

T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

**ÜLSERLİ HASTALARIN GASTRİK EPİTEL
HÜCRELERİNDE EPİDERMAL BÜYÜME
FAKTÖRÜNÜN APOPTOZİS İLE İLİŞKİLİ
GENLERİN EKSPRESYONU ÜZERİNE ETKİSİNİN
İN-VİTRO ARAŞTIRILMASI**

Fatma SÖYLEMEZ

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. M. Emin ERDAL

İKİNCİ DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. Özlem İZCİ AY

MERSİN – 2010

T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

**ÜLSERLİ HASTALARIN GASTRİK EPİTEL
HÜCRELERİNDE EPİDERMAL BÜYÜME
FAKTÖRÜNÜN APOPTOZİS İLE İLİŞKİLİ
GENLERİN EKSPRESYONU ÜZERİNE ETKİSİNİN
İN-VİTRO ARAŞTIRILMASI**

Fatma SÖYLEMEZ

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. M. Emin ERDAL

İKİNCİ DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. Özlem İZCİ AY

Bu tez, Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından BAP-SBE
TBG (FS) 2007-1 DR nolu proje olarak kabul edilmiştir.

Tez No: 14

MERSİN – 2010

Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Doktora Tezi Programı çerçevesinde yürütülmüş olan “Ülserli Hastaların Gastrik Epitelyum Hücrelerinde Epidermal Büyüme Faktörünün Apoptozis İle İlişkili Genlerin Ekspresyonu Üzerine Etkisinin İn-Vitro Araştırılması” başlıklı çalışma, jürimiz tarafından Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 07/10/2010

Prof. Dr. M. Emin ERDAL
Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi
Jüri Başkanı

Doç. Dr. Etem AKBAŞ
Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi
Jüri Üyesi

Doç. Dr. Engin ALTINTAŞ
Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi
Jüri Üyesi

Yrd. Doç. Dr. Selahattin TEKEŞ
Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi
Jüri Üyesi

Yrd. Doç. Dr. Özlem İZCİ AY
Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi
Jüri Üyesi

Yukarıdaki tez, Enstitü Yönetim Kurulunun 12/10/2010 tarih ve 2010-327 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü
Prof. Dr. Ülkü ÇÖMELEKOĞLU

TEŞEKKÜR

Akademik kariyerime başladığım günden itibaren, deneyimlerini ve bilgi birikimlerini benimle paylaşarak kendimi geliştirmemde ve pek çok konuda bilgi sahibi olmamda çok büyük emeği olan, desteğini her zaman hissettiğim, aynı zamanda da tez danışmanım, hocam Sayın Prof. Dr. Mehmet Emin ERDAL'a sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez konusunun belirlendiği aşamalarda, değerli fikirlerini benimle paylaşan ve bu çalışmanın şekillenmesinde büyük katkıları olan hocalarım, Sayın Yrd. Doç. Dr. Ertan AY ve Sayın Yrd. Doç. Dr. Özlem İZCİ AY'a çok teşekkür ederim. Ayrıca, tezin hücre kültürü kısmında çok büyük emeği geçen ve bana hücre kültürü hakkında bildiğim her şeyi öğreten, her zaman desteğini yanımda hissettiğim, aynı zamanda da ikinci danışmanım Sayın Yrd. Doç. Dr. Özlem İZCİ AY'a çok teşekkür ederim.

Anabilim Dalımız öğretim üyesi ve hocam Sayın Doç. Dr. Etem AKBAŞ'a lisans eğitimimle başlayan ve akademik kariyerim süresince devam eden desteği ve eğitim sürecimdeki değerli katkılarından ötürü teşekkür ederim.

Tez çalışmaları süresince, hücre kültürü kısmında bana çok yardımcı olan, teknisyenimiz ve benim sevgili arkadaşım Sayın Hatice ÖZTÜRK'e; tezin moleküler kısmında yine bana çok yardımcı dokunan Sayın Sami DEMİRELLİ'ye çok teşekkür ederim.

Tezin immünohistokimyasal analizleri ve hücre kültürlerinin fotoğraflarının çekilmesindeki yardımlarından dolayı Histoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Doç. Dr. Nejat YILMAZ'a ve Dr. Sinem Hale ÖZTUNA'ya teşekkürlerimi sunarım.

Biyopsi örneklerinin toplanmasındaki yardımları için Mersin Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Gastroenteroloji Anabilim Dalı'ndan Sayın Doç. Dr. Engin ALTINTAŞ'a ve Sayın Dr. Enver ÜÇBİLEK'e teşekkür ederim.

Tezin istatistik analizlerinin yapılmasındaki yardımlarından dolayı Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim Anabilim Dalı'ndan Sayın Arş. Gör. Mehmet Ali SUNGUR'a çok teşekkür ederim

Son olarak da, sıkıntılı süreçlerde hep yanımda olan canım asistan arkadaşım Sayın Arş. Gör. Sevinç SÜRER'e ve yine varlıklarıyla bana güç veren canım aileme çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

KABUL ve ONAY	iii
TEŞEKKÜR	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	xi
ÖZET	xiv
ABSTRACT	xv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Gastrik Epitelyal Turnover.....	4
2.1.1. Gastrik Epitelyal Proliferasyon.....	4
2.2. Apoptozis.....	5
2.2.1. Apoptozis: Genel Bakış.....	5
2.2.2. Bcl-2 Gen Ailesi.....	8
2.2.2.1. Bcl-2 Ailesi Proteinleri ve Bax.....	8
2.2.3. Fas ve FasL.....	11
2.2.4. Normal Gastrik Mukozada Apoptozis.....	14
2.3. Gastroduodenal Ülser Hakkında Genel Bilgiler.....	15
2.3.1. Gastroduodenal Ülserlerin Epidemiyoloji ve Etiyolojisi.....	15
2.4. Epidermal Büyüme Faktörü (EGF).....	17
2.4.1. Büyüme Faktörlerine Genel Bakış.....	17
2.4.2. Gastroduodenal Ülserlerin İyileşme Süreci ve EGF.....	18
3. GEREÇ ve YÖNTEMLER	21
3.1. Hasta ve Kontrol Gruplarının Toplanması.....	21
3.2. Primer Kültürlerin Kurulması, Karakterizasyonu ve EGF Uygulanması.....	22
3.2.1. Primer Kültürlerin Kurulması.....	22
3.2.1.1. Kullanılan Solüsyonlar.....	22
3.2.1.2. Kültürün Kurulması.....	22
3.2.2. Mide Epitel Hücrelerinin Karakterizasyonu.....	23

3.2.2.1. Periyodik Asit Shift (PAS) Boyama.....	23
3.2.2.2. Proliferatif Hücre Nukleer Antikoru (PCNA) Uygulaması.....	25
3.2.3. Hücre Sayımı ve Epidermal Büyüme Faktörünün Uygulanması.....	26
3.3. Hücre Hattı Uygulamaları.....	26
3.4. Semi Kantitatif Ekspresyon Analizleri.....	27
3.4.1. RNA İzolasyonu ve RT-PCR.....	27
3.4.1.1. Kullanılan Solüsyonlar.....	27
3.4.1.2. Yöntem.....	28
3.4.2. Ekspresyon Tayini.....	29
3.5. Real-Time PCR-Comparative C _T ($\Delta\Delta C_t$) Metodu ile Ekspresyon Analizleri.....	30
3.5.1. Kullanılan Primer ve Problar.....	31
3.5.2. Ekspresyon Tayini.....	31
3.5.2.1. Real-Time PCR Reaksiyon Ortamının Hazırlanışı.....	32
3.5.2.2. Real-Time PCR Reaksiyon Şartları.....	32
3.6. İstatiksel Analizler.....	33
4. BULGULAR.....	34
4.1. RT-PCR ile Semikantitatif Ekspresyon Analizi ile İlgili Bulgular.....	34
4.2. Real Time-PCR (Comparative C _T) Analiziyle İlgili Bulgular.....	41
5. TARTIŞMA.....	49
6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER.....	57
7. KAYNAKLAR.....	59
ÖZGEÇMİŞ.....	64

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	Apoptotik süreçte rol alan faktörlerin şematik gösterimi	7
Şekil 2.2.	Bcl-2 ailesinin pro-apoptotik ve anti-apoptotik üyelerini gösteren şema.....	9
Şekil 2.3.	Memeli hücre ölüm yolağının şematik görünümü	10
Şekil 2.4.	Bax ve Bcl-2'nin fonksiyonlarını düzenlemek için oluşturulan modeller	10
Şekil 2.5.	Kaspaz 8'in otoproteolitik aktivitesi tarafından meydana gelen, Fas L'in indüklediği apoptozis	12
Şekil 2.6.	İnsan gastrik ülserasyonunun iyileşen bölgelerinde EGF ailesi büyüme faktörleri, EGFR ve PCNA'nın immüno lokalizasyonunun özeti	19
Şekil 3.1.	Kültüre edilmiş mide epitel hücrelerinin PAS boyama öncesinde, inverted mikroskoptaki görünümü	24
Şekil 3.2.	PAS boyama sonrasında, PAS pozitif olduğu belirlenen mide epitel hücrelerinin görünümü	24
Şekil 3.3.	PCNA sonrasında aktif DNA sentezi olduğu belirlenen mide epitel hücrelerinin görünümü.....	25
Şekil 3.4.	N87 hücre hattından pasajlanarak çoğaltılan mide epitel hücrelerinin inverted mikroskoptaki görünümü.....	27
Şekil 3.5.	Bax genine ait çoğaltılan bölgenin dizisi	30
Şekil 3.6.	Bcl-2 genine ait çoğaltılan bölgenin dizisi.....	30
Şekil 3.7.	Fas genine ait çoğaltılan bölgenin dizisi.....	30
Şekil 3.8.	Beta Aktin genine ait çoğaltılan bölgenin dizisi.....	30
Şekil 4.1.	Farklı dozlarda epidermal büyüme faktörü uygulanan kültürlerden elde edilen cDNA'lar ile kontrol geni olarak β -Aktin'in kullanıldığı Bax geni için yapılan PCR sonrasında elde edilen elektroforez görüntüsü.....	34
Şekil 4.2.	Farklı dozlarda epidermal büyüme faktörü uygulanan kültürlerden elde edilen cDNA'lar ile kontrol geni olarak β -Aktin'in kullanıldığı Fas geni için yapılan PCR sonrasında elde edilen elektroforez görüntüsü.....	35

Şekil 4.3. Farklı dozlarda epidermal büyüme faktörü uygulanan kültürlerden elde edilen cDNA'lar ile kontrol geni olarak β -Aktin'in kullanıldığı Bcl-2 geni için yapılan PCR sonrasında elde edilen elektroforez görüntüsü.....	35
Şekil 4.4. EGF uygulaması yapılan hasta ve kontrollerdeki Bax geni ekspresyon düzeylerinin grafiksel gösterimi.....	37
Şekil 4.5. EGF uygulaması yapılan hasta ve kontrollerdeki Fas geni ekspresyon düzeylerinin grafiksel gösterimi.....	38
Şekil 4.6. EGF uygulaması yapılan hasta ve kontrollerdeki Bcl-2 geni ekspresyon düzeylerinin grafiksel gösterimi.....	39
Şekil 4.7. EGF uygulaması yapılan hasta ve kontrollerdeki Bax, Fas ve Bcl-2 genlerinin total ekspresyon düzeylerinin grafiksel gösterimi	39
Şekil 4.8. EGF uygulaması yapılan ülserli hastaların primer kültürleri ve mide kanseri hücre hattındaki Bax, Fas ve Bcl-2 genlerinin total ekspresyon düzeylerinin grafiksel gösterimi.	40
Şekil 4.9. Beta Aktin genine ait, YAKIMA YELLOW ile işaretlenmiş probun Real Time PCR amplifikasyon eğrisi.....	41
Şekil 4.10. Bax genine ait, FAM'la işaretlenmiş probun Real Time PCR amplifikasyon eğrisi.....	42
Şekil 4.11. Bcl-2 genine ait, FAM'la işaretlenmiş probun Real Time PCR amplifikasyon eğrisi.....	42
Şekil 4.12. Fas genine ait, FAM'la işaretlenmiş probun Real Time PCR amplifikasyon eğrisi.....	43
Şekil 4.13. Real Time PCR ile Comparative C_T Analizine göre belirlenen, EGF uygulaması yapılan hasta ve kontrollerdeki Bax geni ekspresyon düzeylerinin grafiksel gösterimi.....	43
Şekil 4.14. Real Time PCR ile Comparative C_T Analizine göre belirlenen, EGF uygulaması yapılan hasta ve kontrollerdeki Fas geni ekspresyon düzeylerinin grafiksel gösterimi.....	44
Şekil 4.15. Real Time PCR ile Comparative C_T Analizine göre belirlenen, EGF uygulaması yapılan hasta ve kontrollerdeki Bcl-2 geni ekspresyon düzeylerinin grafiksel gösterimi.....	44

- Şekil 4.16.** Real Time PCR ile Comparative C_T Analizine göre belirlenen, EGF uygulaması yapılan hasta ve kontrollerdeki Bax, Fas ve Bcl-2 genlerinin total ekspresyon düzeylerinin grafiksel gösterimi.....46
- Şekil 4.17.** Real Time PCR ile Comparative C_T Analizine göre belirlenen, EGF uygulaması yapılan ülserli hastaların primer kültürleri ve mide kanseri hücre hattındaki Bax geni ekspresyon düzeylerinin grafiksel gösterimi.46
- Şekil 4.18.** Real Time PCR ile Comparative C_T Analizine göre belirlenen, EGF uygulaması yapılan ülserli hastaların primer kültürleri ve mide kanseri hücre hattındaki Fas geni ekspresyon düzeylerinin grafiksel gösterimi..47
- Şekil 4.19.** Real Time PCR ile Comparative C_T Analizine göre belirlenen, EGF uygulaması yapılan ülserli hastaların primer kültürleri ve mide kanseri hücre hattındaki Bcl-2 geni ekspresyon düzeylerinin grafiksel gösterimi.....48

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Agresif faktörlerin ülser oluşturuucu etkilerinin önlenmeye çalışıldığı süreçler.....	16
Çizelge 3.1. Bax, Bcl-2, Fas ve β -Aktin genlerinin primer dizileri ve PCR sonrasında elde edilen bant uzunlukları	29
Çizelge 3.2. Real-Time PCR'da kullanılan Bax, Bcl-2, Fas ve β -Aktin genlerinin primer ve prob dizileri.....	31
Çizelge 4.1. EGF uygulanan hücrelerde Bax geni için ekspresyon oranı (E) değerinin ortalamaları ve standart sapmaları	36
Çizelge 4.2. EGF uygulanan hücrelerde Fas geni için ekspresyon oranı (E) değerinin ortalamaları ve standart sapmaları	37
Çizelge 4.3. EGF uygulanan hücrelerde Bcl-2 geni için ekspresyon oranı (E) değerinin ortalamaları ve standart sapmaları	38
Çizelge 4.4. Ülserli hastaların primer kültürleri ve mide kanseri hücre hattındaki Bax, Fas ve Bcl-2 genlerinin ekspresyon oranı (E) değerinin ortalamaları ve standart sapmaları	40
Çizelge 4.5. EGF uygulaması yapılan hasta ve kontrollerdeki Bax, Fas ve Bcl-2 genlerinin Real Time PCR ile Comparative C _T Analizi yapılarak ekspresyon düzeyi ortalamaları ve standart hataları.....	45
Çizelge 4.6. Ülserli hastaların primer kültürleri ve mide kanseri hücre hattındaki Bax, Fas ve Bcl-2 genlerinin Real Time PCR ile Comparative C _T Analizi yapılarak belirlenen ekspresyon düzeyi ortalamaları ve standart hataları.....	47

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

AGPC	Asit Guanidinyum-Fenol-Kloro form Yöntemi
AIF	Apoptozis İndükleyici Faktör
AP1	Aktive Edici Protein 1
Ar	Amfiregülin
bp	Baz Çifti
BSA	Sığır Serum Albümin
°C	Santigrat Derece
Ca⁺²	Kalsiyum İyonu
Ced	<i>Caenorhabditis elegans</i> ' in Ölüm Geni
CD-95	Fas
CD-95L	Fas Ligandı
CO₂	Karbondioksit
DISC	Ölümü İndükleyici Sinyal Kompleksi
DAB	Diaminobenziamid
DEPC	Dietil pirokarbonat
DEPC-H₂O	Dietil pirokarbonat' lı su
dk	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik Asit
dNTP	Deoksiribonükleotid Trifosfat
DU	Duodenal Ülser
EDTA	Etilendiamintetraasetik Asit
EGF	Epidermal Büyüme Faktörü
EGFR	Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
Erk	Ekstraselüler Sinyal Düzenleyen Kinaz

FasL	Fas Ligand
FADD	Fas ile İlişkili Ölüm Domaini
FBS	Fetal Sığır Serumu
FLICE	FADD Benzeri İnterlökin-1 Dönüştürücü Enzim
FLIP	FADD Benzeri İnterlökin-1 İnhibitör Proteini
g	gram
GU	Mide Ülseri
GDU	Gastroduodenal Ülser
GSCN	Guanidinyum İsoyosiyanat
ICE	İnsan İnterlökin-1 Dönüştürücü Enzim
IL-3	İnterlökin 3
kDa	Kilo Dalton
M	Molar
mg	Miligram
Mg⁺²	Magnezyum İyonu
MgCl₂	Magnezyum Klorür
ml	Mililitre
mM	Milimolar
mRNA	Messenger RNA
ng	Nanogram
NF-kB	Nükleer Faktör Kappa B
NDFs	Heregülin/neu Farklılaşma Faktörleri
(NH₄)₂SO₄	Amonyum Sülfat
NSAİİ	Nonsteroidal Antiinflamatuar ilaçlar
PAS	Periyodik Asit Shift Boyama
PBS	Fosfat Tamponu
PCNA	Proliferatif Hücre Nükleer Antikoru

PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RIP	Fas ile Etkileşimli Serin/Treonin Kinaz Reseptör Protein
RNA	Ribonükleik Asit
rpm	Dakikadaki Devir Sayısı
RT-PCR	Revers Transkriptaz-Polimeraz Zincir Reaksiyonu
s	Saniye
TGF-β	Transforme Edici Büyüme Faktörü Beta
TNF	Tümör Nekroz Faktör
TNF-α	Tümör Nekroz Faktör Alfa
TNFR	Tümör Nekroz Faktör Reseptörü
TNFR-1	Tümör Nekroz Faktör Reseptörü-1
TRADD	TNFR-1 ile ilişkili ölüm domaini
TRAF	Tümör Nekroz Faktör Reseptörü İle İlişkili Protein
TRAIL	Tümör Nekroz Faktör ile İlişkili Apoptozisi İndükleyen Ligand
TNM	Tümör Evreleme Sistemi
UV	Ultraviole
β-Aktin	Beta Aktin
μg	Mikrogram
μl	Mikrolitre

ÖZET

Ülserli Hastaların Gastrik Epitel Hücrelerinde Epidermal Büyüme Faktörünün Apoptozis İle İlişkili Genlerin Ekspresyonu Üzerine Etkisinin İn-Vitro Araştırılması

Gastroduodenal ülserlerin iyileşme sürecinde ve mukozal hücre proliferasyonunun düzenlenmesinde epidermal büyüme faktörü (EGF) önemli rol oynamaktadır. Apoptozis de ülser oluşumunda yer alan önemli bir süreçtir. Bu çalışmada, gastrik ve duodenal ülserli hastaların biyopsi örnekleri ve mide kanseri hücre hattından çoğaltılan hücrelere in-vitro ortamda 3 farklı dozda (20, 50 ve 100 ng/μl) EGF uygulaması yapılmıştır. Bu hücrelerden izole edilen RNA'lar kullanılarak Bax, Fas ve Bcl-2 genlerinin ekspresyon düzeyleri hem semi-kantitatif olarak, hem de Real-Time PCR ile "Comparative C_T Analizi" yapılarak belirlenmiştir.

İstatiksel analizler sonucunda, EGF uygulamasının gastroduodenal ülserli hastalarda Bax, Fas ve Bcl-2 genlerinin ekspresyonunu değiştirmediği belirlendi. Real Time PCR ile "Comparative C_T Analizi" yapılarak elde edilen verilerin istatistiksel değerlendirmesinin sonucunda; EGF'den bağımsız olarak, sadece Bax geninin kontrol grubundaki ekspresyon düzeyinin, hasta grubuna göre daha yüksek olduğu saptandı (p=0.001).

Primer hücre kültürü ve mide kanseri hücre hattındaki gen ekspresyon düzeyleri Real Time PCR'da değerlendirildiğinde; semi kantitatif yöntemde EGF dozlarının ekspresyon düzeyleri üzerinde etkisi olmadığı belirlenirken, 1 doz EGF (20 ng/μl) uygulandığında hücre hattında Bax geninin ekspresyon düzeyinde belirgin bir artış olduğu (p=0.001), 2 doz EGF (50 ng/μl) uygulanmasının ise hücre hattında Fas geninin ekspresyonunu azalttığı (p=0.033) görüldü.

Sonuç olarak; özellikle ülser iyileşmesinde rol oynayan EGF'nin, apoptozisi aktive edici fonksiyona sahip olan Bax ve Fas genlerinin ekspresyonu üzerinde etkili olduğu ve Bcl-2 gen ekspresyonunun ise EGF uygulamasıyla değişmediği belirlenmiştir. Bu çalışmanın, ülserli hastalarda EGF'nin apoptotik etkisini inceleyen ilk çalışma olması nedeni ile bu konuyla ilgili yapılacak diğer çalışmalara yol gösterici olacağı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Gastroduodenal ülser, Bax, Fas, Bcl-2, EGF, N87 hücre hattı

ABSTRACT

In-Vitro Research of Epidermal Growth Factor on the Gene Expressions Associated With the Apoptosis in the Gastric Epithelial Cells of Ulcerous Patients

Epidermal grow factor (EGF) has a major role on recovery process of gastroduodenal ulcers and organization of mucosal cell proliferation. Apoptosis is also an important period taking role in ulcer formation. In this study, EGF application to the biopsy samples of gastric and duodenal ulcer patients and the cells increased from gastric cancer cell line has been carried out in-vitro environment in three different doses (20, 50 and 100 ng/ μ l). Using the RNAs isolated from these cells, the expression levels of Bax, Fas and Bcl-2 genes have been determined both semi quantitatively and with Real-Time PCR by making “Comparative C_T Analysis”.

In consequence of statistical analyses, the EGF application was found not to change expressions of Bax, Fas and Bcl-2 genes in gastroduodenal ulcerous patients. As a result of statistical evaluation of the data got by making “Comparative C_T Analysis with Real-Time PCR, separately from the EGF, only the expression level of Bax gene in the control group was determined to be higher in comparison with the patient group (p=0.001).

When the gene expression levels in the primer cell culture and gastric cancer line were evaluated in Real Time PCR, it was found that EGF doses had no effect on the expression levels in semi quantitative method; on the other hand, there was a clear increase in the expression level of Bax gene in the cell line when one dose EGF (20 ng/ μ l) was applied (p=0.001) and it was also observed that 2 doses EGF (50 ng/ μ l) application decreased the expression of Fas gene in the cell line (p=0.033).

Consequently, it was determined that EGF playing a role especially on the ulcer recovery had influence on the expression of Bax and Fas genes which have a function activating apoptosis and the expression of Bcl-2 gene also didn't change with the EGF application. Because this study is the first examining the apoptotic effect of EGF in ulcerous patients, it is thought that it will be a guide for the other studies about this subject.

Keywords: Gastroduodenal ulcer, Bax, Fas, Bcl-2, EGF, N87 cell line.

1. GİRİŞ

Doku bütünlüğünün korunması, yaşlanmış ya da hasar görmüş hücrelerin ölümü ve yeniden proliferolmaları ile sağlanır. Gastrik mukoza, yenilenme oranı yüksek olan bir dokudur. Örneğin, tüm yüzey epitel hücreleri yaklaşık 3-5 günde bir yenilenir. Gastrik mukozanın bütünlüğünün korunması, epitel hücre proliferasyonu ve programlanmış hücre ölümü olan apoptozis arasındaki dengenin sağlanmasıyla ilişkili kompleks bir biyolojik süreçtir (1). Apoptozis, programlanmış bir hücre ölüm mekanizmasıdır. Biyolojik bilimler literatüründe apoptozis terimi, ilk defa İskoçyalı araştırmacılar olan Kerr, Wyllie ve Currie tarafından 1972 yılında kullanılmış ve canlı dokulardaki hücre azalmalarından sorumlu olan, yapısal olarak özgün bir hücre ölüm tipi olarak tanımlanmıştır (2). Komşu hücreleri etkilemeyen ve inflamatuvar yanıtı neden olmayan bir mekanizma tarafından kontrol edilir. UV veya γ -radyasyon, ısı şoku, DNA hasarı, proteaz inhibitörleri, Fas ligandı ve tümör nekroz faktör ile ilişkili apoptozisi indükleyen ligand (TRAIL) gibi ölüm faktörleri tarafından tetiklenen bir süreçtir. Hücrenin apoptozise girip girmemesi, büyüme faktörleri ve hormonlar gibi pozitif uyarıların kesilmesi veya tümör nekroz faktör (TNF) ve Fas ligandı (FasL) gibi hücre yüzey reseptörlerine bağlanan çeşitli moleküller ile negatif uyarıların alınması şeklinde 2 uyarı sisteminin dengelenmesi ile belirlenir (2).

