T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
RADYASYON ONKOLOJİSİ
ANABİLİM DALI

Tez Yöneticisi
Doç. Dr. Zafer KOÇAK

POSTOPERATİF ADJUVAN KEMORADYOTERAPİ UYGULANAN MİDE ADENOKARSİNOMU TANILI HASTALARDA Her-2 GEN POLİMORFİZMİ VE p21 GEN MUTASYONUNUN SAĞKALIM, LOKAL-BÖLGESEL VE UZAK KONTROLE ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

(Uzmanlık Tezi)

Dr. Alaattin ÖZEN

EDİRNE-2010

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince yetişmemde büyük katkı ve emeği geçen, bilgi ve tecrübeleri ile her zaman yol gösterici olan tez yöneticim ve değerli hocam Doç. Dr. Zafer KOÇAK, değerli öğretim üyeleri Doç. Dr. Cem UZAL, Doç Dr. Murat ÇALOĞLU, Doç. Dr. Vuslat YÜRÜT ÇALOĞLU, Yrd. Doç. Dr. Ruşen COŞAR ALAS, Yrd. Doç. Dr. Mert SAYNAK, laboratuar çalışmalarını gerçekleştiren Yrd. Doç. Dr. Fulya ÖZ PUYAN, Yrd. Doç. Dr. Tammam SİPAHİ, Araş. Gör. Dr. Tufan ÇİFTÇİ, Suat ÇAKINA ve tüm çalışma arkadaşlarıma sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ VE AMAÇ……. 1

GENEL BİLGİLER ……. 3

MİDE ANATOMİSİ VE HİSTOLOJİSİ……. 3

EPİDEMİYOLOJİ…… 4

ETYOLOJİ…… 4

TANI…….. 5

PATOLOJİK ÖZELLİKLER……. 6

EVRELEME……. 6

PROGNOSTİK FAKTÖRLER…….. 7

p21…….. 7

Her-2…….. 7

TEDAVİ…… 8

GEREÇ VE YÖNTEMLER…….. 11

BULGULAR……... 18

TARTIŞMA……. 30

SONUÇLAR…… **35**

ÖZET…… **36**

SUMMARY…… **38**

KAYNAKLAR…… **40**

EKLER……

SİMGE VE KISALTMALAR

CDK: Cyclin Dependant Kinas

CIP1: Cyclin-Dependent Kinases Interacting Protein-1

DNA: Deoksiribo Nükleik Asit

dNTP: Deoksiribonükleozid trifosfat

DSÖ: Dünya Sağlık Örgütü

EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor

FISH: Fluorescence in situ Hybridization

Gy: Gray

ICRU: International Commitee of Radiation Units

IHC: Immunohistochemistry

İHK: İmmünohistokimya

PCR: Polymerase Chain Reaction

PZR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu

RT-PCR: Real Time Polymerase Chain Reaction

SDI-1: Senescent Cell-derived Inhibitor-1

TEMED: Tetrametiletilendiamin

WAF1: Wild Type p53 Activated Fragment-1

GİRİŞ VE AMAÇ

Mide kanseri sık görülmekle birlikte görülme sıklığı coğrafi farklılıklar göstermektedir. Özellikle Japonya, Çin, Güney Amerika ve Doğu Avrupa'da görülme sıklığı yüksektir (1). Türkiye'de mide kanseri gastrointestinal kanserler arasında ilk sırada gelirken, tüm kanserler arasında ise dördüncü sırada yer almaktadır. Sağlık Bakanlığı'nın son istatistiklerine göre Türkiye'de mide kanseri erkeklerde beşinci, kadınlarda altıncı sırada yer almaktadır (2). Mide kanseri oluşumunda rolü olan sebepler arasında çevresel, genetik, ailesel faktörlerin yanı sıra, *helicobacter pylori* ve beslenme alışkanlıkları da yer almaktadır (3-6).

Mide kanserli hastalarda en önemli prognostik faktör TNM evresidir. Transmural penetrasyon, tutulu lenf nodu sayısı ve lokalizasyonu sağkalım ile direk olarak ilişkilidir. Lauren sınıflamasına göre intestinal tip mide kanseri diffüz tipe göre daha iyi prognoza sahiptir. Linitis plastika prognozu kötüleştirmektedir (7-9). Modern moleküler biyoloji yaklaşımları mide kanserindeki heterojeniteyi desteklemektedir. CD44 ekspresyonu, telomeraz reaktivasyonu, p53 gen aktivasyonu, tamir genlerinin reaktivasyonu Her-2, bcl-2 gibi protoonkogenlerin overekspresyonunu içine alan genetik bozukluklar tespit edilmiş ve kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir (10).

Her-2 (c-ErbB-2) kromozom 17q21'de lokalize, 185 kDa molekül ağırlıklı, 1255 aminoasitli transmembran glikoproteinini kodlayan bir protoonkogendir. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda Her-2 protoonkogeni ve kanserlerdeki overekspresyonu araştırılmıştır (11-15). Meme kanserinde Her-2 ekspresyonunun kötü prognozla ilişkisi olduğu gösterilmiştir (16,17). Akciğer adenokarsinomlu hastalarda yapılan bir çalışmada Her-2 overekspresyonunun kısa sağkalım süresi ile ilişkili olduğu bulunmuştur (18). Mide kanserli

hastalarda Her-2 overekspresyonu gösteren hastaların göstermeyen hastalara göre düşük sağkalım oranına sahip olduğu ve Her-2 overekspresyonunun kötü prognostik faktör olduğunu gösteren çalışmalar vardır (19,20).

p21 geni kromozom 6p'de lokalize, siklin bağımlı kinazları inhibe eden, hücre döngüsü kontrolünde görevli p21 proteinini kodlayan bir tümör baskılayıcı gendir. p21 gen mutasyonu ve p21 proteinin ekspresyon azlığının mide kanserinde kötü prognostik faktör olarak rol oynadığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır (21,22).

Bu çalışmada Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Radyasyon Onkolojisi polikliniğine başvuran opere mide kanseri tanılı hastalarda Her-2 gen polimorfizmi ve p21 gen mutasyonunun sağkalım, lokal-bölgesel ve uzak kontrole etkilerinin değerlendirilmesi amaçlandı.

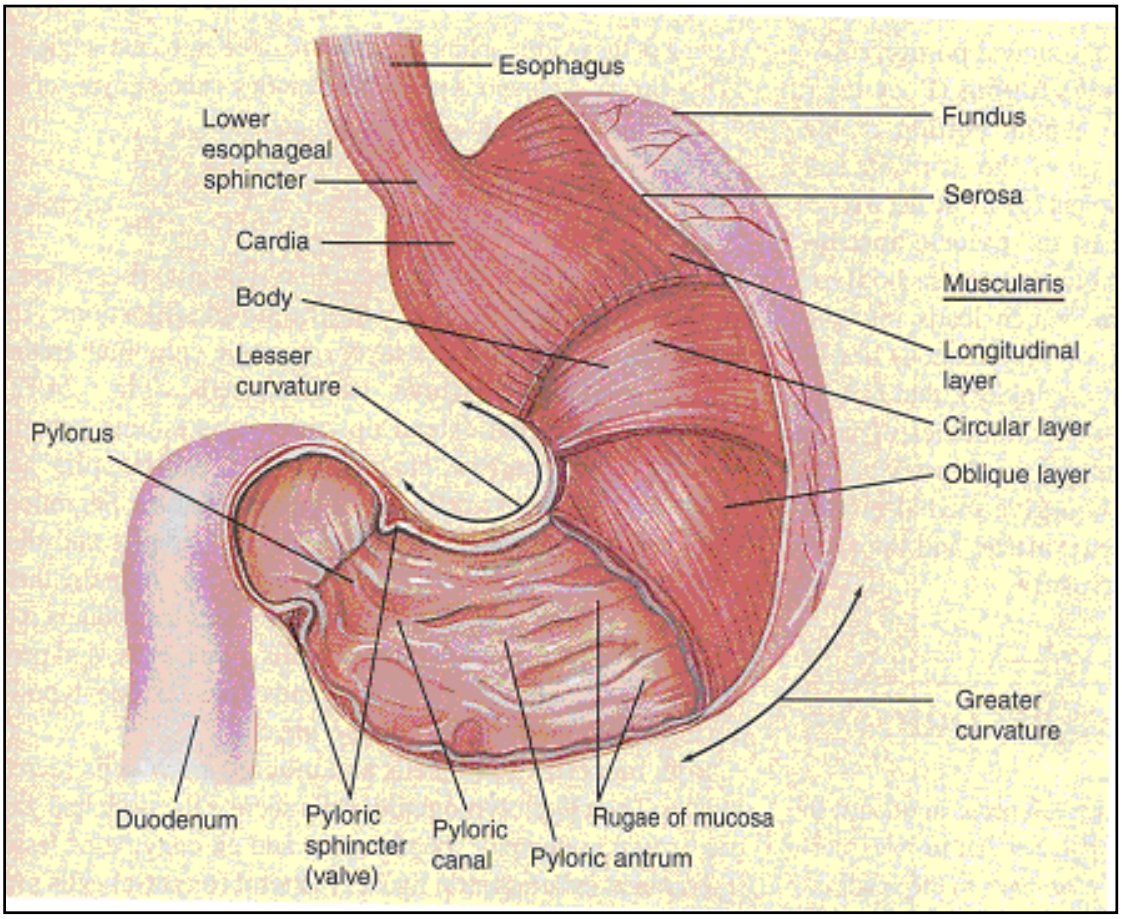
GENEL BİLGİLER

MİDE ANATOMİSİ VE HİSTOLOJİSİ

Mide gastroözefageal bileşkeden başlar ve pylorda sonlanır. Mide dört anatomik bölgeye ayrılmıştır: kardia, fundus, gövde (korpus) ve pylor. Gastroözegeal bileşke onbirinci torakal vertebra korpusu seviyesinde orta hattın solunda, pylor ise birinci lomber vertebra seviyesinde orta hattın sağında yer alır. Pylor duodenumun birinci kısmına açılır (Şekil 1). Küçük kurvatur omentum minor, büyük kurvatur ise omentum major ile ilişkilidir. Midenin ön yüzü periton ile örtülüdür. Karaciğer, karın ön duvarı, dalak, sol böbrek üstü bezi, sol böbrek, pankreas ve transvers kolon ile komşuluğu bulunmaktadır. Mide çöliak akstan beslenmektedir. Venöz akımı portal vene açılır. Lenfatik drenajı arterlerine eşlik edecek şekilde esas olarak çöliak lenf nodları aracılığı ile olmaktadır (23).

Histolojik olarak mide kardia, gövde ya da fundus ve pylor ya da antrum olmak üzere üç belirgin bölgeye ayrılmaktadır. Mide duvarı dört tabakadan meydana gelir. Bunlar: mukoza, submukoza, muskuler tabaka ve serozadır. Boş midenin mukoza ve submukozası "ruga" olarak isimlendirilen uzunlamasına kıvrımlar oluşturur. Mide yiyecekle dolduğunda bu kıvrımlar yassılaşır. Tüm mide boşluğunda değişik uzunluklarda, lamina propriya içine uzanarak mide çukurcuklarını oluşturan bir yüzey epiteli bulunur. Midenin her bölgesi için karakteristik bir yapı gösteren dallanmış tübüler bezler mide çukurcuklarına açılır. Yüzeyi ve mide çukurcukları tek katlı prizmatik epitel ile döşelidir. Hücrelerin tümü mide asit salgısına karşı koruyucu mukus salgılar. Kardia bölgesinde mukus üreten bezler baskın iken fundus ve gövde bölgeleri parietal ve esas hücrelerden zengindir. Esas hücreler pepsinojen, parietal hücreler ise B12 vitamini emilimi için mutlak gerekli olan hidroklorik asit ve intrinsik faktör

salgılar. Antrum bölgesi gastrin sekrete eden G hücreleri ve somatostatin sekrete eden D hücrelerinden zengindir (24).



Şekil 1. Mide anatomisi (24)

EPİDEMİYOLOJİ

1930'dan bu yana mide kanseri görülme sıklığı düşmekte buna paralel olarak lezyonun yerleşim yeri non-kardiadan kardiaya doğru kaymaktadır (25,26). 2008 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde tespit edilen mide kanseri vaka sayısı yirmi bir bin beş yüz, mide kanserine bağlı gelişen ölüm on bir bindir. Erkeklerde görülme sıklığı kadınlara göre daha yüksektir. Tüm dünyada kansere bağlı ölümler arasında mide kanseri ikinci sırada yer almaktadır. Japonya, Çin, Güney Amerika ve Doğu Avrupa'da görülme sıklığı diğer bölgelere oranla oldukça yüksektir (27,28).

ETYOLOJİ

Son altmış yıl içerisinde mide kanseri görülme sıklığı batılı ülkelerde her iki cinsiyette

de düşüş göstermekle birlikte bunun nedeni tam olarak anlaşılamamıştır. Şu ana kadar mide kanseri gelişiminde rol oynadığı gösterilen ve/veya düşünülen birçok etken tespit edilmiştir (29). Bu risk faktörleri:

-*Helicobakter pylori* enfeksiyonu,

-İleri yaş,

-Erkek cinsiyet,

-Nitrat ve nitrit içeren yiyecek tüketimi,

-Bakteri ve mantarlar ile kontamine yiyecek tüketimi,

-Tütsülenmiş, tuzlanmış gıda tüketimi,

-Düşük sebze, meyve tüketimi,

-Yüksek kırmızı et tüketimi,

-Sigara kullanımı,

-Düşük serum ferritin düzeyi,

-Pernisiyöz anemi,

-Gastrik ülser varlığı,

-Adenomatöz polip,

-Barret özefagus,

-Villöz adenom,

-Herediter adenomatöz polipozis,

-Menetrier hastalığı,

-Geçirilmiş subtotal mide rezeksiyonu

TANI

Sıklıkla halsizlik, kilo kaybı, erken doyma hissi, hematemez, melana gibi yakınmalar başvuru anında mevcuttur. Tıkayıcı lezyonlar kusma, yutma güçlüğüne neden olabilmektedir. Erken dönemde semptomlar genellikle non-spesifik olup, tanı anında belirgin semptomların varlığı ilerlemiş hastalığı düşündürür.

Çift kontrastlı mide grafisi, akciğer grafisi ve laboratuar testleri tanıda yardımcıdır. Ancak hem lezyonun görülmesi hem de patolojik tanı açısından üst gastrointestinal sistem endoskopisi gereklidir. Patolojik tanı sonrası lenf nodu, karaciğer ve diğer etraf dokular ile ilişkisini anlayabilmede cerrahi girişim öncesi batın tomografisi yardımcıdır.

