kontrol grubuna oranla hem de metastaz göstermeyen mide kanseri hasta grubuna oranla RHOA, CSNK1A1, DVL2, FZD8 ve LRP5 genlerinde overekspresyon izlenmiştir. Exitus olan hastalarda yaşayan hastalara oranla gen ekspresyonunda anlamlı bir fark bulunmamıştır. Diffüz tip ve metastatik mide kanseri hastalarında RHOA, CSNK1A1, DVL2, FZD8 ve LRP5 genlerinin ekspresyonlarının yüksek bulunması bu genlerin tümör yükü ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. Exitus olanlar ile sağ kalanlar arasında anlamlı olarak fark görülmemesi bu genlerin prognozla ilişkisinin olmayacağını düşündürmektedir. Daha çok hasta ile diğer faktörlerinde göz önünde bulundurularak analiz edilmesi sağ kalıma etkisi açısından bize daha çok bilgi verebilir.

IM hastalarında kontrol grubuna oranla RHOA, CSNK1A1, DVL2, FZD8 ve LRP5 genlerinin overeksprese olduğu görülmüştür. Mide kanseri hastaları ile karşılaştırıldıklarında anlamlı bir fark saptanmamıştır. HP pozitif IM hastalarında HP negatif IM hastalarına oranla RHOA, CSNK1A1, DVL2, FZD8 ve LRP5 genlerinde anlamlı olarak overekspresyon saptanmaktadır. Bu bulgular eşliğinde RHOA, CSNK1A1, DVL2, FZD8 ve LRP5 genlerinin ekspresyonlarının IM zamanında başladığı düşünülebilir. HP pozitif hastalarda negatif hastalara göre anlamlı olarak ekspresyonun yüksek bulunmuş olması HP' nin inflamasyonu artırarak gen ekspresyonunu etkilediğini düşündürmektedir.

VII-ÖZET

MİDE ADENOKANSERİ İLE HP (+), HP (-) İNTESTİNAL METAPLAZİ ARASINDAKİ MOLEKÜLER PATOLOJİ

Giriş ve Amaç: İntestinal metaplazi (IM), mide kanseri gelişmesi için önemli bir risk faktörüdür. WNT sinyal yolağı karsinogenezisde önemli görevler üstlenmektedir. Çalışmamızda IM ve mide kanseri hastalarında WNT sinyal yoluna ait genlerin tanısal ve prognostik marker olarak değerini araştırmayı amaçladık.

Gereç ve Yöntem: 34 mide kanserli, 45 intestinal metaplazili ve 25 kontrol olgu olmak üzere toplam 104 kişi çalışmaya dahil edildi. Mide kanseri, IM ve kontrol gruplarının RT-PCR array yöntemi ile WNT sinyal yolu anahtar gen ekspresyonları değerlendirildi ve karşılaştırıldı. Tümör yükünü yansıtan , prognostik önemi olan metastaz varlığı ve mide de lokalizasyonuna göre mide kanseri hastaları alt gruplara ayrılarak gen ekspresyonu yapıldı. IM hastaları mide kanseri için risk faktörü olarak Kabul edilen Helikobakter Piloni (HP) varlığına göre alt gruplara ayrılarak gen ekspresyonu yapıldı.

Bulgular: Mide kanserli ve IM'li hastalarda RHOA, CSNK1A1, DVL2, FZD8 ve LRP5 genlerinin kontrol grubuna göre anlamlı şekilde overeksprese olduğu saptandı. Metastatik mide kanseri hastalarında metastaz göstermeyen hastalara oranla RHOA, CSNK1A1, DVL2, FZD8 ve LRP5 genlerinin anlamlı olarak overeksprese olduğu görüldü. Diffüz tip mide kanseri hastalarında diffüz olmayan mide kanseri hastalarına göre RHOA, CSNK1A1, DVL2, FZD8 ve LRP5 genlerinin anlamlı olarak overeksprese olduğu görüldü. Mide kanseri hastaları ile IM hastaları karşılaştırıldığında gen ekspresyonlarında anlamlı bir fark bulunmadı. HP pozitif IM hastalarında HP negatif IM hastalarına oranla RHOA, CSNK1A1, DVL2, FZD8 ve LRP5 genlerinin anlamlı olarak overeksprese olduğu saptandı.

Sonuç: RHOA, CSNK1A1, DVL2, FZD8 ve LRP5 genlerinin mide kanseri hastalarında tümör yükünü yansıtabileceğini düşünmekteyiz. Mide kanserinden önce RHOA, CSNK1A1, DVL2, FZD8 ve LRP5 genlerinin IM hastalarında ekspresyon oranının artmaya başladığını ve bu ekspresyonu HP varlığının artırdığını düşünmekteyiz. Bu konularda daha ileri çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Mide kanseri, İntestinal metaplazi, RHOA, CXADR, CSNK1A1, CCND2, DVL2, FZD8, NFACT1

III- SUMMARY

Molecular Pathology Between Hp(+), Hp (-) Intestinal Metaplasia And Gastric Adenocarcinoma

Introduction and Aim: Intestinal metaplasia (IM), is an important risk factor for development of gastric cancer. WNT signalling pathway plays an important role in carcinogenesis. In our study, we aimed to evaluate the diagnostic and prognostic value of the genes in WNT signalling pathway in gastric cancer patients.