Bcl-2 ailesi, üyelerinin bir kısmının apoptozisi indüklediği (Bax, Bad, Bid, Bcl-X_l), bir kısmının ise apoptozisi inhibe ettiği (Bcl-2, Bcl-X_s) geniş bir ailedir (3). Bu ailenin üyeleri kendi aralarında homo veya hetero-dimerler oluştururlar. Hücrenin yaşayabilirlik durumu, bu ailenin pro-apoptotik ve anti-apoptotik üyelerinin göreceli oranına bağlıdır. Bu heterodimerlerden biri olan Bcl-2/Bax oranı bazı hematolojik malignansilerde prognostik markır olarak görülmektedir. Çünkü oranın artması ya da azalması apoptozisin inhibisyonu veya aktivasyonu ile sonuçlanır. Bu da prognozu belirleyici bir değer taşıyabilir. Bcl-2 geni ilk olarak insan B hücreli foliküler lenfomada tanımlanmıştır. Bu lenfoma tipinde, Bcl-2 normalden uzun yaşam sürelerine neden olur. Böylece malignite oluşumuna zemin hazırlamaktadır. Bcl-2, özellikle mitokondri dışı membranında bulunmakta ve iyon transportunu düzenlemektedir. Bax, sitozolde bulunur ve apoptotik uyarı alınması halinde mitokondri membranına bağlanır, burada küçük porların oluşumunu indükler, böylece selektif iyon permeabilitesi kaybolur,

sonuçta sitokrom c ve apoptozisi indükleyici faktör'ün (AIF) mitokondriden sitozole çıkmasını sağlar (4). Bcl-2 gen ürünü olan proteinler mitokondrinin dış membranında, nükleer zarfta ve endoplazmik retikulumda belirlenmiş olan 2,5 kDa'luk proteinlerdir. Özellikle hematopoietik hücreler ve epitel hücreleri gibi proliferen hücreler ve nöronlar gibi sürekli çoğalmayan hücreler olmak üzere birçok dokuda bulunmuşlardır. Bcl-2 proteininin ana biyolojik etkisi, apoptotik hücre ölümünü bloke etmektir. Bu genin proteininin UV ve gama radyasyonu, ısı, glukokortikoidler, kemoterapotik ajanlar, oksidanlar, viral infeksiyonlar ve büyüme faktörleri tarafından uyarılan apoptozisi bloke ettiği gösterilmiştir. Bax geni, Bcl-2 gen ailesinin bir üyesidir ve hücrenin apoptozise girişini aktive edici fonksiyona sahip bir pro-apoptotik gendir. Fonksiyonunu normalde hücrenin apoptozise girişini engelleyen Bcl-2 genini baskılayarak gerçekleştirir (5).

Apoptozis klasik olarak, hücre ölüm reseptörleri olarak bilinen CD95 (sinonimleri: Fas veya APO-1) ve tümör nekroz faktör reseptörü-1 (TNFR-1)'in ilgili ligandları ile etkileşime girmeleri sonucu indüklenir. Bu hücre yüzey reseptörleri membranda bulunur ve TNFR ailesinin üyesidirler. Fas, lenfoid hücrelerde, hepatositlerde, bazı tümör hücrelerinde, akciğerlerde, hatta miyokarda bulunur. İlgili ligandına Fas ligand (FasL) denir (6). FasL, TNF ailesinin bir üyesidir. FasL, sitotoksik T lenfositlerinde ve "natural killer" hücrelerde bulunur. Fas ve TNFR-1, ligandlarıyla bağlandıklarında ölüm uyarısı almış olduklarından bir seri protein-protein interaksiyonlarından geçerler. Öncelikle kendilerine doğal olarak bağlı bulunan ve ölüm bölgeleri adı verilen TNFR-1 ile ilişkili ölüm domaini (TRADD) ve Fas ile ilişkili ölüm domaini (FADD) ile interaksiyona girerler. Bu ölüm bölgeleri ise prokaspaz 8'i aktifleştirerek kaspazların kaskad tarzında aktivasyonlarını başlatırlar (7).

Çeşitli polipeptid büyüme faktörlerinin, gastrik ülser iyileşmesi de dahil mukozal hücre proliferasyonunun düzenlenmesinde önemli rol oynadığı gösterilmiştir. Bu büyüme faktörleri arasında, epidermal büyüme faktör (EGF) ailesi de insan normal gastrik mukozasında belirlenmiştir. EGF ailesi; EGF, transforme edici büyüme faktörü alfa (TGF- α), amfiregülin (Ar), epiregülin, heregülin/neu farklılaşma faktörleri (NDFs) ve kripto'dan oluşur. EGF'nin, gastrik ülser iyileşme sürecinde, mukozal hücre proliferasyonunun düzenlenmesinde önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir (8). EGF'nin gastrik mukozadaki diğer biyolojik aktiviteleri, gastrik asit salgılanmasının

inhibisyonu, çeşitli ülserojenik faktörlere karşı koruma ve gastrik mukoza üretiminin stimulasyonudur.

Apoptozisle ilişkili genlerin gen ve protein ekspresyonları gastrik kanser gibi birçok kanser türünde çalışılmıştır fakat epidermal büyüme faktörünün bu genlerin ekspresyonu üzerindeki etkisi ülserli dokularda incelenmemiştir.

Bu çalışmanın amacı, ülserli hastalarda EGF'nin, apoptozis ile ilişkili Bax, Fas ve Bcl-2 genlerinin ekspresyonu üzerindeki etkisini araştırmak ve hücre hattındaki ekspresyon düzeyleri arasındaki varsa benzerlik ya da farklılığı ortaya koymaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Gastrik Epitelyal Turnover

Gastrik epitelyal turnover, dinamik bir süreçtir. Hücre kaybı sayısı ile dengelenen devamlı hücre proliferasyonu ile karakterize edilir. Epitelyumun, programlı hücre ölümü (apoptozis) ile homeostasisinin sağlandığı biyolojik bir fenomendir (9).

Epitelyal turnover, midenin dört anatomik bölgesine göre değişiklik gösterir. İki farklı mukoza tipi ile sınırlanan bu dört farklı bölge, TNM klasifikasyon sistemine göre (Union Internationale Contre le Cancer [UICC], 1997); cardia, fundus, corpus ve antrum olarak adlandırılır. Mukoza tiplerinden biri, midenin üst ve orta 1/3'ünde, fundus ve corpusda bulunur (UICC, 1997). Bu fundus-tip veya oxyntic mukoza, nöroendokrin hücreler, parietal hücreler, zymogenic hücreler ve mukoz hücrelerle kaplı daha ziyade düz ve komposit glandlar ile karakterize edilir (10). İkinci tip mukoza, midenin distal 1/3'ündeki antrum, pylorus ve ayrıca cardia'da bulunur. Bu antrum-tip mukoza, daha çok dallanmış, birkaç nöroendokrin hücre ile çok sayıda mukoid gland ve seyrek parietal hücrelerden oluşur (10).

2.1.1. Gastrik Epitelyal Proliferasyon

Gastrik mukoza diğer sindirim sistemi mukozalarından, proliferatif bölgesi bakımından farklılık gösterir. Midenin her bölgesinde, proliferatif kök hücreleri gastrik glandların boyun kısmında bulunur ve epitelyal migrasyon iki yönlü olarak meydana gelir. Proliferatif epitelin bir kısmı, luminal yüzeyden yukarıya birkaç günde göç eder ve hücreler, columnar mukoz salgılayan epitele farklılaşır. Diğer proliferatif epitel hücreleri, gastrik glandların aşağısına doğru göç eder. Antrumda, bu epitel bir kaç gün içerisinde pyloric glandları oluşturan mukoz salgılayan hücrelere farklılaşır. Fundus ve corpusda ise, birkaç hafta içerisinde, parietal hücrelere ve nöroendokrin hücrelere farklılaşırlar (10).

Gastrik antral ve fundus tip mukozanın proliferasyon kinetiği büyük ölçüde farklılık gösterir. Bromodeoxyuridine (BrdU) ile işaretleme yapılması aracılığı ile mide

gövdesindeki epitel hücrelerinin % 2,8'i DNA sentezinin S fazında iken, bu oran antrumdaki epitel hücrelerinde % 4,8 olarak bulunmuştur. Gastrik antral hücrelerinin ortalama S fazı süresi 7,7 saat iken, gastrik gövdedeki hücrelerin S fazında 10,8 saat kaldığı belirlenmiştir (11).

Gastrik epitelyal yenilenme çeşitli fizyolojik uyarlardan etkilenir. Gastrik fundus ve corpus'da gastrin, epitel hücrelerinin proliferasyonunu çok güçlü etkiler. Fakat antrumda epitelyal proliferasyon üzerinde gastrinin hemen hemen hiç etkisi yoktur. Bu farklı etkiler, kronik hipergastrinemi ve gastrinoma (Zollinger-Ellison Sendromu) gibi hastalıklarda klinik açıdan bilgi vericidir (12).

2.2. Apoptozis

2.2.1. Apoptozis: Genel Bakış

Hücre ölümündeki çeşitlilik, yüzyıldan daha uzun zaman önce Rudolf Virchow tarafından fark edilmiştir (13). Ancak, nekroz tanımı 1972 yılında, apoptozis teriminin de katılması nedeniyle yeniden tanımlanmıştır (13). Kavramsal olarak apoptozis, hücrenin kendi kendini imha ettiği, aktif ve düzenli bir süreçtir. Bunun aksine, nekroz, geri dönüşümü olmayan bir hasarın ardından meydana gelen pasif bir hücre ölümü şeklindedir. Nekroz ve apoptozis, morfolojik olarak 2 farklı hücre ölümü tipidir (13).

Modern terminolojide nekroz morfolojik olarak, membran geçirgenliğinin kaybolmasıyla birlikte hücre ve organellerin şişmesi ve ardından hücre ve organel lizisiyle sonuçlanan bir süreç olarak karakterize edilir (14). Hücre içeriğinin boşalması nedeniyle, nekroza in-vivo olarak bir inflamatuvar yanıt eşlik eder. Biyokimyasal olarak ise, nekroz nükleer DNA'nın rastgele parçalanması şeklinde karakterize edilir.

Nekrozun aksine apoptozis morfolojik olarak, hem sitoplazmanın hem de kromatinlerin yoğunlaşması şeklinde karakterize edilir. Önemli ve karakteristik özelliği, organellerin bozulmaması ve hücre içeriğinin dış ortama salınmamasıdır. Bu nedenle, apoptotik hücrelerin etrafında herhangi bir inflamatuvar yanıt oluşmaz. Hücrenin tamamen büzülmesi ve apoptotik hücre formasyonunun oluşmasını, nükleusun parçalanması ve sitoplazmik membranların kıvrılması izler. Bu apoptotik hücreler daha

sonra komşu hücreler tarafından fagosite edilir. Biyokimyasal olarak apoptotik hücre ölümü, DNA'nın rastgele olmayan parçalanmasıdır (14).

Apoptozisin regülasyonu hem hücre içi hem de hücre dışında meydana gelen kompleks bir olaydır (Şekil 2.1). Ekstraselüler sinyaller apoptozisi baskılar veya indükleyebilir. Apoptozisi baskılayan moleküller (negatif sinyal), büyüme faktörleri gibi yaşamsal faktörlerdir. Apoptozisi aktive eden moleküller (pozitif sinyal), transforme edici büyüme faktörü- β (TGF- β) veya inhibitörler, aktinler ve Müllerian inhibe edici faktör gibi TGF ilişkili peptidler, CD95 ligand veya TNF ve TNF ilişkili moleküller gibi ölümü indükleyen faktörlerdir. Bu sinyaller, hedef hücre yüzeyindeki spesifik reseptörlerine bağlanarak fonksiyonlarını yerine getirirler. Apoptozisi kontrol eden mekanizmalardaki düzensizliklerin, karsinogenezle, otoimmün hastalıklarla ve *Helicobacter pylori* enfeksiyonu gibi çeşitli enfeksiyon hastalıklarıyla ilişkili olduğu gösterilmiştir (15).

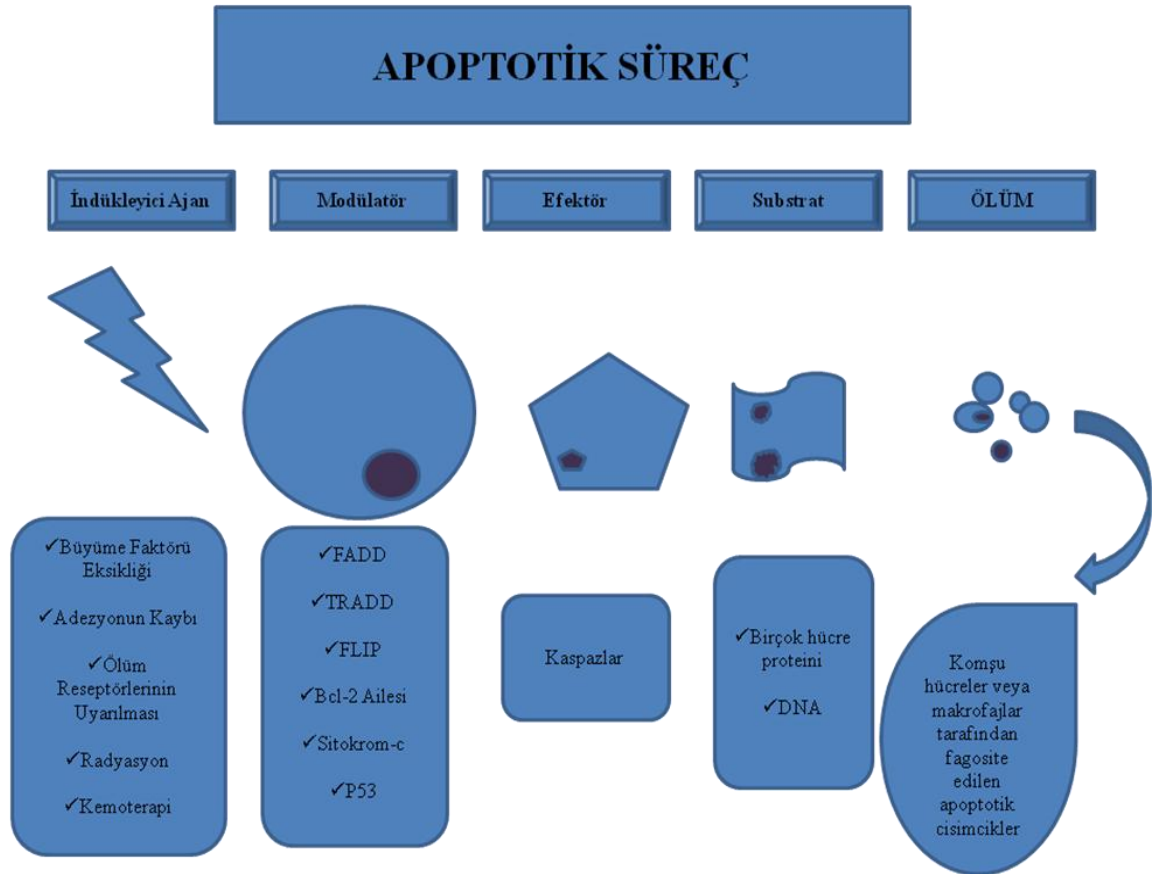
Apoptozisi indükleyen mekanizmalardan birisi, CD95 reseptörü ve ligand sisteminin aktivasyonudur (16). CD95 molekülü, sinir büyüme faktörü/tümör nekroz faktör reseptör süper ailesine ait olan bir tip I transmembran reseptörüdür. CD95, normal insan dokularının büyük bir kısmında eksprese edilir ve ekspresyonu çeşitli koşullarda indüklenebilir (17). CD95 ligandı (CD95L), TNF ailesine ait bir transmembran proteindir (16). CD95L'in, ekstraselüler CD95 domainine bağlanması, reseptörünü indükler. Daha sonra, CD95'in intraselüler domaini, bir adaptör FADD olan sitoplazmik kaspaz-8 (FLICE/MACH/Mch5) aracılığı ile aktive olur (18).

Benzer şekilde, TNF, TNF reseptörün (CD120a,b) ekstraselüler domainine bağlanması, reseptör trimerizasyonunu indükler ve CD120'nin intraselüler domaini, adaptör proteinler olan TRADD ve TNF reseptör ilişkili protein'in (TRAF) çalışmasını sağlar. Daha sonra bu kompleks diğer intraselüler kaskadları aktive eder.

Apoptozisi başlatan diğer mekanizma, kaspazlar olarak adlandırılan, sistein-aspartik asit-spesifik enzim ailesinin üyeleri olan intraselüler proteazların aktivasyonudur (19). Kaspaz-1, *Caenorhabditis elegans*'ın ölüm geni olan ced-3'ün insandaki homologudur ve insan interleukin-1 dönüştürücü enzim'in (ICE) özdeşidir. Aktive edilmiş ICE/CED-3 proteazlar, laminin, aktin, poly-ADP riboz polimeraz gibi çeşitli substratlara bağlanabilirler. Hücrelerin sistematik olarak parçalanmasını

sağlayabilirler. Şimdiye kadar, Kaspaz ailesinin 10 farklı üyesi olduğu belirlenmiştir (20).

Apoptozisin intraselüler regülatörlerinin en büyük sınıfını Bcl-2 protein ailesi oluşturur. İnsan Bcl-2 geni, *C. elegans*'ın ölüm geni olan ced-9'un homologudur. 26 kD'luk bir proteini kodlar. Bcl-2 ailesi, birbirleriyle etkileşime girerek homo veya heterodimer oluşturabilen çeşitli proteinlerden oluşur. Biyolojik etkileri birbirlerinden oldukça farklıdır. Bcl-2, Bcl-x1, Mcl-1 ve Bfl-1, hücreleri parçalayan kaspazların aktivasyonunu için gerekli olan adaptör proteinleri inhibe ederek apoptozisi baskılar (21). Bax, Bak, Bad ve Bid gibi diğer Bcl-2 ailesi üyeleri, yaşam öncülü proteinlerden adaptör proteinleri uzaklaştıran mekanizmalar aracılığıyla apoptozisi aktive ederler. Böylece, bu düzenleyici moleküller arasındaki bu denge hücrenin kaderini belirler (22).



Şekil 2.1. Apoptotik süreçte rol alan faktörlerin şematik gösterimi.

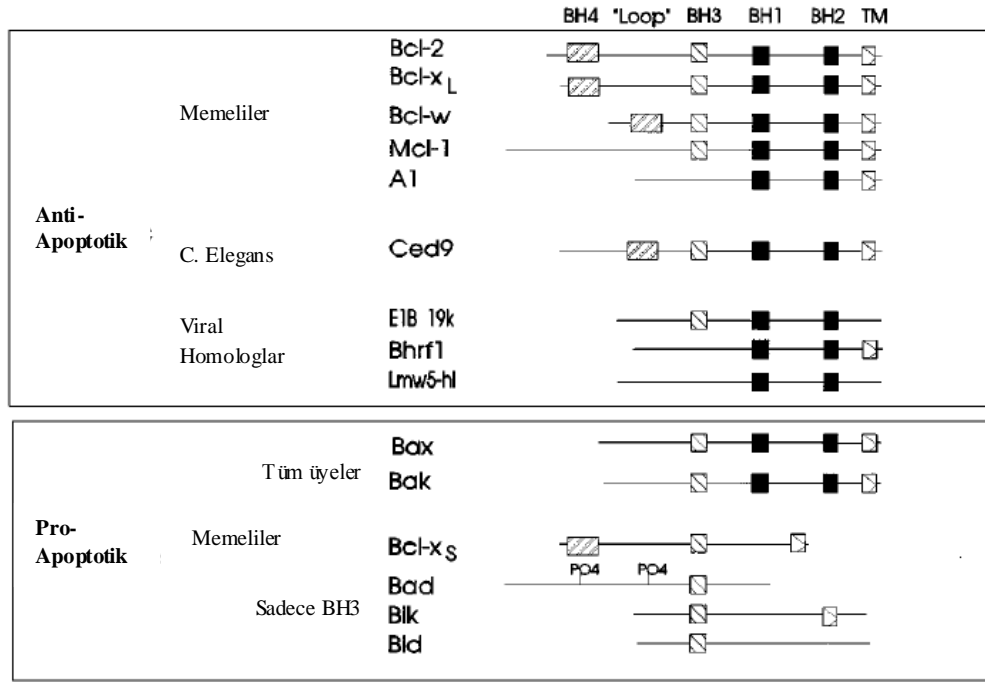
2.2.2 Bcl-2 Gen Ailesi

Bcl-2 ailesinin proteinleri, hücre ölüm yolağı içerisinde apoptozisin kritik bir intraselüler kontrol noktasını oluşturur. Bu ailenin bir üyesi olan Bcl-2, ilk olarak foliküler B hücreli lenfoma için moleküler bir gösterge olan t(14;18)'in kırılma noktasında belirlenmiştir (21). Bcl-2'nin bu keşfi, daha önceden çalışılan onkogenlerin aksine, proliferasyonu uyarmak yerine programlı hücre ölümünü engelleyen fonksiyona sahip yeni bir onkogen sınıfı olarak yayınlanmıştır (23). Bcl-2'nin aşırı ekspresyonu, sitokin geri alınımı üzerine sitokin bağımlı hücrelerin yaşayabilirliğini artırır. İnterlökin-3 (IL-3) bağımlı pro-B hücre hatları ve promyeloid hücre hatlarında, Bcl-2'nin aşırı ekspresyonu hücrenin yaşam süresini uzatmış ve hücrelerin G₀ fazında kalmasını sağlamıştır (24). Ayrıca Bcl-2, T hücrelerinin glukokortikoidler, γ -radyasyonu, forbol esterleri, ionomisin ve anti-CD3 antikoru tarafından hücre yüzey moleküllerin çapraz bağlar oluşturması gibi çeşitli apoptotik sinyallere karşı korunmasını da sağlar (25).

2.2.2.1 Bcl-2 Ailesi Proteinleri ve Bax

Birbirleriyle homo ve heterodimer oluşturan çok sayıda Bcl-2 homologunun tanımlanması, en azından protein-protein interaksyonları aracılığı ile bu moleküllerin fonksiyon gösterdiğini düşündürmüştür. İlk pro-apoptotik homolog olan Bax, Bcl-2 proteiniyle ko-immunopresipitasyon göstermesiyle tanımlanmıştır. Bax, 21 kDa'luk bir proteindir ve Bcl-2 ile BH1 ve BH2 gibi korunmuş bölgeler bakımından homoloji gösterir (26) (Şekil 2.2).

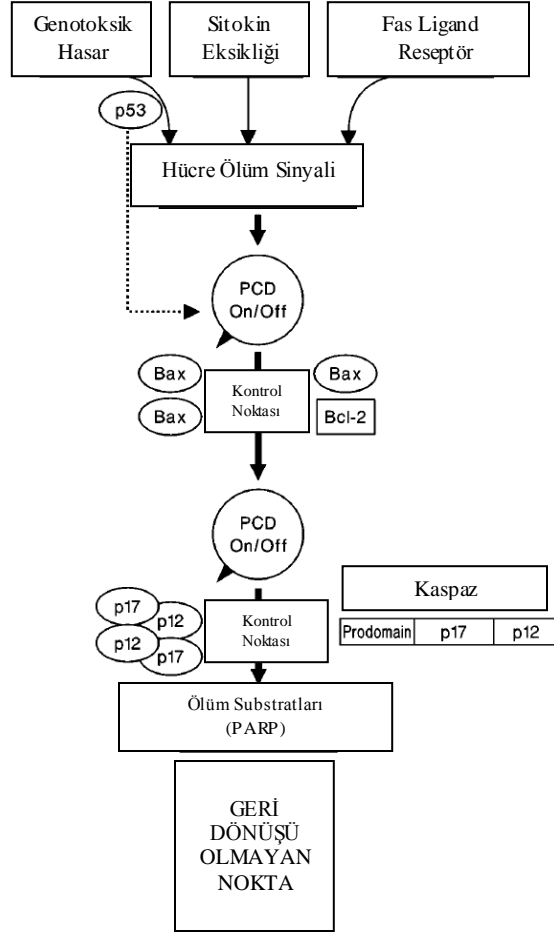
Bax, Bcl-2 ile heterodimer, kendisi ile homodimerler oluşturur (27). Bax, hücrelerde aşırı eksprese edildiği zaman, ölüm sinyaline yanıt ve apoptotik ölüm hızlanır. Bcl-2 aşırı eksprese edildiği zaman, Bax ile heterodimer yapar ve ölüm baskılanır (27). Bu nedenle, Bax/Bcl-2 oranı, apoptozise yatkınlığın belirlenmesinde önemlidir (Şekil 2.3). Bax proteini, Bcl-2'ye benzer şekilde bir karboksil uç içerir ve Bcl-2 gibi mitokondri de dahil intraselüler membranlara lokalize olur. Bax, normal maturasyon sürecinde ölen hücrelerdeki bölgelerde ve dokularda büyük oranda eksprese olur. Ayrıca, Bax/Bcl-2 oranı, gelişim sürecinde değişiklik gösterir.



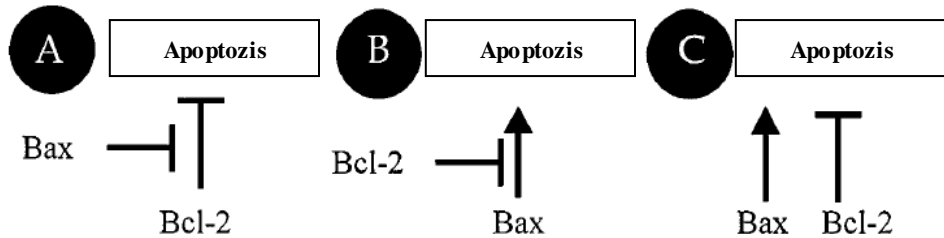
Şekil 2.2. Bcl-2 ailesinin pro-apoptotik ve anti-apoptotik üyelerini gösteren şema. Bcl-2 homolog bölgeleri, aynı renk ve şekildeki kutularla gösterilmiştir (BH1-BH4) (21).

Bcl-2 ailesi, hem Bax, Bcl-X_S, Bak ve Bad gibi pro-apoptotik molekülleri hem de Bcl-2, Bcl-X_L, Mcl-1 ve Mcl-A1 gibi ölüm antagonistleri ile çok geniş bir ailedir. Ölüm agonist ve antagonistleri arasındaki oran ölüm sinyaline yatkınlığı belirler. Korunmuş domainler BH1, BH2 ve BH3, hücre ölümünün düzenlenmesinde olduğu kadar, çeşitli dimer çiftlerinin oluşmasına da katılır (28). Bcl-2 ailesi, DNA virüslerinde de homologlara sahiptir (29). Adenovirüslerin sahip olduğu E1B-19k geni ve Epstein Barr virüsünün BHRF1 geni, litik ve bazı latent enfeksiyonlarda erken dönemde eksprese edilirler ve Bcl-2'nin BH1 ve BH2 domainlerinin homologlarıdır (21, 29) (Şekil 2.2).