PATOLOJİK ÖZELLİKLER

%90-95 oranında adenokarsinom görülmekle birlikte daha az sıklıkla non-hodgkin lenfoma, leiomyosarkom, skuamöz hücreli karsinom, nöroendokrin tümörler de görülebilmektedir. Mide kanseri %40 oranında antrum, %35 oranında proksimal, %25 oranında korpus kaynaklıdır (30). Borrmann sınıflaması makroskobik görünümüne göre tümörü polipoid, ülsere, ülsere infiltratif, diffüz infiltratif (Linitis Plastika) olmak üzere dört farklı kategoride değerlendirmektedir (31). Lauren sınıflaması ise histolojik olarak intestinal ve diffüz tip olmak üzere 2 gruba ayırmaktadır. İntestinal tip daha sık görülmekle birlikte sıklıkla yüzeyel yayılımlı ve gland kaynaklı olup genellikle distal yerleşimli ve endemik özelliktedir; diffüz tip ise daha kötü prognozlu, daha genç hastalarda görülen genellikle kardia olmak üzere tüm midede görülebilen mide kanseri histolojik alt tipleridir (32,33).

EVRELEME

Mide kanseri evrelemesinde TNM sistemi kullanılmaktadır. Ancak patolojik evrelemede tedavinin planlanmasında ve prognozun belirlenmesinde yardımcıdır.

TNM Klasifikasyonu (DSÖ-2002)

T (Kanserin mide duvarına penetrasyonunun derecesini gösterir)	0	Primer tümör mevcut değil.
	İs	İnsitu Karsinom. Lamina propriaya invazyon göstermeyen intraepitelyal tümör.
	1	Tümör lamina propria veya submukozada sınırlıdır.
	2	Tümör muskularis propria veya subserozada sınırlıdır.
	3	Tümör komşu dokulara invazyon göstermeden serozayı geçmiştir.
	4	Tümör komşu dokulara invazedir.
	X	Primer tümör değerlendirilemedi.
N (Nodal Tutulum)	0	Bölgesel lenf nodu metastazı mevcut değil.
	1	Metastazlı bölgesel lenf nodu sayısı 1-6 arasıdır.
	2	Metastazlı bölgesel lenf nodu sayısı 7-15 arasıdır.
	3	Metastazlı bölgesel lenf nodu sayısı 15'ten fazladır.
	X	Bölgesel lenf nodu tutulumu değerlendirilemedi.
M (Uzak Metastaz)	0	Uzak metastaz mevcut değil.
	1	Uzak metastaz mevcuttur.
	X	Uzak metastaz değerlendirilemedi.

PROGNOSTİK FAKTÖRLER

En önemli prognostik faktör TNM evresidir. Transmural penetrasyon, tutulu lenf nodu sayısı ve lokalizasyonu sağkalım ile direk olarak ilişkilidir. İntestinal tip mide kanseri diffüz tipe göre daha iyi prognoza sahiptir. Linitis plastika kötü prognostik faktördür (7-9).

p21

Hücre siklusu dört ana fazdan oluşmaktadır: Hücrenin DNA sentezi için hazırlandığı presentetik büyüme fazı olan G1, siklustaki somatik hücrelerde kromozomların replike olarak DNA sentezinin gerçekleştiği sentez fazı olan S, premitotik büyüme fazı olan G2 ve hücre bölünmesinin gerçekleştiği mitotik faz ise M fazıdır. Hücreler G0 olarak adlandırılan fazda ise istirahat halindedir (34,35).

Farklı hücre siklus fazları siklinler ve siklin bağımlı kinazlar (CDK) olarak bilinen protein kinazlarla kontrol edilir. Siklinler belirlenmiş hücre siklus anında sentezlenen ve ardından hızla parçalanan proteinlerdir. CDK'lar ise hücre siklus regülatör proteinleri olup sadece siklinlere bağlandıklarında aktive olurlar. CDK'ların inaktivasyonu mitozun gerçekleşememesine neden olur. Hücre siklusunda kontrolün iki ana noktası G1-S ve G2-M kontrol noktalarıdır. Bu kontrol noktaları pozitif ve negatif regülatör elemanlar ile düzenlenir. İntrasellüler ve ekstrasellüler sinyaller (hipoksi ve DNA hasarı gibi) CDK inhibitörlerini aktive ederler. Sonrasında CDK inhibitörleri siklinleri inhibe ederek hücre siklusunun ilerleyişini bloke ederler. Böylece siklinler normal fonksiyonları olan DNA replikasyonu ve hücre bölünmesi için gerekli olan protein aktivasyonunu gerçekleştiremezler (36).

p21 (CDKN1A) proteini 6. kromozomun 6p21.2 bölgesinde lokalize tümör baskılayıcı p21 geni (WAF1, CIP1, SDI-1) tarafından kodlanan 188 aminoasitten oluşan ve 21 kDa molekül ağırlığında siklin-CDK komplekslerinin negatif regülatörlerinden bir tanesi olarak görev yapan bir proteindir. Siklin A-CDK2 ve Siklin E-CDK2 komplekslerine bağlanarak retinoblastom geninin fosforilasyonunu önler ve hücre siklusunun ilerlemesini durdurur (37).

Her-2

Her-2 kromozom 17q21'de lokalize bir protoonkogendir. Her-2 proteini veya reseptörü olarak adlandırılmış, cErbB2, Her-2/neu, p185/Her-2 gibi tanımlamaları da bulunan 185 kDa molekül ağırlıklı 1255 aminoasitli bir transmembran glikoproteinini kodlar. Epidermal büyüme faktör reseptör (EGFR) veya Her-1, Her-2, Her-3 ve Her-4 Her reseptör ailesinin dört üyesidir (13,17). Her reseptörleri hücre membranı üzerinde bulunmaktadır (13).

Reseptörlerin hepsi sisteinden zengin ekstrasellüler büyüme faktörü ligandı bağlayan alan, lipofilik bir transmembran segmenti ve düzenleyici karboksi terminal segmentli bir intrasellüler tirozin kinaz alanını kapsayan benzer bir yapıyı paylaşırlar. Her proteinleri hücre membranında monomerler şeklinde bulunurlar. Ligand bağlanmasını takiben dört farklı reseptör homodimerler (Her-1-Her-1) veya heterodimerler (Her-1-Her-2) olabilen on farklı reseptör dimeri formunda her biri diğeri ile ilişkilenebilir. Her reseptör proteinleri monomerler ve üzerine ligand bağlanan homo veya heterodimer formundadırlar. Her ligandları bivalan büyüme faktör molekülleridir.

Her-2 diğer Her proteinleri ile hiyerarşik bir etkileşim sergiler ve tirozin kinaz aktivitesi olmayan en potent dimerizasyon partneri Her-3'tür. Her-2'nin overekspresyonu Her-2 ve Her-3 heterodimer sayısını artırarak Her sinyali artar. Dimerizasyon, reseptörlerin sitoplazmik alanında tirozin kinaz aktivasyonuna yol açar. Sonrasında reseptörlerin intrasellüler alanındaki tirozin rezidülerinin fosforilasyonu sinyal iletimini başlatır. Her-2 içeren heterodimerlere bivalent bağlanma ve ligand bağlanmasının uzaması sonucu, sinyal iletiminin uzaması ayrıca Her-2'nin lizozomal sindirimi sırasında siklusa yeniden girmesi sonucu potent sinyal artışı nedeni ile hücre çoğalması ve malign dönüşüm oluşmaktadır.

TEDAVİ

Cerrahi

Mide kanserinin öncelikli tedavisi cerrahidir. Uygun cerrahi sınırlarla birlikte tam rezeksiyon yaygın kabul gören cerrahi uygulama olup cerrahi rezeksiyonun tipi (total-subtotal gastrektomi) ve geniş lenf nodu diseksiyonu yapılıp yapılmaması gerektiği tartışmalıdır. Cerrahinin amacı R0 rezeksiyon olarak bilinen negatif cerrahi sınır ile birlikte tam rezeksiyondur. Ancak sadece lokal hastalığı olduğu bilinen vakalarda bile R0 rezeksiyon oranı %50'dir. Mikroskobik rezidü hastalık varlığı R1 rezeksiyon, makroskobik rezidü varlığı ise R2 rezeksiyon olarak tanımlanmıştır. Rezeksiyona splenektominin eklenmesinin sağkalım oranlarında artışa yol açmadığı gibi mortalite ve morbidite de hafif artışa neden olduğu gösterilmiştir. Distal mide adenokarsinomu tanılı hastalarda subtotal ve total gastrektomi ile benzer mortalite, morbidite ve 5 yıllık genel sağkalım oranları bildirilmiştir. Eğer mümkünse cerrahi sonrası daha düşük komplikasyon ve düşük beslenme problemleri nedeni ile subtotal gastrektomi tercih edilebilir. Peritoneal yayılım, uzak metastaz, ana damar invazyonu inoperabl olarak değerlendirilir. Obstruksiyon, önlenemeyen kanama varlığında palyatif

cerrahi girişimler düşünülebilir. Lenf nodu diseksiyon tipleri; perigastrik lenf nodlarının diseksiyonu D1, çölyak trunkus, sol gastrik arter, ora hepatik arter ve splenik arter çevresi lenf nodlarının diseksiyonu D2 diseksiyon, hepatoduodenal, peripankreatik ve mezenter kökü lenf nodlarının diseksiyonu D3 diseksiyondur. En az 15 adet lenf nodu çıkarılması önerilmekte olup daha geniş lenf nodu diseksiyonu yapılması tartışmalıdır. D1 ve D2 diseksiyon karşılaştırıldığına genel sağkalım ve nüks oranları benzer olmasına rağmen D2 diseksiyon sonrası komplikasyon, postoperatif morbidite ve hastanede kalış süresi D1 diseksiyona göre daha yüksektir (10).

Radyoterapi

Küratif amaçlı rezeksiyon uygulanan hastalarda 5 yıllık sağkalım oranı %8-26 ve lokal-bölgesel başarısızlık oranı %40-65'tir. Bu nedenle radyoterapi mide kanseri tedavisinde önemli rol oynamaktadır. R0 rezeksiyon yapılan hastalarda T3 ve T4 hastalık, lenf nodu pozitifliği, pozitif cerrahi sınır varlığı postoperatif adjuvan radyoterapi endikasyonlarıdır. Klinik ya da medikal inoperabl hastalarda tek başına ya da kemoterapi ile eşzamanlı küratif radyoterapi sağkalım avantajı göstermiştir. Sağkalım ve lokal kontrolü arttırmasına rağmen preoperatif radyoterapinin uygulanabilirliği için randomize prospektif çalışmalara ihtiyaç vardır. Adjuvan eş zamanlı kemoterapi olarak sıklıkla 5-fluorourasil bazlı kemoterapi rejimleri tercih edilmektedir. Metastatik hastalıkta, palyasyon gerektirecek semptom varlığında, operasyon sonrası takipli hastada nüks gelişmesi durumunda radyoterapi tedavi seçenekleri arasında yer almaktadır (10).

Radyoterapi hedef hacimlerinin seçilmesinde ICRU 62 raporu göz önüne alınarak planlamalar yapılmalı, diğer lümenli organlarda olduğu gibi şekil değişkenliği ve organ hareketleri göz önünde bulundurulmalıdır. Karaciğer, böbrekler, bağırsaklar, spinal kord, kalp ve akciğerler doz sınırlayıcı organlar olup önerilen adjuvan radyoterapi dozu fraksiyon başına 1,8 Gy'den toplam 45-50,4 Gy'dir (38,39).

Kemoterapi

Mide yerleşimi ve komşu dokuların radyasyon tolerans dozu nedeniyle radyoterapinin kemoterapi ile beraber kullanımı araştırılmış ve cerrahi sonrası adjuvan kemoradyoterapinin sağkalım üstünlüğü prospektif randomize çalışma ile ortaya konmuştur. Postoperatif T3 ve T4 hastalık, lenf nodu pozitifliği, pozitif cerrahi sınır varlığında radyoterapi ile eşzamanlı, metastatik hastalıkta performans durumu iyi olan hastalarda kemoterapi uygulanmaktadır. 5-

fluorourasil, dosetaksel, sisplatin, lökovorin mide kanseri tedavisinde sık kullanılan kemoteropi ilaçlarıdır. Tek ajan tedavisi ile yanıt oranları %15-20 arasındadır. 5 fluorourasil ile ilaç kombinasyonları yanıt oranını arttırmaktadır. Kemoterapinin radyoterapiye eklenmesi ya da çoklu ilaç kombinasyonlarının uygulanmaları bulantı, kusma, lökopeni ve anemi gibi yan etkilerin artmasına neden olabilmektedir (39).

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışmaya 1999-2008 yılları arasında kayıtlı olan, Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Radyasyon Onkolojisi polikliniğine başvuran 520 mide adenokarsinomu tanılı hastadan operasyonu Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim dalınca yapılan patoloji örnekleri Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim dalı arşivinde mevcut olan hastalar alındı. Çalışmaya Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı Yerel Etik Kurulu ve Sağlık Bakanlığı'ndan onay alındıktan sonra başlandı (Ek 1,2). İnoperabl ya da medikal nedenlerle opere edilmeyen, operasyonu dış merkezde yapılan, patolojisi adenokarsinom dışı olan hastalar çalışmaya alınmadı.

Negatif cerrahi sınır ile birlikte tam rezeksiyon R0 rezeksiyon, mikroskobik rezidü hastalık varlığı R1 rezeksiyon, makroskobik rezidü varlığı ise R2 rezeksiyon olarak tanımlandı. Lenf nodu diseksiyon tipleri; perigastrik lenf nodlarının diseksiyonu D1, çölyak trunkus, sol gastrik arter, ora hepatik arter ve splenik arter çevresi lenf nodlarının diseksiyonu D2 diseksiyon, hepatoduodenal, peripankreatik ve mezenter kökü lenf nodlarının diseksiyonu D3 diseksiyondur. En az 15 adet lenf nodu çıkarılması önerilmekte olup daha geniş lenf nodu diseksiyonu yapılması tartışmalıdır.

Çalışmaya alınan hasta sayısı 44'dür. Bu hastaların dosyaları geriye dönük incelenerek hasta ve patolojik özellikleri kayıt edildi. Mevcut dosyalardan elde edilen protokol numaraları yardımı ile parafine gömülü doku örnekleri Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Laboratuarı arşivinden çıkarıldı. Bu doku örneklerinden İmmünohistokimyasal Boyama (İHK) ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) için kesitler alındı.

