

T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

H.PYLORİ (+) / (-) GASTRİT VE GASTRİK KANSER
ÖRNEKLERİNDE GEN METİLASYON PATERNLERİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ

DOKTORA TEZİ

DR. MURAT ÖZNUR

DANIŞMAN

PROF. DR. SEVİLHAN ARTAN

EYLÜL, 2011

T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

H. PYLORİ (+) / (-) GASTRİT VE GASTRİK KANSER
ÖRNEKLERİNDE GEN METİLYASYON PATERNLERİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ

DOKTORA TEZİ

DR. MURAT ÖZNUR

DANIŞMAN

PROF. DR. SEVİLHAN ARTAN

TÜBİTAK PROJE NO:109S234

KABUL VE ONAY SAYFASI

Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Doktora öğrencisi Murat ÖZNUR' un Doktora Tezi olarak hazırladığı "*H. Pylori +/- Gastrit Ve Gastrik Kanser Örneklerinde Gen Metilasyon Paternlerinin Değerlendirilmesi* " başlıklı bu çalışma, jürimizce Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Lisans Üstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddesi uyarınca değerlendirerek "**KABUL**" edilmiştir.

13.09.2011

Üye : Prof.Dr. Sevilhan ARTAN (Danışman)

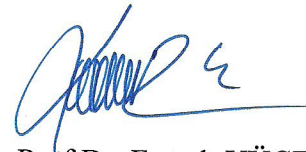
Üye : Doç.Dr. Mustafa ÖZEN

Üye : Prof.Dr. Ayşegül ÖZAKYOL

Üye : Doç.Dr. M.Hamza MÜSLÜMANOĞLU

Üye : Yrd.Doç.Dr. Oğuz ÇİLİNGİR (2.Danışman)

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 15/09/2011 tarih ve 882/1412 sayılı kararı ile onaylanmıştır.



Prof Dr. Ferruh YÜCEL
Enstitü Müdürü

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
KAPAK	i
İÇ KAPAK	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
TABLolar DİZİNİ	x
SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ	xi
ÖZET	xiii
SUMMARY	xiv
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. KANSER ve GENETİK	4
2.1.1. Onkogenler	6
2.1.2. Tümör Baskılayıcı Genler (TBG)	7
2.1.3. DNA Tamir genleri	7
2.2. MİDE KANSERİ	8
2.2.1. Mide Kanserinin Epidemiyolojisi	8
2.2.2. Mide Kanserinin Etiyolojisi	8
2.2.3. Mide Kanserinin Tipleri	9
2.2.3.1. Lauren Sınıflaması	9
2.2.4. Mide Kanserinde Klinik Bulgular	10
2.2.5. Mide Kanserinde Tanı	10

	Sayfa
2.2.6. Mide Kanserinde TNM Sınıflaması ve Evreleme	11
2.2.7. Mide Kanserinde Tedavi ve Prognoz	13
2.3. GASTRİT	13
2.3.1. Akut Gastrit	13
2.3.2. Kronik Gastrit	13
2.3.2.1. Kronik hipertrofik gastrit	14
2.3.2.2. Kronik atrofik gastrit	14
2.4. HELİCOBACTER PYLORİ (Hp)	14
2.5. MİDE KANSERİ ve GENETİK	17
2.5.1. DNA Metilasyonu	18
2.5.2. Genler	26
2.5.2.1. CYP1B1 geni (MIM ID: 601771)	26
2.5.2.2. SCGB3A1 (HIN 1, UGRP2) geni (MIM ID: 606500)	27
2.5.2.3. MT1G geni (MIM ID: 156353)	27
2.5.2.4. BCL2 geni (MIM ID: 151430)	28
2.5.2.5. P16 (CDKN2A) geni (MIM ID: 600160)	29
2.5.2.6. hMSH2 geni (MIM ID: 609309)	30
2.5.2.7. hMLH1 geni (MIM ID: 120436)	30
2.6. METİLASYON ANALİZ YÖNTEMLERİ	31
2.6.1. Bisülfid Genomik Dizileme	31
2.6.2. Kombine Bisülfid Restriksiyon Analizi (COBRA)	31
2.6.3. HeavyMethyl Yöntemi	31
2.6.4. Metilasyon Spesifik PCR (MS-PCR)	32

	Sayfa
2.6.5. Kantitatif MS-PCR: MethyLight	33
2.6.6. Metilation Sensitive-High Resolution Melting (MS-HRM) Yöntemi	33
3. GEREÇ ve YÖNTEMLER	37
3.1. GEREÇLER	37
3.1.1. Kullanılan Gereçler	37
3.1.2. Kullanılan Kimyasal Malzemeler	38
3.2. YÖNTEMLER	39
3.2.1. Hasta Seçimi ve Doku Elde Edilmesi	39
3.2.2. Doku Homojenizasyonu	40
3.2.3. Homojenize Edilen Dokulardan DNA Elde Edilmesi	41
3.2.4. Elde Edilen DNA Ürününün Bisülfid Modifikasyon İşleminin Yapılması	41
3.2.5. Modifiye Edilen DNA Ürünlerinin Metilation Sensitive - High Resolution Melting (MS-HRM) Yöntemi ile Metilasyon Analizinin Yapılması	43
3.3. İSTATİSTİK	45
4. BULGULAR	46
4.1. PCR ÜRÜNLERİNİN METİLASYON PATERNLERİNİN ANALİZİ	46
4.2. HASTA GRUPLARINA GÖRE ABERAN METİLASYON ORANLARI	50
4.3. ANALİZ EDİLEN GENLERİN HASTA GRUPLARINDAKİ METİLASYON ORANLARI	51
4.3.1. CYP1B1 Geni Bulguları	51
4.3.2. SCGB3A1 Geni Bulguları	52
4.3.3. MT1G Geni Bulguları	52

	Sayfa
4.3.4. BCL2 Geni Bulguları	53
4.3.5. P16 Geni Bulguları	54
4.3.6. hMSH2 Geni Bulguları	54
4.3.7. hMLH1 Geni Bulguları	55
4.4. ABERAN GEN SAYILARININ KARŞILAŞTIRILMASI	62
4.5. KANTİTATİF METİLASYON ORTALAMALARI	64
5. TARTIŞMA	66
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	79
KAYNAKLAR DİZİNİ	80
EKLER DİZİNİ	87
EK 1: Gastrit ve mide kanseri tanısı alan olgular arasında incelenen genlerin metilasyon paternlerine göre dağılımı	87
EK 2: Hp(-) Gastrit hasta grubu analiz sonuçları	88
EK 3: Hp(+) Gastrit hasta grubu analiz sonuçları	89
EK 4: Hp(+) Gastrit hasta grubu medikal eradikasyon tedavisi sonrası analiz sonuçları	90
EK 5: Mide Kanseri Hp(+) hasta grubu analiz sonuçları	91
EK 6: Mide Kanseri Hp(-) hasta grubu analiz sonuçları	92
ÖZGEÇMİŞ	93

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1	Hp ile mide karsinogenezi arasındaki muhtemel ilişki..... 16
Şekil 2.2	Hp nedenli metilasyon artışı..... 17
Şekil 2.3	5-metil sitozin oluşumu..... 20
Şekil 2.4	Ökaryotik hücrelerde DNA metilasyonunun kalıtsal niteliğini gösteren moleküler model..... 20
Şekil 2.5	Normal genomda metilasyon paternleri..... 22
Şekil 2.6	Mide karsinogenezisinde oluşan epigenetik değişimler..... 26
Şekil 2.7	P16 geninin G1 fazından S fazına geçişi durdurma mekanizması..... 29
Şekil 2.8	HeavyMetil yönteminde DNA dizisinin metillenip (A) metillenmediğine (B) bağlı olarak gerçekleşen reaksiyon..... 32
Şekil 2.9	Bisüfit modifikasyonunun C nükleotidlere etkisi..... 34
Şekil 4.1	Pozitif/metillenmiş, negatif/metillenmemiş kontrol örnekleri ve bunların %75, %50, %25 ara değer örneklerine ait erime eğrileri.... 47
Şekil 4.2	Çalışılan örnek gruplarının BCL2 genine ait erime eğrilerinin toplu görünümü..... 47
Şekil 4.3	Pozitif/metillenmiş, negatif/metillenmemiş kontrol örnekleri ve bunların %75, %50, %25 ara değer örneklerinin floresan piklerine göre erime eğrileri..... 48
Şekil 4.4	Çalışılan örnek gruplarının BCL2 genine ait floresan piklerine göre erime eğrileri..... 48
Şekil 4.5	Pozitif/metillenmiş, negatif/metillenmemiş kontrol örnekleri ve bunların %75, %50, %25 ara değer örneklerinin LightCycler® 480 Real Time PCR cihazının ‘‘difference plot’’ analiz programı tarafından gruplandırılan erime eğrileri..... 49

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam ediyor)

	Sayfa
Şekil 4.6	Çalışılan örnek gruplarının BCL2 genine ait örneklerin LightCycler® 480 Real Time PCR cihazının “difference plot” analiz programı tarafından gruplandırılan erime eğrileri..... 49
Şekil 4.7	Gastrit ve mide kanseri olgularında CYP1B1, SCGB3A1, MT1G, BCL2, P16, hMSH2 ve hMLH1 genlerine ilişkin saptanan aberan metilasyon sıklıklarının sütun grafik değerlendirilmesi..... 50
Şekil 4.8	Gastrit ve mide kanseri grubu olgularının hipermetile olan gen sayılarına göre karşılaştırılmasının sütun grafik değerlendirilmesi... 63
Şekil 4.9	Mide kanseri, gastrit ve Hp(+) gastrit tedavi sonrası gruplarının kantitatif metilasyon değerlerinin ortalamasının sütun grafik değerlendirilmesi 65
Şekil 4.10	Hp(+) / Hp(-) mide kanseri gruplarının kantitatif metilasyon değerlerinin ortalamasının sütun grafik değerlendirilmesi..... 65
Şekil 4.11	Hp(+) / Hp(-) gastrit gruplarının kantitatif metilasyon değerlerinin ortalamasının sütun grafik değerlendirilmesi..... 65

TABLolar DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 2.1	Mide kanserinde hipermetile olan genlerin frekansı..... 25
Tablo 2.2	Klinik uygulanabilirliği açısından önemli olan faktörlerin yöntemlere göre karşılaştırılması 36
Tablo 3.1	Analizi yapılan genlere ilişkin primer dizileri 44
Tablo 4.1	Gastrit ve mide kanseri olgularında CYP1B1, SCGB3A1, MT1G, BCL2, P16, hMSH2 ve hMLH1 genlerine ilişkin saptanan aberan metilasyon sıklıkları..... 51
Tablo 4.2	Genlerin hastalık gruplarında metilasyon % oranları..... 56
Tablo 4.3	Hp(+) ve Hp(-) gastrit hasta gruplarının (grup 1 ve 2) karşılaştırılmasının istatistik analizi..... 57
Tablo 4.4	Hp(+) gastrit olgularının Hp medikal eradikasyon tedavisi öncesi ve sonrası (grup 1 ve 2) karşılaştırılmasının istatistik analizi..... 58
Tablo 4.5	Mide kanseri hasta grubunda Hp(+) ve Hp(-) hasta gruplarının (grup 1 ve 2) karşılaştırılmasının istatistik analizi..... 59
Tablo 4.6	Mide kanseri ve gastrit hasta gruplarının (grup 1 ve 2) karşılaştırılmasının istatistik analizi..... 60
Tablo 4.7	Hp(-) mide kanseri ile Hp(-) gastrit hasta gruplarının (grup1 ve 2) karşılaştırılmasının istatistik analizi..... 61
Tablo 4.8	Hp(+) mide kanseri ile Hp(+) gastrit hasta gruplarının (grup 1 ve 2) karşılaştırılmasının istatistik analizi..... 62
Tablo 4.9	Gastrit ve mide kanseri grubu olgularının hipermetile olan gen sayılarına göre karşılaştırılması..... 63
Tablo 4.10	Genlerin hastalık gruplarına göre kantitatif metilasyon ortalama oranları..... 64
Tablo 5.1	Gastrit grubu olgularında hipermetilasyon sıklıkları..... 68
Tablo 5.2	P16 geni tartışma özeti 72
Tablo 5.3	P16 ve hMLH1 genleri tartışma özeti 74

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler	Açıklama
AGS	Human Stomach Adenocarcinoma
AJCC	American Joint Committee on Cancer
APAF1	Apoptotic protease activating factor 1 geni
APC	Adenomatöz Polipozis Coli geni
BCL2	B-cell CLL/Lymphoma 2 geni
BT	Bilgisayarlı tomografi
C	Cytosine nükleotidi
CDH1	Cadherin 1, type 1, E-cadherin (epithelial)
CDK4-6	Siklin Dependant Kinaz 4-6
CEA	Carsino Embrionic Antigen
cm	Santimetre
CpA	Cytosine-Adenine nükleotid çifti
CpG	Cytosine-Guanine nükleotid çifti
CpT	Cytosine-Timin nükleotid çifti
CTNNB1	Catenin beta 1 geni
CYP1B1	Cytochrome P450, family1, subfamily B ailesi geni
DNA	Deoxyribonucleic acid
DNMT1	DNA Metil Transferaz 1 geni
DNMT2	DNA Metil Transferaz 2 geni
DNMT3a	DNA Metil Transferaz 3a geni
DNMT3b	DNA Metil Transferaz 3b geni
DNMT3L	DNA Metil Transferaz 3L geni
dsDNA	Double strand DNA
ESOGÜ	Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
F	Forward primer
g	Gram
GTP	Guanozin Trifosfat
hMLH1	MutL, E. Coli, Homolog of; 1 geni
hMSH2	MutS, E. Coli, homolog of; 2 geni
HNPCC	Hereditör nonpolipozis kolorektal kanser
Hp	Helicobacter pylori
mg	Miligram

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam ediyor)

Simgeler	Açıklama
MGMT	O-6-methylguanine-DNA methyltransferase
MIM ID	Genin OMIM numarası
ml	Mililitre
mM	Milimol
MRI	Magnetik Rezonans Imaging
MS-HRM	Metilasyon Sensitif -High Resolution Melting
MS-PCR	Metilasyon Spesifik PCR
MSS	Merkezi Sinir Sistemi
MT1G	Metallothionein, family 1, subfamily G ailesi geni
NHL	Non Hodgkin Lenfoma
P16	Cyclin-dependant kinase inhibitor 2A geni
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polimerase Chain Reaction
R	Reverse primer
RB1	Retinoblastoma 1 geni
RNA	Ribo Nükleik Asit
rpm	Rotorun dakikada dönme hızı
SCGB3A1	Secretoglobin, family 3, subfamily A, member 1 ailesi geni
ssDNA	Single strand DNA
Tm	Melting temperature
TNM	Tümör Node Metastaz sınıflaması
TSG	Tümör süpresör geni
U	Uracil nükleotidi
USG	Ultrasonografi
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
%	Yüzde oranı
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
µM	Mikromol
° C	Derece santigrat
5mC	5-metil sitozinin

ÖZET

Mide kanseri, diyet ve *Helicobacter pylori* (Hp) gibi çevresel faktörlerden kaynaklanan genotipik değişimlerin progresif birikimi sonucu oluşmaktadır. Epigenetik mekanizmalardan biri olan promoter CpG adacık hipermetilasyonu, genin sessizleşmesine neden olmaktadır. Mide karsinomu aberan CpG hipermetilasyonun en sık gözlemlendiği kanser türlerinden biridir. Hp enfeksiyonu mide kanseri, kronik gastrit, tekrarlayan peptik ülser, atrofik gastrit ve intestinal metaplazi gelişiminde bir risk faktörüdür. Hp eradikasyonu sonucu bazı genlerde hipermetilasyon oranı azalmaktadır. Ancak bu oran bazı genlerde aynı kalmakta veya daha da artmaktadır. Bu çalışmada, 23 Hp(+) ve 14 Hp(-) olmak üzere toplam 37 gastrit hasta doku örneğinde ve 30 mide kanseri hasta doku örneğinde CYP1B1, SCGB3A1, MT1G, BCL2, P16, hMSH2 ve hMLH1 genlerinin promoter bölgelerinin metilasyon paternlerinin Metilasyon Sensitif - High Resolution Melting (MS-HRM) tekniği ile karşılaştırılması amaçlanmıştır. Ayrıca Hp(+) gastrit olgularının medikal eradikasyon tedavisinin genlerin metilasyon paternlerine etkisini de belirlemek amacıyla Hp(+) gastrit örneklerinin tedavi öncesi ve sonrası metilasyon paternleri ve oranları karşılaştırılmıştır. İncelenen mide kanseri hasta grubunda hMLH1, BCL2 ve CYP1B1 genlerine ilişkin metilasyon sıklıklarının gastrit hasta grubuna göre önemli düzeyde arttığı; MT1G, hMSH2 ve hMLH1 genlerinin metilasyon oranlarının Hp(+) gastrit olgularındaki medikal eradikasyon tedavisi sonrası azaldığı belirlenmiştir. Diğer taraftan kanser hasta grubunda hipermetile olan gen sayısının gastrit hasta grubuna göre önemli düzeyde arttığı ortaya konmuştur. Sonuç olarak MS-HRM tekniği metilasyon heterojenitesi gösteren tümör örneklerinde başarıyla uygulanabilecek bir yöntemdir. Daha büyük araştırma gruplarında klinikopatolojik verilerle birlikte değerlendirmelerin yapılmasının, etkin tedavi protokollerinin çok iyi gelişemediği bu kanser tipinin erken tanısı, prognoz değerlendirmesi için çok önemli olacağı sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler:

CpG adacıkları, gastrit, hipermetilasyon, *H. pylori*, mide kanseri, MS-HRM tekniği

SUMMARY

Gastric cancer is considered to be the result of a progressive accumulation of genotypic changes due to an adverse environment (i.e., diet and *Helicobacter pylori* infection). CpG island hypermethylation is closely associated with gene inactivation. Gastric carcinoma is one of the tumors with a high frequency of aberrant CpG island hypermethylation. *Helicobacter pylori* (Hp) infection is a risk factor for the development of gastric cancer, chronic gastritis, recurrent peptic ulcer disease, atrophic gastritis and intestinal metaplasia. By the medical eradication of Hp, the methylation rate of some genes might be reduced but the others remained hypermethylated or increased. This study was aimed to evaluate the promoter methylation status of the genes CYP1B1, SCGB3A1, MT1G, BCL2, P16, hMSH2 and hMLH1 in Hp (+) / (-) gastritis and gastric cancer tissues. Besides, the methylation profiles of these genes were also determined following the medical eradication treatment of Hp (+) in gastric cases. MS-HRM technique was performed in tissue samples of 37 acute gastritis and 30 gastric cancer. Statistical analyses were performed through SPSS 15 software. The frequencies of aberrant methylation profiles of hMLH1, BCL2 and CYP1B1 genes were significantly higher in gastric cancer group. Following the medical eradication treatment, the methylation levels of MT1G, hMSH2 and hMLH1 genes were decreased. When the number of methylated genes in gastritis and gastric cancer groups were compared, the number of methylated genes was significantly higher in gastric cancer group. The MS-HRM was determined as a powerful technique for the analysis of methylation profiles of genes in the heterogenous tumor tissues. Our findings show differential gene methylation in tumoral tissue, which allows us to conclude that hypermethylation is associated with gastric carcinogenesis. Further studies in larger groups with clinicopathological features of the cases should be performed to determine molecular biomarkers for early detection and prognostic evaluation of the cases with gastric cancer.

Keywords:

CpG islands, gastric cancer, gastritis, *H. pylori*, hypermethylation, MS-HRM technique

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Mide kanseri dünyada en sık gözlenen üçüncü ve kanser-bağlantılı ölümlerde de ikinci sırada yer alan kanser tipidir (29, 39).

Mide kanseri Lauren sınıflamasına göre intestinal tip ve diffüz tip olarak iki tipe ayrılır. İntestinal tip mide kanseri genellikle “epidemik” olarak ifade edilir. Diğer tipine göre daha sık gözlenir. Çevresel faktörlerle ilişkilidir. Çok aşamalı bir süreç ile kronik gastrit, gastrik atrofi, intestinal metaplazi ve displazi gibi prekanseröz lezyonlardan gelişir. Diffüz tip daha erken yaşlarda ortaya çıkan, prognozu daha kötü olan, prekanseröz lezyonlarla ilişkili olmayan ve invaziv gelişme paterni gösteren mide kanseri tipidir (42, 47).

Gastrit, mide mukozasının inflamasyonudur. İnflamasyona diyet ve *Helicobacter pylori* (Hp) gibi faktörler neden olur. Hp(+) olan bireylerin ufak bir bölümünde mide kanseri gelişir. Enfekte olan bireyler ile kanser gelişen olgular arasındaki farklılığın çevresel faktörlerden, genetik yatkınlıktan ve Hp virülans faktörlerinden kaynaklandığı öne sürülmektedir (4).

Genetik instabilite kanserin temelidir. Bu nedenle Hp enfeksiyonunun DNA da harabiyete yol açtığı veya DNA tamir yollarının aktivitesini azalttığı, biriken mutasyonlara bağlı olarak onkogen aktivasyonu ile TBG inaktivasyonunun meydana geldiği öne sürülmektedir.

Epigenetik, DNA yapısında herhangi bir mutasyon olmamasına rağmen genin ekspresyonundaki kalıtsal ya da sporadik değişimlere neden olan mekanizmaları tanımlayan bir terimdir. Epigenetik mekanizma çeşitleri arasında metilasyon temelli DNA ve histon modifikasyonları ile RNA interference sayılabilir. Kanser etyolojisinde DNA metilasyonunun rolünün ortaya konmasına bağlı olarak bu epigenetik mekanizma özellikle kanser başlama ve gelişiminde bugüne kadar en çok araştırmaların yapıldığı epigenetik mekanizmadır. Metilasyon, CpG dinükleotidlerinde sitozin (C) nükleotidine metil grubunun bağlanması ile oluşur. Genin promoter bölgesinde bulunan CpG adacıklarındaki hipermetilasyon, kromozom yapısını ve DNA stabilitesini

değiştirmeden o genin transkripsiyonunu yani ekspresyonunu engellemektedir. CpG adacıklarının aberan metilasyonu tümör spesifiktir. TBG'lerin inaktivasyonundan yüksek oranda sorumludur. Günümüzde DNA metilasyon profilleri tümörün belirlenmesi ve kanserin progresyonu hakkında bilgi veren bir moleküler marker olarak da kullanılmaktadır (35, 49).

Mide kanserlerinin gelişimi ve progresyonuna ilişkin çalışmalar yoğun olarak devam etmektedir. Ancak bugüne kadar yapılan çalışmalarda diğer kanser tiplerinde etkili olan pek çok gene ilişkin mutasyonun mide kanseri gelişiminde çok yüksek sıklıkta gözlenmemesi, buna karşılık pek çok TBG'ine ilişkin aberan metilasyon paternlerinin saptanması, mide kanseri gelişiminde DNA metilasyon değişikliklerinin anahtar mekanizma olduğunu düşündürmektedir. Mutasyonlara göre CpG adacık hipermetilasyonlarının daha sık gözlenmesi bu düşüncüyü doğrular niteliktedir. Genlerin promoter bölgelerindeki CpG adacık hipermetilasyonlarının; mide kanserli olguların lezyona komşu, kanseröz olmayan dokuları ile mide kanseri tanısı almamış neoplastik olmayan gastrik mukozada da gözlendiği bildirilmiştir. Dolayısıyla, kanserin başlamasında da etkili olabileceği ifade edilmektedir.

Mide karsinogenezisi intestinal metaplazi-displazi-invaziv karsinom sekansı ile gelişen çok aşamalı bir süreçtir. Bu kaskad, Hp enfeksiyonu ile uyarılmaktadır. Hp enfeksiyonu, mide mukozasının şiddetli oksidatif harabiyeti ile kronik aktif inflamasyona neden olur. Gerçekleştirilen pek çok çalışma Hp enfeksiyonu ile spesifik gen promoter metilasyonu ilişkisini ortaya koymuş olup Hp-ilişkili aktif inflamasyonun promoter hipermetilasyonundan sorumlu olabileceği öne sürülmüştür. Ancak Hp medikal eradikasyonu sonrası aberan hipermetilasyonun devam edip etmediği henüz tartışma aşamasındadır (84).

Kanser ile metilasyon anomalileri arasındaki ilişkinin ortaya konması, araştırıcıları hücrelerdeki metilasyon oranlarını daha doğru ve kantitatif olarak değerlendirebilecek yöntem arayışına itmiş ve günümüzde yüksek hassasiyet ve doğrulukta veri sunabilen pek çok yöntem kullanıma hazır hale getirilmiştir. Günümüzde tümör örneklerinde metilasyon paternlerinin analizi farklı yöntemlerle gerçekleştirilmektedir. Kalitatif ve kantitatif yöntemler amaca göre seçilmektedir. Son

yıllarda metilasyona özgü yüksek rezolusyonlu erime ısısı farklılığına dayanan MS-HRM tekniğinin özellikle heterojen tümör dokularında kantitatif metilasyon analizini yüksek doğrulukta belirlemeyi sağlayan bir yöntem olduğu öne sürülmektedir (88).

Bu çalışmada, Hp (+) / (-) gastrit ve mide kanseri doku örneklerinde CYP1B1, SCGB3A1, MT1G, BCL2, P16, hMSH2 ve hMLH1 genlerinin promoter bölgelerinin metilasyon paternlerini MS-HRM tekniği ile belirlenmesi, Hp(+) gastrit olgularının medikal eradikasyon tedavisi sonrası incelenen genlere ilişkin metilasyon profillerindeki değişikliklerin saptanması amaçlanmıştır. Ayrıca, MS-HRM tekniğinin kantitatif metilasyon oranlarını belirlemedeki uygulanabilirliğinin de sorgulanması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. KANSER ve GENETİK

Kanser, klinikte görülen en yaygın ve ciddi hastalıklardan biridir. Bugüne kadar yapılan birçok istatistiksel çalışmada, kanserin toplumların yaklaşık üçte birinden fazlasında görüldüğü, ölümlerin en az %20'sinden sorumlu olduğu ve gelişmiş ülkelerin toplam sağlık harcamalarının yaklaşık %10'unu kanser tedavileri harcamalarının oluşturduğu gösterilmiştir. Bütün bu nedenlere bağlı olarak kanser, dünya genelinde yapılan çalışmaların odak noktası haline gelmiştir.

Kanser, tedavi edilmediği zaman ölüme sonuçlanmaktadır. Erken tanı kanserle mücadelede en önemli noktayı oluşturmaktadır. Kansere yakalanma riski yüksek olan bireylerin kanser gelişmeden önce saptanabilmesi çok önemlidir.

Kanserin başlangıcında yer alan çeşitli genler ve hastalığa neden olan bu genlerin fonksiyon kayıplarındaki mekanizmalar nedeniyle kanser esas olarak genetik bir hastalıktır. Kanserin başlangıcı ve tümör hücrelerinin özellikleriyle ilgili bazı önemli noktaları incelediğimizde kanserin, hücresel düzeydeki temel bir bozukluk olduğu görülür.

Vücuttaki pek çok farklı hücre tipi, kanser hücresi haline gelebilir. Kanser hücreleri, köken olarak çoğalma kapasitesini koruyabilen mutant ve/veya modifiye olmuş hücrelerden ve kök hücrelerden oluşur. Normal hücrelerin canlılığını sürdürmesi, çoğalabilmesi ve yaşlanıp ölmesi için ekstraselüler ortamdan kontrollü olarak büyüme faktörlerinin hücre içerisine girmesi ve rol oynayan genlerin aktif ya da inaktif hale getirilmesi gerekir. Aksine tümör hücrelerinde büyüme faktörü gereksinimi azalmıştır, hatta bazen gerek de duyulmaz. Hatta gerekli büyüme faktörleri hücre tarafından sentezlenir ve kullanılır. Dolayısıyla kanser gelişiminde rol oynayan hücrelerin canlılıklarını sürdürmesi ve sürekliliklerinin korunmasında komşu hücrelere gereksinimleri kalmamıştır. Ayrıca apoptozis sürecinde etkili olan gen ürünleri fonksiyonlarını yitirmişlerdir veya normal programlı hücre ölümü sinyallerine karşı dirençli hale gelmişlerdir.

Kanser hücrelerinin bir diğer özelliği de çevre dokuya invazyon yapabilme potansiyellerine sahip olmalarıdır. Ayrıca gerekli durumlarda anjiyogenezi oluşturabilme yetenekleri ile invaze olduğu dokularda yeni kan damarlarını oluştururlar. Belirtilen tüm yolaklar ilgili gen ürünleri ile kontrollü bir şekilde gerçekleştiğinden, veriler karsinogeneze gen ve/veya protein mutasyon / modifikasyonların oluşması gerektiğini göstermektedir (6, 11, 25).

Tümör oluşumunda en önemli basamağı karsinogenezis süreci oluşturmaktadır. Bugüne kadar elde edilen veriler, karsinogenezis sürecinde farklı görevleri üstlenmiş gen gruplarının etkili olduğunu göstermiştir. Bu genler:

- Hücre proliferasyonunda ve hücreler arası sinyal iletiminde görevli proteinleri kodlayan genler,
- Mitotik siklus düzenleyicilerini kodlayan genler,
- Programlanmış hücre ölümü elemanlarını kodlayan genler,
- Kontakt inhibisyon oluşumunda etkili olan elemanları kodlayan genler,
- Hasarlı DNA'nın tamirinden sorumlu proteinleri kodlayan genlerdir (64).

Kanserde etkili olduğu düşünülen tüm genler birlikte değerlendirildiğinde üç ana grup altında toplanırlar:

- 1- Onkogenler,
- 2- Tümör baskılayıcı genler (TBG),
- 3- DNA tamir genleri (3, 87).

Hücre proliferasyonu, hücre döngüsü olarak ifade edilen ve birbiri ardı sıra gerçekleşme zorunluluğu olan G1, S, G2 ve M fazlarının kontrollü olarak gerçekleşmesi sayesinde meydana gelir. Bu döngü direkt ya da indirekt olarak kontrol edilir (12).

