

**T. C.
İSTANBUL BİLİM ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**

**MİDE KANSER HASTALARINDA EGFR EKSPRESYONU VE
K-RAS MUTASYONLARININ PROGNOSTİK
VE PREDİKTİF ÖNEMİ**

Biyolog Seher Şule YILDIRIM

YÜKSEK LİSANS TEZİ



İSTANBUL, 2010

**T. C.
İSTANBUL BİLİM ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**

**MİDE KANSER HASTALARINDA EGFR EKSPRESYONU VE
K-RAS MUTASYONLARININ PROGNOSTİK
VE PREDİKTİF ÖNEMİ**

Biyolog Seher Şule YILDIRIM

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Tuncay ALTUĞ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İSTANBUL, 2010

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

1. ÖZET.....	1
2. SUMMARY.....	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ.....	3
4. GENEL BİLGİLER.....	4
4.1. KANSERİN MOLEKÜLER GENETİK TEMELLERİ.....	4
4.1.1. Onkogen Aktivasyonu.....	4
4.1.2. Ras.....	5
4.1.3. K-ras.....	7
4.2. BÜYÜME FAKTÖRLERİ.....	7
4.2.1. EGFR (Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü).....	8
4.2.2. EGFR Sinyal Yolları.....	9
4.2.3. EGFR Degradasyonu.....	10
4.2.4. Hücrel İşlevlerin EGFR ile Kontrolü.....	10
4.3. EGFR VE RAS İLE İLİŞKİLİ SİNYAL YOLU: RAS/MİTOJENLE AKTİVE PROTEİN KİNAZ (MAPK).....	11
4.4. MİDE KANSERİ.....	12
4.4.1. Epidemiyoloji, Patoloji ve Risk Faktörleri.....	12
4.4.2. Evreleme ve Prognoz.....	13
4.4.3. Klinik Belirtiler.....	15
4.4.4. Teşhis.....	15
4.4.5. Tedavi.....	16
4.4.5.1. Hedefe Yönelik İlaçlar.....	16
4.4.5.1.1. Monoklonal Antikorlar.....	17
4.4.5.1.2. Küçük Moleküler Ağırlıklı Tirozin Kinaz İnhibitörleri.....	17
5. MATERYAL VE METOD.....	18
5.1. KULLANILAN KİMYASAL MADDELER VE ÇÖZELTİLER.....	18
5.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	18

5.1.2. Kullanılan Çözeltiler.....	19
5.2. ÇALIŞMA GRUBU.....	20
5.3. KULLANILAN İNCELEME YÖNTEMLERİ.....	22
5.3.1. Parafin Doku Örneklerinin Seçilmesi ve Saklama Koşulları.....	22
5.4. EGFR EKSPRESYONU İLE İLGİLİ YÖNTEMLER.....	22
5.4.1. İmmünohistokimya Yöntemi.....	22
5.5. K-RAS KODON 12 MUTASYONU VE K-RAS KODON 13 MUTASYONLARININ TESPİTİ İLE İLGİLİ YÖNTEMLER.....	23
5.5.1. DNA İzolasyonu.....	23
5.5.2. DNA Miktarının Ölçülmesi.....	24
5.5.3. Primerlerin Hazırlanması.....	24
5.5.4. K-ras kodon 12 Mutajenik Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Çoğaltılması.....	25
5.5.5. K-ras kodon 13 Mutajenik Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Çoğaltılması.....	26
5.5.6. Mutajenik PZR Koşulları.....	27
5.5.7. Mutajenik PZR Ürünlerinin Yatay Jel Elektroforezinde Görüntülenmesi.....	28
5.5.8. Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizm (RFLP) Analizi.....	29
5.5.9. İstatiksel Analiz.....	29
6. BULGULAR.....	30
6.1. İMMÜNOHİSTOKİMYA SONUÇLARI.....	31
6.2. MUTAJENİK PZR-RFLP SONUÇLARI.....	33
6.3.İMMÜNOHİSTOKİMYA VE MUTAJENİK PZR-RFLP SONUÇLARININ KARŞILAŞTIRILMASI.....	38
7. TARTIŞMA.....	39
8. SONUÇ.....	46
9. TEŞEKKÜR.....	47
10. KAYNAKLAR.....	48

SİMGE VE KISALTMALAR

bç	: Baz çifti
C	: Sitozin
C°	: Santigrat
Dk	: Dakika
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dNTP	: Deoksiribonükleozid trifosfat
EDTA	: Etilen diamin tetra asetik asit
EGF	: Epidermal büyüme faktörü
EGFR	: Epidermal büyüme faktörü reseptörü
ERK	: Hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz
EtBr	: Etidiyum bromid
G	: Guanin
kDa	: KiloDalton
MAPK	: Mitojenle aktive protein kinaz
MgCl₂	: Magnezyum klorür
ml	: Mililitre
MoAb	: Monoklonal Antikor
OD	: Optik dansite
PBS	: Fosfat tampon solüsyonu
PI3-K	: Fosfotidilinositol-3-kinaz
PZR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
RFLP	: Restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi
rpm	: Revolutions per minute
SD	: Standart sapma
sn	: Saniye
SNP	: Tek nükleotit polimorfizmi
SSCP	: Tek zincir konformasyonel polimorfizm
STAT	: Transkripsiyonun sinyal ileticileri ve aktive edicileri
TAE	: Trisasetik asit
TBS	: Tris tampon solüsyonu

UV	: Ultraviyole
V	: Volt
wt	: Yabani, doğal tip
β	: Beta
μl	: Mikrolitre
μM	: Mikromolar

T.C. İstanbul Bilim Üniversitesi Tıp Fakültesi Yerel Etik Kurulu tarafından alınan 25.03.2009 tarih ve 2009/04-04 nolu karar ile onaylanmıştır.

Araştırma Projesi Numarası: TBG/0352008

1. ÖZET

Epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR), tirozin kinaz ailesinin bir üyesi olup karsinogenezis boyunca genel olarak hücre proliferasyonundan sorumlu olduğu düşünülmektedir. Plazma zarından sinyal geçişinin düzenlenmesinde görev yapan RAS gen ailesinin üyesi olan K-ras proto-onkogeni nokta mutasyonları karsinogeneziste önemli rol oynamaktadır. K-ras mutasyonları pankreas, akciğer, kolon ve mide kanserinde yaygındır. K-ras mutasyonları çoğunlukla kodon 12 ve 13, nadiren kodon 61’de ortaya çıkmaktadır.

Bu çalışmada mide kanser hastalarında EGFR ekspresyonu ve K-ras mutasyonlarının prognostik ve prediktif önemi araştırıldı. Çalışma grubu, 1995-2008 yılları arasında Çağlayan Florence Nightingale Hastanesi Medikal Onkoloji ve İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Patoloji Ana Bilim Dalı’nda takip ve tedavi edilen, parafin blok ve lamaları bulunabilen 62 mide kanseri hastasından oluşturuldu. Bu hastaların demografik ve patolojik özellikleri, sağkalım süreleri Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Patoloji Ana Bilim Dalı arşivlerinden elde edildi. 62 hastanın parafine gömülü mide dokularından kesitler alındı ve immünohistokimya metodu ile hastaların EGFR ekspresyonu (–) ve (+) olanlar belirlendi. EGFR pozitif hastalardan alınan parafin doku örneklerinden DNA izole edildi ve K-ras onkogeni kodon 12 ve 13 nokta mutasyonlarının varlığına mutajenik polimeraz zincir reaksiyonu (mutajenik PZR) ve restriksiyon uzunluk parça polimorfizmi (RFLP) metodu ile bakıldı.

62 mide kanseri hastasında EGFR ekspresyonu (+) olan 48 (%77.42) hastanın K-ras geni kodon 12’ye ait GG, GC ve CC genotip frekansları sırasıyla; %93.62, %6.38 ve %0; K-ras geni kodon 13’e ait CC, CG, GG genotip frekansları sırasıyla; %74.07, %25.93 ve %0 olarak bulundu.

Monoklonal bir antikör olan Cetuximab, K-ras *yabanıl tip* kolorektal kanser hastalarının birinci basamak tedavisinde yeni bir tedavi seçeneği olmuştur. Daha önce yapılan çalışmalarda, K-ras polimorfizm için *yabanıl tip* allel taşıyan hastaların Cetuximab ilacına iyi cevap verdiği ve proliferasyonu engellediğini bilmekteyiz, bizim hasta grubumuzda da yüksek oranda bu genotipler görülmektedir. Bu tip polimorfizm çalışmalarının kanserde özellikle bireysel ilaç tedavilerinde yarar sağlayacağı kanısındayız.

Anahtar Kelimeler: EGFR, K-ras, mide kanseri, cetuximab, mutajenik PCR.

2. SUMMARY

Epidermal growth factor receptor (EGFR), a member of the tyrosine kinase family in general, is thought to be responsible for cell proliferation and for carcinogenesis. Signal transitions in the regulation of plasma membrane serves as a member of the RAS gene family of K-ras proto-oncogenes play an important role carcinogenesis through point mutations. K-ras mutations in pancreatic, lung, colon and stomach cancer is common. K-ras mutations at codon 12 and 13 mostly, rarely occurs at codon 61.

In this study, EGFR expression in gastric cancer patients and their prognostic and predictive importance of K-ras mutations were investigated. Working group between the years 1995 to 2008 Çağlayan Florence Nightingale Hospital Medical Oncology and Istanbul University Faculty of Medicine, Department of Pathology and treated in the follow-up, paraffin blocks and slides may have consisted of 62 gastric cancer patients. 62 patients were included in paraffin embedded sections from gastric tissue of patients with EGFR expression and the immunohistochemistry method (-) and (+) those determined. EGFR positive patients, DNA obtained from paraffin embedded tissue samples and K-ras oncogenes were isolated mutations in codons 12 and 13 points to the existence of the mutagenic polymerase chain reaction (mutagenic PCR) and restriction fragment length polymorphism (RFLP) method was evaluated.

EGFR expression in 62 gastric cancer patients (+) the 48 (77.42%) patients of the K-ras gene codon 12 GG, GC and CC genotype frequencies were: 93.62%, 6.38% and 0% K-ras gene codon 13 of the CC, CG, GG genotype frequencies were: 74.07%, 25.93% and 0% respectively.

Cetuximab is a monoclonal antibody, K-ras wild type first-line treatment of colorectal cancer patients has become a new treatment option. In previous studies, K-ras polymorphism in patients with the wild type allele of the drug Cetuximab and respond well to prevent proliferation are aware that our patients in our group are also higher on these genotypes. This type of polymorphism studies in cancer drug therapy, especially in individuals believe would benefit.

Key Words: EGFR, K-ras, gastric cancer, cetuximab, mutagenic PCR.

3. GİRİŞ VE AMAÇ

Mide kanseri, tüm dünyada önemli bir morbite ve mortalite nedenidir. Mide kanseri dünyada yaklaşık her yıl 870.000 yeni vaka ve 650.000 ölüm ile akciğer kanserinden sonra en önemli ikinci kanser türüdür (1). GLOBOCAN 2002 verilerine göre ülkemizde mide kanseri tüm kanserler arasında insidans açısından erkeklerde ikinci, kadınlardaysa üçüncü sırada yer almaktadır. İnsidans erkeklerde yüzbinde 9,6, kadınlarda yüzbinde 5,7 olarak bildirilmektedir (1-3). Dünyada mide kanserinin görülme sıklığı erkeklerde kadınlardan yaklaşık iki kat daha fazladır (1). Ortalama teşhis yaşı 56'dır. Batı toplumlarında en sık 70'li yaşlarda görülmesine karşın ülkemizde ortalama yaş 10 yıl daha gençtir (4, 5).

Mide kanseri çevresel faktörler, beslenme alışkanlıkları ve genetik faktörler gibi çeşitli etmenlerin rol oynadığı kompleks bir hastalıktır. Patogenezi tam olarak aydınlatılmamıştır. Son yıllarda moleküler onkolojideki gelişmeler sonucu normal hücreden tümör hücresine dönüşümü ve tümör hücresinin karakteristik özellikleri gittikçe daha iyi anlaşılmaktadır. Kanserleşme sürecinde rolü olduğu düşünülen moleküllerden ikisi, epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) ve K-ras'tır.

Sağlıklı bir hücrenin proliferasyonu ve sağkalımı için hücre dışından gelen uyarılara gereksinim vardır. Büyüme faktörlerinin hücre yüzeyindeki reseptörlere bağlanarak ilişkili sinyal iletim ağlarını uyarması bu bilgi iletimini sağlayan temel mekanizmalardan biridir. EGFR (erbB-1, HER) erbB veya HER olarak bilinen reseptör tirozin kinaz ailesinin bir üyesidir. Bu ailenin diğer üç reseptörü HER2 (c-neu, erbB2), erbB-3 (HER3) ve erbB-4 (HER4)' tür. EGFR normal dokuların gelişimi ve homeostazında da rol alır (6).

Hücre büyüme sürecinde bir moleküler anahtar olarak işlev gören, plazma zarından sinyal geçişinin düzenlenmesinde görev yapan ve guanosin nükleosidlerini bağlama yeteneğinde olan G proteinlerinden ras gen ailesinin birbiriyle yakından ilişkili üç üyesi; H-ras, K-ras ve N-ras insan tümörlerinde en sık görülen onkogenlerdir. Tüm insan tümörlerinin yaklaşık %15-20'si, epitelyal kanserlerin %25'i hücre proliferasyonunu teşvik eden mutant RAS proteinleri taşır. Ras onkogeninde 12. ve 13. kodonlarda gerçekleşen amino asit değişiklikleri sık görülür ve bu ras mutasyonlarının %90'ı K-ras'ta ortaya çıkar.

Bu çalışmanın amacı, mide kanser hastalarında EGFR ekspresyonunun ve K-ras mutasyonunun prognostik ve prediktif önemini araştırmaktır.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. KANSERİN MOLEKÜLER GENETİK TEMELLERİ

Kanser, normal hücrelerin malign dönüşüme uğraması, uzun bir zaman süreci içinde genetik materyalin mutasyonlar etkisi ile hasara uğraması sonucu oluşur.

Malign dönüşüme yol açan mutasyonlar etkiledikleri hücresel mekanizmalara göre şöyle sınıflanabilir;

- Büyüme ve hücre çoğalmasını uyarıcı proto-onkogenlerin aktivasyonu
- Hücre çoğalmasını denetleyen tümör baskılayıcı genlerin inaktive olması
- Programlanmış hücre ölümü, apoptozisin engellenmesi
- DNA onarım enzimlerinin inaktivasyonu

Karsinogenezis, bu yaşamsal hücresel yönetim ve denetim mekanizmalarının birer birer devre dışı kalması sonucu kontrolsüz hücre çoğalması, çevre dokuların invazyonu ve uzak organlara metastaz sürecini kapsar (7).

4.1.1. Onkogen Aktivasyonu

Onkogenler, hücre çoğalmasını yöneten proto-onkogenlerin fizyolojik gereksinimlerin ötesinde proliferasyon uyarıları doğuracak şekilde mutasyona uğramaları ile aktive olurlar. Protoonkogenler onkogenlere 3 mekanizmadan biri ile dönüşebilir. Bunlar; nokta mutasyonları, kromozomal yeniden düzenlenmeler ve gen amplifikasyonlarıdır. Özellikle nokta mutasyonlar bir protoonkogenin aktif bir onkogene dönüşmesinde, dolayısı ile kanser gelişiminde önemli bir rol oynamaktadır (8).

Onkogenler, hücre çoğalmasını uyarıcı büyüme faktörlerinin hücre membranı üzerindeki reseptörlerine bağlanmasından nükleus içinde hücre bölünmesi ile ilgili genetik materyalin transkripsiyonuna değin tüm aşamaları etkileyen proteinleri kodlarlar (7).

4.1.2. Ras

Birçok onkogen, onkogen ürünlerinde tek bir aminoasidin yer değiştirmesi sonucu oluşan nokta mutasyonu ile proto-onkogenlerden farklılaşır. Bu şekildeki nokta mutasyonlara önemli bir örnek, ras onkogenlerinde tanımlanmıştır.

Ras onkogeni normal hücrelerde bulunmayıp, daha çok tümör gelişimi sırasında meydana gelen mutasyonlarla sonuçlanan tümör hücrelerinde oluşur. Ras onkogenleri, kritik noktalarda tek aminoasit değişimleriyle sonuçlanan nokta mutasyonu ile proto-onkogenlerden köken alır. İnsan tümörlerinde, ras onkogeninde 12. 13. ve 61. kodonlarda gerçekleşen amino asit değişiklikleri sık görülür (9).

Ras gen ailesinin birbiriyle yakından ilişkili üç üyesi; H-ras, K-ras ve N-ras insan tümörlerinde en sık görülen onkogenlerdir (10). Mutasyonların sıklığı üç ras genine muntazam olarak dağılmamıştır. İlk olarak H-ras gen mutasyonları keşfedilmiş olsa da daha sonra yapılan yoğun çalışmalar K-ras ve N-ras mutasyonlarının insan kanserlerinde daha sık görüldüğünü ortaya çıkarmıştır (11). Özellikle K-ras geni mutasyonları diğer ras genlerine (N-ras ve H-ras) oranla daha sık görülmektedir (12).

Üç ras genini kodlayan proteinler güçlü amino asit benzerliği (%90) gösterirler. H-ras, N-ras ve K-ras (4A ve 4B izoform)'ın biyokimyasal ve biyolojik özelliklerinin temel olarak özdeş olduğu var sayılmaktadır (11).