DOKULARIN İMMÜNOHİSTOKİMYASAL BOYAMA VE POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU İÇİN HAZIRLANMASI

Dokudan Parafinin Uzaklaştırılması

1. 25-50 mg formalinle tespit edilmiş, parafin bloğa gömülü doku örneklerinden 10 µ kalınlığında 10-20 yaprak kesilerek, 1,5 ml'lik ependorf tüplerine alındı.
2. 1 ml ksilol eklendi, +56 ºC'de 15 dakika beklendi. 5 dakika 13.000 rpm'de santrifüj edildi, üstteki sıvı döküldü. Bu işlem 3-4 defa tekrarlandı.
3. 1 ml %100 etanol eklendi, 5 dakika 13.000 rpm'de santrifüj edildi, üstteki sıvı döküldü.
4. 1 ml %80 etanol eklendi, 5 dakika 13.000 rpm'de santrifüj edildi, üstteki sıvı döküldü.
5. 1 ml %60 etanol eklendi, 5 dakika 13.000 rpm'de santrifüj edildi, üstteki sıvı döküldü.
6. 1 ml %40 etanol eklendi, 5 dakika 13.000 rpm'de santrifüj edildi, üstteki sıvı döküldü.
7. 1 ml çift distile su eklendi, 5 dakika 13.000 rpm'de santrifüj edildi, üstteki sıvı döküldü.

DNA İzolasyonu

Dokudan parafinle uzaklaştırma ve DNA izolasyonu Roche firmasının "High Pure PCR Template Preparation Kit–Cat. No: 11796828001" ile elde edilmiştir.

1. Dokular 200 µl "doku buffer" ve 40 µl proteinaz K ile karıştırıldı, +37 ºC'de 1 gece bekletildi.
2. Üzerine 20 µl proteinaz K eklendi, 1-2 saat +55 ºC'de bekletildi.
3. Üzerine 200 µl "bağlanma buffer" eklendi, +70 ºC'de 10 dakika beklendi.
4. Üzerine 100 µl isopropanol eklendi, karıştırıldı.
5. Filtreli tüplerin altına örnek sayısı kadar örnek toplama tüpü dizip üzerine filtreli tüp koyduktan sonra filtreli tüplerin kapağını kapatıp üstlerine numaraları yazıldı.
6. Karışım filtreli tüplere konuldu, 1 dakika 8.000 rpm'de santrifüj edildi.
7. Alttaki tüp atıldı, yerine temiz tüp kondu.
8. Filtreli tüpün üzerine 500 µl "uzaklaştıran buffer" eklendi, alt üst edildikten sonra 1 dakika 8.000 rpm'de santrifüj edildi.
9. Alttaki tüp atıldı, yerine temiz tüp kondu.
10. Filtreli tüpün üzerine 500 µl "yıkama buffer" eklendi, alt üst edildikten sonra 1 dakika 8.000 rpm'de santrifüj edildi.
11. Alttaki tüp atıldı, yerine temiz tüp kondu.
12. 10 ve 11 numaralı basamaklar tekrarlandı. Sonra alttaki tüpün içindeki sıvı döküldü ve

tekrar filtreli tüpün altına konup maksimum hızda 13.000 rpm'de tekrar santrifüj edildi.

13. 1.5 ml ependorf tüpün kapağına numara yazılıp filtreli tüp bu ependorfun içine kondu ve üzerine 200 ml +70 ºC'de ısıtılmış "sulandırma buffer" eklendi, 1 dakika 8.000 rpm'de santrifüj edildi.

Elde edilen DNA örnekleri +4 ºC'de saklandı. DNA'nın kalitesini ve miktarını belirlemek için spektrofotometre cihazında 260 nm ve 280 nm'deki dalga boylarında ölçüm yapıldı. Aynı zamanda %0,8 agaroz jel elektroforezi yapılarak DNA gözlendi.

Her-2 GENİNDE IIe/Val POLİMORFİZMİ

Her-2 geninde IIe/Val polimorfizmin gözlendiği 655. kodon bölgesini çoğaltmada kullanılan primerler:

-F: 5'-AGAGCGCCAGCCCTCTGACGTCCAT- 3'

-R: 5'-TCCGTTTCCTGCAGCAGTCTCCGCA-3'

Polimeraz Zincir Reaksiyonunun Hazırlanışı

1 örnek için hazırlanan karışım:

-10 µl genomik DNA

-20 pmol/L primer F

-20 pmol/L primer R

-0,2 mmol/L dNTP

-2,5 mmol/L $MgCl_2$

-1X Taq Buffer

-1,5 U Taq DNA

Toplam: 50 µl

Polimeraz Zincir Reaksiyonu Programı

Ön denatürasyon : 94 ^{o}C 15 dakika

Denatürasyon : 94 ^{o}C 0,5 dakika

Son sentez : 62 ^{o}C 0,5 dakika } 35 döngü

Bağlanma : 72 ^{o}C 1 dakika

Sentez : 72 ^{o}C 10 dakika

PZR ürünü 1 µl yükleme tamponu ile karıştırılarak %2'lik agaroz jelde yürütüldü.

655 Kodon Bölgesinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu Ürünlerinin B*sm*AI Enzim Kesimi

B*sm*AI enzimi 10 X Buffer R (SibEnzyme) ve Buffer Tango tamponuyla (SibEnzyme) birlikte kullanıldı.

1 örnek için kullanılan miktarlar:

-5 µl PZR ürünü

-1 µl Tampon

-0,5 µl B*sm*AI restriksiyon enzimi

Toplam Hacim: 6,5 µl

55 ºC'de 3 saat inkübasyona bırakıldı ve daha sonra 65 ºC'de 20 dakika inaktivasyon yapıldı. İnkübasyon süresinin sonunda ürünler 5 µg/ml etidyum bromid ile hazırlanan % 3'lük agaroz jelde yürütülerek UV ışık altında oluşan bantlar gözlendi.

B*sm*AI restriksiyon enziminin çalışma mekanizması:

5'- ....GTCTC$(N)_1$↓....-3'

3'-...CAGAG$(N)_5$⇧..-5'

Restriksiyon işlemi sonucunda Her-2 genin 655. pozisyonundaki IIe/Val polimorfizmin varlığında şu bant oluşumları gözlenecektir:

-II genotipinde 148 bazlık bant (restriksiyon yok)

-VV genotipinde 32 ve 116 bazlık bant (restriksiyon tamamlanır)

-Heterozigot IV genotipinde 32, 116 ve 148 bazlık bantlar.

p21 GENİNDE EKSON 3 MUTASYONU

p21 geninin 3. eksonu için kullanılan primerler:

-F: 5'- GCCCCCCACTGTCTTCCT- 3'

-R: 5'-GCGCTTCCAGGACTGCAGG-3'

Polimeraz Zincir Reaksiyonunun Hazırlanışı

1 örnek için hazırlanan karışım:

10 µl genomik DNA

20 pmol/L primer F

20 pmol/L primer R

0,2 mmol/L dNTP

5 mmol/L $MgCl_2$

1X Taq Buffer

1,5 U Taq DNA

Toplam: 50 µl

Polimeraz Zincir Reaksiyonu Programı

Ön denatürasyon : 94 ^{o}C 4 dakika

Denatürasyon : 94 ^{o}C 0,5 dakika

Son sentez : 55 ^{o}C 0,5 dakika } 35 döngü

Bağlanma : 72 ^{o}C 0,5 dakika

Sentez : 72 ^{o}C 5 dakika

PZR ürünü 1 µl yükleme tamponu ile karıştırılarak %2'lik agaroz jelde yürütüldü. %8'lik PAGE jel aşağıdaki protokole göre hazırlandı.

Çalışmanın amacına uygun olarak SE 600 dikey dilim jel elektroforezi hazırlandı. Cam plaklar arasına 1,5 mm'lik aralık bırakılarak, jelin dökülmesi için döküm ayağına monte edildi. Ayrıştırıcı jel için TEMED hariç tüm maddeler pipetlenerek %10'luk ayrıştırıcı jel karışımı hazırlandı. Jel karışımı süzüldü ve havası alındı. TEMED eklendikten sonra hızla hava kabarcığı oluşturulmadan iki cam arasına yukarıdan 4 cm boşluk kalacak şekilde döküldü. Polimerleşmeye bırakıldıktan sonra, düzgün bir yüzey oluşturulması için üzerine su eklendi. Polimerleşme işlemi tamamlandıktan sonra su jel yüzeyinden alındı. Benzer şekilde sıkıştırıcı jel hazırlandı ve ayrıştırıcı jelin üzerine döküldü. Tarak dikkatlice yerleştirildi ve jel polimerleşmeye bırakıldı. Jel polimerleştikten sonra, tarak dikkatlice çıkarıldı.

Ayrıştırıcı Jel Tamponu (pH 8.8)

1,5 M Tris hazırlanır ve 1 M HCI ile pH 8.8'e ayarlanır. Whatman No:1'den süzüldü.

Sıkıştırıcı Jel Tamponu (pH 6.8)

1 M Tris hazırlanır ve 1 M HCI ile pH 6.8'e ayarlanır. Whatman No:1'den süzüldü.

Akrilamid- Bisakrilamid Stoğu (30/0.8)

30 gr akrilamid, 0,8 gr bisakrilamid tartıldı, bidistile su ile 1000 ml'ye tamamlandı.

%10'luk Amonyum Persülfat (APS)

1 gr APS tartılıp, bidistile su ile 10 ml'ye tamamlandı (taze olarak hazırlandı)

SDS-PAGE yükleme çözeltisi

%95 Formamid 950 µl

10 mM NaOH 10 µl

%0,05 Bromfenol mavisi 20 µl

%0,05 Xyclene-Cyenole 20 µl

%8'lik Ayrıştırıcı Jel İçin Karışım (30 ml)

Akrilamid-bisakrilamid karışımı 8 ml

Ayrıştırıcı jel tamponu 7,5 ml

Gliserol 1,5 ml

%30 APS 100 µl

TEMED 7,5 µl

dH_2O 13 ml

Sıkıştırıcı Jel için Karışım (10 ml)

Akrilamid-bisakrilemid karışımı 2 ml

Sıkıştırıcı jel tamponu 1,25 ml

%30 APS 100 µl

TEMED 5 µl

dH_2O 6,5 ml

10 µl PZR ürününe 10 µl PAGE yükleme çözeltisi ilave edildi, 10 dakika 95 ^oC'de denatüre edildi ve -20 ^oC'de 20 dakika soğumaya bırakıldı. Örnekler 20 µl olacal şekilde, kuyucuklara otomatik pipet ile uygulandı. Kuyucuk başına 3 mA sabit akım verilerek elektroforez (CBS SCIENTIFIC CO. California AG-250-02) başlatıldı. İşaret boya bandı jelden çıkmadan elektroforez işlemi durduruldu.

Elektroforez bittikten sonra cam plaklardan çıkartılan jeller 10 dakika karıştırıcıda tespit çözeltisiyle (1 jel için; %10 Etanol, %5 Asetik asit) tespit edilip, bu çözeltiyi döküldükten sonra 20 dakika gümüş nitrat çözeltisiyle (%0,1 Gümüş nitrat) karıştırıcının üstünde boyanmıştır. Bu çözeltiyi döküldükten sonra 30 dakika %1,5 NaOH/Formaldehit içeren çözeltide bekletilmiştir. Bantlar görülünce de %0,75'lik Na2CO3´lük çözeltide iyice yıkanmıştır. Boyama işlemler bittikten sonra jeller bilgisayarda taranıp kurutulmuştur.

İMMÜNOHİSTOKİMYASAL BOYAMA

Hem Her-2 hem de p21 ekspresyonunun değerlendirilebilmesi için her bir hastanın patoloji piyeslerine aşağıdaki işlemler uygulandı.

1. Mide adenokarsinomu morfolojisini en iyi gösterecek kesite ait parafin bloklardan 1/10'luk Poly-L-Lysine ile muamele edilmiş lamlara 4 mikron kalınlıkta her antikor için ayrı ayrı kesitler alındı.
2. Kesitler 12 saat süreyle 56 derecede etüvde bekletilerek deparafinize edildi.

3. Boyama işlemi Ventana Benchmarc otomatik boyama cihazı kullanılarak gerçekleştirildi.

Her bir hasta için hazırlanan lamlara Her-2 için Novocastra marka CB11 klonu kullanıma hazır sıvı fare monoklonal Her-2 onkoproteini antikoru, p21 için kullanıma hazır Thermo Scientific marka p21 WAF1 Ab-3 antikoru damlatıldı.

Mikroskop altında incelenen preparatlarda skorlama Her-2 için; <%10 boyanma 0, >%10 parsiyel membranöz boyanma +1, >%10 orta membranöz boyanma +2, >%10 kuvvetli membranöz boyanma +3, p21 için; <%10 boyanma 0, %10-20 boyanma +1, %20-40 boyanma +2 ve >%40 boyanma +3 olarak yapıldı.

İSTATİSİKSEL ANALİZ

Hastalara ait klinikopatolojik veriler, Her-2 ve p21'in İHK ve PZR skorları, sağkalım süreleri ile son durumları SSPS 17.0 istatistiksel veri tablosuna girildi. 70 vakaya ait klinikopatolojik değişkenler ile bu vakalara ait İHK ve PZR skorları aralarındaki ilişki χ^2 testi uyculanarak değerlendirildi. χ^2 testi ile belirlendn $p<0.05$'ten küçük değerler istatistiksel anlamlı olarak değerlendirildi. Vakalara ait sağkalım oranları Kaplan-Meier analizi ile hesaplandı. Çok-Değişkenli Cox-Regresyon analizi kullanılarak tüm klinikopatolojik değişkenler, İHK ve PZR skorları ile sağkalım oranları karşılaştırılarak, test sonucunda elde edilen p değerlerinden 0.05'ten küçük olan değerler anlamlı olarak değerlendirildi.

BULGULAR

HASTA KARAKTERİSTİKLERİ

Patoloji örnekleri incelenen 44 hastanın karakteristik özellikleri Tablo 1'de yer almaktadır. Medyan yaş 63 (26-75), erkek kadın oranı 3/1'dir. Hastaların büyük çoğunluğu antrum (%45,5) ve korpus (%34,1) yerleşimli idi.

Olguların %95,5 kadarı T3-4 tümöre sahip iken lenf nodu pozitifliği oranı ise %68,2 idi. Otuz sekiz (%86,4) hastada R0 rezeksiyon mevcut idi. Diğer altı (%13,6) hastada cerrahi sınır pozitifti (R1 rezeksiyon).

Tedavi özellikleri Tablo 2'de verilmiştir. Adjuvan radyoterapi dozu ortalama 45 Gy (40,8-50,4) olup medyan fraksiyon sayısı 25 (24-28) ve medyan radyoterapi süresi 38 (30-48) gün olarak belirlenmiştir. Kullanılan ana kemoterapi rejimi FUFA (%85,3), medyan kemoterapi kür sayısı 5, medyan kemoterapi süresi 113 (3-168) gün olarak saptanmıştır.

İMMÜNOHİSTOKİMYASAL BOYAMA VE POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU SONUÇLARI

İmmünohistokimyasal Boyanma

Hastaların Her-2 ve p21 için İHK boyanma özellikleri Tablo 3'te yer almaktadır. p21 antikoru için pozitif boyanma 27 (%61,4) olguda gösterilmiştir (13 hastada +1, 6 hastada +2, 8 hastada +3) (Şekil 2-4). Her-2 antikoru için ise sadece 4 (%9,1) olgunun kanser hücrelerinde pozitif boyanma saptanmıştır (2 hastada +1, 1 hastada +2, 1 hastada ise +3) (Şekil %5-7).