Bu döngüde hücrenin bölünmeye girebilmesini belirleyen ve bir sonraki evreye geçişi düzenleyen kontrol noktaları bulunmaktadır. Bu kontrol noktalarında bir önceki evrede yapılanlar gözden geçirilir, düzeltilebilecek hatalar düzeltilir ve bir sonraki evreye geçilir. Tüm kontrollerde amaç dengeli olarak sağlıklı hücre sayısının artırılması ya da hücre sayısı artışının inhibe edilmesidir. Rol alan genler bu işlevler doğrultusunda

gruplandırılırlar. Kanserin tipik özellikleri olan kontrolsüz hücre proliferasyonu ve invaze olabilme yeteneğini belirleyen iki grup mutasyon vardır:

Birinci mutasyon her normal hücrede hücre sinyal ileti sisteminde görev alan ve protoonkogen olarak isimlendirilen genlerin mutasyona bağlı olarak onkogenik nitelik kazanmasıdır. Hücre proliferasyonunun kontrolsüz olarak gerçekleşmesinde rol alırlar.

İkinci mutasyonda ise normal hücrelerde hücre çoğalmasını inhibe edici özelliği olan TBG'lerin mutasyon ve/veya epigenetik modifikasyona bağlı olarak inaktif hale gelmesidir. TBG'ler tarafından kodlanan proteinlerin fonksiyon kaybı, kontrolsüz hücre bölünmesine, anormal hücre büyümesine ve sorunlu apoptozise neden olmaktadır (23, 64, 87).

2.1.1. Onkogenler

Onkogenler genomda aktif olarak bulunan protoonkogenlerin mutant formlarıdır. Bugüne kadar seksenden fazla protoonkogen saptanmış olup her biri onkogenik potansiyel göstererek farklı kanserlerin oluşumunda rol oynamaktadırlar (64).

Protoonkogenler, ekstraselüler ortamdan gelen sinyalleri alarak nükleusta DNA'ya kadar ulaşmasını sağlayan olaylar zincirinde rol alan proteinleri kodlayan genlerdir. Protoonkogen ürün listesinde hücre sinyal ileti sisteminde görev alan salgılanan proteinler, transmembran proteinler, GTP-bağlayan proteinler, proteinkinazlar, transkripsiyon faktörleri gibi her tip protein bulunmaktadır. Bu moleküller, normal koşullarda hücre gereksinimine bağlı olarak sinyalleri alıp nükleusta DNA'ya kadar iletirler. Bir hücreye ekstraselüler ortamdan gelen sinyaller hücreyi bölünmeye, farklılaşmaya ya da ölmeye yönlendirir. Bu sinyallerin alımından sorumlu olan genlerde veya membrandan intraselüler ortama ya da nükleusa aktaran genlerde meydana gelen mutasyonlar, hücrede sinyal yolaklarının devamlı aktif kalmasına, dolayısıyla da sürekli hücre çoğalmasına neden olmaktadır (23, 64).

2.1.2. Tümör Baskılayıcı Genler (TBG)

Onkogenler, gen ekspresyonunu hızlandıran ya da kodladıkları proteinlerle kontrolsüz aktivite artışına neden olan genetik değişiklikler sonucunda anormal hücre çoğalmasına neden olurken TBG'ler, hücre çoğalmasının kontrolünde bu mekanizmanın tam tersi görev yaparlar. Normal koşullarda hücre çoğalmasını, gerektiğinde DNA tamir sistemlerinin aktifleşmesini veya apoptozis mekanizmalarının işler hale getirilmesinden sorumludurlar. Bu özellikleri nedeniyle tümör gelişimini baskırlar. Tümörigenezde bu genlerin hasar görmesi veya sessizleşmesi, hücre çoğalmasını baskırlayan etkinin ortadan kalkmasına ve mutant hücrelerin kontrolsüz çoğalmasına yol açar (3).

2.1.3. DNA Tamir genleri

Selüler DNA birçok kimyasal reaksiyonla ilişki içindedir. DNA, hücre genetik yapısının kalıcı kopyası olduğu için yapısındaki değişiklikler, RNA ya da proteinlere göre çok daha hayati sonuçlara neden olur. Mutasyonlar, DNA replikasyonu sırasında yanlış eşleşme veya hatalı nükleotidlerin DNA'ya katılması, delesyon, inversiyon gibi mekanizmaların meydana gelmesi sonucu gen dizilerinde başkalaşımlara neden olur. Kimyasal ajanlara veya radyasyona maruz kalma durumunda ya da spontan olarak DNA'da çeşitli kimyasal değişiklikler de ortaya çıkabilir (13, 20).

Hücre genomunun bütünlüğünün korunabilmesi için hücreler harap olan DNA'yı tamir etmek için mekanizmalar geliştirmek durumundadır. Bu DNA tamir mekanizmaları, DNA harabiyetinden sorumlu kimyasal reaksiyonun direkt olarak önlenmesi veya tahrip olan bazların DNA'dan çıkarılması şeklindedir (13).

DNA tamir genlerinde oluşacak mutasyonlar, fonksiyonel ürünün sentezlenmesini engellediği için DNA tamir edilemeyecek ve genom dengesi bozulacaktır. Bu da karsinogeneziste önemli bir etkendir (13).

2.2. MİDE KANSERİ

2.2.1. Mide Kanserinin Epidemiyolojisi

Kanser, sık görülmesi ve öldürücülüğünün yüksek olması nedeniyle günümüzde en önemli toplum sağlığı sorunlarından birisidir. Mide kanseri dünyada en sık görülen üçüncü ve kanser bağlantılı ölümlerde de akciğer kanserlerinden sonra ikinci sırada görülen kanser tipidir (29, 39).

İnsidansı ülkeler arasında değişiklik göstermekle birlikte bazı ülkelerde hala birinci sıradaki yerini korumaktadır (38, 78). Görülme sıklığına göre Batı Asya, Güney Amerika ve Batı Avrupa yüksek riskli bölgeleri oluştururken Kuzey Amerika, Kuzey Avrupa, çoğu Afrika ülkesi ve Güney Batı Asya düşük riskli bölgelerdir (9,18). Bu bölgelerde görülme oranları arasında 10-20 kata kadar fark bildirilmiştir.

Beşinci dekatta sık ortaya çıkan ve yaşla birlikte sıklığı artan (18, 38, 39) mide kanseri 30 yaşından daha genç hastalarda nadirdir. 50 yaş sonrası görülme sıklığı erkeklerde iki kat fazla iken, daha genç yaş grubunda kadın/erkek oranı eşittir (9, 18, 38).

2.2.2. Mide Kanserinin Etiyolojisi

Etiyolojide çevresel faktörler, kişisel faktörler ve predispozan faktörler söz konusudur.

Çevresel faktörler arasında Hp ile enfeksiyon, diyet, iyonize radyasyon, alkol kullanımı, pernisiyöz anemi, sigara alışkanlığı, parsiyel gastrektomi, sosyoekonomik durum sayılmaktadır (39).

Kişisel faktörler olarak pozitif aile hikayesi ve predispozisyona neden olan genetik faktörler sayılmaktadır. Ancak hastaların %4'ünde aile öyküsü saptanabilmiştir (9).

Kronik atrofik gastrit ve intestinal metaplazi, gastrik epitelyal displazi, gastrik adenomlar, hiperplastik polipler, menetrier hastalığı (hipertrofik gastropati) kronik mide ülseri, barret özofagusu gibi hastalıklar ise predispozan durumlardır.

Batı ülkelerinde mide kanseri hastalarının 2/3'ne cerrahi tedavinin sadece palyatif olarak uygulanabildiği ileri seviyelerde tanı konulabilmektedir. Bu sebeple WHO mide kanseriyle ilgili çalışmaları desteklemekte ve teşvik etmektedir. Bu yaklaşımla mide karsinogenezinin altında yatan moleküler sebepler ve etyolojik faktörler araştırılmaktadır (37, 67, 86).

2.2.3. Mide Kanserinin Tipleri

Mide malign tümörlerinin yaklaşık %90 kadarı adenokarsinomlardır. Non-Hodgkin lenfomalar ve leiyomyosarkomlar geri kalan %10'luk dilimi oluşturur (39, 78).

2.2.3.1. Lauren sınıflaması

Adenokarsinomlar, Lauren sınıflamasına göre histolojik olarak iki tipe ayrılır.

Epidemik olan intestinal tip mide kanseri daha sık olup ileri yaşlarda görülür. Çevresel faktörlerden etkilenir. Kronik gastrit, gastrik atrofi, intestinal metaplazi ve displazi gibi prekanseröz lezyonlarla ilişkilidir. Hematojen yolla yayılır. Midenin distal bölümünü tutan ve intestinal bezlere benzeyen tübüler yapılardan oluşur (42, 47).

Genç yaşlarda görülen diffüz tip mide kanseri invazif büyüme yapısı gösterir ve kötü prognozludur. Peritona ve lenfojen yolla yayılma gösterir. Glanduler ya da duktular yapı oluşturmaksızın birbirinden ayrı duran musinöz tipte (taşlı yüzük hücreleri) malign hücre tabakalarından oluşur. Midenin proksimaline yerleşme eğilimi gösterir. Dünyanın her yerinde aynı sıklıkla bulunup aile içi dağılım gösterir (42, 47). Herediter diffüz tip mide kanserlerinden farklı olarak sporadik diffüz tip mide kanserlerinin gelişiminde Hp gibi enfeksiyonların da rolünün olabileceğini gösteren çalışmalar vardır (92).

Yüksek riskli bölgelerde intestinal tip mide kanseri insidansı yüksek olmakla birlikte düşük riskli bölgelerde her iki tipin insidansı birbirine yakındır (42, 47).

2.2.4. Mide Kanserinde Klinik Bulgular

Mide kanserinde belirtiler sıklıkla belirsizdir. Tümör, lümeni tıkayacak kadar büyürse, mide fonksiyonlarını bozacak kadar büyük bir mide bölümünü tutan invazyon gelişirse ve kanamaya başlarsa daha belirgin bulgular saptanabilir.

Hastaların çoğunda başlangıç döneminde üst abdominal ve epigastrik bölgelerde ağrı vardır. Sonrasında yorgunluk, iştahsızlık, erken doyma, şişkinlik, bulantı, kusma, hematemez, melena ve kilo kaybı gibi bulgular eklenebilir. Yutma güçlüğü gelişebilir. Batın muayenesinde ele kitle gelebilir.

Mide kanserlerinde erken dönemde fizik muayene bulgusu çok az olup nadiren epigastrik hassasiyet olur.

2.2.5. Mide Kanserinde Tanı

Mide kanserinin ilk bulguları hematolojik tetkiklerde saptanabilen hipokrom, mikrositer anemi olabilir. Dışkıda gizli kan pozitif olabilir. Hastaların yarısından fazlasında aklorhidri vardır. İlerlemiş olguların 1/3'ünde serumda CEA yüksek seviyelerdedir.

Önemli tanı yöntemleri arasında kontrastlı üst gastrointestinal sistem grafileri yer alır. Çift kontrast teknikle mukozal değişiklikler görüntülenebilir. Ancak kesin tanıyı koymak için yeterli değildir.

Metastazları saptamada bilgisayarlı tomografi (BT), ultrasonografi (USG) ve manyetik rezonans inceleme (MRI) yardımcıdır.

Endoskopik görüntüleme günümüzde en önemli tanı aracıdır. Bu yöntemle özofagus, mide ve duodenum gözle görülür ve görüntülenir. Alınan yeterli sayıda

biyopsi örneği ve histopatolojik değerlendirmesiyle tanı kesinleştirilir. Hastalığın yaygınlığı ve metastaz durumu değerlendirilmesi için temel cerrahi müdahale öncesi laparoskopi yapılabilir (38).

2.2.6. Mide Kanserinde TNM Sınıflaması ve Evreleme

Tümör evreleme sistemleri kişinin kanserinin yayılımı ve ciddiyeti hakkında belli standartlara göre bilgi edinilmesini sağlar. TNM Evreleme Sistemi'nde tümör boyutu (T), lenf nodlarına yayılım (N) ve uzak bölgelere yayılım (M) kriterleri kullanılarak kanser evrelendirilir. American Joint Committee on Cancer (AJCC) periyodik olarak evreleme standartlarını günceller (2).

Primer tümör (T)

Tx: Primer tümör değerlendirilemez.

T0: Primer tümöre ait kanıt yok.

Tis: Karsinoma in situ: Lamina propria invazyonu olmayan intraepiteliyal tümör var.

T1: Lamina propria ve submukoza infiltrasyonu var.

T2: Muskularis propria veya subseroza infiltrasyonu var.

T2a: Muskularis propria invazyonu var.

T2b: Subseroza invazyonu var.

T3: Tümör serozayı geğer (visseral periton), çevre doku invazyonu yoktur.

T4: Tümör çevre dokuyu invaze eder.

Bölgesel lenf nodları (N)

Nx: Bölgesel lenf nodları değerlendirilemez.

N0: Lenf nodu metastazı yoktur.

N1: Büyük ya da küçük kurvatur boyunca primer tümöre en çok 3 cm uzaklıktaki perigastrik lenf nodları tutulmuştur.

N2: Primer tümöre 3 cm'den daha uzaktaki, sol gastrik, splenik, çölyak ve ana hepatik arter çevresinde bölgesel lenf nodları tutulmuştur. Ameliyatla çıkarılabilir.

N3: Hepatoduodenal, retropankreatik ve üst mezenterik arter çevresi lenf nodları tutulmuştur. Ameliyatla çıkarılamaz.

Uzak metastaz (M)

Mx: Uzak metastazın varlığı değerlendirilemez.

M0: Uzak metastaz yok.

M1: Uzak metastaz var.

Tümör evrelemesi:

Evre 0 : (Tis N0 M0)

Evre 1A: (T1 N0 M0)

Evre 1B: (T1 N1 M0) (T2a/b N0 M0)

Evre 2 : (T1 N2 M0) (T2 N1 M0) (T3 N0 M0)

Evre 3A: (T2a/b N2 M0) (T3 N1 M0) (T4 N0 M0)

Evre 3B: (T3 N2 M0)

Evre 4 : (T4 N1-3 M0) (T1-3 N3 M0) (Herhangi bir T ve N M1)

(2).

2.2.7. Mide Kanserinde Tedavi ve Prognoz

Bugün için en etkin tedavi lenf nodu diseksiyonu ile midenin cerrahi rezeksiyonudur. Kemoterapi ve radyoterapi cerrahi tedavinin tamamlayıcısıdır. Buna rağmen ileri evre mide kanseri prognozu kötüdür.

Son yıllarda bu malignansi tipinin insidansında ve mortalite oranlarında bir azalma gözlenmekle birlikte dünyada hala kanser nedenli ölümler arasında akciğer kanserinden sonra ikinci olarak gelmektedir (2, 38).

2.3. GASTRİT

2.3.1. Akut Gastrit

Mukozanın akut bir inflamasyonudur. Geçici olan akut gastritte belirgin mukozal ödem gelişir. Nötrofillerden ve kronik inflamatuvar hücrelerin oluşturduğu infiltrasyon görülür. Bu inflamasyonla beraber mukozaya kanama olabilir. Ağır durumlarda ise yüzey epiteli harabiyeti görülür. Bu bulgular endoskopide kolayca gözlenebilir ve tanı konulabilir. Neden olan olay ne kadar kısa sürerse mide mukozası o kadar çabuk iyileşir.

Mide mukozasını koruyucu mekanizmalar henüz tam olarak değerlendirilemediği için akut gastritin meydana gelmesinde tüketilen besinlerin, alkollü içkilerin, sigara alışkanlığının, aspirin ve diğer ilaçların kronik kullanılmasının, üremenin, bazı sistemik hastalıkların, ağır stres durumlarının, asidik veya alkali maddelerle intihar girişimlerinin ve zehirlerin etkisi vardır (5, 46).

2.3.2. Kronik Gastrit

Sonuçta mukozada atrofi ve epitelde metaplazik değişikliklere yol açan mide mukozasının kronik iltihabı olarak tanımlanan kronik gastrit atrofik ve hipertrofik olarak iki alt grubu ayrılmaktadır (5, 46).

2.3.2.1. Kronik hipertrofik gastrit

Mukoza ve submukozanın kalınlaşması ile tanımlanır. Mide mukoza pilileri kabarık, kalın hatta polipoid biçimde gözüktür. Histolojik olarak incelendiğinde hiperplastik mukoza görülür. Submukozada iltihabi hücre infiltrasyonu vardır. Bağ dokusu artar. Olay ilerledikçe polipler gelişebilir. Nadir görülür. Kanserden ayırımı zordur (5, 46).

2.3.2.2. Kronik atrofik gastrit

İleri yaşlarda görülür. Nonspesifiktir. Kronik alkolizm, kronik pellegra ve pernisiyöz anemi gibi hastalıklarda sık görülür. Mukoza pilileri düzleşmiştir. Hipo ve aklorhidri eşlik eder. Histolojik olarak incelendiğinde mukoza guddelerinin sayıca azaldığı, mukozanın inceldiği görülür. Pilor ve korpus mukozasında intestinal metaplazi, korpus mukozasında pseudopilorik metaplazi görülebilir. Metaplazilerle birlikte kronik atrofik gastritin mide kanserine predispozisyonu oluşur (5, 46).

2.4. HELICOBACTER PYLORİ (Hp)

Mide karsinogenezisi karmaşık, çok basamaklı ve multifaktöriyel bir sonuçtur. Başta çevresel faktörler olmak üzere birçok faktörün etyolojide rolü vardır. Bunlar arasında en ilgi çekici olanı gram (-) bir mikroorganizma olan Hp'dir.

Hp enfeksiyonu gelişmekte olan ülkeler başta olmak üzere dünyada yaygındır. Askeri kışlalar, yurt ve kreşler gibi kalabalık yaşanan ortamlarda ve hijyen şartlarının tam olarak sağlanamadığı durumlarda enfeksiyon oranı artmaktadır. Enfeksiyon gelişmekte olan ülkelerde 20 yaş altı bireylerde %75 oranında pozitif bulunmakta ve yaşla artış göstermektedir. Gelişmiş ülkelerde ise tam tersi olarak çocuklarda oldukça nadir görülürken yetişkinlerde sık görülmektedir (4).

Hp enfeksiyonu ile mide kanseri, kronik gastrit, tekrarlayan peptik ülser, atrofik gastrit ve intestinal metaplazi gelişimi arasında ilişkiyi gösteren pek çok epidemiyolojik

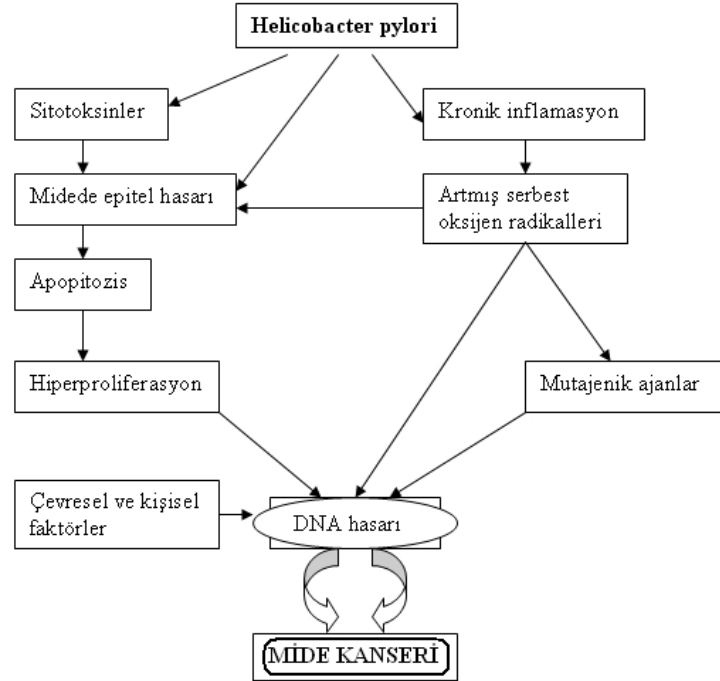
kanıt mevcuttur. Dünya Sağlık Örgütü Kanser Araştırması Uluslararası Ajansı epidemiyolojik bulgulara dayanarak Hp'yi "sınıf 1" karsinogen olarak tanımlamıştır. Mide kanseri riski, kronik Hp enfeksiyonu olan bireylerde 5–6 kat artmaktadır (94).

Bu bilgilerin yanında Hp enfeksiyonunun büyük çoğunlukla kronik antral gastritle sonuçlanmasına rağmen hastaların sadece bir kısmında mide kanseri geliştiğinin gösterilebildiği çalışmalar da mevcuttur. Dolayısıyla bu bakterinin tek etyolojik faktör olamayacağı açıktır (75).

Bu durumu açıklamak üzere kişinin genetik yatkınlığı, diyet, immünolojik durum, Hp'nin farklı suşları, enfeksiyonun alınma zamanı gibi bazı varsayımlar geliştirilmiştir. Bu faktörlerin Hp'nin farklı coğrafi bölgelerdeki farklı kişilerdeki etkisini değiştirdiği şeklinde yorumlanmıştır. Kanser gelişimi de genetik farklılıkların birikimi ve karsinogenik gidişte farklı fenotipik mutasyonların birikimi sonucudur.

Hp ile mide karsinoma ilişkisi daha çok intestinal tip mide kanseri ile kurulmuştur. Çünkü intestinal tip mide kanseri atrofik gastritis ve intestinal metaplazi gibi prekanseröz lezyonları vardır. Ancak Hp'nin karsinogenezde nasıl bir rol oynadığı belirlenememiştir.

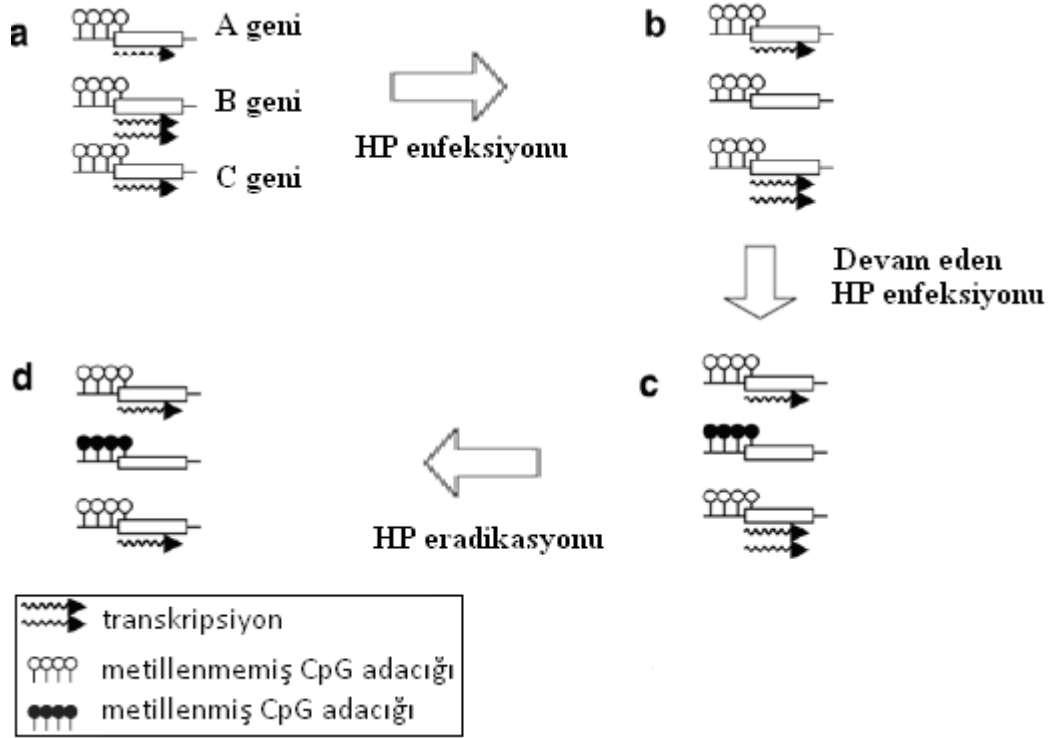
Hp'nin midede epiteliyal hücre döngüsünü değiştirerek mide kanseri riskini arttırdığı kabul edilmektedir. Hücre döngüsündeki değişiklik, artmış apoptos ve proliferasyon şeklindedir. Hp'nin hücre döngüsünü değiştirmesi meydana getirdiği kronik inflamasyon sonucu ortamda artan serbest oksijen radikallerinin DNA hasarı oluşturmasıyla; Hp'nin hücrelerle doğrudan temas kurmasıyla ve Hp'nin toksinleri aracılığıyla doku hasarı yaparak hücre ölümüne sebep olması yollarıyla olmaktadır. Buradaki ölümlerin tamamına yakını apoptosisle gelişir. Bu süreç sonunda mide epitelyumunda hiperproliferasyon gelişip kansere dönüşüm riskini arttırdığı düşünülmekle birlikte bu durumun kanser gelişimindeki rolü tam olarak açıklanmamıştır (**Şekil 2.1**) (15).



Şekil 2.1 Hp ile mide karsinogenezi arasındaki muhtemel ilişki. Demiray ve ark., 2003'den değiştirilerek alınmıştır (15).

Enfeksiyonun DNA metiltransferazı direkt olarak etkileyerek veya inflamatuvar mediatörler aracılığıyla mide mukoza hücrelerinde CpG adacık hipermetilasyonunu (ileri bölümlerde ayrıntılı olarak incelenecek olan DNA metilasyonu) uyurabileceği öne sürülmektedir.

Pek çok çalışmada Hp enfeksiyonu ile spesifik gen promoter hipermetilasyonu arasındaki ilişki ortaya konmuştur. Ancak Hp eradikasyon tedavisi sonrası aberan hipermetilasyon oranında herhangi bir değişiklik olup olmadığına ilişkin veriler henüz yetersizdir. Hp nedeni metilasyon artışı ile birlikte metilasyon sürecinin de aberan metilasyona neden olabileceği ifade edilmektedir (**Şekil 2.2**). Hp medikal eradikasyonu sonucu bazı genlerde hipermetilasyon oranı azalırken bazı genlerde aberan metilasyon oranının arttığını veya hiç değişmediğini belirten veriler bulunmaktadır (84, 85).



Şekil 2.2 Hp nedenli metilasyon artışı: Hp enfeksiyonu ile genin transkripsiyon düzeyinde (dalgalı ok) değişme olmayabileceği gibi azalma veya artma şeklinde değişiklikler de görülebilir. Bu süreç bazen geri dönüşümlü olurken bazen de meydana gelebilecek metilasyona bağlı olarak kalıcı olabilmektedir. Ushijima ve ark. 2006'dan değiştirilerek alınmıştır (85).

Araştırmacılar Hp enfeksiyonu ile mide karsinogenezi arasındaki ilişkiyi incelerken girişimsel çalışmalar kadar deney hayvanları üzerinde de çalışmalar yürütmüşlerdir. Mongol gerbilleri üzerindeki çalışmada Hp'nin erken dönemlerde eradike edilmesinin Hp enfeksiyonunun mide kanseri üzerindeki arttırıcı etkisinin daha etkili olarak azalttığı gösterilirken geç dönemde yapılan eradikasyonun bu süreci çok fazla değiştirmedeği gözlenmiştir (63).

2.5. MİDE KANSERİ ve GENETİK

Kanser, multipl genetik anomalinin birikmesi ile oluşur. Genetik değişimler, onkogenlerin aktivasyonuna, buna karşılık TBG'lerin fonksiyon kayıplarına neden olmaktadır. Önemli bir TBG olan P53 geni mutasyonu intestinal tip kanserlerin yaklaşık %40 kadarında rapor edilirken diffüz tip mide kanserlerinde nadir gözlenmektedir (56, 82).

E-cadherin kodlayan CDH1 geni metilasyonu sporadik diffüz tip mide kanserlerinde genin mutasyonlarından daha sık gözlenir (92).

Bazı herediter diffüz tip mide kanseri olgularında CDH1 germ line mutasyonları saptanmıştır. Ayrıca, Wnt sinyal yolağının aktivasyonunda rol oynayan APC geni mutasyonu kolorektal kanser gelişiminde rol oynamaktadır ki APC gen mutasyonu mide adenom olgularında da sıklıkla rapor edilmektedir. Buna karşılık APC mutasyonu intestinal ve diffüz tip mide kanserlerinde sık gözlenmemektedir. Onkogenler açısından değerlendirdiğimiz zaman catenin kodlayan CTNNB1 gen mutasyonları intestinal tip mide kanserlerinin % 20 kadarında gözlenirken, yine kolorektal kanserlerde sık görülen KRAS mutasyonları her iki mide kanseri histolojik tipinde nadir saptanmıştır (48, 69).

Bu bilgiler ışığında diğer kanser tipleri ile karşılaştırdığımızda genetik mutasyonlar mide kanserlerinde daha düşük sıklıkta gözlenmektedir (83).

2.5.1. DNA Metilasyonu

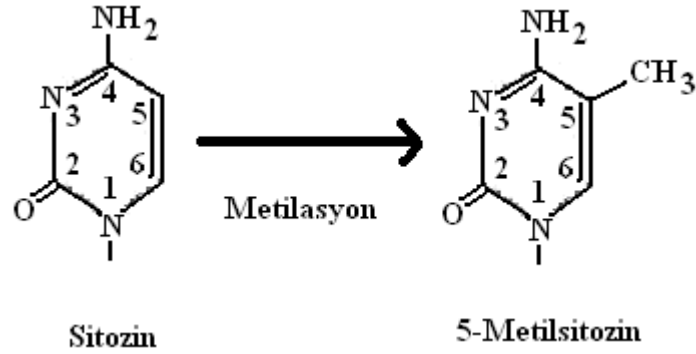
Kromatin, proteinlerle DNA'nın oluşturduğu kompleksi tanımlayan bir terimdir. İki tiptir: Daha az kondanse olan ökromatin ve hücre döngüsü sürecinde çok sıkı kompakt halini koruyan heterokromatin. Ökromatin transkripsiyonel olarak aktif DNA içerir, gen açısından zengindir, histon proteinlerle daha zayıf bağlantı içerisindedir ki bu da hücre döngüsünün erken S fazında replikasyonun gerçekleşmesini sağlar. Ökromatin bölgelerde lokalize olan genler hücre tipine ve hücrenin fonksiyonel gereksinimlerine göre eksprese olurlar veya olmazlar. Bu ökromatin yapı, reversibl kovalent DNA (DNA metilasyonu) ve histon (asetilasyon, metilasyon, fosforilasyon, ubikütinasyon vb) modifikasyonları ile kontrol edilir. Bu modifikasyonlar, DNA metiltransferaz (DNMT), histon asetiltransferaz, histon deasetilaz gibi enzimler ile son yıllarda tanımlanan kodlanmayan RNA'lar aracılığıyla oluşan RNA bağlantılı sessizleşme mekanizmaları ile kontrol edilirler. Epigenetik terimi ile ifade edilen tüm modifikasyonlarda primer DNA dizisinde herhangi bir değişiklik yoktur ancak gen aktivitesinin kalıtsal değişimi söz konusudur.