Mutajenez çalışmalarının çoğu, protein-protein etkileşimlerinin Bcl-2 ailesinin fonksiyonunun düzenlenmesinde fonksiyonel etkisi olduğunu onaylarken, ölüm agonistlerinin mi? antagonistlerinin mi? apoptozisin düzenlenmesinde dominant etkisi olduğunu tam olarak belirleyememişlerdir. Bu soruya genetik bir yaklaşım kazandırmak için, apoptotik yolda, ölüm agonisti (Bax) ya da antagonisti (Bcl-2) residülerindeki kayıp ya da kazancının olduğu hayvan modellerinden yararlanılmıştır. Oluşturulan üç model, Bax ve Bcl-2 aktivitesini açıklayabilir (21) (Şekil 2.4).



Şekil 2.3. Memeli hücre ölüm yolağının şematik görünümü. Programlı hücre ölümünün major kontrol noktaları, pro-apoptotik (Bax) ve anti-apoptotik (Bcl-2) üyelerin oranı ve Kaspazların aktivasyonudur (21).



Şekil 2.4. Bax ve Bcl-2'nin fonksiyonlarını düzenlemek için oluşturulan modeller. (A) Bax, Bcl-2'nin upstreami. (B) Bax, Bcl-2'nin downstreami. (C) Bax ve Bcl-2 birbirinden bağımsız olarak apoptotik yolağı düzenler (21).

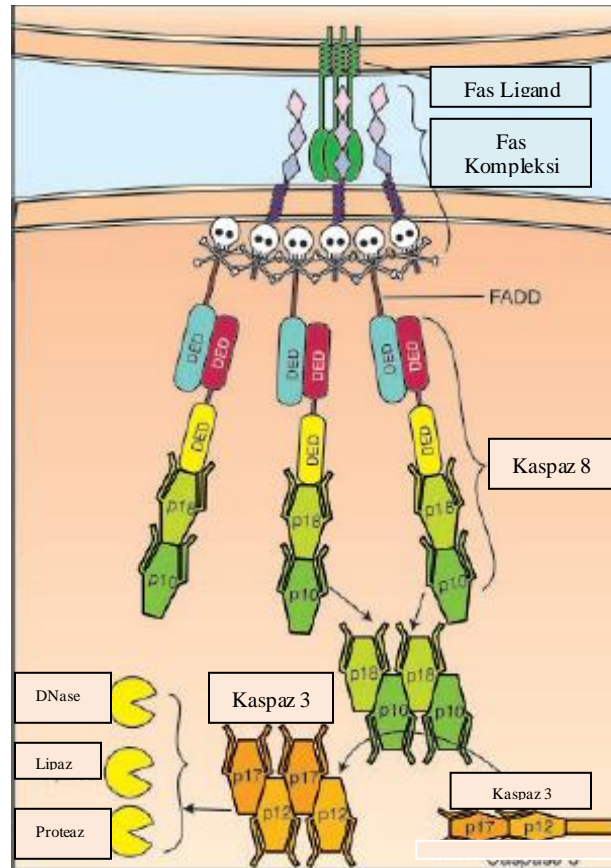
Eğer Bcl-2 apoptozisi baskılayan dominant molekül ise, Bax, Bcl-2'yi inhibe eden ya da alıkoyan bir upstream kelepçesi rolünü oynayabilirdi (Model A, Şekil 2.4). Eğer Bax hücre ölümünün bir downstream aktivatörü ise, Bcl-2, Bax'ın upstream inhibitörü olabilirdi (Model B, Şekil 2.4). Son olarak, bu moleküllerin heterodimer oluşturabilme özelliklerine rağmen, apoptotik yolağın düzenlenmesinde birbirlerinden bağımsız olarak çalışabilirlerdi (Model C, Şekil 2.4). Knockout farelerin karşılaştırılması, Bcl-2'si olmayan farelerdeki apoptozisin, Bcl-2'nin yanı sıra Bax'ı da noksan olan farelere göre dominant olduğunu ortaya koymuştur. Ayrıca, Bcl-2'nin yokluğunda, Bax'ın tek bir kopyası apoptozisi aktive etmiştir. Bununla birlikte, Bcl-2 transjeni, Bax'ın yokluğunda yine de apoptozisi baskılamıştır. Bu nedenle, bu moleküllerin in-vivo rekabetine rağmen, Bcl-2 ve Bax'ın her biri apoptozisi birbirinden bağımsız olarak düzenleme yeteneğine sahiptir (Model C, Şekil 2.4). Model C, ayrıca, hücre hatlarında Bcl-2 ve Bax'ın farklı bölümlerde lokalize olduğu ile ilgili gözlemlerle de uyumludur (21).

2.2.3. Fas ve FasL

Fas ya da diğer adıyla Apo-1 veya CD95, tümör nekroz faktör reseptör (TNFR) süper ailesinin ölüm domaini içeren bir üyesidir. Programlı hücre ölümünün fizyolojik olarak düzenlenmesinde önemli bir rol oynar ve immün sistem hastalıkları ve çeşitli malignansilerin patogeneze katılır (1, 30). FasL/Fas sistemi başlıca ölümü indükleyen fonksiyonu bakımından değerlendirilmekle beraber, hala kesin olarak tanımlanmamış yollar aracılığıyla proliferatif ve aktive edici sinyallere de uyum sağlar (31).

Membrana bağlı ligandın yokluğunda, molekülün domainine pre-ligand bağlanarak Fas'ın inaktif kompleksi oluşturulur. Membrana bağlı FasL veya agonistik antikolar bu kompleksi yeniden düzenler ve ölümü indükleyen sinyal kompleksinin (DISC) oluşmasını sağlar. Bu Fas DISC, FADD ile apoptozis sürecini başlatabilen kaspaz 8 ve kaspaz 10'u içerir. DISC içerisinde FADD, FasL tarafından indüklenen Fas kompleksi ve kaspaz 8 veya 10'un bulunması kaspazların otoproteolitik fonksiyonlarının başlamasına ve aktif proteazların salınımına neden olur (Şekil 2.5). Tip I hücrelerinde, kaspaz 8'in aktivasyonu diğer kaspaz ailesi üyelerini aktive etmek için

yeterlidir. Tip II hücrelerinde, amplifikasyon döngüsüne bağlı olarak Fas tarafından kaspazların aktivasyonunun doğru olarak dengelenmesi, pro-apoptotik Bcl-2 ailesi üyesi olan Bid'in kaspaz 9'un aktive ettiği apoptozomların oluşumunu sağlamak için mitokondrial pro-apoptotik faktörlerin salınımıyla sağlanır. Aktif hale gelen kaspaz 9, Fas DISC'in dışında kaspaz 8'i aktive eden kaspaz 3'ü aktive eder, böylece pozitif feedback döngüsü tamamlanır (20).



Şekil 2.5. Kaspaz 8'in otoproteolitik aktivitesi tarafından meydana gelen, Fas L'ın indüklediği apoptozis (30).

FasL geni çoğu hücrede transkripsiyonel olarak inaktiftir. Bu nedenle, FasL ekspresyonunun nükleer faktör kapa B (NF- κ B), aktive edici protein 1 (AP1) veya aktive olmuş T hücrelerinin nükleer faktörü gibi transkripsiyon faktörleri tarafından düzenlenmesi, CD4⁺ T hücrelerinin hücre ölümünün indüklenmesi gibi, FasL/Fas aracılığıyla meydana gelen etkileri regüle eder (20). Fas ekspresyonunun düzenlenmesi

örneğin p53'ün indüklediği apoptozisde olduğu gibi Fas yanıtının kontrolüyle olur. Membrana bağlı FasL tarafından Fas'ın stimülasyonu, transmembran ve/veya ölüm domainleri eksik olan çeşitli Fas izoformları ve proteolitik süreç veya alternatif splicing tarafından oluşturulan çözümlü FasL tarafından teşvik edilebilir. Fas DISC'in kaspaz 8'i aktive etmesi, FADD-benzeri interlökin-1-dönüştürücü enzim (FLICE) inhibitör proteini (FLIP) tarafından düzenlenir. FLIP'in, enzimatik aktivitelerinde kayıp olmakla beraber kaspaz 8'e yapısal olarak benzeyen çeşitli izoformları vardır. FLIP, ölüm reseptörlerinin DISC'yle birleşebilir, böylece DISC'in aracılık ettiği süreç zayıflar ve aktif kaspaz 8'in salınımı azalır. Ayrıca, Fas aracılı apoptozis, hücre ölümünün mitokondrial yolağındaki Bcl-2 ailesi üyeleri veya apoptozis proteinlerinin inhibitörü gibi regülatörlerin fazla oluşu ile de kontrol edilir. Fas aracılığı ile meydana gelen hücre ölümü sadece apoptozisde değil, hücrenin durumuna bağlı olarak nekrozda da meydana gelir. Fas'ın indüklediği nekrozda kaspaz 8 gerekli gibi görünmemesine rağmen, adaptör protein FADD ve Fas ile etkileşimli serin/treonin kinaz reseptör protein (RIP) gereklidir. Fakat nekroz sürecinde örneğin reaktif oksijen türevlerinin üretiminde, Fas, FADD ve RIP'in bağlanma mekanizmaları henüz açıklanamamıştır. FasL/Fas sistemi başlıca ölümü indükleyen fonksiyonu bakımından değerlendirilmeye beraber, hala kesin olarak tanımlanmamış yollar aracılığıyla proliferatif ve aktive edici sinyallere de uyum sağlar (31).

Fas, bir ölüm indükleyicisi olarak tanımlanmakla birlikte, aynı zamanda insan normal diploid fibroblastları ve T hücrelerinde proliferatif sinyallerine de uyum sağlar. Fas'ın indüklediği proliferasyonu oluşturan sinyal yolları, apoptozisle kısmen ilişkili olabilir. Hatta FasL tarafından T hücre büyümesinin uyarılması, kaspaz inhibitörleri tarafından engellenebilir (20). Ayrıca, kaspaz 8, FADD ve FLIP, Fas'ın indüklediği c-fos proto-onkogeninin ekspresyonuna katılır ve bu moleküllerin farelerde bulunmaması T hücre proliferasyonunda bir defekte sebep olur (30). Fas'ın aracılık ettiği proliferasyonun, NF- κ B'nin aktivasyonu ve Fas tarafından sağlanan non-apoptotik yanıtla nasıl bir ilişkisi olduğu hala aydınlatılamamıştır.

Fas 1991 yılında klonlandığından bu yana, bu reseptör tarafından indüklenen apoptozisin moleküler temelini anlaşılmada çok büyük bir süreç kat edilmiştir. Bununla birlikte, Fas'ın özellikle de non-apoptotik fonksiyonları ile ilgili tam olarak

anlaşılmayan noktalar vardır. Bu nedenle, Fas-FasL sisteminin nasıl bir paradigma olduğunu tahmin etmek zor değildir.

2.2.4. Normal Gastrik Mukozada Apoptozis

Midedeki epitel hücre kaybı, fizyolojik olarak apoptozis tarafından düzenlenir; bu nedenle bu olay aktif bir süreçtir (2, 32). Yan yana duran hücreler hem ekstaselüler matriksten hem de komşu epitelyumdan ayrılır. Hücre-hücre veya hücre-matriks interaksyonunun yıkımı, apoptozisin baskılanmasını ortadan kaldırabilir (33). Sonuç olarak, apoptotik hücreler lümeneye dökülür. Hücre izolasyonundan dolayı, bu aktif hücre ölüm tipinin “anoikis” olarak adlandırılabilen önerilmiştir (33). Anoikis, Yunancadan köken alan ve evsiz anlamına gelen bir kelimedir.

TUNEL metodu aracılığıyla, antrum veya corpus/fundusdaki gastrik epitel hücrelerinin yaklaşık %1-3 kadarının apoptotik olduğu belirlenmiştir. (34). Normal gastrik mukozadaki apoptotik hücreler ışık mikroskopunda nadiren tanımlanır. Apoptotik hücreler meydana geldiği zaman, ya bitişik epitel hücreleri tarafından yutulurlar ya da hemen subepitel bağ dokuya lokalize olurlar (2). Önemli bir noktada, apoptotik hücrelerin rasgele dağılmayıp, gastrik glandların üst ve alt sonlarına doğru bulunmalarındadır (2, 34).

Midedeki epitel hücre kaybı aktif bir süreçtir. İlk yapılan çalışmalarda, normal midedeki hiçbir epitel hücresinde CD95 (APO-1/Fas) ekspresyonu olmadığı öne sürülmüştür (17). Fakat daha sonraki çalışmalarda, CD95’in birkaç gastrik epitelde eksprese edildiği gösterilmiştir (35, 36). CD95’in eksprese edildiği fovealar epitel sayısı çok az olsa da, bu sayı apoptotik hücre sayısının yaklaşık yarısına karşılık gelir. Bu nedenle, gastrik epitel hücrelerin turnoverında apoptozisin CD95 yoluyla etkili olabilir.

Bcl-2 ailesinin proteinleri, normal gastrik epitelyumda farklı patternlerde eksprese edilir. İmmünohistokimya aracılığıyla, Bcl-2 ailesinin düzenleyici proteinlerinin özellikle boyun bölgesindekiler olmak üzere normal midenin tüm epitel hücre tiplerinde eksprese edildiği bulunmuştur (37). Fakat başka bir çalışmada, immünoboyama sonuçlarına göre, ekspresyonlarının boyun bölgesindeki mukozada sadece birkaç hücrede sınırlı olduğu bulunmuştur (38). Mc1-1 gen ürünü olan 37-kd’luk protein, glandular epitelde değil gastrik fovealar epitelde eksprese edilir.

İmmünoablottama ile karşılaştırıldığı zaman, Bcl-2 proteini normal midede Mcl-1 proteininden daha fazladır (37). Bcl-2 ve Mcl-1 proteinlerinin bu farklı ekspresyon patternleri, bu proteinlerin hücre ölüm fizyolojisinin düzenlenmesinde tamamen farklı rolleri olduğunu göstermektedir.

İmmünohistokimya ve Western Blot analizleri, Bax proteininin gastrik glandlarda çok miktarda bulunduğunu göstermiştir (39). Bax'ın hücre ölümünü tetiklemek için yeterli olmadığı fakat apoptozisin diğer regülatörlerinin aktivitelerini değiştirebileceği öne sürülmüştür (39).

2.3. Gastroduodenal Ülser Hakkında Genel Bilgiler

2.3.1. Gastroduodenal Ülserlerin Epidemiyoloji ve Etiyolojisi

Mide, üstte özefagusun alt ucu, altta ise duodenumun birinci kısmı ile komşu Gastrointestinal kanalın diğer kısımlarının çoğunda olduğu gibi 4 doku tabakasından oluşur: Mukoza, submukoza, muskularis propria ve seroza. İnsan midesinin mukozası, yaklaşık 15 milyon tübüler glanda açılan 3,5 milyon civarında basit kolumnar epitelyumdan oluşmuştur. Bu yüzey mukoz hücreleri gastrik kıvrım ve bükümlerin yüzeyini kaplar ve gastrik çukurcuklara uzanır. Duodenum, tübüler bir organ olup yaklaşık 30 cm uzunluğundandır. Midenin devamında ve büyük kısmı retroperitoneal olarak yer alır. İnce barsağın diğer kısımlarındakine benzer şekilde duodenal lümen mukoza ile kaplıdır (40).

Duodenal ülser, gastrointestinal sistemin önemli bir hastalığıdır. Duodenal ülser insidansı, cinsiyete ve ırklara göre farklılıklar gösterir. Erkeklerde kadınlardan 1,5-3 kat daha fazla oranda görülür. Ayrıca beyaz ırkta, diğer ırklara göre daha yüksek sıklıkta duodenal ülser vakası vardır. Yapılan çalışmalarda farklı tanı metodları kullanıldığından ve ülser asemptomatik olabileceğinden duodenal ülserin insidansındaki değişiklikler konusundaki veriler farklılık göstermektedir.

Duodenal ülserin patogeneğinde asit ve pepsin hipersekresyonu ile mukozal direncin bozulması önemli olup, genetik yatkınlık, ayrıca çevresel ve diyetik faktörlerin etkisi vardır. Asit sekresyonunu inhibe eden ilaçlarla duodenal ülserin iyileşebilmesi,

patogenezde asit salınımının önemini göstermektedir. Ancak asit hipersekresyonunun, duodenal ülserli hastaların bir grubunda görülmesi, bazen gastrinomanın varlığında aşırı asit ve pepsin hipersekresyonuna rağmen bile duodenal ülserin oluşmayabilmesi, patogenezinde diğer faktörlerin de bulunduğunu göstermektedir. Genelde ülser oluşumunda agresif faktörler bir yanda ülser oluşturmaya çalışırken, koruyucu faktörlerin varlığı ve onarıcı faktörlerin hızı bunu engellemektedir (Çizelge 2.1). Bu dengede, agresif faktörler ağır basarsa ülser oluşur, ya da iyileşmesi gecikir (40).

Mukoza bütünlüğün sağlanmasında, mukozal kan akımı, mukus ve mukozal bikarbonat sekresyonu, hücre yenilenmesi, prostoglandinler ve mukozal bariyer rol alır. Mide asit sekresyonu normal olan hastalarda, muhtemelen mukozal direncin bozulması duodenal ülserin oluşmasına neden olur.

Çizelge 2.1. Agresif faktörlerin ülser oluşturuca etkilerinin önlenmeye çalışıldığı süreçler. (NSAİİ: Nonsteroidal Antiinflamatuar ilaçlar)

AGRESİF FAKTÖRLER	KORUYUCU FAKTÖRLER	HASARIN ONARIMI
Asit Pepsin NSAİİ H. pylori	Bikarbonat Kan Akımı Mukus Apikal Rezistans Prostoglandinler	Proliferasyon Büyüme Faktörü Diğer Faktörler

Gastrik ülser, 40 yaşından önce çok nadir olup, en sık 55-65 yaşlarında görülen bir hastalıktır. Erkek ve kadınlarda eşit sıklıkta görülür. Gastrik ülserin patogenezi tam olarak anlaşılmış değildir. Mukozayı tahrip edici asit, pepsin gibi etkenler ile mukozayı koruyucu mukus ve bikarbonat gibi faktörler arasındaki dengenin bozulması gastrik ülser oluşumunda önemlidir. Mide lümeni ile mukozal doku arasındaki hidrojen iyonu konsantrasyon gradientinin sağlanması anlamına gelen gastrik mukozal bariyerin, aspirin gibi çeşitli ilaçlarla ya da etanol ve safra asitleri nedeniyle bozulması gastrik ülserle sonuçlanabilir. Ancak mukozal hasar için mutlaka bu bariyerin bozulması şart değildir. Aynı zamanda, nonsteroidal antiinflamatuar ilaç kullanımı, gastrit, *H. pylori* infeksiyonu, asit ve pepsin sekresyonunda artış, duodenogastrik reflü ve prostoglandinler de gastrik ülser oluşturabilen etkenlerdendir. Sigara da gastrik ülser

oluşumunda, ülserden ölümlerde ve ülserin tekrarlanması bir risk faktörüdür, ancak mekanizması tam olarak bilinmemektedir.

2.4. Epidermal Büyüme Faktörü (EGF)

2.4.1. Büyüme Faktörlerine Genel Bakış

Büyüme faktörleri, hücre büyümesi, farklılaşması ve fonksiyonlarını düzenlemek üzere hücre reseptörlerine bağlanan polipeptidlerdir. Çeşitli endokrin hormonlar, düzenleyici peptidler ve sitokinler büyüme faktörü olarak fonksiyon gösterebilirler (41).

Bu alandaki çalışmalar, 1960'ların başlarında fare submandibular bezinden bir substratın izole edilmesi ve neonatal farede gözlerin erken dönemde açılmasını indükleyici özelliği olduğunun gösterilmesiyle başlamıştır (42). Bu durum gözkapağındaki epidermal hiperplazi ile ilişkili bulunmuş ve bu nedenle epidermal büyüme faktörü (EGF) olarak adlandırılmıştır. EGF'nin keşfi ve karakterizasyonunun belirlenmesindeki katkısından dolayı Dr. Stanley Cohen 1986'da Nobel ödülü almıştır (41).

EGF, etkili bir mitojendir, fakat aynı zamanda çok sayıda başka biyolojik etkilere de sahiptir. Geniş biyolojik etkileri olan ve giderek artan sayıda belirlenen diğer büyüme faktörleri için bir prototip olmuştur. Bu büyüme faktörleri, farklı yollarla hücre farklılaşması ve fonksiyonlarını etkilerler ve gelişimde ve emriyogenezde önemli rollere sahiptirler (41).

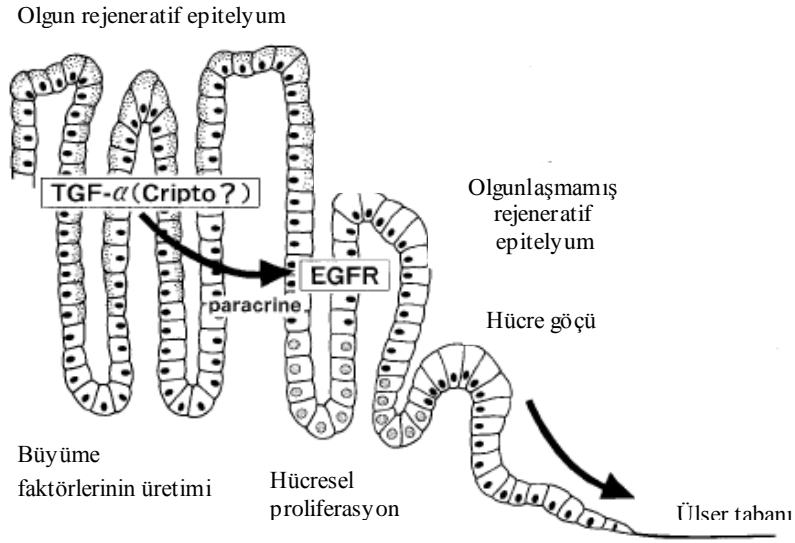
EGF gibi çok sayıda büyüme faktörü de, çoğunlukla biyolojik etkilerine göre adlandırılmıştır. Örneğin, transforme edici büyüme faktörleri (TGF- α , TGF- β), yapısal ve fonksiyonel olarak birbirinden farklıdır. Fakat kültürde hücreleri ölümsüzleştirdiği belirlenen ilk faktörler oldukları için benzer adları almışlardır (43).

2.4.2. Gastroduedonal Ülserlerin İyileşme Süreci ve EGF

Çeşitli polipeptid büyüme faktörlerinin, gastrik ülserin iyileşmesi sürecinde mukozal hücre proliferasyonu ve farklılaşmasının düzenlenmesinde önemli rol oynadıkları gösterilmiştir. Bu büyüme faktörleri arasında, EGF veya EGF ailesi büyüme faktörlerine yapısal benzerlik gösteren büyüme faktörleri normal insan gastrik mukozasında belirlenmiştir. Bu büyüme faktörleri, transforme edici büyüme faktörü- α (TGF- α), amfiregülin (AR) ve kriptodur (8). Ayrıca, TGF- α 'nın EGF kadar mide de dahil olmak üzere gastrointestinal bölgelerdeki mukoza hücrelerinin proliferasyonu ve farklılaşmasında önemli rol oynadığı gösterilmiştir (42). EGF ve TGF- α 'nın gastrik mukozadaki diğer biyolojik aktiviteleri, gastrik asit sekresyonunun inhibisyonunu sağlamaktır (43). Öte yandan, AR ve Kripto'nun gastrik mukozadaki biyolojik aktiviteleri ile ilgili fazla çalışma yapılmamıştır.

EGF, TGF- α ve AR, intrinsik tirozin kinaz aktivitesine sahip, kendi yüzey reseptörleri olan EGF reseptörüne (EGFR) bağlanarak aktivite gösterirler. Kripto'nun bağlandığı reseptör henüz tanımlanamamıştır. EGFR, hücre membranına bağlı ekstraselüler bir N-terminal ucu bulunan tek zincirli bir polipeptittir ve intraselüler domaini tirozin-spesifik protein kinaz aktivitesine sahiptir (44). EGFR'nin mide dokusunda eksprese edildiği çeşitli deney hayvanlarının in-vivo gastrik dokularında hem immünohistokimyasal yöntemlerle hem de reseptör bağlanma deneyleri yapılarak gösterilmiştir (45). Fakat insan midesinde ve gastrik ülserin rejeneratif epitelyumunda EGFR'nin ekspresyonu ile EGF, TGF- α ve AR gibi büyüme faktörleri arasındaki ilişki henüz bilinmemektedir.

EGF ailesi büyüme faktörlerinin ve EGFR'nin insan gastrik ülserlerindeki immüno lokalizasyonları Şekil 2.6' da özetlenmiştir.



Şekil 2.6. İnsan gastrik ülserasyonunun iyileşen bölgelerinde EGF ailesi büyüme faktörleri, EGFR ve PCNA' nın immüno lokalizasyonunun özeti (8).

EGF, TGF- α , AR ve Kriptonun insan normal gastrik dokusunda ve gastrik ülserin rejeneratif epitelyumundaki ekspresyonlarını belirlemek için yapılan immünohistokimyasal çalışmalarda, EGF immüno reaktivitesi ülser etrafındaki gastrik mukozada bulunamamıştır (8, 46). Ayrıca, EGF mRNA, insan da dahil memelilerin gastrik dokularında belirlenmemiştir (47). Bu nedenle insan normal gastrik mukozasında biyolojik etki gösteren EGF'nin aktivitesini endokrin ve/veya muhtemelen eksokrin mekanizmalar aracılığıyla gösterdiği ve EGF sentezinin olduğu belirlenmiş olan duodenal Brunner glandları ve tükürük bezleri gibi uzak organlardan salındığı düşünülmektedir (46).

EGF, TGF- α ve AR gibi büyüme faktörleri, EGFR aracılı aktivitelerini gösterebilmek için, endokrin, parakrin ve/veya otokrin mekanizmaların aracılığıyla hedef hücrelerinin bazolateral kısımlarına alınmak zorundadırlar. Bu bulgu, ülserojenik ajanlara karşı gastrik mukozal korunmanın EGF'nin gastrik asit salınımını enteral olarak (bağırsak emilimi yolunda, gastrointestinal kanalın içinde) değil, parenteral olarak (bağırsak aracılığı olmadan) baskıladığı sonucu ile uyumludur.