Tablo 1. Hasta karakteristikleri

	n (%)
Yaş	
Ortanca (Medyan)	63
Range	26-75
Cinsiyet	
Erkek	34 77,3)
Kadın	10 (22,7)
Patolojik Alt Tip	
Diffüz	19 (43,2)
İntestinal	16 (36,4)
Bilinmiyor	9 (20,4)
T	
T2	2 (4,5)
T3	36 (81,8)
T4	6 (13,7)
N	
Pozitif	30 (68,2)
Negatif	14 (31,8)
Cerrahi Sınır	
Negatif	38 (86,4)
Pozitif	6 (13,6)
Yerleşim Yeri	
Kardia	5 (11,4)
Korpus	15 (34,1)
Antrum	20 (45,5)
Tüm Mide	4 (9,5)
Diferansiasyon	
Diferansiye	26 (59,1)
İndiferansiye	14 (31,8)
Bilinmiyor	4 (9,1)
Vasküler İnvazyon	
Var	27 (61,4)
Yok	16 (36,4)
Bilinmiyor	1 (2,3)
Nöral İnvazyon	
Var	30 (68,2)
Yok	14 (31,8)

T: Mide duvarı invazyon derecesi, **N:** Lenf nodu tutulumu.

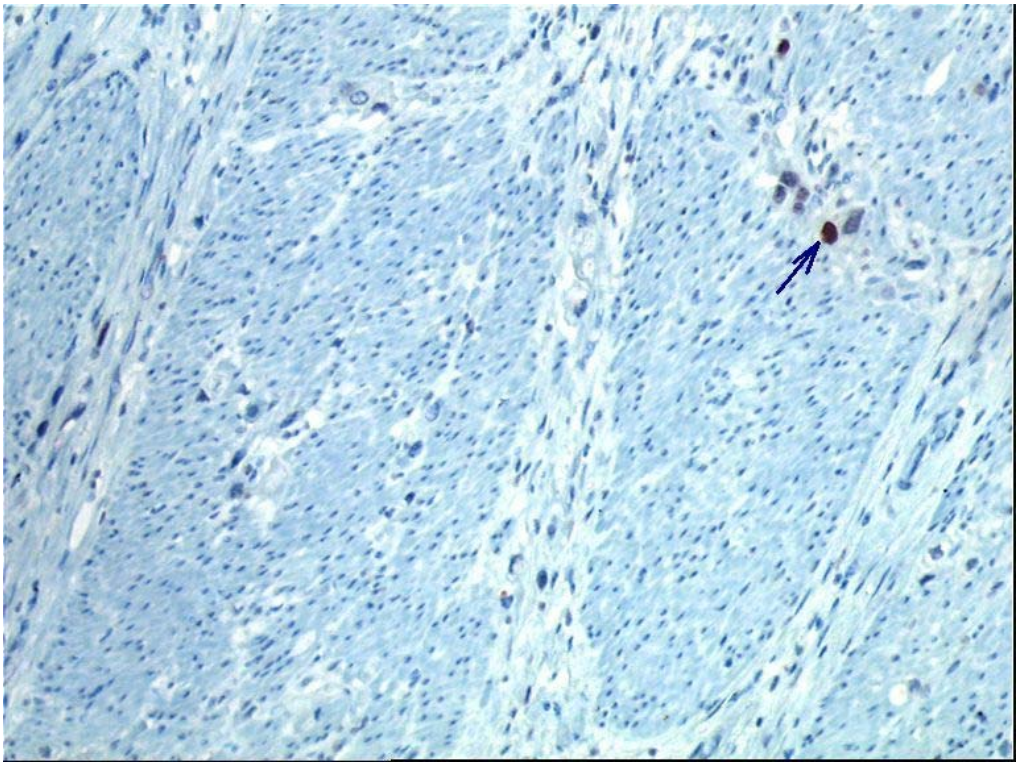
Tablo 2. Uygulanan tedaviler

	n (%)
Operasyon Tipi	
Total Gastrektomi	23 (52,3)
Subtotal Gastrektomi	21 (47,7)
Adjuvan Tedavi Rejimleri	
Kemoradyoterapi	34 (77,3)
Sadece Kemoterapi veya Radyoterapi	10 (22,7)
Uygulanan Kemoterapi Rejimleri	
FUFA	35 (85,3)
Diğer	6 (14,7)

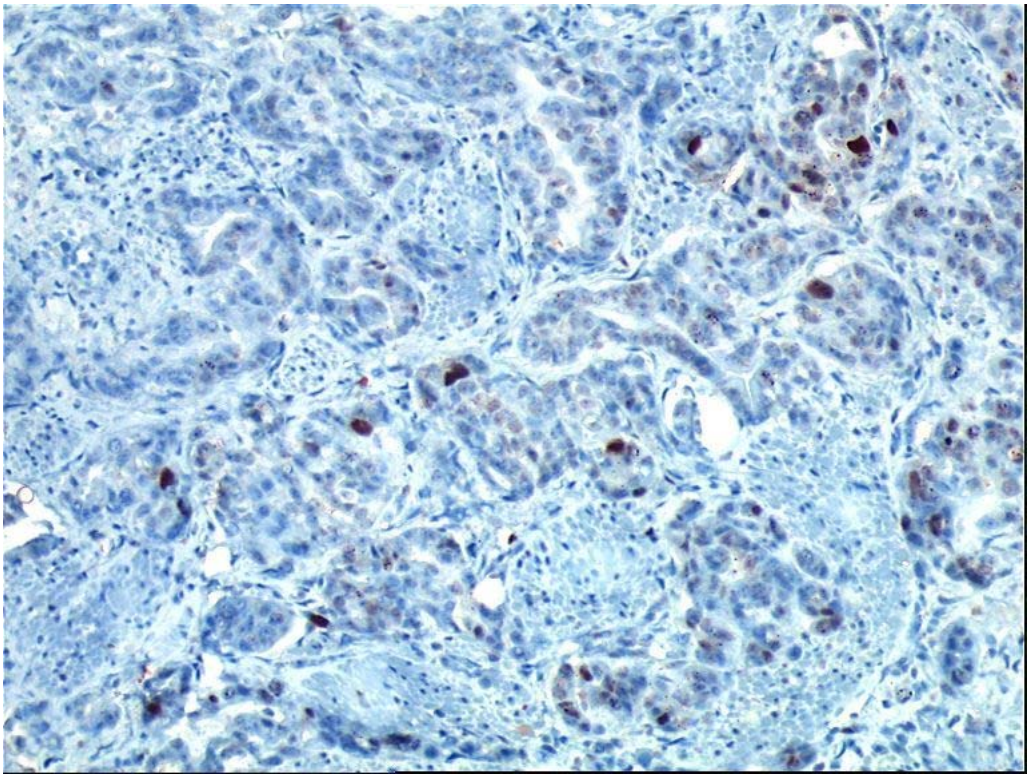
FUFA: 5 Fluorourasil + Kalsiyum folinat.

Tablo 3. İmmünohistokimyasal boyanma özellikleri

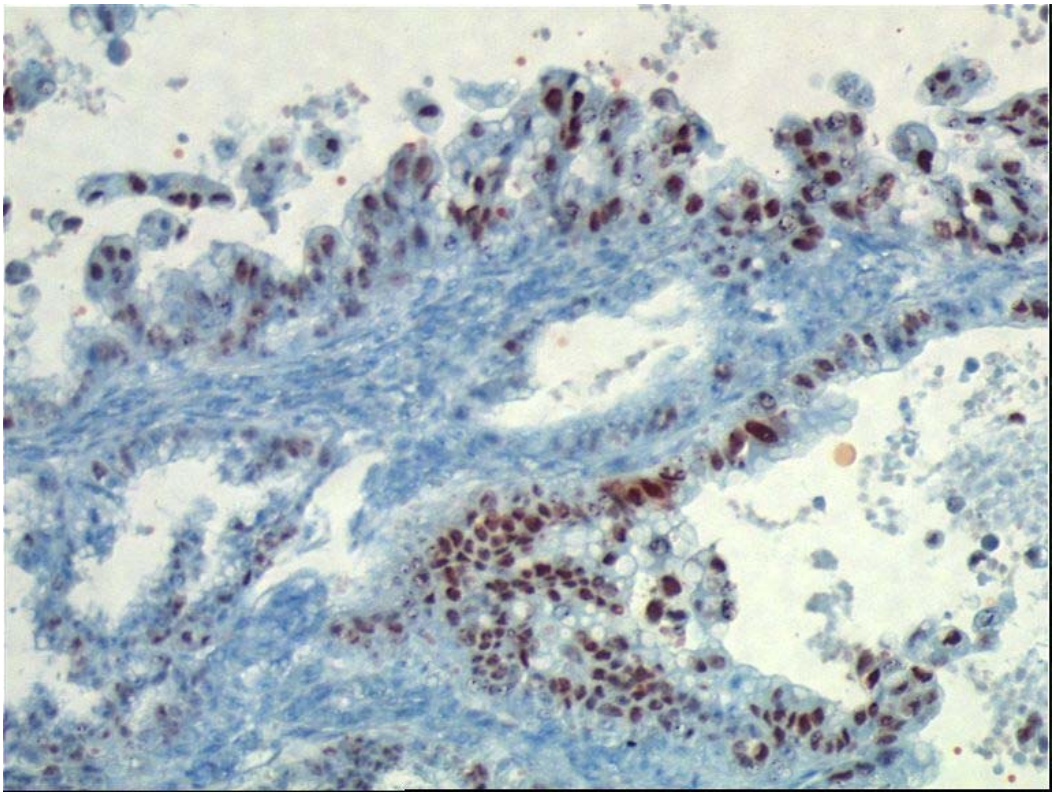
	n (%)
Her-2	
(-)	40 (90,9)
(+/++/+++)	4 (9,1)
p21	
(-)	17 (38,6)
(+ / ++ / +++)	27 (61,4)



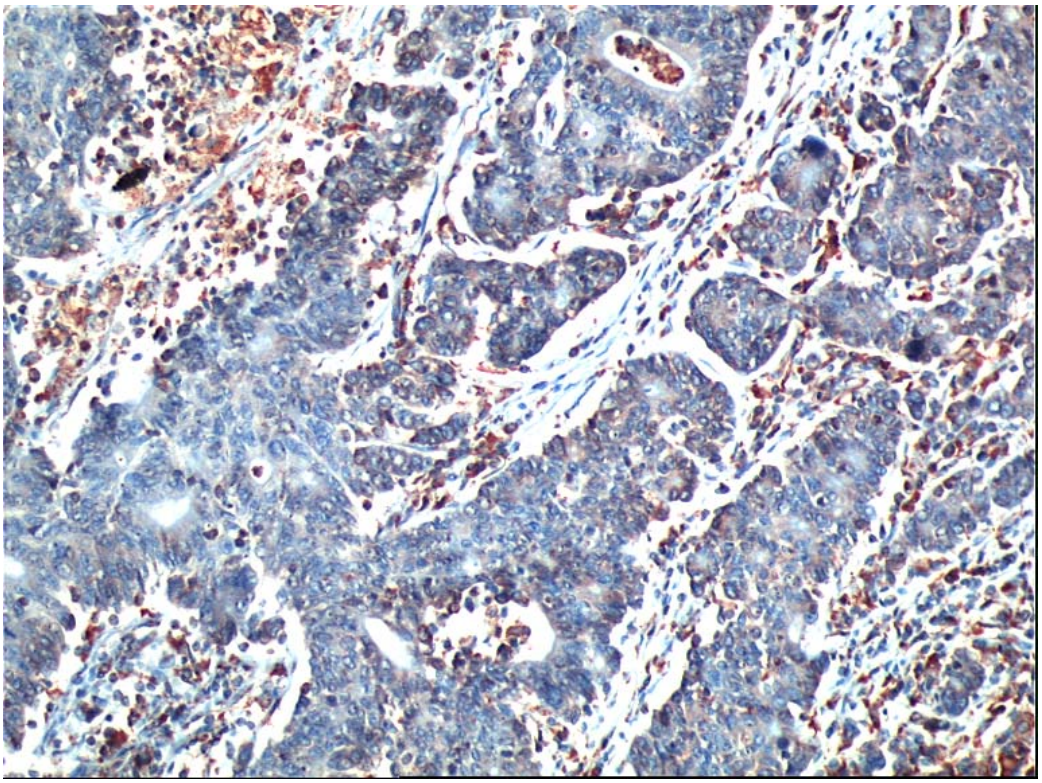
Şekil 2. p21 için mide tümör alanının %10'undan azında nükleer boyanma, Skor 0 (HEx100)



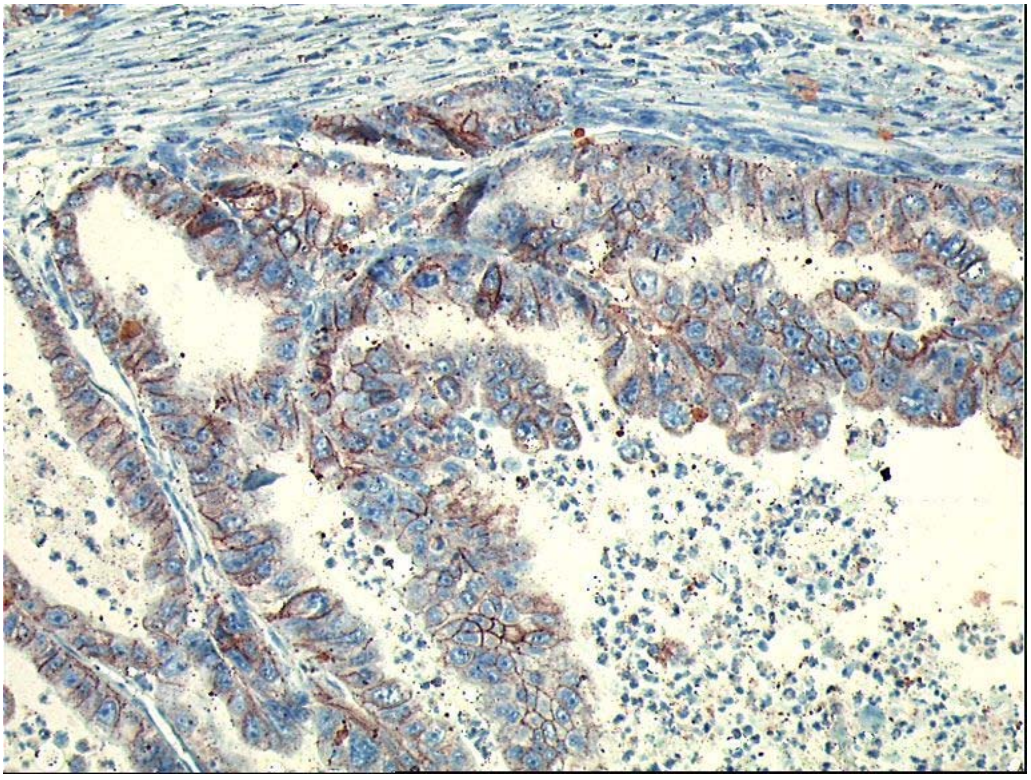
Şekil 3. p21 için mide tümör alanının %20-40'sinde nükleer boyanma, Skor +2 (HEx100)



