

**T.C.
HALIÇ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK PROGRAMI**

**MİDE KANSERİNDE MMP-21 C572T (rs10901425)
POLİMORFİZMİNİN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Hazırlayan
Melike ÖMERUSTAOĞLU**

**Danışman
Doç. Dr. Burcu IRMAK YAZICIOĞLU**

İstanbul – 2016

**T.C.
HALIÇ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK PROGRAMI**

**MİDE KANSERİNDE MMP-21 C572T (rs10901425)
POLİMORFİZMİNİN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Hazırlayan
Melike ÖMERUSTAOĞLU**

**Danışman
Doç. Dr. Burcu IRMAK YAZICIOĞLU**

İstanbul – 2016

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

Moleküler Biyoloji Ve Genetik Yüksek Lisans Öğrencisi Melike ÖMERUSTAOĞLU tarafından hazırlanan "*Mide Kanserinde MMP-21C572T(rs10901425)Polimorfizminin İncelenmesi*" konulu çalışması jürimizce Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi : 23.06.2016

(Jüri Üyesinin Ünvanı, Adı, Soyadı ve Kurumu):

İmzası

Jüri Üyesi : Doç.Dr.Burcu IRMAK YAZICIOĞLU
: Haliç Üniv.

Jüri Üyesi :Doç.Dr Hatice YORULMAZ
: Haliç Üniv.

Jüri Üyesi :Yrd.Doç.Gülay BAYSAL
: İstanbul Aydın Üniv.

Bu tez Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulunun kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Oya Oğuz
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdür V.

ÖNSÖZ

Bu çalışma 2015-2016 yılları arasında T.C Haliç Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nün bilimsel araştırma ve uygulama çalışmalarına verdiği destek ile hazırlanmıştır.

Yüksek lisans eğitimim ve çalışmamın tamamlanması süresince büyük bir gayret ve özveriyle çalışmamı takip eden, gösterdiği sabır ve hoş görüşle bana destek olan tez danışmanım sayın Doç. Dr. Burcu IRMAK YAZICIOĞLU'na; tez çalışmam süresince benden ilgisini, sabrını, bilgisini ve hoşgörüsünü eksik etmeyen Sayın Arş. Gör. Anıl CEBECİ'ye çok teşekkür ederim.

Tüm hayatım boyunca her başım sıkıştığında yanımda olan, beni bu günlere getiren maddi ve manevi desteklerini benden esirgemeyen, verdiğim her kararın arkasında yanımda olan en yakın arkadaşım ablam Merve Ömerustaoğlu ve babam Aydın Ömerustaoğlu'na; enerji kaynağım kardeşim Can ÖMERUSTAOĞLU'na, beni bu günlere getiren başarabileceğime inanan annem Melek ÖMERUSTAOĞLU'na sonsuz teşekkür ederim.

Tez Çalışmam boyunca bana yardımcı olan sevgili meslek arkadaşım Furkan ÖZBAY'a çok teşekkür ederim.

İstanbul, 2016

Melike ÖMERUSTAOĞLU

İÇİNDEKİLER

Sayfa No.

ÖNSÖZ.....	
KISALTMALAR.....	III
ŞEKİLLER.....	V
TABLolar.....	VI
ÖZET.....	VII
ABSTRACT.....	VIII
1.GİRİŞ.....	1
1.1. Kanser Biyolojisi.....	1
1.1.1. Kanser Hücrelerinin Genel Özellikleri.....	2
1.1.2. Kansere Neden Olan Faktörler.....	3
1.1.3. Türkiye’de Kanser İstatistikleri.....	5
1.2. Mide Kanseri.....	7
1.2.1. Mide Anatomisi ve Midenin Bölümleri.....	7
1.2.2. Mide Kanseri Etiyolojisi.....	9
1.2.3. Mide Kanseri Evreleme (TNM Sistemi) –WHO 2000.....	10
1.2.4. Mide Kanserine Neden Olan Prognostik Faktörler.....	11
1.3. Matris Metalloproteinazlar (MMP’ ler).....	14
1.3.1. Matrisin Aile Üyeleri.....	15
1.3.2. Matrisin Gen İfadesinin Düzenlenmesi.....	18
1.3.3. Matris Metalloproteinazlar, ESM ve Kanser.....	19
1.3.4. Matris Metalloproteinazlar’ın Kanser Gelişimindeki Rolü.....	20
1.3.4.1. MMP’lerin Büyüme Sinyallerine Etkisi.....	20
1.3.4.2. MMP’ler Neoanjiyogenezi Düzenler.....	21
1.3.4.3. MMP’ler Apoptozu Düzenler.....	21
1.3.4.4. MMP’ler Tümör Hücrelerindeki İnvazyon ve Metastaz Düzenler.....	21
1.4. MMP-21.....	22
2. AMAÇ.....	24
3. MATERYAL.....	26
3.1. Araştırmada Kullanılan Örnekler.....	26
3.2. Ağız İçi Epitel Doku DNA izolasyonunda Kullanılan Solüsyonlar.....	26
3.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) Tamponları ve DNA Enzimi.....	27
3.4. Primerler.....	27
3.5. Restriksiyon Enzimi ve Restriksiyon Tamponu.....	27

3.6. Elektroforez İçin Kullanılan Tampon ve Kimyasallar.....	28
3.7. DNA Büyüklük Markerları.....	28
3.8. Cihazlar ve Markalar.....	28
4.METOD	30
4.1. Primer Tasarımı.....	30
4.2. DNA İzolasyonu.....	30
4.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	31
4.4. Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi.....	32
4.5. Agaroz Jel Elektroforezi.....	33
4.6. İstatistiksel Veri Analizi.....	34
5. SONUÇ	35
5.1. Örneklerin Tanımı.....	35
5.2. MMP-21 Geni Promotör Bölgesi 572C/T Polimorfizminin PZR-RFLP Yöntemi ile Moleküler Analizi.....	35
5.2.1. İlgili Gen Bölgesinin PZR ile Çoğaltılması.....	35
5.2.2. PZR Ürünlerinin Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi.....	36
5.3. Verilerin İstatistiksel Analizi.....	37
6. TARTIŞMA	41
7. KAYNAKLAR	44
8.ÖZGEÇMİŞ	49

KISALTMALAR

A: Adenin

A: Amper

Bç, Bp: Baz çifti

C: Sitozin

CDK: Siklin Bağımlı Kinaz

dk: Dakika

DNA: Deoksiribonükleik Asit

dNTPs: Deoksiribonükleotid

EDTA: Etilendiamin Tetraasetik Asit

EGF: Epidermal Büyüme Faktörü

ESM: Ekstrasellüler Matris

EtBr: Etidyum Bromür

g: Gram

G: Guanin

GPI: Glikozilfosfatidilinositol

FGF: Fibroblast Büyüme Faktörü

H.pylori: Helikobakter Pylori

IL-6: İnterlökin-6

K: Kontrol

Kb: Kilo Baz

M: Metastaz

mA: Miliamper

mg: Miligram

MgCl₂: Magnezyum Klorür

µg: Mikrogram

ml: Mililitre

μ l: Mikrolitre
mM: Milimolar
MMP: Matris Metallaproteinaz
MSI: Genetik Kararsızlık
MT-MMP: Membran Tip Matris Metallaproteinaz
N.K: Negatif Kontrol
N: Nodal
N: Normal
NaCl: Sodyum Klorür
P.K: Pozitif Kontrol
PZR : Polimeraz Zincir Reaksiyonu
Rasi: Romatoid Artrit
Rb : Retinoblastoma
RFLP: Restriksiyon Fragman Uzunluk Polimorfizmi
SNP: Tek Nükleotid Polimorfizmi
sn: Saniye
T: Tümör
TBE: Tris-Borik Asit-EDTA
TE: Tris-EDTA
TGF: Transformasyon Büyüme Faktörü
TIMP: MMP Doku İnhibitörleri
TNF: Tümör Nekroziz Faktör
U: Ünite
UV: Ultraviyole
V: Volt
VEGF: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
WHO: Dünya Sağlık Örgütü

ŞEKİLLER

Sayfa No

Şekil 1.1. DNA hasarına neden olan faktörler ve DNA hasarının sonuçları.....	1
Şekil 1.2. Kanser hücrelerinin genel özellikleri.....	4
Şekil 1.3. Midenin kısımları.....	8
Şekil 1.4. MMP' lerin domain yapısı.....	15
Şekil 4.1. PZR ile çoğaltılacak hedef bölgenin belirlenmesi.....	30
Şekil 5.1 MMP-21 572 C/T polimorfizm Bölgesinin PZR ile Amplifikasyonu sonuçlarının %2'lik Agaroz Jelde Görünümü	36
Şekil 5.2 Kontrol grubunun PZR sonuçlarının %2'lik Agaroz jelde görünümü.....	36
Şekil 5.3 Polimorfik Promotör Bölgesi Yapılan Örneklerin RFLP sonuçlarının %3'lük Agaroz Jelde Görünümü.....	37
Şekil 5.4 Kontrol grubunun RFLP sonucunda % 3'lük Agaroz jelde görünümü.....	37

TABLolar

Sayfa No

Tablo 1.1. Erkeklerde En Sık Görülen 10 Kanserin Yaşa Göre Standardize Edilmiş Hızları.....	6
Tablo 1.2. Kadınlarda En Sık Görülen 10 Kanserin Yaşa Göre Standardize Edilmiş Hızları.....	6
Tablo 1.3. MMP'lerin kromozomal bölgesi ve geleneksel adları.....	16
Tablo 3.1. MMP-21 geni 572C/T polimorfizm bölgesini oluşturup çoğaltmak için kullanılan primerler.....	27
Tablo 3.2. Kullanılan cihazlar ve markalar.....	29
Tablo 4.1. PZR bileşenleri ve miktarları	31
Tablo 4.2. PZR koşulları	31
Tablo 4.3. RFLP reaksiyon miktarları.....	32
Tablo 4.4: Agaroz jel konsantrasyonları, kullanılan yöntemler ve yükleme koşulları.....	34
Tablo 5.1 Kontrol grubunun belirli karakteristik özelliklerine göre yüzdeleri.....	35
Tablo 5.2. Hasta/sağlıklı bireylerin dokularına ait MMP-21 572C/T genotip-allelotip sayıları ve yüzdeleri.....	38
Tablo 5.3. Hasta ve kontrol gruplarının Hardy Weinberg dengesine göre genotip dağılımı...38	
Tablo 5.4. Genotipik grupların tümör oluşumu üzerindeki etkilerinin Lojistik Regresyon ile incelenmesi.....	39
Tablo 5.5. Farklı genotipik grupların tümör evreleri arasındaki ilişkisi.....	39
Tablo 5.6. Tümör nekroz varlığının farklı genotipik frekanslarla ilişkisi.....	39
Tablo 5.7. Tablo Mide kanser hastalarının belirli karakteristik özelliklerine göre yüzdeleri ve Fisher kesin olasılık testi analizi.....	40

GENEL BİLGİLER

Adı ve Soyadı: Melike ÖMERUSTAOĞLU

Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Programı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Meliha Burcu IRMAK YAZICIOĞLU

Tez Türü ve Tarihi: Yüksek Lisans – Mayıs 2016

ÖZET

MİDE KANSERİNDE MMP-21 C572T (rs10901425) POLİMORFİZMİNİN İNCELENMESİ

Dünyada kansere bağlı ölümlerde 2. Sırada yer alan mide kanseri, Çin, Japonya, doğu Avrupa ve Latin Amerika gibi ülkelerde görülür. Beslenme, tütün ve alkol tüketimi, bakteriyel ve viral enfeksiyonlar (*Helicobakter pylori*, *Mycoplasma*, *Epstein-barr*), kan grubu ve genetik modifikasyonlar mide kanserine neden olan faktörler arasında sayılabilir. Matris metalloproteinazlar, ekstraselüler matris proteinlerinin bozulmasına neden olan ve tümör gelişiminde anahtar rol oynayan proteinazlardır. Ekstraselüler matrisdeki yıkılma tümör ilerlemesi sırasında doku invazyonuna katkıda bulunmaktadır. MMP-21 572C/T polimorfizmi meme kanseri, hepataselüler karsinoma, mide kanseri, pankreatik kanser, over kanser, mesane kanseri, prostat kanseri gibi çeşitli kanser türlerinde tümör invazyonu ile ilişkilidir.

Bu tez çalışmasındaki amaç, MMP-21 geni 572C/T polimorfizminin mide kanseri ile arasındaki ilişkinin araştırılması amaçlanmaktadır. Bu amaçla mide kanseri hastalarından ve sağlam kişilerden alınmış mide doku örneklerinde PCR-RFLP metodu çalışılarak MMP-21 572C/T polimorfizminin mide kanserindeki rolü aydınlatılmaya çalışılmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda MMP-21 C572T polimorfizmi ile mide kanserine yatkınlık ve belirli karakteristik özellikler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanamamıştır.

Anahtar kelimeler: Mide kanseri, Ekstraselüler matris, Matris metalloproteinazlar, MMP-21, Polimorfizm.

GENERAL INFORMATION

Name and Surname: Melike ÖMERUSTAOĞLU

Department: Molecular Biology and Genetics

Program: Molecular Biology and Genetics

Supervisor : Associate. Doc. Dr. Meliha Burcu IRMAK YAZICIOGLU

Degree Awarded and Date : Master of Science – May 2016

SUMMARY

THE 572 C/T POLYMORPHISM ANALYSIS OF MMP-21 PROMOTOR REGIONS IN GASTRIC CANCER

Gastric cancer, which is the second lethal type of cancer in the world, is seen more in China, Japan, eastern Europe and Latin America. Smoking, sex, alcohol, diet, helicobacter pylori infection, etc. are among the environmental factors and blood type is among the genetic factor, which affecting gastric cancer. Matrix metalloproteinases are proteinases that participate in ECM degradation and which plays a key role in tumor development. During tumor progression contributes tissue invasion in the degradation of ECM. MMP-21 572 C/T polymorphism breast cancer, hepatocellular carcinoma, gastric cancer, pancreatic cancer, ovarian cancer, bladder cancer are associated with tumor invasion .

