

ARAŞTIRMA

Emine Büküm¹
Mutlu Karkucak²
Aydın Düzgün¹
Tahsin Yakut²

¹Şevket Yılmaz Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Genel Cerrahi Kliniği, Bursa.

²Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, Bursa.

Yazışma Adresi:
Dr. Tahsin Yakut
Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Tıbbi Genetik AD,
16059 Görükle, Bursa
Tel: 02242954371
E-mail: tahyakut@hotmail.com

Konuralp Tıp Dergisi
e-ISSN1309-3878
konuralptipdergi@duzce.edu.tr
konuralpgeneltip@gmail.com
www.konuralptipdergi.duzce.edu.tr

Mide Kanserli Hastalarda Siklin D1 (G870A) Gen Polimorfizminin Araştırılması

ÖZET

Amaç: Mide kanseri Türkiye’de kadın ve erkeklerde 2. en sık görülen kanserdir. Etyolojide çevresel ve bireysel pek çok etken suçlanırken genetik faktörler ile ilgili de pek çok inceleme yapılmıştır. Hücre siklusunda önemli rol oynayan siklinler üzerinde durulmuş, özellikle siklin D1 gen polimorfizminin bazı kanserlerin gelişiminde rolü gösterilmiştir. Bu çalışmada da toplumumuzda siklin D1 gen polimorfizmi ile mide kanseri arasındaki ilişki araştırmayı amaçladık.

Gereç ve Yöntem: Çalışma Bursa Yüksek İhtisas Eğitim ve Araştırma Hastanesi Genel Cerrahi kliniğine 2005–2010 yılları arasında başvuran mide kanseri tanısı konmuş 57 hasta ve sağlıklı bireylerin oluşturduğu 59 kişilik kontrol grubu ile yapıldı. Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Ana Bilim Dalı’nda PCR-RFLP yöntemi ile genotip tayini yapıldı.

Bulgular: Hasta grubunda GG genotipi 16 (%28), AG genotipi 28 (%49) ve AA genotipi 13 (%23) olarak saptandı. Kontrol grubunda GG genotipi 11 (%19), AG genotipi 31 (%54) ve AA genotipi 17 (%29) olarak bulundu. GG, AG ve AA genotipleri açısından hasta grubu ile kontrol grubu karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı. Hasta grubunda G alleli 60 (%53), A alleli 54 (%47), kontrol grubunda ise G alleli 51 (%45), A alleli 66 (%55) olarak bulundu.

Sonuç: Bu çalışma bildiğimiz kadarıyla Türk toplumunda mide kanseri ile siklin D1 gen polimorfizmini araştıran ilk çalışmadır. Elde ettiğimiz sonuçlar hasta ve kontrol gruplarımızın temsil ettiği toplum kesitinde mide kanseri ile siklin D1 gen polimorfizmi arasında bir ilişki olmadığını göstermektedir.

Anahtar kelimeler: Polimorfizm, Mide Kanseri, Siklin D1 Geni.

Investigation of Cyclin D1 (G870A) Gene Polymorphisms in Patients with Gastric Carcinoma

ABSTRACT

Objectives: Gastric carcinoma is the second most common cancer in both man and woman in Turkey. Many environmental and individual etiological factors have been investigated including genetic factors. Cyclins which have an important role in cell cycle have been studied, particularly cyclin D1 gene polymorphism has been found to have a role in some cancers. In this study, association between cyclin D1 gene polymorphism and gastric carcinoma was searched in our community.

Materials and Methods: Fifty-eight gastric carcinoma patients who had been admitted at Bursa Yüksek İhtisas Hospital General Surgery Department between 2005 and 2010 and 59 healthy individuals have been included in the study. Samples have been subjected to genetic analysis by PCR-RFLP method in Medical Genetics Department laboratory at Uludag University.

Results: GG genotype was found in 16 (28%), AG genotype in 28 (49%), AA genotype in 13 (%23) in patient group. In control group, numbers was 11 (19%), 31 (54%) and 17 (29%) respectively. The difference of GG, AG and AA genotypes between patient and control groups was not statistically significant. G allele was found 60 (53%) and an allele 54 (47%) in patient group and 51 (45%), and 66 (55%) in control group.