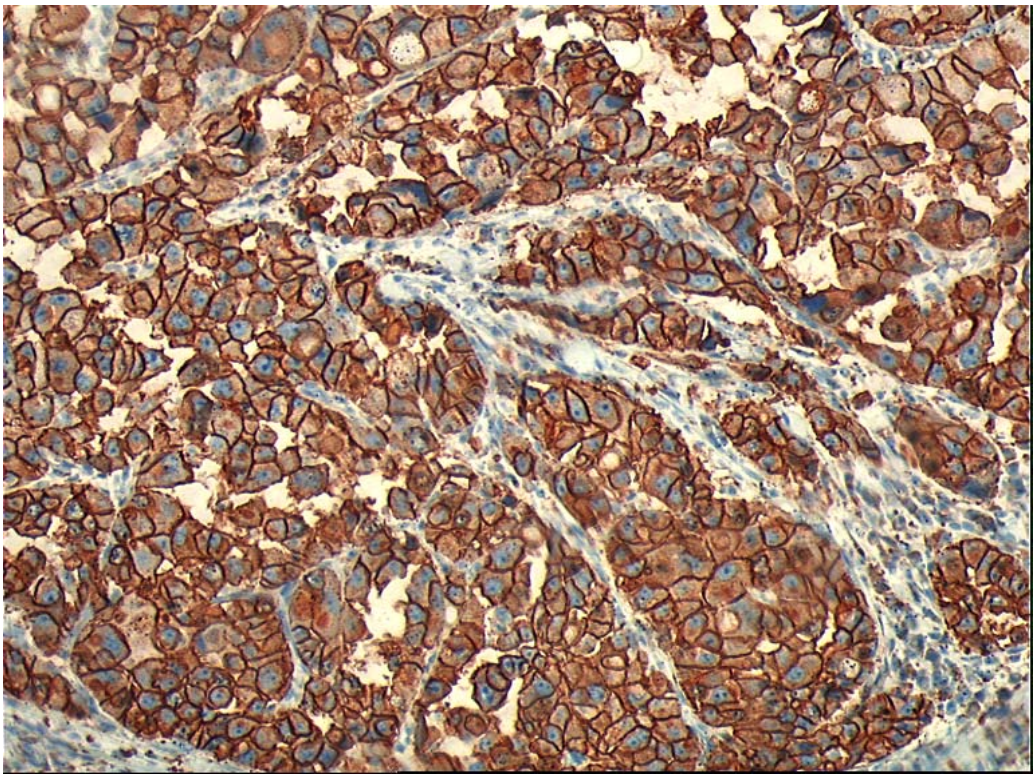
Şekil 4. p21 için mide tümör alanının %40'ından fazlasında nükleer boyanma, Skor +3 (HEx100)



Şekil 5. Her-2 için %10'un altında membranöz boyanma, Skor 0 (HEx100)



Şekil 6. Her-2 için %10'un üzerinde orta membranöz boyanma, Skor +2 (HEx100)



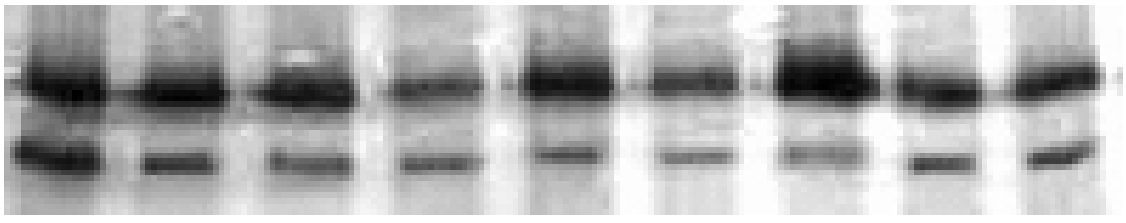
Şekil 7. Her-2 için %10'un üzerinde kuvvetli membranöz boyanma, Skor +3 (HEx100)

Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Hastaların Her-2 ve p21 için PZR sonuçları Tablo 4'te gösterilmiştir. p21 gen mutasyonu 9 (%20,5) hastada pozitif olarak saptandı. Her-2 polimorfizmi 36 (%81,8) hastada VV fenotipinde, 7 hastada (%15,9) IV fenotipinde, 1 (%2,3) hastada II fenotipinde tespit edildi (Şekil 8,9).

Tablo 4. Her-2 gen polimorfizmi ve p21 gen mutasyonu dağılımı

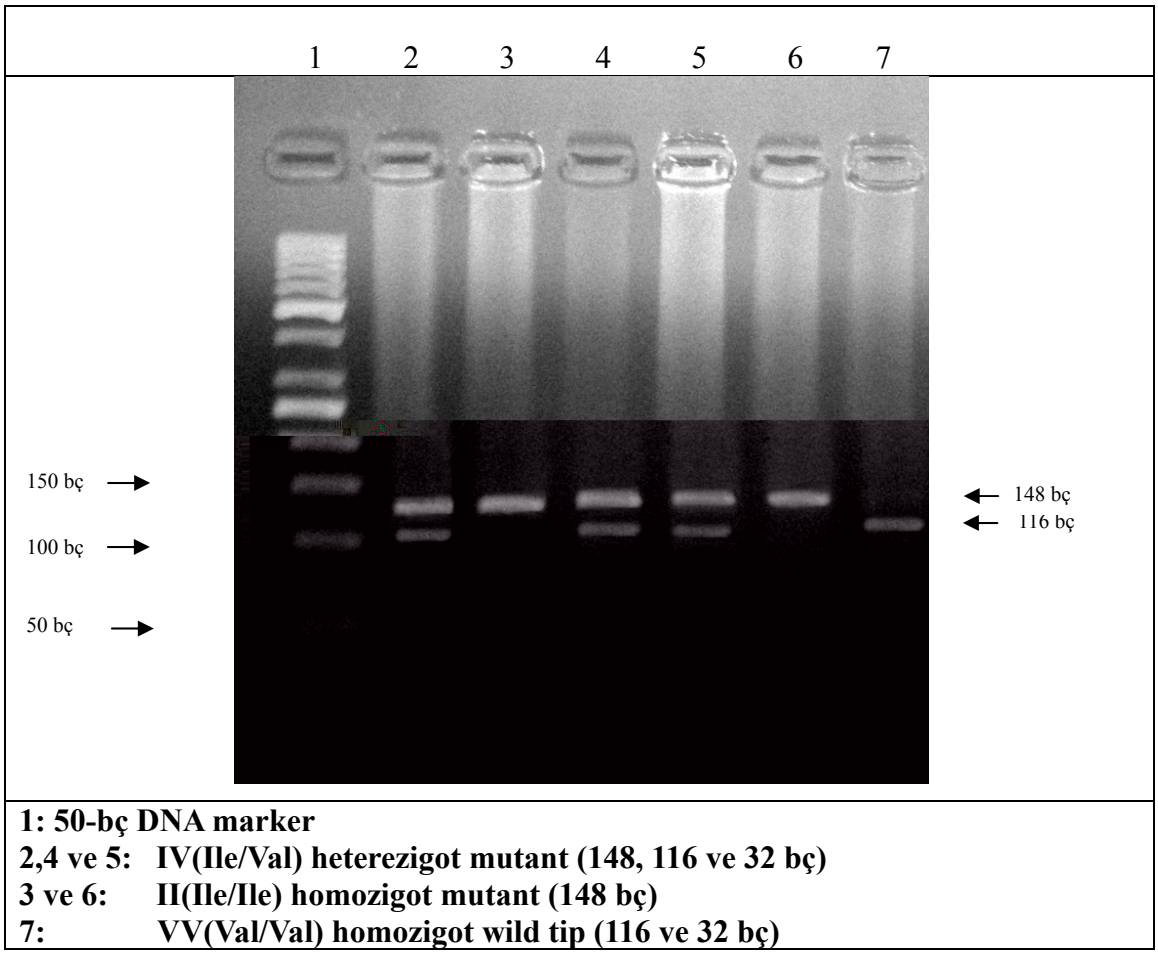
	n (%)
Her-2 Gen Polimorfizmi	
VV	36 (81,8)
IV	7 (15,9)
II	1 (2,3)
p21 Gen Mutasyonu	
Var	9 (20,5)
Yok	35 (79,5)



1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9: Tümör örnekleri

5: Kontrol

Şekil 8. p21 geni (ekson 3) için polimeraz zincir reaksiyonu



1: 50-bç DNA marker
2,4 ve 5: IV(Ile/Val) heterezigot mutant (148, 116 ve 32 bç)
3 ve 6: II(Ile/Ile) homozigot mutant (148 bç)
7: VV(Val/Val) homozigot wild tip (116 ve 32 bç)

Şekil 9. Her-2/NEU'nun RFLP (restriction fragment lenght polymorphism) analizi

İMMÜNOHİSTOKİMYASAL BOYAMA VE POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU SONUÇLARININ HİSTOPATOLOJİK PARAMETRELER, GENEL VE HASTALIKSIZ SAĞKALIM İLE İLİŞKİSİ

Histopatolojik Parametreler İle İlişki

İmmünohistokimyasal incelemede; p21 protein ekspresyonu negatifliği ile diffüz tip adenokarsinom, tüm mide yerleşimi, vasküler ve nöral invazyonun varlığı ve indiferansiye histoloji arasında istatistiksel anlamlı ilişki tespit edildi (Tablo 5). Her-2 pozitifliği ile histopatolojik parametreler arasında istatistiksel anlamlı ilişki tespit edilmedi.

Polimeraz zincir reaksiyonu sonuçları değerlendirildiğinde; p21 mutasyonu varlığı diffüz tip adenokarsinom ve indiferansiye histoloji ile istatistiksel anlamlı ilişki tespit edildi (Tablo 6). Her-2 polimorfizmi ile prognostik faktörler arasında istatistiksel anlamlı ilişki tespit edilmedi.

Tablo 5. p21 ekspresyonu sonuçlarının prognostik faktörler ile karşılaştırılması

		p21 Ekspresyonu		
	n	**(-)**	**(+/++/+++)**	**p**
Cinsiyet				
Erkek	34	14	20	0.401
Kadın	10	3	7	
Patolojik Alt Tip				
Diffüz	19	12	7	
İntestinal	16	2	14	**0.008**
Bilinmiyor	9	3	6	
T				
T 2	2	0	2	
T 3	36	14	22	0.727
T 4	6	3	3	
N				
Pozitif	30	10	20	0.457
Negatif	14	7	7	
Yerleşim Yeri				
Kardia	5	3	2	
Korpus	15	4	11	**0.031**
Antrum	20	6	14	
Tüm Mide	4	4	0	
Diferansiasyon				
Diferansiye	26	7	19	
İndiferansiye	14	7	7	**0.024**
Bilinmiyor	4	3	1	
Vasküler İnvazyon				
Var	27	14	13	
Yok	16	3	13	**0.032**
Bilinmiyor	1	0	1	
Nöral İnvazyon				
Var	30	16	14	**0.003**
Yok	14	1	13	

T: Mide duvarı invazyon derecesi, **N:** Lenf nodu tutulumu.

Tablo 6. p21 mutasyonu sonuçlarının prognostik faktörler ile karşılaştırılması

		p21 mutasyonu		
	n	**Var**	**Yok**	**p**
Cinsiyet				
Erkek	34	7	27	0.672
Kadın	10	2	8	
Patolojik Alt Tip				
Diffüz	19	7	12	
İntestinal	16	1	15	**0.032**
Bilinmiyor	9	1	8	
T				
T 2	2	0	2	
T 3	36	8	28	0.452
T 4	6	1	5	
N				
Pozitif	30	6	24	0.523
Negatif	14	3	11	
Yerleşim Yeri				
Kardia	5	1	4	
Korpus	15	3	12	0.997
Antrum	20	4	16	
Tüm Mide	4	1	3	
Diferansiasyon				
Diferansiye	26	3	23	
İndiferansiye	14	6	8	**0.024**
Bilinmiyor	4	0	4	
Vasküler İnvazyon				
Var	27	8	19	
Yok	16	1	15	0.071
Bilinmiyor	1	0	1	
Nöral İnvazyon				
Var	30	8	22	0.135
Yok	14	1	13	

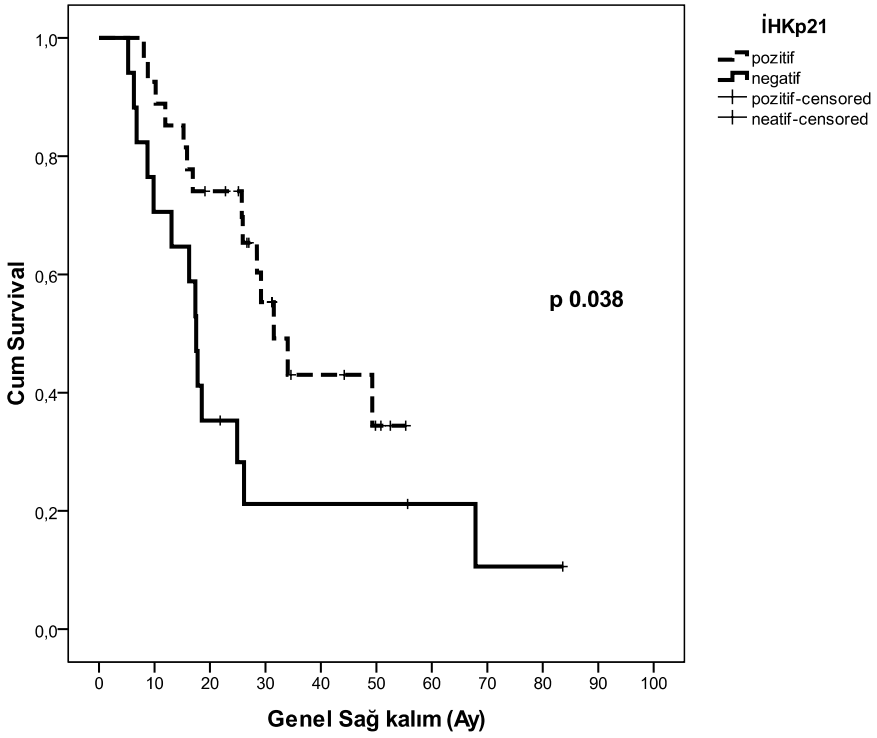
T: Mide duvarı invazyon derecesi, **N:** Lenf nodu tutulumu.