Tüm ras genleri farklı kromozomlar üzerinde lokalize olmasına rağmen tümü 21 kilo daltonluk (kDa) (p21) bir protein kodlamaktadır ve ras proteinleri G proteinleri ailesinden olup guanosin nükleotidlerini bağlama yeteneğindedir (13). 189 amino asitlik bir protein kodlayan ras gen ailesi, plazma zarından sinyal geçişinin düzenlenmesinde görev yapar. Hücre büyüme sürecinde bir moleküler anahtar olarak işlev gören normal ras proteini, değişken açma-kapama durumları oluşturur. Bazı durumlarda mutant ras proteini açık pozisyona (çalışır konum) gelir ve bu durumda hücre büyümesini teşvik eder (14).

Ras proteinlerinin biyolojik aktivasyonu için lipid modifikasyonu ve plazma membranına kuvvetli bağlanması gerekmektedir. Ras proteinleri başlangıçta inaktif sitoplazmik protein olarak sentezlenir. Daha sonra bir dizi posttranslasyonel modifikasyona uğrayarak plazma membranının iç yüzeyine transloke edilirler (11, 15).

Ras protoonkogenleri normal proteinin aşırı ekspresyonu veya gen proteinini kodlayan zincirdeki nokta mutasyonu sonucunda ortaya çıkar (16).

Ras proto-onkogeni solid tümörlerde en sık mutasyona uğrayan genlerden biridir. Tüm insan tümörlerinin yaklaşık %15-20'si mutant RAS proteinleri taşımaktadır (7). Hücre yüzeyinden mitojenik sinyalleri ras-raf-MAPK yoluna aktarmada kilit bir rol oynayan ras proteini epitelial kanserlerin %25'inde mutasyona uğrar ve proliferasyon hızının önemli ölçüde artmasına neden olur (17, 18).

Hücre dışından kaynaklanan büyüme ve çoğalma uyaranları ilgili reseptörlerine bağlandıktan sonra hücre içinde ikincil mesajcılar (second messenger) vasıtası ile uyarıyı nukleusa iletirler. Bu ikincil araçların harekete geçirilmesinde ras proto-onkogeni önemli bir rol oynar.

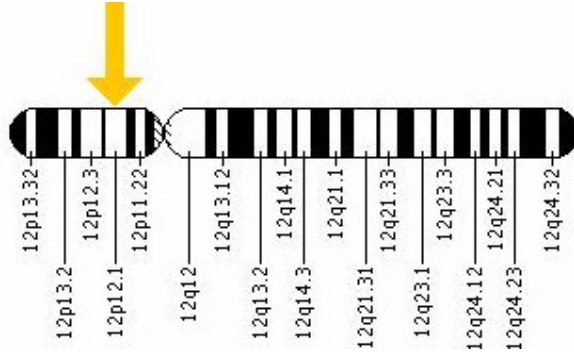
Ras onkoproteini guanosin trifosfat-bağlayan proteinler ailesinin önde gelen bir üyesidir. Plazma membranının hemen altında EGFR'lerinin intrasitoplazmik bölümlerine komşu olarak yer alır. GDP (guanozin difosfat) bağlı iken inaktif olan ras, EGF uyarısı ile GTP'ye bağlanır ve aktif hale geçer. Böylece ras bir yandan nukleusa doğru mitojenik uyarıyı iletecek sinyal silsilesini başlatırken bir yandan da intrinsik GTPaz aktivitesi ile GTP'den disosiyasyon olur ve yeniden GDP bağlayarak inaktif hale geçer. Böylece mitojenik uyarı da sınırlandırılmış olur. Mutant ras proteinleri sıklıkla GTPaz fonksiyonları güdük kalmış proteinlerdir ve bu nedenle ya dış uyarı almaksızın aktive olur (konstitüsyonel aktivasyon) veya daha uzun süreli sinyalizasyona neden olurlar. Her iki koşulda da hızlanmış hücre proliferasyonu söz konusudur. Hızlı hücre bölünmesi aynı zamanda replikasyon hatalarının düzeltilmesine daha az zaman tanıdığı için genomik istikrarsızlığa da neden olarak mutasyonların oluşmasını da kolaylaştırır (7).

Ras proteinlerinin aktivasyon ve inaktivasyonunu tetikleyen GNRP ve GAP'ler reseptör tirozin kinazlar ile kontrol edilmektedir. Aktive olan ras, MAP kinaz uyarımını sağlamaktadır. MAP kinazlar uyarıldığında hücrede çeşitli proteinlerin fosforilasyonu sinyalini nakledebilir (15). Bunlar içinde gen düzenleyici proteinler ve diğer protein kinazlar bulunmaktadır. Gerek jun proteininin direkt fosforilasyonu ve gerekse SRF Elk-1 kompleks proteininin fosforilasyonu ile dolaylı olarak fos geninin transkripsiyonel aktivasyonu hücreyi proliferasyona sürüklemektedir (11, 15).

4.1.3. K-ras

İnsan kanserlerindeki ras mutasyonlarının %90'ı K-ras'da ortaya çıkar (16). K-ras mutasyonlarının çoğu kodon 12, 13, 59 ve 61'de tanımlanmıştır (19). Tüm çalışmaların birleştiği nokta; 12. kodondaki K-ras mutasyonunun en sık adenokanserlerde olmasıdır (16).

K-ras 12. kromozomun kısa kolu üzerinde (12p12.1) hücre membranı ve sitoplazma yerleşimli olan ve intraselüler sinyal iletiminde rol oynayan bir proto-onkogendir (Şekil 1) (20). K-ras onkogeni 21 kilo daltonluk bir protein kodlamakta ve intrinsik GTPaz aktivitesi göstermektedir (21). 2 izoformu (4A ve 4B izoform) bulunmaktadır. Dört ekzon içeren K-ras geninde dördüncü ekzon alternatif olarak kırılırken, 4A ekzonlu transkript 189 amino asit; 4B transkript ise 188 amino asitli bir protein üretmektedir (13). Bunlar arasındaki fark karboksil uçtaki 25 amino asittir. Bu transkriptlerden 4B varyantı 10-20 kat daha fazla eksprese edilmektedir (11).



Şekil 1: K-ras Geninin Kromozomal Lokalizasyonu (22).

4.2. BÜYÜME FAKTÖRLERİ

Bazı protoonkogenler büyüme faktörlerini, bazı onkogenler büyüme faktörü reseptörlerini kodlarlar. Mutasyonlar ve reseptör genlerinin aşırı ekspresyonları malign transformasyonla ilişkili bulunmuştur.

Büyüme faktörleri hücre çoğalması ve diferansiyasyonunu uyaran polipeptid yapısında moleküllerdir. Hücre yüzeyinde yer alan spesifik reseptörleri uyarak etki gösterirler. Kanser

gelişiminde birçok büyüme faktörü ve reseptörlerinde regülasyon bozukluğu kanserli hücrelerin kontrolsüz çoğalmasında önemli rol oynamaktadır.

Her büyüme faktörünün özel bir hücre-yüzey reseptörü vardır. Reseptöre bağlanma hücre bölünmesini başlatır (yada bazen durdurur).

Büyüme faktörlerinin reseptörleri üç ana grupta toplanır:

- Faktöre özel iyon kanalları (ligand-gated ion channels)
- GTPaz ilişkili reseptörler
- Protein kinaz ilişkili reseptörler (7).

Büyüme faktörü reseptörü, hücre dışında büyüme faktörüne bağlanarak aktive olur. Aktive olan reseptör bu kez bir protein substratı aktive eder.

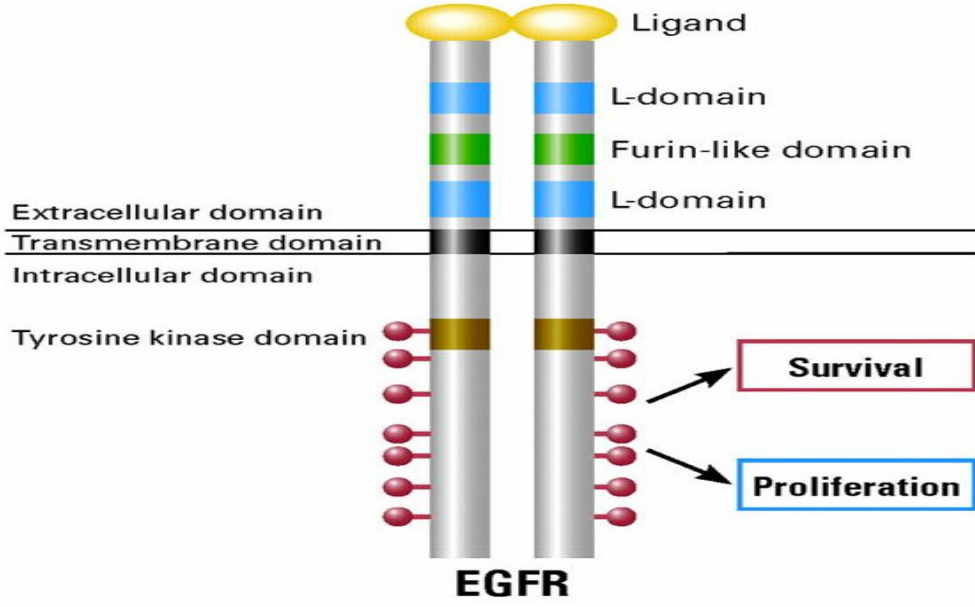
Ras proteinleri sinyal ileticisi olarak önemli rol oynarlar. Büyüme faktörünün bağlanması, reseptöre bağlı GDP'nin (guanozin difosfat) GTP'ye (guanozin trifosfat) değişmesini uyararak Ras proteinini aktive eder ve hücre bölünmesini başlatacak, kısa zamanla sınırlı bir sinyali tetikler. Sinyal, GTP'yi GDP'ye çeviren bir GTP az aktive eden enzim (GAP) tarafından Ras'ın inaktivasyonu ile sonlanır. Ras proteinin yada GAP'ın mutasyonu, hücre uyarıcı sinyalin zaman kısıtlanmasını kaldırarak, kontrolsüz hücre bölünmesine neden olur ve tümöre yol açabilir.

4.2.1. EGFR (Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü)

Hücre membran reseptörü olan EGFR ailesi; EGFR, HER2, HER3 ve HER4'den oluşur. EGFR, tirozin kinaz aktivitesine sahiptir.

Epidermal büyüme faktörü (EGF) 1962'de, EGFR ise 1980'de keşfedilmiştir (23, 24). Stanley Cohen bu çabalarından ötürü 1986 yılında Nobel Fizyoloji ve Tıp ödülünü almıştır. Kanserle ilişkili bulunan ilk hücre yüzeyi reseptörü EGFR'dür (25).

EGFR, kararlılığı sağlayan sisteince zengin iki hücre dışı ligand bağlama domeyni; bir transmembran domeyni; zara bitişik kısa bir bölüm ve hücre içi işlevde önemli olan tirozin kinaz domeyninden ibarettir (Şekil 2). EGFR 1186 amino asitten oluşan 170 kd ağırlığında transmembran bir glikoproteindir. Reseptörler inaktif monomer şeklinde hücre membranında bulunurken ligand bağlanmasının ardından başka bir EGFR ile (homodimerizasyon) ya da EGFR ailesinden başka bir reseptörle (heterodimerizasyon) dimerize olarak aktive olurlar (27).



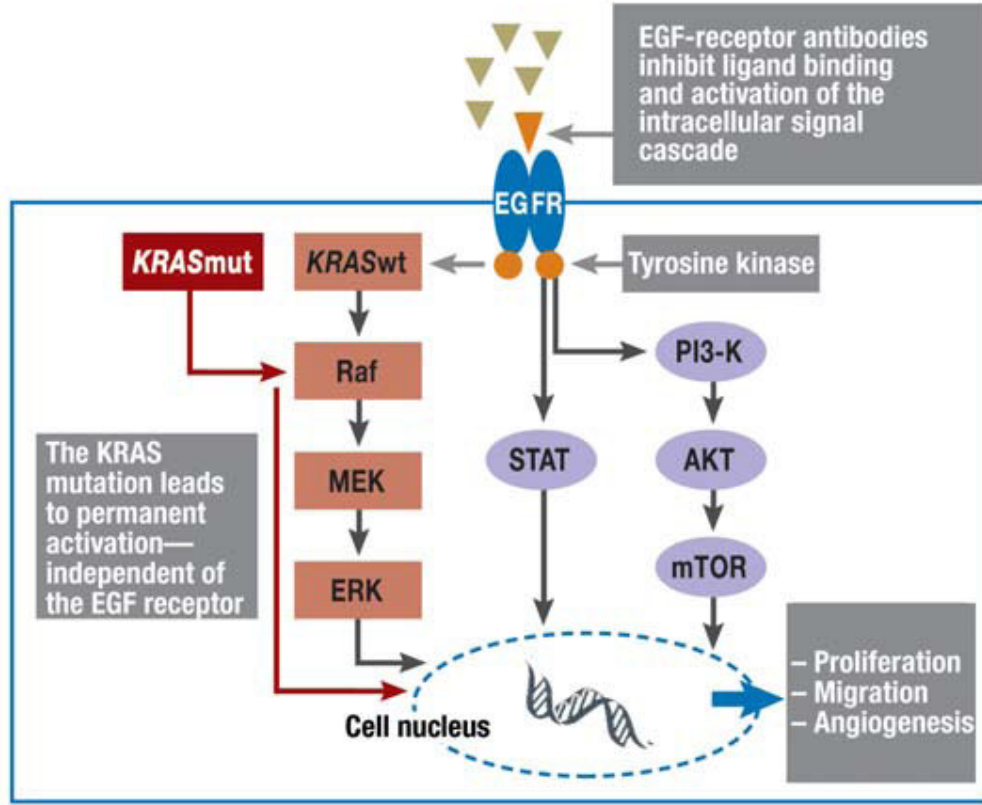
Şekil 2: EGFR'nün Yapısı (26).

Kanser hücrelerinin proliferasyonu, metastaz yeteneği kazanması ve sağkalımı için EGFR'nün tirozin kinaz aktivitesi göstererek ilişkili downstream sinyal iletim ağlarını aktive etmesi temel unsurlardan biridir.

EGFR kolon, akciğer ve baş-boyun kanserlerinde aşırı ekspresyona uğramaktadır (28).

4.2.2. EGFR Sinyal Yolları

EGFR kompleksi sinyal transdüksiyon ağı, ras/mitojenle aktive protein kinaz (MAPK), fosfotidilinositol-3-kinaz (PI3-K)/ Akt ve STAT yollarını içerir (Şekil 3) (30).



Şekil 3: EGFR Fonksiyonları ve Tedavi Hedefleri (29).

4.2.3. EGFR Degrasyonu

Ligandın bağlanmasından sonraki iki saat içinde reseptörlerin %80'i hücre yüzeyinde saptanamaz, ligandın ayrılmasından 9 saat sonra reseptör düzeyleri normale döner. Çukurlaşma ya da vezikül gibi çeşitli yollarla EGFR-ligand kompleksi hızla hücre içine alınır ve burada ya degrade olur ya da hücre yüzeyine geri dönerler (31, 32).

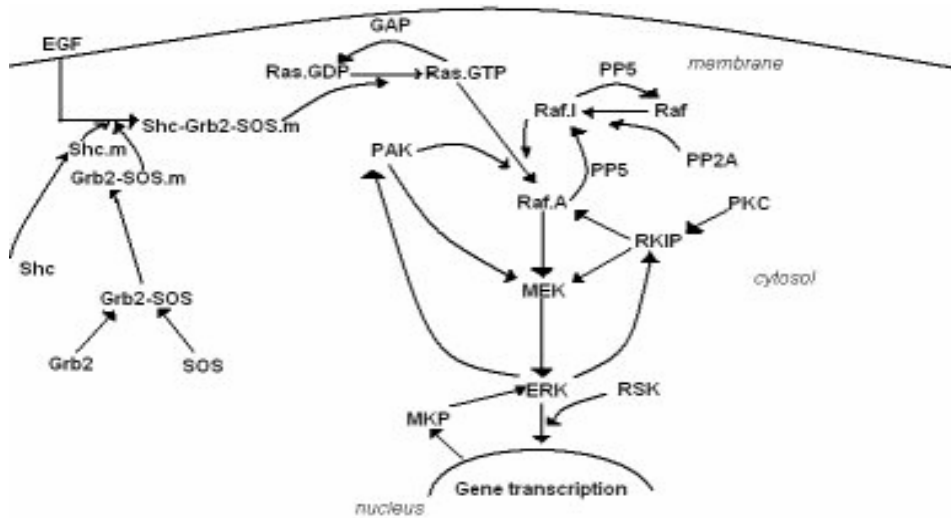
4.2.4. Hücresel İşlevlerin EGFR ile Kontrolü

Hücre bölünmesi ve proliferasyonunda EGFR sinyalinin önemli rolü vardır. Hücrenin sağkalımında (apoptozdan korunma), diferansiyasyonunda, anjiyogeneziste, hücrenin migrasyonunda ve metastazda rolü vardır (30).

Birçok epitelyal tümör hücre yüzeyi, artmış sayıda EGFR (epidermal büyüme faktörü reseptörü) içerir. Anti-EGFR etkili monoklonal antikorların hem normal hem malign kolon epitel hücreleri üzerine inhibitör etkisi gösterilmiştir.

4.3. EGFR VE RAS İLE İLİŞKİLİ SİNYAL YOLU: RAS/MİTOJENLE AKTİVE PROTEİN KİNAZ (MAPK)

Ras proteinleri, mitojenik sinyal yolunda büyüme faktörü reseptörlerini, Raf protein-serin/treonin kinazların aktivasyonuna bağlayan anahtar rolü üstlenirler. Bu işlem ERK MAP kinazların aktifleşmesiyle sonuçlanan protein kinaz kaskadını başlatır. Ras proto-onkogenini onkogene dönüştüren mutasyonlar, sürekli Ras aktivitesine yol açarak ERK sinyal yolunu aktifleştirir. Raf geni de benzer şekilde, Raf proteinin amino ucundaki düzenleyici bölgenin ortadan kalkmasına yol açan delesyonlarla onkogene dönüşür. Bu delesyonlar Raf protein kinazın kontrolsüz aktivitesine, bu aktivite de sürekli ERK faaliyet artışına neden olur. ERK sinyal yolu, transkripsiyon faktörlerinin fosforillenmesi ve gen ekspresyonunda değişikliklerle sonuçlanır (Şekil 4).