Method: A total of 104 patients, 34 patients with gastric cancer, 45 patients with intestinal metaplasia and 25 healthy controls, were included in this study. expression of genes in WNT signalling pathway were evaluated and compared in Gastric cancer, IM and control groups by RT-PCR array method. gastric cancer patients were divided into groups according to presence of metastasis and localization of the cancer in stomach. Intestinal metaplasia patients were divided into groups according to presence of Helicobacter, which is accepted as a risk factor for gastric cancer.

Result: RHOA, CSNK1A1, DVL2, FZD8 and LRP5 were overexpressed in gastric cancer and IM groups, compared to control group. RHOA, CSNK1A1, DVL2, FZD8 and LRP5 were significantly overexpressed in patients with metastasis compared to patients without metastasis. RHOA, CSNK1A1, DVL2, FZD8 and LRP5 were significantly overexpressed in patients with diffuse gastric cancer compared to patients with non-diffuse gastric cancer. there was no significant difference in gene expression between gastric cancer group and IM group. RHOA, CSNK1A1, DVL2, FZD8 and LRP5 were significantly overexpressed in Hp + patients compared to Hp- patients.

Conclusion: We think that RHOA, CSNK1A1, DVL2, FZD8 and LRP5 reflect tumour burden in patients with gastric cancer. Thus they can be used as biomarkers in the future while monitoring treatment. We think that ratio of RHOA, CSNK1A1, DVL2, FZD8 and LRP5 expressions begin to increase before gastric cancer, and presence of Hp increases the expression. Further studies are needed.

Key Words: Gastric Cancer, Intestinal metaplasia, RHOA, CXADR, CSNK1A1, CCND2, DVL2, FZD8, NFACT1

IX. KAYNAKLAR

1. Global Burden of Disease (GBD), 2002 Estimates. World Health Organization. 2008; At www.who.int/healthinfo/bodgbd2002/en/index.html
2. Aldemir M. C, Turkeli M, Simsek M, et al: Prognostic Value of Baseline Neutrophil-Lymphocyte and Platelet-Lymphocyte Ratios in Local and Advanced Gastric Cancer Patients. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention. 2015; 5933-5937
3. Quéro L, Guillermin S and Hennequin C: Neoadjuvant or adjuvant therapy for gastric cancer. World J Gastrointest Oncol. 2015 Aug 15; 7(8): 102–110.
4. İlicin G, Biberoglu K, Suleymanlar G, Unal S, İc hastalıkları. In Demir A. and Ataseven H: Mide Tümörleri. 3 nd edition Ankara: Güven Kitapevi 2012;1339-43
5. Parkin DM: International variation. Oncogene 2004; 23:6329-40.
6. Gokmen FG: Sistemik Anatomi. Systema Digestorium. In Cigali BS. İzmir: Güven Kitapevi Mide. 2003; 482-487
7. Ernst LM: Color Atlas of Fetal and Neonatal Histology. In Huff DS. Gastrointestinal Tract. 2011; 39-67
8. Singh V: Clinical Embryology. Digestive Tract. 2012; 140-158
9. Fock KM, Graham DY and Malfertheiner P: Helicobacter pylori research: historical insights and future directions. 2013; 10(8): 495–500
10. Chmiela M, Gajewski A and Rudnicka K: Helicobacter pylori vs coronary heart disease - searching for connections. World J Cardiol 2015; 7(4): 187-203
11. Linz B. et al: An African origin for the intimate association between humans and Helicobacter pylori. Nature. 2007 February 22; 445(7130): 915–918
12. Malaty HM: Epidemiology of Helicobacter pylori infection. 2007; 205-214
13. Epidemiology of, and risk factors for, Helicobacter pylori infection among 3194 asymptomatic subjects in 17 populations. Gut 1993; 34:1672-1676
14. Salih BA: Helicobacter pylori Infection in Developing Countries: The Burden for How Long? Saudi J Gastroenterol 2009; v.15(3)
15. Yılmaz E, Doğan Y, Gurgoze MK and Unal S: Seroprevalence of Helicobacter pylori infection among children and their parents in eastern Turkey. Journal of Paediatrics and Child Health. 2002; 38, 183–186
16. Ozaydin N, Turkyilmaz SA and Cali S: Prevalence and risk factors of helicobacter pylori in Turkey: a nationally-representative, cross-sectional, screening with the 13C-Urea breath test. BMC Public Health. 2013; 13: 1215
17. Osawa H, Inoue F and Yoshida Y: Inverse relation of serum Helicobacter pylori antibody titres and extent of intestinal metaplasia. Clin Pathol 1996;49:112-115
18. Noriega JR, Noriega FJ, Pe´rez GI, et al: Diagnostic Utility of Invasive Tests and Serology for the Diagnosis of Helicobacter pylori Infection in Different Clinical Presentations. Archives of Medical Research. 2006; (37) 123–128

