

**RAHİM AĞZI, YUMURTALIK VE RAHİM KANSERLİ OLGULARDA
p53 72. KODON VE *MTHFR* C677T POLİMORFİZMİNİN
POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (PZR) VE RESTRİKSİYON
PARÇA UZUNLUK POLİMORFİZMİ (RFLP) ANALİZİ İLE
ARAŞTIRILMASI**

Yeter Ceren ÇİMEN

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**MAYIS 2010
ANKARA**

Yeter Ceren ÇİMEN tarafından hazırlanan RAHİM AĞZI, YUMURTALIK VE RAHİM KANSERLİ OLGULARDA *p53* 72. KODON VE *MTHFR* C677T POLİMORFİZMİNİN POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (PZR) VE RESTRİKSİYON PARÇA UZUNLUK POLİMORFİZMİ (RFLP) ANALİZİ İLE ARAŞTIRILMASI adlı bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. Leyla AÇIK

Tez Danışmanı, Biyoloji Anabilim Dalı

Bu çalışma, jürimiz tarafından oy birliği ile Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Sibel SÜMER

Biyoloji Anabilim Dalı, Hacettepe Üniversitesi

Prof. Dr. Leyla AÇIK

Biyoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Doç. Dr. Barbaros BALABANLI

Biyoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Tarih: 20/05/2010

Bu tez ile G.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu Yüksek Lisans derecesini onamıştır.

Prof. Dr. Bilal TOKLU

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Yeter Ceren ÇİMEN

**RAHİM AĞZI, YUMURTALIK VE RAHİM KANSERLİ OLGULARDA
p53 72. KODON VE MTHFR C677T POLİMORFİZMİNİN POLİMERAZ
ZİNCİR REAKSİYONU (PZR) VE RESTRİKSİYON PARÇA UZUNLUK
POLİMORFİZMİ (RFLP) ANALİZİ İLE ARAŞTIRILMASI
(Yüksek Lisans Tezi)**

Yeter Ceren ÇİMEN

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

Mayıs 2010

ÖZET

Bazı *p53* polimorfizmleri artan kanser geliştirme riskiyle ilişkilidir. *p53*'ün yaygın bir polimorfizmi, 72. kodonda gerçekleşmektedir. Bu polimorfizmin ya bir prolin ya da bir arjinin bölgesi içeren değişmiş bir proteinle sonuçlanmaktadır. *MTHFR*, 5,10-metilentetrahidrofolat redüktaz proteinini kodlar. 5-metiltetrahidrofolat, plazma folatının birincil formudur. *MTHFR* folat metabolizması, DNA sentezi ve tamirinde önemli bir role sahiptir. *MTHFR* C677T polimorfizminde alanin yerine valin aminoasiti kodlanmaktadır. Bu çalışmada rahim ağzı (serviks), yumurtalık (over) ve rahim (endometriyum) kanserlerinde *p53* 72. kodon ve *MTHFR* C677T 4. ekzon polimorfizmi araştırıldı. Çalışmaya endometriyum, serviks ve over kanserli 106 hasta ve 101 sağlıklı birey dahil edilmiştir. Genomik DNA periferal kandan izole edildi. *p53* ve *MTHFR* geninde mutasyona uğrayan 4. ekzon Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile çoğaltıldı. *Bst*UI enzimi *p53* mutasyonlarını, *Hinf*I enzimi ise *MTHFR* mutasyonları belirlemek amacıyla kullanıldı. Sonuç olarak, serviks kanseri ve sağlıklı bireyler arasında *p53* geni 72. kodon polimorfizminde Arg/Pro heterozigot genotipinin görülme sıklığında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark tespit edilmemiştir. Ancak, Arg/Arg genotipinin görülme oranı hastalarda

kontrol grubuna göre daha düşükken Pro/Pro genotipinin görülme oranı hastalarda daha yüksektir. Endometrium kanserinde ise, kanserli hastalar ve sağlıklı bireyler arasında Arg/Arg genotipinde istatistiksel açıdan anlamlı bir fark tespit edilirken, Arg/Pro ve Pro/Pro genotipinde istatistiksel açıdan anlamlı bir fark tespit edilememiştir. *MTHFR* geni C677T (Ala/Val) polimorfizmi serviks ve endometrium kanserli hastalar ve sağlıklı bireylerde, 677CC homozigot normal ve 677CT heterozigot mutant genotipleri arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunamamıştır. 677TT homozigot genotipinde ise istatistiksel açıdan anlamlı bir fark tespit edilmiştir. *p53* geni 72. kodon ve *MTHFR* C677T polimorfizmi için over kanserli hastalarla sağlıklı bireyler karşılaştırıldığında tüm genotiplerde, istatistiksel açıdan anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Bu çalışmanın sonuçlarına göre *p53* 72. kodon ve *MTHFR* C677T polimorfizminin serviks, endometrium, over kanserleri riski için önemli bir belirleyici olabilir fakat karsinogenez için yeterli değildir.

Bilim kodu : 203.1.104

Anahtar Kelimeler: Serviks kanseri, endometriyum kanseri, over kanseri, *p53* 72. kodon, *MTHFR*

Sayfa adedi : 99

Tez yöneticisi : Prof. Dr. Leyla AÇIK

**AN INVESTIGATION WITH POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)
AND RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM (RFLP)
ANALYSIS *p53* CODON 72 AND *MTHFR* C677T POLYMORPHISMS IN
CERVIX, OVER AND ENDOMETRIUM CARCINOMAS
(M. Sc. Thesis)**

Yeter Ceren ÇİMEN

**GAZİ ÜNİVERSİTY
INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY
May 2010**

ABSTRACT

Some of *p53* polymorphisms have been associated with increased risk of cancer development. A common polymorphism of *p53* at codon 72 results in either a variant protein with a proline residue or an arginine residue. *MTHFR* encodes a 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase protein. 5-methyltetrahydrofolate is the primary form of plasma folate. *MTHFR* folate metabolism has a very important role in DNA synthesis and repair. C677T polymorphism is encoded amino acid valine instead of alanine. In this study we investigated *p53* codon 72 and *MTHFR* exon 4 polymorphisms in cervix, over and endometrial cancers. The study composed of 106 cervix, over and endometrial cancer patients and 101 healthy control individual. Genomic DNA was isolated from peripheral whole blood in patient group and control group. Exon 4 of *p53* and *MTHFR* genes which frequently mutated in cervix, over and endometrial cancers was amplified from 207 samples. *Bst*UI restriction enzyme was used to determine *p53* gene mutations and *Hinf*I enzyme was used to determine *MTHFR* mutations for PCR products. As a result, *p53* gene codon 72 polymorphism between cervical cancer patients and healthy individuals was observed statistically significant difference in Arg/Pro heterozygous genotype. However,

the Arg/Arg genotype incidence was lower in patients than in the control group Pro/Pro genotype incidence is higher in patients. MTHFR gene C677T (Ala/Val) polymorphism in cervical and endometrial cancer patients and control group, 677CC homozygous normal and 677CT mutant heterozygous genotypes was found statistically significant difference. 677TT homozygous genotype was found statistically significant *p53* gene codon 72 and MTHFR C677T polymorphism in ovarian cancer patients compared to healthy individuals, all genotypes, a statistically significant difference was observed. Based on the results of this study, we suggest that *p53* codon 72 polymorphism and MTHFR C677T polymorphism may be important determinant for cervix, over and endometrium cancer but it is not sufficient for carcinogenesis.

Science code : 203.1.104

Key words : cervix cancer, over cancer, endometrial cancer, *p53* codon 72, MTHFR

Page number : 99

Adviser : Prof. Dr. Leyla AÇIK

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım süresince sahip olduğu bilgi birikimi ve görüşleriyle beni yönlendiren, her zaman desteğiyle yanımda olan değerli hocam ve tez danışmanım Prof. Dr. Leyla AÇIK’a,

Bu tez çalışması için gerekli olan materyallerin sağlanması konusundaki yardımlarından dolayı Zekai Tahir Burak Kadın Sağlığı Eğitim ve Araştırma Hastanesi Onkoloji Bölümü Klinik şefi Doç. Dr. Tayfun Güngör’e,

Çalışmalarım boyunca ilgi ve dostluklarını her zaman hissettiğim değerli arkadaşlarıma,

Beni yetiştiren, maddi ve manevi destekleriyle her zaman yanımda olan sevgili anneme, babama, ağabeyime ve ablama,

En içten dileklerimle teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	IV
ABSTRACT	VI
TEŞEKKÜR	VIII
İÇİNDEKİLER	IX
ÇİZELGELERİN LİSTESİ	XII
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	XIII
SİMGELER VE KISALTMALAR	XIV
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER	3
2.1. Kanser	3
2.1.1. Proto-onkogenler ve onkogenler	8
2.1.2. Tümör baskılayıcı genler	13
2.1.3. Hücre döngüsü ve kanser	15
2.2. Serviks (Rahim ağzı)	19
2.2.1. Serviks anatomisi, embriyolojisi ve histolojisi	19
2.2.2. Serviks kanseri	20
2.3. Over (Yumurtalık)	26
2.3.1. Over anatomisi, embriyolojisi ve histolojisi	26
2.3.2. Over kanseri	26
2.4. Endometrium (Rahim)	29
2.4.1. Endometrium anatomisi, embriyolojisi ve histolojisi	29

	Sayfa
2.4.2. Endometrium kanseri.....	30
2.5. <i>p53</i> geni	33
2.5.1. <i>p53</i> geninde görülen polimorfizmler	35
2.6. MetilentetrahidrofolatRedüktaz (MTHFR)	36
2.6.1. MTHFR enzimi	36
2.6.2. <i>MTHFR</i> geni	37
2.6.3. <i>MTHFR</i> geni C677T polimorfizmi.....	38
2.6.4. MTHFR C677T ve kanser	39
2.7. Moleküler Teknikler	40
2.7.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)	40
2.7.2. Agaroz Jel Elektroforezi.....	41
2.7.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu-Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi	41
2.7.4. DNA Dizi Analizi.....	42
3. MATERYAL VE METOT	45
3.1. Materyal.....	45
3.1.1. İncelenen kan örneklerinin toplanması.....	45
3.1.2. Tampon ve çözeltiler	46
3.2. Metot.....	49
3.2.1. Periferik kandan DNA izolasyonu.....	49
3.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu	50
3.2.3. Agaroz jel elektroforezi	51
3.2.4. Restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi	51

	Sayfa
3.2.5. DNA dizi analizi	52
3.2.6. İstatistiksel analiz	52
4. DENEYSEL BULGULAR	53
4.1. <i>p53</i> genine ait RFLP ve Dizi Analizi sonuçları.....	61
4.2. <i>MTHFR</i> C677T Polimorfizmine ait RFLP sonuçları	67
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	71
KAYNAKLAR	77
EKLER.....	91
EK-1 Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Yerel Etik Kurulunun tez projesi hakkındaki kararı	92
EK-2 Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Yerel Etik Kurulu tarafından onaylı bilgilendirilmiş gönüllü olur formu	93
ÖZGEÇMİŞ	99

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. FIGO'nun serviks kanseri için klinik evreleme sistemi.....	24
Çizelge 2.2. FIGO'nun over kanseri klinik evrelemesi.....	28
Çizelge 2.3 Endometriyum kanserlerinin risk faktörleri.....	31
Çizelge 2.4. FIGO'nun endometriyum kanseri cerrahi evrelemesi.....	33
Çizelge 3.1. <i>p53</i> geninin 4. ekzon bölgesinin belirlenmesi için kullanılan primerler.....	47
Çizelge 3.2. MTHFR geni 4. ekzon bölgesinin belirlenmesi için kullanılan primerler.....	47
Çizelge 3.3. MTHFR geninin 4. ekzon bölgesinin çoğaltılması için kullanılan PZR programı.....	50
Çizelge 3.4. <i>p53</i> geni 72. kodon 4. ekzon bölgesinin çoğaltılması için kullanılan PZR programı.....	50
Çizelge 4.1. Çalışmamız kapsamında incelemiş olduğumuz kanserli ve sağlıklı bireylerin listesi ve mutasyon tipleri.....	55
Çizelge 4.2. <i>p53</i> geninin PZR-RFLP yöntemiyle BstUI enzim kesimi sonuçlarının kanser tiplerinde ve sağlıklı bireylerde dağılımları.....	63
Çizelge 4.3. <i>p53</i> geni kanserli hasta ve sağlıklı bireyler arasındaki istatistiksel analiz sonuçları.....	63
Çizelge 4.4. MTHFR geni PZR-RFLP yöntemiyle BstUI enzim kesim sonuçlarının kanser tiplerinde ve sağlıklı bireylerde dağılımları.....	69
Çizelge 4.5. MTHFR geni kanserli hasta ve sağlıklı bireyler arasındaki istatistiksel analiz sonuçları.....	69

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Kanser oluşumu ve metastaz.....	6
Şekil 2.2. Hücre döngüsü.....	16
Şekil 2.3. Apoptoz ve nekroz.....	19
Şekil 2.4. Serviksin vücuttaki konumu.....	20
Şekil 2.5. HPV enfeksiyonu ve serviks kanserine geçiş.....	22
Şekil 2.6. Over, endometriyum ve serviksin konumları.....	29
Şekil 2.7. 17. kromozomda <i>p53</i> geninin yeri.....	34
Şekil 2.8. B-12 metabolik reaksiyonu.....	37
Şekil 2.9. 1. Kromozomda <i>MTHFR</i> geninin lokalizasyonu.....	38
Şekil 4.1. <i>p53</i> geni PZR-RFLP analizi sonucu oluşan genotipler.....	53
Şekil 4.2. <i>MTHFR</i> geni PZR-RFLP analizi sonucu oluşan genotipler.....	54
Şekil 4.3. <i>p53</i> PZR ürünü agaroz jel görüntüsü.....	61
Şekil 4.4. <i>p53</i> 72. kodon polimorfizminin <i>BstU1</i> enzimi ile kesildikten sonra agaroz jelde görüntüsü.	62
Şekil 4.5. 3 numaralı olguya ait BLAST analizi görüntüsü.....	66
Şekil 4.6. <i>MTHFR</i> PZR ürünü agaroz jel görüntüsü.....	67
Şekil 4.7. <i>MTHFR</i> geni <i>Hinfi</i> enzimi ile kesildikten sonra agaroz jelde görüntüsü.	68

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış bazı simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklama
bç	Baz çifti
°C	Santigrad derece
gr	Gram
kDA	Kilodalton
Kb	Kilobaz
L	Litre
M	Molar
mM	Milimolar
mg	Miligram
µg	Mikrogram
ml	Mililitre
µl	Mikrolitre
rpm	Dakikadaki devir sayısı
UV	Ultraviyole
%	Yüzde

Kısaltmalar	Açıklama
Ala	Alanin
Arg	Arjinin
Cdc	Siklin bağımlı kinaz
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksiribonükleozit trifosfat
ddNTP	Dideoksi nükleotid trifosfat
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
EGF	Epidermal büyüme faktörü
FIGO	Uluslararası Jinekoloji ve Obstetrik Federasyonu
<i>FHIT</i>	Fragile histidine triad geni
HPV	Human Papilloma Virüs
HSV	Herpes Simpleks Virüsü
<i>MTHFR</i> geni	Metilentetrahidrofolat redüktaz geni
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
Pro	Prolin
<i>PTEN</i>	Phosphatase and tensin homolog geni
RFLP	Restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi
RSV	Raus Sarkoma Virüsü
RTK	Reseptör tirozin kinaz
<i>Rb</i> geni	<i>Retinoblastoma</i> geni
TAE	Tris-Asetat-EDTA
Val	Valin

1. GİRİŞ

Kanser, hücre proliferasyonunun bozulmasıyla ortaya çıkan bir olgudur [1]. Kanser genetik ile bağlantılı olabileceği fikri 20. yüzyıl başlarında ortaya atılmış ve bu fikir kanser araştırmalarının kaynağı olarak rol oynamıştır [2].

Serviks kanseri, önceki yıllarda jinekolojik kanserler arasında ilk sırayı almasına rağmen günümüzde ikinci ve hatta üçüncü sıraya inmiştir [74]. Tüm dünyada yılda 400.000'in üzerinde serviks kanseri olgusu görülmekte ve her yıl yaklaşık 250.000 hasta serviks kanserinden ölmektedir [28].

Over kanseri, kadın kanserleri arasında en sık görülen 5. kanserdir. Jinekolojik kanserler arasında 2. sıklıkta görülmektedir. Toplamda kadın kanserlerinin %4'ünü, jinekolojik kanserlerin %27'sini oluştururlar. En öldürücü jinekolojik kanser over kanseridir [81,82].

Endometrium kanseri gelişmiş ülkelerde kadın genital sistem kanserleri arasında en sık görülen kanserdir. Sağlık bakanlığı verilerine göre ülkemizde kadın genital sistem kanserleri, kanser ölümleri arasında ikinci sırada yer almaktadır ve serviks kanseri 8. sıradayken endometrium kanseri 10. sırada görülmektedir [28].

Bu çalışmada, serviks, endometrium ve over kanserli hastalarda ve kontrol gruplarında *p53* geninin 4. ekzon bölgesinde 72. kodon polimorfizmi ve Metilentetrahidrofolat Redüktaz (*MTHFR*) geninin 4. ekzon bölgesi C677T polimorfizmi Polimeraz Zincir Reaksiyonu- Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi (PZR-RFLP) yöntemi ile taranmıştır. Bu çalışma, Türk hastalardaki serviks, endometrium, over kanserlerinde *p53* ve *MTHFR* gen mutasyonlarının kanserli hastalarının genlerinde ne gibi değişiklikler yaptığını belirlemek amacı ile yapılmış bir ön çalışmadır. Serviks, endometrium ve over kanserli hastalarda kanserle ilişkilendirilen *p53* 72. kodon ve *MTHFR* geninde mutasyon analizinin yapılmasıyla, kanser tanılı bireyin ailesinde ve akrabalarında hastalık belirtisi

oluşmadan veya hastalık ilerlemeden erken tanı konması ve tedaviye başlamasıyla hastalığın ilerlemesinin engellenmesi yolunda adım atılmış olacaktır.

2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1 Kanser

Kanser, hücre proliferasyonunun bozulmasıyla ortaya çıkan bir olgudur [1]. Kanserin genetik ile bağlantılı olabileceği fikri 20. Yüzyıl başlarında ortaya atılmıştır ve bu fikir kanser araştırmalarının kaynağı olarak rol oynamıştır [2]. Kanser hem dünyada hem de ülkemizde %22'lik oran ile kardiyovasküler hastalıklardan sonra ölümlerde ikinci sırada yer almaktadır [6].

Kanserler, esas olarak 3 ana grupta sınıflandırılırlar. Kemik, kas ya da konnektif doku gibi mezenşimal dokulardan köken alan sarkoma; barsak mukozası, bronşlar ve meme duktusları gibi epitelyal dokulardan köken alanlar karsinoma; kemik iliği ve lenfatik sistemden köken alanlar lenfomalardır [3,4].

Kanserlerin oluşum sürecinde genetik ve çevresel faktörlerin rol oynadığı düşünülmektedir [5]. Çevresel faktörler; iyonize radyasyon, sigara ve alkol kullanımı, kötü beslenme alışkanlıkları, fiziksel ve kimyasal ajanlara maruz kalma, güneş ışınlarına maruz kalma gibi kişisel alışkanlıkları ve özellikleri kapsamaktadır [2,3].

Hücre bölünmesi ve hücre ölümünü kontrol eden çeşitli genler bulunmaktadır. Son yıllarda yapılan araştırmalarda hücre çoğalmasını ve hücre ölümünü kontrol eden genlerin mutasyonlarının kanserden sorumlu olduğu belirlenmiştir [3]. Mutasyonların gen ifadesini değiştirmesi tüm kanser çeşitlerinin ortak özelliği olarak bilinmektedir [2]. Birçok kanser tipinde, mutasyonlar bir somatik hücrede oluşmakta ve bu hücre daha sonra bölünerek kanserin gelişmesine sebep olmaktadır. Daha az görülen tipi ise kalıtsal kanser sendromunda görülmektedir. Kanserin başlamasına sebep olan mutasyonlar eşey hücrelerine aktarılmakta ve böylece vücut hücrelerinin tümünde yer almaktadır [3]. Eşey hücrelerinin çeşitli genlerinde meydana gelen

mutasyonlar sonraki nesillere aktarılmakta ve bu değişim, yeni neslin kansere yatkınlığını oluşturmaktadır [2].

Kanserin aile içinde seyredebileceği 200 yılı aşkın bir süredir bilinmektedir. Kalıtımın net ve ayırıcı özelliği birçok ailesel kanser tipleri için belirgin değildir. Hastalar kansere neden olan genin sadece bir mutant allelini kalıtım yolu ile alırlar ve bu gen onları kansere yakalanmaya meyilli hale getirir. Sonuç olarak da birey büyük bir olasılıkla başı başına mutant allele, diğer genlerdeki mutasyonlara ve çevresel faktörlere bağlı olarak kansere yakalanmaktadır. Bu çeşitlilik, hastalığın başlangıç yaşına ve şiddetine etkili olabilmektedir [2]. İster kalıtsal ister çevresel etkenlerle olsun, esasta hücrenin genetik materyalini ilgilendirdiği için, kanser genetik bir hastalık olarak kabul edilmektedir [7].

Bir kitle ya da tümör oluşumuna neden olduğu bilinen hücre çoğalmasına neoplazi denir. Neoplazinin kanser olabilmesi için kötü huylu özellik göstermesi yani kontrolsüz büyümesi, komşu dokulara veya yakın uzak mesafelere yayılabilme (metastaz) özelliklerine sahip olması gerekmektedir. Tümörler metastaz yapmıyorlarsa kanseröz değillerdir ve iyi huylu tümör olarak adlandırılmaktadırlar [8].

Tümörler biyolojik davranışlarına göre iyi huylu, kötü huylu ve ikisi arasında yer alan intermediyer olmak üzere üçe ayrılırlar. İntermediyer tümörlerin nasıl bir klinik gidiş göstereceğini belirlemek zordur. Bazen iyi huylu tümörlerde, yerleşim bölgelerine göre kötü bir klinik gidiş gösterebilirler [9].

İyi huylu ve kötü huylu tümörler arasındaki farklılıkları 4 grupta toplayabiliriz.

Farklılaşma ve anaplazi: farklılaşma tümörün köken aldığı normal hücrelere yapısal ve işlevsel olarak benzerlik gösterir. Genel olarak tüm iyi huylu tümörler kaynaklandığı dokuyu iyi taklit ederler. Kötü huylu tümörler ise kaynaklandığı

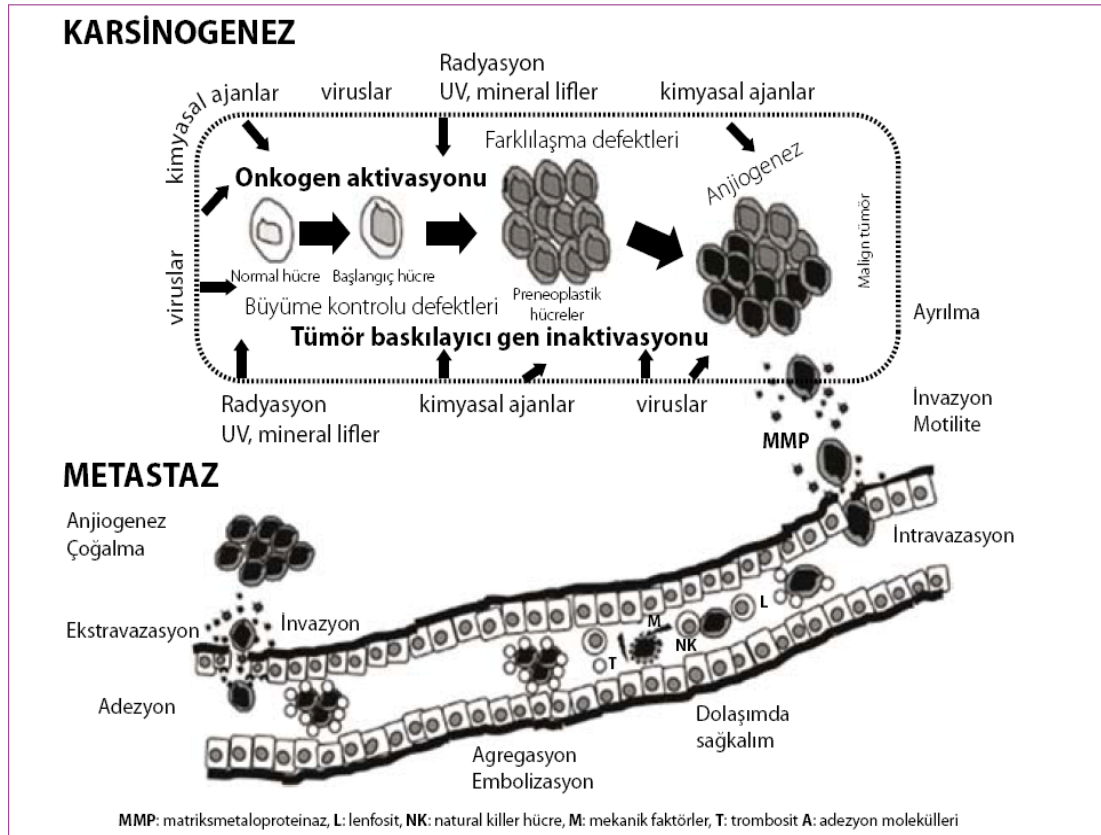
dokuyu iyi taklit etme durumundan hiç taklit edememe durumuna (anaplazi) kadar değişen geniş bir spektrum içerisinde bulunurlar [10].

Tümörlerde farklılaşma kötüye gittikçe mitoz sayısı artmakta ve normalden farklı mitoz şekilleri ortaya çıkmaktadır. Özellikle hızlı büyüme gösteren kötü huylu tümörlerde, kanlanma gereksinimi büyüme hızına paralel olarak sağlanamazsa doku ölümü alanları (nekroz) görülür [11].

Büyüme hızı: İyi huylu tümörler genellikle yavaş, kötü huylu tümörler ise daha hızlı büyür ve zamanla yayılarak hastayı ölüme götürebilir [12].

İnvazyon: Kötü huylu tümörlerin komşu dokulara yayılması olayına denir. Kötü huylu tümörler büyürlerken çevre dokuların içerisine ilerleyerek, o dokuları yok eder ve yerlerini almak istemeleri sebebiyle çevre doku ile sınırları net değildir. İyi huylu tümörler ise kitlesini genişleterek büyürler ve genelde kapsülleri bulunur [11].

Metastaz: Kansere hücreleri, kendi büyüme ve bölünme yeteneklerini kaybetmiştir. Komşu dokuların yerine geçebilen yetenekte kötü huylu tümörler geliştirebilirler. Bazen, kanser hücreleri birincil tümörden ayrılarak vücudun herhangi bir yerine yerleşerek orada büyür ve bölünerek ikincil tümörleri oluşturur. Bu olay metastaz olarak adlandırılmaktadır ve kanser hastalarında ölüme neden olmaktadır (Şekil 2.1) [2].



Şekil 2.1. Kanser oluşumu ve metastaz [8]

Kanserler vücut boşlukları ve yüzeyleri, lenf damarları, kan damarları yoluyla yayılmaktadırlar. Vücut boşlukları ve yüzeyleri ile yayılmada; kötü huylu neoplazmin vücut boşluklarını çevreleyen yüzeylere ulaşmasıyla, tümörden kopan hücreler tohum rolü görerek o vücut boşluğuna komşu diğer doku ve organlara yayılabilmektedir. Yeni bir bölgeye geçiş için tümör hücreleri kılcal damarların (veya lenf damarının) iç duvarlarını saran epitelyum hücre tabakasına geçer ve epitelyum hücrelerinin etrafındaki hücre dışı matrikslerin içerisine yerleşir. Bu tip yayılma en sık karın boşluğu (peritoneal boşluk) ve özellikle over kaynaklı kanserlerde görülmektedir [2,10].

Hücre dışı matriks, dokuları birbirinden ayıran bir protein ve karbonhidrat ağıdır; doku büyümesi ve hücrelerin göçünü önlemek için işlev görmektedir. İkincil tümörün oluşabilmesi için, metastatik hücreler membran kaidesindeki proteinleri parçalayan bir enzim salgılar; bu sayede hareket edebilecek bir boşluk oluştururlar ve hücreler bu boşluktan geçerek yeni dokuya girerek ikincil bir tümör oluştururlar [2].

Metastaz; matriks-kesici enzimleri kodlayan veya düzenleyen genlerle kontrol edilebilir. Son çalışmalar, *metalloproteinazlar* olarak adlandırılan protein kesen enzimlerin hücre istilasını için gerekli olduğunu göstermiştir [2].