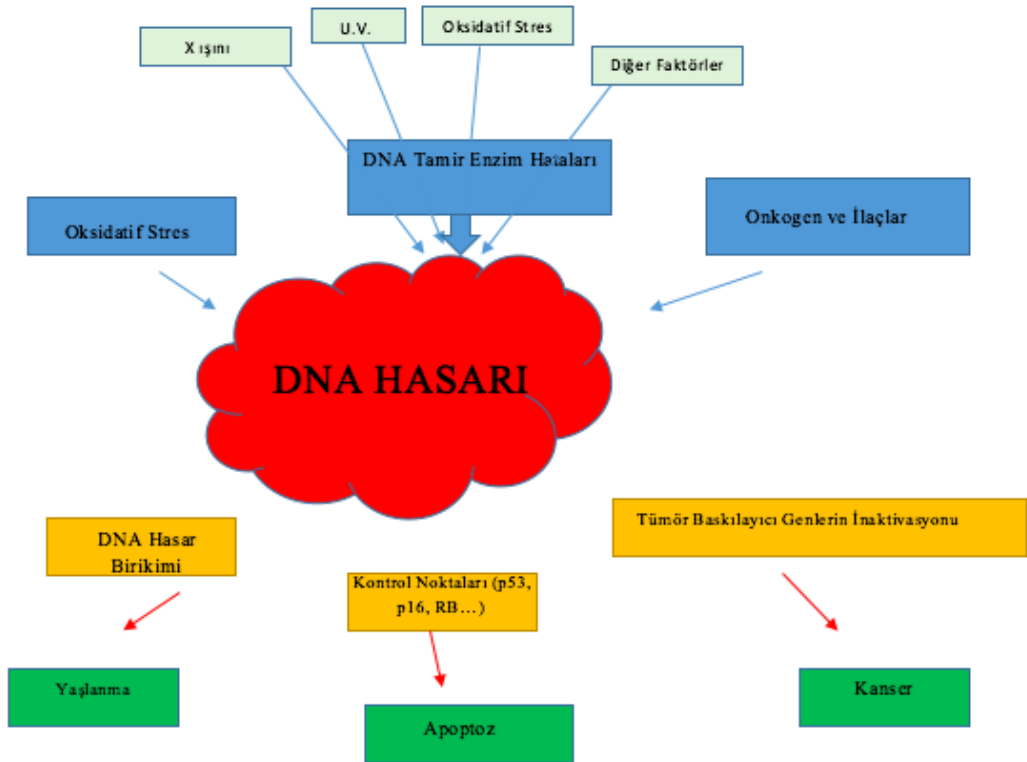
The aim of this thesis is to investigate the relationship between C/T single nucleotid polymorphism observed in MMP-21 gene promoter region 572th position and gastric cancer. In this context MMP -21 572 C/T single nucleotid polymorphisms were determined with the method of polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism in who has gastric cancer and healthy people. The studies resulted in MMP-21 C572T polymorphisms with susceptibility to gastric cancer and not a statistically significant difference between certain characteristics .

Key Words: Gastric Cancer, MMP-21, Extracellular matrix, Matrix metalloproteinases, Polymorphism.

1.GİRİŞ

1.1.Kanser Biyolojisi

Kanser terimi; hücrelerin farklılaşma yeteneklerini kaybetmeleri, sınırsız replikasyon potansiyeli, programlanmış hücre (apoptoz) ölümünden kaçınma, doku invazyonu ve metastazı gibi özellikleri hücreler için mutasyon ve seleksiyon içeren çok basamaklı bir süreç olarak tanımlanmaktadır (Brooks ve diğ., 1998).



Şekil 1.1. DNA hasarına neden olan faktörler ve DNA hasarının sonuçları (Hanahan ve Weinberg'den modifiye edilmiştir)

1.1.1. Kanser Hücrelerinin Genel Özellikleri

- **Büyüme Sinyallerinin Kendi Kendine Yeterliliği:**

Kanser hücreleri, proliferasyonu devam ettirebilirler. Diğer taraftan kanser hücreleri otokrin stimülasyona yol açan kendi büyüme faktörlerini de sentezlerler. Ayrıca büyüme faktörlerinden yararlanabilmek için çevrelerindeki normal hücreleri de stimüle edebilirler. Hücre yüzeyindeki reseptörlerin aşırı ekspresyonu ile kanser hücrelerinin büyüme faktörleri sinyallerine aşırı duyarlı hale gelmesine neden olabilirler (Hanahan ve Weinberg, 2000).

- **Büyüme baskılayan sinyallere karşı duyarsızlık:**

Hücre büyümesi ve proliferasyonun sınırlı olmasını sağlar. Tümör baskılayıcı genlerin etkisizleştirilmesi sürekli hücre proliferasyonuna yol açabilir (Hanahan ve Weinberg, 2000).

- **Programlanmış Hücre Ölümünden Kaçma (Apoptoz):**

Apoptoz, kanser gelişiminin önünde yükseltilmiş bir bariyerdir. Kanser hücreleri tarafından inhibe edilebilir yada hücreler apoptozun etkisinden kaçabilirler. Bu durum tümör baskılayıcı genlerdeki mutasyonlara, antiapoptotik Bcl-2 ve Bcl-XL genlerinin aşırı ekspresyonuna veya proapoptotik Bax gibi faktörlerin aşağı regülasyonuna bağlı olarak oluşur (Hanahan ve Weinberg, 2000).

- **Sınırsız Replikasyon Potansiyeli:**

Telomeraz ekspresyonu mevcut olmayan normal hücrelerde telomerlerin tekrarlanan hücre bölünmeleri sonucu kısalması, hücre döngüsü denetim noktalarını harekete geçirerek hücre yaşlanmasına yol açar ve bir hücrenin geçirebileceği bölünme sayısının sınırlandırılmasına neden olur. Denetim noktaları bozuk olan hücrelerde DNA onarımı yollarının, kısalmış telomerler tarafından uygunsuz bir şekilde aktive edilmesi, yoğun kromozom kararsızlığına ve mitotik krize yol açar. Tümör hücreleri mitotik bölünme sırasındaki apoptozdan telomerazı tekrar aktifleştirerek kurtulur ve ölümsüzlüğe ulaşır (Hanahan ve Weinberg, 2000).

- **Anjiyogenez Devamlılığının Gelişmesi :**

Tümörlerin büyüebilmesi için gerekli olan vaskülarizasyon, tümör ve stroma hücreleri tarafından üretilen anjiyogenik ve anti anjiyogenik faktörler arasındaki dengenin denetimi altındadır.

Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) gibi proanjiogenik faktörlerin aşırı ekspresyonu veya trombospondin-1 gibi inhibitörlerin aşağı regülasyonu sonucu tümörün beslenmesi ve oksijen kullanımı düzelirken, metabolik atık ve karbondioksiti atması da kolaylaşır (Hanahan ve Weinberg, 2000).

- **İnvazyon ve Metastaz :**

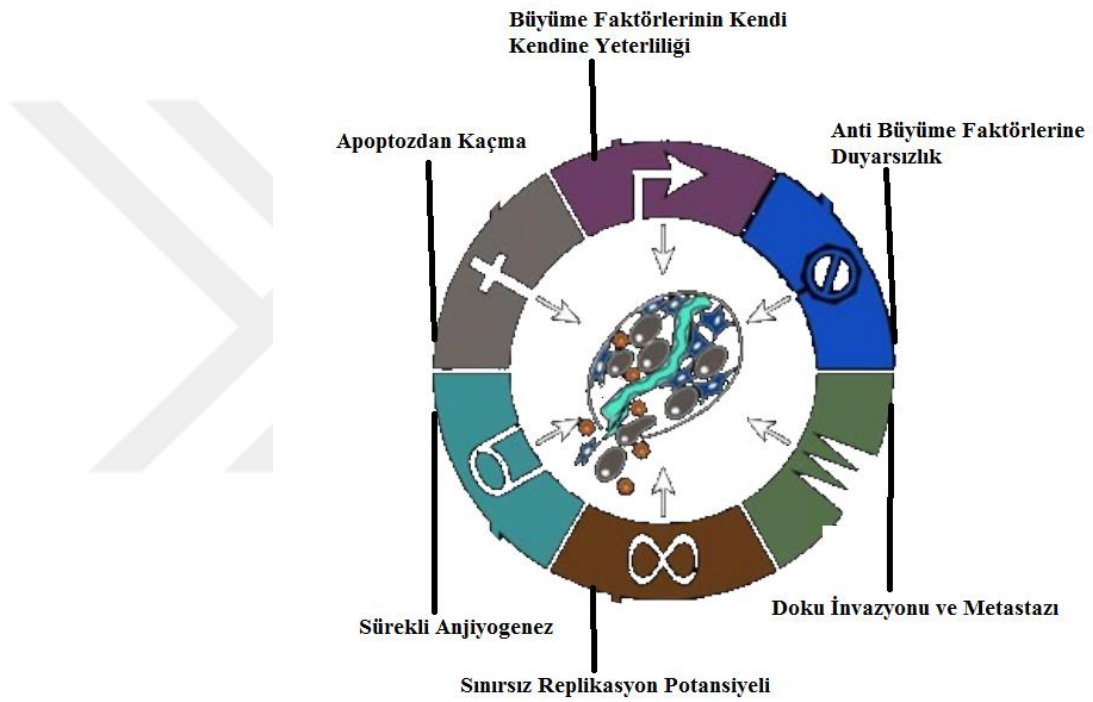
Kanserlerin ayırıcı özelliği olan dokuları invaze etme yeteneği; hücreler arasındaki temasın gevşemesi, ESM parçalanması, yeni ESM komponentlere bağlanma ve tümör hücrelerinin göç etmesi şeklinde dört basamakta gerçekleşir. Metastaz, E-kaderin gibi hücreler arası adezyon moleküllerinin kaybı ile ortaya çıkar. Metastaz, invazyon-metastaz kaskadı adı verilen bir dizi aşama ile ilerler. Birinci aşama invazyonu hücrelerin kan damarlarına intravazasyonunu takip etmesidir. Hücreler daha sonra lenfatik ve hematojen sistemler ile taşınmaya başlarlar. Kanser hücreleri bir sonraki ekstravazasyon aşamasında parenkime taşınarak mikrometastazları oluştururlar. Son olarak mikrometastazlar büyüyerek kolonizasyon adı verilen bir süreç ile makroskopik tümörleri oluştururlar (Hanahan ve Weinberg, 2000).

1.1.2. Kansere Neden Olan Faktörler

Kanserin ortaya çıkmasından sorumlu risk genetik ya da sonradan kazanılmış olabilir (Jones ve Laird, 1999). Bu faktörlerin birlikteliği ile canlıda oluşan DNA hasarı sonucu uygunsuz hücre çoğalımı meydana gelir ve kansere yol açar.

Nörofibromatozis tip 1, retinoblastoma, multiple endokrin neoplazi, ailesel kolon kanseri ve Wilms tümörü genetik faktörlerle ilişkilendirilir (Square ve ark., 1998).

Bununla birlikte, apoptoz ve DNA tamiri gibi görevleri olan tümör supresör genleri kanser gelişimini önleyici bir rol üstlenirler. Bu genlerin mutasyona uğraması sonucu yaşamın ilerleyen dönemlerinde bazı kanserlerin görülme sıklığı artış gösterir.



Şekil 1.2.: Kanser hücrelerinin genel özellikleri (Hanahan ve Weinberg, 2000'den modifiye edilmiştir).

Günümüzde en iyi bilinen tümör supresör geni 17. kromozomda yer alan p53 tümör supresör genidir (Weinberg, 1994). p53 çok hücreli bir organizmaya DNA hasarı ve diğer stres yaratan hücresel olaylara karşı koruyarak hücre çoğalmasını düzenler. Bu etkisini de çok hücreli organizmalar için göreceli olarak zararsız olan bir olaya yani apoptoza yönlendirerek gerçekleştirir. Fakat p53 geninde meydana gelen bir mutasyon sonucunda, p53 tümör supresör özelliğini kaybederek çok çeşitli insan kanserlerine sebep olur.

Ayrıca p53 geninin görevini yerine getiremediği durumlarda kusurlu mutant hücrelerinin hücre döngüsü kontrol noktalarından geçmesini sağlayarak hücre döngüsünü tamamlar. (Alberts ve ark., 2002).

İnsan kanserlerinde virüsler ve diğer enfeksiyonlar önemli bir role sahiptir. İnsan papilloma virüslerinden bazıları rahim ağzını enfekte eder ve rahim boynu karsinomlarının gelişimine neden olur. Hepatit B ise karaciğer kanseri gelişiminde rol alır. Tıpkı virüsler gibi bazı bakteriler de kanser gelişiminde rol alabilir. Örneğin; özellikle tedavi edilmemiş, ülsera sebep olan *Helicobacter pylori* bakterisi ile enfekte olan bireylerde MALT tipi lenfoma ile birlikte mide kanser riskinde artma izlenmektedir. (Lecuit ve ark., 2004).

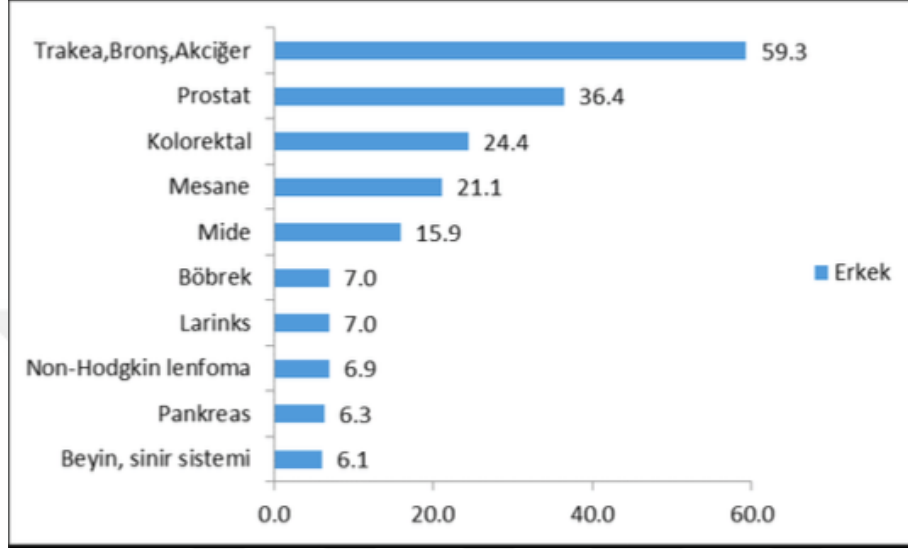
Kanser oluşumun bir temel sebebi de kimyasal ajanlar ve toksinlerdir. Sanayi alanında yüksek oranda kullanılan karsinojenik ve toksik maddeler insanlarda çok çeşitli kanser oluşumlarına sebep olabilir. X ışınları hastalıkların teşhis ve tedavisinde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. İyonize radyasyon tüm kanserlerin %4-15'inden sorumludur (Heath ve ark., 2001).

Dünyada yaklaşık olarak 1.2 milyon kişi sigara kullanmaktadır. Sigaraya başlama yaşı, sigara kullanma süresi, inhalasyon miktarı ve günlük tüketilen sigara miktarı kanser riskini arttırmaktadır. Yine aynı şekilde alkol kullanımı kanser riskiyle ilişkilendirilmiştir. Meyve ve sebze tüketimi çeşitli kanser türlerinin oluşmasına sebep olabilecek kanıtlar mevcuttur (Edwards ve ark., 2004).