Şekil 4: Ras/Mitojenle Aktive Protein Kinaz (MAPK) Yolağı (33).

4.4. MİDE KANSERİ

Mide kanseri dünyada yaygın olarak görülen ve biyolojik olarak agresif tavırlı bir tümördür. Tedavide beklenen yenilikler ancak tümörlerin biyolojisinin daha iyi anlaşılması sayesinde gerçekleşebilecektir. Son 10 yıl içinde ortaya çıkan gelişmeler bugün gerek tanı ve sınıflama, gerekse tedavi seçimi açısından uygulama alanları bulmaktadır.

Mide kanseri daha çok çevresel etkenler ve beslenme alışkanlıkları ile ilişkili bulunmakla birlikte bazı ailelerde kalıtsal yatkınlık bildirilmiş, bu ailelerdeki kusurlu genin çevresel faktörlerden de etkilenerek mutasyona uğrayabildiği ileri sürülmüştür.

4.4.1. Epidemiyoloji, Patoloji ve Risk Faktörleri

Yaklaşık 10 yıldır mide kanseri insidansı ve mortalitesinin azalmasına rağmen dünyada hala en çok rastlanan dördüncü ve en çok ölüme sebep olan ikinci kanser türüdür. İnsidans özellikle Doğu Asya, Doğu Avrupa, Orta ve Güney Amerika'da yüksektir ve erkeklerde kadınlardan yaklaşık iki kat daha fazladır (34, 35).

Mide kanseri Türkiye'de toplumun önemli bir sağlık problemidir. Türkiye'de mide kanseri insidansı dünyanın doğusundan fazla, batısından azdır (1, 2). Erkeklerde akciğer kanserinden sonra 9.6/100.000 ile ikinci ve kadınlarda meme ve kolon kanserinden sonra 5.7/100.000 ile üçüncü sıradadır (1, 3). Mide kanseri erkeklerde 5.84/100.000 ile akciğer kanserinden sonra kanser ölümlerine sebep olan ikinci, kadınlarda 3.7/100.000 ile akciğer ve meme kanserinden sonra üçüncü kanser türüdür. Dünyada mide kanserinde erkek/kadın insidans ortalaması 2/1'dir (1). Ortalama teşhis yaşı 56'dır (36). Batı toplumlarında en sık 70'li yaşlarda görülmesine karşın ülkemizde 60'lı yaşlardır (4, 37).

Türkiye'de mide kanserinin yüksek oranda olması bölgeler arasındaki etyolojik ve epidemiyolojik farklılıklardan kaynaklanır (38, 39). Etyolojide rol oynayan en önemli faktör beslenmedir. Özellikle tuzlanmış ve tütsülenmiş yiyeceklerin, içerdikleri nitrozaminler sayesinde kanser oluşumunu indüklediği gösterilmiştir (4, 37).

Mide kanseri için belirlenen en önemli risk faktörleri *Helicobacter pylori* infeksiyonu, cinsiyet olarak erkek, ailede mide kanseri hikayesi ve sigaradır (34). Mesleki olarak nikel maruz kalınması riski artırır. A grubu kan taşıyıcılarında, mide rezeksiyonu geçirenlerde ve

pernisiyöz anemide de mide kanseri riski artmaktadır (4, 37). Düşük sosyoekonomik düzeydeki topluluklarda mide kanseri riski yüksek düzeydekilere göre daha fazladır (38, 39).

Mide kanserlerinin %90'ından fazlası adenokarsinomlardır ve geriye kalan kısmı lenfomalar ve sarkomalardır (34).

Türkiye'de mide kanserlerinin %15'inden daha azını kardiyak tümörleri oluşturur (40).

Türkiye'de tüm mide kanserlerinin sadece %2.6-3.6'sı erken mide kanseri iken Japonya'da oran %46-50, İngiltere'de %18 ve Kore'de %16.4'tür (40).

4.4.2. Evreleme ve Prognoz

Mide kanserlerinde hastalığın evresi, tümörün derinliği, bölgesel lenf nodlarına yayılımı ve metastaz varlığı prognozu etkileyen faktörlerdir. Erken evrelerde prognoz oldukça iyidir. Günümüzde hastaların çoğunun tanı konulduğunda III. ve IV. evrelerde olması prognozu kötü yönde etkilemektedir. İnfiltrasyona uğrayan seroza alanının genişlemesi ve lenf bezi sayısının artması prognozun kötüleşmesine yol açar.

Hastalığın klinik ve patolojik evrelemede TNM sistemi kullanılmaktadır (4, 37).

Buna göre mide kanseri 4 evreye ayrılır:

Evre I: Tümör mukoza, submukoza, mükösis ya da serozayı tutmuş olabilir. Bölgesel lenf bezi tutulumu yoktur. T1 NO MO, T2 NO MO, T3 NO MO

Evre II: Mide duvarı yaygın olarak tutulmuş ya da mide duvarının herhangi bir derecedeki tutulumu yanında perigastrik lenf bezlerinde metastaz vardır. T4 NO MO, Tx N1 MO

Evre III: Mide duvarının herhangi bir tabakasında tutulumla birlikte primer tümöre 3 cm' den daha uzaktaki lenf bezleri de tutulmuştur. Tx N2 MO

Evre IV: Uzak metastazlar vardır. Tx Nx M1

T	Tümör derinliğini gösterir.
T1	Tümör mukoza-submukozayı tutmuştur.
T2	Tümör mürskularis propriayı tutmuştur. Serozaya varmış olabilir, ancak invaze etmemiştir.
T3	Tümör serozayı infiltre etmiştir. Komşu organ ve dokuları tutmamıştır.
T4	Mide duvarı yaygın olarak tutulmuştur ya da komşu organ ve dokularda invazyon vardır.
N	Lenf bezlerinin durumunu gösterir.
N0	Lenf bezlerinde metastaz yoktur.
N1	Büyük ya da küçük kurvatür boyunca lezyona en çok 3 cm uzaklıktaki perigastrik lenf bezleri tutulmuştur.
N2	Primer tümöre 3 cm' den daha uzaktaki bölgesel lenf bezleri tutulmuştur. Ancak, bu lenf bezleri ameliyatla çıkarılabilir niteliktedir. Lokalizasyonları sol gastrik, splenik, çölyak ve ana hepatik arter çevresidir.
N3	Diğer karın içi lenf bezleri tutulmuştur. Bu bezlerin tümü ameliyat sırasında çıkarılmamaktadır. Başlıcaları hepatoduodenal, retropankreatik ve üst mezenterik arter çevresi lenf bezleridir.
M	Uzak metastazları temsil eder.
M0	Uzak metastaz yok.
M1	Uzak metastaz var anlamına gelir. Bölgesel lenf bezlerinin ötesindeki lenf bezleri metastazları da uzak metastaz sayılır.

Tablo 1: Mide Kanserlerinin TNM Evrelenmesi

Evreleme öncelikle klinik olarak yapılır. Operasyondan sonra elde edilen materyalle patolojik evreleme yapılır.

Tüm evreler dahil hastalığın 5 yıl yaşam şansı %20 civarındadır (37, 38). 5 yıllık sağkalım oranları evre 1'de %78, evre 2'de %42, evre 3'te %35'tir (41).

EGF ile reseptörünün birlikte ekspresyonunun klinik evre, invazyon ve prognoz ile ilişkili olduğu ileri sürülmüştür.

Mide tümörlerinde EGFR aşırı ekspresyonu %20-50 oranında gözlenirken bu gözlemin daha çok hastalığın ileri evrelerinde gerçekleştiği ve anöploidi, proliferasyon hızı ve lenf tutulumu ile bağlantılı olduğu ve kötü prognoz işareti olarak değerlendirildiği bildirilmektedir.

K-ras mutasyonu, küratif rezeksiyon şansı olmasına rağmen kötü prognoz göstergesidir.

4.4.3. Klinik Belirtiler

Mide kanserinin en sık rastlanan belirtileri epigastrik ağrı, iştahsızlık, kilo kaybı, kusma ve bulantıdır (4, 37). Ayrıca disfaji, kusma, hematemez-melena tarzında kanama da görülmektedir.

4.4.4. Teşhis

Mide tümörlerinde prognozu etkileyen en önemli faktör, hastalığın erken devrede teşhis edilmesi ve tedavinin buna göre planlanmasıdır.

Mide adenokanserleri %80 ileri evrede teşhis edilebilmektedir (4, 37). Mide karsinomunun geç teşhis edilmesi, hastalığın ilerlemesine sebep olmakta ve küratif bir ameliyat uygulanmasını önlemektedir.

Mide tümörlerinin teşhisi için çeşitli yöntemler kullanılır. Tanı endoskopik biopsi ile konur (4, 37). Ayrıca yöntemlerin en önemlileri arasında; kan ve idrar tayini, mide suyunun incelenmesi, midenin endoskopik muayenesi (gastroskopi), midenin sitolojik muayenesi, mide tümörlerinin radyolojik teşhisi sayılabilir.

4.4.5. Tedavi

Mide kanserinin tedavisinde kullanılan başlıca metodlar; cerrahi tedavi, radyoterapi ve kemoterapi, hormon tedavisi ve immunoterapidir. Hastalığın bütün evrelerinde etkili ve genel olarak kullanılan tek bir tedavi yöntemi mevcut değildir.

Ameliyattan önce hastanın tedavi yönünden hangi evrede bulunduğu bilmesi ve tedavinin buna göre planlanması gerekir.

Mide kanserinin nüks ve metastaz özelliklerinin bilinmesi en uygun tedavinin belirlenmesi bakımından önemlidir.

Erken evre mide kanserinin primer tedavisi cerrahidir. Cerrahi olarak çıkarılan tümörün arkasından lokal ve sistemik nüksü engellemek amacı ile adjuvan olarak uygulanacak kemoterapi ve radyoterapi sağkalımı uzatmakta ve nüks riskini azaltmaktadır. Cerrahi öncesi uygulanacak tedavilerin rolü, bugün en fazla yoğunlaşılan alanlardan birini oluşturmaktadır (4, 37).

Kanser tedavisinde kullanılan ilaçları 4 bölümde incelemek mümkündür.

1. Sitotoksik ilaçlar

- a) Alkilleyici ajanlar
- b) Antimetabolitler
- c) Doğal Bileşikler

2) Hormonlar

3) Hedefe yönelik ilaçlar

- a) Monoklonal Antikorlar
- b) Protozom inhibitörleri
- c) Küçük moleküler ağırlıklı tirozin kinaz inhibitörleri

4) Biyolojik yanıt modülatörleri (42).

4.4.5.1. Hedefe Yönelik İlaçlar

Hedefe yönelik tedaviler, kanserli hücrelerin aberan sinyal algılama ve ileti sistemlerindeki kritik rol oynayan proteinlere karşı geliştirilmiş çeşitli kimyasal yapıda ilaçları içerir (42).

4.4.5.1.1. Monoklonal Antikorlar

Cetuximab (Erbitux)

Epidermal büyüme faktörü reseptörünün (EGFR, HER 1) sitoplazma dışındaki bölümüne yönlendirilmiş bir monoklonal antikordur. Metastatik kolorektal kanser ve baş boyun kanserlerinin tedavisinde etkilidir (42).

Cetuximab (EGFR'ne karşı kimerik monoklonal antikor) in vitro ve in vivo deneysel kolon kanser modellerinde etkindir. EGFR'e karşı geliştirilmiş antikorlar (Cetuximab ve Panitumumab) ve vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) antikorları metastatik kolon kanser tedavisinde rutin kullanıma girmiştir (43-45).

4.4.5.1.2. Küçük Moleküler Ağırlıklı Tirozin Kinaz İnhibitörleri

Gefitinib (Iressa)

Epidermal büyüme faktörü reseptörü intrasitoplazmik tirozin kinaz aktivitesi olan bölümüne bağlanarak etki eder. İleri evre küçük hücreli akciğer kanserinin tedavisinde kullanılır (42).

Erlotinib (Tarceva)

EGFR tirozin kinaz aktivitesini inhibe eder. Küçük hücreli akciğer kanseri ve pankreas kanserinin tedavisinde kullanılır (42).

Lapatinib (Tykerb)

HER 1 ve HER2 tirozin kinaz inhibitörüdür. Trastuzumaba dirençli HER2 aşırı ekspresyen eden metastatik meme kanserinin tedavisinde kullanılır (42).

5. MATERYAL VE METOD

5.1. KULLANILAN KİMYASAL MADDELER VE ÇÖZELTİLER

5.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

- 1) Gene Ruller 50 bp DNA moleküler ağırlık merdiveni (Fermentas, # SM0371)
- 2) Puc Mix 8, 50 µg (Fermentas, # SM0301)
- 3) DNA leader, 25-500 bp DNA moleküler ağırlık merdiveni (Bioline, H5-107B)
- 4) 6X DNA Loading Dye, 1 ml (Fermentas, # R0611)
- 5) BsuRI (HaeIII) restriksiyon enzimi, 3000 U (Fermentas, # ER0151)
- 6) MvaI (BstNI) restriksiyon enzimi, 2000 U (Fermentas, # ER0552)
- 7) Primer 100 nmol PZR Grade baz (IDT, # 60190159, IDT, # 60190158)
- 8) Primer 100 nmol PZR Grade baz (IDT, # 60190161, IDT, # 60190160)
- 9) Taq DNA polimeraz 500 U (Fermentas, # EP0402)
- 10) Agaroz, (PRONA, # 8012)
- 11) Fosfat Tampon Solüsyonu (PBS) (INVITROGEN, #003000)
- 12) Ksilen, (Carlo Erba Reagenti, 492306)
- 13) Epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) (LabVision, # MS-378-P1)
- 14) Tris Buffered Saline (TBS) (LabVision, # TA-125-TB)
- 15) Protease XXV (LabVision, # AP-9006-005)
- 16) dNTP Mix, 10mM (Fermentas, # R0192)
- 17) Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) kit (ROCHE, 11796828001)
- 18) Tris Base Buffer, 1kg (Multicell, 600-127-LG)
- 19) Etilen diamin tetra asetik asit (EDTA) Disodium, 500g (Multicell, 625-060 CG)
- 20) UltraVision Polyvalent (Rabbit-Mouse) HRP-AEC Kit (LabVision, # TP-015-HA)
- 21) Vision Mount (LabVision, #TA-060-UG)
- 22) UltrAb Diluent (LabVision, #TA-125-UD)

- 23) Etidyum bromid (EtBr) (AppliChem, A1151.0001)
- 24) Glacial asetik asit (Carlo Erba Reagenti, 302011)
- 25) Etanol (Riedel De Haen, 72390)
- 26) İsoopropanol (Merck, K 22313534)

5.1.2. Kullanılan Çözeltiler

1. Etidyum Bromid

Etidyum bromid konsantrasyonu 10mg/ml olacak şekilde dH₂O ile sulandırıldı.

2. TAE (Tris-Asetat-EDTA) Çözeltisi (500 ml, 50X)

Tris baz 242 gr

Glasiyal Asetik Asit 57.1 ml

EDTA 100 ml (0.5 M, pH 8.0)

1000 ml dH₂O ile tamamlanır ve pH 8.0'e ayarlanır.

3. TAE (Tris-Asetat-EDTA) Çözeltisi (1X)

20 ml 50X TAE dH₂O ile 1000 ml'ye tamamlandı.

4. EDTA

100 ml (0.5 M, pH 8.0): 1000 ml dH₂O ile tamamlandı ve pH 8.0'e ayarlandı.

5. Proteinaz K

100 gr liyofilize Proteinaz K 20 ng/ml olacak şekilde 4.5 ml dH₂O ile sulandırıldı.

6. İnhibitor Removal Buffer

Kullanılmadan önce 20 ml %100 etanol eklendi.

7. Wash Buffer

Kullanılmadan önce 80 ml %100 etanol eklendi.

8. PBS (Fosfat Tampon Solüsyonu)

Her poşete 100 ml distile su eklendi ve otoklavlandı.

9. Puc 8 DNA Moleküler Ağırlık Standartı

0.5 µg/µl (Puc 8 Sulandırımı)

10 µl Puc 8 Mix, 10 µl Loading Dye ve 40 µl dH₂O ile sulandırıldı.

10. dNTP (2.5 mM)

10 µl dNTP Mix (10 mM), 30 µl dH₂O ile sulandırıldı.

11. PZR Primerleri (10 pmol/ µl)

10 µl primer, 90 µl dH₂O ile sulandırıldı.

12. %2'lik Agaroz

1 gr agaroz 50 X ana stoktan sulandırılmış 50 ml 1X TAE içerisinde çözündürüldü ve elle tutulabilecek sıcaklığa geldiğinde 2 µl etidiyum bromid eklenerek iyice karıştırıldı.

13. %4'lük Agaroz

2 gr agaroz 50 X ana stoktan sulandırılmış 50 ml 1X TAE içerisinde çözündürüldü ve elle tutulabilecek sıcaklığa geldiğinde 2 µl etidiyum bromid eklenerek iyice karıştırıldı.

5.2. ÇALIŞMA GRUBU

Çalışma grubu, 1995-2008 yılları arasında Çağlayan Florence Nightingale Hastanesi Medikal Onkoloji ve İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Patoloji Ana Bilim Dalı'nda takip ve tedavi edilen, 62 mide kanseri hastasından oluşmaktadır. Hasta grubu 38 erkek (E) ve 24 kadından (K) oluşmaktadır (Tablo 2).