DNA metilasyonu, histon proteinlerinin modifikasyonları ve kromatin yapısı arasında çok yakın bir ilişki vardır. Kromatin inaktivasyonuna bağlı olarak ökromatin yapının heterokromatin hale dönüşümünün genlerin promoter bölgelerindeki DNA metilasyonu ile düzenlendiği, buna karşılık histon asetilasyonunun kromatini ve DNA demetilasyonunu aktive ettiği ve böylece gen sessizleşmesinden sorumlu faktörün ortamdaki uzaklaştırıldığı uzun zamandan beri bilinmektedir.

Kromatinin yani DNA ve histonların doğal kovalent modifikasyonları epigenom olarak tanımlanır. Bu tanım, kompleks organizmaların multipl epigenomlara sahip olduğunu, kromatin modifikasyonlarının sadece dokular arasında değil aynı zamanda gelişim, yaş ve çevreye yanıtta da değiştiğini ifade etmektedir. Kromatin yapısı ve fonksiyonundaki multifaktöriyel etki nedeniyle, epigenomun genetik koda göre daha büyük oranda bilgi taşıdığını düşündürmektedir (51). Genomun aksine reversibl kimyasal modifikasyonlara maruz kalan dinamik bir yapıdır.

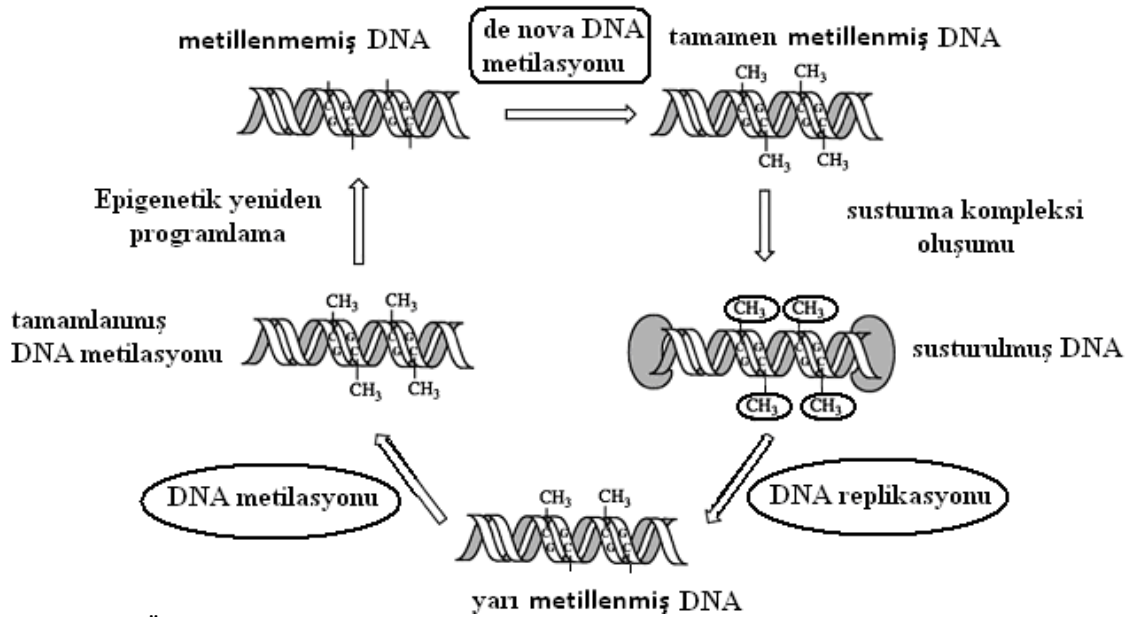
Epigenetik modifikasyonlarla kontrol edilen gen regülasyonu genlerin aktivasyonu veya baskılanması ile kendini gösterir. Gen ekspresyonundaki süreçlere genel bakış epigenetik alanının doğmasına neden olmuştur. Epigenetik, DNA dizisinde herhangi bir değişiklik olmamasına rağmen gen ekspresyonunu etkileyen kimyasal kromatin değişimlerini inceleyen, moleküler patolojisinde bu değişimlerin olduğu özellik ya da hastalıkları belirleyen bir alandır.

DNA metilasyonu, CpG dinükleotidlerindeki sitozinin 5. karbonuna metil grubunun bağlanması ve 5-metil sitozinin (5mC) oluşmasıdır (**Şekil 2.3**). Burada nükleotid değişimi yoktur. Sadece epigenetik olarak bağ ilişkisinde değişim söz konusudur. Normal bir hücrede, DNA'daki tüm nükleotidlerin % 0.75-1 kadarı 5mC şeklindedir ve genomdaki tüm CpG dinükleotidlerinin % 70-80 kadarını etkiler. Sitozin metilasyonu CpG dinükleotidlerinin dışında CpA veya CpT dinükleotidlerinde de gözlenir. Ancak farklılaşmış hücrelerde CpG dışındaki metilasyon çok nadirdir, kök hücrelerinin bir özelliği olarak ifade edilir (53, 71).



Şekil 2.3 5-metil sitozin oluşumu. Kristensen ve ark., 2009'dan değiştirilerek alınmıştır (43).

Ökaryotik hücrelerde, DNA metilasyonu, DNA replikasyonu sonrasında çok etkin bir şekilde görülür. Kalıtsal bir modifikasyondur, yani hücre bölünmeleri sırasında çok iyi korunur. Metilasyonun ana hücreden yavru hücelere nasıl aktarıldığını açıklayan moleküler model **Şekil 2.4**'de görülmektedir.



Şekil 2.4 Ökaryotik hücrelerde DNA metilasyonunun kalıtsal niteliğini gösteren moleküler model. Lewandowska ve ark., 2011'den değiştirilerek alınmıştır (51).

Hesaplamalara göre insan genomunda 29000 CpG den zengin bölge bulunmaktadır. Genomdaki CpG dizileri sıklıkla demetler halinde bulunur ki CpG adacıkları olarak isimlendirilirler. Bu adacıklar, CpG dinükleotidleri açısından zengin ve genin 5' promoter bölgesi ile genin birinci ekzonunun 5' ucunda lokalizedirler. Ortalama % 60 insan geninde CpG adacığı bulunmaktadır ki bu genlerin ekspresyonu

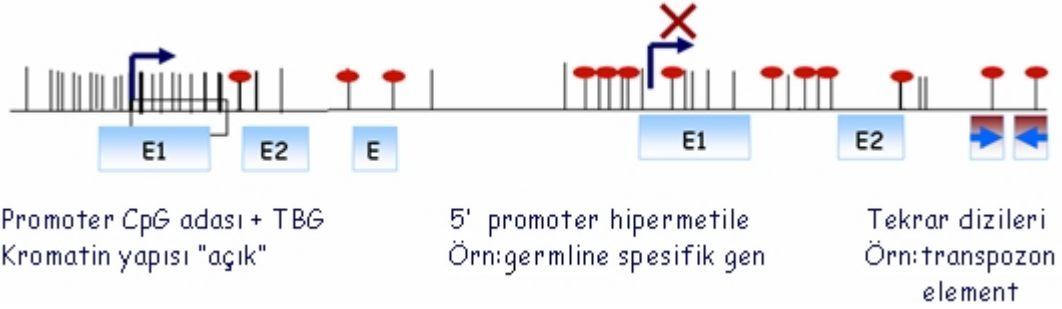
doku spesifiktir. Aktif olan genlerin CpG adacıkları metillenmemişlerdir ve transkripsiyonun başlaması için gerekli enzimler için hedeftirler.

CpG adacığı metilasyonuna bağlı olarak genin sessizleşmesi için önerilen iki mekanizma bulunmaktadır: Birinci mekanizma transkripsiyonel faktörlerin metillenmiş DNA'ya bağlanmasının promoter bölgesindeki CpG adacığı metilasyon düzeyine bağlı olarak engellenmesidir. Düzenleyici genler gen ekspresyon etkinliğini doğrudan etkileyebilirler. İkinci mekanizma ise metillenmiş DNA'nın, metillenmiş DNA'ya bağlanan proteinler (MBP) tarafından tanınması ve baskılayıcıların devreye sokulmasıdır. Oluşan protein kompleksi, MBPlerin bağlandığı bölgedeki kromatin konformasyonunun kompakt hale gelmesini sağlar.

DNA metilasyonu ilk olarak virüsler ve diğer DNA patojenlerine karşı bir korunma mekanizması olarak belirlenmiştir. Normal koşullarda, DNA metilasyonu differensiasyonda, genomik imprintingde, X kromozomu inaktivasyonunda ve tekrar dizilerinin inaktivasyonunda rol oynamaktadır.

Yukarıda da ifade edildiği gibi normal koşullarda CpG adacıkları doku spesifik genlerin promoter bölgelerinde lokalizedir. Ancak house-keeping genlerde yani sürekli aktif olan ve sellüler görevleri üstlenmiş olan genlerin CpG adacıklarında hipermetilasyon paternleri bulunmamaktadır.

Genlerin promoter bölgelerinde bulunan CpG adacıklarının yani tüm genomun %35 kadarında, özellikle LINE-1 gibi uzun tekrar dizilerinin bulunduğu bölgelerde, sentromerler ve mikrosatellit DNA da normal koşullarda hipermetile olan dağınık CpG dinükleotidleri bulunur. Kromozomların bütünlüğünün sağlanmasında hipermetile bölgeler çok önemli bir görevi üstlenmektedirler (**Şekil 2.5**).



Şekil 2.5 Normal genomda metilasyon paternleri. CpG adacıkları genlerin promoter bölgelerinde lokalize iken, genomda dağınık halde özellikle uzun tekrar dizilerinde hipermetile CpG nükleotidleri gözlenir.

DNA metilasyonu palindrom CpG dinükleotidleri tanıyan DNA metil transferaz enzimleri (DNMT) ile katalizlenir. Bu enzimler metil grubunun verici olan S-adenosyl-L methionine (SAM)'dan sitozinin 5. karbonuna transferinden sorumludur. Bugüne kadar 5 farklı DNMT izoenzimi tanımlanmıştır: DNMT1, DNMT2, DNMT3A, DNMT3B ve DNMT3L. Bunlardan DNMT1 yarı metillenmiş DNA'daki orijinal DNA metilasyon paternini korur. Replikasyon sonrası 5-mC sadece bir parental DNA dalında bulunur. Bu enzim yeni sentezlenen DNA dalındaki sitozinin metilasyonunu katalizler. DNMT1 aynı zamanda DNA replikasyonundaki protein kompleksinin bir üyesidir. Yarı-koruyucu DNA replikasyonunu destekler. Hücre bölünmesi ile doğru DNA metilasyonunun olmasını sağlar.

DNMT3A ve 3B, de novo DNA metilasyonundan ve bu nedenle genomdaki metilasyon paterninin değişiminden sorumludur. DNMT2 fonksiyonu henüz detaylandırılmamıştır. Bu enzim zayıf in vitro DNMT aktivitesi ile karakterize edilmiş olmasına rağmen tRNA metilasyonunu etkin şekilde katalizlediği de bilinmektedir. DNMT'lerin her biri, diğerlerinin işlevlerini desteklemektedirler. Örneğin DNMT3a sadece de novo metilasyon değil aynı zamanda DNA metilasyonunun korunmasından da sorumludur.

Metilom hatalarının ilk olarak bazı kompleks konjenital sendromlar ile mental yetmezliklerin oluşumunda etkili olduğu anlaşılmıştır. Takip eden araştırmalarda DNA metilasyon paternlerindeki değişikliklerin yaşlanma ve kronik inflamasyon gibi hayati süreçlerde de rol oynadığı, viral enfeksiyonlar ile karsinogenezde büyük önem taşıdığı saptanmıştır.

Özellikle son iki dekatlık süre içerisinde, DNA metilasyonunun kanser gelişimi ve progresyonunda çok önemli olduğu çalışmalarla ortaya konmuştur. Kanserde iki epigenetik olay çok önemlidir. Bunlardan ilki global hipometilasyon ve diğeri de bölgesel hipermetilasyondur.

Normal koşullarda LINE-1 tekrar dizileri, sentromerler ve mikrosatellit DNA'da hipermetile olan CpG dinükleotidlerinin kanser hücrelerinde hipometile hale geldiği gözlenmektedir. Kanserle ilişkili genlerin promoter bölgelerindeki hipermetilasyona karşı genomda global hipometilasyon karsinogenezin ana özelliği olarak belirlenmiştir. Kanser hücre genomu, normal hücreye göre sitozin metilasyonu düzeyinin azalması ile karakterizedir.

Global hipometilasyonun protoonkogen aktivasyonunda ve kromozomal instabilitede etkili olduğu düşünülmektedir. Bazı kanser tiplerinde mikrosatellit instabilite ile global hipometilasyon arasında yakın ilişki ortaya konmuştur.

Global hipometilasyona bölge spesifik hipermetilasyon anomalileri eşlik etmektedir. Özellikle kanserin başlangıç basamağına spesifiktir ancak tümör gelişiminin ilerleyen aşamalarında da etkisi rapor edilmiştir. Kanser hücrelerinde özellikle TBG'lerin promoterleri ileri düzeyde metillenmiştir. Tahminlere göre kanser hücrelerinde 600 CpG adacığundan zengin bölge bulunmaktadır. DNMT'ler hem normal hem de kanser hücrelerinde DNA metilasyonundan sorumludur. Bu nedenle bu enzimlerin aktivitelerindeki azalma ve artışlar da 5-mC düzeyinde değişikliklere neden olur.

Diğer öne sürülen modelde ise 5-mC metil grubunun DNA'dan uzaklaştırılmasında hızın yavaşlamış olmasıdır ki bu da DNA hipermetilasyona neden olmaktadır. TBG'lerin epigenetik sessizleşmesi kontrolsüz hücre bölünmesi, diğer dokulara infiltrasyon, metastaz, apoptozisten kaçış ya da angiogenezin sağlanması gibi tümör gelişimini uyaran tüm süreçlerden sorumlu olmaktadır. CpG adacıklarındaki DNA metilasyon düzeyinin artması aynı zamanda hormonal yanıtlar ile hücre adezyonundan sorumlu genlerin baskılanmasında da etkilidir. Son yıllarda CpG adacık hipermetilasyonu aracılığıyla ekspresyonları baskılanan mikro RNA'ların da tümör

gelişiminde rol oynadığı ortaya konmuştur. Tümör baskılayıcı fonksiyona sahip miRNA (miR148a, miR-34b/c ve miR-9) ların metilasyona bağlı sessizleşmesi ile lenf nodu metastazı arasındaki bağlantı araştırmalarda ortaya konmuştur (54).

Bilindiği üzere TBG'lerin inaktif hale gelebilmesi için her iki allelinin de fonksiyonlarını yitirmiş olması gerekmektedir. "İki vuruş hipotezi" olarak ifade edilen ve 1970'lerde Knudson tarafından ortaya atılan bu hipotez bugün pek çok TBG'de mutasyonlar olarak rapor edilmiştir. Ancak mutasyon olmamasına rağmen gen ekspresyonunun olmadığı baskılayıcı genler de literatürde yer almıştır ki iki vuruştan birinin CpG adacık hipermetilasyonu olabileceği pek çok çalışma ile gösterilmiştir.

Bazı kanser tiplerinde genomik mutasyonlara göre CpG adacık hipermetilasyonu TBG inaktivasyonunda daha yüksek sıklıkta etkili olmaktadır. Mide kanserleri bu kanser tiplerinden biridir. Çalışmalarda, insan mide karsinogenezinde onkogenlerde, TBG'lerinde, hücre siklus regülatörlerinde, hücre adezyon moleküllerinde, DNA tamir genlerinde meydana gelen genetik ve epigenetik değişikliklerin ve genetik dengesizliğin çok aşamalı süreç içerisinde rol oynadıkları ortaya konmuştur (31, 35, 49, 74).

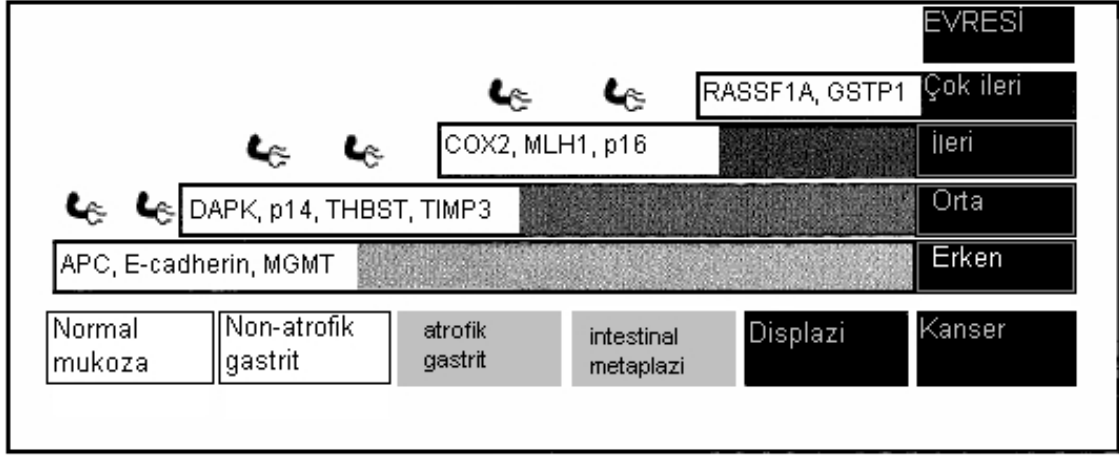
Sato ve Meltzer (73) özofagus ve mide kanserlerinde sinyal iletimi, hücre siklus düzenlenmesi, inflamasyona cevap, apoptozis, DNA tamiri, büyüme faktörü, transkripsiyon faktörü, angiogenesis ile ilişkili 16 geni araştırmışlar (**Tablo 2.1**) ve farklı hasta gruplarındaki hipermetilasyon sıklıklarına göre mide karsinogenezine açıklık getirmeye çalışmışlardır. Mide karsinogenezinin kronik gastrit (CG), atrofik gastrit, intestinal metaplazi (IM), displazi (AD) ve mide kanserinden (GC) oluşan çok basamaklı sürecini ve zaman içerisinde oluşan epigenetik değişimleri değerlendirmişlerdir. Tablo 2.1'de de görüleceği üzere incelenen genler açısından özellikle mide kanser grubunda hipermetilasyon sıklığı anlamlı düzeyde artmaktadır (73).

Tablo 2.1 Mide kanserinde hipermetile olan genlerin frekansı (33 çalışmadan) Sato ve ark., 2006'dan değiştirilerek alınmıştır (73).

	Normal %	CG %	IM %	AD %	GC %
Sinyal iletimi					
APC	69	65	81	72	78
RASSF1A	0.4	0	0	0	23
Hücre siklus regülasyonu					
CDH1	38	85	57	58	61
CHFR	3.1	-	-	-	37
P14/ARF	9.4	30	20	31	33
P15/INK4B	9.6	-	11	-	58
P16/INK4A	4.9	2.7	7	11	38
İnflamatuvar yanıt					
COX-2	4.1	1.4	8.8	3.8	27
Apoptozis					
DAP-K	55	35	44	34	54
DNA Tamiri					
GSTP1	0	0	0	0	14
hMLH1	1.7	0	7	9.8	24
MGMT	25	15	8.8	10	23
Büyüme Faktörü					
HPP1	3.1	-	-	-	50
Transkripsiyon Faktörü					
RUNX3	9	8.1	28	28	65
Anjiyogenez					
THBS1	1.9	1.8	49	34	30
TIMP3	20	19	44	28	43
CG: Kronik gastrit, IM: Intestinal metaplazi, AD: Displazi GC: Mide kanseri					

İntestinal tip mide kanseri olgularının %20 kadarında mikrosatellit instabilite bildirilmiştir ki bunların global hipometilasyonla ve diğer taraftan DNA tamir geni olan hMLH1 hipermetilasyonuyla ilişkili olduğu ortaya konmuştur (8, 65, 80).

Premalign lezyonlarda da metilasyonun önemli bir rol üstlendiğini ortaya koyan çalışmalar bulunmaktadır. Bu da aberan metilasyonun çok aşamalı mide karsinogenezinde erken dönemde ortaya çıktığını göstermektedir (**Şekil 2.6**) (33, 36, 60).



Şekil 2.6 Mide karsinogenezisinde (kronik gastrit, atrofi, intestinal metaplazi, displazi ve mide kanserinden oluşan çok basamaklı süreci ve zaman içerisinde) oluşan epigenetik değişimler. Nardone ve ark., 2007'den değiştirilerek alınmıştır (60).

2.5.2. Genler

2.5.2.1. CYP1B1 geni (MIM ID: 601771)

Kromozom 2p21 de lokalize olan, üç ekzonlu, 8.58 kb uzunluğunda bir genidir. Bu gen sitokrom P450 ailesi üyesi 543 amino asitli bir proteini kodlar. Sitokrom P450 proteinleri ilaç metabolizması, kolesterol, steroid ve diğer lipidlerin sentezinde gerçekleşen pek çok reaksiyonu katalizlerler. CYP1B1 geni tarafından kodlanan enzim endoplazmik retikulumdadır ve polisiklik hidrokarbonlar ile 17 beta-estradiol gibi prokarsinogenleri metabolize eder. Bu gendeki mutasyonlar primer konjenital glokom ile ilişkilidir ve bu nedenle göz gelişiminde devreye giren bir sinyal molekülünü muhtemelen bir steroidi metabolize ettiği düşünülmektedir. Glokom, hepatoselüler adenom, meme veya akciğer kanseri ile prostat kanserinde farklı mutasyonları tanımlanmıştır (22, 66, 79).

Prostat, meme, endometrium ve over kanserleri gibi hormon ilişkili kanserlerde CYP1B1 geni yüksek ekspresyon gösterir. Bununla bağlantılı olarak östrojen, progesteron ve androjen metabolizmaları ile CYP1B1'in endojenik ilişkisi gösterilmiştir (77).

Mide kanseri etyolojisinde androjen ve östrojenlerin de rol oynadığı bilinmektedir ve CYP1B1 geni metilasyonunun anlamlı düzeyde etkili olduğunu ortaya koyan çalışmalar bulunmaktadır (21, 26, 32).

2.5.2.2. SCGB3A1 (HIN 1, UGRP2) geni (MIM ID: 606500)

Kromozom 5q35 de lokalizedir. SCGB3A1 geni Secretoglobin, family 3, subfamily A, member 1 ailesindedir. 104 amino asidden oluşan proteini kodlar.

SCGB3A1'in bilinen proteinlerle belirgin bir homoloji göstermeyen sitokin olduğu AKT sinyal yolağında hücre büyümesi, hücre göçü ve invazyonun önlenmesinde rol oynadığı düşünülmektedir (44).

Meme kanseri hücrelerine SCGB3A1'in yeniden yerleştirilmesi ile hücre büyümesinin engellendiği gözlenmiştir. Bu bilgiler ışığında SCGB3A1 geninin, meme dokusunda tümöröenezisin erken dönemlerinde inaktive olduğu düşünülmektedir. Meme kanserlerinin çoğunluğunda metilasyon mekanizmalarıyla genin aktivitesi engellendiği için TBG olarak tanımlanmıştır. Bu gen trakea, akciğer, tükürük bezleri, prostat, özofagus, duodenum ve meme bezlerinde yüksek oranda eksprese olmaktadır (66).

SCGB3A1 geninin promotor bölge metilasyon yapısı pek çok kanser tipinde değerlendirilmiş olup hipermetilasyon ile SCGB3A1 geni ekspresyon kaybı ve malign fenotiplerle ilişkisi meme, prostat, akciğer ile pankreas kanserinde belirlenmiştir (61).

Gastrit ve gastrik kanserde SCGB3A1 geni metilasyon paternlerine ilişkin bilgilerimiz henüz çok yetersizdir.

2.5.2.3. MT1G geni (MIM ID: 156353)

Kromozom 16q13 de lokalize olan MT1G geni Metallothionein, family 1, subfamily G ailesindedir (66).

Metallothionein'in 1G alt tipini kodlar. Sitozince zengin rezidüleri olan bir proteindir. Pek çok ağır metale bağlanır. Biyolojik işlevinin bakır ve çinko homeostazisi ile organizmanın kadmiyum orjinli toksisiteden korunmasını sağladığı bildirilmektedir. Jahroudi ve ark. ağır metal ve dexamethazona maruz bırakılan hücre dizilerinde MT1G transkripsiyonel aktivitesinin anlamlı düzeyde arttığını göstermişlerdir (30).

Gen ekspresyon kaybının kanser oluşumuna ve gelişimine aracılık ettiği düşünülmektedir. Papiller tiroid kanserinde MT1G geni ekspresyonunun promoter metilasyonu ile önlenmesi bu genin onkosüpresör rolü olduğunu düşündürmektedir. Bu bulgulara uygun olarak immunohistokimyasal analizlerde de bu genin ekspresyonunun azalması gösterilmiştir (19).

Bu gen skuamoz hücreli akciğer kanserlerinin %95'inde hipermetile olarak bulunmuştur (52). Mide kanserindeki rolüne ilişkin verilerimiz eksiktir.

2.5.2.4. BCL2 geni (MIM ID: 151430)

Kromozom 18q21.33 de lokalize olan, üç ekzonlu, 196.04 kb uzunluğunda bir gendir. B-cell CLL/Lymphoma 2; BCL2 olarak isimlendirilir (66).

Otoimmün hastalıklar ve prostat kanseri gibi hastalıklarla ilişkili mutasyonları tanımlanmıştır (79).

Protoonkogen olan BCL2 geni ilk olarak Non-Hodgkin lenfomada t(14;18) kromozomal kırılma noktasında tanımlanmıştır (27).

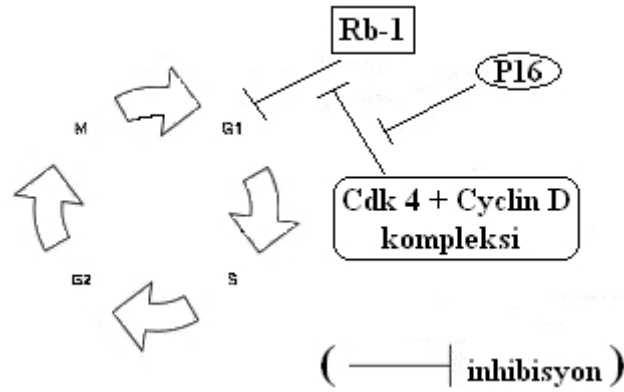
Karsinojenik süreçte düzensiz apoptotik hücre ölümü ile ilişkilidir. BCL2, E2F kopyalanmasını önleyerek DNA yanlış eşleşme onarım sistemini baskılayabilir. RAF1'i mitokondriye yönlendirir. Mitokondriden sitokrom c salınımını önleyerek veya APAF1'e bağlanarak kaspas aktivitesini inhibe eder. BCL2'nin onkogenik aktivitesi pek çok yolakda meydana gelebilir. Pankreas kanserlerinde AKT1 sinyal yolağında aktivatör fonksiyonu vardır. Mide kanserinde DNA metilasyon markerı olarak araştırılmaya aday gendir (22).

2.5.2.5. P16 (CDKN2A) geni (MIM ID: 600160)

Kromozom 9p21.3de lokalize olan, üç ekzonlu, 26.74 kb uzunluğunda bir genidir. Cyclin-dependant kinase inhibitör 2A (CDKN2A) olarak isimlendirilir. Bu gen TBG olup malignansilerde epigenetik susturulmaya en yatkın genlerdendir (66).

Hüresel süreçte, birbiri ardı sıra gerçekleşen G1, S, G2 ve M fazlarının oluşturduğu hüresel döngüde G1 ve G2 – M kontrol noktalarında nükleotid eksizyon tamirinde görev alır. Bu genin kodladığı protein hücre siklus düzenleyici yollarından p53 ve retinoblastoma yollarında rol alır (28).

Retinoblastoma proteini (RB1), hücre siklusunda G1 fazının kontrolünde görev alır. Cyclin D / CDK4 kompleksi oluşumu, RB1'in fosforillenecek inhibe olmasına ve bu kontrol noktasının işlevsiz kalmasına yol açar. P 16 geni Cyclin D / CDK4 kompleksi oluşumunu engelleyerek bu kontrol noktasının sağlıklı çalışmasına olanak sağlar (Şekil 2.7) (22, 79).



Şekil 2.7 P16 geninin G1 fazından S fazına geçişi durdurma mekanizması. Stendon ve ark., 2008'den değiştirilerek alınmıştır (79).

Melanoma, özofagus tümörleri, pankreas kanseri, renal kanser, sarkoma ve baş boyun skuamoz hücreli karsinomunda farklı mutasyonları tanımlanmıştır. Mide, meme, kolorektal, mesane, karaciğer ve akciğer kanserlerinde yapılacak DNA metilasyon çalışmaları için aday genidir (22, 79).

Premalign lezyonlarda olduğu gibi mide kanserlerinde de P16 geni promotor bölgesi metilasyon varlığı gösterilmiştir. Bu genin midede hücre siklus kontrolünde,

apoptozisde ve DNA onarımında hayati rol oynadığı ve bunun bozukluğunun mide karsinogenezi ile yakından ilişkili olduğu saptanmıştır (81).