19. Vaira D, Gatta L, Ricci C and Miglioli M: Review article: diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. 2002; 16 (Suppl. 1): 16–23
20. Lee JY and Kim N : Diagnosis of *Helicobacter pylori* by invasive test: histology. *Ann Transl Med* 2015;3(1):10
21. Patel SK, Pratap CB, Jain AK, et al: Diagnosis of *Helicobacter pylori*: What should be the gold standard? *World J Gastroenterol*. 2014; 20(36): 12847–12859.
22. Kim A, Servetas S: *Helicobacter pylori* bab Paralog Distribution and Association with *cagA*, *vacA*, and *hpaA/B* Genotypes in American and South Korean Clinical Isolates. *PLoS ONE*. 2015 : 10(8): e0137078.doi:10.1371/journal.pone.0137078
23. White J, Winter J. and Robinson K: Differential inflammatory response to *Helicobacter pylori* infection: etiology and clinical outcomes. *Journal of Inflammation Research*. 2015 : 8
24. Ishaq S. and Nunn L: *Helicobacter pylori* and gastric cancer: a state of the art review. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench* 2015;8(Suppl.1):S6-S14
25. Whalen M. and Massidda O: *Helicobacter pylori*: enemy, commensal or, sometimes, friend? *J Infect Dev Ctries* 2015; 9(6):674-678.
26. Crew K and Neugut A: Epidemiology of gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2006 January 21; 12(3): 354-362
27. Maeda S, Ogura K, Yoshida H, et al: Major virulence factors, *VacA* and *CagA*, are commonly positive in *Helicobacter pylori* isolates in Japan. *Gut* 1998;42:338–343
28. Hasni S : Role of *helicobakter pylori* infection in autoimmune diseases. *Curr Opin Rheumatol*. 2012; 429 – 434
29. Bassi V, Marino G, Iengo A, et al: Autoimmune thyroid diseases and *Helicobacter pylori*: The correlation is present only in Graves's disease. *World J Gastroenterol* 2012; 18(10): 1093-1097
30. You WC, Blot WJ, Li JY, et al : Precancerous gastric lesion in a population at high risk of stomach cancer. *Cancer Res* 1993; 53(6): 1317-21.
31. Kullpers EC and Apelmelk BJ : *H.pylori* and atrophic gastritis. *Biomed and Pharmacother*. 1996; 51: 150-155
32. Genta RM, Rugge M: Review article: pre-neoplastic states of gastric mucosa-a practical approach for the perplexed clinician. *Aliment Pharmacol Ther* 2001; 15: 43-50
33. Choi CE and Sonnenberg A : High Prevalence of Gastric Preneoplastic Lesions in East Asians and Hispanics in the USA. 2014
34. Manuel D, Cutler A, Goldstein J, et al: Decreasing prevalence combined with increasing eradication of *Helicobacter pylori* infection in the United States has not resulted in fewer hospital admissions for peptic ulcer disease-related complications. *Aliment Pharmacol Ther*. 2007; 25(12): 1423-7
35. Yoon SS, Coit, DG, Portlock CS, et al: The Diminishing Role of Surgery in the Treatment of Gastric Lymphoma. *Annals of Surgery*. 2004

36. Ohno Y, Kosaka T, Muraoka I, et al: Remission of primary low-grade gastric lymphomas of the mucosa-associated lymphoid tissue type in immunocompromised pediatric patients. *World J Gastroenterol* 2006; 12(16):2625-2628
37. Hasni S, Ippolito A. *Helicobakter pylori* and autoimmun diseases. *Oral Dis.* 2011; 621 – 627
38. Radic M. Role of *helicobakter pylori* infection in autoimmune systemic rheumatic disease. *World J Gastroenterol* 2014; 20(36): 12.839-12846
39. Stemmermann GN: Intestinal metaplasia of the stomach. *Cancer* 1994; 74: 556-64
40. Simko V, Anand N and Ginter E: Gastric intestinal metaplasia – age, ethnicity and surveillance for gastric cancer. *Bratisl Lek Listy* 2015; 116 (1)
41. Jang B, Lee B and Kim W : Intestinal Stem Cell Markers in the Intestinal Metaplasia of Stomach and Barrett's Esophagus. *PLOS ONE.* May 21, 2015
42. Park Y and Kim Y: Review of Atrophic Gastritis and Intestinal Metaplasia as a Premalignant Lesion of Gastric Cancer. *Journal of Cancer Prevention* Vol. 20, No. 1, 2015
43. Yoon H and Kim N: Diagnosis and Management of High Risk Group for Gastric Cancer. *Gut and Liver*, Vol. 9, No. 1, January 2015, pp. 5-17
44. Correa P, Piazuelo MB and Wilson KT : Pathology of Gastric Intestinal Metaplasia: Clinical Implications. *Am J Gastroenterol.* 2010; 105(3): 493–498
45. Woo H. D, Lee J, et al: Dietary Flavonoids and Gastric Cancer Risk in a Korean Population. *Nutrients* 2014, 6, 4961-4973
46. Piazuelo M. B, Correa P: Gastric cancer: Overview. Piazuelo MB et al / *Colombia Médica - Vol. 44 N° 3* 2013 (Jul-Sep)
47. Bonequi P, Meneses-González F, Correa P, et al : Risk factors for gastric cancer in Latin America: a meta-analysis. *Cancer Causes Control.* 2013; 24: 217 – 231.
48. Lee Y. Y, Derakhshan M. H : Environmental and Lifestyle Risk Factors of Gastric Cancer. *Archives of Iranian Medicine*, Volume 16, Number 6, June 2013
49. Keszei A, Goldbohm R. A, Schouten L. J, et al: Dietary N-nitroso compounds, endogenous nitrosation, and the risk of esophageal and gastric cancer subtypes in the Netherlands Cohort Study. *Am J Clin Nutr* 2013;97:135–46
50. Nagini S. Carcinoma of the stomach: A review of epidemiology, pathogenesis, molecular genetics and chemoprevention. *World J Gastrointest Oncol* 2012 July 15; 4(7): 156-169
51. Massarrat S and Stolte M: Development of Gastric Cancer and its Prevention. *Arch Iran Med.* 2014; 17(7): 514 – 520.

