



T.C.  
BEZMÎÂLEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ HASTANESİ

İç Hastalıkları Anabilim Dalı

Prolaktinoma Oluşumunda ve İzleminde p16 ve MDM2 Gen Polimorfizmlerinin Rolü

Dr. Seda TURGUT  
(Uzmanlık Tezi)

Tez Danışmanı  
Prof. Dr. Ertuğrul TAŞAN

İSTANBUL 2015



T.C.  
BEZMÎÂLEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ HASTANESİ

İç Hastalıkları Anabilim Dalı

Prolaktinoma Oluşumunda ve İzleminde p16 ve MDM2 Gen Polimorfizmlerinin Rolü

Dr. Seda TURGUT  
(Uzmanlık Tezi)

Tez Danışmanı  
Prof. Dr. Ertuğrul TAŞAN

İSTANBUL 2015

## İTHAF

Bu tezi, hayatımın her aşamasında hep aynı sevgi ve şefkatle yanımda olan biricik aileme;  
babam Mustafa Kemal Turgut, annem Sırma Turgut ve kardeşim Sedat Turgut'a ithaf  
ediyorum...

## TEŞEKKÜR

Eğitim hayatım boyunca bilgi ve birikimlerini benimle paylaşan tüm emektar hocalarıma; uzmanlık eğitimimiz süresince iyi bir hekim olmamız için azami gayret sarf eden ve bizlere örnek olan anabilim dalı başkanımız sayın Prof.Dr.Reha Erkoç'a, mesleki heyecanını ilk günkü gibi tutabilmesine hayran olduğum Prof.Dr.Rümeyza Kazancıoğlu'na, hekimliği ile örnek olduğu kadar bir abi gibi her konuda desteğini hissettiğim Doç.Dr.Güven etin'e; motivasyonumuz için hiç çekinmeden fedakarlıklarda bulunan Doç.Dr.Mesut Őeker'e ve eğitim sürecime deneyimi ve bilgi birikimi ile katkıda bulunan diğer değerli hocalarıma; beraber çalışırken çok Őey ğrendiğim Uzm.Dr.Ruhper ekin, Uzm.Dr.Murat Alay, Uzm.Dr.Mukaddes Tozlu ve Uzm.Dr.Yusuf Kayar'a ve bu zorlu süreçte birlikte çalışmaktan keyif aldığım başta Dr.Tuba zkan, Dr.Rabia Bağ Soytaş, Dr.İrem Yasin etin, Dr.Nidal evirme, Dr.Mitat Bykkaba ve Dr.Hayati Can İsen olmak üzere bütün asistan arkadaşlarıma teşekkür ederim.

4 yıllık uzmanlık eğitimimde hasta-hekim ilişkisindeki inceliği, her durumda olumlu çözümler bulabilme yeteneği, güler yüzü, alçakgönüllülüğü, bilgisi ve tecrübesi ile bana örnek olan; tez danışmanım olarak da desteğini hep hissettiğim çok değerli hocam Prof.Dr.Ertuğrul Taşan'a; bir çok konuda daha gerçekçi bir bakış açısı kazanmamı sağlayan, kendisinden keyifle çok Őey ğrendiğim Doç.Dr.zcan Karaman'a; asistanlığım boyunca hayata ve hekimliğe dair bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, tezimin her aşamasına sabrı ve aklıyla katkıda bulunan, kendisinden çok Őey öğrendiğim ve birlikte çalışmış olmaktan mutluluk duyduğum Uzm.Dr.M.Muzaffer İlhan'a çok teşekkür ederim.

Tezimin oluşmasında çok değerli katkıları olan, gece gündüz demeden her konuda desteğini esirgemeyen sevgili hocam Prof.Dr.İlhan Yaylım'a; çalışmanın yürütülmesindeki emeğini ve yazım aşamasındaki desteğini unutamayacağım biyolog Saime Turan'a teşekkür ederim.

Ve son olarak, hekimliği kendisiyle sevdiğim, maddi ve manevi desteğiyle her zaman yanımda olan ve bir hekim olarak her zaman örnek aldığım sevgili dayım Uzm.Dr.Yusuf Ziya Bahşi'ye ve belki de hekimliğin ilk gereği olan ömür boyu talebe kalabilmeyi bana öğreten sevgili dedem Selahattin Bahşi'ye sonsuz teşekkür ederim.

Dr. Seda TURGUT

## ÖZET

### PROLAKTİNOMALI HASTALARDA p16 VE MDM2 GEN POLİMORFİZMLERİNİN TÜMÖR OLUŞUMU VE HASTALIK İZLEMİNDE ROLÜ

**Giriş ve Amaç:** Prolaktinomanın gelişim basamakları kesin olarak bilinmemekle birlikte, erken yaşlarda mutasyona uğrayan bir hipofizer kök hücrenin uygun ortamda değişik uyaranlarla karşılaşarak proliferasyona uğraması sonucu oluştuğu düşünülmektedir. Bu çalışmada p16 (540C→G ve 580C→T) ve MDM2 (SNP309T→G) gen polimorfizmlerinin tümör patogenezindeki rolü ve hastalığın klinik parametreleri ile ilişkisi araştırılacaktır.

**Gereç ve Metod:** Çalışmaya 74 prolaktinoma hastası ve yaş ve cinsiyet uyumlu 100 sağlıklı gönüllü dahil edildi. Serum prolaktin düzeyleri enzim bağlı immünosorbent yöntemi ile ölçüldü. Elde edilen DNA örneklerinden p16 ve MDM2 gen polimorfizmleri polimeraz zincir reaksiyonu-restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi ve jel elektroforezi teknikleri kullanılarak incelendi.

**Bulgular:** Prolaktinomali hastalarda p16 540C→G polimorfizmine ait CC genotipi %66,2, CG genotipi %28,4, GG genotipi ise %5,4 saptandı. p16 580C→T polimorfizminde CC genotipi %82,4, CT genotipi %17,6 saptandı, TT genotipi taşıyan hasta saptanmadı. MDM2 gen polimorfizminde ise TT genotipi %31,1 TG genotipi %47,3 ve GG genotipi %21,6 olarak saptandı. Tedavi öncesi tümör boyutu tedavi öncesi prolaktin düzeyiyle iyi derecede ilişkili iken ( $p<0,001$   $r=0,719$ ), prolaktin azalmasıyla orta derecede ilişkili olduğu gösterildi ( $p=0,034$   $r=0,256$ ). Tedavi sonrası tümör boyutu ise tedavi öncesi prolaktin düzeyi ile iyi derecede ilişkili bulundu ( $p<0,001$   $r=0,569$ ). Makroadenomlu hasta grubunda p16 polimorfizmlerinin her ikisinde de CC genotipi (homozigot doğal tip) daha sık görülmekle birlikte bu fark istatistiksel anlamlılığa ulaşmadı. MDM2 polimorfizminde homozigot (TT+GG) genotip taşıyanlarda tümör boyutunda %50'den fazla azalma gösteren hasta sayısı heterozigot (TG) genotip taşıyanlara göre anlamlı olarak yüksek saptandı ( $p=0,003$ , OR: 0,18, CI: 0,06-0,58). Bunun dışında p16 ve MDM2 gen polimorfizmleri ile prolaktinomanın klinik parametreleri arasında anlamlı bir ilişki saptanmadı.

**Sonuç:** Bu çalışmada p16 ve MDM2 gen polimorfizmleri ile prolaktinoma oluşumu ilişkili bulunmazken, bazı genotiplerin klinik parametrelerle ilişkili olabileceği gösterilmiştir. Prolaktinomada prognostik belirteçler ve yeni tedavi seçenekleri geliştirebilmek için tümör oluşumunda ve izleminde rolü olan moleküler mekanizmaların aydınlatılmasına katkı sağlayacak geniş çaplı ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

**Anahtar Sözcükler:** Prolaktinoma, p16, MDM2, Polimorfizm

## ABSTRACT

### THE ROLE OF p16 AND MDM2 GENE POLYMORPHISMS IN TUMORIGENESIS AND FOLLOW-UP CHARACTERISTICS OF PROLACTINOMA

**Background and Aim:** Prolactinomas are thought to arise from the proliferation of a mutated pituitary stem cell which is subjected to the growth stimuli of several permissive factors, although the pathogenetic mechanisms underlying the tumorigenesis still remain unclear. The present study aimed to investigate the role of p16 (540C→G and 580C→T) and MDM2 (SNP309T→G) gene polymorphisms in tumorigenesis and follow-up characteristics of prolactinoma.

**Material and Method:** 74 patients with prolactinoma and age- and gender-matched healthy subjects were enrolled in the study. Serum prolactin levels were measured by enzyme linked immunosorbent assay. DNA was extracted from peripheral blood samples then p16 and MDM2 polymorphisms were determined by polymerase chain reaction-restriction fragment polymorphism and agarose gel electrophoresis.

**Results:** p16 540C→G genotype distribution was found as CC: 66.2%, CG: 28.4%, GG: 5.4%; p16 580C→T genotype distribution was found as CC: 82.4%, CT: 17.6%, TT: 0% and MDM2 genotype distribution was found as TT: 31.1%, TG: 47.3%, GG: 21.6% in patients with prolactinoma. Tumor diameter before treatment was correlated with prolactin levels before treatment and percentage of prolactin decrease with treatment ( $p < 0.001$   $r = 0.719$ ,  $p = 0.034$   $r = 0.256$ , respectively). Tumor diameter after treatment was correlated with prolactin levels ( $p < 0.001$   $r = 0.569$ ). CC genotype (homozygote wild type) frequency is higher without statistical significance in both p16 540C→G and p16 580C→T polymorphisms among prolactinoma patients. The number of patients with tumor size decreased more than 50% in homozygous genotype (TT+GG) carriers of MDM2 SNP309T→G is significantly higher than in heterozygous genotype (TG) carriers ( $p = 0.003$ , OR: 0,18, CI: 0,06-0,58). However, other than that, no significant association was found between characteristics of prolactinoma and p16, MDM2 gene polymorphisms and alleles.

**Conclusion:** This study showed that p16 and MDM2 polymorphisms do not play an important role in tumorigenesis, but some genotypes of these polymorphisms could be associated with follow-up characteristics of prolactinoma. Further studies are needed to clarify the underlying mechanisms of the tumorigenesis in order to define prognostic factors and facilitate appropriate treatment choices for patients with prolactinoma.

**Key Words:** Prolactinoma, p16, MDM2, Polymorphism

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
İTHAF.....	II
TEŞEKKÜR .....	III
ÖZET .....	IV
İNGİLİZCE ÖZET .....	V
İÇİNDEKİLER .....	VI
TABLolar LİSTESİ .....	IX
ŞEKİLLER LİSTESİ .....	X
KISALTMALAR .....	XI
1. GİRİŞ VE AMAÇ .....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	3
2.1 PROLAKTİNOMA .....	3
2.1.1 EPİDEMİYOLOJİ .....	3
2.1.2 KLİNİK ÖZELLİKLER .....	4
2.1.3 TANI VE TEDAVİ .....	4
2.1.3.1 TANI .....	4
2.1.3.2 MEDİKAL TEDAVİ .....	5
2.1.3.3 CERRAHİ TEDAVİ .....	7
2.1.3.4 RADYOTERAPİ .....	7
2.2 TÜMÖR GELİŞİMİNDE VE DAVRANIŞINDA MOLEKÜLER TEMELLER .....	7
2.2.1 HÜCRE DÖNGÜSÜ VE KONTROL NOKTALARI .....	8
2.2.2 p16 (CDKN2A) VE TÜMÖR OLUŞUMU .....	10
2.2.3 MDM2 VE TÜMÖR OLUŞUMU .....	11
2.2.4 TEK NÜKLEOTİD POLİMORFİZMİNİN ÖNEMİ .....	12
2.3 HİPOFİZ ADENOMLARININ MOLEKÜLER VE GENETİK ÖZELLİKLERİ .....	13
2.3.1 PROLAKTİNOMA VE GENETİK FAKTÖRLER .....	15
3. GEREÇ VE YÖNTEM .....	19
3.1 ARAŞTIRMA ÖZELLİKLERİ .....	19

	Sayfa No
3.1.1 ARAŞTIRMA TÜRÜ .....	19
3.1.2 ARAŞTIRMA YERİ VE ZAMANI .....	19
3.1.3 ARAŞTIRMA FORMU .....	19
3.1.4 ARAŞTIRMA EVRENİ .....	19
3.1.5 ARAŞTIRMAYA DÂHİL EDİLME VE DIŞLANMA KRİTERLERİ .....	20
3.1.6 ARAŞTIRMA ETİĞİ .....	20
3.1.7 VERİLERİN ANALİZİ VE DEĞERLENDİRİLMESİ .....	20
3.2 KULLANILAN GEREÇLER VE CİHAZLAR .....	21
3.3 KULLANILAN KİMYASAL MADDELER .....	22
3.4 KULLANILAN ÇÖZELTİLER .....	22
3.4.1. DNA İZOLASYONUNDA KULLANILAN ÇÖZELTİLER .....	22
3.4.2. AGARUZ JEL ELEKTROFOREZİNDE KULLANILAN ÇÖZELTİLER .....	23
3.5 YÖNTEM .....	24
3.5.1 MOLEKÜLER ANALİZLER .....	24
3.5.1.1 PERİFERİK KANDAN DNA İZOLASYONU .....	24
3.5.1.2 ELDE EDİLEN DNA'NIN KONSANTRASYON VE KALİTESİNİN TAYİNİ .....	25
3.5.1.3 p16 VE MDM2 GEN POLİMORFİZMLERİNİN PCR-RFLP YÖNTEMİ İLE SAPTANMASI.....	25
3.5.1.3.1 p16 540C→G VE p16 580C→T GEN POLİMORFİZMLERİNİN TESPİTİNDE KULLANILAN PRİMER DİZİLERİ .....	25
3.5.1.3.2 MDM2 SNP309T→G GEN POLİMORFİZMİNİN TESPİTİNDE KULLANILAN PRİMER DİZİLERİ .....	25
3.5.1.4 PZR'DE KULLANILAN KİMYASAL MADDELER VE PZR'NİN HAZIRLANIŞI .....	26
3.5.1.5 PZR ÜRÜNLERİNİN AGARUZ JEL ELEKTROFOREZ YÖNTEMİ İLE KONTROLÜ .....	27
3.5.1.5.1. %2'LİK AGARUZ JEL HAZIRLANMASI .....	27



	Sayfa No
3.5.1.5.2 PZR ÜRÜNLERİNİN %2'LİK JELE YÜKLENMESİ.....	27
3.5.1.6 p16 GENİNE AİT PZR ÜRÜNLERİNDE RFLP YÖNTEMİNİN UYGULANMASI.....	28
3.5.1.7 MDM2 GENİ PZR ÜRÜNÜNDE RFLP YÖNTEMİNİN UYGULANMASI.....	29
3.5.1.8 ENZİM KESİM ÜRÜNLERİNİN AGARUZ JEL ELEKTROFOREZ YÖNTEMİ İLE KONTROLÜ.....	30
3.5.1.8.2 HaeIII ENZİM KESİM SONUÇLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ .....	30
3.5.1.8.3 MSPA1I ENZİM KESİM SONUÇLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ .....	31
3.5.1.9 SERUMDA PROLAKTİN DÜZEY TAYİN PROTOKOLÜ .....	31
4. BULGULAR .....	33
4.1. PZR ÜRÜNLERİNİN KONTROLÜNE AİT BULGULAR .....	33
4.1.1 p16 540C→G VE p16 580C→T POLİMORFİZMLERİ PZR ÜRÜNLERİNE AİT BULGULAR .....	33
4.1.2. MDM2 SNP309T→G POLİMORFİZMİ PZR ÜRÜNLERİNE AİT BULGULAR .....	33
4.2. KESİM ÜRÜNLERİNİN KONTROLÜNE AİT BULGULAR.....	34
4.2.1. RFLP YÖNTEMİ MSPI ENZİM KESİMİ İLE p16 540C→G POLİMORFİZMİ KESİM ÜRÜNLERİNE AİT BULGULAR.....	34
4.2.2. RFLP YÖNTEMİ MSP1I ENZİM KESİMİ İLE MDM2 SNP309T→G POLİMORFİZMİ KESİM ÜRÜNLERİNE AİT BULGULAR.....	35
4.3. İSTATİSTİKSEL ANALİZ SONRASINDA ELDE EDİLEN BULGULAR .....	36
5. TARTIŞMA .....	44
6. SONUÇ VE ÖNERİLER .....	50
7. KAYNAKLAR .....	51

## TABLULAR LİSTESİ

	Sayfa No
<b>Tablo 1</b> .....	<b>26</b>
<b>Tablo 2</b> .....	<b>27</b>
<b>Tablo 3</b> .....	<b>27</b>
<b>Tablo 4</b> .....	<b>28</b>
<b>Tablo 5</b> .....	<b>29</b>
<b>Tablo 6</b> .....	<b>29</b>
<b>Tablo 7</b> .....	<b>36</b>
<b>Tablo 8</b> .....	<b>37</b>
<b>Tablo 9</b> .....	<b>37</b>
<b>Tablo 10</b> .....	<b>38</b>
<b>Tablo 11</b> .....	<b>39</b>
<b>Tablo 12</b> .....	<b>40</b>
<b>Tablo 13</b> .....	<b>40</b>
<b>Tablo 14</b> .....	<b>41</b>
<b>Tablo 15</b> .....	<b>42</b>
<b>Tablo 16</b> .....	<b>42</b>
<b>Tablo 17</b> .....	<b>43</b>
<b>Tablo 18</b> .....	<b>43</b>

## ŞEKİLLER LİSTESİ

	Sayfa No
Şekil 1 .....	8
Şekil 2 .....	9
Şekil 3 .....	28
Şekil 4 .....	28
Şekil 5 .....	29
Şekil 6 .....	30
Şekil 7 .....	31
Şekil 8 .....	31
Şekil 9 .....	32
Şekil 10 .....	33
Şekil 11 .....	33
Şekil 12 .....	34
Şekil 13 .....	35
Şekil 14 .....	35

## KISALTMALAR

**CDK:** Siklin Bağımlı Kinaz

**CKI:** Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitörü

**DNA:** Deoksiribonükleik Asit

**MDM2:** Murine Double Minutes

**MEN-1:** Multipl Endokrin Neoplazi-1

**GnRH:** Gonad Hormonlarını Salgılayan Hormon

**LH:** Luteinizan Hormon

**FSH:** Folikül Stimulan Hormon

**Ig G:** İmmüoglobülin G

**MRG:** Manyetik Rezonans Görüntüleme

**SNP:** Tek Nükleotid Polimorfizmi

**Rb:** Retinoblastom

**GNAS:** Guanin Nükleotid Bağlayıcı Protein, Alfa Stimule Edici Aktive Polipeptit

**cAMP:** Siklik Adenozin Monofosfat

**CREB:** cAMP Cevap Elementi Bağlayıcı Protein

**TSG:** Tümör Supresör Gen

**PTTG:** Pituiter Tümör Dönüştürücü Gen

**bFGF:** Temel Fibroblast Büyüme Faktörü

**TGF:** Dönüştürücü Büyüme Faktörü

**RNA:** Ribonükleik Asit

**FIPA:** Ailesel İzole Pituiter Adenom

**GTP:** Guanozin Trifosfat

**TRH:** Tirotropin Serbestleştirici Hormon

**DRD2:** Dopaminerjik D2 Reseptörü

**HMGA2:** Yüksek Mobilite Grup A Non-Histon Kromozomal Protein 2

**NGF:** Sinir Büyüme Faktörü

**PZR:** Polimeraz Zincir Reaksiyonu

**ELISA:** Enzim Bağlı İmmünosorbent Yöntemi

**RFLP:** Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi

**OD:** Optik Densite

**WBL:** Lökositleri Parçalama Tamponu

**BMI:** Vücut Kitle İndeksi

## 1. GİRİŞ ve AMAÇ

Prolaktin sekrete eden hipofiz adenomları fonksiyonel hipofiz tümörleri arasında en sık rastlanan adenomlar olup tahmini prevalansı 100/milyondur. Prolaktinomaların nasıl geliştiği kesin olarak bilinmemekle birlikte, erken dönemde mutasyona uğrayan bir hipofizer kök hücrenin uygun ortamda değişik uyaranlarla karşılaşması sonucu proliferasyona uğrayarak tümöre yol açtığı düşünülmektedir. Tümör oluşumunda somatik hücre mutasyonları önemli role sahip olsa da tümörögenезisin birden fazla genetik ve epigenetik faktörün etkisiyle, kalıtsal veya edinsel mutasyonların somatik hücrelerde birikimi sonucu çok aşamalı bir süreçte meydana geldiği düşünülmektedir.

Hücre döngüsünün kontrol noktalarındaki işlevsel değişiklikler, hücrelerin çoğalma ve farklılaşmasında etkili olmaktadır. Bu kontrol noktalarının düzenlenmesinde, döngü basamağına göre düzeyleri artan ve azalan siklin proteinleri esas rolü üstlenmektedir. Siklinlerin sentez ve yıkımları, kendisine bağlanan ve düzeyi hücre döngüsü boyunca değişmeyen siklin bağımlı kinazlar (CDK) ve bu oluşumu inhibe eden siklin bağımlı kinaz inhibitörleri (CKI) ile denetlenmektedir. Tümör gelişiminin, CDK ve CKI ailelerinde oluşan genetik polimorfizm ve hasarlar sonucu, kontrol edilemeyen hücre çoğalması ve farklılaşmasıyla oluştuğu düşünülmektedir. Bu polimorfik/genetik hasar ve değişiklikler DNA onarım kapasitesini etkileyerek kanser riskini arttırabilen başlıca genetik faktörlerdir. Genomda binlerce aday polimorfik genin bulunması, genomunda bu farklılıkları taşıyan kişilerin kanser gelişimine olan duyarlılıklarının etkilenebileceğini düşündürmektedir.

p16 (CDKN2A, MTS-1, INK4a) CKI ailesinin bir üyesidir. p16 gen ürünleri CDK4 ve CDK6 siklin bağımlı kinaz proteinlerine bağlanıp, bu proteinlerin siklin D1 ile aktif siklin D1-CDK kompleksi oluşturmasına engel olarak hücre döngüsünü durdurur. Önemli bir tümör baskılayıcı gen olan p16'nın inaktivasyonu hücre çoğalmasını artırır ve tümör oluşumuna katkıda bulunur. p16'nın kodlanma ve 3'UTR ("untranslated region", kodlanmayan bölge) bölgelerindeki polimorfizmlerinin kanser gelişimi ve prognozu ile ilişkili olduğu daha önce bildirilmiştir.

MDM2 geni, p53 proteininin negatif düzenleyicisidir ve MDM2 proteini p53'e direkt bağlanarak lokalizasyonunu, stabilitesini ve aktivitesini etkiler. p53, hücre bölünmesini inhibe ederek normal hücre büyümesinde önemli bir role sahip olan hücre döngüsü kontrol elemanıdır.