2.5.2.6. hMSH2 geni (MIM ID: 609309)

Kromozom 2p22-p21 de lokalize olan, 16 ekzonlu, 80.10 kb uzunluğunda bir genidir. MutS, E. Coli, homolog of, 2; hMSH2 olarak isimlendirilir. hMSH2 geni E. Coli MutS geninin homologudur.

DNA yanlış eşleşme onarım sisteminde rol oynayan DNA tamir genidir. DNA'da 2-4 bazlık yer değiştirmeleri içeren yanlış eşleşmelerin onarımlarında rol alır. Mitokondriyal DNA metabolizmasında yer alır (66).

TACDSTD1 geni dizisinin üst ucunda bulunan 3 bölgenin delesyonu hMSH2 geninin epigenetik olarak susturulmasına yol açar (22).

Kolorektal kanserler, Muir-Torre sendromu, glioma, kolorektal / endometrial kanser, Herediter nonpolipozis kolorektal kanser (HNPCC), akut lenfositik lösemi, meme ve kolorektal kanser, MSS tümör ve lenfoma, kolon kanseri, endometrial kanser, Turcot sendromu gibi hastalıklarla ilişkili mutasyonları tanımlanmıştır (79).

Hp medikal eradikasyonundan sonra yanlış eşleşme onarım proteinlerinden hMSH2'nin mide mukozasında belirgin olarak arttığı gösterilmiştir (68).

2.5.2.7. hMLH1 geni (MIM ID: 120436)

Kromozom 2p22-p21 de lokalize olan, 16 ekzonlu, 80.10 kb uzunluğunda bir genidir. MutL, E. Coli, Homolog of, 1; hMLH1 olarak isimlendirilir. Genomda 3p21.3 lokalizasyonundadır. 57.50 kb uzunluğundadır. 19 ekzonludur. hMLH1 geni E. Coli MutL geninin homologu olup DNA yanlış eşleşme onarım sisteminde rol oynayan DNA tamir genidir. TBG olup malignensilerde epigenetik susturulmaya en yatkın genlerdendir (28, 66, 79).

Sıklıkla Promoter bölgesinin metilasyonu ile inaktive olduğu gösterilmiştir (83).

Kolorektal kanserler, mide kanseri, Muir-Torre sendromu, meme kanseri, endometrial kanser, glioblastoma, akciğer kanseri riski, Turcot sendromu gibi hastalıklarla ilişkili mutasyonları tanımlanmıştır (22).

Hp medikal eradikasyonundan sonra yanlış eşleşme onarım proteinlerinden hMLH1'in mide mukozasında belirgin olarak arttığı gösterilmiştir (68).

2.6. METİLASYON ANALİZ YÖNTEMLERİ

2.6.1. Bisülfite Genomik Dizileme

DNA'nın bisülfite modifikasyonundan (ileri bölümlerde açıklanacak olan DNA dizisindeki metillenmemiş C nükleotidlerinin U nükleotidine dönüştürme işlemleri) sonra incelenecek bölgenin PCR ile çoğaltıldığı ve dizilemesinin yapıldığı bir yöntemdir (43).

2.6.2. Kombine Bisülfite Restriksiyon Analizi (COBRA)

DNA'nın bisülfite modifikasyonundan sonra PCR ile çoğaltıldığı ve bilinen restriksiyon enzimleri ile kesiminin yapıldığı bir yöntemdir. Agaroz veya poliakrilamide jel elektroforezde yürütülen kesilmiş PCR ürünleri boyutlarına göre gruplandırılarak metillenmiş ve metillenmemiş dizi ayrımı yapılır (43).

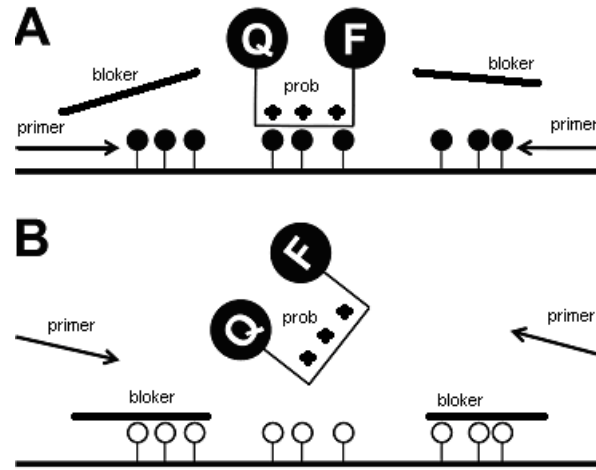
2.6.3. HeavyMethyl Yöntemi

CpG adacıklarına yakın bölgelere yapışacak primerler, sadece metillenmemiş DNA'ya hibridize olacak oligonükleotid blokerlar ve metillenmiş dizinin içine hibridize olacak prob hazırlanır.

Metillenmiş DNA’da oligonükleotid blokerlar DNA dizisine hibridize olamazken floresan prob kendi bölgesine hibridize olur. Primerlerin bağlanmasıyla amplifikasyon başlar. Amplifikasyon ilerlerken DNA polimeraz ekzonukleaz aktivitesiyle floresan probu parçalayarak diziden uzaklaştırır. Bu sırada parçalanmış probun vereceği floresan ışığa görüntülenir (Şekil 2.8-A).

Metillenmemiş DNA’da ise diziyeye hibridize olan oligonükleotid blokerlar primerlerin bağlanmasına ve amplifikasyonun başlamasına izin vermezler. Metillenmiş diziyeye uygun hazırlanan floresan prob da diziyeye bağlanamaz. Floresan ışığa elde edilemez (Şekil 2.8-B).

Elde edilen floresan ışığa farklılıklarına göre dizilerin metillenip metillenmedikleri değerlendirilir (43).



Şekil 2.8 HeavyMetil yönteminde DNA dizisinin metillenip metillenmediğine bağlı olarak gerçekleşen reaksiyon. Şekil A’da metillenmiş dizinin amplifikasyonu, Şekil B’de ise metillenmemiş dizinin amplifikasyonu gösterilmektedir. Kristensen ve ark., 2009’den değiştirilerek alınmıştır (43).

2.6.4. Metilasyon Spesifik PCR (MS-PCR)

DNA’nın bisülfid modifikasyonundan sonra metillenmiş ve metillenmemiş dizilere spesifik primerler kullanılarak incelenecek bölgenin PCR amplifikasyonu yapılır. PCR ürünlerinin jel elektroforez yöntemi ile görüntülenmesi ile dizilerin metillenip metillenmediği değerlendirilir (43).

2.6.5. Kantitatif MS-PCR: MethyLight

Metillenmiş ve metillenmemiş dizilere spesifik primerler ile incelenecek DNA dizisinin içine hibridize olacak floresan probe hazırlanır. DNA'nın bisülfid modifikasyonundan sonra metillenmiş ve metillenmemiş dizilere spesifik primerler kullanılarak incelenecek bölgenin PCR amplifikasyonu yapılır. Real time PCR cihazına yüklenen modifiye edilmiş DNA ürünlerinin amplifikasyonu sırasında DNA polimeraz ekzonukleaz aktivitesiyle floresan probu parçalayarak diziden uzaklaştırır. Bu sırada parçalanan probun vereceği floresan ışımaya cihaz tarafından görüntülenir. Kullanılan primerlerin spesifikliğine uygun olarak dizilerin metilasyon durumları değerlendirilir (43).

2.6.6. Metilation Sensitive-High Resolution Melting (MS-HRM) Yöntemi

MS-HRM esas olarak bir Real-Time PCR uygulamasıdır.

Bu uygulamada DNA'nın incelenmek istenilen bölgesi klasik PCR reaksiyonu ile çoğaltılır. Bu reaksiyonda çift iplikli ürünün tek iplikli hale getirilmesi (denatürasyon), primerlerin bağlanması (annealing) ve polimeraz enzimi ile zincirin uzaması (extension) aşamalarından oluşan döngüler gerçekleşir. Sonrasında HRM uygulamasına geçilir. Bu aşamada sadece çift iplikli DNA'da (dsDNA) komplementer bazlar arasında bağlandığında ışımaya veren, dolayısıyla tek iplikli DNA (ssDNA) ile hiçbir etkileşime girmeyen HRM floresan boyası (SYBR green boya) kullanılır. Bu özellik melting analizi için önemlidir. Bu boyanın dsDNA'ya bağlandığındaki verdiği floresan ışımaya real-time cihazındaki alıcı sayesinde toplanır. En son olarak da yazılım yardımıyla bu ışımaların analizi yapılır ve dizi varyantlarının durumu değerlendirilir.

Yüksek rezolüsyonlu erime analizi, farklı bireylerdeki belirli DNA dizilerinin T_m derecelerinin karşılaştırılmasına olanak sağlayan bir metottür. Reaksiyon başlangıcında floresan ışımaya yüksektir. PCR'dan sonra sıcaklığın belirli aralıklar içerisinde yükseltilmesiyle DNA çift ipliklerinin birbirlerinden ayrılması sağlanır. Buna paralel olarak azalan floresan ışımaya göre DNA'nın T_m derecesi bir eğri olarak saptanır. Bu

gözlenen yüksek rezolusyonlu erime eğrisi, incelenen DNA örneğine özgüdür. Sonuç olarak farklı formlar (heterozigot-homozigot) içerdikleri dizi değişikliğine bağlı olarak gösterdikleri farklı melting eğrileriyle birbirlerinden ayrılırlar. Tek bir bazlık farklılık bile melting eğrisinde değişiklik yapar. Kullanılan yazılımın bir özelliği sayesinde benzer erime eğrileri gruplanarak analizin daha kolay yapılması sağlanır.

Bugüne kadar 87 genin inaktif hale geldiği çalışmalarla ortaya konmuştur. Ancak CpG adacıkları olan genlerin henüz büyük bölümünün gastrit ve mide kanseri örneklerindeki DNA metilasyon düzeyleri hakkında herhangi bir bilginiz bulunmamaktadır. Belirli kanser tipleri gibi moleküler biomarker olarak kullanılacak verilere henüz ulaşılammıştır. Diğer taraftan bugüne kadar yapılan çalışmalarda kullanılan yöntemlerin metilasyon oranını belirlemedeki sensitivitesi de çalışmadan çalışmaya değişkenlik göstermektedir. Düşük orandaki metilasyonu saptayabilecek yöntemlerin gastrit ve mide kanseri örneklerinde uygulanması henüz çok yetersizdir (93).

HRM tekniği ile metilasyon çalışmaları da yapılabilir. İncelenmek istenilen DNA yapısındaki CpG adacıklarında metilasyon olup olmadığının değerlendirilebilmesi için metillenmiş ve metillenmemiş C nükleotidlerini birbirinden ayırabilmek gerekir. Bunun için bisülfite modifikasyon işlemi yapılmaktadır. Bisülfite modifikasyon sayesinde metillenmemiş C nükleotidleri kimyasal olarak U nükleotidlerine dönüştürülürken, metillenmiş C nükleotidleri bisülfite modifikasyonundan etkilenmeden C olarak kalırlar (**Şekil 2.9**). DNA dizilerinin içerdikleri C ve U nükleotid farklılıklarına göre farklı erime eğrileri saptanır (45).

	orjinal dizi	bisülfite uygulama sonrası
Metillenmemiş DNA :	N-C-G-N-C-G-N-C-G-N	N-U-G-N-U-G-N-U-G-N
Metillenmiş DNA :	N-C-G-N-C-G-N-C-G-N	N-C-G-N-C-G-N-C-G-N

Şekil 2.9 Bisülfite modifikasyonunun C nükleotidlere etkisi. Kristensen ve ark., 2009'dan değiştirilerek alınmıştır (43).

Kanserde mortalitenin düşürülmesinde en önemli basamak erken tanıdır. Metilasyon değişikliklerinin de kanser oluşumunun erken basamaklarında olduğu düşünülürse, metilasyon kalıbı değişikliklerinin incelenmesi mortalitenin azaltılması yönünden umut vericidir. Ayrıca son yıllarda vücut sıvılarında analiz ile erken tanıya ilişkin verilerin toplanmasına yönelik çalışmalar gerçekleştirilmektedir. Akciğer kanseri için balgam veya bronşiyal lavaj, prostat kanseri için idrar, multipl kanserlerde de plazma ve serum kullanılmaktadır. Bu tip örneklerde, tümör orijinli DNA'yı belirlemek düşük konsantrasyonda oldukları için ve normal hücre DNA'ları ile kontamine oldukları için çok zordur. Bu nedenle ileri düzeyde belirleme kapasitesi olan yöntemlere gereksinim duyulmaktadır.

Bazı uygulamalarda, tümör orijinli materyal direkt olarak test edilmekte, düşük belirleme limitleri olan yöntemlerin kullanımına gerek duyulmamaktadır. Örneğin bugün klinik amaçla da kullanılan MGMT(O-6-methylguanine-DNA methyltransferase) gen metilasyonu olan alkilleyici ajanlarla tedavi edilen glioblastoma olgularında çok iyi prognoz için bir biyomarkerdir. Pek çok DNA metilasyon biyomarkerleri bulunmaktadır. Ancak yeterli diagnostik sensitivite ve diagnostik testin spesifitesindeki sınırlar nedeniyle kliniğe aktarılamamışlardır. Biyomarkerin diagnostik sensitivitesi belirli bir biyomarker analizi pozitif olan ve hastalığı konfirme edilmiş olguların oranını ifade ederken, diagnostik spesifite testi negatif olan sağlıklı kontrol bireylerinin oranıdır.

DNA metilasyon analizlerinin hemen tümü PCR temellidir. Bisülfid modifikasyonundan geçirilen DNA kalıp olarak kullanılır. Bugüne kadar geliştirilen tüm yöntemler birlikte değerlendirildiğinde kantitatif değerlendirme doğruluğu, yüksek analitik sensitifliği, düşük yanlış-pozitif ve yanlış-negatif oranları, tek CpG bölgesini belirleme kapasitesi, PCR kontaminasyon riskinin düşük olması (kapalı tüp analizi), sonuçların kolayca yorumlanabilmesi, ek cihaza gerek duyulmaması ve ucuz olması gibi özellikler açısından karşılaştırıldığında her yöntemin bir diğerine göre üstünlüğü veya dezavantajı bulunmaktadır. **Tablo 2.2**'de günümüzde kullanılan yöntemlerin birbirleriyle karşılaştırılması yapılmıştır.

Tablo 2.2 Klinik uygulanabilirliği açısından önemli olan faktörlerin yöntemlere göre karşılaştırılması Krstensen ve ark., 2009'dan özetlenmiştir (43).

METOD	ANALİTİK HASSASİYET	İŞ ÇIKARMA YETENEĞİ	KAPALI TÜP	KANTİTATİF DOĞRULUK
Bisülfid Genomik Dizileme	Düşük	Orta	Hayır	Düşük
COBRA	Orta	Orta	Hayır	Yüksek
HeavyMethyl	Yüksek	Yüksek	Evet	Yüksek
MS-PCR	Yüksek	Orta	Hayır	Düşük
MethyLight	Yüksek	Yüksek	Evet	Yüksek
MS-HRM	Yüksek	Yüksek	Evet	Orta

Metilasyon sensitif yüksek rezolusyonlu erime ısısı yönteminin (MS-HRM) genel olarak pek çok metodolojik avantajı olduğu bildirilmiştir. Bu yöntemde çok fazla veri noktası kullanıldığından erime eğrileri daha keskindir ve amplikondaki ufak farklılıklar saptanabilir. Diğer bir avantajı cihaz bünyesinde bulunan yazılım sayesinde uç nokta floresan, ısı kayması ve internal oligonükleotid belirleyiciler ile normalizasyon yapılmaktadır. Bugüne kadar imprinted lokusta metilasyon analizi, MGMT promoter metilasyonu ve H19 imprinted gen analizlerinde kullanılmış ve etkinliği rapor edilmiştir (43).

HRM yöntemi ile yapılan çalışmalarda tüm deney başka bir müdahale gerektirmeden tek bir cihaz içerisinde gerçekleştirilmiş olur. PCR'da oluşan, analizi güçleştirebilecek veya yanlış sonuç verilebilmesine sebep olabilecek primer-primer dimerleri veya non-spesifik ürünler orjinal ürünlerden rahatlıkla ayrılabilirler. Herhangi bir amplikonun herhangi bir bilinmeyen dizi varyasyonu, allel spesik prob gerektirmeden fluoresan boya ile belirlenebilir.

HRM analizi heterozigot PCR ürünlerindeki tek baz değişimlerini bile yüksek duyarlılık ve özgüllükle saptayabilir. Metilasyon analizlerinde %0,1 düzeyindeki metilasyon durumu dahi saptanabilir. Güvenilir, hızlı, ucuz, lokus spesifik ve hem araştırma hem de tanı için uygun bir tarama yöntemidir (88).

3. GEREÇ ve YÖNTEMLER

Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından desteklenen (Proje No:109S234) bu çalışmada, mide kanseri ve gastrit hasta gruplarından (Hp eradikasyonu için medikal tedavi öncesi ve sonrası) elde edilen doku örneklerindeki hipermetile genlerin karşılaştırması yapılarak aralarındaki ilişkinin ortaya konması amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda gastrit ve mide kanseri tanısı alan doku örnekleri MS-HRM tekniği ile analiz edilmiş ve kantitatif değerler gruplar arasında karşılaştırılmıştır.

3.1. GEREÇLER

3.1.1. Kullanılan Gereçler

- Mikro pipet takımı ve uçları (2–20–100–1000 µl) (Gilson)
- Petri kutusu (Steril 4cm çaplı) (NuncTMSurface)
- Bistüri ucu (Aesculap steril BB520)
- Kapaklı santrifüj tüpleri (1,5 ml)
- Kapaklı ependorf Tüpü (1,5 ml lik)
- Falkon tüp (30 ml) (Sterile universal container tube)
- Strip tüpü ve kapağı (0,2 ml Greiner bio one)
- Buzdolabı (Arçelik)
- Çalkalamalı su banyosu (Nüve)
- Mikrosantrifüj (Eppendorf)
- Vorteks (Heidolph)
- MagNa Pure Compact Nucleic Acid Isolation Robotu (Roche)
- Spektrofotometre (Eppendorf)
- Thermal Cycler (Gold 96 Well GenAmp PCR System 9700 ABI PRISM)
- Isıtıcı blok (Elektro-mag)
- Deep Freeze (Meraeus)

- LightCycler ® 480 Real Time PCR (Roche)
- LightCycler® 480 Multiwell Plate 96, colorless (50 plates/kutu) (Roche)

3.1.2. Kullanılan Kimyasal Malzemeler

- RPMI–1640 Medium (modified, 500 ml+10,25 ml 200mM L-glutamine, SigMa)
- PBS solusyonu (500 ml distile su içine 4g NaCl, 0.1g KCl, 0.57g Na₂HPO₄.2H₂O, 0.1g KH₂PO₄ eklenerek oluşturulan tampon solusyonu)
- MagNa Pure DNA Tissue Lysis Buffer (100ml) (Roche)
- Proteinase K, Recombinanat, PCR grade (100mg liyofilize) (Roche)
- MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I– Large volume (32 isolation) (Roche)
- Epiect ® Bisulfite Kit (48) (Qiagen)
- CpGenome TMUniversal Methylated DNA (10µg / 100µl) (Millipore-Chemicon ® International)
- CpGenome TMUniversal Unmethylated DNA (5µg / 50µl)X 2 vials (Millipore-Chemicon ® International)
- LightCycler ® 480 High Resolution Melting Master kiti (5ml / 500 reaksiyon) (Roche)
- CYP1B1 primer (metillenmiş forward / reverse) / (metillenmemiş forward / reverse) (Ella Biotech GmbH / Deutschland)
- SCGB3A1 primer (metillenmiş forward / reverse) / (metillenmemiş forward / reverse) (Alpha DNA, Montreal, Quebec)
- BCL2 primer (metillenmiş forward / reverse) / (metillenmemiş forward / reverse) (Alpha DNA, Montreal, Quebec)
- MT1G primer (metillenmiş forward / reverse) / (metillenmemiş forward / reverse) (Alpha DNA, Montreal, Quebec)
- hMSH2 primer (metillenmiş forward / reverse) / (metillenmemiş forward / reverse) (Alpha DNA, Montreal, Quebec)
- hMLH1 primer (metillenmiş forward / reverse) / (metillenmemiş forward / reverse) (Alpha DNA, Montreal, Quebec)

- p16 primer (metillenmiş forward / reverse) / (metillenmemiş forward / reverse)
(Alpha DNA, Montreal, Quebec)
- Distile Su

3.2. YÖNTEMLER

3.2.1. Hasta Seçimi ve Doku Elde Edilmesi

Bu çalışma ESOĞÜ Tıbbi Genetik Anabilim Dalı başkanlığında Gastroenteroloji Bilim Dalı, Genel Cerrahi Anabilim Dalı ve Patoloji Anabilim Dallarının katılımıyla bir ekip çalışması şeklinde gerçekleştirilmiştir. Çalışmaya dahil olan hastalara araştırma hakkında bilgi verilmiş ve onam formları alınmıştır.

ESOGÜ Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı tarafından mide kanseri tanısı ile ameliyat edilen ve intestinal tip mide kanseri olduğu rapor edilen 30 vakadan alınan doku örnekleri çalışmamızın kanser hasta grubunu oluşturmuştur.

ESOGÜ Gastroenteroloji Bilim Dalı tarafından gastrit tanısı ile endoskopileri yapılan 37 vakadan alınan biyopsi örnekleri de çalışmamızın gastrit hasta grubunu oluşturmuştur. Gastroenteroloji Bilim Dalı tarafından Hp(+) olarak tanı alan vakalara Hp eradikasyonu için medikal tedavi verilerek tedavi sonrası kontrole çağırılmışlardır. Sadece 15 vaka çalışma süreci içinde tedavilerini tamamlayarak 3–8 ay sonra kontrole gelmişler ve kontrol endoskopisi ile örnek alınarak analiz edilmiştir.

ESOGÜ Patoloji Anabilim Dalı tarafından bu dokuların histopatolojik incelemeleri yapılmıştır.

Hp durumu değerlendirilmesi için dokulara mikroskopik, kültür üreme ve üreaz testi incelemesi yapılmıştır. Herhangi bir incelemede Hp varlığı tesbit edilen vakalar Hp(+) ve hiçbirinde Hp varlığı tesbit edilemeyen vakalar Hp(-) olarak değerlendirilerek gruplandırılmıştır. 30 vakadan oluşan kanser grubunda 5 vaka Hp(-), 25 vaka Hp(+) olarak tanı alırken 37 vakadan oluşan gastrit grubunda 14 vaka Hp(-), 23 vaka Hp(+) olarak tanı almıştır.

Gastrit hasta grubunun (n=37) yaş dağılımı 21–75 yaş arasında olup grubun yaş ortalaması 46.60 ± 2.39 ; mide kanseri hasta grubunun (n=30) yaş dağılımı 36–79 yaş arasında olup grubun yaş ortalaması 62.27 ± 2.05 olarak bulunmuştur.

Çalışmamız için Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulundan 13 Nisan 2009 tarih ve 2009 / 130 sayılı onay alınmıştır.

3.2.2. Doku Homojenizasyonu

Analiz yapılincaya kadar buzdolabında - 20 ° C de saklanmış olan taze dokular gruplar halinde çalışmaya alınmıştır.

-1–10 mg boyutlarında alınan doku parçaları petri kutularında mekanik olarak bistüri ile kıyılarak ve ezilerek parçalanmıştır.

-Kıyılan ve ezilen dokular 500 µl PBS solüsyonu eklenerek 1,5 ml tüplere alınmış ve 14000 rpm de 10 dk. santrifüj edilmişlerdir.

-Tüplerin üzerinde kalan solüsyon uzaklaştırılmıştır. Üzerlerine 500 µl PBS solüsyonu eklenerek vorteksle karıştırılan tüpler tekrar 14000 rpm hızla 10 dakika santrifüj edilmiştir. Bu yıkama ve istenmeyen doku parçalarının uzaklaştırılma işlemi iki üç kere tekrarlanmıştır.

-Son santrifüj işleminden sonra üzerinde kalan solüsyon uzaklaştırılan tüplere 200 µl tissue lysis buffer (Roche, MagNa Pure DNA Tissue Lysis Buffer) ve 20 µl proteinaz K (Roche, Proteinase K, Recombinanat, PCR grade) eklenerek tüpler 60 ° C sıcaklığa getirilmiş olan çalkalamalı su banyosunda üç saat tutulmuştur. Daha iyi homojenizasyonun sağlanabilmesi için belirli aralıklarla tüpler vortekste karıştırılmışlardır.

-Bu aşama sonunda dokular homojenize sıvı haline gelmiş oldular.

3.2.3. Homojenize Edilen Dokulardan DNA Elde Edilmesi

DNA izolasyonu nükleik asit izolasyon robotunda gerçekleştirilmiştir.

-MagNa Pure Compact Nucleic Acid Isolation Robotu protokolü “Total Nucleic Acid Plasma 500”, “sample volume 500 µl” ve “elution volume 100 µl ” olarak ayarlanmış, yüklenen örneklerin isimleri yazılarak kartuş ve tüpleri yerleştirilmiştir.

-Homojenize sıvı haline gelmiş dokuların üzerine 280 µl PBS eklenerek total volume 500 µl olacak şekilde robota yüklenmiştir.

-DNA izolasyonu bitince robottan elde edilen DNA ürünleri, bisülfıt modifikasyon yapılmak üzere - 20 ° C buzdolabına kaldırılmıştır.

3.2.4. Elde Edilen DNA Ürününün Bisülfıt Modifikasyon İşleminin Yapılması

DNA izolasyonu tamamlanan örneklerin aynı zamanda bisülfıt modifikasyon işlemine ve takibindeki PCR reaksiyonlarına sokulabilmesi için bisülfıt modifikasyon işlemine kadar DNA örnekleri -20 ° C de saklanmışlardır.

Elde edilen DNA ürünlerinin bisülfıt modifikasyonu işlemi için Epiect ® Bisulfite Kit (48) (Qiagen) kullanılmıştır. Kitin kullanma el kitabında 40 µl hacim içinde 1–500 ng DNA ürünleri için önerilen “Düşük konsantrasyon DNA’daki metillenmemiş sitozinlerin sodyum bisülfıt dönüşümü” protokolü uygulanmıştır:

-Modifiye edilecek DNA ürünleri – 20 ° C’den çıkarılarak çözünmeye bırakılmıştır.

-Bisülfıt mix çıkarılarak her tüp (sekiz örnek modifiye etmek üzere hazırlanan kit içeriği) üzerine 800 µl RNase free water eklenmiş ve beş dakika kadar vorteksleyerek karıştırılmıştır.

-200 µl PCR tüpüne 10 µl DNA, 10 µl RNase free water, 85 µl Bisülfid miks, 35 µl DNA protect buffer konularak total 140 µl hacim elde edilmiştir.

-Termal cyclus cihazı beş dakika 95 ° C (denatürasyon), 25 dakika 60 ° C (inkübasyon), beş dakika 95 ° C (denatürasyon), 85 dakika 60 ° C (inkübasyon), beş dakika 95 ° C (denatürasyon), 175 dakika 60 ° C (inkübasyon), 16 saat 20 ° C olacak şekilde programlanmıştır. Hazırlanan PCR tüpleri termal cyclus cihazına yüklenerek program çalıştırılmıştır.

-Program sonunda elde edilen ürünler yıkanarak temizlenme aşamalarına geçilmek üzere 1,5 ml tüplere alınmış ve hafifçe vorteksleyerek karıştırılmıştır.

-Her tüpe 560 µl taze hazırlanmış Buffer BL eklenerek vortekslenerek bu karışım kit içeriği olan spin tüplerine alınmıştır.

-Spin tüpleri toplama tüplerine yerleştirilerek son hızda bir dakika santrifüj edilmiş, toplama tüplerine süzülen atık dökülerek spin tüpleri tekrar yerleştirilmiştir.

-Her tüpe 500 µl Buffer BW eklenerek son hızda bir dakika santrifüj edilmiş, toplama tüplerine süzülen atık dökülerek spin tüpleri tekrar yerleştirilmiştir.

-Her tüpe 500 µl Buffer BD eklenerek spin tüplerinin kapakları hemen kapatılmış, 15 dakika 15–25 ° C oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. Sonrasında son hızda bir dakika santrifüj edilmiş, toplama tüplerine süzülen atık dökülerek spin tüpleri tekrar yerleştirilmiştir.

-Her tüpe 500 µl Buffer BW eklenerek son hızda bir dakika santrifüj edilmiş, toplama tüplerine süzülen atık dökülerek spin tüpleri tekrar yerleştirilmiştir. Bu işlem bir kez daha tekrarlanmıştır.

-Spin tüpleri yeni toplama tüplerine yerleştirilmiş, son hızda bir dakika santrifüj edilerek kalan sıvılar tamamen uzaklaştırılmaya çalışılmıştır.

-Spin tüpleri temiz epandorf tüplerine alınarak daha önce 56–60 ° C sıcaklığa getirilmiş olan ısıtıcı blok üzerine ağızları açık olarak bırakılmıştır. Beş dakika inkübe edilerek kalan sıvıların buharlaşarak uzaklaştırılması sağlanmıştır.

-Spin tüpleri tekrar temiz epandorf tüplerine alınmış, spin tüplerinin ortasında bulunan membrana 40 µl Buffer EB eklenerek 15 000g (12 000rpm) hızda bir dakika santrifüj edilmiştir. Bu aşama sonunda epandorf tüplerinde bisülfid modifikasyon işlemi gerçekleşmiş olan pürifiye DNA ürünü toplanmıştır.

-Son aşamada spin tüplere iki kere 40 µl EB buffer eklenerek 80 µl toplam hacimli dönüştürülmüş ürün elde edilmiştir. Her örneğe iki kere bisülfid modifikasyon işlemi uygulanarak toplam 160 µl ürünle HRM metilasyon aşamasına geçilmiştir.

-HRM aşamasında kullanılacak olan pozitif/metillenmiş kontrol örneği CpGenome TMUniversal Methylated DNA (Millipore-Chemicon ® International) ve negatif/metillenmemiş kontrol örneği CpGenome TMUniversal Unmethylated DNA (Millipore-Chemicon ® International) bu aşamada modifiye edilmiştir.