52. Kulmambetova G. N, Imanbekova M. K, Logvinenko A. A, et al: Association of Cytokine Gene Polymorphisms with Gastritis in a Kazakh Population. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, Vol 15, 2014
53. De D. D, Roychoudhury S: To be or not to be: The host genetic factor and beyond in *Helicobacter pylori* mediated gastro-duodenal diseases. *World J Gastroenterol* 2015 March 14; 21(10): 2883-2895
54. Gonzalez C. A and Agudo A: Carcinogenesis, prevention and early detection of gastric cancer: where we are and where we should go. *Int. J. Cancer*: 130, 745–753 (2012)
55. Guilford P, Blair V, More H and Humar B: A short guide to hereditary diffuse gastric cancer. *Hereditary Cancer in Clinical Practice* 2007; 5(4)
56. Moat M, O'Donnell R. L, McCluggage W. G: Gastric-type adenocarcinoma of the cervix in a patient with Lynch syndrome: A case report. M. Moat et al. / *Gynecologic Oncology Reports* 10 (2014) 41–43
57. Fan R and Sheng J : A case of Peutz-Jeghers syndrome associated with high-grade intramucosal neoplasia. *Int J Clin Exp Pathol* 2015;8(6):7503-7505
58. Pan M, Huang P, Li S, et al : Double contrast-enhanced ultrasonography in preoperative Borrmann classification of advanced gastric carcinoma: comparison with histopathology. *Scientific Reports*. 2013 : 3 : 3338
59. Ilter T : Klinik Gastroenteroloji ve Atlas. In Simsek I and Meral M : *Mide Kanserleri*. Izmir: Guven Kitapevi 2011;416-424
60. Kantarjian H. P, Wolff R. A, and Koller C. A : MD Anderson. 2 nd edition . *Mid eve Özefagus Kanserleri*. In Phan A. T :2014 : 409-413
61. Qiu M, Zhou Y, Zhang X, et al: Lauren classification combined with HER2 status is a better prognostic factor in Chinese gastric cancer patients. Qiu et al. *BMC Cancer* 2014, 14:823
62. Senates E, and Ince A. T : *Erken Mide Kanseri*. *Güncel Gastroenteroloji*. 2011 : 15/3
63. Ono H, Kondo H, Shirao K, et al: Endoscopic mucosal resection for treatment of early gastric cancer. *Gut* 2001;48:225–229
64. Kim S. T, Jang H, Lee J, et al: Clinical Significance of IGFBP-3 Methylation in Patients with Early Stage Gastric Cancer. *Translational Oncology* (2015) 8, 288–294
65. Kim J, Jang J, Chang Y. W, and Kim Y. H: Clinical features of second primary cancers arising in early gastric cancer patients after endoscopic resection. *World J Gastroenterol* 2015 July 21; 21(27): 8358-8365
66. Lazar D : Gastric Carcinoma- New Insights into Current Management. *Gastric Carcinoma: Morphologic Classifications and Molecular Changes*. In Lee S, Kim K, and Ro J. Y. 2013: Chapter 7. 130-176
67. Wanebo HJ, Kennedy BJ, Chmiel J, et al: Cancer of the stomach. A patient care study by the American College of Surgeons. 1993; 218(5): 583–592.

68. Roushan N, Zolfakhari A, Asadi M and Taslimi R: Pseudoachalasia : a diagnostic challenge. *Medical Journal of the Islamic Republic of Iran*. 2014; 28:54
69. Yan Y, Wang L, and Wang R: Role of cancer-associated fibroblasts in invasion and metastasis of gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2015 September 7; 21(33): 9717-9726
70. Mangi MH, Newland AC: Angiogenesis and angiogenic mediators in haematological malignancies. *Br J Haematol* 2000; 111: 43-51
71. Wyllie AH: Apoptosis: an overview. *British Medical Bull* 1997; 53 (No 3) 451-465
72. Angel Ferrández A, Mostacero S, and Lanás A: Endoscopic Staging and Treatment of Early Gastric Cancer. *Journal of Cancer Therapy*, 2013, 4, 92-98
73. Compton C: A Companion to the Seventh Editions of the AJCC Cancer Staging Manual and Handbook Second Edition. 2013
74. Sah JK, Singh YP and Ghimire B: Presentation and Outcomes of Gastric Cancer at a University Teaching Hospital in Nepal. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 2015; Vol 16
75. Sun Z and Zhang N: Clinical evaluation of CEA, CA19-9, CA72-4 and CA125 in gastric cancer patients with neoadjuvant chemotherapy. *World Journal of Surgical Oncology* 2015, 12:397
76. Ychou M, Duffour J, Kramar, et al: Clinical significance and prognostic value of CA72-4 compared with CEA and CA19-9 in patients with gastric cancer. *Dis Markers*. 2000; 16(3-4):105-10.
77. Song Z, Liu W, Xiao Y, et al: PRR11 Is a Prognostic Marker and Potential Oncogene in Patients with Gastric Cancer. *PLoS One*. 2015; 10(8)
78. Gulley M: Genomic assays for Epstein–Barr virus-positive gastric adenocarcinoma. *Experimental & Molecular Medicine*. 2015; 47, e134
79. Lu B and Li M: Helicobacter pylori eradication for preventing gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2014; 20(19): 5660-5665
80. Wroblewski LE and Peek RM: H. pylori in gastric carcinogenesis-mechanisms. *Gastroenterol Clin North Am*. 2013 June ; 42(2): 285–298
81. Iizasa H, Nanbo A, Nishikawa J, et al: Epstein-Barr Virus (EBV)-associated Gastric Carcinoma. *Viruses* 2012, 4, 3420-3439
82. Bass AJ, Thorsson V, Shmulevich I, et al: Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *Nature*. 2014 September 11; 513(7517): 202–209
83. Akiba S, Koriyama C, Herrera-Goepfert R and Eizuru Y: Epstein-Barr virus associated gastric carcinoma: Epidemiological and clinicopathological features. *Cancer Science*. 2008 : 195-201
84. Camargo MC, Murphy G, Koriyama C. et al: Determinants of Epstein-Barr virus-positive gastric cancer: an international pooled analysis. *British Journal of Cancer* (2011) 105, 38 – 43