Kanser gelişimini açıklamak için çeşitli teoriler öne sürülmektedir. *In vitro* transformasyon ya da *in vivo* karsinogenezis, bazı farklı evrelerden oluşan karmaşık bir süreçtir. Çok evreli karsinogenezis modelinde, normal bir hücrenin tamamıyla kötü huylu bir hücreye dönüşmesi ve metastazı için çok evreli metabolik yollardan geçmesi gerekmektedir. Bu modele göre ilk aşama olan başlama evresi, hücrenin kimyasal karsinojenler, radyasyon, RNA ve DNA tümör virüsleri gibi mutajenlerle geri dönüşümü olmayan bir reaksiyonun uyarılmasıdır. İkinci aşamada hormonlar, büyüme faktörleri, forbol esterleri ve virüsler gibi tümör geliştirici ajanların etkisiyle normal hücrenin bir tümör hücresine dönüşümü hızlandırılır. Daha sonraki ilerleme aşaması ve metastaz aşamalarında tümör hücreleri kötü huylu hücrelere dönüştürülmektedir. Kötü huylu tümörler, öncü tümör hücrelerinden daha fazla sayıda mutasyon veya epigenetik değişim taşıyan heterojen hücrelerden oluşmaktadır [22].

Kanserin genetik yapısına baktığımızda;

Kanser oluşumunda rol oynayan genler; onkogenler ve tümör baskılayıcı genler olarak iki temel alt gruba ayrılırlar.

2.1.1. Proto-onkogenler ve onkogenler

Onkogenler normal hücre büyümesini ve gelişmesini etkileyen genlerdir. Eğer bir onkogen, kendiliğinden gen içindeki bir mutasyon ya da eksternal kontrolün değişmesi sonucu farklılaşır ya da normalden daha fazla ifade edilmeye başlarsa, bu değişiklikler hücrede kontrolsüz büyümeye ve dolayısıyla kanserleşmeye neden olur. Onkogenlerin büyük bir kısmı hücre çoğalması ve farklılaşmasının kontrolü ile ilişkili proto-onkogen denilen normal genlerin mutasyona uğramış yani aktive edilmiş şekilleridir [13]. Onkogenlerin, hücrelerde kanser gelişiminde doğrudan veya dolaylı etkili olabileceği fikri 1970 yılında Huebner ve Todaro isimli araştırmacılar tarafından ilk kez öne sürülmüştür [16].

Normal hücre döngüsünde, onkogenler artan büyüme hareketini, tümör baskılayıcı genlerin büyümeyi inhibe etmesi ile dengelemektedir. Proto-onkogenlerin genetik anormallikleri, tümör hücrelerinin büyümesini artıran onkogenlerde sonuçlanmaktadır [14]. Onkogenler, hücre içi yolun bir kısmında olduğu gibi hücre büyümesini engellerler [15]. Kanser gelişimini uyarmak için tümör baskılayıcı genlerde bir genin her iki allelinde de mutasyon olması gerekirken, kötü huylu tümörlerin uyarılması için bir proto-onkogenin iki kopyasının sadece bir tanesinde mutasyon olması yeterlidir [2].

Onkogenler ilk kez fare, kedi ve maymunlarda kansere sebep olan onkogenik retrovirüslerin moleküler analizleri sonucunda keşfedilmişlerdir [13]. 1911 yılında Peyton Rous, tümör çeşidi bilinen bir civcivden sağlıklı bir civcive aktarılmasıyla benzer tümörün oluşmasına neden olan bir etkenin var olduğunu bildirmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda bu etkenin retrovirüs olduğu ve onun sahip olduğu *v-src* olarak isimlendirilen özgün bir genin tümör oluşumunda sorumlu olduğu belirtilmiştir. Retrovirüslerde bulunan ve normal hücreleri kanser hücrelerine dönüştüren bu genlere viral onkogen adı verilmektedir ve kısaca *v-onc* ile gösterilen bu genler normalde inaktif halde bulunmaktadır.[21]. Bu viral onkogenlerden *Rous sarcoma* virüsü (RSV) ve *Simian virüs 40* (SV 40) kanserin geliştirilmesinde ya dolaylı

ilerletici aksiyonlarıyla veya enfekte ettikleri hücrenin neoplastik transformasyonuna sebep olmalarıyla rol oynamaktadırlar [21].

Proto-onkogenlerin aktivasyon mekanizması

Proto-onkogenler normal hücre büyümeleri için gerekli diziler oluşturmaktadırlar. Aktivasyonlarından ve kontrolü kaybetmelerinden sorumlu pek çok değişik mekanizma bulunmaktadır [16].

Nokta mutasyonları

Nokta mutasyonu sadece bir nükleotid değişikliğine verilen genel bir tanımdır. En sık görülen şekli transisyonudur. Transisyon, bir pürin nükleotidinin yerini bir diğer pürin nükleotidinin almasıyla oluşan nükleotid değişiklikleridir. Daha az görülen transversiyon şeklinde ise, bir pürin nükleotidi ile bir pirimidin nükleotidi ya da bir pirimidin nükleotidi ile bir pürin nükleotidi yer değiştirmektedir. Bir tek nükleotidi değiştiren nokta mutasyonu, sadece nükleotidin içinde yer aldığı bir kodonu değiştirmektedir. Bunun sonucu olarak, proteindeki sadece bir aminoasit etkilenmektedir. Bu yer değiştirme proteinin aktivitesini azaltabilir veya değiştirebilir. Fakat tümüyle ortadan kaldırmayabilir [22].

Gende kodon dizisinin değiştiği nokta mutasyonları oluştuğunda, genetik ürünün kalitesinde meydana gelen değişiklik genin işlevini de değiştirebilmektedir. *p53* genindeki nokta mutasyonları solid tümörlerde en sık tanımlanmış genetik mutasyondur. Bu mutasyonlar özellikle genin en güçlü korunan bölgelerine rastgelen “sıcak noktalarda” oluşmaktadır. *p53* geninin normal işleyişinin kaybolması hücre çoğalmasını engelleyen faktörleri ortada kaldırarak, hasara uğramış DNA’nın kardeş hücrelere geçişini kolaylaştırır. *p53* genindeki mutasyonlar over kanserlerinin ortalama %50’sinde, endometrium kanserlerinin %30-40’ında görülürken, servikal kanserde seyrek görülmektedir. Buna karşın servikal kanserdeki *p53* aktivitesi, insan

papilloma virüsü (HPV) tarafından kodlanan E6 proteini ve P53 proteini arasındaki etkileşim nedeniyle genellikle anormal olarak seyretmektedir [23].

Sonuç olarak, nokta mutasyonu ile oluşan aminoasit yer değişiklikleri hücresel bir proto-onkogeni aktif bir onkogene dönüştürebilmektedir [22].

Gen ifadesinin artması

Gen ifadesinin artması, bir genin kopya sayısındaki artış olarak tanımlanmaktadır. Gen ifadesinin artmasında DNA miktarı artar ve genetik ifade çoğalır. Sonuçta protein artışına neden olabilen bir mekanizmadır [22,23].

Gen ifadesinin artması çoğunlukla kanserli hücrelerde oluşurken az miktarda da normal hücrelerde görülmektedir. Kanserli hücrelerde seçici olarak ifade edilen iki gen sınıfı vardır. Bunlar; ilaca direnç genleri ve proto-onkogenlerdir [22]. Proto-onkogenin ifadesini artması kadın genital sistem malignitelerinde olağan bir durum olduğu görülmektedir [23]. Gen ifadesinin artmasında tümör başlatılmasından çok tümör gelişmesinde avantaj sağladığı düşünülmektedir [24]. Örneğin, meme kanserinde *c-myc* ve *erb B* ya da *neu* onkogen ifadelerinin artması, ilerlemiş evrede her zaman görülmüş fakat erken evrelerde görülememiştir [22].

Kromozomal translokasyonlar

Homolog olmayan kromozomlar arasında parça değiş-tokuşu ya da bir kromozomun parçasının başka bir kromozoma aktarılması olayıdır [2]. Translokasyonlar, insan hematolojik tümörlerinin ortak özelliğidir [16]. Bu mekanizma kromozom translokasyonunun, kromozomun kırılma noktasının yakınında yer alan hücresel bir onkogeni aktifleştirmesi yoluyla çalışmaktadır [26]. İki kromozom parçasının translokasyonlarla birleştirilmesi proto-onkogenlerin ifadesinin ya da biyokimyasal fonksiyonunun etkilenmesine sebep olmaktadır. Gen ifadesinin değişimine örnek olarak Burkitt lenfomasında translokasyonun *c-myc* genini çeşitli immünoglobulin

genlerine eklemesi verilebilir [27]. Kronik myelositik lösemi hücrelerini karakterize eden Philadelphia kromozomu da kromozom translokasyonu ile proto-onkogen fonksiyonu etkileyen değişime örnek verilebilir [16,27].

Sinyal iletimi ve onkogenler

G proteinleri

G proteinleri, GTP (guanozin trifosfat) bağlandığında aktive olan zar proteinleridir. Bu proteinler zarın iç yüzeyinde bulunan bir ifade arttırıcı enzimi aktive ederler. Aktivasyonu yapılan enzim ise fosfat gruplarınca zengin olan öncül molekülleri ikinci haberci moleküllere dönüştürürler. G proteini ya uyarıcı (Gs) ya da baskılayıcı (Gi) özelliktedir [22].

Çekirdek transkripsiyon faktörleri

Sinyal iletiminde hedef çekirdekte DNA replikasyonu olduğuna göre DNA replikasyonu ve hücre bölünmesi için görev yapan çekirdek yerleşimli moleküller son derece önemlidir [28]. Çekirdek transkripsiyon faktörlerini etkileyen mutasyonlar sıklıkla kötü huylu transformasyona eşlik etmektedirler [29]. Örneğin, *Myc*, *myb* ve *fos* onkogenlerinin viral ve hücrel homologlarından kodlanan protein moleküllerinin hücre çekirdeğinde toplandıkları ve DNA'ya bağlanarak replikasyon ve transkripsiyon düzenlenmesini etkiledikleri belirlenmiştir [30].

Protein kinazlar

Hücrede protein fosforilasyonu yolu ile metabolik kontrolü sağlayan enzimlerin genel adı “protein kinaz” olarak bilinmektedir. Bu enzimle zara bağlı iyon değişiklikleri oluşturarak, Na/H alışverişini hızlandırıp hücre içi pH'yı arttırırlar. Hücre içi alkalinizasyon hücre bölünmesini uyaran etkenlerden birisidir. Protein kinaz enzimlerinin proteinleri serin ve treonin aminoasitlerinden, OH grubu yerine

PO₄ bağlayarak fosforladıkları belirlenmiştir. Kanseri hücrelerinde onkogen ürünü olan protein kinazlar, çeşitli proteinleri, serin ve treonin yerine tirozinden fosforlamaktadır. Protein kinaz aktivitesi gösteren onkogenler, fonksiyonları ve lokalizasyonlarına göre, transmembran ve sitoplazmik tirozin kinaz aktivitesi gösterenler olarak ikiye ayrılmaktadır [30].

Büyüme faktörleri ve büyüme faktörleri reseptörleri

Büyüme faktörleri çevre hücrelerden veya bizzat tümör hücresinden salgılanmış olabileceği gibi endokrin hormonlar da büyüme faktörü olarak görev yapabilirler [28]. Kanseri hücreleri çeşitli hormonlar üretirler ve bu hormonların hücre yüzeyindeki reseptörleriyle etkileşimi sonucunda kendi büyümelerini otokrin yollarla uyarırlar [31]. Büyüme faktörleri otokrin, parakrin ve jukstakrin yollarla kanseri büyümesinde rol oynarlar [32]. Eğer bir tümör hücresi hem bir büyüme faktörü hem de reseptörünü taşıyorsa kendisinin uyarıcı büyüme halkasına sahiptir ve buna otokrin büyüme halkası denilmektedir. Otokrin hücreler normal hücrelerde bulunarak sadece fizyolojik uyarılara yanıt verirler. Dengeli büyüme için karşılıklı düzenleyici sistemler birlikte bulunurken kanserli hücrelerde bu dengeler bozulmuştur [33].

Büyüme faktörü reseptörleri yapısal olarak genelde kendine has büyüme faktörünü bağlayan hücre dışı parça; hücre zarı boyunca uzanan transmembranöz parça ve sitoplazma parçalardan oluşmaktadır ve genellikle sitoplazma parçasında tirozin kinaz aktivitesi mevcuttur. Bu aktivitenin uyarılmasıyla, sinyal, sinyal iletili moleküller vasıtasıyla çekirdeğe iletilir. Reseptörler onkogenik hale geldiğinde, büyüme faktörü bağlanmasını gerektirmeyen persistan aktivasyon oluşur, yani mutant reseptörler sürekli mitojenik sinyaller verir [28]. Büyüme faktörü reseptörleri, mutasyonlar, gen düzenlemeleri ya da aşırı ifade şeklinde aktive olmaktadır. Büyüme faktörlerinin normal tiplerinin aşırı ifadesi, mutasyonlarından daha sık görülmektedir. Bu aşırı ifade bazen gende ifade artmasına eşlik etmektedir. En sık aşırı ifade EGF (epidermal growth factor) reseptör ailesi fertlerinde görülmektedir. Örneğin *c-erbB2* geni meme, over, akciğer ve mide kanserleri başta olmak üzere

insan adenokarsinomlarının çoğunda ifade artışı gösterir ve meme, over, endometrium, serviks ve vulva kanserlerinde kötü prognozun habercisidir [28].

2.1.2. Tümör baskılayıcı genler

Tümör baskılayıcı genler, hücre çoğalmasını baskılayarak düzenleyici bir rol oynarlar [34, 35, 36]. Kayıpları ya da aktifliğini kaybetmeleri tümörün gelişimi ile alakalıdır. Tümör gelişiminden önce genin her iki allelinin de işlevini yitirmiş olmalıdır [37]. Normal allelin var olması tümör gelişimini baskılamaktadır. Herhangi bir etki oluşabilmesi için işlev kaybı her iki alleli de etkilemelidir. Bunun olması için iki ya da daha fazla mutasyon olması gerekmektedir [1, 109].

Mitoz iki yolla düzenlenmektedir. Birincisi, hücre bölünmesini baskılayan genlerin normal işlevi ile düzenlenir. Bu genler tümör baskılayıcı genlerdir. İkinci yol ise, hücre bölünmesini yürüten genlerin normal işlevi ile düzenlenmesidir. Tümör baskılayıcı genler hücre döngüsü bölümlerinin birbirine geçişini baskılayarak ya da aktifliğini yok ederek hücre bölünmesini durdurur [2].

Önemli tümör baskılayıcı genlerden bazıları; *Retinoblastoma (Rb)*, *p53*, *BRCA1*, *BRCA2*, *PTEN* ve *FHIT* genleridir.

Retinoblastoma (Rb) geni

Rb geni ilk keşfedilen, bu nedenle üzerinde en çok çalışma yapılan tümör baskılayıcı gendir. *Rb* bir çekirdek fosfoproteinidir. Her hücre tipinde mutlaka ifade olur [28]. *Rb* geni 13. kromozom üzerine yerleşmiş olup, pRb proteinini kodlamaktadır [2]. *Rb* geninin aktif hali az fosfor taşımaktadır ve E2F ailesi transkripsiyon faktörlerini bağlayarak hücre bölünmesini engellemektedir. Fosforu siklin ve cdk komplekslerinden alarak hiperfosforile olmasıyla *Rb* aktifliğini kaybetmekte ve E2F faktörlerini bağlayamamasına, E2F transkripsiyon faktörünün serbest kalmasına ve hücrenin G1 fazından S fazına geçişine imkan vermektedir. Hücre bir kere S fazına

girerse, büyüme faktör uyarımı olmasa da bölünmeye devam eder. M fazında ise Rb molekülünden fosfor alınarak az fosforile hale getirilmektedir. Ailevi *Rb* gen delesyonlarında erken yaşta, bilateral ve multipl retinoblastomalar, seyrek olarak da osteosarkomlar oluşmaktadır. Somatik *Rb* mutasyonları ise meme, mesane kanserleri ve akciğer küçük hücreli kanserlerinde gözlenmiştir [28].

p53 geni

p53 geni insan kanserlerinde en sık değişikliğe uğrayan tümör baskılayıcı gendir [28]. 17. kromozomun p kolunda yerleşen *p53* geni 53 kDa ağırlığındadır ve 393 aminoasitlik bir çekirdek fosfoproteini kodlamaktadır [38, 39, 40, 41]. Tüm kanser vakalarının yarısının *p53* genindeki mutasyonlarla alakalı olduğu düşünülmektedir. *p53* normalde tümör baskılayıcı bir gen olarak, hücrelerin hücre döngüsünün G1'den S fazına geçişini kontrol eder [2]. *p53*'ün en önemli görevlerinden biri genetik olarak hasar görmüş hücrelerin çoğalmasını engellemektir [42,43]. *p53* mutasyonları kolon, meme, akciğer, over gibi organların karsinomlarında %50 ve daha fazla görülür [44].

BRCA1 ve *BRCA2* genleri

17q 12-21 bölgesinde *BRCA1* geni, 13q 12-13 bölgesinde de *BRCA2* geni bulunmaktadır. Meme ve over kanseri dahil pek çok kanserin oluşumunda önemlidir. *BRCA1* ve *BRCA2* genlerini işlevleri henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Bu genlerin ürünü çekirdekte yer almakta ve transkripsiyonda düzenleyici görev aldıkları düşünülmektedir. Bu genler hücre büyümesi ve çoğalmasından doğrudan sorumlu olmasa da mutasyonları DNA replikasyonunda hatalara sebep olacağı için hücre büyüme ve çoğalmasından doğrudan sorumlu olan genlerde eksikliklere neden olurlar [45].

PTEN (Phosphatase and TENsin Homolog) geni

10. kromozomun uzun kolunda yer alan *PTEN* geni endometrium, meme, prostat kanserinde aktivasyonunu kaybettiği bilinmektedir. Bir lipit fosfatazdır [28].

FHIT(Fragile Histidine Triad) geni

3. kromozomun p kolunda yer alan bu tümör baskılayıcı gen fragil (kırılgan) bir kromozom bölgesidir ve ekzojen karsinojenler tarafından delesyon sonucu aktifliğini kaybettiği düşünülmektedir. *FHIT* geninin kodladığı protein hidrolaz aktivitesi olan bir oligofosfattır (ApnA) ve hücre farklılaşması ve apoptozunda fonksiyonu olan hücre dışı ve hücre içi sinyal ileticidir. *FHIT* gen ekspresyonu kaybının meme, mesane, serviks adenokanserlerinde tümörün ilerlemesi ile ilgili olduğu bildirilmiştir [46].

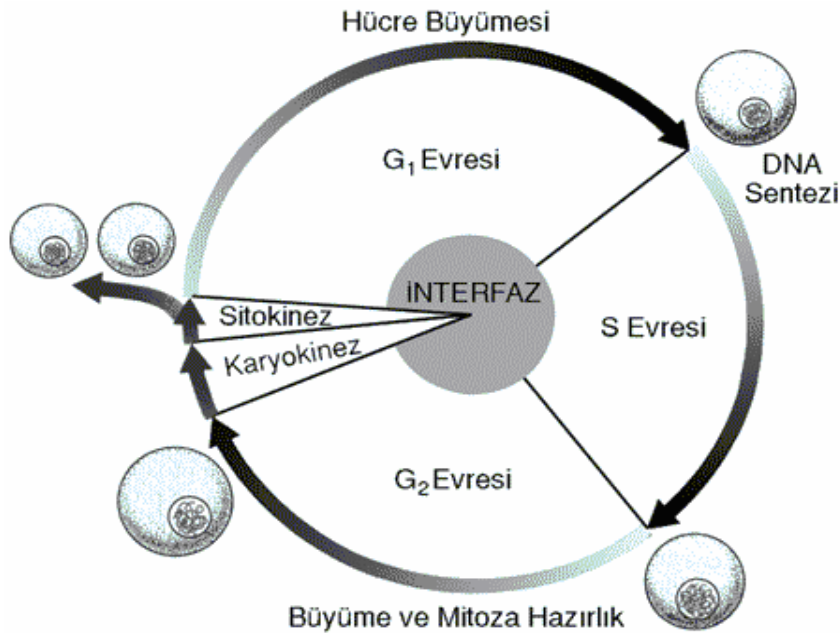
2.1.3. Hücre döngüsü ve kanser

Normal dokularda çoğalan hücre sayısı organizmanın ihtiyaçları nedeniyledir. Hücre çoğalmasının azalması veya hücre ölüm hızının artması herhangi bir artışı önlemektedir. Hücrenin kendine benzeyen iki hücreye çoğalması dış uyarılar sonucunda biyokimyasal olarak başlatılan bir seri fazlardan geçerek iç ve dış büyüme faktörleri tarafından düzenlenir. Bazı onkogenler ve hücre döngüsüne özgü olan proteinler hücre döngüsü boyunca düzenli bir şekilde aktiveleştirilir ve ardından da aktifliğini kaybederler [47]. Hücre döngüsü G1, S, G2, M fazlarından oluşmaktadır. Ayrıca birde G0 fazı bulunmaktadır (Şekil 2.2).

G0 fazında, bazı hücrelerin aktivitesi, hücre döngüsü sırasında geçici ya da sürekli olarak durdurulur. Bu tip hücreler bir anlamda döngüden çekilerek metabolizmalarını değiştirmekte ve büyümelerini durdurmaktadır. G0 fazında hiçbir zaman bölünme olmaz. Hücreler genellikle protein sentezi ve salgılanması işi ile uğraşmaktadır [48].

G0 fazında bulunan hücreler büyüme faktörleri ve steroid hormonlar gibi özgün uyaranların etkisinde kaldıkları zaman hücre döngüsüne girerler ve döngünün ilk fazı olan G1 fazına girerler [23]. G1 fazında, DNA sentezi için gerekli olan düzenleyici proteinler ve enzimlerin sentezi yapılmaktadır. Sentez (S) fazında hücre çekirdeğinin DNA içeriği kopyalanarak 2 katına çıkarılır [23]. Hücre döngüsünün G2 fazında ise RNA ve protein sentezi gerçekleşmektedir. Biyosentetik aktivitenin harekete geçmesiyle iki kardeş hücrenin metabolik gereksinimleri metabolik oluşum ve enzimlerle karşılanır. G2 fazında S fazında meydana gelmesi olası olan DNA kopyalanmasındaki hatalar tamir edilir. Bu genetik hataların tanımlanması ve onarılması yapılmadığında geniş ölçüde yan etkiler oluşabilir. DNA onarım mekanizmasındaki bozukluklar, kanserin görülme oranının artışına sebep olabilir [49].

Mitoz (M) fazında, genetik materyal oluşan iki yeni hücreye dağılır. Mitozu takiben oluşan yeni hücreler ya G0 ya da G1 fazına girerler (47).



Şekil 2.2. Hücre döngüsü [50]

Hücre döngüsünün genetik kontrolü

Hücrenin çoğalabilmesi, hücre kaybının dengelenebilmesi ve dokunun devamlılığının sağlanabilmesi ve organ bütünlüğünün devamı açısından genetik kontrol gereklidir [23]. Bu süreçte hücre döngüsünün farklı evrelerinde birçok genin düzenli ifadesini gerektirmektedir [51]. Hücre döngüsünün başarılı bir şekilde tamamlanması için belli sayıda hücre bölünme döngüsü (*cdc*) geni aktive olmaktadır [23]. Buna ek olarak hücre iki tane önemli kontrol noktasından geçmektedir [52]. Hücredeki kontrol noktalarından biri G1/S kontrol noktası diğeri ise, G2/M kontrol noktasıdır [53].

G1/S kontrol noktası, G1 fazından S fazına girmeden hemen önce gelir ve hücrenin G1 fazını terk etmeden önce DNA'nın hasarsız bir durumda olup olmadığını kontrol eder. Herhangi bir hasar olması durumunda hücreler ya hasarı onarır ya da apoptoza giderek ölürler. Bu kontrol noktası P53 proteinin etki yerlerinden birisidir [47, 54].

G2/M kontrol noktası, hücreler M fazına girmeden önceki kontrol noktasıdır. Hücre döngüsü inhibitörleri, hücreyi, yeni oluşacak hücrelerin doğru genetik kopyaya sahip olacaklarından emin oluncaya kadar durdurur. DNA replikasyonu tamamıyla ve doğru şekilde yapılamamışsa veya beraberindeki tüm proteinler, iplikçik materyalleri ve mitozun tamamlanması için gerekli diğer tüm maddeler eksiksiz olarak tamamlanmamışsa hücre bu kontrol noktasında her şey başarıyla düzenleninceye kadar durur ve ardından M fazına girer [47, 55, 56].

Hücre döngüsü genleri

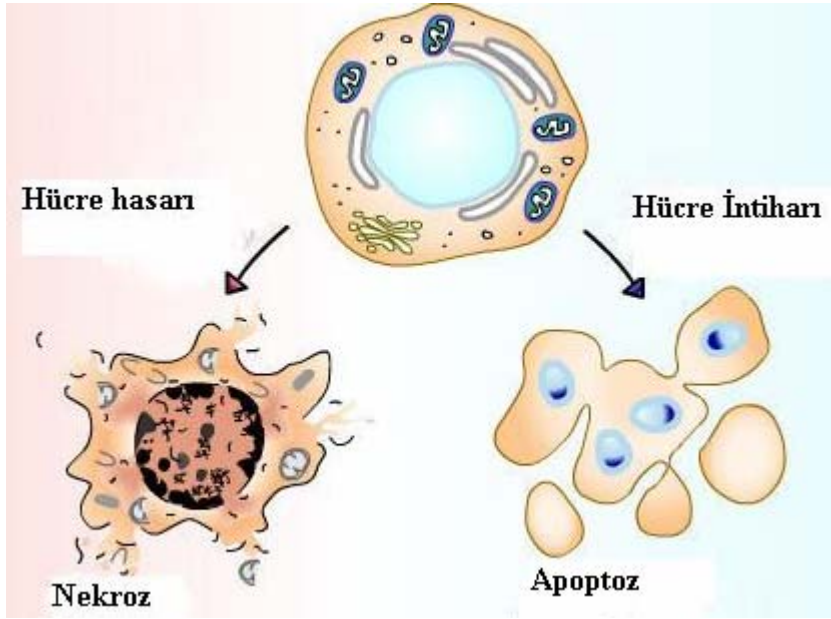
Hücre döngüsünün kontrol noktasının düzenlenmesinde, *cdc2* grubunda olan genler tarafından kodlanan proteinler ve siklin proteinleri önemli bir rol oynamaktadır. Siklinlerin azalması ya da artması G1/S kontrol noktasını düzenlemektedir ve DNA hasarı olduğunda hücre döngüsünün devam etmesini engellerler. Mitoz *cdc2* geninin

G2/M kontrol noktasında aktive edilmesiyle başlar. P34, Cdc2 proteini ve özgün siklinler mitoz başlatıcı faktör (MPF) adı verilen bir heterodimeri oluştururlar. MPF protein fosforilasyonunu katalizler ve hücreyi mitozla yönlendirir. G2/M kontrol noktasının geçilmesiyle birlikte hücre mitozla girer. Eğer kromozomlar anormal bir biçimde kopyalanırsa bu kontrol noktasından geçiş olmaz. Sitoplazma bölünmesini takiben kardeş hücreler hücre döngüsünden çıkıp ya G1 fazına girerler ya da programlı hücre ölümü gerçekleşir [57,23].

Programlı hücre ölümü (Apoptoz)

Normal doku kütlelerinin düzenlenmesi ve devam etmesi, hücre çoğalması ve programlı hücre ölümü arasındaki dengeye bağlıdır. Apoptozis anormal DNA'lı hücreleri yok eder. Anormal DNA'lı hücreler ya tamiri olanaksız DNA hasarı oluşmuş ya da yanlış, eksik veya gereksiz olarak fazla transkribe olmuş DNA'dan dolayı oluşur. Buradaki apoptozis, belli bir tür için gerekli kromozom sayısının uygun miktarda devam ettirilmesinde ve aneploidinin önlenmesinde ana mekanizmadır. Böylece, DNA'sını sadece doğru bir şekilde ve tam olarak replike etmiş hücrelerin mitozla girmesi sağlanır [47]. Ayrıca apoptozis normal doku kaybından da sorumludur. Yaşlanmış ve yararsız hale gelen normal hücrelerin ortamdaki yok edilmelerini sağlar [59]. Kanseri hücreleri ve bazı bağışıklık sistemi hücreleri normal dokularda apoptozisi anormal olarak uyaran maddeleri üretirler. Apoptozis genetik olarak düzenlenir ve kötü huylu tümör hücrelerinde bozulabilir. Örneğin, *p53* tümör baskılayıcı geni apoptozisi uyarır. *Bcl-2* onkogeni ise apoptozisi engeller. Böylece, normal hücre ölümünü yavaşlatarak aşırı hücre birikmesine yol açar [47].

Apoptozis tümör hücrelerinin hormonlar, sitotoksik kemoterapi ve radyasyon terapisiyle azaltılmasında ana mekanizma olabilir [60,61].