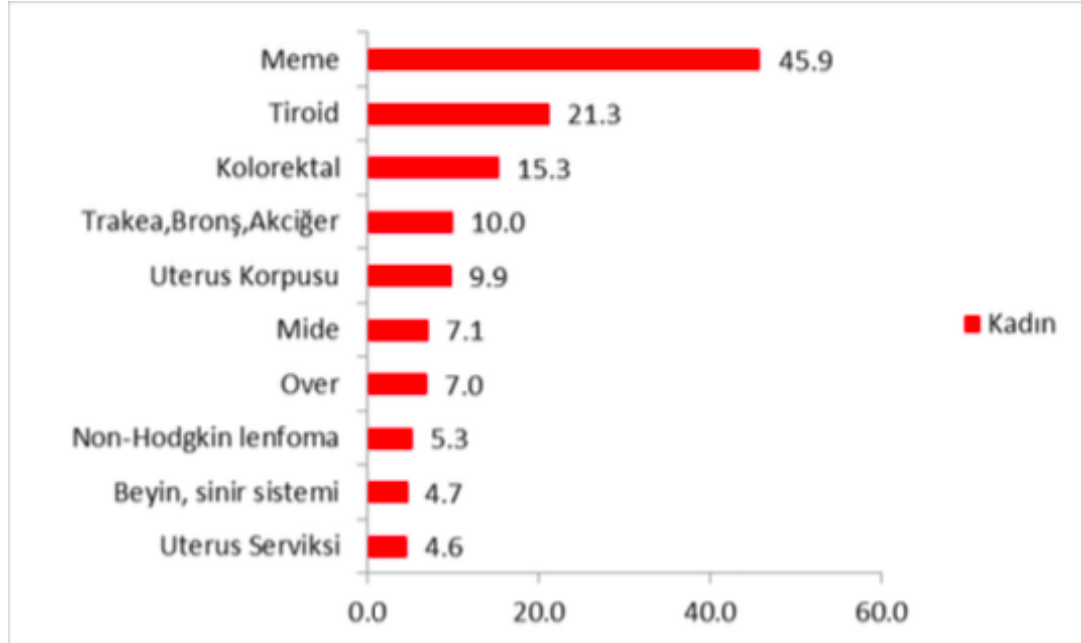
1.1.3. Türkiye’de Kanser İstatistikleri:

2013 yılında yapılan çalışmalara göre Türkiye’de bir yıl içerisinde yaklaşık 174 bin kişiye kanser teşhisi konmaktadır. 103.070 erkek ve 71.233 kadın kansere yakalandığı tahmin edilmektedir.

Tablo 1.1.: Erkeklerde En Sık Görülen 10 Kanserin Yaşa Göre Standardize Edilmiş Hızları (Türkiye Birleşik Veri Tabanı, 2013)



Tablo 1.2.: Kadınlarda En Sık Görülen 10 Kanserin Yaşa Göre Standardize Edilmiş Hızları (Türkiye Birleşik Veri Tabanı, 2013).



1.2. Mide Kanseri

1.2.1 Mide Anatomisi ve Midenin Bölümleri

Mide, diyaframın altında, karın boşluğunun üst bölümünde (suprakolik kompartman) yer almış, sindirim kanalının en geniş bölümüdür. Midenin şekli, boş veya dolu oluşu, yaş-cinsiyet ve kişinin pozisyonu ile değişiklikler gösterir (Yıldırım M., 2014).

Mide, anatomik ve fonksiyonel olarak bir bütün olmasına rağmen tarifsel amaçlar için 5 bölüme ayrılarak incelenir (Şekil 1.3.).

Kardia bölümü (*pars cardiaca*): Midenin, kardiak deliğe yakın olan 2-3 cm genişliğinde, ters çevrilmiş huni şeklindeki bölümüdür (Yıldırım M., 2014).

Fundus bölümü (*fundus gastricus*): Midenin, kardiak delik düzeyinin üzerinde kalan kubbe şeklindeki bölümüdür (Yıldırım M., 2014).

Mide cismi (*corpus gastricum*): Midenin orta bölümü olup, aşağıda *antrum pyloricum* ile uzanır. Mide cisminin ön yüzü, sol *arcus costalis* ile *colon transversum* arasındaki kalan mide üçgeni/*trigonum gastricum*'da, doğrudan karın ön duvarı temas eder (Yıldırım M., 2014).

Pilorik bölüm (*pars pylorica*): Midenin distal bölümü olup *antrum pyloricum* ve *canalis pyloricus* olarak adlandırılan iki alt bölümü vardır (Yıldırım M., 2014).

Pilor (*pylorus*): Midenin duodenum'a yakın bölümüdür. Buradaki *ostium pyloricum* etrafında önemli bir sfinkter (*sphincter pylorici*) bulunur. Bu sfinkter, mide içeriğinin 12 parmak bağırsağına geçişini kontrol eder. Normalde kapalı olan bu delik, sfinkterin gevşemesi ile zaman zaman açılır ve midedeki besin maddelerinin duodenum'a geçişine izin verir (Yıldırım M., 2014).

1.2.1.1. Midenin Duvar Yapısı

Midenin duvar yapısı, sindirim kanalı organlarının genel duvar yapısında olmakla beraber bazı farklı özelliklere de sahiptir.

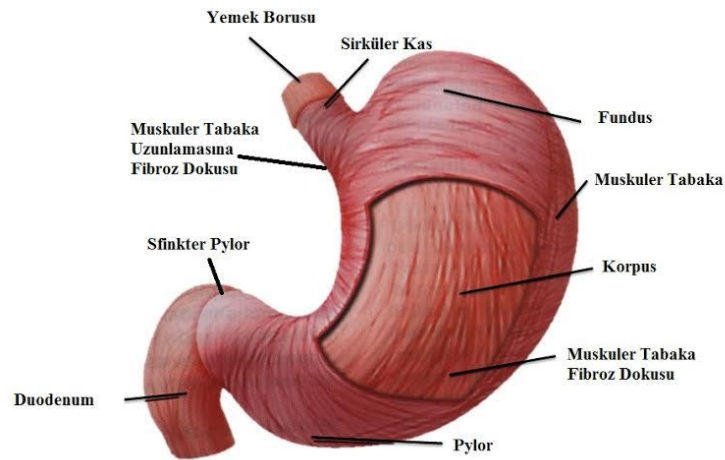
a. Mide mukozası: Mukoza, sığ oluklarla birbirlerinden ayrılmış kabartılar içerir. Bu kabartılarda küçük çukurcuklar görülür.

Boş mide mukozasında kalın kıvrımlar bulunur. Midenin basit kolumnar epitel özelliğindeki mukozasında (özellikle fundus ve korpus'ta olmak üzere) kıvrımlı tubuler tip bezler (gastrik bezler) vardır. Bu bezlerin boşaltma kanalları *foveolae gastricae*'e açılır. Gastrik bezler, içinde HCl ve digestif enzimlerin bulunduğu mide salgısının büyük bir bölümünü üretir. Gastrik bezler ayrıca mukozayı koruyan mukus ile B 12 vitamininin emilimi için gerekli olan intrinsik faktör de salgırlar (Yıldırım M., 2014).

b. Submukoz tabaka: Kan damarları, sinir ağı, lenf damarları ve lenfoid doku elemanları içeren gevşek bağ dokusundan ibarettir (Yıldırım M., 2014).

c. Muskuler tabaka: Üç katmanlı kalın bir tabakadır. En dıştaki kas lifleri longitudinal, ortadakiler sirküler, en içtekiler ise oblik seyirlidir. Sirküler katman, ostium pyloricum etrafında sfinkter pylor'i oluşturur. Mide eğriliklerinde belirgin olan longitudinal lifler özofagus'un kas tabakası ile uzanır. Oblik lifler ön ve arka duvarda belirgindir (Yıldırım M., 2014).

d. Seröz tabaka: En dış tabaka olup, peritonun visseral yaprağından oluşmuştur. Midenin ön ve arka duvarını örten periton büyük eğrilikten omentum majus olarak uzanır. (Yıldırım M., 2014).



Şekil 1.3.: Midenin kısımları (Süzen, 2013'den modifiye edilmiştir)

1.2.2.Mide Kanseri Etiyolojisi

Mide kanseri insidansı ülkelere göre çok farklıdır. Japonya’da, Çin’de, Doğu Avrupa ve Güney Amerika’da en yüksek iken (100.000 erkekte >20), Kuzey Amerika’da, Afrika’nın bazı bölgelerinde ve Güney Amerika’da en düşüktür (100.000 erkekte <10). (Parkin ve ark., 2002). Erkeklerde görülme riski kadınlara göre 2 kat fazladır (Terry ve ark., 2002).

Farklı mide kanseri riski olan bölgelerden gelen göçmenler başlangıçta benzer zamanla yavaş yavaş artarak yada azalarak ülkenin profiline uymaktadır. Bu adaptasyonun mide kanseri etiyojisinde çevresel risk faktörleri için güçlü bir rol oynadığı düşünülmektedir (Stadtlander ve ark., 1999).

1994 yılında WHO/IARC *Helicobakter pylori* (*H. Pylori*’nin mide kanseri gelişiminde karsinojen bir bakteri olduğunu kabul etmiştir. *H. pylori*, gastrik asit salgılanmasını arttırarak gastrite ve ülsera neden olan bir bakteridir. Hastaların düşük bir kısmında ise, ciddi süperfisyal atrofik gastrit gelişerek asit azlığı oluşur ve diğer bakterilerin kolonize olmasına uygun ortam oluşturur. Sonuç olarak hücrelerin DNA'sında genomik hasar oluşmakta ve zamanla mide kanseri gelişmektedir (Wagner ve ark., 1997).

Sigara ve alkol tüketiminin mide kanserinin olumsuz etkilediği düşünülmektedir (Nomura ve ark., 1996).

Daha önce yapılan çalışmalara göre tuzlu salamuralar, tütsülenmiş gıdalar, balıklar, karbonhidratların mide kanseri riskini artırdığı, süt, taze sebzeler ve vitamin C’nin ise mide kanseri riskini azalttığı gösterilmiştir (Stadtlander ve ark., 1999).

Nitritler nitratlardan oluşur. Yüksek protein diyetleri ile, gıda koruyucu olarak veya su ile alınan nitrat ve nitritler, gastrointestinal bakteriler ile nitrozaminlere dönüşebilir. Nitrit ve nitratların kansere neden olduğu düşünülmektedir (Wagner ve ark., 1997). Düşük sosyoekonomik yapı mide kanseri riskini artırır. Kan grubu A olan bireylerde mide kanseri daha sık gözlenmektedir (Aird ve ark., 1991).

1.2.3. Mide Kanseri Evreleme (TNM Sistemi) –WHO 2000

- **Primer tümör:** T T komponenti, primer tümörün boyutu veya çevreye devamlılık gösteren uzanımının durumu ile tanımlanır. Her kanser bölgesinde, T'yi tanımlamak için kullanılan tümörün boyut komponenti ve çevreye devamlılık gösteren uzanımının durumu özel olarak tanımlanmıştır.

T_x : Primer tümör değerlendirilemiyor

T₀ : Primer tümör olgusu yok

T_{is} Karsinoma in situ: lamina propriaya invazyon göstermeyen intraepitelyal tümör

T₁: Muskularis mukozaya veya submukozaya invaze tümör

T_{1a}: Lamina propriaya, muskularis mukozaya veya submukozaya invaze tümör

T_{1b}: Submukozaya invaze tümör

T₂: Muskularis propriaya invaze tümör

T₃: Visseral periton veya çevre dokulara invaze olmadan subserozal bağ dokusuna penetre tümör

T₄: Tümörün serozayı (visseral peritonu) veya çevre dokuları invazyonu

T_{4a}: Tümörün serozayı (visseral peritonu) invazyonu

T_{4b}: Tümörün çevre dokuları invazyonu

- **Bölgesel Lenf Nodülleri (N):** N N komponenti, bölgesel lenf nodlarındaki kanserin durumu, varlığı veya yokluğu ile tanımlanır. Nodal tutulum pozitif lenf nodlarının sayısı ve bazı kanser tiplerine özel bölgesel nodal grupların tutulumu ile kategorize edilir.

N_x: Bölgesel lenf nodülleri değerlendirilemiyor

N₀: Bölgesel lenf nodülleri metastazı yok

N₁: Bölgesel lenf nodüllerinden 1-2'sinde metastaz var

N₂: Bölgesel lenf nodüllerinden 3-6'sinde metastaz var

N₃: Bölgesel lenf nodüllerinden ≥ 7 'sinde metastaz var

N_{3a}: Bölgesel lenf nodüllerinden 7-15'inde metastaz var

N3b: Bölgesel lenf nodüllerinden ≥ 15 'inde metastaz var

- **Uzak Metastaz(M):** M M komponenti, genel olarak kanserin vasküler kanallar ile yayılabileceği lokalizasyonlar veya bölgesel olarak tanımlanan lenf nodlarından daha uzaktaki “rejyonal” olarak tanımlanan lenf nodlarında, uzak yayılım yada metastazın varlığı veya yokluğu ile tanımlanır.

M_x Uzak metastaz değerlendirilemiyor

M0 Uzak metastaz yok

M1 Uzak metastaz var

1.2.4. Mide Kanserine Neden Olan Prognostik Faktörler

Çoklu onkogenler, çoklu tümör supresör genler, hücre döngüsü düzenleyicilerindeki, DNA tamir genlerinde meydana gelen değişikliklere bağlı olarak mide kanserine neden olabilir. Bunların yanı sıra, c-met gen aktivasyonu, p53 geninin inaktivasyonu ve anormal CD44 transkripsiyonu sonucunda farklılaştırılmış adenokarsinoma, intestinal tip ve zayıf farklılaştırılmış adenokarsinoma ya da difüz tip histolojik yapılar meydana gelebilir. Çoklu genlerin değişimine göre bu her iki histolojik tip oluşabilir. Bu iki tip histolojik farklı yolları kullanarak mide kanserine sebep olabilir (Tahara ve ark., 1993).

1.2.4.1. Proto Onkogenleri Kodlayan Tirozin Kinaz Reseptörleri

C-met geni, ilerlemiş mide kanserlerinde sıklıkla ifade edilir, özellikle skiroz karsinom tipinde görülmektedir (Kuniyasu ve ark.,1992). Buna rağmen özefagus ve koleraktel kanser tiplerinde çok fazla görev almaz. C-met geni üzerinde bulunan LOH, 7. Kromozomun q kolunun 31.bölgesinde bulunmaktadır.

LOH, c-met gen çoğalmasından bağımsız olarak yaklaşık %30 oranında farklılaştırılmış tip mide kanseri oluşumuna sebebiyet verir (Tahara ve ark., 1993).

Ek olarak fibroblast büyüme faktör reseptör ailesinin birer üyesi olan c-met ve K-sam genleri tercihen zayıf farklılaştırılmış tip mide kanseri ve skiroz tip kanserlerde ifade edilir (Tahara ve ark., 1993).

C-erbB-2'nin çoğalması ve aşırı ekspresyonu farklılaştırılmış tip mide kanseri ile ilişkilidir. Buna bağlı olarak mide kanseri için iyi bir markerdir. Ancak c-erbB3 mide kanserinde çoğalması gerçekleşmez, bunun yanı sıra aşırı ekspresyonu ile mide kanseri oluşumu arasında iyi bir ilişki kurulamamıştır (Kameda ve ark., 1990).