Önceki çalışmalarda deneysel olarak indüklenen gastrik lezyonların tükürük bezlerindeki EGF içeriğini arttırabileceğini göstermiştir. Bu tükürükteki EGF'nin ülser karşı korunma ve ülser iyileşmesi ile ilişkisi olduğu gösterilmiştir (43, 48). EGF'nin mukozal tamire katılan bir gastrointestinal peptid olarak aktivite gösterdiği öne

sürülmüştür (49). EGF kendi reseptörüyle interaksyonu aracılığıyla epitel hücre proliferasyonunu ve migrasyonunu stimüle eder ve gastrointestinal mukozanın bütünlüğünü korur. *H. pylori* enfeksiyonu ve tedavisinin gastrit ve gastroduodenal ülser hastalarındaki EGF seviyesi üzerindeki etkisi ile ilgili çelişkili sonuçlar bildiren bazı çalışmalar vardır. Bununla birlikte, immünohistokimyasal çalışmalar EGF'nin gastroduodenal mukoza hasarında eksprese edildiğini göstermiştir (50). Bu nedenle, EGF'nin gastrik mukozada reseptörü aracılığıyla gastroduodenal hasarın iyileşmesine doğrudan katılması olasıdır.

3.GEREÇ ve YÖNTEMLER

3.1. Hasta ve Kontrol Gruplarının Toplanması

Bu çalışmada, ülser tanısı alan hastaların ülseratif ve non-ülseratif dokularında epidermal büyüme faktörünün, apoptozis genlerinden Bax, Bcl-2, Fas ve FasL'in ekspresyonu üzerindeki etkisini araştırmak amaçlandı. Hasta grubu, Mersin Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Dahili Tıp Bilimleri, Dahiliye Anabilim Dalı'nın Gastroenteroloji polikliniğine başvuran ve son 1 ay içinde antibiyotik, proton pompa inhibitörü, H₂ reseptör antagonisti, non-steroid anti-inflamatuar, asetil salisilik asit ve klopidogrel gibi ilaçları almamış ve endoskopi sırasında gastrik ülser ve duodenal ülser saptanmış 50 yaş üzeri (50,8±15.4) bireylerden oluşturuldu. Kontrol grubunda da aynı özellikler dikkate alındı.

Gastrik ülserli hastalarda biyopsi, ülser kenarı ve ülserin olduğu duvarın karşı duvarından (antrum); duodenal ülserli hastalarda antrumdan; kontrol grubunda da aynı şekilde antrumdan ve her bir bölgeden en az 5 adet olmak üzere standart biyopsi forsepsi ile biyopsi alındı.

Çalışma süresi içerisinde alınan biyopsilerle, 10'u gastrik ülser ve 21'i duodenal ülserli olmak üzere toplam 31 bireyden hasta grubu; normal mide dokusundan alınan biyopsilerle ise toplam 12 kişilik kontrol grubu oluşturuldu. Alınan biyopsi örneklerinin aynı gün içinde primer kültürleri hazırlandı. Kültürlerin üreme durumuna göre inverted mikroskopta (Olympus CK40, 40X) takip edilerek beslemeleri yapıldı. Epitel hücreleri, petrielerde yeterli düzeyde konfluent olduktan sonra 3 farklı dozda EGF uygulaması yapıldı. Bu kültürlerden manuel yöntemle elde edilen RNA'lar kullanılarak cDNA'ları elde edildi ve apoptotik genlerin primerleri ve kontrol geni olarak da β -Aktin kullanılarak yapılan ikinci PCR'in ürünleri agaroz jelde yürütülerek bant yoğunlukları belirlendi.

Çalışmaya katılan bireylerin hepsi için bilgilendirilmiş onam formu oluşturuldu ve çalışma hakkında bilgi sahibi olmaları sağlanarak onayları alındı. Mersin Üniversitesi Yerel Etik Kurulu'ndan çalışmanın onayı alındı.

3.2. Primer Kültürlerin Kurulması, Karakterizasyonu ve EGF Uygulanması

3.2.1. Primer Kültürlerin Kurulması

3.2.1.1. Kullanılan Solüsyonlar

A. Kültür Ortamı

1. **Ham's F-12 Medium:** İçerisine %10 Fetal Bovine Serum (FBS, Biochrom-S 0113), %1 Penisilin-Streptomisin (Biochrom-A 2210), %1 Amfoterisin-B (Biochrom-A 2610), %1 L-Glutamin (Biochrom-K 0281) eklenerek hazırlandı.
2. **Leibowitz's L-15 Medium:** İçerisine %1 Penisilin-Streptomisin (Biochrom-A 2210), %1 Amfoterisin-B (Biochrom-A 2610), %1 L-Glutamin (Biochrom-K 0281) eklenerek hazırlandı.

B. Kimyasallar

1. **Hücre Yapışma Faktörü (CSC Certified-4Z0-210):** Epitel hücreleri için bir matrix oluşturmak üzere petri yüzeylerini kaplamak için kullanıldı.
2. **Tip II Kollajenaz (Biochrom-CII 28):** Lyofilize haldeki Tip II kollajenazın 5 mg'ının, 5 ml Leibowitz's L-15 besi ortamında çözülmesiyle hazırlandı. Filtreden geçirildi ve biyopsi örneklerinin enzimatik olarak parçalanması sırasında kullanıldı.
3. **Dispaz:** *Bacillus polymyxa*'dan elde edilen ve mide dokusunun enzimatik olarak parçalanıp epitel hücrelerinin elde edilmesine spesifik bir enzimdir.
4. **Kollajenaz/Dispaz Solüsyonu:** Steril bir falkon tüpünde, 5 ml Kollajenaz Tip II, 100 µl Dispaz (30 U), 0.25 mg Tripsin inhibitörü ve 31.25 mg Bovine Serum Albumin (BSA)'in Leibowitz's L-15 besi ortamı ile 25 ml'ye tamamlanmasıyla hazırlandı. Biyopsi örneklerinin enzimatik olarak parçalanması için kullanıldı.

3.2.1.2. Kültürün Kurulması

Biyopsi örnekleri (6 parça-her biri yaklaşık 5'er mg), 5 ml Leibowitz's L-15 besi ortamı içeren 15 ml'lik ayrı tüplere alınıp laboratuara getirildi. Besi ortamı içerisinde laboratuara getirilen biyopsi örnekleri önce mekanik daha sonra da enzimatik olarak

parçalandı (51). Mekanik parçalama, biyopsi örneklerinin laminar kabinette 3 ml kollajenaz/dispaz solüsyonu (%0.05 Tip II Kollajenaz/120U Dispaz) içeren steril bir petri içerisinde bisturi aracılığı ile küçük parçalara ayrılmasıyla yapıldı. Daha sonra parçalanmış biyopsi örnekleri, kollajenaz/dispaz solüsyonu içeren 50 ml'lik falkon tüpüne alındı. Vortekste 1 saat karıştırılarak mide epitel hücrelerinin izole edilmesi sağlandı. Kollajenaz/dispaz solüsyonunda izole edilen mide epitel hücrelerini içeren falkon tüpü, 1500 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Laminar kabinette üst faz atılıp, üzerine 10 ml Hank's Solüsyonu (w/o Ca⁺², Mg⁺² free) eklendi. 1500 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Üst faz atılıp, pelet üzerine 8 ml, oda sıcaklığında FBS içeren Ham's F-12 eklendi. Pipetle karıştırıldıktan sonra, her bir petriye (35 mm'lik) 2'şer ml olmak üzere toplam 4 petriye paylaştırılarak primer kültür hazırlandı. Primer kültür kurulmadan önce petrilere, mide epitel hücrelerinin tutunmasını sağlayan yapışma faktöründen 1'er ml eklenerek yapışma yüzeyi kaplandı. Primer kültürü kurulan petriler %5 CO₂ ve 37°C'deki inkübatöre kaldırıldı. Ortalama 7. günün sonunda izlem altına alınan petriler 3 günde bir, inverted mikroskopla (Olympus CK40) kontrol edildikten sonra, üreme duruma göre 1/1 veya 1/2 oranında besleme yapılarak takip edildi.

3.2.2. Mide Epitel Hücrelerinin Karakterizasyonu

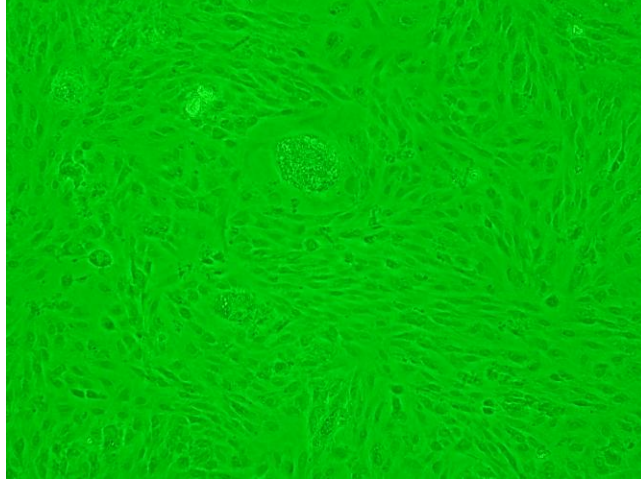
3.2.2.1. Periyodik Asit Shift (PAS) Boyama

Yeterli konfluensi elde edildikten sonra, mide epitel hücrelerini karakterize etmek ve mide epitel hücrelerinin içerisindeki nötral münlerin varlığını göstermek amacıyla, PAS (Periyodik Asit Shift) boyama yapıldı. PAS, mün salgılayan mide epitel hücrelerini leylak rengine boyar, hücrelerin nükleusları ise açık mavi renkte görünür. Kültüre edilen mide epitel hücrelerinin hem PAS boyama öncesinde (Şekil 3.1), hem de sonrasında fotoğrafı çekildi. PAS boyama sonucunda çok miktarda PAS pozitif hücre görüldü (Şekil 3.2).

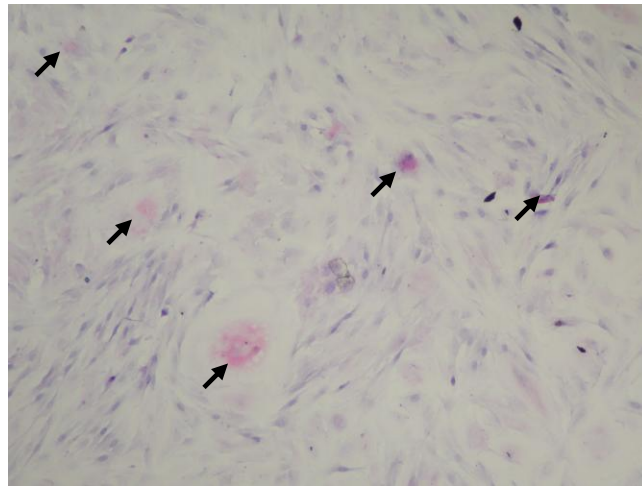
3.2.2.1.1. Yöntem

- Petri üzerine paraformaldehit eklenip 45 dakika bekletildi (fiksasyon aşaması).

- Paraformaldehit dökülüp petri distile su ile çalkalandı ve % 0,5 periyodik asitte 2,5 dakika bekletildi. Distile sudan geçirildi.
- Schiff solüsyonunda 2,5 dakika bekletilip, tekrar distile sudan geçirildi.
- Hematoksilende 15 saniye tutuldu ve distile sudan geçirildi.
- Sırasıyla % 80, %90 ve % 96'lık alkol serilerine daldırılıp çıkarıldı.
- Kurumadan üzerine az miktarda distile su ekleyerek fotoğraf özelliği olan bir mikroskopta incelenip, PAS pozitif hücrelerin fotoğrafları çekildi (Şekil 3.2).



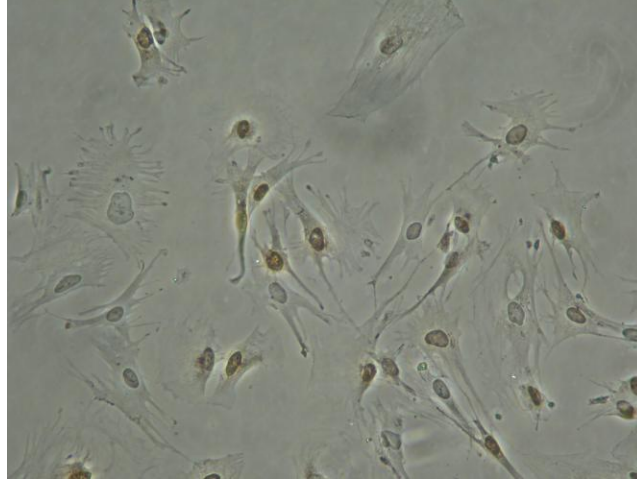
Şekil 3.1. Kültüre edilmiş mide epitel hücrelerinin PAS boyama öncesinde, inverted mikroskoptaki (Nikon Eclipse, TS 100) görünümü (100X).



Şekil 3.2. PAS boyama sonrasında, PAS pozitif olduğu belirlenen mide epitel hücrelerinin görünümü (Olympus BX50) (100X). Leylak renkli sitoplazmik alanlar, mide epitel hücrelerindeki nötral münlerin varlığını gösterir.

3.2.2.2. Proliferatif Hücre Nukleer Antikoru (PCNA) Uygulaması

Mide epitel hücrelerindeki aktif DNA sentezi ve hücre replikasyonunun devamlılığını göstermek amacı ile proliferatif hücre nukleer antikoru (PCNA) ile immunohistokimya yapıldı (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. PCNA sonrasında aktif DNA sentezi olduğu belirlenen mide epitel hücrelerinin görünümü. (Olympus BX50) (100X).

3.2.2.2.1. Yöntem

- Petri üzerine fosfat tamponu (PBS) eklenerek yıkama yapıldı.
- 45 dk, %4'lük paraformaldehitte bekletildi.
- 3 kere PBS ile yıkama yapıldı.
- Üzerine 1/100 dilüsyonda 200µg/ml PCNA (Santa Cruz Biotechnology, sc-25280) eklendi.
- 3 kere 5'er dk süre ile PBS ile yıkama yapıldı.
- 10 dk Streptavidin Peroksidazda (Lab Vision Corporation, TS-125-HR) bekletildi ve PBS ile yıkandı.
- 10 dk Sekonder Antikorda (Biotinylated Goat Anti-Polyvalent) (Lab Vision Corporation, TP-125-BN) bekletildi ve PBS ile yıkandı.
- Üzerine DAB (Diaminobenzamid) (Santa Cruz Biotechnology, sc-24941) damlatıldı ve 5 dk bekletildi.

- Petri yüzeyi distile su ile kaplanarak mikroskopta incelendi ve fotoğrafları çekildi (Şekil 3.3).

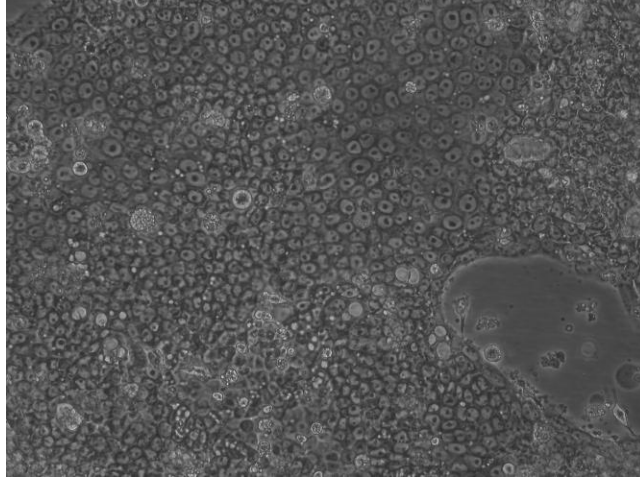
3.2.3. Hücre Sayımı ve Epidermal Büyüme Faktörünün Uygulanması

Belirli zamanlarda yapılan beslemeler ve mikroskop takibi sonucunda konfluent olduğu belirlenen petrillerdeki ortam uzaklaştırılıp FBS içermeyen Ham's F12 kültür ortamı eklenerek bu şekilde 24 saat bekletildi. Ertesi gün 24. saatte petrilere 3 farklı dozda EGF (Sigma-E9644) uygulaması yapıldı (0-kontrol; 1. doz -20 ng/μl; 2. doz- 50 ng/μl; 3. doz 100 ng/μl). EGF uygulamasından sonraki 24. saatte petrillerdeki besi ortamı uzaklaştırılıp, üzerine 2 ml Hank's Solüsyonu eklendi. Hank's solüsyonu uzaklaştırılıp üzerine 0,5 ml Tripsin-EDTA (Biological Industries/03-053-1B/10X) eklendi. Hücrelerin yuvarlaklaşp kalktığı mikroskopla kontrol edildi. Hücrelerin tamamen kalktığı mikroskopla görüldükten sonra, petriye 1,5 ml Ham's F12 eklenip tripsin inhibe edildi. Bu aşamada aldığımız 20 μl örnekle hücre sayımı yapıldı. Bunun için Thoma lamı %70'lik alkolle temizlenip üzerine lamel kapatıldı. Alınan 20 μl örnek lamın kenarından bırakılıp mikroskoptaki alanda sayım yapıldı (40X). Thoma lamındaki çizgilerle belirlenmiş kare alanın kenarlarındaki çizgilerin üzerine denk gelen hücreler de dahil olmak üzere yapılan sayım sonucunda 1.2×10^6 /ml hücre olduğu belirlendi. Tripsin-EDTA ile kaldırdığımız ve daha sonra FBS içeren kültür ortamı ekleyerek tripsini de inhibe ettiğimiz petrideki hücreler, RNA izolasyonu yapılmak üzere 1,5 ml'lik bir ependorfa aktarıldı.

3.3. Hücre Hattı Uygulamaları

Azot tankında gelen NCI-N87 (ATCC-CRL-5822) hücre hattı 37°C su banyosunda çözüldükten sonra %10 FBS, %1 penisilin-streptomisin, %1 amfoterisin- B ve %1 L-glutamin içeren RPMI-1640 besi ortamının 9 ml'si içerisinde alındı. 1200 rpm'de 6 dakika santrifüjlendi ve hücre peleti 3 ml besi ortamı ile dilue edilip 25 cm²'lik flaska ekilerek %5 CO₂'li etüvde 37°C'de inkübasyona bırakıldı. İki günlük aralıklarla düzenli olarak inverted mikroskopta (Olympus CK40, 40X) takip edilerek beslemeleri yapıldı. Konfluent olduğu belirlenen flasklar dilüsyon oranı 1:3 olacak

şekilde pasajlandı. Pasajlanan flasklardaki hücreler fotoğraflandı (Şekil 3.4). Daha sonra da petrilere yine aynı dilüsyon oranında pasajlanarak, primer hücre kültürlerine uygulanan standart prosedürlerin tamamı, EGF uygulanılan dozlar da (0-20-50 ve 100 ng/µl) dahil olmak üzere hücre hattına da uygulandı.



Şekil 3.4. N87 hücre hattından pasajlanarak çoğaltılan mide epitel hücrelerinin inverted mikroskoptaki (Nikon Eclipse, TS 100) görünümü (100X).

3.4. Semi Kantitatif Ekspresyon Analizleri

3.4.1. RNA İzolasyonu ve RT-PCR

24 saatlik EGF uygulaması sonrasında petrilere çoğaltılmış epitel hücrelerinden RNA izolasyonu manuel olarak Asit Guanidinyum-Fenol-Kloroform Yöntemi (AGPC) ile yapıldı (52).

3.4.1.1. Kullanılan Solusyonlar

- 1) Sodyum Sitrat (0,75 M):** 15,78 g sodyum sitrat tartıldı ve DEPC-H₂O ile 100 ml'ye tamamlanarak hazırlandı.
- 2) N-Lauroyl Sarkozil (%10):** 1 gr sarkozil tartıldı ve DEPC-H₂O ile 10 ml'ye tamamlanarak hazırlandı.

- 3) **DEPC-H₂O:** 1000 ml de-iyonize su içerisine 2 damla DEPC eklendi. 1 gece oda ısısında bekletildi. Ertesi gün, pastör fırınında 60°C'de 2 saat şişenin kapağı hafifçe gevşetilerek bekletilerek hazırlandı.
- 4) **Guanidinyum İsoitiyosiyonat (GSCN) Solusyonu:** 25 mg GSCN (4 M), 5 ml sodyum sitrat (0,75 M), 2,5 ml sarkozil (%10) tartıldı ve DEPC-H₂O ile 50 ml'ye tamamlanarak hazırlandı.
- 5) **Denatürasyon Solüsyonu:** 9,9 ml GSCN çözeltisi içerisine 0,1 ml 2-merkaptoetanol (14 M) eklenerek hazırlandı.

3.4.1.2. Yöntem

RNA izolasyonu için ayrılan steril ependorftaki hücreler 3000 rpm'de 10 dk santrifüjlendi ve süpernatant atıldı. Üzerine 500 µl denatürasyon solüsyonu eklenip birkaç saniye vortekslendikten sonra 15 dk -20°C'de bekletildi. 500 µl fenol-kloroform-isoamilalkol (25:24:1) eklenip, 15 dk -20°C'de bekletildi. 4 dk 10.000 rpm'de santrifüjlendi. Üst faz alınıp yeni bir 1,5 ml'lik tüpe aktarıldı ve üzerine 500 µl kloroform-isoamilalkol (24:1) eklendi. 2 dk 10.000 rpm'de santrifüjlendi. Üst faz yeni bir 1,5 ml'lik tüpe alınıp üzerine 1 ml absolu etanol eklendi ve en az 1 gece beklemek üzere -20°C'ye bırakıldı. 15 dk 12.500 rpm'de santrifüjlendi. Tüpteki etanol atılıp, 500 µl %70'lik etanol eklendi ve birkaç saniye vortekslendi. 5 dk 12.500 rpm'de santrifüjlendi. Süpernatant atılıp, tüpün ağzı açık olarak en az 10 dk bekletildi. Pelet üzerine 50 µl DEPC-H₂O eklendi. 70°C'de 1 saat bırakıldı.

Elde edilen total RNA, 200 ünite Moloney murine leukemia virus reverse transkriptaz enzimi kullanılarak cDNA'ya reverse transkribe edildi. Bunun için elde edilen RNA örnekleri ile (1 µl) RT-PCR yapıldı. PCR ortamı; 5 µl 5X RT-PCR buffer, 10 µl 2 mM dNTP karışımı, 1 µl poli-T primeri, 0,1 µl reverse transkriptaz enzimi, 0,5 µl RNase inhibitörü ve 12 µl distile su ile hazırlandı. RT-PCR koşulları; 37 °C'de 1 saat ve 95 °C'de 5 dakika olarak uygulandı. Elde edilen cDNA'lar analizi yapılana kadar +4 °C'de saklandı.

3.4.2. Ekspresyon Tayini

Elde edilen cDNA örneklerinden Bax, Bcl-2, Fas ve kontrol geni olarak da beta aktin'in gen ekspresyonları PCR (Techne-Flexigene) cihazı ile belirlendi. Çalışmamızda RNA kontrolü ve kantitasyon için bir housekeeping gen olan beta aktin geni kullanıldı. Bax, Fas ve Bcl-2 genlerinde çoğaltılan bölgelerin dizisi sırasıyla, Şekil 3.5, Şekil 3.6 ve Şekil 3.7'de gösterilmiştir.

Bax, Bcl-2, Fas ve Beta aktin için PCR reaksiyonu 16 µl su, 2,5 µl PCR buffer (with (NH₄)₂SO₄), 2,5 µl dNTP karışımı, 0,5 µl primer (forward ve reverse) (Çizelge 3.1), 1,5 µl MgCl₂ ve 4 µl cDNA kullanılarak 1 siklus 96 °C'de 2 dakika, 35 siklus 96 °C 30 sn, * °C'de 45 sn, 72 °C'de 5 dakika ve son olarak 1 siklus 72 °C'de 7 dakika tutularak gerçekleştirildi (*: Annealing derecesi Bax için 57 °C, Bcl-2 için 60 °C, Fas için 56 °C olarak ayarlandı). İkinci PCR sonrasında Bax (Şekil 4.1), Fas (Şekil 4.2) ve Bcl-2 (Şekil 4.3) genlerinin ekspresyon düzeyleri görüntüleme sistemi (Vilber Lourmat) ile bant düzeyinde gösterildi. Her bir gruptan elde edilen ekspresyon oranı PhotoCapt programı yardımıyla ölçüldü ve beta aktin'e oranlanarak ekspresyonların semi-kantitatif değeri belirlendi.

Çizelge 3.1. Bax, Bcl-2, Fas ve β-Aktin genlerinin primer dizileri ve PCR sonrasında elde edilen bant uzunlukları (bp).

Gen	Primer Dizisi	Ürün (bp)
Bax	5'TGG CAG CTG ACA TGT TTT CTG AC 3' CGT CCC AAC CAC CCT GGT CT	195 bp
Bcl-2	5'CAG CTG CAC CTG ACG CCC TT 3'CCC AGC CTC CGT TAT CCT GGA	235 bp
Fas	5'CAA TGG GGA TGA ACC AGA CTGC 3'GGC AAA AGA AGA AGA CAA AGCC	324 bp
β-Aktin	5'TGA AGT GTG ACG TGG ACA TCCG 3'GCT GTC ACC TTC ACC GTT CCA G	449 bp

TGGCAGCTGACATGTTTTCTGACGGCAACTTCAACTGGGGCCGGGTGTGCGCCCTT
TTCTACTTTGCCAGCAAAGTGGTGTCAAAGGCCCTGTGCCAAAGGTGCCGGAACT
GATCAGAAACCATCATGGGCTGGACATTGGACTTCCTCCGGGAGCGGCTGTTGGGCT
GGATCCAAGACCAAGGTGGTTGGGACG

Şekil 3.5. Bax genine ait çoğaltılan bölgenin dizisi (195 bp).

CAGCTGCACCTGACGCCCTTCAACGC GCGGGGA CGCTTGGCACGGTGGTGGAGGA
GCTCTTCA GGGACGGGGTGAAGTGGGGGAGGATTGTGGCCTTCTTTGAGT
TCGGTGGGGTCA TGTGTGTGGA GAGCGTCAACGGGGA GATGTCGCCCCCTGGTG
GACAACATCGCCCTGTGGATGACTGAGTACCTGAACGGGCACTGCACACCTG
GATCCAGGATAACGGA GGCTGGG

Şekil 3.6. Bcl-2 genine ait çoğaltılan bölgenin dizisi (235 bp).