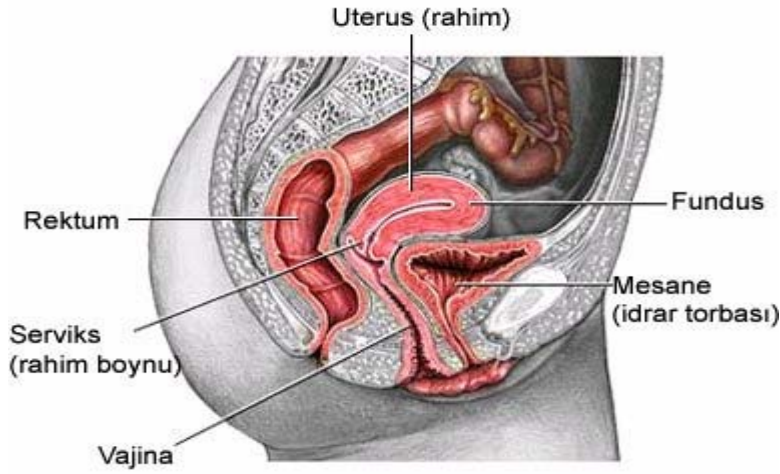
Şekil 2.3. Apoptoz ve nekroz [127]

2.2. Serviks

2.2.1 Serviks anatomisi, embriyolojisi ve histolojisi

Uterusun vajinaya doğru çıkıntı yaptığı bölümüdür ve internal os aracılığıyla uterus ile devam eder. İnternal os serviks ile uterus arasındaki anatomik sınırdır ve uterusun yapsal özellikleri bu noktada başlar. Serviks vajina arasındaki sınırı ise eksternal os sağlar. Tübüler bir organ olan serviks yetişkin bir kadında 3 cm uzunluğunda 2-2.5 cm çapındadır. Gebelik ve doğumlar sonrası biçimi biraz değişerek çan benzeri bir görünüm alır [23, 28].

Serviks lümeni mukus salgılayan basit prizmatik epitelyum ile döşelidir. Endoservikal kanalın endometriyum ile birleştiği bölgede epitelyum hücreleri arasında sili prizmatik hücrelerde bulunmaktadır. Bu hücreler silleri vasıtasıyla mukusu vajene doğru iterler [23, 28].



Şekil 2.4. Serviksin vücuttaki konumu [58]

2.2.2. Serviks kanseri

Serviks kolay ulaşılabilir bir organ olduğundan, bu organın kanserlerinde Papanikolau testi (Pap smear) sayesinde erken tanı yapılabilmektedir ve bu sayede serviks kanserinin görülme sıklığındaki azalmada sitolojik taramaların önemli rolü olmuştur [71,72]. Serviks kanseri önceki yıllarda jinekolojik kanserler arasında ilk sırayı almasına rağmen günümüzde ikinci ve hatta üçüncü sıraya inmiştir [74]. Tüm dünyada yılda 400.000'in üzerinde serviks kanseri olgusu görülür ve her yıl yaklaşık 250.000 hasta serviks kanserinden ölür. Bu rakamların %80 gibi önemli bir bölümü geri kalmış ve gelişmekte olan ülkelerden gelmektedir. Bu nedenle serviks kanseri gelişmemiş ülkelerin önemli sağlık sorunlarından birisidir. Sağlık bakanlığı verilerine göre ülkemizde 9/100.000 oranında görülür [28]. Servikal kanserli hastaların ortalama tanı alma yaşı 51'dir [75].

Serviks kanserinin epidemiyoloji ve etiyolojisi

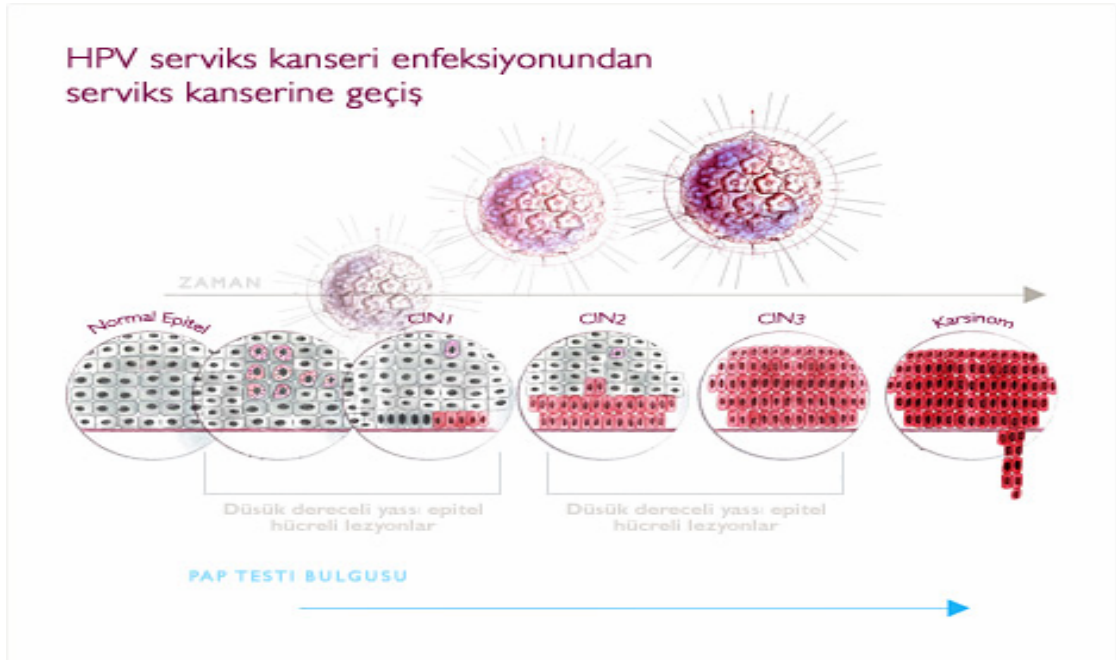
Serviks kanserinin oluşmasında pek çok faktör rol oynamaktadır, fakat hastalığın cinsel yaşamın başlamasıyla birlikte ortaya çıkması cinsel geçiş özelliğini ortaya çıkarmaktadır [62,63].

Servikal kanser risk faktörleri olarak, ilk ilişki yaşının küçük olması, çoğul cinsel partner, düşük sosyoekonomik düzey, sigara alışkanlığı, ırk, diyetel faktörler, kontrasepsiyon kullanımı, bağışıklık baskılanması, ve cinsel partnere ait özellikler değerlendirilir [64].

1960 ve 1970'lerdeki çalışmalarda Herpes Simpleks Virüs (HSV) Tip 2'nin servikal kanser ve prekanseröz lezyonların gelişiminde rol oynadığı düşünülmüştür, fakat sonradan yapılan çalışmalarda HSV ile servikal displaziler arasında herhangi bir anlamlı ilişki saptanamamıştır [65,66].

1970'li yıllarda Zur Hausen Human Papilloma Virüs (HPV) ile serviks kanseri arasındaki ilişki olduğunu bildirmiştir [67,68]. Günümüz mevcut verilerine göre servikal intraepitelyal neoplazilerin (CIN) oluşumunda HPV enfeksiyonları önemli bir rol oynamaktadır (Şekil 2.5).

Skumöz hücreli kanserlerin %95'inde, adenokarsinomların da %90'ında HPV enfeksiyonu belirlenmiştir [69]. Günümüzde tanımlanmış 70'den fazla HPV tipi mevcuttur. Bu virüsler mukokutenöz grup, epidermodisplazi grup ve anogenital grup olarak 3 başlıkta incelenebilir. Anogenital hastalıkların etkeni olan 35'ten fazla HPV tipi mevcuttur ve bunların yaklaşık 20-30 kadarı kanser oluşumunda rol oynamaktadır [70]. Günümüzde en sık görülen HPV tipleri 16 ve 18'dir. HPV 16 ve 18 servikal kanserlerin %62'sinde tespit edilmiştir [71].



Şekil 2.5. HPV enfeksiyonu ve serviks kanserine geçiş [79]

Serviks kanserlerinin patolojik özellikleri

Dünya sağlık örgütü habis serviks kanserlerini 3 ana histolojik tip altında toplamıştır. Skuamoz hücre kanserleri, adenokanserler ve diğerleri olarak sınıflandırılabilir [28,74].

Skuamoz serviks kanserleri

Büyük hücreli nonkeratinize olanlar, büyük hücreli keratinize olanlar, küçük hücreli olanlar ve verrüköz kanserler olmak üzere 4 alt grupta incelenmektedir. Skuamoz hücreli serviks kanseri hemen daima değişim bölgesinde metaplazik olayların anormal değişim göstermesi ile başlayıp CIN I, CIN II, CIN III ve mikroinvaziv kanser gibi lezyonlar ile devam eden bir sürecin sonucunda meydana gelir. Bunun yanı sıra çok nadiren değişim bölgesinin dışında yassı epitelde bazal hücre hiperaktivitesi ile başlayıp invaziv kansere dönen lezyonların olabileceği de bildirilmiştir [28,74]. Serviks kanserlerinin yaklaşık %70-80'i skuamoz hücrelidir [77].

Skuamoz kanserler farklılaşma derecelerine göre 3 aşamada değerlendirilirler. İyi farklılaşmış hücrelerden oluşmuş keratin incileri yapan tümörler 1. aşama, yoğun mitotik aktivite gösteren ileri derecede atipik hücrelerden oluşmuş tümörler ise 3. aşama olarak kabul edilirler [28,74].

Servikal adenokanser

Histolojik olarak endoservikal tip, endometroid tip, berrak hücreli kanser, adenoid kistik kanser, adenoskuamoz kanser ve adenoma malignum olmak üzere alt gruplara ayrılmaktadır. En sık görülen tip endoservikal tiptir ve olguların yaklaşık %50'sini oluşturmaktadır [76]. Serviks kanserinin yaklaşık %20'si adenokarsinomlardır [78]. Adenokarsinoma, endoservikal mukus üreten bez hücrelerinden gelişmektedir ve endoservikal gelişmesinden dolayı da klinik olarak uzun bir süre ortaya çıkmayabilir [75].

Küçük hücreli serviks kanseri

Serviksin nöroendokrin karsinomu olarak da adlandırılmaktadırlar. Tüm serviks malignitelerinin %5'inden daha azını oluşturmaktadırlar. Bu tümörler genel olarak kötü prognostik özellikler göstermektedir [80].

Diğer serviks kanserleri

Yukarıda sayılan histolojik tiplerden başka sarkom, lenfoma ve melanom gibi kötü huylu tümörler serviksten çıkabilirler [28, 74].

Serviks kanserinde klinik evrelendirme

Evre tümörün yayılım özelliklerini ifade eden bir sınıflama sistemidir. Jinekolojik kanserlere ait evreleme sistemi Uluslararası Jinekoloji ve Obstetrik Federasyonu (FIGO)'nun evreleme sistemidir (Çizelge 2.1) [28,74].

Çizelge 2.1. FIGO'nun serviks kanseri için klinik evreleme sistemi [28]

Evre 0: İntraepitelya karsinom.

Evre 1: Tümör yalnızca serviks içinde.

Evre 1a: Preklinik karsinom, tanı yalnızca mikroskopik incelemeyle konur.

Evre 1a1: 3 mm altında stromal invazyon mevcut.

Evre 1a2: Stromal invazyon derinliği 5 mm'den ve horizontal yayılım büyüklüğü 7 mm'den az tümör.

Evre 1b: Servikse sınırlı 1a2'den büyük tümör.

Evre 1b1: 4 cm altında tümör.

Evre 1b2: 4 cm üzerinde tümör.

Evre 2: Tümör parametrium veya vajinaya yayılmış.

Evre 2a: Tümör 2/3 üst vajinaya yayılmış, parametrium tümör yok.

Evre 2b: Tümör parametriumya yayılmış fakat kemik pelvis kadar ilerlememiş.

Evre 3: Tümör 1/3 alt vajinaya veya kemik pelvis kadar ilerlemiş.

Evre 3a: Tümör 1/3 alt vajinaya ilerlemiş.

Evre 3b: Tümör kemik pelvis kadar ilerlemiş veya böbrekte hidronefroz mevcut.

Evre 4: Tümör pelvis dışına yayılmış.

Evre 4a: Rektum ve mesane mukozasına yayılım var.

Evre 4b: Tümör uzak metastaz yapmış.

Serviks kanseri gelişiminde moleküler çalışmalar

Tümör DNA özellikleri, mikrodamar sayısı, matriks ve bazal membran parçalama enzimleri, ErbB proteinleri ve CR-1 proteini moleküler tanı faktörleri olarak kullanılmakta ve diğer kanserlerde olduğu gibi serviks kanserinde de moleküler tanı faktörleri önem kazanmaktadır [88, 89]. Ancak günümüz verilerine bakıldığında henüz moleküler tanı yöntemleri klinik uygulamalara girmemiştir.

Serviks kanserinde Human Papilloma Virus (HPV) aşısı

Etiyoloji'de HPV'nin anahtar rolü oynaması, bu virüse karşı aşı çalışmalarını teşvik etmiş ve oldukça etkin koruyucu aşılar geliştirilmiştir. Yakın gelecekte bu aşının kullanımının yaygınlaşmasıyla 20-30 yıllık bir süreçte serviks kanseri görülme sıklığı ve ölüm oranlarında azalmalar beklenmektedir [169].

Günümüzde 2006'da onaylanan quadrivalan (4'lü) ve 2007'de onaylanan bivalan (2'li) olmak üzere 2 çeşit HPV aşısı mevcuttur. Her iki aşının da adölesan dönemde uygulanması en yüksek bağışıklık yanıtını oluşturmaktadır [170]. Halen Amerikan İlaç Gıda Dairesi (FDA) ve Avrupa Komisyonu tip 6, tip 11, tip 16 ve tip 18 içeren HPV aşısı; servikal kanserlerin, yüksek dereceli servikal displazinin, prekanseröz servikal lezyonun, prekanseröz vulvar displastik lezyonların ve yaygın genital siğillerin (kondiloma akuminata) önlenmesi için onaylamıştır. Bu aşı 11-12 yaşlarında 3 doz olarak uygulanmaktadır. Bununla beraber 9-26 yaşlarında bu aşı uygulanabilir. Profilaktik HPV aşılarının düzenli servikal tarama ile birlikte HPV ile ilişkili hastalığa yakalananların sayısı ve ölümü üzerinde çarpıcı etkileri olacağı öngörülmektedir [171].

Toplumda HPV'nin onkojenik türlerinin yaygınlığına bağlı olarak aşının HPV enfeksiyonlarını %65-76 oranında önlediği kanıtlanmıştır. HPV 16 ve 18 suşlarına bağlı oluşan hastalıkları önlemede hem bivalan (2'li) hem quadravalan (4'lü) aşının

koruyuculuğu %90'ın üzerindedir. Bununla beraber quadrivalan (4'lü) aşının %100 etkin olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir [172].

2.3. Over

2.3.1. Over anatomisi, embriyolojisi ve histolojisi

Küçük 1.5-3 cm genişliğinde ve 1.5 cm kalınlığında yassı ve oval biçimli bir çift organ olarak pelvis boşluğunda bulunurlar. Yaklaşık olarak 4-6 gr ağırlığındadır. Ovaryumların iki önemli işlevi vardır. Birincisi, olgunlaşma sürecindeki oositlerle ovulasyonda atılan sekonder oositin kaynağıdır. İkinci işlevi ise, endokrin organ olarak görev yaparlar. Ovaryumlar korteks ve medulladan oluşurlar ve mezoovaryumla devam eden yassılaştırmış tek katlı epitelyum ile örtülüdür. Kortekste özelleşmiş bir stroma ve değişik fazlarda foliküller bulunmaktadır. Medulla ise hiler bölgede yer almaktadır ve kan damarları ile fibromusküler tabakayı içermektedir [23, 28].

2.3.2. Over kanseri

Kadın kanserleri arasında en sık görülen 5. kanserdir. Jinekolojik kanserler arasında 2. sıklıkta görülmektedir. Total kadın kanserlerinin %4'ünü, jinekolojik kanserlerin %27'sini oluştururlar. Tanıda olguların %70'i ileri evrede bulunmaktadır. En öldürücü jinekolojik kanser over kanseridir [81,82].

Over kanserinin epidemiyolojisi ve etiyolojisi

Over kanserinin ortalama tanı yaşı 63'tür. Yaşla birlikte over kanserlerinin görülme sıklığı artmaktadır. En yüksek görülme sıklığı 75-79 yaş grubundadır. Görülme sıklığı 40-44 yaş grubunda yaklaşık olarak 16/100.000 iken, 50 yaşın üzerinde 35/100.000'e, 75-79 yaş grubunda ise 54/100.000'e çıkar [83, 84]. 30 yaş altında bu risk çok azdır [83]. Genel olarak söylenirse bir kadının hayatı boyunca over

kanserine yakalanma riski%1.4'tür. Görülme sıklığı açısından ülkeler arasında homojen bir dağılım bulunmamaktadır. Over kanseri endüstriyel kuzey Avrupa ve Amerika gibi gelişmiş ülkelerde daha sık görülmektedir [28].

Over kanserinin en önemli risk faktörlerinden birisi ailede over kanseri olma durumudur. Eğer ailede birden fazla over kanserli akraba bulunursa bu risk daha da artmaktadır [86,87]. Toplam over kanserlerinin %10'u kalıtsaldır ve otozomal dominant olarak kalıtım göstermektedir.

Over kanseri gelişiminde moleküler çalışmalar

Over kanserlerinde kromozom bozuklukları ilk kez 6 numaralı kromozomun uzun kolunda delesyonla ortaya çıkarılmıştır. Sonra kromozom 14'te delesyon ve kromozom 1, 2, 3, 4, 5, 9, 10, 11, 15, 19'da yapısal anomaliler belirlenmiştir. Over kanserinde belirlenen proto-onkogenler *c-mos*, *c-fms*, *c-erbB1*, *her-2/neu* ve *ras* genleridir. Tümör baskılayıcı bir gen olan *p53* geninin baskılanması over hücrelerinde neoplastik değişikliklere yol açabilmektedir [28]. *p53* geninin ileri evre tümörlerinde sıklıkla mutasyonlarına rastlanmaktadır ve aşırı ifade edilmesi de çok sık görülmektedir [90]. *Her-2/neu* geni üzerinde aşı çalışmaları yapılmaktadır [91].

Over kanserlerinin klinik olarak evrenmesi

Evre tümörün yayılım özelliklerini ifade eden bir sınıflama sistemidir ve FIGO'nun evreleme sistemi kullanılmaktadır (Çizelge 2.2)

Çizelge 2.2. FIGO'nun over kanseri klinik evrelemesi [28]

Evre 1: Overlerde sınırlı tümör.

Evre 1a: Tek overde sınırlı tümör; dış yüzeyde tümör veya malign hücre içeren asit veya yıkama sıvısı yok; kapsül intakt.

Evre 1b: Her iki overle sınırlı tümör; dış yüzeyde tümör veya malign hücre içeren asit veya yıkama sıvısı yok; kapsül intakt.

Evre 1c: Tek veya her iki overle sınırlı tümör; ancak malign hücre içeren asit veya yıkama sıvısı, dış yüzeyde tümör mevcut; kapsül yırtılmış.

Evre 2: Pelvik yayılım gösteren tek veya her iki overle sınırlı tümör.

Evre 2a: Uterus ve/veya tüplere yayılım gösteren tümör.

Evre 2b: Diğer pelvik dokulara yayılım gösteren tümör.

Evre 2c: Tümör evre 2a veya 2b; ancak malign hücre içeren asit veya yıkama sıvısı veya dış yüzeyde tümör mevcut; veya kapsül yırtılmış.

Evre 3: Pelvis dışında peritoneal implantlar ve/veya retroperitoneal ve/veya inguinal lenf nodu tutulumu mevcut.

Evre 3a: Abdominal peritoneal yüzeylerde histolojik olarak kanıtlanmış mikroskopik yayılım; lenf nodu tutulumu yok.

Evre 3b: Abdominal peritoneal yüzeylerde 2 cm'yi aşmayan makroskopik implantlar mevcut; lenf nodu tutulumu yok.

Evre 3c: Abdominal peritoneal yüzeylerde 2 cm'nin üzerinde implantlar mevcut ve/veya retroperitoneal veya inguinal lenf nodları mevcut.

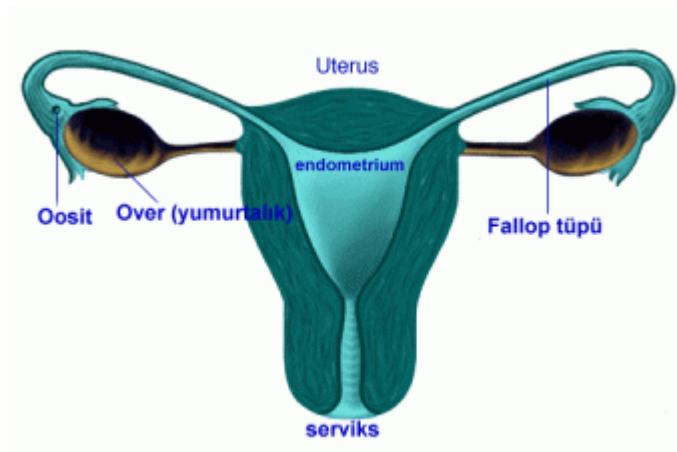
Evre 4: Uzak metastaz.

2.4. Endometrium

2.4.1. Endometriumun anatomisi, embriyolojisi ve histolojisi

Uterus'un mukozası tuba uterina'nın fibrillerinin bulunduğu uca kadar uzanmaktadır. Alt kısımda da vajinanın mukozası ile devam eder. Corpus uteri'nin mukozası ovarial döngü nedeniyle sürekli değişmektedir. Döngü boyunca çoğalma, salgılama, epitelyum tabakasının soyulması ve yenilenme devrelerinden geçmektedir. Embriyonun beslenmesini sağlamaktadır ve endometrium'da bol miktarda kan damarları ve bezler bulunmaktadır [28].

Endometrium uterusun tunika mukozasıdır. Gelişen embriyonun implante olmasına ve plasantanın maternal bölümünün oluşmasına elverişli bir yapıdır. Uterus mukozası basit prizmatik epitelle lamina propriyadan meydana gelmiştir. Yüzey epiteli ise silsile prizmatik salgı hücreleri ile sili hücrelerden meydana gelmiştir. Endometriumda çok sayıda bez bulunmaktadır. Bu bezler oldukça uzun tübüler bezlerdir. Uterus bezleri sili hücre içermezler. Endometrium iki tabakadan oluşmaktadır. Endometrium fonksiyonalis, endometriumun yüzey tabakasıdır ve kalın olan bu tabaka menstruasyon esnasında dökülmektedir. Endometrium bazalis ise oldukça ince olup, menstrual döngüde dökülen endometrium fonksiyonalisin yenilenmesini sağlamaktadırlar [28].



Şekil 2.6. Over, endometrium ve serviksin konumları [85]

2.4.2. Endometrium kanseri

Endometrium kanseri gelişmiş ülkelerde kadın genital sistem kanserleri arasında en sık görülen kanserdir. Endometrium kanseri meme, kolon, akciğer kanserlerinden sonra kadınlarda en sık görülen dördüncü kanser türüdür [92, 93]. Endometrium kanseri genel olarak postmenopozal dönemdeki kadınlarda görülmektedir, 55-59 yaşlarında görülme sıklığı en üst noktaya ulaşır ve sonrasında azalmaktadır [94-96]. Sağlık Bakanlığı verilerine göre ülkemizde kadın genital sistem kanserleri, kanser ölümleri arasında ikinci sırada yer almaktadır ve serviks kanseri 8. sıradayken endometrium kanseri 10. sırada görülmektedir [28].

Endometrium kanserinin epidemiyoloji ve etiyolojisi

Yapılan araştırmaların sonucuna göre her 100 kadından 2-3'ü hayatı boyunca endometrium kanseri geçirme riskine sahiptir [97].

Endometrium knaserinin iki patogenetik tipi olduğu bilinmektedir. Daha sık rastlanan tipi endojen ya da eksojen karşılanmamış östrojene maruz kalmış, genç perimenopozal kadınlarda görülür, östrojen bağımlıdır ve daha iyi differansiye olurken diğer endometrium kanserinde endometriumu uyacak östrojen kaynağı bulunamayan kadınlarda görülmektedir. Daha az differansiye olmaktadır ve östrojen bağımlı olmayan bu tümörler daha yaşlı, postmenopozal kadınlarda görülmektedir [98].

Endometrium kanserinin gelişimi için birçok risk faktörü bulunmaktadır. Karşılanmamış östrojene maruz kalmayı arttıran faktörler endometrium kanseri riskini arttırırken, azaltan faktörler veya progesteron düzeyini artıran faktörler endometrium kanseri riskini azaltmaktadır (Çizelge 2.3) [99].

Çizelge 2.3. Endometriyum kanserinin risk faktörleri [28]

Artıran faktörler	Azaltan faktörler
Erken yaşta menarş	Kombine oral kontraseptifler
Geç menopoz yaşı	Sigara kullanımı
Nulliparite	Yağdan fakir diyet
Polikistik over sendromu	Egzersiz
Tamoksifen	Artmış parite
Hormon replasman tedavisi (HRT)	Diyette yüksek protein, sebze ve lifli yiyecekler
Obezite	Vitamin C, folat ve keratin alımı
Hipertansiyon	
Diyabet	
Yüksek sosyoekonomik düzey	
İnfertilite	

Endometrium kanserinin görülme riski 45 yaşından sonra artar ve 55-60 yaş dolaylarında en üst noktaya ulaşır. Tüm vakaların %75'i 55-60, %5-8'i 30-40, %2'si 20-30 geriye kalanlar ise 40-50 yaşları arasındadır [93, 96]. İdeal vücut ağırlığının 22 kg ve daha fazla geçen kadınlarda endometrium kanser riski 2-3 kat kadar artış gösterdiği bilinmektedir [100]. Term gebelik, kombine oral kontraseptif kullanımı (1 yıl veya daha fazla süreyle) ve düşük sayısının artması genç yaşta görülen vakalarda kanser riskini azaltabilmektedir. Diyetle bakıldığında doymamış yağ kullanımı, kalsiyum alımı, yüksek protein ve enerji alımı, liflerden zengin besinlerin alımı, sebze tüketimi, folat-karoten-vitaminden zengin besinlerin alımı endometrium kanser riskini düşürebilmektedir [101]. Diyabetes mellitus endometrium kanser riskini 1,3-2,8 kat arttırdığı bilinmektedir, fakat endometrium kanseri için direk bir risk faktörü değildir aynı şekilde hipertansiyon doğrudan bir risk faktörü olmasa bile endometrium kanseri ile birlikte görülebilmektedir [49, 102]. Sigara kullanma alışkanlığı diğer kanserlerde hastalığın görülme sıklığını arttırmasına rağmen

endometrium kanserinde azalttığı bildirilmiştir. Sigaranın bu etkisini over dışı hormon mekanizmasını etkileyerek yaptığı düşünülmektedir [28, 103].

Tamoksifen kullanımına bakıldığında ise, tamoksifen meme kanseri tedavisinde kullanılmakta olup endometrium kanserinin gelişim riskini 7-8 kat arttırdığı bilinmektedir [100]. Kadınları etkileyen endokrin bozukluklardan biri de polikistik over sendromudur (PCOS). PCOS'lu hastalarda karşılanmamış östrojen etkisi nedeniyle endometrium kanser riski artmaktadır [104].

Endometrium kanserinde evreleme

Endometrium kanserinde 1988 yılına kadar klinik evreleme kullanılmıştır fakat hastaların toplamına bakıldığında %13-22 kadarında eksik evreleme olması sebebiye FIGO 1988 yılında cerrahi evreleme sistemini önermiştir. Hastaların %78'i evre 1, %9'u evre 2, %11'i evre 3, %2'si evre 4'te tanı almaktadır (Çizelge 2.4.) [105].

Endometrium kanserinde moleküler çalışmalar

Endometrium kanserinde onkogenler ve tümör baskılayıcı genler önem taşımaktadır. Onkogenler normal hücrelerin büyüme yollarındaki uyarıcı proteinleri kodlarken tümör baskılayıcı genler tam tersi bir etki göstermektedirler. Endometrium kanserinin yaklaşık %20'sinde artmış DNA içeriği (anöploidi) görülmektedir. Anöploidi ileri evre tümörlerinde, kötü histolojik özelliklere sahip tümörlerde ve artan ölüm miktarı ile birlikte görülmektedir. Endometrium kanserinde en sık etkilenen onkogenler *K-ras* ve *HER-2/neu*, tümör baskılayıcı genler ise *p53*, *PTEN*, *HMLH1* genleridir [28]. Endometrium kanserinde tümör baskılayıcı genlerin bulunduğu gen bölgeleri 1, 3p, 6, 8p, 9p, 10q, 11, 13, 14q, 15, 16q, 17p, 18p, 20, 21 ve 22q kromozomlarının lokuslarında heterozigotluk kaybı olduğu belirlenmiştir [106, 107].

Çizelge 2.4. FIGO'nun endometriyum kanseri cerrahi evrelemesi [28]

Evre 0: Primer tümör bulunmuyorsa. İn situ karsinom varlığı

Evre 1: Tümör korpus uteriye sınırlıdır.

Evre 1a: Tümör endometriuma sınırlıdır.

Evre 1b: Tümör miyometriumun ½'sinden azına invazyon göstermektedir.

Evre 1c: Tümör miyometriumun ½'sinden fazlasına invazyon göstermektedir.