Kiyokawa ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada mide kanseri doku ve hücre hatlarında sinyal regülasyon protein kinazın aşırı ekspresyonunun söz konusu olduğu gösterilmiştir (Kiyokawa ve ark., 1994).

1.2.4.2. Büyüme Faktörleri ve Sitokinler

TGF- α , EGF, amfiregülinin ve interlökin-a fonksiyonları otokrin büyüme faktörleri gibi etki göstermektedir. EGF/TGF- α ve EGF reseptörleri biyolojik malignitenin oluşumuna katkıda bulunur (Tahara ve ark., 1993).

EGF ailesinin yeni bir üyesi olan kriptonun ekspresyonu, mide kanseri ve bağırsak metaplazisi ile ilişkilidir. Kriptonun ekspresyonu ile tümör evresi ve progresyonu sıkı bir ilişki içindedir, buna bağlı olarak kriptonun ekspresyonu mide kanserinin gelişiminde ve ilerlemesinde önemlidir.

Bu 2.2 kb'lık kripto geninde delesyon meydana gelmesine karşın neredeyse tüm bağırsak metaplazisinde ve farklılaştırılmış mide adenokarsinomlarda, aşırı eksprese olmaktadır (Kuniyasu ve ark., 1991).

EGF ailesi, TGF- β , PDGF, IGF, bFGF, zayıf farklılaştırılmış adenokarsinomlarda ve skiroz karsinomlarda aşırı eksprese olmaktadır.

İlerlemiş mide kanseri hastalarının %80'nin de TGF- β tip 1 reseptör azalması ve düşük seviyede TGF- β inhibitör element bağlanma proteini bulunmaktadır. Bu olayda mide kanserindeki tümör invazyonu ile ilişkilidir (Tahara ve ark., 1993).

HGF, mide kanseri morfolojisinde ve ilerlemesinde çok önemli bir role sahiptir. Yapılan çalışmada mide kanseri morfolojisinin oluşumu için ortaya atılan hipotez, tümör oluşumu bağlantılı büyüme faktörleri ya da IL-1a tarafından salgılanan HGF tarafından aktive edilen stromal fibroblastlar, in vivo olarak kanser hücresinde ki c-met proteinine bağlanır, ve mide kanserinin morfolojisinde ve ilerlemesine öncülük eder (Tahara ve ark., 1993).

1.2.4.3. Hücre Döngüsü Düzenleyicileri

Büyüme faktörleri ve sitokinler pozitif ve negatif yönde hücre çoğalmasını, farklılaşmasını ve hücre ölümünü yada hücre apoptozunu, CDK'lar ve CDK inhibitörleri ile hücre döngüsünü yönlendirir. Bir çok pozitif büyüme faktörü siklin D ile bağlantılıken negatif büyüme faktör TGF- β hücre proliferasyonunu bir siklin-CDK inhibitörü aracılığıyla inhibe edebilir. Örneğin: p27 (Polyak ve ark., 1994).

1.2.4.4. Tümör Supresör Geni ve Hücre Adhezyon Molekülleri

Mide kanserinde, çoklu tümör supresör genlerin inaktivasyonu söz konusudur. p53, APC ve DCC genleri buna dahildir (Tahara ve ark., 1993). APC genindeki alel kaybı ve mutasyonu sonucunda, mide kanserinde farklılaştırılmış adenokarsinom ile ilişkilidir. APC proteini, α -katenin ve β -katenin ile kompleks bir yapı oluşturarak, büyüme düzenleyici faktörün transmisyonuna aracılık edebilir. α -katenin, epitel dokuda morfogenezin düzenlenmesinde rol alır.

Azalmış veya kaybolmuş kadherin ve katenin gen ekspresyonu, az farklılaştırılmış tip mide kanserlerinde ya da skiroz karsinomlarda görülmektedir (Nakatsuru ve ark., 1992).

1.2.4.5. Genetik Kararsızlık

Genetik kararsızlık, insan kanser genetiğinde çok önemli bir yer tutar. DNA mismatch tamir genlerinde meydana gelen germline mutasyon sonucunda genetik kararsızlık meydana gelir. Yeni bulgular sonucunda genetik kararsızlığın, zayıf farklılaştırılmış tip mide kanserinin oluşumunda rol aldığı gösterilmiştir.

Bir çok bölgede meydana gelen replikasyon hataları sonucunda, mide ve kolon kanseri olmak üzere bir çok primer kanser oluşumu gözlemlenmektedir (Tahara ve ark., 1993).

1.2.4.6. Telomer ve Telomeraz Aktivitesinin Mide Kanseri Üzerine Etkisi

Hücrede bulunan telomerler, telomeraz aktivitesi sayesinde onarılır. Bu aktivasyon sonucunda hücre apoptoza gidecekken, hücre ölüm baskılanır ve karsinogenez oluşumu meydana gelebilir (Kim ve ark., 1994). Mide kanseri hastalarında bu telomeraz enzim aktivitesi oldukça yüksektir.

1.2.4.7. Metastaz İle İlişkili Genler

CD44 fonksiyonel olarak, hücre adhezyonunda önemli bir role sahiptir (Tahara ve ark., 1993). CD44'ün alternatif kırılması sonucu elde edilen farklı varyantları insanlarda kolon ve meme kanserini de içine alan kanser tiplerine sebep olabilir (Matsumura ve ark., 1992). Tüm mide kanseri dokularında CD44 alternatif kesim varyantları aşırı ifade edilmektedir. CD44 alternatif kesim varyantları az farklılaştırılmış ve farklılaştırılmış tip mide kanserlerinde farklı ekspresyon seviyelerine sahiptir (Yokozaki ve ark., 1994).

1.3. Matris Metalloproteinazlar (MMP ailesi)

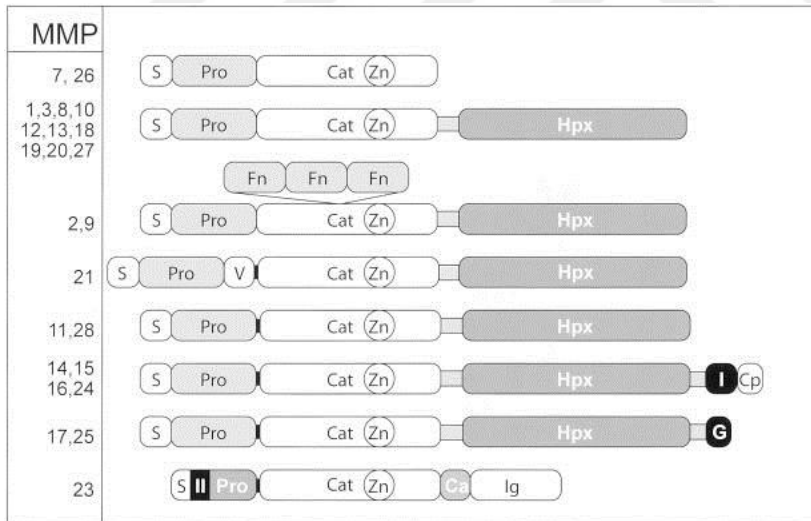
Ekstraselüler matris molekülleri, hücre ortamın şekillenmesi ve gelişiminde önemli rol oynamaktadır. Matrisin olarak da adlandırılan MMP'ler ESM bozulmasına katılan proteinazlardır.

Normal fizyolojik koşullar altında, MMP'lerin aktivitesi eksiksiz olarak; transkripsiyon seviyesini düzenleme, prekürsör zimojen aktivasyonu, belirli ESM bileşenleri ile etkileşim ve endojen inhibitörleri tarafından inhibe edilme şeklindedir. Aktivite kontrol kaybı artrit, kanser, ateroskleroz, anevrizma, nefrit, doku ülseri ve fibrozis gibi hastalıklara neden olabilir. TIMP'ler dokularda MMP'lerin aktivitelerinin kontrolüne katılan matrislere özel inhibitörlerdir. (Shagısultanova ve diğ., 2004).

1.3.1. Matrisin Aile Üyeleri

İlk MMP aktivitesi iribaş kuyruğunda metamorfoz esnasında, fibriller kollejeni bozan bir enzim olarak Gross ve Lapiere tarafından tanımlanmıştır.(Page-McCaw ve ark., 2007).

Bugüne kadar 24 omurgalıda matrisinler keşfedilmiştir, bunların 23'ü insanlarda bulunur. Kollejenaz 1 (MMP-1) ile dizi homolojisi, MMP'leri zimojen formunda koruyan (proMMP) propeptitteki sistein anahtar modeli PRCGXPD, katalitik domaindeki çinko bağlayıcı model HEXGHXXGXXH bu aileye ait olan proteinazları belirlemek için kullanılan katalitik domainlerdir. MMP-23'ün sistein anahtar modeli yoktur, ancak katalitik domainin aminoasit dizisi MMP-1 ile bağlantılıdır. MMP'ler genellikle prodomain, katalitik domain, bağlanma bölgesi ve hemopeksin domainden oluşur (Şekil 1.4.).



Şekil 1.4.: MMP'lerin domain yapısı (Visse ve ark., 2015)

Tablo 1.3.: MMP'lerin kromozomal bölgesi ve geleneksel adları (Visse, 2015'den modifiye edilmiştir)

ENZİM		MMP	KROMOZOM
Kollajenazlar	İnterstisyel kollajenaz; Kollajenaz 1	MMP-1	11q22-q23
	Nötrofil kollajenaz; kollajenaz 2	MMP-8	11q21-q22
	Kollajenaz 3	MMP-13	11q22.3
	Kollajenaz 4	MMP-18	Bilinmiyor
Jelatinazlar	Jelatinaz A	MMP-2	16q13
	Jelatinaz B	MMP-9	20q11.2-q13.1
Stromelisinler	Stromelisin 1	MMP-3	11q23
	Stromelisin 2	MMP-10	11q22.3-q23
	Stromelisin 3	MMP-11	22q11.2
Matrilsinler	Matrilsin 1	MMP-7	11q21-q22
	Matrilsin 2	MMP-26	11p15
Membran-Tip MMP'ler Transmembran	MT1-MMP	MMP-14	14q11-q12
	MT2-MMP	MMP-15	15q13-q21
	MT3-MMP	MMP-16	8q21
	MT5-MMP	MMP-24	20q11.2
GPI bağlayıcı	MT4-MMP	MMP-17	12q24.3
	MT6-MMP	MMP-25	16p13.3
Diğerleri	Makrofaj elastaz	MMP-12	11q22.2-q22.3
	İsim yok	MMP-19	12q14
	Enamelisin	MMP-20	11q22.3
	XMMP (<i>Xenopus</i>)	MMP-21	Bilinmiyor
	CA-MMP	MMP-23	1p36.3
	CMMP (<i>Gallus</i>)	MMP-27	11q24
	Epilisin	MMP-28	17q21.1

MMP'ler ya hücreden yada plazma zarına sabitlenerek salgılanırlar. Bu enzimler omurgalı MMP'leri substrat özgüllüğü, dizi benzerliği ve domain organizasyonlarına göre 6 gruba ayrılmıştır (Tablo 1.2.).

- **Kollajenazlar**

MMP-1, MMP-8, MMP-13 ve MMP-18 (*Xenopus*) bu gruptadır.

Bu enzimlerin en önemli özelliği dokular arası kollajen 1, 2 ve 3'ü N-terminalinden başlayarak belirli bölgelerinden kesmektir. Kollajenazlar diğer ESM ve ESM olmayan molekülleri de parçalayabilirler.

- **Jelatinazlar**

Jelatinaz A (MMP-2) ve Jelatinaz B (MMP-9) bu gruptadır. Bunlar kolayca denatüre olmuş kollajenazları ve jelatinazlar parçalayabilirler. Bu enzimler, jelatin, kollajen ve laminine bağlanabilen tip 2 fibronektin domainin 3'lü tekrarlarına sahiptirler. MMP-2 tip 1, 2 ve 3 kollajenleri sindirirken MMP-9 sindiremez.

- **Sitromelisinler**

Sitromelisin 1 (MMP-3) ve Sitromelisin-2 (MMP-10) benzer substrat özgünlüğüne sahiptir, ancak MMP-3'ün genel olarak proteolitik verimliliği MMP-10'a göre daha fazladır. Ayrıca ESM bileşenlerinin parçalanmasının yanı sıra, MMP-3 bir dizi proMMP'yi aktive eder. MMP-11'e sitromelisin-3 adı verilir, ancak gen dizisinin ve substrat özgünlüğünün MMP-3'den farklı olmasından dolayı genellikle "diğer MMP'ler" ile gruplanır.

- **Matrilsinler**

Matrilsinler hemopeksin domaini eksikliği ile karakterizedir. Endometaz olarak da bilinen matrilsin 1 (MMP-7) ve matrilsin 2(MMP-26) bu grupta yer alır. ESM bileşenlerinin yanı sıra MMP-7 prodefensin, Fas-ligand, pro-tümör nekrozis faktör (TNF)- α ve E-katherin gibi hücre yüzey moleküllerini de işler. Matrilsin 2 (MMP-26) önemli ESM bileşenlerinin bir kısmını sindirir.

- **Membran Tip MMP'ler**

6 tip MT-MMP vardır. Bunların 4 tanesi Tip 1 transmembran proteini (MMP-14, MMP-15, MMP-16 ve MMP-24) ve 2 tane glikozilfosfatidilinositol (GPI) bağlantılı proteinlerdir (MMP-17 ve MMP-25). MT4-MMP haricinde hepsi proMMP-2'yi aktive edebilirler. Bu enzimler aynı zamanda ESM moleküllerini parçalayabilirler. MT1-MMP tip 1, 2 ve 3 kollajenolitik etkiye sahiptir.

Doğum sonrası gelişimi boyunca MT1-MMP'si işlevsiz farelerde iskeletsel anormallikler gösterir, bunun temel sebebi olarak kollejenolitik aktivite yetersizliği olduğu düşünülmektedir. MT1-MMP anjiyogenez de önemli bir rol oynar. MT5-MMP beyine özgüdür ve beyincik tarafından ifade edilir. MT6-MMP (MMP-25) periferel kan lökositlerinde, anoplastik astrositomalarda ve glioblastomalarda ifade edilir.

- **Diğer MMP'ler**

7 adet MMP kategorilerine göre ayrılarak sınıflandırılmamıştır. Metalloelastaz (MMP-12) temel olarak makrofajlar da ifade edilir ve makrofaj göçü için gereklidir. Karaciğerdeki cDNA klonlamalarında ve romatoid artrit (RASİ) hastalarından alınan T-hücresi kaynaklı otoantijenlerde MMP-19 bulunmuştur.

Amelogenini parçalayan MMP-20, yeni oluşan diş minesini içinde yer alır. Amelogenin imperfekta, genetik bir hastalıktan dolayı hatalı diş minesini oluşumudur ve MMP-20 kesim bölgelerindeki mutasyonlardan kaynaklanmaktadır.

MMP-22, insan homoloğu EST dizilerinin kaynağında bulunmuştur. Bu enzimin işlevi bilinmemektedir.