85. Camargo MC, Kim W, Chiaravalli AM, et al: Improved survival of gastric cancer with tumour Epstein–Barr virus positivity: an international pooled analysis. *Gut*. 2014 February ; 63(2): 236–243
86. Sandoval-Bórquez A, Saavedra K, Carrasco-Avino G, et al : Noncoding Genomics in Gastric Cancer and the Gastric Precancerous Cascade: Pathogenesis and Biomarkers. Hindawi Publishing Corporation Disease Markers. 2015; 14
87. Kang C, Song J, Lee J and Kim MY: Epigenetics: An emerging player in gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2014; 20(21): 6433-6447
88. Dinis-Ribeiro M, Areia M, de Vries AC : Management of precancerous conditions and lesions in the stomach (MAPS): guideline from the European Society of Gastrointestinal Endoscopy (ESGE), European Helicobacter Study Group (EHSg), European Society of Pathology (ESP), and the Sociedade Portuguesa de Endoscopia Digestiva (SPED). *Endoscopy*. 2012 January ; 44(1): 74–94
89. Ballester V and Cruz-Correa M: Endoscopic Surveillance of Gastrointestinal Premalignant Lesions: Current Knowledge and Future Directions. *Curr Opin Gastroenterol*. 2014 September ; 30(5): 477–483
90. Zullo A, Hassan C, Repici A and Annibale B: Intestinal metaplasia surveillance: Searching for the road-map. *World J Gastroenterol* 2013; 19(10): 1523-1526
91. Gomez JM and Wang AY: Gastric Intestinal Metaplasia and Early Gastric Cancer in the West: A Changing Paradigm. *Gastroenterology & Hepatology*. 2014; Volume 10, Issue 6
92. Meyer H and Wilke H: Treatment strategies in gastric cancer. *Dtsch Arztebl Int*. 2011 Oct; 108(41): 698–706.
93. Ilter T: Klinik Gastroenteroloji ve Atlas. In Guler A: Mide Tümörlerinin Cerrahi Tedavisi. Izmir: Guven Kitapevi 2011; 434-446
94. El-Omar EM, Carrington M, Chow WH, et al. Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer. *Nature* 2000; 404:398–402.
95. El-Omar EM, Rabkin CS, Gammon MD, et al. Increased risk of noncardia gastric cancer associated with proinflammatory cytokine gene polymorphisms. *Gastroenterology* 2003;124: 1193–1201.
96. Study Group of Millennium Genome Project for C, Sakamoto H, Yoshimura K, et al. Genetic variation in PSCA is associated with susceptibility to diffuse-type gastric cancer. *Nat Genet* 2008; 40:730–740.
97. Peiliang Geng P, Li J, Wang N, et al: PSCA rs2294008 Polymorphism with Increased Risk of Cancer. *Plos One*. 2015
98. Zhang W, Liang P, Wang W, et al : The Influence of PSCA Gene Variation on Its Expression and Gastric Adenocarcinoma Susceptibility in the Northwest Chinese Population. *Int. J. Mol. Sci*. 2015, 16, 11648-11658
99. Tan P and Yeoh K: Genetics and Molecular Pathogenesis of Gastric Adenocarcinoma. *j.gastro*.2015.05.059