Conclusion: Our knowledge, this study is the first to evaluate the relation between gastric carcinoma and cyclin D1 polymorphism in Turkish population. Our results show that there is no any association between gastric carcinoma and cyclin D1 polymorphism in the community which is represented by our study and control groups.

Key Words: Polymorphism, Gastric Carcinoma, Cyclin D1 Gene.

GİRİŞ

Kanser, dünyada ve Türkiye’de kardiyovasküler hastalıklardan sonra en önemli 2. ölüm sebebidir. Sindirim sistemi kanserleri arasında mortalitesi en yüksek olan kanser türü mide kanseridir. Agresif bir tümör olarak bilinen mide kanseri dünyada görülme sıklığı açısından erkeklerde en sık 2. kadınlarda ise en sık 4. kanserdir. Türkiye’de ise 2. en sık görülen kanserdir. Erken evrede tanı konduğunda sağ kalım oranı %90–100 iken ileri evrelerde bu oran %15-25’lere düşmektedir (1,2).

Mide kanseri, çevresel ve genetik faktörleri içeren birçok etyolojisi olan karmaşık bir hastalıktır. Mide karsinogenezi, çok adımlı bir süreçtir. Normal mide mukozasından kronik gastrit, prekanseröz lezyonları ve erken mide kanserine kadar ilerlemektedir (3,4). İlerleme sırasında, mide epitel hücre proliferasyonu ve apoptoz arasındaki denge yavaş yavaş değişir. Buna ek olarak, önceki çalışmalarda bazı genlerin tek nükleotid polimorfizmlerinin bireysel yatkınlık ile mide kanseri gelişimi arasında ilişki olduğu belirtilmiştir (5,6).

Hücre siklusunda G1’den S fazına geçiş kontrol noktasıdır ve siklin proteinleri ile denetlenir. Döngüde rol alan pek çok onkogen ve tümör süpresör gen G1 kontrol noktasındaki hatalar ile ilişkilidir(7). G1 fazından S fazına hücre döngüsünün düzenlenmesi için önemli bir protein olan siklin D1 (CCND1), bir onkogen olarak kabul edilmiştir. Çünkü proteinin aşırı ekspresyonu G1 fazını hızlandırır ve böylece hücre çoğalması ile karsinogenez riskinde artışa neden olur (8,9).

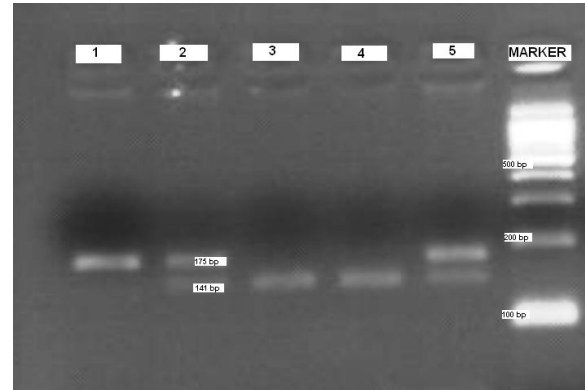
CCND1 geninin 4. ekzonda kodon 242 (G870A) polimorfizm vardır ve önceki yapılan çalışmalarda, bu polimorfizm ile bazı kanserlerin (kolorektal, mesane, akciğer, baş ve boyun, prostat, özofagus) gelişimi arasında ilişkili olduğunu göstermiştir (6,10). Ayrıca bir polimorfik genin alel sıklığı coğrafi ve etnik olarak değişebilmektedir. Siklin D1 gen polimorfizmi ile mide kanseri gelişimi arasındaki ilişkinin ırklara göre araştırıldığı bir meta-analizde Asya ırkları (Çin, Japon ve Kore) kendi aralarında tutarlı olup Kafkas ırkları ile aralarında alel sıklığında farklılıklar bulunmuştur (11). Türk toplumunda mide kanserinde gen polimorfizm çalışmaları yapılmış olup bildiğimiz kadarıyla siklin D1 polimorfizmi ile mide kanseri arasında ilişkiyi araştıran çalışma yoktur. Bu çalışmamızda, bu polimorfizmin mide kanseri gelişimi ile ilişkisini araştırarak türk toplumundaki alel sıklığını bulmayı amaçladık.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmaya Bursa Yüksek İhtisas Eğitim ve Araştırma Hastanesi Genel Cerrahi Kliniğine 2005–2010 yılları arasında başvuran mide kanserli 57 hasta dahil edilmiştir. Kontrol grubuna ise herhangi bir kanser hikâyesi olmayan gönüllü 59 kişi seçilmiştir. Kişilerin yaş, cinsiyet, genotip, patoloji

ve kanser yerleşim yerleri dahil olmak üzere demografik bilgileri kayıt edilmiştir.