DNA hasarında hücre bölünmesini durdurur ve hasar tamir mekanizmalarının devreye girmesinde rol oynar. Hasar büyükse hücreyi programlı hücre ölümüne götürür. p53 ve MDM2 genlerinde meydana gelebilecek bazı modifikasyonlar bu iki genin ürünleri arasındaki etkileşimi bozabilir. MDM2 geninin tümör oluşturma potansiyeli, insan tümörlerinde aşırı ekspresyonun gösterilmesi ile belirlenmiştir. MDM2 geninin aşırı ekspresyonu, p53 proteininin yıkımı artırarak hücre döngüsü kontrolü ve apoptoz indüklemeye işlevlerini bozar böylece tümör oluşumuna katkıda bulunur. Ayrıca MDM2 aşırı ekspresyonunun p53'ten bağımsız olarak tümör oluşumuna direkt etki edebileceği de düşünülmektedir. MDM2 promotör bölgesi polimorfizminin birçok kanser tipiyle ilişkili olduğu gözlemlenmiştir.

Tümör oluşumuna katkıları nedeniyle, hücre döngüsünü düzenleyen bu proteinlere ait genlerde saptanan polimorfizmleri ve bunların görülme sıklıklarını araştıran çalışmalar günümüzde giderek önem kazanmaktadır. Daha önce yapılan çalışmalarda, p16 ve MDM2 gen ekspresyonları hipofizer tümörlerde gösterilmiş olmakla beraber, bu iki gen polimorfizminin prolaktinoma ile ilişkisini inceleyen bir çalışma henüz bulunmamaktadır.

Prolaktinomalar dopamin agonistleri ile efektif olarak tedavi edilebilmelerine rağmen, %20 hastada dopamin rezistansı varlığı, bazı vakalarda operasyon sonrası tümör rekürrensi görülmesi, çoğunlukla benign histopatolojik özelliğe sahip olmalarına karşın agresif tümörlerin nasıl geliştiği henüz tam olarak anlaşılamamıştır.

Bu çalışmada, prolaktinoma etiyopatogenezinde p16 ve MDM2 polimorfizmlerinin rolü ve klinik parametrelerle ilişkisi ele alınacaktır. Çalışmanın, tümör davranışındaki farklılıkların anlaşılması, hastalık prognozunu belirleyebilecek yeni parametreler tanımlanabilmesi ve etkin tedavi seçenekleri geliştirilebilmesi için aydınlatılması gereken tümör etiyopatogenezinin anlaşılmasına katkıda bulunacağı ve konuyla ilgili yapılacak diğer çalışmalara ışık tutacağı düşünülmektedir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. PROLAKTİNOMA

Hipofiz, beyin tabanında yer alan, metabolizma, büyüme, gelişme ve üreme sistemlerini de içeren birçok sistemi salgıladığı hormonlar aracılığı ile kontrol eden endokrin bir bezdir. Hipofiz adenomları en sık görülen intrakranyal lezyonlardır ve hipofiz bezindeki tümöral oluşumların çoğu adenom yapısında olup ön hipofizden kaynaklanmaktadır (1). Prolaktinomalar, prolaktin salgılayan laktotrop hücrelerden gelişen, büyük çoğunluğu benign karakterde olan ve %40 görülme sıklığı ile hipofiz adenomlarının büyük çoğunluğunu oluşturan fonksiyonel tümörlerdir Mikroadenomlar (<1 cm) kadınlarda sık görülürken, daha nadir rastlanan makroadenomlar ( $\geq 1$  cm) erkeklerde daha yaygın olarak görülür (2). Erkeklerde tanı anındaki ortalama yaş, cinsel istekte ve/veya cinsel güçte azalma gibi semptomların erkek hastaların çoğu tarafından yıllarca ciddiye alınmaması gibi nedenlerle kadınlardan 10 yıl daha ileridir (3, 4). Makroadenomların erkeklerde daha sık görülmesi tanıdaki bu gecikme ile ilişkilendirilmiştir (5).

Prolaktinomaların nasıl geliştiği kesin olarak bilinmemekle birlikte, erken yaşlarda mutasyona uğrayan hipofizer bir kök hücrenin uygun ortamda birden fazla genetik ve epigenetik faktörün etkisi sonucu proliferasyona uğrayarak tümöre yol açtığı düşünülmektedir (6). Prolaktinomaların çoğu sporadiktir ancak nadir olarak bazı ailesel sendromların bir komponenti olarak da karşımıza çıkabilmektedir.

#### 2.1.1. EPİDEMİYOLOJİ

Prolaktinomalar hipofiz adenomlarının yaklaşık %40'ını oluşturmaktadır. Erişkinlerde tahmini prevalansı 100/milyon dur. Prolaktinoma yaygın olarak 20-50 yaş arasında görülür ve kadın erkek oranı 10:1'dir (7). Beşinci dekattan sonra prolaktinoma sıklığı kadın ve erkeklerde aynıdır (8). Pediatrik ve adölesan yaş grubunda prolaktinoma çok nadir olarak görülür ve intrakranyal tümörlerin %2'sinden daha azını oluşturur (9). Dev prolaktinoma terimi ise >40 mm boyutunda ve/veya masif ekstrasellar uzanımı olan, tedavi edilmesi zor, genelde yüksek serum prolaktin (>1000 ng/ml) düzeyi ile ilişkili nadir görülen adenomlar için kullanılmaktadır (10). Prolaktinomalar, MEN-1 tanılı hastalarda en sık görülen hipofizer tümör histotipidir ve bu hastalarda sporadik tümörlere göre daha agresif seyretmektedir (11).

## **2.1.2. KLİNİK ÖZELLİKLER**

Prolaktinomada görülen klinik belirtilerin çoğu hiperprolaktinemi ile ilişkilidir. Hiperprolaktinemi GnRH sekresyonunu inhibe ederek, LH ve FSH salınımını duraksamasına ve buna bağlı olarak gonadal steroidogenezisin azalıp sekonder hipogonadizm gelişmesine neden olur (12). Hiperprolaktinemiye bağlı başlıca klinik bulgular kadınlarda galaktore, amenore-oligomenore, seksüel disfonksiyon, infertilite, kilo artışı, osteopeni veya osteoporoz ve adölesan çağda gecikmiş pubertedir. Erkeklerde ise libido kaybı, erektil disfonksiyon, infertilite, jinekomasti, kemik mineral yoğunluğunda azalma ve adölesan çağda puberte gecikmesidir. Büyük tümörlerde ise hipofizer diğer hücrelerin harabiyeti ve hipotalamo-hipofizer sapın basısına bağlı olarak hipopitüitarizm bulgular görülebilir. Ayrıca optik kiazma ve beynin diğer bölümlerine bası yapan tümörlerde değişen derecelerde görme bozuklukları, baş ağrısı ve felç gibi belirtiler de görülebilmektedir. Tanı gecikmesine bağlı olarak erkeklerde görme bozuklukları ve nörolojik semptomlar daha ön plandadır (4, 6).

## **2.1.3. TANI VE TEDAVİ**

### **2.1.3.1. TANI**

Prolaktinoma tanısı klinik olarak değerlendirilip hiperprolaktinemi varlığından şüphelenilen hastalarda laboratuvar bulgularının tanıyı desteklenmesi, sekonder nedenlerin dışlanması ve pituiter adenomun radyolojik olarak gösterilmesi ile konulmaktadır. Normal prolaktin seviyeleri kadınlarda 25 ng/mL, erkeklerde ise 20 ng/mL'nin altındadır. Dopamin etkisinin engellenmesine bağlı prolaktin artışları hafif orta düzeyde olup 150 ng/mL geçmemektedir. Bunun üzerindeki prolaktin değerleri prolaktinoma açısından mutlaka araştırılmalıdır. Hiperprolaktinemi tespit edildiğinde, buna yol açabilecek ilaç anamnezi başta olmak üzere tüm olası sekonder nedenler ekarte edilmelidir. Diğer hipofiz tümörleri hipofiz sap basısı yaparak hiperprolaktinemiye neden olabileceğinden ayırıcı tanıda göz önünde bulundurulmalı ve hastalarda tüm hipofiz hormonları değerlendirilmelidir. Prolaktinomada genel olarak tümör çapı prolaktin seviyesi ile paraleldir (6).

Prolaktinoma tanısında yalancı hiperprolaktinemisinin ayırıcı tanısı oldukça önemlidir. Prolaktin hormonu ile IgG antikorunun oluşturduğu "makroprolaktin" kompleks bileşiği biyolojik olarak aktif değildir ve kandan temizlenmesi oldukça zordur. Makroprolaktin serum prolaktin



düzeşinin yaklaşık %20'sini oluşturur. Rutinde kullanılan analiz yöntemlerinin bir kısmı bu kompleksi ayırt edememektedir. Bu ayırımı için kullanılan en pratik yöntem, polietilen glikol presipitasyon yöntemidir (13). Prolaktin düzeyi tayininde bir diğer handikap, büyük volümlü prolaktinomalarda üretilen fazla miktardaki prolaktin hormonuna karşı antikor gelişmesi ve bazı analiz yöntemleriyle gerçek prolaktin düzeyinin hatalı olarak düşük ölçülmesidir. Bu sorunu aşmak için 1:100 oranında dilüsyon yapılmalı veya antikor yıkama yöntemleri kullanılmalıdır (14).

Hiperprolaktinemisi olan hastada olası diğer nedenler dışlandıktan sonra, yapılması gereken tetkik hipofizin gadoliniumlu manyetik rezonans görüntülemesidir (MRG). Kontrastlı bilgisayarlı tomografi özellikle mikroadenom tanısında MRG'den daha az efektif olduğundan, ancak MRG kontrendikasyonu varlığında veya MRG'ye ulaşılamayan durumlarda başvurulacak bir yöntem olmalıdır (15). Normal popülasyonda mikroadenom insidansı %10'dur ve MRG'de kitle saptanmaması, mikroadenomun varlığını dışlamamaktadır (16). Hipofiz MRG'de kitle saptandığında, hipofiz sapı basısına neden olabilecek diğer kitleler de hiperprolaktinemiye neden olabileceğinden, prolaktinoma dışı hipofizer kitleler de ayırıcı tanıda göz önünde bulundurulmalıdır. Patolojik inceleme ile kesin tanı koyulması pratikte başvuru olan bir uygulama olmadığından, tedaviden tanıya gidilmelidir. Böyle hastalara birkaç ay süreyle medikal tedavi başlanarak, seri serum prolaktin ölçümleri izlenebilir (17).

Prolaktinomalı hastaların tedavisinde öncelikli amaç; prolaktin düzeylerini normale getirmek, gonadal disfonksiyonları düzeltmek ve fertilitiyi sağlamak, tümör boyutunu küçültmek, varsa görme alanı kaybı ve kranial sinir felçlerini düzeltmek ve hipofiz fonksiyon bozukluklarını gidermektir. Ayrıca galaktorenin kesilmesi, kemik mineral yoğunluğunun korunması, metabolik sendrom ve hiperandrojenizm komponentlerinin düzeltilmesi tedavinin diğer önemli noktalarını oluşturmaktadır. Bu amaçlarla hastalara medikal tedavi, cerrahi tedavi ve radyoterapi uygulanmaktadır.

### **2.1.3.2. MEDİKAL TEDAVİ**

Hiperprolaktinemi ve prolaktinomaların primer tedavisi medikaldir ve sıklıkla bromokriptin ve kabergolin gibi dopamin agonistleri kullanılırken, nadiren pergolid ve quinagolid gibi dopamin agonistleri de tercih edilebilmektedir. Dirençli veya ilacı tolere edemeyen vakalarda bu ilaçlar arasından tercih yapılabilir. Kabergolin; hasta uyumu, prolaktin düzeyini düşürme, gonadal fonksiyonların yenilenmesi ve tümör hacmini küçültme etkinliği gibi özellikleri

bakımından bromokriptinden üstün olarak gösterilmekte ve birinci basamak medikal tedavide öncelikli olarak tercih edilmektedir (15).

0,125-1,0 mg haftada iki kez uygulanan kabergolin tedavisinin prolaktinomalı hastaların büyük çoğunluğunda prolaktin seviyelerinde normalizasyon sağladığı gösterilmiştir (15). Aylık periyotlarla kontrol edilen prolaktin düzeyi normale dönene kadar doz artışı yapılabilir. Haftalık doz gereksinimi nadiren 3 mg'ın üzerine çıkmaktadır. Bromokriptin tedavisine ise 0,625-1,25 mg/gün dozu ile başlanır, haftada bir günlük doz 1,25 mg artırılarak 2,5 mg 2-3 doz /gün'e ulaşılır. Kademeli doz artışı yan etkilerin tolerasyonunu artırmaktadır. En az 24 ay dopamin agonisti tedavisine devam edilmeli, takip süresince serum prolaktin düzeylerine göre ilaç dozu ayarlanmalıdır (3).

Mikroprolaktinomaların yaklaşık olarak %90-95'i tedavisiz de büyüme göstermediğinden, tedavide amaç tümörün büyümesini önlemek olmayıp, gonadal fonksiyonların ve fertilitenin sağlanması olmalıdır. Ancak uzun süren medikal tedavilerin sonucunda mikroprolaktinomaların çoğu küçülerek kaybolabilmektedir. Bazı olgularda prolaktin düzeyi normale dönmemesine rağmen, gonadal fonksiyonlar düzelebilmektedir. Bu olgularda biyolojik yanıtın ön plana çıktığı savunulmaktadır.

Makroprolaktinomada ise, dopamin agonistleri tedavisi altında, %80 hastanın tümör boyutunda %25'ten fazla azalma ve hastaların neredeyse tümünde prolaktin düzeyinde %50'den fazla düşme gösterilmiştir (6). Tümör boyutundaki azalma genellikle 1-2 haftada bazen birkaç ay sonra başlayıp aylar hatta yıllar boyu devam edebilmektedir. Tümör boyutu tedaviden 2-3 ay sonra MRG ile değerlendirilmeli ve takip aralığı giderek uzatılmalıdır. Medikal tedavinin, görme bozukluklarında en az cerrahi tedavi kadar etkin olduğu gösterildiğinden, görme bozukluğu olan hastalarda da eskisi gibi mutlak cerrahi endikasyon bulunmamaktadır. En az 24 ay süre ile prolaktin düzeyi normal ve tümör boyutu %50 oranında azalmış olarak devam eden vakalarda, ilaç dozu azaltılabilir ve hatta ilaç kesilebilir. Ancak bu hastalarda tümörün tekrar büyüme olasılığı bulunduğundan, yakın izlem yapılmalıdır. Eğer prolaktinoma dirençli ise tüm dopamin agonistleri maksimum dozlarına kadar denenmeli ve yine yanıt alınamıyor ise cerrahi tedavi veya radyoterapi alternatif olarak düşünülmelidir (17).

### **2.1.3.3. CERRAHİ TEDAVİ**

Medikal tedaviye yanıt alınamayan ve görme bozukluklarında düzelme olmayan hastalar prolaktinomaların yaklaşık %10'unu oluşturmaktadır ve bu hastalara cerrahi tedavi önerilmektedir. Hipofiz cerrahisi genellikle trans-sfenoidal yolla uygulanmakta olup, tümör rekürrensi sık görülür. %75 oranla en yüksek başarı, prolaktin düzeyi < 200 ng/mL olan mikroadenomlu hastalardadır (18).

### **2.1.3.4. RADYOTERAPİ**

Prolaktinoma tedavisinde radyoterapi primer tedavi olarak kabul görmemekte ve dopamin agonistlerine cevapsız, cerrahi ile kür sağlanamayan, nadir malign prolaktinomalarda tercih edilmektedir. Radyoterapi, panhipopituitarizm, optik sinir hasarı, nörolojik hasar ve sekonder beyin tümörü gelişimi gibi ciddi yan etkileri olan bir tedavi seçeneğidir (6). Kavernöz sinüsteki kranial sinirler radyorezistant olduğu için kavernöz sinüs invazyonu veya komsuluğu olan tümörler radyoterapiye en uygun olan seçilmiş tümörlerdir (4).

## **2.2. TÜMÖR GELİŞİMİNDE VE DAVRANIŞINDA MOLEKÜLER TEMELLER**

Tümör oluşumu somatik mutasyon teorisine göre, çok basamaklı bir süreçte, birçok karsinojenin (kimyasal, fiziksel, viral) etkisiyle oluşan genetik ve epigenetik hasarlanmalarla meydana gelmektedir. Bu hasarlanmalar; nokta mutasyonları, DNA hasarının onarım kapasitesini etkileyen genetik değişiklikler (kromozom anomalileri veya polimorfizmler), gen amplifikasyonu, genin yeniden düzenlenmesi, gen metilasyonundaki değişimler ya da transkripsiyonel düzenlemedeki değişiklikler ile oluşabilir (19, 20). Polimorfizmler toplumda %1'den daha yüksek sıklıkta bulunan genetik çeşitlilik tipi olarak tanımlanır ve kalıtsal veya somatik mutasyonlardan daha sık olarak tespit edilmektedir. İnsan genomunda en çok bulunan genetik çeşitlilik tipi, tek nükleotid polimorfizmleridir (SNP) (21).

Hücre döngüsünün kontrol noktalarındaki işlevsel değişiklikler, hücrelerin çoğalma ve farklılaşmasında etkili olmaktadır. Tümör gelişiminin, hücre döngüsünün kontrol noktalarının düzenlenmesinde esas rolü üstlenen CDK ve CKI ailelerinde oluşan genetik polimorfizm ve hasarlar sonucu, kontrol edilemeyen hücre çoğalması ve farklılaşmasıyla oluştuğu düşünülmektedir. Bu polimorfik/genetik hasar ve değişiklikler DNA onarım kapasitesini etkileyerek kanser riskini arttırabilen başlıca genetik faktörlerdir. Genomda binlerce aday

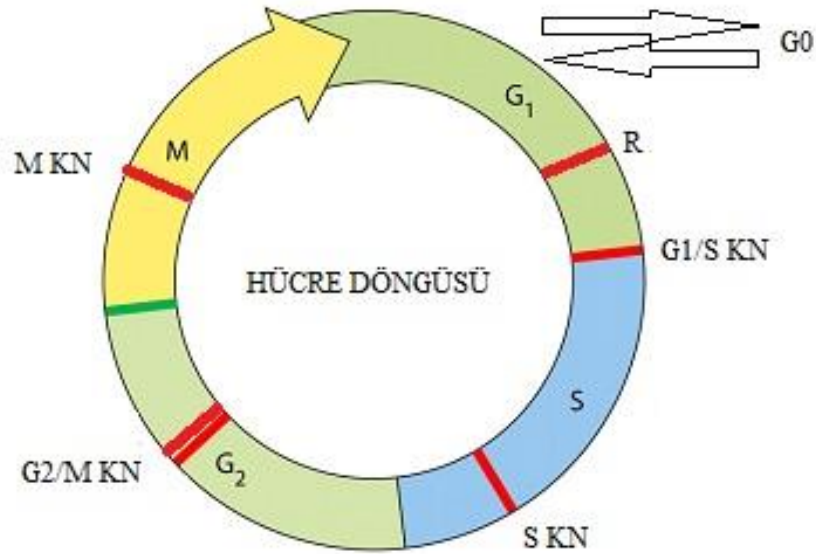
polimorfik genin bulunması, genomunda bu farklılıkları taşıyan kişilerin kanser gelişimine olan duyarlılıklarının etkilenebileceğini düşündürmektedir (22).

Bütün etkenler göz önünde tutulduğunda tümörögenезis ve tümör davranış özelliklerinin ortaya konması ve araştırılması için öncelikle hücre bölünme döngüsünün anlaşılması gerekmektedir.

### 2.2.1. HÜCRE DÖNGÜSÜ VE KONTROL NOKTALARI

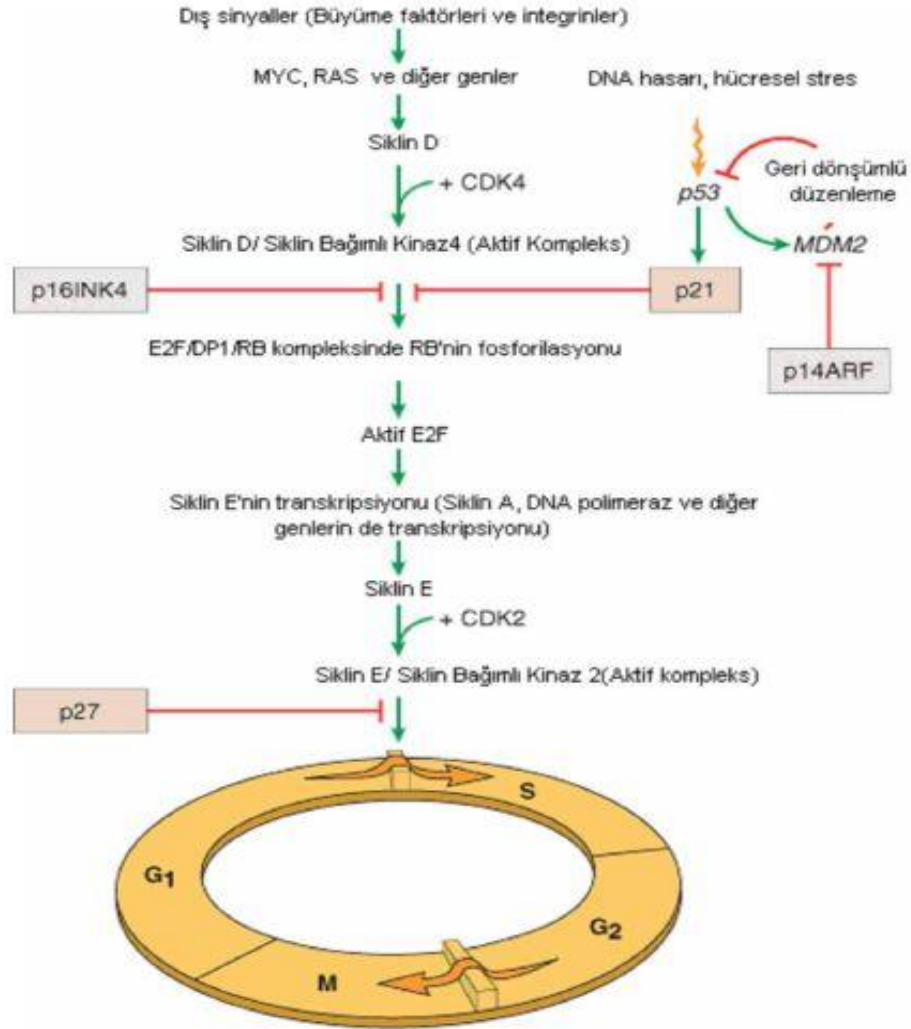
İki mitotik bölünme arasındaki periyod “hücre döngüsü” olarak adlandırılır. Hücre döngüsünün en temel fonksiyonu, kromozomda bulunan DNA’yı iki katına çıkarmak ve genetik olarak birbirinin aynı olan yavru hücreler oluşturmaktır. Hücre döngüsünde proliferasyon, farklılaşma ve apoptozis gibi temel hücre fonksiyonları düzenlediğinden organizmadaki hemen her tür fizyolojik veya patolojik durumda hücre döngüsü kritik bir öneme sahip olmaktadır.

Hücre döngüsünün merkezinde CDKlar ve siklin proteinleri yer almakta olup, döngünün G1, S, G2, M fazlarına geçişini düzenlemektedirler. Hücre döngüsü boyunca kontrol noktaları (KN) bulunmaktadır. Bu kontrol noktalarında hücrenin döngüye devam edip etmeyeceğine karar verilir ve döngü boyunca genom bütünlüğünün devamı kontrol edilir (Şekil 1).