Tez çalışmasının EGFR ekspresyonu ile ilgili basamağı İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Patoloji Ana Bilim Dalı'nda, K-ras kodon 12 ve 13 mutasyonu ile ilgili basamağı İstanbul Üniversitesi Çapa Tıp Fakültesi Çocuk Endokrin Laboratuvarı'nda yapıldı.

Ad Soyad	Yaş	Cinsiyet	EGFR (+)	EGFR (-)	K12			K13		
					GG (wt)	GC	CC	CC (wt)	CG	GG
H. E.	57	erkek	<30		133bp					
H. Y.	63	kadın		(-)						
S. C.	51	erkek	<30		133bp			85,48bp		
A. G.	68	erkek	<30		133bp					
A. B.	37	erkek	>60		133bp					
A. Y.	71	kadın	<30		133bp					
B. K.	75	erkek		(-)						
C. T.	30	erkek	30-60		133bp					
G. G.	63	kadın	<30		133bp					
H. T.	52	erkek	<30			162,133bp		85,48bp		
H. K.	75	kadın	30-60		133bp			85,48bp		
M. K.	40	kadın		(-)						
N. G.	44	kadın	30-60		133bp					
R. K.	43	erkek	<30		133bp			85,48bp		
S. A.	52	kadın		(-)						
Y.A.	50	kadın	<30		133bp			85,48bp		

E. Ü.	63	kadın		(-)					
F. Y.	74	kadın		(-)					
H. S.	59	kadın	<30		133bp				
M. A.	60	kadın	30-60		133bp				
N. Y.	43	kadın	<30		133bp				
S. U.	33	erkek		(-)					
F. B.	65	kadın	30-60		133bp			85,74,48bp	
F. M.	59	erkek	>60		133bp				
F. İ.	43	erkek	30-60		133bp				
İ. İ.	63	erkek		(-)					
K. M.	59	kadın		(-)					
N. A.	54	erkek		(-)					
R. B.	42	kadın	30-60		133bp				
S. Y.	67	erkek		(-)					
Ş. K.	39	kadın	<30		133bp		84,48bp		
Y. A.	69	erkek	<30		133bp				
N. Ö.	52	erkek	30-60		133bp			85,74,48bp	
A. Ö.	72	erkek		(-)					
A. İ.	50	erkek	<30		133bp			85,74,48bp	
İ. S.	52	erkek	30-60						
İ. T.	60	kadın		(-)					
T. E.	64	kadın	<30		133bp				
M. Y. G.	61	erkek	<30			162,133bp			
M. D.	60	erkek	30-60		133bp		84,48bp		
M. Ö.	55	erkek	<30			162,133,29bp		85,74,48,26bp	
O. Ş.	65	erkek	>60		133bp				
R. Ö.	72	erkek		(-)					
R. Ö.	45	kadın	<30		133bp				
Ş. Ç.	44	erkek	30-60		133bp		85,48bp		
N. K.	77	erkek	30-60		133bp				
A. K.	50	erkek	<30		133bp		85,48bp		
S. K.	53	kadın	30-60		133bp		85,48bp		
C. B.	80	erkek	<30		133bp		85,48bp		
H. B.	92	kadın	<30		133bp		85,48bp		
K. Ç.	70	erkek	<30		133bp		85,48bp		
T. Ç.	70	erkek	<30		133bp		85,48bp		
M. E.	78	erkek	30-60		133bp		85,48bp		
C. Ş.	73	erkek	<30		133bp			85,74,48bp	
C. B.	80	kadın	<30		133bp			85,74,48bp	
H. Ö.	78	erkek	<30		133bp			85,74,48bp	
H. I.	68	kadın	<30		133bp				
N. D.	86	erkek	30-60		133bp		85,48bp		
C. B.	85	erkek	<30		133bp		85,48bp		
E. D.	49	erkek	<30		133bp		85,48bp		
Z. Ç.	62	erkek	>60		133bp		85,48bp		
S. G.	79	erkek	30-60		133bp		85,48bp		

Tablo 2: Hasta Tablosu

5.3. KULLANILAN İNCELEME YÖNTEMLERİ

5.3.1. Parafin Doku Örneklerinin Seçilmesi ve Saklanma Koşulları

Patoloji raporları incelenerek uygun oldukları belirlenen hastaların parafin blokları ve lamaları arşivden çıkarıldı. Olguların lamaları ışık mikroskopunda yeniden değerlendirildi ve işaretlendi. İşaretlenen lamaların ait olduğu parafin bloklar eşleştirilerek seçildi. Parafin bloklar DNA izole edilene kadar + 4 °C’de saklandı.

5.4. EGFR EKSPRESYONU İLE İLGİLİ YÖNTEMLER

5.4.1. İmmünohistokimya Yöntemi

Parafin bloklara gömülü dokulardan, 3 mikronluk kesitler pozitif şarjlı lamalara alındı. Lamalar bir gece boyunca 56°C’de etüvde inkübe edildi. Ertesi gün şalelere alınan lamalar sırasıyla 15 dakika ksilen, 15 dakika %100 alkol, 15 dakika %90’lık alkolde bekletilerek deparafinize edildi ve 5 dakika distile suda bekletilerek rehidrasyon sağlandı. Sonra antiijenleri geri kazanma işlemi için lamalar, %10’luk EDTA solüsyonuna alınıp düdüklü tencerede 15 dakika kaynatıldı. İşlem sonunda düdüklü tencerenin kapağı açılıp lamalar tencereden çıkarılıp 20 dakika oda sıcaklığında bırakıldı. Tekrar şalelere alınan lamalar, distile suda yıkandıktan sonra kenarları kurulanıp dokuların etrafı PAP-PEN kalem ile çizildikten sonra inkübasyon mapesine dizildi. Her dokunun üzerine hidrojen peroksit damlatılıp 10 dakika bekletilerek endojen peroksidaz blokajı sağlandı. Bu süre sonunda lamalar distile suda yıkandı ve 5 dakika PBS’te bekletildi. PBS’ten sonra dokuların üzerine Proteaz XXV damlatılıp 5 dakika bekletildi. (pH: 7.4) Bu süre sonunda lamalar 5 dakika PBS’ te bekletildi. PBS’ten sonra dokulara Protein Block (Hidrojen Peroksit Block) damlatılıp 5 dakika bekletildi. Sonra 1/50 konsantrasyonunda hazırlanan primer antikör EGFR (Lab Vision) damlatıldı ve 2 saat süreyle nemli ortamda inkübe edildi. İnkübasyon sonunda lamalar, içinde PBS bulunan şalelere alınıp yıkandı. Sonra dokulara Biotinylated Goat Anti- Polyvalent (Biotin ile işaretli keçi antikoru) damlatılıp 30 dakika bekletildi. Sürenin bitiminde lamalar içinde PBS bulunan şalelere alınıp yıkandı.

Sonrasında lamaların üzerine ikincil antikor olan Large Volume Streptavidin Peroksidaz damlatılıp 30 dakika bekletildi.

Sürenin bitiminde lamalar içinde PBS bulunan şalelere alınıp yıkandı. Bu süre sonunda lamaların üzerine AEC kromojen damlatılıp 5 dakika bekletildi. Dokuların kırmızı renk aldığı görülünce lamalar çeşme suyunda yıkandı. Ardından lamalar mayer hematoksilende 5 dakika bekletilerek karşıt boyama yapıldıktan sonra lamalar kapatma solüsyonu (Clear Mounting Solution) ile kapatılıp ışık mikroskopunda incelemeye hazır hale getirildi.

5.5. K-RAS KODON 12 MUTASYONU VE K-RAS KODON 13 MUTASYONUNUN TESPİTİ İLE İLGİLİ YÖNTEMLER

Hastaların parafin doku örneklerinden, genomik DNA izolasyonu yapıldı. Elde edilen DNA örneklerinin kantifikasyonu yapıldı. DNA örneklerinin kalitesini kontrol etmek amacı ile öncelikle β Globin polimeraz zincir reaksiyonu uygulandı. Daha sonra, 162 bç K-ras kodon 12 ve 159 bç K-ras kodon 13 gen ürününü çoğaltmak amacıyla mutajenik polimeraz zincir reaksiyonu (Mutajenik PZR) uygulandı. Çoğaltılan ürünlere, genotiplerin belirlenmesi amacıyla restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi (RFLP) yöntemi uygulandı.

5.5.1. DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu High Pure PCR Template Preparation Kit (ROCHE) kullanılarak yapıldı. Yüzde 10'luk formaldehit ile fikse edilmiş parafin bloklardan bisturi ile kesitler alınıp ependorf tüplere koyulduktan sonra kesitlerin üzerine ksilen eklenip 30 dakika bekletildi. Dokular için %100, %80, %60, %40'luk etanol serisi hazırlandıktan sonra sırası ile 10'ar saniye etanol serilerinden ve sudan geçirildi. Bu serilerden sonra dokuya 200 μ l lysis buffer ve 40 μ l proteinaz K eklenip pipetaj yapıldı. Sonrasında ependorf tüpler bir gece boyunca 37°C'de inkübe edildi. Ertesi gün inkübasyondan sonra 20 μ l proteinaz K karışıma ilave edilip pipetaj yapıldıktan sonra tekrar ependorf tüpler 1-2 saat boyunca 55°C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonunda dokuların eriyen kısımları yeni ependorf tüplere aktarılıp üzerine 200 μ l binding buffer eklenip pipetaj yapıldıktan sonra ependorf tüpler tekrar 70°C'de 10 dakika inkübe edildi.

İnkübasyon sonunda üzerine 100 µl isopropanol eklenip pipetaj yapıldı. Bu işlemden sonra toplama tüpün içine filtre tüp geçirilip ependorftaki örnek aktarıldı ve 14000 rpm’de 1 dakika santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonra toplama tüpü atılıp yenisi takıldı ve 500 µl removal buffer eklenip 14000 rpm’de 1 dakika santrifüj edildi. Ardından toplama tüpü atılıp yenisi takıldı ve 500 µl yıkama tamponu eklenip 14000 rpm’de 1 dakika santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonra tekrar toplama tüpü atılıp yenisi takıldı ve 500 µl yıkama tamponu eklenip 14000 rpm’de 1 dakika santrifüj edildi. Sonra toplama tüpü atılıp yenisi takıldı ve herhangi bir solüsyon eklenmeden, boş bir şekilde 14000 rpm’de 10 saniye santrifüj edildi. Bu santrifüj işleminden sonra toplama tüpü atılıp filtre tüp ependorf tüpe geçirildi ve 200 µl elution buffer eklenip DNA’nın bağlanması için 5 dakika beklendikten sonra 14000 rpm’de 1 dakika santrifüj edildi ve filtre tüpü atıldı.

5.5.2. DNA Miktarının Ölçülmesi

İzole edilen DNA’nın konsantrasyonu ve saflığı Picodrop Microlitre Spectrophotometer Version 3.0 ile ölçüldü. Her bir ölçümde 1µl DNA örneği, blank solüsyonu olarak da Elution buffer (Roche) kullanıldı. İzole edilen DNA örneklerinin konsantrasyonu 260 nm’deki optik dansitesinden (OD), saflığı ise 260 nm/280 nm dalga boyundaki OD oranından tespit edildi.

Çift zincirli DNA molekülleri için, 1 optik dansitenin (OD) 50 µg/ml’ye karşılık geldiği bilinmektedir. Buna göre çift zincirli DNA için konsantrasyonu (formül a) ve saflığının (formül b) belirlenmesinde aşağıdaki formüller kullanılır:

$$\text{DNA konsantrasyonu (ng/}\mu\text{l)} = A_{260} \times \text{Sulandırım oranı} \times 50 \text{ (a)}$$

$$\text{DNA saflığı} = A_{260} \times \text{Sulandırım oranı} \times 50 / A_{280} \times \text{Sulandırım oranı} \times 50 \text{ (b)}$$

5.5.3. Primerlerin Hazırlanması

İzole edilen DNA örneklerinin kalitesini kontrol etmek amacıyla uygulanan β Globin PZR primerleri ve K-ras kodon 12 ve K-ras kodon 13 genotiplerinin belirlenmesi için kullanılan ileri ve geri primerler DNaz, RNaz içermeyen çift distile su ile çözdürüldü (100 pmol/µl). Daha sonra stoklar (10pmol/µl) hazırlanıp – 20°C’de saklandı.

BstNI kesim bölgesini tanınması amacı ile K-ras kodon 12 için mismatched upstream primer ve HaeIII kesim bölgesini tanınması amacı ile K-ras kodon 13 için mismatched downstream primer kullanıldı. K-ras kodon 12 için kullanılan mismatched ileri primer Levi et al. (1991) tarafından bildirilmiş olup geri primer 9 bp uzatılarak modifiye edilmiştir (46). K-ras kodon 13 için kullanılan primerlerin dizisi A. Hatzaki et al. (2001) tarafından yayınlanmış dizilere göre (GenBank Acc. M54968, ve M38506) dizayn edildi (59).

Bu çalışmada β Globin kontrol PZR'ında kullanılan primerler ve K-ras kodon 12 ve K-ras kodon 13 genotiplerinin belirlenmesi amacı ile kullanılan oligonükleotid primerlerin dizileri aşağıda verilmiştir (Tablo 3). Tablo 3'te K-ras kodon 12 ve 13 primer dizisinde altı çizili bazlar mismatch'tir.

	İleri primer	Geri primer
β Globin primerleri	5'-GAAGAGCCAAGGACAGGTA -3'	5'- CCACTTCATCCACGTTCCACC - 3'
Kras kodon 12 Primerleri	5'-ACTGAATATAAACTTGGTAGTTGGAC <u>CT</u> -3'	5'-CTGTATCAAAGAATGGTCCTGCACCAGTA-3'
Kras kodon 13 Primerleri	5'-GTACTGGTGGAGTATTTGATAGTGATTAA-3'	5'- GTATCGTCAAGGCACTCTTGCC <u>TAGG</u> -3'

Tablo 3: Oligonükleotid Primerlerin Dizisi

5.5.4. K-ras kodon 12 Mutajenik Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Çoğaltılması

Hastalara ait DNA örneklerinin kalitesini kontrol etmek amacı ile öncelikle β Globin geni PZR ile amplifiye edildi. Amplifiye olduklarını saptadıktan sonra K-ras geninin 12. kodonunu da içeren bölge çoğaltıldı. Standart 25 μ l'lik PZR karışımı 0.5 ml'lik ince duvarlı PZR tüplerinde Tablo 4'de belirtildiği gibi hazırlandı.

Kullanılan temel bileşenler	Stok konsantrasyon	Kullanılan miktar	Son konsantrasyon
10X PZR Tamponu	10X	2.5 µl	1X
MgCl ₂	25 mM	1.5 µl	1.5 mM
İleri primer	10 pmol/µl	1 µl	0.5µM
Geri primer	10 pmol/µl	1 µl	0.5µM
Taq polimeraz	5 U/µl	0.15 µl	0.05 U/µl
dNTP mix	2 mM	2 µl	40 µM
Çift distile su	—	14.85 µl	—
Kalıp DNA	50 ng/µl	2 µl	100ng
TOPLAM	25 µl		

Tablo 4: β Globin PZR ve K-ras Kodon 12 PZR Reaksiyon Karışımı İçeriği

5.5.5. K-ras kodon 13 Mutajenik Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Çoğaltılması

Hastalara ait DNA örneklerinin kalitesini kontrol etmek amacı ile öncelikle β Globin geni PZR ile amplifiye edildi. Amplifiye olduklarını saptadıktan sonra K-ras geninin 13. kodonunu da içeren bölge çoğaltıldı. Standart 25 µl'lik PZR karışımı (primerler hariç) 0.5 ml'lik ince duvarlı PZR tüplerinde Tablo 5'de belirtildiği gibi hazırlandı.

Kullanılan temel bileşenler	Stok konsantrasyon	Kullanılan miktar	Son konsantrasyon
10X PZR Tamponu	10X	2.5 µl	1X
MgCl ₂	25 mM	1.5 µl	1.5 mM
İleri primer	10 pmol/µl	1 µl	0.5µM
Geri primer	10 pmol/µl	1 µl	0.5µM
Taq polimeraz	5 U/µl	0.5 µl	0.16 U/µl
dNTP mix	2 mM	2 µl	40 µM
Çift distile su	—	13.5 µl	—
Kalıp DNA	50 ng/µl	2 µl	100ng
TOPLAM	25 µl		

Tablo 5: K-ras Kodon 13 PZR Reaksiyon Karışımı İçeriği

5.5.6. Mutajenik PZR Koşulları

İstenilen polimorfik bölgeyi çoğaltmak amacı ile mutajenik PZR koşulları oluşturuldu. β Globin kontrol PZR'ı, K-ras kodon 12 ve K-ras kodon 13 mutajenik PZR'nın koşulları sırasıyla Tablo 6, 7 ve 8'de gösterilmiştir.