100. Bang YJ, Van Cutsem E, Feyereislova A, et al. Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label
101. Xun Yuan X, Wu H, Xu H, et al: Notch signaling: An emerging therapeutic target for cancer treatment. *Cancer Letters*. 2015
102. Liu s, Dontu G and Wicha MS: Mammary stem cells, self-renewal pathways, and carcinogenesis. *Breast Cancer Res*. 2005; 7(3): 86–95.
103. Thomas SJ, Snowden JA, Zeidler MP and Danson SJ: The role of JAK/STAT signalling in the pathogenesis, prognosis and treatment of solid tumours. *British Journal of Cancer* (2015) 113, 365–371
104. Luo G, Zhou Y, Yi W and Yi H: Lactotransferrin expression is downregulated and affects the mitogen-activated protein kinase pathway in gastric cancer. *Oncology Letters*. 2015
105. Park J and Jeong S: Wnt activated β -catenin and YAP proteins enhance the expression of non-coding RNA component of RNase MRP in colon cancer cells. *Oncotarget*. 2015
106. Piersma B, Bank RA and Boersema M: Signaling in Fibrosis: TGF- β , WNT, and YAP/TAZ Converge. *Frontiers in Medicine*. 2015
107. Zeng L1, Fagotto F, Zhang T, et al: The Mouse Fused Locus Encodes Axin, an Inhibitor of the Wnt Signaling Pathway That Regulates Embryonic Axis Formation. *Cell*. 1997 Jul 11; 90(1):181-92.
108. Hart MJ, Santos R, Albert IN, et al: Downregulation of b-catenin by human Axin and its association with the APC tumor suppressor, b-catenin and GSK3b. *Current Biology*. 1998; Vol 8 No 10
109. Liu C, Li Y, Semenov M, et al: Control of b-Catenin Phosphorylation/Degradation by a Dual-Kinase Mechanism. *Cell*. 2002; Vol. 108, 837–847
110. Ikeda S, Kishida S, Yamamoto H, et al : Axin, a negative regulator of the Wnt signaling pathway, forms a complex with GSK-3 β and β -catenin and promotes GSK-3 β -dependent phosphorylation of β -catenin. *The EMBO Journal*. 1998; Vol.17 No.5 pp.1371–1384
111. Nelson WJ and Nusse R: Convergence of Wnt, β -Catenin, and Cadherin Pathways. *Science*. 2004 March 5; 303(5663)
112. Clevers H and Nusse R: Wnt/b-Catenin Signaling and Disease. *Cell* 149, June 8, 2012
113. Polakis P: Wnt signaling and cancer. *Genes Dev* 2000; 14(15):1837-51.
114. Schweizer L and Varmus H: Wnt/Wingless signaling through β -catenin requires the function of both LRP/Arrow and frizzled classes of receptors. *BMC Cell Biology* 2003, 4
115. Kohn D and Moon R: Wnt and calcium signaling: β -Catenin-independent pathways. *Cell Calcium* 38 (2005) 439–446
116. Zhang X and Hao J: Development of anticancer agents targeting the Wnt/ β -catenin signaling. *Am J Cancer Res* 2015;5(8):2344-2360

117. Enzo MT, Rastrelli M, Rossi CR, et al: The Wnt/ β -catenin pathway in human fibrotic-like diseases and its eligibility as a therapeutic target. *Molecular and Cellular Therapies* (2015) 3:1
118. Sadot E, Geiger B, Oren M and Ben-Ze'ev A: Down-Regulation of β -Catenin by Activated p53. *Molecular and Cellular Biology*. 2001; 6768–6781
119. Sundram V, Ganju A, Hughes JE, et al: Protein Kinase D1 attenuates tumorigenesis in colon cancer by modulating β -catenin/T cell factor activity. *Oncotarget*. 2014 Aug; 5(16): 6867–6884.
120. Furlong MT, Hough CD, Sherman-Baust CA, et al: Evidence for the Colonic Origin of Ovarian Cancer Cell Line SW626. *Journal of the National Cancer Institute*. 1999; Vol.91, No.15
121. Binnerts ME, Kim K, Bright JM: R-Spondin1 regulates Wnt signaling by inhibiting internalization of LRP6. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Sep 11; 104(37): 14700–14705.
122. Dihlmann S and Doeberitz MK: Wnt/ β -catenin-pathway as a molecular target for future anti-cancer therapeutics. *Int. J. Cancer*. 2005; 113, 515–524
123. Maeda M and Ushijima T: RHOA mutation may be associated with diffuse-type gastric cancer progression, but is it gain or loss? *Gastric Cancer*. 2015
124. Huang K, Lan Y, Chen M, Chao Y, et al: The Correlation Between RhoA Expression and Clinicopathological Characteristics in Gastric Cancer Patients After Curative Surgery. *World J Surg* (2015) 39: 2289–2299
125. Zhang S, Tang Q, Xu F, Xue Y, et al: RhoA regulates G1-S progression of gastric cancer cells by modulation of multiple INK4 family tumor suppressors. *Mol Cancer Res*. 2009 Apr;7(4): 570-80.
126. Karlsson R, Pedersen E.D, Wang Z, Brakebusch C. Rho GTPase function in tumorigenesis. *Biochimica et Biophysica Acta* 1796 (2009) 91–98
127. Pan Y1, Bi F, Liu N, Xue Y, et al: Expression of seven main Rho family members in gastric carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004 Mar 12;315(3):686-91
128. Ushiku T, Ishikawa S, Kakiuchi M, Tanaka A, et al: RHOA mutation in diffuse-type gastric cancer: a comparative clinicopathology analysis of 87 cases. *Gastric Cancer*. 2015
129. Kakiuchi M, Nishizawa T, Ueda H, Gotoh K, et al: Recurrent gain-of-function mutations of RHOA in diffuse-type gastric carcinoma. *Nat Genet*. 2014 Jun;46(6):583-7.
130. Wang K, Yuen ST, Xu J, Lee SP, et al: Whole-genome sequencing and comprehensive molecular profiling identify new driver mutations in gastric cancer. *Nat Genet*. 2014 Jun;46(6):573-82
131. Röcken C, Behrens HM, Böger C and Krüger S1. Clinicopathological characteristics of RHOA mutations in a Central European gastric cancer cohort. *J Clin Pathol*. 2016 Jan;69(1):70-5