**Şekil 1:** Hücre Döngüsü ve Ana Kontrol Noktaları R: kısıtlama noktası, S: sentez, M: mitoz, KN: kontrol noktası (23)

G1, DNA replikasyonu için hazırlıkların yapıldığı fazdır ve hücrel büyüme artırıcı ve azaltıcı uyarılarla hücre döngüsünün başlaması kontrol edilir. Büyüme uyarılarının varlığında R noktasına (“restriction point”, kısıtlama noktası) geçilir. Hücrenin bölünmesine veya döngü dışında durağan faz olan G0 fazına geçiş bu fazda kontrol edilir. G1/S KN, G1 fazından S fazına geçişi kontrol eder ve DNA hasarının ana kontrol noktasıdır (Şekil 2). DNA replikasyonu S (sentez) fazında gerçekleşir. S KN’de, DNA replikasyonu tamamlanamadığında veya DNA hasarı varlığında S fazında döngü durdurulur. G<sub>2</sub> ise mitotik faza (M) hazırlıkların yapıldığı geçiş dönemdir. G<sub>2</sub>/M KN’de, DNA replikasyonunun uygunluğu ve DNA hasarı kontrol edilir. M KN iğ iplikçiklerinin oluşumu ve uygunluğu kontrol edilir (“spindle checkpoint”) (24).



Şekil 2: G1/S Geçişinde Siklin Bağımlı Kinaz ve Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitörlerinin Rolü (25)

Retinablastom (Rb) tümör baskılayıcı genin ürünü olan ve CDK'lar tarafından fosforilize edilen Rb proteini, G1 fazındaki progresyonda önemli rol oynamaktadır. Erken G1 fazında hipofosforile durumda iken E2F transkripsiyon faktörlerine sıkıca bağlı olarak bulunur. CDK'lar tarafından fosforilize edildiğinde E2F'lerden ayrılır ve E2F'lerin aktifleşmesi ile R noktası geçilerek hücre döngüsünün devamı sağlanır. CDK fosforilasyonu ve Rb proteinin E2F'lerden ayrılması iki aşamalı CDK aktivasyonu ile sağlanır. Bir hücre büyümeyi uyaran bir sinyalle karşılaştığında, siklin D düzeyleri artar, CDK4 ve CDK6 aktive olur. CDK4 ve CDK6'nın siklin D ile oluşturduğu kompleksi takiben, Rb proteini fosforile olur ve siklin E ekspresyonu başlar. Ancak CDK2-siklin E kompleksinin Rb proteinini daha fazla fosforlaması ile Rb proteini hiperfosforile haline gelir ve E2F proteinlerini bağlayamadığından S fazına geçiş gerçekleşir (26). Hücre S fazına geçtikten sonra siklin A ekspresyonu olup CDK2 ile kompleks oluşturur ve replikasyon için gerekli olan protein fosforilasyonunu sağlar. G2 den M fazına geçiş için CDK1-siklin B kompleksi gereklidir ve bu aktivasyon mitoz fazında görevli düzenleyici proteinlerin fosforilasyonunu sağlar (22).

CKI olarak bilinen hücre döngü inhibitör proteinleri CDK aktivitesini kontrol eder. CDK lara bağlanarak aktivitelerini azaltan ve değiştiren 2 protein ailesi mevcuttur. INK4 (CDK4 inhibitörü) ailesi; CDK4 ve CDK6'yı inhibe eder. p16 (INK4a), p15 (INK4b), p18 (INK4c), p19 (INK4d) bu aileye mensuptur. CIP (CDK aracılı protein/kinaz inhibitör protein) ailesi; CDK4, CDK6, CDK2 ve CDC2'yi etkilerler. Siklin D bağımlı CDK'ları stabilize ederken CDK2'yi güçlü şekilde inhibe ederler; p21 (CIP1), p27 (KIP1), p57 (KIP2) bu aileye mensuptur. Bu inhibitörlerin salınımı mitojenik sinyal yolunu inhibe eder. CKI'lar insan malignitelerinin çoğunda sıklıkla mutasyonlu veya sessiz haldedir (19).

Tüm hücre döngüsü fazlarında ortaya çıkan DNA hasarlarında bazı mekanizmalar ile bu mekanizmaları düzenleyen faktörlerle ilişkili bazı anormallikler birçok tümör tipinde gösterilmiştir (27, 28). Tüm insan tümörlerinde, kontrol noktalarını etkileyen genlerde değişikliklerin (mutasyon, delesyon, amplifikasyon veya polimorfizm) saptanması yüksek olasılıklıdır.

### **2.2.2. p16 (CDKN2A) VE TÜMÖR OLUŞUMU**

156 aminoasitten oluşan INK4 grubuna bağlı bir CKI olan p16, insan genomunun 9p21 bölgesinde tümör baskılayıcı bir gen tarafından kodlanmaktadır (29). p16, G1 fazından CDK4 ve CDK6'yı bağlayarak Rb proteininin fosforlanmasını önler ve hücre siklusunun G1 fazından S

fazına geçişine engel olur (30). Birçok kanserde p16'nın, mutasyon, delesyon veya hipermetilasyon yoluyla inaktivasyonu gösterilmiştir (31). p16'nın metilasyonu veya mutasyonu %1 dolaylarında bildirilmiştir (32). p16'nın promotor bölgesindeki hipermetilasyonlar protein ekspresyonunda kayıplara neden olmaktadır (33). p16 inaktivasyonu ise sıklıkla p53 mutasyonu bulunmayan hastalarda saptanmış olup homozigot delesyonu yüksek Ki-67 proliferatif indeks ile ilişkili bulunmuştur ve hücre çoğalmasını artırarak tümör gelişimine katkıda bulunduğu gösterilmiştir (34, 35). p16 ekspresyon eksikliğinde siklin D1-CDK4 kompleksi Rb proteinini fosforlar ve E2F'nin serbest kalmasına neden olur. E2F'in siklus ilerletici etkisi ile hücrenin S fazına geçmesi için gerekli olan genlerin transkripsiyonu aktive olur ve hücre S fazına girer (36). Premalign lezyonlarda p16 kaybının sıklığının fazla olması p16 aktivite kaybının kanser gelişiminin erken dönemindekini önemini gösterirken, p16 ekspresyonunun değerlendirilmesi kanser rekürrensini öngörülmesinde erken prognostik bir gösterge olarak değerli olabilir (37, 38).

### **2.2.3. MDM2 VE TÜMÖR OLUŞUMU**

MDM2 geni 12q13-14 kromozom bölgesinden kodlanan MDM2 proteini (pMDM2), p53'ü tutar ve p53'ün G1/S geçişinde siklusu durdurma ve apoptoz etkisini engeller (39). p53 proteini, 491 aminoasitten oluşup 56kDa moleküler ağırlığındadır ve 17. kromozomda yer alan 11 ekzonlu bir gen tarafından kodlanmaktadır (40). Birçok malignite durumu ile ilişkili olan p53; hipoksi, ultraviyole, radyasyon ve ilaç gibi nedenlerle hücrenin strese maruz kaldığı durumlarda p21, p14, ARF, MDM2 ve bax genleri ile etkileşime girerek G1, G2 kontrol noktalarında döngünün durdurulmasına ve apoptoza neden olmaktadır (41). Hücrenin strese maruz kaldığı durumlarda pMDM2'nin p53'e bağlanma yerinde asetilasyon ve fosforilasyon ile yapısal değişiklikler meydana gelir. Bu yüzden MDM2 proteini p53'ü bağlayamaz ve serbest kalan p53 transkripsiyonel aktivitesini göstererek G1 ve G2 kontrol noktalarında siklusun durdurulmasına ve bax geni aktivasyonu ile apoptoza neden olur. Özellikle onkojenik uyarı varlığında pMDM2 etkisini p53'e bağımlı olmayan yollarla da gösterebilir. G1/S geçişinden sorumlu olan E2F/DP1 aktivasyonu p14ARF'nin inaktivasyonuna neden olur. İnaktive p14ARF hücre çekirdeğinde pMDM2'yi bağlayamaz ve sitoplazmaya çıkmasına engel olamaz. Bu nedenle p53'ün etkisi azalır. Ayrıca E2F aktivasyonu yaptığından hücre G1 fazından S fazına geçer (42, 43).

MDM2 geninin birinci intronunun 309. nükleotidinde meydana gelen T→G baz değişiminin MDM2 RNA ve protein düzeylerinin artışına sebep olduğu ve p53 yolağının

baskılandığı bildirilmiştir (44). Fonksiyonlarına normal olarak devam eden hücrelerde p53 proteini, düşük yoğunlukta ve kısa yarı ömre sahiptir. Bu durum p53 proteinin düzenleyicisi olan MDM2 proteini ile sağlanır. MDM2 proteini, bu regülasyonu p53 proteinin amino ucuna bağladıktan sonra, hem p53 proteinin transkripsiyel etkinliğini baskılayarak, hem de proteozom aracılıklı parçalanmasını sağlayarak gerçekleştirir (45). MDM2'nin tümör oluşturma potansiyeli, insan tümörlerinde aşırı miktarda eksprese edilmesi ile belirlenmiştir. Bu aşırı ekspresyon; gen amplifikasyonu transkripsiyon artışı ya da translasyon artışı sebebi ile olabilir.(39, 46).

#### **2.2.4. TEK NÜKLEOTİD POLİMORFİZMİNİN ÖNEMİ**

Polimorfizm bir popülasyonda en az %1 sıklıkta bir varyantın olduğu bölge olarak tanımlanır. Aynı türün farklı bireyler arasında iki veya daha fazla dizin varlığını ifade eder. Polimorfizmler; tek nükleotid polimorfizmleri, mikrosatellit tekrarları, insersiyon ve delesyonlar olmak üzere 3 grupta incelenir. Tek nükleotid polimorfizmi belirli bir baz pozisyonunda meydana gelen tek nükleotid değişikliğidir. Tüm genetik varyasyonların yaklaşık %90'ını oluşturur. Bu farklılıklar hastalıklara yatkınlık derecesi, ilaçlara veya tedaviye olası yanıt ve bilinen mutasyonlar ile etkileşim gibi birçok hayati faktör üzerinde etkilidir. İnsan genomunda 10-30 milyon SNP olduğu tahmin edilmekle birlikte, olası tek nükleotid polimorfizmleri içerisinde hangisinin ilgili hastalık ile ilişki içerisinde olabileceğinin belirlenmesi yapılan çalışmalarda en büyük güçlüğü meydana getirmektedir (47).

Gen kodlayan bölgelerde görülen SNP varyantları, bir proteinin fonksiyonunu doğrudan etkileyebilmekte bazı varyantlar bazı hastalıklarla yakın ilişkili olabilmektedir. Gen kodlayan bölgelerde SNP varlığı hücre döngüsünde rolü olan, DNA tamir mekanizmasından veya karsinojenlerin detoksifikasyonundan sorumlu genlerde görülürse önemli değişikliklere neden olabilmektedir. Bu değişiklikler hücrelerin çoğalma mekanizmasını etkileyip uygun olmayan hücre bölünmelerine ya da programlı hücre ölümü inhibisyonuna yol açabilirler. SNP'ler aracılığıyla hangi sinyal iletim yolağının insan kanserlerinin oluşmasında rol oynadığı inceleyen çalışmalar giderek artmaktadır (48-50). Günümüzde yapılan tek nükleotid polimorfizm çalışmaları popülasyondaki tümör sıklığının, tümör görülme yaşının ve bu tümörlerin tedaviye verdiği yanıtın belirlenmesinde öncü olabilecek aydınlatıcı bilgiler ortaya koymaktadır.



## 2.3. HIPOFİZ ADENOMLARININ MOLEKÜLER VE GENETİK ÖZELLİKLERİ

Hipofiz adenomları intrakranyal tümörlerin %10'unu oluşturur. Morfolojik açıdan adenom olarak tanımlanan birçok tümör farklı davranışlar gösterebilmekte, çoğu benign davranışlı olmalarına rağmen bazı hipofiz adenomları agresif seyredilebilmekte ve lokal invazyon yaparak büyük boyutlara ulaşarak farklı prognoz gösterebilmektedirler. Bu bireysel farklılıkları anlamak, prognozu belirleyici parametreleri tanımlayabilmek, tümörleri sınıflayabilmek ve böylece hipofiz adenomlarını daha etkin tedavi edebilmek için tümör etiopatogenezinin anlaşılması büyük önem taşımaktadır (1, 51).

### *Proto-Onkogenlerin fonksiyon kazanması*

Nokta mutasyonu, translokasyon, insersiyon ve gen amplifikasyonu protoonkogenleri aktive edebilir.

Sporadik hipofiz adenomlarında en sık gözlenen genetik değişiklik GNAS (guanin nükleotid bağlayıcı protein, alfa stimule edici aktive polipeptit) somatik gen mutasyonudur. Bu mutasyon gsp mutasyonu olarak adlandırılır ve büyüme hormonu sekrete eden hipofiz adenomlarında %40'a kadar görülebilmektedir. Bu gen mutasyonu cAMP geçidinde devamlı bir aktivasyona neden olarak cAMP düzeylerini ve protein kinaz A aktivasyonunu artırır. Sonrasında, cAMP cevap elementi bağlayıcı protein (CREB) fosforilasyonu gerçekleşir ve şüpheli büyüme hormonu hipersekresyonuna ve hücre çoğalmasına yol açar (52).

Ras onkogenik proteinlerin üretilmesinde nokta mutasyonlarının rolü gösterilmiştir. H-ras gen mutasyonları, invaziv ve uzak metastazı olan prolaktinomaların az bir kısmında saptanmıştır (53, 54).

### *Tümör supresör genlerde fonksiyon kaybı*

Tümör supresör genler (TSG) normal olarak hücrenin bölünmesini baskılayan bir grup genlerdir. TSG'de her iki allelde kaybı, Knudson'un çift vuruş hipotezine göre tümöral hücre gelişimine neden olabilir (55). Hücre döngüsünü düzenleyen bazı tümör supresör genlerinin rolü hipofiz adenomlarında incelenmiştir.

Rb geni ilk tanımlanan tümör supresör genlerden biridir. Rb geni uzaklaştırılmış "knock out" farelerin intermedial hipofiz lobunda ACTH sekrete eden hipofizer adenomlar geliştiği gösterilmiştir. İnsan hipofiz adenomlarında ise Rb gen promotor bölgesinde metilasyon tanımlanmıştır (56, 57).

Hipofiz adenomlarında şimdiye kadar gösterilmiş kayıp olan tipik gen bölgeleri; 11. Kromozomun p ve q kolları, 11q13, 13q12-14, 10q ve 1q, 9p,13, 3 ve 12'dir. Bu bölgelerin çoğu tümör supresör genler içerir (58).

### *Hücre Döngüsünde Bozulma*

Birçok fare modelinde hücre döngüsü düzenleyicilerinde inaktivasyon veya aşırı üretimin hipofizer tümörögenezi başlatmaya yeterli olabileceği gösterilmiştir. Siklinler ve CDKların hücre döngüsünün başlaması ve devamında önemli role sahip olması tümörögenizde etkili olabilmelerine olanak sağlanmaktadır. Fonksiyonel olmayan hipofiz adenomlarında ve prolaktinoma da dahil olmak üzere invaziv adenomlarda siklin D1'in anlamlı ekspresyonu gösterilmiştir (59).

CKI ailesi üyelerinden CDKN2A (p16), CDKN2C (p18) ve CDKN1B (p27<sup>kip1</sup>)'nin G1-S geçişinde rol oynayarak hipofizer hücre proliferasyonunda etkili oldukları gösterilmiştir (60, 61).

PTTG ("pituitary tumor transforming gene", pituitier tümör dönüştürücü gen), hipofiz adenomu olan ratlarda GH4 hücrelerinden izole edilmiş olup hipofiz adenomlarının çoğunda aşırı ekspresse olduğu gösterilmiştir. PTTG, potent bir mitojenik ve anjiyojenik faktör olan bFGF'yi ("basic fibroblast growth factor", temel fibroblast büyüme faktörü) uyararak anjiogenezde ve tümör yayılımında etkili olması muhtemel bir genidir (62).

### *Büyüme Faktörleri*

Birçok büyüme faktörü ve onları tanıyan reseptörlerin hipofizer hücre gelişimi ve normal hormon üretiminin sağlanmasında önemli rolleri bulunmaktadır. TGF alfa ("transforming growth factor", dönüştürücü büyüme faktörü), laktotrop hücrelerden salınan mitojenik bir proteindir. TGF alfa hipofizer adenomların diğer alt tiplerini etkilemezken, prolaktinoma tümörögenizinde spesifik rol oynamaktadır (63). Ayrıca ptd-FGFR4 (fibroblast büyüme faktörü reseptörü 4), epidermal büyüme faktörü, sinir büyüme faktörü ve BMP4'ün (kemik morfogenetik protein) de hipofizer tümörögenizde rolleri olabileceği literatürde daha önce gösterilmiştir (64-66). BMP4 ön hipofizin gelişiminde rol oynamaktadır ve prolaktinoma oluşumunda etkili olabileceği gösterilmiştir (67).

### *Transkripsiyonel regülatörler ve mikroRNAlar*

Transkripsiyonel faktörler hipofizer hücre farklılaşmasının her basamağında büyük önem taşımaktadırlar. Ptx1 (pituitary homeobox 1) hipofizer hücre farklılaşmasının erken

basamaklarında panhipofizer bir transkripsiyon aktivatörüdür ve adenom gelişiminde rol oynayabileceği düşünülmektedir. Pit 1 (PUO1F1) mRNA'sının ise hipofizer adenomlarda normal hipofiz dokusuna göre 2,5-5 kat artmış olduğu gösterilmiştir (68).

MikroRNAlar (miRNAlar) yaklaşık 22 nükleotid uzunluğunda, gen ekspresyonunun transkripsiyon sonrası düzenlenmesinde ve mRNA translasyonu ve yıkımında yer alan kodlanmayan küçük RNA'lardır. Bu moleküllerin insan genlerinin yaklaşık %30'unun düzenlenmesinde rol oynadığı bilinmesine karşın hipofizer tümörogenezdeki rolleri henüz bilinmemektedir. Bazı hipofiz adenomu alt tiplerinde gösterilmekle birlikte mekanizmadaki rolleri henüz açıklığa kavuşmamıştır (69).

#### *Ailesel hipofiz adenomları*

Hipofiz adenomlarının çoğu sporadik olmasına karşı genetik faktörler de adenom gelişiminde rol oynayabilmektedirler. Klasik ailesel hipofizer tümör sendromu hipofiz hastalarının yaklaşık %5'inde tanımlanmıştır. Hipofizer adenom gelişimine predispozan olduğu bilinen klasik ailesel sendromlar; multipl endokrin neoplazmi tip 1 (MEN1) ve tip 4 (MEN4), carney kompleksi ve ailesel izole pituitar adenomlardır (FIPA). Bazı çalışmalarda DICER1 ve süksinat dehidrogenaz gen mutasyonlarının hipofiz adenomlarına neden olabileceği de gösterilmiştir (70). Ayrıca birkaç vaka bildiriminde nörofibromatozis tip 1'li hastalarda hipofizer adenom varlığı bildirilmiştir (71, 72).

Sonuç olarak hipofiz adenom gelişimi multifaktöriyel ve ilerleyen bir süreçtir. İlk aşamada bir tek hücrede somatik nokta mutasyonu ile başladığı, ikincil mutasyonlarla ilerlediği, çevresel ve büyüme faktörleri, hormonlar ve reseptörlerdeki değişikliklerin tümördeki biyolojik davranış üzerinde etkili olduğu düşünülmektedir. Tümör oluşumunun tüm basamakları henüz aydınlatılmadığından, hipofiz adenomlarında moleküler genetik değişiklikler ile ilgili çalışmalar, tümörün oluşum sürecinin ve davranış şeklinin anlaşılması için yapılan araştırmalar günümüzde önemini korumaktadır.

### **2.3.1. PROLAKTİNOMA VE GENETİK FAKTÖRLER**

Prolaktinomaların patogenezi kesin olarak bilinmemekle beraber, erken yaşlarda mutasyona uğrayan hipofizer bir kök hücrenin uygun ortamda birden fazla genetik ve epigenetik faktörün etkisi sonucu çoğalarak tümör gelişimine neden olduğu düşünülmektedir. Şimdiye kadar

prolaktinomaların patogenezi incelenmişse de, laktotrop hücre proliferasyonundaki moleküler olaylarla ilgili bilgiler diğer hipofizer tümör tiplerine göre daha sınırlıdır ve yapılan moleküler biyolojik çalışmalar daha çok agresif seyirli ve atipik prolaktinomalar üzerinde olmuştur (6).

#### *Proto-Onkogenlerin fonksiyon kazanması*

Günümüzde prolaktinomada az sayıda mutasyona veya fazla ekspresyona uğramış proto-onkogen tanımlanmıştır. İstisna olarak, büyüme faktörü sinyalizasyonunda yer alan GTP bağlayıcı proteini kodlayan Ras genindeki nokta mutasyonu (Gly12Val) dopaminerjik inhibisyona cevapsız agresif prolaktinomalarda gösterilmiştir (73). Diğer tümörlerin aksine prolaktinomalarda Ras mutasyonları sık olarak görülmemektedir.

Dopaminerjik uyarı prolaktin sekresyonunun en önemli düzenleyicisi olsa da tirotropin serbestleştirici hormon (TRH) gibi nöropeptiler laktotroplar üzerine uyarıcı etkide bulunabilmektedirler. Önceki çalışmalarda tüm hipofiz adenomlarında TRH reseptörlerinde normal dokuya göre değişim görülmemekle birlikte, prolaktinomada kısa bir TRH reseptörü sentezlendiği ve bunun da liganda bağlanma süresini kısalttığı gösterilmiştir. TRH uygulaması prolaktinomalı hastalarda prolaktin seviyesi azaltmada başarılı olmamasına karşın, tümörde TRH reseptörlerinin aşırı ekspresyonu gösterilmiştir (74, 75).

Prolaktinomalarda görülen cinsiyet farklılıkları da çalışmalara konu olmuş ve hipofizer tümörlerde östrojen reseptör polimorfizmleri bazı *in vitro* çalışmalarda gösterilmiştir. Ancak bu varyantların hücre büyümesi üzerine etkisi ve tümör patogenezindeki rolü ile ilgili bilgiler oldukça yetersizdir (76).

#### *Tümör supresör genlerde fonksiyon kaybı*

İnsan hipofizer tümörleri için tanımlanmış tümör supresör genler arasında Rb agresif adenomlarda, Dopaminerjik D2 reseptörü (DRD2) dirençli prolaktinomada ve p16INK4a tüm prolaktinomalarda tanımlanmıştır. Ancak diğer yaygın tümör supresör genlerin prolaktinoma patogenezinde rolü saptanmamıştır (77).

Hipofizer hormon sekresyonunu inhibe eden membran ve nükleus reseptör genlerinde oluşabilecek mutasyonların, aşırı hormon sekresyonuna ve sonuç olarak tümör gelişimine neden olabileceği düşünülmektedir. DRD2 dopaminin prolaktin salınımı üzerindeki inhibitör etkisini kontrol eder. Daha önce DRD2 geni uzaklaştırılmış “knock out” fare modellerinde dopamin inhibisyon kaybının neoplastik dönüşüme yol açtığı gösterilmişse de insan hipofiz

adenomlarındaki durum henüz tam olarak netliğe kavuşmamıştır. Yapılan sınırlı sayıdaki çalışmada DRD2 geni ile prolaktinoma patogenezi arasında herhangi bir ilişki gösterilememiştir (78). Fonksiyonellik açısından incelendiğinde ise dopamin agonisti tedavisine dirençli prolaktinomalarda DRD2 mRNA azlığı sıklıkla bildirilmiştir (79).