Döngü sayısı	Derece	Süre	Evre
1	95°C	3 dak	Başlangıç denatürasyonu
40	95 °C	45 sn	Denatürasyon
	56 °C	30 sn	Primerlerin bağlanması
	72 °C	30 sn	Uzama
1	72 °C	10 dak	Sonlanma
1	4 °C	∞	Saklanma Isısı

Tablo 6: β Globin PZR Koşulları

Döngü sayısı	Derece	Süre	Evre
1	95°C	5 dak	Başlangıç denatürasyonu
35	95 °C	40 sn	Denatürasyon
	60 °C	30 sn	Primerlerin bağlanması
	72 °C	30 sn	Uzama
1	72 °C	10 dak	Sonlanma
1	4 °C	∞	Saklanma Isısı

Tablo 7: K-ras Kodon 12 Mutajenik PZR Koşulları

Döngü sayısı	Derece	Süre	Evre
1	95 °C	5 dak	Başlangıç denatürasyonu
35	95 °C	40 sn	Denatürasyon
	50 °C	30 sn	Primerlerin bağlanması
	72 °C	30 sn	Uzama
1	72 °C	10 dak	Sonlanma
1	4 °C	∞	Saklanma Isısı

Tablo 8: K-ras Kodon 13 Mutajenik PZR Koşulları

5.5.7. Mutajenik PZR Ürünlerinin Yatay Jel Elektroforezinde Görüntülenmesi

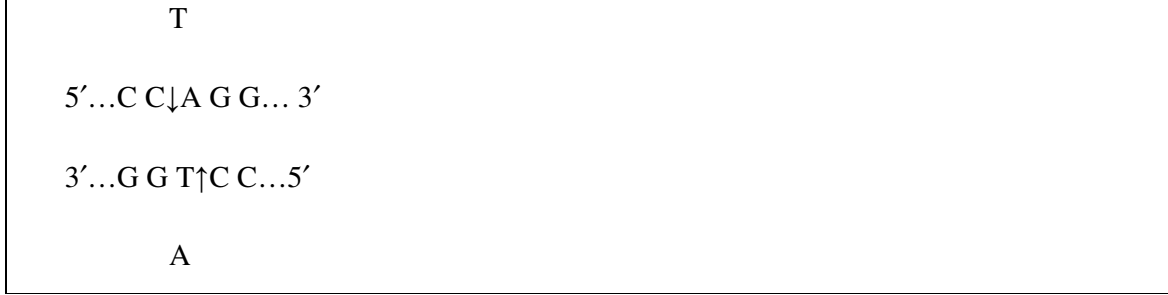
Jel elektroforezinde kullanılacak agaroz jelin konsantrasyonu, ayrıştırılmak istenen parçanın büyüklüğüne göre değişmektedir. Bu çalışmada, kontrol PZR olarak uygulanan β Globin PZR ürünleri %2'lik agaroz jellerde, çoğaltılan K-ras kodon 12 ve K-ras kodon 13 gen ürünleri de %2'lik jellerde, RFLP ürünleri %4'lük jellerde yürütüldü ve jeller ultraviyole (UV) ışık altında incelendi.

%2'lik jel için; 1 gr agaroz, 50X ana stoktan sulandırılmış 50 ml 1X TAE içerisinde çözdürüldü. Elle tutulabilecek sıcaklığa geldiğinde 2 μ l etidiyum bromid (EtBr) eklenerek iyice karıştırıldı. Kuyucukları oluşturacak taraklar kasete yerleştirildi ve jel üzerine döküldü. Jel donduktan sonra taraklar dikkatlice çıkarıldı.

10 μ l PZR ürünleri 2 μ l yükleme tamponu ile karıştırılıp kuyucuklara yüklendi. Jeldeki DNA Thermo Scientific elektroforez sistemi ile 90 V gerilimde 1X TAE tamponu içerisinde 30 dakika yürütüldü. PZR ürünlerinin büyüklükleri PUK8 ve 25 bp'lik DNA moleküler ağırlık merdiveni standartı ile karşılaştırılarak belirlendi.

5.5.8. Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizm (RFLP) Analizi

K-ras kodon 12 genotiplerinin belirlenmesi amacı ile çoğaltılan 162 bç'lik PZR ürünleri BstN1 (Mva1) enzimi kullanılarak kesildi. 10 µl PZR ürünü 1 µl enzim ile 37°C'de su banyosunda 1 gece boyunca inkübasyona bırakıldı.



Şekil 5: BstN1 (Mva1) Enziminin Kesim Bölgesi

K-ras kodon 13 genotiplerinin belirlenmesi amacı ile çoğaltılan 159 bç'lik PZR ürünleri HaeIII (BsuR1) enzimi kullanılarak kesildi. 10 µl PZR ürünü 1 µl enzim ile 37°C'de su banyosunda 1 gece boyunca inkübasyona bırakıldı.



Şekil 6: HaeIII (BsuR1) Enziminin Kesim Bölgesi

5.5.9. İstatiksel Analiz

İstatiksel analiz SPSS (Sürüm: 17.0) paket programı kullanılarak yapılmıştır. Çalışmanın biyoistatistiksel çözümlemesinde, değişkenler ortalama, standart sapma (SD), frekans ve yüzdeler ile tanımlanmış, frekans ve yüzdelerin kıyaslanmasında ki kare testi kullanılmıştır. Normal dağılıma uygun ölçümsel değişken ortalamalarının karşılaştırılması için *t testi* kullanılmıştır. Sağkalım için *log-rank testi* ve *Kaplan-Meier* yöntemi kullanılmıştır. Ayrıca *Fisher's exact testi*, *lojistic regression testi*, *enter* metodu da kullanıldı. Yorumlamalarda P değerinin 0.05'ten küçük olması istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

6. BULGULAR

Bu çalışmada, 1995-2008 yılları arasında Çağlayan Florence Nightingale Hastanesi Medikal Onkoloji ve İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Patoloji Ana Bilim Dalı'nda takip ve tedavi edilen, 62 mide kanser hastasına ait parafin blokları kullanıldı.

Mide kanseri hasta grubumuzun yaş ortalamaları 59.33 olan 24 kadın ve yaş ortalamaları 61.08 olan 38 erkekten oluşmaktadır.

Bu çalışmadaki 62 mide kanser hastasının 52 tanesinde (%83.87) lenf nodu metastazı mevcut iken, 10 tanesinde (%16.13) lenf nodu metastazı bulunmamaktaydı. TNM sınıflamasına göre N0 için 10 (%16.13), N1 için 29 (%46.77), N2 için 18 (%29.03) ve N3 için 5 hasta (%8.07) saptandı.

Tümörlerin anatomik yerleşimlerine göre dağılımı incelendiğinde tümörlerin 9'u kardial (%14.52), 15'i korpus (%24.19), 31'i (%50) antrum ve 1'i diğer (%1.61) kaynaklıydı. 6 hastada ise (%9.68) diffüz tutulum saptandı.

Makroskopik olarak olguların 42'si (%67.74) infiltran, 14'ü (%22.58) ülseröz, 6'sı (%9.68) fungatif özellik gösteriyordu.

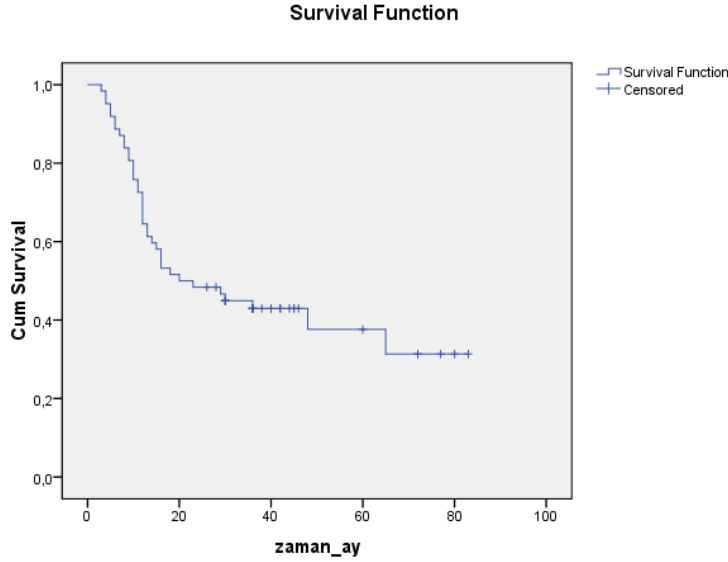
Histolojik tipler içinde %48.39 (30/62) ile en sık rastlanılan adenokarsinomlardı. Ayrıca %25.81'i (16/62) indiferansiyel karsinom, %11.29'u (7/62) taşlı yüzük hücreli karsinom, %14.51'i (9/62) diğer olarak değerlendirildi. Diğer olarak değerlendirilen histolojik tipler, nöroendokrin karsinom %8.06 (5/62) ve müsinöz karsinom %6.45 (4/62)'du.

Hastaların tamamı operable (ameliyat edilebilir) olarak değerlendirilmiş ve %50'sine total gastrektomi %50'sine subtotal gastrektomi uygulanmıştı.

Evrelere göre hastaların dağılımına bakıldığında, evre I'de 5 (% 8.06), evre II'de 26 (% 41.94), evre III'te 26 (% 41.94), evre IV'te 5 hasta (% 8.06) saptandı.

Lojistik Regression ve log-rank testine göre sağkalım ile evre arasında ileri derecede anlamlı bir ilişki saptanmıştır (p=0.001). Evresi yüksek olan hasta erken ölmektedir. Lojistik Regression testine göre sağkalım ile yaş arasında da anlamlı bir ilişki saptanmıştır (p=0.048). Yaş arttıkça sağkalım şansı azalmaktadır. Enter metoduna göre mikroskopik tip sağkalım için klinik olarak önemli bir parametredir (p=0.068).

Çalışma grubumuzu oluşturan mide kanseri hastalarının evrelere göre 5 yıllık sağkalım oranları Grafik 1’de Kaplan Meier Grafiği ile gösterilmiştir. Kaplan-Meier metoduna göre medyan sağkalım 20 aydır (SD:7.252).

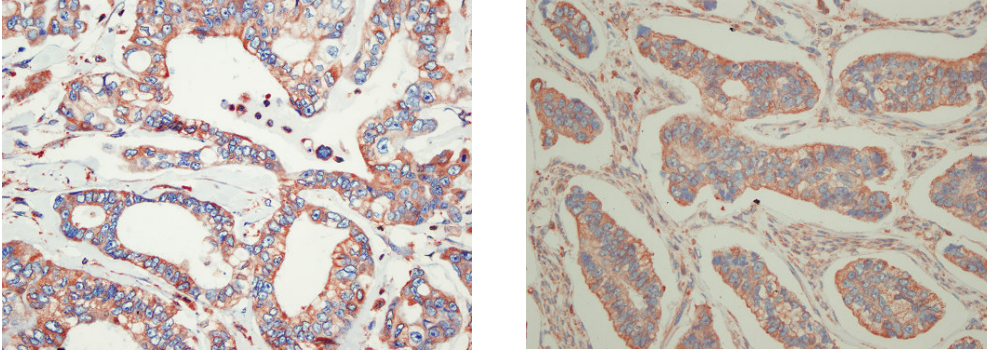


Grafik 1: Kaplan-Meier Grafiği

6.1. İMMÜNOHİSTOKİMYA SONUÇLARI

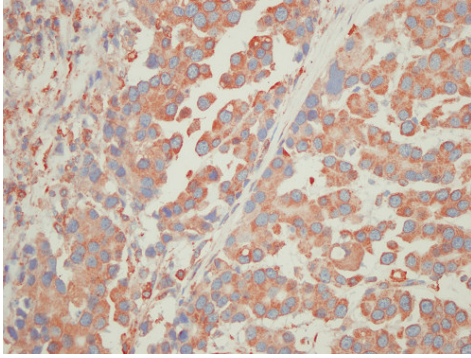
İmmünohistokimyasal antikorlarla boyalı kesitler, ışık mikroskopunda değerlendirildi. EGFR’ünün membranöz ve sitoplazmik boyanma özelliği gösterdiği izlendi.

İstatiksel değerlendirilme yapılırken hastalar pozitif ve negatif olanlar olmak üzere 2 gruba ayrılarak sonuçları değerlendirildi. 62 hastanın 48’inde EGFR ekspresyonu pozitif (%77.42) ve 14 tanesinde negatif boyanma (%22.58) özelliği gösterdiği izlendi.

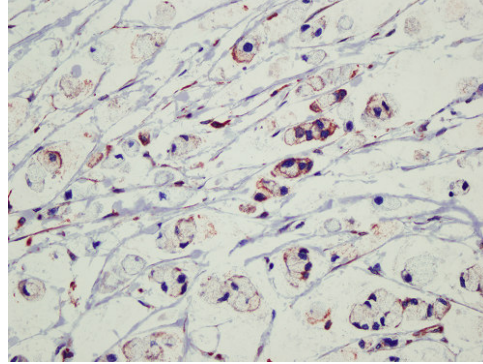


Şekil 7: Mide Adenokarsinom Hücrelerinde EGFR Pozitifliği (Membranöz Boyanma) (x400)

A



B



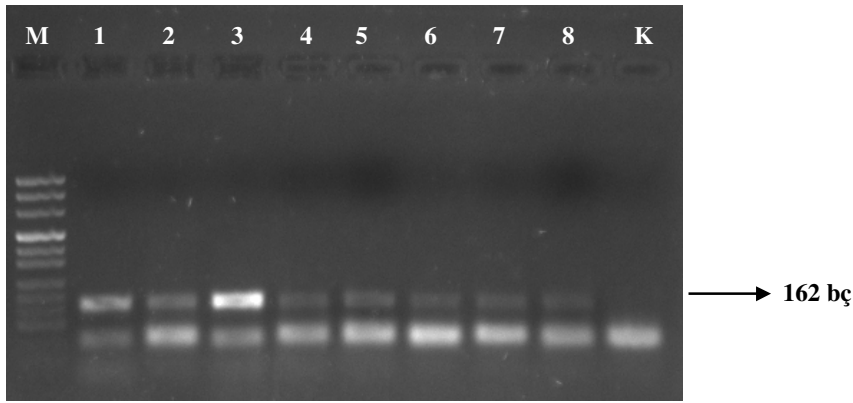
Şekil 8: A'da Mide İndiferansiye Karsinom Hücrelerinde EGFR Pozitifliği (Membranöz ve Sitoplazmik Boyanma) (x400)

B'de Mide Taşlı Yüzük Hücreli Karsinomda EGFR Pozitifliği (Membranöz Boyanma) (x400)

t Testine göre EGFR ekspresyonu ile yaş ($p=0.977$), zaman ($p=0.635$), lenf nodu sayısı ($p=0.814$) ve tümör çapı ($p=0.960$) arasında anlamlı bir ilişki olmadığı saptanmıştır. Ki kare testine göre EGFR ekspresyonu ile cinsiyet ($p=0.324$), evre ($p=0.785$), mikroskopik tip ($p=0.906$), lenf nodu metastazı ($p=0.298$), tümör tipi ($p=0.946$) arasında da anlamlı bir ilişki olmadığı saptanmıştır. Fisher testine göre EGFR ekspresyonu ile makroskopik tip ($p=0.349$) arasında anlamlı bir ilişki olmadığı saptanmıştır. EGFR ekspresyonu ve sağkalım oranlarını kıyaslamak için log-rank testi kullanılmıştır. Bu teste göre EGFR ekspresyonu ile sağkalım arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır ($p=0.306$).

6.2. MUTAJENİK PZR-RFLP SONUÇLARI

K-ras kodon 12 genotiplerini saptamak amacı ile yapılan mutajenik PZR sonucunda 162 bç'lik ürün elde edildi (Şekil 9). Mutajenik PZR ürünleri BstN1 restriksiyon enzimi ile kesildi. Kesim sonrası, mutant alleli taşımayan yabancı tiplerin PZR ürünlerini 133 ve 29 bç'lik DNA parçaları, mutant alleli yalnız bir allelinde taşıyan heterozigotların PZR ürünlerini 162, 133 ve 29 bç'lik DNA parçaları, mutant alleli her iki allelinde de taşıyan homozigotların PZR ürünlerini ise 162 bç'lik DNA parçaları oluşturmaktaydı (Tablo 9).