MMP-23, çoğalabilen dokularda ifade edilmektedir. Enzimin prodomaininde sistein anahtar modeli ve hemopeksin domaini yerine imminoglobulin-benzer domain ve ardından sisteince zengin domaine sahiptir. Epilisin yada MMP-28, esas olarak keratinositlerde ifade edilir.

1.3.2. Matrisinlerin Gen ifadesinin Düzenlenmesi

MMP enzimleri, genel olarak çok düşük miktarlarda ifade edilir, inflamatuvar interlökinler (IL-6, TNF) ve transformasyon büyüme faktörleri gibi büyüme faktörleri ve sitokinler tarafından transkripsiyon pozitif veya negatif yönde düzenlenebilir. Matrisinin ifade edilmesi, sitokinler, kimyasal ajanlar, tümör büyüme promotörleri, fiziksel stres, onkojenik transformasyon vs. tarafından başlatılır (Sternlicht ve ark., 2001). Matrisinler inaktif pro-enzimler olarak salgılanır ve proteinaz tarafından kesilerek aktive edilir. Katalitik domaindeki çinko iyon bağları ve propeptid domaindeki sistein-sülfidril grubu matrisinlerin inaktif bir şekilde tutulması ile ilişkilidir.

MMP'lerin aktivitesi 5 mekanizma ile düzenlenir: gen transkripsiyonu, salgılama, zimojen formun proteolitik aktivitesi, aktif formun endojen inhibisyonu, glikolizasyon'dur (Philippe ve ar., 2002). En önemli doğal inhibitör metalloproteinaz doku inhibitör (TIMP)'leridir. Çeşitli hücre tipleri indüklenmiş epitel hücreler, mezenkimal hücreler (temel fibroblastlar), inflamatuvar hücreleri tarafından matrisinler ifade edilir. Matrisinlerin fiziksel fonksiyonu ekstraselüler matrisin modülasyonu ve düzenlenmesi ile ilişkilidir, bu mekanizmada ekstraselüler matrisin bileşenlerinin proteolitik bozulması ile düzenlenir (Yamamoto ve ark., 2006).

Matrisinler, Matris metalloproteinaz doku inhibitörleri (TIMP) tarafından kontrol edilir. TIMP'ler MMP aktivitesi negatif yönde kontrol eder. 4 çeşit TIMP bulunur: TIMP1, TIMP2, TIMP3, TIMP4. Endopeptidazlar ile stokiyometrik kovalent olmayan bileşenler tarafından TIMP'ler MMP aktivitesini baskılar. TIMP etkisi ECM'nin farklı fizyolojik koşullardaki hücre içi dengesinde gereklidir. TIMP ve MMP arasındaki dengesizlik gastrointestinal malignitenin oluşumunda temel bir adımdır ve bu dengesizlik erken tümör ilerlemede kritik öneme sahiptir.

TIMP'ler tümör ilerlemesi ve metastazında kompleks bir etki gösterir: bir taraftan MMP'leri direkt olarak düzenler yada inhibe edebilirler, diğer taraftan anjiogenez etki gösterebilir, tümör hücrelerindeki apoptoz inhibisyonu, malign transformasyon ve tümör büyümesi ve metastazını kolaylaştırır (Woessner ve ark., 1991).

1.3.3. Matris Metalloproteinazlar, ESM ve Kanser

Tümör hücrelerindeki göç, ekstraselüler matrisin bozulması ile alakalıdır (Woessner ve ark., 1991). Ekstraselüler matris; kollojen, fibronektin, laminin ve proteoglikan bağlantılı hücreler gibi dinamik bir yapıya sahip olan makromoleküllerdir (Herszenyi ve ark., 2012). Ekstraselüler matrislerin hücredeki rolü, hücre fonksiyonlarının düzenlenmesi belirli bir mikro çevrenin oluşumunda görev alır.

Ekstraselüler matrisin transformasyonunda çeşitli fizyolojik ve patolojik adımlar önemli bir faktördür; hücrelerin doku gelişimi ve oluşumu, çoğalması ve farklılaşması, neoplastik hücrelerdeki metastaz ve invazyon sayılabilir (Grobewska ve ark., 2012).

Ekstraselüler matristeki tümör hücresi invazyonu üç adımda açıklanabilir. Bunlar; hücre göçü, tutunma ve matris bozulmasıdır. Fibronektin ve laminin gibi spesifik glikoproteinlerle ilişkili tümör hücre yüzey reseptörleri bazal membrana tutunması ile ilişkilidir. İkinci adım (tümör hücre bağlantılı proteinazlar tarafından matrisin lokal bozulması) tümör hücreleri direkt olarak ESM'i bozan enzimleri salgılar. Bazı proteinazlar hem matrisdeki yapısal kollojen proteinleri hem de tutunma proteinlerini bozabilir. Üçüncü adımda göç, kemotatik faktörler göç yönünü etkilemektedir (Herszenyi ve ark., 2000).

1.3.4. MMP'lerin Kanser Gelişimindeki Rolü

Çok çeşitli patolojik süreçlerde MMP'ler, ESM'nin bozulmasında ve yeniden yapılanmasında majör etki gösterir. Bunlara örnek olarak; kanser invazyonu ve metastazı, ülser varyasyonları, fibrotik karaciğer hastalığı vb. verilebilir (Vlaykova ve ark., 2012).

MMP'ler ESM bozulmasına aracılık eder bu da kanser hücre invazyonuna ve metastazına öncülük eder. Bu olay MMP çalışmalarında bir yol gösterici konumundadır. Neredeyse tüm kanser türlerinde MMP'lerin artmış ekspresyonu ve bioaktivitesi vardır. Birçok çalışma MMP'lerin ekspresyonu ve prognozu arasında negatif bir ilişki olduğunu göstermiştir. Ancak yeni bulgularla MMP'lerin kanserde çok daha kompleks bir etki gösterdiği ortaya çıkmıştır (Popharitov ve ark., 2015).

1.3.4.1. MMP'lerin Büyüme Sinyallerine Etkisi

Aktif tümör büyüme faktör- β , inaktif pro-form'dan dönüştürülür. Bu dönüşümde proteolitik dönüşüm meydana gelir. Proteolitik dönüşüm furin veya diğer proteinazlar tarafından yapılır. Örnek olarak, MMP-9 benzeri, MMP-14 ve 2 proteolitik aktiviteli TGF-b1 verilebilir.

MMP-2, -9, -14 indirekt olarak TGF- β 'nin biyoaktivitesini ayarlar. Bu ayarlamayı LTBP-1 tarafından gerçekleştirir. Dolayısıyla ESM-bağlı TGF- β 'nin çözülmesini sağlar. Büyüme faktörleri ayrılır. ESM proteinleri biyolojik olarak kullanılabilir duruma gelir. Bir kereye mahsus bu proteinler MMP'ler tarafından bozulabilir (Manes ve ark., 1999).

1.3.4.2. MMP'ler Neoanjiyogenezi Düzenler

MMP'ler kanser oluşumu ve metastazını düzenlerler. Bunu neoanjiyogenezi aktivitesini regüle ederek gerçekleştirirler. Anjiyogenik faktörler, ESM'den salgılanır. Bunlar; endotelial büyüme faktörü (VEGF), fibroblast büyüme faktörü (FGF), transformasyon büyüme faktörü (TGF), tümör nekroz faktör-alfa (TNF-alfa), epidermal büyüme faktör (EGF), interlökin-8 ve diğerleridir. Bu faktörler MMP salgılanmasını ve aktivasyonunu uyarır (Rundhaug ve ark., 2005).

1.3.4.3. MMP'ler Apoptozu Düzenler

MMP'ler hem apoptotik hemde anti-apoptotik etkiye sahiptirler. Meme epitel hücrelerinde aşırı eksprese olan MMP-3 apoptozu indükler (Alexander ve ark., 1996). MMP-7 membran-bağlı FASL'yi serbest bırakır. Salınmış olan FASL komşu hücrelerin apoptozunu indükler yada kanser apoptozunu azaltır.

Bu etkisini proheparin-bağlı epidermal büyüme faktör (pro-HB-EGF)'lerin HB-EGF'ye olgunlaşmasıyla hücrenin hayatta kalmasını sağlayarak gerçekleştirir. MMP-11 ise kanser hücrelerinin apoptozunu inhibe eder (Mitsiades ve ark., 2001).

1.3.4.4. MMP'ler Tümör Hücrelerindeki İnvazyon ve Metastazı Düzenler

MMP'lerin proteolitik aktiviteleri, tümör invazyonu için temel bir adımdır. Burada iki temel mekanizma görev almaktadır. İlk mekanizmada, MMP'ler tümör hücrelerindeki proliferasyonu ve büyümeyi teşvik eder. ESM içindeki proteinler bozulur ve bazal membranda tümör hücreleri fiziksel olarak çevredeki periferik hücre ve kan damarlarına penetre olabilir ve bu şekilde metastaz meydana gelir.

İkinci mekanizmada ise, MMP'ler matris komponentlerin bozulmasında görev alır. Bu moleküllere örnek olarak; VEGF, FGF, EGF, TGF verilebilir.

MMP-2, -9 çok çeşitli kanser hücrelerinde aşırı eksprese olabilir. Bu MMP'ler, ESM'deki kollajen tip-4'ün bozulmasında rol oynar. Bu enzimlerin artmış ekspresyonu kanser invazyonu ile ilişkilidir (Popharitov ve ark., 2015).

MMP-1, -2, -7, -9, -13 ve diğerleri, tümör progresyonu–düşük prognoz ve farklılaşma, kanser ve metastaz aşamasında önemli bir yer tutar. MMP'ler tümör hücrelerinin metastazına yardımcı moleküller olarak ifade edilmektedir. Birçok çalışmada, MMP'lerin inhibisyonu üzerine çalışılmış ve bunun sonucunda hücre invazyonunda inhibisyon görülmüştür (Sternlicht ve ark., 2001).

1.4. MMP-21

Matris metalloproteinaz ailesinin en yeni üyelerinden sayılan MMP-21 henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Bundan dolayı X-MMP olarak isimlendirilir. 10. Kromozomun q kolunun 2.bölgesinin 6. bandının 2. alt bandında bulunur. C terminalinde hemopeksin/fibronektin benzeri bölgeler içerir (Shagısultanova ve ark., 2004).

MMP-21 geni 7 ekzon içerir. Ekzon 1 sinyal sekansı ve prodomainin bir kısmını, ekzon 2 prodomainin diğer kısmını ve katalitik domainin başlangıcını, ekzon 3 ve 4 katalitik domainin tamamını ve ekzon 5,6 ve 7 hemopeksin benzeri domaini kodlar. Ekzon/intron sınırları GT/AG splayz bölgesi kuralına uyar. MMP-21 splayz bölgeleri, diğer klasik kromozom 11 üzerine kümelenmiş ve diğer temel MMPlerden, MMP-19 ve MMP-28'lerden farklıdır (Ahokas, 2002).

MMP-21'in promotör bölgesi diğer bilinen tüm MMP'lere göre farklılık gösterir. İnsandaki MMP-21 geni üzerinde bulunan TATA box, transkripsiyon başlatıcı ATG kodonuna göre 92 bç uzağına konumlanmıştır.

MMP-21 promotörlerini diğer MMP promotörlerinden ayıran temel özellikler; konsensus aktivatör protein 1 , transkripsiyon faktör Sp-1 yada polyoma virüs aktive edici A-bağlanma protein-3 bölgesine sahip olmamasıdır. MMP-21 promotöründeki Pax ve RBP-Jκ transkripsiyon faktör bağlanma bölgeleri diğer MMP'lere göre farklı bir motife sahip olması konvensiyonel olmayan regülasyona sebep olmaktadır (Ahokas ve ark., 2002).

MMP-21'in 2 ekzonunda Ala191'den Val191 değişimindeki enzimin katalitik domaininin N-terminal parçasında 572C/T tek nükleotit polimorfizmi (SNP) bulunur. Alanin ve Valin aminoasitinde yapısal benzerlik olmasına rağmen, alaninin valine mutasyonunda protein işlevselliğine olumsuz etkisi olabilir.

Birçok çeşitli fetal doku ve erişkin normal dokularda bulunduğu gibi; aynı zamanda tümör dokuları ve tümör hücre çizgilerinde de bulunur. Meme, yumurtalık, akciğer ve prostat kansinimleri, epidermoid kansinom ve osteokansinimlerde bulunur.

Yapılan bir meme kanseri çalışmasına göre; 572C/T polimorfik kısmı MMP-21 geninin katalitik domainini kodlayan bölümünde bulunur. Alanin ve Valin aminoasitlerinin yer değiştirmesi proteinin enzim özelliklerinin malign tümörün gelişiminde ve ilerlemesini etkiler. MMP-21'in C572T (rs10901425) polimorfizmi ekzon 2 içindeki kodon 191 T den C ye geçişi ile ilişkilidir.

2. AMAÇ

Ekstraselüler matris molekülleri, hücresel ortamın şekillenmesi ve gelişiminde önemli rol oynamaktadır. Matrisin olarak da adlandırılan MMP'ler ekstraselüler matris bozulmasına katılan proteinazlardır. MMP'ler membran protein bileşenlerinin yapısını bozarak tümör hücrelerinin invazyonuna neden olur (Popharitov ve ark., 2015).

İnsan MMP-21 geni 10q26.2'de bulunur, 7 ekzon içerir (Shagısultanova ve ark., 2004). C/T tek nükleotid değişimi promotör bölgesinde, 572 pozisyonunda C/T polimorfizmine neden olur. MMP-21 transkripsiyon seviyesi, homozigot C/C alellerine sahip bireylerde, C/T veya T/T genotipine sahip bireylerine oranla daha fazladır.

Son yıllarda kanser ile ilgili yapılan çalışmalarda kanser oluşumunda etkin bir rol oynadığı düşünülen MMP'ler üzerine yoğunlaşmıştır. Shagısultanova ve arkadaşlarının meme kanserinde MMP-21 geninin promotör polimorfizmiyle (572C/T) ile ilgili yaptığı bir çalışmada, meme kanserine sahip bireyler ve sağlıklı kişilerden alınan kan örnekleri sonucunda, 572. bazdaki hasta bireylerdeki genotipleri belirlenerek homozigot T aleline sahip hastalardaki tümör büyüklüğü, C/C homozigotuna sahip hastalara göre daha fazla olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre MMP-21 genindeki 572C/T polimorfizminin meme kanseri gelişimi ve ilerlemesinde herhangi bir önemli etkisine rastlanmamıştır (Shagısultanove ve diğ., 2004).

Ahokas ve arkadaşlarının, insan plasentasından MMP-21 cDNA'sı elde edilerek, RT-PCR ve in vivo bulguları sonucunda doku ve hücrelerde yüksek MMP-21 ekspresyonu embriyogenez ve tümör gelişiminde rol aldığı gösterilmiştir (Ahokas ve diğ., 2002).