### *Hücre Döngüsünde Bozulma*

Önceki çalışmalarda prolaktinoma da dahil hipofiz tümörlerinde JUN, FOS ve MYC genlerindeki değişiklikler incelenmiştir (80). Güncel çalışmalarda ise daha çok hücre döngüsündeki geçişlerin kontrol basamaklarını düzenleyen genlerdeki değişiklikler incelenmektedir. Siklin D1 aşırı ekspresyonunun hipofizer adenomlarda agresif tümör davranışında etkili olduğu gösterilmiştir. Siklin D1'in prolaktinoma için gelişim patogenezinde rolü olabileceği tartışılrsa da, tümör davranışında etkinliği açısından benzer sonuçlara ulaşılamamıştır (81).

PTTG, prolaktinoma da dahil olmak üzere tüm hipofizer tümör alt gruplarında gösterilmiştir. PTTG'nin prolaktinoma patogenezindeki rolü rat prolaktinoma gelişimi üzerinden incelenmiştir. Bu modelde laktotrop proliferasyonunda östrojenin PTTG üzerinden etkisi vurgulanmıştır. Östrojen PTTG aşırı ekspresyonuna neden olarak tümör formasyonu, progresyonu ve anjiogenezinde etkili olan bFGF ekspresyonunun uyarılmasına yol açar. Bu da prolaktinoma gelişiminde parakrin bir mekanizma varlığını düşündürmektedir (82). PTTG'nin hormonal fenotip üzerine direkt etkisi incelendiğinde ise PTTG1 C-terminal peptid mutasyonunun prolaktin gen supresyonuna neden olduğu gösterilmiştir. Bu da hedeflenmiş PTTG1 etki inhibisyonunun prolaktinoma tedavisinde yer alabileceğini düşündürmektedir (83).

Daha önce tiroid, pankreas ve prostat kansinomlarında tespit edilmiş olan yüksek mobilite grup A non-histon kromozomal protein 2 (HMGA2) aşırı ekspresyonu, ratlarda büyüme hormonu ve prolaktin sekrete eden hipofiz tümörlerinde tespit edilmiştir. Ayrıca insan prolaktinomalarında HMGA2 gen ekspresyonunun arttığı ve bu artışın adenom boyutuyla ilişkisi de gösterilmiştir (84). Özellikle aşırı ekspresyon saptananlarda dopamin agonisti tedavisine cevapsız tümörler gözleendiği bildirilmiştir (85).

### *Büyüme Faktörleri*

Hipofizden salgılanan birçok büyüme faktörü arasında, *in vitro* ve *in vivo* hayvan modellerinde laktotrop hücrelerin prolaktinle birlikte sinir büyüme faktörü (NGF) salgıladıkları gösterilmiştir (86). Sonraki çalışmalar mikroprolaktinomalı hastalarda NGF salımının kandaki prolaktin düzeyiyle paralel olduğunu, bu sekresyonunu nörotransmitter düzenleyen bir mekanizma ile kontrol edildiğini doğrulamıştır. Sonrasında dopamin agonisti tedavisiyle prolaktin normalizasyonu sağlanmış ve eş zamanlı olarak serum NGF düzeylerinde de anlamlı azalma saptanmıştır (87). İlginç olarak aynı yazarlar tarafından yapılan başka bir çalışmada medikal tedaviye cevapsız prolaktinomalarda DRD2 ekspresyonu olmamasıyla birlikte NGF sekresyonunun da olmadığı gösterilmiştir (88). Bununla birlikte, NGF uygulandığında p75 (NGFR) ve NF-kappaB aracılığıyla medikal tedaviye cevapsız prolaktinomalarda DRD2 ekspresyonunu uyararak tedavi cevabını düzeldiği gösterilmiştir (89). Dirençli prolaktinoma laktotrop hücrelerinde NGF aracılı otokrin döngünün rolünün anlaşılması için ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

### **3. GEREÇ VE YÖNTEM**

#### **3.1. ARAŞTIRMA ÖZELLİKLERİ**

##### **3.1.1. ARAŞTIRMA TÜRÜ**

Araştırmamız; prolaktinoma tanısı almış hastalara MDM2 (SNP309T→G) ve p16 (540C→G ve 580C→T) gen polimorfizmi analizi yapılması ve sağlıklı gönüllülerde de yapılan aynı gen analizi sonuçlarının karşılaştırılması ile bu polimorfizmlerin prolaktinoma hastalığının oluşumu ve klinik takibindeki rolünün anlaşılması amacıyla yapılan prospektif bir çalışmadır.

##### **3.1.2. ARAŞTIRMA YERİ VE ZAMANI**

Araştırma; Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları Polikliniği'ne başvuran hastalardan, Mart 2013 ile Mart 2014 tarihleri arasında prolaktinoma tanısı alan ve takip edilen hastaların katılımıyla yapılmıştır. Hastalardan tanı sırasında ve 6 aylık takip sonrasında alınan serum örneklerinin çalışılması ise Eylül 2013 ile Eylül 2014 tarihleri arasında yapılmıştır.

##### **3.1.3. ARAŞTIRMA FORMU**

Araştırma kayıt formunda; hastaya ait ad, soyad, cinsiyet, yaş, iletişim bilgileri, sağlık özgeçmişi (kronik hastalıkları, geçirdiği operasyonlar...) sigara ve alkol kullanım öyküsü, boy, kilo, vücut kitle indeksi, araştırmada bakılan parametreler bulunmaktadır.

##### **3.1.4. ARAŞTIRMA EVRENİ**

Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları Polikliniği'ne, Mart 2013 ile Mart 2014 tarihleri arasında prolaktinoma şüphesiyle başvurup prolaktinoma tanısı alan ve araştırmaya katılmayı kabul eden 74 hasta ile 100 sağlıklı gönüllü araştırma evrenini oluşturmaktadır. Polimorfizm çalışması için sağlıklı ve prolaktinomali bireylerin kan örnekleri EDTA'lı tüpe alınıp, DNA izolasyonu yapılmış ve 74 prolaktinoma hastası ve 100 sağlıklı kontrolde p16 (540C→G ve 580C→T) , MDM2 (SNP309T→G) gen polimorfizm analizleri yapılmıştır. Tüm bireylerden sağlanan kan örneklerinden DNA izolasyonu amonyum asetat ve proteinaz K'nın kullanıldığı tuz çöktürme metoduyla elde edilmiştir (90). Hastaların rutin

parametreleri ise aynı gün içinde alınan serum örneklerinden Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Biyokimya Laboratuvarı'ndan çalışılmıştır.

### **3.1.5. ARAŞTIRMAYA DÂHİL EDİLME VE DIŞLANMA KRİTERLERİ**

#### **Dâhil Edilme Kriterleri:**

- 18-70 yaş grubundaki hastalar
- Hipofizde tümörü saptanan ve prolaktin değeri normalin üzerinde olan prolaktinoma hastaları çalışmaya dâhil edilmiştir.

#### **Dışlanma Kriterleri:**

- Yaş grubu uygun olmayan hastalar
- Prolaktin dışında hipofiz hormon bozukluğu olan hastalar
- Hipofiz operasyonu geçirmiş olan hastalar
- Kronik böbrek yetmezliği
- Karaciğer yetmezliği
- Prolaktin yüksekliğini olumsuz etkileyebilecek ilaç kullanımı (antidepresan vb)
- Gebelik
- Çalışmaya katılmaya gönüllü olmamak

### **3.1.6. ARAŞTIRMA ETİĞİ**

Araştırma Bezmialem Vakıf Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan onay alınarak yapıldı (Onay Tarihi: 08.01.2014, Numarası: 71306642/050-01-04/02). Bütün hastalardan ve sağlıklı gönüllülerden bilgilendirilmiş onam formu alındı. Çalışmamız 2009 Helsinki Bildirgesine göre gerçekleştirildi.

### **3.1.7. VERİLERİN ANALİZİ VE DEĞERLENDİRİLMESİ**

Araştırmada elde edilen tüm veriler SPSS (IBM Statistical Package for Social Sciences, IBM Corporation, NY, USA) 21.0 programı kullanılarak değerlendirildi. Klinik parametreler ortalama  $\pm$  Standart Sapma veya yüzde oranları olarak verildi. Çalışmada değerlendirilen verilerin dağılım özelliğinin incelenmesinde One-Sample Kolmogorov-Smirnov testi kullanıldı. Hasta ve kontrol gruplarında MDM2 ve p16 polimorfizmlerinin farkları Ki-Kare testi ile analiz edildi. Mann Whitney U testi iki grup karşılaştırılırken, Kruskal Wallis testi ise ikiden fazla grup



karşılaştırılırken kullanıldı. Veriler arasındaki korelasyonların değerlendirilmesi için ise Spearman Korelasyon testi kullanıldı.

Gruplar arasında çoğunluğu normal dağılım gösteren verilerin karşılaştırılması için Student's T testi kullanıldı. Araştırmada  $p < 0,05$  istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

### 3.2. KULLANILAN GEREÇLER VE CİHAZLAR

- Buzdolabı (+4 Beko)
- Derin Dondurucu (-20 Uğur)
- Derin Donudurucu (-80°C Sanyo)
- Distile Su Cihazı (Millipore)
- Hassas terazi (Radwag AS 220/C/2)
- Isıtıcıly manyetik karıştırıcı (Elektromag)
- pHmetre (Hanna)
- Soğutmalı Santrifüj (Hereaus)
- Vorteks karıştırıcı, Spin (Biosan)
- Su banyosu (Elektromag)
- Spektrofotometre (NanoDrop2000)
- Pipet takımı (Gilson)
- PZR cihazı (BioRad)
- Etüv (Nüve)
- Güç Kaynağı (Titan plus Helena Laboratories)
- Mikrodalga Fırın (Philco)
- Isı Bloğu (Biosan)
- Elektroforez sistemi (LKB 2013 miniphor electrophoresis, LKB 2012 maxiphor electrophoresis)
- UV transilluminator (KODAK)
- ELISA Okuyucu Medispec

### **3.3. KULLANILAN KİMYASAL MADDELER**

Agaroz (İnvitrogen MBG), Amonyum asetat (Sigma A-8920), Amonyum klorür (Sigma A-5666), Borik asit (Sigma B-6768), 6X Yükleme boyası (Intron), DNA marker (Fermentas), EDTA (Merck K-90602121), Etanol (%99 Merck), Etidyum Bromid (Sigma E-8751), Hidroklorik asit (% 37 Merck K-13190114), Potasyum bikarbonat (Merck K-126223552), Primerler (İnvitrogen), Proteinaz K (İnvitrogen) Sodyum dodesil sülfat (Sigma L-5750), Sodyum hidroksit (Merck C754962), Sodyum klorür (Carlo Erba 368257), Trizma baz (Sigma T-1503), Taq polimeraz (Intron), 100bp marker (Intron).

### **3.4. KULLANILAN ÇÖZELTİLER**

#### **3.4.1. DNA İZOLASYONUNDA KULLANILAN ÇÖZELTİLER**

##### **Eritrosit Parçalama Tamponu (Lysis Buffer)**

8,74 gram Amonyum klorür, 1 gram Potasyum bikarbonat, 200 µl 0,5 M Etilen diaminetetraasetat (EDTA)'ın tartımları yapılarak erlen içine alındı. 900 mililitre distile su eklendi ve çözeltinin pH'sı 1N NaOH ile 7,4'e ayarlandı. Daha sonra balon jöje içine alınarak 1 litreye tamamlandı. Çözelti ısıya dayanıklı cam şişelere aktarılarak 120°C'de 15 dakika otoklavlandı ve +4°C'de saklandı.

##### **0.5 M Disodyumetilendiaminteraasetat ( EDTA) (pH 8.0)**

186,1 gram Etilendiamintetraasetat (EDTA) tartılarak beher içine alındı ve 800 ml distile su eklendi. Manyetik karıştırıcı yardımıyla çözüldürüldü ve pH'sı NaOH çözeltisi ile 8.0'e ayarlanarak distile su ile 1 litreye tamamlandı. 120°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildi.

##### **4 M Sodyum Klorür (NaCl)**

233,6 gram NaCl tartılarak erlene alındı. Üzerine 800 mililitre distile su ilave edildi ve manyetik karıştırıcı yardımıyla iyice çözüldürüldü. Balon jöjeye aktarılarak 1 litreye tamamlandı. 120°C 'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildi.

##### **Lökositleri Parçalama Tamponu (“White Blood Cell Buffer”)**

25 mililitre 4 M NaCl ve 50 mililitre 0,5 M Etilendiaminasetat (EDTA) balon jöjeye konularak 1 litreye tamamlandı. 120°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildi. Oda ısısında saklandı.

### **1 M Tris Tamponu ( Stok)**

121,1 gram Tris baz tartılarak bir behere alındı. Üzerine 42 µl hidroklorik asit (HCl) ile yaklaşık 800 mililitre distile su eklenerek manyetik karıştırıcı yardımıyla çözüldürüldü. Daha sonra balon jøjeye aktarıldı ve 1 litreye tamamlandı. 120°C’de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildi.

### **9.5 M Amonyum Asetat**

73,22 gram amonyum asetat tartılarak beher içine alındı. Üzerine 80 mililitre distile su eklenerek manyetik karıştırıcıda çözüldürüldü. Balon jøjeye aktarıldı ve distile su ile 100 mililitreye tamamlandı. 0,22 mikronluk filtreden geçirilerek sterilize edildi ve +4°C’de saklandı.

### **%10’luk Sodyum Dodesil Sülfat (SDS)**

10 gram Sodyum dodesil sülfat tartıldı. Beher içine alınarak üzerine 80 mililitre distile su eklendi. Manyetik karıştırıcı yardımı ile çözüldürüldü ve pH’sı 7,2’ye ayarlandı. 0,22 mikronluk filtreden geçirilerek sterilize edildi ve oda ısısında saklandı.

### **Proteinaz K (20 mg/ml)**

20 miligram Proteinaz K tartılarak steril bir tüp içinde steril distile su ile 1 mililitreye tamamlandı. -20 °C’de saklandı.

## **3.4.2. AGARUZ JEL ELEKTROFOREZİNDE KULLANILAN ÇÖZELTİLER**

### **Agaroz Jel Yükleme Tamponu (5X)**

20 gram Ficoll 400, 1 gram SDS, 0,2 mililitre 0,5 M, etilendiamintetraasetat, 1 mililitre 1M Tris (pH 8.0), 200 miligram Bromfenol blue, 200 miligram xylene cyanol tartılarak steril distile su ile 100 mililitreye tamamlandı. Oda ısısında saklandı.

### **Etidyum Bromür (10 mg/ml)**

1 gram Etidyum bromür tartılarak steril distile su ile 10 mililitreye tamamlandı.

### **5X Tris-Borik Asit-Etilendiamintetraasetat (TBE)**

54 gram Tris baz ve 27,5 gram borik asit tartılarak beher içine aktarıldı. Üzerine 20 mililitre 0.5 M EDTA (pH 8.0) ve 800 ml. distile su ilave edilerek manyetik karıştırıcıda çözüldürüldü.

Çözelti balon jojeye aktarılarak 1 litreye tamamlandı ve 120°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildi. Oda ısısında saklandı.

### **3.5. YÖNTEM**

Proje kapsamında ilk olarak daha önce belirtilen klinik parametrelere uygun olan olgular çalışmaya dahil edilmiştir. Seçilen olgulardan izin alınarak 10 ml'lik kan örnekleri EDTA'lı ve kuru tüplere toplanmıştır. EDTA'lı tüplere alınmış olan periferik kan lökositlerinden en geç 1 gün içinde DNA izolasyonu yapılmış ve DNA saflığı tespit edilerek DNA konsantrasyonları hesaplanmıştır. İzole edilen DNA örneklerinden, p16 ve MDM2 genlerindeki polimorfizmleri saptayabilmek için polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile çoğaltılarak restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi (RFLP) yöntemi ile varyasyon tespiti yapılmıştır. Kuru tüplerle alınan kan örneklerinden ise santrifüjleme yöntemi ile serum elde edilmiş ve çalışılmak üzere -40 °C'de saklanmıştır. Ayrılan serum örneklerinden prolaktinoma düzeyleri tayin edilmiştir. Hasta ve kontrol gruplarındaki genotip ve allel dağılımlarının belirlenmesi ve biyokimyasal parametrelere ilişkin dağılımlar istatistiksel analizlerle yapılmış olup hastalık gelişiminde risk oluşturup oluşturmadıkları tespit edilmeye çalışılmıştır.

#### **3.5.1. MOLEKÜLER ANALİZLER**

##### **3.5.1.1. PERİFERİK KANDAN DNA İZOLASYONU**

10 ml periferik kan örneği steril EDTA'lı tüplere alındıktan sonra çalışma için falkon tüpüne aktarıldı. Üzerine 1:3 oranında (30 ml) eritrosit parçalama çözeltisi eklenerek karıştırıldı ve +4°C'de 15 dakika bekletildi. +4°C'den çıkarılan örneklerin 1500 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek süpernatant kısımları atıldı ve pelletleri tamamen süspanse edilerek üzerlerine tekrar 15-20 ml. eritrosit parçalama çözeltisi eklendi. Örnekler +4°C'de 15 dakika bekletildikten sonra 1500 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatantları atılarak süspanse edildi. Süspanse olan pellet üzerine 500 µl %10'luk SDS, 75 µl proteinaz K (20mg/ml) ve 9,4 ml lökosit parçalama çözeltisi (WBL) eklenerek 56 °C su banyosunda 1 gece inkübe edildi. İnkübasyon sonrası her 1 ml. örnek başına 0,37 ml. olacak şekilde 9,5 M Amonyum asetat çözeltisi eklendikten sonra yavaşça karıştırıldı ve 3000 rpm'de 25 dakika santrifüj edilerek proteinler çöktürüldü. Santrifüj sonrası süpernatant kısmı 50ml'lik temiz bir tüpe aktarıldı ve üzerine 1:2 oranında %99'luk absolü alkol eklendi ve DNA'nın presipitasyonu sağlandı. Yoğunlaşan DNA'nın alkol yüzeyine çıkması

beklenip ve DNA mikropipet ucuyla alındı. DNA %70'lik alkolde yıkandı ve korunmak üzere Tris-EDTA çözeltisinde çözündürülerek +4 °C'de saklandı (90).

### **3.5.1.2. ELDE EDİLEN DNA'NIN KONSANTRASYON VE KALİTESİNİN TAYİNİ**

Spektrofotometrik olarak, 260 nm ve 280 nm dalga boylarında yapılan ölçümlerle DNA'nın saflığı ve konsantrasyonu belirlendi. 50µg/ml çift iplikçikli DNA içeriğinin 260 nm dalga boyunda 1 optik densite (OD) verdiği kabul edilmektedir. 260 nm'deki ölçüm değeri aşağıdaki formüle uygulanarak DNA konsantrasyonu hesaplandı.

$$\text{DNA Konsantrasyonu: OD}_{260} \times 50\mu\text{g/ml}$$

DNA örneklerinin saflığı  $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$  oranı kullanılarak belirlendi. Yeterince iyi saflıkta kabul edilen DNA'nın  $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$  değeri yaklaşık 1,8'dir. Ortamda fenol veya protein mevcutsa bu oran 1,8'den küçük olacaktır.  $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$  değeri 2'den büyükse ortamda RNA bulunduğu anlamına gelir.

### **3.5.1.3. p16 VE MDM2 GEN POLİMORFİZMLERİNİN PCR-RFLP YÖNTEMİ İLE SAPTANMASI**

#### **3.5.1.3.1. p16 540C→G VE p16 580C→T GEN POLİMORFİZMLERİNİN TESPİTİNDE KULLANILAN PRİMER DİZİLERİ**

p16 gen bölgesinin çoğaltılmasında kullanılan primerlerin nükleotid dizisi aşağıda verildiği şekildedir. Bu primerler uluslararası yayınlarda doğrulanmış primer dizileridir.

**p16 İleri Primer:** 5' GAT GTG CCA CAC ATC TTT GAC CT'3

**p16 Geri Primer:** 5' CTA CGA AAG CGG GGT GGG TTG T'3

#### **3.5.1.3.2. MDM2 SNP309T→G GEN POLİMORFİZMİNİN TESPİTİNDE KULLANILAN PRİMER DİZİLERİ**

MDM2 gen bölgesinin çoğaltılmasında kullanılan primerlerin nükleotid dizisi aşağıda verildiği şekildedir. Bu primerler uluslararası yayınlarda doğrulanmış primer dizileridir.

**MDM2 İleri Primer:** 5' CGC GGG AGT TCA GGG TAA AG'3

**MDM2 Geri Primer:** 5' AGC TGG AGA CAA GTC AGG ACT TAA C'3

### 3.5.1.4. PZR'DE KULLANILAN KİMYASAL MADDELER VE PZR'İN HAZIRLANIŞI

Genomik DNA örneklerinde p16 geni 181 bç'lik gen bölgesi ve MDM2 geni 237 bç'lik gen bölgesi PCR yöntemi ile çoğaltıldı. Bu amaçla toplam reaksiyon hacmi 25 µl olacak şekilde, Tablo 1'deki bileşenler sırası ile 0,2 ml'lik steril tüpe konuldu. 10 örnek çalışılacak ise pozitif ve negatif kontrol için birer tane ve pipetleme hataları için de bir tane olmak üzere toplam 13 örnek üzerinden reaksiyon karışımı hazırlandı. PCR karışımının hazırlanma işlemlerinin hepsi buz üzerinde soğukta ve steril kabin içerisinde yapıldı.

**Tablo 1:** PZR Karışımının Hazırlanması

Malzemeler	Kullanılan Hacim
Mg Free 10XPCR Tamponu	2,5 µl
dNTP (200 µM) (herbir nükleotidden 25 mM)	1,5 µl
Primer karışımı (10 pmol)	1 µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM/ml)	1,75 µl
Taq DNA polimeraz	0,3 µl
PCR grade dH <sub>2</sub> O	16.95µl
DNA (100 ng/µl)	1 µl

Taq DNA polimeraz eklendikten sonra hiç vakit kaybetmeden tüp içine konan bileşenlerin iyice karışması için pipetleme işlemi yapıldı. Örnek sayısı kadar 0,2 ml'lik tüplere 24 µl reaksiyon karışımı dağıtıldı. p16 Gen Polimorfizmini tespit etmek için kullanılan ileri ve geri primerler için annealing derecesi optimize edilerek 56 °C sıcaklık kullanıldı (Tablo 2).

**Tablo 2:** p16 geni PZR Çoğalma Koşulları

°C	SÜRE	DÖNGÜ SAYISI
95	5dk	1
94	45 sn	35
56	45 sn	
72	45 sn	
72	5dk	1

MDM2 Gen Polimorfizmini tespit etmek için kullanılan ileri ve geri primerler için annealing derecesi optimize edilerek 57 °C sıcaklık kullanıldı (Tablo 3).