Çalışmaya katılan tüm bireyler çalışma hakkında sözel olarak ve ayrıntılı onam formları ile bilgilendirildi ve onamı alındı. Olgu ve kontrol gruplarındaki bireylerden 2 cc kan örnekleri alındı. Bu örneklerden Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı’nda DNA izolasyonları yapıldı. Siklin D1 genindeki A870G polimorfizmi, polimeraz zincir reaksiyonu-restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi (polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism=PCR-RFLP) yöntemi ile uygulandı. Siklin D1 genindeki A870G polimorfizmi için forward 5’-AGTTCATTTCCAATCCGCC -3’ ve reverse 5’-TTTCCGTGGCACTAGGTGTC -3’ primerleri kullanıldı. Oluşan ürünlerde Siklin D1 genindeki A870G polimorfizmi belirlemek için Msp I (Bioron, Germany) enzimi kullanıldı. Enzim kesimi sonrası %4’lük agaroz jelde yapılan analizde, Siklin D1 genine ait 212 bp’lik PCR ürününden 175 bp ve 37 bp iki ayrı ürün oluşursa AA genotipi, 175 bp,141 bp, 37 bp ve 34 bp dört ayrı ürün oluşursa AG genotipi ve 141 bp, 37 bp ve 34 bp şeklinde olursa ise GG genotipi olarak belirlendi. Siklin D1 genindeki G870A polimorfizminin agaroz jel görüntüsü şekilde görülmektedir (Şekil 1).



Şekil 1. Siklin D1 genindeki A870G polimorfizmi PCR-RFLP ürünlerinin Msp I enzim kesimi sonrası %4 agaroz jeldeki görüntüsü. Son kuyucuk 100 bp DNA ladder (Marker), 1 nolu kuyucuk A/A genotipine, 2 ve 5 nolu kuyucuklar A/G genotipine, 3 ve 4 nolu kuyucuk ise G/G genotipine sahip bireyleri göstermektedir.

İstatistiksel değerlendirme için SPSS 17.0 paket programı kullanılmıştır. Gruplar arası karşılaştırmada sürekli nitelikteki veriler için T testi, kategorik veriler için ise Ki-kare ve Fisher’in Kesin Ki-kare testi yapıldı. Betimleyici değer olarak ortalama ± standart sapma ve oranlar verildi. P değeri 0.05 düzeyi anlamlı seviye olarak kabul edildi.

BULGULAR

Çalışmaya katılan bireyler 57 hasta ve 59 kontrol olmak üzere 116 kişiden oluşuyordu. Hasta grubunun 18'i (%31.6) kadın, 39'u (%68.4) erkekti. Kontrol grubu ise 26 (%44.1) kadın ve 33 (%55.9) erkekten oluşuyordu. Hasta ve kontrol grubu arasında hastaların cinsiyetleri açısından anlamlı bir farklılık yoktu ($p=0.166$). Hasta grubu kadın/erkek oranı 0.46 (18/39) olarak bulundu. Mide kanserli hasta grubunda, G/G genotipi 16 (%28), A/G genotipi 28 (%49) ve A/A genotipi ise 13 (%23) olguda saptandı. Kontrol grubunda incelendiğinde, G/G genotipi 11 (%19), G/A genotipi 31 (%54) ve A/A genotipi ise 17 (%29) olguda bulundu. Hasta ve kontrol grubu karşılaştırıldığında grupların dağılımları bakımından anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. Hasta grubunun G alel sıklığı 60 (%53), A alel sıklığı ise 54 (%47) idi. Kontrol grubunun G alel sıklığı 51 (%45), A alel sıklığı ise 66 (%55) idi (Tablo 1). A alel sıklığı hasta grubunda kontrol grubuna göre daha az çıkmasına rağmen istatistiksel olarak bir fark gözlenmedi (Tablo 1) ($p>0.05$).