CAATGGGGATGAACCA GACTGC GTGCCCTGCCAAGAA GGGAA GGA GTACA CA
GACAAA GCCCATTTTCTTCCAAA TGCA GAA GATGTA GATTGTGTGATGAA GG
ACATGGCTTA GAA GTGGAAATAAACTGCACCCGGA CCCA GAATACCAA GTGCA
GATGTAAACCAAAC TTTTTTTGTA ACTCTACTGTATGTGAA CACTGTGACCCCTT
GCA CCAAATGTGAA CATGGAATCATCAA GGAATGCA CACTCA CCA GCAACA CC
AAGTGCAAA GAGGAA GGATCCA GATCTAACTTGGGGTGGCTTTGTCTTCTCTT
TTGCC

Şekil 3.7. Fas genine ait çoğaltılan bölgenin dizisi (324 bp).

TGAA GTGTGACGTGGACATCCGCAAA GACCTGTACGCCAACA CA GTGCTGTCT
GGCGGCA CCAACATGTACCCTGGCATTGCCGACAGGATGCA GAA GGA GATCAC
TGCCCTGGCA CCCA GCA CAATGAA GATCAA GATCATTGCTCCTCCTGAGCGCA
AGTACTCCGTGTGGA TCGGCGGCTCCATCCTGGCCTCGCTGTCCACCTTCCA GC
AGATGTGGATCA GCAA GCA GGA GTATGA CGA GTCCGGCCCCTCCATCGTCCAC
CGCAAATGCTTCTA GCGGGA CTATGACTTA GTTGC GTTACCCCTTCTTGA CA
AAACCTAACTTGC GCA GAAAACAA GATGAGATTGGCATGGCTTTATTTGTTTTT
TTTGT TTTGTTTGGT TTTTTTTTTTTTGGCTTGA CTCA GGATTTAAAAA CTG
GAACGGTGAA GGTGACAGC

Şekil 3.8. Beta Aktin genine ait çoğaltılan bölgenin dizisi (449 bp).

3.5. Real Time PCR-Comparative C_T ($\Delta\Delta C_t$) Metodu ile Ekspresyon Analizleri

RT-PCR ile semi kantitatif ekspresyon analizi yapılan aynı örneklerin RNA'larından yeniden cDNA eldesi yapılarak, Bax, Bcl-2, Fas ve beta aktin'in gen ekspresyonları Real Time PCR (ABI 7500, Applied Biosystems) cihazı ile ve

“Comparative C_T ($\Delta\Delta C_t$)” analizi yapılarak belirlendi (53, 54, 55). Bu çalışma hazırlığı için bu genlerin her birinin primer ve prob dizaynı yapıp sentezletildi.

3.5.1. Kullanılan Primer ve Problar

Primer Express 3.0 (Applied Biosystems) programı kullanılarak Bax geninin “NM_138761.3| Homo sapiens BCL2-associated X protein (BAX), transcript variant alpha, mRNA” (56), Bcl-2 geninin “AY220759.1| Homo sapiens B-cell CLL/Lymphoma 2 (BCL2) gene” (57), Fas geninin “BC012479.1| Homo sapiens Fas (TNF receptor superfamily, member 6, mRNA” (58) ve beta aktin geninin “NM_001101.3| Homo sapiens actin, beta (ACTB),mRNA” (59) dizilerinden primer ve prob dizileri oluşturuldu (Çizelge 3.2).

Primer ve problar, “Metabion International AG, D-82152 Martinsried/Deutschland” tarafından sentezlendi.

Çizelge 3.2. Real-Time PCR’da kullanılan Bax, Bcl-2, Fas ve β -Aktin genlerinin primer ve prob dizileri.

Gen	Primer ve Prob Dizileri
Bax	F 5’-GGTTGTCGCCCTTTTCTACTTTG-3’ R 5’-CAGTCCGGCACCTTGGT-3’ Pr 5’-FAM-CAGCAAACCTGGTGTCTCAAGGCCCT-BHQ-1-3’
Bcl-2	F 5’-GGATTGFGGCCTTCTTTGAGTT-3’ R 5’-TCCACAGGGCGATGTTGTC-3’ Pr 5’-FAM-TCAACCGGGA GATGTCGCCCC-BHQ-1-3’
Fas	F 5’-CACTGTGACCCCTTGCAACAA-3’ R 5’-AGTTAGATCTGGATCCTTCTCTTTG-3’ Pr 5’-FAM-AATCATCAAGGAATGCACTCAACCA GCA-BHQ-1-3’
β -Aktin	F 5’-GGCACCCAGCA CAATGAA G-3’ R 5’-GCCGATCCACA CGGA G TACT-3’ Pr 5’-Yakima Yellow-TCAAGATCATTGCTCCTCCTGAGCGC-BHQ-1-3’

3.5.2. Ekspresyon Tayini

Primer ve problar kullanılarak Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Real Time Polymerase Chain Reaction, RT-PCR) yöntemiyle “Comparative C_T

($\Delta\Delta C_t$)” analizi yapılarak Bax, Bcl-2, Fas genlerinin kantitasyonu belirlendi. Kontrol geni olarak insan Beta Aktin geni (actin beta, ACTB) kullanıldı.

Comparative C_T analiziyle ekspresyon tayini yapabilmek için ayrıca bir internal kontrol olarak standart bir RNA’dan (Taqman Control-Human RNA, 50ng/ μ l) hazırlanan cDNA kullanıldı.

3.5.2.1 Real-Time PCR Reaksiyon Ortamının Hazırlanışı

Real-Time PCR reaksiyon ortamı, total 25 μ l olacak şekilde hazırlandı:

- a) 12.5 μ l, 2X TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems)
- b) Son konsantrasyon; BAX-F, BAX-R, BCL2-F, BCL2-R, FAS-F, FAS-R, ACTB-F ve ACTB-R primerlerinden 900 nmol olacak şekilde primerler kullanıldı. FAM ile işaretli BAX-Pr, BCL2-Pr ve FAS-Pr problarından ve Yakima Yellow ile işaretli ACTB-Pr probundan 200 nmol olacak şekilde problar kullanıldı.
- c) 2,5 μ l cDNA örneği
- d) 5 μ l Distile Su

3.5.2.2 Real-Time PCR Reaksiyon Şartları

50°C’de	2 dakika ön inkübasyon	(1 döngü)
95°C’de	10 dakika aktivasyon	(1 döngü)
95°C’de	15 saniye denatürasyon	(40 döngü)
60°C’de	1 dakika bağlanma/uzama	(40 döngü)

Real Time PCR işlemi ve kantitasyon “ABI Prism 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems)” cihazı ve “7500 Software; SDS 2.0.3 software for 7500 Real Time PCR Product (Applied Biosystems)” programı kullanılarak gerçekleştirildi.

3.6. İstatiksel Analizler

RT-PCR ile semi-kantitatif ekspresyon tayini ile elde edilen verilerin analizinde iki yönlü varyans analizi (Two-Way Anova) kullanıldı. Anova sonucunda farklılık gösteren alt grupların belirlenmesinde Bonferroni Post-hoc testinden yararlanıldı. Değişkenlerin tanıtıcı istatistikleri ortalama \pm standart sapma cinsinden verildi.

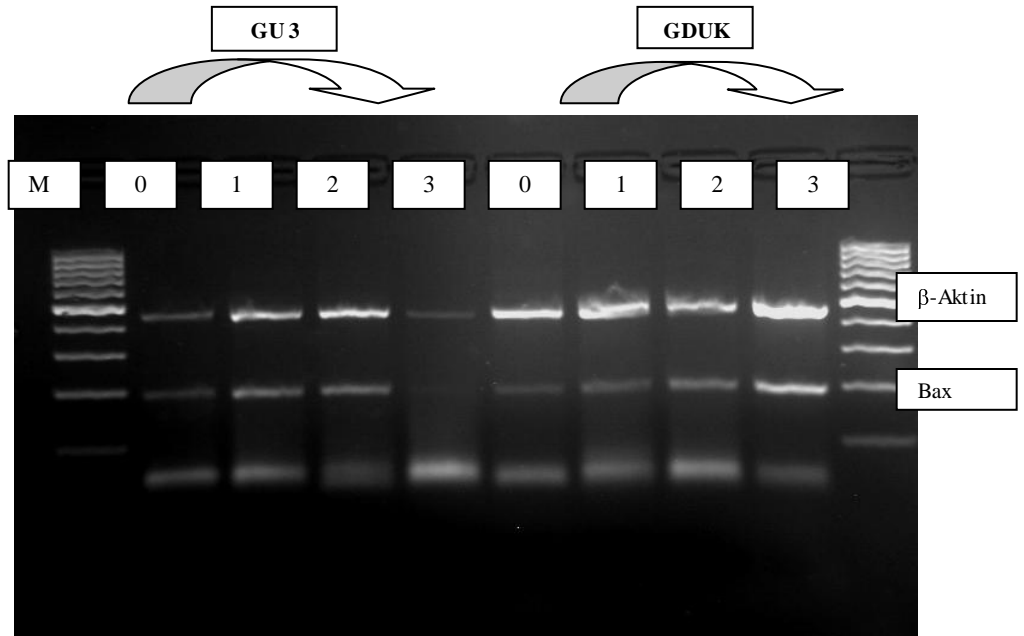
Real-Time PCR ile “Comparative C_T ($\Delta\Delta C_t$)” analizi yapılarak elde edilen verilerin istatistik analizlerinde, Bax, Bcl-2 ve Fas genlerinin ekspresyon miktarlarını gösteren $\Delta\Delta C_t$ değerleri, $2^{-\Delta\Delta C_t}$ şeklinde yeniden hesaplandı. Hesaplanan Bax, Bcl-2 ve Fas genlerinin ekspresyon düzeylerinin hem gruplar arasında hem de EGF dozları arasında farklılık gösterip göstermediğinin incelenmesi amacıyla İki Faktörlü Faktöriyel Varyans Analizi testinden yararlanıldı.

Tüm istatistik analizlerde SPSS V.11.5 paket programı kullanıldı ve analiz sonucunda $p \leq 0,05$ olan bulgular anlamlı olarak kabul edildi.

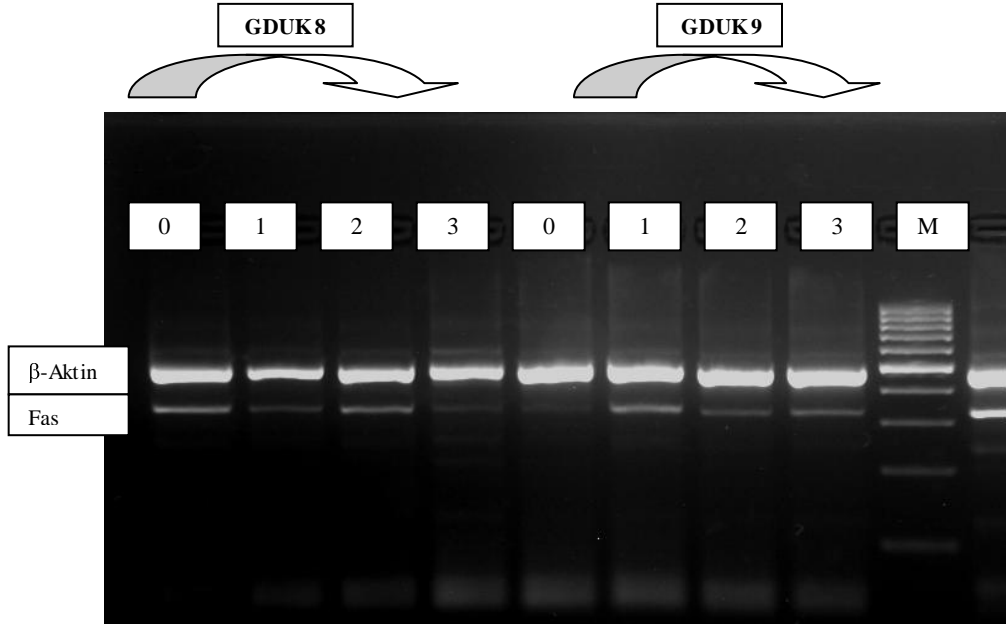
4. BULGULAR

4.1. RT-PCR ile Semi-Kantitatif Ekspresyon Analiziyle İlgili Bulgular

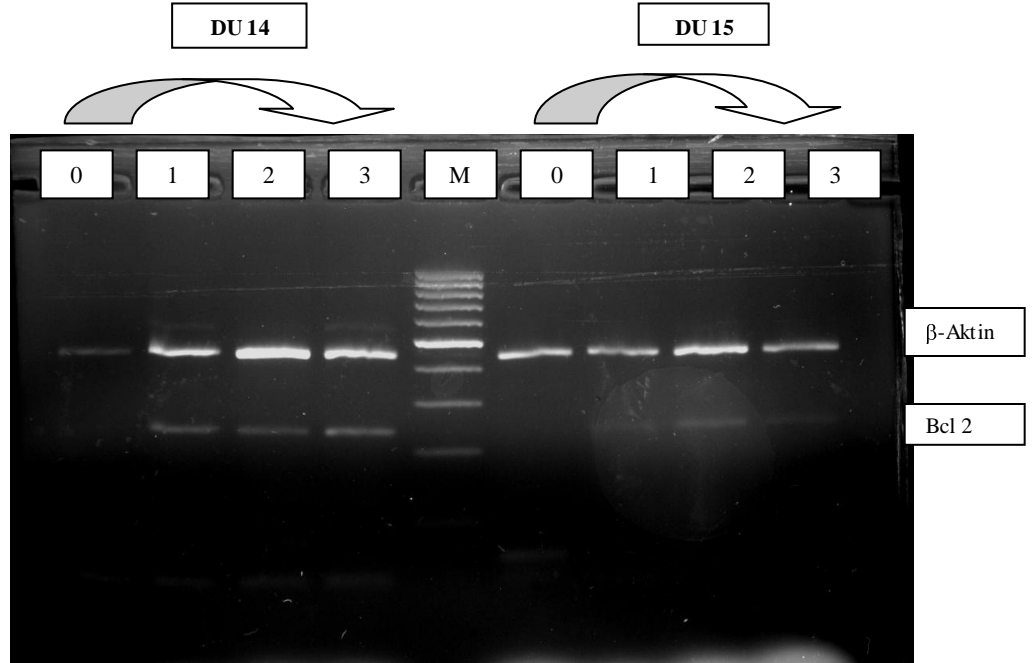
Ülserli hastalardan alınan biyopsi örnekleriyle kurulan primer kültürler konfluent olduktan sonra 24 saat serum içermeyen kültür ortamında bekletildi. 24. saatte bu kültürlerle 20 ng/μl, 50 ng/μl ve 100 ng/μl olmak üzere 3 farklı dozda EGF uygulaması yapıldı. Bu kültürlerden manuel yöntemle elde edilen RNA'lar kullanılarak cDNA'ları elde edildi ve apoptotik genlerin primerleri ve kontrol geni olarak da β-Aktin kullanılarak yapılan ikinci PCR'in ürünleri agaroz jelde yürütülerek bant yoğunlukları belirlendi (Şekil 4.1, Şekil 4.2 ve Şekil 4.3). Aynı şekilde hücre hattı da (NCI-N87) önce flasklara, daha sonra da petrilere pasajlanarak, primer hücre kültürlerine uygulanan standart prosedürlerin tamamı uygulandı. Birbirinden bağımsız toplam 13 pasaja EGF uygulaması, RNA izolasyonu ve ilgili genlerin primerleriyle PCR analizi yapıldı. Hücre hattı için yapılan ikinci PCR'in ürünleri de agaroz jelde yürütülerek bant yoğunlukları belirlendi.



Şekil 4.1. Farklı dozlarda epidermal büyüme faktörü uygulanan kültürlerden elde edilen cDNA'lar ile kontrol geni olarak β-Aktin'in kullanıldığı Bax geni için yapılan PCR sonrasında elde edilen elektroforez görüntüsü. (0: Kontrol; 1: 20 ng/μl EGF; 2: 50 ng/μl EGF; 3: 100 ng/μl EGF) (Beta Aktin=447bp; Bax=195bp) (M: Marker [100bp]; GU: Gastrik ülser; GDUK: Kontrol)



Şekil 4.2. Farklı dozlarda epidermal büyüme faktörü uygulanan kültürlerden elde edilen cDNA'lar ile kontrol geni olarak β -Aktin'in kullanıldığı Fas geni için yapılan PCR sonrasında elde edilen elektroforez görüntüsü. (0: Kontrol; 1: 20 ng/ μ l EGF; 2: 50 ng/ μ l EGF; 3: 100 ng/ μ l EGF) (Beta Aktin=447bp; Fas=324bp) (M: Marker [100bp]; GDUK: Kontrol)



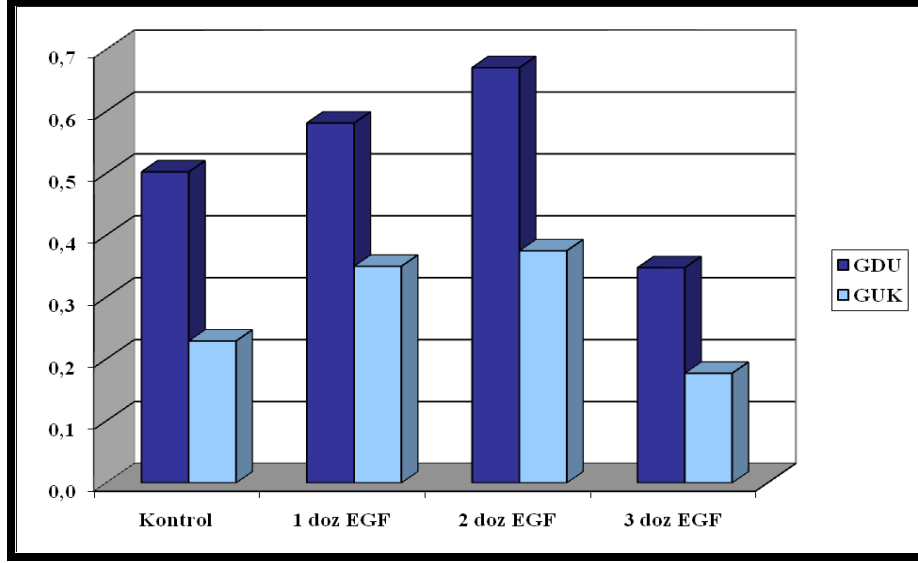
Şekil 4.3. Farklı dozlarda epidermal büyüme faktörü uygulanan kültürlerden elde edilen cDNA'lar ile kontrol geni olarak β -Aktin'in kullanıldığı Bcl-2 geni için yapılan PCR sonrasında elde edilen elektroforez görüntüsü. (0: Kontrol; 1: 20 ng/ μ l EGF; 2: 50 ng/ μ l EGF; 3: 100 ng/ μ l EGF) (Beta Aktin=447bp; Bcl-2=235bp) (M: Marker [100bp]; DU: Duodenal ülser)

Her bir gruptan elde edilen bant yoğunlukları, beta-aktin'in bant yoğunluğuna bölünerek ekspresyonların semi-kantitatif oranı saptandı. Elde edilen veriler SPSS (V.11.5) programına aktarılarak istatistiksel analiz yapıldı. Ayrıca EGF uygulaması için her bireyin negatif kontrole göre ekspresyon oranları da karşılaştırılarak EGF uygulamasının ilgili genlerin ekspresyonu üzerine etkisi olup olmadığı da değerlendirildi. Çalışma planlanırken, içeriğine dahil edilmiş olan FasL geninin tüm hücre kültürlerinde genel olarak ekspresyonunun çok az olduğu belirlendiğinden, istatistik analizi yapılamadı. Ve bu nedenle değerlendirmeye alınmadı.

İstatistik analiz sonuçlarına göre; primer hücre kültürlerinde uyguladığımız EGF dozlarıyla, çalışmaya dahil edilen apoptotik genlerin ekspresyon düzeyleri arasında bir ilişkiye rastlanmadı (Bax, $p=0.991$; Fas, $p=0.503$; Bcl-2, $p=0.173$) (Çizelge 4.1, 4.2 ve 4.3). EGF uygulanan ve uygulanmayan petripler arasındaki ana etkiye (mean effect) bakıldığında da fark olmadığı görüldü (Bax, $p=0.591$; Fas, $p=0.768$; Bcl-2, $p=0.803$) (Çizelge 4.1, 4.2 ve 4.3) (Şekil 4.4, 4.5 ve 4.6).

Çizelge 4.1. EGF uygulanan hücrelerde Bax geni için ekspresyon oranı (E) değerinin ortalamaları ve standart sapmaları. (GDU: Gastroduodenal ülserli hasta grubu; GDUK: Kontrol grubu)

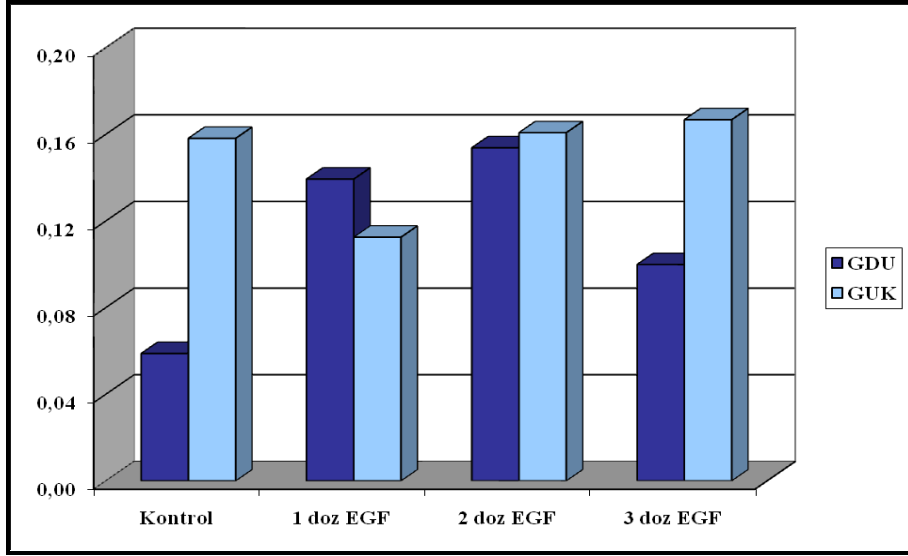
Bax Ekspresyonu					
Grup	Uygulanan EGF Miktarı (ng/μl)	N	E Değeri Ortalaması	Standart Sapma	Standart Hata
GDU	0	27	0.310	0.740	0.1424
	20	29	0.458	0.874	0.1624
	50	29	0.295	1.436	0.2668
	100	28	0.309	0.295	0.055
GDU K	0	12	0.205	0.152	0.442
	20	12	0.269	0.366	0.105
	50	11	0.209	0.427	0.128
	100	11	0.133	0.105	0.031



Şekil 4.4. EGF uygulaması yapılan hasta ve kontrollerdeki Bax geni ekspresyon düzeylerinin grafiksel gösterimi. (Kontrol: EGF uygulaması yok; 1 Doz EGF: 20 ng/µl; 2 Doz EGF: 50 ng/µl; 3 Doz EGF: 100 ng/µl) (GDU: Gastroduodenal ülserli hasta grubu; GDUK: Kontrol grubu)

Çizelge 4.2. EGF uygulanan hücrelerde Fas geni için ekspresyon oranı (E) değerinin ortalamaları ve standart sapmaları. (GDU: Gastroduodenal ülserli hasta grubu; GDUK: Kontrol grubu)

Fas Ekspresyonu					
Grup	Uygulanan EGF Miktarı (ng/µl)	N	E Değeri Ortalaması	Standart Sapma	Standart Hata
GDU	0	12	0,023	0,344	0,009
	20	15	0,053	0,149	0,038
	50	13	0,049	0,192	0,535
	100	12	0,037	0,072	0,020
GDU K	0	7	0,097	0,190	0,072
	20	8	0,085	0,950	0,033
	50	7	0,087	0,143	0,054
	100	7	0,059	0,177	0,670

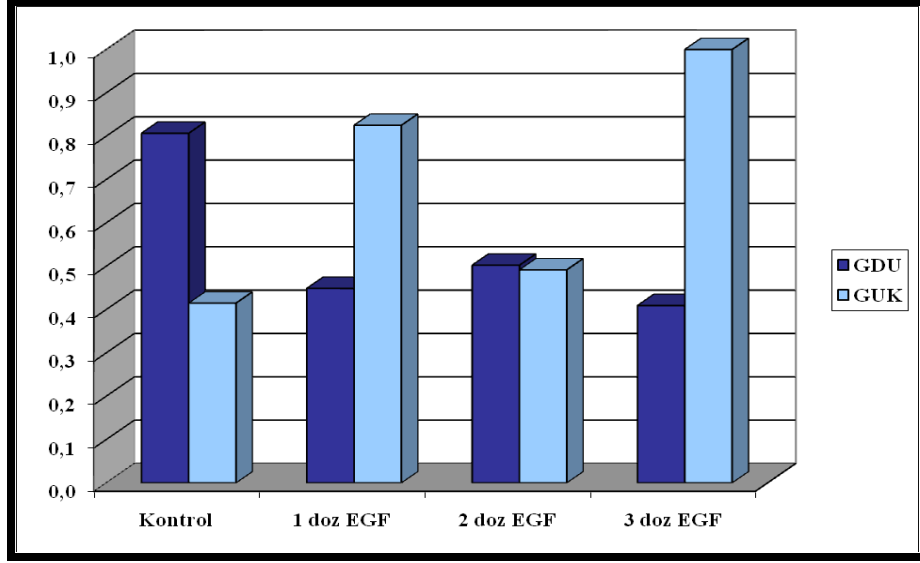


Şekil 4.5. EGF uygulaması yapılan hasta ve kontrollerdeki Fas geni ekspresyon düzeylerinin grafiksel gösterimi. (Kontrol: EGF uygulaması yok; 1 Doz EGF: 20 ng/µl; 2 Doz EGF: 50 ng/µl; 3 Doz EGF: 100 ng/µl) (GDU: Gastroduodenal ülserli hasta grubu; GDUK: Kontrol grubu)

Çizelge 4.3. EGF uygulanan hücrelerde Bcl-2 geni için ekspresyon oranı (E) değerinin ortalamaları ve standart sapmaları. (GDU: Gastroduodenal ülserli hasta grubu; GDUK: Kontrol grubu)