**Tablo 3:** MDM2 geni PZR Çoğalma Koşulları

°C	Süre	Döngü Sayısı
95	5dk	1
94	45 sn	35
57	45 sn	
72	45 sn	
72	5dk	1

### **3.5.1.5. PZR ÜRÜNLERİNİN AGARUZ JEL ELEKTROFOREZ YÖNTEMİ İLE KONTROLÜ**

#### **3.5.1.5.1. %2'LİK AGARUZ JEL HAZIRLANMASI:**

- 4 gr. agaroz (Invitrogen) tartılarak erlen içine konuldu. Üzerine son hacim 200 ml. olacak şekilde 1X TBE tamponu eklenerek, mikrodalga fırında kaynatma yolu ile çözündürüldü.
- Erlenin sıcaklığı elle tutulabilecek sıcaklığa düştüğünde (50-55°C ) çözülmüş agaroz jel içine 4,5 µl etidyum bromür (10mg/ml) ilave edildi.
- Hazırlanan jel yatay jel yatağı içine dökülerek, yükleme kuyucuklarının oluşması için tarak yerleştirilerek donmaya bırakıldı.
- Jel donduktan sonra tarak dikkatlice çıkarıldı ve jel örnek yüklenmesi için hazır duruma geldi.

#### **3.5.1.5.2. PZR ÜRÜNLERİNİN %2'LİK JELE YÜKLENMESİ:**

- %2'lik jel hazırlandıktan sonra 1X TBE tamponu içeren jel tankı içine uygun şekilde konuldu.
- Agaroz jelin üzerini 2-3 ml gelecek şekilde 1X TBE tamponu jel üzerine eklendi.
- 7 µl PZR ürününe, 3 µl yükleme tamponu (6X) eklenip pipetleme yapılarak karıştırıldı. 10 µl'lik örnek karışımı kuyucuklara sırasıyla yüklendi.

Yükleme işleminden sonra jel tankının kapağı kapatıldı. Güç kaynağı (E-C apparatus Corporation, E-C4000P) 500 miliamper 120 volt elektrik gücüne ayarlanarak elektroforez jel yürütülmesi gerçekleştirildi.

### 3.5.1.6. p16 GENİNE AİT PZR ÜRÜNLERİNDE RFLP YÖNTEMİNİN UYGULANMASI

MspI enzimi 10X Buffer Tango ile birlikte p16 540C→G gen polimorfizminin belirlenmesi için kullanıldı. MspI enziminin tanıdığı dizi ve kesim yeri şekil 3'te gösterilmiştir.



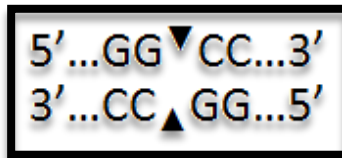
**Şekil 3:** MspI Restriksiyon Enzimine Ait Kesim Tanıma Bölgesi

PZR ürünü saptanmış örneklerden toplam hacmi 10 µl olacak şekilde restriksiyon enzim kesimi Tablo 4'te belirtilen çözeltilere, MspI enziminin eklenmesi ile gerçekleştirildi. Bu kesim işleminde kullanılan enzim için optimum sıcaklık 37°C'de 16 saat olmuştur.

**Tablo 4:** MspI Enzimi Kesim Protokolü

Kimyasallar	Kullanılan Hacim
PZR ürünü	5µl
Distile Su	4,5µl
10X Buffer	0,5µl
Enzim	0,3µl

HaeIII enzimi 10X Buffer Tango ile birlikte p16 580C→T gen polimorfizminin belirlenmesi için kullanıldı. HaeIII enziminin tanıdığı dizi ve kesim yeri şekil 4'te gösterilmiştir.



**Şekil 4:** HaeIII Restriksiyon Enzimine Ait Kesim Tanıma Bölgesi



PZR ürünü saptanmış örneklerden toplam hacmi 10 µl olacak şekilde restriksiyon enzim kesimi Tablo 5’te belirtilen çözeltilere, HaeIII enziminin eklenmesi ile gerçekleştirildi. Bu kesim işleminde kullanılan enzim için optimum sıcaklık 37°C’de 16 saat olmuştur.

**Tablo 5:** HaeIII Enzimi Kesim Protokolü

<b>Kimyasallar</b>	<b>Kullanılan Hacim</b>
PZR ürünü	5µl
Distile Su	4,5µl
10X Buffer	0,5µl
Enzim	0,3µl

### 3.5.1.7. MDM2 GENİ PZR ÜRÜNÜNDE RFLP YÖNTEMİNİN UYGULANMASI

MspAII enzimi 10X Buffer Tango ile birlikte MDM2 T→G gen polimorfizminin belirlenmesi için kullanıldı. MspAII enziminin tanıdığı dizi ve kesim yeri şekil 5’te gösterilmiştir.



**Şekil 5:** MspAII Restriksiyon Enzimine ait kesim tanıma bölgesi

PZR ürünü saptanmış örneklerden toplam hacmi 10 µl olacak şekilde restriksiyon enzim kesimi Tablo 6’da belirtilen çözeltilere, MspAII enziminin eklenmesi ile gerçekleştirildi. Bu kesim işleminde kullanılan enzim için optimum sıcaklık 37°C’de 16 saat olmuştur.

**Tablo 6:** MspAII Enzimi Kesim Protokolü

<b>Kimyasallar</b>	<b>Kullanılan Hacim</b>
PZR ürünü	5µl
Distile Su	4,5µl
10X Buffer	0,5µl
Enzim	0,3µl

### 3.5.1.8. ENZİM KESİM ÜRÜNLERİNİN AGAROZ JEL ELEKTROFOREZ YÖNTEMİ İLE KONTROLÜ

%3'lük agaroz jel hazırlandı. Kesim ürünlerinden 10 µl ve yükleme tamponundan 3 µl alınarak karıştırılıp %3'lük agaroz jeldeki kuyulara yükleme yapıldı. Kesim ürünleri 50 bç'lik DNA moleküler marker ile birlikte yürütüldü. Yürütme sonrası jel üzerindeki bantlar, UV ışık (304 nm) altında incelendi.

#### 3.5.1.8.1. MSPİ ENZİM KESİM SONUÇLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ

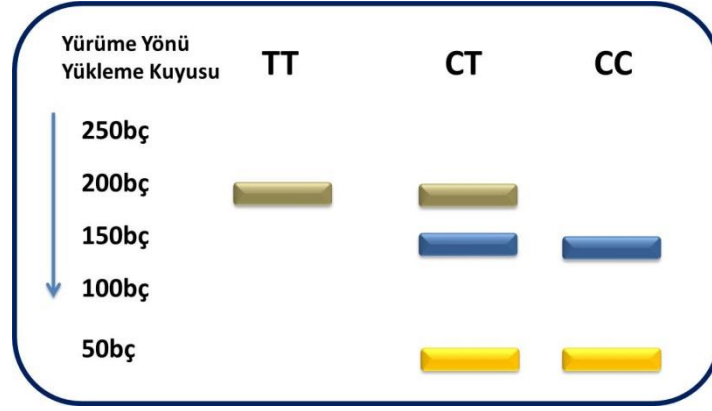
Kesim işlemi yapılmadan önce elde edilen PZR ürünlerinin bant büyüklüklerinin 181 bç olduğu saptandı. MspI enzimi ile kesim sonrasında sadece 181 bç'lik bant görüldüğünde GG (homozigot mutant), 181, 104 ve 77 bç'lik bantlar görüldüğünde CG (heterozigot mutant), 104 ve 77 bç'lik bantlar görüldüğünde ise CC (homozigot doğal) genotip olarak değerlendirildi (Şekil 6).



Şekil 6: RFLP sonrası oluşabilecek p16 540C→G polimorfizmine ait DNA parçalarının % 3'lük agaroz jeldeki bant şeklinin şematik görüntüsü.

#### 3.5.1.8.2 HaeIII ENZİM KESİM SONUÇLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ

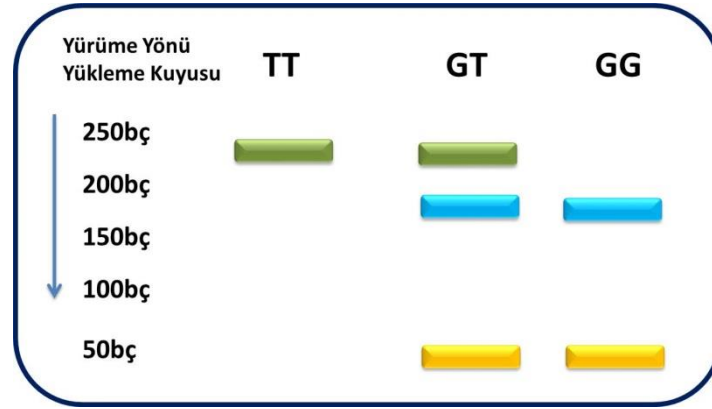
Kesim işlemi yapılmadan önce elde edilen PZR ürünlerinin bant büyüklüklerinin 181 bç olduğu saptandı. HaeIII enzimi ile kesim sonrasında sadece 181 bç'lik bant görüldüğünde TT (homozigot mutant), 181, 142 ve 39 bç'lik bantlar görüldüğünde CT (heterozigot mutant), 142 ve 39 bç'lik bantlar görüldüğünde ise CC (homozigot doğal) genotip olarak değerlendirildi (Şekil 7).



**Şekil 7:** RFLP sonrası oluşabilecek p16 580 C→T polimorfizmine ait DNA parçalarının % 3'lük agaroz jeldeki bant şeklinin şematik görüntüsü.

### 3.5.1.8.3. MSPA1I ENZİM KESİM SONUÇLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ

Kesim işlemi yapılmadan önce elde edilen PZR ürünlerinin bant büyüklüklerinin 237 bç olduğu saptandı. MspA1I enzimi ile kesim sonrasında sadece 237 bç'lik bant görüldüğünde TT (homozigot mutant), 237, 189 ve 48 bç'lik bantlar görüldüğünde GT (heterozigot mutant), 189 ve 48 bç'lik bantlar görüldüğünde ise GG (homozigot doğal) olarak değerlendirildi (Şekil 8).

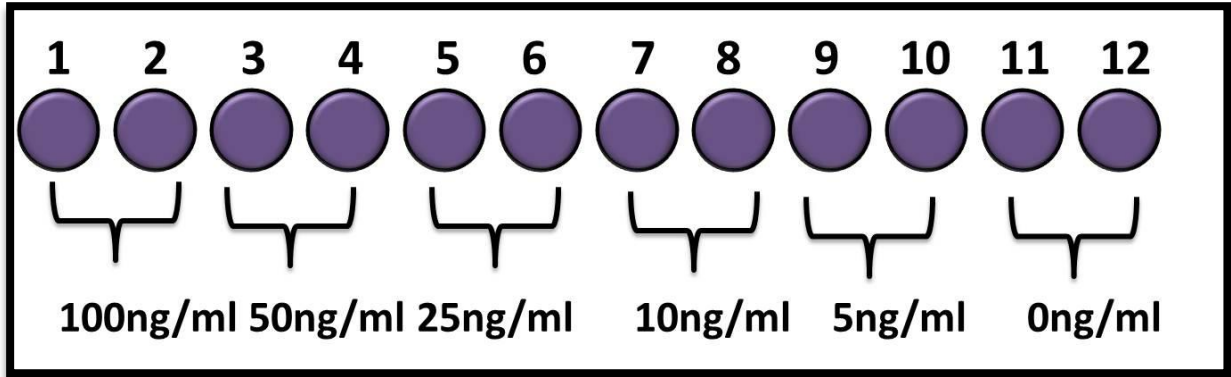


**Şekil 8:** RFLP sonrası oluşabilecek MDM2 genine ait DNA parçalarının % 3'lük agaroz jeldeki bant şeklinin şematik görüntüsü

### 3.3.1.9. SERUMDA PROLAKTİN DÜZEY TAYİN PROTOKOLÜ

Serum örneklerinde prolaktin seviyesi tayini ELISA yöntemi ile "Diametra" ticari kiti kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Çalışma öncesinde kit içerisindeki tüm solüsyonlar ve örnekler oda ısısına getirilmiştir.

1. Standartlardan 50' µl olmak üzere Şekil 9'da gösterildiği gibi kuyucuklara yüklenmiştir. Her bir standart çift çalışılmıştır.
2. Kalan diğer kuyucuklara ise 50'şer µl serum örneklerinden ve tüm kuyucuklara 100 µl antibody anti prolaktin konjugat (Horseradish (HRP) ve anti prolaktin biotin işaretli) eklenmiştir.
3. Oda ısısında 1 saat inkübe edilmiştir.
4. İnkübasyondan sonra kuyucuklar içerisindeki tüm sıvılar aspire edilerek 300'şer µl'lik yıkama solüsyonu ile 3'er defa yıkanmıştır. Yıkama öncesinde 10X konsantrasyondaki 20ml yıkama solüsyonuna 50 ml distile su eklenerek 1X konsantrasyonda 500ml yıkama solüsyonu hazırlanmıştır.
5. Yıkamanın ardından kuyucuklara 100 µl TMB substrat (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) solüsyonu eklenerek 15 dakika karanlıkta inkübe edilmiştir.
6. İnkübasyon sonrası her bir kuyucuğa 100 µl durdurma solüsyonu (sülfürik asit) eklenip, iyice karıştırılmıştır. (Kuyucukların rengi stop solüsyon eklendiğinde maviden sarıya dönmüştür.)
7. 5 dakika içerisinde 450 nm dalga boyunda ELISA okuyucusunda okuma yapılmıştır.



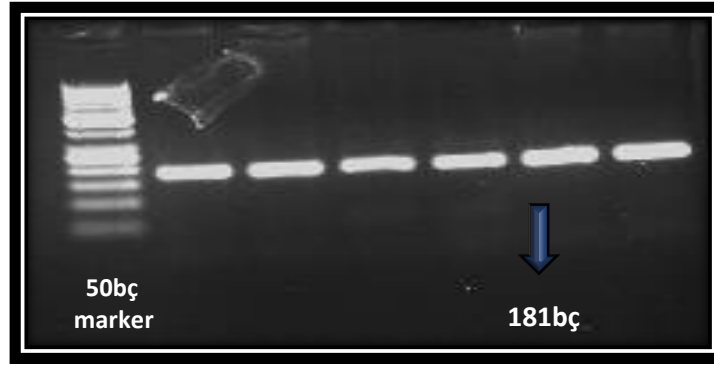
Şekil 9: Standartların kuyucuklara yüklenmesi

## 4. BULGULAR

### 4.1. PZR ÜRÜNLERİNİN KONTROLÜNE AİT BULGULAR

#### 4.1.1. p16 540C→G VE P16 580C→T POLİMORFİZMLERİ PZR ÜRÜNLERİNE AİT BULGULAR

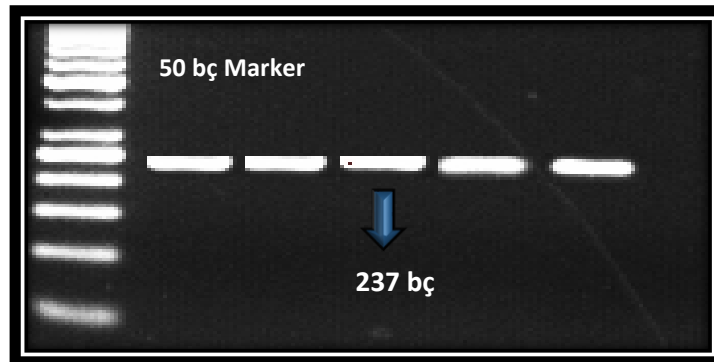
p16 gen bölgesinin polimorfizmine ait PZR ürünleri %2'lik agaroz jelde yürütülerek kontrol edildi. Agaroz jelde ilgili gen varyasyonunun tespiti için 181 bç'lik özgül PZR ürününe ait bantlar elde edildiği gözlemlendikten sonra bu PZR ürünlerinin MspI ve HaeIII enzimleri kullanılarak kesimi gerçekleştirildi (Şekil 10).



**Şekil 10:** p16 geni primerleriyle çoğaltılan 181 bç'lik PZR ürünlerinin %2'lik agaroz jeldeki görüntüsü. Marker: MBI Fermentas 50 bç DNA marker

#### 4.1.2. MDM2 SNP309T→G POLİMORFİZMİ PZR ÜRÜNLERİNE AİT BULGULAR

MDM2 gen bölgesinin polimorfizmine ait PZR ürünleri %2'lik agaroz jelde yürütülerek kontrol edildi. Agaroz jelde ilgili gen varyasyonunun tespiti için 237 bç'lik özgül PZR ürününe ait bantlar elde edildiği gözlemlendikten sonra bu PZR ürünlerinin MSPA1I enzimi kullanılarak kesim gerçekleştirildi (Şekil 11).



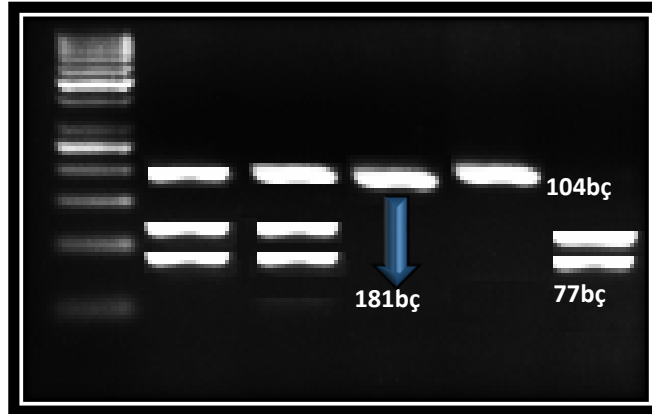
**Şekil 11:** MDM2 geni primerleriyle çoğaltılan 237 bç'lik PZR ürünlerinin %2'lik agaroz jeldeki görüntüsü. Marker: MBI Fermentas 50 bç DNA marker

## 4.2. KESİM ÜRÜNLERİNİN KONTROLÜNE AİT BULGULAR

### 4.2.1. RFLP YÖNTEMİ MSPİ ENZİM KESİMİ İLE p16 540C→G POLİMORFİZMİ KESİM ÜRÜNLERİNE AİT BULGULAR

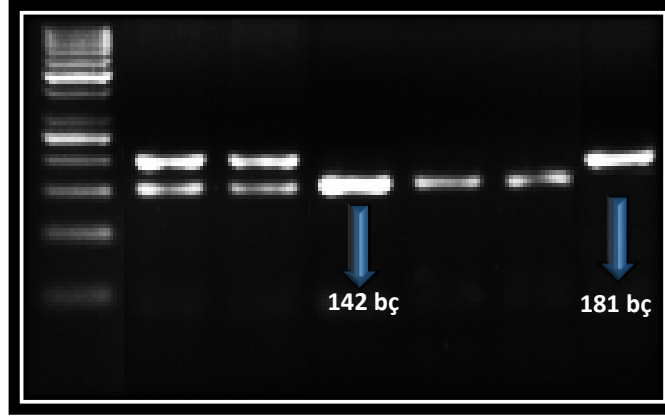
p16 genine ait PZR ürünleri %2'lik agaroz jele yüklenip kontrol edildikten sonra, p16 540C→G ürünlerinin eldesi için MspI ve p16 580C→T ürünleri için HaeIII enzim kesimleri uygulandı. Kesim sonrası elde edilen ürünler %3'lük agaroz jel elektroforez yöntemiyle yürütüldü. p16 540C→G polimorfizminde MspI enzim kesimi sonucu 181 bç'lik tek band veren örnekler homozigot mutant (GG) olarak, 104 bç ve 77 bç'lik iki band veren örneklerde homozigot doğal (wild) tip (CC) şeklinde değerlendirilirken, 181 bç, 104 bç ve 77 bç olmak üzere üç band veren örnekler ise heterozigot mutant (CG) olarak değerlendirildi. p16 580C→T polimorfizminde HaeIII enzim kesimi sonucu 181 bç'lik tek band veren örnekler homozigot mutant (TT) olarak değerlendirilirken, 142 bç ve 39 bç'lik iki band veren örneklerde homozigot doğal (wild) tip (CC); 181 bç, 142 bç ve 39 bç olmak üzere üç band veren örnekler ise heterozigot mutant (CT) olarak değerlendirildi (Şekil 13).

1. ve 2. kuyucuklar 181, 104 ve 77 bç heterozigot tip (CG); 3. ve 4. kuyu 181 bç homozigot mutant (GG); 5. kuyu 104 ve 77 bç homozigot doğal tip (CC). Marker: Fermentas 50bç marker (Şekil 12).



**Şekil 12:** MspI enzim kesimi sonucunda ürünlerin %3'lük agaroz jeldeki görüntüsü

1. ve 2. kuyucuklar 181, 142 ve 39 bç heterozigot tip (CT); 3.,4., ve 5. kuyu 142 ve 39 bç homozigot doğal tip (CC); 6. kuyu 181 bç homozigot mutant (TT). Marker: Fermentas 50bç marker (Şekil 13).

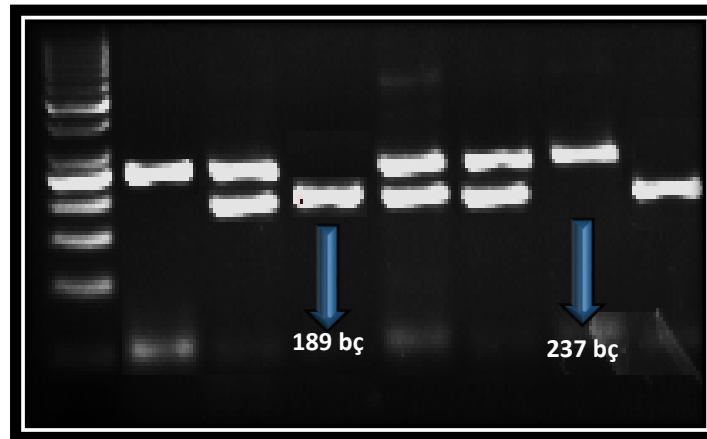


**Şekil 13:** HaeIII enzim kesimi sonucunda ürünlerin %3'lük agaroz jeldeki görüntüsü

#### **4.2.2. RFLP YÖNTEMİ MSP1I ENZİM KESİMİ İLE MDM2 SNP309T→G POLİMORFİZMİ KESİM ÜRÜNLERİNE AİT BULGULAR**

MDM2 genine ait PZR ürünleri %2'lik agaroz jele yüklenip kontrol edildikten sonra, MDM2 T309G ürünlerinin eldesi için MspAII enzim kesimi uygulandı. Kesim sonrası elde edilen ürünler %3'lük agaroz jel elektroforez yöntemiyle yürütüldü. MspAII enzim kesimi sonucu 237 bç'lik tek band veren örnekler homozigot mutant (TT) olarak, 189 bç ve 48 bç'lik iki band veren örneklerde homozigot doğal (wild) tip (GG) şeklinde değerlendirilirken, 237 bç, 189 bç ve 48 bç olmak üzere üç band veren örnekler ise heterozigot mutant (GT) olarak değerlendirildi.