3.2.5. Modifiye Edilen DNA Ürünlerinin MS-HRM (Metilation Sensitive - High Resolution Melting) Yöntemi ile Metilasyon Analizinin Yapılması

Bu aşamadaki işlemler LightCycler ® 480 real time PCR (Roche) cihazında uygulanmıştır. Cihazla uyumlu olan ‘‘LightCycler ® 480 High Resolution Melting Master ‘‘ kiti kullanılarak PCR amplifikasyonu ve yüksek rezolusyonlu erime analizi gerçekleştirilmiştir. Çalışmamızda metilasyon paternleri değerlendirilen genlerin primer dizileri **Tablo 3.1** ‘de verilmiştir.

Tablo 3.1 Analizi yapılan genlere ilişkin primer dizileri

BCL2		KAYNAK
Metillenmiş	F 5'TCGTATTTTCGGGATTCGGTC-3' R 5'ACCTAAACGCAAACCCCGC-3'	52
Metillenmemiş	F 5'TTGTATTTTGGGATTTGGTT-3' R 5'AACTAAACACAAACCCAC-3'	
MLH1		
Metillenmiş	F 5'TATATCGTTCGTAGTATTCGTGT-3' R 5'TCCGACCCGAATAAACCCAA-3'	10, 31, 65
Metillenmemiş	F 5'TTTGATGTAGATGTTTATTAGGGTTGT-3' R 5'ACCACCTCATCATAACTACCCACA-3'	
MSH2		
Metillenmiş	F 5'TCGTGGTCGGACGTCGTTC-3' R 5'CAACGTCTCCTTCGACTACACCG-3'	38, 84
Metillenmemiş	F 5'GGTTGTTGTGGTTGGATGTTGTTT-3' R 5'CAACTACAACATCTCCTTCAACTA CACCA-3'	
MT1G		
Metillenmiş	F 5'TGCGGTGTGCGTTTAGTT-3' R 5'AAACCCAACAACCAACGA-3'	49
Metillenmemiş	F 5'TGTGGTGTGTGTTTAGTTGTG-3' R 5'CCAACAACCAACAACACTATTTTAA-3'	
P16		
Metillenmiş	F 5'TTATTAGAGGGTGGGGCGGATCGC-3' R 5'GACCCCGAACCGCGACCGTAA-3'	1, 54, 66
Metillenmemiş	F 5'TTATTAGAGGGTGGGGTGGATTGT-3' R 5'CAACCCCAACCAACAACATAA-3'	
SCGB3A1		
Metillenmiş	F 5'-GTTTCGTGGTTTTGTTTCGGGTAGTC-3' R 5'-GCAAAACCCCAAAAAACGACG-3'	24
Metillenmemiş	F 5'-GAAGTTTTGTGGTTTTGTTTGGGTAGTT-3' R 5'-CACACAAAACCCCAAAAAACAACA-3'	
CYP1B1		
Metillenmiş	F 5'-TCCGGGTCAAAGCGGGC -3' R 5'-CGTCAATTCATGCCCTTGC-3'	71
Metillenmemiş	F 5'-GATGGGAGTTTGGGTAAAG -3' R 5'-TTACAACCTCACAACATAAATCAC -3'	

Kitin kullanma el kitabına uygun olarak uygulanan 50 siklus amplifikasyon aşamaları aşağıda maddeler halinde belirtilmiştir:

- Pre-inkubasyon olarak 95 ° C sıcaklıkta 10 dakika bekleme

- ‘‘Touchdown PCR protokolü’’ olarak önerilen ve primer annealing sıcaklık aralığının 65–53 ° C olduğu protokol:

95 ° C sıcaklıkta 10 saniye bekleme ve ısınma hızı 4.4 ° C/saniye

65 ° C sıcaklıkta 15 saniye bekleme ve ısınma hızı 2.2 ° C/saniye

72 ° C sıcaklıkta 25 saniye bekleme ve ısınma hızı 4.4 ° C/saniye

- HRM analiz aşaması önerilen standartlara uygun olarak ayarlanmıştır.

- Her gen için ayrı plate kullanılarak: 30 kanser, 14 Hp(-) gastrit, 23 Hp(+) gastrit, 15 Hp(+) gastrit tedavi sonrası olmak üzere toplam 82 örnek; pozitif/metillenmiş kontrol, negatif/metillenmemiş kontrol örnekler ve bunların %75, %50, %25 ara değer örnekleri; reaksiyonun negatif kontrolü olarak HRM mix ve distile su örnekleri

ayrı kuyucuklara 10 µl olacak şekilde yüklenmiştir. Ayrıca her kuyucuğa 10 µl HRM master mix, 2 µl primer F (forward) ve 2 µl primer R (reverse) (10 µM konsantrasyonda), 2 µl Mg² (2.5 µM konsantrasyonda), 1 µl ‘‘RNase free’’ su eklenerek her kuyuda 27 µl toplam hacime ulaşılmıştır. LightCycler ® 480 real time PCR (Roche) cihazı bu protokol çerçevesinde hazırlanıp çalıştırılarak işlem bittikten sonra değerlendirmeler cihazın kendi analiz programı ile yapılmıştır.

3.3. İSTATİSTİK

Verilerin istatistik analizi SPSS 15 paket programında değerlendirilmiştir. Nicel olarak değerlendirilen verilerin normal dağılım analizleri yapılmıştır. Normal dağılım göstermeyen verilerin değerlendirilmesinde Mann-Whitney U ve Wilcoxon T testleri kullanılmıştır. Ayrıca Spearman’s korelasyon analizi ve X² analizi uygulanmıştır.

4. BULGULAR

Mide kanseri (intestinal tip) hasta grubu 30 olgu (5 hasta Hp - / 25 hasta Hp +) ve gastrit hasta grubu da 37 olgu (14 hasta Hp - / 23 hasta Hp +) ile çalışma grupları oluşturulmuştur. Gastrit hasta grubunun (n=37) yaş dağılımı 21–75 yaş arasında olup grubun yaş ortalaması 46.60 ± 2.39 ; mide kanseri hasta grubunun (n=30) yaş dağılımı 36–79 yaş arasında olup grubun yaş ortalaması 62.27 ± 2.05 olarak bulunmuştur. Bu veriler ışığında gastrit ve mide kanseri hasta grupları arasında yaşları yönünden anlamlı istatistiksel fark bulunmuştur ($t= -4.85$; $Sd= 65$; $p< 0.001$).

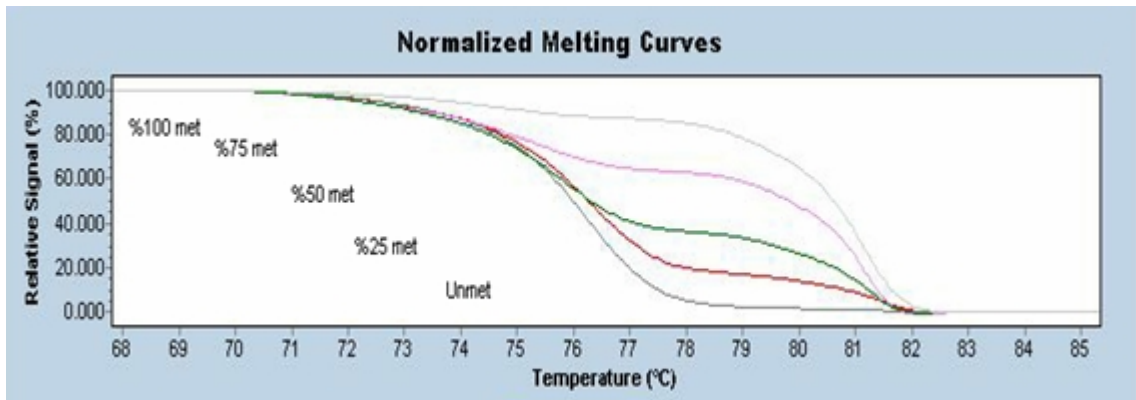
Hp eradikasyonu için medikal tedavi verilen 23 Hp(+) gastrit hasta grubunda çalışma süreci içinde 15 hasta tedavisini tamamlayarak sonrasında kontrole gelmiştir. Kontrol endoskopileri yapılan bu 15 hastanın sadece 4 tanesinde Hp'nin eradike edilebildiği saptanırken diğer 11 hastada Hp enfeksiyonunun devam ettiği saptanmıştır.

4.1. PCR ÜRÜNLERİNİN METİLYASYON PATERNLERİNİN ANALİZİ

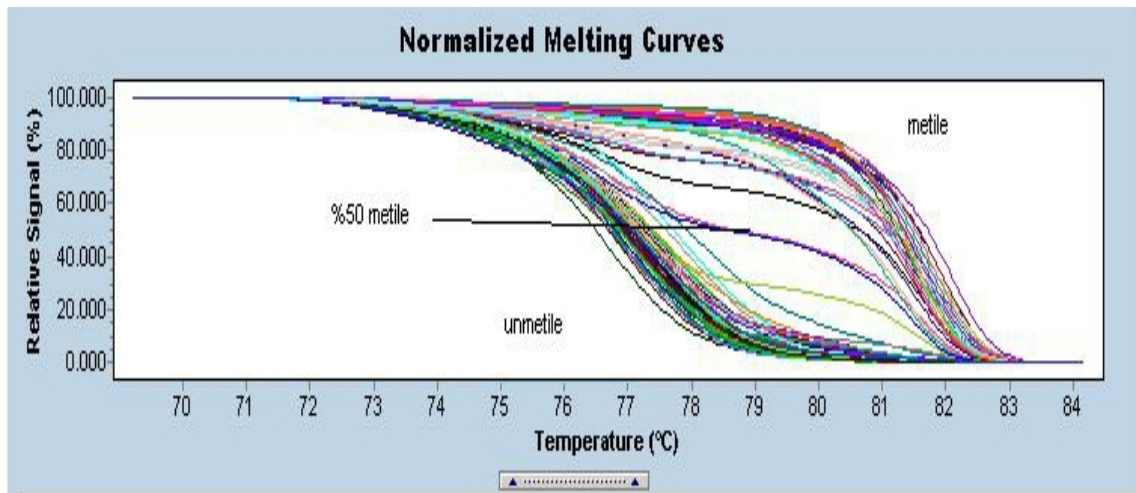
Çalışmaya dahil edilen olguların doku örneklerinden elde edilen genomik DNA dizisine bisülfid modifikasyon işlemi uygulanmıştır. Bu işlemin amacı DNA dizisinde metillenmemiş sitozin nükleotidlerinin urasil nükleotidine dönüştürülmesi ile metillenmiş sitozinlerin ayrımının yapılabilmesidir. Daha sonra LightCycler ® 480 Real Time PCR ile PCR amplifikasyonu ve yüksek rezolüsyonlu erime analizi uygulanmıştır. Analiz verileri “Gene Scanning” ve “Tm calling” olmak üzere iki veri tabanına göre değerlendirilmiş ve benzer sonuçlara ulaşılmıştır. Ayrıca cihazın “Difference plot” veri tabanı ile örneklerin metilasyon farklılıklarına göre grafik dağılımları incelenmiştir.

Yüksek rezolüsyonlu erime verilerinin analizi LightCycler ® 480 “Gene Scanning” yazılım programı ile gerçekleştirilmiştir. Bu değerlendirmede örnekler arasındaki farklı floresan düzeylerine göre bir değerlendirme yapılmaktadır. Normalize erime profilleri direkt olarak karşılaştırılmakta, olgulara ilişkin örneklerdeki DNA metilasyon düzeyi, metillenmiş/metillenmemiş oranı bilinen standartların erime profillerine benzerliklerine göre değerlendirilmektedir. Bu algorithmada olgulara ilişkin

PCR ürünlerinin erime sıcaklık eğrileri ile metillenmemişin metillenmiş olan oranının bilindiği kontrol PCR ürünlerinin erime sıcaklık eğrileri karşılaştırılmıştır. Bu değerlendirmede kullanılan kontrol gruplarına ve hasta gruplarına ait yazılım grafipleri aşağıda verilmiştir (Şekil 4.1–4.2). Hastaların her birinin tek tek ve ayrıca grupların toplu olarak kontrol eğrileri ile karşılaştırılmaları yapılarak ilgili genlere ait metilasyon durumları saptanmıştır.



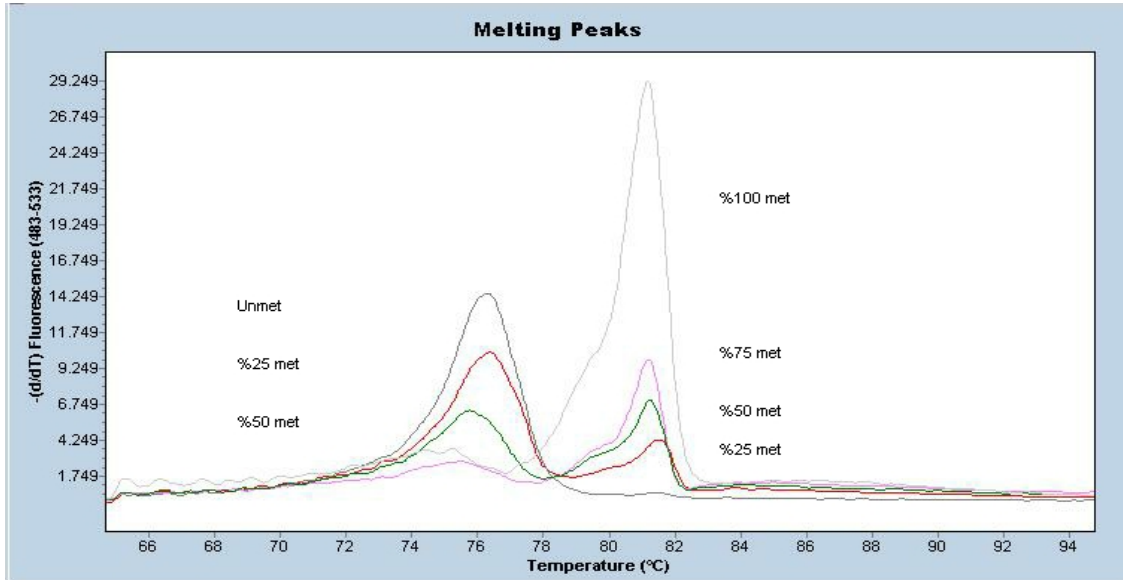
Şekil 4.1 Pozitif/metillenmiş, negatif/metillenmemiş kontrol örnekleri ve bunların %75, %50, %25 ara değer örneklerine ait erime eğrileri. Metilasyon oranı arttıkça ısı yükselmektedir.



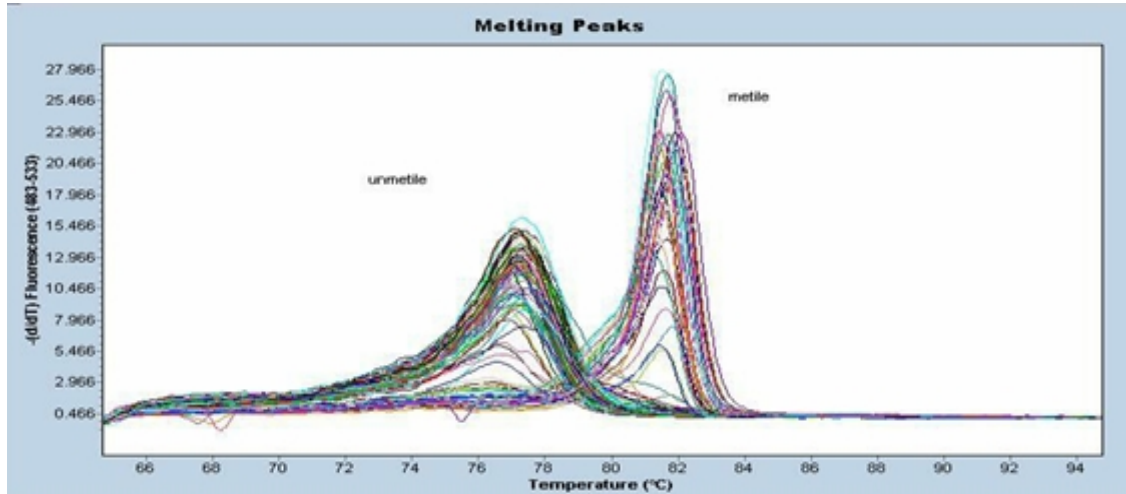
Şekil 4.2 Çalışılan örnek gruplarının BCL2 genine ait erime eğrilerinin toplu görünümü

Erime ısı verileri “Tm calling” yazılım programına göre de değerlendirilmiştir. Bu algorithmada örneklerin erime profilleri metillenmiş veya metillenmemiş olarak farklılık göstermektedir. Metillenmiş DNA’dan amplifiye olan ürünler ampliconda bulunan CpG dizileri nedeniyle daha yüksek Tm derecesine sahiptirler. Metillenmemiş sitozin nükleotidleri bisülfid modifikasyonu ile urasil nükleotidlerine dönüştürüldükleri

için Tm dereceleri daha düşüktür. Örneklerin metillenmiş ve metillenmemiş DNA karışımı nedeniyle "melting pik" graflerinde iki farklı sıcaklık değerlerine karşılık gelen bölgelerde pikler olarak veriler elde edilmiştir (Şekil 4.3–4.4).



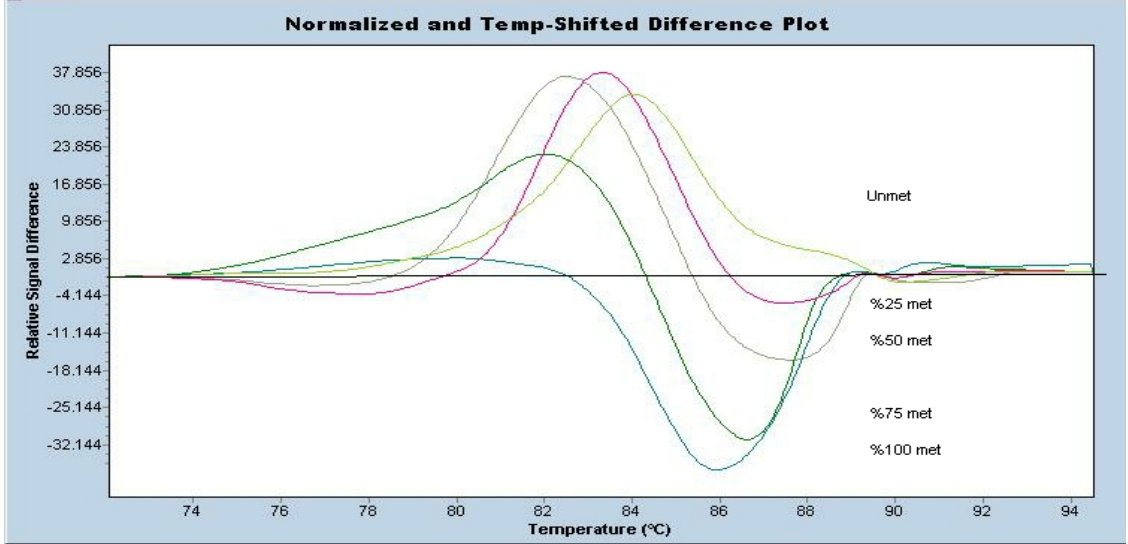
Şekil 4.3 Pozitif/metillenmiş, negatif/metillenmemiş kontrol örnekleri ve bunların %75, %50, %25 ara değer örneklerinin floresan piklerine göre erime eğrileri. Metillenmiş ve metillenmemiş DNA karışımı nedeniyle farklı erime sıcaklıklarından kaynaklanan iki pik görülmektedir. Düşük erime sıcaklığı urasil nükleotidlerine çevrilmiş olan metillenmemiş sitozin nükleotidleri içeren örnekleri ifade ederken yüksek erime sıcaklığı metillenmiş sitozin nükleotidlerini göstermektedir. Metilasyon oranlarına göre ısılarda da göreceli farklılıklar gözlenmektedir.



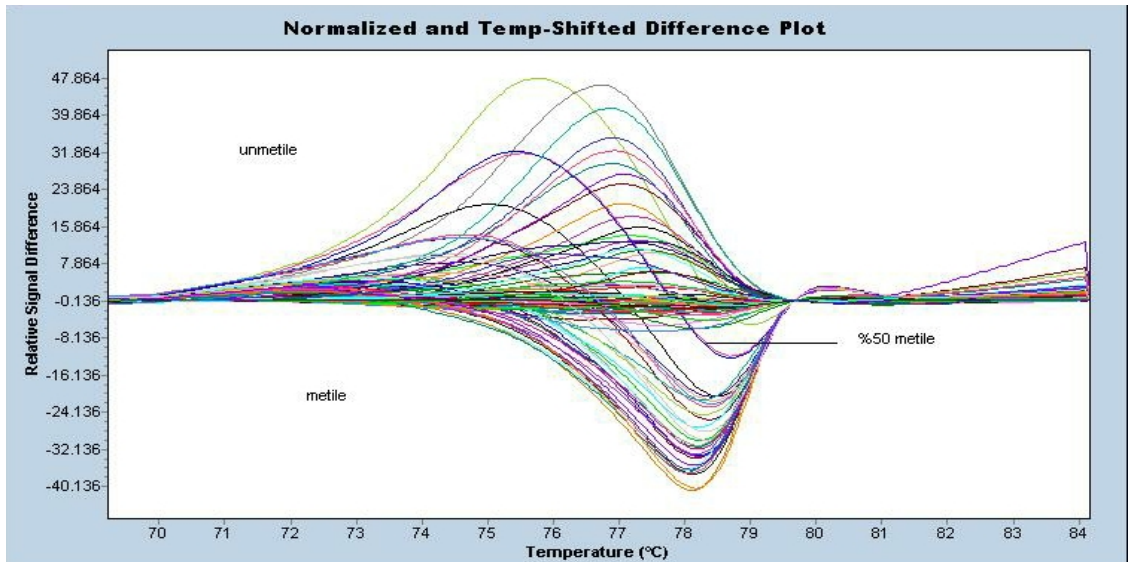
Şekil 4.4 Çalışılan örnek gruplarının BCL2 genine ait floresan piklerine göre erime eğrileri

LightCycler® 480 Real Time PCR cihazının "difference plot" analiz programı, plağa yüklenen örnekleri içerdikleri dizi farklılıklarına göre işaretleyerek bir grupta

yapmaktadır. Şekil 4.5 ve 4.6’da gözleendiği üzere metillenmemiş örnekler ile metillenmiş örnekler aralarındaki dizi farklılıklarına göre grafik dağılımı olarak gösterilmektedir. Çalışmada kullanılan iki veri tabanı ile cihazın bu grafik gruplamasından elde edilen verilerin uyumlu olduğu gözlenmiştir.



Şekil 4.5 Pozitif/metillenmiş, negatif/metillenmemiş kontrol örnekleri ve bunların %75, %50, %25 ara değer örneklerinin LightCycler ® 480 Real Time PCR cihazının “difference plot” analiz programı tarafından gruplandırılan erime eğrileri

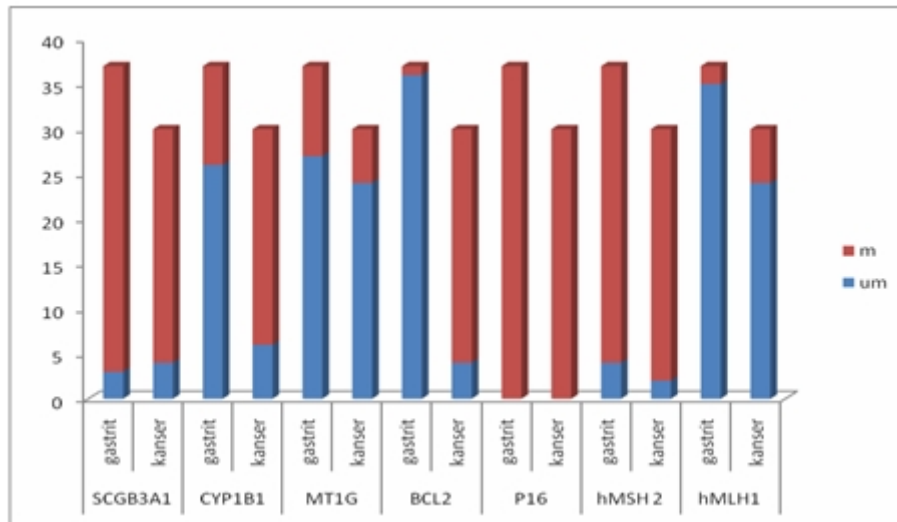


Şekil 4.6 Çalışılan örnek gruplarının BCL2 genine ait örneklerin LightCycler ® 480 Real Time PCR cihazının “difference plot” analiz programı tarafından gruplandırılan erime eğrileri

4.2. HASTA GRUPLARINA GÖRE ABERAN METİLASYON ORANLARI

Çalışmamızda toplam 37 gastrit ve 30 mide kanseri olgusundan elde edilen doku örnekleri CYP1B1, SCGB3A1, MT1G, BCL2, P16, hMSH2 ve hMLH1 genleri açısından değerlendirilmiştir.

Tüm olgular birlikte değerlendirildiğinde gastrit ve mide kanseri olgularının tümünde (%100) en az bir gen açısından anormal metilasyon paterni gözlenmiştir. Üç veya daha fazla gende aberan metilasyonun saptandığı olgu sayısı gastrit hasta grubunda 34/37 iken mide kanseri hasta grubunu oluşturan 30 olgunun tümünde (%100), üç ve üzeri gende aberan metilasyon saptanmıştır. Gastrit hasta grubunda hipermetile gen ortalaması 3.46, mide kanseri hasta grubunun ise 4.87 olarak saptanmıştır. Gastrit hasta grubunda tedavi öncesi ve sonrası metilasyon paterni değerlendirmesi ancak 15 olguda gerçekleştirilmiştir. Sadece 15 olguda aberan metilenmiş genler karşılaştırıldığında bazı genlerin hipermetilasyon oranlarında azalma olduğu gözlenmiştir. Buna karşılık bazı genlerde tedavi öncesi herhangi bir aberan metilasyon paterni saptanmamasına rağmen tedavi sonrası örneklerde hipermetile paternler gözlenmiş, pre ve post örneklerin tekrar analizinde aynı bulgulara ulaşılmıştır (Şekil 4.7) ve (Tablo 4.1).



Şekil 4.7 Gastrit ve mide kanseri olgularında CYP1B1, SCGB3A1, MT1G, BCL2, P16, hMSH2 ve hMLH1 genlerine ilişkin saptanan aberan metilasyon sıklıklarının sütun grafik değerlendirilmesi

Tablo 4.1 Gastrit ve mide kanseri olgularında CYP1B1, SCGB3A1, MT1G, BCL2, P16, hMSH2 ve hMLH1 genlerine ilişkin saptanan aberan metilasyon sıklıkları

	CYP1B1	SCGB3A1	MT1G	BCL2	P16	hMSH2	hMLH1
Gastrit (n=37)							
Hp(+)(Pre) (n=23)	3	22	7	1	23	22	1
Hp(+)(Post) (n=15)	5	15	2	1	15	13	0
Hp(-) (n=14)	8	12	3	0	14	11	1
Total	11	34	10	1	37	33	2
Kanser (n=30)							
Hp(+)(n=25)	19	21	6	21	25	23	4
Hp(-)(n=5)	5	5	0	5	5	5	2
Total	24	26	6	26	30	28	6

4.3. ANALİZ EDİLEN GENLERİN HASTA GRUPLARINDAKİ METİLASYON ORANLARI

4.3.1. CYP1B1 Geni Bulguları

CYP1B1 geni açısından gastrit olgularının %29,7'si hipermetile iken özellikle Hp(-) olgularda, Hp(+) olgulara göre daha yüksek sıklıkta hipermetilasyona rastlanmıştır (% 57.14 ve % 13.04). Hp(+) olguların medikal eradikasyon tedavisi sonrası incelenen iki olguda da metilasyon oranlarının azaldığı gözlenmiştir. Ancak tedavi sonrası kontrolü yapılan diğer üç olguda, tedavi öncesi aberan metilasyon gözlenmezken tedavi sonrası analizlerde “%100, %50 ve % 75 oranlarında” gen hipermetilasyonu saptanmış, tekrarlanan analizlerde de benzer verilere ulaşılmıştır. Bu üç olguda tedavi sonrası yüksek oranda metilasyon gözlenmesi nedeniyle tedavi öncesi

%13,04 olan metilasyon düzeyi %33,3'e yükselmiştir. Kalan olgularda ise tedavi öncesi metillenmemiş durumlarında değişiklik saptanmamıştır.

CYPB1 geni hipermetilasyonu mide kanseri olgularının % 80'inde gözlenmiştir. Hp(-) mide kanseri olgularının tümünde, Hp(+) olguların ise % 76'sında genin hipermetilasyonu gözlenmiştir.

4.3.2. SCGB3A1 Geni Bulguları

SCGB3A1 gastrit ve mide kanseri hasta gruplarında yüksek oranlarda hipermetilasyonun saptandığı bir gen olarak gözlenmiştir. Gastrit olgularının % 91,9'unda aberan metilasyon gözlenmiştir. Toplam 23 Hp(+) olgunun 22'sinde (%95,7) bu gen hipermetile iken Hp(-) olguların % 85,7'sinde hipermetilasyon saptanmıştır. Hp(+) olguların tümünde "% 100 oranında" hipermetilasyon belirlenirken Hp(-) olguların 9 tanesinde "% 100 oranında", iki olguda "% 75 oranında" ve bir olguda da "% 50 oranında" hipermetilasyon saptanmıştır. Tedavi öncesi ve sonrası SCGB3A1 gen hipermetilasyon oranlarında herhangi bir değişiklik olmadığı gözlenmiş, kontrol olgularının tümünde de yine "%100 oranında" metilasyon saptanmıştır.

SCGB3A1 gen hipermetilasyonu mide kanseri olgularının % 86,7'sinde saptanmıştır. Hp(-) olgulara ilişkin örneklerin tamamında hipermetilasyon gözlenirken metilasyon oranları "%50 ve üzeri oranlarda" idi. Hp(+) mide kanseri olgularında SCGB3A1 geni hipermetilasyon ortalaması % 84 olarak hesaplanmıştır.