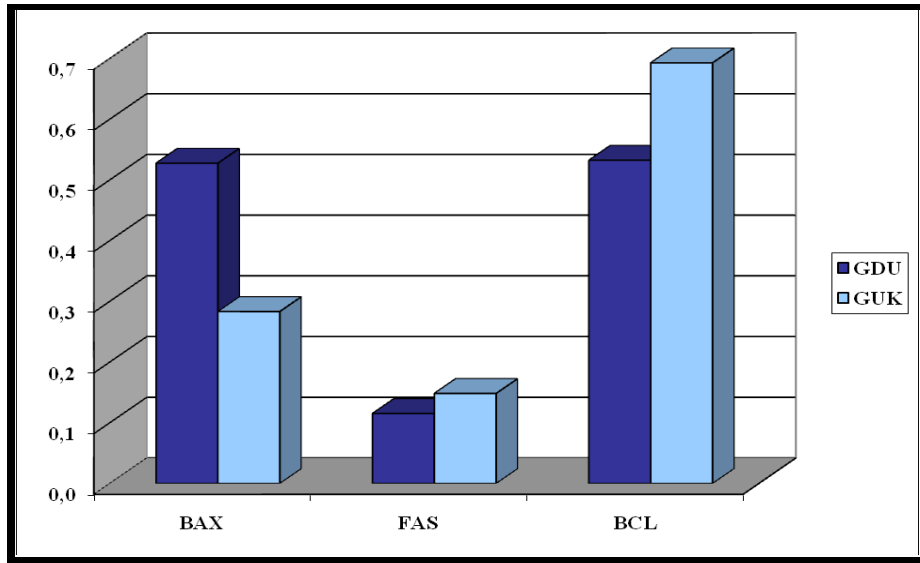
Bcl-2 Ekspresyonu

Grup	Uygulanan EGF Miktarı (ng/µl)	N	E Değeri Ortalaması	Standart Sapma	Standart Hata
GDU	0	17	0,537	1.479	0.358
	20	20	0,334	0.411	0.091
	50	18	0,354	0.773	0.182
	100	20	0,299	0.297	0.066
GDU K	0	8	0,308	0.325	0.115
	20	8	0,660	1.009	0.356
	50	9	0,442	0.421	0.140
	100	8	0,851	1.166	0.412



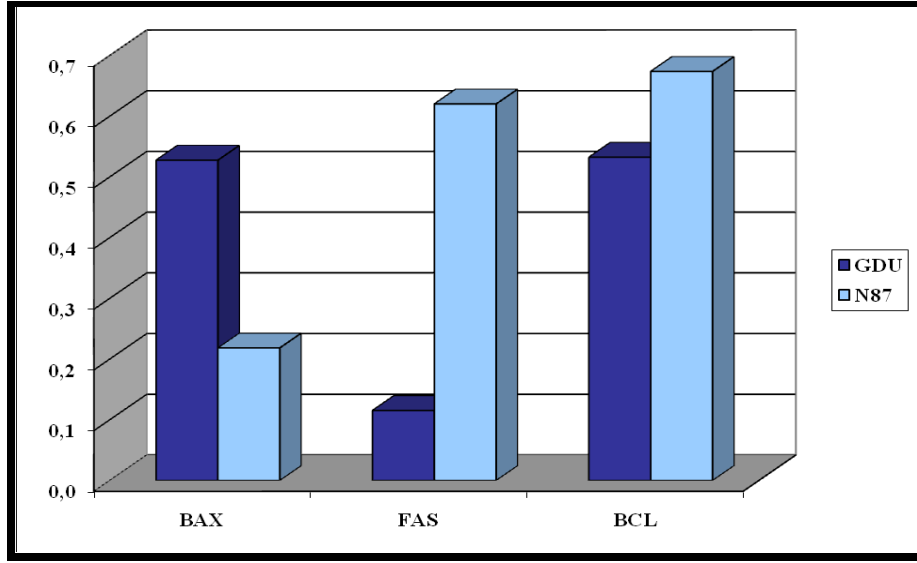
Şekil 4.6. EGF uygulaması yapılan hasta ve kontrollerdeki Bcl-2 geni ekspresyon düzeylerinin grafiksel gösterimi. (Kontrol: EGF uygulaması yok; 1 Doz EGF: 20 ng/µl; 2 Doz EGF: 50 ng/µl; 3 Doz EGF: 100 ng/µl) (GDU: Gastroduodenal ülserli hasta grubu; GDUK: Kontrol grubu)

EGF'den bağımsız olarak, tüm gruplar arasındaki apoptotik genlerin ekspresyon düzeyleri değerlendirildiğinde, primer kültürleri yapılan hasta grubundaki Bax, Fas ve Bcl-2 genlerinin ekspresyon düzeyleriyle kontrol grubu arasında fark olmadığı belirlendi (sırasıyla; $p=0.090$; $p=0.263$; $p=0.368$) (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. EGF uygulaması yapılan hasta ve kontrollerdeki Bax, Fas ve Bcl-2 genlerinin total ekspresyon düzeylerinin grafiksel gösterimi.

N87 hücre hattı ile primer kültürlerini hazırlamış olduğumuz ülserli hastalardan oluşturduğumuz grup arasında ise Bax geninin ekspresyon düzeyinin ülserli hastalarda, Fas geninin ekspresyon düzeyinin ise mide kanseri hücre hattında artmış olduğu belirlendi (sırasıyla, $p=0.021$; $p=0.001$) (Şekil 4.8). EGF uygulanan ve uygulanmayan petripler arasındaki ana etkiye (mean effect) bakıldığında da ülserli hasta grubu ve hücre hattı arasında fark olmadığı görüldü (Bax, $p=0.785$; Fas, $p=0.472$; Bcl-2, $p=0.068$) (Çizelge 4.4).



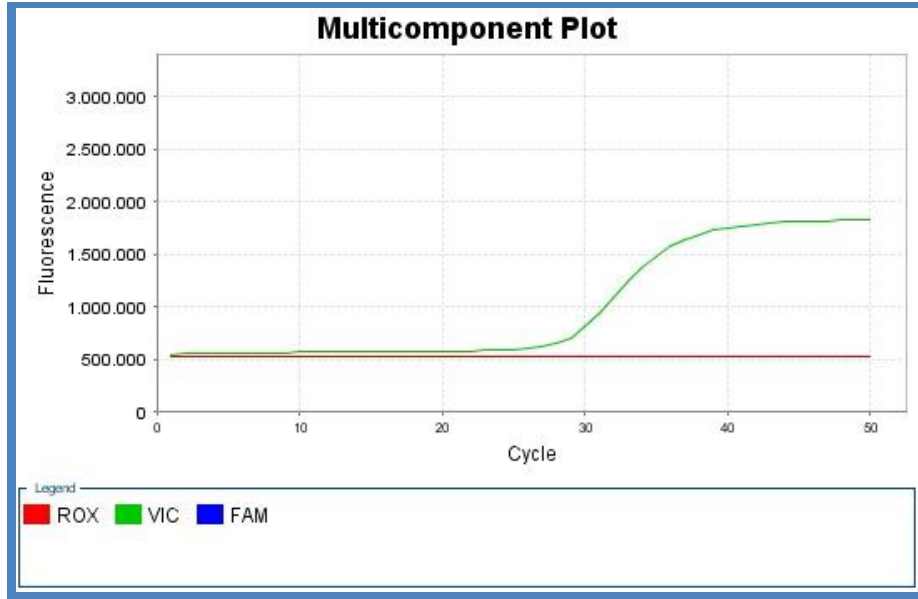
Şekil 4.8. EGF uygulaması yapılan ülserli hastaların primer kültürleri ve mide kanseri hücre hattındaki Bax, Fas ve Bcl-2 genlerinin total ekspresyon düzeylerinin grafiksel gösterimi. (GDU: Gastroduodenal ülserli hasta grubu; N87: Mide Kanseri Hücre Hattı)

Çizelge 4.4 Ülserli hastaların primer kültürleri ve mide kanseri hücre hattındaki Bax, Fas ve Bcl-2 genlerinin ekspresyon oranı (E) değerinin ortalamaları ve standart sapmaları. (GDU: Gastroduodenal ülserli hasta grubu; N87: Mide Kanseri Hücre Hattı)

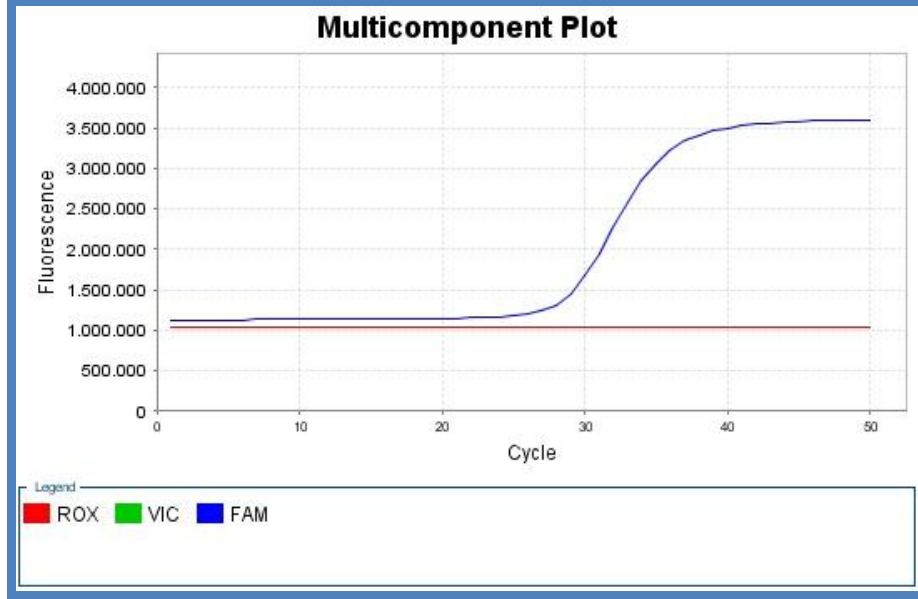
Grup	Apoptozis Genleri	N	E Değeri Ortalaması	Standart Sapma	Standart Hata
GDU	Bax	113	0,343	0.932	0.087
	Fas	52	0,406	0.132	0.018
	Bcl-2	75	0,379	0.836	0.096
N 87	Bax	52	0,214	0.185	0.025
	Fas	29	0,102	0.628	0.116
	Bcl-2	32	0,375	0.786	0.139

4.2. Real Time-PCR (Comparative C_T) Analiziyle İlgili Bulgular

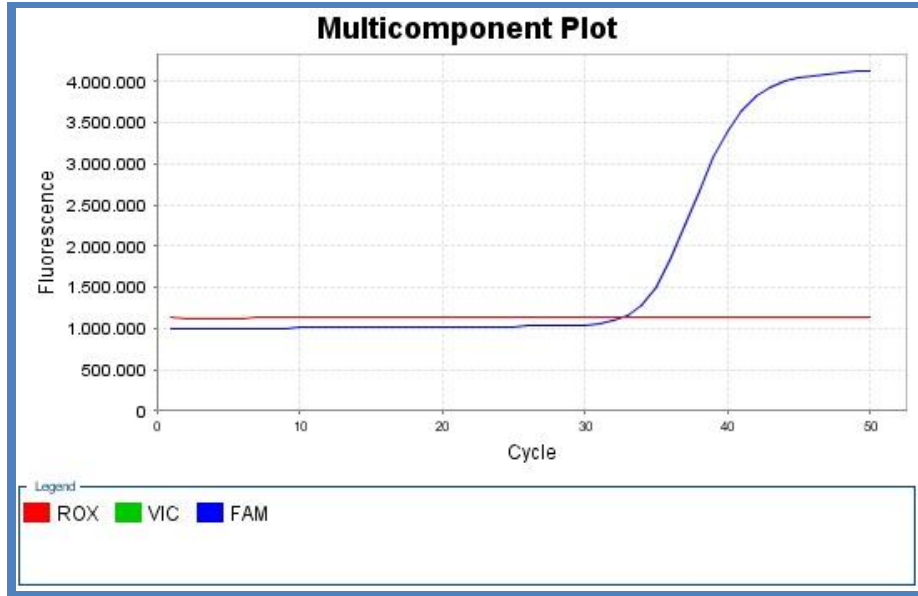
20 ng/ μ l, 50 ng/ μ l ve 100 ng/ μ l olmak üzere 3 farklı dozda EGF uygulaması yapılan primer kültürlerden ve hücre hattından elde edilen cDNA'lar ile Bax, Bcl-2, Fas ve beta aktin'in gen ekspresyonları Real-Time PCR (ABI 7500, Applied Biosystems) cihazı ile ve "Comparative C_T ($\Delta\Delta$ Ct)" analizi yapılarak belirlendi. Real-Time PCR cihazı ile her bir gen için elde edilen PCR amplifikasyon eğrileri ile her bir örneğin ekspresyon oranları değerlendirildi (Sırasıyla Beta Aktin, Bax, Bcl-2, Fas; Şekil 4.9, Şekil 4.10, Şekil 4.11, Şekil 4.12). Elde edilen veriler SPSS (V.11.5) programına aktarılarak istatistiksel analiz yapıldı.



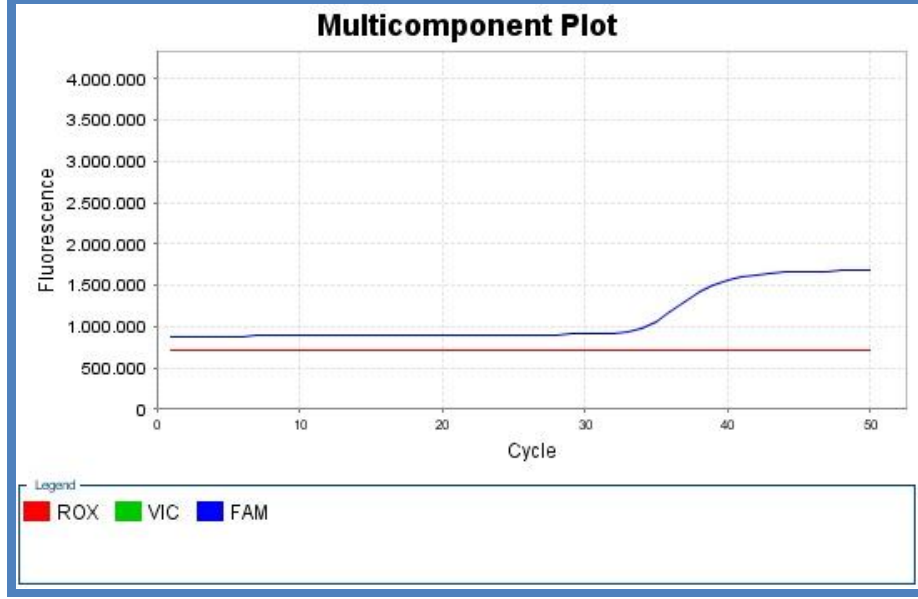
Şekil 4.9. Beta Aktin genine ait, YAKIMA YELLOW ile işaretlenmiş probun Real Time PCR amplifikasyon eğrisi.



Şekil 4.10. Bax genine ait, FAM'la işaretlenmiş probun Real Time PCR amplifikasyon eğrisi.

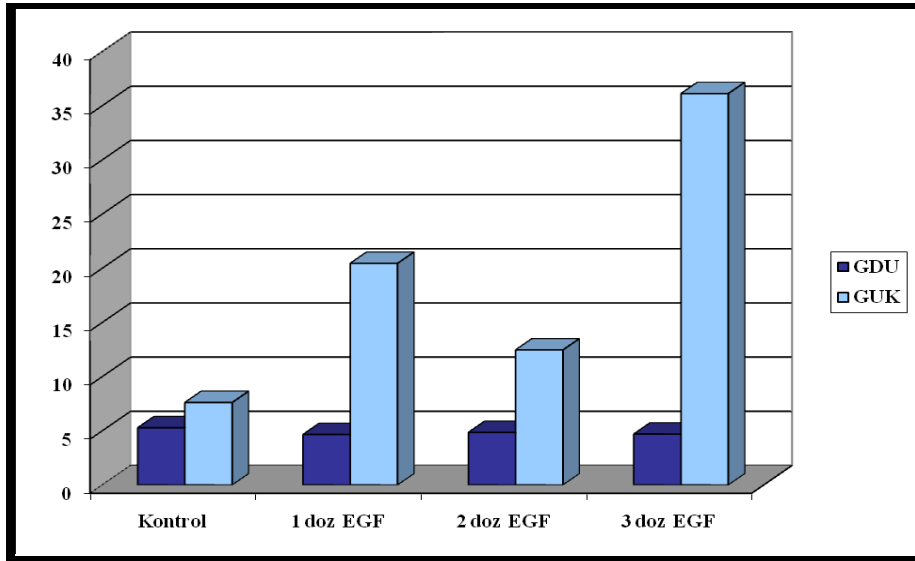


Şekil 4.11. Bcl-2 genine ait, FAM'la işaretlenmiş probun Real Time PCR amplifikasyon eğrisi.



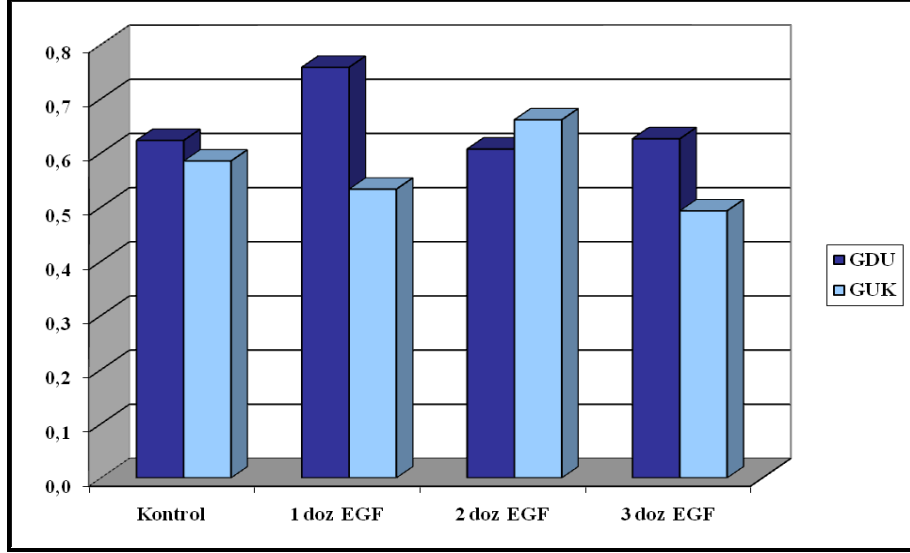
Şekil 4.12. Fas genine ait, FAM'la işaretlenmiş probun Real Time PCR amplifikasyon eğrisi.

İstatistik analiz sonuçlarına göre; primer hücre kültürlerinde uyguladığımız EGF dozlarıyla, çalışmaya dahil edilen apoptotik genlerin ekspresyon düzeyleri arasında bir ilişkiye rastlanmadı (Bax, $p=0.069$; Fas, $p=0.877$; Bcl-2, $p=0.532$) (Çizelge 4.5). EGF uygulanan ve uygulanmayan petripler arasındaki ana etkiye (mean effect) bakıldığında da fark olmadığı görüldü (Bax, $p=0.056$; Fas, $p=0.646$; Bcl-2, $p=0.961$) (Çizelge 4.5) (Şekil 4.13, 4.14 ve 4.15).

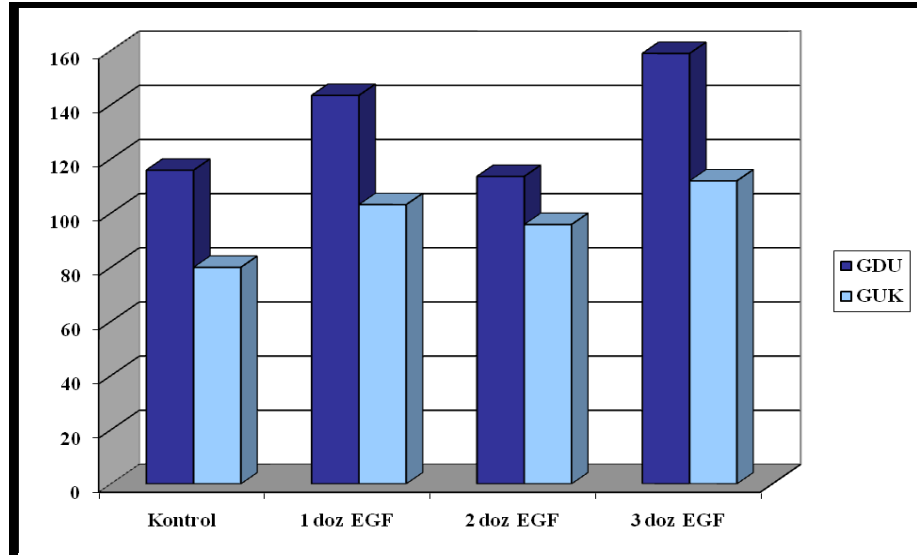


Şekil 4.13. Real Time PCR ile Comparative C_T Analizine göre belirlenen, EGF uygulaması yapılan hasta ve kontrollerdeki Bax geni ekspresyon düzeylerinin grafiksel gösterimi. (Kontrol: EGF uygulaması yok; 1 Doz EGF: 20 ng/ μ l; 2 Doz

EGF: 50 ng/μl; 3 Doz EGF: 100 ng/μl) (GDU: Gastroduodenal ülserli hasta grubu; GDUK: Kontrol grubu)



Şekil 4.14. Real Time PCR ile Comparative C_T Analizine göre belirlenen, EGF uygulaması yapılan hasta ve kontrollerdeki Fas geni ekspresyon düzeylerinin grafiksel gösterimi. (Kontrol: EGF uygulaması yok; 1 Doz EGF: 20 ng/μl; 2 Doz EGF: 50 ng/μl; 3 Doz EGF: 100 ng/μl) (GDU: Gastroduodenal ülserli hasta grubu; GDUK: Kontrol grubu)

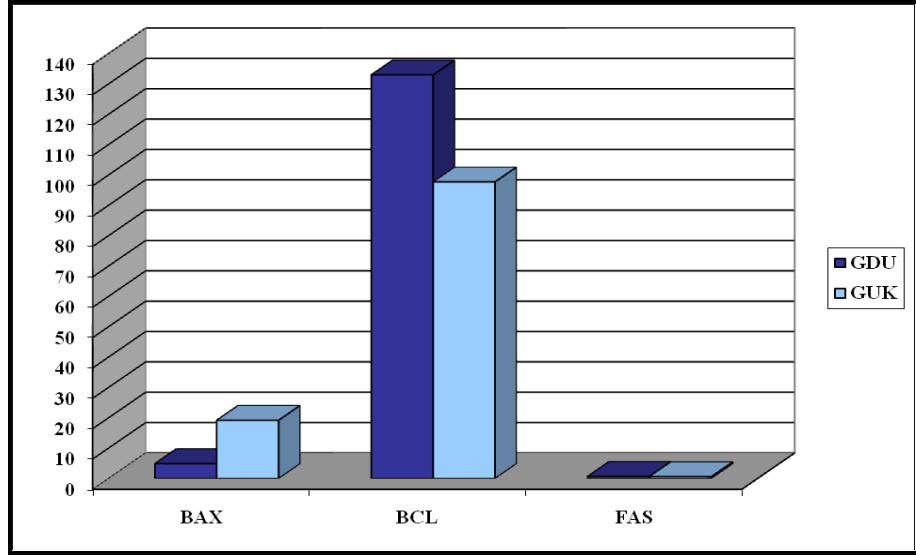


Şekil 4.15. Real Time PCR ile Comparative C_T Analizine göre belirlenen, EGF uygulaması yapılan hasta ve kontrollerdeki Bcl-2 geni ekspresyon düzeylerinin grafiksel gösterimi. (Kontrol: EGF uygulaması yok; 1 Doz EGF: 20 ng/μl; 2 Doz EGF: 50 ng/μl; 3 Doz EGF: 100 ng/μl) (GDU: Gastroduodenal ülserli hasta grubu; GDUK: Kontrol grubu)

Çizelge 4.5. EGF uygulaması yapılan hasta ve kontrollerdeki Bax, Fas ve Bcl-2 genlerinin Real Time PCR ile Comparative C_T Analizi yapılarak belirlenen ekspresyon düzeyi ortalamaları ve standart hataları. (GDU: Gastroduodenal ülserli hasta grubu; GDUK: Kontrol grubu)

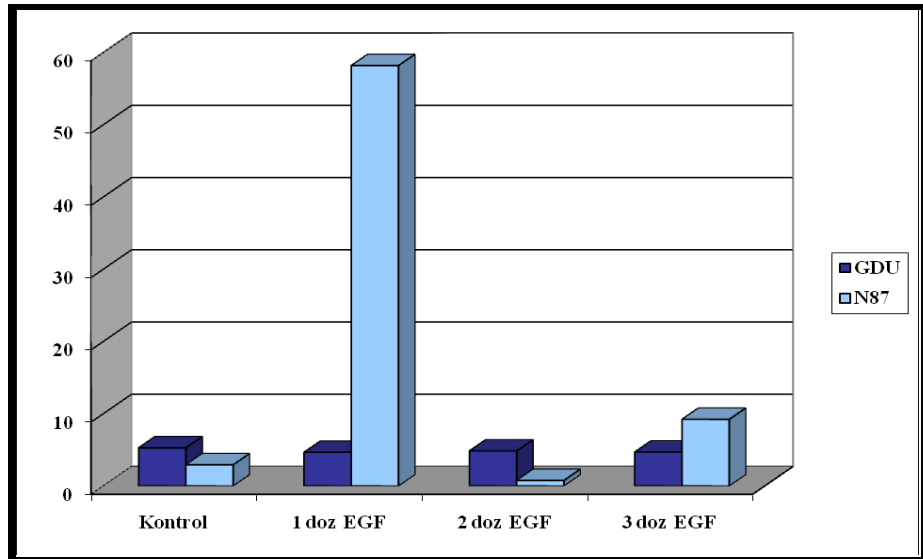
GRUP	EGF (ng/μl)		BAX	FAS	BCL-2	
GDU	Kontrol (0)	Ortalama	5,273	0,623	115,839	
		Standart Hata	2,614	0,086	21,866	
	1 doz (20)	Ortalama	4,658	0,758	143,458	
		Standart Hata	1,896	0,075	17,021	
	2 doz (50)	Ortalama	4,849	0,607	113,538	
		Standart Hata	1,302	0,091	15,064	
	3 doz (100)	Ortalama	4,697	0,626	158,938	
		Standart Hata	2,098	0,081	32,529	
	Total	Ortalama	4,869	0,653	132,943	
		Standart Hata	1,003	0,042	11,319	
	GUK	Kontrol (0)	Ortalama	7,610	0,585	79,969
			Standart Hata	3,836	0,144	12,155
1 doz (20)		Ortalama	20,450	0,533	103,117	
		Standart Hata	7,661	0,138	25,563	
2 doz (50)		Ortalama	12,461	0,661	95,783	
		Standart Hata	4,981	0,124	19,163	
3 doz (100)		Ortalama	36,117	0,493	111,888	
		Standart Hata	22,312	0,139	21,794	
Total		Ortalama	19,160	0,568	97,689	
		Standart Hata	6,114	0,066	9,916	

EGF'den bağımsız olarak, tüm gruplar arasındaki apoptotik genlerin ekspresyon düzeyleri değerlendirildiğinde, primer kültürleri yapılan hasta grubundaki Bax geninin ekspresyon düzeyi ile kontrol grubu arasında fark olduğu görüldü. Bax geninin kontrol grubundaki ekspresyon düzeyi, hasta grubuna göre daha yüksekti ($p=0.001$). Fas ve Bcl-2 genlerinin ekspresyon düzeyleri bakımından ise, hasta ve kontrol grubu arasında fark olmadığı belirlendi (sırasıyla; $p=0.294$; $p=0.080$) (Şekil 4.16).