2.,4. ve 5. kuyucuklar 237, 189 ve 48 bç heterozigot tip (GT); 1.ve 6. kuyucuklar 237 bç homozigot mutant (TT); 3. ve 7. kuyucuklar 189 ve 48 bç homozigot doğal tip (GG). Marker: Fermentas 50bç marker (Şekil 14)



**Şekil 14:** MspAII enzim kesimi sonucunda ürünlerin %3'lük agaroz jeldeki görüntüsü

### 4.3. İSTATİSTİKSEL ANALİZ SONRASINDA ELDE EDİLEN BULGULAR

**Tablo 7:** Araştırma Grubu Genel Özellikleri

	<b>Prolaktinoma (n= 74)</b>	<b>Kontrol (n= 100)</b>
<b>Yaş (yıl)</b>	35,4 ± 11	32,8 ± 4,1
<b>Cinsiyet (Kadın/Erkek)</b>	59/15	78/22
<b>Boy (cm)</b>	164,7 ± 9,2	162,2 ± 8,4
<b>Kilo (kg)</b>	71,8 ± 15,8	62,4 ± 16,3
<b>BMI (kg/m<sup>2</sup>)</b>	26,5 ± 5	23,1 ± 2
<b>Prolaktin (ng/ml)</b>	257,3 ± 366,2	13,6 ± 4,9

BMI: “Body Mass Index”, Vücut Kitle İndeksi

Araştırma grubunun genel özellikleri Tablo 7’de gösterilmiştir. Araştırmaya dahil edilen 74 hastanın yaş ortalaması 35,4 ± 11 yıl olup, yaş aralığı 18-68’dir. Araştırmaya dahil edilen 100 sağlıklı gönüllüden oluşan kontrol grubunun ise yaş ortalaması 32,8 ± 4,1 yıl olup yaş aralığı 27-45 yaştır. Araştırmaya katılan prolaktinomali hastalar ile kontrol grubu arasında yaş ortalaması bakımından istatistiksel fark saptanmamıştır (p>0,05).

Araştırmadaki prolaktinoma grubu 59 (%79,7) kadın, 15 (%20,3) erkek katılımcıdan oluşurken; kontrol grubu 78 (%78) kadın, 22 (%22) erkek sağlıklı gönüllüden oluşmaktadır. Araştırmaya dahil edilen prolaktinomali hastalar ve kontrol grubu arasında cinsiyet dağılımı açısından istatistiksel anlamlı fark saptanmamıştır (p>0,05).

Araştırmaya katılan hastaların boy ortalaması 164,7 ± 9,2 cm, kilo ortalaması 71,8 ± 15,8 kg olarak ölçülmüş olup vücut kitle indeksi (BMI “Body Mass Index”) ortalaması 26,5 ± 5 kg/m<sup>2</sup> olarak hesaplanmıştır. Araştırmaya katılan kontrol grubunun ise boy ortalaması 162,2 ± 8,4 cm, kilo ortalaması 62,4 ± 16,3 kg olarak ölçülmüş olup ortalama BMI 23,1 ± 2 kg/m<sup>2</sup> olarak hesaplanmıştır. Araştırmaya katılan prolaktinomali hastalarda BMI kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek saptanmıştır (p<0,0001).

Araştırmaya katılan hasta grubunda ortalama prolaktin değeri 257,3 ± 366,2 ng/ml saptanırken kontrol grubunda bu değer 13,6 ± 4,9 ng/ml olarak saptanmıştır (p<0,0001).



**Tablo 8:** Araştırma Grubu Cinsiyete Göre Prolaktin Dağılımı

		<b>Kadın</b>	<b>Erkek</b>	<b>p</b>
<b>Prolaktin (ng/ml)</b>	<b>Hasta</b>	215,8 ± 337,8	451,8 ± 462,9	0,036
	<b>Kontrol</b>	14 ± 5,2	11,8 ± 2,6	>0,05

Değerler ortalama ± Standart Sapma olarak verilmiştir.

Araştırmaya katılan hasta grubunda kadınların prolaktin ortalaması 215,8 ± 337,8 ng/ml iken erkeklerin prolaktin ortalaması 451,8 ± 462,9 ng/ml anlamlı olarak yüksek saptanmıştır (p=0,036). Kontrol grubunda ise kadınların prolaktin ortalaması 14 ± 5,2 ng/ml saptanırken erkeklerin prolaktin ortalama değeri 11,8 ± 2,6 ng/ml saptanmıştır. Kontrol grubunda kadın ve erkekler arasında prolaktin değerinde anlamlı farklılık saptanmamıştır (Tablo 8).

**Tablo 9:** Prolaktinoma Hastalarının Cinsiyete Göre zellikleri

	<b>Kadın (n= 59)</b>	<b>Erkek (n= 15)</b>
<b>Adenom Tipi (n, %)</b>		
<b>Mikroadenom</b>	41 (69,5)	5 (33,3)
<b>Makroadenom</b>	18 (30,5)	10 (66,7)
<b>Galaktore (n, %)</b>	20 (33,8)	0
<b>Görme Alanı Defekti (n, %)</b>	1 (1,7)	1 (6,7)

Araştırmaya katılan hastaların 46'sında (%62,2) mikroadenom saptanırken, 28'inde (%37,8) makroadenom tespit edilmiştir. Kadın hastaların 41'inde (%69,5) mikroadenom saptanırken 18'inde (%30,5) makroadenom saptanmıştır. Erkek hastaların ise 5'inde (%33,3) mikroadenom saptanırken, 10'unda (%66,7) makroadenom saptanmıştır. Erkek hastalarda makroadenom görülme sıklığı kadın hastalara göre yüksek olup aradaki fark istatistiksel olarak anlamlılığa ulaşmıştır (p=0,016, OR: 4.55, %95 CI: 1,36-15,25). Araştırmaya katılan prolaktinomalı kadın hastaların 20' sinde (%33,8) galaktore saptanmış olup, galaktore görülen tüm hastaları kadınlar oluşturmaktadır. Yine hasta grubunda görme alanı defekti olan 1 kadın ve 1 erkek hasta tespit edilmiştir (Tablo 9).

**Tablo 10:** Prolaktinoma Hastalarının Mikroadenom ve Makroadenom Olmasına Göre Genel Özellikleri

	Mikroadenom (n=46)	Makroadenom (n=28)	P
Yaş	34,5 ± 9,9	36,6 ± 13	>0,05
Cinsiyet (Kadın/Erkek)	41/5	18/10	0,016
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	25,9 ± 4	27,7 ± 6,3	>0,05
Prolaktin (ng/ml)			
Tedavi Öncesi	123,4 ±48,5	470,6 ± 531,3	<0,0001
Tedavi Sonrası	6,9 ± 7,3	10,5 ± 17,7	>0,05
Prolaktin Düzeyinde Azalma (%)	94 ± 5,9	96 ± 6,2	>0,05
Tümör Boyutu (mm)			
Tedavi Öncesi	5,5 ± 2,8	18,6 ± 10,9	<0,0001
Tedavi Sonrası	3,1 ± 2,6	9,2 ± 6,4	<0,0001
Tümör Boyutunda Azalma (%)	52,4 ± 33,9	51,2 ± 31,1	>0,05
Kabergolin Dozu (mg/hafta)	1 ± 0,4	1,2 ± 0,9	>0,05

Araştırmaya katılan hasta grubunda makroadenom ve mikroadenomu olanların genel özellikleri incelendiğinde yaş, BMI, tedavi sonrası prolaktin düzeyi, tedavi ile prolaktin düzeyinde görülen azalma, tümör boyutunda azalma ve kabergolin dozu açısından iki grup arasında fark saptanmamıştır (Tablo 10). Tedavi öncesi prolaktin düzeyi makroadenomu olanlarda 470,6 ± 531,3 ng/ml, mikroadenomu olanlarda ise 123,4 ±48,5 ng/ml ölçülmüş olup, makroadenomu olanlarda anlamlı olarak yüksek saptanmıştır (p<0,0001).

Tablo 11’de prolaktinomali hastalarda yaş, BMI, prolaktin düzeyi, tümör boyutu ve kabergolin dozu değerlerindeki korelasyonlar verilmiştir. Buna göre hasta grubunda bakılan BMI iyi derecede ilişkili saptanmıştır (p<0,001 r=0,515). Prolaktin düzeyinde azalma tedavi öncesi prolaktin düzeyiyle orta derecede ilişkili (p=0,019 r=0,279), tedavi sonrası prolaktin düzeyiyle ise iyi derecede negatif yönde ilişkili bulunmuştur (p<0,001 r=-0,732). Tedavi öncesi tümör boyutu tedavi öncesi prolaktin düzeyiyle iyi derecede ilişkili iken (p<0,001 r=0,719), prolaktin azalmasıyla orta derecede ilişkili olduğu gösterilmiştir (p=0,034 r=0,256). Tedavi sonrası tümör boyutu ise tedavi öncesi prolaktin düzeyi ve tedavi öncesi kitle boyutuyla iyi derecede ilişkili bulunmuştur (p<0,001 r=0,569), (p<0,001 r=0,638). Ayrıca ortalama kabergolin dozu ile tedavi sonrası prolaktin düzeyi ve tedavi öncesi tümör boyutu arasında orta derecede anlamlı ilişki saptanmıştır (p<0,001 r=0,443), (p=0,017 r=0,284).

**Tablo 11:** Prolaktinomali Hastalarda Yaş, BMI, Prolaktin Düzeyi, Tümör Boyutu ve Kabergolin Dozu Değerlerinde Korelasyonlar

			Yaş	BMI (kg/m <sup>2</sup> )	Prolaktin Düzeyi			Tümör Boyutu		
					Tedavi Öncesi	Tedavi Sonrası	Prolaktin Düzeyin de Azalma	Tedavi Öncesi	Tedavi Sonrası	Tümör Boyutu nda Azalma
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	Pearson Korelasyon	,515**								
	p değeri	,000								
Prolaktin Düzeyi	Tedavi Öncesi	Pearson Korelasyon	,016	,120						
		p değeri	,893	,317						
	Tedavi Sonrası	Pearson Korelasyon	-,010	-,083	-,054					
		p değeri	,935	,490	,653					
	Prolaktin Düzeyinde Azalma	Pearson Korelasyon	-,039	,093	,279*	-,732**				
		p değeri	,751	,442	,019	,000				
Tümör Boyutu	Tedavi Öncesi	Pearson Korelasyon	,010	,108	,719**	-,037	,256*			
		p değeri	,931	,364	,000	,763	,034			
	Tedavi Sonrası	Pearson Korelasyon	-,016	-,047	,569**	,123	,063	,638**		
		p değeri	,894	,700	,000	,309	,608	,000		
	Tümör Boyutunda Azalma	Pearson Korelasyon	,105	,231	-,030	-,193	,132	,054	-,615**	
		p değeri	,443	,087	,824	,154	,338	,693	,000	
Kabergolin Dozu	Pearson Korelasyon	-,117	,009	,208	,443**	-,172	,284*	,051	,087	
	p değeri	,332	,942	,081	,000	,155	,017	,673	,524	

p16 540C→G gen polimorfizmi sonuçları değerlendirildiğinde, genotip dağılımı açısından prolaktinomali hastalar ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır. GG genotipi hasta grubunda %5,4, kontrol grubunda ise %5 saptanarak iki grupta da en az görülen genotip olmuştur. p16 540C→G gen polimorfizmine ait allel frekansları değerlendirildiğinde prolaktinomali hasta grubu ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır (p>0,05) (Tablo 12).

**Tablo 12:** Prolaktinomalı Hasta ve Kontrol Grubunda p16 540C→G ve 580C→T Gen Polimorfizmlerine Ait Genotip ve Allel Dağılımları

Genotip ve Alleller	Prolaktinoma n (%)	Kontrol n (%)	P
p16 540C→G			>0,05
CC	49 (66,2)	57 (57)	
CG	21 (28,4)	38 (38)	
GG	4 (5,4)	5 (5)	
C Alleli	119 (80,4)	152 (76)	
G Alleli	29 (19,6)	48 (24)	
p16 580C→T			>0,05
CC	61 (82,4)	85 (85)	
CT	13 (17,6)	13 (13)	
TT	0 (0)	2 (2)	
C Alleli	135 (91,2)	183 (91,5)	
T Alleli	13 (8,8)	17 (8,5)	

p16 580C→T gen polimorfizmi sonuçları değerlendirildiğinde, genotip dağılımı açısından kontrol grubu ve prolaktinomalı hastalar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır. p16 580C→T gen polimorfizmine ait allel frekansları değerlendirildiğinde prolaktinomalı hastalarda ki allel frekansları (C allel; %91,2, T allel; %8,8) kontrol grubu ile (C allel; %91,5, T allel; %8,5) karşılaştırıldığında oldukça yakın değerlerde oldukları ve aralarında istatistiksel anlamlı bir farkın olmadığı saptanmıştır. TT genotipi prolaktinoma hastalarında görülmezken, kontrol grubunda da oldukça düşük frekansta gözlenmiştir (%2) (Tablo 12).

**Tablo 13:** Prolaktinomalı Hasta ve Kontrol Grubunda MDM2 SNP309T→G Gen Polimorfizmlerine Ait Genotip ve Allel Dağılımları

Genotip ve Alleller	Prolaktinoma n (%)	Kontrol n (%)	P
MDM2 SNP309 (T→G)			>0,05
TT	23 (31,1)	25 (25)	
TG	35 (47,3)	50 (50)	
GG	16 (21,6)	25 (25)	
T Alleli	81 (54,7)	100 (50)	
G Alleli	67 (45,3)	100 (50)	

MDM2 SNP309T→G gen polimorfizmi sonuçları değerlendirildiğinde, genotip dağılımı açısından prolaktinoma hastaları ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark

saptanmamıştır ( $p>0,05$ ). MDM2 SNP309T→G gen polimorfizmine ait allel frekansları değerlendirildiğinde, prolaktinomalı hastalarda (%54,7) T allel frekansı kontrol grubuna (%50) göre daha yüksek saptanmış, G allel frekansı da prolaktinomalı hastalarda (%45,3) kontrol grubuna (%50) göre daha düşük frekansta saptanmıştır. Ancak aradaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür ( $p>0,05$ ) (Tablo 13).

Prolaktinoma hastalarının p16 540C→G polimorfizmine göre genel özellikleri incelendiğinde cinsiyet, tedavi öncesi ve sonrası prolaktin düzeyi, 1 yıllık dopamin agonisti tedavisi sonrası prolaktin düzeyinde, tümör boyutunda azalma ve hastalara verilen ortalama haftalık kabergolin dozu parametreleri ile aralarında istatistiksel anlamlı bir farklılık bulunamamıştır ( $p>0,05$ ) (Tablo 14).

**Tablo 14:** Prolaktinoma Hastalarının p16 540C→G Polimorfizmine Göre Genel Özellikleri

	CC (n=49)	CG (n=21)	GG (n=4)
Cinsiyet n (%)			
Kadın	42 (85,7)	17 (81)	2 (50)
Erkek	7 (14,3)	4 (19)	2 (50)
Prolaktin (ng/ml)			
Tedavi Öncesi	254 ± 393,3	212,8 ± 293,2	549,6 ± 435,4
Tedavi Sonrası	9,3 ± 14,7	7,1 ± 7,5	3,7 ± 2,6
Prolaktin Düzeyinde Azalma (%)	94,5 ± 6,3	94,5 ± 5,9	98,8 ± 6,1
Tümör Boyutu (mm)			
Tedavi Öncesi	10,2 ± 9,4	9,1 ± 5,5	22,5 ± 19,6
Tedavi Sonrası	5,5 ± 5,4	5,2 ± 4,7	6,3 ± 9,5
Tümör Boyutunda Azalma (%)	51,3 ± 31,4	46 ± 33,8	82,2 ± 20,9
Tümör Boyutunda Azalma n (%)			
<50 %	13 (32,5)	9 (45)	0 (0)
≥50 %	27 (67,5)	11 (55)	4 (100)
Kabergolin Dozu (mg/hafta)	1,1 ± 0,7	1 ± 0,3	1,1 ± 0,6

**Tablo 15:** Prolaktinoma Hastalarının p16 580C→T Polimorfizmine Göre Genel Özellikleri

	CC (n=61)	CT (n=13)	TT (n=0)
Cinsiyet n (%)			
Kadın	52 (85,2)	9 (69,2)	-
Erkek	9 (14,8)	4 (30,8)	-
Prolaktin (ng/ml)			
Tedavi Öncesi	260,2 ± 379,2	248,6 ± 340,4	-
Tedavi Sonrası	8,5 ± 13,4	7,7 ± 6,2	-
Prolaktin Düzeyinde Azalma (%)	95 ± 6	93,4 ± 6,4	-
Tümör Boyutu (mm)			
Tedavi Öncesi	10,7 ± 9,8	10 ± 8,8	-
Tedavi Sonrası	5,4 ± 5,3	5,9 ± 5,9	-
Tümör Boyutunda Azalma (%)	52,4 ± 32,8	49 ± 31,6	-
Tümör Boyutunda Azalma n (%)			
<50 %	18 (34)	4 (36,4)	-
≥50 %	35 (66)	7 (63,6)	-
Kabergolin Dozu (mg/hafta)	1,1 ± 0,7	1 ± 0,3	-

p16 580C→T polimorfizmine bakıldığında prolaktinoma grubunda TT genotipi taşıyan hasta saptanmamıştır. Genotip dağılımına göre genel özellikleri incelendiğinde ise cinsiyet, tedavi öncesi ve sonrası prolaktin düzeyi, 1 yıllık dopamin agonisti tedavisi sonrası prolaktin düzeyinde, tümör boyutunda azalma ve hastalara verilen ortalama haftalık kabergolin dozu parametreleri ile aralarında istatistiksel anlamlı bir farklılık bulunamamıştır ( $p>0,05$ ) (Tablo 15).

**Tablo 16:** Prolaktinoma Hastalarının MDM2 Polimorfizmine Göre Genel Özellikleri

	TT (n=23)	TG (n=35)	GG (n=16)
Cinsiyet n (%)			
Kadın	20 (87)	28 (80)	13 (81,2)
Erkek	3 (13)	7 (20)	3 (18,8)
Prolaktin (ng/ml)			
Tedavi Öncesi	260,9 ± 336,3	296,3 ± 451,8	174,6 ± 185
Tedavi Sonrası	6,4 ± 7,1	10,4 ± 16,8	6,4 ± 5,2
Prolaktin Düzeyinde Azalma (%)	94,7 ± 6,6	94,9 ± 6,1	94,7 ± 5,7
Tümör Boyutu (mm)			
Tedavi Öncesi	10,7 ± 11,2	10,9 ± 10	9,7 ± 5,5
Tedavi Sonrası	4 ± 4,7	6,8 ± 5,7	4,6 ± 4,9
Tümör Boyutunda Azalma (%)	64,4 ± 31	41,7 ± 29	54 ± 36,1
Tümör Boyutunda Azalma n (%)			
< %50	3 (15)	16 (53,3)	3 (21,4)
≥ %50	17 (85)	14 (46,7)	11 (78,6)
Kabergolin Dozu (mg/hafta)	1 ± 0,6	1,2 ± 0,7	1 ± 0,2

Prolaktinoma hastalarının MDM2 SNP309T→G polimorfizmine göre genel özellikleri incelendiğinde anlamlı bir farklılık bulunamamıştır ( $p>0,05$ ) (Tablo 16).

**Tablo 17:** Prolaktinoma Hastalarında MDM2 Polimorfizmine Göre Tümör Boyutu

MDM2 SNP309T→G Genotipleri	Tümör Boyutunda Azalma	
	≥ %50	< %50
TG (n, %)	14 (46,7)	16 (53,3)
TT+GG (n, %)	28 (82,4)	22 (17,6)

Tablo 17’de prolaktinoma hastalarında MDM2 SNP309T→G polimorfizmine göre, tümör boyutunda azalma homozigot ve heterozigot genotip taşıyanlar gruplandırılarak incelenmiştir. Homozigot genotip (TT+GG) taşıyanlarda tümör boyutunda %50’den fazla azalma gösteren hasta sayısı heterozigot genotip taşıyanlara (TG) göre anlamlı olarak yüksek saptanmıştır ( $p=0,003$ , OR: 0,18, CI: 0,06-0,58).

**Tablo 18:** Prolaktinoma Hastalarının Mikroadenom ve Makroadenom Olmasına Göre p16 540C→G, p16 580C→T, MDM2 SNP309T→G Polimorfizmleri ve Allel Dağılımı

Genotipler	Mikroadenom (n=46) n (%)	Makroadenom (n=28) n (%)
p16 540C→G		
CC	31 (67,4)	18 (64,3)
CG	14 (30,4)	7 (25)
GG	1 (2,2)	3 (10,7)
C Alleli	76 (82,6)	43 (76,8)
G Alleli	16 (17,4)	13 (23,2)
p16 580C→T		
CC	37 (80,4)	24 (85,7)
CT	9 (19,6)	4 (14,3)
TT	0	0
C Alleli	83 (90,2)	52 (92,9)
T Alleli	9 (9,8)	4(7,1)
MDM2 SNP309T→G		
TT	16 (34,8)	7 (25)
TG	19 (41,3)	16 (57,1)
GG	11 (23,9)	5 (17,9)
T Alleli	51 (55,4)	30 (53,6)
G Alleli	41 (44,6)	26 (46,4)

Tablo 18’de prolaktinoma hastalarının mikroadenom ve makroadenom olmasına göre p16 540C→G, p16 580C→T, MDM2 T→G polimorfizmleri ve allel dağılımı incelendiğinde iki grupta istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır ( $p>0,05$ ).