4.3.3. MT1G Geni Bulguları

MT1G geninde gastrit olgularının % 27.02 sinde aberan metilasyon gözlenmiştir. Hp(+) hasta grubu örneklerinin % 30,4'ü hipermetile iken Hp(-) hasta grubu örneklerinin %21,4'ünde hipermetilasyon saptanmıştır. Hp(+) olguların medikal eradikasyon tedavisi sonrası kontrol analizlerinde, bir olgu dışında diğer aberan metilasyonun gözleendiği örneklerde hipermetilasyon bulgusuna rastlanmadı. Bu olguda (G44) tedavi öncesi "%25 oranında" gözlenen MT1G hipermetilasyonununun tedavi

sonrası analizde “%50 oranında” hipermetile olduğu; tedavi öncesi herhangi bir aberan metilasyonun gözlenmediği bir diğer olgu örneğinde (G42) ise tedavi sonrası genin “%25 oranında” hipermetile olduğu saptanmıştır. Analizlerin tekrarı sonrasında da aynı verilere ulaşılmıştır. Hp(+) gastrit olgularının tedavi öncesi ve sonrası metilasyon düzeyleri karşılaştırıldığında ise tedavi öncesi %30,4 olan metilasyon düzeyinin % 13,3’e düştüğü gözlenmiştir.

Mide kanseri hasta grubunda MT1G aberan metilasyonu %20 olguda saptanmış olup olguların tamamı Hp(+) mide kanseri hasta grubundandır. Hp(-) olgularda bu gene ilişkin herhangi bir metilasyon değişimi gözlenmemiştir.

4.3.4. BCL2 Geni Bulguları

BCL2 geni hipermetilasyonu gastrit hasta grubunda nadir gözlenmiştir. Hp(-) gastrit hasta grubu örneklerinin hiçbirinde BCL2 metilasyonu saptanmazken Hp(+) gastrit hasta grubu örneklerinin sadece birinde “%100 oranında hipermetile” BCL2 gen metilasyon paterni gözlenmiştir. Bu olgu kontrole gelmediği için Hp medikal eradikasyon tedavisi sonrası durumu hakkında bir değerlendirme yapılamamıştır. Buna karşılık, tedavi öncesi BCL2 metilasyonu saptanmayan bir olgunun (G35) tedavi sonrası örneklerinde %100 oranında hipermetile BCL2 bulgusu gözlenmesi nedeniyle tedavi öncesi ve sonrası örneklerde tekrar analizleri gerçekleştirilmiş ve benzer bulgulara ulaşılmıştır.

BCL2 geni metilasyon alterasyonları mide kanseri olgularının %86,7’sinde pozitif. Hp(-) mide kanseri olgularının tümünde (%100), Hp(+) mide kanseri olgularının ise %84’ünde BCL2 gen hipermetilasyonu gözlenmiştir. Mide kanseri hasta grubunda tüm olgularda “%50 ve üzeri oranlarda hipermetilasyon” belirlenmiştir. Bunlar 3/30 hastada “%50 metilasyon” (%10,0); 1/30 hastada “%75 metilasyon” (%3,3); 22/30 hastada “%100 metilasyon” (%73,4) olarak saptanmıştır. Hp(-) mide kanseri grubunda 5 olgunun tamamında BCL2 geni % 100 oranında hipermetile idi.

Sonuç olarak genel bir değerlendirme yaparsak BCL2 geni aberan metilasyonu özellikle mide kanseri hasta grubunda anlamlılık göstermektedir.

4.3.5. P16 Geni Bulguları

Çalışmamızdaki en ilginç bulgulardan biri **P16** geni aberan hipermetilasyonu idi. P16 hipermetilasyonu hem gastrit hem de mide kanseri hasta gruplarındaki örneklerin tümünde farklı oranlarda gözlenmiştir. Dolayısıyla bu gruplarda hipermetilasyon %100 oranında görülmüş oldu.

Hp(+) olup medikal eradikasyon tedavisi sonrası kontrole gelen hasta grubunun büyük bölümünde P16 hipermetilasyon oranlarında bir değişim gözlenmemiştir. Ancak bir olguda 50→100 ve iki olguda 75→100 olmak üzere toplam üç olguda metilasyon oranlarının arttığı saptanmıştır.

Sonuç olarak P16 genine ilişkin aberan metilasyon paternleri gastrit ve mide kanseri olgularında yüksek oranlarda gözlenmektedir. Hp eradikasyon tedavisinin P16 metilasyon oranına herhangi bir etkisi saptanmamıştır.

4.3.6. hMSH2 Geni Bulguları

hMSH2 geni incelediğimiz genler içerisinde yüksek oranda metilasyon anomalilerinin gözleendiği genler arasındadır. Gastrit hasta grubunda %89,2 oranında mide kanseri hasta grubunda ise %93,3 oranında metilasyon görülmüştür.

Gastrit hasta grubunda Hp(-) örnekler arasındaki metilasyon oranı % 78,6 iken bu metilasyon oranı tedavi öncesi Hp(+) örneklerde % 95,7 olarak saptanmıştır. Hp eradikasyon tedavisi sonrası ise %86,7 oranında metilasyon görülmüştür.

Mide kanseri olgularında hMSH2 hipermetilasyon oranı %93,3 olup Hp(+) ve Hp(-) mide kanseri hasta gruplarında ise sırasıyla %92,0 ve %100 olarak saptanmıştır.

Sonuç olarak hMSH2 geni gerek gastrit gerekse mide kanseri grubu olguları arasında yüksek sıklıkta hipermetile olan bir genidir. Ancak yüksek sıklıkta aberan metilasyonun gözleendiği diğer genlerle karşılaştırdığımızda hMSH2 geni daha düşük oranlarda metilasyon göstermektedir.

4.3.7. hMLH1 Geni Bulguları

DNA tamir genlerinden **hMLH1**, incelediğimiz genler arasında aberan metilasyonun en az görüldüğü gen olarak dikkati çekmiştir. Hp(+) gastrit hasta grubunda sadece bir olguda ‘‘%25 oranında’’ hipermetilasyon saptanmıştır. Hp(+) olması nedeniyle verilen medikal tedavi sonrası kontrolünde örnekte normal metilasyon paterni gözlenmiştir. Hp(-) gastrit olguları arasında da sadece bir olguda (G14) ‘‘%25 oranında’’ hipermetilasyon gözlenmiştir.

hMLH1 geni aberan metilasyonu mide kanseri hasta grubunda, gastrit hasta grubuna göre daha yüksek oranda gözlenmiştir. Tüm mide kanseri olgularının %20 sinde aberan metilasyon paterni gözlenirken Hp(+) mide kanserli 4/25 olguda, Hp(-) mide kanserli 2/5 olguda farklı oranlarda hipermetilasyon saptanmıştır.

Sonuç olarak hMLH1 geni metilasyon anomalileri mide kanseri olgularında daha yüksek sıklıkta gözlenmektedir.

Tüm veriler birlikte değerlendirildiğinde genlerin hastalık gruplarındaki metilasyon oranları **Tablo 4.2**’de özet olarak verilmiştir.

Tablo 4.2 Genlerin hastalık gruplarında metilasyon % oranları

	CYP1B1	SCGB3A1	MT1G	BCL2	P16	hMSH2	hMLH1
Mide Kanseri (n=30) (%)	80	86,7	20	86,7	100	93,3	20
Hp(+) mide kanseri (n=25) (%)	76	84	24	84	100	92	16
Hp(-) mide kanseri (n=5) (%)	100	100	0	100	100	100	40
Gastrit (n=37) (%)	29,7	91,9	27	2,7	100	89,2	5,4
Hp(+) gastrit (n=23) (%)	13	95,7	30,4	4,3	100	95,7	4,3
Hp(-) gastrit (n=14) (%)	57,1	85,7	21,4	0	100	78,6	7,1
Tedavi sonrası Hp(+) gastrit (n=15) (%)	33,3	100	13,3	6,7	100	86,7	0

Toplam 37 olgudan oluşan gastrit hasta grubunda Hp(+) ve Hp(-) hasta grupları karşılaştırıldığında; CYP1B1 geni hipermetilasyonunun Hp(-) gastrit olgularında anlamlı düzeyde arttığı ($p<0.05$), buna karşılık SCGB3A1 ve hMSH2 gen metilasyonlarının Hp(+) gastrit olgulardaki artışlarının anlamlı olduğu (sırasıyla $p<0.001$, $p<0.05$) saptanmıştır (**Tablo 4.3**).

Tablo 4.3 Hp(+) ve Hp(-) gastrit hasta gruplarının (grup 1 ve 2) karşılaştırılmasının istatistik analizi

GEN	GRUP	N	MEAN RANK	Z	P
CYP1B1	1	23	16.09	-2.61	<0.05
	2	14	23.79		
	TOTAL	37			
SCGB3A1	1	23	24.61	-4.79	<0.001
	2	14	9.79		
	TOTAL	37			
MT1G	1	23	19.30	-0.28	0.84
	2	14	18.50		
	TOTAL	37			
BCL2	1	23	19.30	-0.78	0.84
	2	14	18.50		
	TOTAL	37			
P16	1	23	17.85	-0.89	0.41
	2	14	20.89		
	TOTAL	37			
hMSH2	1	23	22.46	-2.60	<0.05
	2	14	13.32		
	TOTAL	37			
hMLH1	1	23	18.80	-0.36	0.89
	2	14	19.32		
	TOTAL	37			

Hp(+) gastrit olgularında, Hp medikal eradikasyon tedavisi öncesi ve tedavi sonrası gen metilasyon oranları açısından anlamlı bir farklılık olmadığı gözlenmiştir. Tedaviye alınan olgulardan sadece dört tanesinde Hp'nin eradike edilmesi verilerimizi destekler niteliktedir (**Tablo 4.4**).

Bu dört olgunun Hp eradikasyon tedavisi öncesi ve sonrası metilasyon durumlarını karşılaştırdığımızda; CYP1B1, BCL2 ve hMLH1 genlerinde tedavi öncesinde ve sonrasında herhangi bir metilasyon saptanmamışken, SCGB3A1 ve P16 genlerinde tedavi öncesi saptanan metilasyon durumlarında tedavi sonrasında her hangi bir değişiklik saptanmamıştır. hMSH2 geninde tedavi sonrası iki olgunun metilasyon oranları azalırken diğer iki olgunun metilasyon oranlarının arttığı saptanmıştır. MT1G geninde ise üç olguda tedavi öncesi %50 oranında saptanan metilasyonun tedavi

sonrasında %0 olarak tamamen düzeldiği saptanırken, kalan olguda tedavi öncesinde ve sonrasında metilasyon saptanmamıştır (**Ek-3** ve **Ek-4**'de yeşil işaretli olguların verileridir).

Tablo 4.4 Hp(+) gastrit olgularının Hp medikal eradikasyon tedavisi öncesi ve sonrası (grup 1 ve 2) karşılaştırılmasının istatistik analizi

GEN	GRUP	N	MEAN RANK	Z	P
CYP1B1	1	23	18.13	-1.32	0.36
	2	15	21.60		
	TOTAL	38			
SCGB3A1	1	23	21.67	-2.36	0.14
	2	15	16.17		
	TOTAL	38			
MT1G	1	23	20.76	-1.17	0.39
	2	15	17.57		
	TOTAL	38			
BCL2	1	23	19.33	-0.31	0.91
	2	15	19.77		
	TOTAL	38			
P16	1	23	17.00	-1.90	0.09
	2	15	23.33		
	TOTAL	38			
hMSH2	1	23	19.20	-0.22	0.84
	2	15	19.97		
	TOTAL	38			
hMLH1	1	23	19.80	-0.46	0.82
	2	15	20.32		
	TOTAL	38			

Toplam 30 olgudan oluşan mide kanseri hasta grubunda Hp(+) ve Hp(-) hasta grupları karşılaştırıldığında Hp(+) ve Hp(-) mide kanseri hasta grupları arasında genlerin metilasyonu açısından anlamlı farklılıkların olmadığı saptanmıştır (**Tablo 4.5**).

Tablo 4.5 Mide kanseri hasta grubunda Hp(+) ve Hp(-) hasta gruplarının (grup 1 ve 2) karşılaştırılmasının istatistik analizi

GEN	GRUP	N	MEAN RANK	Z	P
CYP1B1	1	25	14.50	-1.43	0.17
	2	5	20.50		
	TOTAL	30			
SCGB3A1	1	25	15.82	-0.51	0.67
	2	5	13.90		
	TOTAL	30			
MT1G	1	25	16.10	-1.20	0.42
	2	5	12.50		
	TOTAL	30			
BCL2	1	25	14.70	-1.43	0.28
	2	5	19.50		
	TOTAL	30			
P16	1	25	16.36	-1.31	0.25
	2	5	11.20		
	TOTAL	30			
hMSH2	1	25	14.94	-0.10	0.93
	2	5	15.30		
	TOTAL	30			
hMLH1	1	25	14.34	-2.31	0.11
	2	5	21.30		
	TOTAL	30			

Mide kanseri ve gastrit hasta grupları birbirleriyle karşılaştırıldığında mide kanseri hasta grubunda CYP1B1 ($p<0.001$), MT1G ($p<0.001$), BCL2 ($p<0.05$), hMSH2 ($p<0.001$) ve hMLH1 ($p<0.001$) gen metilasyon oranlarının anlamlı düzeylerde artış gösterdikleri saptanmıştır (**Tablo 4.6**).

Tablo 4.6 Mide kanseri ve gastrit hasta gruplarının (grup 1 ve 2) karşılaştırılmasının istatistik analizi

GEN	GRUP	N	MEAN RANK	Z	P
CYP1B1	1	30	42.87	-3.59	<0.001
	2	37	26.81		
	TOTAL	67			
SCGB3A1	1	30	34.07	-0.03	1.0
	2	37	33.95		
	TOTAL	67			
MT1G	1	30	48.78	-5.96	<0.001
	2	37	22.01		
	TOTAL	67			
BCL2	1	30	37.10	-2.21	<0.05
	2	37	31.49		
	TOTAL	67			
P16	1	30	38.17	-1.75	0.8
	2	37	30.62		
	TOTAL	67			
hMSH2	1	30	42.65	-3.41	<0.001
	2	37	26.99		
	TOTAL	67			
hMLH1	1	30	50.91	-7.21	<0.001
	2	37	19.85		
	TOTAL	67			

Hp(-) mide kanseri ile Hp(-) gastrit hasta grupları, analiz edilen genlerin metilasyon oranları açısından karşılaştırıldıklarında SCGB3A1 ($p<0.05$), MT1G ($p<0.001$) ve hMLH1 ($p<0.000$) genlerinin hipermetilasyon oranlarının Hp(-) kanser grubunda anlamlı düzeyde artış gösterdikleri saptanmıştır (**Tablo 4.7**).

Tablo 4.7 Hp(-) mide kanseri ile Hp(-) gastrit hasta gruplarının (grup 1 ve 2) karşılaştırılmasının istatistik analizi

GEN	GRUP	N	MEAN RANK	Z	P
CYP1B1	1	5	12.90	-1.40	0.19
	2	14	8.96		
	TOTAL	19			
SCGB3A1	1	5	14.40	-2.14	<0.05
	2	14	8.43		
	TOTAL	19			
MT1G	1	5	16.40	-3.31	<0.001
	2	14	7.71		
	TOTAL	19			
BCL2	1	5	16.30	-0.78	0.84
	2	14	14.50		
	TOTAL	19			
P16	1	5	13.50	-1.89	0.11
	2	14	8.75		
	TOTAL	19			
hMSH2	1	5	13.80	-1.91	0.09
	2	14	8.64		
	TOTAL	19			
hMLH1	1	5	16.80	-3.84	<0.001
	2	14	7.57		
	TOTAL	19			

Hp(+) mide kanseri ile Hp(+) gastrit hasta grupları, analiz edilen genlerin metilasyon oranları açısından karşılaştırıldıklarında ise CYP1B1 ($p<0.001$), MT1G ($p<0.001$), hMSH2 ($p<0.05$) ve hMLH1 ($p<0.001$) genlerinin hipermetilasyon oranlarının Hp(+) mide kanseri grubunda anlamlı düzeyde artış gösterdikleri saptanmıştır. Buna karşılık SCGB3A1($p<0.05$) geni hipermetilasyonunun Hp(+) gastrit örneklerinde anlamlı olduğu belirlenmiştir (**Tablo 4.8**).

Tablo 4.8 Hp(+) mide kanseri ile Hp(+) gastrit hasta gruplarının (grup 1 ve 2) karşılaştırılmasının istatistik analizi

GEN	GRUP	N	MEAN RANK	Z	P
CYP1B1	1	25	31.36	-3.88	<0.001
	2	23	17.04		
	TOTAL	48			
SCGB3A1	1	25	20.96	-2.58	<0.05
	2	23	28.35		
	TOTAL	48			
MT1G	1	25	33.34	-4.84	<0.001
	2	23	14.89		
	TOTAL	48			
BCL2	1	25	26.64	-1.80	0.07
	2	23	22.17		
	TOTAL	48			
P16	1	25	26.78	-1.28	0.20
	2	23	22.02		
	TOTAL	48			
hMSH2	1	25	29.02	-2.43	<0.05
	2	23	19.59		
	TOTAL	48			
hMLH1	1	25	34.79	-5.95	<0.001
	2	23	12.74		
	TOTAL	48			

Mide kanseri ve gastrit hasta gruplarında incelenen CYP1B1, SCGB3A1, MT1G, BCL2, P16, hMSH2 ve hMLH1 genlerinde metilasyon paternlerine sigara, kronik ilaç kullanımı ve Hp varlığının etkisi araştırılmıştır. Bu parametrelerin gen metilasyon paternleri üzerine etkilerinde anlamlı istatistiksel fark bulunamamıştır.

4.4. ABERAN GEN SAYILARININ KARŞILAŞTIRILMASI

Çalışmamızda metilasyon paternlerinin analizlerinin yapıldığı yedi genin gastrit ve mide kanseri hasta gruplarındaki aberan metilasyon oranları karşılaştırılmıştır (**Tablo 4.9**). Tüm olgular birlikte değerlendirildiğinde 20 olguda 1-3 gende aberan metilasyon paterni gözlenmiştir. Bu olgulardan %90 u (18/20) gastrit hasta grubu olguları iken sadece iki kanser olgusunda bir üç arası gende hipermetilasyon saptanmıştır. Buna

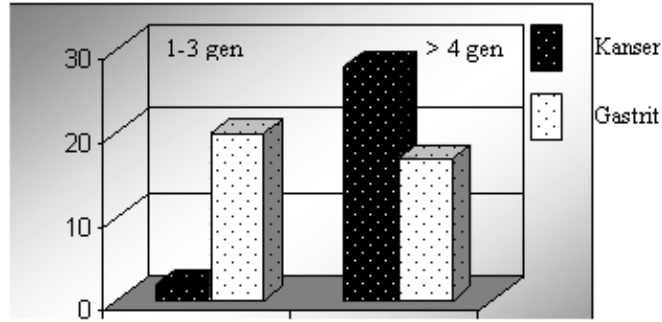
karşılık dört ve daha fazla gende hipermetilasyonun saptandığı toplam 47 olgunun %59,6'sı mide kanseri hasta grubu olguları iken %40,4'ü gastrit hasta grubu örnekleriydi. Mide kanseri hasta grubu olgularında beş altı gende hipermetilasyon yüksek sıklıkta gözlenmiştir. Aberan metilasyon paternine sahip gen sayısına göre gruplar arasında istatistiksel olarak önemli düzeyde farklılık saptanmıştır.

Tablo 4.9 Gastrit ve mide kanseri grubu olgularının hipermetile olan gen sayılarına göre karşılaştırılması

METİLE GEN SAYISI	KANSER (n=30)	GASTRİT (n=37)	TOPLAM (n=67)
1-3	2 (%10)	18 (%90)	20 (%100)
4+	28 (%59,6)	19 (%40,4)	47 (%100)

$$X=13.94 \quad P<0.001$$

Kanser grubunda hipermetile gen sayısı gastrit grubuna göre önemli düzeyde artmıştır (**Şekil 4.8**).



Şekil 4.8 Gastrit ve mide kanseri grubu olgularının hipermetile olan gen sayılarına göre karşılaştırılmasının sütun grafik değerlendirilmesi

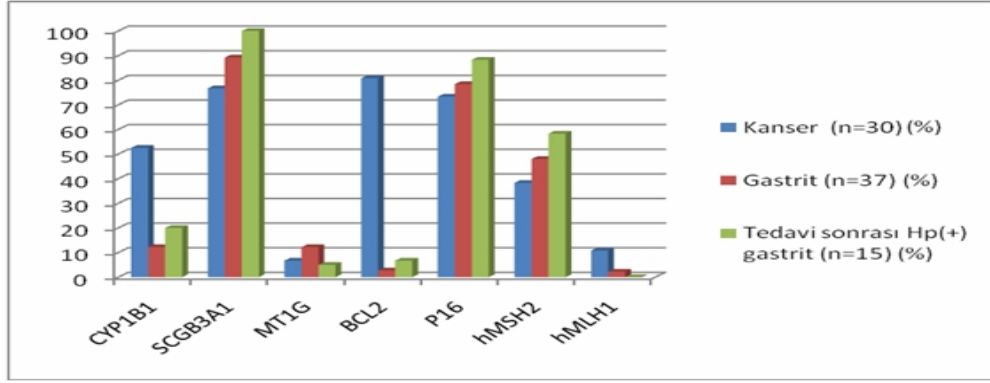
Çalışmamızda değerlendirilen genlerdeki metilasyon anomalilerine sahip örnek oranları gastrit hasta grubu ile mide kanseri hasta grubu arasında karşılaştırıldığında (**EK-1**) CYP1B1, BCL2 ve hMLH1 genlerine ilişkin aberan metilasyona sahip mide kanseri grubu olgu sıklığının, gastrit hasta grubu olgularına göre anlamlı düzeyde artış gösterdiği gözlenmiştir.

4.5. KANTİTATİF METİLASYON ORTALAMALARI

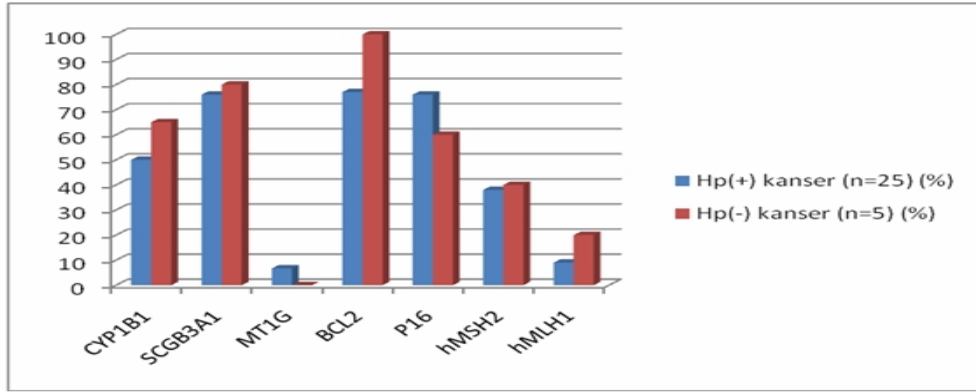
MS-HRM yöntemini kullanırken her plate kuyucuklarına hasta gruplarının örnekleriyle birlikte kantitatif olarak metilasyon durumlarını bildiğimiz pozitif/metillenmiş kontrol örneği CpGenome™Universal Methylated DNA (Millipore-Chemicon® International) ve negatif/metillenmemiş kontrol örneği CpGenome™Universal Unmethylated DNA (Millipore-Chemicon® International) ve bunların seyreltilmesi ile elde edilen %25, %50 ve %75 ara değerleri de yüklenmiştir. LightCycler® 480 Real Time PCR (Roche) cihazının yazılım programları aracılığıyla kontrol örneklerine göre tüm çalışma gruplarının kantitatif metilasyon değerlerinin ortalaması alınmıştır (Tablo 4.10). Bu ortalamalara göre grupların sütun grafik değerlendirilmesi yapılmıştır (Şekil 4.9- 4.10- 4.11).

Tablo 4.10 Genlerin hastalık gruplarına göre kantitatif metilasyon ortalama oranları.

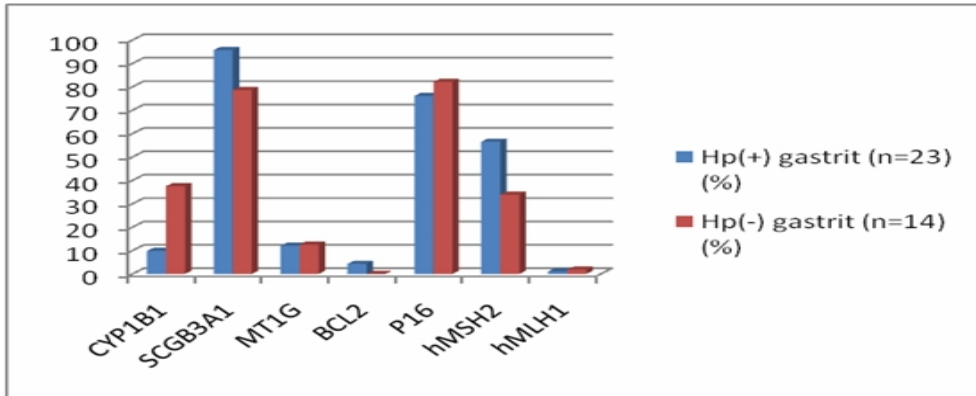
	CYP1B1	SCGB3A1	MT1G	BCL2	P16	hMSH2	hMLH1
Mide Kanseri (n=30) (%)	52,5	76,7	6,7	80,8	73,3	38,3	10,8
Hp(+) mide kanseri (n=25) (%)	50	76	6,7	77	76	38	9
Hp(-) mide kanseri (n=5) (%)	65	80	0	100	60	40	20
Gastrit (n=37) (%)	12,2	89,2	12,2	2,7	78,4	48	2,2
Hp(+) gastrit (n=23) (%)	9,8	95,7	12	4,3	76,1	56,5	1,1
Hp(-) gastrit (n=14) (%)	37,5	78,6	12,5	0	82,1	33,9	1,8
Tedavi sonrası Hp(+) gastrit (n=15) (%)	20	100	5	6,7	88,3	58,3	0



Şekil 4.9 Mide kanseri, gastrit ve Hp(+) gastrit tedavi sonrası gruplarının kantitatif metilasyon değerlerinin ortalamasının sütun grafik değerlendirilmesi



Şekil 4.10 Hp(+) / Hp(-) Mide kanseri gruplarının kantitatif metilasyon değerlerinin ortalamasının sütun grafik değerlendirilmesi



Şekil 4.11 Hp(+) / Hp(-) gastrit gruplarının kantitatif metilasyon değerlerinin ortalamasının sütun grafik değerlendirilmesi

Ayrıca Hp(+) / (-) gastrit, Hp medikal eradikasyon tedavisi sonrası gastrit ve Hp(+) / (-) mide kanseri grupları olarak elde edilen bütün veriler EK 2 – 5’de tablo olarak sunulmuştur.

5. TARTIŞMA

DNA hipermetilasyonundan kaynaklanan gen sessizleşmesi insanda gözlenen kanserlerde sıklıkla karşımıza çıkmaktadır. Kanser hücrelerinde çok sayıda gen etkilenmektedir. Etkilenen genler kimyasal ve kanser tipine göre değişkenlik göstermektedir. Yani bazı ortak genlerin yanı sıra tümör tiplerine spesifik gen hipermetilasyonları gözlenmektedir. Bu nedenle metilasyon analizlerinde tümörlere spesifik genlerin hipermetilasyon paternlerinin değerlendirilmesi erken tanı, klinik özelliklerle bağlantıların ortaya konması ve tedavi seçimi gibi önemli klinik uygulamaların daha etkin gerçekleştirilmesini sağlayacaktır.

Mide kanseri dünyada en sık gözlenen üçüncü kanser tipi olup kanser nedeni ölümlerde akciğer kanserinden sonra ikinci sırada yer almaktadır. Mide, kanser gelişimi sırasında veya yaş ilerledikçe aberan CpG adacık hipermetilasyonunun sıklıkla gözlendiği organlardan biridir. Kang ve ark.ları bugüne kadar 90 dolaylarında genin gastrik kanserlerde promoter bölgesi hipermetilasyonuna bağlı olarak inaktif hale geldiğini ileri sürmüşlerse de Ushijima ve ark.ları kanserde pek çok CpG adacığının metillenmiş olduğunu ve inaktif olan gen sayısının AGS mide kanseri hücre serilerinde 421 ± 75 gen sayısına ulaştığını bildirmişlerdir (34, 85). İnsan genomundaki genlerin %40 kadarının promoter içerdiği gerçeği dikkate alındığında ve mide kanserlerinde hipermetile oldukları belirlenen gen sayısı sınırlı olduğundan, mide kanseri örneklerinde promoter bölgesi metilasyon paternlerine ilişkin bilgilerimizin yetersiz olduğu çok sayıda gen bulunmaktadır.

Mide kanseri multipl genetik ve epigenetik olayların meydana geldiği çok aşamalı bir süreç olup kronik gastrit, atrofi, intestinal metaplazi, displazi aşamaları sonrasında geliştiği düşünülmektedir. Ancak her kronik gastriti olan olguda kanser gelişimi gözlenmemektedir. Bunun nedeninin altında, çok aşamalı süreçte meydana gelen moleküler olayların etkili olduğu görüşündeyiz. İşte moleküler olayların incelenmesi biyomarkerlerin belirlenmesini sağlayacaktır ki bu da erken tanı, prognoz ve tedavi açısından umut verici olacaktır. Bu nedenle dünyada pek çok merkezde gastrit ve mide

kanserine ilişkin moleküler analizler yoğun olarak gerçekleştirilmekte ve WHO bu yöndeki çalışmaları desteklemektedir.