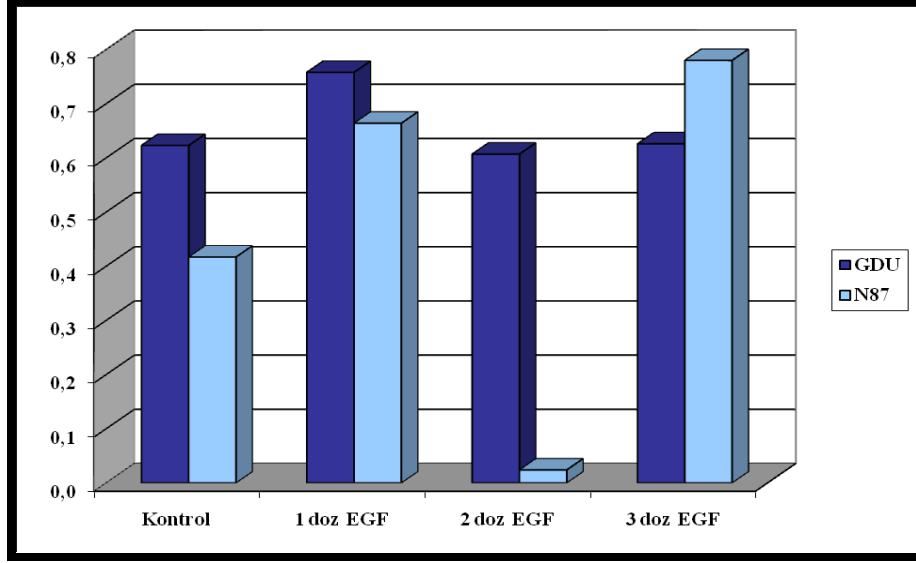


Şekil 4.16. Real Time PCR ile Comparative C_T Analizine göre belirlenen, EGF uygulaması yapılan hasta ve kontrollerdeki Bax, Fas ve Bcl-2 genlerinin total ekspresyon düzeylerinin grafiksel gösterimi.

Petirilere uygulanan EGF dozları bakımından ülserli hasta grubu ile hücre hattı arasında Bax ve Fas genlerinin ekspresyon düzeylerinde farklılık olduğu belirlendi. 1 doz EGF (20 ng/ μ l) uygulandığında hücre hattında Bax geninin ekspresyon düzeyinde belirgin bir artış olduğu ($p=0.001$), 2 doz EGF (50 ng/ μ l) uygulanmasının ise hücre Fas geninin ekspresyonunu azalttığı görüldü (sırasıyla; $p= 0.001$, $p=0.033$) (Şekil 4.17, Şekil 4.18) (Çizelge 4.6).



Şekil 4.17. Real Time PCR ile Comparative C_T Analizine göre belirlenen, EGF uygulaması yapılan ülserli hastaların primer kültürleri ve mide kanseri hücre hattındaki Bax geni ekspresyon düzeylerinin grafiksel gösterimi. (GDU: Gastroduodenal ülserli hasta grubu; N87: Mide Kanserli Hücre Hattı)

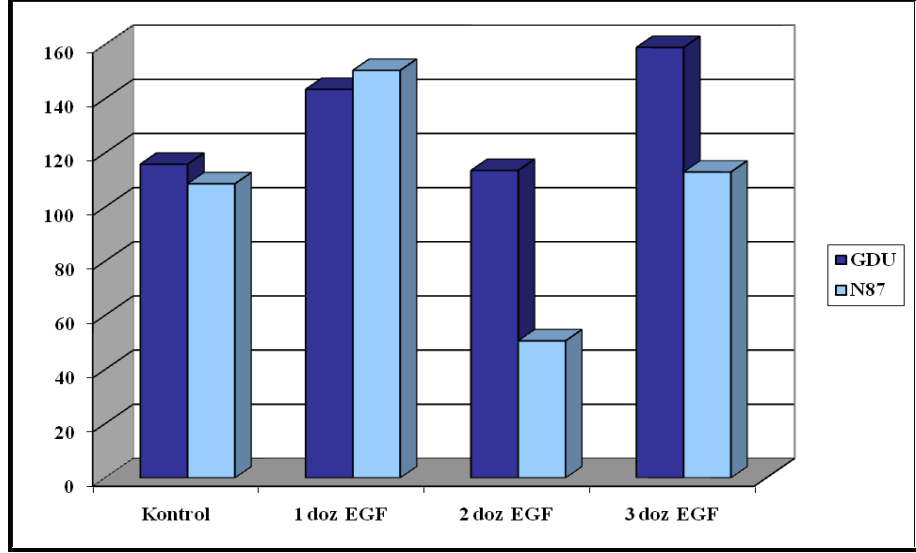


Şekil 4.18. Real Time PCR ile Comparative C_T Analizine göre belirlenen, EGF uygulaması yapılan ülserli hastaların primer kültürleri ve mide kanseri hücre hattındaki Fas geni ekspresyon düzeylerinin grafiksel gösterimi. (GDU: Gastroduodenal ülserli hasta grubu; N87: Mide Kanseri Hücre Hattı)

Çizelge 4.6. Ülserli hastaların primer kültürleri ve mide kanseri hücre hattındaki Bax, Fas ve Bcl-2 genlerinin Real Time PCR ile Comparative C_T Analizi yapılarak belirlenen ekspresyon düzeyi ortalamaları ve standart hataları. (GDU: Gastroduodenal ülserli hasta grubu; N87: Mide Kanseri Hücre Hattı)

GRUP	EGF (ng/ μ l)		BAX	FAS	BCL-2
GDU	Kontrol (0)	Ortalama	5,273	0,623	115,839
		Standart Hata	2,614	0,086	21,866
	1 doz (20)	Ortalama	4,658	0,758	143,458
		Standart Hata	1,896	0,075	17,021
	2 doz (50)	Ortalama	4,849	0,607	113,538
		Standart Hata	1,302	0,091	15,064
	3 doz (100)	Ortalama	4,697	0,626	158,938
		Standart Hata	2,098	0,081	32,529
	Total	Ortalama	4,869	0,653	132,943
		Standart Hata	1,003	0,042	11,319
N87	Kontrol (0)	Ortalama	2,926	0,417	108,592
		Standart Hata	1,188	0,238	62,966
	1 doz (20)	Ortalama	58,190	0,664	150,482
		Standart Hata	50,214	0,267	79,234
	2 doz (50)	Ortalama	0,761	0,024	50,615
		Standart Hata	0,195	0,011	16,894
	3 doz (100)	Ortalama	9,223	0,780	112,929
		Standart Hata	6,462	0,199	32,755
	Total	Ortalama	17,775	0,471	105,654
		Standart Hata	12,812	0,115	26,033

Bcl-2 geninin ekspresyon düzeyleri ile uygulanan EGF dozları bakımından ise, mide kanseri hücre hattı ve ülserli hastalar arasında fark olmadığı belirlendi (p=0.407) (Şekil 4.19).



Şekil 4.19. Real Time PCR ile Comparative C_T Analizine göre belirlenen, EGF uygulaması yapılan ülserli hastaların primer kültürleri ve mide kanseri hücre hattındaki Bcl-2 geni ekspresyon düzeylerinin grafiksel gösterimi. (GDU: Gastroduodenal ülserli hasta grubu; N87: Mide Kanseri Hücre Hattı)

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada insan mide kanseri hücre hattında ve ülserli hastalardan alınan biyopsi örnekleri ile hazırlanan primer kültürlerde epidermal büyüme faktörünün apoptozis üzerine etkileri araştırıldı. Epidermal büyüme faktörü uygulanan deney ve kontrol gruplarında, apoptotik genler olan Bax, Bcl-2 ve Fas genlerinin ekspresyon düzeylerindeki değişiklikler incelendi. Çalışma planlanırken, içeriğine dahil edilmiş olan FasL geninin tüm hücre kültürlerinde genel olarak ekspresyonunun çok az olduğu belirlendiğinden, istatistik analizi yapılamadı ve bu nedenle değerlendirmeye alınamadı.

RT-PCR ile semi-kantitatif olarak elde edilen verilerin istatistik analiz sonuçlarına göre; hem primer hücre kültürlerinde hem de hücre hattında uyguladığımız EGF dozlarıyla apoptotik genlerin ekspresyon düzeyleri arasında bir ilişkiye rastlanmadı. EGF uygulanan ve uygulanmayan primer kültürler arasındaki ana etkiye bakıldığında da yine bir ilişki olmadığı görüldü. EGF'den bağımsız olarak, tüm gruplar arasındaki apoptotik genlerin ekspresyon düzeyleri değerlendirildiğinde, primer kültürleri yapılan hasta grubu ile kontrol grubu arasında fark yoktu.

Primer hücre kültürü ve mide kanseri hücre hattındaki gen ekspresyon düzeyleri karşılaştırıldığında; EGF dozlarının ekspresyon düzeyleri üzerinde etkisi olmadığı, ancak EGF'den bağımsız olarak gruplar arasındaki ekspresyon düzeyleri karşılaştırıldığında Bax geninin ekspresyon düzeyinin ülserli hastalarda, Fas geninin ekspresyon düzeyinin ise mide kanseri hücre hattında ülserli hastalara göre artmış olduğu belirlendi.

Real Time PCR ile "Comparative C_T Analizi" yapılarak elde edilen verilerin istatistiksel değerlendirmesinin sonucunda ise; semi-kantitatif ekspresyon analizi yaparak elde ettiğimiz bulgulara benzer şekilde, primer hücre kültürlerinde uyguladığımız EGF dozlarıyla, çalışmaya dahil edilen apoptotik genlerin ekspresyon düzeyleri arasında bir ilişkiye rastlanmadı. EGF uygulanan ve uygulanmayan petriker arasındaki ana etkiye (mean effect) bakıldığında da fark olmadığı görüldü. EGF'den bağımsız olarak, tüm gruplar arasındaki apoptotik genlerin ekspresyon düzeyleri değerlendirildiğinde, primer kültürleri yapılan hasta grubundaki Bax geninin ekspresyon

düzeyle kontrol grubu arasında fark olduğu görüldü. Semi-kantitatif yöntemde tüm gruplar arasındaki apoptotik gen ekspresyon düzeylerinde fark görülmezken, Real Time PCR sonucunda, Bax geninin kontrol grubundaki ekspresyon düzeyinin, hasta grubuna göre daha yüksek olduğu belirlendi. Fas ve Bcl-2 genlerinin ekspresyon düzeyleri bakımından ise, hasta ve kontrol grubu arasında ise semi kantitatif yöntemle benzer şekilde fark yoktu.

Primer hücre kültürü ve mide kanseri hücre hattındaki gen ekspresyon düzeyleri karşılaştırıldığında; semi kantitatif yöntemde EGF dozlarının ekspresyon düzeyleri üzerinde etkisi olmadığı belirlenirken, Real Time PCR ile Comparative C_T analizinde, petrilere uygulanan EGF dozları bakımından ülserli hasta grubu ile hücre hattı arasında Bax ve Fas genlerinin ekspresyon düzeylerinde farklılık olduğu belirlendi. 1 doz EGF (20 ng/μl) uygulandığında hücre hattında Bax geninin ekspresyon düzeyinde belirgin bir artış olduğu (0 doza göre yaklaşık 25 katlık bir artış), 2 doz EGF (50 ng/μl) uygulanmasının ise hücre hattında Fas geninin ekspresyonunu azalttığı (0 doza göre yaklaşık 18 katlık bir azalış) görüldü. Bcl-2 geninin ekspresyon düzeyleri ile uygulanan EGF dozları bakımından ise, mide kanseri hücre hattı ve ülserli hastalar arasında fark olmadığı belirlendi.

Gastrik mukoza normalde çok çeşitli zarar verici maddeye maruz kalır ve doku hasarını tamir edecek etkili mekanizmalar geliştirmiştir. Yüzeysel hasarın olması durumunda epitel yüzeyin rejenerasyonu çok hızla gerçekleşir. Bu, epitel hücrelerinin komşu mukozadan hasar görmüş membran tabanına göçü ile gerçekleştirilir ve proliferasyondan bağımsız olarak meydana gelir (60).

Ülser gibi daha derin bir mukozal hasarın olması durumunda subepitelial miyofibroblastlar, düz kas hücreleri, damarlar ve sinirlerde olduğu gibi epitelial ve bağ doku bileşenleri de hasar görür ve rejenerasyon olmak zorundadırlar. Yüzeysel epitelyumun yeniden yapılması (re-epitelizasyon), ülser sınırından granülasyon dokusu içine göç eden farklılaşmamış epitelial öncülerinin proliferasyonu ve ülser yatağını kaplamaları ile gerçekleştirilir. Gastrik bezlerin rejenerasyonu ülser sınırının tabanından granülasyon dokusu içine penetre olan ve glandular tübüllerde farklılaşan epitel hücrelerinin göçü ve proliferasyonun bir sonucudur.

Bu karmaşık olaylar dizisi, farklı hücre tipleri arasında yüksek oranda koordinasyonu gerektirir ve çeşitli faktörler tarafından düzenlenir. Bu faktörler arasında

polipeptid büyüme faktörleri, hücre proliferasyonu, migrasyonu ve farklılaşması dahil olmak üzere doku iyileşmesine katılan başlıca hücresel fonksiyonları düzenleme özelliklerinden dolayı son yıllarda çok dikkat çekmiştir. Bazı veriler, birkaç polipeptid büyüme faktörü ve onların reseptörlerinin gastrik ülser iyileşmesi sürecinde eksprese edildiğini ve doğal ya da rekombinant analoglarının tamir mekanizmasını hızlandırdığını göstermiştir (61).

Bu büyüme faktörlerinden birisi olan EGF de normal insan gastrik mukozasında belirlenmiştir (8). Epidermal büyüme faktörü, büyük transmembran öncülleri ve proteolitik olarak aktive edilmiş daha küçük olgun formlar olarak sentezlenen 53 aminoasitlik bir polipeptiddir (42). Hücre proliferasyonunu ve hücre göçünü uyarır (61), gastrik asit salgılanmasını inhibe eder (47, 62) ve mukus salgısını artırır (63).

EGF, başlıca tükürük bezlerinden salgılanır. Aynı zamanda gastrointestinal sistemin üst kısmındaki Brunner bezleri de EGF içerir (62, 64). Önceki çalışmalarda deneysel olarak indüklenen gastrik lezyonların kapsaikin duyarlı sinirler aracılığıyla bir refleks oluşmasıyla ilişkili olan tükürük bezlerindeki EGF içeriğini arttırabileceğini göstermiştir (8, 10). Bu tükürükteki EGF'nin ülserle karşı korunma ve ülser iyileşmesi ile ilişkisi olduğu gösterilmiştir (12). EGF kendi reseptörüyle interaksyonu aracılığıyla epitel hücre proliferasyonunu ve migrasyonunu stimüle eder ve gastrointestinal mukozanın bütünlüğünü korur (46, 61). H. pylori enfeksiyonu ve tedavisinin gastrit ve gastroduodenal ülser hastalarındaki EGF seviyesi üzerindeki etkisi ile ilgili çelişkili sonuçlar bildiren bazı çalışmalar vardır. Bununla birlikte, immünohistokimyasal çalışmalar EGF'nin gastroduodenal mukoza hasarında eksprese edildiğini göstermiştir (50). Bu nedenle, EGF'nin gastrik mukozada reseptörü aracılığıyla gastroduodenal hasarın iyileşmesine doğrudan katılması olasıdır.

Gastrik mukoza bütünlüğünün korunması ve ülser iyileşmesinde EGF'nin rolü çeşitli gözlemlerle desteklenmiştir. Gastrik sıvıdaki EGF'nin major kaynağı olan submandibular bezlerin ratlarda çıkarılması, spontan ülser gelişime sebebi olarak yeterli olmamasına rağmen, gastrik ülser iyileşmesini geciktirebilir (65). İnsanlarda EGF'nin tükürükteki düzeyi (64) ve gastrik sıvıdaki yoğunluğu (66), peptik ülser hastalığının aktif fazı süresince azalır fakat ülser iyileşmesi sonrasında normal düzeyine yeniden ulaşır. Ayrıca, sigara kullanımının muhtemelen granülasyon dokusunda ve mukus

sentezinde anjiogenik yanıtı inhibe ederek hem tükürükte hem de duodenal bezlerde EGF salınımını azalttığı ve ülser iyileşmesini geciktirdiği bildirilmiştir (61).

Çeşitli çalışmalar EGF ve TGF- α 'nın her ikisinin de gastrik mukozal hasar sonrasında tamir olaylarında önemli bir rol oynayabileceklerini göstermiştir. Wright ve ark., gastrointestinal sistemde ülser oluşumunun, ülser sınırlarında EGF immünoaktivitesini indüklediğini bildirmiştir (67). Lee ve ark., asetik asitle muamele edilip hasarlanan rat gastrik mukozasında EGF immünoaktivitesinde artış olduğunu bildirmiştir (68). Bu çalışmaların her ikisi de insan gastrointestinal sistemindeki ülser oluşumunun, EGF salgılayan kök hücrelerden yeni hücre soyları gelişmesini indüklediğini göstermektedir. Öte yandan, Polk ve ark., hidroklorid ve taurokolat'la akut hasar oluşturulan rat gastrik mukozasında TGF- α mRNA ve protein ekspresyonunu artırırken, EGF ekspresyonunda bu akut gastrik hasar sürecinde artış olmadığını gözlemlemiştir (47).

EGF, *in vitro*'da çeşitli hücre hatlarındaki hücre proliferasyonu için bir uyarandır ve *in vivo*'da da gut'un her tarafında DNA sentezini stimüle eder. Bu nedenle, EGF'nin gut lümeninde bir gastrointestinal büyüme faktörü olarak aktivite gösterdiği düşünülmüştür (41).

EGF'nin mukozal tamire katılan bir gastrointestinal peptid olarak aktivite gösterdiği öne sürülmüştür (49). Ratların tükürük bezlerinin alınması, luminal EGF konsantrasyonunu büyük ölçüde azaltır ve bu, normal gutta çok küçük bir etkiye sahip olmasına rağmen yavaş yavaş indüklenen ülserin iyileşmesini azaltır (69).

Peptik ülser iyileşme sürecinde luminal EGF konsantrasyonunun azalmasına neden olan mekanizmalar henüz tanımlanmamış olmakla birlikte, bu veriler intragastrik EGF'nin mukozal tamirin kontrolünde önemli bir rol oynadığına ve azalışının peptik ülser gelişimine zemin hazırladığına işaret etmektedir.

Sukralfat ve koloidal bizmut subsitrat gibi anti-ülser ilaçları, ülser yatağında EGF'yi bağlayıp yoğunlaştırırken (60), omeprazol, muhtemelen gastrik asit salgılanmasının inhibisyonunun bir sonucu olarak gastrik sıvıdaki EGF konsantrasyonunu arttırabilir (70). Bu gözlemler EGF'nin tükürükte salgılanmasının ve gastrik sıvıdaki konsantrasyonunun ülser iyileşmesinin ilerleyişinde önemli olduğunu göstermektedir. İyileşen doku içerisinde ekstra EGF kaynakları tanımlanmıştır. Özellikle, EGF diğer büyüme faktörleri ile birlikte ülser sınırından granülasyon

dokusuna doğru büyüyen epiteliyal hücre soyu tarafından sentezlenir (67). Kemirgenlerde kriyoprob ile deneysel olarak indüklenen ülserden 10 gün sonra EGF mRNA ekspresyonunun artmış olduğu gösterilmiştir (71). Ayrıca ratlarda deneysel olarak oluşturulan ülser sınırında EGF mRNA ekspresyonunun olduğu gösterilmiştir (72).

EGF, etkisini spesifik hücre membran reseptörü (EGFR) ile etkileşime girerek gösterirler. EGFR, tirozin kinaz aktivitesine sahip yaklaşık 1200 aminoasit residüsünden oluşan bir transmembran glikoproteinidir. EGF'nin EGFR'nin ekstraselüler domainine bağlanması reseptörün dimerizasyonuna neden olan bir konformasyonel değişikliğe ve EGFR'nin intraselüler domaininin spesifik rezidülerinde fosforilasyonuna yol açar ve sonuçta gen transkripsiyonunun regülasyonunu sağlayan kompleks bir sinyal yolağı ile bağlantı oluşturur (44).

Normal gastrik mukozada EGFR'nin fazla miktarda ekspresyonunun olduğu gösterilmiştir. EGFR bu dokuda luminal membran üzerinde hemen hemen hiç bulunmazken yaygın olarak glandular hücreler ve basolateral membran boyunca dağılmıştır (45, 73). Bu özel dağılım, luminal EGF'nin reseptörüyle sadece epitel hücrelerinin basolateral membranlarına geçiş oluşturan bir mukozal hasar sonrasında bağlanabildiğini göstermektedir. Bu durum kronik gastrik ülserli ratlarda EGF'nin oral alımı sonrasında ülser yüzeyi üzerinde ve küçük epiteliyal hasar bölgelerinde birikmesine karşılık sadece çok küçük miktarda peptidin hasarsız mukozaya bağlanabildiğinin belirlenmesi ile de doğrulanmıştır (41). Bu, gastrik sıvıdaki EGF'nin fonksiyonlarını sadece mukozal bütünlük bozulduktan sonra gösteren bir luminal gözetim faktörü olduğunu düşündürmektedir.

EGFR'nin ekspresyonu ülser iyileşmesi sürecinde özellikle de ülser sınırındaki mukozada önemli ölçüde artar (45, 72). EGFR aktivasyonunun ardından intraselüler sinyallerin analizleri, akut mukozal hasar sonrasında ekstraselüler sinyal düzenleyen kinaz (Erk1 ve Erk2) ve EGFR tirozin kinazın çok erken bir sürede arttığını (74-76) göstermiştir. Bu gözlemler, EGFR'nin aktivasyonunun gastrik mukozal rejenerasyon sürecinde en erken meydana gelen olay olduğunu öne sürmektedir.

Mukozal hasarın olması durumunda EGF, bazolateral enterositte EGFR'ye ulaşabilir. Mukozadaki ülser oluşumunun kök hücrelerden yeni hücre soyları gelişmesini indüklediği ve bu yeni hücre soylarının da EGF salgıladığı keşfedilmiştir

(67). Bu “ülser-ilişkili hücre soyu”, küçük bir bezden gelişir ve daha sonra mukozal yüzeyi kaplar. Ülser sınırları etrafında bu tür bezler oluşur. Bu durum, EGF'nin ülser iyileşmesinde en önemli role sahip olduğunu düşündürmektedir. Yapılan çalışmalar, EGF'nin oral alınımının yetişkin ratlarda gastrik ve duodenal mukoza büyümesini stimüle ettiğini göstermiştir ve neonatal Ratların kolon, ince bağırsak ve mide gelişimini arttırdığı bildirilmiştir (41).

EGF ailesi büyüme faktörleri de dahil olmak üzere, çeşitli polipeptid büyüme faktörleri, hasar sonrası doku tamirinde rol oynarlar. Epidermal büyüme faktörünün, gastrik ülser iyileşme sürecinde mukozal hücre proliferasyonunun düzenlenmesinde önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. Bu nedenle, gastrik ülserin ardından rejeneratif epitel hücrelerinin gelişiminde muhtemel rolü olan çeşitli büyüme faktörlerinin anlaşılması önemlidir. EGF'nin sağlıkta ve hastalığıdaki önemi ile ilgili hala bazı çelişkiler bulunmaktadır. EGF ailesi büyüme faktörleri gibi çeşitli polipeptid büyüme faktörleri, hasar sonrası doku tamirinde rol oynarlar. Bu nedenle, gastrik ülserin ardından rejeneratif epitel hücrelerinin gelişiminde muhtemel rolü olan çeşitli büyüme faktörlerinin anlaşılması önemlidir.

Apoptozisin, midenin tüm bölgelerinde olduğu ve akut mukozal hasarın ardından ve gastrik ülser iyileşme sürecinde indüklendiği gösterilmiştir. Deneysel olarak ülserin indüklenmesinden 2 saat kadar sonra kaspaz 3'ün mukozadaki ekspresyonunun 3,9 kat arttığı belirlenmiştir (77). Bax, bak ve p53 ekspresyonunun, ilerlemiş gastrik ülserde arttığı, Bcl-2 ekspresyonunun ise kontrollerle benzer olduğu bulunmuştur (1).

Bcl-2 ailesinin proteinleri, normal gastrik epitelyumda farklı patternlerde eksprese edilir. İmmünohistokimya aracılığıyla, Bcl-2 ailesinin düzenleyici proteinlerinin özellikle boyun bölgesindekiler olmak üzere normal midenin tüm epitel hücre tiplerinde eksprese edildiği bulunmuştur (28). Fakat başka bir çalışmada, immünoboyama sonuçlarına göre, ekspresyonlarının boyun bölgesindeki mukozada sadece birkaç hücrede sınırlı olduğu bulunmuştur (29). Bizim çalışmamızın sonucunda, Bcl-2 ekspresyonunun normal mide hücrelerindeki ekspresyon oranı ile ülserli hastaların mide hücrelerindeki ekspresyonu arasında fark olmadığı belirlenmiştir. Benzer şekilde mide kanseri hücreleriyle, ülserleşmiş dokudaki mide ve duodenum epitel hücrelerinde de Bcl-2'nin ekspresyonunun değişmediği gözlenmiştir.