## 5. TARTIŞMA

Prolaktinomalar, hipofiz adenomlarının yaklaşık %40'ını oluşturan laktotrop hücre kaynaklı fonksiyonel tümörlerdir. Prolaktinomaların patogenezi hala tartışmalı olmakla birlikte hipofizer adenomlarının monoklonal kökenli olduğunun gösterilmesiyle, tümör oluşumunda daha çok onkogenlerin aktivasyonu, progresyonunda ise ilave genetik mutasyonlar, özellikle tümör supresör genlerin inaktivasyonu sorumlu tutulmuştur (91). Prolaktinoma en sık hipofizer tümör olmasına rağmen çok nadir cerrahi olarak çıkarıldığından laktotrop hücre proliferasyonundaki moleküler olaylarla ilgili bilgiler diğer hipofizer tümör tiplerine göre daha sınırlıdır ve yapılan moleküler biyolojik çalışmalar daha çok atipik prolaktinomalar üzerinde olmuştur (6). Bunun bir sonucu olarak şimdiye kadar yapılmış çalışmalarla tümör patogenezinde yer alan hücrel mekanizmalar incelenmiş olsa da tümör oluşumu ve klinik parametrelerle ilişkili faktörler tam olarak aydınlatılamamıştır. Çalışmamızda bu hücrel mekanizmalar içinde önemli bir yeri olan CDK'ların düzenlenmesinde etkili p16 geni ve apoptoz regülasyonunda rol alan MDM2 geni polimorfizmlerinin, prolaktinoma gelişimindeki rolü ve klinik parametrelerle ilişkisi değerlendirilmiştir.

p16 geni hücre döngüsünde G1/S geçişinin negatif regülasyonunda rol alan önemli bir tümör supresör gendir (92). p16INK4A/p14ARF/p15 tümör supresör lokuslarını kodlayan 9p21 kromozom bölgesi delesyonunun da çeşitli insan dokularında tümöral oluşuma neden olduğu gösterilmiştir (93, 94). Ayrıca, 9p21 bölgesinde promotör hipermetilasyonunun, heterozigotluk ve homozigotluk kaybının p16 ekspresyon eksikliğine neden olduğu ve p16 ilişkili neoplazilere yol açan önemli mekanizmalar arasında yer aldığı çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (95, 96). p16 promotör bölgesindeki CpG adalarının hipermetilasyonunun insan kolorektal kanserlerinde hücre çoğalmasını hızlandırdığı ve tümör invazyonunu artırdığı gösterilirken (97), diğer bir çalışmada sistozomal mesane kanserleri ve skuamöz hücreli karsinomlarda p16 ve p15 ekspresyonunda değişiklikler ve TGF alfa aşırı ekspresyonu varlığı gösterilmiştir (98). Yang ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada azalmış p16 ekspresyonunun ürotelyal karsinomların invazyon ve evresiyle ilişkili olduğu saptanmıştır (99). p16 ekspresyonunda artışın diferansiye olmuş yetişkin insan beyin dokusunda gösterilmesi, p16'nın insan beyninin gelişiminde ve olası tümör patogenezinde rolü olabileceğini düşündürmüştür (100). Daha sonra yapılan çalışmalarda p16 geninde mutasyonel değişiklikler anaplastik astrositom, glioblastom, hemanjiyoperistom ve pituiter adenomlar gibi



intrakranyal tümörlerde gösterilmiştir (34, 51, 101, 102). Seamann ve ark. yaptığı bir çalışmada hipofizer adenomlarda p16INK4a gen değişiklikleri saptanmış olup somatotrop ve kortikotrop adenomlarda en önemli mekanizmanın p16 down-regülasyonu olduğunu bildirmiştir. Aynı çalışmada CDKN2A/p16 inaktivasyonunun tümör tipi ve boyutu ile ilişkili olduğu ve p16 down-regülasyonunun tümör başlangıcından çok adenom progresyonu takibinde gözlemlendiği rapor edilmiştir (103). Benzer bir diğer çalışmada p16INK4a metilasyonunun tümör boyutu büyüklüğü ile anlamlı ilişkili olduğu saptanmış ve p16 inaktivasyonunun hipofizer tümör oluşumu, gelişimi ve davranışında önemli rol oynayabileceği öne sürülmüştür (104). Tümörlerde ve premalign lezyonlarda uzamış yaşam döngüsü ile ilişkili olduğu bilinen p16 kaybının sık bulunması, bu durumun tümör oluşumu ve rekürrensini gösterilmesinde erken prognostik bir belirteç olarak değerlendirilebileceğini desteklemektedir (38, 105).

Tek nükleotid polimorfizmi belirli bir baz pozisyonunda meydana gelen tek nükleotid değişikliğidir ve spesifik allel varyantları ile kanser gelişimi ilişkisi bir çok SNP çalışmasında bildirilmiştir. p16 geninin 3'UTR bölgesinde bulunan 540C→G (rs=11515) ve 580C→T (rs=3088440) polimorfizmleri birçok hücre yolakları etkileyerek tümör gelişiminde rol oynayabilmektedir. Ülkemizde yapılan bir çalışmada p16 540C→G polimorfizminde C allel sıklığı %77,4 iken G allel sıklığı %22,6 saptanmıştır (106). Bu çalışmaya ve Avrupa popülasyonunda gösterilmiş p16 540C→G polimorfizmine ait allel sıklığına benzer şekilde ([http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Variation/Population?db=core;r=9:21967700-21968700;v=rs11515;vdb=variation;vf=22717](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population?db=core;r=9:21967700-21968700;v=rs11515;vdb=variation;vf=22717)) bizim çalışmamızda da C allel sıklığı %76, G allel sıklığı ise %24 bulunmuştur. Çalışmamızda p16 580C→T polimorfizmine ait C allel sıklığı %91,5, T allel sıklığı %8,5 saptanmış olup bu sonuçlar da Avrupa popülasyonunda gösterilen allel sıklığı ([http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Variation/Population?db=core;r=9:21967660-21968660;v=rs3088440;vdb=variation;vf=2689541](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population?db=core;r=9:21967660-21968660;v=rs3088440;vdb=variation;vf=2689541)) ile uyumludur.

Daha önce yapılan bir çalışmada, p16 540C→G genotipi ile üst gastrointestinal ve özefageal adenokarsinomları arasında herhangi bir ilişki gösterilemezken (107), Sauroja ve ark.'ın yaptığı çalışmada p16 540C→G ve p16 580C→T polimorfizmlerinin hastalık progresyonu ve ailesel melanom riski ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (108). Chen ve ark. her iki genotipin de pankreas kanseri gelişimi riski açısından anlamlı olmadığını saptamışlardır (109). Başka bir çalışmada ise p16 540C→G polimorfizmi ile ovaryan kanser gelişimi ve progresyon riski arasında ilişki bulunamamıştır. Buna ek olarak, iki polimorfizmin haplotipleri ve tümör progresyonu

arasında da herhangi bir ilişki bulunmamıştır (110). Tuna ve ark. tarafından Türkiye’de yapılmış bir çalışmada p16 (540C→G ve p16 580C→T) ve MDM2 polimorfizmlerinin kolorektal kanser oluşumu ve progresyonundaki rolü incelenmiştir (111). Çalışmada hasta ve kontrol grubu arasında p16 540C→G polimorfizmi dağılımında anlamlı fark saptanırken kombine genotip analizlerinde bazı klinik parametrelerle anlamlı ilişkiler saptanmıştır. Cander ve ark. ülkemizde yapılan bir çalışmada ilk kez prolaktinomali hastalarda p16 540C→G polimorfizmi ve tümör davranışı ilişkisini incelemiştir. Bahsi geçen çalışmada p16 540C→G polimorfizmi ile tümör davranışı arasında bir ilişki saptanmazken yüksek proliferatif kapasitenin bir göstergesi olan Ki67 indeksi artmış olan hastalarda ve dev prolaktinomalarda CG genotipi sıklığında istatistiksel anlamlılığa ulaşmayan bir artış saptanmıştır (106). Çalışmamız güncel literatür verilerine göre prolaktinomali hastalarda p16 (540C→G, p16 580C→T) ve MDM2 (SNP309 T→G) polimorfizmleri ile tümör gelişimi ve klinik parametreler arasında ilişkiyi değerlendiren ilk çalışmadır. Bir önceki çalışmayla uyumlu olarak prolaktinoma hastalarında p16 540C→G polimorfizmi dağılımında anlamlı bir farklılık saptanmamış, kontrol grubu ile hasta grubunda da benzer bir dağılım görülmüştür. Literatürde yapılmış çalışmaların çoğuna benzer şekilde klinik parametreler ve tedavi cevabı ile polimorfizmler arasında anlamlı bir ilişki gösterilememiştir. Çalışmada makroadenomu olan hasta grubunda p 16 540C→G ve p16 580C→T polimorfizmlerinin her ikisinde de homozigot doğal tip olan CC genotipi daha sık görülmekle birlikte muhtemel örneklem sayısı yetersizliğinden bu fark istatistiksel anlamlılığa ulaşmamıştır. Daha fazla örneklem sayısı ile yapılacak ileri çalışmalar bu farkın anlamlılığı açısından yön verici olacaktır.

G1 fazı boyunca, hücre siklusu aktivatörlerinden olan CDK4 ve CDK6 Rb tümör baskılayıcı genini inaktive eder, CDKN2A’nın kodladığı transkriptlerden biri olan p16 bu aktivatörlerin inhibisyonunda rol alır. Bir diğer transkript olan p14 ise p53’ün degradasyonundan sorumlu olan MDM2’yi inaktive etmektedir (112). MDM2 geni 12. kromozomun uzun kolunda tanımlanmış ve insan sarkomlarının üçte birinde gösterilmiştir. MDM2 proteini, G1/S geçişinde siklusu durdurarak p53’ün apoptoz etkisini engeller (39). MDM2, p53’ün fonksiyonlarını durduran bir protein olmasının yanı sıra p53’ten bağımsız olarak da etkinlik gösterdiği bildirilmiştir (113). MDM2’nin tümör oluşturma potansiyeli, insan tümörlerinde gen amplifikasyonu, transkripsiyon ya da translasyon artışı gibi aşırı ekspresyon sebeplerinin gösterilmesiyle belirlenmiştir (46). Okamoto ve ark. yaptığı bir çalışmada MDM2 ve p16’nın ileri evre özefageal skuamöz hücreli karsinomlarda kemoradyorezistans açısından prediktif belirteçler olabileceğini göstermiştir (114).

Yapılan başka bir çalışmada, küçük hücreli dışı akciğer kanseri hastalarında MDM2'nin kontrol hastalarına göre 6 kat daha fazla eksprese olduğu, p53'ün ekspresyonunda ise 7 kat düşüş olduğu gösterilmiştir. Ayrıca bu sonuç hastaların klinik parametreleriyle de ilişkili bulunmuştur (115).

Hipofizer tümörlerin patogenezinde rolü olduğu bilinen sitokinler ve büyüme faktörleri gibi hücrel stres oluşturabilecek etkenlerin p53 ve MDM2 yolağı üzerinden tümör gelişimine katkıda bulunabileceği düşünülmüştür. Bu hipoteze dayanarak, hipofizer tümörlerde MDM2 proteini ekspresyonu ilk kez Suliman ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada gösterilmiştir (116). p53 insan kanserlerinde en çok inaktive olan genlerden biri iken, hipofiz adenomlarında p53 mutasyonu çok nadir gösterilmiştir (117, 118). Bunun bir nedeni olarak; hipofiz tümörleri patogenezinde tümörün maruz kaldığı hücrel stresin p53 yolağına etkisinin, p53 mutasyonlarından daha önemli olabileceği ve p53'ün tümör gelişimini başlatmayıp prognozda rol alabileceği tartışılmıştır (119).

MDM2 geninin birinci intronunun 309.nükleotidinde meydana gelen T→G baz değişimi MDM2 SNP309T→G (rs= rs2279744) olarak ifade edilir ve MDM2 protein düzeylerinin artışına sebep olarak p53 apoptoz yolağının baskılanmasına neden olduğu bildirilmiştir (44). Ülkemizde yapılan bir çalışmada MDM2 polimorfizminde T allel sıklığı %44,7 iken G allel sıklığı %55,3 olarak saptanmıştır (111). Bununla uyumlu olarak çalışmamızda T allel sıklığı %50 ve G allel sıklığı %50 olarak bulunmuştur. Avrupa popülasyonunda T allel sıklığı %64, G allel sıklığı %36, Asya popülasyonunda ise T allel sıklığı %43, G allel sıklığı %57 olarak gösterilmiştir ([http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Variation/Population?r=12:68808300-68809300;v=rs2279744;vdb=variation;vf=1937624](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population?r=12:68808300-68809300;v=rs2279744;vdb=variation;vf=1937624)). Çalışma sonucumuz Asya popülasyonu ile daha çok uyum göstermektedir.

Literatürde MDM2 polimorfizminin kanser gelişme riski ve prognoz üzerindeki etkisini inceleyen birçok çalışma bulunmaktadır. Schmidt ve ark.'nın yaptığı geniş ölçekli bir çalışmada MDM2 SNP309T→G ve p53 polimorfizmleri ile meme kanserli hastalar arasında herhangi bir ilişki saptanmazken (120), Boersma ve ark. tarafından 2006 yılında yapılan bir çalışmada MDM2 SNP309T→G polimorfizmi ile meme kanserli hastaların hayatta kalımları arasında güçlü bir ilişki olduğu gösterilmiştir (121). Hirata ve ark. tarafından 2007 yılında renal hücreli karsinomlu hastalarda yapılan çalışmada MDM2 polimorfizminin artmış renal kanser riski ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Aynı çalışmada MDM2 GG genotipinin TT veya TG genotiplerine göre renal kanser dokularında anlamlı olarak daha sık görüldüğü rapor edilmiştir. Ayrıca MDM2 polimorfizmi kötü

prognozla anlamlı olarak ilişkili bulunmuştur (122). Hori ve ark. 2015 yılında yapmış oldukları çalışmada, pankreatik duktal adenokarsinomlu ve kronik pankreatitli hasta grubu ile sağlıklı gönüllüler arasında MDM2 polimorfizmi açısından anlamlı bir farklılık gösterememişlerdir. Ancak yapılan Kaplan-Meier analizinde MDM2 GG genotipinde diğer genotiplere (TG, TT) kıyasla total yaşam beklentisinin daha kısa olduğu saptanmıştır (123). Prostat kanserli hastalarda yapılan iki çalışmada ise MDM2 SNP309T→G polimorfizmi genotipleri arasında her hangi bir fark saptanmamıştır (124, 125). Meme, kolorektal ve akciğer kanserleri ile yapılan çalışmaların değerlendirildiği bir meta analizinde, MDM2 SNP309T→G polimorfizminin meme ve kolorektal kanser gelişim riskinde etkili olmadığı, ancak akciğer kanserinde GG genotipinin TT genotipine göre risk artışına neden olduğu rapor edilmiştir (126). MDM2 polimorfizmi GG genotipinin MDM2 RNA ve protein seviyelerini artırarak p53 inhibisyonu üzerinde etkili olduğu önceki çalışmalarda gösterilmiş ve birçok kanser tipinde GG genotipinde risk artışı saptanmış olmasına karşın diğer genotiplerde de risk artışı nispeten daha az sayıdaki çalışmalarda gösterilmiştir. Phang ve ark. tarafından 2008 yılında yapılan bir çalışmada G allelinin lösemi hastalığının başlangıcı ve ilerlemesi üzerine predispozan bir etkisi olmadığı gibi cinsiyetten bağımsız olarak hastalık riskini azalttığı tespit edilmiştir. Chua ve ark.'nın Çin popülasyonunda yaptığı bir diğer çalışmada ise MDM2 TT genotipinin sigara içmeyen kadınlardaki akciğer kanseri riski ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (127). Yine aynı popülasyonda meme kanserli hastalarda yapılan bir çalışmada G allelinin kanser riskini artırdığı gösterilse de erken başlangıç yaşıyla TT genotipinin ilişkili olduğu bulunmuştur (128). Genotip dağılımlarının hastalık oluşma riski ve prognoz açısından gösterdiği bu farklılıkların nedeni olarak birkaç nokta dikkati çekmektedir. MDM2 polimorfizminde Asya popülasyonunda bazal G allel frekansı yüksek iken, Avrupa popülasyonunda bazal T allel frekansı daha yüksek saptanmıştır. Buna bağlı olarak Çin popülasyonunda yapılan çalışmalar, MDM2 gen fonksiyonları ve G allelinin neden olduğu kanser riski üzerinde etnik farklılıkların etkili olabileceğini düşündürmektedir. Bu etnik farklılıklar, p53 yolağındaki genlerin bireysel polimorfik varyantlarının etkinliğindeki değişikliklerin olası nedenleri arasındadır.

Çalışmamız prolaktinomali hastalarda MDM2 SNP309T→G polimorfizmini inceleyen ilk çalışmadır. Çalışmamızda MDM2 polimorfizm genotipleri ve allel dağılımında prolaktinoma ve kontrol grubu arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. Genotiplerin klinik parametrelerle ilişkisi incelendiğinde ise homozigot genotip (TT+GG) taşıyanlarda tümör boyutunda %50'den fazla azalma gösteren hasta sayısı heterozigot genotip (TG) taşıyanlara göre anlamlı olarak yüksek

saptanmıştır (p=0,003, OR: 0,18, CI: 0,06-0,58). Bu bulgu G allelinin daha önce gösterilmiş olumsuz etkilerinin dışında, homozigot genotipteki hastalarda heterozigot genotip taşıyanlara göre tedaviye tümöral yanıtın daha iyi olduğuna işaret etmektedir. Çalışmamızda MDM2 SNP309T→G polimorfizmi için bazal allel frekansı dağılımı Asya popülasyonu ile daha uyumlu olduğundan, daha önce bahsedilen popülasyon çalışmalarındakine benzer şekilde etnik köken farklılığı bu sonucun nedenleri arasında gösterilebilir. Bu konuda dikkati çeken noktalardan bir diğeri ise p53'ün hücre proliferasyonu kontrolünün çevresel etkenlere olan duyarlılığının polimorfizm çalışmalarındaki olası karıştırıcı etkisidir. Hücrede DNA hasarı olduğunda, p53 tamir mekanizmalarının devreye girmesi için replikasyonu durdurur. Eğer hasar tamir edilemezse, p53 apoptozu tetikleyerek hücre ölümüne neden olabilir. Güncel kanıtlar genotoksik hasara yol açabilecek sitokinler, büyüme faktörleri, hipoksi ve metabolik değişiklikler gibi hücrel stres faktörlerinin p53 cevabı başlangıcında etkili olabileceklerini ve polimorfizm fonksiyonelliğinde farklılıklar görülmesine neden olabileceklerini göstermektedir (41). Daha geniş prolaktinoma hasta gruplarında yapılacak polimorfizm çalışmaları genotiplerin tedavi cevabındaki yerinin anlaşılmasına katkıda bulunacaktır.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada p16 (540C→G ve 580C→T) ve MDM2 (SNP309T→G) gen polimorfizmlerinin tümör patogenezindeki rolü ve hastalığın klinik parametreleri ile ilişkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmada, tedavi öncesi tümör boyutu, tedavi öncesi prolaktin düzeyi ve prolaktin azalmasıyla ilişkili bulunmuştur ( $p<0,001$   $r=0,719$ ), ( $p=0,034$   $r=0,256$ ). Tedavi sonrası tümör boyutunun ise tedavi öncesi prolaktin düzeyi ile iyi derecede ilişkili olduğu gösterilmiştir ( $p<0,001$   $r=0,569$ ). Makroadenomlu hasta grubunda p16 polimorfizmlerinin her ikisinde de homozigot doğal tip olan CC genotipi daha sık görülmekle birlikte bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. MDM2 polimorfizmi homozigot (TT+GG) genotipi taşıyanlarda tümör boyutu %50'den fazla azalma gösteren hasta sayısı, heterozigot (TG) genotipi taşıyanlara göre anlamlı olarak yüksek saptanmıştır ( $p=0,003$ , OR: 0,18, CI: 0,06-0,58). Bunun dışında p16 ve MDM2 gen polimorfizmleri ile prolaktinomanın klinik parametreleri arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır.

Araştırma sonuçları değerlendirildiğinde p16 ve MDM2 gen polimorfizmleri ile prolaktinoma oluşumu ilişkili bulunmazken, bazı genotiplerin klinik parametrelerle ilişkili olabileceği gösterilmiştir. Günümüzde yapılan tek nükleotid polimorfizm çalışmaları popülasyondaki tümör sıklığının, tümör görülme yaşının ve bu tümörlerin tedaviye verdiği yanıtın belirlenmesinde öncü olabilecek aydınlatıcı bilgiler ortaya koymaktadır. En sık görülen hipofizer tümör olan prolaktinomada da prognostik belirteçler tanımlayabilmek ve yeni tedavi seçenekleri geliştirebilmek için tümör oluşumunda ve izleminde rolü olan moleküler mekanizmaların aydınlatılması gerekmektedir. Çalışmamız bu kapsamda yapılacak geniş çaplı ileri araştırmalara ışık tutacaktır.

## KAYNAKLAR

1. Aflorei ED, Korbonits M. Epidemiology and etiopathogenesis of pituitary adenomas. *Journal of neuro-oncology*. 2014;117(3):379-94.
2. Hong JW, Lee MK, Kim SH, Lee EJ. Discrimination of prolactinoma from hyperprolactinemic non-functioning adenoma. *Endocrine*. 2010;37(1):140-7.
3. Gillam MP, Molitch ME, Lombardi G, Colao A. Advances in the treatment of prolactinomas. *Endocrine reviews*. 2006;27(5):485-534.
4. Colao A. Pituitary tumours: the prolactinoma. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2009;23(5):575-96.
5. Colao A, Lombardi G. Growth-hormone and prolactin excess. *Lancet*. 1998;352(9138):1455-61.
6. Casanueva FF, Molitch ME, Schlechte JA, Abs R, Bonert V, Bronstein MD, et al. Guidelines of the Pituitary Society for the diagnosis and management of prolactinomas. *Clinical endocrinology*. 2006;65(2):265-73.
7. Daly AF, Rixhon M, Adam C, Dempegioti A, Tichomirowa MA, Beckers A. High prevalence of pituitary adenomas: a cross-sectional study in the province of Liege, Belgium. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2006;91(12):4769-75.
8. Mindermann T, Wilson CB. Age-related and gender-related occurrence of pituitary adenomas. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1994;41(3):359-64.
9. Harrington MH, Casella SJ. Pituitary tumors in childhood. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 2012;19(1):63-7.
10. Corsello SM, Ubertini G, Altomare M, Lovicu RM, Migneco MG, Rota CA, et al. Giant prolactinomas in men: efficacy of cabergoline treatment. *Clinical endocrinology*. 2003;58(5):662-70.
11. Verges B, Boureille F, Goudet P, Murat A, Beckers A, Sassolas G, et al. Pituitary disease in MEN type 1 (MEN1): data from the France-Belgium MEN1 multicenter study. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2002;87(2):457-65.
12. Bronstein MD, Salgado LR, de Castro Musolino NR. Medical management of pituitary adenomas: the special case of management of the pregnant woman. *Pituitary*. 2002;5(2):99-107.
13. Gibney J, Smith TP, McKenna TJ. The impact on clinical practice of routine screening for macroprolactin. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2005;90(7):3927-32.

14. Petakov MS, Damjanovic SS, Nikolic-Durovic MM, Dragojlovic ZL, Obradovic S, Gligorovic MS, et al. Pituitary adenomas secreting large amounts of prolactin may give false low values in immunoradiometric assays. The hook effect. *J Endocrinol Invest*. 1998;21(3):184-8.
15. Melmed S, Casanueva FF, Hoffman AR, Kleinberg DL, Montori VM, Schlechte JA, et al. Diagnosis and treatment of hyperprolactinemia: an Endocrine Society clinical practice guideline. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2011;96(2):273-88.
16. Naidich MJ, Russell EJ. Current approaches to imaging of the sellar region and pituitary. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 1999;28(1):45-79, vi.
17. Colao A, Di Sarno A, Landi ML, Scavuzzo F, Cappabianca P, Pivonello R, et al. Macroprolactinoma shrinkage during cabergoline treatment is greater in naive patients than in patients pretreated with other dopamine agonists: a prospective study in 110 patients. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2000;85(6):2247-52.
18. Losa M, Mortini P, Barzaghi R, Gioia L, Giovanelli M. Surgical treatment of prolactin-secreting pituitary adenomas: early results and long-term outcome. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2002;87(7):3180-6.
19. Hartwell L, Weinert T, Kadyk L, Garvik B. Cell cycle checkpoints, genomic integrity, and cancer. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*. 1994;59:259-63.
20. Pietenpol JA, Stewart ZA. Cell cycle checkpoint signaling: cell cycle arrest versus apoptosis. *Toxicology*. 2002;181-182:475-81.
21. Guryev V, Berezikov E, Malik R, Plasterk RH, Cuppen E. Single nucleotide polymorphisms associated with rat expressed sequences. *Genome research*. 2004;14(7):1438-43.
22. Hartwell LH, Kastan MB. Cell cycle control and cancer. *Science*. 1994;266(5192):1821-8.
23. Chin CF, Yeong FM. Safeguarding entry into mitosis: the antephase checkpoint. *Molecular and cellular biology*. 2010;30(1):22-32.
24. Chan HM, Shikama N, La Thangue NB. Control of gene expression and the cell cycle. *Essays in biochemistry*. 2001;37:87-96.
25. Kumar V CR, Robbins SL. Neoplasia. *Basic Pathology*. 7th ed 2003. p. 182.
26. Harbour JW, Dean DC. The Rb/E2F pathway: expanding roles and emerging paradigms. *Genes & development*. 2000;14(19):2393-409.
27. Bertram JS. The molecular biology of cancer. *Molecular aspects of medicine*. 2000;21(6):167-223.