Evre 2: Servikte tutulum vardır ancak tümör hala uterus sınırlıdır.

Evre 2a: Sadece endoservikal glandüler tutulum.

Evre 2b: Servikal stromal invazyon.

Evre 3: Lokal ve/veya bölgesel yayılım.

Evre 3a: Seroz veya adneksial tutulum

Evre 3b: Vajinal tutulum

Evre 3c: Pelvik veya para-aortik metastaz.

Evre 4:

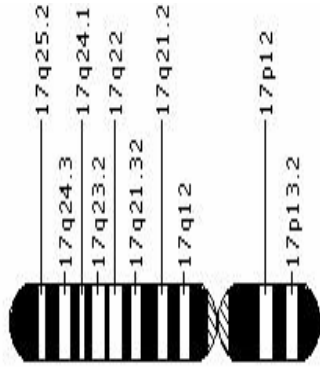
Evre 4a: Mesane veya barsak mukozası tutulumu.

Evre 4b: Uzak metastaz varlığı

2.5. *p53* geni

Kanserin moleküler yapısının incelenmesinde üzerinde en yoğun çalışmaların yapıldığı tümör baskılayıcı gen *p53* genidir.

p53 geni 17. kromozomun kısa kolunda (p) yerleşmiştir (17p13.1) ve 53 kDa ağırlığında 393 aminoasitlik bir çekirdek fosfoproteini kodlamaktadır [38, 39, 41]. 11 ekzon ve 10 intron içermektedir ve 5. ve 8. ekzona karşı gelen protein bölgesi ile DNA'ya bağlanmaktadır [110].



Şekil 2.7. 17. kromozomda *p53* geninin yeri [108]

p53 geninin ürünü olan protein P53 proteini yaklaşık 20 dakikalık kısa yarı ömre sahip olduğu için normal hücrelerde tespit edilemez. İnsan kanserlerinin çoğunda P53 proteini üretilmez ya da *p53* genindeki mutasyon sebebiyle hatalı olarak üretilir [37]. P53 proteini 393 aminoasit içermektedir, 50-60 aminoasitten oluşan asidik amino terminal bölgeyi oluşturur ve bu bölge *p53*'ün transaktivasyonel özelliklerinden sorumludur. 91-301 aminoasitleri arasındaki kısım yüksek korunmuşluğa sahiptir ve bu bölge prolin bakımından zengin olup DNA bağlanma bölgesidir. Transkripsiyonel aktivasyona uğrayacak genlerdeki hedef diziler ile etkileşir. İnsan tümörlerindeki mutasyonların çoğu bu bölgede görülmektedir. 300-350 aminoasitler arasındaki bölge nükleer lokalizasyon sinyal (NLS) bölgesidir. Bu bölgedeki mutasyonlar, primer olarak sitoplazmada bulunan bir proteinle sonuçlanır. Bu bölge aynı zamanda P53 proteininin oligomer oluşturma yeteneğinden de sorumludur. Yabancıl tip P53 proteini normalde G1 fazı boyunca kısa süreyle sitoplazmada bulunur ve S fazında çekirdeğe girer. Yabancıl tip P53'ün tümör baskılayıcı etki gösterebilmesi için çekirdek içerisinde bulunması gerekir. P53 proteininin çekirdek yerleşimi NLS ile belirlenir [37, 113-115].

P53 molekülü normal durumda aktif halde değildir, DNA hasarı olması durumunda aktif hale geçer. P53 molekülünün aktif hale geçmesi için düzenleme bölgesinde bulunan 371, 376, 378. kodonlardaki serin aminoasitlerinden fosforillenmesi

gerekmektedir. Bu bölgedeki fosforilasyondan kazein kinazII ve protein kinaz-C enzimleri sorumludur [115]. DNA transkripsiyonu üzerinde etkili olan pekçok genin ifade edilmesi *p53* geni tarafından düzenlenmektedir. Yabancıl tip P53 proteini P53 bağlanma bölgesi içeren genlere bağlanarak büyümeyi durduran genlerin ifadesini uyarır. P53'ün aktif hale gelmesiyle büyümenin durdurulması ya da hücre ölümü (apoptoz) olayları gerçekleşmektedir. Hücre çoğalması hücre döngüsü boyunca kontrol edilir [42, 43]. Hücre döngüsünün kontrolü genelde protein kinazlar ve siklinler ile sağlanmaktadır. Hücre döngüsünde görev alan protein kinazlar siklin bağlı kinazlar (cdk) olarak adlandırılmaktadır [42, 115]. Hücre döngüsünün G1 fazında *p53*, hücre döngüsünün ilerlemesini durduran bir kontrol noktasını uyarır. Bu kontrol noktası bir cdk inhibitörü olan *p21*'i uyarır ve böylece hücre S fazına girmeden önce hasar gören DNA' nın da onarılmasını sağlar. Eğer hücre bölünme aşamasındaysa *p53* hücre ölümünü tetikler [116].

2.5.1. *p53* geninde görülen polimorfizmler

İnsan *p53* geninde en az 10 farklı polimorfizm tanımlanmıştır. Bu polimorfizmlerden en yaygın görülenlerinden çoğu genin kodlayıcı olmayan bölgelerinde (intron) görülürken, kodlayıcı olan bölgelerdeki (ekzon) polimorfizmlerden sadece ikisinde aminoasit dizisi değişmektedir. Bu polimorfizmler 47. kodonda prolin serine, 72. kodonda ise arjinin proline dönüşmektedir [117].

p53 72. kodon polimorfizmi ve kanser yatkınlığı

İnsan popülasyonlarında yabancıl tip P53 proteininin iki tipi bulunmaktadır. Bu tiplerde 72. kodonda argininin (Arg) bir prolin (Pro) ile değişmesidir ve bu değişim sonucu yapısal olarak değişmiş bir protein oluşmaktadır. 3 farklı genotip oluşmaktadır. Bunlar homozigot arjinin (Arg/Arg), homozigot prolin (Pro/Pro) ve heterozigot (Arg/Pro)' tur. *p53* tümör baskılayıcı genindeki bu polimorfizm kansere yatkınlık ile yakından ilişkilidir. Akciğer, meme ve kalın bağırsak kanserlerinde *p53* polimorfizminin prolin varyantı bir risk faktörü olarak bilinmektedir [117-119].

Serviks kanserli hastalarda yapılmış bir çalışmanın sonucunda 72. kodon arjinin homozigotluğu kanser için bir risk faktörü olarak belirtilmiştir [120].

2.6. Metilentetrahidrofolat Redüktaz (MTHFR)

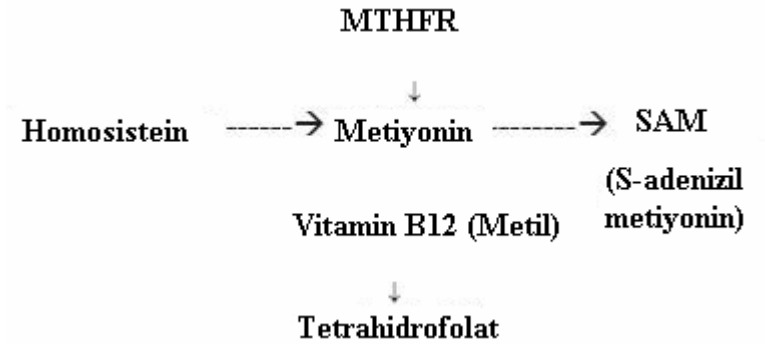
2.6.1. MTHFR enzimi

5,10-metilentetrahidrofolat redüktaz enzimi, bir flavoproteindir ve MTHFR enzim ailesinin bir üyesidir [128, 129]. Yaklaşık 70 kDa iki benzer alt birimi içermektedir [129].

Yapılan çalışmalar sonucunda enzimin katalitik bölgesi olan N-terminal ucu substrat ve koenzimlerin bağlanma kısımlarına sahip olup, bu uca NADPH, FADH ve 5,10-metilentetrahidrofolat bağlanır. Enzimin regülatör bölgesi olan C-terminal uç bölgesine ise S-adenozil metiyonin (SAM) inhibitörü bağlanır [128, 130].

MTHFR, 5,10-metilentetrahidrofolatın 5-metiltetrahidrofolata (THF) dönüşümünü gerçekleştirir [131].

MTHFR, folat metabolizmasını düzenleyen anahtar enzim olarak, 5,10-metilentetrahidrofolatın 5-metiltetrahidrofolata (THF) değişimini katalizleyerek homosistein metabolizmasında rol alır. Folat serumda ve diğer vücut sıvılarında farklı şekillerde bulunmasına rağmen, plazmada bulunduğu asıl tip 5-metiltetrahidrofolattır ve bu form homosisteinden metiyonin sentezlenmesi için gerekli olan metil grubunu taşımaktadır [132-134]. B₁₂ vitamini 5-metiltetrahidrofolat metil grubu alıcısı olarak görev yapar. Bu vitaminin eksikliği ile, tetrahidrofolatın folat havuzu içine tekrar girmesini sağlayamaz. Metiyonin sentetaz reaksiyonundaki bu başarısızlık metiyonin eksikliğine sebep olur ve organizmada homosistein metabolizmasını önemli ölçüde etkiler [132, 133, 135].

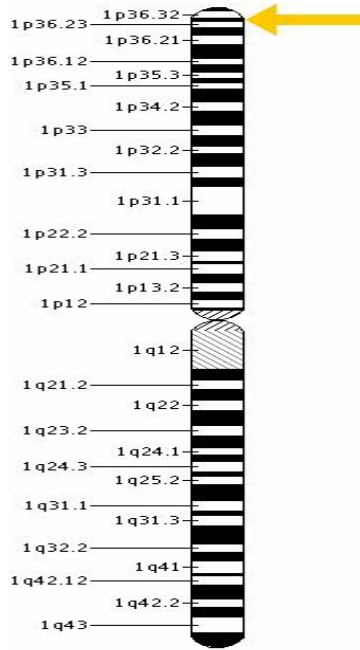


Şekil 2.8. B-12 metabolik reaksiyonu [158]

2.6.2. *MTHFR* geni

İnsan *MTHFR* geni kromozom 1p36.3 de yer almaktadır ve 656 aminoasitten oluşan MTHFR enzimini kodlar [136]. *MTHFR* geni, 77 kDa oluşan birbirine eş iki altbirimi kodlar. Bu alt birimlerden her biri N-terminal ucu (40 kDa) ve C-terminal ucu 37 (kDa) içerir. İnsan genomik klonu 2,2 kb uzunluğundaki *MTHFR*, cDNA sekansının tamamını içermektedir. Her biri 102-432 baz çifti uzunluğunda olan 11 ekzon ile 250 baz çifti-1,5 kilobaz uzunluğunda farklı büyüklüklerde intronlar içermektedir. Sadece bir intronun uzunluğu 4,2 kilobazdır [133]. *MTHFR* geninin promotor bölgesinin transkripsiyon faktörlerine bağlanması için belirli korunmuş dizilere sahip olduğu fakat TATA kutusu içermediği belirlenmiştir [136-139].

İnsan ve fare *MTHFR* geninde yapılan çalışmaların sonucunda, *MTHFR* geninde 15 farklı mutasyon ve polimorfizm görüldüğü saptanmıştır. Bu gende görülen mutasyonlar, kardiyovasküler ve serebrovasküler hastalıklar, venöz tromboz, diabet, nöral tüp defekti, böbrek yetmezliği ve özellikle kolon kanseri ve endometrium kanseri gibi hastalıklarda önemli bir risk faktörüdür [128, 136, 139].



Şekil 2.9. 1. Kromozomda *MTHFR* geninin lokalizasyonu [159].

2.6.3. *MTHFR* geni C677T polimorfizmi

MTHFR C677T polimorfizminde, 4. ekzonda 677. nükleotid olan Sitozinin → Timin' e değişimi sonucu bir nokta mutasyonu oluşmaktadır ve bu mutasyonda genin ürünü olan proteinin 226. pozisyonunda alanin aminoasiti yerine valin geçmektedir. Alanin/Valin değişimiyle *MTHFR* aktivitesinde azalma görülmekte, bu azalma 5-metiltetrahidrofolat düzeyinde azalmaya, sonuç olarak da homosisteinin metiyonine dönüşmemesine neden olmaktadır. Böylece plazmadaki homosistein düzeyinde artış olurken, plazma folat seviyesinde de azalış görülmektedir [128,140-144].

MTHFR geninde 677. nükleotidin her iki allelde mutasyona uğramadan CC (Alanin/Alanin) homozigot normal genotipi, iki allelden birinde mutasyon oluşmasıyla CT (Alanin/Valin) heterozigot ve her iki allelde de mutasyon oluşması durumu TT (Valin/Valin) homozigot mutant genotipi oluşması sebebi ile genin kodladığı enzimin aktivitesinin azaldığı düşünülmektedir [144].

MTHFR C677T polimorfizminin, kardiyovasküler hastalıklar, inme, nöral tüp defekti, Down sendromu, meme ve endometrium kanseri için genetik bir risk faktörü olduğu bildirilmiştir. Yapılan araştırmalar sonucunda, MTHFR C677T polimorfizminin TT genotipinin akut lösemi, kolon ve akciğer kanseri riskini azaltırken, endometrium kanseri riskini arttırdığı ileri sürülmüştür [128,146,147].

MTHFR aktivitesi, homozigot normal 677CC ve heterozigot 677CT genotipine sahip bireylere oranla homozigot mutant 677TT genotipine sahip bireylerde azalırken bu bireylerde homosistein seviyesinde artış olduğu gözlenmiştir. MTHFR' nin eksik olması durumunda homosisteinden metiyonin oluşumunda meydana gelen bozukluk organizmada hem metiyonin azalmasına hem de homosistein birikimi nedeniyle toksik etkilere sebep olur [128].

MTHFR polimorfizmi nedeniyle azalan enzim aktivitesinin tümör baskılayıcı genlerin hipometilasyonunu ve kararlılığını etkilediği bildirilmiştir [148].

MTHFR C677T mutasyonunun toplumda görülme oranı %12 olduğu bilinmektedir. Yapılan çalışmalarla Türk toplumunda sağlıklı bireylerde homozigot mutant oranı %5 iken, heterozigot mutant oranının ise %33 olduğu belirlenmiştir [144,145].

2.6.4. MTHFR C677T ve kanser

MTHFR aktivitesinin DNA sentez, tamir ve metilasyonundaki etkisi *MTHFR*' nin karsinogenezele ilişkili bir gen olduğunun göstermektedir [149].

Folat türevleri, DNA'nın sentezlenmesinde ve metilasyonunda görevli önemli yapıtaşlarındandır. Bu sebeple folat eksikliği kanser oluşumu ile ilişkilendirilmektedir. Homozigot mutant genotipte (677TT) düşük serum folat ve yüksek plazma homosistein çeşitli kanserler ile bağdaştırılmıştır [150].

Kolon kanseri ile yapılan çalışmalarda MTHFR 677TT polimorfizminin kolon kanseri riskini azaltırken 677CC ve 677CT genotiplerinde kanser riskini arttırdığı belirlenmiştir [151,152]. 677TT polimorfizminde folat alınımları arttıkça, bireylerde pürin ve timinin sentezlenmesi için artan 5,10-metilentetrahidrofolat seviyesinin de arttığı buna bağlı olarak da kanser riskinin azaldığı belirtilmiştir [153].

MTHFR polimorfizmi endometrium kanseri, servikal intraepitelyal neoplazi, meme ve ovaryum kanseri ile ilişkilidir [154]. 677TT polimorfizminin artan endometrium kanseri riskiyle ilişkili olduğu bildirilmiştir [155].

2.7. Moleküler Teknikler

2.7.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Kary Mullis tarafından 1980 yılında geliştirilen Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR), bir organizma veya bir mutant gene ilişkin, sağlam veya parçalanmış DNA veya RNA parçasının *in vitro* olarak çoğaltılmasını sağlayan bir yöntemdir [17].

PZR reaksiyonun ilk adımında, çoğaltılacak DNA denatüre edilerek tek zincirli hale getirilir. Çift zincirli DNA, tek zincirli hale gelene kadar ısıtılır (90-95 °C de, yaklaşık 5 dakika süreyle). Sıcaklık 50-70 °C arasında bir değere düşürülerek, primerlerin tek zincirli hale getirilmiş DNA'ya bağlanması sağlanır. Bu primerler yapay oligonükleotitlerdir ve 15-30 nükleotit uzunluğundadırlar. DNA sentezi, Taq DNA polimeraz'ın ilave edilmesi ile 70-75 °C sıcaklıklarında gerçekleşmektedir. Enzim nükleotitleri 5' den 3' ne doğru ekleyerek hedef DNA' nın iki zincirli kopyasını oluşturmaktadır [2].

PZR reaksiyonunda 3 temel basamağı; DNA ipliklerinin birbirinden ayrılması, primerlerin bağlanması ve polimeraz enzimi ile zincirin uzamasıdır [2]. Bu döngüler tekrarlanarak istenen sayıda hedef DNA bölgesi elde edilmektedir. Bir döngü 3-5 dakika sürer ve bu olay 20-40 kez tekrarlanır. Her döngüde oluşan ürün bir öncekinin

2 katıdır. Böylece yaklaşık 25-30 döngülük bir reaksiyon sonucu yaklaşık 1 milyon DNA kopyası elde edilebilir [17].

2.7.2. Agaroz Jel Elektroforezi

İlk defa Arne Tiselius tarafından geliştirilen elektroforezin çalışma ilkesi, molekül ağırlığı ve molekülde bulunan elektrik enerjisinin jel içinden bir yükten diğerine giderken kat ettiği mesafe farklılıklarını ele almaktadır [18]. Bu teknikle, farklı uzunluklardaki DNA ve RNA zincirlerine ait parçalar birbirlerinden ayrılabilir [2].

Agaroz jel elektroforezi 200-50.000 baz çiftleri (bç) boyutları arasındaki DNA moleküllerini tanımlamakta kullanılır [18]. DNA'nın elektroforezle analizinin temeli, molekülün elektriksel bir alanda, jel üzerinde (-) yüklü DNA molekülünün (+) yüklü alana doğru hareket etmesidir. Göç hızı molekül büyüklüğüne ve yapısına, jelde kullanılan maddenin yoğunluğuna, iyonik kuvvete ve uygulanan alana bağlı olarak değişmektedir. Jel elektroforezinde kullanılan destekleyici madde olarak kullanılan agaroz, *Agar agar* adlı algden elde edilmektedir. Elektroforez tamamlandıktan sonra, çeşitli büyüklüklerdeki molekülleri temsil eden bantlar, molekülün bileşenlerinden biri radyoaktif işaretli ise otoradyografi ile ya da nükleik asitlere bağlanan floresan bir boya ile görüntülenir [2].

2.7.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu-Restriksiyon Fragmentleri Uzunluk Polimorfizmi (PZR-RFLP)

Nükleik asit seviyesinde yapılacak incelemeler için Restriksiyon Fragmentleri Uzunluk Polimorfizmi (RFLP) tekniği DNA dizisinde olan değişiklikleri dolaylı olarak belirleyen bir metottur [111]. Restriksiyon enzimleri (RE) çok özgül olarak DNA'yı belli bölgelerden keserek genellikle 1.000-20.000 baz çiftlik parçalar oluşturan enzimlerdir. Sıklıkla kullanılan RE arasında *EcoRI*, *ClaI*, *HindIII*, *Hinfi* sayılabilir. DNA'nın istenilen bölgesi uygun primerlerle çoğaltıldıktan sonra DNA bu enzimlerden bir veya birkaçı ile kesilir. Daha sonra agaroz jel elektroforezinde

yürütülür. Etidyum bromür ile boyanan jelde oluşan DNA bantlarının yeri ve sayısı kıyaslanarak oluşan çeşitliliğe RFLP adı verilir. DNA'lar restriksiyon enzimi adı verilen enzimlerle küçük parçalara ayrılabilir [112]. Bu enzimler 4-8 baz çifti uzunluğunda özgün bir dizisini tekrarlanabilir bir şekilde keser. DNA'nın RE ile muamelesi sonucunda çeşitli uzunlukta DNA parçaları oluşmaktadır [111].

2.7.4. DNA Dizi Analizi

DNA dizi analizleri DNA'nın nükleotid diziliminin belirlenmesinde kullanılan yöntemlerdir. Analiz bir nükleik asit dizisinin diğerine hibridizasyonuna dayanır. Bu hibridizasyon sırasında radyoaktif ya da radyoaktif olmayan florasan maddelerle işaretleme yapılır. Sıklıkla gen mutasyonları (delesyon, insersiyon vb.) tespiti ya da DNA dizilerinin tayininde kullanılır. Ayrıca gen ifadesinin düzenlenmesinde yer alan genetik kontrol bölgeleri, korunmuş diziler, epistatik genler ve etkileri belirlenebilmektedir [111].

İlk dizi analiz çalışmaları 1960'lı yılların başında 75-80 nükleotitlik tRNA'larla başlamıştır. İlk olarak maya alanin tRNA dizi analiz teknikleride gelişmektedir. Nükleotit dizilein belirlenmesinde iki temel teknik kullanılmaktadır. Bunlar, Sanger dideoksi yöntemi ve Maxam-Gillbert kimyasal parçalanma yöntemidir. Her iki teknik de üç temel basamaktan oluşmaktadır.

- DNA'nın hazırlanması
- Reaksiyonlar
- Yüksek voltajlı jel elektroforezi

Her iki analiz sırasında da tek iplikçikli DNA parçaları hazırlanır. DNA dizi analiz yöntemi arasındaki temel fark DNA fragmentlerinin üretilme biçiminden kaynaklanır. Sanger dizi analiz yöntemi dideoksi ya da zincir sonlanması reaksiyonları olarak da bilinir. Tehlikeli kimyasallardan uzak ve daha hızlı bir yöntem olduğundan Maxam-Gilbert yöntemine tercih edilir [2,111]

Sanger-Coulson zincir sonlandırma yöntemi

Fred SANGER ve arkadaşlarının geliştirdiği yöntem olan zincir sonlanma yöntemidir ve enzimatik DNA sentezine dayanmaktadır. Bu yöntemde dizisi saptanacak olan DNA ipliği yeni sentezlenecek iplik için kalıp olarak kullanılır. Yöntemin temeli DNA polimerazın dNTP'lerin (deoksiribonükleozit trifosfat) yanı sıra deoksiribozun 3' pozisyonunda OH grubu taşımayan ddNTP'leri de (dideoksiribonükleozit trifosfat) substrat olarak kullanabilmesine dayanır.

Sentezlenen DNA'ya bir ddNTP'nin katılması 3' pozisyonunda OH grubu olmadığı için sentezi durdurur. Dizi analizi yapılırken dört ayrı reaksiyon karışımı hazırlanır. Her bir karışım kalıp DNA zinciri, bir primer, dört dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) ve az miktarda ddNTP'lerden birini (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP) içerir. Özgül zincir sonlanması için her bir reaksiyonda farklı bir ddNTP bulunur. Reaksiyonların her birinde çok az miktarda modifiye nükleotit kullanıldığı için yeni zincir sentezi rastgele sonlanarak bir dizi DNA fragmenti meydana gelir.

Reaksiyonlar sonucu elde edilen DNA parçalarına elektroforez uygulanarak jel üzerinde yanyana yürütülür. Uygulanan elektrikselsel alanın etkisi ile DNA parçacıkları en kısası en önde olmak üzere jel üzerinde bir merdiven görüntüsü oluşturur. İşaretleme yöntemine göre jel üzerinde, tespit edilen parçacıklar reaksiyon karışımına konulan ddNTP'nin tipine göre okunur [2,111,160]

Maxam–Gilbert Kimyasal Degredasyon Yöntemi

Bu yöntemde DNA özgün nükleotid dizilerinden bazı kimyasallar aracılığıyla kesilerek değişik uzunlukta fragmentler elde edilmektedir. DNA'daki nükleotidlerin tahrip edilip hasar görmüş bölgelerinden piperidin ile fosfodiester bağlarının kırılması esasına dayanır. Çok fazla tercih edilmemektedir [160].

Otomatik DNA Dizi Analizi

Otomatik analizde, Sanger'in enzimatik DNA sentezine dayanan zincir sonlanma yöntemi kullanılmıştır. Otomatik DNA dizi analiz cihazları basit olarak, sabit bilgisayarda yüklü programlar ile bu programların yönettiği elektroforez sistemini içermektedir. Elektroforetik ünitelerde bulunan lazer ışık kaynağı ile monokromatik bir ışık oluşturulur. Söz konusu DNA'nın bulunduğu jelmatriks bu monokromatik ışık ile taranır. Elektroforez süresince DNA'ya bağlanan floresan boya ışık ile taranan bölgeye geldiğinde uyarılır. Uyarılan boya kendi için karakteristik olan dalga boyunda ışığı geri yansıtır. Yansıyan bu ışık demeti bir detektör tarafından kaydedilir. Kaydedilen veriler bilgisayar programları ile değerlendirilerek sonuçlar bilgisayar ekranına aktarılır. DNA dizi analizi cihazlarında 6 nükleotidden 1000 nükleotide kadar güvenli okuma yapılabilmektedir [160].

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. İncelenen kan örneklerinin toplanması

Serviks, endometrium ve over kanserlerinde *MTHFR* geni 4. ekzon ve *p53* geni 4. ekzondaki 72. kodon mutasyonların taranması amacıyla incelenen tüm kanser hastalarına ve kontrol grubuna ait kan örnekleri Ankara Zekai Tahir Burak Kadın Sağlığı Eğitim ve Araştırma Hastanesi Onkoloji Kliniği'ne yatarak ve ayakta tedavi olan toplam 106 kanserli ve 101 sağlıklı bireyden alınmıştır.

Çalışmanın amacı ve içeriği gönüllülere açık bir dille anlatılarak Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Yerel Etik Kurulu tarafından onaylanmış genetik materyal üzerinde yapılacak araştırmalar bilgilendirilmiş gönüllü olur formu aracılığıyla izinleri alınmıştır (EK-1, 2).

DNA elde etmek için kullanılmak üzere tüm bireylerden 9 ml periferik kan, etik kurulun onayladığı protokole uygun olarak alınmış olup, bu tez kapsamında yapılan tüm çalışmalar, Gazi Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı Moleküler Biyoloji Laboratuvarında yapılmıştır.

3.1.2. Tampon ve çözeltiler

Kandan DNA izolasyonu için kullanılan tampon ve çözeltiler

Eritrosit parçalama tamponu (Red Blood Cell lysis buffer; RBC): 0,5 M EDTA, 100 mM NaHCO₃ ve 1,5 M NH₄Cl (pH: 8,0) ile karıştırılarak hazırlanmıştır.

Lökosit parçalama tamponu (Sodyum klorid-Tris-EDTA; STE): 10 mM Tris HCl (pH: 7,4), 400 mM NaCl ve 0,2 mM EDTA (PH: 8,0) ile karıştırılarak hazırlanmıştır.

Fenol: kloroform: izoamilalkol (25:24:1) çözeltisi: 25 ml fenol, 24 ml kloroform ve 1 ml izoamilalkol karıştırılarak hazırlanmıştır. Hazırlanan çözelti 1 gece +4 °C’ de bekletildikten sonra kullanılmıştır.

Proteinaz K (20 mg/ml): 0,02 gr proteinaz K, 1 ml steril saf su ile karıştırılarak hazırlanmış ve milipor filtre ile steril edilmiştir.

TE çözeltisi: 0,5 M EDTA (pH: 8,0), 10 mM Tris (pH: 8,0) ile karıştırılarak hazırlanmıştır.

%10’luk Sodyum Dodesil Sülfat (SDS): 10 gr SDS, 100 ml distile su içerisinde çözülerek hazırlanmıştır.

2M Sodyum Asetat (CH₃COONa): 1,64 gr sodyum asetat 100 ml distile su içerisinde çözülmüştür.

%70’lik etil alkol: 70 ml %100’lük etil alkol, 30 ml distile su ile hazırlanmıştır.

%95’lik etil alkol: 95 ml %100’lük etil alkol, 5 ml distile su ile hazırlanmıştır.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu için kullanılan tampon ve çözeltiler

Taq polimeraz tamponu 10x: 100 mM Tris-HCl (pH: 8,3), 500 mM KCl, 1 mg/ml jelatin.

MgCl₂: 25 mM MgCl₂ kullanılmıştır.

Nükleotit karışımı: 10 mM dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP).

Taq polimeaz: 5 u/ µl kullanılmıştır.

Primerler: *p53* ve *MTHFR* genine ait 4. ekzon bölgelerinin çoğaltılması için kullanılan primerler çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1. *p53* geninin 4. ekzon bölgesinin belirlenmesi için kullanılan primerler

<i>p53</i> geni 4. ekzon primeri
4F: 5'-GGATGATTTGATGCTGTCCC-3'
4R: 5'-GTCCCAGAATGCAAGAAGCC-3'

Çizelge 3.2. *MTHFR* geni 4. ekzon bölgesinin belirlenmesi için kullanılan primerler

<i>MTHFR</i> geni 4. ekzon primeri
4F: 5'-GGATGATTTGATGCTGTCCC-3'
4R: 5'-GTCCCAGAATGCAAGAAGCC-3'

Agaroz jel elektroforezi için kullanılan çözeltiler

Tris- Asetik Asit- EDTA (TAE) tamponu (x50) (pH: 8,0): 242 gr Tris, 57,1 ml glacial asetik asit, 0,5 M 100 ml EDTA (pH: 8,0) distile su içerisinde çözülerek hacim 1000 ml'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.