132. Katoh M and Katoh M: Comparative integromics on FZD7 orthologs: conserved binding sites for PU.1, SP1, CCAAT-box and TCF/LEF/SOX transcription factors within 5'-promoter region of mammalian FZD7 orthologs. *Int J Mol Med*. 2007 Mar; 19(3):529-33.
133. Katoh M and Katoh M: Transcriptional regulation of WNT2B based on the balance of Hedgehog, Notch, BMP and WNT signals. *Int J Oncol*. 2009 May; 34(5):1411-5.
134. Joiner DM, Ke J, Zhong Z, Xu HE and Williams BO: Lrp5 and Lrp6 in Development and Disease. *Trends Endocrinol Metab*. 2013 Jan;24(1):31-9.
135. Ettenberg SA, Charlat O, Daley MP, Liu S, et al: Inhibition of tumorigenesis driven by different Wnt proteins requires blockade of distinct ligand-binding regions by LRP6 antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Aug 31; 107(35):15473-8.
136. Björklund P, Svedlund J, Olsson AK, Akerström G and Westin G: The internally truncated LRP5 receptor presents a therapeutic target in breast cancer. *PLoS One*. 2009;4(1):e4243
137. Hoang BH, Kubo T, Healey JH, Sowers R, et al: Expression of LDL receptor-related protein 5 (LRP5) as a novel marker for disease progression in high-grade osteosarcoma. *Int J Cancer*. 2004 Mar; 109(1): 106-11.
138. Liu X, Huang MZ, Chen ZY, Zhao XY, et al: LRP5 polymorphism-A potential predictor of the clinical outcome in advanced gastric cancer patients treated with EOF regimen. *Chin J Cancer Res*. 2014 Aug; 26(4):478-85.
139. Ueno K, Hirata H, Hinoda Y and Dahiya R: Frizzled homolog proteins, microRNAs and Wnt signaling in cancer. *Int J Cancer*. 2013 Apr 15; 132(8):1731-40.
140. Janssens N, Andries L, Janicot M, Perera T and Bakker A: Alteration of frizzled expression in renal cell carcinoma. *Tumour Biol*. 2004 Jul-Aug; 25(4):161-71.
141. Khan NI, Bradstock KF and Bendall LJ: Activation of Wnt/beta-catenin pathway mediates growth and survival in B-cell progenitor acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol*. 2007 Aug; 138(3):338-48.
142. Wang HQ, Xu ML, Ma J, Zhang Y and Xie CH: Frizzled-8 as a putative therapeutic target in human lung cancer. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012 Jan 6; 417(1):62-6.
143. Kirikoshi H, Sekihara H and Katoh M: Expression profiles of 10 members of Frizzled gene family in human gastric cancer. *Int J Oncol*. 2001 Oct; 19(4):767-71.
144. Gnad T, Feoktistova M, Leverkus M, Lendeckel U and Naumann M: *Helicobacter pylori*-induced activation of beta-catenin involves low density lipoprotein receptor-related protein 6 and Dishevelled. *Mol Cancer*. 2010 Feb 5; 9: 31.

145. Katoh M: WNT/PCP signaling pathway and human cancer (review). *Oncol Rep.* 2005 Dec; 14(6): 1583-8.
146. Schwarz-Romond T, Metcalfe C and Bienz M: Dynamic recruitment of axin by Dishevelled protein assemblies. *J Cell Sci.* 2007 Jul 15;120(Pt 14): 2402-12.
147. Schlange T, Matsuda Y, Lienhard S, Huber A and Hynes NE: Autocrine WNT signaling contributes to breast cancer cell proliferation via the canonical WNT pathway and EGFR transactivation. *Breast Cancer Res.* 2007; 9(5): R63.
148. Zhu Y, Tian Y, Du J, Hu Z, et al: Dvl2-dependent activation of Daam1 and RhoA regulates Wnt5a-induced breast cancer cell migration. *PLoS One.* 2012;7(5): e37823.
149. Metcalfe C, Ibrahim AE, Graeb M, de la Roche M, et al: Dvl2 promotes intestinal length and neoplasia in the ApcMin mouse model for colorectal cancer. *Cancer Res.* 2010 Aug 15; 70(16): 6629-38.
150. Chong Y, Mia-Jan K, Ryu H, Abdul-Ghafar J, et al: DNA methylation status of a distinctively different subset of genes is associated with each histologic Lauren classification subtype in early gastric carcinogenesis. *Oncol Rep.* 2014 Jun; 31(6): 2535-44.
151. Truong PK, Lao TD, Doan TP and Le TA: Loss of expression of cyclin d2 by aberrant DNA methylation: a potential biomarker in vietnamese breast cancer patients. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2015; 16(6): 2209-13.
152. Myant K and Sansom O: Efficient Wnt mediated intestinal hyperproliferation requires the cyclin D2-CDK4/6 complex. *Cell Div.* 2011 Feb 2; 6(1): 3.
153. Ortega S, Malumbres M and Barbacid M: Cyclin D-dependent kinases, INK4 inhibitors and cancer. *Biochim Biophys Acta.* 2002 Mar 14; 1602(1): 73-87.
154. Serrano M, Lee H, Chin L, Cordon-Cardo C, Beach D and DePinho RA: Role of the INK4a locus in tumor suppression and cell mortality. *Cell.* 1996 Apr 5; 85(1): 27-37.
155. Sakuma M, Akahira J, Ito K, Niikura H, et al: Promoter methylation status of the Cyclin D2 gene is associated with poor prognosis in human epithelial ovarian cancer. *Cancer Sci.* 2007 Mar; 98(3): 380-6.
156. Cole AM, Myant K, Reed KR, Ridgway RA, et al: Cyclin D2-cyclin-dependent kinase 4/6 is required for efficient proliferation and tumorigenesis following Apc loss. *Cancer Res.* 2010 Oct 15; 70(20): 8149-58.
157. Shi H, Han J, Yue S, Zhang T, et al: Prognostic significance of combined microRNA-206 and CyclinD2 in gastric cancer patients after curative surgery: A retrospective cohort study. *Biomed Pharmacother.* 2015 Apr;71: 210-5.
158. Cheong JK and Virshup DM: Casein kinase 1: Complexity in the family. *Int J Biochem Cell Biol.* 2011 Apr; 43(4): 465-9.