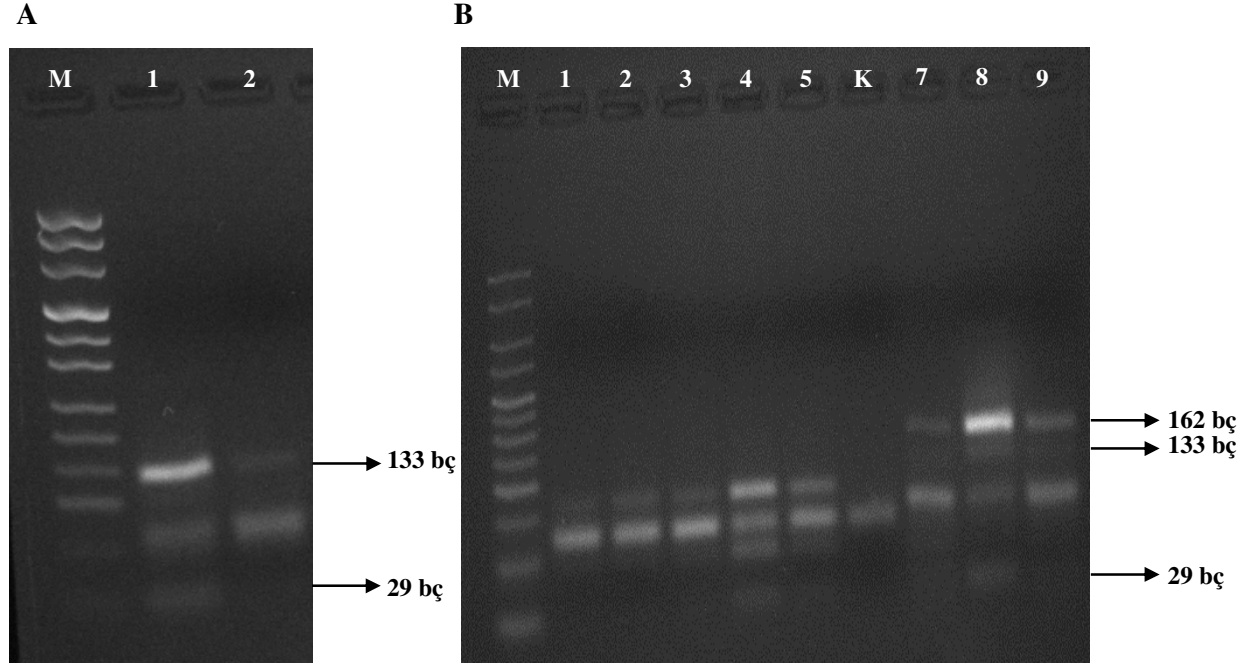


Şekil 9: K-ras kodon 12 polimorfik bölgeyi taşıyan mutajenik PZR ürünlerinin %2'lik agaroz jel görünütüsü. M: PUC8 DNA moleküler ağırlık standartı; 1-8. kuyular: 162 bç' lik PZR ürünleri; K: kontrol

	Yabancı Tip (G/G)	Heterozigot Mutant (G/C)	Homozigot Mutant (C/C)
162 bç		————	————
133 bç	————	————	
29 bç	————	————	

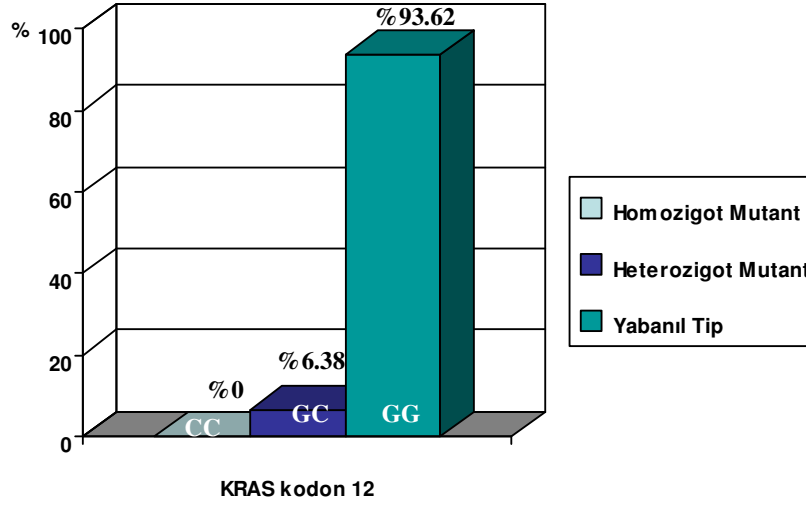
Tablo 9: K-ras Kodon 12 Mutajenik PZR Sonrasında BstN1 Enzimi Kesimi Sonucu Ortaya Çıkan Ürünler

Allelik polimorfizmler, K-ras kodon 12 mutasyonunun her iki allelde de bulunmaması (yabanıl tip); her iki allelde bulunması (homozigot mutant) ve sadece bir allelde bulunması (heterozigot mutant) şeklinde açıklanabilir (Şekil 10).



Şekil 10: Mutajenik PZR ürünlerinin BstN1 ile kesimi sonucu elde edilen K-ras kodon 12 genotiplerinin %4'lük agaroz jel görüntüsü. A'da M: PUC8 DNA moleküler ağırlık standartı; 1,2. kuyular G/G genotipi (yabanıl tip) B'de M: 25 bp' lik DNA moleküler ağırlık standartı; 7-9. kuyular G/C genotipi (heterozigot mutant). B'de diğer kuyular K-ras kodon 13 genotipleri (1, 2, 3. kuyular C/G genotipi (heterozigot mutant); 4,5. kuyular C/C genotipi (yabanıl tip); K: kontrol)

Mide kanseri hastalarında 44 kişi yabanıl tip, 3 kişi heterozigot mutant olarak bulunmuştur. Homozigot mutasyona rastlanmamıştır. Hastaların K-ras kodon 12 genotiplerinin dağılım sıklıkları Grafik 2'de gösterildiği gibidir. Hasta gruplarında GG genotip sıklığı hem GC ve CC genotiplerine göre fazla bulundu (Tablo 10). Hasta bireylerin K-ras 12 mutasyonlarını taşıma sıklığı %6.38 (3/47) olduğundan bu mutasyonlar mide kanseri riski açısından Fisher testine göre herhangi bir anlamlılık taşımamaktaydı ($p= 1.000$). K-ras kodon 12 mutasyonu ile sağkalım arasında log-rank testine göre anlamlı bir ilişki saptanmamıştır ($p=0.815$)

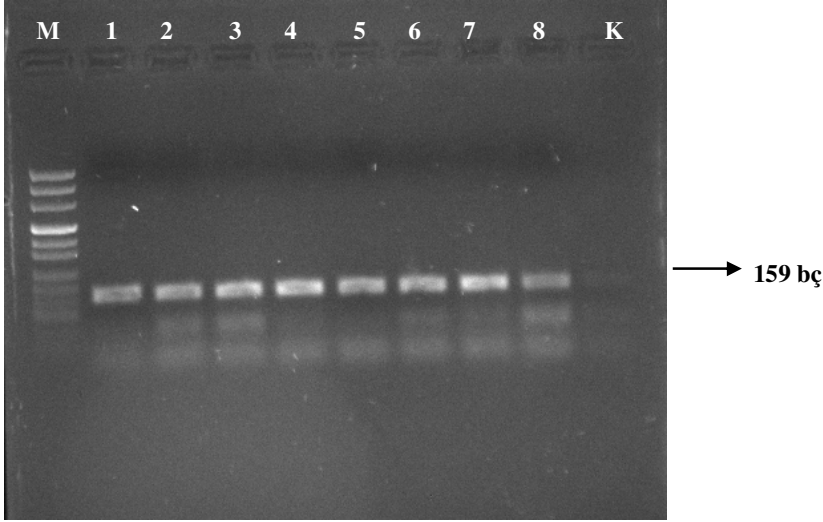


Grafik 2: Hasta Grubuna Ait K-ras kodon 12 Genotip Dağılımları

K-ras kodon 12 Genotipleri			
	GG; n (%)	GC; n (%)	CC; n (%)
Hasta grubu	44 (%93.62)	3 (%6.38)	0 (%0)

Tablo 10: Hasta Grubunda K-ras Kodon 12 Genotiplerinin Dağılımı

K-ras kodon 13 genotiplerini saptamak amacı ile yapılan mutajenik PZR sonucunda 159 bç'lik ürün elde edildi (Şekil 11). Mutajenik PZR ürünleri HaeIII restriksiyon enzimi ile kesildi. Kesim sonrası, mutant alleli taşımayan yabanıl tiplerin PZR ürünlerini 85, 48 ve 26 bç'lik DNA parçaları, mutant alleli yalnız bir allelinde taşıyan heterozigotların PZR ürünlerini 85 ve 74 bç'lik DNA parçaları, mutant alleli her iki allelinde de taşıyan homozigotların PZR ürünlerini ise 159 bç'lik DNA parçaları oluşturmaktaydı (Tablo 11).

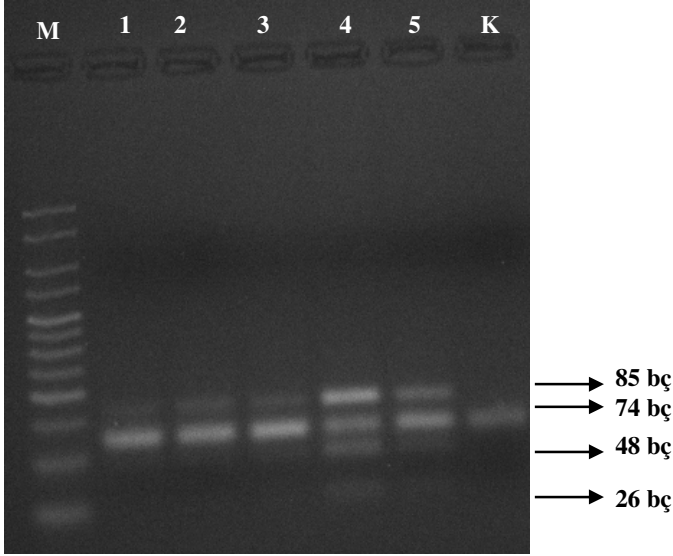


Şekil 11: K-ras kodon 13 polimorfik bölgeyi taşıyan mutajenik PZR ürünlerinin %2'lik agaroz jel görünütüsü. M: PUC8 DNA moleküler ağırlık standartı; 1-8. kuyular: 159 bç'lik PZR ürünleri; K: kontrol

	Yabancıl Tip (C/C)	Heterozigot Mutant (C/G)	Homozigot Mutant (G/G)
159 bç			————
85 bç	————	————	
74 bç		————	
48 bç	————		
26 bç	————		

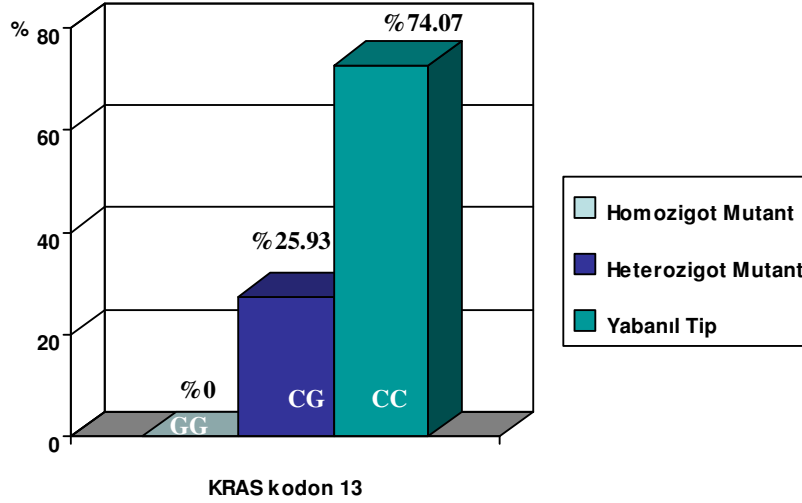
Tablo 11: K-ras Kodon 13 Mutajenik PZR Sonrasında HaeIII Enzimi Kesimi Sonucu Ortaya Çıkan Ürünler

Allellik polimorfizmler, K-ras kodon 13 mutasyonunun her iki allelde de bulunmaması (yabancıl tip); her iki allelde bulunması (homozigot mutant) ve sadece bir allelde bulunması (heterozigot mutant) şeklinde açıklanabilir (Şekil 12).



Şekil 12: Mutajenik PZR ürünlerinin HaeIII ile kesimi sonucu elde edilen K-ras kodon 13 genotiplerinin %4'lük agaroz jel görüntüsü. M: 25 bp'lik DNA moleküler ağırlık standartı; 1, 2, 3. kuyular C/G genotipi (heterozigot mutant); 4,5. kuyular C/C genotipi (yabanıl tip); K: kontrol

Mide kanser hastalarında 20 kişi yabanıl tip, 7 kişi heterozigot mutant olarak bulunmuştur. Homozigot mutasyona rastlanmamıştır. Hastaların K-ras kodon 13 genotiplerinin dağılım sıklıkları Grafik 3'de gösterildiği gibidir. Hasta gruplarında CC genotip sıklığı hem CG ve GG genotiplerine göre fazla bulundu (Tablo 12). Hasta bireylerin K-ras 13 mutasyonlarını taşıma sıklığı %25.93 (7/20) olduğundan bu mutasyonlar mide kanseri riski açısından Fisher testine göre herhangi bir anlamlılık taşımamaktaydı. ($p=0.616$) K-ras kodon 13 mutasyonu ile sağkalım arasında log-rank testine göre anlamlı bir ilişki saptanmamıştır ($p=0.655$).



Grafik 3: Hasta Grubuna Ait K-ras Kodon 13 Genotip Dağılımları

K-ras kodon 13 Genotipleri			
	CC; n (%)	CG; n (%)	GG; n (%)
Hasta grubu	20 (%74.07)	7 (%25.93)	0 (%0)

Tablo 12: Hasta Grubunda K-ras Kodon 13 Genotiplerinin Dağılımı

6.3. İMMÜNOHİSTOKİMYA VE PZR-RFLP SONUÇLARININ KARŞILAŞTIRILMASI

Fisher testine göre EGFR ekspresyonu negatif boyanma (-) ve EGFR ekspresyonu pozitif boyanma (+) ile K-ras kodon 12 ve 13 mutasyonu arasında anlamlı bir ilişki olmadığı saptanmıştır ($p= 1.000$, $p= 0.616$). Hasta bireylerin K-ras 12 ve 13 mutasyonlarını taşıma sıklığı sırasıyla %6.38 ve %25.93 olduğundan bu mutasyonlar mide kanseri riski açısından herhangi bir anlamlılık taşımamaktadır.

7. TARTIŞMA

Mide kanseri çok faktörlü bir hastalık olup birçok gen ve çevresel faktör hastalıkta etkilidir. Yaklaşık 10 yıldır mide kanseri insidansı ve mortalitesi azalmasına rağmen dünyada hala en çok rastlanan dördüncü ve en çok ölüme sebep olan ikinci kanser türüdür (34, 35).

Mide tümörlerinin görülme sıklığının erkeklerde iki kat fazla olduğu literatürde bildirilmektedir (1). Çalışma grubumuzdaki yaş ortalaması yabancı kaynaklarla kıyaslandığında benzerdir. Erkek kadın oranında kısmi eşitlik (E/K=1.58) bulunmaktadır. Mide kanserinin ortalama teşhis yaşı 56'dır. Batı toplumlarında en sık 70'li yaşlarda görülmesine karşın ülkemizde ortalama yaş 10 yıl daha gençtir (4, 5). 2008 yılında 840 hastadan oluşan Türk onkoloji grup çalışmasında mide kanserlerinin saptanma yaşı ortalama 57'dir (yaş aralığı 19-85) (47). 62 hastadan oluşan çalışma grubumuzda ise yaş ortalaması 60.4'tür (yaş aralığı 30-92). Aradaki farkın hasta sayısının azlığından kaynaklandığını düşünmekteyiz. Mide kanserlerinde cinsiyet farkının sağkalım üzerine etkisi bildirilmemiştir.

2008 yılı Türk onkoloji grup çalışmasında tümör lokalizasyon yüzdeleri antrum %44.5, korpus %41.3 kardial sadece %7.5 olarak saptandı (47). Bizim çalışmamızda ise, tümörlerin anatomik lokalizasyonlarına göre dağılımı incelendiğinde tümörlerin %50'si antrum, %24.19'u korpus, %14.52'si kardial ve 1.61'i özofagogastrik bileşke kaynaklıydı. %9.68'inde de diffüz tutulum saptandı. Kardial bölgesi tümörleri son yıllarda artış göstermektedir. Türkiye'de mide kanserlerinin %15'inden daha azını kardial tümörleri oluşturur (40). Bazı dış literatürlerde bildirilen artan özofagogastrik bileşke tümörlerine çalışma grubumuzda 1 hastada (%1.61) rastlanmıştır. Batı ülkelerinde mide adenokarsinom tümörlerinde fundus ve distal tümörlerde belirgin bir düşüş olmasına rağmen gastroözofageal bileşke ve kardial tümörlerinde sıklık yüksektir (48). Son yıllarda mide kanserinde görülen önemli değişikliklere rağmen antral tümörler korpus ve kardialakilere nazaran daha sık görülmektedir.

Alberts ve ark.'nın 2003 yılında Hollanda'da mide kanserinin epidemiyolojisi, patolojisi ve tedavisi üzerine yaptığı çalışmaya göre; mide kanserlerinin üçte biri (1/3) evre I ve II, dörtte biri (1/4) evre III ve %40'ı evre IV olarak teşhis edilmiştir (49). 2008 yılı Türk onkoloji grup çalışmasında hastaların %8.4'ü evre I, %14.5'i evre II, 56.7'si evre III ve 14.5'i evre IV olarak belirlendi (47). Bizim çalışmamızda evrelere göre hastaların dağılımına bakıldığında, % 8.06'sı evre I, %41.94'ü evre II, %41.94'ü evre III ve %8.06'sı evre IV olarak saptanmıştır.

Mide kanserlerinin %90'ından fazlası adenokarsinomlardır ve geriye kalan kısmı lenfomalar ve sarkomalardır (34). Çalışmamızda histolojik tipler içinde %48.39 (30/62) ile en sık rastlanan adenokarsinomdu. Ayrıca %25.81'i (16/62) indifferansiye karsinom, %11.29'u (7/62) taşlı yüzük hücreli karsinom, nöroendokrin karsinom % 8.06 (5/62) ve müsinöz karsinom % 6.45 (4/62)'du. Bu oranlar literatürle uyumludur.

Mide kanserinin moleküler temelinde büyüme faktörleri ve onkogenler yer alır. Mide kanserinde rol alan genlere ait tek nükleotid polimorfizmlerinin (SNP) tespiti mide kanseri patogenezinin aydınlanmasına yol açacağı gibi aynı zamanda hastalığın teşhis, tedavi ve önlenmesinde yardımcı olacaktır. Kanserin henüz yerleşmediği ve tanımlamanın zor olduğu erken evrede, bilinen bu gen mutasyonlarının taranması ile olası ilerlemenin önüne geçilmesi mümkün olabilecektir.

Spesifik nokta mutasyonları ile kanserin biyolojik davranışının nasıl etkilendiği yapılan çalışmaların odak noktasını oluşturmaktadır. Mide kanserli hastalarda K-ras kodon 12 spesifik mutasyonlu kanserlerin metastaz gösterme eğiliminde oldukları yapılan çalışmalar ile ortaya konmuştur (50). Tedaviye verilecek cevabın ve bireyin kansere olan genetik yatkınlığının önceden belirlenmesi, spesifik gen mutasyonlarının incelenmesi ile sağlanabilecektir.

Mide kanserinin moleküler mekanizmaları ve kliniğe yansımaları açısından oldukça önemli görülen K-ras gen mutasyonlarının belirlenmesinde PCR ve RFLP yöntemleri, EGFR ekspresyonlarının belirlenmesinde immünohistokimya yöntemi etkindir.