Agaroz jel: %0,8 ve %2'lik (w/v) agaroz TAE tamponunda çözülerek hazırlanmıştır.

Yükleme tamponu: 40 gr süktroz, 0,025 gr bromofenol mavisi, 0,25 gr ksilen siyanol 100 ml distile su içerisinde çözülerek hazırlanmıştır.

Etidyum bromür: 10 mg/ml olacak şekilde hazırlanmıştır ve koyu renkli şişelerde muhafaza edilerek kullanılmıştır.

Sterilizasyon

Steril kullanılması gereken tüm tampon ve çözeltiler, 121 °C'de 20 dakika otoklavda sterilizasyon yapılarak kullanılmıştır.

3.2. Metot

3.2.1. Periferik kandan DNA izolasyonu

Deney grubunda bulunan hastalardan ve sağlıklı bireylerden alınan 9 ml'lik periferik kan örnekleri içerisinde 1 ml 0,5 M EDTA bulunan tüplere alınmış ve hafifçe karıştırılmıştır. Alınan kan örneği 50 ml'lik steril falkon tüp içerisine aktararak üzerine 25 ml RBC lizis çözeltisi eklenmiştir. Çalkalandıktan sonra 20 dakika buz içerisinde bekletilmiştir. Soğutmalı santrifüjde +4 °C'de 4000 rpm'de 20 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant kısmı dökülerek üzerine tekrar 25 ml RBC lizis çözeltisi eklenmiş ve tekrar soğutmalı santrifüjde +4 °C'de 4000 rpm'de 20 dakika santrifüj edilmiştir. Bu işlem tüm eritrositler giderilene kadar tekrarlanmıştır. Dipte kalan lökositlerin üzerine 1000 µl RBC lizis çözeltisi eklenmiş ve vorteksle homojen hale getirilmiştir. Bu karışımın 200 µl'si bir ependorf tüpüne alınmış geriye kalan örnek stok olarak saklanmıştır. 200 µl alınan örneğin üzerine 500 µl STE çözeltisi, 30 µl SDS çözeltisi ve 20 µl proteinaz K eklenerek bir gece 56 °C'de sıcak su banyosunda bekletilmiştir. İkinci gün 1:1 oranında fenol: kloroform: izoamilalkol eklenerek 10 dakika elde alt üst ederek çalkalanmıştır. Çalkalama işleminden sonra 20 dakika buzda bekletilmiş ve +4 °C'de 4000 rpm'de 20 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası karışım iki faza ayrılmaktadır. Bu karışımın üst fazı başka bir ependorf tüpe alınarak üzerine toplam hacmin 1/10'u kadar 2M sodyum asetat ve toplam hacmin 2 katı kadar %95'lik etanol eklenmiştir. Tüp yavaşça çevrilerek DNA görünür hale geldikten sonra -20 °C'de bir gece bekletilmiştir. Üçüncü gün +4 °C'de 4000 rpm'de 20 dakika santrifüj edilerek DNA çöktürülmüştür. Ependorf tüpün içindeki karışım dikkatlice dökülerek tüpe %70'lik etanol eklenmiştir ve +4 °C'de 4000 rpm'de 20 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında ependorf tüpün içerisindeki alkol dökülerek, tüp içerisindeki alkol tamamen uçana kadar kurumaya bırakılmıştır. Kuruduktan sonra tüp içerisine TE çözeltisi eklenip 37 °C'de bir gece bekletilerek DNA'nın çözünmesi sağlanmıştır. İzole edilen DNA -20 °C'de saklanmıştır.

3.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Periferik kandan izole edilmiş DNA'larda *p53* ve *MTHFR* geninin 4. ekzon bölgelerine ait analizleri, genel primerleri kullanılarak (bkz. çizelge 3.1 ve 3.2) PZR yöntemi ile belirlenmiştir. PZR işlemi *MTHFR* ve *p53* genleri için; Taq tamponu (10x), MgCl₂, dNTP, primer, total DNA ve Taq enzimi ilave edilmiş ve reaksiyon hacmi sterli su ile 50 µl'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan bu karışım PZR cihazına yerleştirilmiş ve aşağıda verilen programlar kullanılmıştır.

Çizelge 3.3. *MTHFR* geninin 4. ekzon bölgesinin çoğaltılması için kullanılan PZR programı [20].

İlk denatürasyon	94 °C	2 dakika	1 döngü
Denatürasyon	94 °C	30 saniye	40 döngü
Primerlein bağlanması	62 °C	30 saniye	
Uzama	72 °C	45 saniye	
Son uzama	72 °C	7 dakika	1 döngü

Çizelge 3.4. *p53* geni 4. ekzon bölgesinin çoğaltılması için kullanılan PZR programı [19].

İlk denatürasyon	94 °C	2 dakika	1 döngü
Denatürasyon	94 °C	30 saniye	40 döngü
Primerlein bağlanması	60 °C	30 saniye	
Uzama	72 °C	45 saniye	
Son uzama	72 °C	7 dakika	1 döngü

3.2.3 Agaroz jel elektroforezi

p53 72. kodon ve *MTHFR* geni için kurulan tüm PZR reaksiyon ürünleri %2'lik agaroz jelde yürütülmüştür. 1,2 gr agaroz, TAE tamponu ile 60 ml'ye tamamlanmış, kaynatılarak homojen hale gelmesi sağlanmış ve oda sıcaklığında biraz bekletildikten sonra etidyum bromür eklenmiştir. DNA yükleme kuyucukları oluşturmak için tarak jel tabağına yerleştirilmiştir. Erimiş agarozu jel tabağına dökmeden önce yaklaşık 65°C'ye kadar soğutulmuş ve sonrasında jel tabağına dökülmüştür. Polimerizasyon için yaklaşık 30-45 dakika beklenmiştir. Jelin polimerize olmasında sonra jel tabağı elektroforez tankına yerleştirilmiştir. Elektroforez tankı jelin üzerini kapatacak şekilde TAE 1X tamponu ile doldurulmuştur. Jelde oluşturulan ilk kuyucuğa DNA marker, diğer kuyucuklara ise PZR ürünü yükleme tamponu ile karıştırılarak yüklenmiştir. Yüklenen örnekler 70 V'ta 30 dakika yürütülmüştür. Yürütme işleminin sonunda PZR ürünlerinin görüntülenmesi DNA görüntülenme cihazında UV ışık altında değerlendirilerek, fotoğrafları dijital olarak bilgisayar ortamında çekilmiştir.

3.2.4. Restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi

PZR sonrası çoğaltılmış DNA parçası restriksiyon enzimi ile kesilmiştir.

p53 4. ekzon bölgesindeki 72. kodon mutasyonunu belirlemek için *Bst*UI restriksiyon endonükleaz enzimi kullanılmıştır [19]. *MTHFR* geni C677T polimorfizminin belirlenmesi için *Hinf*I restriksiyon endonükleaz enzimi kullanılmıştır [20].

*Bst*UI restriksiyon enzimi için kesim koşulları:

8µl PZR ürünü, 1 µl enzim tamponu (1 ml/10x) ve 0.1 µl *Bst*UI (10 unit/µl) restriksiyon enzimi ilave edilerek karışım steril distile su ile 10 µl' ye tamamlanmıştır. 37 °C' de etüvde 1 gece inkübe edilmiştir. Kesim işleminden sonra DNA fragmentleri %2,5'lik agaroz jel elektroforezinde yürütülmüştür.

*Hinf*I restriksiyon enzimi için kesim koşulları:

8µl PZR ürünü, enzim tamponu (10X) ve *Hinf*I (10 unit/µl) restriksiyon enzimi ilave edilerek karışım steril distile su ile 10 µl' ye tamamlanmıştır. 37 °C' de etüvde 1 gece inkübe edilmiştir. Kesim işleminden sonra DNA fragmentleri %2,5'lik agaroz jel elektroforezinde yürütülmüştür.

3.2.5. DNA dizi analizi

Elde edilen PZR ürünlerinin dizi analizi bir ticari firma tarafından yapılmıştır. Dizi analizi yapılan örneklerin sonuçlarının değerlendirilmesinde ClustalX2 ve Chromas2 programları ve <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> adresinde BLAST uygulaması kullanılarak yapılmıştır.

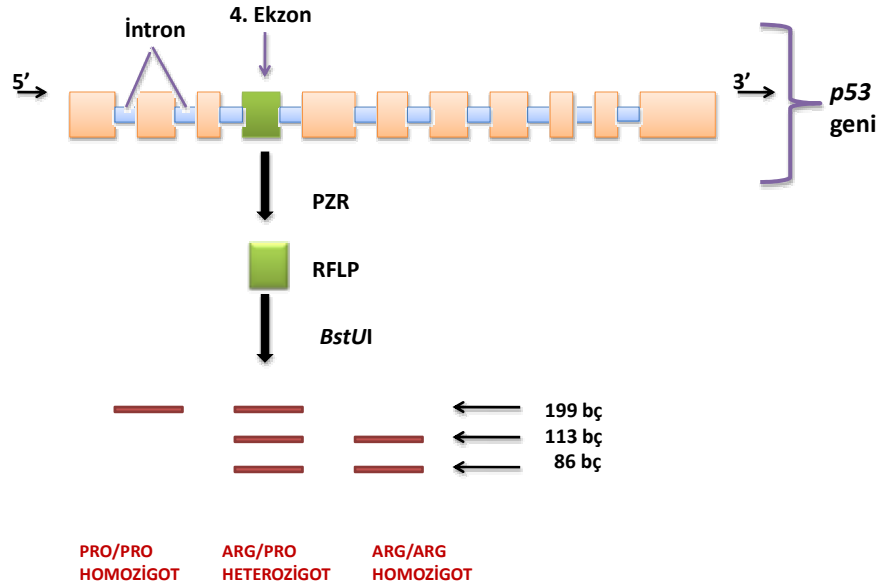
3.2.6. İstatistiksel analiz

İstatistiksel analiz hastalar ve kontroller arasındaki genotipik dağılımların farklılıkları ve ilişkileri belirlemek amacı ile *p53* 72. kodon polimorfizmi ve *MTHFR* C677T polimorfizmi göz önüne alınarak Ki-kare testi ile değerlendirildi. P değerinin <0.05 olması istatistiksel açıdan anlamlı olarak kabul edildi. Bütün istatistiksel testler “SPSS for Windows computing program, Version 16.0” ile gerçekleştirildi.

4. DENEYSEL BULGULAR

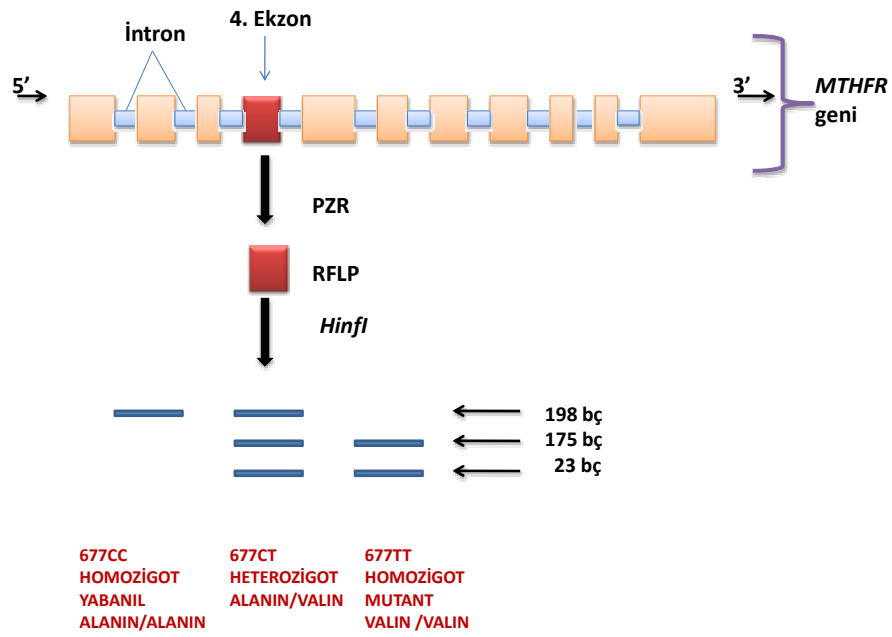
Bu çalışmada 39 serviks kanseri, 23 endometriyum kanseri, 44 over kanserli olmak üzere 106 jinekolojik kanser hastası ve 101 sağlıklı bireyden kan örnekleri alınmıştır. Alınan kan örneklerinden DNA izole edilmiştir. Daha sonra çizelge 3.1. ve 3.2’de verilen primerlerle *p53* ve *MTHFR* geni 4. ekzon bölgeleri PZR ile çoğaltılmıştır. Çalışma kapsamında *p53* 72. kodon polimorfizmi ve *MTHFR* C677T kodon polimorfizmi belirlemek amacı ile PZR ürünleri restriksiyon enzimleri ile kesilmiştir.

PZR-RFLP analizi sonucunda *p53* 72. kodon mutasyonu için 3 farklı genotip belirlenmiştir. Bu genotipler; Arg/Arg homozigot: 113 ve 86 bç uzunluğunda, Pro/Pro homozigot: 199 bç uzunluğunda, Arg/Pro heterozigot: 199, 113 ve 86 bç uzunluklarındaki bantların birlikte olması durumunda görülmektedir (Şekil 4.1) (Çizelge 4.1).



Şekil 4.1. *p53* geni PZR-RFLP analizi sonucu oluşan genotipler

PZR-RFLP analizi sonucunda *MTHFR* geninde C677T mutasyonu için 3 farklı genotip belirlenmektedir. Bu genotipler; 677CC homozigot normal: 198 bç uzunluğunda, 677CT heterozigot: 198,175 ve 23 bç uzunluğunda, 677TT homozigot mutant: 175 ve 23 bç uzunluğundadır (Şekil 4.2) (Çizelge 4.1).



Şekil 4.2. *MTHFR* geni PZR-RFLP analizi sonucu oluşan genotipler

Çizelge 4.1. Çalışmamız kapsamında incelemiş olduğumuz kanserli ve sağlıklı bireylerin listesi ve mutasyon tipleri

Olgu no	Kanser tipi	p53	MTHFR
1	Serviks Kanseri	Arg/Pro heterozigot	Homozigot normal
2	Serviks Kanseri	Arg/Pro heterozigot	Heterozigot
3	Serviks Kanseri	Arg/Pro heterozigot	Heterozigot
4	Serviks Kanseri	Arg/Pro heterozigot	Heterozigot
5	Serviks Kanseri	Arg/Pro heterozigot	Heterozigot
6	Serviks Kanseri	Arg/Pro heterozigot	Homozigot normal
7	Serviks Kanseri	Pro/Pro homozigot	Homozigot normal
8	Serviks Kanseri	Pro/Pro homozigot	Heterozigot
9	Serviks Kanseri	Arg/Arg homozigot	Heterozigot
10	Serviks Kanseri	Arg/Pro heterozigot	Heterozigot
11	Serviks Kanseri	Pro/Pro homozigot	Homozigot normal
12	Serviks Kanseri	Arg/Pro heterozigot	Heterozigot
13	Serviks Kanseri	Arg/Pro heterozigot	Heterozigot
14	Serviks Kanseri	Arg/Arg homozigot	Homozigot normal
15	Serviks Kanseri	Arg/Pro heterozigot	Homozigot normal
16	Serviks Kanseri	Arg/Pro heterozigot	Homozigot normal
17	Serviks Kanseri	Arg/Pro heterozigot	Homozigot normal
18	Serviks Kanseri	Arg/Pro heterozigot	Heterozigot
19	Serviks Kanseri	Arg/Pro heterozigot	Heterozigot
20	Serviks Kanseri	Pro/Pro homozigot	Homozigot normal
21	Endometrium Kanseri	Arg/Pro heterozigot	Homozigot normal
22	Endometrium Kanseri	Arg/Pro heterozigot	Heterozigot
23	Endometrium Kanseri	Arg/Pro heterozigot	Homozigot normal
24	Over Kanseri	Arg/Pro heterozigot	Heterozigot
25	Over Kanseri	Arg/Pro heterozigot	Homozigot normal
26	Endometrium Kanseri	Arg/Pro heterozigot	Heterozigot
27	Over Kanseri	Arg/Pro heterozigot	Heterozigot
28	Over Kanseri	Arg/Pro heterozigot	Heterozigot
29	Over Kanseri	Arg/Pro heterozigot	Homozigot normal
30	Serviks Kanseri	Arg/Pro heterozigot	Homozigot normal
31	Serviks Kanseri	Arg/Pro heterozigot	Heterozigot
32	Serviks Kanseri	Arg/Pro heterozigot	Homozigot normal
33	Endometrium Kanseri	Arg/Pro heterozigot	Homozigot normal
34	Over Kanseri	Arg/Arg homozigot	Homozigot mutant
35	Serviks Kanseri	Pro/Pro homozigot	Homozigot normal
36	Serviks Kanseri	Arg/Arg homozigot	Homozigot normal
37	Endometrium Kanseri	Pro/Pro homozigot	Homozigot normal

Çizelge 4.1. (Devam) Çalışmamız kapsamında incelemiş olduğumuz kanserli ve sağlıklı bireylerin listesi ve mutasyon tipleri

Olgu no	Kanser tipi	p53	MTHFR
38	Endometrium Kanseri	Arg/Pro heterozigot	Homozigot normal
39	Over Kanseri	Arg/Pro heterozigot	Heterozigot
40	Over Kanseri	Arg/Pro heterozigot	Heterozigot
41	Over Kanseri	Arg/Arg homozigot	Homozigot normal
42	Endometrium Kanseri	Arg/Pro heterozigot	Heterozigot
43	Endometrium Kanseri	Arg/Pro heterozigot	Homozigot normal
44	Over Kanseri	Arg/Arg homozigot	Homozigot normal
45	Serviks Kanseri	Arg/Pro heterozigot	Homozigot normal
46	Over Kanseri	Arg/Pro heterozigot	Heterozigot
47	Over Kanseri	Arg/Pro heterozigot	Heterozigot
48	Over Kanseri	Arg/Pro heterozigot	Homozigot normal
49	Over Kanseri	Arg/Arg homozigot	Heterozigot
50	Over Kanseri	Arg/Pro heterozigot	Heterozigot
51	Over Kanseri	Arg/Pro heterozigot	Heterozigot
52	Endometrium Kanseri	Arg/Pro heterozigot	Heterozigot
53	Endometrium Kanseri	Arg/Pro heterozigot	Homozigot normal
54	Over Kanseri	Arg/Pro heterozigot	Homozigot normal
55	Over Kanseri	Arg/Pro heterozigot	Homozigot normal
56	Over Kanseri	Pro/Pro homozigot	Homozigot mutant
57	Over Kanseri	Arg/Arg homozigot	Heterozigot
58	Over Kanseri	Arg/Pro heterozigot	Heterozigot
59	Over Kanseri	Arg/Pro heterozigot	Homozigot normal
60	Serviks Kanseri	Arg/Arg homozigot	Heterozigot
61	Serviks Kanseri	Pro/Pro homozigot	Homozigot normal
62	Over Kanseri	Arg/Pro heterozigot	Heterozigot
63	Over Kanseri	Arg/Arg homozigot	Heterozigot
64	Over Kanseri	Arg/Arg homozigot	Heterozigot
65	Endometrium Kanseri	Arg/Arg homozigot	Homozigot normal
66	Over Kanseri	Arg/Pro heterozigot	Heterozigot
67	Endometrium Kanseri	Arg/Pro heterozigot	Homozigot normal
68	Serviks Kanseri	Arg/Pro heterozigot	Homozigot normal
69	Endometrium Kanseri	Arg/Pro heterozigot	Homozigot normal
70	Over Kanseri	Arg/Pro heterozigot	Homozigot normal
71	Over Kanseri	Arg/Pro heterozigot	Homozigot normal
72	Over Kanseri	Arg/Pro heterozigot	Homozigot normal
73	Serviks Kanseri	Arg/Pro heterozigot	Homozigot normal

Çizelge 4.1. (Devam) Çalışmamız kapsamında incelemiş olduğumuz kanserli ve sağlıklı bireylerin listesi ve mutasyon tipleri

Olgu no	Kanser tipi	<i>p53</i>	<i>MTHFR</i>
74	Serviks Kanseri	Arg/Pro heterozigot	Heterozigot
75	Serviks Kanseri	Arg/Pro heterozigot	Homozigot normal
76	Serviks Kanseri	Arg/Pro heterozigot	Heterozigot
77	Endometrium Kanseri	Arg/Pro heterozigot	Heterozigot
78	Serviks Kanseri	Arg/Pro heterozigot	Heterozigot
79	Over Kanseri	Arg/Pro heterozigot	Heterozigot
80	Serviks Kanseri	Pro/Pro homozigot	Homozigot mutant
81	Endometrium Kanseri	Arg/Arg homozigot	Heterozigot
82	Over Kanseri	Arg/Arg homozigot	Homozigot mutant
83	Endometrium Kanseri	Pro/Pro homozigot	Heterozigot
84	Endometrium Kanseri	Arg/Pro heterozigot	Heterozigot
85	Endometrium Kanseri	Arg/Arg homozigot	Homozigot normal
86	Over Kanseri	Arg/Pro heterozigot	Homozigot normal
87	Serviks Kanseri	Arg/Pro heterozigot	Heterozigot
88	Endometrium Kanseri	Arg/Pro heterozigot	Heterozigot
89	Over Kanseri	Arg/Pro heterozigot	Heterozigot
90	Over Kanseri	Arg/Arg homozigot	Heterozigot
91	Over Kanseri	Arg/Pro heterozigot	Heterozigot
92	Serviks Kanseri	Arg/Pro heterozigot	Heterozigot
93	Over Kanseri	Arg/Arg homozigot	Heterozigot
94	Over Kanseri	Arg/Pro heterozigot	Homozigot normal
95	Over Kanseri	Pro/Pro homozigot	Heterozigot
96	Endometrium Kanseri	Arg/Pro heterozigot	Homozigot normal
97	Endometrium Kanseri	Arg/Pro heterozigot	Heterozigot
98	Endometrium Kanseri	Arg/Pro heterozigot	Heterozigot
99	Serviks kanseri	Arg/Pro heterozigot	Homozigot normal
100	Over Kanseri	Arg/Arg homozigot	Heterozigot
101	Over kanseri	Arg/Pro heterozigot	Homozigot mutant
102	Over Kanseri	Arg/Pro heterozigot	Homozigot normal
103	Over Kanseri	Arg/Arg homozigot	Heterozigot
104	Serviks Kanseri	Arg/Arg homozigot	Heterozigot
105	Over Kanseri	Arg/Pro heterozigot	Heterozigot
106	Adneksial Kitle	Arg/Arg homozigot	Heterozigot
107	Kontrol	Arg/Arg homozigot	Heterozigot

Çizelge 4.1. (Devam) Çalışmamız kapsamında incelemiş olduğumuz kanserli ve sağlıklı bireylerin listesi ve mutasyon tipleri

Olgu no	Kanser tipi	<i>p53</i>	<i>MTHFR</i>
108	Kontrol	Arg/Pro heterozigot	Heterozigot
109	Kontrol	Arg/Arg homozigot	Homozigot normal
110	Kontrol	Arg/Pro heterozigot	Homozigot mutant
111	Kontrol	Arg/Pro heterozigot	Heterozigot
112	Kontrol	Arg/Pro heterozigot	Heterozigot
113	Kontrol	Arg/Pro heterozigot	Heterozigot
114	Kontrol	Pro/Pro homozigot	Heterozigot
115	Kontrol	Arg/Pro heterozigot	Homozigot normal
116	Kontrol	Arg/Arg homozigot	Homozigot normal
117	Kontrol	Arg/Arg homozigot	Homozigot normal
118	Kontrol	Pro/Pro homozigot	Homozigot normal
119	Kontrol	Arg/Arg homozigot	Homozigot normal
120	Kontrol	Arg/Pro heterozigot	Heterozigot
121	Kontrol	Arg/Pro heterozigot	Homozigot normal
122	Kontrol	Arg/Pro heterozigot	Heterozigot
123	Kontrol	Arg/Arg homozigot	Homozigot normal
124	Kontrol	Arg/Pro heterozigot	Homozigot normal
125	Kontrol	Arg/Pro heterozigot	Heterozigot
126	Kontrol	Arg/Arg homozigot	Homozigot normal
127	Kontrol	Arg/Pro heterozigot	Heterozigot
128	Kontrol	Arg/Pro heterozigot	Homozigot normal
129	Kontrol	Arg/Arg homozigot	Homozigot normal
130	Kontrol	Arg/Pro heterozigot	Heterozigot
131	Kontrol	Arg/Pro heterozigot	Heterozigot
132	Kontrol	Arg/Pro heterozigot	Homozigot normal
133	Kontrol	Arg/Pro heterozigot	Homozigot normal
134	Kontrol	Arg/Pro heterozigot	Heterozigot
135	Kontrol	Arg/Arg homozigot	Homozigot mutant
136	Kontrol	Arg/Pro heterozigot	Homozigot normal
137	Kontrol	Arg/Arg homozigot	Heterozigot
138	Kontrol	Arg/Arg homozigot	Heterozigot
139	Kontrol	Arg/Arg homozigot	Homozigot normal
140	Kontrol	Arg/Arg homozigot	Homozigot normal
141	Kontrol	Arg/Arg homozigot	Homozigot normal
142	Kontrol	Arg/Arg homozigot	Homozigot normal
143	Kontrol	Arg/Arg homozigot	Heterozigot

Çizelge 4.1. (Devam) Çalışmamız kapsamında incelemiş olduğumuz kanserli ve sağlıklı bireylerin listesi ve mutasyon tipleri

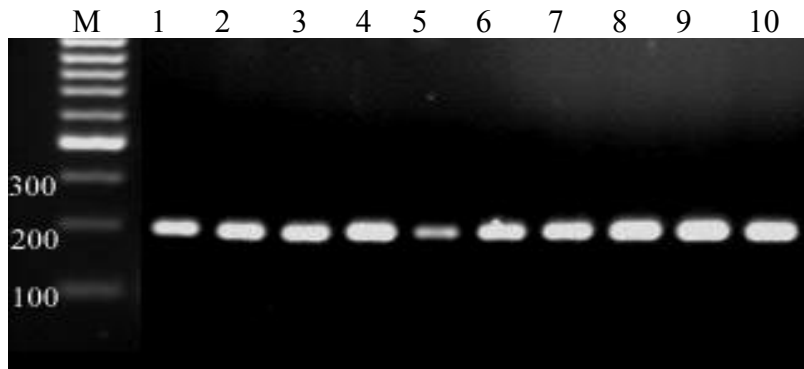
Olgu no	Kanser tipi	<i>p53</i>	<i>MTHFR</i>
144	Kontrol	Pro/Pro homozigot	Heterozigot
145	Kontrol	Arg/Pro heterozigot	Heterozigot
146	Kontrol	Arg/Arg homozigot	Heterozigot
147	Kontrol	Arg/Arg homozigot	Homozigot normal
148	Kontrol	Arg/Pro heterozigot	Heterozigot
149	Kontrol	Arg/Pro heterozigot	Heterozigot
150	Kontrol	Arg/Pro heterozigot	Homozigot normal
151	Kontrol	Arg/Arg homozigot	Heterozigot
152	Kontrol	Arg/Pro heterozigot	Heterozigot
153	Kontrol	Arg/Pro heterozigot	Homozigot normal
154	Kontrol	Arg/Pro heterozigot	Homozigot normal
155	Kontrol	Arg/Arg homozigot	Homozigot normal
156	Kontrol	Arg/Arg homozigot	Heterozigot
157	Kontrol	Arg/Arg homozigot	Heterozigot
158	Kontrol	Arg/Pro heterozigot	Homozigot normal
159	Kontrol	Arg/Arg homozigot	Heterozigot
160	Kontrol	Arg/Pro heterozigot	Homozigot normal
161	Kontrol	Arg/Pro heterozigot	Homozigot normal
162	Kontrol	Arg/Arg homozigot	Homozigot normal
163	Kontrol	Arg/Arg homozigot	Homozigot mutant
164	Kontrol	Arg/Pro heterozigot	Homozigot normal
165	Kontrol	Arg/Pro heterozigot	Heterozigot
166	Kontrol	Arg/Pro heterozigot	Heterozigot
167	Kontrol	Arg/Arg homozigot	Heterozigot
173	Kontrol	Arg/Arg homozigot	Homozigot normal
174	Kontrol	Arg/Arg homozigot	Homozigot normal
175	Kontrol	Arg/Pro heterozigot	Homozigot mutant
176	Kontrol	Arg/Pro heterozigot	Heterozigot
177	Kontrol	Arg/Arg homozigot	Homozigot normal
178	Kontrol	Arg/Arg homozigot	Heterozigot
179	Kontrol	Arg/Arg homozigot	Homozigot normal
180	Kontrol	Pro/Pro homozigot	Homozigot normal
181	Kontrol	Pro/Pro homozigot	Heterozigot
182	Kontrol	Arg/Pro heterozigot	Homozigot normal