Tablo 1. Genotip ve alel sıklığı dağılımı

	Hasta grubu n(%)	Kontrol grubu n(%)	p
Kişi sayısı	57	59	-
G/G genotipi	16 (28)	11 (19)	>0.05
A/G genotipi	28 (49)	31 (54)	
A/A genotipi	13 (23)	17 (29)	
G alel sıklığı	60 (53)	51 (45)	>0.05
A alel sıklığı	54 (47)	66 (55)	

Tablo 2. Genotiplerin histolojilere göre dağılımı

Diferansiye	Genotip			Toplam n(%)
	G/G n(%)	G/A n(%)	A/A n(%)	
İyi	2 (12.5)	3 (10.7)	2 (16.7)	7 (12.5)
Orta	4 (25.0)	8 (28.6)	4 (33.3)	16 (28.6)
Kötü	7 (43.8)	11 (39.3)	4 (33.3)	22 (39.3)
Diğer	3 (18.8)	6 (21.4)	2 (16.7)	11 (19.6)
Toplam	16 (100)	28 (100)	12 (100)	56 (100)

Hasta grubu kendi içinde histoloji ve yerleşim yeri açısından değerlendirildi. Histolojik olarak iyi diferansiye, orta diferansiye, kötü diferansiye ve diğerleri olarak 4 gruba ayrıldı. İyi diferansiye grubunda 7 (%12.5) hasta, orta diferansiye grupta 16 (%28.6) hasta, kötü diferansiye grupta 22

(%39.3) hasta ve sınıflandırılmayan 4. grupta ise 11 (%19) hasta mevcuttu (Tablo 2). Hasta grubu yerleşim yeri olarak ise proksimal, distal ve korpus olarak sınıflandı. Hastaların 10'i (%17.9) proksimal yerleşimli, 30'i (%53.6) distal yerleşimli ve 16'i (%28.6) ise korpus yerleşimliydi (Tablo 3) Hastaların histolojileri ve yerleşim yerleri ile genotipleri ve alel sıklıkları açısından incelendiğinde bir ilişkisi gözlenmedi ($p>0.05$).

Tablo 3. Genotiplerin yerleşim yerine göre dağılımı

Yerleşim	Genotip			Toplam n(%)
	G/G n(%)	G/A n(%)	A/A n(%)	
Proksimal	3 (18.8)	4 (14.3)	3 (25.0)	10 (17.9)
Distal	6 (37.5)	17 (60.7)	7 (58.3)	30 (53.6)
Diğer	7 (43.8)	7 (25.0)	2 (16.7)	6 (28.6)
Toplam	16 (100)	28 (100)	12 (100)	56 (100)

TARTIŞMA

Siklin D1 gen polimorfizmlerinin kanser gelişiminde etkisi tam olarak bilinmemektedir. Literatürlerde endometriyum kanseri, renal hücreli kanser (RCC), akciğer kanseri ve ilerlemiş kolorektal kanser gelişimi ile Siklin D1 gen polimorfizmi arasında anlamlı bir ilişki olduğu bildirilmiştir (12-15). Ancak bu sonuçların aksine siklin D1 gen polimorfizminin meme kanseri, squamoz hücreli özofagus kanseri ve mesane kanseri ile ilişkisinin olmadığını bildiren çalışmalar da mevcuttur(16-21). Biz de bu çalışmamızda Türk toplumunda siklin D1 polimorfizmi ile mide kanseri arasındaki ilişkiyi araştırmayı amaçladık. Çalışmamızın sonuçları incelendiğinde çalışma grubumuz ile kontrol grubu arasında siklin D1 genotipi farklılık göstermemektedir. Bu veriler siklin D1 polimorfizminin çalışma grubumuzu oluşturan bireylerin yansıttığı toplumda mide kanseri gelişiminde rolü olmadığını düşündürmektedir. Bizim çalışmamızda mide kanserli hastalar tümör lokalizasyonu ve diferansiyasyonuna göre alt gruplara incelendiğinde ise gerek bu alt gruplar arasında gerekse hasta grubu ile kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır. Mide kanserinde siklin D1 gen polimorfizminin araştırıldığı çalışma sayısı sınırlıdır. Gedert ve ark. (22) 2005'te Almanya'da yaptığı siklin D1 ve p16 gen polimorfizminin mide ve özofagus kanseri ile ilişkisini araştıran 286 mide adenokanserli hastanın bulunduğu bir çalışmada siklin D1 gen polimorfizmi ile mide kanseri arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır. Kuzey Çin toplumu için yapılan bir çalışmada da yine özofagus ve mide kardiyak kanseri ile siklin D1 ilişkisi incelenmiştir. Sigara içen ve içmeyen olarak iki gruba ayrılan