Sağkalım İle İlişki

Tek-değişkenli analiz sonucuna göre p21 protein ekspresyonu göstermeyen hastalarda genel sağkalım anlamlı olarak daha kısa idi (0.038) (Şekil 10). Her-2 protein ekspresyonu ve

polimorfizmi ve p21 mutasyonu varlığı ile genel sağkalım arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmadı. Operasyon tipi, yerleşim yeri, vasküler ve nöral invazyon varlığı ile genel sağkalım arasında anlamlı ilişki saptandı. Nüks ve metastaz varlığı da sağkalımı anlamlı olarak azaltmıştır (Tablo 7).

Çok-değişkenli regresyon analizinde ise nüks ve p21 protein ekspresyonu negatifliği genel sağkalımı olumsuz yönde etkileyen bağımsız prognostik faktörler olarak bulunmuştur (Tablo 7). Hastalıksız sağkalım süresi ile herhangi bir parametre arasında istatistiksel anlamlı bir ilişki tespit edilmemiştir.



Şekil 10. p21 ekspresyonu ile genel sağkalım İlişkisi

Klinik Sonuçlar

3 yıllık genel ve hastalıksız sağkalım oranı sırası ile %30,45 ve %18,8'dir. Hastaların medyan genel ve hastalıksız sağkalım süresi sırası ile 26,52 (5,23-83,60) ay ve 19,45 (1,17-83,6) ay olarak belirlenmiştir.

Takiplerinde nüks gelişen 18 (%40,9) hastanın 4'ünde lokal nüks, 14'ünde uzak metastaz mevcut idi. En sık metastaz yeri %46,2 ile karaciğer idi. Metastaz gelişen 6 hastaya salvaj kemoterapisi uygulanmış olup 8 hastaya yaş ve performans nedeni ile salvaj tedavi uygulanmamıştır.

Tablo 7. Genel sağkalım için tek-değişkenli ve çok-değişkenli analiz sonuçları

	Tek-değişkenli Analiz (p)	Çok-değişkenli Analiz (p)
Operasyon Tipi		
Total Gastrektomi **Subtotal Gastrektomi**	**0.012**	
Patolojik Alt Tip		
Diffüz **İntestinal** **Bilinmiyor**	0.135	
T		
T 2 **T 3** **T 4**	0.183	
N		
Pozitif **Negatif**	0.774	
Yerleşim Yeri		
Kardia **Korpus** **Antrum** **Tüm Mide**	**0.026**	
Vasküler İnvazyon		
Var **Yok**	**0.047**	
Nöral İnvazyon		
Var **Yok**	**0.005**	
p21 Ekspresyonu		
Negatif **Pozitif**	**0.038**	**0.014**
Nüks		
Var **Yok**	**0.001**	**0.002**
Metastaz		
Var **Yok**	**0.009**	

T: Mide duvarı invazyon derecesi, **N:** Lenf nodu tutulumu.

TARTIŞMA

Erken evre mide kanserinin tanı ve tedavisindeki gelişmeler uzun dönem sağkalım süresi sağlamasına karşın lokal ileri mide kanserindeki kötü prognoz günümüzde klinisyenler için sorun olmaya devam etmektedir. Kansere bağlı ölüm nedenlerinin çoğunluğunu metastazlara bağlı gelişen komplikasyonlar oluşturmaktadır. Son on beş yıldır mide kanserinde moleküler patoloji alanında yapılan çalışmalar invazyon ve metastazın moleküler mekanizmasını tam anlamıyla aydınlatamamıştır. Tümör progresyonu ve metastaz gelişiminde lokal invazyon, anjiogenez, damar invazyonu, endotele adhezyon, ekstravazasyon ve farklı organlarda yeniden büyüme rol oynamaktadır (Tablo 8). Bu basamakların her birinde adhezyon molekülleri, büyüme faktörleri, tümör baskılayıcı ve protoonkogenler, enzimler gibi farklı moleküllerin rolü araştırılmıştır. Daha açık ve anlaşılabilir moleküler temelli bilgilerin elde edilmesi tanı ve tedavide daha kolay yol alınmasını sağlayacaktır (40).

Tablo 8. İnvazyon, metastaz ve prognoz ile ilişkili moleküler ve genetik belirteçler

Kategori	**Belirteçler**
Büyüme Faktörleri	EGF, TGF-alfa, c-met, K-sam, Her-2, VEGF
Hücre Siklus Regülatörleri	Siklin E, p21,p27, p53, RB
Telomer	POT1
Hücre Adhezyon Molekülleri	E-Kadherin, CD44v6, CD44v9
Matriks Metalloproteinaz	MMP-1, MMP-2, MT1-MMP

Hücre siklusunun iki ana kontrol noktası G1-S ve G2-M kontrol noktalarıdır. Siklus anında sentezlenen ve sonrasında hızla parçalanan protein yapılı siklinler ve hücre siklusunda düzenleyici olarak görev yapan, yalnızca siklinlere bağlandıklarında aktive olan siklin bağımlı kinazlar bu kontrol noktalarına pozitif ya da negatif olarak etki ederek hücre siklusunun ilerleyişini düzenlerler. Siklin bağımlı kinazların inaktivasyonu mitozun gerçekleşememesine neden olur. İntrasellüler ve ekstrasellüler sinyaller (hipoksi ve DNA hasarı gibi) siklin bağımlı kinaz inhibitörlerini aktive ederler. Sonrasında siklin bağımlı kinaz inhibitörleri siklinleri inhibe ederek hücre siklusunun ilerleyişini bloke ederler. Böylece siklinler normal fonksiyonları olan DNA replikasyonu ve hücre bölünmesi için gerekli olan protein aktivasyonunu gerçekleştiremezler (34-36).

p21 proteini 6. kromozomun 6p21.2 bölgesinde lokalize tümör baskılayıcı p21 geni (WAF1) tarafından kodlanır, siklin-CDK komplekslerinin negatif regülatörlerinden bir tanesi olarak görev yapan bir proteindir. Siklin A-CDK2 ve Siklin E-CDK2 komplekslerine bağlanarak retinoblastom proteinin fosforilasyonunu önler ve hücre siklusunun ilerlemesini durdurur (37).

p21 proteininin fonksiyonu hücre kültürlerinde araştırılmıştır. Işınlanan hücrelerde p21 hücreyi G1 fazı kontrol noktasında durdurarak hücrede DNA tamirini veya apoptozisin gerçekleşmesini sağlamaktadır (41-43). Ayrıca tümör hücrelerinde ve sağlam fibroblastlarda hücre proliferasyonunu direk olarak inhibe ettiği de farklı çalışmalarda gösterilmiştir (44,45). Bu çalışmalarda p21 proteinin bu etkisinin tümör baskılayıcı gen olarak görev yaptığı bilinen p53 genine bağımlı bir etki olduğu savunulmuştur. İki ayrı çalışmada hücre kültüründe p21 proteininin p53 geninden bağımsız etkisi araştırılmış ve p53 geninin baskılandığı durumlarda da DNA hasarı sonrası p21'in indüklendiği gösterilmiştir (46,47).

Normal mide mukozasında epitelyal hücreler mukoza yüzeyine doğru ilerledikçe hücre siklusunda da ilerlerler ve mide yüzeyini örten bu hücreler iyi diferansiyasyon özelliği kazanırlar. Hücre mukozasının yüzeyini örten bu hücrelerin p21 pozitif hücreler olduğu gösterilmiş ve bunun sonucu olarak p21 pozitif hücrelerin iyi diferansiye oldukları bildirilmiştir (48). Xie ve ark. (22) 108 kanserli, 40 displazik, 20 normal mide doku örneğini incelemişler ve normal mide doku örneklerinin hepsinde boyanma tespit etmişler ancak mide kanserli doku örneklerinin %39,8'inde pozitif boyanma tespit etmişler ve iyi diferansiye hastalarda ise p21'in pozitif boyanmasını istatistiksel anlamlı olarak yüksek bulmuşlardır. Ogawa ve ark. (49) 172 opere mide kanserli hastayı incelemişler ve p21 ekspresyonu ile iyi diferansiye histoloji arasında istatistiksel anlamlı ilişki tespit etmişlerdir. Çalışmamızda iyi

diferansiye mide kanseri tanılı hastalarda p21 ekspresyonu istatistiksel anlamlı olarak yüksek tespit edilmiştir.

Farklı çalışmalarda tümör invazyonu, lenf nodu metastazı, lenfatik ve venöz invazyon gibi histopatolojik parametreler ile p21 ekspresyonu arasında istatistiksel anlamlı ilişki gösterilmiştir (50,51). Ogawa ve ark. (49) indiferansiye histoloji, derin tümör inazyonu, venöz ve lenfatik invazyon varlığında p21 ekspresyonunda istatistiksel anlamlı belirgin bir azalma saptamışlardır. Benzer olarak Kouraklis ve ark. (52) derin tümör invazyonu, venöz ve lenfatik invazyon varlığında, karaciğer metastazlı hastalarda p21 ekspresyonunda istatistiksel anlamlı belirgin bir azalma saptamışlardır. Çalışmamızda p21 ekspresyonu negatif hastalarda diffüz ve indiferansiye histoloji, midenin tümünün tutulumu, vasküler ve nöral invazyon varlığı istatistiksel anlamlı olarak daha yüksek oranda tespit edilmiştir.

Ogawa ve ark. (49) p21 ekspresyonu tespit edilen hastalarda nüks oranının istatistiksel olarak daha düşük olduğunu ve bu hastaların daha uzun bir genel sağkalıma sahip olduklarını bildirmişlerdir. Gomyo ve ark. (53) 93 mide kanserli hastayı içeren çalışmalarında p21 ekspresyonu varlığının istatistiksel anlamlı olarak daha iyi genel sağkalım ile ilişkili olduğunu göstermişlerdir. Kouraklis ve ark. (52) p21 ekspresyonu pozitif hastalarda genel sağkalımı daha yüksek bildirmişlerdir. Bunların aksine Muller ve ark. (54) ise p21 ekspresyonu ile sağkalım arasında herhangi bir ilişki gösterememişlerdir. Çalışmamızda p21 ekspresyonu ile nüks gelişimi arasında bir ilişki saptanamamıştır ancak, p21 ekspresyonunun varlığı genel sağkalımı istatistiksel anlamlı olarak iyileştirmiştir.

p21'in mide kanserindeki rolünü araştıran çalışmalarda özellikle p21 ekspresyonu üzerine durulmuştur. Literatürde p21'in mide kanserindeki rolünü araştıran çalışmalardan sadece bir tanesinde p21 gen mutasyonu araştırılmıştır. Bu çalışma ile Park ve ark. (21) 20 mide kanserli hastanın doku örneklerinde p21 gen mutasyonunun varlığını araştırmışlar ancak hem ekzon 2 hem de ekzon 3'te herhangi bir mutasyon tespit edememişlerdir. Çalışmamızda p21 mutasyonu ekzon 3'te çalışılmış ve 9 (%20,5) hastada p21 gen mutasyonu tespit edilmiştir. Ayrıca diffüz tip ve undiferansiye mide kanserli hastalarda p21 gen mutasyonu istatistiksel anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Bu sonuçlar p21 ekspresyonu ile benzerlik göstermektedir.

Her-2 proteini kromozom 17q21'de lokalize Her-2 protoonkogeni tarafından kodlanan, hücre membranı üzerindeki reseptör yapısında yer alan bir transmembran glikoproteinidir (13,17). Reseptörlerin yapısında yer alan ligand bağlayan alana ligand bağlanmasını takiben monomerler şeklinde bulunan Her proteinleri homo veya heterodimer oluştururlar ve bunun

sonucunda tirozin kinaz aktivitesi ile tirozin rezidülerinin fosforilasyonu hücrenin çoğalmasına yönelik sinyal iletimini başlatır.

Her-2 protein ekspresyonu kolon, mesane, over, endometrium ve akciğer kanseri gibi farklı malignitelerde araştırılmıştır (52,55-58). Mide kanserinde immunohistokimyasal (İHK) boyanma yöntemi ile Her-2 overekspresyonu ilk defa 1986 yılında gösterilmiştir (59). Mide kanserlerindeki Her-2 overekspresyonu meme kanserlerindeki oranlarla benzer sonuçlar göstermektedir (60). Mide kanserinde yapılan çalışmalarda Her-2 overekspresyonu %8-28 arasında bulunmuştur (61-66). Chariyalertsak ve ark. (67) Her-2 overekspresyonunu, erken mide kanserlerinde %6,9, ileri evre mide kanserlerinde %15,9, nüks ve inoperabl vakalarda %28,6 oranında tespit etmişlerdir. Çalışmamızda immünohistokimyasal boyama ile Her-2 ekspresyonu %9,1 olarak tespit edilmiştir.

Mide kanserli hastalarda Her-2 ekspresyonu ile prognostik faktörler arasındaki ilişkiyi araştıran çalışmaların sonuçları farklılıklar göstermektedir. Her-2 ekspresyonunun invazyon derinliğine göre ileri evre, papiller histoloji, karaciğer metastazı, iyi diferansiyasyon, serozal invazyon ve lenf nodu metastazı ile istatistiksel olarak anlamlı derecede ilişkili olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır (19,20,68). Bunun yanı sıra Sousa ve ark. (64) 157 mide kanserli hastayı içeren çalışmalarında Her-2 ekspresyonu ile tümör lokalizasyonu ve venöz invazyon arasında ilişki olduğunu, Jain ve ark. (69) Her-2 pozitifliği ile iyi diferansiye histoloji, intestinal tip, tübüler tip ve ekspansif yayılım arasında ilişki olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmamızda da Her-2 ekspresyonu ile histopatolojik parametreler arasında istatistiksel anlamlı bir ilişki saptanmamıştır.

Mide kanserinde Her-2 ekspresyonu gösteren vakaların göstermeyen vakalara göre daha düşük bir sağkalım oranına sahip olduklarını ve Her-2 ekspresyonunun kötü prognostik faktör olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır (19,20,61,68,70). Bu çalışmalarda Her-2 ekspresyonu ile tümör invazyon derinliği, lenfatik invazyon varlığı, lenf nodu tutulumu gibi prognozu olumsuz etkilediği bilinen parametreler arasında ilişki gösterilmiştir. Bazı çalışmalarda ise Her-2 ekspresyonu ile düşük sağkalım süresi arasında bir ilişki bulunamamıştır (71,72). Bu çalışmalarda prognozu etkileyen histopatolojik parametreler ile herhangi bir istatistiksel ilişki gösterilememiştir. Jain ve ark. (69) ise ilginç olarak 93 mide kanserli hasta içeren çalışmalarında Her-2 pozitif olan vakaların negatiflere göre anlamlı derecede daha iyi prognozlu olduğunu bildirmişlerdir. Ancak bu çalışmada Her-2 ekspresyonu gösteren tüm hastaların iyi prognoza sahip olduğu bilinen intestinal tip histolojiye sahip oldukları bildirilmiştir. Çalışmamızda Her-2 ekspresyonu ile genel sağkalım ve hastalıksız

sağkalım arasında istatistiksel anlamlı bir ilişki tespit edilmemiştir. Hasta sayısının azlığı bu sonuca etki etmiş olabilir.