K-ras gen polimorfizminin kolon ve mide kanseri ile ilişkileri çeşitli çalışmalar ile bildirilmiştir. Kolon ve mide kanserlerinde K-ras ile ilgili polimorfizm çalışması *Kimura ve ark.* tarafından 2007 yılında Japon popülasyonunda araştırılmıştır. 66 mide kanseri ve 170 kolon kanseri hastasında K-ras kodon 12 ve 13 mutasyonunun saptanması için PZR ve RFLP yöntemleri kullanılmıştır. K-ras mutasyonları kolon kanserinde 57/170 (%34) ve mide kanserinde 2/66 (%3) olarak bulunmuştur. 66 mide kanseri hastasının K-ras kodon 12 ve 13 mutasyonları sadece K-ras kodon 12'de 2 (%3) ve K-ras kodon 13'te 1 (%1.5) olarak saptanmıştır. K-ras kodon 12 ve 13'te ikisinde birlikte bulunan mutasyon 1/66 (%1.5) olarak tespit edilmiştir. 170 kolon kanseri hastasının K-ras kodon 12 ve 13 mutasyonları K-ras kodon 12'de 47 (%28) ve K-ras kodon 13'te 13 (%7.6) olarak saptanmıştır. K-ras kodon 12 ve 13'te ikisinde birlikte bulunan mutasyon 3/170 (%1,8) olarak tespit edilmiştir. Metastatik kolon ve mide kanser hastalarının büyük kısmında benzer mutasyonal durum saptanmıştır (51).

Bu çalışmadan farklı olarak bizim çalışmamızda mide kanseri hastasında K-ras kodon 12'de 3/47 (%6.38) ve 13'te 7/27 (%25.93) olarak saptanmıştır. Mide kanserinde beslenme alışkanlığının önemli bir risk faktörü olmasından yola çıkarak bu farkın Türk populasyonundaki beslenme alışkanlığı ile ilişkili olabileceğini düşünmekteyiz.

Mide kanserinde K-ras mutasyonunun makroskopik özelliklere etkisi *Yashiro ve ark.* tarafından 2005 yılında Japon populasyonunda araştırılmıştır. 108 hastanın parafin doku kesitlerini kullanarak exon 1 K-ras kodon 12 ve 13 mutasyonunun saptanması için PZR ve dot-blot yöntemleri kullanılmıştır. K-ras mutasyonu 108 mide kanseri hastasının 20'sinde (%18.52) bulunmuştur. K-ras mutasyonu ile polipoid kanser arasında anlamlı bir ilişki saptanmıştır (52). Bizim çalışmamızda K-ras mutasyonu ile makroskopik tipler arasında bir ilişki bulunmadı.

Mide kanserinde K-ras kodon 12 nokta mutasyonlarının klinikopatolojik önemi *Lee ve ark.* tarafından 1995 yılında Kore populasyonunda araştırılmıştır. 140 mide kanseri hastasında K-ras kodon 12 nokta mutasyonunun saptanması için PZR yöntemi kullanılmıştır. K-ras kodon 12 mutasyonu sıklığı %7.9 (11/140) olarak saptanmıştır. Klinikopatolojik karakterlerle K-ras kodon 12 mutasyon sıklığı arasında anlamlı olmayan bir fark gözlenmiştir. 26 ay sonraki takiplerde K-ras kodon 12 mutasyonlu yada mutasyonsuz mide kanseri hastaları arasında sağkalım açısından anlamlı bir fark saptanmamıştır. Bu çalışmada midedeki K-ras mutasyonları ile vertikal tümör lokalizasyonu arasındaki korelasyonun önemli olduğu ve mide kanser patogenezinde midedeki tümör lokalizasyonuna nazaran farklı mekanizmalar rol oynayabileceği ileri sürülmüştür (53). Bizim çalışmamızdaki K-ras kodon 12 mutasyon sıklığı ile bu çalışmadaki sıklık benzerdir. Bizim çalışmamızda da klinikopatolojik karakterlerle ve sağkalım ile K-ras kodon 12 mutasyon sıklığı arasında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır.

Mide epitel tümörlerindeki K-ras aktivasyonunu *Miki ve ark.* Japon populasyonunda araştırmışlardır. Bu çalışmada 20 mide kanseri hastasının parafin doku örneklerini kullanarak K-ras onkogeninde kodon 12, 13 ve 61 nokta mutasyonunun saptanması için PZR ve dot-blot yöntemleri kullanılmıştır. Nokta mutasyonları 20 intestinal tümörün 4'ünde (%20) K-ras kodon 12'de (GGT, GAT 3'ü, GTT 1'i) bulunmuştur. Bu mutasyonlar ayrıca dizileme yöntemi ile doğrulanmıştır. 11 diffüz tip tümörde K-ras nokta mutasyonuna rastlanmamıştır (54). Bu çalışmadaki K-ras kodon 12 mutasyon sıklığı bizim çalışmamızdakinden fazladır. Bu fark bize bu çalışmadaki hasta sayısının yetersiz olmasından kaynaklandığını düşündürmektedir.

Kolon adenokarsinomlarında hastaların %20-50'si K-ras mutasyonuna sahip olup bu mutasyonların %90'ı K-ras kodon 12 ve 13'te bulunmaktadır (55). Kolon kanserindeki K-ras mutasyonu 2010 yılında *Yunxia ve ark.* tarafından Çin populasyonunda araştırılmıştır. 101 kolon kanser hastasının parafin blok dokuları kullanılarak K-ras mutasyonlarının saptanması için PZR ve dizileme yöntemi kullanılmıştır. K-ras kodon 12, 13, 45, 69 ve 80'de %32.7 (34/101) oranında mutasyon saptandı. 34 mutasyonun 30'u (%88.2) K-ras kodon 12'de, 1'er tanesi de K-ras kodon 13, 45, 69 ve 80'de saptanmıştır. K-ras mutasyonları kolon kanserinde Çin ve Avrupalılarda benzer sıklıktadır. Çin populasyonunda K-ras kodon 45, 69 ve 80'de yeni mutasyonlar saptandı. Bu çalışmada K-ras kodon 61'de mutasyon saptanmazken, K-ras kodon 13'te sadece 1 hastada mutasyon saptandı (56).

K-ras mutasyonlarının kolon kanserindeki varlığı kötü prognoz ile ilişkilidir (57, 58). Kolon karsinomu hastalarında K-ras kodon 12 ve 13 mutasyonlarını *Ja-Lok Ku ve ark.* 2010 yılında Kore populasyonunda araştırılmıştır. 13 kolon karsinom hastasının hücre kültürü örnekleri kullanılarak K-ras kodon 12 ve 13 mutasyonlarının saptanması için PZR ve dizileme yöntemleri kullanılmıştır. İncelenen 13 hücre kültürü örneğinden 6'sında (%46) K-ras mutasyonu saptandı. K-ras kodon 12 mutasyonu 4 örnekte, K-ras kodon 13 mutasyonu 2 örnekte saptanmıştır (59).

NSCLC hastalarında K-ras kodon 12 ve 13 mutasyonunu *Hatzaki ve ark.* 2001 yılında Yunan populasyonunda araştırmıştır. 70 NSCLC hastasının doku örneklerini kullanarak K-ras kodon 12 ve 13 mutasyonunun saptanması için PZR ve RFLP yöntemleri kullanılmıştır. K-ras kodon 12 mutasyonu %20 (14/70) olarak saptanırken, K-ras kodon 13 mutasyonuna 69 hastanın hiçbirinde rastlanmamıştır. Hastaların %55'i (8/70) adenokarsinomdu yani 20 K-ras kodon 12 mutasyonunun 8'i adenokarsinomdu. K-ras kodon 12 mutasyonu bu kanser tipinde %15-30 arasında iken kolon adenokarsinomlarında %39'lara kadar çıkmaktadır (60). Bu çalışmalardaki K-ras kodon 12 ve kodon 13 mutasyon sıklıklarının bizim çalışmamızdakinden fazla olması kanser türünün farklılığından kaynaklanmaktadır. K-ras kolon ve tiroid kanserlerinde daha sık mutasyona uğramaktadır.

Ras onkogen polimorfizmi 2008 yılında *Fatma Öztürk ve ark.* tarafından Türk populasyonunda araştırılmıştır. 24 tiroid kanser hastası ve 77 kontrol kan örneklerini kullanılarak K-ras geni kodon 12 ve 13, N-ras kodon 12 mutasyonlarının saptanması için PZR ve RFLP yöntemleri kullanılmıştır. K-ras kodon 12 ve 13, N-ras kodon 12'de nokta

mutasyonuna rastlanmamıştır (61). Buna karşılık literatürde ras onkogenleri için tiroid tümörlerde %20-60 mutasyon saptanmıştır. Bu çalışmada hiç mutasyon saptanmamasının sebebi çalışılan hasta sayısının az olmasından kaynaklandığını düşünmekteyiz.

Biz çalışmamızda, K-ras mutasyonu daha çok kodon 12 ve 13'te gözleendiği için bu kodonları inceledik. 62 mide kanseri hastasından EGFR ekspresyonu (+) olan 48 hastanın K-ras kodon 12 nokta mutasyonu %93.62'sinde (44 kişi) yabancı tip (GG), %6.38'inde (3 kişi) heterozigot mutant (GC) olarak bulunmuş olup 1 hastanın parafin blok izolasyonu sonuç vermemiştir. Homozigot mutasyona (CC) rastlanmamıştır. Hasta gruplarında GG genotip sıklığı hem GC ve CC genotiplerine göre fazla bulunmuştur. Hasta bireylerin K-ras 12 mutasyonlarını taşıma sıklığı %6.38 (3/47) olduğundan bu mutasyonlar mide kanseri riski açısından bir anlamlılık taşımamaktadır ($p=1.000$). K-ras kodon 12 ile sağkalım arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır ($p=0.815$). 62 mide kanseri hastasından EGFR ekspresyonu (+) olan 48 hastanın K-ras kodon 13 nokta mutasyonu %74.07'sinde (20 kişi) yabancı tip (CC), %25.93'ünde (7 kişi) heterozigot mutant (CG) olarak bulunmuş olup 1 hastanın parafin blok izolasyonu sonuç vermemiş, 20 hastanın mutasyonu tespit edilememiştir. Homozigot mutasyona (GG) rastlanmamıştır. Hasta gruplarında CC genotip sıklığı hem CG ve GG genotiplerine göre fazla bulundu. Hasta bireylerin K-ras 13 mutasyonlarını taşıma sıklığı %25.93 (7/20) olduğundan bu mutasyonlar mide kanseri riski açısından bir anlamlılık taşımamaktadır ($p= 0.616$). K-ras kodon 13 ile sağkalım arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır ($p=0.655$).

Hedefe yönelik tedaviler, kanserli hücrelerin aberran sinyal algılama ve ileti sistemlerindeki kritik rol oynayan proteinlere karşı geliştirilmiş çeşitli kimyasal yapıda ilaçları içerir. Cetuximab epidermal büyüme faktörü reseptörünün (EGFR, HER 1) sitoplazma dışındaki bölümüne yönlendirilmiş bir monoklonal antikordur. Metastatik kolon kanserinde 2008 yılında *De Roock ve ark.* K-ras yabancı tip için öngörülen cetuximab ile tedavisini Belçika'da araştırılmıştır. 113 metastatik kolon kanser hastasının parafin doku örneklerini kullanarak EGFR için immünohistokimya, K-ras kodon 12 ve 13 mutasyonu için RT-PZR yöntemleri kullanılmıştır. 113 hastanın tamamı EGFR pozitif olarak saptanmış hastalardır. K-ras mutasyonları 113 hastanın 46'sında (%40.7) saptanmıştır (62).

EGFR'e karşı geliştirilmiş antikorlar Cetuximab ve Panitumumab Almanya'da onaylandı. Cetuximab EGFR sinyal yolağını bloke eder. Mutasyonlu K-ras durumunda EGFR

blokajı yolağı baskılayamamaktadır, tümör büyüme ve yayılmaya devam eder. Monoklonal antikorlar ile kolon kanseri tedavisini *Sebastian Stintzing ve ark. 2009* yılında Almanya’da araştırmıştır. EGFR ekspresyonu immünohistokimya yöntemi ile tespit edilmektedir. Metastatik kolon kanseri hastalarının %70’inde EGFR ekspresyonu saptanabilir. Bizim çalışmamızda mide kanserinde EGFR ekspresyonu immünohistokimya yöntemi ile %77.42 (48/62) olarak saptandı. K-ras kodon 12 ve 13 mutasyonlarının belirlenmesi için PCR temelli metodlar ile kullanılır. K-ras mutasyonu kolon kanserinde %30-49 olarak saptanmaktadır. Kalıtsal olmayan kolon kanserinde K-ras mutasyonu %40 civarında bulunmaktadır. K-ras genindeki nokta mutasyonlarının %98.4’ü kodon 12 ve 13’te, çok seyrek olarak kodon 61 ve 63’te olabilmektedir. Cetuximab ve Panitumumab ile tedavisinin K-ras mutasyon varlığında etkisiz olduğu metastatik kolon kanserinin ön tedavi çalışmalarında gösterildi (CRYSTAL çalışması). K-ras genindeki aktif mutasyonlar Cetuximab ve Panitumumab’a karşı direnci gösteren biomarkerlerdir. Bu nedenle Anti-EGFR tedavileri K-ras gen mutasyonlarının belirlenmesi şartı ile metastatik kolon kanseri için onaylanmış bir tedavidir, çünkü anti-EGFR ve kemoterapi kombinasyonu ile K-ras yabanıl tip olan hastalarda beklenen cevap artışı sağlanmıştır. Monoklonal antikorların gelişiminin sonucu olarak (EGFR ve VEGFR) metastatik kolon kanser için spesifik moleküler biyolojik tedavinin önemi artmıştır. Bu nedenle birçok çalışma Cetuximab ve Panitumumab’ın etkinliğini ispat etmiştir (BOND çalışması) (29).

Cetuximab metastatik kolorektal kanser hastalarının birinci basamak tedavisinde hedefe yönelik tedaviler içinde çığır açmıştır. K-ras wt tümörler Cetuximab tedavisi için prediktif biomarkerdir. K-ras mKRR hastalarının birinci basamak tedavisinde standart kemoterapi ile kombinasyonunda yer alan hedefe yönelik tedaviler içinde kullanılan ilk biomarkerdir. Cetuximab tedavisi ile K-ras wt tümörlü mKRR hastalarında progresyon riskinde azalma sağlanır. Cetuximab K-ras wt metastatik kolorektal kanser hastalarının birinci basamak tedavisinde standart kemoterapi ajanları ile kombinasyonunda yeni bir tedavi seçeneğidir. mKRR birinci basamak hastaların tedavi stratejisi belirlenmeden önce K-ras gen analizi yapılmalıdır. Sonuçlarımıza göre kolorektal kanser (*Derek J Jonker ve ark. 2007*) (63) (*Carsten Bokemeyer ve ark. 2008*) (64) ve baş boyun kanserlerinde (*James A. Bonner ve ark. 2006*) (65) (*Jan B. Vermorken 2008*) (66) etkili olduğu belirlenen Cetuximab’ın (Merck-Serono) mide kanserinde de için de etkili olabileceği düşünülmektedir. Bu nedenle bu ilaçları kullananların yanıtlarının K-ras mutasyonuna göre karşılaştırma çalışmaları yapılmalıdır. Çalışmanın hasta

sayısı arttırılmalı ve mutasyon sıklıkları dizileme yöntemi ile doğrulanmalıdır. Öncelikle K-ras kodon 61 ve sonrasında diğer kanser türlerinde mutasyon belirlenen kodonlar için K-ras mutasyon taraması yapılmalıdır.

8. SONUÇ

Bu çalışmada amaç mide kanser hastalarının prognostik ve prediktif faktör olarak EGFR ekspresyonu ve K-ras mutasyonları incelenmesiydi. Çalışmada parafin bloklar kullanıldı. Çalışmaya alınan hasta grubunun demografik özelliklerinin genel olarak literatürle uyumlu olması bu grubun genel mide kanseri popülasyonunu temsil edebileceğini göstermektedir.

EGFR ekspresyonunun hastalığın evresi, yaş, zaman, lenf nodu sayısı, tümör çapı, cinsiyet, mikroskopik tip, lenf nodu metastazı, tümör tipi, makroskopik tip ve sağkalım ile arasında anlamlı bir korelasyon bulunmuş olması çalışmamız kısıtlı sayıda hastadan oluşmasına rağmen mide kanserinde EGFR ekspresyonu ile korelasyon gösteren patolojik sonuç olmadığını göstermektedir.

Sağkalım ile evre, yaş ve mikroskopik tip arasında anlamlı bir ilişki saptanmış olması bu verilerin sağkalım için klinik olarak önemli bir parametre olabileceğini düşündürmektedir.

EGFR ekspresyonu ile K-ras kodon 12 ve 13 mutasyonu ve sağkalım arasında anlamlı bir ilişki görülmedi.

Sonuç olarak, EGFR ekspresyonu pozitif (+) olan hastaların K-ras kodon 12 ve 13 mutasyonu için yabancı tip allel (C/C ve G/G) taşıyan hastaların Cetuximab'a (Merck-Serono) iyi cevap verdiği ve proliferasyonu engellediği daha önce yapılan çalışmalarda belirlenmiş olup, çalışmamızdaki sonuçlarımızdan yola çıkarak Türk popülasyonundaki yabancı tip allel sıklığının oldukça yüksek oranda olması bize bu ilacın muhtemelen mide kanserinde de fayda sağlayabileceğini düşündürmektedir. Sonuçlar mide kanseri tedavi sürecinde bu mutasyonların analizinin rutin olarak kullanılabilmesini akla getirmektedir. Bulunan mutasyon sıklıklarını dizileme yöntemi ile doğrulayacağız. Çalışmaya hasta sayısını arttırarak devam etmekteyiz. Ayrıca K-ras kodon 61 için de mutasyon taraması yapacağız.

9. TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim süresince ve tezimin her türlü aşamasında bana her türlü bilimsel desteği sağlayan, değerli görüş ve katkılarını esirgemeyen tez danışmanım Prof. Dr. Tuncay ALTUĞ'a çok teşekkür ederim.

Hasta örneklerinin toplanması, hasta verilerinin oluşturulması ve tezimin her aşamasında bana bilimsel destek veren Prof. Dr. Gökhan DEMİR ve Prof. Dr. Gülen DOĞUSOY ve Dr. Fatmahan ATALAR'a teşekkür ederim. Laboratuvar çalışmalarındaki bilimsel yardımları için Melike ERSÖZ, Türkan SARIOĞLU ve Gökçe AKAN'a teşekkür ederim. Bıkmadan her gerektiğinde yardımını benden esirgemeyen Enstitü Sekreterimiz İlknur KARAOSMANOĞLU'na, ihtiyaç duyduğum her durumdaki destekleri ve yardımları için yüksek lisans arkadaşlarım Tuğba TARHAN ve Hasan ARSLANYÜREĞİ'ne teşekkür ederim.

Tez deneylerimi gerçekleştirebilmem için maddi destekte bulunan Merck-Serono firmasına teşekkür ederim.

Tüm yaşamım ve eğitim hayatım boyunca desteğini biran bile eksik etmeyen aileme ve nişanlıma çok teşekkür ederim.

10. KAYNAKLAR

1. Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin DM. GLOBOCAN 2002: Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide. IARC Cancer Base No. 5, version 2.0, Lyon (France): IARC Press, 2004.
2. Mackay J, Jemal A, Lee NC, Parkin DM. The Cancer Atlas. American Cancer Society, 2006.
3. Karaoğuz H, İçli H. Cancer problem in Türkiye. *J Ankara Med School*. 1993, 15: 547-558.
4. Haskell Saunders. Cancer Treatment. . Philadelphia, W.B. Saunders Company, 2000.
5. Albeloff MD, Armitage JO, Licker AS, Niederhuber JE. Clinical Oncology. Newyork, Churchill Livingstone, 2000.
6. Miettinen PJ, Berger JE, Meneses J, Phung Y, Pederson RA, Werb Z, and Derynck R. Epithelial immaturity and multiorgan failure in mice lacking epidermal growth factor receptor. *Nature*. 1995, 376: 337-341.
7. Demirelli F. Kanserin Moleküler Genetik Temelleri. *İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri: Güncel Klinik Onkoloji Sempozyum Dizisi*. 2003, 37: 9-15.
8. Tabin CJ, Bradley SM, Bargmann CI. Mechanism of activation of a human onkogene. *Nature*. 1982, 300: 143-149.
9. Ümit Lüleyap. Moleküler Genetiğin Esasları. Adana, Nobel Kitabevi, 2008.
10. Geoffrey M. Cooper, Robert E. Hausman. Hücre: Moleküler Yaklaşım. Çeviri Editörleri: Meral Sakızlı, Neşe Atabey. İzmir, İzmir Tıp Kitabevi, 2006.
11. Cox AD, Der CJ. Farnesyltransferase inhibitors and cancer treatment: Targeting simply ras. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1997, 1333: F51-F71.
12. Bos JL. Ras onkogenes in human cancer. *Cancer Res*. 1989, 49: 4682-4689.
13. Carether JM. The cellular and molecular pathogenesis of colorectal cancer. *Gastroenterology Clinics of North America*. 1996, 25: 737-754.
14. William S. Klug, Michael R. Cummings. Genetik Kavramlar. Çeviri Editörü: Cihan Öner. Ankara, Palme Yayıncılık, 2003.
15. Lowry DR. Function and regulation of ras. *Annu. Rev. Biochem*. 1993, 62: 851-891.
16. İsmail Savaş. Onkogenler. *T Klin Tıp Bilimleri*. 1995, 15: 374-377.
17. Hanahan D, Weinberg R. The Hallmarks of Cancer. *Cell*. 2000. 100: 57-70.

18. Kumar V, Abbas AK, Fausto N. Neoplasia in Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease. 7th Edition, Philadelphia, Elsevier Saunders Company, 2005.
19. Oh JH, Ku JL, Yoon KA, Kwon HJ, Kim WH, Park HS, Yeo KS, Song SY, Chung JK and Park JG. Establishment and characterization of 12 human colorectal-carcinoma cell lines. *Int. J. Cancer*. 1999, 81: 902-910.
20. Barbacid M. Ras genes. *Annu Rev Biochem*. 1987, 56: 779-827.
21. Bos JL. Ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res*. 1989, 49: 4682-4689.
22. <http://ghr.nlm.nih.gov/gene=kras>
23. Cohen S. Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new-born animal. *J Biol Chem*. 1962, 237: 1555-1562.
24. Cohen S, Carpenter G, King L, Jr. Epidermal growth factor-receptor-protein kinase interactions. Co-purification of receptor and epidermal growth factor-enhanced phosphorylation activity. *J Biol Chem*. 1980, 255: 4834-4842.
25. De Larco JE, Todaro GJ. Epitheloid and fibroblastic rat kidney cell clones: epidermal growth factor (EGF) receptors and the effect of mouse sarcoma virus transformation. *J Cell Physiol*. 1978, 94: 335-342.
26. <http://cancergrace.org/lung/2009/03/20/np-egfr-muts-demystified/>
27. Burgess AW, Hyun-Soo C, Eigenbrot C, Ferguson KM, Garrett TPJ, Leahy DJ, Lemmon MA, Sliwkowski MX, Ward CW, Yokoyama S. An open-and-shut case. Recent insights into the activation of EGF/Erb Receptors. *Molecular Cell*. 2003, 12: 541-552.
28. Eppenberger U, Mueller H. Growth factor receptors and their ligands. *J Neurooncol*. 1994, 22: 249-254.
29. Sebastian Stintzing, Volker Heinemann, Andreas Jung, Nicolas Moosmann, Wolfgang Hiddemann, Thomas Kirchner. The Treatment of Colorectal Cancer With Monoclonal Antibodies. *Dtsch Arztebl Int*. 2009, 106(12): 202-206.
30. Harari PM, Allen GW, Bonner JA. Biology of interactions: antiepidermal growth factor receptor agents. *J Clin Oncol*. 2007, 25: 4057-4065.
31. Wells A. EGF receptor. *Int J Biochem Cell Biol*. 1999, 31: 637-643.
32. Karunagaran D, Tzahar E, Beerli RR, Chen X, Graus-Porta D, Ratzkin BJ, Seger R, Hynes NE, Yarden Y. ErbB2 is a common auxiliary subunit of NDF and EGF receptors: implications for breast cancer. *Embo J*. 1996, 15: 254-264.

33. <http://pharma.sourcebioscience.com/drug-development/market/kras>
34. Hermann Brenner, Dietrich Rothenbacher and Volker Arndt. Epidemiology of Stomach Cancer. *Methods of Molecular Biology, Cancer Epidemiology*. 2009, vol. 472: 467-477.
35. Parkin DM, Bary F, Ferlay J, Pisani P. Global Cancer Statistics, 2002. *CA Cancer J Clin*. 2005, 55: 74-108.
36. S. Yalcin. Gastric Cancer in Turkey-A Bridge Between West and East. *Gastrointest Cancer Res*. 2009, 3: 29-32.
37. Albeloff MD, Armitage JO, Lictor AS, Niederhuber JE. *Clinical Oncology*, Newyork, Churchill Livingstone, 2000.
38. Firat D, Celik I. Cancer statistics in Turkey and in the world 1993–1995. Turkish Association for Cancer Research and Control, Ankara, 1998.
39. Tuncer I, Topcu N, Ugras S, Turkdogan K, Kotan C, Kosem M. Van gölü havzasında gastrointestinal kanserlerin dağılımı; 1002 olgunun analizi. *T Klin J Gastroenterohepatol*. 2003, 14: 161–166.
40. Buğra D. Erken evre mide kanserine yaklaşım. Cerrahi ilkeler ve Türkiye’de durum. Mide Tümörleri Sempozyumu, İstanbul, 17–18 December 2004.
41. Nazli O, Derici H, Tansug T, Yaman I, Bozdog AD, Isgüder AS, Bölükbaşı H. Survival analysis after surgical treatment of gastric cancer: review of 121 cases. *Hepatogastroenterol*. 2007, 54: 625–629.
42. Skeel RT. Antineoplastic drugs and biologic response modifiers: Classification, use and toxicity of clinically useful agents. *Handbook of Cancer Chemotherapy*, 6th Edition, LWW, 2003, 53-157.
43. Gibson TB, Ranganathan A, Grothey A. Randomized phase III trial results of panitumumab, a fully human anti-epidermal growth factor receptor monoklonal antibody, in metastatic colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer*. 2006 May, 6(1): 29-31.
44. Cunningham D, Humblet Y, Siena S, Khayat D, Bleiberg H, Snatoro A, Bets D, Mueser M, Harstrick A, Verslype C, Chau I, Van Cutsem E. Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2004 Jul 22, 351(4): 337-345.

45. Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, Cartwright T, Hainsworth J, Heim W, Berlin J, Baron A, Griffing S, Holmgren E, Ferrara N, Fyfe G, Rogers B, Ross R, Kabbinavar F. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2004 Jun 3, 350(23): 2335-2342.
46. Levi S, Urbano-Ispizua A, Gill R, Thomas DM, Gilbertson J, Foster C, Marshall CJ. Multiple K-ras codon 12 mutations in cholangiocarcinomas demonstrated with a sensitive polymerase chain reaction technique. *Cancer Research*. 1991. 51: 3497–3502.
47. Demir G, Ünsal D, Zengin N, Er Ö, Dane F, Yalçın Ş. Opere 840 mide kanserli hastada prognostik faktörler. TOG. Gastrointestinal Tümörler Grubu Çalışması, Medical Oncology Congress, Antalya; 2008, (abstr SB15).
48. Meyers WC, Damiano RJ, Postlethwait, Rotolo FS. Adenokarsinoma of the stomach. *Ann urg*. 1987, 205: 1-8.
49. SR Alberts, A Cervantes, CJH van de Velde. Gastric cancer: epidemiology, pathology and treatment. *Annals of Oncology*. 2003, 14 (Supplement 2): ii31-ii36.
50. Finkelstein SD, Sayegh R, Christensen S. Genotypic classification of colorectal adenocarcinoma. *Cancer*. 1993. 71: 3827-3838.
51. K Kimura, T Nagasaka, N Hoshizima, H Sasamoto, K Notohara, M Takeda, K Kominami, T Iishii, N Tanaka and N Matsubara. No Duplicate KRAS Mutation is Identified on the Same Allele in Gastric or Colorectal Cancer Cells with Multiple KRAS Mutations. *The Journal of International Medical Research*. 2007, 35: 450-457.
52. Yashiro M, Nishioka N, Hirakawa K. K-ras mutation influences macroscopic features of gastric carcinoma. *J Surg Res*. 2005, 124 (1): 74-78.
53. Lee KH, Lee JS, Suh C, Kim SW, Kim SB, Lee JH, Lee MS, Park MY, Sun HS, Kim SH. Clinicopathologic significance of the K-ras gene codon 12 point mutation in stomach cancer. An analysis of 140 cases. *Cancer*. 1995, 75 (12): 2794-2801.
54. H. Miki, M. Ohmori, AO Perantoni and T Enomoto. K-ras activation in gastric epithelial tumors in Japanese. *Cancer letters*. 1991. 58: 107-113.
55. Shaw P, Tardy S, Benito E, Obrador A, Costa J. Occurrence of Ki-ras and p53 mutation in primary colorectal tumors. *Oncogene*. 1991. 6: 2121–2128.
56. Zuo Yunxia, Cao Jun, Zhu Guanshan, Lu Yachao, Zhou Xueke, Li Jin. Mutations in epidermal growth factor receptor and K-ras in Chinese patients with colorectal cancer. *BMC*

Medical Genetics. 2010. doi: 10.1186/1471-2350-11-34.

57. Andreyev HJ, Norman AR, Cunningham D, Oates J, Dix BR, Iacopetta BJ, Young J, Walsh T, Ward R, Hawkins N, Beranek M, Jandik P, Benamouzig R, Jullian E, Laurent-Puig P, Olschwang S, Muller O, Hoffmann I, Rabes HM, Zietz C, Troungos C, Valavanis C, Yuen ST, Ho JW, Croke CT, O'Donoghue DP, Giaretti W, Rapallo A, Russo A, Bazan V, Tanaka M, Omura K, Azuma T, Ohkusa T, Fujimori T, Ono Y, Pauly M, Faber C, Glaesener R, de Goeij AF, Arends JW, Andersen SN, Lovig T, Breivik J, Gaudernack G, Clausen OP, De Angelis PD, Meling GI, Rognum TO, Smith R, Goh HS, Font A, Rosell R, Sun XF, Zhang H, Benhattar J, Losi L, Lee JQ, Wang ST, Clarke PA, Bell S, Quirke P, Bubb VJ, Piris J, Cruickshank NR, Morton D, Fox JC, Al-Mulla F, Lees N, Hall CN, Snary D, Wilkinson K, Dillon D, Costa J, Pricolo VE, Finkelstein SD, Thebo JS, Senagore AJ, Halter SA, Wadler S, Malik S, Krtolica K and Urosevic N. Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the 'RASCAL II' study. *Br. J. Cancer*. 2001. 85: 692-696.

58. Goh HS, Elnatan J, Low CH and Smith DR. p53 point mutation and survival in colorectal cancer patients: effect of disease dissemination and tumour location. *Int. J. Oncol*. 1999. 15: 491-498.

59. Ja-Lok Ku, Young-Kyoung Shin, Duck-Woo Kim, Kyung-Hee Kim, Jin-Sung Choi, Sung-Hye Hong, You-Kyung Jeon, Sung-Hee Kim, Hong-Sun Kim, Jae-Hyun Park, Il-Jin Kim and Jae-Gahb Park. Establishment and Characterization of 13 Human Colorectal Carcinoma Cell Lines: Mutations of Genes and Expressions of Drug Sensitivity Genes and Cancer Stem Cell Markers. *Carcinogenesis*. 2010. doi:10.1093/carcin/bgq043.

60. A. Hatzaki, E. Razi, K. Anagnostopoulou, K. Iliadis, A. Kodaxis, D. Papaioannou, S. Labropoulos, M. Vasilaki, P. Kosmidis, A. Saetta, M. Mihalatos and G. Nasioulas. A modified mutagenic PCR-RFLP method for K-ras codon 12 and 13 mutations detection in NSCLC patients. *Molecular and Cellular Probes*. 2001. 15: 243-247.

61. Fatma Öztürk, Cihan Daloğlu, Leyla Açık, Mehmet Kılıç, Mahmut Koç. Ras oncogenes polymorphism in Turkish thyroid cancer patients. *Advances in Molecular Biology*. 2008. 2: 67-70.

62. W. De Roock, H. Piessevaux, J. De Schutter, M. Janssens, G. De Hertogh, N. Personeni, B. Biesmans, J.L. Van Laethem, M. Peeters, Y. Humblet, E. Van Cutsem, S. Tejpar. KRAS wild-type state predicts survival and is associated to early radiological response in metastatic

colorectal cancer treated with cetuximab. *Annals of Oncology*. 2008. 19: 508-515.

63. Derek J. Jonker, Chris J. O'Callaghan, Christos S. Karapetis, John R. Zalcberg, Dongsheng Tu, Heather-Jane Au, Scott R. Berry, Marianne Krahn, Timothy Price, R. John Simes, Niall C. Tebbutt, Guy van Hazel, Rafal Wierzbicki, Christiane Langer and Malcolm J. Moore. Cetuximab for the Treatment of Colorectal Cancer. *N Engl J Med*. 2007. 357: 2040-2048.

64. Carsten Bokemeyer, Igor Bondarenko, Anatoly Makhson, Joerg T. Hartmann, Jorge Aparicio, Filippo de Braud, Serban Donea, Heinz Ludwig, Gunter Schuch, Christopher Stroh, Anja H. Loos, Angela Zobel, and Piotr Koralewski. Fluorouracil, Leucovorin, and Oxaliplatin With and Without Cetuximab in the First-Line Treatment of Metastatic Colorectal Cancer. *J Clin Oncol*. 2008. 27: 1-11.

65. James A. Bonner, Paul M. Harari, Jordi Giralt, Nozar Azarnia, Dong M. Shin, Roger B. Cohen, Christopher U. Jones, Ranjan Sur, David Raben, Jacek Jassem, Roger Ove, Merrill S. Kies, Jose Baselga, Hagop Yousoufian, Nadia Amellal, Eric K. Rowinsky and K. Kian Ang. Radiotherapy plus Cetuximab for Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck. *N Engl J Med*. 2006. 354: 567-578.

66. Jan B. Vermorken, Ricard Mesia, Fernando Rivera, Eva Remenar, Andrzej Kawecki, Sylvie Rottey, Jozsef Erfan, Dmytro Zabolotnyy, Heinz-Roland Kienzer, Didier Cupissol, Frederic Peyrade, Marco Benasso, Ihor Vynnychenko, Dominique De Raucourt, Carsten Bokemeyer, Armin Schueler, Nadia Amellal and Ricardo Hitt. Platinum-Based Chemotherapy plus Cetuximab in Head and Neck Cancer. *N Engl J Med*. 2008. 359: 1116-1127.