28. Kim JK, Diehl JA. Nuclear cyclin D1: an oncogenic driver in human cancer. *Journal of cellular physiology*. 2009;220(2):292-6.
29. Serrano M, Hannon GJ, Beach D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature*. 1993;366(6456):704-7.
30. Besson A, Yong VW. Mitogenic signaling and the relationship to cell cycle regulation in astrocytomas. *Journal of neuro-oncology*. 2001;51(3):245-64.
31. Koh J, Enders GH, Dynlacht BD, Harlow E. Tumour-derived p16 alleles encoding proteins defective in cell-cycle inhibition. *Nature*. 1995;375(6531):506-10.
32. Costello JF, Berger MS, Huang HS, Cavenee WK. Silencing of p16/CDKN2 expression in human gliomas by methylation and chromatin condensation. *Cancer research*. 1996;56(10):2405-10.
33. Herman JG, Merlo A, Mao L, Lapidus RG, Issa JP, Davidson NE, et al. Inactivation of the CDKN2/p16/MTS1 gene is frequently associated with aberrant DNA methylation in all common human cancers. *Cancer research*. 1995;55(20):4525-30.
34. Ono Y, Tamiya T, Ichikawa T, Kunishio K, Matsumoto K, Furuta T, et al. Malignant astrocytomas with homozygous CDKN2/p16 gene deletions have higher Ki-67 proliferation indices. *Journal of neuropathology and experimental neurology*. 1996;55(10):1026-31.
35. Abbaszadegan MR, Raziee HR, Ghafarzadegan K, Shakeri MT, Afsharnezhad S, Ghavamnasiry MR. Aberrant p16 methylation, a possible epigenetic risk factor in familial esophageal squamous cell carcinoma. *International journal of gastrointestinal cancer*. 2005;36(1):47-54.
36. Stevaux O, Dyson NJ. A revised picture of the E2F transcriptional network and RB function. *Current opinion in cell biology*. 2002;14(6):684-91.
37. Loughran O, Malliri A, Owens D, Gallimore PH, Stanley MA, Ozanne B, et al. Association of CDKN2A/p16INK4A with human head and neck keratinocyte replicative senescence: relationship of dysfunction to immortality and neoplasia. *Oncogene*. 1996;13(3):561-8.
38. Liggett WH, Jr., Sidransky D. Role of the p16 tumor suppressor gene in cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 1998;16(3):1197-206.
39. Oliner JD, Kinzler KW, Meltzer PS, George DL, Vogelstein B. Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas. *Nature*. 1992;358(6381):80-3.

40. Uhrinova S, Uhrin D, Powers H, Watt K, Zheleva D, Fischer P, et al. Structure of free MDM2 N-terminal domain reveals conformational adjustments that accompany p53-binding. *Journal of molecular biology*. 2005;350(3):587-98.
41. Prives C, Hall PA. The p53 pathway. *The Journal of pathology*. 1999;187(1):112-26.
42. Piette J, Neel H, Marechal V. Mdm2: keeping p53 under control. *Oncogene*. 1997;15(9):1001-10.
43. Daujat S, Neel H, Piette J. MDM2: life without p53. *Trends in genetics : TIG*. 2001;17(8):459-64.
44. Bond GL, Hu W, Bond EE, Robins H, Lutzker SG, Arva NC, et al. A single nucleotide polymorphism in the MDM2 promoter attenuates the p53 tumor suppressor pathway and accelerates tumor formation in humans. *Cell*. 2004;119(5):591-602.
45. Faur N, Araud L, Laroche-Clary A, Kanno J, Toutain J, Yamori T, et al. The association between the T309G polymorphism of the MDM2 gene and sensitivity to anticancer drug is dependent on the p53 mutational status in cellular models. *British journal of cancer*. 2009;101(2):350-6.
46. Landers JE, Haines DS, Strauss JF, 3rd, George DL. Enhanced translation: a novel mechanism of mdm2 oncogene overexpression identified in human tumor cells. *Oncogene*. 1994;9(9):2745-50.
47. Bond GL, Hu W, Levine A. A single nucleotide polymorphism in the MDM2 gene: from a molecular and cellular explanation to clinical effect. *Cancer research*. 2005;65(13):5481-4.
48. Piotrowski P, Lianeri M, Rubis B, Knula H, Rybczynska M, Grodecka-Gazdecka S, et al. Murine double minute clone 2,309T/G and 285G/C promoter single nucleotide polymorphism as a risk factor for breast cancer: a Polish experience. *The International journal of biological markers*. 2012;27(2):e105-10.
49. Thanopoulou E, Kotzamanis G, Pateras IS, Ziras N, Papalambros A, Mariolis-Sapsakos T, et al. The single nucleotide polymorphism g.1548A >G (K469E) of the ICAM-1 gene is associated with worse prognosis in non-small cell lung cancer. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. 2012;33(5):1429-36.
50. Kuraoka K, Oue N, Yokozaki H, Kitadai Y, Ito R, Nakayama H, et al. Correlation of a single nucleotide polymorphism in the E-cadherin gene promoter with tumorigenesis and progression of gastric carcinoma in Japan. *International journal of oncology*. 2003;23(2):421-7.

51. Heaney AP, Melmed S. New pituitary oncogenes. *Endocrine-related cancer*. 2000;7(1):3-15.
52. Levy A, Lightman S. Molecular defects in the pathogenesis of pituitary tumours. *Frontiers in neuroendocrinology*. 2003;24(2):94-127.
53. Tada M, Kobayashi H, Moriuchi T. Molecular basis of pituitary oncogenesis. *Journal of neuro-oncology*. 1999;45(1):83-96.
54. Cai WY, Alexander JM, Hedley-Whyte ET, Scheithauer BW, Jameson JL, Zervas NT, et al. ras mutations in human prolactinomas and pituitary carcinomas. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1994;78(1):89-93.
55. Knudson AG, Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1971;68(4):820-3.
56. Asa SL, Ezzat S. The pathogenesis of pituitary tumors. *Annual review of pathology*. 2009;4:97-126.
57. Woloschak M, Yu A, Xiao J, Post KD. Abundance and state of phosphorylation of the retinoblastoma gene product in human pituitary tumors. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 1996;67(1):16-9.
58. Wierinckx A, Roche M, Raverot G, Legras-Lachuer C, Croze S, Nazaret N, et al. Integrated genomic profiling identifies loss of chromosome 11p impacting transcriptomic activity in aggressive pituitary PRL tumors. *Brain pathology*. 2011;21(5):533-43.
59. Moreno CS, Evans CO, Zhan X, Okor M, Desiderio DM, Oyesiku NM. Novel molecular signaling and classification of human clinically nonfunctional pituitary adenomas identified by gene expression profiling and proteomic analyses. *Cancer research*. 2005;65(22):10214-22.
60. Kirsch M, Morz M, Pinzer T, Schackert HK, Schackert G. Frequent loss of the CDKN2C (p18INK4c) gene product in pituitary adenomas. *Genes, chromosomes & cancer*. 2009;48(2):143-54.
61. Franklin DS, Godfrey VL, Lee H, Kovalev GI, Schoonhoven R, Chen-Kiang S, et al. CDK inhibitors p18(INK4c) and p27(Kip1) mediate two separate pathways to collaboratively suppress pituitary tumorigenesis. *Genes & development*. 1998;12(18):2899-911.
62. Vlotides G, Eigler T, Melmed S. Pituitary tumor-transforming gene: physiology and implications for tumorigenesis. *Endocrine reviews*. 2007;28(2):165-86.

63. McAndrew J, Paterson AJ, Asa SL, McCarthy KJ, Kudlow JE. Targeting of transforming growth factor- $\alpha$  expression to pituitary lactotrophs in transgenic mice results in selective lactotroph proliferation and adenomas. *Endocrinology*. 1995;136(10):4479-88.
64. Theodoropoulou M, Arzberger T, Gruebler Y, Jaffrain-Rea ML, Schlegel J, Schaaf L, et al. Expression of epidermal growth factor receptor in neoplastic pituitary cells: evidence for a role in corticotropinoma cells. *The Journal of endocrinology*. 2004;183(2):385-94.
65. Missale C, Boroni F, Losa M, Giovanelli M, Zanellato A, Dal Toso R, et al. Nerve growth factor suppresses the transforming phenotype of human prolactinomas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1993;90(17):7961-5.
66. Shorts-Cary L, Xu M, Ertel J, Kleinschmidt-Demasters BK, Lillehei K, Matsuoka I, et al. Bone morphogenetic protein and retinoic acid-inducible neural specific protein-3 is expressed in gonadotrope cell pituitary adenomas and induces proliferation, migration, and invasion. *Endocrinology*. 2007;148(3):967-75.
67. Giacomini D, Paez-Pereda M, Theodoropoulou M, Gerez J, Nagashima AC, Chervin A, et al. Bone morphogenetic protein-4 control of pituitary pathophysiology. *Frontiers of hormone research*. 2006;35:22-31.
68. Pellegrini I, Barlier A, Gunz G, Figarella-Branger D, Enjalbert A, Grisoli F, et al. Pit-1 gene expression in the human pituitary and pituitary adenomas. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1994;79(1):189-96.
69. Gadelha MR, Trivellin G, Hernandez Ramirez LC, Korbonits M. Genetics of pituitary adenomas. *Frontiers of hormone research*. 2013;41:111-40.
70. Lakk M, Szabo B, Volgyi B, Gabriel R, Denes V. Development-related splicing regulates pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) receptors in the retina. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2012;53(12):7825-32.
71. Kurozumi K, Tabuchi A, Ono Y, Tamiya T, Ohmoto T, Furuta T, et al. [Pituitary adenoma associated with neurofibromatosis type 1: case report]. *No shinkei geka Neurological surgery*. 2002;30(7):741-5.
72. Barberis M, Gambacorta M, Versari P, Filizzolo F. [About a case of Recklinghausen's disease associated with pituitary adenoma (author's transl)]. *Pathologica*. 1979;71(1012):265-72.
73. Karga HJ, Alexander JM, Hedley-Whyte ET, Klibanski A, Jameson JL. Ras mutations in human pituitary tumors. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1992;74(4):914-9.

74. Faccenda E, Melmed S, Bevan JS, Eidne KA. Structure of the thyrotrophin-releasing hormone receptor in human pituitary adenomas. *Clinical endocrinology*. 1996;44(3):341-7.
75. Kaji H, Xu Y, Takahashi Y, Abe H, Tamaki N, Chihara K. Human TRH receptor messenger ribonucleic acid levels in normal and adenomatous pituitary: analysis by the competitive reverse transcription polymerase chain reaction method. *Clinical endocrinology*. 1995;42(3):243-8.
76. Chaidarun SS, Klibanski A, Alexander JM. Tumor-specific expression of alternatively spliced estrogen receptor messenger ribonucleic acid variants in human pituitary adenomas. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1997;82(4):1058-65.
77. Spada A, Mantovani G, Lania A. Pathogenesis of prolactinomas. *Pituitary*. 2005;8(1):7-15.
78. Filopanti M, Barbieri AM, Angioni AR, Colao A, Gasco V, Grottoli S, et al. Dopamine D2 receptor gene polymorphisms and response to cabergoline therapy in patients with prolactin-secreting pituitary adenomas. *The pharmacogenomics journal*. 2008;8(5):357-63.
79. Caccavelli L, Feron F, Morange I, Rouer E, Benarous R, Dewailly D, et al. Decreased expression of the two D2 dopamine receptor isoforms in bromocriptine-resistant prolactinomas. *Neuroendocrinology*. 1994;60(3):314-22.
80. Raghavan R, Harrison D, Ince PG, James RA, Daniels M, Birch P, et al. Oncoprotein immunoreactivity in human pituitary tumours. *Clinical endocrinology*. 1994;40(1):117-26.
81. Cander S, Erturk E, Karkucak M, Oz Gul O, Gorukmez O, Yakut T, et al. Effect of cyclin [corrected] D1 (CCND1) gene polymorphism on tumor formation and behavior in patients with prolactinoma. *Gene*. 2012;509(1):158-63.
82. Pei L, Melmed S. Isolation and characterization of a pituitary tumor-transforming gene (PTTG). *Molecular endocrinology*. 1997;11(4):433-41.
83. Horwitz GA, Miklovsy I, Heaney AP, Ren SG, Melmed S. Human pituitary tumor-transforming gene (PTTG1) motif suppresses prolactin expression. *Molecular endocrinology*. 2003;17(4):600-9.
84. Fedele M, Pierantoni GM, Visone R, Fusco A. Critical role of the HMGA2 gene in pituitary adenomas. *Cell cycle*. 2006;5(18):2045-8.
85. Finelli P, Pierantoni GM, Giardino D, Losa M, Rodeschini O, Fedele M, et al. The High Mobility Group A2 gene is amplified and overexpressed in human prolactinomas. *Cancer research*. 2002;62(8):2398-405.

86. Missale C, Boroni F, Sigala S, Buriani A, Fabris M, Leon A, et al. Nerve growth factor in the anterior pituitary: localization in mammothroph cells and cosecretion with prolactin by a dopamine-regulated mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996;93(9):4240-5.
87. Sigala S, Martocchia A, Missale C, Falaschi P, Spano P. Increased serum concentration of nerve growth factor in patients with microprolactinoma. *Neuropeptides*. 2004;38(1):21-4.
88. Missale C, Losa M, Sigala S, Balsari A, Giovanelli M, Spano PF. Nerve growth factor controls proliferation and progression of human prolactinoma cell lines through an autocrine mechanism. *Molecular endocrinology*. 1996;10(3):272-85.
89. Fiorentini C, Guerra N, Facchetti M, Finardi A, Tiberio L, Schiaffonati L, et al. Nerve growth factor regulates dopamine D(2) receptor expression in prolactinoma cell lines via p75(NGFR)-mediated activation of nuclear factor-kappaB. *Molecular endocrinology*. 2002;16(2):353-66.
90. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic acids research*. 1988;16(3):1215.
91. Herman V, Fagin J, Gonsky R, Kovacs K, Melmed S. Clonal origin of pituitary adenomas. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1990;71(6):1427-33.
92. Baylin SB, Herman JG, Graff JR, Vertino PM, Issa JP. Alterations in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia. *Advances in cancer research*. 1998;72:141-96.
93. Packenham JP, Taylor JA, White CM, Anna CH, Barrett JC, Devereux TR. Homozygous deletions at chromosome 9p21 and mutation analysis of p16 and p15 in microdissected primary non-small cell lung cancers. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 1995;1(7):687-90.
94. Kamb A, Gruis NA, Weaver-Feldhaus J, Liu Q, Harshman K, Tavitgian SV, et al. A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science*. 1994;264(5157):436-40.
95. Ranade K, Hussussian CJ, Sikorski RS, Varmus HE, Goldstein AM, Tucker MA, et al. Mutations associated with familial melanoma impair p16INK4 function. *Nature genetics*. 1995;10(1):114-6.

96. Herman JG, Civin CI, Issa JP, Collector MI, Sharkis SJ, Baylin SB. Distinct patterns of inactivation of p15INK4B and p16INK4A characterize the major types of hematological malignancies. *Cancer research*. 1997;57(5):837-41.
97. Jie G, Zhixiang S, Lei S, Hesheng L, Xiaojun T. Relationship between expression and methylation status of p16INK4a and the proliferative activity of different areas' tumour cells in human colorectal cancer. *International journal of clinical practice*. 2007;61(9):1523-9.
98. Swellam M, El-Aal AA, AbuGabel KM. Deletions of p15 and p16 in schistosomal bladder cancer correlate with transforming growth factor-alpha expression. *Clinical biochemistry*. 2004;37(12):1098-104.
99. Yang CH, Wu CC, Chen WT, Chai CY, Yang SF. Expressions of p16 and p27 in urothelial carcinoma and their prognostic value. *The Kaohsiung journal of medical sciences*. 2014;30(9):453-8.
100. Lois AF, Cooper LT, Geng Y, Nobori T, Carson D. Expression of the p16 and p15 cyclin-dependent kinase inhibitors in lymphocyte activation and neuronal differentiation. *Cancer research*. 1995;55(18):4010-3.
101. Ono Y, Ueki K, Joseph JT, Louis DN. Homozygous deletions of the CDKN2/p16 gene in dural hemangiopericytomas. *Acta neuropathologica*. 1996;91(3):221-5.
102. Biernat W, Tohma Y, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. Alterations of cell cycle regulatory genes in primary (de novo) and secondary glioblastomas. *Acta neuropathologica*. 1997;94(4):303-9.
103. Seemann N, Kuhn D, Wrocklage C, Keyvani K, Hackl W, Buchfelder M, et al. CDKN2A/p16 inactivation is related to pituitary adenoma type and size. *The Journal of pathology*. 2001;193(4):491-7.
104. Abd El-Moneim HM, Abd El-Rehim D. Immunohistochemical and Molecular Study of p16INK4A Expression in Pituitary Adenoma. *Journal of the Egyptian National Cancer Institute*. 2009;21(4):351-60.
105. Bartoletti R, Cai T, Nesi G, Roberta Girardi L, Baroni G, Dal Canto M. Loss of P16 expression and chromosome 9p21 LOH in predicting outcome of patients affected by superficial bladder cancer. *The Journal of surgical research*. 2007;143(2):422-7.

106. Cander S, Karkucak M, Gul OO, Sag SO, Yakut T, Ersoy C, et al. Association between p16(CDKN2A) C540G polymorphism and tumor behavior in prolactinoma: A single-center study. *Biomedical reports*. 2014;2(4):589-95.
107. Geddert H, Kiel S, Zotz RB, Zhang J, Willers R, Gabbert HE, et al. Polymorphism of p16 INK4A and cyclin D1 in adenocarcinomas of the upper gastrointestinal tract. *Journal of cancer research and clinical oncology*. 2005;131(12):803-8.
108. Sauroja I, Smeds J, Vlaykova T, Kumar R, Talve L, Hahka-Kemppinen M, et al. Analysis of G(1)/S checkpoint regulators in metastatic melanoma. *Genes, chromosomes & cancer*. 2000;28(4):404-14.
109. Chen J, Li D, Wei C, Sen S, Killary AM, Amos CI, et al. Aurora-A and p16 polymorphisms contribute to an earlier age at diagnosis of pancreatic cancer in Caucasians. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2007;13(10):3100-4.
110. Yan L, Na W, Shan K, Xiao-Wei M, Wei G, Shu-Cheng C. p16(CDKN2) gene polymorphism: association with histologic subtypes of epithelial ovarian cancer in China. *International journal of gynecological cancer : official journal of the International Gynecological Cancer Society*. 2008;18(1):30-5.
111. Tuna G, Kucukhuseyin O, Arikan S, Kaytan Saglam E, Guler E, Cacina C, et al. Do CDKN2 p16 540 C>G, CDKN2 p16 580 C>T, and MDM2 SNP309 T>G gene variants act on colorectal cancer development or progression? *DNA and cell biology*. 2013;32(7):400-8.
112. Sharpless NE. INK4a/ARF: a multifunctional tumor suppressor locus. *Mutation research*. 2005;576(1-2):22-38.
113. Iwakuma T, Lozano G. MDM2, an introduction. *Molecular cancer research : MCR*. 2003;1(14):993-1000.
114. Okamoto H, Fujishima F, Kamei T, Nakamura Y, Ozawa Y, Miyata G, et al. Murine double minute 2 predicts response of advanced esophageal squamous cell carcinoma to definitive chemoradiotherapy. *BMC cancer*. 2015;15:208.
115. Javid J, Mir R, Julka PK, Ray PC, Saxena A. Association of p53 and mdm2 in the development and progression of non-small cell lung cancer. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. 2015.
116. Suliman M, Royds J, Cullen D, Timperley W, Powell T, Battersby R, et al. Mdm2 and the p53 pathway in human pituitary adenomas. *Clinical endocrinology*. 2001;54(3):317-25.



117. Tanizaki Y, Jin L, Scheithauer BW, Kovacs K, Roncaroli F, Lloyd RV. P53 gene mutations in pituitary carcinomas. *Endocrine pathology*. 2007;18(4):217-22.
118. Levy A, Hall L, Yeudall WA, Lightman SL. p53 gene mutations in pituitary adenomas: rare events. *Clinical endocrinology*. 1994;41(6):809-14.
119. Zhou Y, Zhang X, Klibanski A. Genetic and epigenetic mutations of tumor suppressive genes in sporadic pituitary adenoma. *Molecular and cellular endocrinology*. 2014;386(1-2):16-33.
120. Schmidt MK, Reincke S, Broeks A, Braaf LM, Hogervorst FB, Tollenaar RA, et al. Do MDM2 SNP309 and TP53 R72P interact in breast cancer susceptibility? A large pooled series from the breast cancer association consortium. *Cancer research*. 2007;67(19):9584-90.
121. Boersma BJ, Howe TM, Goodman JE, Yfantis HG, Lee DH, Chanock SJ, et al. Association of breast cancer outcome with status of p53 and MDM2 SNP309. *Journal of the National Cancer Institute*. 2006;98(13):911-9.
122. Hirata H, Hinoda Y, Kikuno N, Kawamoto K, Suehiro Y, Tanaka Y, et al. MDM2 SNP309 polymorphism as risk factor for susceptibility and poor prognosis in renal cell carcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2007;13(14):4123-9.
123. Hori Y, Miyabe K, Yoshida M, Nakazawa T, Hayashi K, Naitoh I, et al. Impact of TP53 codon 72 and MDM2 SNP 309 polymorphisms in pancreatic ductal adenocarcinoma. *PloS one*. 2015;10(3):e0118829.
124. Xu B, Xu Z, Cheng G, Min ZC, Mi Y, Zhang ZZ, et al. Association between polymorphisms of TP53 and MDM2 and prostate cancer risk in southern Chinese. *Cancer genetics and cytogenetics*. 2010;202(2):76-81.
125. Stoehr R, Hitzenbichler F, Kneitz B, Hammerschmied CG, Burger M, Tannapfel A, et al. Mdm2-SNP309 polymorphism in prostate cancer: no evidence for association with increased risk or histopathological tumour characteristics. *British journal of cancer*. 2008;99(1):78-82.
126. Wilkening S, Bermejo JL, Hemminki K. MDM2 SNP309 and cancer risk: a combined analysis. *Carcinogenesis*. 2007;28(11):2262-7.
127. Chua HW, Ng D, Choo S, Lum SS, Li H, Soh LY, et al. Effect of MDM2 SNP309 and p53 codon 72 polymorphisms on lung cancer risk and survival among non-smoking Chinese women in Singapore. *BMC cancer*. 2010;10:88.

128. Lum SS, Chua HW, Li H, Li WF, Rao N, Wei J, et al. MDM2 SNP309 G allele increases risk but the T allele is associated with earlier onset age of sporadic breast cancers in the Chinese population. *Carcinogenesis*. 2008;29(4):754-61.