bireylerden sigara içenlerde A/A genotipi saptananlarda kanser gelişim riski 2 kat artmış bulunurken; G/G ve G/A genotipi saptananlarda bir fark gözlenmemiş, sigara içmeyen grupta ise siklin D1 polimorfizmi sağlıklı bireylerden oluşan kontrol grubu ile benzer bulunmuştur (23).

Alel sıklıkları etnik ve coğrafik olarak değişiklik gösterebilmektedir. Bizim çalışmamızda kontrol grubunda G aleli %45 ve A aleli ise %55 olarak bulundu. Akız ve ark.(24) Hepatoselüler kanserli hastalarda yapılan çalışmada kontrol grubunda G aleli %58 ve A aleli ise %42 olarak, Yaylim-Eraltan ark. (25) kolorektal kanserli hastalarda yapılan çalışmada kontrol grubunda ise G aleli %51 ve A aleli ise %49 olarak bulunmuştur. Çalışmalar arasında farklılıklar alel sıklıkları açısından çok büyük farklılık gözlenmemektedir. Polimorfizm çalışmaları kanser tedavisini yönlendirebilmesi açısından da önem taşımaktadır. Genetik polimorfizm ilaçların insan vücudunda göstereceği etki ve yan etkinin oluşmasında rol

oynayabilmektedir. Stocker ve ark. (26) Siklin D1 ve IL-1 reseptör antagonisti polimorfizmlerinin mide kanserinde neoadjuvan tedavi ile ilişkisini araştıran 178 vakalık çalışmasında siklin D1 gen polimorfizminin neoadjuvan tedaviye klinik yanıtla ilişkisi anlamlı bulunmuştur (p=0.044). Bu çalışmada G aleli kötü prognozla ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bu sonuç siklin D1 polimorfizmi araştırmalarının riskli grupların belirlenmesi yanında tedavi stratejilerinin yönlendirilmesinde de rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Genel olarak kemoterapiye dirençli bir tümör olarak kabul edilen mide kanserinde polimorfizme ilgili yapılacak daha detaylı çalışmalar adjuvan ve neoadjuvan tedavide yeni ufuklar açabilir. Sonuç olarak çalışmamızda Türk toplumunda mide kanseri ile siklin D1 G870A polimorfizmi arasında anlamlı bir ilişki bulunmamış olup daha geniş vaka sayılı çalışmalar yapılarak alt gruplar incelenerek bu çalışma desteklenmelidir.