Çizelge 4.1. (Devam) Çalışmamız kapsamında incelemiş olduğumuz kanserli ve sağlıklı bireylerin listesi ve mutasyon tipleri

Olgu no	Kanser tipi	<i>p53</i>	<i>MTHFR</i>
183	Kontrol	Arg/Pro heterozigot	Homozigot mutant
184	Kontrol	Arg/Pro heterozigot	Homozigot mutant
185	Kontrol	Arg/Pro heterozigot	Heterozigot
186	Kontrol	Arg/Pro heterozigot	Homozigot normal
187	Kontrol	Arg/Pro heterozigot	Homozigot normal
188	Kontrol	Arg/Pro heterozigot	Homozigot normal
190	Kontrol	Arg/Arg homozigot	Heterozigot
191	Kontrol	Arg/Arg homozigot	Heterozigot
192	Kontrol	Arg/Arg homozigot	Heterozigot
193	Kontrol	Arg/Pro heterozigot	Homozigot mutant
194	Kontrol	Arg/Pro heterozigot	Heterozigot
195	Kontrol	Arg/Pro heterozigot	Homozigot normal
196	Kontrol	Arg/Pro heterozigot	Homozigot normal
197	Kontrol	Arg/Arg homozigot	Homozigot normal
198	Kontrol	Arg/Arg homozigot	Heterozigot
199	Kontrol	Arg/Pro heterozigot	Heterozigot
200	Kontrol	Arg/Pro heterozigot	Heterozigot
201	Kontrol	Arg/Pro heterozigot	Heterozigot
202	Kontrol	Arg/Pro heterozigot	Heterozigot
203	Kontrol	Arg/Pro heterozigot	Heterozigot
204	Kontrol	Pro/Pro homozigot	Heterozigot
205	Kontrol	Arg/Arg homozigot	Homozigot normal
206	Kontrol	Arg/Arg homozigot	Heterozigot
207	Kontrol	Arg/Pro heterozigot	Heterozigot

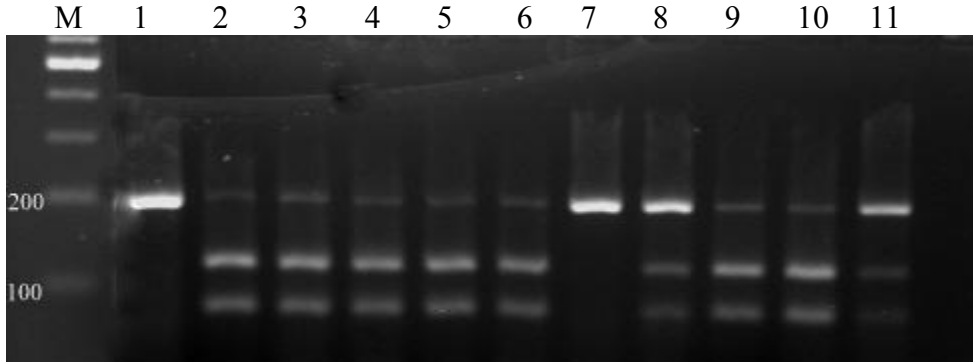
4.1. *p53* Genine Ait PZR-RFLP ve Dizi Analizi Sonuçları

p53 geninin 4. ekzon bölgesi çizelge 3.1’de verilen primerler kullanılarak PZR ile çoğaltılmıştır. PZR ürünü agaroz jel elektroforezinde yürütülmesi ile PZR ürününün 199 bç büyüklüğünde olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. *p53* PZR ürünü agaroz jel görüntüsü. M: DNA boyut marker, Hat 1-3: Serviks kanserli hastaların PZR ürünü, Hat 4-6: Over kanserli hastaların PZR ürünü, Hat 7-9: Endometrium kanserli hastaların PZR ürünü

p53 geninin 4. ekzon bölgesinde 72. kodondaki polimorfizm varlığını belirlemek için PZR ürünleri, *Bst*UI enzimi ile kesilerek %2.5’ lik agaroz jel elektroforezinde yürütülmüştür. Kesim sonucu Arg/Arg homozigot genotipi 113 ve 86 bç, Pro/Pro homozigot genotipi 199 bç ve Arg/Pro heterozigot genotipi 199, 113 ve 86 bç olmak üzere üç farklı tipte DNA parçası elde edilmiştir (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. *p53 72. kodon polimorfizminin BstUI enzimi ile kesildikten sonra agaroz jelde görüntüsü. M: DNA boyut markırı 100 bç. Hat 1: Kesim yapılmamış. Hat: 2-3-4-5-6-8-9-10-11: Arg/Pro Heterozigot (199, 113, 86 bç), 7: Pro/Pro homozigot (199 bç)*

p53 72. kodonda tek baz değişikliği ile meydana gelen bu polimorfizm Arg (CGC) aminoasiti yerine Pro (CCC) aminoasidinin kodlanmasıyla meydana gelen değişimle sonuçlanmaktadır. Bu değişimle birlikte kodlanan protein farklı elektroforetik hareketliliğe sahip yapısal olarak değişmiş bir proteindir.

Yapılan RFLP analizleri sonucunda kanserli hasta grubundan Arg/Arg homozigot bireylerin sayısı 21 (%19,8), Pro/Pro homozigot bireylerin sayısı 11 (%10,4) ve Arg/Pro heterozigot bireylerin sayısı ise 74 (%69,8) olarak belirlenmiştir. Kontrol grubunda yapılan RFLP analizleri sonucu ise Arg/Arg homozigot bireylerin sayısı 41 (%40,6), Pro/Pro homozigot bireylerin sayısı 6 (%5,9) ve Arg/Pro heterozigot bireylerin sayısı ise 54 (%53,5) olarak belirlenmiştir.

Bu sonuçlara göre hasta ve kontroller arasında Arg/Arg, Arg/Pro ve Pro/Pro genotiplerinin dağılımı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmiştir ($p<0,05$). Hastalarda Arg/Pro (74/106) genotipinin kontrol grubundan (54/101) daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Hastalarda Arg/Arg (21/106) genotipi kontrol grubundan (41/101) daha düşük olarak belirlenmiştir. Pro/Pro genotipi ise hastalarda (11/106) kontrol grubundan (6/101) daha yüksek olduğu gözlenmiştir.

Genotiplerin kanser tipleri ve sağlıklı bireyler arasındaki dağılımı (Çizelge 4.2, Çizelge 4.3).

Çizelge 4.2. *p53* geninin PZR-RFLP yöntemiyle *Bst*UI enzimi kesimi sonuçlarının kanser tiplerinde ve sağlıklı bireylerde dağılımları

Genotip Kanser Tipi	Arg/Arg homozigot	Arg/Pro heterozigot	Pro/Pro homozigot	Toplam
Serviks Kanseri	5 (%12,8)	27 (%69,2)	7 (%18)	39
Over Kanseri	13 (%29,6)	29 (%65,9)	2 (%4,5)	44
Endometrium Kanseri	3 (%13)	18 (%78,3)	2 (%8,7)	23
Sağlıklı Bireyler	41 (%40,6)	54 (%53,5)	6 (%5,9)	106 101

Çizelge 4.3. *p53* geni kanserli hasta ve sağlıklı bireyler arasındaki istatistiksel analiz sonuçları

GENOTİP	SERVİKS KANSERİ	OVER KANSERİ	ENDOMETRİUM KANSERİ
Arg/Arg homozigot	+	-	+
Arg/Pro heterozigot	-	-	-
Pro/Pro homozigot	+	-	-

$P < 0,05$: + istatistiksel açıdan anlamlı bir fark var. $p > 0,05$: - istatistiksel açıdan anlamlı bir fark yok.

39 serviks kanseri hastasında, Arg/Arg homozigot bireylerin sayısı 5 (%12,8), Pro/Pro homozigot bireylerin sayısı 7 (%18) ve Arg/Pro heterozigot bireylerin sayısı ise 27 (%69,2) olarak belirlenmiştir. Serviks kanserli hastalar ile kontrol grubu Arg/Arg ve Pro/Pro genotipinin dağılımı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmiştir ($p<0,05$). Kontrol grubunda Arg/Arg (%40,6) genotipinin dağılımı hasta grubundan (%12,8) daha yüksek olduğu ve Pro/Pro genotipinin ise kontrol grubunda (%5,9) kanserli hastalardan (%18) daha düşük olduğu gözlenmiştir. Arg/Pro heterozigot genotipinin dağılımı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p>0,05$).

44 over kanserli hastadan, Arg/Arg homozigot bireylerin sayısı 13 (%29,6), Pro/Pro homozigot bireylerin sayısı 2 (%4,5) ve Arg/Pro heterozigot bireylerin sayısı ise 29 (%65,9) olarak belirlenmiştir. Over kanserli hastalar ile kontrol grubu Arg/Arg, Pro/Pro ve Arg/Pro genotiplerinin dağılımları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p>0,05$).

23 endometrium kanserli hastada genotip dağılımı ise, Arg/Arg homozigot bireylerin sayısı 3 (%13), Pro/Pro homozigot bireylerin sayısı 2 (%8,7) ve Arg/Pro heterozigot bireylerin sayısı ise 18 (%78,3) olarak belirlenmiştir. Endometrium kanserli hastalar ile kontrol grubu Arg/Arg genotipinin dağılımı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmiştir ($p<0,05$). Kontrol grubunda Arg/Arg genotipinin dağılımı (%40,6) kanserli hasta grubundan (%13) daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Pro/Pro ve Arg/Pro genotiplerinin dağılımları arasında ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p>0,05$).

Hasta ve kontrol grubunda yaşa ait *p53* 72. kodon polimorfizmi Arg/Arg, Arg/Pro ve Pro/Pro genotip dağılımında 52 yaş ve üstü ile 52 yaş altında istatistiksel açıdan önemli bir farklılık olmadığı gözlenmiştir ($p>0,05$). Ancak Arg/Pro heterozigot genotipi diğer genotiplere göre her iki yaş grubunda da önemli ölçüde yüksektir ($p<0,05$).

PZR ürünleri ticari firma aracılığıyla saflaştırılmış ve DNA dizi analizleri yapılmıştır. İncelenen kanser hastalarının her birinin DNA dizisi gen bankası ile uyumlu bulunmuştur (Şekil 4.5).

```

Score = 353 bits (191), Expect = 2e-95
Identities = 198/201 (98%), Gaps = 2/201 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 1 GGATGATTTGATGCTGTCCCCGGACGATATTGAACAATGGTTCACTGAAGACCCAGGTCC 60
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 317 GGATGATTTGATGCTGTCCCCGGACGATATTGAACAATGGTTCACTGAAGACCCAGGTCC 376

Query 61 AGATGAAGCTCCCAGAATGCCAGAGGCTGCTCCCCGCGTGGCCCCTGCACCAGCAGCTCC 120
      |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||
Sbjct 377 AGATGAAGCTCCCAGAATGCCAGAGGCTGCTCCCCCGTGGCCCCTGCACCAGCAGCTCC 436

Query 121 TACACCGGCGGCCCCTGCACCAGCCCCCTCCTGGCCCCTGTCATCTTCTGTCCCT-CCCA 179
      |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||
Sbjct 437 TACACCGGCGGCCCCTGCACCAGCCCCCTCCTGGCCCCTGTCATCTTCTGTCCCTTCCCA 496

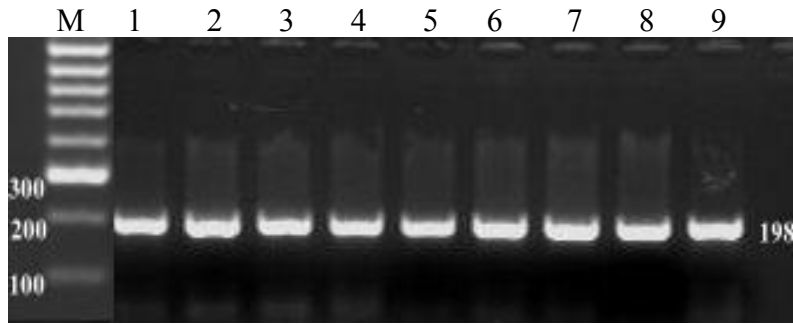
Query 180 GAAAACCTACCAGG-CAGCTA 199
      |||||||||||| |||||
Sbjct 497 GAAAACCTACCAGGGCAGCTA 517

```

Şekil 4.5. 3 numaralı olguya ait BLAST analizi görüntüsü. Referans: NM 001126114.1

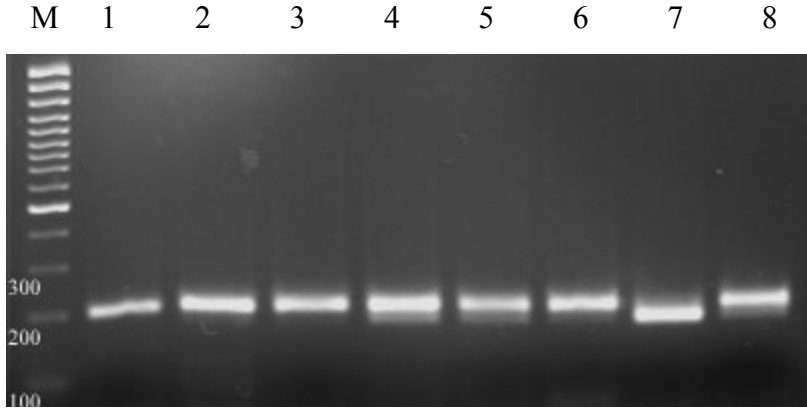
4.2. *MTHFR* C677T Polimorfizmine Ait RFLP Sonuçları

MTHFR genindeki polimorfizmin belirlenmesi amacıyla PZR-RFLP analizleri yapılmıştır. *MTHFR* geninin 4. ekzon bölgesi çizelge 3.2’de verilen primerler kullanılarak çoğaltılmıştır. Elde edilen PZR ürünleri agaroz jel elektroforezinde yürütülmüştür ve PZR ürünü 198 bç olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. *MTHFR* PZR ürünü agaroz jel görüntüsü. M: DNA boyut marker (100bç)
Hat 1-9: PZR ürünü (198 bç)

Daha sonra PZR ürünü olan DNA *Hinf*I enzimi ile kesilmiş ve %2.5 agaroz jelde kesim ürünleri yürütülmüştür (Şekil 4.7). Kesim sonucu 198 bç homozigot normal, 198,175 ve 23 bç heterozigot, 175 ve 23 bç homozigot mutant PZR ürünleri gözlenmiştir. Kesim ürünleri arasında bulunan 23 bç’lik DNA bandının moleküler ağırlığı çok küçük olduğundan agaroz jelde görüntülenememiştir.



Şekil 4.7. *MTHFR* geni *Hinfi* enzimi ile kesildikten sonra agaroz jelde görüntüsü. M:DNA boyut markırı: 100 bç, Hat 1: Kesim yapılmamış örnek, Hat 2-3:Homozigot normal (198 bç), Hat 4-5-8: Heterozigot (198 ve 175,23 bç),Hat 7: Homozigot mutant (175, 23 bç).

Yapılan RFLP analizleri sonucunda kanserli hasta grubundan C677T polimorfizminin CC homozigot normal bireylerin sayısı 45 (%42,5), TT homozigot mutant bireylerin sayısı 5 (%4,7) ve CT heterozigot bireylerin sayısı ise 56 (%52,8) olarak belirlenmiştir. Kontrol grubunda yapılan RFLP analizleri sonucu ise CC homozigot normal bireylerin sayısı 44 (%43,6), TT homozigot mutant bireylerin sayısı 7 (%6,9) ve CT heterozigot bireylerin sayısı ise 50 (%49,5) olarak belirlenmiştir. Kanserli hastalar ile kontrol grubu arasında CC, CT ve TT genotipleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0,05$).

Genotiplerin kanser tipleri ve sağlıklı bireyler arasındaki dağılımı (Çizelge 4.4, Çizelge 4.5).

39 serviks kanseri hastasında, CC homozigot normal bireylerin sayısı 19 (%48,7), TT homozigot mutant bireylerin sayısı 1 (%2,6) ve CT heterozigot bireylerin sayısı ise 19 (%48,7) olarak belirlenmiştir. Serviks kanserli hastalar ile kontrol grubu CC homozigot normal ve CT heterozigot genotipinin dağılımı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p>0,05$). TT homozigot mutant genotipinin görülme sıklığı kanserli hastalar (%2,6) ile kontrol grubu (%6,9) karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($p<0,05$).

Çizelge 4.4. *MTHFR* geninin PZR-RFLP yöntemiyle *HinfI* enzim kesim sonuçlarının kanser tiplerinde ve sağlıklı bireylerdeki dağılımları

Genotip Kanser Tipi	677CC Homozigot normal	677CT Heterozigot	677TT Homozigot mutant	Topla m
Serviks Kanseri	19 (%48,7)	19 (%48,7)	1 (%2,6)	39
Over Kanseri	14 (%31,8)	26 (%59,1)	4 (%9,1)	44
Endometrium Kanseri	13 (%56,5)	10 (%43,5)	-	23
Sağlıklı Bireyler	44 (%43,6)	50 (%49,5)	7 (%6,9)	106 101

Çizelge 4.5. *MTHFR* geni kanserli hasta ve sağlıklı bireyler arasındaki istatistiksel analiz sonuçları

GENOTİP	SERVİKS KANSERİ	OVER KANSERİ	ENDOMETRİUM KANSERİ
677CC Homozigot normal (Alanin/Alanin)	-	-	-
677CT heterozigot (Alanin/Valin)	-	-	-
677TT homozigot mutant (Valin/Alanin)	+	-	+

P<0,05: + istatistiksel açıdan anlamlı bir fark var. p>0,05: - istatistiksel açıdan anlamlı bir fark yok.

44 over kanserli hastadan, CC homozigot normal bireylerin sayısı 14 (%31,8), TT homozigot mutant bireylerin sayısı 4 (%9,1) ve CT heterozigot bireylerin sayısı ise 26 (%59,1) olarak belirlenmiştir. Serviks kanserli hastalar ile kontrol grubu CC, CT ve TT genotiplerinin dağılımları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p>0,05$).

23 endometrium kanserli hastada genotip dağılımı ise, CC homozigot normal bireylerin sayısı 13 (%56,5), CT heterozigot bireylerin sayısı 10 (%43,5) olarak belirlenmiştir. TT homozigot mutant genotipe ise bu kanser tipinde rastlanmamıştır. Endometrium kanserli hastalar ile kontrol grubu arasında CC homozigot normal ve CT heterozigot genotipinin dağılımında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p>0,05$). kanserli hastalarda TT homozigot mutant genotipi görülemezken kontrol grubu (%6,9) ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($p<0,05$).

Kanserli hastalar ve kontrol grubunda yaş bakımından istatistiksel olarak karşılaştırdığımızda MTHFR C677T polimorfizminde genotip dağılımında 52 yaş ve üstü ile 52 yaş altında istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık olmadığı gözlenmiştir ($p>0,05$).

5.SONUÇ VE ÖNERİLER

Tümör baskılayıcı bir gen olan *p53* geni, hücre döngüsünün kontrolünde görev alan bir proteini kodlar. İnsanlarda kanserin yaklaşık olarak %50'sinden *p53* mutasyonları sorumludur ve kötü huylu insan kanserlerinin önemli bir bölümünde *p53* tümör baskılayıcı geni moleküler değişimlere uğramaktadır.

p53'ün yaygın bir polimorfizmi, 72. kodonda gerçekleşmektedir ve bu polimorfizm ya bir prolin ya da bir arjinin bölgesi içeren değişmiş bir proteinle sonlanmaktadır. *p53* çeşitlerinin, transkripsiyonu aktifleştirmek, apoptozu indüklemek ve primer hücrelerin transkripsiyonunu baskılamak için transkripsiyonel sistemin komponentlerine bağlanma yeteneklerinde farklılıklar olduğu bilinmektedir. *p53* geninde 72. kodonunda tek bir nükleotit değişerek Arg (CGC) aminoasiti yerine Pro (CCC) aminoasidini kodlamaktadır. Bu değişimle birlikte kodlanan protein farklı elektroforetik hareketliliğe sahip yapısal olarak değişmiş bir proteindir [121].

p53 arjinin varyantı, hücre ölümünü indükleme ve transformasyonu baskılamada *p53* prolin varyantından daha etkilidir. *p53* 72. kodon polimorfizminin Arg ve Pro allelleri farklı mekanizmalar yoluyla farklı kanserlerde yükselmiş risklere neden olabilir [122].

Bu veriler ayrıca serviks kanserli hasta grubunda genotip analizi yoluyla desteklenmiştir. Thomas ve arkadaşları, hastaların sağlıklı kontrollerle kıyaslandığında Arg allelinin Pro allelinden 7 kat zenginleştirilmiş olduğunu çalışmalarında belirtmiştir. Bu gözlemlerle, denekleri kanserin gelişmesinden korumak, yabancı tip *p53* dizilerini ve tümörün terapiye yanıtını açıklıyor olabilirler [123].

Bu çalışmada *p53* 72. kodon polimorfizminin Türk populasyonunda serviks, over ve endometrium kanserlerindeki polimorfizmlerin belirlenmesi ve bunların kanserle olan ilişkisinin istatistiksel olarak belirlenmesi amaçlanmıştır.

Çalışmamızda, serviks kanserli hastalar ile sağlıklı bireyler arasında Arg/Arg homozigotluğu ve Pro/Pro homozigotluğu arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunmuştur ($p<0,05$).

Zehbe ve arkadaşlarının servikal kanserli hastalarda yapmış olduğu bir çalışmada 72. kodon Arg homozigotluğunun servikal kanser gelişimi için bir risk faktörü olabileceği tespit edilmiştir [120].

Toda ve arkadaşları, resesif *p53* mutantlı kanserlerde Arg 72 allelinin tercihli bir seçiciliği olduğunu bulmuşlardır [124]. Buna göre resesif *p53* mutantlarının, *p53*'ün Arg-72 bağımlı inaktivasyonu ile seçici bir büyüme avantajı kazandığını ileri sürmektedirler.

Tenti ve arkadaşları kuzey İtalya' da serviks kanserli hastalarda yaptıkları bir çalışma sonucunda serviks kanseri ile *p53* Arg/Arg homozigotluğu arasında bir ilişki olmadığını bildirmişlerdir (123).

Bazı gruplar *p53* 72. kodon varyantı ile gastrik kanser, meme kanseri, ürogenital bölge kanserlerini içeren çeşitli kanser tipleri arasında artmış bir risk bulmalarına rağmen bazı gruplar *p53* 72. kodon varyantları ile kanser riski arasında bir ilişki tespit edememişlerdir [117].

Govan ve arkadaşları Güney Afrika popülasyonunda *p53* polimorfizmi ve servikal kansere yatkınlık dağılımı arasında ilişki gözlenmediğini belirtmişlerdir. Ancak Güney Afrika popülasyonu *p53* 72. kodon Pro/Pro genotipinin görülme sıklığı Kafkasyalılarla, Hindistanlılar ve Portekizliler ile karşılaştırıldığında bir artış gözlenmiştir. Özellikle, *p53* geni 72. kodonda Pro/Pro genotipinin dağılımının önemli ölçüde farklı olduğunu belirtmişlerdir [161].

Her aşamadaki ovaryum tümörlerinde mutasyona rastlanması endometriyum tümör gelişmesine oranla daha erken evrede ortaya çıktığını işaret etmektedir. Kohler ve ark. endometrial kanserlerde sadece %20 oranında *p53* aşırı ifade edilmesi ve mutasyonu bulmuşlar ve bu oranın evre ilerledikçe arttığını saptamışlardır. Mutasyonel analizler uterin seröz kanserlerin öncüsü olan endometriyal intraepitelyal kanserlerin %78'inde *p53*'ün 5-8. ekzonlarında mutasyon varlığı göstermiştir. Dolayısıyla *p53* mutasyonlarının bu tümör tipinin patogenezinde erken evrede gerçekleştiği ve agresif bir yapıya sahip uterin seröz kanserlerin yaklaşık %5-10'unu oluşturmaktadır [125].

Birçok çalışmada over kanserlerinin endometriyum ve serviks kanserinden daha sık görülmesinin nedeni over kanserinin daha agresif olması ile ilişkilendirilmektedir [126]. Over kanseri jinekolojik kanserler arasında en ölümcül olan kanser grubudur [156]. Sebebi kesin olarak belli değildir fakat çevresel faktörler, doğurganlık ve viral ajanlarla ilişkili olduğu bildirilmiştir. Gebelik döneminde ovulasyon sıklığının azalması, emzirme ve oral kontraseptif kullanımı gibi faktörler over kanserinin oluşmasına karşı koruyucu olduğu bildirilmiştir. Ovulasyonu artıran fertilité girişimleri ise kanser oluşumunu arttırdığı gözlenmiştir [157].

Çalışmamızda, over kanserli hastalar ile sağlıklı bireyler arasında Arg/Arg homozigotluğu, Pro/Pro homozigotluğu ve Arg/Pro heterozigotluğu arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunamamıştır.

Malisic ve arkadaşlarının over kanserli hastalarla yapmış olduğu çalışmada, over kanserinin seyrinde *p53* 72. kodon polimorfik varyant mutasyonlarının rolü hala net olmadığını ifade etmişlerdir. Over kanserinde *p53* mutasyonları ve çeşitli klinikopatolojik özellikler arasında da ilişkiler bulunamamıştır. Ancak, Pro/Pro genotipinin sıklığı yüksek histolojik evre ile artmaktadır fakat bu durumda da istatistiksel bir anlamlılık olmadığı gözlenmiştir. *p53* 72. kodon mutasyonlarının Pro/Pro, Arg/Arg ve Arg/Pro genotiplerinin dağılımları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç bulunamamıştır. Çalışmada 72. kodon polimorfizminin Pro/Pro

genotipi için over kanserlerinde bağımsız bir belirteç olabileceğini düşündürmektedir [162].

Çalışmamızda, endometrium kanserli hastalar ile sağlıklı bireyler arasında Arg/Arg homozigotluğu istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). Pro/Pro homozigotluğu ve Arg/Pro heterozigotluğu arasında istatistiksel açıdan önemli bir fark bulunamamıştır ($p>0,05$).

Zubor ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmanın sonucunda, hastalarda kontrollere göre daha yüksek olduğu gözlenen prolin allel ve genotip sıklığı istatistiksel açıdan anlamlı değildi. Ayrıca, erken menarş ve geç menopoz olan kadınlarda kanser için Pro/Pro genotipi daha düşük bir risk ile ilişkili bulunmuştur. Kafkas kadınlarında yapılan bu çalışmanın sonucunda *p53* 72. kodon Arg/Pro polimorfizmi sıklığı açısından anlamlı bir fark olmadığı bildirilmiştir. Sadece Kafkas kadınlarında endometrium kanser riskiyle prognostik faktörler arasında zayıf bir ilişki olduğu tespit edilmiştir [163].

Ghasemi ve arkadaşları, İranlı kadın popülasyonunda *p53* gen 72. kodon polimorfizminin Pro/Pro genotipi artmış endometrial kanser riski ile ilişkili olduğunu tespit etmişlerdir [164].

Çalışmamızda *p53* geni için toplam 106 kanserli hasta ve 101 sağlıklı bireye ait kanlardan izole edilen DNA'lar uygun primerler kullanılarak PZR yapılmıştır. PZR ürünlerinin *Bst*UI enzimi ile kesimi sonucunda genotip sıklıkları %69,8 Arg/Pro heterozigot, %19,8 Arg/Arg homozigot ve %10,4 Pro/Pro homozigot olarak tespit edilmiştir. Kontrol grubunda ise genotip sıklıkları %53,5 Arg/Pro heterozigot, %40,6 Arg/Arg homozigot ve %5,9 Pro/Pro homozigot olarak belirlenmiştir. Hasta ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmiştir ($p<0,05$).

Çalışmamız sonucunda hastalarda Arg/Pro genotipi ve Pro/Pro genotipleri kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Hastalarda Arg/Arg genotipi ise kontrol grubuna göre daha düşük olduğu gözlenmiştir.

Bu çalışma serviks, over ve endometriyum kanserlerinde gelişiminde *p53* 72. kodonun oynadığı rolün anlaşılmasında ve daha sonra yapılacak olan çalışmalar için bir temel oluşturmaktadır. *p53* 72. kodon polimorfizminin jinekolojik kanserlere yatkınlık oluşturabileceği düşünülmektedir. Bu polimorfizm jinekolojik kanserlerinin riski için önemli bir belirleyici olabilir, fakat karsinogenez için yeterli değildir. Bu nedenle 72. kodon polimorfizimlerinin jinekolojik sistem kanserlerinin gelişmesinde bir rol oynayabileceği konusu daha fazla çalışma ve olgu sayısı ile desteklenmelidir.