Hp enfeksiyonu gastrit ve mide kanseri açısından önemli bir etiyolojik risk faktörüdür. WHO tarafından grup 1 karsinogen olarak tanımlanmıştır. Kronik Hp enfeksiyonu mide kanseri riskini 5-6 kat arttırmaktadır (62). Hayvan modelleri ile yapılan çalışmalarda Hp enfeksiyonu ile mide kanseri arasındaki yakın ilişki ortaya konmuştur (94). Mide karsinogenezi ile uzun süreli Hp enfeksiyonu ilişkisinin mekanizması tam olarak bilinmemesine rağmen uzun süreli enfeksiyon, kronik inflamasyon gelişimi ve mukozal epitelyum hücre proliferasyonunun sürekliliğinin karsinojenik bir çevre oluşturduğu düşünülmektedir. Son yıllarda pek çok çalışma ile Hp enfeksiyonunun kronik gastritte çok sayıda genin aberan CpG adacık hipermetilasyonu ile ilişkisi ortaya konmuştur (10, 55, 85). Hp ile uyarılan aberan metilasyon değişimleri, Hp enfeksiyonu nedenli mide kanseri gelişimine katılabilirler. Ancak bugüne kadar olası tüm genlerden sadece sınırlı sayıdaki genlerde hipermetilasyon paternleri ile Hp ilişkisi incelenmiştir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda Hp eradikasyonu aracılığıyla çok sayıdaki lokusun hipermetilasyon paternlerinin geri dönüşümü rapor edilmiştir (10). Ancak bunu desteklemeyen verilere de rastlanmaktadır (76).

Çalışmamızda akut gastrit tanısı alan Hp(+) ve Hp(-) olgularda SCGB3A1, CYP1B1, MT1G, BCL2, P16, hMSH2 ve hMLH1 genlerinin metilasyon paternleri MS-HRM tekniği kullanılarak analiz edilmiş ve karşılaştırılmıştır. Hp(+) gastrit tanısı alan olgular medikal eradikasyon tedavisi sonrası kontrole tekrar çağırılmışlardır. Literatürde altı hafta (10) ile 12 ay (50) sonra kontrol endoskopileri yapıldığına dair birbirinden çok farklı kontrol sürelerine ait veriler olmasına karşın çalışmamızda 3-8 aylık süreç içerisinde gelen 15 olguda tedavi sonrası kontroller gerçekleştirilmiştir. Çalışmaya dahil edilen olgulardan sadece 4 tanesinde (%26,7) eradikasyon saptanmış olup diğer olgularda Hp enfeksiyonunun devam ettiği ortaya konmuştur.

Akut gastrit hasta grubunu Hp(+) ve Hp(-) olarak metilasyon oranlarını değerlendirdiğimizde **Tablo 5.1**'de de görüldüğü üzere P16 aberan metilasyonu hem (+) hem de (-) gastrit olgularının tümünde ve kantitatif olarak yüksek oranlarda gözlenmiştir.

Tablo 5.1 Gastrit grubu olgularında hipermetilasyon sıklıkları

GEN ADI	Hp(+) AKUT GASTRİT (n=23) %met.	Hp(-) AKUT GASTRİT (n=14) %met.
BCL2	4,3	0,0
SCGB3A1	95,7	85,7
CYP1B1	13	57,1
MT1G	30,4	21,4
P16	100,0	100,0
MLH1	4,3	7,1
MSH2	95,7	78,6

Hp(+) gastrit olgularından tedavi sonrası kontrollerinde de hem olgular arasındaki görülme sıklığı hem de metilasyon oranlarında herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir. Çalışma verilerini literatür ile karşılaştırdığımızda görülme sıklığı açısından oranlarımızın yüksek olduğu gözlenmektedir. Bu farklılığın temel nedenlerinden birinin kullanılan analiz yöntemlerindeki çeşitlilikten kaynaklandığını düşünüyoruz. Literatürdeki çalışmaların hemen tümü MS-PCR yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Çalışmamızda kullanılan MS-HRM yönteminin analitik sensitivitesinin diğer yönteme göre yüksek olması, % 0.1 gibi çok düşük oranlardaki metillenmiş CpG'leri dahi saptayabilmesinin (43, 88) farklılıklarda etkili olduğu görüşünde yiz.

Çalışmamızda hasta sayısının sınırlı olması da önemli bir etkendir. Çalışmamıza dahil edilen olguların akut gastrit olmalarının da metilasyon oranlarında etkili olabileceğini düşündürmektedir.

P16 geni ile ilgili literatür tartışması

Aabbaszadegan ve ark. 2008 yılında yayınlanan İran toplumunda yaptıkları çalışmalarında (1) 52 mide adenokarsinomu ile endoskopi ve biyopsi sonuçları normal olarak değerlendirilen 50 kontrol olgusunda **P16** geni metilasyon durumunu MS-PCR yöntemi ile incelemişlerdir. Mide adenokarsinomu olgularında %44,2 (23/52 olgu) oranında metilasyon saptanırken kontrol grubu örneklerinde hiç metilasyon saptamamışlardır. İran popülasyonunda gerçekleştirdikleri çalışmalarında Hp varlığı ile P16 metilasyon durumu arasında ilişki bulamadıklarını rapor etmişlerdir. Çalışma verilerimizde de mide kanseri hasta grubunda metilasyon oranının yüksek olduğu gözlenmiştir. Ancak oranlarımız araştırmacıların bildirdikleri oranlardan daha yüksektir. Bunun nedeninin metodolojik farklılıklardan kaynaklandığı görüşündeyiz.

Tahara ve ark.'ları 2007 yılında yayınlanan Japonya'da yaptıkları çalışmalarında (81) 43 mide kanseri ve 46 gastrit veya peptik ülser olgusunda **P16**, P14 ve P21 genlerini MS-PCR yöntemi ile incelemişlerdir. Mide kanseri ve gastrit hasta gruplarının her ikisinde de aberan metilasyon saptadıklarını, fakat P16 geni için kanser grubu (%55,8) ile gastrit grubu (%50,0) örneklerinde metilasyon oranları açısından belirgin fark görmediklerini bildirmişlerdir. Ayrıca Hp varlığının etkisini araştırdıkları gastrit hasta grubu içinde P16 geni anormal metilasyon oranlarının Hp(+) ve Hp(-) hasta gruplarının her ikisinde de %50 olduğunu ve mide kanseri hasta grubunda da benzer oranların gözlendiğini, sonuç olarak Hp ile P16 geni hipermetilasyonu arasında bir ilişki olmadığını öne sürmüşlerdir. Bizim çalışmamızda da tüm örneklerde %100 oranında hipermetilasyon gözlenmiştir ve gruplar arasında herhangi bir farklılık gözlenmemiştir. Dolayısıyla çalışma verilerimiz bu çalışma bulguları ile birebir örtüşmekte olup metilasyon oranlarının düşük olmasının analiz yöntemlerinin hassasiyetlerindeki farklılıklardan kaynaklandığı düşüncesindeyiz.

Buna karşılık Kaise ve ark. 2008 yılında yayınlanan Japonya'da yaptıkları çalışmalarında (32) 34 Hp(+) ve 11 Hp(-) erken evre (evre 1-3) mide kanseri ile 68 Hp(+) gastrit gruplarında **P16**, Ecad ve DAPK genlerini MS-PCR yöntemi ile incelemişlerdir. Çalışma verilerine göre P16 geninde Hp(+) mide kanseri hastalarının nonkanseroz komşu gastrik mukozalarında %68 oranında; Hp(+) gastrit kontrol

grubunda %25 oranında ve Hp(-) mide kanseri hasta grubunda % 63,6 oranlarında metilasyon varlığı saptamışlardır. Çalışmamızda olduğu gibi bu çalışmada da mide kanseri örneklerinde belirgin bir P16 hipermetilasyon artışı dikkati çekmektedir. Ancak nonkanseroz komşu dokularda da aberan P16 gen metilasyonunun gözlenmesi, P16 hipermetilasyonunun kanser progresyonunda erken dönem değişimler olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca Hp(-) kanser grubu ile nonkanseroz komşu doku oranlarındaki benzerlik de Hp enfeksiyonundan çok moleküler patolojinin daha etkili olabileceğini düşündüren bir veridir. Kanser grubu olgularında saptanan P16 hipermetilasyon oranının çalışmamızda çok daha yüksek oranda gözlenmesi, metodolojiden kaynaklanan farklılıklarla birlikte örneklerimizin ileri evre (evre 3-4) gastrik kanser olmaları ile de ilişkili olabilir.

Nonkanseroz Hp(+) örneklerde **P16** hipermetilasyonunun % 50 ve üzeri sıklıkta gözleendiği, periferik kan örneklerinde P16 geni metilasyon analizinin gastrik kanser erken tanısında bir biyomarker olarak umut vaat ettiğini ortaya koyan çalışmalar bulunmaktadır (1, 16, 81).

Dong ve ark.larının 2009 yılında yayınlanan Çin’de toplam 920 nonkanseroz gastrit örnekte yaptıkları populasyon temelli çalışmada (16) Hp’nin **P16** hipermetilasyonu ile yakın ilişkisini ortaya koymuşlardır. Hp enfeksiyon yoğunluğu, enfeksiyon süresi ile P16 aberan metilasyon sıklığı arasında doğru orantılı ilişkiyi belirlemişlerdir. Farklı Hp(+) ve Hp(-) gastrit lezyonlarında P16 metilasyon düzeyleri değerlendirildiği zaman kronik atrofik gastritten intestinal metaplaziye doğru P16 metilasyonunda artış olduğu ifade edilmiştir. Mide karsinogenezinin erken aşamalarında P16 geninde epigenetik değişikliklerin özellikle Hp enfeksiyonundan etkilendiği, ileri evrelerde ise çevresel maruz kalmalar ile somatik mutasyonların birlikte etkili olabileceği düşünülmektedir. Bu görüş Feinberg ve ark. (17) tarafından ortaya atılan “epigenetik progenitör model”ini destekler niteliktedir. Modele göre nonneoplastik kök hücrelerindeki tümör öncü genlerinin epigenetik özelliklerinin değişimi erken gelişen olaydır. İlerleyen evrelerde diğer faktörler rol oynamaktadır.

Çalışma verilerimizde **P16** hipermetilasyonunun Hp(-) mide kanseri ve gastrit hasta gruplarında yüksek oranda gözlenmesi Tahara ve ark.'ları (81) ile Kaise ve ark.'larının (32) yaptıkları çalışma bulguları ile örtüşmektedir. Diğer gruplardaki epigenetik değişimler de literatür bilgilerini desteklemektedir. Daha geniş Hp(-) gastrit grubunda, patolojik ve klinik bilgileriyle birlikte P16 hipermetilasyonunun değerlendirilmesi gerektiği görüşündeyiz. P16 geni ile ilgili tartışma **Tablo 5.2**'de özetlenmiştir.

Tablo 5.2 P16 geni tartışma özeti

ARAŞTIRICI	YÖNTEM	GRUPLAR	METİLASYON (%)
Aabbaszadegan (İran) (1)	MS-PCR	52 mide kanseri	44.2
		50 sağlıklı normal	0.00
YORUM: Hp varlığı ile P16 hipermetilasyon durumu arasında ilişki bulamadıklarını rapor etmişler.			
Tahara (Japonya)(81)	MS-PCR	43 mide kanseri	55.8
		46 gastrit/peptik ülser	50.0
YORUM: Hp varlığı ile P16 hipermetilasyon durumu arasında ilişki bulamadıklarını rapor etmişler.			
Kaise (Japonya) (32)	MS-PCR	34 Hp(+) mide kanseri (Evre 1-3)	68.0
		11 Hp(-) mide kanseri (Evre 1-3)	63.6
		68 Hp(+) gastrit	25.0
Dong (Çin) (16)	MS-PCR MethyLight	920 Nonkanseroz gastrit (gastrit, kronik atrofik gastrit, intestinal metaplazi, displazi)	
YORUM: Gastritten intestinal metaplazi grubuna doğru hastalık ilerledikçe * P16 hipermetilasyon oranlarının arttığı Mide karsinogenezinin erken evrelerinde P16 hipermetilasyonunda * Hp varlığının etkisi olduğu * ileri evrelerde çevresel maruz kalmaların ve somatik mutasyonların birlikte etkili olduğu			
Çalışmamızda	MS-HRM	30 mide kanser (evre 3-4) 37 akut gastrit	100 (kantitatif 73.3) 100 (kantitatif 78.4)

P 16 ve hMLH1 genleri ile ilgili literatür tartışması

Kang ve ark.ların 2003 yılında yayınlanan çalışmalarında (35) Güney Kore'de arşiv dokudan elde ettikleri 80 mide kanseri örneği ile endoskopik olarak elde ettikleri 74 kronik gastrit örneğini MS-PCR yöntemiyle çalışmışlardır. İnceledikleri 12 gen arasında olan **P16** ve **hMLH1** genlerinin kronik gastrit hasta grubunda daha düşük metilasyon (sırasıyla %2.7 ve %0) ve mide kanseri hasta grubunda daha yüksek metilasyon (sırasıyla %43.8 ve %20) göstermeleri dolayısıyla bu genlerin kanser ile ilişkili metillenmiş genler olarak sınıflanabileceklerini bildirmişlerdir.

Perri, F. ve ark.ları 2007 yılında yayınlanan çalışmalarında (70) İtalya'da 57 dispeptik şikayetleri olan hastadan elde ettikleri endoskopik biyopsi örneklerinde **P16** ve **hMLH1** dahil 5 tümör ilişkili genin metilasyon durumunu MS-PCR yöntemiyle araştırmışlardır. Toplam 45 Hp(+) hastaya medikal eradikasyon tedavisi verilmiş. 12 ay sonra kontrol endoskopisi için çağırılmışlardır. Hp(+) olgularda P16 için 12/45 (%27) hMLH1 için ise 2/45 (%4) hipermetilasyon oranları saptamışlardır. Araştırmacılar, sonuçlarının P16 geninde Hp enfeksiyonu ile promoter hipermetilasyonu arasındaki anlamlı ilişkiyi ortaya koyduğu görüşüyle yorumlamışlardır. Hp(+) olan 45 hastaya verdikleri medikal tedaviden 12 ay sonra 23 hasta kontrol için gelmiş ve bunların 17'sinde (%74) Hp eradikasyonunun başarılı olduğu tesbit edilmiştir. Bu hastaların yapılan kontrol endoskopilerinden elde edilen biyopsi doku örneklerinde metilasyon durumlarında kısmi gerileme saptadıklarını bildirmişlerdir.

Kang G.H. ve ark.larının 2001 yılında yayınlanan çalışmalarında (36) Güney Kore'de 69 kronik gastrit ve 64 mide kanseri arşiv dokusunda **P16** ve **hMLH1**'in de içinde olduğu toplam beş genin metilasyon durumlarını MS-PCR yöntemi ile araştırmışlardır. Kronik gastrit olgularında P16 ve hMLH1 genleri için herhangi bir aberan metilasyon paterni saptayamamışlar, buna karşılık bu genler açısından mide kanseri örneklerinin sırasıyla %42,2 ve %20,3 kadarında gen hipermetilasyonunun olduğunu bildirmişlerdir.

Çalışmamızda **hMLH1** geni için saptadığımız bulgular literatür ile uyumludur. Hem mide kanseri hem de gastrit hasta grubunda %100 metilasyon saptadığımız **P16** geni için grup örnek sayılarımızın daha az olması farklı bir görüş bildirmemizi sınırlamaktadır. P16 ve hMLH1 genleri ile ilgili tartışma **Tablo 5.3**'de özetlenmiştir.

Tablo 5.3 P16 ve hMLH1 genleri tartışma özeti

ARAŞTIRICI	YÖNTEM	GRUPLAR	METİLASYON (%)	
			P16	hMLH1
Kang (2003) Güney Kore	MS-PCR	80 mide kanseri 74 kronik gastrit	43.8 2.7	20.0 0.0
YORUM: Bu genlerin kanser ilişkili genler olduğu				
Perri (İtalya)	MS-PCR	57 dispeptik şikayeti olan hasta	27.0	4.0
YORUM: P16 geninde Hp enfeksiyonu ile hipermetilasyon arasında ilişki olduğu				
Kang (2001) Güney Kore	MS-PCR	64 mide kanseri 69 kronik gastrit	42.2 0.0	20.3 0.0
Çalışmamızda	MS-HRM	30 mide kanseri 37 akut gastrit	100.0 Kantitatif 73,3 100.0 Kantitatif 78,4 P16	20.0 Kantitatif 10,8 5,4 Kantitatif 2,2 hMLH1

hMLH1 ve hMSH2 genleri ile ilgili literatür tartışması

Kim ve ark.ları 2002 yılında yayınlanan mide kanseri hücre serilerinde yaptıkları çalışmada (41) Hp enfeksiyonu sonrasında **hMLH1**, PMS1, PMS2, **hMSH2** ve MSH6 ekspresyonlarının azaldığını, eradikasyon sonrası hMLH1 ve hMSH2 düzeylerinin enfekte olmayan hücrelerdeki düzeye döndüğünü bildirmişlerdir.

Carvalho ve ark.ları 2003 yılında yayınlanan çalışmalarında (8) Portekiz’de 51 mide kanseri hasta grubunda **hMLH1**’in içinde bulunduğu toplam dört geni MS-restriksiyon analizi sonrası PCR ve MS-PCR yöntemleriyle incelemişler. **hMLH1** geni için %37 oranında metilasyon saptayarak, hipermetilasyon bulunan mide kanserlerinde tümör hücrelerinin düşük **hMLH1** ekspresyonu gösterdiklerini, bu durumun da mikrosatellit dengesizliğine yol açtığını öne sürmüşlerdir.

Park ve ark.ları 2005 yılında yayınlanan Güney Kore’de yaptıkları çalışmalarında (68) 60 gastrit ve peptik ülserli hastada **hMLH1** ve **hMSH2** dahil toplam altı gen üzerinde immünohistokimyasal inceleme yapmışlar, Hp(+) gastrit olgularına ilişkin doku örneklerini tedavi öncesi ve sonrası ayrı ayrı değerlendirmişlerdir. Hp eradikasyon tedavisinin **hMLH1** ve **hMSH2** protein düzeylerini arttırdığını, Hp(+) kronik gastrit olgularında **hMSH2** ve **hMLH1** proteinlerinin eksikliğinin mikrosatellit instabilite birikimine neden olabileceğini ve bunun karsinogenezis progresyonu açısından önemli olacağını vurgulamışlardır.

Mirzae ve ark.ları 2008 yılında İran’da yaptıkları çalışmalarında(58), 50 Hp(+) ve 50 Hp(-) dispeptik hasta gruplarında **hMLH1** ve **hMSH2** genlerine ilişkin yaptıkları immünohistokimyasal analizlerde Hp(+) dispeptik hastalarda **hMLH1** düzeyinin azaldığını gözlemlemişlerdir.

Çalışmamızda **hMSH2** geni hipermetilasyonu yüksek sıklıkta gözlenirken **hMLH1** geni sessizleşmesine yönelik sadece bir olguda %25 oranında metilasyon saptanmıştır. Ancak özellikle **hMSH2** olmak üzere **hMLH1** de de bir olguda Hp medikal eradikasyon tedavisi sonrası aberan metilasyon oranlarının azaldığının saptanması literatürü destekler niteliktedir. Gastrit ve mide kanseri örneklerinde bu iki DNA tamir genine ilişkin metilasyon sıklık ve düzeyleri karşılaştırıldığı zaman mide kanseri grubunda her iki gen için de önemli düzeyde farklılıklar saptanmıştır. Mide kanseri grubunda aberan gen metilasyonunun anlamlı derecede arttığı verilerimizle de desteklenmiştir.

CYP1B1, BCL2, MT1G, SCGB3A1, hMLH1 ve P16 (CDKN2A) genleri ile ilgili literatür tartışması

Yoo ve ark.ları 2008 yılında yayınlanan Güney Kore’de yaptıkları çalışmalarında (95), 41 Hp(+) ve 28 Hp(-) olmak üzere toplam 69 mide kanseri ile 43 Hp(+) ve 39 Hp(-) olmak üzere toplam 82 kronik gastrit hasta gruplarında 25 gen bölgesini MethyLight assay yöntemi ile incelemişlerdir. Bu 25 gen içerisinde **CYP1B1, BCL2** ve **hMLH1** genleri çalışmamızla ortak genlerdir. CYP1B1 genini kanser ilişkili gen olarak sınıflamışlardır. Yaptıkları çalışmada 23 gende (CYP1B1, BCL2 ve hMLH1 genleri dahil) Hp(-) mide kanseri grubunda Hp(-) kronik gastrit grubuna göre daha yüksek metilasyon saptamışlar ve bu durumu kanser ilişkili metilasyon olarak yorumlamışlardır. CYP1B1, BCL2 ve hMLH1 genlerinin dahil olduğu 23 genden yedi tanesi dışında (hMLH1 bu grupta) geri kalan 16 gende (CYP1B1 ve BCL2 bu grupta) Hp(+) mide kanseri grubunda Hp(+) kronik gastrit grubuna göre daha yüksek metilasyon saptamışlardır. Hp(-) mide kanseri grubunda, Hp(-) kronik gastrit grubuna göre CYP1B1, BCL2 ve hMLH1 genlerinde saptadıkları yüksek hipermetilasyon çalışmamız verileri ile örtüşmektedir. Hp(+) mide kanseri grubunda Hp(+) kronik gastrit grubuna göre elde ettikleri CYP1B1 ve BCL2 genlerindeki metilasyon yüksekliği de çalışmamızda elde edilen verilerle uyumludur. Bu gruptan farklı olarak çalışmamızda hMLH1 geninde de Hp(+) mide kanseri grubunda Hp(+) kronik gastrit grubuna göre yüksek oranda anormal metilasyon paterni saptanmıştır. Analizlerin tekrarlanması ile de aynı sonuçlara ulaşılması, incelenen örnekler arasındaki aberan metilasyon oranları bakımından gözlenen farklılıkların kullanılan yöntemlerin yanısıra, tümör heterojenitesinden, hasta sayılarındaki farklılıklardan, Hp enfeksiyonu analiz yöntemlerinin çeşitliliğinden kaynaklanabileceği düşüncesindeyiz.

Kang GH ve ark.ları 2008 yılında yayınlanan Güney Kore’de yaptıkları çalışmalarında (34). 33 mide kanseri ile 14 Hp(+)ve 13 Hp(-) olmak üzere toplam 27 kronik gastrit hasta gruplarıyla 27 gen bölgesini MethyLight assay yöntemi ile incelemişlerdir. Bu 27 gen içerisinde **CYP1B1, SCGB3A1, MT1G, BCL2** ve **P16(CDKN2A)** genleri çalışmamızla ortak genlerdir. İnceledikleri 27 genin tamamında mide kanseri hasta grubunda metilasyon saptamışlardır. Bu grupta gösterdikleri

metilasyon oranlarına göre BCL2 (%80) ve SCGB3A1 (%64) genlerini yüksek metilasyon gösteren; CYP1B1(%40), P16(CDKN2A) (%36) ve MT1G (%32) genlerini orta metilasyon gösteren olarak sınıflamışlar ayrıca CYP1B1 ve BCL2 genlerinin mide kanseri hasta grubunda gastrit hasta grubundan 2-3 kat, SCGB3A1 geninin 0,5 kat yüksek metilasyon gösterdiklerini; MT1G geninin ise tam tersi olarak gastrit hasta grubunda mide kanseri hasta grubundan daha yüksek metilasyon gösterdiğini ve P16(CDKN2A) geninin ise her iki hasta grubunda metilasyon oranlarının birbirine yakın olduğunu bildirmişlerdir.

Öncelikle çalışmamızda da bütün genlerin mide kanseri hasta grubunda aberan metilasyon paternleri göstermiş olması Kang GH ve ark.larının çalışmasıyla örtüşmektedir. Tüm örnekler aberan metilasyonlu gen sayıları açısından incelendiğinde en az 1-3 hipermetile aberan gen içeren örnekler ile dört ve üzeri geni hipermetile olan örnekler olarak karşılaştırılırken kanser grubunda hipermetile gen sayısının önemli düzeyde arttığı gözlenmiştir. Bu verimiz literatürle tam uyumludur.

BCL2, CYP1B1 MT1G ve P16-CDKN2A (yüzde oranlarımız yüksek olmakla birlikte) genlerindeki verilerimiz de ilgili araştırma verileri ile uyumlu olmakla birlikte çalışmamızda **SCGB3A1** geninin hipermetilasyon oranları, mide kanseri ve gastrit hasta gruplarında birbirlerine yakın olarak saptanmıştır. Bu gene ilişkin gastrit ve mide kanseri örneklerinde yapılan çalışmaların kısıtlı olması nedeniyle yoruma açıktır.

Ayrıca çalışmamızda özellikle **CYP1B1** gen metilasyon sıklığına ilişkin ilginç bir veri ile de karşılaşılmış, Hp(-) gastrit vakalarında, Hp(+) vakalara göre hipermetilasyon sıklığının daha yüksek olduğu gözlenmiştir.

Akut gastrit ile ileri evre mide kanseri hasta gruplarını karşılaştırdığımızda **CYP1B1, BCL2, hMSH2 ve hMLH1** genlerinin mide kanseri; **SCGB3A1 ve MT1G** genlerinin ise akut gastrit hasta gruplarında daha yüksek sıklıkta hipermetile oldukları saptanmıştır.

P16 geninin hem gastrit hem de mide kanseri gruplarının tümünde %100 metillenmiş olması çalışmamızın ilginç bir bulgusudur. Bu durum kullanılan analiz yönteminin ve P16 genine spesifik primerlerin yanlış seçiminden kaynaklanabileceği gibi gastrit gelişiminin moleküler patolojisi ile de ilişkili olabilir. Bu örneklerin P16 hipermetilasyonu açısından farklı yöntemlerle değerlendirilmesi gerekmektedir.

Gastrit grubunun analizinde **SCGB3A1**, **MT1G**, **BCL2** ve **hMSH2** genlerinin metilasyonu üzerine Hp enfeksiyonunun arttırıcı etkisi göze çarpmaktadır.

Hp eradikasyonu için medikal tedavi alan hasta grubunda 4/15 hastada eradikasyon sağlanmıştır. Yine de bu grupta **MT1G**, **hMSH2** ve **hMLH1** genlerinde metilasyon oranlarında azalma saptanmıştır.

Çalışmamızda metilasyon paternlerini değerlendirdiğimiz, DNA yanlış eşleşme tamir sistemi (MMR) genlerinden **hMLH1** ve **hMSH2**'nin Hp(+) gastrit olgularında hipermetile olmaları literatürle uyumlu bir bulgudur. Hp enfeksiyonunun mikrosatellit instabilitesi olan olgularda daha yüksek sıklıkta bulunması, Hp'nin DNA yanlış eşleşme tamir sistemini etkileyerek mikrosatellit instabiliteye neden olabileceği olasılığını gündeme getirmiştir. Yao ve ark.ları yaptıkları çalışmalarının sonucunda Hp enfeksiyonunun, mide epitelinde tamir sistemi protein düzeylerini azalttığını, bu nedenle de instabilitenin oluştuğunu, Hp eradikasyonu sonrası yanlış eşleşme tamir sisteminden **hMLH1** ve **hMSH2** protein düzeylerinin gastrik mukozada arttığını bildirmişlerdir (94).

Çalışmamızda da her iki tamir geninin gastrit ve mide kanseri gruplarında hipermetile bulgular göstermesi literatür ile uyumludur. Ancak dikkatimizi çeken bir bulgu gastrit grubunda özellikle **hMSH2** geni hipermetilasyonunun, mide kanseri grubunda ise **hMSH2** ile birlikte **hMLH1** gen hipermetilasyonunun arttığı yönündedir. Bu bulgunun kanserde mikrosatellit instabilite artışı ile her iki tamir geninin inaktif hale gelmesi arasındaki ilişkiyi doğrular nitelikte bir bulgu olduğu görüşündeyiz. Ancak ekspresyon verilerinin geniş araştırma grubunda değerlendirilmesi gerektiğine inanıyoruz.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Literatürde mide kanserinde bu gen gruplarıyla yapılmış araştırmaların sınırlı olması nedeniyle verilerimiz tartışmaya açıktır. Bu durumun daha büyük hasta sayılarıyla ayrıntılı olarak değerlendirilmesi gerektiğini düşünmekteyiz. Ayrıca toplum taramalarında vakaların durumlarını değerlendirilmek için Kang GH ve ark.larının (34) sınıfladığı gibi mide kanseri ve gastrit hasta gruplarında yüksek, orta, düşük düzeyde metilasyon anomalileri gösteren genlerin birlikte çalışılmasının gerektiğini düşünmekteyiz.

Metilasyon analizlerini gerçekleştirdiğimiz MS-HRM tekniği henüz yeni uygulamaya başlanan bir yöntemdir (88). Ancak bugüne kadar yapılan çalışmalarda MS-HRM yöntemi ile heterojen olarak metillenmiş tümör dokularında metilasyon analizlerinin yüksek doğrulukta yapılabildiği sonucuna varılmıştır (7, 43, 89, 91). Çalışmamızda da tüm örneklerde MS-HRM yöntemi uygulamasında başarılı olunmuştur. Uygulaması hızlı, ekonomik ve analitik sensitivitesi yüksek olan bir yöntemdir.

Sonuç olarak gastrit ve mide kanserinde metilasyon anomalileri etiyolojide önemli rol oynayan mekanizmadır. Ancak kendi çalışmamız da dahil olmak üzere pek çok çalışmada incelenen örnek sayısı sınırlı ve kantitatif metilasyon değerlendirmeleri ise henüz çok eksiktir. Daha büyük populasyonlarda bu analizlerin gerçekleştirilmesi ve genlere spesifik ekspresyon analizlerinin de yapılarak, klinik verilerle metilasyon sonuçlarının karşılaştırılması gerekir. Tedavi olanaklarının henüz büyük bir atılım yapmadığı bu kanser tipinde moleküler biyomarkerleri saptamak son derece önemli olacaktır.