KAYNAKLAR

1. Winawer SJ. Gastric cancer: Worldwide burden and prevention opportunities. *Chin J Dig Dis.* 2005;6(3):107-9.
2. Tuncer AM. Türkiye'de Kanser Kontrolü. Ankara: Onur Matbaacılık, 2007.
3. Stadtländer CT, Waterbor JW. Molecular epidemiology pathogenesis and prevention of gastric cancer. *Carcinogenesis.* 1999; 20(12):2195-8.
4. Correa P. Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process-First American Cancer Society Award Lecture on Cancer Epidemiology and Prevention. *Cancer Res.* 1992;52(24):6735-40.
5. Correa P, Piazuelo MB, Camargo MC. Future of gastric cancer prevention. *Gastric Cancer.* 2004;7(1):9-16.
6. Jia A, Gong J, Li Y, et al. GG genotype of cyclin D1 G870A polymorphism is associated with non-cardiac gastric cancer in a high-risk region of China. *Scand J Gastroenterol.* 2008;43(11):1353-9.
7. Massagué J. G1 cell-cycle control and cancer. *Nature.* 2004;432(7015):298-306.
8. Arber N, Gammon MD, Hibshoosh H, et al. Overexpression of cyclin D1 occurs in both squamous carcinomas and adenocarcinomas of the esophagus and in adenocarcinomas of the stomach. *Hum Pathol.* 1999; 30(9):1087-92.
9. Oda K, Okabayashi T, Kataoka M, et al. Evaluation of cyclin D1 mRNA expression in gastric and colorectal cancers. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol.* 1999;105(3):237-52.
10. Knudsen KE, Alan Diehl J, Haiman CA, et al. Cyclin D1: polymorphism, aberrant splicing and cancer risk. *Oncogene.* 2006; 25(11):1620-8.
11. Loh M, Koh KX, Yeo BH, et al. Meta-analysis of genetic polymorphisms and gastric cancer risk: variability in associations according to race. *Eur J Cancer.* 2009;45(14):2562-8.
12. Liu W, Zhu E, Wang R, et al. Cyclin D1 gene polymorphism, A870G, is associated with an increased risk of salivary gland tumors in the Chinese population. *Cancer Epidemiol.* 2011; 35(4):e12-7.
13. Kang S, Kim JW, Park NH, et al. Cyclin D1 polymorphism and the risk of endometrial cancer. *Gynecol Oncol.* 2005; 97(2):431-5.
14. Yu J, Habuchi T, Tsuchiya N, et al. Association of the cyclin D1 gene G870A polymorphism with susceptibility to sporadic renal cell carcinoma. *J Urol.* 2004; 172(6 Pt 1):2410-3.
15. Hong Y, Eu KW, Seow-Choen F, et al. GG genotype of cyclin D1 G870A polymorphism is associated with increased risk and advanced colorectal cancer in patients in Singapore. *Eur J Cancer.* 2005;41(7):1037-44.
16. Krippel P, Langsenlehner U, Renner W, et al. The 870G > A polymorphism of the cyclin D1 gene is not associated with breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2003; 82(3):165-8.
17. Grieu F, Malaney S, Ward R, et al. Lack of association between CCND1 G870A polymorphism and the risk of breast and colorectal cancers. *Anticancer Res.* 2003;23(5b):4257-9.
18. Yu C, Lu W, Tan W, et al. Lack of association between CCND1 G870A polymorphism and risk of esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2003;12(2):176.

19. Sanyal S, Festa F, Sakano S, et al. Polymorphisms in DNA repair and metabolic genes in bladder cancer. *Carcinogenesis*. 2004;25(5):729-34.
20. Cortessis VK, Siegmund K, Xue S, et al. A case-control study of cyclin D1 CCND1 870A > G polymorphism and bladder cancer. *Carcinogenesis*. 2003;24(10):1645-50.
21. Zhang YJ, Chen SY, Chen CJ, et al. Polymorphisms in cyclin D1 gene and hepatocellular carcinoma. *Mol Carcinog*. 2002;33(2):125-9.
22. Geddert H, Kiel S, Zotz RB, et al. Polymorphism of p16 INK4A and cyclin D1 in adenocarcinomas of the upper gastrointestinal tract. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2005;131(12):803-8.
23. Zhang J, Li Y, Wang R, et al. Association of cyclin D1 (G870A) polymorphism with susceptibility to esophageal and gastric cardiac carcinoma in a northern Chinese population. *Int J Cancer* 2003;105(2):281-4.
24. Akkiz H, Bayram S, Bekar A, et al. Cyclin D1 G870A polymorphism is associated with an increased risk of hepatocellular carcinoma in the Turkish population: case-control study. *Cancer Epidemiol*. 2010; 34(3):298-302.
25. Yaylim-Eraltan I, Arikan S, Yildiz Y, et al. The influence of cyclin D1 A870G polymorphism on colorectal cancer risk and prognosis in a Turkish population. *Anticancer Res*. 2010;30(7):2875-80.
26. Stocker G, Ott K, Henningsen N, et al. CyclinD1 and interleukin-1 receptor antagonist polymorphisms are associated with prognosis in neoadjuvant-treated gastric carcinoma. *Eur J Cancer*. 2009;45(18):3326-35.