Satıroğlu ve ark. (73) mide kanserli hastalarda Her-2 gen polimorfizmini (IIe/Val) %20 olarak bildirmişler ve evre 4 hastalıkla istatistiksel anlamlı ilişkili bulmuşlardır. Çalışmamızda sadece 1 hastada II fenotipinde Her-2 gen polimorfizmi tespit edilmiş ve histopatolojik parametreler, genel sağkalım ve hastalıksız sağkalım arasında istatistiksel anlamlı ilişki tespit edilememiştir.

SONUÇLAR

Mide adenokarsinom tanılı ve postoperatif adjuvan kemoradyoterapi uygulanan 44 olgunun incelenmesi sonucunda;

1 p21 ve Her-2 ekspresyon pozitifliği sırası ile %61,4 ve %9,1 olarak saptanmıştır. p21 mutasyonu her beş olgudan birinde mevcut iken Her-2 gen polimorfizmi %2,3 oranında II fenotipinde idi.

2 p21 ekspresyonunun negatif olduğu olgularda diffüz tip adenokarsinom, vasküler/nöral invazyon varlığı ve indiferansiye histoloji p21 ekspresyonu pozitif olgulara göre anlamlı olarak daha yüksek oranlarda gözlenmiştir. p21 mutasyon varlığında ise diffüz tip ve indiferansiye histoloji anlamlı olarak yüksek bulunmuştur.

3 p21 ekspresyonunun negatif olduğu olgularda genel sağkalım p21 ekspresyonu pozitif olgulara göre anlamlı olarak daha kısa bulunmuştur. Hastalıksız sağkalım ile ilişki saptanamamıştır.

4 Her-2 gen ekspresyon pozitifliği ve polimorfizmi ile histopatolojik parametreler ve genel ve hastalıksız sağkalım arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır.

ÖZET

Bu çalışma ile postoperatif adjuvan kemoradyoterapi uygulanan mide adenokarsinomu tanılı hastalarda Her-2 gen polimorfizmi ve p21 gen mutasyonunun sağkalım, lokal-bölgesel ve uzak kontrole etkilerinin değerlendirilmesi amaçlandı. Kırk dört olgunun patoloji preapartları incelenerek immünohistokimyasal boyama yöntemi ile Her-2 ve p21 protein ekspresyonu pozitifliği ve polimeraz zincir reaksiyon yöntemi ile p21 gen mutasyonu ve Her-2 gen polimorfizmi varlığı araştırılmıştır.

p21 ve Her-2 ekspresyon pozitifliği sırası ile %61,4 ve %9,1 olarak saptanmıştır. p21 mutasyonu her beş olgudan birinde mevcut iken Her-2 gen polimorfizmi %2,3 oranında II fenotipinde idi.

p21 ekspresyonunun negatif olduğu olgularda diffüz tip adenokarsinom, vasküler/nöral invazyon varlığı ve indiferansiye histoloji p21 ekspresyonu pozitif olgulara göre anlamlı olarak daha yüksek oranlarda gözlenmiştir. p21 mutasyon varlığında ise diffüz tip ve indiferansiye histoloji anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. p21 ekspresyonunun negatif olduğu olgularda genel sağkalım p21 ekspresyonu pozitif olgulara göre anlamlı olarak daha kısa bulunmuştur (*Cox regresyon*, p=0.014). Hastalıksız sağkalım ile p21 ekspresyonu arasında ilişki saptanamamıştır. Her-2 gen ekspresyon pozitifliği ve polimorfizmi ile histopatolojik parametreler ve genel ve hastalıksız sağkalım arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır.

Sonuç olarak; p21 ekspresyonu negatifliği kötü prognostik faktörler olduğu bilinen vasküler/nöral invazyon, indiferansiye ve diffüz tip histoloji ile ilişkili olup mide adenokarsinom tanılı hastalarda genel sağkalımı olumsuz etkilemektedir.

Anahtar kelimerler: Mide kanseri, p21, Her-2

EVALUATION THE EFFECTS OF Her-2 GENE POLYMORPHISM AND p21 GENE MUTATİON ON OVERALL SURVIVAL, LOCOREGIONAL AND DISTANT CONTROL IN PATIENTS TREATED WITH POSTOPERATİVELY ADJUVANT CHEMORADIOTHERAPY

SUMMARY

In this study it was aimed to evaluate the effects of Her-2 gene polymorphism and p21 gene mutation on overall survival, locoregional and distant control in patients treated with postoperatively adjuvant chemoradiotherapy. Immunohistochemical staining (IHC) and polymerase chain reaction (PCR) was performed in 44 patients who were treated with adjuvant chemoradiotherapy in 1999-2008.

The expression of p21 and Her-2 was found in 61.4% and 9.1% patients respectively. p21 gene mutation was positive in one of every five patients and Her-2 polymorphism was II phenotype in 2.3% patient.

In the patients with the negative expression of p21, diffuse type histology, whole gastric involvement and positive vascular and neural invasion, undifferential histology rate was significantly higher than in the patients with positive expression of p21. p21 mutation was significantly higher in diffuse and undifferential type histology. In the patients with the negative expression of p21, overall survival was significantly shorter than in the patients with positive expression of p21 *(*Cox regression*, p=0.014).* There was no association between any

parameters with disease free survival. There was no significant association between histopathological parameters with Her-2 expression and Her-2 gene polymorphism.

Consequently, negative p21 staining with IHC is associated with undifferantial and diffuse type histology which are known as a worse prognostic factors and it effects negatively overall survival in patients with gastric adenocarcinoma who were treated with postoperatively adjuvant chemoradiotherapy.

Key words: Gastric cancer, p21, Her-2

KAYNAKLAR

1. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. CA Cancer J Clin 2005;55:74-108.

2. Kanserle Savaş Politikası ve Kanser Verileri (2004-2006), T.C Sağlık Bakanlığı Kanserle Savaş Dairesi Başkanlığı, Ankara 2007.

3. Chyou PH, Nomura AM, Hankin JH, Stemmermann GN. A case-cohort study of diet and stomach cancer. Cancer Res 1990;50:7501-04.

4. Nomura A, Grove JS, Stemmermann GN, Severson RK. Cigarette smoking and stomach cancer. Cancer Res 1990;50:7084.

5. Munoz SE, Ferraroni M, La Vecchia C, Decarli A. Gastric cancer risk factors in subjects with family history. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 1997;6:137-40.

6. Forman D. Helicobacter pylori infection and cancer. Br Med Bull 1998;54:71-8.

7. Klein Kranenbarg E, Hermans J, van Krieken JH, van de Velde CJ. Evaluation of the 5th edition of tha TNM classification for gastric cancer: improved prognostic value. British Journal of Cancer 2001;84:64-71.

8. Nakamura K, Ueyama T, Yao T, Xuan ZX, Ambe K, Adachi Y, et al. Pathology and prognosis of gastric carcinoma. Findings in 10000 patients who underwent primary gastrectomy. Cancer 1992;70:1030-7.

9. Adachi Y, Yasuda K, Inomata M, Sato K, Shiarishi N, Kitano S. Pathology and prognosis of gastric carcinoma: well versus poorly differantiated type. Cancer 2000;89:1418-24.

10. Halperein EC, Perez CA. Perez and Brady's Principles and Practice of Radiation Oncology. 5th ed. Wolters Kluwer; 2007. p.1318-35.

11. Berchuck A, Kamel A, Whitaker R, Kerns B, Olt G, Kinney R, et al. Overexpression of HER-2/neu Is Associated with Poor Survival in Advanced Epithelial Ovarian Cancer. Jr Cancer Res 1990;50:4087-91.

12. Day JD, Digiuseppe JA, Yeo C, Lai-Goldman M, Anderson SM, Goodman SN, et al. İmmunohistochemical evaluation of HER-2/neu expression in pancreatic adenocarcinoma and pancretic intraepithelial neoplasms. Hum Pathol 1996;27:119-24.

13. Sato K, Moriyama M, Mori S, Saito M, Watanuki T, Terada K, et al. An immunohistologic evaluation of c-erbB-2 gene product in patients with urinarry baldder carcinoma. Cancer 1992;70:2493-8.

14. Mellon JK, Lunec J, Wright C, Horne CH, Kelly P, Neal DE. C-erbB-2 in bladder cancer. Moleculer biology corelation with epidermal growth factor receptörs and prognostic value. J Urol 1996;155:321-6.

15. Ross JS, Sheehan C, Hayner-Buchan AM, Ambros RA, Kallakury BV, Kaufman R, et al. HER-2/neu gene amplication status in prostate cancer by flourescence insutu hybridization. Hum Pathol 1997;28:827-33.

16. Guérin M, Gabillot M, Mathieu MC, Travagli JP, Spielmann M, Andrieu N, et al. Structure and expression of c-erbB-2 and EGF receptor genes in inflammatory and noninflamatory breast cancer: Prognostic significance. Int J Cancer 1989;43:201-8.

17. Berger MS, Locher GW, Saurer S, Gullick WJ, Waterfield MD, Groner B, et al. Correlation of c-erbB-2 gene amplication and protein expression in human breast carcinoma with nodal status and nuclear grading. Cancer Res 1988;48:1238-43.

18. Kern JA, Schwartz DA, Nordberg JE, Weiner DB, Greene MI, Torney L, et al. p185/neu expression in human lung adenocarcinomas predicts shortened survival. Cancer Res 1990;50:5184-7.

19. Yonemura Y, Ninomiya I, Ohoyama S, Kimura H, Yamaguchi A, Fushida S, et al. Evalution of immünreactivity for c-erbB-2 protein as a marker of poor short term prognosis in gastric cancer. Cancer Res 1991;51:1034-8.

20. Yonemura Y, Ninomiya I, Yamaguchi A, Fushida S, Kimura H, Ohoyama S, et al. Expression of c-erbB-2 oncoprotein in gastric carcinoma. İmmünreactivity for c-erbB-2 protein is an indipentent indicatör of poor short–term prognosis in patients with gastric carcinoma. Cancer 1991;67:2914-8.

21. Park YE, Choi KC, Choi YH. p21 expression and mutation in gastric carcinoma: analysis by immunohistochemistry and PCR-SSCP. J Korean Med Sci 1998;13:507-12.

22. Xie HL, Su Q, He XS, Liang XQ, Zhou JG, Song Y, et al. Expression of p21WAF1 and p53 and polymorphismof p21WAF1gene in gastric carcinoma. World J Gastroenterol 2004;10:1125-31.

23. Goss CM. Anatomy of the human body. Philadelphia: Lea & Febiger, 1973.

24. Cox JD, Ang KK. Radiation Oncology: Rationale, Technique, Results. 9th ed. Mosby

Elsevier; 2010. p.493-515.

25. Haenszel W. Variation in incidence of and mortality from stomach cancer with particular reference to the United States. J Natl Cancer Inst 1958;21:213-62.

26. Devesa SS, Blot WJ, Fraumeni JF Jr. Changing patterns in the incidence of esophageal and gastric carcinoma in the United States. Cancer 1998;83:2049-53.

27. American Cancer Society: Cancer Facts & Figures 2008. Atlanta, American Cancer Society, 2008.

28. Pisani P, Parkin DM, Bray F, Ferlay J. Estimates of the worldwide mortality from 25 cancers in 1990. Int J Cancer 1999;83:18-29.

29. Kelley JR, Duggan JM. Gastric cancer epidemiology and risk factors. Journal of Clinical Epidemiology 2003;56:1-9.

30. Borrmann R. Geschwulste des Magens und Duodenums. Handbuch der Speziellen Pathologischen Anatomie und Histologie, Springer, Berlin.

31. Lauren P. The two histological main types of gastric carcinoma. Acta Pathol Microbiol Scand 1965,64:31-49.

32. Lauren PA, Nevalainen TJ. Epidemiology of İntestinal and Diffüse Types of Gastric Carcinoma. Cancer 1993;71,2926-33.

33. NCCN Practise Guidlines in Oncology v.1.2010, Gastric Carcinoma.

34. Loddish H, Berk A, Zipurskyb SL, Matsudairan P, Baltimore D, Darnell J. Molecular Cell Biology: Regulation of the Eukaryotic Cell Cycle, 4 th ed. W.H. Freeman and compony, New York;2001:495-536.

35. Vincenzi B, Schiavon G, Silletta M, Santini D, Perrone G, di Marino M, et al. Cell cycle alterations and lung cancer. Histol Histopathol. 2006;21:423-35.

36. Esposito V, Baldi A, Tonini G, Santini M, Ambrogi V, Persichetti P, et al. Analysis of cell cycle regulator proteins in non-small cell lung cancer. J Clin Pathol 2004;57:58-63.

37. Stein JP, Ginsberg DA, Grossfeld GD, Chatterjee SJ, Esrig D, Dickinson MG, et al. Effect of p21WAF1/CIP1 expression on tumor progression in bladder cancer. J Natl Cancer Inst 1998;90:1072-9.

38. McCloskey SA, Yang GY. Benefits and challenges of radiation therapy in gastric cancer: Techniques for improving outcomes. Gastrointestinal Cancer Research 2008;3:15-9.

39. Watanabe M, Isobe K, Takisima H, Uno T, Uneno N, Kawakami H, et al. Intrafractional gastric motion and interfractional stomach deformity during radiation therapy. Radiotherapy and Ocology 2008;87:425-31.

40. Yasui W, Oue N, Aung PP, Matsumura S, Shutoh M, Nakayama H. Molecular-pathological prognostic factors of gastric cancer: a review. Gastric Cancer. 2005;8:86-94.

41. El-Deiry WS, Harper JW, O'Connor PM, Velculescu VE, Canman CE, Jackman J, et al. WAF1/CIP1 is induced in p53 mediated G1 arrest and apoptosis. Cancer Res1994;54:1169-74.

42. Sheikh MS, Rochefort H, Garcia M. Overexpression of p21/Waf1/Cip1 induced growth arrest, giant cell formation and apoptosis in human breast carcinoma cell lines. Oncogene 1995;11:1487-98.

43. Chen CY, Faller DV. Direction of p21 generated signals towards cell growth or apoptosis is determined by protein kinase C and Bcl-2. Oncogene 1995;11:1675-83.

44. Harper JW, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K, Elledges SJ. The p21 Cdk-interacting protein Cip 1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. Cell 1993;75:805-16.

45. El-Deiry WS, Tokino T, Velculesco VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM et al. WAF1, a potential mediator of p53 tumor supression. Cell 1993;75:817-25.

46. Michieli P, Chedid M, Lin D, Pierce JH, Mercer WE, Givol D. Induction of WAF1/CIP1 by a p53-independent pathway. Cancer Res 1994;54:3391-5.