Wu ve arkadaşlarının, mide kanseri hastalarında MMP-21 ekspresyon seviyelerine göre hayatta kalabilirliği üzerine çalışılmış ve yüksek ekspresyon seviyelerine sahip hastaların düşük ekspresyon seviyelerine sahip hastalara göre yaşam sürelerinin daha az olduğu belirlenmiştir (Wu ve ark., 2012).

Daha önce Türkiye’de mide kanseri ile MMP-21 gen promotör bölgesindeki (572C/T) polimorfizm arasındaki ilişkiyle ilgili yapılan bir çalışma olmamıştır.

Yaptığımız bu çalışmada, sağlıklı bireylerin dokularında ve mide kanseri hastalarının normal ve tümörlü dokularında MMP-21 geninin promotör bölgesi PZR ile çoğaltılıp, Eco52I restriksiyon enzimi ile kesim işlemi gerçekleştirilerek, 572. bazdaki C/T polimorfizmi araştırılıp, belirlenen genotiplerin *H.pylori* enfeksiyonu, invazyon derinliği, tümör evresi, tümör nekrozu, ailesel hikâye, sigara ve alkol kullanımını açısından karşılaştırılması hedeflenmektedir.

3.MATERYAL

3.1. Araştırmada Kullanılan Örnekler

Bu çalışmada kullanılan mide kanserli hastaların tümör ve evre doku örnekleri, bu hastalara ait patolojik bilgiler, ailesel öykü, sigara, alkol kullanımı gibi bilgileri Cerrahpaşa Tıp Fakültesinden temin edilmiştir. Cerrahpaşa Tıp Fakültesinden alınan 30 adet mide tümör ve evre doku örnekleri (#2405/296) sayılı etik kurul onayı ile kullanılmıştır. Doku örnekleri -80°C de muhafaza edilmiştir. Daha önceden bu doku örneklerinden izole edilen DNA örnekleri -20°C de muhafaza edilmiştir. Kontrol grubu için kullanılan örnekler sağlıklı bireylerden ağız içi epitel doku örneği alınarak izole edilen DNA örnekleri -20°C de muhafaza edilmiştir.

3.2. Ağız İçi Epitel Doku DNA izolasyonunda Kullanılan Solüsyonlar

-600 µl Lizis Tampon

-50 µl Proteinaz K

-300 µl Fenol

-300 µl Kloroform

-50 µl Sodyum Asetat

-300 µl İzopropanol

-500 µl %70'lik Etanol

-50 µl Low-TE

3.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu(PZR) Tamponları ve DNA Enzimleri

10X MgCl ₂ ' süz tampon	: 200 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ 750 mM Tris-HCL (pH=8) % 0,1 Tween 20 (Fermentas, LİTVANYA)
MgCl ₂	: dH ₂ O' da 25 mM (Fermentas, LİTVANYA)
Deoksiribonükleotitler (dNTP)	: 100 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP (Fermentas, LİTVANYA)
Taq DNA Polimeraz	: 5U/µl Rekombinant Taq DNA

3.4. Primerler

Bu çalışmada kullanılan primerler Wei Qiu ve arkadaşlarının çalışması referans alınarak tasarlanmıştır. Primer dizileri ve özellikleri Tablo 3.1.'de gösterilmiştir.

Tablo 3.1.: MMP-21 geni 572C/T polimorfizm bölgesini oluşturup çoğaltmak için kullanılan primerler

Pozisyon	Primer İsmi	Primer Dizisi	Baz Uzunluğu(bp)	Erime Sıcaklığı (T _m)
572	MMP-21 R	5'-CTTCTCCAAGAGGACGCTGAG-3'	21	57.2°C
	MMP-21 F	5'-TGCTCTTACCTCTCCCAAAGC -3'	21	56.8°C

3.5. Restriksiyon Enzimi ve Reaksiyon Tamponu

EagI (Eco52I)	: 10 µl (Fermentas, LİTVANYA)
Reaksiyon Tamponu	: 10X FastDigest Green Buffer
Tanıma yeri	: 5'...C↓ G G C C G...3' 3'...G C C G G↑ C...5'

3.6. Elektroferez İçin Kullanılan Tamponlar ve Kimyasallar

10X TBE (Tris-Borik Asit- EDTA) (pH 8,3) (1 lt) 2H ₂ O (25 mM)	: 100g Tris-Baz 55g Borik Asit 9,3g Na ₂ EDTA- 2H ₂ O (25 mM)
Agaroz jel	: 0,5X TBE tamponunda %2'lik ve %3'lük agaroz (Prona, EEC)
Etidyum Bromür (EtBr)	:10 mg/ml (Sigma, ALMANYA)
6X DNA yükleme boyası	:10 mM Tris-HCl (pH 7,6) 2,5 mg/ml BPB 2,5 mg/ml Ksilen Siyanol 60 Mm EDTA (Fermentas, LİTVANYA)

3.7. DNA Büyüklük Markörleri

GeneRuler 100 baz iftlik DNA Markr: 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 ve 1000 baz çiftlik fragmanlar içeren DNA markörü (Fermentas, LİTVANYA)

3.8. Cihazlar ve Markaları

Cihazlar ve Markalara ait bilgiler Tablo 3.2.'de verildiği gibidir.

Tablo 3.2.: Kullanılan cihazlar ve markalar

Cihazlar	Marka
Tartılar	Hassas terazi, Sartorius BL 120 S (ALMANYA) Hassas Terazi, XB220 A (Presica, İSVİÇRE)
Derin dondurucular	20 °C, Arçelik 2021 D 80 °C, Thermo Fisher Scientific
Buzdolapları	Beko 8742, Arçelik 3061 Plus
Yatay Elektroforez Sistemi	MultiSub Midi (Cleaver Scientific, İNGİLTERE)
Isı Bloğu	DB 2D (Techne, İNGİLTERE)
Görüntüleme Sistemi	Bio-RAD UniversalHoodII (BIO-RAD, İTALYA)
Otoklav	Dik Tip Otoklav (BES, TÜRKİYE)
Manyetik Karıştırıcı	MR 3001
Vorteks	Heidolph, ALMANYA)
PZR Cihazları	Teche TC-512 Teche TecheGene (İNGİLTERE)
Güç Kaynakları	Pharmacia Biotech, (İSVEÇ)
Mikrodalga Fırın	MD 592 SUPER (Arçelik, İSVEÇ)
Su Arıtma Sistemi	Miilipore Milli Q synthesis A10
Mikropipet Seti	0,2-2, 2-20, 20-200, 200-1000 ul'lik Finnipipette (ThermoScientific, FİNLANDİYA)
Santrifüj	Eppendorf AG (GERMANY)

4. METOD

4.1. Primer Tasarımı

MMP-21 geni promotör bölgesi 572. Pozisyonundaki C/T SNP analizi için ileri ve geri primer diziyeye özel olarak tasarlandı.

Şekil 4.1.'de gösterilen dizilerin hedef dizi amplifikasyonu NCBI BLAST kullanılarak test edildi.

```
5' TGCTCTTACCTCTCCCAAAGC CCAGCTTGAT
GTCGACCGCGGGCCCCGGGGGCGGCCAGGTCCT
CGCGGAAGTCCAGCGGGCGTCACCTCGCTCCAC
ATCCTGAAGGCCAGCGCCACAATGCGCCGCTG
GTCGGGCCR CGGACAGTTGGCTGCTCAGGGCCT
CGCCCAGCAGCCGCCAG CTCAGCGTCCTCTTG
GAGAAG3'
```

Şekil 4.1.: PZR ile çoğaltılacak hedef bölgenin belirlenmesi (kırmızı ile vurgulanan yer ileri primer, sarı ile vurgulanan yer geri primer, yeşil ile vurgulanan yer restriksiyon enziminin bağlanma bölgesidir)

4.2. DNA İzolasyonu

Bazı kimyasal maddeler ve enzimler ile canlı hücelere ait hücre zarı veya canlı hücre duvarının yıkılıp DNA'nın ortaya çıkarılması prensibine dayanır. Moleküler çalışmalarda öncelikle DNA'nın saf olarak, proteinlerden arındırılmış bir şekilde, elde edilmesi esastır. Temel olarak hücrenin parçalanması ve DNA'nın açığa çıkması, DNA'nın proteinlerden ayrılması ve çözünür duruma gelmesi, RNA, protein ve diğer makromoleküllerden ayrılmasına göre DNA izolasyonu gerçekleştirilir.

Bu çalışmada sağlıklı bireylerden alınan ağız içi epitel dokular klasik fenol/kloroform tekniğine göre DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

4.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu(PZR)

Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) in vitro olarak DNA'nın çoğaltılmasıdır. Bu teknikte ilk olarak çift sarmal DNA (dsDNA) iplikçikleri yüksek sıcaklıkta birbirinden ayrılır. Bu aşama "denatürasyon" olarak adlandırılır. Primer bağlanması aşamasında, primer olarak kullanılan iki nükleotidin çoğaltılarak hedef diziye bağlanmasıdır. Primer uzaması aşamasında ise Mg^{+2} iyonlarının varlığında, katalizör olan DNA polimeraz ile primerlere nükleotit (dNTP) eklenmesi ve DNA zincirinin 3'OH ucundan uzamasıdır. Her bir döngüde üretilen ürün bir sonraki döngü için "kalıp DNA" görevi görür. Böylece her PCR döngüsü, DNA molekülü üzerinde istenen bölgenin 2 katına çıkması ile sonuçlanır. Bu çalışmada kullanılan PZR bileşenleri Tablo 4.1.'de, döngü koşulları Tablo 4.2'de belirtilmiştir.

Tablo 4.1.: PZR bileşenleri ve miktarları

PZR İçeriği (Reaktifler)	Kullanılan Miktar (Stok konsantrasyonu)
10X Tampon $(NH_4)_2SO_4$	2.5 μ l (10X)
MgCl ₂	3 μ l (25mM)
dNTP	0.5 μ l (10mM)
MMP-21 F Primer	0.25 μ l (10 mM)
MMP-21 R Primer	0.25 μ l (10 mM)
Taq Polimeraz	0.2 μ l (5U/ μ l)
DNA	100 ng
dH ₂ O	17.3 μ l
Toplam Hacim	25 μ l

Tablo 4.2.: PZR koşulları

PZR Koşulları		
İlk Denatürasyon	95 °C, 15 dk	
Denatürasyon	95 °C, 45 sn	Döngü Sayısı: 41
Primerlerin Bağlanması	58 °C, 45 sn	
Uzama	72 °C, 45 sn	
Son Uzama	72 °C, 5 dk	

4.4. Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (RFLP)

Restriksiyon enzimleri (RE), DNA'da özgün, kısa ve simetrik dizilerini tanıyıp keserler. Restriksiyon enzimleri kesimi sonucunda küt ya da yapışkan uçlu (5' veya 3' kuyruklu) DNA parçaları oluşur. DNA molekülü farklı kesim bölgelerine sahip olabilir.

Değişik enzimlerle muamele sonucunda farklı uzunluklarda restriksiyon parçaları oluşur ve bu parçalar jel elektroforezi yoluyla birbirlerinden ayrılabilirler. Aynı RE farklı sayıda bireye uygulandığında, bireylerin genetik yapıları birbirinden farklı olacağından değişik miktar ve uzunlukta parçalar oluşur. DNA parçalarında görülen bu polimorfizmin nedeni nokta mutasyonu olabileceği gibi, inversiyon, delesyon, translokasyondan kaynaklanan büyük mutasyonlarda olabilir. Kısaca; RFLP analizinde restriksiyon enzimlerinin DNA'daki kesim noktalarında ki değişimlerden faydalanılır.

Bu çalışmadaki PZR ile çoğaltılan hedef bölgeler, ECO52I RE kesim koşulları ve oluşması beklenen fragment uzunlukları Tablo 4.3.'de belirtilmiştir. Eğer PCR örneği C/C homozigotuna sahipse 197 bç uzunluğunda bant elde edilir, C/T heterozigotuna sahipse 197-63-134 bç uzunluğunda 3 bant elde edilebilir, T/T mutant homozigotuna sahipse 63-134 bç 2 bant elde edilebilir.

Tablo 4.3.: RFLP reaksiyon miktarları

RFLP Reaksiyon Miktarları
10 µl PCR mix
18 µl dH ₂ O
2 µl 10XBuffer Eco52I
1 µl Eco 52I
RFLP Koşulları
37°C, 4 saat inkübasyon süresi
65°C, 20 dk Eco52I enziminin inaktivasyon süresi
Beklenen DNA Parçaları
Homozigot CC genotipi : 197 bç
Heterozigot CT genotipi : 197, 63, 134 bç
Homozigot TT genotipi: 134, 63 bç

4.5. Agaroz Jel Elektroforezi

DNA fragmanlarının boylarına göre ayırt edilmesini sağlayan jel elektroforezi, uygun bir tampon içerisinde jele yüklenen DNA'nın yapısındaki negatif yüklü fosfat grupları nedeniyle negatif elektrondan pozitif elektrona göç etme prensibine dayanır.

Agaroz, kırmızı alg türü olan Agar agar'dan izole edilir. Agaroz sıcak suda çözünebilir, soğuduğunda ise polimerle karşılıklı hidrojen bağları kurarak jel yapısını oluşturur.

Belirli bir büyüklükteki DNA fragmenti agarozun farklı konsantrasyonlarını içeren jeller boyunca farklı oranlarda göç eder. Düşük agaroz konsantrasyonu büyük DNA'ların ayrılmasını sağlarken, yüksek agaroz konsantrasyonu küçük DNA'ların ayrılmasını kolaylaştırır.

Etiyüm Bromür, DNA bağları arasına bağlanarak UV ışığı altında floresan etki göstermesi sonucunda DNA jelde görünür hale gelir.

Bu çalışmada agaroz jel elektroforezi kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan agaroz jel konsantrasyonları, hangi yöntemlerde kullanıldıkları ve yükleme koşulları Tablo 4.4.'de gösterilmiştir.

Tablo 4.4.: Agaroz jel konsantrasyonları, kullanılan yöntemler ve yükleme koşulları

Kullanıldığı Yöntem	Konsantrasyon	Hazırlanış	Yükleme Koşulu	Yürütme Şartı
DNA Görüntüleme	%0,50'lik	-0,50 gr agaroz -50 ml 0,5x TBE -1,5 µl EtBr	-3 µl yükleme boyası (BPB) -5 µl DNA	120 V 300mA 15 dk
PZR	%2'lik	-1 gr agaroz -50 ml 0,5x TBE -1,5 µl EtBr	-1 µl yükleme boyası (BPB) -5 µl PZR ürünü -2 µl 100 bç marker	110V 300mA 35 dk
RFLP	%3'lük	-1,5 gr agaroz -50 ml 0,5x TBE -1,5µl EtBr	-1 µl yükleme boyası (BPB) -5 µl PZR ürünü -2 µl 100 bç marker	110V 300mA 35 dk

4.6. İstatistiksel Veri Analizi

Çalışmanın istatistiksel değerlendirilmesi SPSS 21 paket programı kullanılarak yapıldı. Tanımlayıcı değerler yaş ortalaması standart sapma olarak, kategorik değişkenler gözlem sayısı ve yüzde olarak gösterildi. Genotiplerle tümör evrelerinin karşılaştırılması (Tümör evresi, tümör nekrozu) lojistik regresyon ile incelenmiştir. Polimorfizmin kontrol grubu için Hardy Weinberg dengesine uyumluluğu analiz edilmiştir. Cinsiyet, *H.pylori*, Tümör nekrozu, Sigara ve Alkol kullanımı, Aile hikayesi için Fisher Exact testi kullanılmıştır.