KAYNAKLAR DİZİNİ

1. Abbaszadegan, M.R., Moaven, O., Sima, H.R., Ghafarzadegan, K., A'rabi, A., Forghani, M.N., Raziee, H.R., Mashhadinejad, A., Jafarzadeh, M., Esmaili-Shandiz, E. and Dadkhah, E., 2008, p16 promoter hypermethylation: A useful serum marker for early detection of gastric cancer. *World J Gastroenterol*, 14(13): 2055- 2060.
2. Akyan, N.F. ve Topuz, E., (Editörler), 2008, Gastrointestinal Sistem Kanseri (Özofagus, Mide, Kolon ve Rektum) Tanı – Tedavi – Takip İstanbul Konsensüsü 2006, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 13-14.s / 46s.
3. Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Watson, J.D., The molecular biology of the cell, 1994, Third Edition, Garland Publishing Inc.,New York&London
4. Altındış, M. ve Özdemir, M., 2003 , *Helicobacter pylori* ve tanısı, Afyon Kocatepe Üniversitesi, Kocatepe Tıp Dergisi (2003), 2, 1-12.
5. Anderson, W.A.D.and Scotti, T.M., 1990, 3. baskı, Kısa Patoloji (Synopsis of Pathology), (Çevirenler: Aykan T.B., Tüzüner N., Sav A.ve İnce Ü.), Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul; 622-623.s / 944s.
6. Bienz, M. and Clevers, H., Linking colorectal cancer to Wnt signaling.,2000, *Cell*, 103, 311–320 p.
7. Candiloro, I.L., Mikeska, T., Hokland, P.and Dobrovic, A., 2008, Rapid analysis of heterogeneously methylated DNA using digital methylation-sensitive high resolution melting: application to the CDKN2B (p15) gene. *Epigenetics Chromatin*. 1(1):7
8. Carvalho, B., Pinto, M., Cirnes, L., Oliveira, C., Machado, J.C., Suriano, G., Hamelin, R., Carneiro, F. and Seruca, R., 2003, Concurrent hypermethylation of gene promoters is associated with a MSI-H phenotype and diploidy in gastric carcinomas, *Eur. J.Cancer* 39 1222–1227.
9. Cecilia, M. and Fenoglio-Preiser, C., 2008, *Gastrointestinal Pathology An Atlas and Text* ,Third Edition, 135–269.
10. Chan, A.O., Peng, J.Z., Lam, S.K., Lai, K.C., Yuen, M.F., Cheung, H.K., Kwong, Y.L., Rashid, A., Chan, C.K. and Wong, B.C., 2006, Eradication of *Helicobacter pylori* infection reverses E-cadherin promoter hypermethylation, *Gut* 55:463–468
11. Classon, M. and Harlow, E., 2002., The retinoblastoma tumour suppressor in development and cancer, *Nature Rev. Cancer*, 2, 910–917 p.
12. Collins, K., 1997, The cell cycle and cancer, *Proc Natl Acad Sci USA*, 94, 7, 2776-2778 p.
13. Cooper, M., 1997 *The cell, A molecular approach*, ASM Press Washington ,D.C.
14. Croke, P.S., Ritchie, M.D., Hachey, D.L., Dawling, S., Roodi, N. and Parl, F.F., 2006, Estrogens, Enzyme Variants, and Breast Cancer: A Risk Model, *Cancer Epidemiol Biomarkers* 15:1620-1629.
15. Demiray, M. ve Manavoğlu, O., 2003, *Helicobacter pylori* ve gastrik karsinogenez, Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi, 29 (2) 29-33,

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

16. Dong, C-X., Deng, D-J., Pan, K-F., Zhang, L., Zhang, Y., Zhou, J. and You, W-C., 2009, Promoter methylation of p16 associated with Helicobacter pylori infection in precancerous gastric lesions: A population-based study. *Int. J. Cancer*: 124, 434–439
17. Feinberg, A.P., Ohlsson, R. and Henikoff, S., 2006, The epigenetic progenitor origin of human cancer, *Nature Reviews Genetics* 7, 21-33
18. Fenoglio-Preiser, C., Carneiro, F., Correa, P., Gulford, P., Lambert, R. and Megraud, F., 2000, Gastric Carcinoma. Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System, World Health Organization Classification of Tumours, Edited by Stanley R. Hamilton, Lauri A. Aaltonen chapter:3, 37–66
19. Ferrario, C., Lavagnini, P., Gariboldi, M., Miranda, C., Losa, M., Cleris, L., Formelli, F., Pilotti, S., Pierotti, M. A. And Greco, A., 2008, Metallothionein 1G acts as an oncosuppressor in papillary thyroid carcinoma, *Laboratory Investigation*, 88, 474–481.
20. Franks, L.M. and Teich, N.M., 1998, Cellular and molecular biology of cancer, Third edition, Oxford Uni. Pres.
21. Freedman, N.D., Ahn, J., Hou, L., Lissowska, J., Zatonski, W., Yeager, M., Chanock, S.J., Chow, W.H. and Abnet, C.C., 2009, Polymorphism in estrogen and androgen metabolizing genes and risk of gastric cancer, *Carcinogenesis*, 30(1):71-7.
22. Frézal, J., 2011.04.06. Genatlas Université René Descartes-Paris. [online] <http://genatlas.medicine.univ-paris5.fr/html> [2011.04.06].
23. Geoffrey, M.C. and Hausman, E.R., 2006, Hücre: Moleküler Yaklaşım, (Çev.: Sakızlı M., Atabey N.), İzmir Tıp Kitabevi, İzmir, 592-640 s.
24. Guo, M.Z., Ren, J. L., Brock, M. V., Herman, J. G. and Carraway, H. E., 2008, Promoter methylation of HIN-1 in the progression to esophageal squamous cancer, *Epigenetics* Vol. 3 Issue 6, 336-341;
25. Hesketh, R.E., 1997, The Onkogene and Tumor Suppressor Gene Facts Book, 2d ed. Academic Pres.
26. Hiraki, M., Kitajima, Y., Koga, Y., Tanaka, T., Nakamura, J., Hashiguchi, K., Noshiro, H. and Miyazaki, K. 2011, Aberrant gene methylation is a biomarker for the detection of cancer cells in peritoneal wash samples from advanced gastric cancer patients. *Ann Surg Oncol*. [2011 Mar 16, Epub ahead of print]
27. Hou, Y., Gao, F., Wang, Q., Zhao, J., Flagg, T., Zhang, Y. and Deng, X., 2006, Bcl2 impedes DNA mismatch repair by directly regulating the hMSH2-hMSH6 heterodimeric complex, *The Journal Of Biological Chemistry*, Vol. 282, NO. 12, 9279–9287 p.
28. Huang, Q., Su, X., Ai, L., Li, M., Fan, C.Y. and Weiss, L.M., 2007, Promoter hypermethylation of multiple genes in gastric lymphoma, *Leuk Lymphoma*, 48(10):1988-96.
29. Ito, M., Tanaka, S., Kamada, T., Haruma, K. and Chayama, K., 2006, Casual role of Helicobacter pylori infection and eradication therapy in gastric carcinogenesis, *World J Gastroenterol*, 12(1) :10–16.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

30. Jahroudi, N., Foster, R., Price-Haughey, J., Beitel, G. and Gedamu, L. 1990, Cell-type specific and differential regulation of the human metallothionein genes. Correlation with DNA methylation and chromatin structure. *J Biol Chem* 265:6506–6511.
31. Jee, C., Kim, D.M.A., Jung, E. J., Kim, J. and Kim, W.H., 2009, Identification of genes epigenetically silenced by CpG methylation in human gastric carcinoma, *Eur J Cancer* 45: 1282-1293.
32. Kaise, M., Yamasaki, T., Yonezawa, J., Miwa, J., Ohta, Y. and Tajiri, H., 2008, CpG island hypermethylation of tumor-suppressor genes in *H. pylori*-infected non-neoplastic gastric mucosa is linked with gastric cancer risk, *Helicobacter*, 13(1):35-41.
33. Kang, G.H., Lee, H.J., Hwang, K.S., Lee, S., Kim, J.H. and Kim, J.S., 2003, Aberrant CpG island hypermethylation of chronic gastritis, in relation to aging, gender, intestinal metaplasia, and chronic inflammation, *Am J Pathol* 163:1551–1556.
34. Kang, G.H., Lee, S., Cho, N.Y., Gandamihardja, T., Long, T.I., Weisenberger, D.J., Campan, M. and Laird, P.W., 2008, DNA methylation profiles of gastric carcinoma characterized by quantitative DNA methylation analysis. *Lab Invest.*, 88:161-70
35. Kang, G.H., Lee, S., Kim, J.S. and Jung, H.Y., 2003, Profile of aberrant CpG island methylation along the multistep pathway of gastric carcinogenesis, *Lab Invest*, 83(5): 635-41.
36. Kang, G.H., Shim, Y.H., Jung, H.Y., Kim, W.H., Ro, J.Y. and Rhyu, M.G., 2001, CpG island methylation in premalignant stages of gastric carcinoma. *Cancer Res*, 61:2847–2851.
37. Kapadia, C. R., 2003, Gastric Atrophy, Metaplasia, and Dysplasia, A Clinical Perspective, *J Clin Gastroenterol*, 36; 29-36.
38. Kapan, M., 2001, İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri, Gastrointestinal Sistem Hastalıkları Sempozyumu, 11–12 Ocak 2001, İstanbul, s.253–269.
39. Kelley, J.R. and Duggan, J.M., 2003, Commentary, Gastric cancer epidemiology and risk factors, *Journal of Clinical Epidemiology*, 56, 1–9.
40. Kim, H.G., Lee, S., Kim, D.Y., Ryu, S.Y., Joo, J.K., Kim, J.C, Lee, K.H. and Lee, J.H., 2010, Aberrant methylation of DNA mismatch repair genes in elderly patients with sporadic gastric carcinoma: A comparison with younger patients, *Journal of Surgical Oncology*, 2010;101:28–35
41. Kim, J.J., Tao, H., Carloni, E., Leung, W.K., Graham, D.Y. and Sepulveda, A.R., 2002, *Helicobacter pylori* impairs DNA mismatch repair in gastric epithelial cells, *Gastroenterology* 123:542–553.
42. Kountouras, J., Zavos, C., Chatzopoulos, D., Katsinelos, P., 2008, New aspects of *Helicobacter pylori* infection involvement in gastric oncogenesis, *J Surg Res* 146(1):149-58.
43. Kristensen, L.S. and Hansen L.L., 2009, PCR -Based Methods for Detecting Single-Locus DNA Methylation Biomarkers in Cancer Diagnostics, Prognostics, and Response to Treatment, *Clinical Chemistry*, 55:1471–1483.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

44. Krop, I., Parker, M.T., Bloushtain-Qimron, N., Porter, D., Gelman, R., Sasaki, H., Maurer, M., Terry, M.B., Parsons, R. and Polyak, K., 2005, HIN-1, an inhibitor of cell growth, invasion, and AKT activation, *Cancer Res*, 65:9659-9669.
45. Krypuy, M., Wojdacz, T.K. and Dobrovic, A. 2008, Rapid High-Throughput Methylation Analysis Using the LightCycler® 480 System, *Biochemica*, vol. 1, Article
46. Kumar, V., Cotran, R.S. and Robbins, S.L., 2003, 6. baskı, *Temel Patoloji – Basic Pathology* (Çeviri editörü: Çevikbaş U.), Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 481- 489.s / 590 s.
47. Leal, M. F., Lima, E. M., Silva, P. N. O. Assumpção, P. P., Calcagno D. Q., Payão, S. L., Burbano, R. R. and Smith, M. de A. C., Kountouras, J., Zavos, C., Chatzopoulos, D. and Katsinelos, P., 2008, New aspects of *Helicobacter pylori* infection involvement in gastric oncogenesis, *J Surg Res* 146(1):149-58).
48. Lee, J.H., Abraham, S.C., Kim, H.S., Nam, J.H., Choi, C., Lee, M.C., Park, C.S., Juhng, S.W., Rashid, A., Hamilton, S.R. and Wu, T.T., 2002, Inverse relationship between APC gene mutation in gastric adenomas and development of adenocarcinoma, *Am J Pathol.* 161: 611–618.
49. Lee, J.H., Park, S.J., Abraham, S.C., Seo, J.S., Nam, J.H., Choi, C., Juhng, S.W., Rashid, A., Hamilton, S.R. and Wu, T.T., 2004, Frequent CpG island methylation in precursor lesions and early gastric adenocarcinomas, *Oncogene*, 23(26): 4646-54.
50. Leung, W.K., Man, E.P., Yu, J., Go, M.Y., To, K.F., Yamaoka, Y., Cheng, V.Y., Ng, E.K. and Sung, J.J., 2006, Effects of *Helicobacter pylori* eradication on methylation status of E-cadherin gene in noncancerous stomach, *Clin Cancer Res*, 12(10):3216-21.
51. Lewandowska J. and Bartoszek A., 2011, DNA methylation in cancer development, diagnosis and therapy—multiple opportunities for genotoxic agents to act as methylome disruptors or remediators, *Mutagenesis* vol. 26 no. 4 pp. 475–487,
52. Lin, Q., Geng, J., Ma, K., Yu, J., Sun, J., Shen, Z., Bao, G., Chen, Y., Zhang, H., He, Y., Luo, X., Feng, X. and Zhu, J., 2009, RASSF1A, APC, ESR1, ABCB1 and HOXC9, but not p16INK4A, DAPK1, PTEN and MT1G genes were frequently methylated in the stage I non-small cell lung cancer in China, *J Cancer Res Clin Oncol.*, 135(12):1675-84.
53. Lister, R., Pelizzola, M. and Downen, R. H., 2009, Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences, *Nature*, 462, 315–322.
54. Lujambio, A., Calin, G. A. and Villanueva, A., 2008, A microRNA DNA methylation signature for human cancer metastasis, *Proc. Natl Acad.Sci. USA.*, 105, 13556–13561
55. Maekita, T., Nakazawa, K., Mihara, M., Nakajima, T., Yanaoka, K., Iguchi, M., Arii, K., Kaneda, A., Tsukamoto, T., Tatematsu, M., Tamura, G., Saito, D., Sugimura, T., Ichinose, M. and Ushijima, T., 2006, High levels of aberrant DNA methylation in *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosae and its possible association with gastric cancer risk, *Clin Cancer Res* 12:989–995.
56. Maesawa, C., Tamura, G., Suzuki, Y., Ogasawara, S., Sakata, K., Kashiwaba, M. and Satodate, R., 1995, The sequential accumulation of genetic alterations characteristic of the colorectal adenoma-carcinoma sequence does not occur between gastric adenoma and adenocarcinoma. *J Pathol*; 176: 249–258.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

57. Malentacchi, F., Forni, G., Vinci, S. and Orlando, C., 2009, Quantitative evaluation of DNA methylation by optimization of a differential-high resolution melt analysis protocol, *Nucleic Acids Research*, Vol. 37, No. 12 e86.
58. Mirzaee, M., Molaei, V., Shalmani, H.M. and Zali, M.R., 2008, Helicobacter pylori infection and expression of DNA mismatch repair proteins, *World J. Gastroenterol.* 14: 6717–6721.
59. Nakayama, H., Hibi, K., Taguchi, M., Takase, T., Yamazaki, T., Kasai, Y., Ito, K., Akiyama, S. and Nakao, A., 2002, Molecular detection of p16 promoter methylation in the serum of colorectal cancer patients, *Cancer Letters Volume 188, Issue 1, Pages 115-119*
60. Nardone, G., Compare, D., De Colibus, P., De Nucci, G. and Rocco, A., 2007, Helicobacter pylori and epigenetic mechanisms underlying gastric carcinogenesis, *Dig Dis*, 25(3):225-9.
61. Nimi, T., Keck-Waggoner, CL., Popescu, NC., Zhou, Y., Levitt, RC. and Kimura, S., 2001, UGRP1, a uteroglobin/clara cell secretory protein-related protein, is a novel lung-enriched downstream target gene for the T/EBP/NKX2.1 homeodomain transcription factor, *Mol Endocrinol*, 15:2021-2036.
62. Normark, S., Nilsson, C., Normark, B.H. and Hornef, M.W., 2003, Persistent infection with Helicobacter pylori and the development of gastric cancer, *Adv Cancer Res*, 90:63–89
63. Nozaki, K., Shimizu, N. and Ikehara, Y., 2003, Effect of early eradication on Helicobacter pylori-related gastric carcinogenesis in Mongolian gerbils, *Cancer Sci* 94:235-239.
64. Nussbaum, R.L., McInnes, R.R. and Willard, H.F., 2005, Thompson & Thompson Tıbbi Genetik, Güneş Kitabevi, 312-313 s.
65. Ohmura, K., Tamura, G., Endoh, Y., Sakata, K., Takahashi, T. and Motoyama, T., 2000, Microsatellite alterations in differentiated-type adenocarcinomas and precancerous lesions of the stomach with special reference to cellular phenotype, *Hum Pathol*31:1031–1035.
66. OMIM: Online Mendelian Inheritance in Man, John Hopkins University, National Center of Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine, Gene ID:1545, updated on 3-Apr–2011, [online] <http://ncbi.nlm.nih.gov/html> [2011.04.06].
67. Owen, D. A., 2004, The stomach. Sternberg's diagnostic Surgical, Pathology, Volume 2., Edited by Stacey E.Mills. 1435–1474.
68. Park, D.I.I, Park, S.H., Kim, S.H., Kim, J.W., Cho, Y.K., Kim, H.J., Sohn, C.I., Jeon, W.K., Kim, B.I., Cho, E.Y., Kim, E.J., Chae, S.W., Sohn, J.H., Sung, I.K., Sepulveda, A.R. and Kim, J.J. 2005, Effect of Helicobacter pylori infection on the expression of DNA mismatch repair protein, *Helicobacter* 10:179–184.
69. Park, W.S., Oh, R.R., Park, J.Y., Lee, S.H., Shin, M.S., Kim, Y.S., Kim, S.Y., Lee, H.K., Kim, P.J., Oh, S.T., Yoo, N.J. and Lee, J.Y., 1999, Frequent somatic mutations of the B-catenin gene in intestinal-type gastric cancer, *Cancer Res* 59: 4257–4260.
70. Perri, F., Cotugno, R., Merla, A.P.A., Quitadamo, M., Gentile, A., Pilotto, A., Annese, V. and Andriulli, A., 2007, Aberrant DNA Methylation in Non-Neoplastic Gastric Mucosa of H. Pylori Infected Patients and Effect of Eradication, *The American Journal of Gastroenterology*, 102, 1361–1371

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

71. Ramsahoye, B. H., Biniszkievicz, D., Lyko, F., Clark, V., Bird, A. and Jaenisch, R., 2000, Non-CpG methylation is prevalent in embryonic stemcells and may be mediated by DNA methyltransferase 3a. *Proc. NatlAcad. Sci. USA.*, 97, 5237–5242.
72. Qian, X., Huang, C., Cho, C.H., Hui, W.M., Rashid, A. and Chan, A.O.O., 2008, E-cadherin promoter hypermethylation induced by interleukin-1b treatment or H. pylori infection in human gastric cancer cell lines, *Cancer Letters* 263, 107–113,
73. Sato, F. and Meltzer, S.J., 2006, CpG island hypermethylation in progression of esophageal and gastric cancer, *Cancer*, 106(3):483-93.
74. Satoh, A., Toyota, M., Itoh, F., Sasaki, Y., Suzuki, H., Ogi, K., Kikuchi, T., Mita, H., Yamashita, T., Kojima, T., Kusano, M., Fujita, M., Hosokawa, M., Endo, T., Tokino, T. and Imai, K., 2003, Epigenetic inactivation of CHFR and sensitivity to microtubule inhibitors in gastric cancer, *Cancer Res*, 63: 8606-13.
75. Shimizu, N., Tatematsu, M. and Kaminishi, M (Çeviri: Çelik, A. ve Kadioğlu, H.) 2009, Mide kanserinin farklılığı-patogenez, tanı ve tedavi, Bölüm 3, Patogenez ve Patoloji, *Helicobacter pylori ve mide kanseri*, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 75. s- 355s.
76. Shin, C. M., Kim, N., Jung, Y., Park, J. H., Kang, G.H., Kim, J.S., Jung, H.C., Song, I.S., 2010, Role of *Helicobacter pylori* infection in aberrant DNA methylation along multistep gastric carcinogenesis, *Cancer Sci*. 101:1337–1346
77. Sissung, T. M., Price, D. K., Sparreboom, A. and Figg, W. D., 2006, Pharmacogenetics and Regulation of Human Cytochrome P450 1B1: Implications in Hormone-Mediated Tumor Metabolism and a Novel Target for Therapeutic Intervention, *Mol. Cancer Res.*, 4(3); 135-150.
78. Stadlander, C.T. and Waterbor, J.W., 1999, Molecular epidemiology, pathogenesis and prevention of gastric cancer. *Carcinogenesis*;20(12);2195–2208.
79. Stendon, P.D., 2008, The Human Gene Mutation Database at the Institute of Medical Genetics in Cardiff University [online] <http://hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php.html> [2011-04-06].
80. Suzuki, H., Itoh, F., Toyota, M., Kikuchi, T., Kakiuchi, H., Hinoda, Y. and Imai, K., 1999, Distinct methylation pattern and microsatellite instability in sporadic gastric cancer, *Int J Cancer*; 83:309–313.
81. Tahara, T., Arisawa, T., Shibata, T., Wang, F.Y., Nakamura, M., Sakata, M., Nagasaka, M., Takagi, T., Kamiya, Y., Fujita, H., Nakamura, M., Hasegawa, S., Iwata, M., Takahama, K., Watanabe, M., Hirata, I. and Nakano, H., 2007, Risk prediction of gastric cancer by analysis of aberrant DNA methylation in non-neoplastic gastric epithelium, *Digestion*, 75(1):54-61.
82. Tamura, G., Sato, K., Akiyama, S., Tsuchiya, T., Endoh, Y., Usuba, O., Kimura, W., Nishizuka, S. and Motoyama, T., 2001, Molecular characterization of undifferentiated-type gastric carcinoma. *Lab Invest*; 81: 593–598.
83. Ushijima, T. and Sasako, M., 2004, Focus on gastric cancer. *Cancer Cell*, 5: 121–125.
84. Ushijima, T., 2007, Epigenetic field for cancerization, *J Biochem Mol Biol*. 31;40(2):142-50.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

85. Ushijima, T., Nakajima, T. and Maekita, T., 2006, DNA methylation as a marker for the past and future, *J Gastroenterol*, 41(5):401-7.
86. Vieth, M. and Stolte, 2006, M. Elevated risk for gastric adenocarcinoma can be predicted from histomorphology, *World J Gastroenterol*; 14;12(38):6109–6114.
87. William, S.K. and Cummings, M.R., 2000, *Genetik Kavramlar*, (Çev.: Öner C.), Palme Yayıncılık, Ankara, 635-636 s.
88. Wojdacz, T. K. and Dobrovic, A., 2007, Methylation-sensitive high resolution melting(MS-HRM): a new approach for sensitive and high-throughput assessment of methylation, *Nucleic Acids Research*, Vol. 35, No. 6 e41
89. Wong, E.M. and Dobrovic, A., 2011, Assessing gene-specific methylation using HRM-based analysis. *Methods Mol Biol.*;687:207-17.
90. Wu, M-S., Lee, C-W., Shun, C-T., Wang, H-P., Lee, W-J., Chang, M-C., Sheu, J-C. and Lin, J-T., 2000, Distinct clinicopathologic and genetic profiles in sporadic gastric cancer with different mutator phenotypes, *Genes, Chromosomes & Cancer* 27: 403–411;
91. Wu, W., Zhang, J., Yang, H., Shao, Y. and Yu, B., 2010, Examination of AKAP12 promoter methylation in skin cancer using methylation-sensitive high-resolution melting analysis. *Clin Exp Dermatol*. Dec 24, doi: 10.1111/j.1365-2230.2010.03968.
92. Yamamoto, E., Suzuki, H., Takamaru, H., Yamamoto, H., Toyota, M. and Shinomura, Y., 2011, Role of DNA methylation in the development of diffuse-type gastric cancer, *Digestion*;83:241–249.
93. Yamashita, S., Tsujino, Y., Moriguchi, K., Tatematsu, M. and Ushijima, T., 2005, Chemical genomic screening for methylation silenced genes in gastric cancer cell lines using 5-aza-2'-eoxycytidine treatment and oligonucleotide microarray, *Cancer Sci* | January 2006 | vol. 97 | no. 1 | 64–71.
94. Yao, Y., Tao, H., Park, D.H., Sepulveda, J. L. and Sepulveda, A. R., 2006, Demonstration and Characterization of Mutations Induced by *Helicobacter pylori* Organisms in Gastric Epithelial Cells, *Helicobacter*; 11: 272–286.
95. Yoo, E.J., Park, S.Y., Cho, N.Y., Kim, N., Lee, H.S. and Kang, G.H., 2008, *Helicobacter pylori*-infection-associated CpG island hypermethylation in the stomach and its possible association with polycomb repressive Marks, *Virchows Arch*, 452(5):515-24.

EKLER DİZİNİ

EK - 1: Gastrit ve mide kanseri tanısı alan olgular arasında incelenen genlerin metilasyon paternlerine göre dağılımı

	SCGB3A1			CYP1B1			MT1G			BCL2			P16			hMSH 2			hMLH1		
	UM	M	p	UM	M	p	UM	M	p	UM	M	p	UM	M	p	UM	M	p	UM	M	p
Gastrit			ns			*			ns			*			?			ns			*
(N)	3	34		26	11	*	27	10	ns	36	1	*	0	37		4	33	ns	35	2	*
%	42,9	56,7		81,3	31,4	*	52,9	62,5		90,0	3,7		0,0	55,2		66,7	54,1		59,3	25,0	*
Kanser																					
(N)	4	26		6	24		24	6		4	26		0	30		2	28		24	6	
%	57,1	43,3		18,8	68,6		47,1	37,5		10,0	96,3		0,0	44,8		33,3	45,9		40,7	75,0	
Toplam																					
(N)	7	60		32	35		51	16		40	27		0	67		6	61		59	8	
%	100	100		100	100		100	100		100	100		0,0	100		100	100		100	100	

(ns= anlamlı değil) (* = p<0.05) (***) = p<0.001) (UM: Metillenmemiş) (M: Metillenmiş)

EK - 2: Hp(-) Gastrit hasta grubu MS-HRM analiz sonuçları

SIRA	KOD	CYP1B1	SCGB3A1	MT1G	BCL2	P16	MSH2	MLH1	METİLENMİŞ GEN SAYISI
1	G 01								2
2	G 05								4
3	G 07								3
4	G 08								3
5	G 12								4
6	G 13								4
7	G 14								5
8	G 16								4
9	G 24								2
10	G 25								3
11	G 30								4
12	G 31								4
13	G 32								3
14	G 40								4

EK - 3: Hp(+) Gastrit hasta grubu analiz sonuçları (Yeşil işaretli olgular medikal eradikasyon sonrası Hp(-) olarak saptanan olgulardır. Kırmızı dolgulu olgular medikal tedavileri sonrası kontrole gelmeyen olgulardır.)

SIRA	KOD	CYP1B1	SCGB3A1	MT1G	BCL2	P16	MSH2	MLH1	METİLENMİŞ GEN SAYISI
1	G 03								4
2	G 06								4
3	G 18								4
4	G 20								4
5	G 21								4
6	G 23								3
7	G 28								3
8	G 35								3
9	G 36								4
10	G 37								3
11	G 38								4
12	G 39								4
13	G 42								3
14	G 43								3
15	G 44								4
16	G 11								3
17	G 19								3
18	G 26								4
19	G 27								5
20	G 29								1
21	G 34								3
22	G 41								3
23	G 46								3

EK - 4: Hp(+) Gastrit hasta grubu medikal eradikasyon tedavi sonrası analiz sonuçları

(Yeşil işaretli olgular Hp(-) olarak saptanan olgulardır.)

SIRA		KOD	CYP1B1	SCGB3A1	MT1G	BCL2	P16	MSH2	MLH1	METİLENMİŞ GEN SAYISI
1	K 03									4
2	K 06									2
3	K 18									4
4	K 20									3
5	K 21									2
6	K 23									3
7	K 28									3
8	K 35									4
9	K 36									3
10	K 37									3
11	K 38									4
12	K 39									3
13	K 42									4
14	K 43									3
15	K 44									5

EK - 5: Mide kanseri Hp(+) hasta grubu analiz sonuçları

SIRA	KOD	CYP1B1	SCGB3A1	MT1G	BCL2	P16	MSH2	MLH1	METİLENMİŞ GEN SAYISI
1	F01								6
2	F02								5
3	F03								4
4	F04								5
5	F05								6
6	F06								4
7	F07								4
8	F08								4
9	F09								7
10	F10								3
11	F11								3
12	F12								4
13	F14								6
14	F15								5
15	F16								5
16	F18								4
17	F19								5
18	F20								4
19	F21								5
20	C01								4
21	C03								7
22	C05								5
23	C10								5
24	C11								4
25	C12								5

Ek - 6: Mide kanseri Hp(-) hasta grubu analiz sonuçları

SIRA		KOD	CYP1B1	SCGB3A1	MT1G	BCL2	P16	MSH2	MLH1	METİLENMİŞ GEN SAYISI
1	F13									5
2	F22									5
3	F23									6
4	C02									6
5	C04									5

Şekil açıklamaları:

Metillenmemiş	
%25 metilasyon	
%50 metilasyon	
%75 metilasyon	
%100 metilasyon	

ÖZGEÇMİŞ

Bireysel Bilgiler

Adı Soyadı : Murat ÖZNUR
Doğum Tarihi ve Yeri : 09.05.1968 Sarıkamış
Uyruğu : T.C.
Medeni Durumu : Meşüde ÖZNUR ile evli
Emel Afranur (1997) ve Safiye Ceydanur (2003) adlı iki
kızı var. 2011’de 3. kez (erkek) baba olma heyecanını
yaşıyor.
İletişim Adresleri : İstiklal Mahallesi Yalaman Sokak No: 19/4 ESKİŞEHİR
: dr_muratoznur@yahoo.com
: 0-5057758139

Eğitim Durumu:

İlkokul : Ankara Ahmet Vefik Paşa İÖÖ. -1979
Ortaokul : Ankara Atatürk Anadolu Lisesi - 1983
Lise : Ankara Atatürk Anadolu Lisesi - 1986
Üniversite : Anadolu Üniversitesi Tıp Fakültesi -1993

Üye Olunan Bilimsel Kuruluşlar:

: Tıbbi Genetik Derneği