159. Wang Y, van der Zee M, Fodde R and Blok LJ: Wnt/B-catenin and sex hormone signaling in endometrial homeostasis and cancer. *Oncotarget*. 2010 Nov; 1(7): 674-84.
160. Knippschild U, Wolff S, Giamas G, Brockschmidt C: The role of the casein kinase 1 (CK1) family in different signaling pathways linked to cancer development. *Onkologie*. 2005 Oct; 28(10): 508-14. Epub 2005 Sep 19.
161. Huart AS, MacLaine NJ, Meek DW, Hupp TR: CK1alpha plays a central role in mediating MDM2 control of p53 and E2F-1 protein stability. *J Biol Chem*. 2009 Nov 20; 284(47): 32384-94.
162. Zhan F, Barlogie B, Arzoumanian V, Huang Y, et al: Gene-expression signature of benign monoclonal gammopathy evident in multiple myeloma is linked to good prognosis. *Blood*. 2007 Feb 15; 109(4): 1692-700. Epub 2006 Oct 5.
163. Dickens NJ, Walker BA, Leone PE, Johnson DC, et al: Homozygous deletion mapping in myeloma samples identifies genes and an expression signature relevant to pathogenesis and outcome. *Clin Cancer Res*. 2010 Mar 15; 16(6): 1856-64.
164. Hu Y, Song W, Cirstea D, Lu D, et al: CSNK1 α 1 mediates malignant plasma cell survival. *Leukemia*. 2015 Feb; 29(2): 474-82
165. Sun D, Zhou M, Kowolik CM, Trisal V, et al: Differential expression patterns of capping protein, protein phosphatase 1, and casein kinase 1 may serve as diagnostic markers for malignant melanoma. *Melanoma Res*. 2011 Aug; 21(4): 335-43
166. Järås M, Miller PG, Chu LP, Puram RV, et al: Csnk1a1 inhibition has p53-dependent therapeutic efficacy in acute myeloid leukemia. *J Exp Med*. 2014 Apr 7; 211(4): 605-12.
167. Northrop J, Ho SN, Chen L, Thomas DJ, et al. NF-AT components define a family of transcription factors targeted in T-cell activation. *Nature* 369, 497 - 502 (09 June 1994)
168. Serfing E, Berberich-Siebelt F, Chuvpilo S, Jankevics E, et al. The role of NF-AT transcription factors in T cell activation and differentiation. *Biochimica et Biophysica Acta* 1498 (2000) 1-18
169. Li X, Ho SN, Luna J, et al. Cloning and chromosomal localization of the human and murine genes for the T-cell transcription factors NFATc and NFATp. *Cytogenet Cell Genet*. 1995;68(3-4):185-91.
170. Jan T, Rao GK, and Kaminski NE. Cannabinol Enhancement of Interleukin-2 (IL-2) Expression by T Cells Is Associated with an Increase in IL-2 Distal Nuclear Factor of Activated T Cell Activity. *Mol Pharmacol* 61:446–454, 2002
171. Sherman MA, Powell DR, Weiss DL, and Brown MA. NF-ATc Isoforms Are Differentially Expressed and Regulated in Murine T and Mast Cells. *The Journal of Immunology*. 1999; 162:2820-2828

- 172.** Park J, Takeuchi A, and Sharma S. Characterization of a New Isoform of the NFAT (Nuclear Factor of Activated T Cells) Gene Family Member NFATc. *The Journal of Biological Chemistry*. 1996. 20914 –20921
- 173.** Aramburu J, García-Cózar F, Raghavan A, Okamura H, et al. Selective Inhibition of NFAT Activation by a Peptide Spanning the Calcineurin Targeting Site of NFAT. *Molecular Cell*. 1998, 627–637
- 174.** Gebert B, Fischer W, Weiss E, Hoffmann R, and Haas R. *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin inhibits T lymphocyte activation. *Science*. 2003 Aug 22;301(5636):1099-102.
- 175.** Winslow MM, Pan M, Starbuck M, Gallo EM, et al. Calcineurin/NFAT Signaling in Osteoblasts Regulates Bone Mass. *Developmental Cell* 10, 771–782, June, 2006
- 176.** Bergelson JM, Cunningham JA, Droguett G, Kurt-Jones EA, et al. Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science*. 1997; 275(5304):1320-3
- 177.** Tomko RP, Xu R, and Philipson L. HCAR and MCAR: the human and mouse cellular receptors for subgroup C adenoviruses and group B coxsackieviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997; 94(7):3352-6
- 178.** Bowles KR, Gibson J, Wu J, Shaffer LG, et al. Genomic organization and chromosomal localization of the human Coxsackievirus B-adenovirus receptor gene. *Hum Genet*. 1999 Oct;105(4):354-9.
- 179.** Witherden DA, Verdino P, Rieder SE, Garijo O, et al. The junctional adhesion molecule JAML is a costimulatory receptor for epithelial gammadelta T cell activation. *Science*. 2010; 329(5996):1205-10