5. SONUÇ

5.1. Örneklerin Tanımı

Bu çalışmada, mide kanseri olan 30 hastanın tümör ve çevre dokuları ile toplam 30 çift örnek kullanılmıştır. Tümör dokularına ait *H. pylori* enfeksiyonu, invazyon derinliği, tümör evresi, tümör nekrozu, sigara ve alkol kullanımı, ailesel hikâye bulgularına göre yüzdelik oranları ve yaş ortalaması \pm standart sapma olarak Tablo 5.7.'de gösterilmiştir.

Kontrol grubu olarak çalışılan 30 sağlıklı birey örnek olarak kullanılmıştır. Bireylere ait sigara ve alkol kullanımı, ailesel hikaye bulgularına göre yüzdelik oranları ve yaş ortalaması \pm sapma olarak Tablo 5.1.'de gösterilmiştir.

Tablo 5.1.: Kontrol grubunun belirli karakteristik özelliklerine göre yüzdeleri

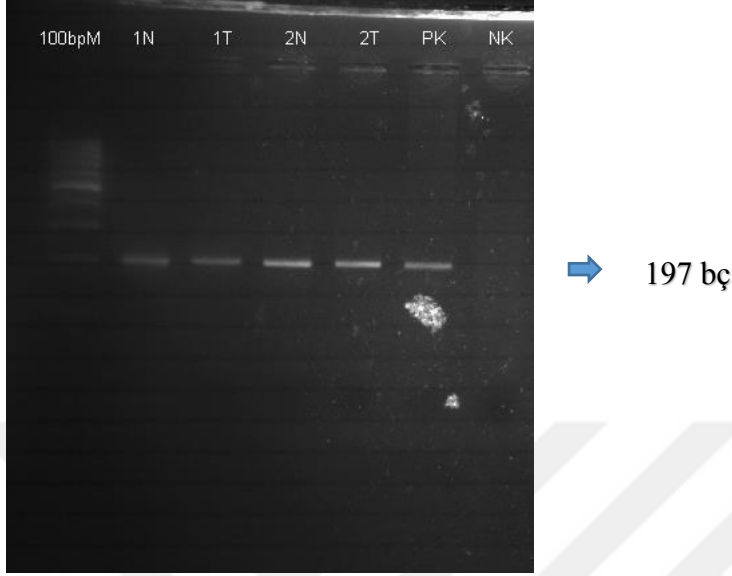
	Sağlıklı Birey Sayısı	Ortalama	Standart Sapma
Yaş	30	57,3	9,13
Cinsiyet	30		
Kadın	10	59,2	9,4
Erkek	20	56,4	9,08
		Yüzde(%)	
	Var/Yok		
Sigara	12/18	40-60	
Alkol	10/20	33,3-66,7	
Aile Hikayesi	18/12	60-40	

5.2. MMP-21 Geni Promotör Bölgesi 572 C/T Polimorfizminin PZR-RFLP Yöntemi ile Moleküler Analizi

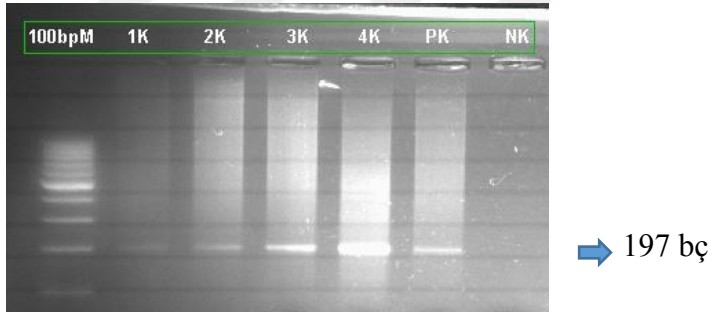
5.2.1. İlgili Gen Bölgesinin PZR ile Çoğaltılması

MMP-21 geni 572 C/T tek nükleotid polimorfizmi için diziyeye özel olarak geri ve ileri primer tasarlanmıştır.

Polimorfik bölge için tasarlanan bu primerler sınıflandırılarak çoğaltılmış ve 197 bç'lik PZR ürünü elde edilmiştir (Şekil 5.1.).



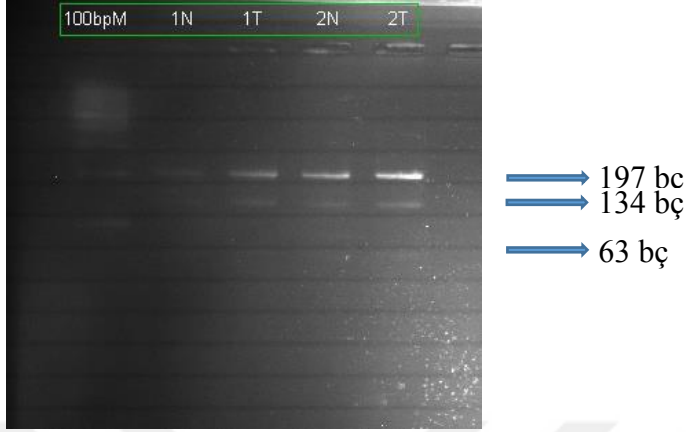
Şekil 5.1.: MMP-21 572 C/T polimorfizm Bölgesinin PZR ile Amplifikasyonu sonuçlarının %2'lik Agaroz Jelde Görünümü (T: Tümörlü Doku, N: Normal Doku, PK: Pozitif Kontrol, NK: Negatif Kontrol)



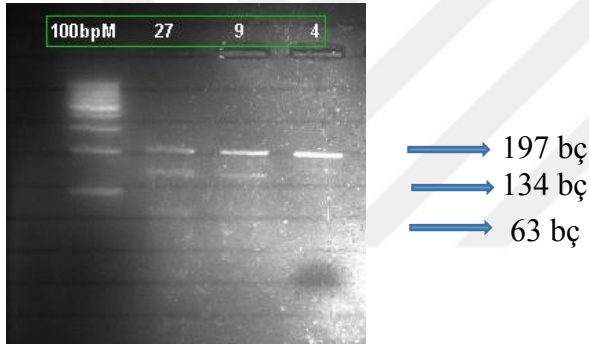
Şekil 5.2.: Kontrol grubunun PZR sonuçlarının %2'lik Agaroz jelde görünümü (K: Kontrol)

5.2.2. PZR Ürünlerinin Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi

Çoğaltılan ilgili MMP-21 gen bölgesi, 572 C/T tek nükleotid polimorfizmi analizi için Eco52I restriksiyon enzimi ile muamele edilmiştir. Bant boyları 100 bç DNA ladder ile %3'lük agaroz jelde 35 dakika yürütülerek değerlendirilmiştir. CC genotipinde 197 bç uzunluğunda bant görülmesi, CT genotipinde 197, 134, 63 bç uzunluğunda üç bant görülmesi ve TT genotipinde 134, 63 bç uzunluğunda iki bant görülmesi beklenmektedir (Şekil 5.3.).



Şekil 5.3.: Polimorfik Promotör Bölgesi Yapılan Örneklerin RFLP sonuçlarının %3'lük Agaroz Jelde Görünümü (1N-T Homozigot, 2N Homozigot, 2T Heterozigot).



Şekil 5.4.: Kontrol grubunun RFLP sonucunda % 3'lük Agaroz jelde görünümü

5.3. Verilerin İstatistiksel Analizi

PZR-RFLP yöntemi sonucu elde edilen hasta tümör dokusu örneklerinin ve sağlıklı kontrol grubu örneklerinin genotip ve allelotip sayısı sırayla Tablo 5.2.'de gösterilmiştir. Genotip dağılımının Hardy Weinberg dengesine uyumluluğu analiz edilmiştir. (Tablo 5.3.)

Tablo 5.2.: Hasta/sağlıklı bireylerin dokularına ait MMP-21 572C/T genotip-allelotip sayıları ve yüzdeleri

Genotip	Genotip Sayısı	Genotip Yüzdesi
CC	9 / 10	30 / 33,3
CT	14 / 16	46,6 / 53,3
TT	7 / 4	23,3/13,3
Allelotip	Allelotip Sayısı	Allelotip Yüzdesi
C	32 / 36	53,3 / 60
T	28 / 24	46,6 / 40

Tablo 5.3.: Hasta ve kontrol gruplarının Hardy Weinberg dengesine göre genotip dağılımı

	Kontrol			Hasta		
Genotip	CC	CT	TT	CC	CT	TT
%	59,9	29,99	9,99	29,99	46,66	23,33
n	18	9	3	9	14	7
HWE p değeri	0,326821			0,724066		

MMP-21 572 C/T (rs10901425) polimorfizminin kontrol grubu için Hardy-Weinberg dengesinde olduğu tespit edilmiştir ($p=0,326821$).

Genotiplerin grupları arası dağılımı ve odds ratio (oranlar oranı, risk) alelik ve genotipik modellere göre lojistik regresyon ile incelenmiştir. Sonuçlar rs10901425 T alelinin C aleline göre koruyucu etki gösterdiği , aynı şekilde TT alelinin de CC aleline göre koruyucu etkisi olduğu belirlenmiştir. Heterozigot genotip için ise anlamlı ilişki belirlenmemiştir (Tablo 5.5.).

Tümör örnekleri erken evre (1. Evre) ve geç evre (2. ve 3. evre) olarak gruplandırıldığında, genotiplerle tümör evreleri arasında herhangi bir ilişki belirlenmemiştir (Tablo 5.6.). Tümörde nekroz varlığı ile genotip frekansları arasında da anlamlı bir ilişki görülmemiştir (Tablo 5.7.).

Tümörde invazyon derinliği ile farklı genotip frekansları arasında anlamlı bir ilişki görülmemiştir (p=0,699619). Tümör oluşumunun cinsiyetler arasında da anlamlı bir ilişkiye rastlanmamıştır. Tümör varlığı ile *H. Pylori* arasında anlamlı bir ilişki görülmemiştir (p=0,697593). Sigara kullanımı ile tümör varlığı arasında anlamlı bir ilişki görülmemiştir (p=0,684153). Alkol kullanımı ile tümör varlığı arasında anlamlı bir ilişki görülmemiştir (p=0,654377). Aile öyküsü ile tümör varlığı arasında anlamlı bir ilişki görülmemiştir (p=0,428571).

Tablo 5.4.: Genotipik grupların tümör oluşumu üzerindeki etkilerinin Lojistik Regresyon ile incelenmesi

	OR	%95CI	Ki-kare	P değeri
C	Referans			
T	0,381	0,176-0,826	6,13	0,01333
CC	Referans			
CT	0,667	0,136-3,272	0,25	0,61631
TT	0,214	0,045-1,032	4,00	0,04557

Tablo 5.5.: Farklı genotipik grupların tümör evreleri arasındaki ilişkisi

	OR	%95CI	Ki-kare	P değeri
C	Referans			
T	0,605	0,205-1,783	0,84	0,36024
CC	Referans			
CT	0,514	0,076-3,488	0,47	0,49252
TT	0,381	0,043-3,338	0,78	0,37703

Tablo 5.6.: Tümör nekroz varlığının farklı genotipik frekanslarla ilişkisi

	OR	%95CI	Ki-kare	P değeri
C	Referans			
T	0,833	0,265-2,620	0,10	0,75497
CC	Referans			
CT	3,0	0,390-23,072	1,17	0,27976
TT	0,667	0,087-5,127	0,15	0,69627

Bu sonuçlara göre hastaların 9'u (%30) kadın, 21'i (%70) erkektir. *H. Pylori* enfekte hasta sayısı 9 (%30)'dur. Tümör evre tiplerinde 10 (%33,3) kişi 1. evre, 7 (%23,3) kişi 2. Evre, 13 (%43,3) kişi 3. evrededir. İnvazyon derinliğine bakıldığında L.propia/mukoza 27 (%90) kişi, subseroza 3 (% 10) kişi sahiptir. Tümör nekrozuna sahip 22 (%73,3) kişi bulunmaktadır. Hastalar arasında 22 (%73,3) kişi sigara, 18 (%60) alkol kullanırken 4 (%13,3) kişinin aile geçmişinde mide kanseri görülmüştür.

Bu sonuçlara göre sağlıklı bireylerin 10'u (%33,3) kadın, 20'si (%66,7) erkektir. Bireyler arasında 12 (%40) sigara, 10 (%33,3) alkol kullanırken 18 (%60) kişinin aile geçmişinde kanser bulunmaktadır.

Tablo 5.7.:Tablo Mide kanser hastalarının belirli karakteristik özelliklerine göre yüzdeleri ve Fisher kesin olasılık testi analizi

	n (Hasta Sayısı)	Ortalama	Standart Sapma	Sütun2	Exact (HWE p değeri)
Yaş	30	55,8	± 14,6		
Cinsiyet	30	55,8	± 14,6		
Kadın	9	56,8	± 19,07		0,225998
Erkek	21	55,3	± 12,9		0,184742
Mide Kanseri	n (Hasta Sayısı)	Yüzde (%)	Bilgisi Olan Hasta Sayısı	Bilgisi Olmayan Hasta Sayısı	
Toplam Hasta	30				
<i>H. Pylori</i>	9	30%	21	9	0,697593
Tümör Evresi					
1	10	33,30%			
2	7	23,30%			
3	13	43,30%			
İnvazyon Derinliği					
Lamina Propia/M. Mukoza/Submukoza	27	90%			
Subseroza	3	10%			
Tümör Nekrozu	22	73,30%	30	0	0,199378
Sigara	22	73,30%	30	0	0,684153
Alkol	18	60%	30	0	0,654377
Aile Hikayesi	4	13,30%	30	0	0,428571

6. TARTIŞMA

SNP, DNA dizisi üzerinde meydana gelen tek bazlık nükleotid değişimleri olarak tanımlanır. Bunun yanı sıra, DNA dizisi üzerindeki tek bazlık delesyon ve insersiyon ile gen ifadesinde değişiklik meydana gelebilir (Brooks., 1999).

SNP oluşumunda meydana gelen tek bazlık nükleotid değişimlerinde, pürin (A-G) veya pirimidin (T-C) bazlarının kendi aralarında ki değişimi transisyon olarak adlandırılırken, bir pürin bazının pirimidin bazı ile yer değiştirmesi transversiyon olarak adlandırılır (Zang ve diğ., 2013).

Bir toplum popülasyonunda ki tek nükleotid değişiminin frekansı %1 den daha büyükse bu özellik polimorfizm olarak nitelendirilirken, popülasyonda ki frekansı % 1 den daha düşükse bu değişim mutasyon olarak nitelendirilmektedir (Zang ve diğ., 2013).