MTHFR C677T polimorfizminde, 4. ekzonda 677. nükleotid olan Sitozinin → Timin' e değişimi sonucu bir nokta mutasyonu oluşmaktadır ve bu mutasyonda genin ürünü olan proteinin 226. pozisyonunda alanin aminoasiti yerine valin geçmektedir. Alanin/Valin değişimiyle MTHFR aktivitesinde azalma görülmekte, bu azalma 5-metiltetrahidrofolat düzeyinde azalmaya sonuç olarak da homosisteinin metiyonine dönüşmemesine neden olmaktadır. Böylece plazmadaki homosistein düzeyinde artış olurken, plazma folat seviyesinde de azalış görülmektedir [128,140-144]. MTHFR C677T polimorfizmine bağlı olarak gelişen hiperhomosisteinemi ve folat seviyesindeki azalışın kanserogenezle ilişkili olduğu bildirilmiştir [165,166].

MTHFR geninde 677. nükleotidin her iki allelde mutasyona uğramadan CC (Alanin/Alanin) homozigot normal genotipi, iki allelden birinde mutasyon oluşmasıyla CT (Alanin/Valin) heterozigot ve her iki allelde de mutasyon oluşması durumu TT (Valin/Valin) homozigot mutant genotipi oluşması sebebi ile genin kodladığı enzimin aktivitesinin azaldığı düşünülmektedir [144].

Çalışmamızda 106 jinekolojik kanserli hasta ve 101 sağlık birey MTHFR C677T genotip dağılımı bakımından incelenmiştir. Kanserli hasta grubunda 677CC homozigot normal genotip sıklığı %42,5, 677CT, heterozigot genotip sıklığı %52,8 ve 677TT homozigot mutant genotip sıklığı %4,7 olarak bulunmuştur. Kontrol grubunda 677CC homozigot normal genotip sıklığı %43,6, 677CT heterozigot genotip sıklığı %49,5 ve 677TT homozigot mutant genotip sıklığı %6,9 olarak bulunmuştur. Serviks, endometrium ve over kanserli hastalar CC, CT ve TT

genotipleri ile kontrol grubunda CC, CT, TT genotipleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır.

Esteller ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada MTHFR C677T polimorfizmi endometriyum kanserinin gelişmesinde bir risk faktörü olmadığını bildirmişlerdir [155].

Kore’ de serviks kanserli hastalarla yapılan çalışma sonucunda MTHFR C677T polimorfizmi serviks kanserinin gelişiminde bir risk faktörü olarak belirlenmiştir [168]. Fakat Lambropoulos ve arkadaşları MTHFR C677T polimorfizminin serviks kanserinin gelişiminde risk faktörü olmadığını belirtmişlerdir [167].

MTHFR 677CT polimorfizmi endometriyum kanseri, servikal intraepitelyal neoplasi meme ve ovaryum kanserlerinin artmış riskiyle ilişkilendirilmiştir [154]. 677TT polimorfizmi de artan endometrium kanseri riskiyle ilişkili olduğu bildirilmiştir [155].

Bu çalışma serviks, over ve endometrium kanserlerinin gelişiminde *MTHFR*’nin oynadığı rolün anlaşılmasında ve daha sonra yapılacak olan çalışmalar için bir temel oluşturmaktadır. *MTHFR* polimorfizminin jinekolojik kanserlere yatkınlık oluşturabileceği düşünülmektedir. Bu polimorfizm jinekolojik kanserlerinin riski için önemli bir belirleyici olabilir, fakat karsinogenez için yeterli değildir. Bu nedenle *MTHFR* polimorfizimlerinin jinekolojik sistem kanserlerinin gelişmesinde bir rol oynayabileceği konusu daha fazla çalışma ve olgu sayısı ile desteklenmelidir.

KAYNAKLAR

1. Lewin, B., "Genes", **Oxford University Press**, New York, 1089-1171 (1997).
2. Klug, W.S., Cummings, M.R., "Genetik", (ed). Öner, C., **Palme Yayıncılık**, Ankara, 312-515-516-640-647 (2002).
3. Nussbaum, R. L., McInnes R. R., Willard, F. H. And Boerkoel III, F. C., "Thompson & Thompson Tıbbi Genetik", **Güneş Kitabevi**, Ankara, 311-321 (2005).
4. Strachan T, Read AP., Human Molecular Genetics 3. 3rd edition. **Garland Science**, New York, (2004).
5. Weinberg, B. A., "The genetics origins of human cancer", **Cancer**, 61: 1963-1968, (1988).
6. Tuncer, A.M., "Türkiye’de Kanser Kontrolü", **Onur Matbaacılık**, Ankara, 1-113 (2007).
7. Çiçek, M.N., Akyürek, C., Çelik, Ç., Haberal, A., "Kadın Hastalıkları ve Doğum Bilgisi", Güneş Kitabevi, Ankara, İstanbul, (2006).
8. İnternet: Klinik gelişim dergisi, "Temel kanser fizyopatolojisi makalesi", http://www.klinikgelisim.org.tr/kg22_3/8.pdf (2010).
9. Cooper, G.M., "The Cell. A Molecular Approach", **ASM Press**, Washington, 521-633, (1997).
10. Mange, E.J., Mange, A.P., "Basic Human Genetics, 2nd Ed.", **Sinauer yayınevi**, Massachusetts, 365-388, (1999).
11. Bates, S., Vosuden, K.H., "Mechanısım of *p53*-mediated apoptosis", **Cell. Mol. Sci.**, 55:28-37 (1999).
12. Kumar, V.K., Cotran, R.S., Robbins, S.L., "Temel Patoloji", 7. Baskı, **Nobel Yayınevi**, İstanbul, 171-196 (2003).
13. Basaran, A., "Tıbbi Biyoloji Ders Kitabı", 7. Baskı, **Günes & Nobel Tıp Kitabevleri**, Bursa, 375-377 (2005).
14. Rupnarain, C., Dlamini, Z., Naicker, S., ve Bhoola, K., "Colon cancer: genomics and apoptotic events", **Biol. Chem.**, 385, 449-464 (2004).
15. Hendon, S.E. ve Dipalma, J.A., "U.S. practices for colon cancer screening", Division of Gastroenterology, **University of South Alabama College of Medicine**, Mobile, AL, USA", 54(4), 179-183 (2005).

16. Sezgin, İ., “Klinik Genetik”, *Cumhuriyet Üniversitesi Yayınları*, Sivas, 216-217 (1998).
17. Güneş, H.V., “Moleküler Hücre Biyolojisi”, 1. Baskı, *Kaan Kitabevi*, Eskişehir, 10 (2003).
18. İnternet: Hacettepe Üniversitesi “Elektroforez notları”, http://yunus.hacettepe.edu.tr/~mergen/sunu/s_elektroforez.pdf (2009).
19. Govan, V.A., Loubser, S., Saleh, D., Hoffmant, M. and Williamson A. L., “No relationship observed between human *p53* codon-72 genotype and HPV-associated cervical cancer in a population group with a low arginine-72 allele frequency”, *International Journal of Immunogenetics*, 34: 213-217 (2007).
20. Taşcıoğlu, N., “Gastrointestinal sistem kanserlerinde Metilentetrahidrofolat redüktaz geni 677C-T, 1298 A-C ve Metiyonin sentetaz geni 2756 A-G polimorfizmlerinin incelenmesi”, Yüksek lisans Tezi, *Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kayseri*, 31-32 (2005).
21. Bahçeci, Z., “Moleküler Biyoloji”, *Göktuğ Basın Yayın Dağıtım*, Amasya, 251 (2007).
22. Ekmekçi, A., Erbaş, D., “Kanserin Moleküler Mekanizması Onkogenler ve Büyüme Fakörleri”, *Ankara*, 58, 59, 114 (1991).
23. Berek, J.S., “Novak Jinekoloji”, (ed) Erk, A., *Nobel Tıp Kitapevleri*, İstanbul, 79-82, 134-135, 1124 (2004).
24. Kohl, N. E., et al, “Transposition and amplification of oncogene-related sequences in human neuroblastomas”, *Cell*, 35: 359 (1983).
25. Spandidos, D.A. and Anderson, ML. M., “Oncogenes and Oncosupressor genes: Their involvement in cancer”, *Journal of Pathology*, 157: 1-10 (1989).
26. Spandidos, D.A., “A unified theory fort he development of cancer”, *Bioscience Reports*, 6 (8): 691 (1986).
27. Shen-Ong, G. L., Keath, E. J., Piccoli, S. P., “Novel *myc* oncogene RNA from abortive immunoglobulin-gene recombination in mouse plasmacytomas”, *Cell* 31, 443 (1983).
28. Ayhan, A., Durukan, T., Günalp, S. ve ark. “Temel Kadın Hastalıkları ve Doğum Bilgisi”, *Güneş Tıp Kitapevleri*, Ankara, 1046-1048 (2008).

29. İnternet: Süleyman Demirel Üniversitesi “Patoloji Ders Notları”
<http://tip.sdu.edu.tr/akademikyapi/dersnotlar/Patoloji/DocDrNilgunKapucuoglu/oknogen.pdf> (2010).
30. Evrenkaya, T., Aksoy, F., “Genetik ve Kanser”, *Ankara Patoloji Bülteni*, 10 (1): 93-97 (1993).
31. Fernandes, A.M., Hamburger, A.W., Gerwin, B.I., “Production of epidermal growth factor related ligands in tumorigenic and benign human lung epithelial cells”, *Cancer Letters*, 142: 55-63 (1999).
32. Siegfried, J.M., Demichele, M.A.A., Davis, A.G., Gubish, C.T., Singh-Kaw, P., “Growth factors and receptors in non small cell lung cancer”, In: Brambilla C, Brambilla E, ed. Lung tumors fundamental biology and clinical management. New York, *Marcel Dekker Inc.*, 317- 336 (1999).
33. Hastürk, S., “Akciğer kanserinin moleküler biyolojisi”, In: Hastürk S., Yüksel M. edi, *Akciğer Kanseri*, İstanbul, 1-27 (2000).
34. Baserga, R., Porcu, P., Sell, C., “Oncogenes, growth factors, and control of the cell cycle”, *Cancer Surv.*, 16: 201-213 (1993).
35. Smith, M. R., Matthews N. T., Jones, K. A., et al., “Biological actions of oncogenes”, *Pharmacol Ther.*, 58: 211-236 (1993).
36. Studzinski, G. P., “Oncogenes, growth and the cell cycle: an overview”, *Cell Tissue Kinet.*, 22: 405-424 (1989).
37. Macdonald F., Ford C.H.J., Casson A.G., “Molecular Biology of Cancer, Second Edition”, *BIOS Scientific Publishers*, London and Newyork (2004).
38. Yukishige Y., Teruhiko Y, Kenshi H., “*p53* Gene Mutations in Gastric Cancer Metastases And in Gastric Cancer Cell Lines Derived from Metastases”, *Cancer Research*, 51:5800-5 (1991).
39. Mueller R.F., Young I.D., “Emery’s Elements of Medical Genetics” *Produced by Longman*, Singapore, 196-207 (1998).
40. Criss W.E., “Kanserle ilişkili Genler- Onkogenler”, *Doktor*, 228-33 (1994).
41. Buchman V.L., Chumakov P.M., Ninkina N.N., Samarina O.P. and Georgiev G.P., “A variation in the structure of the protein-coding region of the human *p53* gene”, *Gene Elsevier*, 70: 245-52 (1988).
42. Xiaoling Zhou, Xin Wei Wang, Lixin Xu, Koichi Hagiwara, “COOH-Terminal Domain of *p53* Modulates *p53*-mediated Transcriptional Transactivation”, *Cell Growth, and Apoptosis. Cancer Research*, 59:843-8 (1999).

43. Kastan, M.B., Onyekwere, O., Sidransky, D., Vogelstein, B., "Participation of p53 Protein in the Cellular Response to DNA Damage", *Cancer Research*, 51:6304-11 (1991).
44. Lane, D.P. And Fisher, P.M., "Turning the key on p53", *Nature*, 427:480-490 (2004).
45. Zheng, L., Li, S., Boyer, T.G., "Lessons learned from BRCA1 and BRCA2", *Oncogene*, 6159-75 (2001).
46. Tavassoli, F.A., "Tumors of the brast and female genital organs", (ed) Devilee, P., *IARC Press*, Lyon (2003).
47. İnternet: Uludağ Üniversitesi "Kanser Biyolojisi ve Onkogenler", <http://biyokimya.uludag.edu.tr/SiklusApoptozisKanser.pdf>(2010).
48. Alberts, B., Bray, D., Lewis, J. Raff, M., Roberts, K. And Watson, J. D., "Molecular Biology of the Cell", *New York and London*, (1983).
49. Taylor, A. M., McConville C. M., Byrd, P. J., "Cancer and processing disorders", *Br Med Bull*, 50: 708-717 (1994).
50. İnternet: Hücre döngüsü, <http://img508.imageshack.us/img508/9011/hc2cw5.png> (2010).
51. Jacobs, T., "Control of the cell cycle", *Dev Biol*, 153: 1-15 (1992).
52. Weinert, T., Lydall D., "Cell cycle checkpoints, genetic instability and cancer", *Semin Cancer Biol*, 4: 129-140 (1993).
53. Fridovich-Keil, J.L., Hansen, L.J., Keyomarsi K., et al., "Progression through the cell cycle: an overview", *Am. Rev. Respir. Dis.*, 142: 53-56 (1990).
54. Reddy, G.P., "Cell cycle regulatory events in G1-S transition of mammalian cells", *J. Cell Biochem.*, 54: 379-386 (1994).
55. Hartwell, L.H., Weinert T.A., Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle", *Science*, 246: 629-634 (1989).
56. Strachan, T., Read, A.P., "Human Molecular Genetics 3. 3rd edition", *Garland Science*, New York (2004).
57. Morena, S., Nurse, P., "Substrats for p34cdc2: in vivo vritas?", *Cell*, 61: 743-752 (1990).
58. İnternet: Kadın sağlığı bilgilendirme sayfası "Papsmear incelemesi", http://www.jinekoloji.org/dosyalar/resim/illo_papsmear.gif (2009).

59. Farbman, A. I., "Electron microscopic study of palate fusion in mouse embryos", *Dev. Biol.*, 18: 93-116 (1968).
60. Williams, G.T., Smith C.A., "Molecular regulation of apoptosis: genetic controls on cell death", *Cell*, 74: 777-779 (1993).
61. Vaux, D.L., "Toward and understanding of the molecular mechanisms of physiological cell death", *Proc Natl Acad Sci USA*, 90: 786-789 (1993).
62. Barron, B.A., Richart, R.M., "An epidemiologic study of cervical neoplastic disease", *Cancer*, 27: 978 (1971).
63. Guijon, F.B., Paraskaves, M., Brunham, M., "The association of sexually transmitted diseases with cervical intraepithelial neoplasia: a case control study", *Am. J. Obsteret. Gynecol.*, 151: 185 (1985).
64. Meland, M.R., Flehinger, B.J., "Early incidence rates of precancerous cervical lesions in women using contraceptives", *Gynecol. Oncol.*, 1:290-294 (1973).
65. Kotsky, L. A., Holmes K. K., Critchlow, C.W., et al., "A cohort study of the risk for cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or 3 in relation to papillomavirus infection", *N. Engl. J. Med.*, 327: 1272 (1992).
66. Olsen, A.O., Gjoen, K., Sauer,T., et al., "Human papillomavirus and cervical intraepithelial neoplasia grade II-III: A population-based case-control study", *Int. J. Cancer*, 61:312 (1995).
67. Bosch, F., Munoz, N., "Human papillomavirus and cervical neoplasia: a critical review of the epidemiological evidence", *IARC Sci. Publ.*, 94:135 (1989).
68. Wright, T.C., Richart, R.M., "Role of human papillomavirus in the pathogenesis of genital tract warts and cancer", *Gynecol. Oncol.*, 37: 151-164 (1990).
69. Wright, T.C., Schiffman, M., "Adding a test for human papillomavirus DNA to cervical cancer screening", *N. Eng. J. Med.*, 348(6): 489-490 (2003).
70. Bosch, F.X., Manos, M.M., Munoz, N., et al., "International Biological Study on Cervical Cancer Study Group, Prevalance of human papillomavirus in cervical cancer: A worldwide perspective", *J. Natl. Cancer Inst.*, 87:796 (1995).
71. Munger K., Scefher M., Huibregtse J.M., et al., "Interactions of HPV E6 and E7 oncoproteins with tumor supressor gene protacts", *Cancer Surv.*, 12:197-217 (1992).
72. Hakama, M., Miller, A.B., "Screening for Cancer of the Uterine Cervix, Vol. 76", (eds) Day, N.E., *IRAC Scientific Publications*, Lyons, (1986).

73. MacGregor, J.E., Moss, S.M., Parkin, D.M., et al., "A case control study of cervical cancer screening in northeast Scotland", **Br. Med. J.**, 290:1543-1546 (1985).
74. Kösebay, D., Demirkıran, F., "İnvaziv serviks kanseri", Jinekolojik Onkoloji, (ed) Güner, H., **Çağdaş Medikal Kitapevi**, Ankara, 91 (2002).
75. Patnick, J., "Cervical screening programme", **J. Med. Screen**, 6:57 (1999).
76. Morrow, C.P., Curtin, J.P., "Synopsis of Gynecologic Oncology, Fifth edition", **Churchill Livingstone**, Philadelphia (1998).
77. Butterworth, C.E., "Effect of folate on cervical cancer", **Ann. NY. Acad. Sci.**, 669:293 (1992).
78. Hatch, K.D., "Cervical cancer", Practical Gynecologic Oncology 2nd ed., (ed) Hacker, N.F., **Williams & Wilkins**, Baltimore (1994).
79. İnternet: GlaxoSmithKline İlaçları "HPV enfeksiyonu ve serviks kanserine geçiş" http://www.servikskanseri.org/serviks_kanseri/i/imgserviksenfeksiyon.jpg(2009).
80. Pazdur, E.R., et al., "Neuroendocrine carcinoma of the cervix. Implication for staging and therapy", **Gynecol. Oncol.**, 12:120 (1981).
81. Greenlee, R.T., Murray, T., Bolden, S., and Wingo, P.A., "Cancer statistics, 2000 CA", **A Cancer J. for Clinic.**, 50:7-33 (2000).
82. Cannistra, S.A., "Cancer of the ovary", **N. Eng. J. Med.**, 329: 1550-9 (1993).
83. Runnebaum, I.B., and Stickeler, E., "Epidemiological and molecular aspects of ovarian cancer risk", **J. Cancer Res. Clinic. Oncol.**, 127:73-9 (2001).
84. Yancik, R., "Ovarian cancer. Age control in incidence, histology, disease stage at diagnosis, and mortality", **Cancer**, 71:517-23 (1993).
85. İnternet: Gebelik bilgilendirme sitesi "Uterus", <http://gebelik.org/dosyalar/infertil/uterus.gif> (2009).
86. Gregg, S., Genuardi, M., Benedetti-Panici, P., Cento, R., Scambia, G., Neri, G., Mancuso, S., "Analysis of 138 consecutive ovarian cancer patients: incidence and characteristics of familial cases", **Gynecol. Oncol.**, 39:300-304 (1994).
87. Piver, M.S., Baker, T.R., Jishi, M.F., Sandeck, A.M., Tsukada, Y., Natarajan, N., Mettlin, C.J., Blake, C.A., "Familial ovarian cancer. A report of 658 families from the Gilda Radner Familial Ovarian Cancer Registry 1981-1991", **Cancer**, 71:582-588 (1993).

88. Dellas, A., Torhots, J., Jiang, F., Proffit, J., et al., "Prognostic value of genomic alteration in invasive cervical squamous cell carcinoma of clinical stage IB detected by comparative genomic hybridization", *Cancer Research*, 59: 3475-3479 (1999).
89. Magtibay, P.M., Perrone, J.F., Stamhope, C.R., Katzmman, J.A., et al., "Flow-cytometric DNA analysis of early stage adenocarcinoma of the cervix", *Gynecol Oncol.*, 75:20-24 (1999).
90. Marks, J.R., Davidoff, A.M., Kerns, B.J., Humphrey, P.A., Pence, J.C., Dodge, R.K., et al., "Overexpression and mutation of *p53* in epithelial ovarian cancer", *Cancer Res*, 51: 2979-2984 (1991).
91. Eifel, P.J., Morris, M., Oswald, M.J., Wharton, J.T., Delclos, L., "Adenocarcinoma of the uterine cervix: prognosis and patterns of failure in 367 cases", *Cancer.*, 65:2507-14 (1990).
92. Whitaker, G.K., Lee, R.B., Benson, W.L., "Carcinoma of the endometrium in young women", *Milit Med.*, 151:25 (1986).
93. Gallup, D.G., Stock, R.J., "Adenocarcinoma of the endometrium in women 40 years of age or younger", *Obstet Gynecol*, 64:417 (1984).
94. Candiani, G.B., Mangioni, C., Narzi, M.M., "Surgery in endometrium cancer: age, route and operability rate in 854 stage 1 and 2 fresh consecutive cases: 1955-1976", *Gynecol Oncol.*, 6:363-72 (1978).
95. Zucker, P.K., Kasdon, E.J., Feldstein, M.L., "The validity of pap-smear parameters as predictors of endometrial pathology in postmenopausal women", *Cancer*, 56: 2256-2263 (1985).
96. Yavuz, H., "Kadın Genital Kanseri", *Yargıcıoğlu Matbaası*, Ankara, 271 (1978).
97. Parker, S.I., Tong, T., et al., "Cancer Statistics 1996", *CA Cancer J Clin.*, 46: 5-28 (1996).
98. Vardar, M.A., "Endometriyal kanserde erken tanı ve tarama", *Arşiv*, 9:311-324 (2000)
99. Purdie, D.M., Green, A.C., "Epidemiology of endometrial cancer", *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.*, 15:341-54 (2001).
100. Barakat, R.R., "Contemporary issues in management of endometrial cancer", *Ca-A Cancer J. Clin.*, 48:299-314 (1998).
101. Levi, F., Franceschi, S., Negri, E., La Vecchia, C., "Dietary factors and the risk of endometrial cancer", *Cancer*, 71:3575-81(1993).

102. Mahboubi, E., Eyler, N., Wynder, E.L., "Epidemiology of cancer of endometrium", *Clin. Obstet. Gynecol.*, 302:729-31 (1982).
103. MacMahon, B., "Risk factors for endometrial cancer", *Gynecol. Oncol.*, 2:122-9 (1974).
104. Grady, D., Gebretsadik, T., Kerlikowske, K., et al., "Hormone replacement therapy and cancer risk: a meta analysis", *Obstet. Gynecol.*, 85: 304-313 (1995).
105. International Federation of Gynecology and Obstetrics: Annual report on the results of treatment of gynecologic cancer. *Int. J. Gynecol. Obstet.*, 28: 189-90 (1989).
106. Hendrickson, M., Ross, J., Eifel, P., Martinez, A., Kempson, R., "Uterine papillary serous carcinoma a highly malignant form of endometrial adenocarcinoma", *American Journal of Surgical Pathology*, 6: 93 (1982).
107. Imamura, T., Arima, T., Kato, H., Miyamoto, S., Sasazuki, T., Wake, N., "Chromosomal deletions K-ras gene mutations in human endometrial carcinomas", *International Journal of Cancer*, 51: 47 (1992).
108. Internet: Genetics Home Reference "Gene",
<http://ghr.nlm.nih.gov/dynamicImages/chromomap/chr-17.jpeg> (2009).
109. Pasternak, J.J., "An introduction to human molecular Genetics", 365-413 (1999).
110. Nigro, J.M., Baker, S.J., Preisinger, A.C., Jessup J.M., "Mutations in the *p53* gene occur in diverse human tumour types", *Nature*, 342:705-7 (1989).
111. Sambrook, I., Fritsch, E.F., and Maniatis, T., "Molecular cloning, A Laboratory Manual, second edition", *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, New York, 1989.
112. Disaia, P.J., Creasman, W.T., "Klinik Jinekolojik Onkoloji", (ed). Ayhan A., *Güneş Kitabevi*, Ankara, 576 (2003).
113. Saraçoğlu, O.F., "Özet Temel ve Klinik Bilimler cilt I", *Güneş kitabevi yayınları*, Ankara, 5-382 (1996).
114. Levine, A.J., Momand, J., Finlay A. C., "The *p53* tumour suppressor gene", *Nature*, 351:453-6 (1991).
115. Janus, F., Albrechtsen, N., Dornreiter, I., Wiesmüller, L., "The dual role model for *p53* in maintaining genomic integrity", *Cell. Mol. Life. Sci.*, 55:12-27 (1999).

116. Oren, M., Rotter, V., "Introduction: *p53*-the first twenty years", *Cell. Mol. Life. Sci.*, 55:9-11 (1999).
117. Pietsch, E.C., Humbey, O., Murphy, M.E., "Polymorphisms in the *p53* pathway", *Oncogene*, 25 (11):1602-1611 (2006).
118. Yi, S.Y., Lee, W.J., "A *p53* genetic polymorphism of gastric cancer: difference between early gastric cancer and advanced gastric cancer", *World J Gastroenterol*, 12(40):6536-6539 (2006).
119. Sul, J., Yu, G.P., Lu, Q.Y., Lu, M.L., Setiawan, V.W., Wang, M.R., Guo, C.H., Yu, S.Z., Mu, L., Cai, L., Kurtz, R.C., Zhang, Z.F., "*p53* Codon 72 polymorphisms: a case-control study of gastric cancer and potential interactions", *Cancer Lett*, 238(2):210-223 (2006).
120. Zehbe, I., Voglino, G., Wilander, E., Delius, H., Marongiu, A., Edler, L., Klimek F., Andersson, S., Tommasino, M., "*p53* codon 72 polymorphism and various humanpapillomavirus 16 E6 genotypes are risk factors for cervical cancer development", *Cancer Res*, 61(2):608-611 (2001).
121. Zhang, Z.W., Laurence, N.J., Hollowood, A., Newcomb, P., Moorghen, M., Gupta, J., Feakins, R., Farthing, M.J., Alderson, D., Holly, J., "Prognostic value of TP53 codon 72 polymorphism in advanced gastric adenocarcinoma", *Clin. Cancer Res.*, 10(1):131-135 (2004).
122. Shepherd, T., Tolbert, D., Benedetti, J., Macdonald, J., Stemmermann, G., Wiest, J., DeVoe, G., Miller, M.A., Wang, J., Noffsinger, A., Fenoglio-Preiser, C., "Alterations in exon 4 of the *p53* gene in gastric carcinoma", *Gastroenterol.*, 118(6):1039-1044 (2000).
123. Tenti, P., Vesentini, N., Rondo, M.S., Zappatore, R., Migliora, P., Carnevali, L. and Ranzani, G.N., "*p53* Codon Polymorphism Does Not Affect the Risk of Cervical Cancer in Patients from Northern Italy", *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 9: 435-438 (2000).
124. Tada, M., Furuuchi, K., Kaneda, M., Matsumoto, J., Takahashi, M., Hirai, A., Mitsumoto, Y., Iggo, R.D., Moriuchi, T., "Inactivate the remaining *p53* allele or the alternate p73? Preferential selection of the Arg72 polymorphism in cancers with recessive *p53* mutants but not transdominant mutants", *Carcinogenesis* 22(3):515-517 (2001).
125. Vogelstein, B., Kinzler, K.W., "Endometrial Cancer", The Genetic Basis Of Human Cancer , 2nd ed., *Mc Graw Hill Medical Publishing Division*, New York, 681-688 (2002).
126. Vogelstein, B., Kinzler, K.W., "Endometrial Cancer", The Genetic Basis Of Human Cancer , 2nd ed., *Mc Graw Hill Medical Publishing Division*, New York, 675-680 (2002).

127. İnternet: Apoptoz ve nekroz,
<http://img166.imageshack.us/img166/6031/celldeathdi6.jpg> (2010).
128. Dikmen, M., “Metilentetrahidrofolat Redüktaz (MTHFR) Enziminin Moleküler Biyolojisi ve Hastalıklarla İlişkisi”, Kocatepe Tıp Dergisi **The Medical Journal of Kocatepe**, 5: (2004).
129. Daubner, S.C., Matthews, R. G., “Purification and properties of MTHFR from pig liver”, **J.Biol Chem**, 257:140-145 (1982).
130. Kutzbach, C., Stokstad, E. L., “Mammalian MMTHFR. Partial purification, properties and inhibition by S-adenosylmethionine”, **Biochem Biophys Acta**, 250:459-477 (1971).
131. Hillman, R.S., “Hematopoietic agents: growth factors, minerals and vitamins”, The pharmacological basis of therapeutics, Googman G. A., Rall T.W., Nies A.S., Taylor P., **Pergamon Pres.**, New York, 1277-1310 (1990).
131. Narayanan, S., McConnell, J., Little, J., Sharp, L., Piyathilake, C. J. , Powers H., Basten and Duthie, S. J., “Associations between Two Common Variants C677T and A1298C in the Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene and Measures of Folate Metabolism and DNA Stability” **Cancer Epidemiology**, 13:1436, (2004).
133. Goyette, P., Pai, A., Milos, R., Frosst, P., Tran, P., Chen, Z., Chan, M., Rozen, R., “Gene structure of human and mouse methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR)”, **Mamm Genome**, 9(8):652-6 (1998).
134. Leclerc, D., Wilson, A., Dumas, R., Gafuik, C., Song, D., Watkins, D., Heng, H. Rommens, J. M., Scherer, S. W., Rosenblatt, D. S., Gravel, R.A., “Cloning and mapping of a cDNA for methionine synthase reductase, a flavoprotein defective in patients with homocystinuria”, **Proc Natl Acad Sci.**, 17;95(6):3059-64 (1998).
135. Rosenblatt, D. S., “Clinically Imported Genes: Methylenetetrahydrofolate Reductase”, **Clin Invest Med**, 24 (1), 56-9 (2001).
136. Homberger, G., Linnebank, M., Winter, C. et al., “Genomic structure and transcript variants of the human MTHFR gene”, **European j of human genetics**. 8:725-729 (2000).
137. Gos, M., Szpecht-Potocka, A., “Genetic basis of neural tube defects”, **II. Genes correlated with folate and methionine**, (2002).
138. Botto, L. D., Yang, Q., “5, 10- MTHFR gene variants and congenital anomalies:A huge rewiev”, **Am J Epidemiol.**, 151:862-877 (2000).