47. Akagi M, Yasui W, Akama Y, Yokozaki H, Tahara H, Haruma K, et al. Inhibition of cell growth by transforming growth factor b1 is associated with p53-independent induction of p21 in gastric carcinoma cells. Jpn J Cancer Res 1996;87:377-84.

48. Yasui W, Akama Y, Kuniyasu H, Yokozaki H, Semba S, Shimamoto F, et al. Expression of cyclin-deperndent kinase inhibitor p21 in non-neoplastic mucosa and neoplasia of the stomach: relationship with p53 status and proliferative activity. J Pathol 1996;180:122-8.

49. Ogawa M, Maeda K, Onoda N, Chung Y-S, Sowa M, Nakata B, et al. Loss of p21 espression correlates with disease progression in gastric carcinoma. Br j Cancer 1997;75:1617-20.

50. Seo YH, Joo YE, Choi SK, Rew JS, Park CS, Kim SJ. Prognostic significance of p21 and p53 expression in gastric cancer. The Korean Journal of Internal Medicine 2003;18:98-103.

51. Mizokami K, Kakeji Y, Oda S, Maehara Y. Relationship of hypoxia-inducible factor 1α and p21WAF1/CIP1 expression to cell apoptosis and clinical outcome in patients with gastric cancer. World Journal of Surgical Oncology 2006;4:94-101.

52. Schuell B, Gruenberger T, Scheithauer W, Zielinski Ch, Wrba F. HER 2/neu protein expression in colorectal cancer. BMC Cancer 2006;8:123.

53. Gomyo Y, Ikeda M, Osaki M, Tatebe S, Tsujitani S, Ikeguchi M, et al. Expression of p21, but not p53 protein, is a factor in the survival of patients with advanced gastric carcinoma. Cancer 1997;79:2067-72.

54. Kaye PV, Radebold K, Isaacs S, Dent DM. Expression pf p53 and p21waf1/cip1 in gastric carcinoma: lack of inter-relationship or correlation with prognosis. Eur J Surg Oncol 2000;26:4322.

55. Eltze E, Wülfing C, Von Struensee D, Piechota H, Buerger H, Hertle L. Cox-2 and Her2/neu co-expression in invasive bladder cancer. Int J Oncol 2005;26:1525-31.

56. McKenzie SJ, DeSombre KA, Bast BS, Hollis DR, Whitaker RS, Berchuck A, et al. Serum levels of HER-2 neu (C-erbB-2) correlate with overexpression of p185neu in human ovarian cancer. Cancer 1993;71: 3942-6.

57. Hetzel DJ, Wilson TO, Keeney GL, Roche PC, Cha SS, Podratz KC. HER-2/neu expression: a major prognostic factor in endometrial cancer. Gynecol Oncol 1992;47:179-85.

58. Hirashima N, Takahashi W, Yoshii S, Yamane T, Ooi A. Protein overexpression and gene amplification of c-erb B-2 in pulmonary carcinomas: a comparative immunohistochemical and fluorescence in situ hybridization study. Mod Pathol 2001;14:556–662.

59. Sakai K, Mori S, Kawamoto T, Taniguchi S, Kobori O, Morioka Y, et al. Expression of epidermal growth factor receptors on normal human gastric epithelia and gastric carcinomas. J Natl Cancer Inst 1986;77:1047-52.

60. Kono K, Takahashi A, Ichihara F, Sugai H, Fujii H, Matsumoto Y. İmpaired Antibody–dependent Cellular Cytotoxicity Mediated by Herceptin in patient with Gastric Cancer. Cancer Res 2002;62:5813-7.

61. Uchino S, Tsuda H, Maruyama K, Kinoshita T, Sasako M, Saito T, et al. Overexpression of c-erbB-2 protein in gastric cancer. Its correlation with long term survival of patients. Cancer 1993;72:3179-84.

62. Gürel S, Dolar E, Yerci O, Samli B, Oztürk H, Nak SG ve ark. The relationship between c-erbB-2 oncogene expression and clinicopathological faktors in gastric cancer. J Int Med Res 1999;27:74-8.

63. Dursun A, Poyraz A, Çelik B, Akyol G. Expression of c-erbB-2 Oncoprotein in gastric carcinoma: Correlation with Histopathologic Charesteristics and Analysis of Ki-67. Pathol Oncol Res 1999;5:104-6.

64. Pinto-de-Sousa J, David L, Almeida R, Leitão D, Preto JR, Seixas M, et al. c-erbB-2 expression is associated with tumor lokation and venous invasion and ınfluences survival of patients with gastric carcinoma. Int J Surg Pathol 2002;10:247-56.

65. Takehana T, Kunitomo K, Kono K, Kitahara F, Iizuka H, Matsumoto Y, et al. Status of c-erbB-2 in gastric adenocarcinoma: Acomparative study of immünohistochemistry,

fluoresence insutu hybridization and enzyme linked immünsorbent assay. Int J Cancer 2002;98:833-7.

66. Park JB, Rhim JS, Park SC, Kimm SW. Amplication, overexpression and rearrengament of the c-erbB-2 protooncogene in primary stomach carcinomas. Cancer Res 1989;49:6605-9.

67. Chariylertsak S, Sugano K, Ohkura H, Mari Y. Comparasion of c-erbB-2 oncoprotein expression in tissue and serum of patients with stomach cancer. Tumour Biol 1994;15:294-303.

68. Mizutani T, Onda M, Tokunaga A, Yamanaka N, Sugisaki Y. Relationship of c-erbB-2 protein Expression and gene amplication to invasion and metastasis in Human Gastric Cancer. Cancer 1993;72:2083-8.

69. Jain S, Filipe MI, Gullick WJ, Linehan J, Morris RW. C-erbB-2 protooncogene expression and its relationship to survival in gastric carcinomas: an immünhistochemical study on archival material. Int J Cancer 1991;48:668-71.

70. Kim YJ, Ghu HD, Kim DY, Kim HJ, Kim SK, Park CS. Expression of Cellular Onkogenes in Human Gastric Carcinoma: c-myc, c-erbB-2 and K-ras. J Surg Oncol 1993;54:167-70.

71. Polkowski W, van Sandick JW, Offerhaus GJ, ten Kate FJ, Mulder J, Obertop H, et al. Prognostic value of Lauren classification and c-erbB-2 oncogene overexpression in adenocarcinoma of the esophagus and gastroesophageal junction. Ann Surg Oncol 1999;6:290-7.

72. Albino AP, Jaehne J, Altorki N, Blundell M, Urmacher C, Lauwers G, et al. Amplication of c-erbB-2 gene in human gastric carcinomas: Correlation with primary site. Eur J Surg Oncol 1995;21:56-60.

73. Satiroglu-Tufan NL, Bir F, Calli-Demirkan N. Investigation of HER-2 codon 655 single nucleotide polymorphism frequency and c-ErbB-2 protein expression alterations in gastric cancer patients. World J Gastroenterol 2006 28;12:3283-7.

EKLER

EK1

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI
YEREL ETİK KURULU Edirne, Türkiye
ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAYI

BAŞVURU BİLGİLERİ	PROTOKOL KODU	TÜTFEK 2009 / 96
	PROTOKOL ADI	Postoperatif adjuvan kemoradyoterapi uygulanan mide adenokarsinom tanılı hastalarda Her-2 gen polimorfizmi ve p 21 gen mutasyonunun sağkalım, lokal-bölgesel ve uzak kontrole etkilerinin değerlendirilmesi
	SORUMLU ARAŞTIRICI UNVANI/ADI	Doç. Dr. Zafer KOÇAK
	ARAŞTIRMA MERKEZİ	T.Ü.T.F. Radyasyon Onkolojisi Anabilim Dalı
	BAŞVURULAN ETİK KURUL	T.Ü.T.F. Yerel Etik Kurulu
	DESTEKLEYİCİ FİRMA	Trakya Üniversitesi Araştırma Projeleri (TÜBAP)
	FAZI	
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	☒ Tek Merkez ☐ Çok Merkez ☒ Ulusal ☐ Uluslar arası

	Belge Adı	Tarihi	Değişiklik No.su	Dili
DEĞERLENDİRİLEN İLGİLİ BELGELER	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	20.04.2009		☒ Türkçe ☐ İngilizce
	ARAŞTIRICI BROŞÜRÜ			☐ Türkçe ☐ İngilizce
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU ÖRNEĞİ	20.04.2009		☒ Türkçe ☐ İngilizce
	OLGU RAPOR FORMU			☐ Türkçe ☐ İngilizce

KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 08 / 11 Tarih: 30.04.2009 Üniversitemiz Tıp Fakültesi Radyasyon Onkolojisi Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Zafer KOÇAK'ın sorumluluğunda yapılması tasarlanan ve yukarıda başvuru bilgileri verilen Dr. Alaattin ÖZEN'in tez çalışmasının araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeleri araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, araştırmaya ilişkin giderlerin T.Ü. Araştırma Projeleri (TÜBAP) tarafından karşılanması koşuluyla ve araştırmanın TÜBAP onay yazısının Yerel Etik Kurulumuza gönderilmesinden sonra başlatılmasında etik sakınca bulunmadığına mevcudun oybirliği ile karar verilmiştir. Ayrıca araştırma genetik bir çalışma olduğundan araştırıcıların 23.12.2006 tarihli Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik Madde 17(3) gereğince Sağlık Bakanlığı Tedavi Hizmetleri Genel Müdürlüğü tarafından çalışmalarına onay alması gerekmektedir.

ETİK KURUL BİLGİLERİ
ÇALIŞMA ESASI: Helsinki Bildirgesi, Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamalar Kılavuzu
ÜYELER

Ünvanı / Adı / Soyadı Ek Üyeliği	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İlişki (*)	Katılım (**)	İmza
Prof. Dr. Dikmen DÖKMECİ Başkan	Farmakoloji	T.Ü.T.F. Farmakoloji A.D.	K	E	E	
Doç. Dr. Ümit N. BAŞARAN Başkan Yardımcısı	Çocuk Cerrahisi	T.Ü.T.F. Çocuk Cerrahisi A.D.	E	E	E	
Prof.Dr. Betül Biner ORHANER Üye	Çocuk Sağ. ve Hst.	T.Ü.T.F. Çocuk Sağlığı ve Hst. A.D.	K	E	E	İzinli
Doç. Dr. Dilek MEMİŞ Üye	Anesteziyolji	T.Ü.T.F. Anesteziyoloji A.D.	K	E	E	
Doç. Dr. Ömer Nuri PAMUK Üye	Romatoloji	T.Ü.T.F. İç Hst. A.D.	E	E	E	İzinli
Yrd. Doç. Dr. Hakan ERBAŞ Üye	Biyokimya	T.Ü.T.F. Biyokimya A.D.	E	E	E	
Yrd. Doç. Dr. Ufuk USTA Üye	Patoloji	T.Ü.T.F. Patoloji A.D.	E	E	E	
Yrd. Doç. Dr. Esin KARLIKAYA Üye	Deontoloji ve Tıp Tarihi	T.Ü.T.F. Deontoloji ve Tıp Tarihi A.D.	K	E	E	
Ecz. Emine SAKMAN Üye	Eczacı	T.Ü.T.F. Başhekimliği	K	E	E	İzinli
Avukat Barış DEMİREL Üye	Hukuk	T.Ü. Rektörlüğü	E	E	E	katılmadı

* Araştırma ile İlişki
** Toplantıda Bulunma

Prof. Dr. Murat DİKMENGİL
Dekan

EK2

T.C.
SAĞLIK BAKANLIĞI
Tedavi Hizmetleri Genel Müdürlüğü

Sayı : B.10.0THG.0.79.00.07/ 46511 7../12/2009
Konu : Genetik Hastalıklar Alt Bilim Komisyonu
Toplantı Kararı

Doç.Dr.Zafer KOÇAK
Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi
Radyasyon Onkolojisi Anabilim Dalı

EDİRNE

Genetik Hastalıklar Tanı Merkezlerinin, faaliyet, denetim, kalite kontrolü yönünden gerekli standardizasyon ayrıntılarını kapsayan Yönetmeliğe duyulan ihtiyaç doğrultusunda, ülke koşulları göz önüne alınarak hazırlanan "Genetik Hastalıklar Tanı Merkezleri Yönetmeliği" 10 Haziran 1998 tarihli ve 23368 sayılı Resmi Gazete' de yayımlanarak yürürlüğe girmiştir.

Halen yürürlükte olan Klinik Araştırmalar Hakkındaki Yönetmeliğin 17. Maddesinin 3. fıkrası gereği; araştırma yapmak isteyenler her bir araştırma için etik kurulun olumlu görüşünü aldıktan sonra genetik araştırmalar için Genetik Hastalıklar Bilim Komisyonu Alt Kurulu tarafından değerlendirilmiştir.

''Postoperatif adjuvan kemoradyaterapi uygulanan mide adenokarsinom tanılı hastalarda HER-2 Gen Polimorfizmi ve P-21 Gen Mutasyonunun Sağ kalım lokal-bölgesel ve uzak kontrole etkilerinin değerlendirilmesi'' isimli çalışmanın değerlendirilmesinde;

a)Araştırma broşürünün usulüne uygun düzenlendiği, broşürde sunulan bilginin yeterli olduğu

b)Araştırma başlığı ile amacının uygun olduğu,

c)Araştırmanın bir polimorfik çalışma örneği olduğu,

d)Araştırmadan Postoperatif adjuvan kemoradyaterapi uygulanan mide adenokarsinom tanılı hastalarda HER-2 Gen Polimorfizmi ve P-21 Gen Mutasyonunun Sağ kalım lokal-bölgesel ve uzak kontrole etkilerinin değerlendirilmesinin amaçlandığı,

e)Araştırma kapsamında materyal alınacak bireylere ilişkin bilgilendirilmiş gönüllü olur formunun yeterli olduğu ve imza karşılığı onaylatılacağı,

f)Araştırmada Moleküler Genetik araştırma yöntemlerinin uygulanacağı,

g)Araştırmanın bütçesinin olduğu,

h)Araştırmanın tek merkezli olup araştırıcıların çalışmadaki rolünün belirlendiği,

i) Araştırmanın araştırmada yer alan araştırıcıların nitelik ve deneyimine uygun olduğu,

j)Araştırmanın yapılacağı merkezin araştırma için yeterli olduğu,

Verilerinden hareketle projenin sürdürülmesinin uygun olduğuna Komisyonumuzca karar verilmiş olup, bu karar Makamın 09.09.2009 tarih 35267 sayılı Onayı ile uygun görülmüştür.

Bilgilerinizi rica ederim.

Dr.Ş.Serdar MERCAN
Bakan a.
Genel Müdür Yardımcısı V.

Sağlık Bakanlığı Tedavi Hizmetleri Genel Müdürlüğü Mithatpaşa Cad. No:3 (B) Blok 2.Kat Sıhhiye/ANKARA
Tel: 0.312.585 15 46 Fax: 0.312.585 15 41-55-66
Email: tedavi2009@yahoo.com