Mide kanserine neden olan çevresel faktörler; sigara, alkol, yaş, coğrafya, cinsiyet, *H.pylori* enfeksiyonu, beslenme olarak sayılabilir.

Mide kanseri insidansı Japonya, Çin, Doğu Avrupa ve Güney Amerika' da diğer ülkelere göre daha yüksektir. En sık görüldüğü yaş aralığı 50-60'lı yaşlardır. Gelir düzeyi düşük olan toplumlarda mide kanseri artış gösterir. Bu çalışmada mide kanseri olan 30 hastanın tümörlü ve normal dokusu incelenmiştir. 30 hastanın 9'u kadın 21'i erkektir. Yaş ortalaması ise kadınlarda 59,2 erkeklerde 56,4 olarak hesaplanmıştır.

H.pylori enfeksiyonu mide ülseri, mide iltihabı, mide kanseri riskini artırmaktadır. *H.pylori* enfeksiyonu olan kişiler tedavi edilmezlerse mide kanseri oluşum riski artar (Wagner ve ark., 1997). Bu çalışmada 30 mide kanserli hastanın 9'inde *H.pylori* enfeksiyonu görülmüştür. Elde edilen sonuçlara göre tümör oluşumunda *H.pylori* varlığı anlamlı bulunamamıştır.

Yaptığımız bu çalışmada homozigot CC genotipine sahip 9 hastadan 7'sinin sigara içtiği bilinmektedir. Heterozigot CT genotipine sahip 14 hastanın 9'unun sigara içtiği bilinmektedir. Homozigot mutant TT genotipine sahip 7 hastanın 6'sının sigara içtiği bilinmektedir. Bu çalışmada hastaların % 60'ı alkol kullanmaktadır. Elde edilen istatistiksel sonuçlara göre alkol ve sigara kullanımı ile rs10901425 polimorfizmi arasında anlamlı bir ilişkiye rastlanamamıştır.

Mide kanseri nadiren ailesel geçişlidir. Bu çalışmada 30 hastanın 4'ünün aile geçmişinde mide kanserine rastlanmıştır. Aile hikayesi ve rs10901425 polimorfizmi arasında anlamlı bir ilişki kurulamamıştır.

Mide kanseri patolojisini etkileyen birçok prognostik faktör vardır. Büyüme faktörleri ve reseptörleri, hücre-hücre düzenleyicileri, hücre-adezyon molekülleri, MMP'ler gibi invazyon ve metastaza katılan gen ve moleküller, telomeraz aktivasyonu prognostik faktörlere birer örnektir. Bu faktörlerin dışında epigenetik değişiklikler ve genetik polimorfizmler de mide kanserini etkileyen prognostik faktörlerdendir (Tahara ve ark., 1993).

MMP ailesinin bir üyesi olan MMP-21, 10. Kromozomun q kolunun 2.bölgesinin 6. bandının 2. alt bandında bulunur. ESM'nin parçalanması, tümör invazyonu ve metastaz için önemlidir. MMP-21'in ESM bozulmasında önemli olduğu düşünülmektedir. MMP-21 572 C/T polimorfizminin mide kanseriyle ilişkili olduğu düşünülmektedir. MMP-21 transkripsiyon seviyesi, homozigot C/C alellerine sahip bireylerde, C/T veya T/T genotipine sahip bireylerine oranla daha fazladır. Yaptığımız bu çalışmada, kullanılan hasta bireylerin % 90'ı 1. derece invazyona sahiptir. Shagisultanova ve arkadaşları MMP-21 572C/T polimorfizmi ile meme kanseri arasında bir ilişki bulmaya çalışmışlardır. 76/320 hasta- kontrol grubunu yaş, klinik aşama, patolojik tümör tipi, metastaz varlığına göre gruplandırmışlardır. Yapılan moleküler RFLP analizi sonuçları ile belirlenen kriterlerin istatistiksel veri analiziyle karşılaştırılması sonucunda meme kanseri gelişimi ve ilerlemesinde MMP-21 572C/T polimorfizmiyle anlamlı bir ilişki bulamamışlardır (Shagisultanova ve ark., 2004)

Qiu ve arkadaşları Çin popülasyonunda MMP-7, MMP-8, MMP-21 polimorfizmleri ile hepataselüler karsinoma arasında bir ilişki kurmaya çalışmışlardır. 434/480 hasta-kontrol grupları hepatit B taşıyan ve taşımayanlar; yaş, sigara ve alkol durumu, aile hikayesi, tüketilen yıllık sigara paketi'ne göre karşılaştırılmış ve hepataselüler karsinoma ile MMP-21 polimorfizmi arasında ilk sonuçlara göre anlamlı bir ilişki olabileceğini belirtmişlerdir (Qiu ve ark., 2008).

Ahokas ve ark., tarafından yapılan çalışmada, insan plasentasından MMP-21 cDNA'sı elde edilerek, RT-PCR ve in vivo bulguları sonucunda doku ve hücrelerde yüksek MMP-21 ekspresyonu embriyogenez ve tümör gelişiminde rol aldığı gösterilmiştir (Ahokas ve diğ., 2002).

Wu ve ark., tarafından yapılan çalışmada, mide kanseri hastalarında MMP-21 ekspresyon seviyelerine göre hayatta kalabilirliği üzerine çalışılmış ve yüksek ekspresyon seviyelerine sahip hastaların düşük ekspresyon seviyelerine sahip hastalara göre yaşam sürelerinin daha az olduğu belirlenmiştir (Wu ve ark., 2012).

Bister ve ark., tarafından yapılan bir çalışmada, pankreatik adenokarsinomlu hücre hatları olan PANC-1, BxPC-3, AsPC-1 ve MMP-21, MMP-26, TIMP-4 ekspresyon seviyeleri incelenmiştir.

Boyd ve ark., tarafından yapılan çalışmada, insan ve farelerde skuamöz hücre karsinomlarında MMP-21, -10, ekspresyon seviyelerine bakılarak ulaşılan sonuca göre MMP-21 ekspresyon seviyesinin skuamöz hücre karsinomu ve invazyonu arasında herhangi bir bağlantı bulunamamıştır. MMP-10 ekspresyon seviyesinin skuamöz hücre karsinomu başlangıcında etkin bir rol oynadığı ortaya konmuştur.

Bütün bu veriler ışığında MMP-21 572C/T polimorfizmi ile mide kanseri arasında anlamlı bir ilişki kurulamamıştır. Daha önce yapılan çalışmalar göz önüne alındığında daha geniş hasta ve kontrol gruplarında tekrarlanmış araştırmalarla çalışma geliştirilebilir.

7. KAYNAKLAR

Ahokas K., Matrix metalloproteinase-21, the human orthologue for XMMP, is expressed during fetal development and in cancer, *gene* Volume 301, Issues 1-2, November 2002, pages 31-41996

Alexander, C. M., Howard, E. W., Bissell, M. J. & Werb, Z. Rescue of mammary epithelial cell apoptosis and entactin degradation by a tissue inhibitor of metalloproteinases-1 transgene. *J. Cell Biol.* 1996, 135, 1669–1677.

Bilkem I., İnsan Anatomisine Giriş, Nobel tıp kitabevi, 2013.

DeClerck, Y.A.; Mercurio, A.M.; Stack, M.S.; Chapman, H.A.; Zutter, M.M.; Muschel, R.J.; Raz, A.; Matrisian, L.M.; Sloane, B.F.; Noel, A.; et al. Proteases, extracellular matrix and cancer: A workshop of the path B study section. *Am. J. Pathol.* 2004, 164, 1131–1139.

Deryugina E, Quigley J, Matrix metalloproteinases and tumor metastasis; *Cancer metastasis Rev* (2006) 25:9-34

Edwards R. The problem of tobacco smoking. *BMJ* 2004; 328: 217-9.

Heath CW, Fontham ETH. Cancer etiology. In: Lenhard RE, Osteen RT, Gansler T (eds). *Clinical Oncology*. 1st ed. Atlanta, Georgia 2001: 37-55.

Herszényi, L.; Plebani, M.; Carraro, P.; de Paoli, M.; Roveroni, G.; Cardin, R.; Foschia, F.; Tulassay, Z.; Naccarato, R.; Farinati, F. Proteases in gastrointestinal neoplastic disease. *Clin. Chim. Acta* 2000, 291, 171–187.

Ii M, Yamamoto H, Adachi Y, Maruyama Y, Shinomura Y. : Role of matrix metalloproteinase-7 (matrilysin) in human cancer invasion, apoptosis, growth, and angiogenesis. *Exp Biol Med.* 2006;231:20– 27.

Jones P., Cancer-epigenetics comes of age *Nature Genetics* 21, 163 - 167 (1999)

Kameda T, Yasui W, Yoshida K, Tsujino T, Nakayama H, Ito M, et al. Expression of ERBB2 in human gastric carcinomas: relationship between p185ERBB2 expression and the gene amplification. *Cancer Res* 1990;50:8002-9.

Kiyokawa E, Takai S, Tanaka M, Iwase T, Suzuki M, Xiang Y-Y, et al. Overexpression of ERK, an EPH family receptor protein tyrosine kinase, in various human tumors. *Cancer Res* 1994;54: 3645-50.

Kuniyasu H, Yasui W, Kitadai Y, Yokozaki H, Ito H, Tahara E. Frequent amplification of the c-met gene in scirrhous type stomach cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 189:27-32.

Kuniyasu H, Yoshida K, Yokozaki H, Yasui W, Ito H, Toge T, et al. Expression of *cripto*, a novel gene of the epidermal growth factor family, in human gastrointestinal carcinomas. *Cancer Res* 1991;51:969-73.

Landis SH, Murray T, Bolden S, et al. Cancer statistics, 1998. *CA Cancer J Clin* 1998; 48: 6.

Lecuit M, Abachin E, Martin A, et al. Immunoproliferative small intestinal disease associated with *Campylobacter jejuni*. *N Engl J Med* 2004; 350: 239-48.

Mabuchi K, Soda M, Ron E, et al. Cancer incidence in atomic bomb survivors. Part I. Use of tumor registries in Hiroshima and Nagasaki for incidence studies in the atomic bomb survivors. *Radiat Res* 1994; 137: 1. Wagner S, Beil W, Westermann J et al. Regulation of gastric epithelial cell growth by helicobacter pylori. *Gastroenterology* 1997.113: 1836 - 1847

Manes, S. et al. The matrix metalloproteinase-9 regulates the insulin-like growth factor-triggered autocrine response in DU-145 carcinoma cells. *J. Biol. Chem.* 1999 274, 6935–6945.

Matsumura Y, Tarin D. Significance of CD44 gene products for cancer diagnosis and disease evaluation. *Lancet* 1992;340:1053- 8.

Mitsiades, N., Yu, W.-H., Poulaki, V., Tsokos, M. & Stamenkovic, I. Matrix metalloproteinase-7-mediated cleavage of Fas ligand protects tumor cells from chemotherapeutic drug cytotoxicity. *Cancer Res.* 2001, 61, 577–581. Sternlicht MD, Werb Z: How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2001, 17: 463– 516.

McCaw A., Ewald A., Werb Zena., *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8, 221-233 (March 2007)

Nakatsuru S, Yanagisawa A, Ichii S, Tahara E, Kato Y, Nakamura Y, et al. Somatic mutation of the *APC* gene in gastric cancer: frequent mutations in very well differentiated adenocarcinoma and signet-ring cell carcinoma. *Hum Molec Genet* 1992; 1: 559-63.

Neugut AI, Hayek M, Howe G. Epidemiology of gastric cancer. *Semin Oncol* 1996;23(3):281-291.

Parkin DM, Bray F, Ferlay J, et al. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005;55(2):74-108.

Pei D, Weiss SJ. Furin-dependent intracellular activation of the human stromelysin-3 zymogen. *Nature.* 1995; 375:244-247.

Philippe E. Van den Steen, Bénédicte Dubois, Inge Nelissen, Pauline M. Rudd, Raymond A. Dwek, and Ghislain Opdenakker. Biochemistry and Molecular Biology of Gelatinase B or Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9). *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 2002, 37(6):375–536

Philippe E. Van den Steen, Bénédicte Dubois, Inge Nelissen, Pauline M. Rudd, Raymond A. Dwek, and Ghislain Opdenakker. Biochemistry and Molecular Biology of Gelatinase B or Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9). *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 37(6):375–536 (2002)

Polyak K, Lee M-H, Erdjument-Bromage H, Koff A, Roberts JM, Tempst P, et al. Cloning of p27^{OP1}, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals. *Cell* 1994; 78:59-66.

Rydlova M. , Holubec Jr., M. Ludvikova Jr., D. Kalfert, J. Franekova, C. Povysil and M. Ludvikova. Biological Activity and Clinical Implications of the Matrix Metalloproteinases. *Anticancer Research* 2008, 28, 1389-1398.

Shagisultanova E, Novikova I, et al. The Matrix Metalloproteinase-21 Gene 572C/T Polymorphism and the Risk of Breast Cancer. *Anticancer Research* 24;199-202(2004).

SEER, SEER Stats Facts Sheet. (Cited 2009 December 27,2009). Available from: <http://www.seer.cancer.gov/statfacts/html/stomach.html>.

Squire JA, Whitmore GF, Phillips RA. Genetic basis of cancer. In: Tannock IF, Hill RP (eds). *The Basic Science of Oncology*. 3rd ed. New York: McGraw- Hill, 1998: 48-105.

Stadtlander C, Waterbor J: Molecular epidemiology, pathogenesis and prevention of gastric cancer. *Carcinogenesis* 20:2195-2207, 1999

Sternlicht M. D., Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2001 ; 17: 463– 516.

Tahara E. Molecular mechanism of stomach carcinogenesis. *J Cancer Res Clin Oncol* 1993; 119:265-72.

T. Vlaykova, D. Dimov ; Polymorphisms of matrix metalloproteinases (MMP) in COPD; *Biotechnol. & Biotechnol. Eq.* 26/2012/SE 50 years Roumen Tsanev Institute of Molecular Biology, p111-19.

Yıldırım M., İnsan anatomisi 7.baskı Prof. Dr. Mehmet yıldırım, Nobel tıp kitabevleri, 2014, sf.188-189)

Weinberg RA. Oncogen and tumor suppressor genes. CA 1994; 44: 160-9.

Woessner JF, JR. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. The FASEB Journal, Vol. 5 May 1991, 2145-2154.

Zang X., Zhang S. ve diğ., SNP rs3825214 in TBX5 Is Associated with Lone Atrial Fibrillation in Chinese Han Population, *Journal*, 2013.

8. ÖZGEÇMİŞ

1991 yılında, İstanbul'da doğan Melike ÖMERUSTAOĞLU 2009 yılında İstanbul Bağcılar Lisesi'nden mezun oldu.

Lisans öğrenimi Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Biyoloji Bölümü'nde yaparak 2013 yılında mezun oldu.

Yüksek lisans eğitimini Haliç Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda yapmak üzere 2015 yılında başlamıştır.