139. Daly, S. F., Molloy, A. M., Mills, J.L. et al., "The influence of 5,10-MTHFR genotypes on enzyme activity in placental tissue", *B J of Obstetrics and gynaecology*, 106: 1214-1218 (1999).
140. Frosst, P., Blom, H.J., Milos, R., "A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in MTHFR", *Nat Genet.*, 10: 111-113 (1995).
141. Demuth, K., Moatti, N., Hanon, O., Benoit, M. O., Safar, M., Girerd, X., "Opposite effects of plasma homocysteine and the methylenetetrahydrofolate reductase C677T mutation on carotid artery geometry in asymptomatic adults. Arterioscler", *Thromb Vasc Biol.*, (1998).
142. Friedman, G., Goldschmidt, N., Friedlander, Y., Ben-Yehuda, A., Selhub, J., Babaey, S., Mendel, M., Kidron, M., Bar-On, H., "A common mutation A1298C in human methylenetetrahydrofolate reductase gene: association with plasma total homocysteine and folate concentrations", *J Nutr.*, 129 (9): 1656-61 (1999).
143. Lee, H. A., Choi, J.S., Ha, K. S., Yang, D. H., Chang, S. K., Hong, S. Y., "Influence of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism on plasma homocysteine concentration in patients with end-stage renal disease", *Am J Kidney Dis.*, 34 (2): 259-63 (1999).
144. Brattstrom, L., Wilcken, D. E., Ohrvik, J., Brudin, L., "Common MTHFR gene mutation leads to hyperhomocysteinemia but not to vascular disease: the result of a meta analysis", *Circulation*. 98:2520-6 (1998).
145. Güleç, S., Aras, O., Akar, E., Tutar, E., Onurlu, K., Avcı, F., Dinçer I., Akar N., Oral D., "MTHFR gene polymorphism and risk of premature myocardial infarction", *Clinical Cardiology.*, 24 (4):281-284 (2001).
146. Bova, I., Chapman, J., Sylantiev, C., Korczyn, A. D., Bornstein, N.M., "The T677C MTHFR gene polymorphism and carotid atherosclerosis", *Stroke.*, 30:2180-82 (1999).
147. Kang, S., Wong, P. W. K., Susmano, "Thermolabile MTHFR: An inherited risk factor for coronary artery disease" *J Hum Genet.*, 48:536-545 (1991).
148. Fodinger, M., Horl, W. H., Sunder-Plassman, G., "Molecular biology of 5,10-MTHFR", *J Neurol.*, 13 (1):20-33 (2000).
149. Leopardi, P., Marcon F., Caiola S., Cafolla A., Siniscalchi E., Zijno A., Crebelli R., "Effects of Folic Acid Deficiency and MTHFR C677T Polymorphism on Spontaneous and Radiation-Induced Micronuclei in Human Lymphocytes", *Mutagenesis*, 21 (5):327-333 (2006).

150. Götze, T., Röcken, C., Röhl F., Wex T., Hofmann J., Westphal S., Maltferheiner P., Ebert M., Dierkes J., “Gene Polymorphisms of Folate Metabolizing Enzymes and the Risk of Gastric Cancer”, *Cancer Letters*, 251: 228–236 (2007).
151. Jiang, Q., Chen, K., Ma, X., Li, Q., Yu, W., Shu, G., Yao, K., “Diets, Polymorphisms of Methylenetetrahydrofolate Reductase, and the Susceptibility of Colon Cancer and Rectal Cancer”, *Cancer Detection and Prevention*, 29:146–154 (2005).
152. Chen J., Giovannucci E., Kelsey K., Rimm E. B., Stampfer M. J., Colditz G. A., Spiegelman D., Willett W.C., Hunter D. J., “A methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism and the risk of colorectal cancer”, *Cancer Res.*, 56:4862-4864 (1996).
153. Skibola, C. F., Smith, M. T., Kane E., Roman E., Rollinson S., Cartwright R.A., Morgan G., “Polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene are associated with susceptibility to acute leukemia in adults”, *Proc Natl Acad Sci USA.*, 96(22):12810-5 (1999).
154. Song, C., Xing, D., Tan, W., Wel, Q., Lin, D., “Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms increase risk of esophageal squamous cell carcinoma in a Chinese population”, *Cancer Research*, 61: 3272-3275 (2001).
155. Esteller, M., Garcia, A., Martinez-Palones, J. M., Xercavins, J., Reventos, J., “Germ line polymorphisms in cytochrome-P450 1A1 (C4887 CYP1A1) and methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) genes and endometrial cancer susceptibility”, *Carcinogenesis*. 18(12):2307-11 (1997).
156. Ayhan, A., Kösebay, D., Yüce, K., “Jinekoloji, Üreme ve Endokrinolojisi ve İnfertilite Jinekolojik Onkoloji, cilt 2”, *Medicel Network*, 1433-1453 (2006).
157. Whittemore, A. S., Harris, R., Intyre, J., “Characteristics relating to ovarian cancer risk. Collaborative analysis of 12 US case control studies. Invasive epithelial ovarian cancers in white woman. Collaborative Ovarian Cancer Group”, *Am. J. Epidemiol.*, 136:1184 (1992).
158. İnternet: B-12 metabolik reaksiyonu,
http://www.annalsofian.org/articles/2007/10/4/images/AnnIndianAcadNeurol_20071041983781220.jpg (2010).
159. İnternet: Genetics Home Refernce “Gene”,
<http://ghr.nlm.nih.gov/gene=mthfr> (2010).
160. İnternet: Hacettepe Üniversitesi “DNA Dizi Analizi Notları”,
http://yunus.hacettepe.edu.tr/~mergen/derleme/d_dizi.pdf (2010).

161. Govan, V. A., Loubser, S., Saleh, D., Hoffmant, M. and Williamson, A-L., "No relationship observed between human *p53* codon-72 genotype and HPV-associated cervical cancer in a population group with a low arginine-72 allele frequency", *International Journal of Immunogenetics*, 34:213-217 (2007).
162. Malisic, E., Jankovic, R., Slavkovic, D., Milovic-Kovacevic, M., Radulovic, S., "*p53* gene mutations and codon 72 polymorphism in ovarian carcinoma patients from Serbia", *Journal of B.U.ON.*, 15(1):101-6 (2010).
163. Zubor, P., Stanclova, A., Kajo, K., Hatok, J., Klobusiakova, D., Visnovsky, J., Danko, J. "The *p53* codon 72 exon 4 BstUI polymorphism and endometrial cancer in Caucasian women", *Oncology*, 76(3):173-83 (2009).
164. Ghasemi, N., Karimi-Zarchi, M., Mortazavi-Zadeh, M. R., Atash-Afza A., "Evaluation of the frequency of TP53 gene codon 72 polymorphisms in Iranian patients with endometiral cancer", *Cancer Genet. Cytogenet.*, 196(2):167-70 (2010).
165. Payne, D. A., Chamoun, A. J., Seifert, S. L., Stouffer, G.A., "MTHFR C677T mutation. A predictor of early-onset coronary artery disease risk", *Thromb Res.* 103:275-279 (2001).
166. Shield, D. C., Kirke, P. N., Mills, J. L., "The termolabile variant of MTHFR and neural tube defects: an evaluation of genetic risk and the relative importance of the gnotypes of the embryo and the mother", *Am J Hum Genet.*, 64:1045-55 (1999).
167. Lambropoulos, A. F., Agorastos, T., Foka, Z. J., Chrisafi, S., Constantinidis, T. C., Bontis J., Kotsis, A., "Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism C677T is not associated to the risk of cervical dysplasia", *Cancer Lett.*, 191(2):187-91 (2003).
168. Sull J. W., Jee S. H , Yi S., Lee J. E., Park J. S., Kim S., Ohrr H., "The effect of methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism C677T on cervical cancer in Korean women", *Gynecol Oncol.*, 95(3):557-63 (2004).
169. Güner, H., Taşkıran, Ç., "Epidemiology of cervical cancer and the role of human papilloma virus", *Türk Jinekoloji ve Obstetrik Derneği Dergisi*, 4(1):11-19 (2007).
170. Cutts, F. T., Franceschi, S., Goldie, S., Castellsague, X., de Sanjose, S., Garnett, G., Edmunds, W. J., Claeys, P., Goldenthal, K. L., Harper, D. M., Markowitz, L., "Human papillomavirus and HPV vaccines: a review", *Bull World Health Organ*, 85(9):719-26 (2007).
171. Salman, N., "İnsan papilloma virüs aşısı", *ANKEM Derg*, 21(Ek 2):99-101 (2007).

172. Ult, K. A., “ Epidemiology and natural history of human papillomavirus infections in the female genital tract”, *Infect Dis Obstet Gynecol.*, Suppl:40470 (2006).

EKLER

EK-1 Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Yerel Etik Kurulunun tez projesi hakkındaki kararı



T.C
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ YEREL ETİK KURULU
RESEARCH ETHICS COMMITTEE OF MEDICAL FACULTY, GAZİ UNIVERSTY
ANKARA-TÜRKİYE
ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAYI
İLAÇ DIŞI KLİNİK ÇALIŞMALAR

	PROTOKOL ADI	"Serviks Kanserli Olgularda p53 72. Kodon Polimorfizminin Etkilerinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu ve DNA Dizi Analizi ile Araştırılması"					
BAŞVURU BİLGİLERİ	SORUMLU ARAŞTIRICI UNVANI, / ADI	Prof.Dr.Leyla Açık					
	Belge Adı	Tarihi / değişiklik No.su	Dili Türkçe				
DEĞERLENDİRİLEN İLGİLİ BELGELER	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ						
KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 312	Tarih : 17 Eylül 2008					
G.Ü. Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde yapılması tasarlanan ve yukarıdaki künyede kayıtlı araştırma projesine ait dosya; amaç, gerekçe, yaklaşım, yöntemler ve aydınlatılmış onamin yeterliliği yönünden incelenmiş ve çalışmanın gerçekleştirilmesinde Etik sakınca bulunmadığına karar verilmiştir.							
ETİK KURUL BİLGİLERİ							
ÇALIŞMA ESASI	İYİ KLİNİK UYGULAMALAR KILAVUZU, HELSİNKİ BELGESİ, BİYOTİK SÖZLEŞMESİ						
ÜYELER							
Ünvanı / Adı / Soyadı Üyeliği	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İlişki (*)	Katılım (**)	İmza	
Prof.Dr.Necila BUYAN BAŞKAN	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları - Nefroloji	G.Ü.T.F Çocuk Sağ.ve Hast.A.D.	K	E	xx	E	
Prof. Dr.Firdevs Aktaş ÜYE	Enfeksiyon	G.Ü.T.F Enfeksiyon Hast. A.D.	K	x	H	H	Katılmadı
Prof. Dr.Aysel ARICIOĞLU ÜYE	Tıbbi Biyokimya	G.Ü.T.F Tıbbi Biyokimya A.D.	K	x	H	H	
Prof.Dr.Fatma ATALAY ÜYE	Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon	G.Ü.T.F Fiziksel Tıp ve Reha.A.D.	K	x	H	H	
Prof.Dr.Çağatay ÇİFTER ÜYE	Genel Cerrahi	G.Ü.T.F Genel Cerrahi A.D.	E	x	H	H	
Prof.Dr.Seyhan ERSAN ÜYE	Farmasötik Kimya Ecz. Fak.	G.Ü.E.F (Ecz.Fak.) Farmasötik Kimya	K	x	H	H	
Prof.Dr.Reha KURUOĞLU ÜYE	Nöroloji	G.Ü.T.F Nöroloji A.D.	E	x	H	H	Katılmadı
Doç.Dr.Nesrin ÇOBANOĞLU ÜYE	Tıp Etiği ve Tıp Tarihi	G.Ü.T.F Tıp Etiği ve Tıp tarihi A.D.	K	x	H	H	
Doç.Dr.Mehmet Ali Ergün ÜYE	Tıbbi Genetik	G.Ü.T.F Tıbbi Genetik A.D.	E	x	H	H	
Doç.Dr.Aylar POYRAZ ÜYE	Tıbbi Patoloji	G.Ü.T.F Tıbbi Patoloji A.D.	K	x	H	H	
Doç.Dr.Canar ULUOĞLU ÜYE	Tıbbi Farmakoloji	G.Ü.T.F Tıbbi Farmakoloji A.D.	K	x	H	H	
Doç.Dr.Münci YAĞCI ÜYE	İç Hastalıkları - Hematoloji	G.Ü.T.F İç Hastalıkları A.D.	E	x	H	H	
Yrd.Doç.Dr.Birol DEMİREL ÜYE	Adli Tıp	G.Ü.T.F Adli Tıp A.D.	E	x	H	H	
Hukuk Müşaviri Adem GELİR ÜYE	Hukuk Müşavirliği	Rektörlük Hukuk Müşavirliği	E	x	H	H	

* Araştırma İle İlişki

** Toplantıda Bulunma

EK-2 Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Yerel Etik kurul tarafından onaylanmış
bilgilendirilmiş gönüllü olur formu

GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ YEREL ETİK KRURL TARAFINDAN ONAYLANMIŞ BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

Araştırma Projesinin Adı: Serviks Kanserli Olgularda *p53* 72. kodon Polimorfizminin Etkilerinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ve DNA Dizi Analizi ile Araştırılması

Sorumlu Araştırmacının Adı: Prof. Dr. Leyla AÇIK

Diğer Araştırmacıların Adı: Yeter Ceren ÇİMEN

Destekleyici (varsa): Destekleyici Yoktur. Laboratuvarda araştırma için gereken cihazlar, kimyasal maddeler, diğer malzemeler ve enzimler mevcuttur.

“Türk toplumunda serviks kanserli olgularda ki *p53* 72. kodonunda Polimorfizminin Etkilerinin PZR, ve DNA Dizi Analizi ile Araştırılması” isimli bir çalışmada yer almak üzere davet edilmiş bulunmaktasınız. Bu çalışma, araştırma amacı ile yapılmaktadır. Çalışmaya katılma konusunda karar vermeden önce araştırmanın neden ve nasıl yapıldığını, sizinle ilgili bilgilerin nasıl kullanılacağını, çalışmanın neler içerdiğini, olası yararlarını, risklerini ve rahatsızlıklarını bilmeniz önemlidir. Lütfen aşağıdaki bilgileri dikkatlice okumak için zaman ayırın ve bu bilgileri ailenizle ve/veya doktorunuzla tartışın. Çalışma hakkında tam olarak bilgi sahibi olduktan sonra ve sorularınız cevaplandıktan sonra eğer katılmak isterseniz sizden bu formu imzalamanız istenecektir.

1. Genetik çalışmanın amacı ve dayanağı nelerdir; benden başka kaç kişi bu çalışmaya katılacak?

a. Neden özellikle bu kişi / hasta seçilmiştir?

Bu çalışmaya davet edilmenizin nedeni sizde serviks kanseri hastalığı tanısı konmasıdır. Katılımınız ile bu hastalığın nedenlerini ortaya çıkaracak bir araştırma gerçekleştirilecektir.

b. Çalışmanın önemi ve gerekliliği nelerdir?

Genler, DNA olarak isimlendirilen genetik materyalden oluşurlar. DNA hücrenin bir bölümüdür ve kalıtsal özelliklerin (göz rengi gibi) oluşmasından sorumludur.”Serviks Kanseri” hastalığı ile ilişkilendirilen çeşitli genler bulunmuştur. Bu araştırma ile sizin DNA’nızı çalışmak ve genlerinizde herhangi bir anormallik olup olmadığını ya da bu soruna neden olabilecek yeni genler olup olmadığını bulmak istiyoruz.

c. Çalışmaya toplam kaç kişinin katılması planlanmaktadır?

Çalışmaya toplam 200 kişinin katılması planlanmaktadır

EK-2 (Devam) Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Yerel Etik kurul tarafından onaylanmış bilgilendirilmiş gönüllü olur formu

2. Bu genetik çalışmaya katılmalı mıyım?

Bu çalışmada yer alıp almamak tamamen size bağlıdır. Eğer katılmaya karar verirsiniz bu yazılı bilgilendirilmiş olur formu imzalanmak için size verilecektir. Şu anda bu formu imzalarsanız bile istediğiniz herhangi bir zamanda bir neden göstermeksizin çalışmayı bırakmakta özgürsünüz. Böyle bir karar vermeniz durumunda tıbbi bakımınız bu durumdan etkilenmeyecektir.

3. Genetik araştırma nasıl yapılacaktır?

a. Hangi örnek (ler) alınacak ve nasıl alınacak ?

Araştırmaya katılmayı kabul ederseniz, 10 ml kadar bir miktarda kolunuzdan kan alınacaktır. Genellikle bir tek örnekleme yeterlidir ancak bu aşamada başarısız olduğunda bir kez daha kan vermeniz istenebilir.

b. Örnekte neler araştırılacaktır?

Örneklerden DNA izole edilerek serviks kanserine sebep olan gen mutasyonları araştırılacaktır. Bu çalışma için kan örnekleri RBC lizis tamponu serilerinden geçirilir. Santrifüj serilerinden sonra, proteinler ve DNA dışındaki tüm moleküller uzaklaştırılır. Alkol serilerinden geçirilerek DNA'nın kümeleşmesi sağlanır. Alkol uzaklaştırıldıktan sonra DNA çözücü, TE tamponunda saklanacaktır. Daha sonra PZR işlemi yapılacak PAGE ve agoroz jelde ürünleri yürütülerek PZR'ın başarılı olup olmadığına bakılacaktır. Daha sonra PZR ürünlerinin DNA dizi analizi yapılacaktır. Daha sonra diziler BLAST search yapılarak mutasyonlar tespit edilecektir.

c. Örnekler nerede çalışılacaktır?

Toplanan kanlar ile Gazi Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji laboratuvarında çalışılacaktır.

(Toplanan kanda yeterli genetik materyal elde edilemediği durumda ya da farklı bir metod ile çalışılma gerekliliğinde toplanan kandan hücre çoğaltması yoluna gidilebilir. Bu işlem "hücre kültürü" olarak adlandırılır ve bu yolla hücreleriniz ölümsüz olarak çoğaltılabilir.)

d. Genetik örneğin gelecekte nasıl imha edilmesi planlanıyor?

Elde edilen DNA, DNaz enzimi ile parçalanarak, atılacaktır.

EK-2 (Devam) Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Yerel Etik kurul tarafından onaylanmış bilgilendirilmiş gönüllü olur formu

4. Tarafımdan alınan örnekler gelecekte de kullanılabilir mi?

(Bu bölümde katılımcıdan “Tabakalandırılmış olur” olarak isimlendirilen bir onay alınmalıdır. Aşağıda yazılı olan bölüm aynen korunarak katılımcının aşağıdaki 4 seçenekten birini işaretlemesi istenmelidir).

Tarafınızdan alınan örneğin saklanması ve ileride yapılacak diğer çalışmalarda kullanımı ancak sizin izninize tabidir. Bu örnekler uzun yıllar isminiz (kimlik bilgileriniz) korunmak ya da yok edilmek kaydı ile saklanabilir. Lütfen aşağıdaki seçeneklerden size uygun olan bir tanesini işaretleyiniz.

1- ☐ Tarafımdan alınan kodlanmış* örneğin yalnızca önerilen çalışma için kullanımını onaylıyorum; ileride yapılması olası diğer çalışmalar için onay vermiyorum.

2- ☐ Tarafımdan alınan kodlanmış örneğin yalnızca önerilen çalışma için kullanımını onaylıyorum; ileri çalışmalar için tekrar bilgilendirilmek ve yeni onay vermek istiyorum.

3- ☐ Tarafımdan alınan kodlanmış örneğin, araştırma konusuyla bağlantılı diğer çalışmalarda kullanımını onaylıyorum, ancak farklı çalışmalar için tekrar bilgilendirilmek ve yeni onay vermek istiyorum.

4- ☐ Tarafımdan alınan kodlanmış örneğin önerilen çalışma için kullanımını onaylıyorum ve gelecekte de her türlü genetik çalışmada anonim (kimliğim ile bağlantısız) olarak kullanılmasını onaylıyorum.

*Kodlanmış örnek: Sizden alınan örneğe bir kod numarası verilir. Kod numarasını yalnızca araştırmacı bilir ve sizin kimlik bilgilerinize yalnızca araştırmacı ulaşabilir. Böylece kimlik bilgileriniz gizli tutulmuş olur.

5. Çalışmanın riskleri nelerdir?

- Kan alınması sırasında oluşabilecek riskler: İğne batmasına bağlı olarak az bir acı duyabilirsiniz ve kolda morarma olabilir. Düşük bir olasılık da olsa iğne batması sonrasında kanamanın uzaması, veya enfeksiyon riski vardır.
- Yapılacak genetik teste bağlı oluşabilecek riskler: Yapılan testler sizin veya ailenizin bir ferдинin ileriki bir zamanda bu genetik hastalıktan etkilenebileceğini ortaya çıkarabilir. Bu bilginin kötüye kullanılması sizi ekonomik ve sosyal yönden etkileyebileceği gibi, böyle bir hastalığa sahip olduğunuzu öğrenmeniz sizi psikolojik yönden de olumsuz etkileyebilir.

6. Çalışmanın yararları nelerdir?

Böyle bir çalışma hastalığa neden olan mekanizmaların ve hastalığa bağlı ek klinik tablolarla ilgili risklerin daha iyi anlaşılacak gelecekte bu hastalığın tedavisinde daha etkin ilaçların geliştirilmesini sağlayabilir. Şu anda bu çalışmanın hemen size bir fayda olarak dönüp dönmeyeceğini bilmiyoruz. Ancak

EK-2 (Devam) Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Yerel Etik kurul tarafından onaylanmış bilgilendirilmiş gönüllü olur formu

İlgili hastalığın temelinde yatan nedenlerin öğrenilmesi tedavide yeni yaklaşımlara ve ileride ilgili hastalıktan etkilenmiş bireylere fayda sağlayacaktır.

7. Kişisel bilgilerim nasıl kullanılacak?

Çalışma doktorunuz, araştırmada yer alan diğer araştırmacılar ve destekleyici (varsa, firma adını belirtiniz) kişisel bilgilerinizi, araştırmayı ve istatistiksel analizleri yürütmek için kullanacaktır ancak kimlik bilgileriniz gizli tutulacaktır. Size ait bulgular üçüncü kişilere, onayınız dışında hiçbir şekilde açıklanmayacaktır. Çalışmanın sonunda, size ait tüm sonuçlar hakkında bilgi istemeye hakkınız olduğu gibi böyle bir bilgiyi öğrenmeyi reddetme hakkınız da vardır. Lütfen aşağıdaki kutucuklardan size uygun olanı işaretleyiniz:

- ☐ Bu çalışmada elde edilecek kendimle ilgili bilgileri öğrenmek istiyorum
- ☐ Bu çalışmada elde edilecek kendimle ilgili bilgileri öğrenmek istemiyorum.

Kendinizle ilgili genetik bilgiyi öğrenmeyi seçmeniz durumunda size (varsa) sağaltım ile ilgili bilgiler ve genetik danışmanlık hizmeti verilecektir.

Çalışma sonuçları çalışma bitiminde tıbbi literatürde yayınlanabilecektir ancak kimliğiniz açıklanmayacaktır.

(Çalışma için eğer gerekiyorsa aşağıdaki standart durumlar açıklanmalıdır)

- *Örnek: Kanınız genetik faktörler açısından test edilecek ve elde edilen bilgi sizin hakkınızda bize genetik bilgi verecektir. Genetik testler, bu araştırma ile ilgisi olmayan size ait çok özel başka bilgiler de verebilir. Böyle bir durumda da gizlilik ilkesine bağlı kalınacak ve bilgiler üçüncü şahıslara sizin onayınız olmaksızın açıklanmayacaktır.)*

8. Bu çalışmaya katılmamanın maliyeti nedir?

a. *Çalışmaya katılmakla parasal yük altına girmeyeceksiniz ve size de herhangi bir ödeme yapılmayacaktır.*

9. Çalışmanın ticari bir yönü var mıdır?

Gönüllülerden elde edilen bilgilerden, tıbbi testler ya da tedaviler geliştirilebilmesi gibi ticari bir fayda sağlanabilir. Böyle bir durum olursa, gönüllüler herhangi bir şekilde ticari gelir temin etmeyeceklerdir.

10. Göreceğim olası bir zarar durumunda ne yapılacaktır?

- *Araştırmadan dolayı katılımcının göreceği olası bir zararda bunun sorumluluğunun ve giderilmesi için gerekli her türlü tıbbi müdahalenin yapılacağı; bu konudaki tüm harcamaların üstlenileceğini belirtiriz.*

EK-2 (Devam) Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Yerel Etik kurul tarafından onaylanmış bilgilendirilmiş gönüllü olur formu

11. Daha fazla bilgi, yardım ve iletişim için kime başvurabilirim?

Araştırma ile ilgili bir sorunuz olduğunda ya da çalışma ile ilgili ek bilgiye gereksinim duyduğunuzda aşağıdaki kişi ile lütfen iletişime geçiniz.

ADI : Prof. Dr. Leyla AÇIK

GÖREVİ : Öğretim Üyesi

TELEFON : (312) 202 11 85

(Katılımcının/Hastanın Beyanı)

GÜFEF Biyoloji Anabilim dalında, Prof. Dr. Leyla AÇIK tarafından genetik bir araştırma yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler bana aktarıldı ve ilgili metni okudum. Bu bilgilerden sonra böyle bir araştırmaya “katılımcı” olarak davet edildim.

Araştırmaya katılmam konusunda zorlayıcı bir davranışla karşılaşmış değilim. Eğer katılmayı reddedersem, bu durumun tıbbi bakımına ve hekim ile olan ilişkiye herhangi bir zarar getirmeyeceğini de biliyorum. Projenin yürütülmesi sırasında herhangi bir neden göstermeden araştırmadan çekilebilirim. *(Ancak araştırmacıları zor durumda bırakmamak için araştırmadan çekileceğimi önceden bildirmemim uygun olacağının bilincindeyim)*. Ayrıca tıbbi durumuma herhangi bir zarar verilmemesi koşuluyla araştırmacı tarafından araştırma dışı da tutulabilirim.

İster doğrudan, ister dolaylı olsun araştırma uygulamasından kaynaklanan nedenlerle meydana gelebilecek herhangi bir sağlık sorunumun ortaya çıkması halinde, her türlü tıbbi girişimin sağlanacağı konusunda gerekli güvence verildi. (Bu tıbbi girişimlerle ilgili olarak parasal bir yük altına girmeyeceğim).

Araştırma sırasında bir sağlık sorunu ile karşılaştığımda; herhangi bir saatte, Doç.Dr. Aydan Biri (Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi 065000 Beşevler/ Ankara Telefon: 0312-202 59 43)’ten ve Doç.Dr. Tayfun Güngör (Dr. Zekai Tahir Burak Kadın Sağlığı Eğitim ve Araştırma Hastanesi 06320 Cebeci/ Ankara Telefon: 0312-310 31 00)’ ü arayabileceğimi biliyorum.

Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Bu koşullarla söz konusu genetik araştırmaya kendi rızamla, hiç bir baskı ve zorlama olmaksızın, gönüllülük içerisinde katılmayı kabul ediyorum.

İmzalı bu form kâğıdının bir kopyası bana verilecektir.

EK-2 (Devam) Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Yerel Etik kurul tarafından
onaylanmış bilgilendirilmiş gönüllü olur formu

Katılımcı

Adı, soyadı:

Adres:

Tel:

İmza:

Tarih:

Görüşme tanığı

Adı, soyadı:

Adres:

Tel:

İmza:

Tarih:

Katılımcı ile görüşen hekim

Adı soyadı, unvanı:

Adres:

Tel:

İmza:

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : ÇİMEN, Yeter Ceren
Uyruğu : T.C.
Doğum tarihi ve yeri : 04.10.1984 Çorum
Medeni hali : Bekar
Telefon : 0 (312) 315 62 71
Faks : 0 (312) 344 27 80
e-mail : y.cerencimen@gmail.com

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Yüksek lisans	Gazi Üniversitesi /Biyoloji Bölümü	2010
Lisans	Gazi Üniversitesi/ Biyoloji Bölümü	2007
Lise	Yahya Kemal Beyatlı Lisesi	2001

Yabancı Dil

İngilizce