Çalışmanın sonucunda, hem semi kantitatif analizler hem de Real Time PCR ile yapılan analizler, EGF'nin ülserli hastalarda apoptotik genlerin ekspresyon düzeylerini etkilemediğini ortaya koydu. Ancak, Real Time PCR ile yapılan analizlerin sonucunda, EGF'den bağımsız olarak, Bax geninin ekspresyonunun sağlıklı bireylerde ülserli hastalardan daha yüksek olduğu belirlendi. Semi kantitatif yöntemle yapılan analizlerde böyle bir farkın bulunmamasının, Real Time PCR'la yapılan analizlere göre semi kantitatif analizlerin daha az hassasiyet gösterdiğini düşündürmektedir.

Mide kanseri hücre hattı ve ülserli hastalar arasında, EGF'nin Bax, Bcl-2 ve Fas genlerinin ekspresyonuna etkisini değerlendirdiğimizde, yine semi kantitatif analizler EGF'nin apoptotik genlerin ekspresyonunu etkilemediğini fakat, EGF'den bağımsız olarak Bax geninin ekspresyonunun ülserli hastalarda, Fas geni ekspresyonunun ise mide kanseri hücre hattında artmış olduğunu gösterdi. Ancak, Real Time PCR ile Comparative C_T analizinde, petrilere uygulanan EGF dozlarının Bax ve Fas genlerinin ekspresyon düzeylerini etkilediğini ortaya koydu. 1 doz EGF (20 ng/μl) uygulandığında hücre hattında Bax geninin ekspresyon düzeyinde belirgin bir artış olduğu, 2 doz EGF (50 ng/μl) uygulanmasının ise hücre hattında Bax ve Fas genlerinin ekspresyonunu azalttığı görüldü.

Bu veriler, ülseratif lezyonların uzun dönemde mide kanseriyle sonuçlanması ile ilgili tartışmalar açısından bilgi verici olabilir. EGF'nin ülser iyileşmesinde etkili olduğu ve iyileşme sürecine katıldığı bilinmektedir. Bcl-2 geni apoptozisi baskımlarken, Bax ve Fas genlerinin her ikisi de apoptozisi aktive edici fonksiyona sahip olan genlerdir. Mide kanseri hücre hattında EGF'nin 20 ng/μl'sinin, Bax geninin ekspresyonunda belirgin bir artışa (0 doza göre yaklaşık 25 katlık bir artışa) neden olması, mide karsinogenezi sürecine Bax geninin EGF'nin de katkısıyla katıldığını düşündürmektedir. EGF'nin 50 ng/μl'sinin, Fas geni ekspresyonunu ani olarak düşürmesi (0 doza göre yaklaşık 18 katlık bir düşüş), özellikle tedavi düşünüldüğünde önemli olabilir. Çünkü Fas geni, apoptozisi aktive eden, o nedenle ülserleşme sürecinde etkili olan bir apoptotik gendir. Belki de EGF'nin hastalara özellikle bu dozda uygulanması, Fas'ın etkinliğini azaltarak tedaviye katkısı olabilir. Semi kantitatif ekspresyon analizlerinin, Real-Time PCR analizinin aksine, EGF uygulamasının Bax, Fas veya Bcl-2 genlerinin ekspresyonu üzerinde etkili olmadığını göstermesi, iki yöntem arasındaki hassasiyet farkını ortaya koymasından önemlidir. O nedenle,

buna benzer ekspresyon analizine dayanan çalışmaların Real-Time PCR ile planlanmasının, sonuçların güvenilirliği açısından önemli olduğu söylenilebilir.

EGF'nin Bcl-2 geninin ekspresyonu üzerinde etkili olmadığı hem semi kantitatif analizlerle, hem de Real Time PCR ile yapılan analizlerle ortaya konmuştur. Bu nedenle, Bcl-2 geninin ülserleşme ve mide karsinogenezi süreçlerinde EGF'den etkilenmeksizin eksprese edildiği düşünülebilir.

Apoptozisle ilişkili genlerin gen ve protein ekspresyonları gastrik kanser de dahil birçok kanser türünde çalışılmıştır fakat mide ülserinde epidermal büyüme faktörünün bu genlerin ekspresyonu üzerindeki etkisiyle ilgili yayınlanmış bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışma, ülserli hastalarda EGF'nin apoptotik etkisini inceleyen ilk çalışma olması nedeniyle önemlidir ve elde edilen sonuçlar bu konuda yol gösterici olabilir.

6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Gastroduodenal ülser, özellikle belli bir yaşın üzerindeki insanlar arasında oldukça sık görülebilen bir gastrointestinal sistem hastalığıdır. Bu hastalığın oluş nedenleri arasında, genetik faktörlerin, *Helicobacter pylori* enfeksiyonunun ve diyetin önemli bir etkisi olduğu bilinmektedir. Ülser oluşumuna yol açan bu faktörlerin etkileri, büyüme faktörleri gibi koruyucu faktörler ve hücre proliferasyonu gibi ülserleşme sonucu oluşan hasarı iyileştiren faktörler tarafından giderilmeye çalışılır. Gastrik mukoza ve duodenum yenilenme oranı yüksek olan dokulardır. Bu dokulardaki bütünlüğün korunması epitelium hücre proliferasyonu ve apoptozis arasındaki denge ile sağlanır. Ayrıca, EGF de gastroduodenal ülselerin iyileşme sürecinde hücre proliferasyonunun düzenlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır.

Bu çalışmada, ülserli hastalarda EGF'nin, apoptozis ile ilişkili, Bax, Fas ve Bcl-2 genlerinin ekspresyonu üzerindeki etkisini araştırmak ve hücre hattındaki ekspresyon düzeyleri arasındaki varsa benzerlik ya da farklılığı ortaya koymak amaçlanmıştır. Bunu yaparken aynı zamanda ekspresyon analizi için iki farklı yöntem seçilmiş ve etkinlikleri değerlendirilmiştir. Çalışmanın sonucunda, hem semi kantitatif analizler hem de Real Time PCR ile yapılan analizler, EGF'nin ülserli hastalarda apoptotik genlerin ekspresyon düzeylerini etkilemediğini ortaya koymuştur. Ancak, Real Time PCR ile yapılan analizlerin sonucunda, EGF'den bağımsız olarak, Bax geninin ekspresyonunun sağlıklı bireylerde ülserli hastalardan daha yüksek olduğu belirlenmiştir. İki yöntem arasında benzer bir fark mide kanseri hücre hattında da ortaya çıkmıştır. EGF uygulamasının semi kantitatif analizlerde hücre hattında da ekspresyonu etkilemediğini göstermesine rağmen, Real Time PCR ile yapılan analizlerde EGF dozlarının Bax ve Fas genlerinin ekspresyonunda belirgin bir etken olduğu belirlenmiştir. Bu iki yöntem arasında, olduğu düşünülen hassasiyet ya da etkinlik farkı kesin bir şekilde ortaya konmuştur. Bu nedenle, özellikle ekspresyon analizine dayanan çalışmalarda Real-Time PCR'in tercih edilmesinin önemli olduğu söylenilebilir.

Apoptozisle ilişkili genlerin gen ve protein ekspresyonları gastrik kanser gibi birçok kanser türünde çalışılmıştır fakat epidermal büyüme faktörünün bu genlerin ekspresyonu üzerindeki etkisi ülserli dokularda incelenmemiştir. Bu nedenle, çalışmamızın sonucunda elde edilen tüm veriler, ilk olması bakımından önemli olabilir. Özellikle mide kanseri hücre hattında, uyguladığımız EGF dozlarıyla, Bax ve Fas

genlerinin ekspresyon düzeylerinde meydana gelen belirgin artış ve azalışlarla ilgili elde edilen bulgular, hem mide karsinogenez süreci hem de tedavisiyle ilgili önemli bilgiler içeriyor olabilir.

7. KAYNAKLAR

1. **Szabó I, Tarnawski AS.** Apoptosis in the gastric mucosa: molecular mechanisms, basic and clinical implications. *J Physiol Pharmacol*, **2000**; 51 (1): 3-15.
2. **Hall PA, Coates PJ, Ansari B, Hopwood D.** Regulation of cell number in the mammalian gastrointestinal tract: the importance of apoptosis. *J Cell Sci*, **1994**; 107: 3569-3577.
3. **Xiao G, Fang H, Xing C, Xu W.** Structure, function and inhibition of Bcl-2 family proteins: a new target for anti-tumor agents. *Med Chem*, **2009**; 9 (14): 1596-604.
4. **Konturek PC, Pierzchalski P, Konturek SJ, Meixner H, Faller G, Kirchner T, Hahn EG.** *Helicobacter pylori* Induces Apoptosis in Gastric Mucosa through an Upregulation of Bax Expression in Humans. *Scand J Gastroenterol*, **1999**; 4: 375-383.
5. **Hua-Xiang Xia H, Zhang GS, Talley NJ, Yu Wong BC, Yang Y, Henwood C, Wyatt JM, Adams S, Cheung K, Xia B, Zhu YQ, Lam SK.** Topographic Association of Gastric Epithelial Expression of Ki-67, Bax, and Bcl-2 With Antralization in the Gastric Incisura, Body, and Fundus. *Am J Gastroenterol*, **2002**; 97(12): 3023-3031.
6. **Pinkoski MJ, Green DR.** Fas ligand, death gene. *Cell Death Differ*, **1999**; 6: 1174-81.
7. **Maeda S, Yoshida H, Mitsuno Y, Hirata Y, Ogura K, Shiratori Y, Omata M.** Analysis of apoptotic and antiapoptotic signaling pathways induced by *Helicobacter pylori*. *J Clin Pathol: Mol Pathol*, **2002**; 55: 286-293.
8. **Abe S, Sasano H, Katoh K, Ohara S, Noguchi T, Asaki S, Yasui W, Tahara E, Nagura E, Toyota T.** Immunohistochemical Studies on EGF Family Growth Factors in Normal and Ulcerated Human Gastric Mucosa. *Dig Dis and Sci*, **1997**; 42 (6): 1199-1209.
9. **Herbay AV, Rudi J.** Role of Apoptosis in Gastric Epithelial Turnover. *Microscopy Research and Technique*, **2000**; 48:303-311.
10. **Owen DA.** Histology of the normal stomach. In: Sternberg SS, editor. *Histology for pathologists*, 2nd ed. Philadelphia-New York: Lippincott-Raven, 1997: 481-493.
11. **Patel S, Rew DA, Taylor I, Potten CS, Owen C, Roberts SA.** Study of the proliferation in human gastric mucosa after in vivo bromodeoxyuridine labelling. *Gut*, **1993**; 34: 893-896.
12. **Sarosiek J, Jensen RT, Maton PN, Peura DA, Harlow D, Feng T, McCallum RW, Pisegna JR.** Salivary and gastric epidermal growth factor in patients with Zollinger±Ellison syndrome: its protective potential. *Am J Gastroenterol*, **2000**; 95: 1158-1165.
13. **Targa1AC, César ACG, Cury PM, Silva AE.** Apoptosis in different gastric lesions and gastric cancer: relationship with *Helicobacter pylori*, overexpression of p53 and aneuploidy. *Genet Mol Res*, **2007**; 6(3): 554-565.
14. **Majno G, Joris I.** Apoptosis, oncosis, and necrosis: an overview of cell death. *Am J Pathol*, **1995**; 146: 3-15.
15. **Moss S.F, Calam J, Agarwal B, Wang S, Holt PR.** Induction of gastric epithelial apoptosis by *Helicobacter pylori*. *Gut*, **1996**; 38(4): 498-501.
16. **Krammer PH.** CD95 (APO-1/Fas)-mediated apoptosis: live and let die. *Adv Immunol*, **1999**; 71: 163-210.

17. **Leithauser F, Dhein J, Mechtersheimer G, Koretz K, Bruderlein S, Henne C, Schmidt A, Debatin K-M, Krammer PH, Moller P.** Constitutive and induced expression of APO-1, a new member of the nerve growth factor/tumor necrosis factor receptor superfamily, in normal and neoplastic cells. *Lab Invest*, **1993**; 69: 415-429.
18. **Mahmood Z, Shukla Y.** Death receptors: targets for cancer therapy. *Exp Cell Res*, **2010**; 316 (6): 887-889.
19. **Nicholson DW, Thornberry NA.** Caspases: killer proteases. *Trends Biochem Sci*, **1997**; 22: 299-306.
20. **Chen M, Wang J.** Initiator caspases in apoptosis signaling pathways. *Apoptosis*, **2002**; 7: 313-9.
21. **Chao DT, Korsmeyer SJ.** BCL-2 FAMILY: Regulators of Cell Death. *Annu. Rev. Immunol*, **1998**; 16: 395-419.
22. **Adams JM, Cory S.** The Bcl-2 protein family arbiters of cell survival. *Science*, **1998**; 281:1322-1325.
23. **Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ.** BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes & Development*, **1999** 13: 1899-1911.
24. **Hockenbery D, Nunez G, Milliman C, Schreiber RD, Korsmeyer SJ.** Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature*, **1990**; 348:334-336.
25. **Brumatti G, Salmanidis M, Ekert PG.** Crossing paths: interactions between the cell death machinery and growth factor survival signals. *Cell. Mol. Life Sci*, **2010**; 10: 18-29.
26. **Yin XM, Oltvai ZN, Korsmeyer SJ.** BH1 and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax. *Nature*, **1994**; 369:321-323
27. **Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ.** Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell*, **1993**; 74: 609-619.
28. **Sedlak TW, Oltvai ZN, Yang E, Wang K, Boise LH, Thompson CB, Korsmeyer SJ.** Multiple Bcl-2 family members demonstrate selective dimerizations with Bax. *Proc. Natl. Acad. Sci*, **1995**; 92: 7834-7838.
29. **Zhu W, Cowie A, Wasfy GW, Penn LZ, Leber B, Andrews DW.** Bcl-2 mutants with restricted subcellular location reveal spatially distinct pathways for apoptosis in different cell types. *EMBO J*, **1996**; 15: 4130-4141.
30. **Wajant H.** The Fas Signaling Pathway: More Than a Paradigm. *Science*, **2002**; 296: 1635-1636.
31. **Suda T, Takahashi T, Golstein P, Nagata S.** Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell*, **1993**; 75: 1169-1178.
32. **Stachura J, Tarnawski A, Dabros W.** Apoptosis: genetically programmed physiological cell loss in normal gastric oxyntic mucosa and in mucosa of grossly healed gastric ulcer. *J Clin Gastroenterol*, **1993**; 17(Suppl 1): 70-77.
33. **Frisch SM, Francis H.** Disruption of the epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *J Cell Biol*, **1994**; 124: 619-626.
34. **Ishida M, Gomyo Y, Tatebe S, Ohfuji S, Ito H.** Apoptosis in human gastric mucosa, chronic gastritis, dysplasia and carcinoma: analysis by terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTPbiotin nick end labelling. *Virchows Arch*, **1996**; 428: 229-235.

35. **Houghton J, Korah RM, Condon MR, Kim KH.** Apoptosis in *Helicobacter pylori*-associated gastric and duodenal ulcer disease is mediated via the Fas antigen pathway. *Dig Dis Sci*, **1999**; 44: 465-478.
36. **Rudi J, Kuck D, Strand S, von Herbay A, Mariani SM, Krammer PH, Galle PG, Stremmel W.** Involvement of the CD95 (APO-1/ Fas) receptor and ligand system in *Helicobacter pylori*-induced gastric epithelial apoptosis. *J Clin Invest*, **1998**; 102: 1506-1514.
37. **Krajewski S, Bodrug S, Krajewska M, Shabaik A, Gascoyne R, Beran K, Reed J C.** Immunohistochemical analysis of Mcl-1 protein in human tissues. Differential regulation of Mcl-1 and Bcl-2 protein production suggests a unique role for Mcl-1 in control of programmed cell death in vivo. *Am J Pathol*, **1995**; 146: 1309-1319.
38. **Cho JH, Kim WH.** Altered topographic expression of p21 WAF1/ CIP1/SDI1, bcl-2 and p53 during gastric carcinogenesis. *Path Res Pract*, **1998**; 194: 309-317.
39. **Penault-Llorca F, Bouabdallah R, Devillard E, Charton-Bain MC, Hassoun J, Birg F, Xerri L.** Analysis of BAX expression in human tissues using the anti-BAX, 4F11 monoclonal antibody on paraffin sections. *Pathol Res Pract*, **1998**; 194: 457-464.
40. **Telatar H, Şimşek H.** Gastroenteroloji. Cilt I, Ankara: Medikomat AŞ, **1993**: 305-327.
41. **Murphy MS.** Growth Factors and the Gastrointestinal Tract. *Nutrition*, **1998**; 14 (10): 771-774.
42. **Barnard JA, Beauchamp RD, Russell WE, Dubois RN, Coffey RJ.** Epidermal growth factor-related peptides and their relevance to gastrointestinal pathophysiology. *Gastroenterology*, **1995**; 108: 564.
43. **Konturek SJ, Brzozowski T, Majka J, Dembinski A, Slomiany A, Slomiany BL.** Transforming growth factor alpha and epidermal growth factor in protection and healing of gastric mucosal injury. *Scand J Gastroenterol*, **1992**; 27: 649-655.
44. **Carpenter G, Cohen S.** Epidermal growth factor. *J Biol Chem*, **1990**; 265: 7709-7712.
45. **Tarnawski A, Stachura J, Durbin T, Gergely H.** Expression of epidermal growth factor receptor in rat gastric oxyntic mucosa. *J Clin Gastroenterol*, **1991**; 13: 109-113.
46. **Wong CY, Wang WP, Leung WH, Shin VY, Wong WM, Yee Fung FM, Liu SL, Hiu WM, Lam SK, Cho CH.** Epidermal growth factor and its receptor in chronic active gastritis and gastroduodenal ulcer before and after *Helicobacter pylori* eradication. *Aliment Pharmacol Ther*, **2001**; 15: 1459-1465.
47. **Polk WH, Dempsey PJ, Russell WE, Brown PI, Beauchamp RD, Barnard JA, Coffey RJ.** Increased production of transforming growth factor alpha following acute gastric injury. *Gastroenterology*, **1992**; 102: 1467-1474.
48. **Ma L, Wang WP, Chow JY, Yuen ST, Cho CH.** Reduction of EGF is associated with the delay of ulcer healing by cigarette smoking. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, **2000**; 278: 10-17.
49. **Lemoine NR, Leung HY, Gullick WJ.** Growth factors in the gastrointestinal tract. *Gut*, **1992**; 33: 1297.
50. **Konturek JW, Brzozowski T, Konturek SJ.** Epidermal growth factor and transforming growth factor alpha in duodenal ulcer and non-ulcer dyspepsia patients before and after *Helicobacter pylori* eradication. *Scand J Gastroenterol*, **1998**; 33: 143-151.

51. **Smoot DT, Sewchand J, Young K, Desbordes BC, Allen CR, Naab TA.** Method for establishing primary cultures of human gastric epithelial cells. *Methods in Cell Sci*, **2000**; 22: 133-136.
52. **Chomczynski P., Sacchi N.** Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, **1987**; 162 (1): 156-159.
53. **Livak KJ, Schmittgen TD.** Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods*, **2001**; 25, 402–408.
54. **Schmittgen TD, Livak KJ.** Analyzing real-time PCR data by the comparative C_T method. *Nature Protoc*, **2008**; 3 (6): 1101-1108.
55. **Scheffe JH, Lehmann KE, Buschmann IR, Unger T, Kaiser HF.** Quantitative real-time RT-PCR data analysis: current concepts and the novel “gene expression’s CT difference” Formula. *J Mol Med*, **2006**; 84: 901–910.
56. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_138761 (Erişim Tarihi: 18.09.2010)
57. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/28144172> (Erişim Tarihi: 18.09.2010)
58. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/BC012479.1> (Erişim Tarihi: 18.09.2010)
59. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/15214691> (Erişim Tarihi: 18.09.2010)
60. **Milani S, Calabro A.** Role of Growth Factors and Their Receptors in Gastric Ulcer Healing. *Microsc Res Tech*, **2001**; 53: 360-371.
61. **Konturek SJ.** Role of growth factors in gastroduodenal protection and healing of peptic ulcers. *Gastroenterol Clin North Am*, **1990**; 19: 41–65.
62. **Konturek JW, Brzozowski T, Konturek SJ, Bogdal J, Oleksy J.** Distribution and release of epidermal growth factor in man. *Gut*, **1989**; 30: 1194-1200.
63. **Romano M, Polk WH, Awad JA, Arteaga CL, Nanney LB, Wargovich MJ, Kraus ER, Boland CR, Coffey RJ.** Transforming growth factor alpha protection against drug-induced injury to the rat gastric mucosa in vivo. *J Clin Invest*, **1992**; 90: 2409-2421.
64. **Konturek JW, Brzozowski T, Konturek SJ.** Epidermal growth factor in protection, repair, and healing of gastroduodenal mucosa. *J Clin Gastroenterol*, **1991**; 13: 88-97.
65. **Tarnawski A, Stachura J, Durbin T, Sarfeh IJ, Gergely H.** Increased expression of epidermal growth factor receptor during gastric ulcer healing in rats. *Gastroenterology*, **1992**; 102: 695-698.
66. **Calabro A, Orsini B, Brocchi A, Falchini M, Fedi P, Surrenti C.** Gastric juice immunoreactive epidermal growth factor levels in patients with peptic ulcer disease. *Am J Gastroenterol*, **1990**; 85: 404-407.
67. **Wright N.A., Pike C., Elia G.** Induction of a novel epidermal growth factor-secreting cell lineage by mucosal ulceration in human gastrointestinal stem cells. *Nature*, **1990**; 343: 82-85.
68. **Lee H, Hansson HA, Norstrom E, Helander HF.** Immunoreactivities for epidermal growth factor (EGF) and for EGF receptors in rats with gastric ulcers. *Cell Tissue Res*, **1991**; 265: 211-218.
69. **Playford RJ, Wright NA.** Why is epidermal growth factor present in the gut lumen? *Gut*, **1996**; 38: 303.

70. **Itoh M, Imai S, Joh T, Yokoyama Y, Yasue N, Iwai A, Matsusako K, Endoh K, Kawai T, Takeuchi T.** Effect of epidermal growth factor in combination with sucralfate or omeprazole on the healing of chronic gastric ulcers in the rat. *J Clin Gastroenterol*, **1990**; 12 (1): 187-191.
71. **Alison MR, Chinery R, Poulson R, Ashwood P, Longcroft JM, Wright NA.** Experimental ulceration leads to sequential expression of spasmolytic polypeptide, intestinal trefoil factor, epidermal growth factor and transforming growth factor alpha mRNAs in rat stomach. *J Pathol*, **1995**; 175: 405-414.
72. **Konturek PC, Brzozowski T, Konturek SJ, Ernst H, Drozdowicz D, Pajdo R, Hahn EG.** Expression of epidermal growth factor and transforming growth factor alpha during ulcer healing. Time sequence study. *Scand J Gastroenterol*, **1997**; 32: 6-15.
73. **Orsini B, Calabro` A, Milani S, Grappone C, Herbst H, Surrenti C.** Localization of epidermal growth factor/transforming growth factor- α receptor in human gastric mucosa. An Immunohistochemical and in situ hybridization study. *Virchows Archiv A [Pathol Anat]*, **1993**; 423: 57-63.
74. **Jones MK, Tomikawa M, Mohajer B, Tarnawski AS.** Gastrointestinal mucosal regeneration: role of growth factors. *Front Biosci*, **1999**; 4: 303-309.
75. **Pai R, Ohta M, Itani RM, Sarfeh IJ, Tarnawski AS.** Induction of mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway during gastric ulcer healing in rats. *Gastroenterology*, **1998**; 114: 706-713.
76. **Relan NK, Fligel SE, Dutta S, Tureaud J, Chauhan DP, Majumdar AP.** Induction of EGF-receptor tyrosine kinase during early reparative phase of gastric mucosa and effects of aging. *Lab Invest*, **1995**; 73: 717-726.
77. **Piotrowski J, Slomiany A, Slomiany BL.** Activation of apoptotic caspase-3 and nitric oxide synthase-2 in gastric mucosal injury induced by indomethacin. *Scand J Gastroenterol*, **1999**; 34(2): 129-134.

ÖZGEÇMİŞ

10.10.1978 yılında Erzurum’da doğdum. İlkokulu Kahramanmaraş’ta, ortaokul ve liseyi İzmir’de okudum. 1999 yılında Mersin Üniversitesi Biyoloji Bölümünü dönemin Üniversite Birincisi olarak tamamladım. 2001 yılında Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı’nda yüksek lisans eğitimine başladım. 2002 Kasım ayında Araştırma Görevlisi kadrosuna geçtim.

2002 yılında, İsviçre’deki, Swiss Federal Enstitüsüne bağlı Moleküler Teknoloji Araştırma Merkezinde (EAWAG-Kastanienbaum/İsviçre), 2 ay süresince bakteri genetiği ve Floresans İn-Situ Hibridizasyon (FISH) tekniği üzerinde çalıştım. 29 Mart-2 Nisan/2005 tarihleri arasında, Mersin Üniversitesi’nde yapılan IV. Ulusal Sinir Bilimleri Kongresinin, “Nöropsikiyatrik Hastalıklarda Genetik Polimorfizmler” kursunda kurs eğitmeni olarak görev aldım. 6-9/Eylül/2006 tarihleri arasında, Trabzon Karadeniz Teknik Üniversitesi’nde düzenlenen, “2. Ulusal Kök Hücre Kongresi”ne katıldım. 2-3/Kasım/2006 tarihleri arasında, Ege Üniversitesi Genetik Hastalıkları Araştırma ve Uygulama Merkezi (EGETAM) tarafından düzenlenen, “Uluslar arası Katılımlı QF-PCR WORKSHOP”a katıldım. 25-29/Haziran/2007 tarihleri arasında, Ege Üniversitesi, Fizyoloji Anabilim Dalı tarafından düzenlenen “IV. EGE BIENNIAL INTERNATIONAL NEUROSCIENCE GRADUATE SUMMER SCHOOL” ve bu yaz okulu kapsamındaki “Isolation of Rat Bone Marrow Stromal Cells” kursuna katıldım.

Halen Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı’nda Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktayım.