

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı**

**MALİGN EPİTELYAL OVER TÜMÖRLERİNDE
METASTAZ SUPRESÖR GENLERİN EKSPRESYON
DÜZEYLERİNİN BELİRLENMESİ VE MDR1 GENİNİN
İLAÇ DİRENÇLİLİĞİ ÜZERİNE ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Türker BİLGİN

Doktora Tezi

Antalya, 2008

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı**

**MALİGN EPİTELYAL OVER TÜMÖRLERİNDE
METASTAZ SUPRESÖR GENLERİN EKSPRESYON
DÜZEYLERİNİN BELİRLENMESİ VE MDR1 GENİNİN
İLAÇ DİRENÇLİLİĞİ ÜZERİNE ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Türker BİLGİN

Doktora Tezi

**Tez Danışmanı
Doç. Dr. İbrahim KESER**

“Bu çalışma Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından desteklenmiştir. (Proje No: 2005.03.0122.004)”

“Kaynakça Gösterilerek Tezimden Yararlanılabilir”

Antalya, 2008

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Kurulu ve Akdeniz Üniversitesi Senato Kararı

Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün 22/06/2000 tarih ve 02/09 sayılı Enstitü Kurul kararı ve 23/05/2003 tarih ve 04/44 sayılı Senato kararı gereğince "Sağlık Bilimleri Enstitülerinde lisansüstü eğitim gören doktora öğrencilerinin tez savunma sınavlarına girebilmeleri için, doktora bilim alanında SCI tarafından taranan dergilerde en az bir yurtdışı yayın yapması gerektiği" ilkesi gereğince yapılan yayınların listesi aşağıdadır.

- 1) **Bilgen T**, Tosun O, Luleci G, Keser I. Frequencies of Four Genetic Polymorphisms in the CYP1A2 Gene in Turkish Population. Russian Journal of Genetics. 2008 August; (8): 989-93.
- 2) Şimşek M, Çetin Z, **Bilgen T**, Taşkın O, Lüleci G, Keser İ.: Effects of hormone replacement therapy on bone mineral density in Turkish patients with or without COL1A1 Sp1 binding site polymorphism. Journal of Obstetrics and Gynecology Research. 2008 Feb; 34(1):73-7.
- 3) Akbaş SH, **Bilgen T**, Keser İ, Tuncer M, Yüce L, Tosun O, Gültekin M, Lüleci G.: The effect of MDR1 (ABCB1) polymorphism on the pharmacokinetic of tacrolimus in Turkish renal transplant recipients. Transplant Proceedings. 2006 Jun;38(5):1290-2.
- 4) Karaüzüm SB, **Bilgen T**, Karadoğan İ, Yakut S, Çetin Z, Uğur A, Lüleci G.: Novel cytogenetic findings revealed by conventional cytogenetic and FISH analyses in leukaemia patients. Experimental Oncology. 2005 Sep;27(3):229-32.
- 5) Alper Ö, Erengin H, Manguoğlu AE, **Bilgen T**, Çetin Z, Dedeoğlu N, Lüleci G.: Consanguineous marriages in the province of Antalya: Turkey. Annales de génétique 2004; 47:129-38.

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;

Bu alışma, jürimiz tarafından Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Tıbbi Genetik Programında doktora tezi olarak kabul edilmiştir. 14 / 11 / 2008

Tez Danışmanı: **Doç. Dr. İbrahim KESER**
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Üye **:** **Prof. Dr. Güven LÜLECİ**
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Üye **:** **Prof. Dr. Şeyda KARAVELİ**
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Patoloji Anabilim Dalı

Üye **:** **Prof. Dr. Sibel BERKER KARAÜZÜM**
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Üye **:** **Doç. Dr. Oğuz ALTUNGÖZ**
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

ONAY:

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulumuzca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulumuzun/...../ 2008 tarih ve/..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. İsmail ÜSTÜNEL
Enstitü Müdürü

ÖZET

Epitelyal yumurtalık kanserleri jinekolojik kanserler içinde ölüm oranı en yüksek olanıdır. Hastalık erken evrede belirti vermez ve hastaların en az 2/3' si tümörün karın bölgesine metastaz yaptığı ve 5 yıllık sağ kalım oranlarının % 20' den daha az olduğu evre III ve IV gibi ileri evrelerinde tanı alır. Hastalığın yüksek ölüm oranına sahip olmasında başlıca; hastalığın ileri evrelerde belirlenmesi, tanı sırasında metastazın gerçekleşmiş olması ve ilaç dirençliliği gibi mekanizmalar rol oynamaktadır. Bu çalışmada; metastaz baskılayıcı genler olarak bilinen *NM23-H1*, *KAI1* ve *MAP2K4* genlerinin malign epitelyal yumurtalık tümörünün karın bölgesine metastazındaki rollerinin ve çoklu ilaç dirençliliğinden sorumlu olduğu bilinen *ABCB1* genindeki g.3435C>T polimorfizminin epitelyal yumurtalık kanserlerinde ilaç dirençliliğindeki rolünün belirlenmesi amaçlanmıştır. Malign epitelyal yumurtalık tümürlü 50 olguda cerrahi işlem ile elde edilen normal, primer tümör ve metastatik tümör dokularında Q-RT-PCR tekniği ile *NM23-H1*, *KAI1* ve *MAP2K4* genlerinin mRNA düzeyleri belirlenerek gen ifadesindeki değişimler belirlendi. *ABCB1* geni g.3435C>T polimorfizminin varlığı PCR-REA yöntemi ile belirlendi ve hastalısız yaşam süresi ve yan etkiler gibi klinik parametrelerle birlikte değerlendirildi. Genel olarak *NM23-H1* ve *KAI1* genlerinin ifadelerinin normal dokuya kıyasla primer tümör ve metastatik tümör dokularında arttığı, *MAP2K4* geninin ifadesinin ise azaldığı belirlenmiştir. Ancak sadece *MAP2K4* geninin hem karın bölge metastazı olan hem de lenf düğümü metastazı olan olgularda sadece karın bölge metastazı olan olgulara göre analizi istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur. *NM23-H1* ve *KAI1* genlerinin metastaz baskılayıcı rolleri diğer birçok kanser tipinde gösterilmiştir ancak yumurtalık kanserindeki rolü belirsizdir. *NM23-H1* ve *KAI1* gen ifadelerinin daha önce de bildirildiği gibi hastaların bir kısmında arttığı, geri kalanlarda ise azaldığı ya da değişmediği belirlenmiştir. Bu genlerin ifadesinin yumurtalık kanseri metastazında diğer kanser tiplerine zıt olarak artması, bu genlerin farklı dokularda farklı şekillerde metastaz baskılayıcı mekanizmalarda rol alabileceklerini gösterebilir. Hem primer tümör hem de metastatik tümör dokularında *MAP2K4* geninin ifadesindeki azalma, *MAP2K4* geninin yumurtalık kanserinin oluşumunda ve metastazında baskılayıcı rolünü göstermektedir. Yumurtalık kanseri metastazını baskılamak ve hastalığın tekrarlama riskini azaltabilmek için *MAP2K4* fonksiyonunun yerine konmasını hedefleyen tedavi yaklaşımları yumurtalık kanserinde ölüm oranlarının azaltılmasında önemli olabilir. Çalışmamızda ayrıca; *ABCB1* geni g.3435 T/T genotipi ile hastalısız yaşam süresinin kısalması arasında bir ilişki belirlendi. Bu bulgu; değerlendirilen hasta sayısı az olmakla birlikte TT genotipinin kötü prognoz ile ilişkili bir belirteç olarak tanımlanmasını sağlamaktadır. *ABCB1* geninin 3435. pozisyonundaki T varyantının hangi mekanizma ile hastalısız yaşam süresinin kısalmasına neden olduğunun belirlenmesi aynı zamanda bu bulgunun kullanılabilirliğini desteklemek açısından aydınlatılması gereken bir konu olarak kalmaktadır.

Anahtar Kelimeler: *NM23-H1*, *KAI1*, *MAP2K4*, Yumurtalık kanseri, Metastaz.

ABSTRACT

Epithelial ovarian cancer has the highest mortality rate among gynecological malignancies. Disease is generally asymptomatic in early stages, and 2/3 of the patients are diagnosed at advanced stages as stage III and IV in which disease spread beyond the pelvis and 5 years survive rate is less than 20 %. The leading reasons for high mortality rate are late diagnosis of the disease, existence of metastasis at time of diagnosis, and high recurrency rate because of drug resistance. In this study, we aimed to determine the role of *NM23-H1*, *KAI1*, and *MAP2K4* genes known as metastasis suppressors in abdomino-pelvic metastasis of epithelial ovarian cancer, and to determine the impact of *ABCB1* g.3435C>T polymorphism which is associated with multi-drug resistance on drug resistance occurring in epithelial ovarian cancer. Surgically obtained normal, primary tumor and metastatic tumor samples from fifty patients with malign epithelial ovarian tumor were involved in this study. The changes of mRNA levels of *NM23-H1*, *KAI1*, and *MAP2K4* between three different tissues were determined using Q-RT-PCR. *ABCB1* g.3435C>T polymorphism was genotyped by PCR-REA techniques, and it was correlated with some clinical data as disease free survive and recurrency. Elevated mRNA levels of *NM23-H1* and *KAI1* genes were detected, while lowered mRNA level of *MAP2K4* gene was detected in primary tumor and metastatic tumor tissues compared to normal tissue. But these findings were not statistically significant. On the other hand, it was statistically confirmed that *MAP2K4* expression level decreased in primary tumor sample compared to normal tissue in patients with omental metastasis and lenf node positive to those in patients with omental metastasis positive and lenf node metastasis negative. Even though it is clear that anti-metastatic role of *NM23-H1* and *KAI1* genes in many cancer types, it is not completely elucidated in epithelial ovarian cancer. Despite of insufficient number of patients involved in this study, increases in some part of the patients and decreases or no changes in the others were detected conformingly the literature. While lowered expression levels of *NM23-H1* and *KAI1* genes has been detected in other cancer types, detection of increased expression levels of these genes in ovarian cancer may imply that they show metastasis suppressor effect with different mechanisms in different types of cancers. Decreased expression levels of *MAP2K4* gene in primary tumor and metastatic tumor tissues could support both of tumor and metastasis suppressor roles of *MAP2K4* gene in epithelial ovarian cancer. Based on this finding, therapeutic approaches aiming to replace the *MAP2K4* function can suppress metastasis and lower the recurrency risk of the disease, and may help us to decrease the high mortality rate in epithelial ovarian cancer. In this study; we have also found that there is an association between *ABCB1* g.3435T/T genotype and lowered disease free survive. This finding shows that T/T genotype might be marker pointing out poor prognosis. Mechanisms explaining how “T” variant at position 3435 in *ABCB1* gene can lead shortened disease free survive remains elusive. Clarification of these mechanisms is required to support the validation of effect of “T” allele on poor prognosis.

Key Words: *NM23-H1*, *KAI1*, *MAP2K4*, Ovarian cancer, Metastasis.

TEŞEKKÜR

Doktora ve Yüksek Lisans çalıőmalarım süresince gösterdiği yakın ilgi için, akademik kariyerimin őekillenmesinde önemli rolü olan saygı değer danıőman hocam Doç. Dr. İbrahim KESER' e,

Tez çalıőmalarıma önerileri ile katkıda bulunan anabilim dalı başkanımız sayın hocam Prof. Dr. Güven LÜLECI' ye,

Tez savunma sınavımda jüri üyeliği yapan ve önerileriyle tezimin olgunlaőtırılmasına katkıda bulunan sayın hocalarım Prof. Dr. Sibel BERKER KARAÜZÜM, Prof. Dr. şeyda KARAVELİ ve Doç. Dr. Oğuz ALTUNGÖZ' e,

Tümör dokularının sağlanmasında emeği geçen Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Tayup şİMŞEK ve ekibine,

Tezimin deneysel çalıőmalarının ilgili kısımlarını gerçekleőtirebilmem için Gen Tedavi ünitesi laboratuvar olanaklarını kullanmama izin veren sayın hocam Prof. Dr. Salih őANLIOđLU' na,

Doktora tez çalıőmam ile ilgili resmi işlemleri yürüten Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü çalıőanlarına,

Çalıőmam süresince gösterdikleri güler yüz, destek ve yardımları için Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Patoloji Anabilim Dalı ve Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı ekiplerine,

Tez verilerimin istatistiksel analizlerini gerçekleőtiren Yard. Doç. Dr. Hakan GÜLKESEN' e

Doktora çalıőmalarım süresince anlayıő ve her konudaki desteğiyle her zaman yanımda olan sevgili eőtım Banu BİLGEN ve aileme en içten teőtakkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	Sayfa
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
TABLolar DİZİNİ	xiv
GİRİŞ ve AMAÇ	1
GENEL BİLGİLER	
2.1. Kanserde Hücresel ve Genetik Temel	2
2.2. Kanserde Metastaz Nasıl Gerçekleşir?	3
2.3. Metastaz İlişkili Genler	4
2.4. Yumurtalık Kanserinin Sınıflandırılması	7
2.5. Borderline Yumurtalık Yüzey Epitel Tümörleri	10
2.6. Yumurtalık kanseri riskini arttıran durumlar	11
2.7. Yumurtalık kanseri riskini azaltan durumlar	11
2.8. Yumurtalık Kanserinin Yakın Bölge Metastazlarının Mekanizması	11
2.9. Epitelyal Yumurtalık Tümörünün Metastazında Rol Oynayan Faktörler	12
2.9.1. <i>NM23-H1</i> geni	13
2.9.2. <i>KAI1</i> geni	15
2.9.3. <i>MAP2K4</i> geni	16
2.10. <i>ABCBI (MDR1)</i> geni g.3435C>T Polimorfizminin Epitelyal Yumurtalık Tümörünün Tedavisindeki Önemi	19
MATERYAL ve METODLAR	
3.1. Normal, Primer Tümör ve Metastatik Tümör Dokularından RNA İzolasyonu	22
3.1.1. Taze Dokudan RNA İzolasyonu	22
3.1.1.1. Kullanılan Solüsyonlar	22
3.1.1.2. İşlemler	22
3.1.2. FFPE Dokudan RNA İzolasyonu	23
3.1.2.1. Yapılan İşlemler	23
3.2. Kantitatif Gerçek Zamanlı PCR (Q-RT-PCR)	24
3.2.1. cDNA Eldesi	24
3.2.2. Q-RT-PCR Reaksiyonu	25
3.2.3. Q-RT-PCR Sonuçlarının Değerlendirilmesi	26
3.3. <i>ABCBI</i> g.3435C>T Polimorfizminin REA ile Belirlenmesi	26
3.3.1. Genomik DNA İzolasyonu	26
3.3.1.1. Kandan DNA İzolasyonu İçin Kullanılan Çözeltiler	26

3.3.1.2. Kandan DNA İzolasyonu İçin Yapılan İşlemler	27
3.3.1.3. FFPE Dokulardan Kit ile DNA İzolasyonu	28
3.3.1.4. FFPE Dokulardan DNA İzolasyonu İçin Yapılan İşlemler	28
3.3.2. <i>ABCB1</i> g.3435C>T polimorfizminin (Entrez SNP veritabanı no: rs1045642) REA Yöntemi İle Belirlenmesi İçin İlgili Gen Bölgesinin PCR İle Çoğaltılması	29
3.3.2.1. PCR ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi İle Kontrol Edilmesi	29
3.3.2.1.1. Kullanılan Çözeltiler	29
3.3.2.1.2. İşlemler	30
3.3.3. REA İle <i>ABCB1</i> g.3435C>T Polimorfizminin Belirlenmesi	30
3.3.3.1. Kullanılan Çözeltiler	31
3.3.3.2. İşlemler	31
3.3.3.3. Sonuçların Değerlendirilmesi	31
3.3.4. Uzun Süreli Doku Kültürü ve Kromozom Eldesi Çalışmaları	32
3.3.4.1. Primer Hücre Kültürü Çalışmaları	32
3.3.4.1.1. Besi Ortamı ve Kültür Koşulları	32
3.3.4.1.2. İşlemler	32
3.3.4.2. Kromozom Eldesi ve Analizi	33
3.3.4.2.1. Kullanılan Solüsyonlar	33
3.3.4.2.2. İşlemler	33

BULGULAR

4.1. Epitelyal Yumurtalık Kanserli Olguların Klinik ve Patolojik Bulguları	34
4.2. Normal, Primer Tümör ve Metastatik Tümör Dokularında <i>NM23-H1</i> , <i>KAI1</i> ve <i>MAP2K4</i> Genlerinin mRNA Düzeyleri	37
4.2.1. <i>NM23-H1</i> Geni mRNA Düzeylerindeki Değişimler	37
4.2.2. <i>KAI1</i> Geni mRNA Düzeylerindeki Değişimler	39
4.2.3. <i>MAP2K4</i> Geni mRNA Düzeylerindeki Değişimler	40
4.3. <i>NM23-H1</i> , <i>KAI1</i> ve <i>MAP2K4</i> Genlerinin mRNA Düzeylerindeki Değişimler ile Hastaların Klinik ve Patolojik Verilerinin Birlikte Değerlendirilmesi.	42
4.3.1. <i>NM23-H1</i> Geni	43
4.3.2. <i>KAI1</i> Geni	45
4.3.3. <i>MAP2K4</i> Geni	46
4.4. Epitelyal Yumurtalık Kanserli Olguların <i>ABCB1</i> g.3435C>T Polimorfizminin REA Yöntemi İle Belirlenmesi	50
4.5. <i>ABCB1</i> g.3435C>T Polimorfizm Sonuçları	51

TARTIŞMA ve SONUÇLAR

KAYNAKLAR

ÖZGEÇMİŞ

EKLER

Ek-1. Bilgen T, Tosun O, Luleci G, Keser I. Frequencies of Four Genetic Polymorphisms in the CYP1A2 Gene in Turkish Population. Russian Journal of Genetics. 2008 August; (8): 989-92.

Ek-2. Şimşek M, Çetin Z, Bilgen T, Taşkın O, Luleci G, Keser İ.: Effects of hormone replacement therapy on bone mineral density in Turkish patients with or without

COL1A1 Sp1 binding site polymorphism. Journal of Obstetrics and Gynecology Research. 2008 Feb; 34(1):73-7.

Ek-3. Akbaş SH, **Bilgen T**, Keser İ, Tuncer M, Yüçetin L, Tosun O, Gültekin M, Lüleci G.: The effect of MDR1 (ABCB1) polymorphism on the pharmacokinetic of tacrolimus in Turkish renal transplant recipients. Transplant Proceedings. 2006 Jun;38(5):1290-2.

Ek-4. Karüzüm SB, **Bilgen T**, Karadoğan İ, Yakut S, Çetin Z, Uğur A, Lüleci G.: Novel cytogenetic findings revealed by conventional cytogenetic and FISH analyses in leukaemia patients. Experimental Oncology. 2005 Sep;27(3):229-32.

Ek-5. Alper Ö, Erengin H, Manguoğlu AE, **Bilgen T**, Çetin Z, Dedeoğlu N, Lüleci G.: Consanguineous marriages in the province of Antalya: Turkey. Annales de génétique 2004; 47:129-38.

SİMGELER ve KISALTMALAR

NM23-H1	: Non-metastatik Protein 23
KAI1	: Kanga1
MAP2K4	: Mitozu Aktive Eden Protein Kinaz Kinase 4
MDR1	: ATP-Binding Cassette, Subfamily B, Member 1; ABCB1
MMP	: Matriks Metallo Proteaz
VEGF	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
RT-PCR	: Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction
PCR	: Polymerase Chain Reaction
NaCl	: Sodyum klorür
NH₄Cl	: Amonyum klorür
TBE	: Tris-Borik Asit-EDTA
WBL	: Lökosit lizis (White Blood Lysis)
FIGO	: Federation Internationale de Ginecologie et d'Obstetrique
NDP	: Nükleozid Difosfat
ATP	: Adenosine Triphosphate
GTP	: Guanosine Triphosphate
ADP	: Adenosine Diphosphate
TM4SF	: Tetraspanin Süpergen Ailesi
MAPK	: Mitozu Aktive Eden Protein Kinaz
JNK	: c-Jun NH ₂ - terminal Kinaz
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
RNA	: Ribonükleik Asit
MKK6	: Mitozu Aktive Eden Protein Kinaz Kinaz 6
P-gp	: P-glikoproteini
EGF	: Epidermal Büyüme Faktörü
CT	: Treshold Cycle
LOH	: Loss of Heterozygosity
CGH	: Karşılatırmalı Genomik Hibridizasyon
FISH	: Floresan In Situ Hibridizasyon
SKY	: Spectral Karyotyping

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil		Sayfa
2.1.	Bazı tümör tipleri belirgin metastatik profile sahiptir.	6
2.2.	Kökenlerine göre yumurtalık tümörlerinin sınıflandırılması.	8
2.3.	Yumurtalık kanserlerinde yakın bölge metastazlarının mekanizması.	12
2.4.	<i>NM23-H1</i> geninin faklı mekanizmalarla metastazı baskılaması.	14
2.5.	<i>KAI1</i> ' in hücre membranında etkileştiği moleküller ve olası metastaz baskılayıcı mekanizmaları.	16
2.6.	<i>MAP2K4</i> geninin farklı organlarda farklı mekanizmalarla metastazda rol alması.	18
2.7.	<i>ABCB1</i> geni 3435. pozisyondaki "C" ya da "T" değişiminin <i>ABCB1</i> mRNA' sının ikincil yapısını değiştirmesi.	20
3.1.	<i>ABCB1</i> g.3435C>T polimorfizminin belirlenmesinde kullanılan DNA dizisi	32
4.1.	Malign epitelyal yumurtalık tümörlü hastalarda, <i>NM23-H1</i> geninin gerçek zamanlı PCR ile belirlenen mRNA miktarlarının primer tümör ile normal doku arasındaki değişim oranları.	38
4.2.	Malign epitelyal yumurtalık kanserli hastalarda, <i>NM23-H1</i> geninin gerçek zamanlı PCR ile belirlenen mRNA miktarlarının primer tümör ile metastatik tümör dokuları arasındaki değişim oranları.	38
4.3.	Malign epitelyal yumurtalık tümörlü hastalarda, <i>KAI1</i> geninin gerçek zamanlı PCR ile belirlenen mRNA miktarlarının primer tümör ile normal doku arasındaki değişim oranları.	39
4.4.	Malign epitelyal yumurtalık tümörlü hastalarda, <i>KAI1</i> geninin gerçek zamanlı PCR ile belirlenen mRNA miktarlarının primer tümör ile metastatik tümör dokuları arasındaki değişim oranları.	40
4.5.	Malign epitelyal yumurtalık tümörlü hastalarda, <i>MAPKK4</i> geninin gerçek zamanlı PCR ile belirlenen mRNA miktarlarının primer tümör ile normal doku arasındaki değişim oranları.	40
4.6.	Malign epitelyal yumurtalık tümörlü hastalarda, <i>MAPKK4</i> geninin gerçek zamanlı PCR ile belirlenen mRNA miktarlarının primer tümör ile metastatik tümör dokuları arasındaki değişim oranları.	41
4.7.	İki ayrı dokudan elde edilen cDNA ile gerçekleştirilen gerçek zamanlı PCR'da CT değerlerinin belirlenmesinde kullanılan amplifikasyon eğrileri.	42
4.8.	Q-RT-PCR' daki amplifikasyon eğrileri.	42
4.9.	<i>MAP2K4</i> geninin mRNA düzeylerindeki değişim oranları, hasta sayıları ve yumurtalık tümörü lenf düğümü metastazındaki rolü	49
4.10.	<i>NM23-H1</i> , <i>KAI1</i> ve <i>MAP2K4</i> genlerinin mRNA düzeylerinin normal, primer tümör ve metastatik tümör dokularındaki değişim oranları ve hasta sayıları	50
4.11.	<i>ABCB1</i> g.3435C>T genotiplemesi için ilgili bölgenin PCR ile çoğaltılması.	51
4.12.	<i>ABCB1</i> g.3435C>T genotiplemesi için REA sonuçları.	51

4.13 *ABCB1* geni g.3435C>T değişiminin epitelyal yumurtalık kanserinde hastalısız yaşam sürelerine etkisi.

52

TABLolar DİZİNİ

Tablo	Sayfa
2.1. Metastaz Baskılayıcı Genler.	5
2.2. Epitelyal yumurtalık tümörlerinin histolojik sınıflandırılması.	9
2.3. Yumurtalık tümörlerinin evrelendirilmesinde FIGO ve UICC-TNM evrelendirme sistemleri.	10
4.1. Epitelyal yumurtalık kanserli 50 olgunun yaş aralıklarındaki dağılımları	34
4.2. Epitelyal yumurtalık kanserli 50 olgunun tümörün histolojik alt tiplerine göre dağılımları	35
4.3. Epitelyal yumurtalık kanserli olguların klinik, patolojik bulguları ve <i>ABCBI</i> g.3435 C>T açısından genotipleri.	35
4.4. <i>NM23-H1</i> geninin primer tümör ve metastatik tümör dokularında mRNA düzeylerindeki değişimler.	43
4.5. <i>KAI1</i> geninin primer tümör ve metastatik tümör dokularında mRNA düzeylerindeki değişimler.	45
4.6. <i>MAP2K4</i> geninin primer tümör ve metastatik tümör dokularında mRNA düzeylerindeki değişimler.	47
4.7. Normale kıyasla primer tümör dokusunda ve primer tümöre kıyasla metastatik tümör dokusunda her 3 genin mRNA düzeylerindeki değişim oranları ve hasta sayıları.	49
4.8. <i>ABCBI</i> g.3435C>T polimorfizminin genotip oranları.	50
4.9. <i>ABCBI</i> g.3435C>T polimorfizminin alel frekansları.	50

GİRİŞ ve AMAÇ

Kanser; günümüzde moleküler boyutta daha iyi anlaşılmasıyla ve gelişen tanı yöntemleri sayesinde giderek artan sıklıkta bildirilen, tüm toplumları etkileyen önemli bir sağlık sorunudur. Kanser, tüm dünyada kardiyovasküler hastalıklardan sonra en çok ölüme sebebiyet veren ikinci hastalıktır [1].

T.C. Sağlık Bakanlığı 2004 yılı verilerine göre yumurtalık kanseri “Over kanseri” Türkiye’ de, yüz binde 5,86 oranı ile kadınlarda en sık görülen kanserler arasında sekizinci sıradadır. 2004 yılı verilerine göre Amerika Birleşik Devletleri’nde, 24 bin yeni olgu yumurtalık kanseri tanısı almış ve 14 bin kişi bu hastalıktan dolayı hayatını kaybetmiştir. Yumurtalık kanseri Amerika Birleşik Devletleri’nde kadınlar arasında en sık görülen beşinci kanser türü ve ölüme sebebiyet veren dördüncü kanser türüdür [2]. Yumurtalık dokusu pek çok değişik hücreyi barındırır. Dolayısıyla yumurtalık kanserleri; epitelyal hücreler, germ hücreleri ve stromal hücreler olmak üzere 3 farklı hücre tipinden köken alabilir. Epitelyal hücreden köken alan yumurtalık kanserleri tüm yumurtalık kanserlerinin % 90’ından fazlasını oluşturur ve histolojik özelliklerine göre seröz, müsinöz, endometrioid, berrak hücreli, değişici epitel hücreli, miks, farklılaşmamış ve az farklılaşmış gibi alt tiplere ayrılır. Bunlar içerisinde en sık görülen ise seröz tiptir [3]. Jinekolojik kanserler arasında en sık ölüm bu kanser türünde görülmektedir [4]. Bunun sebeplerinden birisi hastaların % 75’ inden fazlasında tanı sırasında tümörün vücuda yayılmış olmasıdır. Epitelyal yumurtalık tümörleri lenf ve kan yoluyla uzak bölgelere metastaz yapabilirse de en sık peritoneal boşluğa bazen de yakın bölge lenf düğümlerine metastaz yaparlar. Olguların sadece % 2- 3 kadarında akciğer ve karaciğer gibi uzak bölge metastazları görülmektedir [5]. Evre I’ de tanı alanlarda 5 yıllık sağ kalım oranı % 90’dan fazla iken, evre III ve IV’ de tanı alanlarda ise bu oran % 25’ dir [6]. Yumurtalık kanserini erken dönemde belirlemeye yönelik güncel tarama seçenekleri; ultrason görüntüleme, serum CA-125 düzeyi ve rektovajinal pelvik muayene olarak sıralanabilir [7]. Hastalığın yüksek ölüm oranına sahip olmasında başlıca etken; hastalığın ileri evrelerde belirlenmesi, tanı sırasında metastazın gerçekleşmiş olması ve ilaç dirençliliği gibi mekanizmaların rol oynamasıdır.

Bu çalışmada; metastaz baskılayıcı genler olarak bilinen *NM23-H1*, *KAI1* ve *MAP2K4* genlerinin malign epitelyal yumurtalık tümörünün karın bölgesine metastazındaki rolleri ile çoklu ilaç dirençliliğinden sorumlu olduğu bilinen *ABCBI* geni g.3435C>T polimorfizminin epitelyal yumurtalık kanserlerinde ilaç dirençliliğindeki rolünün belirlenmesi amaçlanmıştır.

GENEL BİLGİLER

Hücre bölünmesi genetik kontrol altındadır. Bu kontrol farklı zamanlarda ifade edilen birçok gen tarafından düzenlenmektedir. Kanser ise hücre bölünmesinin kontrol edilememesine bağlı olarak gelişen, bulunduğu doku veya organın normal yapı ve fonksiyonunu etkileyerek organ homeostasisini bozmak suretiyle ölüme neden olan oldukça heterojen bir hastalıktır.

2.1 Kanserde Hücresel ve Genetik Temel

Kanser aynı zamanda, çok sayıda genomik değişimin aynı hücrede birikmesiyle, hücrenin bölünmeyi kontrol eden içsel ve dışsal uyarılara yanıt vermeyerek sınırsız bölünme yeteneği kazanmasıyla ortaya çıkan, tek bir hücreden köken alan klonal bir hastalıktır. Aşırı hücre bölünmesinin temelindeki neden hücre döngüsünü kontrol eden ve hücrenin gerektiğinde planlı bir şekilde ölmesini yöneten genlerde bir takım değişikliklerin olmasıdır. Bu değişiklikler DNA sentezindeki hatalar ya da metabolizma faaliyetleri sırasında ortaya çıkan serbest radikaller gibi içsel faktörlerin yanında kimyasal, UV ve iyonize edici radyasyon gibi fiziksel veya biyolojik ajan olarak virüsler gibi dışsal faktörler aracılığıyla meydana gelebilir. DNA' da meydana gelen değişimlerin bir hücrede birikerek kanser oluşumunda rol alabilmesi için bölünmeyle oluşan yeni hücrelere bu değişimlerin aktarılıyor olması önemlidir. Hücrenin DNA' da meydana gelen hasarı onarabilme mekanizması sayesinde mutasyonların bir kısmı düzeltilebilirse de bir kısmı genomda kalıcı değişiklikler olarak hücresel ve bireysel bazda sonraki nesillere aktarılır. Aynı zamanda genomik bütünlüğün korunmasından da sorumlu olan DNA tamir mekanizmasında görevli genlerde meydana gelen inaktive edici mutasyonlar ise hücrenin kanserleşmeye giden yolda kazanacağı genomik değişiklikleri edinme sürecini hızlandırır. Ayrıca bu tip genlerde ya da kanser oluşumunda baskın role sahip diğer genlerde kazanılmış mutasyonların kuşaklar arası aktarılması tüm kanserlerin % 5' ini oluşturan ailesel kanser sendromlarının ortaya çıkmasına neden olur [8]. Tüm kanser olgularının % 95' ini oluşturan sporadik kanser olgularında hücreyi kanser hücresi haline dönüştürecek olan değişimler, ailesel kanser sendromlarında da olduğu gibi genetik ve epigenetik mekanizmalarla, ilişkili genlerin fonksiyon kaybı ya da kazancıyla ortaya çıkabilmektedir.

Kanserin oluşum süreci 3 ayrı evreye bölünebilen karmaşık bir süreçtir. Bunlar; başlangıç, gelişme ve ilerleme evreleridir. Başlangıç evresi normal hücreleri kanser oluşturmaya yatkın hale getiren, geri dönüşümü olmayan genetik değişikliklerden kaynaklanır. Bu evre haftalar ya da yıllar sürebilir. Gelişme evresi ise hücre bölünmesindeki artış ile karakterize, geri dönüşümlü bir süreçtir. Üçüncü evre olan ilerleme evresi genetik ya da epigenetik mekanizmalarla hücrenin kanser hücresine dönüşümünün son basamağıdır. Geri dönüşümü olmayan bu evre genetik kararsızlık, hızlı büyüme ve yayılma ile hücrelerin biyokimyasal, morfolojik ve metabolik değişimleriyle karakterizedir. 3 evre boyunca genetik değişiklikler devam eder [1]. Bir hücrede meydana gelerek kanser oluşumuna neden olan bu değişimlerin yanında bireyler arasında farklılık gösteren bir takım özellikler nedeniyle bireysel yatkınlıklar söz konusudur. Tümör oluşumu üzerinde belirleyici rolü olan bu olaylar;

karsinojenlere maruz kalmada detoksifikasyon mekanizması, bireyin immün savunması gibi sistemik faktörlerdir. Hücre bölünmesindeki artış ile gelişen tümör dokusu her zaman kanser oluşumuna neden olmaz. Benign “iyi huylu” tümörler ileri derecede farklılaşmış olması, bir bağ doku ile çevrelenerek köken aldıkları dokuda sınırlı kalma eğiliminde olması ve ayrıca büyüme hızının çok daha yavaş olması gibi temel bir takım farklılıklar ile Malign “kötü huylu” tümörlerden ayrılırlar. Malign dönüşümün doğal seyri olarak en son basamakta hücreler yayılma ve ilk başta köken aldığı doku veya organ dışında başka bölgelere yerleşerek metastaz yapma yeteneği kazanırlar. Solid tümörlerde kanserden ölümlerin % 90’ından fazlasında temel neden metastazdır [9].

Karmaşık bir genetik hastalık olan kanser, genomda farklı genetik lokuslardaki kalıtsal ve somatik olarak kazanılmış, genetik ve epigenetik değişiklikler sonucu ortaya çıkmaktadır. Bunlar; DNA düzeyindeki değişimler, sayısal ve yapısal kromozom değişimleri, gen amplifikasyonları ya da delesyonları, kanser gelişiminde rol oynayan tümör virüsleri ve DNA paketlenmesinde rol oynayan proteinlerin metilasyonu-demetilasyonu ve asetilasyonu-deasetilasyonudur. Ayrıca kalıtsal kanserler üzerine yapılan çalışmalarda birçok fonksiyonel gen tanımlanmıştır. Bunlar; proto-onkogenler, onkogenler, tümör baskılayıcı genler ve DNA tamir mekanizmasında rol oynayan genlerdir. Son yıllarda yapılan çalışmalar daha çok kanserin metastazı ve metastazın baskılanması mekanizması üzerine yoğunlaşmıştır.

2.2. Kanserde Metastaz Nasıl Gerçekleşir?

Metastaz malign dönüşümün son basamağıdır ve kanserden ölümlerin başlıca nedenidir. Duktal karsinoma in situ ve intraepitelyal prostat neoplazisi gibi örneklerin dışında, solid doku tümörlerinde tümör hücreleri malignitenin doğal seyri olarak tümörü çevreleyen kapsülün dışına çıkar ve bu olay invazyon olarak tanımlanır. Sonrasında yeterli potansiyele sahip tümör hücreleri primer tümör odağından başka bir bölgeye çeşitli yollarla göç ederek burada ikincil tümör odağını oluşturur. Birbirinden bağımsız olarak meydana gelen ve ayırt edilebilen bu karmaşık olaylar süreci “metastaz” olarak tanımlanmaktadır. Metastaz 3 farklı yolla gerçekleşebilmektedir. Birincisi kan damarları yolu, ikincisi lenfatik damar yolu ve üçüncüsü ise tümör hücrelerinin vücut boşluklarına yayılması yolu ile gerçekleşmektedir [10]. Kan ve lenfatik damar yolu ile gerçekleşen metastazda bu süreç; tümör hücresinin primer tümör dokusundan ayrılması, damar içerisine girmesi, dolaşım sisteminde hayatta kalarak yer değiştirmesi, damar dışına çıkması, ikincil noktada ihtiyaçlarını karşılayabilmek için damarlanmayı sağlayabilmesi ve burada aşırı derecede büyüyerek yeni bir tümör kitlesi oluşturması olarak tanımlanmaktadır [11-14].

Primer tümör gelişiminin erken evrelerinde, hücrelerin invaziv ya da metastatik özellik göstermediği ve tümör hücrelerinde sonradan kazanılan ilave bir takım genetik değişikliklerin birikimi sonucu, metastaz yapma özelliğinin kazanıldığı düşünülmektedir [15]. Ancak, son dönemde tümör hücresinin metastatik süreci başarıyla gerçekleştirebilmesi için gerekli özellikleri, tümörün sahip olduğu içsel özellikler sayesinde tahmin edilenden çok daha önce kazanabileceği de bildirilmiştir [12, 16]. Ayrıca tüm kanser olgularının % 5’inde görülen ve kökeni bilinmeyen kanserler olarak bilinen bir kanser tipinde; tanımlanabilir bir primer odak olmaksızın vücudun birden fazla bölgesinde metastatik tümör dokularının gelişmesi söz

konusudur [17]. Bu durum, metastaz gerçekleşmesi için gerekli özelliklerin tümör gelişiminden bağımsız olarak kazanılabileceğine işaret etmektedir. Günümüzde kanser gelişiminde farklı birçok mekanizmanın rolü olduğu bilinmektedir. Bu mekanizmalardan bazılarının hem tümör gelişiminde hem de metastaz gerçekleşmesinde rolü olan bazı genleri içermesi, metastatik özelliğin bazen tümör gelişiminin erken basamaklarında gelişebildiğini desteklemektedir [13].

Solid doku tümörleri sadece kanser hücrelerinden ibaret değildir. Makrofajlar, adipositler, mast hücreleri, düz kas hücreleri, fibroblast ve diğer endotelial hücreler de tümör dokusunda yer alır ve tümör hücreleriyle karşılıklı etkileşimin de bir sonucu olarak, tümör gelişiminin erken ve geç evrelerinde hatta metastazda rol oynarlar. Başlıca damarlanmayı artıran anjiogenetik faktörler, ekstrasellüler matriksin yıkımına neden olan matriks metallo-proteazlar ve hücre göçü ile invazyonu artıran hücre yüzey ligandları ile metastazın gerçekleşmesinde rol almaktadırlar [18-21].

Metastatik süreci yönlendiren genetik değişikliklerin belirlenmesinde en akılcı yaklaşımlardan birisi primer tümör dokusu ile metastatik tümör dokusundaki genetik değişikliklerin kıyaslanmasıdır. Fakat primer tümör dokusu ile metastatik tümör dokularının elde edilmesindeki güçlük bu kıyaslama için en önemli sorundur. Metastatik özelliğin kazanılmasının tümör gelişiminin ilerleyen evrelerinde olduğu var sayımından yola çıkıldığında, aynı kanser tipine ait erken ve ileri evre tümör dokularının kıyaslanması da metastazda rolü olan genler hakkında bilgi verici olabilmektedir. Ayrıca tümördeki heterojeniteden yola çıkılarak, metastaz yapma yeteneğine sahip olan ve olmayan hücre tiplerinin bir birinden ayrılması ve bu sub-populasyonların kıyaslanması metastazda rolü olan genlerin belirlenmesi için önemli bir yaklaşımdır. Tüm bu genomik kıyaslamalara ilave olarak gen ekspresyon profillerinin kıyaslanması da metastazda rolü olan genlerin belirlenmesine yardımcı olmaktadır [15].

2.3. Metastaz İlişkili Genler

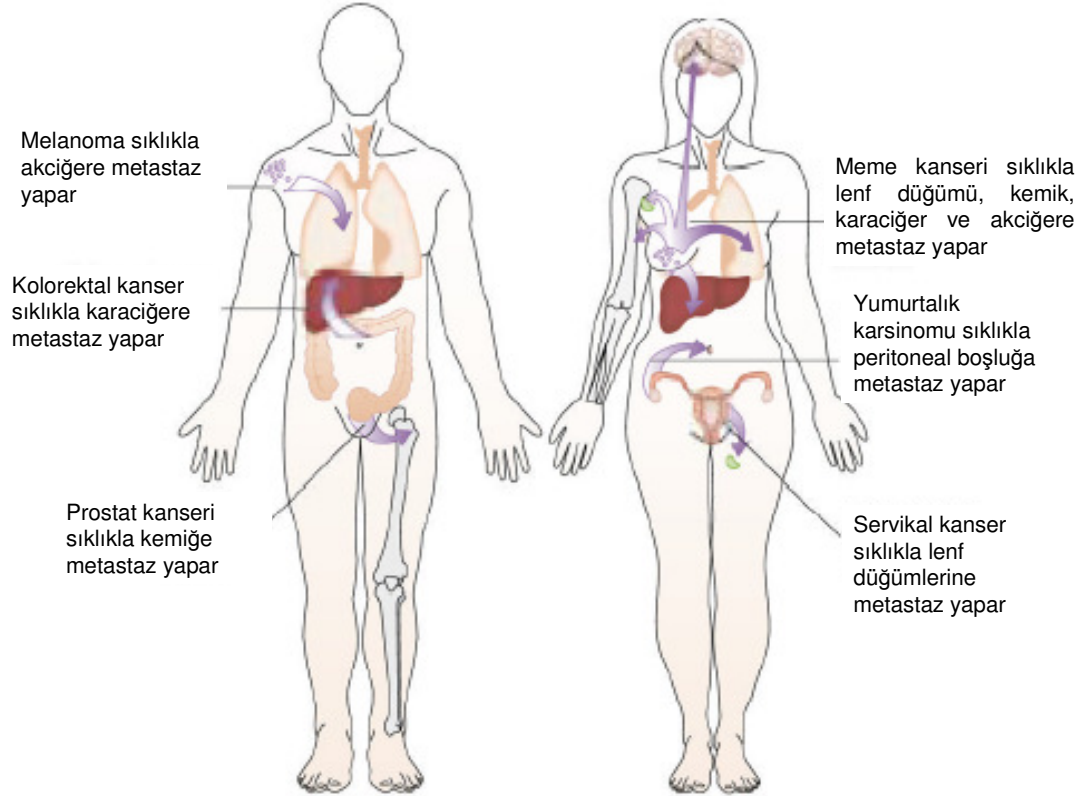
Tümör gelişiminde rolü olan onkogenler ve tümör baskılayıcı genler örneğinde olduğu gibi metastatik süreci aktive eden metastatik genler ile bu süreci engelleyen metastaz baskılayıcı genlerin varlığından da bahsedilmektedir. Metastazla ilişkili genler ilk olarak primer tümör kitlesinin büyümesi üzerine herhangi bir etkisi olmaksızın metastatik süreçte rolü olan genler olarak tanımlanmıştır [10]. Ancak günümüzde sadece metastaz üzerine etkisi olan genler dışında tümör gelişimi üzerine etkisi olduğu bilinen bazı genlerin aynı zamanda metastaz üzerine de etkilerinin olabildiği gösterilmiştir. Dolayısıyla metastatik genlerin tanımı değişebilmektedir [13]. Farklı tümör tiplerinde farklı mekanizmaların metastazın gerçekleşmesinde rolü olabileceği düşünülmesine rağmen temelde korunmuş bir mekanizmanın da olabileceği düşünülmektedir [22]. Metastazla ilişkili genlerin ürünleri, hücre yüzey reseptörleri ile onların ligandları, bu reseptörlerle ilişkili sinyal yolları, hücre dışı matriksini yıkan proteazlar olarak tanımlanmıştır.

Metastaz Baskılayıcı Genler

Genler	Fonksiyonu
Cytoskeletal signaling	Tip II kaderin
Cadherin-11	Proapoptotik enzim
Caspase-8	Transmembran glikoproteini
CD44	Hücreler arası bağlantı molekülü elemanı
Claudin-1, claudin-4	Transkripsiyonel ko-regülatör
CRSP3	İntegrein bağlama
Connective tissue growth factor	Aktin regülatör protein
Gelsolin	Integral membran proteini
E-cadherin, N-cadherin	EGFR desensitizasyonu
KAI1	G-coupled reseptör ligandı
KISS1	MMP lerin negatif regülatörü
RECK	Rho ve Rac' in fonksiyonunu düzenler
RhoGDI2	Rho sinyali için scaffold protein
Src-suppressed C kinase substrate	
Stress-activated signaling	P38 ve/veya JNK' yı aktive eder
JNKK1/MKK4	
MKK6	P38' i aktive eder
MKK7	JNK' yı aktive eder
ERK signaling	
nm23-H1	ERK1/2 aktivasyonunu düşürür
RKIP	MAP/ERK kinaz fosforilasyonunu inhibe eder
PI3K/AKT signaling	
BRMS1	Kromatin yeniden yapılanması
Drg-1	Fonksiyonu bilinmiyor

Metastaz için bazı doku ve organların tercih edilmesinin altında tümörün sahip olduğu hücre yüzey reseptörleri ile bunları tanıyan sitokin ligandlarının rol oynadığı bilinmektedir [24]. 4012 otopsi incelemesi ile değişik dokularda gelişen primer tümörlerin hangi bölgelere metastaz yaptıkları belirlenmeye çalışılmıştır. Bu çalışmanın sonucunda en çok metastazın lokal ve bölgesel lenf düğümlerine gerçekleştiği belirlenmiştir. Karaciğer, akciğer ve kemiğin en çok metastaz gerçekleşen diğer bölgeler olduğu bildirilmiştir. Bu bölgelerin yüksek kan akışına maruz kaldıkları için tercih edildiği ileri sürülmektedir. Mide, vajina, prostat, iskelet kası ve testislerin ise metastaz için en az tercih edilen bölgeler oldukları bildirilmiştir. Ayrıca primer tümör başına en çok metastaz yapan kanser tipleri ise sırasıyla testis, meme, adrenal, deri, akciğer, retroperitoneal, yumurtalık, böbrek, göz ve pankreas olarak bildirilmiştir. Yumurtalık tümörlerinin sıklıkla metastaz yaptığı bölgeler; omentum, periton, kalın ve ince barsaklar ile beyin ve diyafram olarak sıralanmıştır [25]. Yapılan başka bir çalışmada 3 farklı primer tümör tipinin belirgin bir metastatik profili ve metastaz için bir bölgenin baskın bir şekilde tercih edildiği bildirilmiştir. Yumurtalık tümörleri % 91 sıklıkla karın boşluğuna, prostat % 90 sıklıkla kemiğe ve pankreas % 85 sıklıkla karaciğere metastaz yapar. Karın boşluğuna metastaz yapan yumurtalık tümörlerinin % 80' inin sadece bu bölgeye metastaz yaptığı bildirilmiştir. Yumurtalık tümöründe ikinci en sık metastaz lenf düğümleri gerçekleşir ve evre 1 tümürlü hastaların %10,6-24' ünde, evre 2 tümürlü hastaların % 23-50 kadarında, evre III hastaların % 53-74' ü ve evre IV hastaların ise % 65-75 kadarında lenf düğümü tutulumu vardır [26]. Ayrıca diğer kanser tiplerinde de belirgin bir şekilde bir organın tercih edildiği bildirilmiştir. Farklı dokuların kendilerine özgü metastatik profilleri olması iki ayrı teori ile açıklanmaktadır. Birincisi hemodinamik teoridir. Aynı zamanda mekanik teori olarak da bilinen bu teoriye göre, kan akış yönü ve organ drenaj rotası metastatik profilde belirleyici olmaktadır. Bu teori ile sistemik venöz dolaşımın nasıl akciğer metastazına neden olduğu ve gastrointestinal sistem kanserlerinin niçin karaciğere daha sıklıkla metastaz yaptıkları portal ven aracılığıyla açıklanmaktadır. İkinci teori ise toprak ve tohum hipotezidir. Bu teoriye göre ise tümör hücreleri vücudun birçok bölgesine

yayılmakla birlikte sadece tümör dokusu oluşturmasına olanak sağlayabilecek özellikteki dokularda ikincil odakları oluşturarak metastazı gerçekleştirebilmektedir. Primer tümör hücresinin tipi ve ikincil odağın oluşacağı dokunun bu tümör hücrelerine sağlayabileceği olanaklar metastatik profilin belirlenmesinde önemlidir. Bazı kanser tiplerinde mekanik teori metastatik profil açısından daha belirleyici olabilirken, bazılarında ise toprak ve tohum hipotezi gibi doku uyumunun rol oynadığı bir mekanizma daha belirleyici olabilmektedir [27]. Toprak ve tohum hipotezinde heterojen tümör dokusu içerisinde genetik olarak metastatik fenotipi kazanan alt klonların metastaz yapma ve dolayısıyla primer tümör dokusundan belirgin bir şekilde genetik olarak farklı olma eğilimi vardır. Mekanistik modele göre ise metastatik hücreler seçilmiş değildir ve primer tümörden genetik olarak farklı değildir [28]. Günümüzde tümörlerin metastatik profillerini açıklamak için bu iki teori birlikte kullanılmaktadır.



Şekil 2.1. Bazı tümör tipleri belirgin metastatik profile sahiptir.

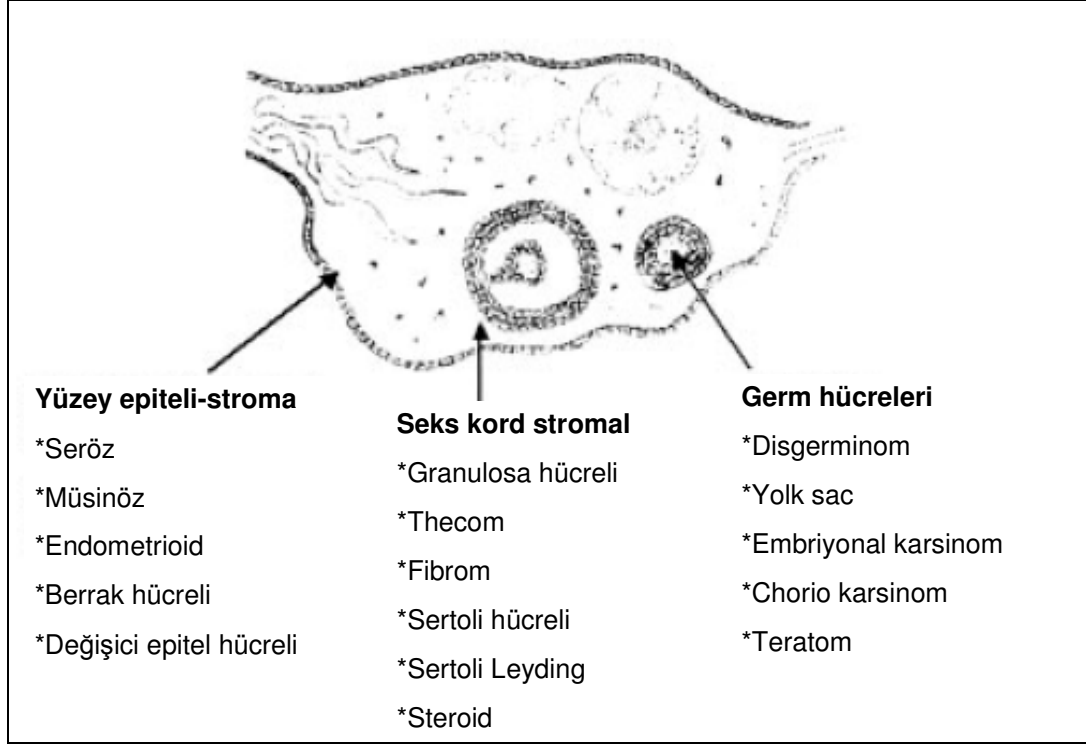
Akciğer ve kemiğe metastaz yapan meme kanseri dokularındaki gen ifadesi profillerine bakıldığında farklılıklar gözlenmiştir. Bu bulgu aynı tümörden köken alsın bile farklı organlara metastaz yapan tümör hücrelerinin tümör dokusundaki heterojenitenin de bir göstergesi olarak birbirinden farklı özelliklere sahip olduğunu ve metastaz için farklı dokuların tercih edilmesinin nedenini göstermektedir. Böylelikle organa spesifik metastazda belirli genlerin rol oynadığı gösterilmiştir [13]. Ayrıca metastazda rolü olan gen ifade profillerinin primer tümörlerde belirlenmesi olası metastazları engellemek amacıyla koruyucu tedavinin verilmesi açısından da önemlidir [29].

Epitelyal yumurtalık tümörü olan olgularda yapılan otopsi çalışması ile epitelyal yumurtalık kanserinin metastatik paterni belirlenmeye çalışılmıştır. Daha önceki çalışmalara paralel olarak abdominal ve retroperitoneal tutulumun en fazla olduğu ancak önceki çalışmalardan farklı olarak karaciğer, akciğer ve perikardiyal tutulumun daha fazla olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada kemoterapide cisplatin alan ve almayan hastaların farklı metastatik yayılım sergiledikleri bildirilmiştir ve cisplatinin bu tümörün metastatik potansiyelini etkilediği ileri sürülmüştür. Toplam 73 hastanın sadece 17' sinde metastazın abdominopelvik bölgede sınırlı olduğu, diğerlerinde ise birden fazla bölgeye yayılmış olduğu bildirilmiştir. Bu durumun incelemenin tanı sırasında değil de, post mortem yapılmasıyla ilişkili olduğu ileri sürülmektedir. Evre 3 ve evre 4 yumurtalık kanserli olgularda metastatik dağılımların bir miktar farklılık gösterdiği bildirilmiştir. Evre 4' yumurtalık kanserli olgularda karaciğer parankimi ve mediastinal lenf düğümü tutulumunun daha fazla olduğu bildirilmiştir [30].

2.4. Yumurtalık Kanseri ve Sınıflandırılması

Yumurtalık dokusu pek çok değişik hücreyi barındırır. Dolayısıyla yumurtalık kanserleri; epitelyal hücreler, germ hücreleri ve seks kord stromal hücreler olmak üzere 3 farklı hücre tipinden köken almaktadır (Şekil 2.2). Epitelyal hücreden köken alan yumurtalık kanserleri tüm yumurtalık kanserlerinin % 90'ından fazlasını oluşturur ve histolojik özelliklerine göre seröz, müsinöz, endometrioid, berrak hücreli, değişici epitel hücreli, mikst, farklılaşmamış ve az farklılaşmış gibi alt tiplere ayrılır. Bunlar içerisinde en sık görülen ise seröz tiptir [3]. Epitelyal yumurtalık tümörleri lenf ve kan yoluyla uzak bölgelere metastaz yapabilirse de en sık peritoneal boşluğa bazen de yakın bölge lenf düğümlerine metastaz yaparlar. Olguların sadece % 2- 3' nde akciğer ve karaciğer gibi uzak bölge metastazları görülmektedir [5].

Malign epitelyal yumurtalık kanserinde hastaların % 70' inden fazlası evre III ve IV gibi ileri evrelerde tanı alırlar ve 5 yıllık sağ kalım oranları % 30' dan azdır [9, 31]. Metastatik süreçte rolü olan moleküler elemanların belirlenmesi hem bu sürecin daha iyi anlaşılabilmesi hem de yeni tedavi yaklaşımları için aday moleküler hedeflerin belirlenebilmesi açısından önemlidir. Yumurtalık kanserinde uygulanan cerrahi işlem ve ilaç tedavisine rağmen hastaların yarısında hastalık tekrar ortaya çıkmaktadır. Hastaların ileri evrelerde tanı almasının yanında kemoterapiye yanıt vermemeleri tekrarlama riskinin birincil nedenidir. İlaç tedavisine dirençliliğin altında yatan moleküler mekanizmaların aydınlatılması da yumurtalık kanserlerinin tedavisinde yeni yaklaşımların belirlenebilmesi açısından önemli olabilecektir.



Şekil 2.2. Kökenlerine göre yumurtalık tümörlerinin sınıflandırılması.

Yumurtalık kanserinin belirtileri erken, geç ve ileri evrelerde farklıdır. Bunlar;

1- Erken evre yumurtalık kanserinin klinik bulguları:

Karın bölgesinde ağrı

Karın bölgesinde doluluk ve şişkinlik hissi

2- Geç evre yumurtalık kanserinin klinik bulguları:

Adet düzensizliği

Karın bölgesinde ağrı

Kabızlık

Sık idrara çıkma

Cinsel birleşme sırasında ağrı

Karın bölgesinde şişkinlik hissi

3- İleri evre yumurtalık kanserinin klinik bulguları:

İştah kaybı

Kabızlık

Yorgunluk hissi

İyi hissetmeme ve hastalık hissi

Yumurtalık kanseri evrelemesi cerrahi yöntemle aşağıda verilen kriterlere uygun olarak yapılır.

Yumurtalık kanseri için FIGO (The Federation Internationale de Gynecologie et d'Obstetrique) tarafından önerilen evreleme yöntemi:

Evre 1: Tümör overlerde sınırlıdır.

1a- Tümör tek overde sınırlı, kapsül invazyonunun olmaması ve/veya asidik sıvıda ya da batın yıkantı sıvısında malign hücre olmaması.

1b- Tümör her iki overde sınırlı, kapsül invazyonunun olmaması ve/veya asidik sıvıda ya da batın yıkantı sıvısında malign hücre olmaması.

1c- 1a veya 1b bulgularına ilave olarak, kapsül invazyonunun olması ve/veya asit sıvısı veya batın yıkantı sıvısında malign hücre olması.

Evre 2: Pelvis içersine ilerlemiş overlerden birini ya da her ikisini birden tutan tümör

2a- Uterus veya tubalara yayılım, asidik sıvıda ya da batın yıkantı sıvısında malign hücre olmaması.

2b- Diğer pelvis içi dokulara yayılım olması ancak asidik sıvıda ya da batın yıkantı sıvısında malign hücre olmaması.

2c- 2a veya 2b bulgularına ilave olarak, overlerden birinin ya da her ikisinin de yüzeyinde tümör olması ya da asit sıvısı veya batın yıkantı sıvısında malign hücre olması.

Evre 3: Bir ya da her iki overdeki tümöre ilave olarak pelvis dışında peritoneal tutunmalar ve/veya retroperitoneal ya da inguinal lenf düğümlerine malign hücre olması.

3a- Lenf düğümleri negatif, tümörün pelviste sınırlı olması ancak batın içine mikroskopik yayılımın varlığı.

3b- Batın içine 2 cm den daha küçük makroskopik yayılımın olması, nodlarda malign hücre olmaması.

3c- Batın içine 2cm den daha büyük makroskopik yayılımın olması ve/veya retroperitoneal ya da inguinal lenf düğümlerinde malign hücre olması.

Evre 4: Bir ya da her iki overdeki tümöre ilave olarak uzak bölge metastazın varlığı (Plevral sıvıda malign hücre olması) [32, 33].

Tablo 2.2. Epitelyal yumurtalık tümörlerinin histolojik sınıflandırılması [34].

1. Seröz tümörler: Seröz benign kistadenomlar Düşük potansiyelli veya borderline malign seröz kistadenomlar Seröz kistadenomlar
2. Musinöz tümörler (Endoservikal benzeri ve intestinal tipler): Musinöz benign kistadenomlar Düşük potansiyelli veya borderline malign musinöz kistadenomlar Musinöz kistadenomlar
3. Endometrioid tümörler (Endometriumda adenokarsinom benzeri tümör): Endometrioid benign kistler Düşük potansiyelli veya borderline malign endometrioid tümörler Endometrioid Adenokarsinomlar
4. Berrak hücreli (mesonephroid) tümörler: Benign berrak hücreli tümörler Düşük potansiyelli veya borderline malign berrak hücreli tümörler Berrak hücreli kistadenokarsinomalar
5. Değişici hücreli (Brenner) tümörler: Benign ya da malign Brenner tümörler Düşük potansiyelli veya borderline malign Brenner tümörler Değişici epitel hücreli karsinomları
6. Miks tip epitelyal tümörler: Benign tümörler Düşük potansiyelli veya borderline malign tümörler Malignant tümörler
7. Farklılaşmamış karsinomlar:
8. Sınıflandırılmayan ve miscellaneous epitelyal tümörler yukarıdaki grupların hiç birisine dâhil edilemeyenler.

Tablo 2.3. Yumurtalık tümörlerinin evrelendirilmesinde FIGO ve UICC-TNM evrelendirme sistemleri [35].

TNM Kategorisi	FIGO Evresi	Özellikleri
Tx		Değerlendirmesi yapılamayan primer tümör
T0		Primer tümör bulgusu olmaması
T1	I	Overlerle sınırlı tümör
T1a	IA	Tümör bir over ile sınırlı olması Kapsül sağlamdır. Over yüzeyinde tümör olmaması
T1b	IB	Tümör her iki overde, kapsül sağlam, over yüzeylerinde tümör olmaması
T1c	IC	Tümör bir veya her iki overle sınırlı olmakla birlikte kapsül yırtılması, yüzeyde tümör olması, periton yıkamasında veya asit sıvısında malign hücre görülmesi gibi durumlardan birinin varlığı
T2	II	Bir veya her iki over tutulumu ve beraberinde pelvik yayılımı olan tümörler
T2a	IIA	Uterus ve/veya tüplere yayılım ve/veya implantasyon
T2b	IIB	Diğer pelvik dokulara yayılım
T2c	IIC	Periton yıkaması veya asitte malign hücre ile birlikte pelvik yayılımı (2a veya 2b)
T3 ve/veya N1	III	Mikroskopik olarak doğrulanmış pelvis peritoneal metastazlar ve/veya bölgesel lenf düğümü + olan bir veya her iki overde yerleşen tümörler
T3a	IIIA	Pelvis dışında mikroskopik periton metastazları
T3b	IIIB	Pelvis dışında en büyük çapı 2 cm veya daha küçük olan makroskopik periton metastazları
T3c ve/veya N1	IIIC	Pelvis dışında en büyük çapı 2 cm' den daha büyük olan periton metastazları ve/veya bölgesel lenf düğümü metastazları
M1	IV	Periton metastazları dışında uzak metastazlar

T-Primer Tümör

N-Bölgesel lenf düğümleri

NX	Bölgesel lenf düğümleri değerlendirilememekte.
N0	Bölgesel lenf düğümü metastazı yok.
N1	Bölgesel lenf düğümü metastazı var.

M-Uzak metastaz

MX	Uzak metastaz değerlendirilememekte.
M0	Uzak metastaz yok.
M1	Uzak metastaz var.

2.5. Borderline Yumurtalık Yüzey Epitel Tümörleri

Tüm yumurtalık tümörlerinin % 10-15 kadarını oluştururlar. İleri evre malign yumurtalık tümörlerine kıyasla daha genç yaşlarda ortaya çıkan, daha iyi prognoza sahip ve olguların % 50-80 kadarında Evre-I ile sınırlı malignite potansiyeli düşük

olan tümörlerdir. En sık görülen histolojik tipi hastaların % 50' sinde görülen seröz tiptir. Müsinöz tip % 46 sında, Miks, endometrioid, berrak hücreli ve brenner tümörleri ise yaklaşık % 4' ünde görülür. Seröz tip borderline yumurtalık tümörleri hastaların % 30' unda bilateraldir ve yine hastaların % 35' inde yumurtalık dışında da lezyonlar bulunabilir [36]. Yumurtalık dışında yerleşebilen bu lezyonlar invaziv ve non-invasiv olabilir. Non-invasiv yumurtalık dışı lezyonları olan hastalarda tekrarlama riski % 18 ve ölüm oranları % 6 iken, invaziv yumurtalık dışı lezyonları olan hastalarda tekrarlama riski % 36, ölüm oranı ise % 25 olarak bildirilmektedir. 5 yıllık sağ kalım oranları seröz ve müsinöz borderline yumurtalık tümörlerinde sırasıyla % 98,4 ve % 97 olarak bildirilmişken, ileri evre seröz ve müsinöz borderline yumurtalık tümörlerinde ise sırasıyla % 92,3 ve % 85,5 olarak bildirilmiştir [37]. Borderline yumurtalık tümöründe hastalığa özgü spesifik bir bulgu olmamakla birlikte, tanı konulduğu anda hastaların % 16' sında her hangi bir bulgu da yoktur [38]. Borderline yumurtalık tümörünün tedavisinde temel uygulama tümörün cerrahi işlem ile çıkartılmasıdır. Tamamlayıcı kemoterapinin tedavideki rolü tam olarak aydınlatılamamıştır ve yalnızca küçük bir kısmında uygulanmaktadır [39, 40].

2.6. Yumurtalık kanseri riskini arttıran durumlar;

- * Menapozdan sonra hormon replasman tedavisi
- * Aile hikâyesinin olması (ailede iki veya üç kişide yumurtalık kanseri varsa risk % 7, anne veya kız kardeşte yumurtalık kanseri varsa risk % 5' dir.)
- * Yağdan zengin beslenme
- * Perine bölgesine talk pudra uygulanması
- * Serum selenyum düzeyinin düşük olması

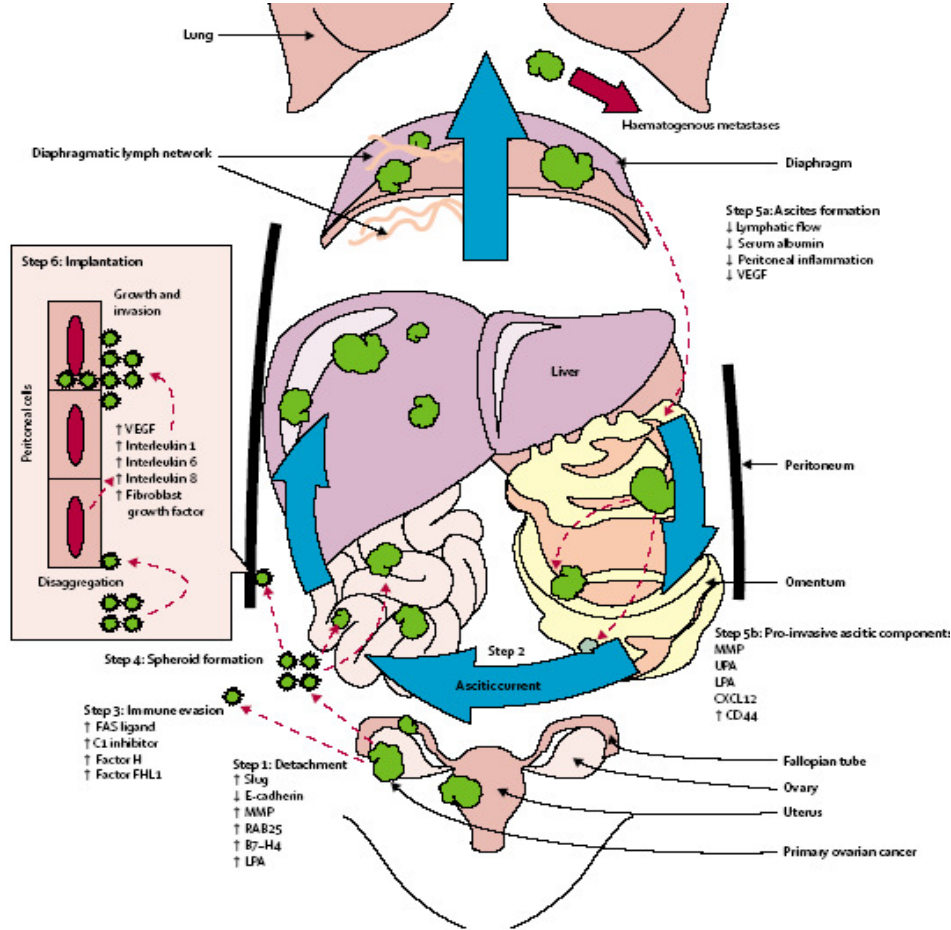
2.7. Yumurtalık kanseri riskini azaltan durumlar;

- * Doğum kontrol ilaç kullanımı
- * Çocuk doğurma ve emzirme
- * Rahmin alınması
- * Tüplerin bağlanması
- * Koruyucu olarak yumurtalıkların alınması
- * Yağlı beslenmeden kaçınma
- * Fertilizan ilaç kullanımından kaçınma

2.8. Yumurtalık Kanseri Yakın Bölge Metastazlarının Mekanizması

Yumurtalık epiteli omentum yüzeyindeki mezotelyal hücreler ile aynı kökene sahiptir ve bu nedenle omentum yüzeyi yumurtalık epitelinin barınması için diğer epitel tiplerine göre daha uygundur. Bu durum epitelyal yumurtalık kanserinin abdominal bölge metastazlarının mekanizmasında, toprak ve tohum hipotezinin önemli rolü olduğunu düşündürmektedir. Ancak bugüne kadar bu konuda yapılan çalışmalardan elde edilen veriler ışığında hem toprak ve tohum hem de mekanistik teorinin özelliklerini birlikte sergileyen bir model tanımlanmıştır. Bu modelde epitelyal yumurtalık tümörünün omentum metastazı 6 basamakta gerçekleşmektedir (Şekil 2.3). Birinci basamak; tümör hücrelerinin primer tümör kitlesinden ayrılması ve bağımsız yaşayabilme özelliği kazanmalarıdır. Bunu başarabilmelerindeki önemli etkenlerden birisi yumurtalık epitelinin epitelyal-mezenşimal değişim geçirerek fibroblast benzeri morfolojik özellikler ile invazyon ve göç edebilme özelliğini kazanabilmeleridir. İkinci basamak; tümör hücrelerinin migrasyonuna kolaylık sağlayacak asit oluşumudur. Üçüncü basamak; immün sistemden kaçmalarıdır. Dördüncü basamak; metastatik tümör hücrelerinin bir araya gelerek küre şeklinde bir

yapı kazanmasıdır ve böylelikle komplement ve antikorlardan kaçarak humoral immün yanıtta kaçabilmektedir. Beşinci basamak; tümör hücrelerinin invazyonu ve sonraki basamakta tutunmasını kolaylaştıracak molekülleri içeren asit içerisinde göçüdür. Altıncı basamak ise; tümör hücrelerinin peritoneal bir yüzeye tutunmasıdır. Tümör hücrelerinin karın boşluğundaki metastazları aynı zamanda uzak bölge metastazları için lenf ve kan damarlarına ulaşmanın da bir yoludur [28].



Şekil 2.3. Yumurtalık kanserlerinde yakın bölge metastazlarının mekanizması [28].

2.9. Epitelyal Yumurtalık Tümörünün Metastazında Rol Oynayan Faktörler

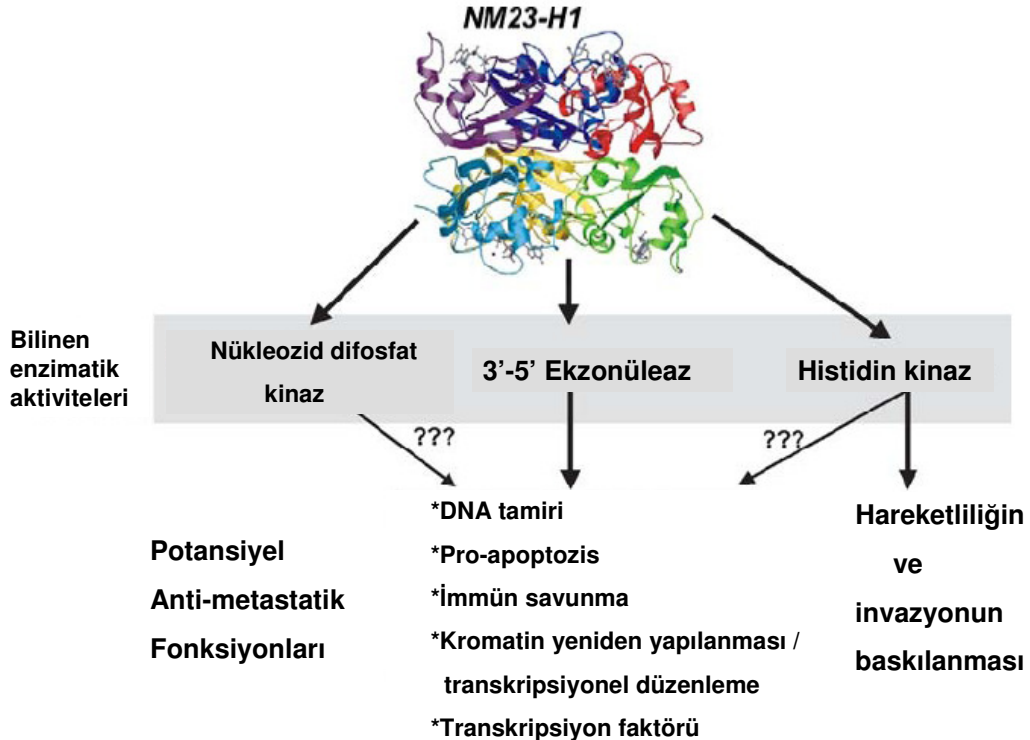
Epitelyal yumurtalık tümörü, çoğunlukla yakın bölgeye metastaz yapması ve hem primer tümör hem de metastatik tümör kitlelerinin tedavi amaçlı çıkarılması nedeniyle, metastazda rolü olan genlerin belirlenmesi açısından gerekli tümör materyallerinin nispeten kolaylıkla elde edilebildiği iyi bir modeldir. İki farklı hücre popülasyonundaki genomik farklılıkların belirlenmesi için klasik karyotip analizi, genoma dağılmış halde bulunan ve bireyler arası farklılık gösteren belirteçlerle (mikrosatellitler vb.) yapılan ve spesifik genomik bölgelerdeki alelik kayıpların belirlenmesine olanak sağlayan heterozigosite kaybının tespiti (LOH; Loss of Heterozygosity), Karşılaştırmalı Genomik Hibridizasyon (CGH) gibi iki farklı hücre popülasyonundaki genomik artış yada azalışların belirlenmesi ve Floresan In Situ Hibridizasyon (FISH), Spektral karyotipleme (SKY) gibi moleküler sitogenetik yöntemler kullanılmaktadır. Ancak yumurtalık kanserinin metastazında rolü olan faktörlerin belirlenmesi için aynı hastadan elde edilen primer tümör ve metastatik tümör dokularında genetik farklılıkların belirlenmesine yönelik bahsedilen tekniklerle yapılmış sistemli ve kapsamlı bir çalışma bulunmamaktadır. Epitelyal

yumurtalık kanserinde peritoneal metastaz sıklığı oldukça yüksek olmasına rağmen, primer tümör ve metastazının gen ifadesi profilindeki değişimleri konu alan çalışma sayısı da oldukça azdır. Bu çalışmalar oldukça küçük çalışma gruplarını kapsamakta ve yumurtalık kanserinin abdomino-pelvik bölge metastazlarının mekanizmalarını açıklamak için yeterli veri sağlamamaktadır [28]. Son dönemde epitelyal yumurtalık tümörünün metastazında rol oynayan faktörleri tanımlamak için aynı hastadan elde edilen primer yumurtalık tümörü ile omentumdan alınan metastatik tümör dokusu arasındaki gen ifadesi profilindeki değişimleri tanımlamak üzere yapılan bir çalışmada; yumurtalıkta lokalize olan primer tümör dokusu ile omentumda lokalize olan metastatik tümör dokuları arasında ekspresyon farklılığı gösteren genleri belirlemek amacıyla 12000' den fazla genin ekspresyon düzeylerinin belirlenmesine olanak sağlayan çip ile hibridizasyona dayalı gen ekspresyon deneyi gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada 20 ileri evre seröz epitelyal yumurtalık kanserli olgudan cerrahi yöntemle alınan taze tümör dokuları kullanılmıştır. İki doku arasında toplam 56 genin ekspresyon farklılığı gösterdiği, bunların 23 tanesinin metastatik tümör dokusunda ifadeleri artmışken 33 tanesinin azaldığı belirlenmiştir. Ayrıca bu 56 genden 20 tanesinin daha önce metastaz ile ilişkili olduğu belirlenmiştir [41]. Aynı konuda yapılan başka bir çalışmada, 4 adet normal yumurtalık dokusu ve 6 adet Evre III C yumurtalık kanserli hastadan elde edilen primer tümör dokusu ile metastatik tümör dokusunda ifadesi değişen genler 12000' den fazla gene ait prob içeren çip ile belirlenmeye çalışılmıştır. Primer tümör dokusu normal dokuyla kıyaslandığında 172 genin ifadesinin 3 kattan fazla değiştiği belirlenmişken omentumdan alınan metastatik tümör dokusu primer tümör dokusuyla kıyaslandığında sadece 35 genin ifadesinin metastatik dokuda arttığı gösterilmiştir bununla birlikte temelde primer tümör ile metastatik tümör dokusunun gen ifade profillerinin benzer olduğu bildirilmiştir [42]. Yumurtalık kanserinin metastazında rolü olabilecek genlerin tanımlanmasına yönelik mikroarray ile gerçekleştirilen global gen ekspresyonu çalışmalarına ek olarak daha önce değişik kanser tiplerinde metastatik süreç ile ilişkili olduğu gösterilmiş olan aday genlerin ifadelerindeki değişimlerin belirlenmesi de önemli bir yaklaşım olmuştur.

2.9.1. *NM23-H1* geni

NM23 geni 1988 yılında metastaz baskılayıcı olarak tanımlanmış ilk genidir [43]. Nükleozid Difosfat (NDP) kinaz olarak da bilinmektedir. İlk olarak mayada tanımlanmış olan bu genin daha sonra memeli dokularında yapılan çalışmalarda farklı elektroforetik profiller sergilemesiyle *NM23-H1* den H8' e kadar 8 farklı izomeri tanımlanmıştır [44]. Ancak bu güne kadar bunlardan sadece *NM23-H1*' in metastazda rolü olduğu gösterilmiştir. *NM23-H1* geni 17q21.3' te lokalize olan 8,5 kb uzunluğunda 5 ekzonlu bir genidir [45]. Aynı zamanda NME1, NDPK-A olarak da isimlendirilmektedir. İlk olarak Melanoma hücre soylarının metastatik potansiyellerinin araştırıldığı bir çalışmada, bu genin mRNA düzeyleri ile metastatik potansiyel arasında ters bir ilişki olduğu 23 nolu klonda belirlenmiş ve buradan yola çıkarak bu gen nonmetastatik klon 23 olarak isimlendirilmiştir. Sonrasında kısaca *NM23* olarak isimlendirilmiştir. *NM23* proteini Nükleozid Trifosfatın Nükleozid Difosfata dönüşümünü katalizleyen bir enzimdir. Memelilerde bir NDP kinaz olarak *NM23* proteininin rol aldığı metabolik yollar; nükleik asit sentezinde ATP kaynağı, GTP ve ADP arasındaki transfosforilasyon reaksiyonu ve protein sentezi için gerekli GTP kaynağının sağlanması olarak tanımlanmıştır [46]. *NM23* geninin metastaz üzerindeki baskılayıcı etkisini nasıl gösterdiği bilinmemekle birlikte bu etkisini NDP kinaz enzimatik aktivitesinin dışında bir fonksiyonu sayesinde yaptığı

düşünülmektedir [47]. Yönlendirilmiş mutagenesis ile yapılan çalışmalarla *NM23-H1* geninin metastaz baskılayıcı etkisini histidin protein-kinaz aktivitesi sayesinde gerçekleştirdiği bildirilmiştir [48]. *NM23-H1* proteinin 3'-5' ekzonükleaz aktivitesine sahip olduğu gösterilmiş ve DNA tamirinde rol aldığı öne sürülmüştür. Şekil 2.4' de *NM23-H1* geninin metastazda hangi mekanizmalarla rol aldığı şematize edilmiştir [49] [50]. *NM23-H1*' in metastaz baskılayıcı etkisini nasıl gösterdiğini araştıran çalışmalarda farklı hücre tiplerinde farklı bulgular elde edilmesiyle *NM23-H1*' in doku spesifik rolü olabileceği ve farklı kanser hücrelerinde farklı mekanizmaların metastaz baskılayıcı etkisini gösterme de rol oynadığı görüşü öne sürülmüştür [51]. Genel olarak *NM23-H1* protein düzeyindeki azalış ile tümör agresivitesi arasında bir ilişki olduğu birçok kanser tipinde gösterilmiş olmasına rağmen, ileri evre tiroid kanserleri gibi bazı örneklerde *NM23-H1* geninin ifadesinin artmış olduğu bildirilmiştir [52]. Bunun dışında, osteosarkom ve nöroblastomda da *NM23-H1* geninin ifadesindeki artış kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir [53]. Günümüzde *NM23-H1* geninin farklı kanser tiplerinde araştırılmasına yönelik çalışmaların artmasıyla farklı kanser tiplerinde farklı bulgular gözlenmiştir. Bu da *NM23-H1*' ün doku spesifik rolünü güçlendirmektedir. Yumurtalık kanserlerinde *NM23-H1*' in rolünü belirlemeye yönelik yapılan çalışmalarda *NM23-H1* geninin ifadesindeki azalışın lenf düğümü metastazını artırdığı bildirilmiştir [54]. Bu konuda yapılan başka bir çalışmada *NM23-H1* gen ifadesi ile yumurtalık kanserindeki ortak klinopatolojik parametreler arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır [55]. Diğer bir çalışmada ise daha önceki bulgulara tümüyle zıt olarak *NM23-H1* gen ifadesindeki artış, epitelyal yumurtalık kanserinde ileri evre invazyon ile ilişkili bulunmuştur [56]. Bu çelişkili bulgular ışığında *NM23-H1* geninin epitelyal yumurtalık kanserindeki rolü belirsiz ve araştırılması gereken bir konu olarak tanımlanmıştır [51].



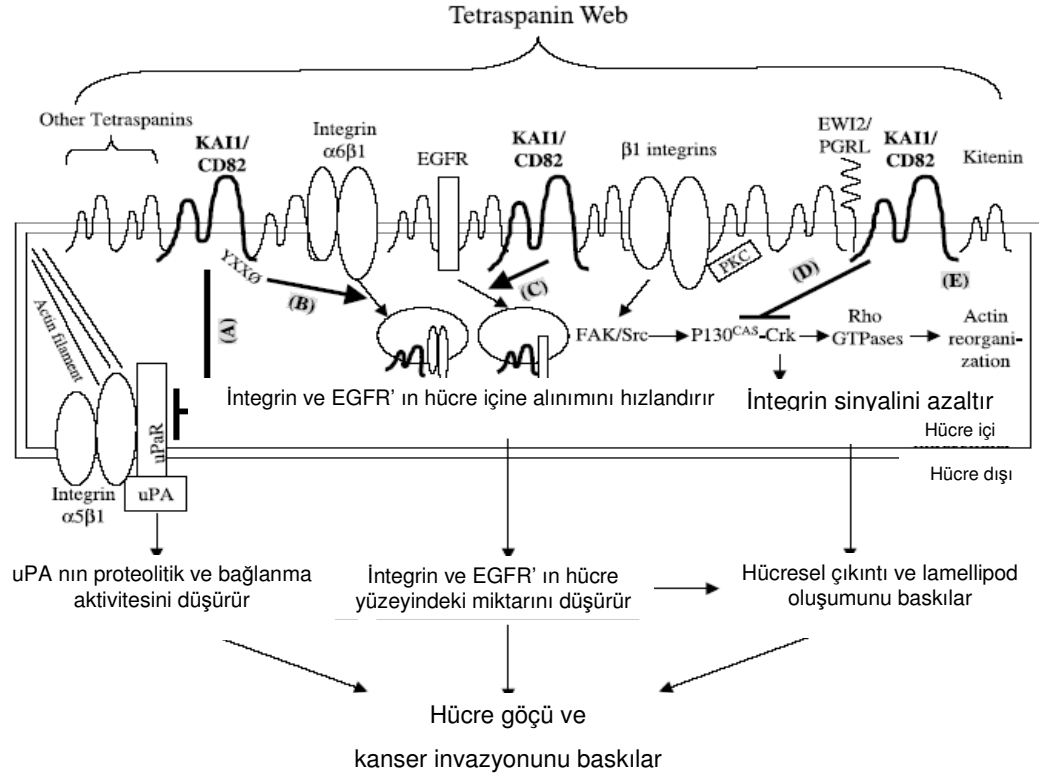
Şekil 2.4. *NM23-H1* geninin farklı mekanizmalarla metastazı baskılanması.

2.9.2. *KAI1* geni

Tetraspanin (TM4SF) süpergen ailesi üyesi olan *KAI1* geni, aynı zamanda CD82, R2, C33, IA4 ve 4F9 olarak da isimlendirilmektedir. 11 nolu kromozomun p11.2 bölgesinde yer almaktadır. Toplamda 80 kb uzunluğunda 10 ekzonlu bir gen dir ve 267 aminoasitlik 4 adet transmembran domaini bulunan bir proteini kodlar [57, 58]. *KAI1* proteini normal dokularda sürekli olarak sentez edilmekle birlikte bazı dokularda yüksek miktarda, yumurtalık dokusunun da içinde olduğu bazı dokularda ise düşük düzeyde ifade edildiği belirlenmiştir. *KAI1* geninin metastaz baskılayıcı özelliği ilk olarak mikro hücre aracılı kromozom transfer tekniği ile *KAI1* geninin lokalize olduğu kromozom bölgesinin metastatik potansiyeli azalttığı belirlenmesiyle anlaşılmıştır [59]. Daha sonraki çalışmalarla ilgili kromozom bölgesinde yer alan *KAI1* geninin ekspresyonunun aşırı derecede metastatik prostat kanseri hücrelerinin primer tümörün büyümesine herhangi bir etkisi olmaksızın akciğer metastazlarını engellediği belirlenmiştir [60]. Birçok solid tümörlerde *KAI1* ekspresyonu iyi prognoz ile ilişkilendirilmesine ilave olarak prostat, mide, kolon, serviks, meme, deri, mesane, akciğer, pankreas, karaciğer ve tiroid kanserlerinde *KAI1* ekspresyonu ile tümörün invaziv ve metastatik potansiyeli arasında pozitif bir ilişki kurulmuştur. Ayrıca in vitro ve hayvan modellerinde yapılan çalışmalarla *KAI1* aşırı sentezlenmesinin hücre göçü ve invazyonunu engellediği böylelikle metastazı baskıladığı gösterilmiştir [61]. Bir tetraspanin gen ailesi üyesi olarak *KAI1* geninin immün yanıt, sinaps oluşumu, sinir hücresi gelişimi ve sperm ile yumurtanın birleşmesi gibi birçok farklı biyolojik olayda işe karıştığı bilinmekle birlikte, hücrelerin birbirine tutunması, birleşmesi ve göçünde ne şekilde rol aldığı bilinmemektedir [62]. *KAI1* geninin hücre göçü ve invazyonunu iki farklı mekanizma ile baskılayarak metastazı engellediği düşünülmektedir. Birincisinde *KAI1*' in hücre hareketliliğini azaltan sinyalleri direk olarak kendisinin başlatması söz konusudur. Her ne kadar *KAI1*' in intrastoplazmik domainlerinde bu tür bir sinyali başlatacak enzim motifi bulunmasa da *KAI1* ligandının olması ve *KAI1*' in monoklonal antibodiler ile bağlanmasıyla hücrede morfolojik değişimlerin meydana gelmesi dolaylı kanıtlar olarak değerlendirilebilir. İkinci olarak ise *KAI1*' in hücre membranında kompleks oluşturduğu integrin ve EGFR gibi proteinlerce başlatılan ya da aracılık edilen sinyalin regülasyonu ile hücre hareketliliğini baskıladığı düşünülmektedir. *KAI1* hücre membranında bir çok molekül ile kompleks oluşturur bu kompleks Tetraspanin Web olarak isimlendirilmektedir. Şekil 2.5' de *KAI1*' in hangi mekanizmalarla anti-metastatik rol oynayabileceği özetlenmiştir [61]. *KAI1* geninin ifadesindeki azalışın nedenleri araştırıldığında, bunun alelik kayıplardan, gen içi mutasyonlardan veya promotor hipermetilasyonu gibi epigenetik bir faktörden kaynaklanmadığı gösterilmiştir [63] [64, 65]. *KAI1* ifadesindeki değişimin transkripsiyonel regülasyondaki değişikliklerden kaynaklandığı düşünülmektedir. Ancak *KAI1* transkripsiyonun düzenlenmesinde çok sayıda faktörün birlikte işe karıştığı anlaşılmıştır. Bunlardan bazıları NFkB, P53, N-CoR, B-Katenin, AP-1 ve AP-2' dir.

Epitelyal yumurtalık kanserinde *KAI1* geni ve ifadesindeki değişimleri belirlemeye yönelik yapılan çalışmalar genelde, immüno histokimyasal boyama yöntemleri ile *KAI1* proteinin miktarını belirlemeye yöneliktir. 32 primer, 8 metastatik epitelyal yumurtalık tümörü ve 18 normal yumurtalık dokusunun kullanıldığı bir çalışmada; *KAI1* protein miktarı ile tümörün histolojik derecesi arasında ters bir ilişki olduğu ve metastazlarda da *KAI1*' in azaldığı bulunmuştur. Ayrıca bu çalışmada, *KAI1* protein lokalizasyonunda tümörün histolojik derecesi

artıkça membrandan stoplazmaya doğru kaydığı gösterilmiş ve bu değişimin malign transformasyon sürecinde tümör hücresinin adhesif özelliğini kaybetmesinde rolü olabileceği öne sürülmüştür [66]. 107 primer epitelyal yumurtalık tümör dokusunun kullanıldığı bir çalışmada KAI1 protein miktarının seröz tip yumurtalık tümöründe diğer histolojik tiplere kıyasla daha fazla azaldığı belirlenmiş ve *KAI1* bağımsız bir prognostik faktör olarak tanımlanmıştır [67]. 11 benign, 11 borderline, 44 primer invaziv ve 8 tekrarlayan epitelyal yumurtalık tümörü olan ve ayrıca prospektif olarak toplanmış 7' sinde abdominal metastaz olan 24 primer invaziv epitelyal yumurtalık tümörü ile yapılan bir çalışmada; *KAI1* ifadesinin genellikle erken evre tümörlerden başlayarak bir azalma gösterdiği ve yumurtalık tümörü gelişiminde rol oynayabileceği ileri sürülmüştür. Bu çalışmada ayrıca bazı primer invaziv ya da tekrarlayan yumurtalık kanserli hastaların örneklerinde *KAI1* ifadesinin hiç değişmediği ya da arttığı belirlenmiştir [61]. Bu bulgular *KAI1* geninin yumurtalık kanseri metastazındaki rolünün anlaşılması için daha fazla çalışma yapılması gerekliliğini ortaya koymaktadır.



Şekil 2.5. *KAI1*' in hücre membranında etkileştiği moleküller ve olası metastaz baskılayıcı mekanizmaları.

2.9.3. *MAP2K4* geni

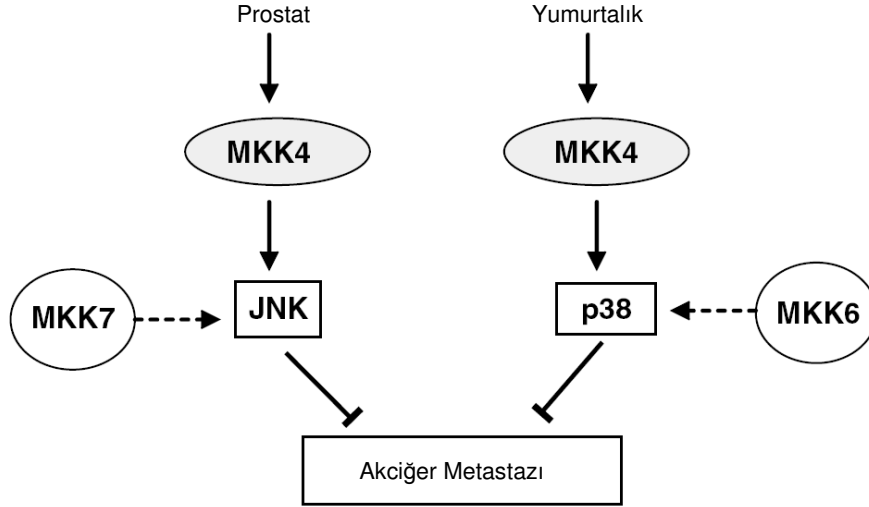
Genomda 17 nolu kromozomun p11.2 bölgesinde ve pozitif zincir üzerinde 123 Kb uzunluğundaki bir bölgede yer almaktadır. Toplamda 399 amino asitten oluşan 11 domain kodlayan bir genidir. *MAP2K4* geni aşağıda sıralandığı gibi birçok farklı şekilde isimlendirilmektedir. C-JUN N-terminal kinaz kinaz 1, İkili spesifik mitojen-aktive protein kinaz kinaz 4, JNK-aktive eden kinaz 1, JNKK 1, JNK kinaz 1, MAPK/ERK kinaz 4, MAP kinaz kinaz 4, MAPKK 4, MEK4, MKK4, Prkmk4, PRKMK4, SAPK/ERK kinaz 1, Sek1, SEK1, Serk1. *MAP2K4* geninin fonksiyonunu araştırmaya yönelik olarak knock out fare modeli oluşturulmaya çalışılmış ancak karaciğer gelişiminde anomali gözlenmiştir. Bu çalışmalar 14. embriyonik günden

önce farenin ölümüyle sonuçlanmıştır. Bununla birlikte *MAP2K4* geninin her iki kopyasının da hasara uğratılarak oluşturulan hücre soyu modelleri *MAP2K4* proteinin hücresel fonksiyonlarının aydınlatılmasında faydalı bir model olarak kullanılmaktadır. *MAP2K4*, mitozu aktive eden protein kinaz (MAPK) ailesinin bir üyesidir ve üç önemli MAPK sinyal yolağı vardır. Birincisi ERK ya da MAPK olarak bilinir. İkincisi p38 kinazlar ve üçüncüsü c-Jun NH2- terminal kinaz (JNK) yolağıdır. Ayrıca; JNK ve p38 ısı, ozmotik dengesizlik, DNA hasarı, bakteriyel infeksiyon ve inflamatuvar sitokinlerin uyarımıyla aktive edilen, stresle aktive olan protein kinaz yolağı (SAPK) olarak bilinirler. *MAP2K4* hücresel stres ile proinflamatuvar uyarılara yanıt olarak, strese bağlı hücresel yanıtın anahtar molekülü olan JNK' i direk olarak fosforiller ve aktive eder. *MAP2K4* proteini beyin ve iskelet kasında bol miktarda olmakla birlikte tüm dokularda eksprese olmaktadır. JNK' in en üst düzeyde aktivasyon gösterebilmesi için threonin ve tirozin rezidülerinden fosforillenmesi gerekmektedir. *MAP2K4*, JNK' nin fosforillenmesinde MKK7 ile birlikte görev alır ve *MAP2K4* daha çok tirozin rezidülerin fosforilasyonundan sorumlu olduğu gösterilmiştir. JNK' nin fosforile edilerek aktive edilmesi ise c-Jun ve ATF2 gibi transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonuna neden olur. Böylelikle strese bağlı hücresel yanıt oluşturulmuş olur [68].

MAP2K4 geninin metastaz ile olan ilişkisi ilk olarak prostat tümöründe *MAP2K4* ekspresyon düzeylerinin Gleason skorlaması ile ters orantılı olduğunun görülmesiyle kurulmuştur. Metastatik epitelyal yumurtalık tümöründen elde edilen patolojik kesitlerde yapılan immüno boyama ile de *MAP2K4* proteinin ekspresyon düzeyinin normal yumurtalık epiteline kıyasla azalmış olduğu gösterilmiştir. Böylelikle *MAP2K4* geninin yumurtalık kanserinin metastazında rolü olabileceğinin düşünülmesiyle yumurtalık tümörü hücre soyları kullanılarak daha detaylı çalışmalar yapılmasının zorunluluğu doğmuştur. *MAP2K4* proteinin sentezlenemediği yumurtalık tümörü hücre soylarında, *MAP2K4* proteinin ektopik ekspresyonu sağlanmıştır. Gerçekleştirilen çalışmalarda, bu hücre soylarının fare modellerindeki metastatik kolonizasyon oluşturma yeteneğine bakılarak, *MAP2K4* geninin metastatik süreçteki rolüne ilişkin olumlu bulgular elde edilmiştir. Ayrıca bu çalışmalar sırasında, *MAP2K4*' in ektopik ekspresyonunun tümör hücresi proliferasyonu ve apoptoz gibi tümörojenik parametreler üzerine bir etkisinin olmadığı da gösterilmiştir. Aynı zamanda *MAP2K4* ekspresyonu olmayan metastatik yumurtalık kanseri hücre soylarında, *MAP2K4* ile aynı metabolik yolda yer alan diğer proteinlerin ekspresyon düzeylerinde bir etkilenme olmadığı gösterilmesi de *MAP2K4*' in SAPK metabolik yolundan bağımsız olarak, metastatik süreçte selektif bir rolü olabileceğine işaret etmektedir [22].

MAP2K4 geninin metastatik sürecin son basamağı olan ikincil dokuda metastatik kolonizasyonu baskılayarak metastaz baskılayıcı gen olma özelliğini gösterdiği ileri sürülmüştür. *MAP2K4* proteinin bilinen fonksiyonuyla yani çeşitli stres uyarılarına maruz kalınmasına yanıt olarak, bu oluşan cevabın anti metastatik etkide rol oynadığı düşünülmektedir. Bu durum hücre içi sinyal yolları ile metastatik sürecin kesişmesi olarak değerlendirilmiştir. Yine de *MAP2K4* proteinin henüz aydınlatılmamış başka bir fonksiyonu aracılığıyla metastaz baskılayıcı özelliğini yerine getirebileceği de vurgulanmaktadır [69]. *MAP2K4* proteinini sentezleyemeyen hücre soylarında, *MAP2K4*' in hedef moleküllerinin aktivasyonunun sağlanması sonucu gerçekleştirilen deneylerle, *MAP2K4* proteinin

prostat ve yumurtalık kanserlerinin metastatik süreçlerinde, farklı mekanizmalarla rol alabileceğini gösteren bulgular elde edilmiştir (Şekil 2.6) [70].



Şekil 2.6. *MAP2K4* geninin farklı organlarda farklı mekanizmalarla metastazda rol alması.

MAP2K4 proteininin sentez edilemediği metastatik yumurtalık kanseri hücre soyu modellerinde, *MKK6* aktivasyonunun *p38* sinyal yolunu aktive ederek metastazı baskıladığı görülmüştür. Bu bulguya dayanarak *MAP2K4*'in aktive ettiği iki hücresel sinyal yolundan *p38* sinyal yolunun metastazın baskılanmasında önemli sinyal yolu olduğu gösterilmiştir. Ayrıca *MAP2K4*'in bilinen kinaz aktivitesi aracılığıyla bu yolun aktivasyonunda ve dolayısıyla metastazın baskılanmasında rol aldığı görüşü öne sürülmüştür. Tüm bunlara ilave olarak, yumurtalık kanseri tedavisinde sıklıkla kullanılan kemoterapötik ajanlardan platinum ve taxane'in yumurtalık kanseri hücre soylarında *JNK* ve *p38* sinyal yollarını aktive ettiği gösterilmiştir. Buna dayanarak iki sinyal yolunun başlangıcında bulunan *MAP2K4*'in aktivasyonuna yönelik yeni yaklaşımların anti-metastatik tedavinin geliştirilmesinde önemli olacağı düşünülmektedir [71]. Proteinin hücredeki miktarının yanı sıra ne kadar aktif olduğu ya da aktive edilebildiği de hücredeki fonksiyonunu yerine getirebilmesi açısından önemlidir. *MAP2K4* proteinin hücredeki miktarının belirlenmesinde *MAP2K4* promotor metilasyonu ve *MAP2K4* geninin alelik kayıplarının belirleyici olacağı düşüncesiyle yumurtalık tümörü örneklerinde LOH analizi ve metilasyon analizi yapılmış ancak her iki etkeninde yumurtalık tümörü hücrelerindeki *MAP2K4* protein miktarının azalmasında belirleyici olmadıkları bulgusuna ulaşılmıştır. Bununla birlikte *MAP2K4*'in serin 80. pozisyonun fosforillenmesinin proteinin fonksiyonunu engellediği ve serin 257 ile treonin 262 den fosforillenmesinin ise proteini aktive ettiği bilinmektedir. Yumurtalık tümörü örneklerinde *MAP2K4*'un 80. pozisyonundaki serin aminoasidinin fosforile formunun toplam *MAP2K4* proteinin % 62' sini oluşturduğu bununla birlikte 257. pozisyonundaki serin ve 262. pozisyonundaki threoninden fosforillenmiş aktif formunun hemen hemen hiç bulunmadığı spesifik antikolarla yapılan western blot çalışmalarıyla gösterilmiştir. Bu bulgular ışığında yalnız protein miktarındaki azalma değil, aynı zamanda *MAP2K4* proteininin farklı bölgelerinden fosforilasyonu aracılığıyla sağlanan regülasyonunun *MAP2K4*'in metastazdaki rolünün aydınlatılmasının önemli olabileceği gösterilmiştir [72].

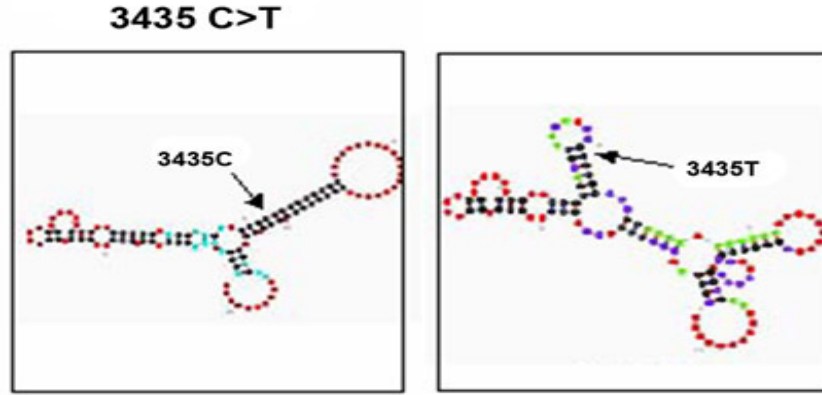
2.10. *ABCB1* (*MDR1*) geni g.3435C>T Polimorfizminin Epitelyal Yumurtalık Tümörünün Tedavisindeki Önemi

Kanser tedavisinde kullanılan antikanser ajanların büyük bir kısmı toksik etkiye sahiptir. Etki mekanizmaları kısaca DNA sentez ve transkripsiyonu baskılama, DNA' da hasar oluşturma ve hücre bölünmesinde önemli rolü olan mitotik iğ iplikçiklerinin organizasyonunu engelleme gibi genel mekanizmalardır. Günümüzde genel etkiye sahip anti-kanser ilaçlar yerine, hedeflenmiş anti-kanser tedavi moleküllerinin geliştirilmesi kanser tedavisindeki güncel yaklaşımların başında gelmektedir. Her ne kadar kanserin ilaç ile tedavisinde önemli gelişmeler olmakta ise de çeşitli nedenlerden ötürü farklı kanser tiplerinde farklı oranlarda olmakla birlikte ilaca yanıtızlık ya da diğ er bir ifade ile dirençlilik gelişebilmektedir. Bu dirençlilik kanser tedavisindeki başarısızlığın başlıca nedenini oluşturmaktadır. Özellikle metastatik kanserlerin % 90' nından fazlasında tedavinin başarısız olmasından ilaç dirençliliğinin sorumlu olduğuna inanılmaktadır. Kimi kanser tiplerinde bu dirençlilik tedavinin başlangıcından itibaren ortaya çıkmakla birlikte kimi kanser tiplerinde ise ilk etapta iyi yanıt alınmasının ardından bir süre sonra dirençlilikle karşılaşmaktadır. Bu durum, başlangıçta ilacın tümör dokusundaki hücrelerin tamamına yakınını öldürmesinin ardından, bir grup hücrenin ilaca karşı kendisini koruyabilecek adaptasyonları gösterebilmesiyle açıklanabilmektedir. Bu hücrelerin yeniden tümör dokusu oluşturmasıyla eski tümör dokusundan kaynaklanan ancak ilaca dirençli yeni bir tümör oluşumundan bahsedilebilir. Normal kök hücrelerin sahip olduğ u özelliklere sahip olup tümör dokusunun yeniden oluşturulmasında rolü olan ve tümörün kimliğini tamamen değiştirerek agresiviteyi arttıran bu hücre grubu kanser kök hücresi olarak nitelenmektedir [73].

Genel olarak kanser hücresine spesifik ilaç dirençliliğinin mekanizmaları; ilacın dışarı atılımındaki artış, içeri alınımındaki azalış, ilaç inaktivasyonu, ilacın hedeflerindeki değişiklikler, ilaçla sağlanan hasarın giderilmesi ve apoptozdan kaçma olarak sıralanmaktadır [33]. Sitotoksik etkiye sahip konvansiyonel anti kanser ajanların vücuttaki emilim, atılım ve dağılımı gibi kinetiğini etkileyen faktörler, genel anlamda ilacın kanser hücresi üzerine etkisini değiştirerek tedaviye verilen yanıt üzerine belirleyici olabilmektedir. Öte yandan kanser hücresinde spesifik bir molekülü hedef alan tedavi yaklaşımlarında, yukarıda bahsedilen farmakokinetik özellikler üzerine olan etkilere ilave olarak, hedef alınan moleküldeki değişkenlikler nedeniyle farklı yanıtlar hatta yanıtızlık ve direnç durumu gelişebilmektedir. Bu direnç ilacın kanser hücresinde istenilen konsantrasyonda olmasına rağmen, farmakodinamik özelliklerindeki değişkenlikten kaynaklanır. Bunun temelindeki neden ise hedef alınan moleküldeki heterojenitedir. Dolayısıyla dirençliliğ e neden olan mekanizmaları başlıca ilacın farmakokinetik ve farmakodinamik özelliklerini belirleyici faktörler olarak iki grupta sınıflandırabiliriz. Bunların da temelinde genetik ve genetik olmayan faktörler yer almaktadır.

Her iki grup anti kanser ajana karşı istenilen yanıtın alınamayışının altında yatan ve ajanın farmakokinetik özelliklerini etkilediğ i düşünölen en önemli genetik faktörlerden birisi ATP bağımlı, hücre yüzeyinde yer alan ATP-Binding Cassette süper gen ailesi üyesi *ABCB1* geni ürünü olan P-glikoproteinidir (P-gp). Normal koşullarda hücreye giren her türlü kimyasal ajanın hücre dışına atılması görevini üstlenmiş olan P-gp' nin hücre için toksik olabilecek birçok kimyasalı substrat olarak kabul ettiğ i, özellikle de antikanser birçok ajanın hücre dışına atılmasında rolü olduğ u gösterilmiştir. P-gp' nin bu özelliğ i ile bu ajanların vücuda alış yoluna bağı

olarak emilimi, atılımı ve vücuttaki dağılımı üzerine etkisi olduğu gösterilmiştir. Bunların yanında kimi kanser tiplerinde P-gp' inin fazla sentezlenmesinin ilacın kanser hücresindeki miktarı ve dolayısıyla ilaca verilen yanıt üzerinde belirleyici etkisi olduğu gösterilmiştir. *ABCB1* geninde, 3435. pozisyondaki C/T değişimi P-gp sentezini etkilediği için en çok araştırılan *ABCB1* gen polimorfizmi olarak gözlenmektedir. Bu genomik değişiklik 26. ekzonda yer alır, ancak amino asit değişikliğine neden olmaz. Bununla birlikte *ABCB1* mRNA' sının üç boyutlu komformasyonel yapısını değiştirmek suretiyle mRNA stabilitesini ve sonuç olarak da P-gp' nin miktarını azaltır (Şekil 2.7). Ayrıca C varyantını taşıyan alelin T' ye göre daha fazla transkribe olduğu böylelikle C alelinin P-gp miktarındaki artışa katkı sağladığı gösterilmiştir [74]. Bu bulgular ışığında *ABCB1* geni 3435C/T genotiplemesinin kemoterapiye dirençliliğin öngörülmesinde ve buna bağlı olarak kişiye özel, doğru ilaç dozu ve kompozisyonu anlamına gelen doğru ilaç rejiminin belirlenmesinde belirleyici bir rolü olduğu kabul edilmektedir.



Şekil 2.7. *ABCB1* geni 3435. pozisyondaki “C” ya da “T” değişiminin *ABCB1* mRNA' sının ikincil yapısını değiştirmesi.

Epitelyal yumurtalık kanserinde, cerrahi işlem ile tümörün çıkarılmasını takiben uygulanan kemoterapiye başlangıçta iyi yanıt alınmış olsa bile hastaların % 50 kadarında hastalığın tekrar ortaya çıktığı bildirilmiştir [75]. Bu kanser türünde görülen dirençliliğin altında yatan mekanizmaların aydınlatılmasıyla, kemoterapinin başarısını arttırarak, hastaliksız yaşam süreleri ve sağ kalım sürelerinin uzatılması amaçlanmaktadır. Bu amaçla yapılan çalışmalarda yumurtalık kanseri tedavisinde yaygın kullanılan ilaçlardan birisi olan paclitaxel' in farmakokinetik özelliklerinin bireyler arasında farklı olmasına *ABCB1* genindeki varyasyonların neden olduğu ve *ABCB1* genotiplemesinin kişiye özel doğru dozun ayarlanmasında kullanışlı olabileceği gösterilmiştir [76]. Paclitaxel birçok toksik yan etkiye sahiptir. Bunun yanında tümör hücresini öldürebilmek için belli miktarda olmalıdır. Bu nedenle ilacın kandaki istenilen düzeyler aralığında olması tedavinin başarısı açısından önemlidir. Bu noktada bireye özgün dozun belirlenmesinde kullanışlı olabilecek genetik ve genetik olmayan faktörlerin belirlenmesi önemlidir. Yumurtalık kanserinde paclitaxel dirençliliği ile *ABCB1* geninin aşırı eksprese olması arasında bir ilişki olduğu kemoterapiye yanıt veren ve tekrarlayan yumurtalık kanseri olgularını içeren çalışma ile gösterilmiştir. Bu çalışmada; ayrıca tekrarlayan yumurtalık kanserli olgulardan elde edilen tümör örneklerinde, hücre kültürü koşullarında paclitaxel kullanımının, cisplatin ve doxorubicine gibi yumurtalık kanseri tedavisinde sıklıkla kullanılan diğer ajanlara kıyasla P-gp sentezini de indüklediği ve paclitaxel dirençliliğinde P-gp' inin önemli rolü olduğu gösterilmiştir

[77]. Epitelyal yumurtalık kanserinde *ABCB1* geni ifadesi ile hastalık ilerleme hızı ve tedaviye yanıt arasında bir ilişki olduğu öne sürülmüştür [78]. Bu nedenle *ABCB1* geni ifadesini direk olarak etkileyen g.3435C>T polimorfizminin prognostik açıdan kullanışlı bir markır olup olamayacağının belirlenmesi önemlidir.

Bu çalışmamızda; metastaz baskılayıcı genler olarak bilinen *NM23-H1*, *KAI1*, *MAP2K4* ve genlerinin metastatik yumurtalık kanserlerinde primer kanser odağı ve varsa aynı hastadan elde edilen metastatik tümör dokularında mRNA düzeylerinin Q-RT-PCR ile belirlenmesi, böylelikle bu genlerin epitelyal over kanserlerinin ortaya çıkışı, progresyonu ve metastazındaki rolü araştırılmıştır. Ayrıca aynı hasta grubunda *ABCB1* geni g.3435C>T polimorfizmine bakılarak tedavi ile ilişkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METODLAR

Bu çalışmada 50 malign epitelyal yumurtalık tümörlü olguda cerrahi yöntemle elde edilen normal, primer tümör ve varsa metastatik dokularda RNA izolasyonunu takiben metastaz baskılayıcı genler olarak bilinen *NM23*, *KAI1* ve *MAP2K4* genlerinin mRNA düzeylerindeki değişimler kantitatif gerçek zamanlı PCR (Q-RT-PCR) tekniği kullanılarak belirlendi. Dokuların tümör veya normal doku olduğundan emin olmak amacıyla, cerrahi işlem ile hastadan alınan tümör dokusunun frozen tekniği ile uzman patoloğlar tarafından patolojik incelemesi yapıldı. Hastalardan izole edilen genomik DNA' lardan farmakogenetik önemi olan *ABCB1* g.3435C>T polimorfizminin varlığı Restriksiyon Endonükleaz Analizi (REA) yöntemi ile araştırıldı. Yeterli miktarda ve uygun koşullarda temin edilebilen örneklerde uzun süreli doku kültürü ile sitogenetik çalışmalar gerçekleştirildi. Ayrıca hastaların patolojik ve klinik bulguları ile uygulanan kemoterapi protokolleri kayıt edilerek deneysel çalışmalardan gelen bulgularla birlikte değerlendirildi. Elde edilen deneysel verilerin klinik ve patolojik bulgularla birlikte değerlendirilmesi için; sayısal değerlerin karşılaştırılmasında Mann-Whitney U testi ve Kruskal Wallis testleri, ikili karşılaştırmalarda Mann-Whitney U testi ile Bonferroni düzeltmesi, nominal verilerin karşılaştırılmasında ise Chi-square testleri kullanılarak istatistiki açıdan değerlendirildi.

3.1. Normal, Primer Tümör ve Metastatik Tümör Dokularından RNA İzolasyonu

Akdeniz Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Kadın Doğum ve Hastalıkları Anabilim Dalı tarafından gerçekleştirilen cerrahi işlem ile çıkarılan tümör dokuları, patolojik incelemesi yapılarak, Anabilim Dalımız Moleküler Genetik Laboratuvarına gönderildi. Gönderilen 40 hastaya ait normal, primer tümör ve varsa metastatik tümör dokularından; manuel yöntem ile taze dokudan RNA izolasyonu gerçekleştirildi. Bunlara ilave olarak, formalin ile fiske edilerek ve parafine gömülerek (FFPE) saklanan patolojik doku arşivlerinden alınan kesitlerle, 10 hastaya ait normal, tümör ve varsa metastatik tümör dokuları çalışıldı. Parafine gömülü dokulardan total RNA izolasyonu kit kullanılarak gerçekleştirildi.

3.1.1. Taze Dokudan RNA İzolasyonu

3.1.1.1. Kullanılan Solüsyonlar:

TRI Reagent (Trizol) (Sigma)

Kloroform (Sigma)

İzopropanol (Sigma)

%70' lik Etanol (Reidel-de Haen)

3.1.1.2. İşlemler:

1. 10 mg büyüklüğündeki doku parçacıkları steril petri kabı içinde bistüri yardımı ile parçalandı.

2. 2 ml' lik steril ependorf içine 500 µl Trizol konuldu. Parçalanmış doku trizol içine eklendi. Doku, homojen bir görünüm alınca kadar mekanik homojenizatör yardımı ile iyice parçalandı.
3. Tamamen homojen bir hale geldikten sonra üzerine 500 µl daha Trizol ilave edildi ve karıştırıldı.
4. Üzerine 200 µl Kloroform ilave edilerek oda ısısında 5 dakika süre ile alt-üst edilerek karıştırıldı.
5. Süre sonunda 12000 rpm' de 15 dakika oda ısısında santrifüj edildi.
6. Santrifüj sonunda üç faz oluşmaktadır. En üstte oluşan faz, RNA' nın bulunduğu faz olup temiz bir 2 ml' lik ependorfa alındı. Üzerine 1:1 oranında İzopropanol eklendi ve alt-üst edilerek karışması sağlandı.
7. Oda ısısında 10 dakika bekletildi.
8. Süre sonunda 12000 rpm' de 10 dakika oda ısısında santrifüj edildi.
9. Santrifüj sonrası üst faz atıldı ve tüpün dibine çökmüş olan RNA üzerine 250 µl %70' lik etanol eklendi.
10. 12000 rpm' de 5 dakika oda ısısında santrifüj yapıldı.
11. Süre sonunda üst faz otomatik pipet yardımıyla atıldı.
12. Alkolün uçması için tüpler 37°C' ye ayarlı etüvde 30 dakika bekletildi.
13. Elde edilen RNA miktarına göre RNaz içermeyen steril distile su eklendi.
14. Oda ısısında 5 dakika bekletilerek RNA' nın çözünmesi sağlandı.
15. 260/280 nm dalga boylarında spektrofotometrik (Shimadzu,UV-1601) ölçüm yapılarak RNA miktarı belirlendi.

3.1.2. FFPE Dokudan RNA İzolasyonu

Kullanılan Kit:

RecoverAll Total Nucleic Acid Isolation Kit (Ambion INC)

Kit İçeriği:

İzolasyon katkı solüsyonu

Sindirme solüsyonu

Yıkama solüsyonu 1

Yıkama solüsyonu 2/3

Toplama tüpleri

Filtreler

DNase inkübasyon solüsyonu

RNase

DNase

Proteaz

3.1.2.1.Yapılan İşlemler

1. Öncelikle deparafinizasyon için parafine gömülü dokulardan 20 mikronluk 4 kesit lam üzerine alınarak, 75°C' ye ayarlanmış etüvde 15 dakika bekletildi.
2. Üzerinde kesitleri taşıyan lamalar 75°C' lik sıcaklığa önceden getirilmiş Ksilen bulduran şaleye alınarak 10 dakika bekletildi.
3. Süre sonunda oda ısısına soğutularak Ksilen değiştirildi ve oda ısısında 10 dakika bekletildi.
4. Ksilen uzaklaştırılarak absolü etanol eklendi ve 15 dakika bekletildi.
5. Absolü etanol değiştirilerek yeni absolü etanolde 15 dakika bekletildi.

6. Alkol uzaklaştırılarak Şaleye su ilave edildi ve 5 dakika oda ısısında bekletildi. Bu işlem 2 defa tekrarlandı. Böylelikle örnekler deparafinize edilerek kit ile kullanım için uygun hale getirildi.
7. Sudan geçirilen lam üzerindeki örnekler bisturi yardımı ile homojenize edilerek 1,5 ml lik ependorf tüpü içine alındı.
8. 400 µl Sindirme solüsyonu' na 4 µl proteaz eklenerek hazırlanan solüsyon tüp içerisine eklenerek 50°C' de 3 saat inkübe edildi.
9. Süre sonunda 480 µl İzolasyon katkı solüsyonu eklenip vorteks yardımıyla iyice karıştırıldı.
10. Beyaz ve bulanık bir görünüm kazanan solüsyon üzerine 1,1 ml lik absöü etanol ilave edilerek pipet yardımıyla karıştırıldı ve bu karışım toplama tüpüne yerleştirilen filtreden yaklaşık 700 µl hacimlerle 3 seferde geçirildi.
11. Filtre üzerine 700 µl Yıkama solüsyonu 1 eklendi ve 10000 rpm de 30 saniye santrifüj yapılarak yıkama yapıldı.
12. Aynı işlem 500 µl Yıkama solüsyonu 2/3 ile tekrarlandı.
13. 6 µl 10X DNase inkübasyon solüsyonu, 4 µl DNase ve 50 µl nükleaz içermeyen su ile hazırlanan solüsyon filtre üzerine eklenerek 30 dakika oda ısısında bekletildi.
14. 11. ve 12. basamaktaki işlemler tekrarlandı.
15. Önceden 95°C' ye getirilmiş Elüsyon tampondan 30 µl filtre üzerine yerleştirilerek maksimum devirde 1 dakika santrifüj yapıldı. Bu basamaktaki işlem tekrar edilerek toplam 60 µl RNA içeren solüsyon elde edildi.
16. 260/280 nm dalga boylarında spektrofotometrik (Shimadzu, UV-1601) ölçüm yapılarak RNA miktarı belirlendi.

3.2. Kantitatif Gerçek Zamanlı PCR (Q-RT-PCR)

3.2.1. cDNA Eldesi

Kullanılan kit:

Taqman Reverse Transcription Reagents (Applied Biosystems)

Kit içeriği:

10X Reverse transkripsiyon tamponu
MgCl₂ (25 mM)
dNTP karışımı (25 mM)
10XRandom Hekzamer (50 mM, 5 nmol)
Multiscribe Reverse Transkriptaz (50 U/µl)
RNaz İnhibitörü (200 U/µl)

cDNA reaksiyonu için PCR koşulları:

10X Reverse transkripsiyon tamponu	5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	11 µl
dNTP karışımı (25 mM)	2,5 µl
10XRandom Hekzamer (50 mM, 5 nmol)	2,5 µl
RNaz İnhibitörü (200 U/µl)	3 µl
Multiscribe Reverse Transkriptaz (50 U/ml)	1.25 µl
Nükleaz içermeyen distile su	23,75 µl
RNA	1 µg

Toplam hacim 50 µl olacak şekilde PCR reaksiyonu kuruldu.

PCR ısı döngüleri:

25 °C' de	10 dakika	1 döngü
37 °C' de	120 dakika	1 döngü
85 °C' de	5 saniye	1 döngü
4 °C' de		∞

3.2.2. Q-RT-PCR Reaksiyonu

mRNA düzeyleri belirlenecek genlerin kantitatif gerçek zamanlı PCR reaksiyonunda kullanılan primer ve prob karışımını içeren solüsyonlar firmadan hazır olarak temin edildi. *NM23-H1* geni için Hs00264824_m1, *KAI1* geni için Hs00174463_m1, *MAP2K4* geni için ise Hs0387426_m1 nolu primer prob karışımlarını içeren kitler kullanıldı (Applied Biosystems). Reaksiyonda iç kontrol olarak Ribozomal RNA' ya ait primer ve prob kullanıldı. Her iki genin aynı tüp içerisinde birlikte çalışılması, hem test edilen genin hem de ribozomal RNA' nın ekspresyon düzeylerinin bir örnekte aynı anda belirlenmesini sağlamıştır.

Kullanılan solüsyonlar:

Universal Master Miks (Applied Biosystems)

Q-RT-PCR koşulları:

<u>Miktar</u>	<u>Stok Derişim</u>	<u>Kullanılan</u>
Üniversal Master Miks	2X	10 µl
Test Geni Primer Prob karışımı	20X	1 µl
Ribozomal RNA Spesifik Primer (İleri)	10 pmol/µl	0,2 µl
Ribozomal RNA Spesifik Primer (Geri)	10 pmol/µl	0,2 µl
Ribozomal RNA Spesifik Prob	10 pmol/µl	0,05 µl
Nükleaz içermeyen distile su		4,6 µl
cDNA		4 µl

Toplam hacim 20 µl olacak şekilde PCR kuruldu.

Hazırlanan PCR reaksiyonu, aşağıda belirtilen sıcaklık döngüleri ile kantitatif gerçek zamanlı PCR cihazında (Applied Biosystems) gerçekleştirildi.

PCR Koşulları:

50 °C	2 dakika	1 Döngü
95 °C	10 dakika	1 Döngü
95 °C	45 saniye	} 1 Döngü
62 °C	45 saniye	
72 °C	1.5 dakika	
95 °C	45 saniye	
61 °C	45 saniye	
72 °C	1.5 dakika	} 1 Döngü
95 °C	45 saniye	
60 °C	45 saniye	
72 °C	1.5 dakika	} 1 Döngü
95 °C	45 saniye	
59 °C	45 saniye	

72 °C	1.5 dakika	}	1 Döngü
95 °C	45 saniye		
58 °C	45 saniye		
72 °C	1.5 dakika	}	1 Döngü
95 °C	45 saniye		
57 °C	45 saniye		
72 °C	1.5 dakika	}	1 Döngü
95 °C	45 saniye		
56 °C	45 saniye		
72 °C	1.5 dakika	}	40 Döngü
95 °C	45 saniye		
55 °C	45 saniye		
72 °C	1.5 dakika		

3.2.3. Q-RT-PCR Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Sonuçlar $2[-\Delta\Delta C(T)]$ ($2^{-\Delta\Delta CT}$) (CT; Treshold Cycle) metodu kullanılarak hesaplandı. Bu metotda; her bir örnek için ayrı ayrı olarak, test edilen genin CT değeri ile endojen kontrol olarak kullanılan rRNA' nın verdiği CT değerleri birbirinden çıkarılarak ΔCT değerleri belirlendi. Benzer şekilde her bir olgudan alınan normal, primer tümör ve metastatik tümör doku örnekleri için ΔCT değerleri belirlendi. Kıyaslanmak istenilen dokulara ait ΔCT değerleri birbirinden çıkartılarak $\Delta\Delta CT$ değerleri hesaplandı. Örneğin bir genin normal doku ile primer tümör dokusu arasındaki mRNA düzeyleri arasındaki farklılığı bulmak amacıyla, normal doku için belirlenen ΔCT değerinden tümör dokusu için belirlenen ΔCT değerinin çıkartılmasıyla artış veya azalış olup olmadığı belirlendi.

3.3. ABCB1 g.3435 C>T Polimorfizminin REA ile Belirlenmesi

3.3.1. Genomik DNA İzolasyonu

Epitelyal yumurtalık tümörlü 40 olgudan operasyon sırasında alınan periferik kan örneklerinden genomik DNA izolasyonu için, yüksek tuz konstrasyonu kullanılarak proteinlerin çöktürülmesi ve DNA' nın alkol ile presipite edilmesi esasına dayanan salting-out yöntemi olarak bilinen bir yöntem kullanıldı. Ayrıca 10 hastaya ait FFPE dokulardan genomik DNA izolasyonu kit ile gerçekleştirildi.

3.3.1.1. Kandan DNA İzolasyonu İçin Kullanılan Çözeltiler

0.5 M EDTA (pH:7.4 - 8.0): 100 ml 0.5 M EDTA solüsyonu hazırlamak için 18.6120 g EDTA (Sigma) 100 ml steril distile su içerisinde çözüldü. Solüsyonun pH'ını 7.4'e ayarlamak için NaOH çözeltisi kullanıldı. Oda sıcaklığında saklandı.

Eritrosit Liziz Tamponu:

155 mM NH₄Cl

10 mM KHCO₃

0.5 M EDTA

1 litre liziz tamponu hazırlamak için 8.28 g NH₄Cl (Sigma), 1 g KHCO₃ (Sigma) ve 4 ml 0.5 M EDTA (Sigma) toplam hacim 1 litre olacak şekilde distile suda çözüldü. Otoklavda steril edildikten sonra +4 °C'de saklandı.

0.1 M NaCl: 100 ml 0.1 M NaCl solüsyonu hazırlamak için 23.4 g NaCl (Sigma) 100 ml steril distile su içerisinde çözüldü. Oda sıcaklığında saklandı.

Lökosit Liziz Tamponu (WBL):

0.1 M NaCl

0.5 M EDTA (pH: 7.4 – 8.0)

100 ml WBL hazırlamak için 2.5 ml NaCl (Sigma), 5 ml EDTA (Sigma) ve 92.5 ml steril distile suda çözüldü. Otoklavda steril edildikten sonra oda sıcaklığında saklandı.

9.5 M Amonyum Asetat Çözeltisi: 36.613 g amonyum asetat (Sigma) 20 ml distile suda çözüldü. Sonra toplam hacim 50 ml'ye tamamlandı. Otoklavda steril edildikten sonra oda sıcaklığında saklandı.

% 10'luk Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) Çözeltisi: 10 g SDS (Sigma) 100 ml distile suda çözüldükten sonra filtreden (Orange Scientific) geçirilerek steril edildi ve oda sıcaklığında saklandı.

Proteinaz K Çözeltisi: 10 mg proteinaz K (Sigma) 1ml steril distile suda çözüldü. Daha sonra 50 µl'lik alikotlara bölünerek -20 °C'de saklandı.

% 70'lik Etanol: 70 ml % 99'luk etanol, 30 ml distile su ile karıştırıldı ve +4 °C'de saklandı.

3.3.1.2. Kandan DNA İzolasyonu İçin Yapılan İşlemler

1. Her bireyden K₃EDTA'lı tüplere 10 ml periferik kan alındı.
2. K₃EDTA'lı tüp içerisindeki 10 ml kan 50 ml'lik santrifüj tüpüne transfer edildi ve transfer edildikten sonra alt üst edilerek homojenize edildi.
3. Üzerine toplam hacim 40 ml olacak şekilde soğuk liziz tamponu ilave edildi ve vorteks aracılığı ile karıştırıldı.
4. 15 dakika -20 °C'de inkübe edildi.
5. 10 dakika 1500 rpm'de +4 °C'de santrifüj (Sigma) edildi.
6. Dökelti atılıp çökelti elle vurularak iyice homojenize edildikten sonra üzerine toplam hacim 20 ml olacak şekilde ikinci kez soğuk liziz tamponu ilave edildi ve vorteks aracılığı ile iyice kısa süreli karıştırıldı.
7. 10 dakika 1500 rpm'de +4 °C'de santrifüj edildi.
8. Dökelti atılıp çökelti iyice karıştırılarak homojenize edildi ve çökeltinin üzerine 9.4 ml WBL tamponu, 500 µl % 10'luk SDS ve 50 µl proteinaz K (20 mg/ml) eklendi.
9. 37 °C'de bir gece etüvde bekletildikten sonra ertesi gün üzerlerine 3.7 ml 9.5 M amonyum asetat çözeltisinden eklendi. Beyaz köpüklü bir görünüm oluşuna kadar elle vurularak iyice karıştırıldı.
10. Oda ısısında 5000 rpm'de 25 dakika santrifüj edildi.
11. Protein içeren çökelti tüpte bırakılarak, DNA'yı bulduran dökelti, mikropipet ile başka bir 50 ml'lik steril santrifüj tüpüne aktarıldı. Üzerine 1:2 oranında saf etanol yavaşça eklendi ve tüp alt üst edilerek DNA'nın toplanması sağlandı.
12. Toplanan DNA, içine 500 µl % 70'lik etanol konulmuş 1.5 ml'lik ependorf tüpüne pipet ucu ile transfer edildi.
13. 10 dakika 13000 rpm'de oda sıcaklığında santrifüj (Sigma) edildi.

14. Santrifüj sonrasında dökelti atıldı ve dipte kalan DNA'dan alkolün uzaklaşması için ependorf tüpünün kapağı açık şekilde yaklaşık 1 saat 37 °C etüvde inkübe edildi.
15. Kurumuş olan DNA üzerine 50-100 µl steril distile su ilave edildi.
16. Yaklaşık 20 dakika 37 °C etüvde DNA çözünmeye bırakıldı.
17. Elde edilen DNA örneklerinin optik dansite (OD) ölçümleri 260 nm'da spektrofotometre (Shimadzu,UV-1601) kullanılarak ölçüldükten sonra, konstrasyonları 500 ng/µl olacak şekilde sulandırılıp uzun süreli -20 °C'de, kısa süreli +4 °C'de saklandı.

3.3.1.3. FFPE Dokulardan DNA İzolasyonu

Kullanılan Kit

RecoverAll Total Nucleic Acid Isolation Kit (Ambion INC)

Kit İçeriği

İzolasyon katkı solüsyonu
Sindirme solüsyonu
Yıkama solüsyonu 1
Yıkama solüsyonu 2/3
Toplama tüpleri
Filtreler
DNase inkübasyon solüsyonu
RNase
DNase
Proteaz

3.3.1.4. FFPE Dokulardan DNA İzolasyonu İçin Yapılan İşlemler

1. Öncelikle deparafinizasyon için parafine gömülü dokulardan 20 mikrometrelik 4 kesit lam üzerine alınarak 75°C' ye ayarlanmış etüvde 15 dakika bekletildi.
2. Üzerinde kesitleri taşıyan lamalar 75°C' ye önceden ısıtılmış Ksilen bulunduran şaleye alınarak 10 dakika bekletildi.
3. Süre sonunda oda ısısına soğutularak Ksilen değiştirildi ve oda ısısında 10 dakika bekletildi.
4. Ksilen uzaklaştırılarak absolü etanol eklendi ve 15 dakika bekletildi.
5. Absolü etanol değiştirilerek yeni absolü etanolde 15 dakika bekletildi.
6. Alkol uzaklaştırılarak şaleye su ilave edildi ve 5 dakika oda ısısında bekletildi. Bu işlem 2 kez tekrarlandı ve böylelikle dokular deparafinize edildi.
7. Sudan geçirilen lam üzerindeki örnekler bisturi yardımı ile homojenize edilerek 1,5 ml lik ependorf tüpü içine alındı.
8. 400 µl Sindirme solüsyonu' na 4 µl proteaz eklenerek hazırlanan solüsyon tüp içerisine eklenerek 50°C' de 48 saat inkübe edildi.
9. Süre sonunda 480 µl İzolasyon katkı solüsyonu eklenip vorteks yardımıyla iyice karıştırıldı. 10. Beyaz ve bulanık bir görünüm kazanan solüsyona 1,1 ml lik absolü etanol ilave edilerek pipet yardımıyla karıştırıldı ve bu karışım toplama tüpüne yerleştirilen filtreden yaklaşık 700 µl hacimlerle 3 seferde geçirildi.
11. Filtre üzerine 700 µl yıkama solüsyonu 1 eklendi ve 10000 rpm de 30 saniye santrifüj edilerek yıkama yapıldı.
12. Aynı işlem 500 µl Yıkama solüsyonu 2/3 ile tekrarlandı.

13. 10 µl RNaseA ve 50 µl nükleaz içermeyen su ile hazırlanan toplam 60 µl hacmindeki solüsyon filtre üzerine eklenerek 30 dakika oda ısısında bekletildi.
14. 11. ve 12. basamaktaki işlemler tekrarlandı.
15. Önceden 95°C' ye getirilmiş Elüsyon tampondan 30 µl filtre üzerine yerleştirilerek maksimum devirde 1 dakika santrifüj yapıldı. Bu basamaktaki işlem tekrar edilerek toplam 60 µl DNA içeren solüsyon elde edildi.
16. 260/280 nm dalga boylarında spektrofotometrik (Shimadzu, UV-1601) ölçüm yapılarak DNA miktarı belirlendi.

3.3.2.1. *ABCB1* g.3435C>T Polimorfizminin (Entrez SNP veritabanı no: rs1045642) REA Yöntemi İle Belirlenmesi İçin İlgili Gen Bölgesinin PCR İle Çoğaltılması

ABCB1 geninin 26. ekzonunda ve 3435. pozisyonundaki C>T değişimini belirleyebilmek için ilgili bölgeyi içerecek şekilde primerler dizayn edildi ve PCR ile ilgilenilen bölge çoğaltıldı. PCR ürünleri agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildi.

PCR koşulları:

10X tampon (NH ₄) ₂ SO ₃	2,5 µl
MgCl ₂ (25mM)	1,5 µl
dNTP mix (10mM)	0,5 µl
primer F (20µmol)	1 µl
primer R (20µmol)	1 µl
Taq polimeraz (Fermentaz) (5U/µl)	0,2 µl
ddH ₂ O	17,7 µl
gDNA (500ng)	<u>1 µl</u>
	25 µl

Primer dizileri:

Primer F: gTAACTTggCAgTTTCAgT

Primer R: CATgCTCCCAggCTgTTTaT

PCR sıcaklık döngüleri:

95 °C 5 dak 1 döngü
95 °C 1 dak }
55 °C 1 dak } 40 döngü
72 °C 2 dak }
72 °C 3 dak 1 döngü

3.3.2.2. PCR ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi İle Kontrol Edilmesi

3.3.2.1.1. Kullanılan Çözeltiler

10X Tris- Borat-EDTA (TBE) Tamponu:

0.089 M Tris-Borat (Sigma)

0.089 M Borik Asit (Sigma)

0.002 M EDTA (Sigma)

500 ml 10X TBE tamponu hazırlamak için 54 g tris-baz, 27.5 g borik asit, 20 ml 0.5 M EDTA (pH:8.0) son hacim 500 ml olacak şekilde distile suda çözüldü. Oda sıcaklığında saklandı.

1X TBE Tamponu: 1X TBE tampon çözeltisi hazırlamak için 10X TBE tampon çözeltisi 1:9 oranında distile su içerisinde seyreltilti. Oda sıcaklığında saklandı.

EtBr (Etidyum-bromid) (Sigma) Çözeltisi: 10 mg EtBr 1ml distile suda çözüldü. Işık geçirmeyen bir şişede +4 °C'de saklandı.

Yükleme Tamponu:

% 0.5 (w/v) ksilen siyanol (Sigma)

% 95 (w/v) formamid (Sigma)

% 5 (w/v) bromfenol mavisi (Sigma)

100 ml yükleme tamponu hazırlamak için 95 ml formamid, 0.5 g ksilen siyanol ve 0.5 g bromfenol mavisi toplam hacim 100 ml olacak şekilde distile suda çözüldü. Çözelti +4 °C'de saklandı.

% 2'lik Agaroz Jel Çözeltisi: 50 ml % 2'lik agaroz jel çözeltisi hazırlamak için 1 gr agaroz (Sigma) 50 ml 1X TBE tamponunda çözelti berrak görünüm kazanıncaya kadar kaynatılarak çözüldü ve sonra 50 °C' ye gelene kadar soğutuldu. Daha sonra stok EtBr solüsyonundan 1 µl ilave edilerek karıştırıldıktan sonra içine tarağı önceden yerleştirilerek hazırlanmış olan elektroforez küvetine boşaltıldı. Agaroz çözeltisi oda ısısında 40-45 dakika polimerizasyon için bekletildikten sonra kullanıldı.

3.3.2.1.2. İşlemler

1. Elektroforez tankına 1X TBE tamponu konuldu. Jel, tarak çıkartıldıktan sonra bu tampon içerisine alındı.
2. 5 µl PCR örneği, 1 µl yükleme tamponuyla karıştırılarak jelde tarağın oluşturmuş olduğu kuyulara yüklenerek yaklaşık 15 dakika 120 volt potansiyel farkında yürütüldü.
3. Örneklerin yürütülme işlemi tamamlandıktan sonra UV ışıkta görüntülenerek PCR sonuçları kontrol edildi.

3.3.3. REA İle ABCB1 g.3435C>T Polimorfizminin Belirlenmesi

İlgili gen bölgesinin PCR ile çoğaltılması ve agaroz jel elektroforezi ile kontrol edilmesinin ardından 3435. pozisyondaki nükleotidin C ya da T olmasına göre kesim yaparak genotiplemede kullanılan Nde-II restriksiyon endonükleaz ile kesim reaksiyonu gerçekleştirildi. Kesim ürünleri agaroz jel elektroforezi ile kontrol edilerek oluşan band paternine göre genotipleme yapıldı.

Enzim reaksiyonu Koşulları:

10X Buffer	5 µl
Nde-II Restriksiyon Endonükleaz	0,2 µl
PCR ürünü	3 µl
ddH ₂ O	<u>1,8 µl</u>
	10 µl

3.3.3.1. Kullanılan Çözeltiler

10X Tris- Borat-EDTA (TBE) Tamponu:

0.089 M Tris-Borat (Sigma)

0.089 M Borik Asit (Sigma)

0.002 M EDTA (Sigma)

500 ml 10X TBE tamponu hazırlamak için 54 g tris-baz, 27.5 g borik asit, 20 ml 0.5 M EDTA (pH:8.0) son hacim 500 ml olacak şekilde distile suda çözüldü. Oda sıcaklığında saklandı.

1X TBE Tamponu: 1X TBE tampon çözeltisi hazırlamak için 10X TBE tampon çözeltisi 1:9 oranında distile su içerisinde seyreltildi. Oda sıcaklığında saklandı.

EtBr (Etidyum-bromid) (Sigma) Çözeltisi: 10 mg EtBr 1ml distile suda çözüldü. Işık geçirmeyen bir şişede +4 °C'de saklandı.

Yükleme Tamponu:

% 0.5 (w/v) ksilen siyanol (Sigma)

% 95 (w/v) formamid (Sigma)

% 5 (w/v) bromfenol mavisi (Sigma)

100 ml yükleme tamponu hazırlamak için 95 ml formamid, 0.5 g ksilen siyanol ve 0.5 g bromfenol mavisi toplam hacim 100 ml olacak şekilde distile suda çözüldü. Çözelti +4 °C'de saklandı.

% 2'lik Agaroz Jel Çözeltisi: 50 ml % 2'lik agaroz jel çözeltisi hazırlamak için 1 gr agaroz (Sigma) 50 ml 1X TBE tamponunda çözelti berrak görünüm kazanıncaya kadar kaynatılarak çözüldü ve sonra 50 °C' ye gelene kadar soğutuldu. Daha sonra stok EtBr solüsyonundan 1 µl ilave edilerek karıştırıldıktan sonra içine tarağı önceden yerleştirilerek hazırlanmış olan elektroforez küvetine boşaltıldı. Agaroz çözeltisi oda ısısında 40-45 dakika polimerizasyon için bekletildikten sonra kullanıldı.

3.3.3.2. İşlemler

1. Elektrofotez tankına 1X TBE tamponu konuldu. Jel, tarak çıkartıldıktan sonra bu tampon içerisine alındı.

2. 5 µl PCR örneği, 1 µl yükleme tamponuyla karıştırılarak jelde tarağın oluşturmuş olduğu kuyulara yüklenerek yaklaşık 15 dakika 120 volt potansiyel farkında yürütüldü.

3. Örneklerin yürütülme işlemi tamamlandıktan sonra UV ışıktaki görüntülenerek PCR sonuçları kontrol edildi.

3.3.3.3. Sonuçların Değerlendirilmesi

PCR ile elde edilen fragment 340 nükleotid uzunluğundadır. Nde-II enziminin PCR ürünü içerisinde aranılan polimorfizm dışında bir kesim noktası daha vardır ve bu bize internal pozitif kontrol görevi görerek enzimin çalışması hakkında bilgi veren bir durumdur. Nde-II enziminin tanıma bölgesi *GATC* dir dolayısıyla enzim C varyantını tanıyarak kesim yapar ve CC genotipine sahip bireylerde 172, 94 ve 76 nükleotid uzunluğunda 3 ayrı fragment oluşur. TT genotipine sahip bireylerde 266 ve 76 nükleotid uzunluğunda 2 ayrı fragment, CT genotipinde ise 266, 172, 94 ve 76 nükleotid uzunluğunda 4 ayrı fragment beklenmektedir. *ABCBI* g.3435C>T

polimorfizminin genotiplenmesinde kullanılan primer dizileri, Nde-II enziminin tanıma bölgeleri, genin intron ve ekzonik dizileri Şekil 3.1' de verilmiştir.

gtaacttgccagtttcagtgtaagaaataatgatgtaattgtgctacattcaaagtgctggtcctgaagttgat'ctgtg
aactctgttttcagCTGCTTGATGGCAAAGAAATAAAGCGACTGAATGTTTCAGTG
GCTCCGAGCACACCTGGGCATCGTGTCCAGGAGCCCATCCTGTTTGACT
GCAGCATTGCTGAGAACATTGCCTATGGAGACAACAGCCGGGTGGTGTC
ACAGGAAGAGAT'CGTGAGGGCAGCAAAGGAGGCCAACATACATGCCTT
CATCGAGTCACTGCCTAATGtaagtctctctcaaa**ataaacagctgggagcatg**

Şekil 3.1. *ABCB1* g.3435C>T polimorfizminin belirlenmesinde kullanılan Nde-II enziminin tanıma bölgelerini (İnternal kesim bölgesi; mavi renkte. Polimorfizmi içine alan kesim bölgesi; büyük ve yeşil renkte), polimorfizm noktası (Altı çizili ve yeşil renkte), primer dizilerini (Kırmızı), genin intron (Küçük harf) ve ekzonik (Büyük harf) dizileri içeren genomik DNA dizisi.

3.3.4. Uzun Süreli Doku Kültürü ve Kromozom Eldesi Çalışmaları

Cerrahi yöntemle elde edilen, RNA ve DNA çalışmaları için ayrılan dokulardan geriye kalan, uygun koşullarda ve yeterli olan normal, primer tümör ve varsa metastatik tümör dokularından primer hücre kültürü ile kromozom elde edilerek karyotip analizine gidildi. Projemizde; metastatik tümör dokusu ile primer tümör dokusu arasında kromozom düzeyindeki genomik değişikliklerin belirlenmesi için sitogenetik analiz yapılması planlanmıştır. Ancak sadece 3 hastadan doku kültürü çalışması için uygun metastatik tümör dokusu temin edilebildi. Bu nedenle sadece 3 metastatik tümör dokusu, 7 normal doku ve 7 primer tümör dokusunda doku kültürü çalışmaları gerçekleştirildi.

3.3.4.1. Primer Hücre Kültürü Çalışmaları

3.3.4.1.1. Besi Ortamı ve Kültür Koşulları

RPMI 1640 medium (Biological Industries)	100 ml
% 10 Fetal Kalf Serum (Biological Industries)	2,5 ml
% 1 Penisilin-Streptomisin Antibiyotik Karışımı (Sigma)	1 ml
% 0,1 Epidermal Büyüme Faktörü (EGF)(Biological Industries)	0,1 ml
L-Glutamin (Sigma)	1 ml

Epidermal Büyüme Faktörü:

100 mg toz haldeki EGF steril distile su ile çözüldükten sonra final konsantrasyonu 20 ng/ml olacak şekilde sulandırılarak ve 0,5 ml lik steril küçük plastik tüplere bölünerek -20 °C' de saklandı.

3.3.4.1.2. İşlemler

Dokular güvenli kabin içerisinde steril koşullarda bisturi yardımıyla parçalandıktan sonra bir miktar besiyeri ile süspanse edilerek T25 (25cm²) flaska aktarılarak ekim yapıldı. % 5 CO₂'li etüvde 37 °C' de ve % 60 nem koşullarında inkübe edildi. Belirli aralıklarla kültürlerde hücrelerin tutunması inverted mikroskop ile kontrol edildi ve gelişen kültürlerde taze besiyeri eskisiyle değiştirildi. Yeterli mitoz oranına sahip kültürler kromozom eldesi için harvest protokolüne alındı.

3.3.4.2. Kromozom Eldesi ve Analizi

3.3.4.2.1. Kullanılan Solüsyonlar

Kolçisin solüsyonu (Biological Industries)
tripsin-EDTA solüsyonu (Sigma)
Hipotonik Solüsyonu (0,06 M KCl (Sigma))
Fiksatif solüsyonu (3/1 oranında Metanol (Sigma), Glasiyal Asetik Asit (Sigma))

3.3.4.2.2. İşlemler

Mikroskopta incelenerek yeterli mitoz oranına sahip olduğuna karar verilen kültürlerle 4 µl hazır kolçisin solüsyonu güvenli kabin içerisinde steril koşullarda damlatıldı ve 3 saat 37 °C etüvde bekletildi. Süre sonunda flask içerisindeki besiyeri dışarı alındı ve flask 5 ml izotonik solüsyon ile yıkandı. izotonik solüsyon uzaklaştırıldıktan sonra 1,5 ml hazır Tripsin-EDTA solüsyonundan flaska ilave edildi ve yüzeyin solüsyon ile kaplanması sağlanarak 37 °C etüvde 10 dakika bekletildi. İverted mikroskopta hücrelerin flasktan ayrıldığı tespit edildikten sonra üzerine 5 ml izotonik solüsyon ilave edildi ve steril cam pastör pipeti ile hücreler 15 ml' lik plastik santrifüj tüpüne aktarıldı. Bir miktar hücre flaskta bırakılarak kromozom eldesi işlemlerinin tekrarlanabilmesi için 5ml taze besi yeri ilave edilerek kültürün başlangıçtaki koşullarda inkübasyonuna devam edildi. 15 ml' lik plastik santrifüj tüpüne alınan hücre süspansiyonu 1200 rpm' de 7 dakika santrifüj edilerek dökelti uzaklaştırıldı. Çökelti süspanse edilerek üzerine 8 ml hipotonik solüsyon ilave edildi ve oda ısısında 10 dakika bekletildi. Süre sonunda 1200 rpm' de 7 dakika santrifüj edilerek dökelti uzaklaştırıldı. Çökelti üzerine 3 ml taze hazırlanmış fiksatif solüsyonu ilave edilerek 1200 rpm' de 10 dakika santrifüj edildi. Bu son basamak 2 defa daha tekrarlandı. Son basamakta çökelti miktarına uygun hacimde fiksatif solüsyonu bırakılarak hücreleri içeren çökelti tekrardan süspanse edildi. Yıkamış ve soğutulmuş lam (Menzel) üzerine hücre süspansiyonundan bir damla yaklaşık 30 cm mesafeden cam pastör pipeti yardımıyla damlatılarak uygun nem ve ısı koşullarında yayma yapıldı. Preparatlar 3 gün 37 °C etüvde bekletilerek yaşlandırma işlemi yapıldı. Kromozomlar yaşlandırma işlemi sonunda GTG bandlama tekniği ile bandlanarak analiz edildi.

GTG Bandlama Tekniği:

Tripsin solüsyonu:

0,1gr toz tripsin (Sigma) tartıldı ve 100 ml pH 7 fosfat tamponunda çözülerek hazırlandı.

Giemsa boya solüsyonu:

4 ml hazır giemsa boyası 1L bidistile suda 9.08gr KH_2HPO_4 ' ün çözülmesiyle hazırlanmış pH 7 Sörensan tamponun 96 ml' sine ilave edilip karıştırılarak hazırlandı.

Preparatlar 30-60 saniye tripsin solüsyonunda bekletildikten sonra akan musluk suyuyla yıkandı ve giemsa boyasında ortalama 4-5 dakika bekletilerek tekrar musluk suyunda yıkandı. Preparatlar özel kurutma kâğıtları (Whatman) ile kurutularak entellan (Merk) aracılığıyla 24x60mm boyutlarındaki lamelle (Menzel) kapatıldı ve ışık mikroskobunda (Olympus) metafazlar analiz edildi.

BULGULAR

Epitelyal yumurtalık kanserli 50 olgudan cerrahi işlem ile elde edilen taze ya da formalin ile fiske edilerek parafinize edilmiş normal, primer tümör ve varsa metastatik tümör dokularından RNA izolasyonunu takiben *NM23-H1*, *KAI1* ve *MAP2K4* genlerinin mRNA düzeyleri Q-RT-PCR yöntemi ile belirlendi. Normal, tümör ve metastatik tümör dokularında Q-RT-PCR ile her 3 gen için elde edilen CT değerleri rölatif kantifikasyon yöntemi ile değerlendirildi. Bu kapsamda, her hasta için normal-primer tümör ve primer tümör-metastatik tümör dokularında her 3 geninde mRNA düzeylerindeki değişimler belirlendi. mRNA düzeylerindeki değişimler hastaların klinik ve patolojik verileri ile birlikte değerlendirilerek, bu genlerin hastalığın evresine ve tümörün histopatolojik tipine göre epitelyal yumurtalık tümörünün oluşumunda, ilerlemesinde ve metastazında rol alıp almadığı araştırıldı. Ayrıca hastalarda *ABCBI* g.3435C>T polimorfizmi belirlenerek, tedavi ile arasındaki ilişki değerlendirildi. Doku kültürü ve sitogenetik çalışmalarda sadece 6 normal doku örneğinde kromozom analizi gerçekleştirilerek 46,XX kromozom kuruluşu belirlendi. Bir normal doku örneğinde tutunma olmadığı için kromozom analizi gerçekleştirilemedi. 7 primer tümör ve 3 metastatik tümör örneğinde kontaminasyon ve tutunmama gibi nedenlerle kromozom elde edilemedi. Bu nedenle, sitogenetik çalışmalarda elde edilen veriler yetersiz olduğundan değerlendirmeye alınmadı.

4.1. Epitelyal Yumurtalık Kanserli Olguların Klinik ve Patolojik Bulguları

Malign epitelyal yumurtalık tümürlü 50 hastanın yaşlarının ortalaması 57,48±10,6 bulundu. 50 hastanın yaşlarına göre dağılımları Tablo 4.1’ de verilmiştir. Hastaların 22’ sinde tümörün histolojik tipi seröz, 10’ unda endometrioid, 5’ inde müsinöz, 6’ sında Miks tip (Endometrioid + Seröz), 2’ sinde Miks tip (Berrak hücreli + Seröz) ve geri kalan 5’ inde borderline seröz (1), borderline müsinöz (4) olarak belirlendi (Tablo 4.2).

Tablo 4.1. Epitelyal yumurtalık kanserli 50 olgunun yaş aralıklarındaki dağılımları

Yaş Aralığı	Hasta Sayısı (%)
38-43	4 (8)
44-48	9 (18)
49-53	4 (8)
54-58	11 (22)
59-63	7 (14)
64-68	7 (14)
69-73	2 (4)
74-79	6 (12)

Tablo 4.2. Epitelyal yumurtalık kanserli 50 olgunun tümörün histolojik alt tiplerine göre dağılımları

Histolojik alt tipi	Olgu Sayısı (%)
Seröz	22(44)
Müsinöz	5 (10)
Endometrioid	10 (20)
Miks tip; Endometrioid + Seröz	6 (12)
Miks tip; Berrak hücreli + Seröz	2 (4)
Borderline, Seröz	1 (2)
Borderline, Müsinöz	4 (8)

FIGO evreleme sistemine göre 41 (% 82) hasta evre III-C, 1 (% 2) hasta evre IV, 2 (% 4) hasta evre III-B, 2 (% 4) hasta evre I-A, 2 (% 4) hasta evre I-B, 1 (% 2) hasta evre I-C ve 1 (% 2) hasta evre II-A olarak evrelendi. 43 (% 86) hastada abdomino-pelvik bölgede metastaz belirlenirken, bu olguların 27' sinde (% 54) aynı zamanda bölgesel lenf düğümü metastazı ve 2 (% 4) tanesinde ise uzak bölge metastazı belirlendi. Hastaların sadece 16' sında (% 32) abdomino-pelvik bölge metastazı olduğu belirlendi. Hastaların tümünde cerrahi işlem ile tümör çıkartıldıktan sonra, evre III ve daha yukarı olanlarda Carboplatin + Paclitaxel 6 x 1 kemoterapi protokolü uygulanmıştır. Tüm hastalara ait bazı klinik ve patolojik veriler Tablo 4.3.' de verilmiştir. Bu tabloda düşük malign potansiyelli borderline tümörlü 6, 18, 19, 20 ve 30 nolu hastalar tablonun sonuna yerleştirilmiştir.

Tablo 4.3. Epitelyal yumurtalık kanserli olguların klinik, patolojik bulguları ve *ABCB1* g.3435 C>T genotipleri.

Hasta No	Yaş	Tümör Evresi (FIGO)	Tümör Histolojik Tipi	TNM	ABCB1 g.3435C>T	Metastaz		
						Om.	Lenf nodu	Uzak bölge
EOC1	46	IIIC	Seröz	pT3c pN1	TT	+	+	
EOC 2	49	IIIC	Miks tip (Endometrioid + Seröz)	pT3 pN1	CC	+	+	
EOC 3	74	IIIC	Seröz	pT3c pN0	TT	+	-	
EOC 4	45	IA	Müsinöz	pT1a pN0	CT	-	-	
EOC 5	47	IIIC	Miks tip (Endometrioid + Seröz)	pT3c pN1	CC	+	+	
EOC 7	48	IIIC	Seröz	pT3c pN1	CT	+	+	
EOC 8	63	IIIC	Miks tip (Endometrioid + Seröz)	pT3c pN1	CC	+	+	
EOC 9	47	IIIB	Seröz	pT3b pN0	CT	+	-	
EOC 10	64	IIIC	Seröz		TT			
EOC 11	54	IIIC	Seröz	pT3c pN1	TT	+	+	
EOC 12	73	IIIC	Miks tip (Berrak hücreli + Seröz)	pT3c pN0	CC	+	-	

EOC 13	69	IIIC	Seröz	pT3c pN1	CT	+	+	
EOC 14	79	IIIC	Seröz	pT3c pN1	CT	+	+	
EOC 15	64	IIIC	Seröz	pT3c pN1	CT	+	-	
EOC 16	48	IIIC	Endometrioid	pT3c pN1	CT	+	+	
EOC 17	65	IIIC	Miks tip (Berrak hücreli + Seröz)	pT3c pN0	CC	+	-	+
EOC 21	56	IIIC	Müsinöz	pT3c pN1	CT	+	+	
EOC 22	47	IIIC	Endometrioid	pT3c pN1	CT	+	+	
EOC 23	68	IIIC	Miks tip (Endometrioid + Seröz)	pT3 pN1	CT	+	+	
EOC 24	63	IIIC	Seröz	pT3c pN1	CT	+	+	
EOC 25	74	IIIC	Seröz	pT3c pN1	CT	+	+	
EOC 26	65	IIIC	Müsinöz	pT3c pN1	TT	+	+	
EOC 27	78	IIIC	Seröz	pT3c pN1	CT	+	+	
EOC 28	72	IIIC	Seröz	pT3c pN1	CT	+	-	
EOC 29	61	IIIC	Miks tip (Endometrioid + Seröz)	pT3 pN1	CT	+	+	
EOC 31	56	IIIC	Seröz	pT3c pN1	CT	+	+	
EOC 32	63	IIIC	Endometrioid	pT3c pN1	CC	+	+	
EOC 33	38	IIIC	Seröz	pT3c pN1	CT	+	+	
EOC 34	45	IIA	Müsinöz	pT2a pN0	CT	-	-	
EOC 35	55	IIIC	Seröz	pT3c pN1	CT	+	+	
EOC 36	49	IIIC	Seröz	pT3c pN1	CT	+	+	
EOC 37	65	IIIC	Miks tip (Endometrioid + Seröz)	pT3c pN0	CC	+	-	
EOC 38	74	IIIC	Seröz	pT3c pN0	TT	+	-	
EOC 39	49	IIIC	Seröz	pT3c pN0	CT	+	-	
EOC 40	41	IIIC	Endometrioid	pT3c pN0	CC	+	-	
EOC 41	55	IIIC	Endometrioid	pT3c pN1	CT	+	+	

EOC 42	56	IIIC	Endometrioid	pT3c pN0	CT	+	-	
EOC 43	68	IIIB	Seröz	pT3b pN0	TT	+	-	
EOC 44	61	IIIC	Endometrioid	pT3c pN0	TT	+	-	
EOC 45	57	IIIC	Endometrioid	pT3c pN0	CT	+	-	
EOC 46	58	IIIC	Endometrioid	pT3c pN1	TC	+	+	
EOC 47	60	IIIC	Seröz	pT3c pN0	CC	+	-	
EOC 48	39	IIIC	Endometrioid	pT3c pN1	TT	+	+	
EOC 49	58	IV	Seröz	pT4 pN1 M1	CC	+	+	+
EOC 50	59	IIIC	Müsinöz	pT3c pN0	CC	+	-	
EOC 6 *	55	IB	Borderline, Müsinöz	pT1b pN0	CC	-	-	
EOC 18 *	53	IC	Borderline, Seröz	pT1c pN0	TT	-	-	
EOC 19 *	43	IB	Borderline, Müsinöz	pT1b pN0	CC	-	-	
EOC 20 *	44	IA	Borderline, Müsinöz	pT1a pN0	TT	-	-	
EOC 30 *	54	IIIC	Borderline, Müsinöz	pT3c pN1	TT	+	+	

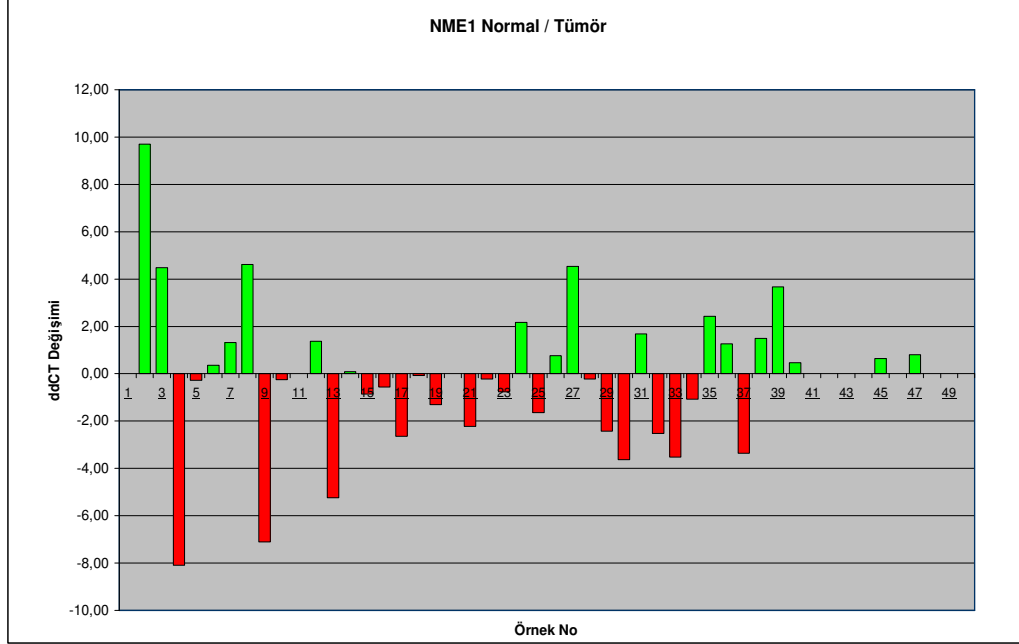
* Borderline yumurtalık yüzey epiteli tümürlü hastalar.

4.2. Normal, Primer Tümör ve Metastatik Tümör Dokularında *NM23-H1*, *KAI1* ve *MAP2K4* Genlerinin mRNA Düzeyleri

Tüm olgularda her 3 genin normal, primer tümör ve metastatik tümör dokularında mRNA düzeylerindeki değişimler ilk olarak hastalığın evresi, histolojik alt tipi ya da diğer klinik parametrelerden bağımsız şekilde verilecek, takip eden bölümde ise klinik bulguları ile birlikte değerlendirilecektir.

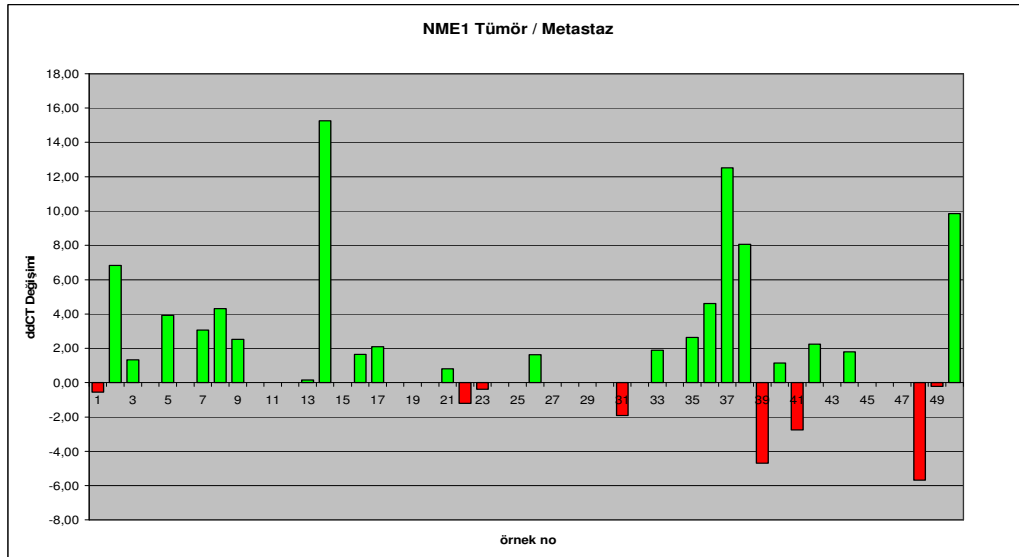
4.2.1. *NM23-H1* Geni mRNA Düzeylerindeki Değişimler

Malign epitelyal yumurtalık tümürlü hastaların hem normal hem de primer tümör dokularına ait örneklerden Q-RT-PCR ile *NM23-H1* geni için 50 hastanın 39'undan (% 78) bilgi verici sonuç alındı. Diğer 11 hastanın 3 tanesinde normal dokusu elde edilemediğinden, geri kalan 8 tanesinde ise sadece normal ya da primer tümör örneğinden sonuç elde edildiği için değerlendirmeye alınmadı. Düşük malign potansiyelli Borderline 4 hasta değerlendirme dışı bırakıldı. Tümörün histolojik tipinden ve hastalığın evresinden bağımsız olarak değerlendirildiğinde, *NM23-H1* geninin mRNA miktarının tümör dokusunda normal dokuya kıyasla 17 hastada (% 48) ortalama 2.44 kat arttığı, geri kalan 18 hastada (% 52) ortalama 2,39 kat azaldığı belirlendi. Tüm hastalardaki *NM23-H1* geni mRNA miktarının tümör ve normal doku arasındaki değişim oranları Şekil 4.1' de verilmiştir.



Şekil 4.1. Malign epitelyal yumurtalık tümörlü hastalarda, *NM23-H1* geninin Q-RT-PCR ile belirlenen mRNA miktarlarının primer tümör ile normal doku arasındaki değişim oranları.

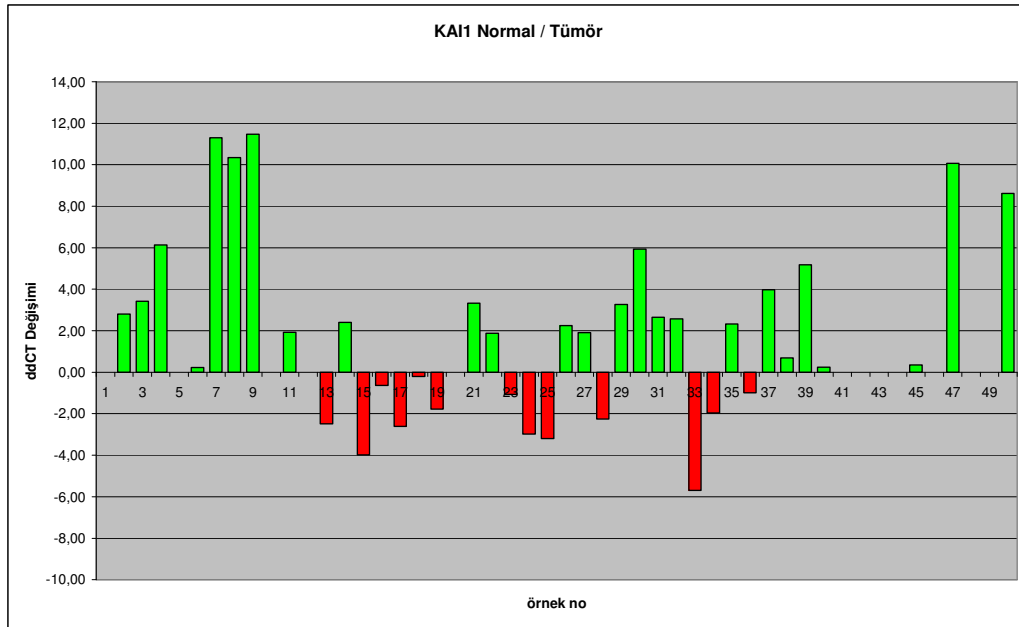
50 hastanın hem primer tümör hem de metastatik tümör dokularında Q-RT-PCR yöntemi ile *NM23-H1* geni mRNA düzeylerine bakıldığında 29 (% 58) hastada sonuç alındı. Diğer 21 hastanın 15 tanesinde metastatik tümör dokusu elde edilemediğinden, geri kalan 6 tanesinde ise sadece primer tümör ya da metastatik tümör dokusunda sonuç elde edildiği için değerlendirmeye alınmadı. Tümörün histolojik tipinden ve hastalığın evresinden bağımsız olarak değerlendirildiğinde, *NM23-H1* geninin mRNA miktarının metastatik tümör dokusunda, primer tümör dokusuna kıyasla 8 hastada (% 27.5) ortalama 2.17 oranında azaldığı, geri kalan 21 hastada (% 72.5) 4,20 oranında arttığı belirlenmiştir. Tüm hastalardaki primer tümör ve metastatik tümör dokusu arasındaki değişim oranları Şekil 4.2’ de verilmiştir.



Şekil 4.2. Malign epitelyal yumurtalık kanserli hastalarda, *NM23-H1* geninin Q-RT-PCR ile belirlenen mRNA miktarlarının primer tümör ile metastatik tümör dokuları arasındaki değişim oranları.

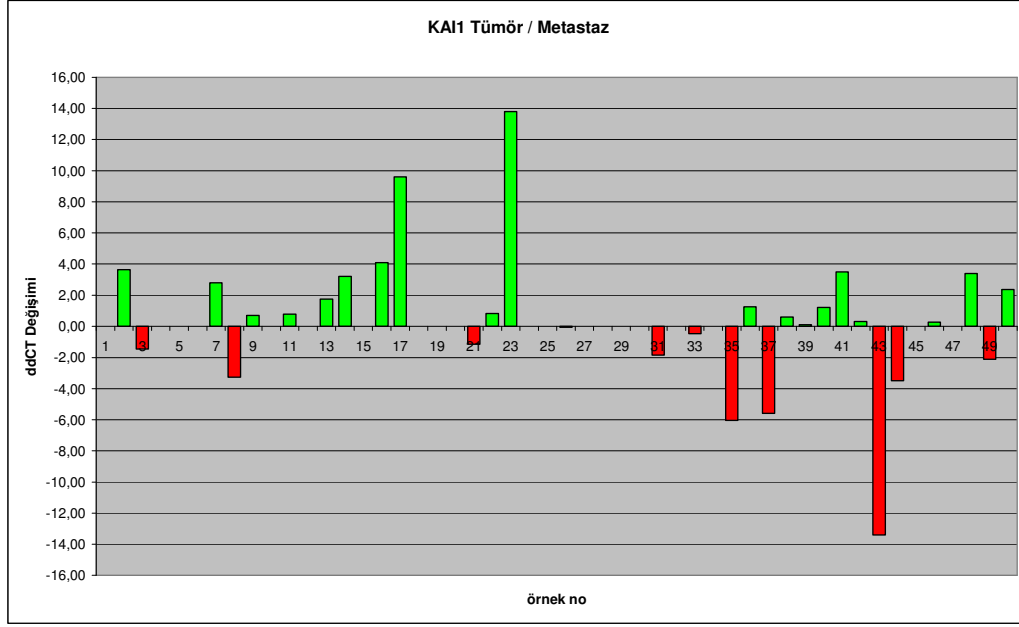
4.2.2. *KAI1* Geni mRNA Düzeylerindeki Değişimler

Malign epitelyal yumurtalık tümörlü hastaların hem normal hem de primer tümör dokularına ait örneklerden Q-RT-PCR ile *KAI1* geni için 50 hastanın 38'inden (% 76) bilgi verici sonuç alındı. Diğer 12 (% 24) hastanın 3 tanesinde normal dokusu elde edilemediğinden, geri kalan 9 tanesinde ise sadece normal ya da primer tümör dokusunda sonuç elde edildiği için değerlendirmeye alınmadı. Düşük malign potansiyelli Borderline 4 hasta değerlendirme dışı bırakıldı. Tümörün histolojik tipinden ve hastalığın evresinden bağımsız olarak değerlendirildiğinde, *KAI1* geninin mRNA miktarının primer tümör dokusunda normal dokuya kıyasla 11 (% 32) hastada ortalama 2,53 kat azaldığı, geri kalan 23 (% 68) hastada ortalama 4,30 kat arttığı belirlenmiştir. Tüm hastalardaki *KAI1* geni mRNA miktarının primer tümör ve normal doku arasındaki değişim oranları Şekil 4.3' te verilmiştir.



Şekil 4.3. Malign epitelyal yumurtalık tümörlü hastalarda, *KAI1* geninin Q-RT-PCR ile belirlenen mRNA miktarlarının primer tümör ile normal doku arasındaki değişim oranları.

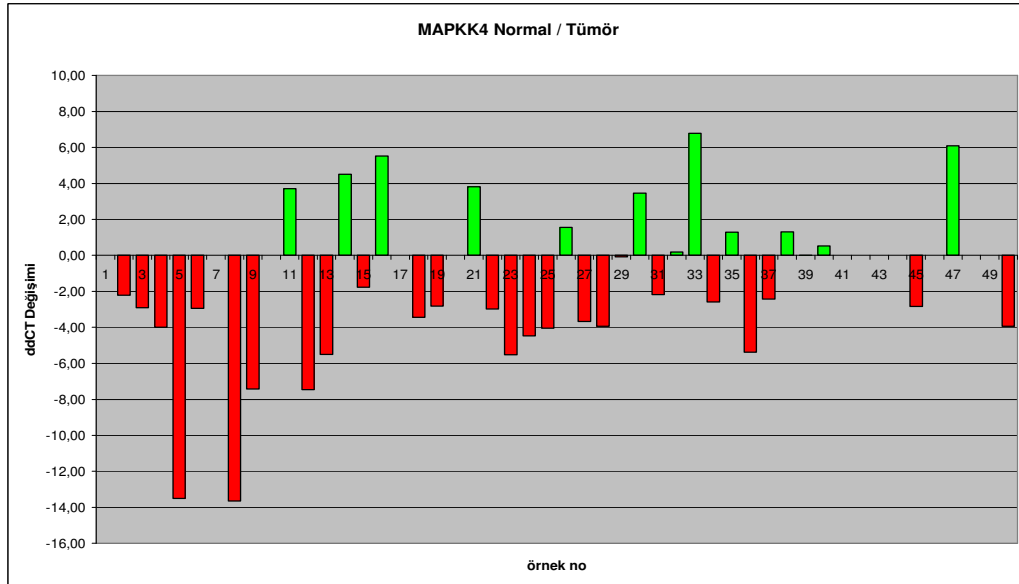
50 hastanın hem primer tümör hem de metastatik tümör dokularında Q-RT-PCR yöntemi ile *KAI1* geni mRNA düzeylerine bakıldığında 31 (% 62) hastada sonuç alındı. Diğer 19 hastanın 15 tanesinde metastatik tümör dokusu elde edilemediğinden, geri kalan 4 tanesinde ise sadece primer tümör ya da metastatik tümör dokusunda sonuç elde edildiği için değerlendirmeye alınmadı. Tümörün histolojik tipinden ve hastalığın evresinden bağımsız olarak değerlendirildiğinde, *KAI1* geninin mRNA miktarının metastatik tümör dokusunda, tümör dokusuna kıyasla 11 (% 35.5) hastada ortalama 3,53 oranında azaldığı, geri kalan hastaların 19'unda (% 61.3) 2,85 oranında arttığı belirlenmiştir. Ayrıca 1 (% 3.2) hastada herhangi bir değişim belirlenmemiştir. Tüm hastalardaki primer tümör ve metastatik tümör dokusu arasındaki değişim oranları Şekil 4.4' de verilmiştir.



Şekil 4.4. Malign epitelyal yumurtalık tümürlü hastalarda, *KAI1* geninin Q-RT-PCR ile belirlenen mRNA miktarlarının primer tümör ile metastatik tümör dokuları arasındaki değişim oranları.

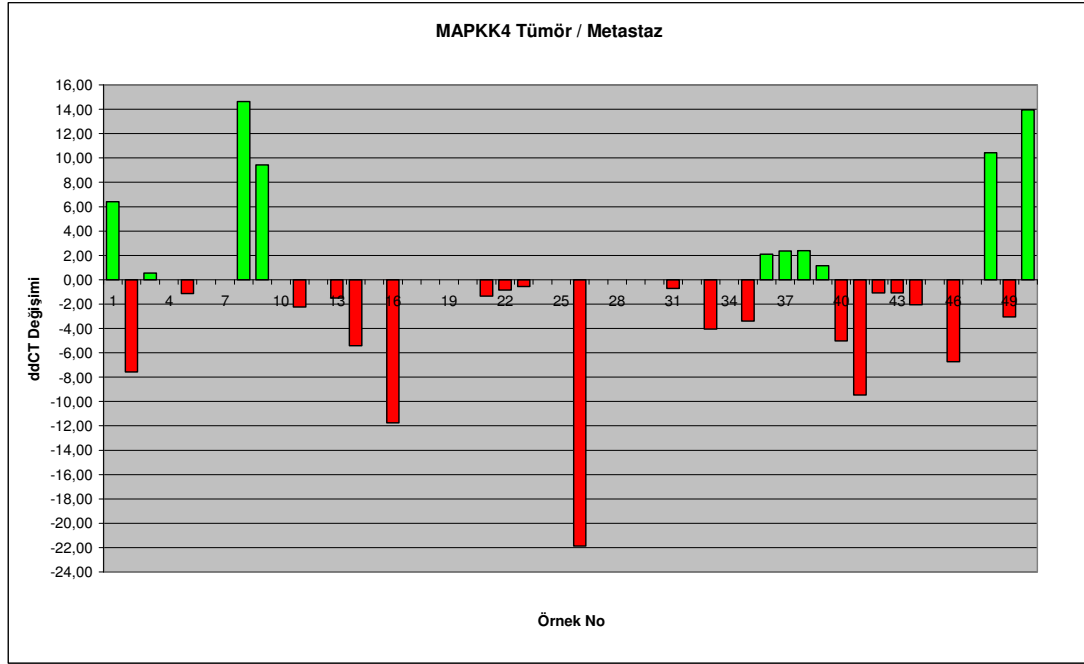
4.2.3. *MAP2K4* Geni mRNA Düzeylerindeki Değişimler

Malign epitelyal yumurtalık tümürlü hastaların hem normal hem de primer tümör dokularına ait örneklerden Q-RT-PCR ile *MAP2K4* geni için 50 hastanın 38'inden (% 76) bilgi verici sonuç alındı. Diğer 12 (% 24) hastanın 3 tanesinde normal dokusu elde edilemediğinden, geri kalan 9 tanesinde ise sadece birer örneğinde sonuç elde edildiğ i için değerlendirmeye alınmadı. Düşük malign potansiyelli Borderline 4 hasta değerlendirme dışı bırakıldı. Tümörün histolojik tipinden ve hastalığın evresinden bağımsız olarak değerlendirildiğ inde, *MAP2K4* geninin mRNA miktarının primer tümör dokusunda normal dokuya kıyasla 12 (% 35) hastada ortalama 2,94 kat arttığ ı belirlenmişken, geri kalan 22 (% 65) hastada ortalama 4,52 kat azaldığı belirlenmiştir. Tüm hastalardaki *MAP2K4* geni mRNA miktarının primer tümör ve normal doku arasındaki değişim oranları Şekil 4.5' te verilmiştir.



Şekil 4.5. Malign epitelyal yumurtalık tümürlü hastalarda, *MAP2K4* geninin Q-RT-PCR ile belirlenen mRNA miktarlarının primer tümör ile normal doku arasındaki değişim oranları.

50 hastanın hem primer tümör hem de metastatik tümör dokularında Q-RT-PCR yöntemi ile *MAP2K4* geni mRNA düzeylerine bakıldığında 30 (% 60) hastada sonuç alındı. Diğer 20 (% 40) hastanın 15 tanesinde metastatik tümör dokusu elde edilemediğinden, geri kalan 5 tanesinde ise sadece primer tümör ya da metastatik tümör dokusunda sonuç elde edildiği için değerlendirmeye alınmadı. Tümörün histolojik tipinden ve hastalığın evresinden bağımsız olarak değerlendirildiğinde, *MAP2K4* geninin mRNA miktarının metastatik tümör dokusunda, primer tümör dokusuna kıyasla 20 (% 66,6) hastada ortalama 4,54 oranında azaldığı, geri kalan 10 (% 33,3) hastada 6,34 oranında arttığı belirlenmiştir. Tüm hastalardaki primer tümör ve metastatik tümör dokusu arasındaki değişim oranları Şekil 4.6' de verilmiştir.

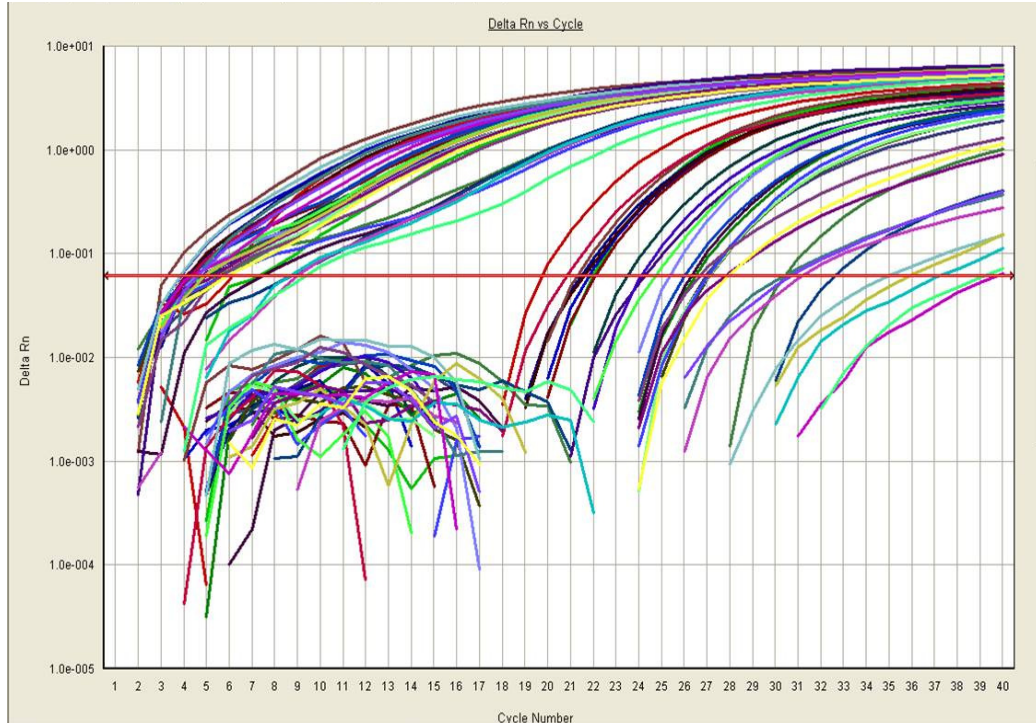


Şekil 4.6. Malign epitelyal yumurtalık tümörlü hastalarda, *MAP2K4* geninin Q-RT-PCR ile belirlenen mRNA miktarlarının primer tümör ile metastatik tümör dokuları arasındaki değişim oranları.

Q-RT-PCR'da endojen kontrol olarak kullanılan rRNA' ya ait amplifikasyon eğrileri PCR' ın daha erken evrelerinde ve birbirlerine daha yakın siklularda eşik değerini aşarken, test edilen genler PCR' ın daha geç evrelerinde eşik değerini aştığı ve daha geniş bir dağılım gösterdiği izlenmiştir (Şekil 4.7 ve Şekil 4.8).



Şekil 4.7. İki ayrı dokudan elde edilen cDNA ile gerçekleştirilen Q-RT-PCR’da CT değerlerinin belirlenmesinde kullanılan amplifikasyon eğrileri. Normal ve primer tümör dokularındaki endojen kontrol olarak kullanılan rRNA’ ya ait amplifikasyon eğrileri aynı CT değerine sahipken, test edilen gene ait eğriler farklı dokularda farklı CT değerlerine sahiptir. Aralarındaki fark ilgili genin mRNA düzeyindeki farklılığı yansıtmaktadır.



Şekil 4.8. Q-RT-PCR’ daki amplifikasyon eğrileri: rRNA’ ya ait amplifikasyon eğrileri PCR’ ın daha erken evrelerinde ve birbirlerine daha yakın sıklularda eşik değerini aşarken, test edilen genlerin PCR’ ın daha geç evrelerinde eşik değerini aştığı ve daha geniş bir dağılım gösterdiği belirlenmiştir.

4.3. *NM23-H1*, *KAI1* ve *MAP2K4* Genlerinin mRNA Düzeylerindeki Değişimler ile Hastaların Klinik ve Patolojik Verilerinin Birlikte Değerlendirilmesi

Hastalar 57 yaş ve üzeri ve 57 yaş altı olmak üzere iki gruba bölündüğünde iki grup arasında, ileri ve geç evreler arasında, metastaz olan ve olmayan olgular

arasında ve farklı histolojik tipler arasında her 3 genin mRNA düzeylerindeki değişimler açısından istatistiksel fark bulunmadı. Üç genin kendi aralarındaki ilişki değerlendirildiğinde, aynı hastalardan alınan örneklerde *NM23-H1* mRNA'sındaki değişimlerin *KAI1* genindeki değişimlere paralellik gösterdiği belirlendi (Correlation Coefficiency: 0,479).

4.3.1. *NM23-H1* Geni

NM23-H1 geninin mRNA düzeyleri erken evre (evre I ve II) ve ileri evre (evre III ve IV) olgular arasında kıyaslandığında; ileri evrede normal dokuya kıyasla primer tümör dokusunda ve özellikle ileri evreli olgularda primer tümör dokusuna kıyasla metastatik tümör dokusunda artış oranının fazla olduğu ve artış gösteren hasta sayısının 3 kat fazla olduğu belirlendi. Metastatik dokuda 21 (% 72.4) hastada ortalama 4.20 oranında artış ve 8 (% 27.6) olguda 2.17 oranında azalış belirlendi (Tablo 4.4). Metastaz açısından hastalar; 1) metastaz olmayan, 2) sadece abdominopelvik bölge metastazı olan ve 3) hem abdominopelvik bölge hem de lenf düğümü metastazı olan hastalar olmak üzere 3 gruba ayrıldığında ve gruplar arasında mRNA düzeylerindeki değişimler kıyaslandığında; 2. grupta; 8 hastada ortalama 4,93 artış, 1 hastada 4,69 azalış. 3. grupta 12 hastada ortalama 3,89 oranında artış, 6 hastada 2.07 oranında azalış belirlendi. Ancak bu değişimler istatistikî açıdan anlamlı bulunmadı ($p=0,183$, Chi-square testi). Tümörün histolojik tipine göre mRNA düzeylerindeki değişimler örnek sayısı yetersiz olduğu için istatistikî açıdan değerlendirilemedi. Hastaliksız yaşam süreleri ile *NM23-H1* geninin mRNA düzeylerindeki değişimler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmadı. Primer tümör dokusu için $p=0,167$, metastatik tümör dokusu için $p=0,821$ olarak bulundu (Chi-square testi).

Tablo 4.4. *NM23-H1* geninin primer tümör ve metastatik tümör dokularında mRNA düzeylerindeki değişimler.

Hasta No	Tümör Evresi (FIGO)	Tümörün Histolojik Tipi	Normal / Tümör (ddCT) *	Tümör / Metastaz (ddCT) #	Metastaz		
					Omen.	Lenf nodu	Uzak bölge
EOC1	IIC	Seröz	-	-0,55	+	+	
EOC 2	IIC	Miks tip (Endometrioid + Seröz)	9,70	6,83	+	+	
EOC 3	IIC	Seröz	4,48	1,34	+	-	
EOC 4	IA	Müsinöz	-8,09	-	-	-	
EOC 5	IIC	Miks tip (Endometrioid + Seröz)	-0,27	3,93	+	+	
EOC 6	IB	Borderline, Müsinöz	0,36	-	-	-	
EOC 7	IIC	Seröz	1,32	3,07	+	+	
EOC 8	IIC	Mikst tip (Endometrioid + Seröz)	4,61	4,31	+	+	
EOC 9	IIIB	Seröz	-7,11	2,53	+	-	
EOC 10	IIC	Seröz	-0,26	-			
EOC 11	IIC	Seröz	-	-	+	+	
EOC 12	IIC	Miks tip (Berrak hücreli + Seröz)	1,38	-	+	-	
EOC 13	IIC	Seröz	-5,24	0,16	+	+	

EOC 14	IIC	Seröz	0,08	15,25	+	+	
EOC 15	IIC	Seröz	-0,86	-	+	-	
EOC 16	IIC	Endometrioid	-0,57	1,64	+	+	
EOC 17	IIC	Miks tip (Berrak hücreli + Seröz)	-2,65	2,10	+	-	+
EOC 18	IC	Borderline, Seröz	-0,07	-	-	-	
EOC 19	IB	Borderline, Müsinöz	-1,31	-	-	-	
EOC 20	IA	Borderline müsinöz	-	-	-	-	
EOC 21	IIC	Müsinöz	-2,22	0,80	+	+	
EOC 22	IIC	Endometrioid	-0,23	-1,20	+	+	
EOC 23	IIC	Miks tip (Endometrioid + Seröz)	-0,76	-0,38	+	+	
EOC 24	IIC	Seröz	2,17	-	+	+	
EOC 25	IIC	Seröz	-1,65	-	+	+	
EOC 26	IIC	Müsinöz	0,76	1,63	+	+	
EOC 27	IIC	Seröz	4,53	-	+	+	
EOC 28	IIC	Seröz	-0,23	-	+	-	
EOC 29	IIC	Miks tip (Endometrioid + Seröz)	-2,43	-	+	+	
EOC 30	IIC	Borderline, Müsinöz	-3,63	-	+	+	
EOC 31	IIC	Seröz	1,69	-1,92	+	+	
EOC 32	IIC	Endometrioid	-2,52	-	+	+	
EOC 33	IIC	Seröz	-3,53	1,90	+	+	
EOC 34	IIA	Müsinöz	-1,07	-	-	-	
EOC 35	IIC	Seröz	2,43	2,64	+	+	
EOC 36	IIC	Seröz	1,27	4,61	+	+	
EOC 37	IIC	Miks tip (Endometrioid + Seröz)	-3,37	12,52	+	-	
EOC 38	IIC	Seröz	1,49	8,06	+	-	
EOC 39	IIC	Seröz	3,67	-4,69	+	-	
EOC 40	IIC	Endometrioid	0,46	1,15	+	-	
EOC 41	IIC	Endometrioid	-	-2,75	+	+	
EOC 42	IIC	Endometrioid	-	2,24	+	-	
EOC 43	IIIB	Seröz	-	-	+	-	
EOC 44	IIC	Endometrioid	-	1,80	+	-	
EOC 45	IIC	Endometrioid	0,64	-	+	-	
EOC 46	IIC	Endometrioid	-	-	+	+	
EOC 47	IIC	Seröz	0,81	-	+	-	
EOC 48	IIC	Endometrioid	-	-5,67	+	+	
EOC 49	IV	Seröz	-	-0,23	+	+	+
EOC 50	IIC	Müsinöz	-	9,85	+	-	

* Normal dokuya kıyasla primer tümör dokusunda *NM23-H1* geninin mRNA düzeyindeki değişim oranları Q-RT-PCR yöntemi ile belirlenmiş ve ddCT değeri olarak verilmiştir.

Primer tümör dokusuna kıyasla metastatik tümör dokusunda *NM23-H1* geninin mRNA düzeyindeki değişim oranları Q-RT-PCR yöntemi ile belirlenmiş ve ddCT değeri olarak verilmiştir.

4.3.2. *KAI1* Geni

KAI1 geninin mRNA düzeyleri erken evre ve ileri evre olgular arasında kıyaslandığında; ileri evrede özellikle normal dokuya kıyasla primer tümör dokusunda artış oranının fazla olduğu ve artış gösteren hasta sayısının yaklaşık 2 kat fazla olduğu belirlendi (23 hastada ortalama 4,38 oranında artış ve 10 hastada ortalama 2,58 oranında azalış) (Tablo 4.5). Aynı zamanda hastalar metastaz açısından; 1) metastaz olmayan, 2) sadece abdomino-pelvik bölge metastazı olan ve 3) hem abdomino-pelvik bölge hem de lenf düğümü metastazı olan hastalar olmak üzere 3 gruba ayrıldığında ve gruplar arasında mRNA düzeylerindeki değişimler kıyaslandığında; metastaz olan 2. ve 3. grup olgularda normale kıyasla primer tümör dokularında mRNA miktarının oransal olarak arttığı ve artış gösteren hasta sayısının belirgin düzeyde fazla olduğu belirlendi (2. grupta; 10 hastada ortalama 4.88 oranında artış, 2 hastada ortalama 3,11 oranında azalış. 3. grupta 14 hastada ortalama 3,91 oranında artış, 7 hastada 2.43 oranında azalış belirlendi). Ancak bu artış istatistikî açıdan anlamlı bulunmadı. Tümörün histolojik tipine göre mRNA düzeylerindeki değişimler örnek sayısı yetersiz olduğu için istatistikî açıdan değerlendirilemedi. Hastalısız yaşam süreleri ile *KAI1* geninin mRNA düzeylerindeki değişimler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmadı. Primer tümör dokusu için $p=0,810$, metastatik tümör dokusu için $p= 0,564$, Chi-square testi.

Tablo 4.5. *KAI1* geninin primer tümör ve metastatik tümör dokularında mRNA düzeylerindeki değişimler.

Hasta No	Tümör Evresi (FIGO)	Tümörün Histolojik Tipi	Normal / Tümör (ddCT) *	Tümör / Metastaz (ddCT) #	Metastaz		
					Omen.	Lenf nodu	Uzak bölge
EOC1	IIC	Seröz	-	0,00	+	+	
EOC 2	IIC	Miks tip (Endometrioid + Seröz)	2,80	3,64	+	+	
EOC 3	IIC	Seröz	3,42	-1,45	+	-	
EOC 4	IA	Müsinöz	6,13	-	-	-	
EOC 5	IIC	Miks tip (Endometrioid + Seröz)	-	-	+	+	
EOC 6	IB	Borderline, Müsinöz	0,23	-	-	-	
EOC 7	IIC	Seröz	11,30	2,80	+	+	
EOC 8	IIC	Miks tip (Endometrioid + Seröz)	10,35	-3,27	+	+	
EOC 9	IIIB	Seröz	11,47	0,71	+	-	
EOC 10	IIC	Seröz	-	-			
EOC 11	IIC	Seröz	1,93	0,79	+	+	
EOC 12	IIC	Miks tip (Berrak hücreli + Seröz)	-	-	+	-	
EOC 13	IIC	Seröz	-2,49	1,74	+	+	
EOC 14	IIC	Seröz	2,40	3,20	+	+	
EOC 15	IIC	Seröz	-3,98	-	+	-	
EOC 16	IIC	Endometrioid	-0,63	4,10	+	+	
EOC 17	IIC	Miks tip	-2,60	9,59	+	-	+

		(Berrak hücreli + Seröz)					
EOC 18	IC	Borderline, Seröz	-0,20	-	-	-	
EOC 19	IB	Borderline, Müsinöz	-1,78	-	-	-	
EOC 20	IA	Borderline müsinöz	-	-	-	-	
EOC 21	IIIC	Müsinöz	3,33	-1,14	+	+	
EOC 22	IIIC	Endometrioid	1,88	0,83	+	+	
EOC 23	IIIC	Miks tip (Endometrioid + Seröz)	-1,07	13,79	+	+	
EOC 24	IIIC	Seröz	-2,98	-	+	+	
EOC 25	IIIC	Seröz	-3,19	-	+	+	
EOC 26	IIIC	Müsinöz	2,25	-0,05	+	+	
EOC 27	IIIC	Seröz	1,90	-	+	+	
EOC 28	IIIC	Seröz	-2,25	-	+	-	
EOC 29	IIIC	Miks tip (Endometrioid + Seröz)	3,26	-	+	+	
EOC 30	IIIC	Borderline, Müsinöz	5,93	-	+	+	
EOC 31	IIIC	Seröz	2,65	-1,84	+	+	
EOC 32	IIIC	Endometrioid	2,57	-	+	+	
EOC 33	IIIC	Seröz	-5,69	-0,48	+	+	
EOC 34	IIA	Müsinöz	-1,96	-	-	-	
EOC 35	IIIC	Seröz	2,32	-6,04	+	+	
EOC 36	IIIC	Seröz	-0,99	1,25	+	+	
EOC 37	IIIC	Miks tip (Endometrioid + Seröz)	3,97	-5,59	+	-	
EOC 38	IIIC	Seröz	0,68	0,60	+	-	
EOC 39	IIIC	Seröz	5,17	0,11	+	-	
EOC 40	IIIC	Endometrioid	0,24	1,22	+	-	
EOC 41	IIIC	Endometrioid	-	3,49	+	+	
EOC 42	IIIC	Endometrioid	-	0,31	+	-	
EOC 43	IIIB	Seröz	-	-13,41	+	-	
EOC 44	IIIC	Endometrioid	-	-3,50	+	-	
EOC 45	IIIC	Endometrioid	0,36	-	+	-	
EOC 46	IIIC	Endometrioid	-	0,26	+	+	
EOC 47	IIIC	Seröz	10,07	-	+	-	
EOC 48	IIIC	Endometrioid	-	3,39	+	+	
EOC 49	IV	Seröz	-	-2,11	+	+	+
EOC 50	IIIC	Müsinöz	8,61	2,37	+	-	

* Normal dokuya kıyasla primer tümör dokusunda *KAI1* geninin mRNA düzeyindeki değişim oranları Q-RT-PCR yöntemi ile belirlenmiş ve ddCT değeri olarak verilmiştir.

Primer tümör dokusuna kıyasla metastatik tümör dokusunda *KAI1* geninin mRNA düzeyindeki değişim oranları Q-RT-PCR yöntemi ile belirlenmiş ve ddCT değeri olarak verilmiştir.

4.3.3. *MAP2K4* Geni

Diğer iki genin (*NM23-H1* ve *KAI1*) aksine *MAP2K4* geninin mRNA düzeyleri normal dokuya kıyasla primer tümör ve metastatik tümör dokularının çoğunda azalma gösterdiği belirlendi. *MAP2K4* geninin mRNA düzeyleri erken evre ve ileri

evre olgular arasında kıyaslandığında; ileri evrede özellikle normal dokuya kıyasla tümör dokusunda azalış oranının fazla olduğu ve azalış gösteren hasta sayısının artış gösterenlere göre yaklaşık 2 kat fazla olduğu belirlendi. Erken evrede artış belirlenmezken, 5 hastada ortalama 3.15 oranında azalış belirlendi. İleri evrede 13 hastada ortalama 2.98 oranında artış ve 20 hastada 4.79 oranında azalış belirlendi (Tablo 4.6). Hastalar metastaz açısından; 1) metastaz olmayan, 2) sadece abdomino-pelvik bölge metastazı olan ve 3) hem abdomino-pelvik bölge hem de lenf düğümü metastazı olan hastalar olmak üzere 3 gruba ayrıldığında ve gruplar arasında mRNA düzeylerindeki değişimler kıyaslandığında; mRNA düzeyi ve azalma gösteren hasta sayısının, 3. gruptaki hastalarda 2. gruba göre primer tümör dokusuna kıyasla metastatik dokularda istatistikî açıdan anlamlı bir şekilde azaldığı belirlendi (Şekil 4.9). 3. grupta; 9 hastada ortalama 3.42 artış, 12 hastada 5.26 oranında azalış, 2. grupta; 4 hastada ortalama 1.99 oranında artış, 8 hastada 4.09 oranında azalış belirlendi (mRNA düzeyi için $p=0,048$, Kruskal Wallis testi ve hasta sayısı için $p=0,039$, Fisher's Exact Test). Tümörün histolojik tipine göre mRNA düzeylerindeki değişimler örnek sayısı yetersiz olduğu için istatistikî açıdan değerlendirilemedi. Hastalısız yaşam süreleri ile *MAP2K4* geninin mRNA düzeylerindeki değişimler arasında istatistikî açıdan anlamlı bir ilişki bulunmadı. Primer tümör dokusu için $p=0,287$, metastatik tümör dokusu için $p=0,309$ olarak belirlendi (Chi-square testi).

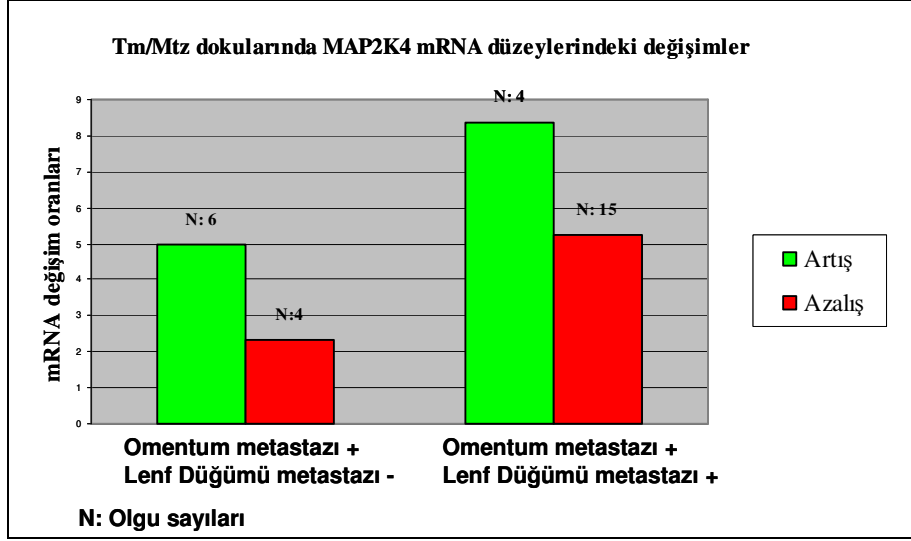
Tablo 4.6. *MAP2K4* geninin primer tümör ve metastatik tümör dokularında mRNA düzeylerindeki değişimler.

Hasta No	Tümör Evresi (FIGO)	Tümörün Histolojik Tipi	Normal / Tümör (ddCT) *	Tümör / Metastaz (ddCT) #	Metastaz		
					Omentum	Lenf nodu	Uzak bölge
EOC1	IIC	Seröz	-	6,40	+	+	
EOC 2	IIC	Miks tip (Endometrioid + Seröz)	-2,21	-7,57	+	+	
EOC 3	IIC	Seröz	-2,91	0,54	+		
EOC 4	IA	Müsinöz	-4,00	-	-	-	
EOC 5	IIC	Miks tip (Endometrioid + Seröz)	-13,51	-1,12	+	+	
EOC 6	IB	Borderline, Müsinöz	-2,94	-	-	-	
EOC 7	IIC	Seröz	-	-	+	+	
EOC 8	IIC	Miks tip (Endometrioid + Seröz)	-13,64	14,65	+	+	
EOC 9	IIIB	Seröz	-7,43	9,43	+	-	
EOC 10	IIC	Seröz	-	-			
EOC 11	IIC	Seröz	3,71	-2,23	+	+	
EOC 12	IIC	Miks tip (Berrak hücreli + Seröz)	-7,46	-	+	-	
EOC 13	IIC	Seröz	-5,51	-1,51	+	+	
EOC 14	IIC	Seröz	4,50	-5,42	+	+	
EOC 15	IIC	Seröz	-1,77	-	+	-	
EOC 16	IIC	Endometrioid	5,52	-11,75	+	+	
EOC 17	IIC	Miks tip (Berrak hücreli +	-	-	+	-	+

		Seröz)					
EOC 18	IC	Borderline, Seröz	-3,44	-	-	-	
EOC 19	IB	Borderline, Müsinöz	-2,82	-	-	-	
EOC 20	IA	Borderline müsinöz	-	-	-	-	
EOC 21	IIIC	Müsinöz	3,82	-1,34	+	+	
EOC 22	IIIC	Endometrioid	-2,97	-0,86	+	+	
EOC 23	IIIC	Miks tip (Endometrioid + Seröz)	-5,52	-0,56	+	+	
EOC 24	IIIC	Seröz	-4,47	-	+	+	
EOC 25	IIIC	Seröz	-4,05	-	+	+	
EOC 26	IIIC	Müsinöz	1,55	-21,86	+	+	
EOC 27	IIIC	Seröz	-3,67	-	+	+	
EOC 28	IIIC	Seröz	-3,94	-	+	-	
EOC 29	IIIC	Miks tip (Endometrioid + Seröz)	-0,09	-	+	+	
EOC 30	IIIC	Borderline, Müsinöz	3,45	-	+	+	
EOC 31	IIIC	Seröz	-2,18	-0,73	+	+	
EOC 32	IIIC	Endometrioid	0,19	-	+	+	
EOC 33	IIIC	Seröz	6,79	-4,04	+	+	
EOC 34	IIA	Müsinöz	-2,59	-	-	-	
EOC 35	IIIC	Seröz	1,30	-3,40	+	+	
EOC 36	IIIC	Seröz	-5,37	2,11	+	+	
EOC 37	IIIC	Miks tip (Endometrioid + Seröz)	-2,43	2,35	+	-	
EOC 38	IIIC	Seröz	1,32	2,39	+	-	
EOC 39	IIIC	Seröz	0,02	1,15	+	-	
EOC 40	IIIC	Endometrioid	0,53	-5,02	+	-	
EOC 41	IIIC	Endometrioid	-	-9,47	+	+	
EOC 42	IIIC	Endometrioid	-	-1,08	+	-	
EOC 43	IIIB	Seröz	-	-1,08	+	-	
EOC 44	IIIC	Endometrioid	-	-2,06	+	-	
EOC 45	IIIC	Endometrioid	-2,83	-	+	-	
EOC 46	IIIC	Endometrioid	-	-6,74	+	+	
EOC 47	IIIC	Seröz	6,10	-	+	-	
EOC 48	IIIC	Endometrioid	-	10,43	+	+	
EOC 49	IV	Seröz	-	-3,06	+	+	+
EOC 50	IIIC	Müsinöz	-3,95	13,95	+	-	

* Normal dokuya kıyasla primer tümör dokusunda *MAP2K4* geninin mRNA düzeyindeki değişim oranları Q-RT-PCR yöntemi ile belirlenmiş ve ddCT değeri olarak verilmiştir.

Primer tümör dokusuna kıyasla metastatik tümör dokusunda *MAP2K4* geninin mRNA düzeyindeki değişim oranları Q-RT-PCR yöntemi ile belirlenmiş ve ddCT değeri olarak verilmiştir.

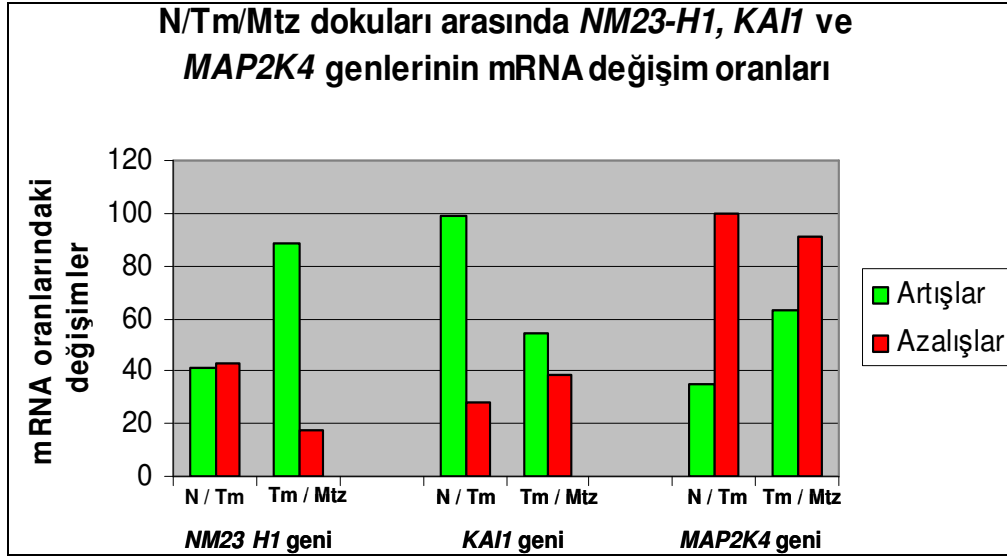


Şekil 4.9. *MAP2K4* geninin mRNA düzeylerindeki değişim oranları, hasta sayıları ve yumurtalık tümörü lenf düğümü metastazındaki rolü.

Tablo 4.7. Normale kıyasla primer tümör dokusunda ve primer tümöre kıyasla metastatik tümör dokusunda her 3 genin mRNA düzeylerindeki değişim oranları ve hasta sayıları.

		<i>NM23-H1</i>		<i>KAI1</i>		<i>MAP2K4</i>	
		Hasta sayısı (%)	Değişim oranı	Hasta sayısı (%)	Değişim oranı	Hasta sayısı (%)	Değişim oranı
Normale kıyasla primer tümör dokusunda	Artışlar	17 (48)	2,44	23 (68)	4,30	12 (35)	2,94
	Azalışlar	18 (52)	2,39	11 (32)	2,53	22 (65)	4,52
Primer Tümöre kıyasla metastatik tümör dokusunda	Artışlar	21 (72,5)	4,20	19 (61,3)	2,85	10 (33,3)	6,34
	Azalışlar	8 (27,5)	2,17	11 (35,5)	3,53	20 (66,6)	4,54

Her 3 genin mRNA düzeylerinin normale kıyasla primer tümör dokusunda ve primer tümöre kıyasla metastatik tümör dokusunda hastaların bir kısmında azalırken geri kalan kısmında ise arttığı belirlenmiştir (Tablo 4.7). Bu nedenle bu genlerin epitelyal yumurtalık tümöründeki davranışlarını belirleyebilmek için artış ve azalış gösteren hasta sayılarının ortalama artış ve azalış oranları ile çarpımından elde edilen değerler toplam etki olarak hesaplandı. Böylelikle dokular arasındaki ortalama değişim oranları, hasta sayıları ile birlikte değerlendirilerek her 3 gen için final değişim oranları belirlenmiştir (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. *NM23-H1*, *KAI1* ve *MAP2K4* genlerinin mRNA düzeylerinin normal, primer tümör ve metastatik tümör dokularındaki değişim oranları.

4.4. Epitelyal Yumurtalık Kanserli Olguların *ABCB1* g.3435C>T Polimorfizminin REA Yöntemi İle Belirlenmesi

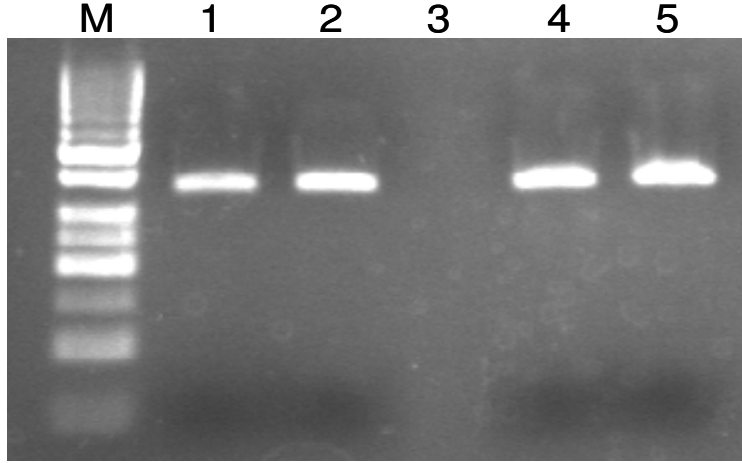
Tüm hastaların *ABCB1* g.3435C>T genotiplemesinin sonuçları Tablo 4.8' de verilmiştir. Alel frekansları Tablo 4.9' de verilmiştir. Bazı örneklerin *ABCB1* g.3435C>T genotiplemesine ait PCR ürünlerini ve REA sonrası jel profilleri Şekil 4.11 ve 4.12' de verilmiştir.

Tablo 4.8. *ABCB1* g.3435C>T polimorfizminin genotip oranları.

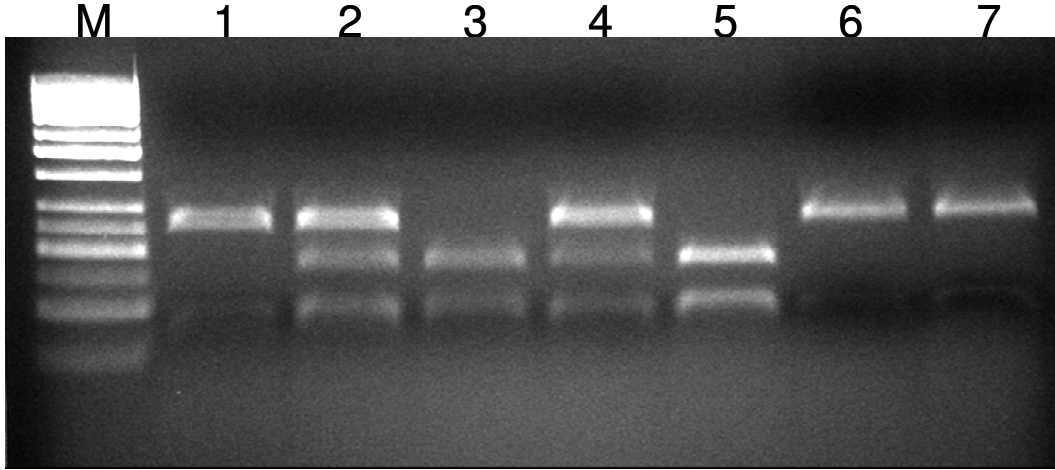
<i>ABCB1</i> g.3435C>T	Genotip Dağılım (%)
CC	30
CT	46
TT	24

Tablo 4.9. *ABCB1* g.3435C>T polimorfizminin alel frekansları.

<i>ABCB1</i> g.3435C>T	Alel Frekansı
C aleli	0,53
T aleli	0,47



Şekil 4.11. *ABCBI* g.3435C>T genotipleme için; ilgili genom bölgesi PCR ile çoğaltıldıktan sonra PCR ürünleri % 2' lik agaroz jelde EtBr ile UV ışığı kullanılarak görüntülenmiştir. M: 50bp DNA markır (Fermentas), 1,2,4,5: 340 nükleotid uzunluğundaki PCR ürünleri.

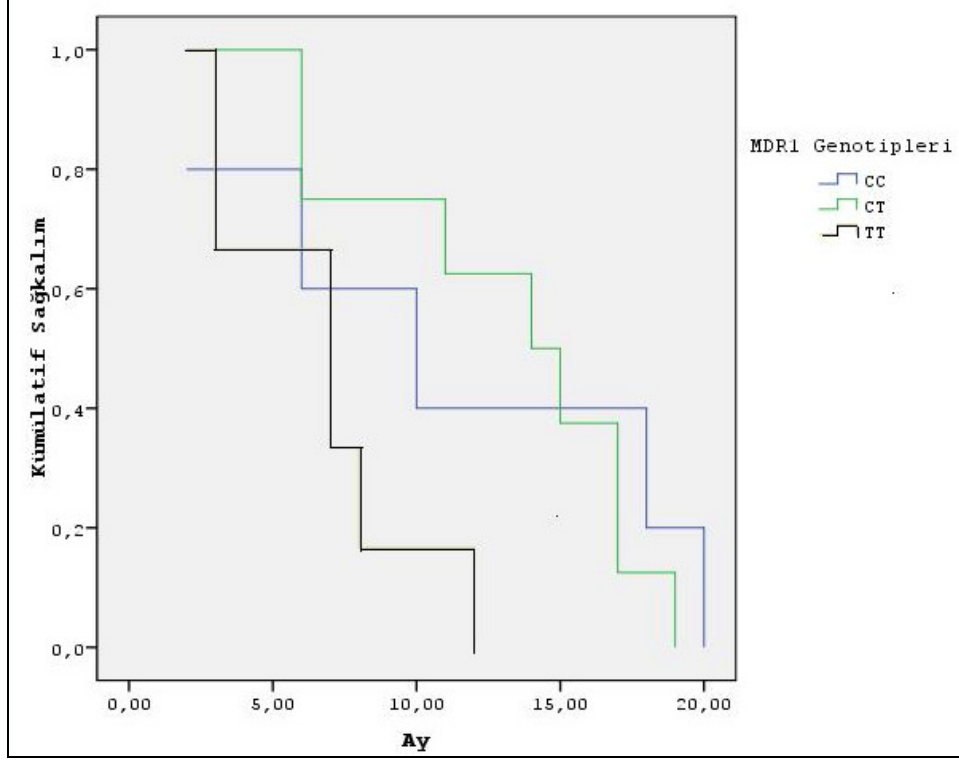


Şekil 4.12. *ABCBI* g.3435C>T genotipleme için; PCR ürünlerinin Nde-II restriksiyon enzimi ile kesim reaksiyonu sonucu oluşan ürünler % 2' lik agaroz jelde EtBr ile UV ışığı kullanılarak görüntülenmiştir. M: 50bp DNA markır (Fermentas); 3,5: CC genotipli olgular; 1,6,7: TT genotipli olgular, 2,4: CT genotipli olgular.

4.5. *ABCBI* g.3435C>T Polimorfizm Sonuçları

Epitelyal yumurtalık kanserli 50 olgudan 39' unda dosya incelemesi ve hastalara telefon ile ulaşılarak hastalığın güncel durumu hakkında bilgi alındı. 39 hastanın 19' unda hastalığın tekrarladığı ve ilave tedavi protokollerinin uygulandığı belirlendi. Hastalığın tekrarladığı 19 hastanın 3' ünde (12, 26, 47 nolu hastalar) hastalığın 6 aydan kısa bir süre içerisinde tekrarladığı gözlemlendi ve bu durum primer kemodirençlilik olarak belirlendi. Tanı konulduktan sonra 5 yıldan fazla süre geçen hasta sayısı 10 olarak belirlendi. On hastanın birisine ulaşılamadı, 3' ünün hastalıktan dolayı öldüğü ve 6' sının hayatta olduğu belirlendi. Bilgilerine ulaşılan 39 hastadan geri kalan 10' unda ise hastalığın tekrarladığına dair herhangi bir bulgu yoktu. *ABCBI* g.3435C>T polimorfizmi ile hastalısız yaşam süreleri arasındaki ilişki hastalığın tekrarladığı 19 hastada değerlendirildiğinde; TT genotipine sahip olanların diğerlerine göre daha kısa hastalısız yaşam sürelerine sahip olduğu belirlendi (Şekil 4.13). Ancak TT genotipinde hastalısız yaşam sürelerindeki kısalma Chi square testi ile test edildiğinde p değeri 0,05' den büyük fakat yakın bir değer (p=0.078, Chi

square) bulundu. *ABCB1* g.3435C>T polimorfizmi ve kemoterapi ile ortaya çıkan yan etkiler arasında anlamlı bir fark bulunamadı.



Şekil 4.13. *ABCB1* geni g.3435C>T değişiminin epitelyal yumurtalık kanserinde hastalıksız yaşam sürelerine etkisi.

TARTIŞMA ve SONUÇLAR

Epitelyal yumurtalık kanseri ileri evrelerde belirti veren ve genellikle tanı sırasında tümörün primer bölgeden yayılarak karın bölgesine metastaz yaptığı yüksek derecede metastatik potansiyeli olan bir tümör tipidir. Epitelyal yumurtalık kanserinde güncel standart tedavi; tümörün cerrahi işlem ile çıkarılmasını takiben tamamlayıcı olarak carboplatin-paclitaxel kombine kemoterapi protokolünün uygulanmasıdır. Hastaların büyük çoğunluğu başlangıçta bu tedaviye iyi yanıt verseler de bir süre sonra hastaların yaklaşık % 50' sinde hastalık tekrar ortaya çıkar [75]. Bu nedenle 5 yıllık sağ kalım oranları yaklaşık % 35' tir [79]. Bu oran ileri evrelerde çok daha azdır. Bu nedenler epitelyal yumurtalık kanserinde mortalite oranını artırır ve yumurtalık kanserlerini kadınlarda en çok ölüme sebebiyet veren jinekolojik kanser yapar. Bu durumda epitelyal yumurtalık kanserinin ortaya çıkışında, ilerlemesinde, metastazında ve tedaviye yanıtızlıkta rolü olan faktörlerin belirlenmesi, hastalığın daha iyi anlaşılması ve yeni tedavi protokolleri için aday moleküler hedeflerin seçilmesi açısından önemlidir.

Çalışmamıza dâhil edilen 50 malign epitelyal yumurtalık tümörlü olgu FIGO evrelendirmesine göre sınıflandırıldığında % 90'ından fazlasının evre III ve IV gibi ileri evrelerde olduğu belirlenmiştir. Bu oran toplumumuzda daha önce yapılan bir çalışmada % 88,2 olarak bildirilmiştir [80]. Literatürde olguların % 70' inin tanı sırasında evre III ve IV gibi ileri evrelerde olduğu [79, 81] bizim serimizde bu oranının daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Bu durum ülkemizde tanının daha geç konduğu anlamına gelebilir. İleri evrelerde tanı alan hastalarda 5 yıllık sağ kalım oranlarının çok düşük olduğu düşünüldüğünde hastalığın mümkün olduğunca erken tespit edilmesi önemlidir. Dolayısıyla toplumun yumurtalık kanserinin bulguları konusunda bilgilendirilmesi ve erken tanı yöntemlerinin geliştirilmesinin gerekliliği anlaşılmaktadır.

Evre III epitelyal yumurtalık kanserli hastaların % 53-74' ünde lenf düğümü metastazının görüldüğü rapor edilmiştir [26]. Bu oran bizim çalışmamızda literatüre benzer bir şekilde % 62 olarak belirlenmiştir. Borderline epitelyal yumurtalık tümörleri, tüm yumurtalık tümörlerinin % 10-15' ini oluşturur. Bu oran bizim çalışmamızda da % 10 olarak belirlenmiştir. En yaygın görülen histolojik tipleri seröz (% 26-50) ve müsinoz (% 45-68) tiplerdir. Bizim çalışmamızda da 1 seröz ve 4 müsinoz tip borderline yumurtalık tümörlü hasta belirlenmiştir. Seröz tip borderline yumurtalık tümörlü hastaların % 20-35' inde tümörün yumurtalık dışına çıktığı bildirilmiştir. Müsinoz tip borderline yumurtalık tümörlü hastaların ise % 3,6' sında tümörün yumurtalık dışına çıktığı bildirilmiştir [39, 82]. Bizim çalışmamızda borderline 5 olgudan sadece 1 müsinoz tip borderline yumurtalık tümörlü olguda tümörün yumurtalık dışına çıktığı belirlenmiş ve evre III olarak sınıflandırılmıştır.

Literatürde epitelyal yumurtalık kanseri ve metastazı ile ilişkili genlerin belirlenmesine yönelik çalışmalar yer almaktadır. Bu çalışmalarda; primer tümör ve omentumda lokalize metastatik tümör dokularındaki gen ifade profilleri

kıyaslandığında, 56 genin ifadesinin değiştiği bildirilmiştir. Bu genlerden 20 tanesinin daha önce metastaz ile ilişkili genler olduğu gsterilmiştir [41]. Diğer bir benzer çalışmada da 35 farklı genin ifadesinin primer tümör ve omentumda lokalize metastatik tümör dokularında farklılık gsterdiği bildirilmiştir. Aynı zamanda bu genlerin daha önce farklı kanser tiplerinde metastazla ilişkisi de gsterilmiştir [42]. Her iki çalışmada da gen ifadelerinin değiştiği belirlenmiş olan, dolayısı ile epitelyal yumurtalık kanserinin abdomino-pelvik bölge metastazında rolü olabileceği ileri sürülen genler birbirlerinden farklıdır. Ayrıca bu genler bizim çalışmamıza dâhil edilen *NM23-H1*, *KAI1* ve *MAP2K4* genlerini de kapsamamaktadır. *NM23-H1*, *KAI1* ve *MAP2K4* genlerinin metastaz baskılayıcı rollerini nasıl gerçekleştirdikleri henüz tam olarak aydınlatılmamıştır. Buna karşın, birçok kanser türünde primer tümör ve metastatik tümör dokularında bu genlerin mRNA ve protein düzeylerinde ifadelerinin değiştiği gsterilmiştir. Gen ifade profillerinin değiştiği bulgusu doğrultusunda, bu genlerin metastazdaki mekanizmalarına yönelik fonksiyonel çalışmalar, bu alanda çalışan araştırmacılar için günümüzde en önemli ilgi alanlarından birisi olmuştur. Bununla birlikte bu genlerin değişik kanser trlerindeki rolleri de henüz yeterince aydınlatılmamıştır.

NM23-H1 geni ifadesinin, metastaz baskılayıcı bir gen olarak tanımlanmasından dolayı, primer tümör dokusuna kıyasla metastatik tümör dokusunda azalması beklenmektedir. Birçok kanser türünde *NM23-H1* geninin ifadesinin beklendiği üzere azaldığı gözlenmesine rağmen, bazı kanser trlerinde de arttığı gözlenmiştir. Bu bulguya dayanarak *NM23-H1* geninin farklı kanser tiplerinde farklı mekanizmalarla metastazda rol alabileceği ne sürülmüştür [51]. Epitelyal yumurtalık kanserinde de benzer çalışmalar ile *NM23-H1* geninin metastazdaki rolü araştırılmıştır. Bunlar temelde yarı kantitatif bir yöntem olan immünohistokimyasal yöntemle protein miktarındaki değişimleri belirlemeye yönelik çalışmalardır. *NM23-H1* geninin epitelyal yumurtalık kanserinin metastazındaki rolünü araştıran çalışmalarda *NM23-H1* geninin ifadesinde hem artış hem de azalışlar olabileceği gsterilmiştir [54, 56]. 247 epitelyal yumurtalık tümöründe primer tümör dokularında *NM23-H1* protein miktarları immünohistokimyasal yöntemle belirlendiğinde, *NM23-H1*'in özellikle ileri evrelerde ifadesinin arttığı ve bu artışın kötü prognozla ilişkisi olduğu bulunmuştur. Ayrıca bu artışın *NM23-H1* geninde her hangi bir mutasyondan kaynaklanmadığı gsterilmiştir [83]. Diğer yandan literatürde çalışmamızdaki gibi bir yaklaşımla; primer tümör ve metastatik tümör dokularında *NM23-H1* geninin ifadesinin çalışıldığı bir araştırmaya rastlanılmamıştır. Bizim alışmamızda artış ve azalış gsteren hastalar olmakla birlikte temelde *NM23-H1* geninin ifadesinin metastatik dokuda primer tümör dokusuna kıyasla arttığı ve artış gsteren hasta sayısının azalış gsterenlere göre daha fazla olduğu gözlenmiştir. Dolayısıyla artış oranları ve hasta sayısı birlikte değerlendirildiğinde primer tümör dokusuna kıyasla metastatik tümör dokusunda *NM23-H1* geninin ifadesinin arttığı belirlenmiştir (şekil 4.10). Bununla birlikte *NM23-H1* geni ifadesinin artışına neden olabilecek genomik kopya sayısı artışları, gen mutasyonları ya da metilasyon kaybı gibi epigenetik faktörler çalışılmadığı için *NM23-H1* geni ifadesindeki artışın altında yatan moleküler mekanizmalar çalışılması gereken konulardır. Alışılagelmiş mekanizmalarla metastaz baskılayıcı rolünü gsterebilmesi için *NM23-H1* geninin ifadesinde azalma olması beklenmektedir. Fakat daha önce farklı yöntemlerle elde edilen ve çalışmamızdan Q-RT-PCR ile elde edilen bulgular ışığında *NM23-H1* geninin ifadesinde azalış yerine, artış tespit edilmiştir. *NM23-H1*'in olası farklı bir mekanizma ile epitelyal yumurtalık kanserinin metastazında rol oynayabileceği

düşünülebilir. Diğer bir olasılık ise *NM23-H1* geninin ifadesinde azalma gözlenmediği için yumurtalık kanserinin abdomino-pelvik bölge metastazında işe karışmıyor olabileceğidir. Çalışmamız olgu sayısı sınırlı olmasına rağmen güncel bir yöntem olan Q-RT-PCR ile elde edilen verilerin *NM23-H1* geninin epitelyal yumurtalık kanserinin metastazındaki rolüne ilişkin önemli bilgiler kazandırdığı düşüncesindeyiz.

KAI1 geninin epitelyal yumurtalık kanserindeki rolünü araştıran çalışmalar ve elde edilen bulgular *NM23-H1* geni ile ilgili yapılan çalışmalara ve bulgulara oldukça benzerlik göstermektedir. Birçok farklı kanser tipinde metastaz ile ilişkili olduğu gösterilmiş olan *KAI1* geninin epitelyal yumurtalık kanserindeki çalışmalarda çelişkili bulgulara ulaşılmıştır. Bazı çalışmalarda *KAI1* geninin ifadesindeki azalışlar ileri evre ve metastatik potansiyel ile ilişkilendirilmişken, bazılarında ise *KAI1* geninin ifadesinin hiç değişmediği ya da arttığı bildirilmiştir [61, 67]. Otuz iki primer yumurtalık ve 8 metastatik yumurtalık tümörlü hastadan elde edilen tümör örneklerinde ve 18 normal yumurtalık dokusunda immünohistokimyasal yöntemle yapılan bir çalışmada; *KAI1* protein miktarının normalden metastatik dokuya geçildikçe azaldığı belirlenmiştir. Bununla birlikte normal yumurtalık yüzey epitelinde protein miktarının farklılık gösterdiği belirlenmiştir [66]. Diğer bir çalışmada ise; 24 primer invaziv yumurtalık tümörlü ve 7 tekrarlayan yumurtalık tümörlü olgudan elde edilen tümör dokularında, immünohistokimyasal yöntemle *KAI1* protein miktarının ve yarı kantitatif RT-PCR tekniği ile *KAI1* mRNA' sının azaldığı ancak bazı örnekler de hiç değişmediği ya da arttığı bildirilmiştir. Ayrıca bu değişimlerin gen içi mutasyonlardan kaynaklanmadığı da bildirilmiştir [84]. Çalışmamızda; normal dokuya kıyasla primer tümör dokusunda *KAI1* geninin ifadesinin 23 (% 68) hastada 4.30 oranında arttığı belirlenmiştir. Ayrıca oransal olarak *KAI1* geni mRNA miktarı fazla değişmese de artış gösteren hasta sayısının metastatik tümör dokularında primer tümöre kıyasla daha fazla olduğu belirlenmiştir. Böylelikle hasta sayısı ile artış oranları birlikte değerlendirildiğinde; *KAI1* geni mRNA miktarının normale kıyasla primer tümörde artış gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 4.10). Dolayısıyla *KAI1* geninin ifadesindeki artış ve *KAI1* proteininin henüz belirlenmemiş bir mekanizma ile epitelyal yumurtalık kanserinin ortaya çıkışında rol oynadığı ileri sürülebilir. Diğer yandan mRNA düzeyindeki değişimler her zaman protein miktarlarına aynı şekilde yansımaz. Örneğin; mRNA miktarındaki artış, fonksiyon kaybına uğramış bir proteinin yer aldığı yolaktaki bir geri bildirim mekanizması ile azalan ya da kaybolan fonksiyonu yerine koymak amacıyla mRNA sentezini indüklemesi gibi bir olası mekanizma ile de açıklanabilir. Literatürdeki çelişkili bulgular göz önüne alındığında, çalışmamızla *KAI1* geninin epitelyal yumurtalık kanserindeki rolünü aydınlatmaya yönelik önemli bulgular elde edildiği düşüncesindeyiz. Çalışmamızda; ayrıca *NM23-H1* ve *KAI1* genlerinin primer tümör ve metastatik tümör dokularında mRNA düzeylerinin aynı hastalarda artış veya azalış gösterdiği, dolayısıyla bu iki genin artış ve azalışlarında paralellik olduğu gözlemlendi. *KAI1* ve *NM23-H1* genlerinin ifadelerindeki artış ya da azalışlarındaki paralellik aynı zamanda belli bir metastatik fenotipin varlığına ve ilişkili genlerin davranışlarındaki birlikteliğe işaret edebilir.

MAP2K4 geninin mRNA düzeylerinde ise *NM23-H1* ve *KAI1* genlerindeki bulgulara zıt olarak normal dokudan primer tümör ve metastatik tümör dokularına geçildikçe hem mRNA düzeylerinde bir azalma olduğu hem de azalma gösteren hasta sayısında artış olduğu gözlemlendi. Dolayısıyla değişim oranları hasta sayısı ile

birlikte değerlendirildiğinde *MAP2K4* geni ifadesinin hem primer tümör hem de metastatik tümör dokusunda azaldığı belirlendi. (Şekil 4.10) *MAP2K4* geninin ifadesinde abdomino-pelvik bölge ve lenf düğümü metastazı gösteren hastalarda sadece abdomino-pelvik bölge metastazı gösteren hastalara kıyasla bir azalma olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.9). Aynı zamanda azalma gösteren hasta sayısında bir artış olduğu belirlenmiş ve istatistiksel olarak bu ilişkiler doğrulanmıştır (mRNA düzeyleri için Kruskal Wallis testi, $p=0,048$. Hasta sayıları için Fisher's Exact Test $p= 0,039$). Bu bulgu, *MAP2K4* geninin epitelyal yumurtalık kanserinde lenf düğümü metastazında işe karışabileceği görüşünü doğrular. Lenf düğümünden izole edilecek metastatik tümör hücrelerinde *MAP2K4* geni mRNA düzeylerinin primer tümör dokusuna kıyaslanması bu bulgu hakkında daha derin bilgi verebilir. Ancak lenf düğümünden metastatik tümör hücrelerin toplanması oldukça zordur. Daha önceki çalışmalar ve bizim çalışmamızdan gelen bilgiler *MAP2K4* geninin yumurtalık tümöründeki metastaz baskılayıcı rolünü desteklemektedir. Diğer yandan *MAP2K4* geninin homozigot kayıpları ya da gen içi mutasyonları meme, pankreas ve safra kesesi karsinomlarında ve akciğer, testis ve kolorektal kanser hücre soylarında belirlenmiştir [68]. Bizim çalışmamızdan elde edilen gen ifadesinin azalışı ile ilgili bulgular *MAP2K4* geninin yumurtalık kanserinde hem karsinogenez aşamasında hem de metastazında rolü olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte daha önce yapılan çalışmalarda; epitelyal yumurtalık kanserinde *MAP2K4* geninin ifadesindeki azalışın altında yatan moleküler mekanizmalar araştırıldığında, *MAP2K4* geni promotör metilasyonu ya da gen içi mutasyonlarının *MAP2K4* geni ifadesinin azalmasındaki temel mekanizma olmadığı bildirilmiştir [72]. Gen içi markırlar kullanılarak yapılan LOH analizinde ise hastaların % 20 - 35' inde alelik kayıpların olduğu belirlenmiştir. Ancak hastaların % 97' sinde *MAP2K4* proteini tespit edilmiştir. Dolayısıyla bazı hastalarda tespit edilen LOH' un protein miktarını etkilemediği öne sürülmüştür. Daha önce yapılan *MAP2K4* geninin mRNA düzeyini belirlemeye yönelik çalışmalar, hibridizasyona dayalı mikroarray yöntemi ile sınırlıdır. Bu yöntemle yapılan bir çalışmada; *MAP2K4* geni mRNA düzeyinin primer tümör dokusuna kıyasla metastatik dokuda 1.3 oranında azaldığı bulunmuştur [72]. Bizim çalışmamızda Q-RT-PCR gibi çok daha hassas bir yöntemin kullanılmış olması sonuçların güvenilirliği açısından önemlidir. Öte yandan mRNA miktarındaki değişimler her zaman proteinin fonksiyonuna aynı şekilde yansımaz. mRNA miktarındaki azalma ile fonksiyon kaybı arasında bir ilişki kurarken mRNA miktarındaki azalmanın protein miktarında bir azalmaya neden olduğu ön kabulüyle hareket edilmektedir. Fakat protein miktarındaki azalmanın dışında proteinin aktif formundaki azalmanında ilgili sinyal yolunu kesintiye uğratarak metastaz baskılayıcı rolün engellenebileceği gösterilmiştir. *MAP2K4* proteinin 80. pozisyondan fosforilasyonu PI3K/Akt inhibitörleri aracılığıyla engellendiğinde proteinin aktif formunun miktarı artarak metastazın baskılanmasını sağlayacaktır. Günümüzde wortmannin gibi Akt yolağını inhibe eden moleküller mevcuttur ancak bunlar spesifik olmayan ajanlardır. Bu nedenle, Akt yolağını spesifik olarak inhibe eden ajanların geliştirilmesi hücredeki *MAP2K4* proteinini aktif hale getirmek suretiyle yumurtalık kanserinde tedavi amaçlı kullanılabilirliği düşünülmektedir [72]. Mikrotübül organizasyonunu etkileyerek, mitozu inhibe edici etki gösteren ve yumurtalık kanseri tedavisinde de kemoterapetik olarak kullanılan paclitaxelin, *MAP2K4*' ünde yer aldığı SAPK yolağını aktive ettiği gösterilmiştir [85]. Bu bulgu yumurtalık kanseri tedavisinde güncel olarak kullanılan paclitaxelin hangi mekanizma ile etkisini gösterdiğinin anlaşılmasının yanında daha önce de

öngörüldüğü gibi *MAP2K4*' ün yumurtalık kanserinde yeni tedavi yaklaşımları için yeni bir hedef molekül olabileceğini göstermektedir.

mRNA düzeylerindeki değişimin erken ve ileri evreli olgularda kıyaslanması bu genlerin epitelyal yumurtalık kanserinin ilerlemesinde bir rolü olup olmadığı hakkında bilgi verebilir. Bizim çalışmamızda; erken evreli 6 hasta ve ileri evreli 44 hastada mRNA düzeylerindeki değişim kıyaslandığında anlamlı bir fark gözlenmedi. Bu durum erken evreli hasta sayısının az olmasından kaynaklanabilir. *NM23-H1*, *KAI1* ve *MAP2K4* genlerinin epitelyal yumurtalık kanserinin ilerlemesindeki rolünün gösterilmesi için daha fazla erken evreli olgunun değerlendirilmesi gerekmektedir.

Hastalar ortalama yaş olan 57 yaş üzeri ve altı olmak üzere iki gruba bölündüğünde, iki grup arasında her 3 gen için de mRNA düzeylerinin değişimi açısından anlamlı bir fark bulunamamıştır. Ayrıca yaşa göre oluşturulan bu iki grup arasında hastalısız yaşam süreleri açısından da anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p=0,954$, Chi-square). Hastalar yaşları açısından iki gruba ayrıldığında grup içinde hastalığın evresi, tümörün histolojik tipi ve diğer parametreler açısından homojen bir dağılım olmaması, sadece yaş kriterinin hastalısız yaşam süresi üzerine etkisini tartışmada sınırlayıcı bir faktördür. Benzer durum diğer kıyaslamalar için de geçerlidir.

Hastalar seröz, müsinöz, endometrioid ve miks tip gibi tümörün histolojik alt tiplerine göre sınıflandırıldığında, oluşan gruplardaki hasta sayıları istatistikî değerlendirme için yetersiz olduğundan tümörün histolojik alt tiplerindeki ifade farklılıkları değerlendirilemedi. Yukarıda bahsedilen istatistikî değerlendirmelerde; oranlar arasında belirgin farklılık gözlenmesine rağmen, grupları oluşturan olgu sayılarının az olması sebebiyle elde edilen verilerden istatistiksel olarak sadece birkaç noktada anlamlı sonuç alınması, bu genlerin yumurtalık kanserindeki rolünü değerlendirme açısından daha geniş serilerin çalışılmasının gerekliliğini ortaya çıkarmıştır.

Özellikle Q-RT-PCR gibi hassas bir tekniğin kullanıldığı gen ekspresyon çalışmalarında verilerin geniş bir aralığa dağılıyor olmasının ve bazı hastalarda artış gözlenirken bazılarında azalış belirlenmiş olmasının bir nedeni de çalışılan doku parçasındaki normal hücrelerin çeşitliliği ve tümör hücrelerine oranıdır. Kullanılan dokuların her ne kadar makroskobik ve mikroskobik olarak tümör dokusu olduğu uzman jinekolog onkolog ve uzman patolog tarafından teyit edilmiş olsalar da, bu dokularda belli oranda normal hücrelerin olması kaçınılmazdır. Normal hücre çeşidi ve oranındaki farklılıklar, farklı hastalarda farklı bulguların elde edilmesini açıklamaya yardımcı olabilir. Ayrıca tümör dokusu homojen bir hücre kitlesi değildir. Tümörün farklı bölgelerindeki tümör hücreleri de farklı gen ifadesi profiline sahip olabilirler. Bu nedenle tümör dokusu içerisindeki heterojenite de farklı mRNA düzeylerinin belirlenmesine yol açabilir. Aynı zamanda bireyler arası farklılıklar da gen ifadesindeki farklılıkların açıklanmasında kullanışlı olabilir.

Aynı primer kökene sahip olsalar ve sıklıkla aynı bölgeye metastaz yapsalar bile metastazda birden fazla mekanizma ve bağlı olarak da çok sayıda gen rol alabilir. Bazı hastalarda *NM23-H1*, *KAI1* ya da *MAP2K4* genleri rol oynarken başka hastalarda başka genler rol alabilir. Yumurtalık kanseri metastazında rolü olan bütün genetik faktörler belirlendiğinde, bir hastada olası değişimler test edilerek o hastada

hangi faktörlerin sorumlu olduğu belirlenebilir. Böylelikle sorumlu genler hedef alınarak geliştirilecek tedavi yaklaşımlarının uygulanmasıyla hastaya özgün tedavi sayesinde tedavinin başarısı artacaktır. Metastazın gerçekleşmesi, aynı tümör tipinde bile olsa farklı hastalarda çok sayıda ve farklı genetik faktörlerin rol oynadığı heterojen bir süreçtir. Bu nedenle bireye özgü tedavi yaklaşımları gerektirebilir.

Yumurtalık kanserinde hastaların bir kısmı başlangıçta kemoterapiye yanıt vermezken, yanıt veren hastaların ise yarısında hastalık ilerleyen zamanda tekrar ortaya çıkar. Bu nedenle yumurtalık kanseri tedavisinde kemoterapinin başarısını etkileyen faktörlerin belirlenmesi ve yeni tedavi yaklaşımları ile kemoterapi başarısının artırılması, epitelyal yumurtalık kanserinde sağ kalım oranlarının artırılması açısından önemlidir. *ABCB1* geni çok sayıda ilacın istenilen etkiyi gösterememesinde birçok farklı mekanizma ile rol aldığı gösterilmiş olan, iyi karakterize edilmiş bir genetik faktördür. Epitelyal yumurtalık kanserinde tedavinin başarısını etkileyen faktörleri konu alan bir çalışmada; 32 klinik örnekte immünohistokimyasal yöntemle *ABCB1* geni ifadesi belirlenmiştir. Bu çalışmada; *ABCB1* geni ifadesi ile paclitaxele yanıt ve sağ kalım süreleri açısından negatif bir ilişki bulunmuştur. Ancak bu çalışmada *ABCB1* geninin ifadesini etkileyen polimorfizmler açısından genotipleme yapılmamıştır [86]. *ABCB1* genindeki g.-129T>C, g.1236T>C, g.2677G>A/T polimorfizmlerinin, yumurtalık kanserinin tedavisinde kullanılan paclitaxelin kanda düşük konsantrasyonda olmasına neden olduğu, dolayısıyla paclitaxelin kandaki istenilen düzeylerine ulaşılmasında *ABCB1* genotiplemesinin katkısı olabileceği bildirilmişken, *ABCB1* g.3435C>T polimorfizmi ile ilacın kandaki düzeyleri arasında bir ilişki kurulamamıştır [76]. Başka bir çalışmada ise; paclitaxelin *ABCB1* geni ifadesini arttırdığı ve böylelikle paclitaxele yanıtızsızlığa neden olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada ayrıca *ABCB1* geni ifadesini baskılayan yeni ajanların bulunmasının epitelyal yumurtalık kanserlerinde paclitaxel tedavisinin başarısını arttıracığı görüşü ileri sürülmüştür [77]. Paclitaxelin etkinliğini arttırmak için yapılan diğer bir çalışmada; paclitaxele etil karbonat gibi bir yan grubun ilave edilmesi ile epitelyal yumurtalık kanseri hücrelerinde, paclitaxelin P-gp aracılığıyla hücre dışına atılmasının engellenebildiği gösterilmiştir [87]. Böylelikle modifiye paclitaxelin öncül-ilaç olarak verildiğinde hücre içi konsantrasyonunun artırılabilmesi için P-gp' in önemini göstermekle birlikte, yeni tedavi yaklaşımları için de iyi bir örnektir. Çalışmamıza dâhil edilen hastaların III. ve IV. evre olanlarında; cerrahi işlem ile tümörün çıkarılmasını takiben 20 gün ara ile 6 defa Carboplatin-paclitaxel kombine kemoterapi protokolü uygulanmıştır. Hastalar kemoterapi sonrası görülen yan etkilerden bulantı ve kusma açısından değerlendirildiğinde *ABCB1* g.3435C>T polimorfizmi açısından yapılan genotipleme ile oluşturulan 3 grup (CC, CT, TT) arasında bir fark gözlenmemiştir. Ancak hastaliksız yaşam süreleri açısından kıyaslandığında düşük P-gp sentezlenmesine neden olduğu gösterilmiş olan TT genotipine sahip hastaların diğer genotiplere kıyasla daha kısa hastaliksız yaşam sürelerine sahip oldukları belirlenmiştir. Her ne kadar sonuç istatistiksel olarak anlamlı bulunmasa da p değeri 0,05' e yakın bir değer (p=0,078, Chi-square) bulunmuştur. Bu bulgu; çalışılan hasta sayısı artırıldığında istatistikî açıdan da anlamlı fark bulunma olasılığını desteklemektedir. Çalışmamıza dâhil edilen hastaların yaş, hastalığın evresi, tümörün histolojik tipi ve tümörün farklılaşmış olması gibi hastaliksız yaşam süreleri üzerine etkisi olabilecek bilinen ve bilinmeyen birçok faktör açısından heterojenite göstermesi, TT genotipi ile hastaliksız yaşam süreleri arasındaki ilişkinin yorumlanmasında sınırlayıcı faktördür. Çalışmamızda hastaliksız yaşam süreleri üzerine etkisi olabilecek diğer tüm faktörler

göz ardı edildiğinde, TT genotipi ile hastalıksız yaşam süresinin kısalması arasında bir ilişki belirlenmiştir. Böylelikle TT genotipi epitelyal yumurtalık kanserinde kötü prognoz ile ilişkili bir prognostik faktör olarak tanımlanabilir. Ancak bu bulgunun çok daha fazla sayıda hastanın değerlendirildiği çalışmalarla teyit edilmesi gerekmektedir. Diğer yandan, TT genotipinin hangi mekanizma ile hastalıksız yaşam süresinin kısalmasında rol aldığı belirlenmesi aydınlatılması gereken bir nokta olarak kalmaktadır. İlgili mekanizmaların aydınlatılması, TT genotipinin prognostik önemine dair elde edilen bilginin kullanılabilirliğinin desteklenmesi açısından da önemlidir.

Çalışmamızla elde edilen verilerin şu sonuçlara ulaşılmasına olanak sağladığı düşüncesindeyiz;

1- Epitelyal yumurtalık kanseri tanısının erken evrelerde konulması tedavinin başarıya ulaşması ve sağ kalım oranlarının artırılması açısından önemlidir. Bu nedenle, hastalığın erken tanısında kullanışlı olabilecek moleküler belirteçlerin bulunması ile erken tanıya olanak sağlayan yöntemler geliştirilmelidir. Hastalığın erken görülen bulguları açısından toplumun bilgilendirilmesi gerekmektedir.

2- Diğer kanser tiplerinde metastatik dokularda *NM23-H1*, *KAI1* genlerinin ifadelerinin azaldığı gösterilmiş olmasına rağmen, yumurtalık kanserinde metastatik dokularda azalmadığı, bu yüzden yumurtalık kanserinin metastazındaki mekanizmasını aydınlatmaya yönelik daha fazla çalışma yapılmasının gerekliliği ortaya çıkmaktadır.

3- *MAP2K4* geninin hem primer tümör hem de metastatik tümör dokularında azalması *MAP2K4* geninin epitelyal yumurtalık kanserinde hem tümörogenesizde hem de metastazında baskılayıcı rolü olabileceğini göstermektedir.

4- *ABCBI* TT genotipinin diğer faktörlerden bağımsız düşünüldüğünde hastalıksız yaşam süresini kısaltarak, kötü prognoz ile ilişkili olduğu ileri sürülebilir. Ancak bu ilişkinin doğrulanması için daha fazla sayıda hastada test edilmesi gereklidir.

KAYNAKLAR

1. Oliveira, P.A., et al., Chemical carcinogenesis. *An Acad Bras Cienc*, 2007. 79(4): p. 593-616.
2. Polsky, D., et al., Variation in chemotherapy utilization in ovarian cancer: the relative contribution of geography. *Health Serv Res*, 2006. 41(6): p. 2201-18.
3. Martin, V.R., Straight talk about ovarian cancer. *Nursing*, 2005. 35(4): p. 36-41; quiz 42.
4. Cvetkovic, D., Early events in ovarian oncogenesis. *Reprod Biol Endocrinol*, 2003. 1: p. 68.
5. Israeli, O., et al., Genomic analyses of primary and metastatic serous epithelial ovarian cancer. *Cancer Genet Cytogenet*, 2004. 154(1): p. 16-21.
6. Hibbs, K., et al., Differential gene expression in ovarian carcinoma: identification of potential biomarkers. *Am J Pathol*, 2004. 165(2): p. 397-414.
7. Chobanian, N. and C.S. Dietrich, 3rd, Ovarian cancer. *Surg Clin North Am*, 2008. 88(2): p. 285-99, vi.
8. Sonnenschein, C. and A.M. Soto, Theories of carcinogenesis: an emerging perspective. *Semin Cancer Biol*, 2008. 18(5): p. 372-7.
9. Nguyen, D.X. and J. Massague, Genetic determinants of cancer metastasis. *Nat Rev Genet*, 2007. 8(5): p. 341-52.
10. Stafford, L.J., K.S. Vaidya, and D.R. Welch, Metastasis suppressors genes in cancer. *Int J Biochem Cell Biol*, 2008. 40(5): p. 874-91.
11. Eccles, S.A. and D.R. Welch, Metastasis: recent discoveries and novel treatment strategies. *Lancet*, 2007. 369(9574): p. 1742-57.
12. Molloy, T. and L.J. van 't Veer, Recent advances in metastasis research. *Curr Opin Genet Dev*, 2008. 18(1): p. 35-41.
13. Duffy, M.J., P.M. McGowan, and W.M. Gallagher, Cancer invasion and metastasis: changing views. *J Pathol*, 2008. 214(3): p. 283-93.
14. Weinberg, R.A., Mechanisms of malignant progression. *Carcinogenesis*, 2008. 29(6): p. 1092-5.
15. Yokota, J., Tumor progression and metastasis. *Carcinogenesis*, 2000. 21(3): p. 497-503.
16. Bernards, R. and R.A. Weinberg, A progression puzzle. *Nature*, 2002. 418(6900): p. 823.

17. van de Wouw, A.J., et al., The unknown biology of the unknown primary tumour: a literature review. *Ann Oncol*, 2003. 14(2): p. 191-6.
18. Giraudo, E., M. Inoue, and D. Hanahan, An amino-bisphosphonate targets MMP-9-expressing macrophages and angiogenesis to impair cervical carcinogenesis. *J Clin Invest*, 2004. 114(5): p. 623-33.
19. Huang, S., et al., Contributions of stromal metalloproteinase-9 to angiogenesis and growth of human ovarian carcinoma in mice. *J Natl Cancer Inst*, 2002. 94(15): p. 1134-42.
20. Biswas, C., et al., The human tumor cell-derived collagenase stimulatory factor (renamed EMMPRIN) is a member of the immunoglobulin superfamily. *Cancer Res*, 1995. 55(2): p. 434-9.
21. Allinen, M., et al., Molecular characterization of the tumor microenvironment in breast cancer. *Cancer Cell*, 2004. 6(1): p. 17-32.
22. Yamada, S.D., et al., Mitogen-activated protein kinase kinase 4 (MKK4) acts as a metastasis suppressor gene in human ovarian carcinoma. *Cancer Res*, 2002. 62(22): p. 6717-23.
23. Rinker-Schaeffer, C.W., et al., Metastasis suppressor proteins: discovery, molecular mechanisms, and clinical application. *Clin Cancer Res*, 2006. 12(13): p. 3882-9.
24. Weber, G.F., Molecular mechanisms of metastasis. *Cancer Lett*, 2008.
25. Disibio, G. and S.W. French, Metastatic patterns of cancers: results from a large autopsy study. *Arch Pathol Lab Med*, 2008. 132(6): p. 931-9.
26. Takeshima, N., et al., Lymph node metastasis in ovarian cancer: difference between serous and non-serous primary tumors. *Gynecol Oncol*, 2005. 99(2): p. 427-31.
27. Hess, K.R., et al., Metastatic patterns in adenocarcinoma. *Cancer*, 2006. 106(7): p. 1624-33.
28. Tan, D.S., R. Agarwal, and S.B. Kaye, Mechanisms of transcoelomic metastasis in ovarian cancer. *Lancet Oncol*, 2006. 7(11): p. 925-34.
29. Smid, M., et al., Genes associated with breast cancer metastatic to bone. *J Clin Oncol*, 2006. 24(15): p. 2261-7.
30. Reed, E., et al., Analysis of autopsy evaluations of ovarian cancer patients treated at the National Cancer Institute, 1972-1988. *Am J Clin Oncol*, 2000. 23(2): p. 107-16.
31. Chan, M.W., et al., Hypermethylation of 18S and 28S ribosomal DNAs predicts progression-free survival in patients with ovarian cancer. *Clin Cancer Res*, 2005. 11(20): p. 7376-83.
32. Anish Bali, K.R., The current management of primary ovarian cancer: a review. *Cancer Therapy*, 2004. 2: p. 305-316.

33. Longley, D.B. and P.G. Johnston, Molecular mechanisms of drug resistance. *J Pathol*, 2005. 205(2): p. 275-92.
34. Colombo, N., et al., Ovarian cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2006. 60(2): p. 159-79.
35. Chen, V.W., et al., Pathology and classification of ovarian tumors. *Cancer*, 2003. 97(10 Suppl): p. 2631-42.
36. Tinelli, R., et al., Conservative surgery for borderline ovarian tumors: a review. *Gynecol Oncol*, 2006. 100(1): p. 185-91.
37. Gershenson, D.M., Clinical management potential tumours of low malignancy. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 2002. 16(4): p. 513-27.
38. Webb, P.M., et al., Symptoms and diagnosis of borderline, early and advanced epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol*, 2004. 92(1): p. 232-9.
39. Wong, H.F., et al., Ovarian tumors of borderline malignancy: a review of 247 patients from 1991 to 2004. *Int J Gynecol Cancer*, 2007. 17(2): p. 342-9.
40. Suh-Burgmann, E., Long-term outcomes following conservative surgery for borderline tumor of the ovary: a large population-based study. *Gynecol Oncol*, 2006. 103(3): p. 841-7.
41. Lancaster, J.M., et al., Identification of genes associated with ovarian cancer metastasis using microarray expression analysis. *Int J Gynecol Cancer*, 2006. 16(5): p. 1733-45.
42. Adib, T.R., et al., Predicting biomarkers for ovarian cancer using gene-expression microarrays. *Br J Cancer*, 2004. 90(3): p. 686-92.
43. Steeg, P.S., et al., Evidence for a novel gene associated with low tumor metastatic potential. *J Natl Cancer Inst*, 1988. 80(3): p. 200-4.
44. Fournier, H.N., C. Albiges-Rizo, and M.R. Block, New insights into Nm23 control of cell adhesion and migration. *J Bioenerg Biomembr*, 2003. 35(1): p. 81-7.
45. Dooley, S., et al., Isolation and characterization of the human genomic locus coding for the putative metastasis control gene nm23-H1. *Hum Genet*, 1994. 93(1): p. 63-6.
46. Lacombe, M.L., et al., The human Nm23/nucleoside diphosphate kinases. *J Bioenerg Biomembr*, 2000. 32(3): p. 247-58.
47. Lee, H.Y. and H. Lee, Inhibitory activity of nm23-H1 on invasion and colonization of human prostate carcinoma cells is not mediated by its NDP kinase activity. *Cancer Lett*, 1999. 145(1-2): p. 93-9.
48. Freije, J.M., et al., Site-directed mutation of Nm23-H1. Mutations lacking motility suppressive capacity upon transfection are deficient in histidine-dependent protein phosphotransferase pathways in vitro. *J Biol Chem*, 1997. 272(9): p. 5525-32.

49. Yoon, J.H., et al., Characterization of the 3' --> 5' exonuclease activity found in human nucleoside diphosphate kinase 1 (NDK1) and several of its homologues. *Biochemistry*, 2005. 44(48): p. 15774-86.
50. Kaetzel, D.M., et al., Potential roles of 3'-5' exonuclease activity of NM23-H1 in DNA repair and malignant progression. *J Bioenerg Biomembr*, 2006. 38(3-4): p. 163-7.
51. Tee, Y.T., et al., Nm23-H1: a metastasis-associated gene. *Taiwan J Obstet Gynecol*, 2006. 45(2): p. 107-13.
52. Zou, M., et al., High levels of Nm23 gene expression in advanced stage of thyroid carcinomas. *Br J Cancer*, 1993. 68(2): p. 385-8.
53. Oda, Y., et al., Comparison of histological changes and changes in nm23 and c-MET expression between primary and metastatic sites in osteosarcoma: a clinicopathologic and immunohistochemical study. *Hum Pathol*, 2000. 31(6): p. 709-16.
54. Mandai, M., et al., Expression of metastasis-related nm23-H1 and nm23-H2 genes in ovarian carcinomas: correlation with clinicopathology, EGFR, c-erbB-2, and c-erbB-3 genes, and sex steroid receptor expression. *Cancer Res*, 1994. 54(7): p. 1825-30.
55. Tas, F., et al., Prognostic role of nm23 gene expression in patients with ovarian cancer. *Am J Clin Oncol*, 2002. 25(2): p. 164-7.
56. Tomic, S., et al., c-erbB-2, p53, and nm23 proteins as prognostic factors in patients with epithelial ovarian carcinoma. *Croat Med J*, 2003. 44(4): p. 429-34.
57. Gaugitsch, H.W., et al., A new superfamily of lymphoid and melanoma cell proteins with extensive homology to *Schistosoma mansoni* antigen Sm23. *Eur J Immunol*, 1991. 21(2): p. 377-83.
58. Dong, J.T., et al., Genomic organization of the human KAI1 metastasis-suppressor gene. *Genomics*, 1997. 41(1): p. 25-32.
59. Ichikawa, T., et al., Localization of metastasis suppressor gene(s) for prostatic cancer to the short arm of human chromosome 11. *Cancer Res*, 1992. 52(12): p. 3486-90.
60. Dong, J.T., et al., KAI1, a metastasis suppressor gene for prostate cancer on human chromosome 11p11.2. *Science*, 1995. 268(5212): p. 884-6.
61. Liu, W.M. and X.A. Zhang, KAI1/CD82, a tumor metastasis suppressor. *Cancer Lett*, 2006. 240(2): p. 183-94.
62. Maecker, H.T., S.C. Todd, and S. Levy, The tetraspanin superfamily: molecular facilitators. *FASEB J*, 1997. 11(6): p. 428-42.
63. Tagawa, K., et al., Down-regulation of KAI1 messenger RNA expression is not associated with loss of heterozygosity of the KAI1 gene region in lung adenocarcinoma. *Jpn J Cancer Res*, 1999. 90(9): p. 970-6.

64. Miyazaki, T., et al., Mutation and expression of the metastasis suppressor gene KAI1 in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer*, 2000. 89(5): p. 955-62.
65. Jackson, P., et al., Methylation of a CpG island within the promoter region of the KAI1 metastasis suppressor gene is not responsible for down-regulation of KAI1 expression in invasive cancers or cancer cell lines. *Cancer Lett*, 2000. 157(2): p. 169-76.
66. Houle, C.D., et al., Loss of expression and altered localization of KAI1 and CD9 protein are associated with epithelial ovarian cancer progression. *Gynecol Oncol*, 2002. 86(1): p. 69-78.
67. Schindl, M., et al., Downregulation of KAI1 metastasis suppressor protein is associated with a dismal prognosis in epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol*, 2001. 83(2): p. 244-8.
68. Cuenda, A., Mitogen-activated protein kinase kinase 4 (MKK4). *Int J Biochem Cell Biol*, 2000. 32(6): p. 581-7.
69. Robinson, V.L., et al., MKK4 and metastasis suppression: a marriage of signal transduction and metastasis research. *Clin Exp Metastasis*, 2003. 20(1): . 25-30.
70. Whitmarsh, A.J. and R.J. Davis, Role of mitogen-activated protein kinase kinase 4 in cancer. *Oncogene*, 2007. 26(22): p. 3172-84.
71. Hickson, J.A., et al., The p38 kinases MKK4 and MKK6 suppress metastatic colonization in human ovarian carcinoma. *Cancer Res*, 2006. 66(4): p. 2264-70.
72. Spillman, M.A., et al., Regulation of the metastasis suppressor gene MKK4 in ovarian cancer. *Gynecol Oncol*, 2007. 105(2): p. 312-20.
73. Chien, J.R., et al., Molecular pathogenesis and therapeutic targets in epithelial ovarian cancer. *J Cell Biochem*, 2007. 102(5): p. 1117-29.
74. Wang, D., et al., Multidrug resistance polypeptide 1 (MDR1, ABCB1) variant 3435C>T affects mRNA stability. *Pharmacogenet Genomics*, 2005. 15(10): p. 693-704.
75. Chan, K.K., et al., The role of regular physical examination in the detection of ovarian cancer recurrence. *Gynecol Oncol*, 2008. 110(2): p. 158-61.
76. Yamaguchi, H., et al., Genetic variation in ABCB1 influences paclitaxel pharmacokinetics in Japanese patients with ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer*, 2006. 16(3): p. 979-85.
77. Hille, S., et al., Anticancer drugs induce *mdr1* gene expression in recurrent ovarian cancer. *Anticancer Drugs*, 2006. 17(9): p. 1041-4.
78. Lu, L., et al., Expression of MDR1 in epithelial ovarian cancer and its association with disease progression. *Oncol Res*, 2007. 16(8): p. 395-403.

79. Legge, F., et al., Biological characterization of ovarian cancer: prognostic and therapeutic implications. *Ann Oncol*, 2005. 16 Suppl 4: p. iv95-101.
80. Ayhan, A., et al., Lymphatic metastasis in epithelial ovarian carcinoma with respect to clinicopathological variables. *Gynecol Oncol*, 2005. 97(2): p. 400-4.
81. Chu, C.S. and S.C. Rubin, Screening for ovarian cancer in the general population. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 2006. 20(2): p. 307-20.
82. Cadron, I., et al., The management of borderline tumours of the ovary. *Curr Opin Oncol*, 2006. 18(5): p. 488-93.
83. Schneider, J., et al., nm23-H1 expression defines a high-risk subpopulation of patients with early-stage epithelial ovarian carcinoma. *Br J Cancer*, 2000. 82(10): p. 1662-70.
84. Liu, F.S., et al., Frequent down-regulation and lack of mutation of the KAI1 metastasis suppressor gene in epithelial ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol*, 2000. 78(1): p. 10-5.
85. Wang, T.H., et al., Microtubule-interfering agents activate c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase through both Ras and apoptosis signal-regulating kinase pathways. *J Biol Chem*, 1998. 273(9): p. 4928-36.
86. Penson, R.T., et al., Expression of multidrug resistance-1 protein inversely correlates with paclitaxel response and survival in ovarian cancer patients: a study in serial samples. *Gynecol Oncol*, 2004. 93(1): p. 98-106.
87. Tanino, T., et al., Paclitaxel-2'-Ethylcarbonate prodrug can circumvent P-glycoprotein-mediated cellular efflux to increase drug cytotoxicity. *Pharm Res*, 2007. 24(3): p. 555-65.

ÖZGEÇMİŞ

Türker BİLGEN 29.08.1975 tarihinde Amasya' da doğmuştur. 1992 yılında Kırklareli Atatürk Lisesi'nden mezun olmuştur. 1995 yılında İstanbul Üniversitesi Tıbbi Laboratuvar önlisans programını tamamlamıştır. 1999 yılında Akdeniz Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü' nden üçüncülük derecesiyle mezun olarak aynı yıl Akdeniz Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Bilim Dalı' nda Tıbbi Genetik Yüksek Lisans Programına başlamış ve aynı anabilim dalına araştırma görevlisi olarak atanmıştır. 2002 yılında yüksek lisans programından mezun olmuş ve aynı anabilim dalında 2002 yılında Tıbbi Genetik doktora programına başlamıştır.

EKLER

Frequencies of Four Genetic Polymorphisms in the *CYP1A2* gene in Turkish Population¹

T. Bilgen^a, O. Tosun^b, G. Luleci^a, and I. Keser^a

^aDepartment of Medical Genetics Faculty of Medicine, Akdeniz University, Antalya, TR-07070, Turkey

^bDepartment of Biostatistics, Faculty of Medicine, Akdeniz University, Antalya, TR-07070 Turkey

e-mail: keser@akdeniz.edu.tr

Received September 22, 2006; in final form, January 29, 2007

Abstract—Cytochrome P450 (CYP) 1A2 gene is involved in the metabolic activation of several carcinogens and altered metabolism of some clinically used drugs. We aimed to investigate the distributions of genetic polymorphisms -3860 (G/A) (*CYP1A2*1C*) and -2467 (T/del) (*CYP1A2*1D*) in the 5'-flanking region and -739 (T/G) (*CYP1A2*1E*) and -163 (C/A) (*CYP1A2*1F*) in the first intron of the *CYP1A2* gene in 110 unrelated healthy Turkish volunteers by PCR-RFLP technique. The frequencies of each polymorphism in Turkish population were found as 0.04, 0.92, 0.01, 0.27 for *CYP1A2*1C*, *CYP1A2*1D*, *CYP1A2*1E*, *CYP1A2*1F*, respectively. Compared with other populations, *CYP1A2*1D* has been found to be significantly increased in Turkish population. On the other hand, in general, the frequencies of the other polymorphisms were concordant with those in the Egyptian and Caucasian populations, and were different from those in the Japanese, Chinese and Ethiopian populations. Our results suggest that due to increased frequency of *CYP1A2*1D* in Turkish population, functional significance of *CYP1A2*1D* should be evaluated. It might be screened to determine the relationship between *CYP1A2*1D* and *CYP1A2* related drug metabolisms in associated groups.

DOI: 10.1134/S102279540800139

INTRODUCTION

CYP1A2, a member of the cytochrome P450 superfamily (CYPs), is involved in the metabolic activation of several carcinogens and more than 20 clinically used drugs are partly or predominantly metabolized by *CYP1A2* [1–3]. Low inducibility of *CYP1A2* gene has been also associated with high risk of myocardial infarction [4]. Since interindividual differences in *CYP1A2* protein and mRNA levels have been reported in human liver samples, it has been thought that genetic variations may have an important role in expression of *CYP1A2* gene [5, 6]. Up to now, 23 variants of the *CYP1A2* gene have been reported, see <http://www.imm.ki.se/CYPalleles/cyp1a2.htm>. It has been demonstrated that -3860(G/A) and -163(C/A) polymorphisms are associated with decreased and increased inducibility of the *CYP1A2* gene, respectively [7, 8]. Decreased activity for the *CYP1A2*1K*, *CYP1A2*7* and *CYP1A2*11* haplotypes has also been reported [9–11].

We selected four *CYP1A2* polymorphisms which have been studied in Japanese, Egyptian populations; two of them were associated with altered enzyme activity. Moreover, there are several studies on the distribution of some *CYP1A2* variants in different ethnic populations. This is the first report on *CYP1A2* variants in Turkish population, to our knowledge. In this study, we

aimed to investigate the frequency of G3860A (*CYP1A2*1C*), T-2467del (*CYP1A2*1D*), T-739G (*CYP1A2*1E*) and C-163A (*CYP1A2*1F*) polymorphisms in the *CYP1A2* gene in Turkish population, and to compare frequencies with other populations.

MATERIALS AND METHODS

Subjects

A hundred-ten unrelated Turkish healthy volunteers with no history of disease were included in this study. Of them, 42 were men and 68 were women with ages varying between 22 and 61 years. Peripheral blood samples were collected from volunteers living in the city of Antalya that is located in southern Turkey. Although parental origins of volunteers were from different regions of Turkey, it was Antalya province for the vast majority of the cases. Signed written consents were taken from the subjects. This study was also approved by the ethic committee of Faculty of Medicine, Akdeniz University.

DNA extraction

Genomic DNA was isolated from peripheral leukocytes of each subject by DNA extraction kit (Molzyme, DE).

¹This article was submitted by the authors in English

Table 1. Allele frequencies of the *CYP1A2*1C* variant in Turkish, Japanese, Egyptian and Chinese populations

Polymorphism <i>CYP1A2*1C</i>	Turkish (n = 110)	Japanese ^{a(12)} (n = 159)	Egyptian ^b (n = 212)	Japanese ^{a(1)} (n = 116)	Chinese ^a (n = 139)
G allele	0.96	0.79	0.93	0.77	0.75
A allele	0.04	0.21	0.07	0.23	0.25

a: Statistically significant difference; $p < 0.0001$, $\chi^2 = 27.926$ for Japanese (Chida), $\chi^2 = 30.33$ for Japanese (Nakajima), $\chi^2 = 37.34$ for Chinese.

b: No significant difference; $P = 0.21$, $\chi^2 = 1.55$ for Egyptian.

PCR-RFLP

Four genetic polymorphisms, *CYP1A2*1C*, *CYP1A2*1D* in the 5'-flanking region, *CYP1A2*1E* and *CYP1A2*1F* in the first intron of the *CYP1A2* gene, were detected by PCR-RFLP as described before [12]. The primers were obtained from Iontek (Turkey). Genotype and allelic frequencies of polymorphisms at each site were determined and compared with other populations.

Statistical analysis

Differences between allelic frequencies among different ethnic groups were assessed using Pearson chi-square test (SPSS, version 11.01).

RESULTS

The frequencies of *CYP1A2*1C*, *CYP1A2*1D*, *CYP1A2*1E*, *CYP1A2*1F* alleles in the Turkish population were found as 0.04, 0.92, 0.01, 0.27, respectively. Comparisons of the allelic frequencies of *CYP1A2*1C*, **1D*, **1E*, **1F* between our results and other populations are shown in Tables 1-4. When compared with other populations, *CYP1A2*1D* has been found to be very high in the Turkish population (Table 2).

DISCUSSION

Interindividual variation in *CYP1A2* levels may be explained by different factors, including genetic differences and environmental exposure. It has been demonstrated that some *CYP1A2* polymorphisms are associated with individual differences in *CYP1A2* activity. Thus, it may influence individual susceptibility to cancer risk and the therapeutic efficacy of related drugs. *CYP1A2* polymorphisms have ethnic variability. Therefore, detection of the frequencies of *CYP1A2* gene polymorphisms in different populations may be important in order to start an investigation on the relationship between diseases and polymorphisms. There are few population studies comparing the frequencies of *CYP1A2* variants in different ethnic groups.

The frequency of *CYP1A2*1C* was significantly lower in the Turkish population than in Japanese and Chinese populations, whereas the frequency of *CYP1A2*1C* was relatively equal in the Turkish and

Egyptian populations (Table 1) [12-15]. Our data suggest that allele frequency of *CYP1A2*1D* (del variant) in Turkish population was substantially higher than those in Japanese and Egyptian populations (Table 2). Frequency of *CYP1A2*1E* in the Turkish population was lower than those in Japanese and Egyptian, only the difference with the Japanese population was statistically significant (Table 3) [12, 15]. When the allele frequency of *CYP1A2*1F* in the Turkish population was compared with those in Japanese, Egyptian, Ethiopian, Chinese and Caucasians, the *CYP1A2*1F* allele frequency was found to be significantly higher than those in the Japanese and the Ethiopian populations (Table 4) [8, 9, 12-15].

It is obvious that, to explain the relationship between *CYP1A2* polymorphisms and enzyme activity, all of the described allelic variants in the *CYP1A2* gene should be screened in specific groups, using drugs that are substrates for *CYP1A2*. The entire *CYP1A2* gene should be also screened to describe new allelic variants that may be unique for Turkish population. On the other

Table 2. Allele frequencies of the *CYP1A2*1D* variant in Turkish, Japanese and Egyptian populations

Polymorphism <i>CYP1A2*1D</i>	Turkish (n = 110)	Japanese ^a (n = 159)	Egyptian ^b (n = 212)
T allele	0.08	0.58	0.60
del allele	0.92	0.42	0.40

a: Statistically significant difference; $p < 0.0001$, $\chi^2 = 125.32$ for Japanese (Chida), $\chi^2 = 148.63$ for Egyptian.

Table 3. Allele frequencies of the *CYP1A2*1E* variant in Turkish, Japanese and Egyptian populations

Polymorphism <i>CYP1A2*1E</i>	Turkish (n = 110)	Japanese ^a (n = 159)	Egyptian ^b (n = 212)
T allele	0.99	0.92	0.97
G allele	0.01	0.08	0.03

a: Statistically significant difference; $p = 0.0008$, $\chi^2 = 11.15$ for Japanese (Chika).

b: No significant difference; $P = 0.15$, $\chi^2 = 2.08$ for Egyptian.

hand, it seems that detection of the single nucleotide polymorphism (SNP) in the *CYP1A2* gene may be insufficient to decide its clinical role, because many SNPs exist in the *CYP1A2* gene. It might be necessary to do haplotype analysis.

Our study provided *CYP1A2* profile for four known polymorphisms in Turkish population and revealed an extremely high frequency of *CYP1A2*1D* variant in Turkish population. On the other hand, we need to study the functional role of *CYP1A2*1D*, which is highly frequent in Turkish population compared to

other populations, to clarify any possible clinical importance.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by Akdeniz University Scientific Research Project Management Unit.

REFERENCES

1. Landi, M.T., Sirha, R., Lang, N.P., and Kadlubar, F.F., Human Cytochrome P4501A2, *IARC Sci. Publications*, 1999, vol. 148, pp. 173–195.
2. McManus, M.E., Burgess, W.M., and Veronese, M.E., Metabolism of 2-Acetylaminofluorene and Benzo(A)pyrene and Activation of Food-Derived Heterocyclic Amine Mutagens by Human Cytochromes P-450, *Cancer Res.*, 1990, vol. 50, no. 11, pp. 3367–3376.
3. Bertilsson, L., Camillo, J.A., and Dahl, M.L., Clozapine Disposition Correlates with *CYP1A2* Activity Determined by a Caffeine Test, *British J. Clin. Pharmacol.*, 1994, vol. 38, no. 5, pp. 471–473.
4. Cornelis, M.C., El-Soheby, A., and Campos, H., Genetic Polymorphism of *CYP1A2* Increases the Risk of Myocardial Infarction, *J. Med. Genet.*, 2004, vol. 41, no. 10, p. 758–762.
5. Hammons, G.J., Yan-Sanders, Y., and Jin, B., Specific Site Methylation in the 5'-Flanking Region of *CYP1A2*—Interindividual Differences in Human Livers, *Life Sci.*, 2001, vol. 69, no. 7, pp. 839–845.
6. Shimada, T., Yamazaki, H., and Mimura, M., Interindividual Variations in Human Liver Cytochrome P-450 Enzymes Involved in the Oxidation of Drugs, Carcinogens and Toxic Chemicals: Studies with Liver Microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians, *J. Pharmacol. Exptl. Therapeutics*, 1994, vol. 270, no. 1, pp.4146-423.

Table 4. Allele frequencies of the *CYP1A2*1F* variant in Turkish, Japanese, Egyptian, Ethiopian, Chinese and Caucasian populations

Polymorphism <i>CYP1A2*1F</i>	Turkish (n = 110)	Japanese ^a (n = 159)	Egyptian ^b (n = 212)	Ethiopian ^b (n = 173)	Chinese ^b (n = 139)	Caucasian ^b (n = 185)
C allele	0.27	0.39	0.32	0.40	0.33	0.32
A allele	0.73	0.61	0.68	0.60	0.67	0.68

a: Statistically significant difference; $p = 0.045$, $\chi^2 = 3.99$ for Japanese (Chika), $p = 0.0025$, $\chi^2 = 9.12$ for Ethiopian.

b: No significant difference; $P = 0.23$, $\chi^2 = 1.46$ for Egyptian, $P = 0.076$, $\chi^2 = 3.14$ for Chinese, $P = 0.128$, $\chi^2 = 2.32$ for Caucasian.

7. Nakajima, M., Yokoi, T., and Mizutani, M., Genetic Polymorphism in the 5'-Flanking Region of *CYP1A2* Gene: Effect on the *CYP1A2* Inducibility in Humans, *J. Biochem. (Tokyo, Jpn.)*, 1999, vol. 125, no. 4, pp. 803–808.
8. Sachse, C., Brockmoller, J., Bauer, S., and Roots, I., Functional Significance of a CA Polymorphism in Intron 1 of the Cytochrome P450 *CYP1A2* Gene Tested with Caffeine, *British J. Clin. Pharmacol.*, 1999, vol. 47, no. 4, pp. 445–449.
9. Aklilu, E., Carrillo, J.A., and Makonnen, E., Genetic polymorphism of *CYP1A2* in Ethiopians Affecting Induction and Expression: Characterization of Novel Haplotypes with Single-Nucleotide Polymorphisms in Intron 1, *Mol. Pharmacol.*, 2003, vol. 64, no. 3, pp. 659–669.
10. Allorge, D., Chevalier, D., and Lo-Guidice, J.M., Identification of a Novel Splice-Site Mutation in the *CYP1A2* Gene, *British J. Clin. Pharmacol.*, 2003, vol. 56, no. 3, pp. 341–344.
11. Murayama, N., Soyama, A., and Saito, Y., Six Novel Nonsynonymous *CYP1A2* Gene Polymorphism: Catalytic Activities of the Naturally Occurring Variant Enzymes, *J. Pharmacol. Exptl. Therapeutics*, 2004, vol. 308, pp. 3005–3006.
12. Chida, M., Yokoi, T., and Fukui, T., Detection of Three Genetic Polymorphisms in the 5'-Flanking Region and Intron 1 of Human *CYP1A2* in the Japanese Population, *Cancer Res.*, 1999, vol. 90, pp. 899–902.
13. Obase, Y., Shimoda, T., and Kawano, T., Polymorphisms in the *CYP1A2* Gene and Theophylline Metabolism in Patients with Asthma, *Clin. Pharmacol. Therapeutics*, 2003, vol. 73, no. 5, pp. 4686–474.
14. Han, X.M., Ou-Yang, D.S., and Lu, P.X., Plasma Caffeine Metabolite Ratio (17X/137X) *in vitro* Associated with G-2964A and C734A Polymorphisms of Human *CYP1A2*, *Pharmacogenetics*, 2001, vol. 11, no. 5, pp. 429–435.
15. Hamdy, S.I., Hiratsuka, M., and Narahara, K., Genotyping of Four Genetic Polymorphisms in the *CYP1A2* Gene in the Egyptian Population, *British J. Clin. Pharmacol.*, 2003, vol. 55, no. 3, pp. 321–324.

SPELL: 1. OK

Effects of hormone replacement therapy on bone mineral density in Turkish patients with or without COL1A1 Sp1 binding site polymorphism

Mehmet Simsek¹, Zafer Cetin², Turker Bilgen², Omur Taskin¹, Guven Luleci² and Ibrahim Keser²

Departments of ¹Obstetrics and Gynecology, and ²Medical Genetics, Akdeniz University, School of Medicine, Antalya, Turkey

Abstract

Aim: To evaluate the effects of hormone replacement therapy (HRT) on bone mineral density (BMD) in patients with or without COL1A1 Sp1 binding site polymorphism.

Methods: Non-smoking otherwise healthy postmenopausal women ($n = 111$), who had not received any kind of HRT for at least 3 years (between 2002 and 2005) at the onset of menopause, were included. All patients received 0.625 mg conjugated estrogen/2.5 mg medroxyprogesterone for 18 months. BMD by dual X-ray absorptiometry was measured at the lumbar spine and the femur neck initially and after 18th months of treatment. COL1A1 Sp1 binding site polymorphism was studied using the PCR-RFLP method.

Results: After having the results of COL1A1 Sp1 binding site polymorphism, 79 (71.2%) patients were SS, 30 (27.0%) were Ss and two (1.8%) were homozygous for ss. The mean age, weight and length of menopausal period were similar between the SS and Ss patients. The Ss heterozygotes had lower BMD values both at the lumbar spine and at the femur neck compared with the SS patients. This difference was also reflected in post treatment measurements. The increase in BMD scores was higher in the SS homozygotes than in the Ss patients.

Conclusion: Our preliminary data supports the fact that HRT had a lower increase in BMD scores following 18 months of treatment in COL1A1 s allele individuals compared with normal SS individuals. Therefore our study may provide evidence that the Sp1 polymorphism may ameliorate the effects of HRT on BMD, suggesting some additional regimens may be used to support bone strength and to decrease osteoporotic fractures.

Key words: bone mineral density, COL1A1 polymorphism, hormone replacement therapy, postmenopausal woman.

Introduction

Osteoporosis is a common condition with low bone mineral density (BMD) deterioration of the skeletal micro architecture and consequently increased risk of fracture. It affects up to 40% of woman at some point, decreasing their quality of life. Use of antiosteoporotic therapy and hospitalization after fractures among elderly persons represent a major public health

problem with significant cost to the health system. Genetic factors are important in the pathogenesis, since 80% of variance in bone mass is under genetic control.¹ Less is known, however, about the possible roles of genetic factors in predicting a response to antiosteoporotic therapy. Although the genes regulating bone mass are incompletely defined, several candidate genes (Vitamin D receptor, the estrogen receptor, the COL1A1 gene, and transforming growth factor beta-1)

Received: March 7 2007.

Accepted: June 30 2007.

Reprint request to: Associate Professor Ibrahim Keser, Department of Medical Biology and Genetics, School of Medicine, Akdeniz University, TR-07070, Antalya, Turkey. Email: keser@akdeniz.edu.tr

contribute to osteoporosis, however each one has a relatively small effect on BMD and other determinants of fracture risk.^{1,2}

Collagen type I is an important component of the bone matrix. Previous works have identified polymorphism affecting Sp1 binding site in the transcriptional control region of the COL1A1 gene. Alleles with a C-base at the Sp1 binding are defined as 'S', whereas alleles with a T-base are defined as 's'. Clinical studies have shown that patients with 's' allele are likely to have reduced BMD and osteoporotic fractures in several populations.³⁻⁵ Since estrogen deficiency as a consequence of menopause is a major risk factor for osteoporosis, one aim of postmenopausal hormone therapy is to protect against osteoporosis and consequent fractures. However, HRT and/or antio-osteoporotic medications reveal increases in BMD with greater inter individual variance. Therefore, predicting response to osteoporotic treatments not only prevents fracture but will also reduce the cost of treatment and increase the effectiveness of therapy. COL1A1 Sp1 alleles are determinants of bone mass and quality. Therefore, the aim of our study was to find out the effects of HRT on BMD in patients with or without COL1A1 Sp1 binding site polymorphism and its possible role in bone collagen turnover in postmenopausal women with osteoporosis.

Materials and Methods

Non-smoking otherwise healthy postmenopausal women aged 46–54 years ($n=111$) who had not received any kind of HRT for at least 3 years (between 2002 and 2005) at the onset of natural menopause were included. An informed consent was obtained to participate in the study, which had previously been approved by the local ethics committee and the institutional review board. All the women had low serum estradiol levels (<20 pg/mL) and elevated serum follicle-stimulating hormone levels (>40 MIU/mL). Clinical examination and routine biochemical tests were performed to exclude secondary osteoporosis inclusion criteria which were: no previous osteoporotic fracture, at least 2 years of amenorrhoea, and no previous HRT or any kind of antio-osteoporotic medications. Women with liver or renal disease or endocrine or metabolic abnormalities and/or receiving any medicine known to influence bone mineralization, a history of cancer of the endometrium, liver, or breast; surgical

menopause; and a risk of cardiovascular disease were excluded. All patients received 0.625 mg conjugated estrogen/2.5 mg and medroxyprogesterone for 18 months. BMD was measured at the lumbar spine (L2-4) and the femoral neck using dual X-ray absorptiometry (DXA) both initially and after 18th months of treatment. The coefficient of variation in percent (CV%) from duplicate measurements in healthy volunteers was 1% at the lumbar spine and 1.4% at the femoral neck.

Genomic DNA was extracted from samples of peripheral venous blood according to standard procedures, and the polymerase chain reaction (PCR) using primers with a mismatched primer that introduced a diallelic restriction site, as previously described,⁶ detected the intronic polymorphism of the COL1A1 gene. The test discriminates two alleles, S and s, which correspond to the presence of guanine and thymidine, respectively, as the first bases in the Sp1-binding site in the first intron of the gene for COL1A1. The reaction mixture of 25 μ L contained 100 ng of genomic DNA, 50 mM potassium chloride, 10 mM TRIS-hydrochloric acid (pH 8.3), 1.5 mM magnesium chloride, 0.2 mM dideoxynucleoside triphosphates, 150 ng of each primer, and 0.2 unit of Super Taq DNA polymerase (MBI Fermentas Ltd, Lithuania). The reactions were performed in a DNA thermal cycler Genus (Techno Ltd, USA) with a cycling protocol of 94°C, 60°C, and 72°C for one minute each, for 35 cycles. Ten microliters of PCR product was digested with 2 units of MseI restriction enzyme and 1.2 μ L of a buffer, containing 150 mM TRIS-hydrochloric acid (pH 7.5), 250 mM sodium chloride, and 35 mM magnesium chloride, by incubation for 16 h at 37°C. The digestion products underwent electrophoresis on a 3% NuSieve agarose gel (BMC Bio Products, Rockland, ME, USA.) in 44.5 mM TRIS, 44.5 mM boric acid, and 1 mM disodium ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) for 300 volt-hours. The separation patterns were documented by thermal printer (Mitsubishi Ltd, Japan) under ultraviolet illumination (302 nm). COL1A1 Sp1 binding site polymorphism was studied using the PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism) method and the examiners were unaware of the results. The BMD measurements were grouped into Ss and Ss groups at the end of the study. Differences in demographic variables between COL1A1 genotypes were initially compared using parametric and non-parametric tests where applicable. A *P*-value < 0.05 was accepted as significant.

Table 1 Baseline characteristics of the study group according to the COL1A1 genotype (Mean \pm SD)

COL1A1 genotypes	SS (n = 79)	Ss (n = 30)	ss (n = 2)
Age (years)	54.3 \pm 4.4	49.4 \pm 3.33	48.6 \pm 3.0
BMI (kg/m ²)	25.2 \pm 1.6	25.6 \pm 1.3	24.3 \pm 1.4
Time since menopause (months)	28.4 \pm 4.2	30.9 \pm 3.7	30.5 \pm 3.5
PSH (IU/L)	62.9 \pm 13.4	68.0 \pm 11.7	68.0 \pm 11.7
E ₂ (pmol/L)	27.2 \pm 1.9	26.1 \pm 1.7	25.2 \pm 1.8
Parity (number)	2.0 \pm 0.4	2.1 \pm 0.4	2.0 \pm 0.2
Smoking history (n)	5	3	2
Women taking Ca supplementation (%)	44.4	48.1	45.6

Results

The demographic data are given in Table 1. Complete clinical and genotype data were obtained from 111 postmenopausal women. The mean age was 52.7 ± 3 years. Genotype distributions in the 111 women's demographic characteristics are also shown in Table 1. Seventy-nine (71.2%) were homozygous for SS, 30 (27.0%) were heterozygous carrying Ss and two (1.8%) were homozygous for ss. No significant differences were obtained between the COL1A1 genotype groups in terms of age, months since menopause, weight, height, baseline BMD at the femoral neck and the lumbar spine. All patients were osteopenic with a T score of < -2.5 SD. Relevant clinical details at the baseline in relation to the COL1A1 genotype are shown in Table 1 and Figure 1. The spinal and femoral necks BMD were lower in the Ss group compared to the SS group, however the decrease was not statistically significant, possibly reflecting the small number of subjects ($P < 0.05$). Following the HRT treatment, the spine BMD increased in both genotype groups, however the response of the spine BMD was not identical in both groups. The increase in BMD was higher in the SS groups compared to the Ss ($3.1 \pm 0.3\%$ vs $1.8 \pm 0.2\%$, $P < 0.05$; Fig. 1). Interestingly, HRT seemed to be less effective in Ss group and only caused some positive changes in lumbar spine compared to the baseline at the 18th month. (Table 2) Femoral neck BMD changes displayed a similar trend as in the lumbar spine although less effectively ($3.1 \pm 0.3\%$ and $1.8 \pm 0.2\%$ vs $2.0 \pm 0.3\%$ and $1.1 \pm 0.1\%$, respectively) (Table 2). Low-dose HRT caused an increase in the femoral neck BMD in both genotypes but the increase was significantly higher in the SS group compared to the Ss group ($2.0 \pm 0.3\%$ vs $1.1 \pm 0.1\%$, $P < 0.05$). Although the patients with the ss genotype were few, all parameters

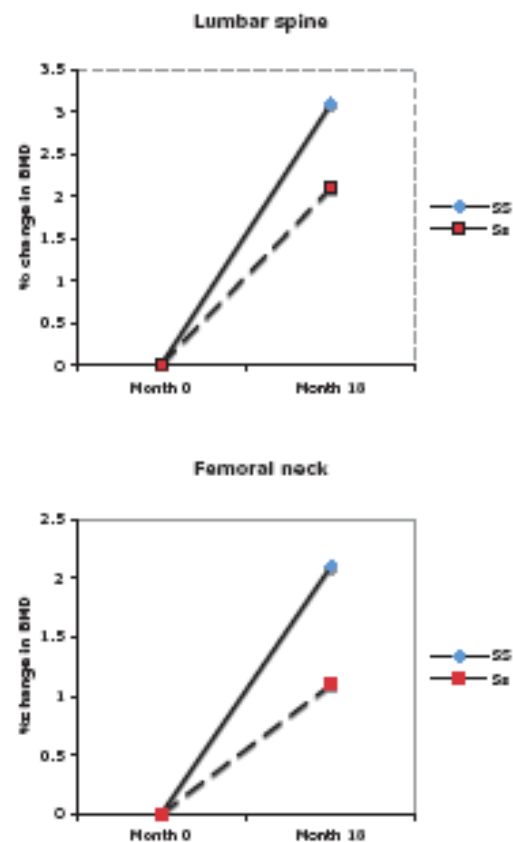


Figure 1 Mean percentage changes in bone mineral density (BMD) in the Lumbar spine and the femoral neck according to COL1A1 genotypes, except the ss genotype.

In conclusion, it has been shown that osteoporotic fractures were strongly associated with the COL1A1 s allele. Our Preliminary data supports that COL1A1 s allele is associated with lower BMD compared to normal women. Furthermore, HRT had a lower increase in BMD scores following 18 months of treatment in COL1A1 s allele individuals compared with normal SS individuals. Our study therefore may provide evidence that the Sp1 polymorphism may ameliorate the effects of HRT on BMD. Thus, we suggest that some additional regimens may be used to support the bone strength and decrease the osteoporotic fractures on this occasion. Moreover, COL1A1 genotyping may be of clinical value in targeting different regimens to those most likely to respond with potential benefits in terms of cost effectiveness.

Acknowledgment

This study was supported by Akdantz University Research Foundation.

References

- Stewart TL, Ralston SH. Role of genetic factors in the pathogenesis of osteoporosis. *J Endocrinol* 2000; 166: 235–245.
- Grant SFA, Reid DM, Blake G, Herd R, Fogelman I, Ralston SH. Reduced bone density and osteoporosis associated with a polymorphic Sp1 site in the collagen type I alpha 1 gene. *Nat Genet* 1996; 14: 203–205.
- Aharez L, Oriola J, Jo J *et al*. Collagen type I alpha 1 gene Sp1 polymorphism in premenopausal women with primary osteoporosis: improved detection of Sp1 binding site polymorphism in the collagen type I gene. *Clin Chem* 1999; 45: 904–906.
- Keen RW, Woodford-Richens KL, Grant SFA, Ralston SH, Lanchbury JS, Spector TD. Association of polymorphism at the type I collagen (COL1A1) locus with reduced bone mineral density, increased fracture risk, and increased collagen turnover. *Arthritis Rheum* 1999; 42: 285–290.
- Roux C, Dougados M, Abel L, Mercier G, Lucotte G. Association of a polymorphism in the collagen I 1 gene with osteoporosis in French women. *Arthritis Rheum* 1998; 41: 187–188.
- Garnero P, Borel O, Grant SFA, Ralston SH, Delmas PD. Collagen I 1 polymorphism, bone mass and bone turnover in healthy French pre-menopausal women: the OFELY study. *J Bone Miner Res* 1998; 13: 813–818.
- Hampson G, Evans C, Pettit RJ *et al*. Bone mineral density, collagen type I alpha 1 genotypes and bone turnover in premenopausal women with diabetes mellitus. *Diabetologia* 1998; 41: 1314–1320.
- Byers PH. Brittle bones—fragile molecules: disorders of collagen gene structure and expression. *Trends Genet* 1990; 6: 293–300.
- Mann V, Hobson EE, Li B *et al*. A COL1A1 Sp1 binding site polymorphism predisposes to osteoporotic fracture by affecting bone density and quality. *J Clin Invest* 2001; 107: 899–907.
- Langdahl BL, Ralston SH, Grant SFA, Eriksen EF. A Sp1 binding site polymorphism in the COL1A1 gene predicts osteoporotic fractures in men and women. *J Bone Miner Res* 1998; 13: 1384–1389.
- Weichtova M, Stepan JJ, Michalaka D *et al*. COL1A1 polymorphism contributes to bone mineral density to assess prevalent wrist fractures. *Bone* 2000; 26: 287–290.
- McGuigan FE, Reid DM, Ralston SH. Susceptibility to osteoporotic fracture is determined by allelic variation at the Sp1 site, rather than other polymorphic sites, at the COL1A1 locus. *Osteoporos Int* 2000; 11: 338–343.
- Sowers M, Wilting M, Burns T *et al*. Genetic markers, bone mineral density and serum osteocalcin levels. *J Bone Miner Res* 1999; 14: 1411–1419.
- Hustmyer FG, Lui G, Johnston CC, Christian J, Pascock M. Polymorphism at an Sp1 binding site of COL1A1 and bone mineral density in pre-menopausal female twins and elderly fracture patients. *Osteoporos Int* 1999; 9: 346–350.
- Uitterlinden AG, Burger H, Huang Q *et al*. Relation of alleles of the collagen type I 1 gene to bone density and risk of osteoporotic fractures in postmenopausal women. *N Engl J Med* 1998; 338: 1016–1022.
- Zajackova K, Zolikova I, Hill M. Is the Sp1 polymorphism in the COL1A1 gene a risk factor for postmenopausal osteoporosis? Comment on the article by Keen *et al*. *Arthritis Rheum* 2002; 46: 2828–2829.
- Liden M, Wilen B, Ljunghall S, Melhus H. Polymorphism at the Sp1 binding site in the collagen type I alpha 1 gene does not predict bone mineral density in postmenopausal women in Sweden. *Calcif Tissue Int* 1998; 63: 293–295.
- Hougaard A, Jørgensen HL, Vestergaard AW, Hassager C, Ralston SH. Lack of influence of collagen type I alpha 1 Sp1 binding site polymorphism on the rate of bone loss in a cohort of postmenopausal Danish women followed for 18 years. *Calcif Tissue Int* 2000; 66: 409–413.
- Pedersen AT, Ottosen B. Issues to debate on the Women's Health Initiative (WHI) study: Epidemiology or randomized clinical trials – time out for hormone replacement therapy studies? *Hum Reprod* 2003; 18: 2241–2244.
- Qureshi AM, Herd RJ, Blake GM, Fogelman I, Ralston SH. COL1A1 Sp1 polymorphism predicts response of femoral neck bone density to cyclical etidronate therapy. *Calcif Tissue Int* 2002; 70: 158–163.
- Mann V, Ralston SH. Meta-analysis of COL1A1 Sp1 polymorphism in relation to bone mineral density and osteoporotic fracture. *Bone* 2003; 32: 711–717.



The Effect of *MDR1* (*ABCB1*) Polymorphism on the Pharmacokinetic of Tacrolimus in Turkish Renal Transplant Recipients

S.H. Akbas, T. Bilgen, I. Keser, M. Tuncer, L. Yucetin, O. Tosun, M. Gultekin, and G. Luleci

ABSTRACT

There is marked interindividual variability in trough blood levels of tacrolimus (TRL) following standard dosing. TRL is a substrate for P-glycoprotein (P-gp), the product of the multidrug resistance-1 (*MDR1*)/(*ABCB1*) gene. P-gp acts as a membrane efflux pump, which affects TRL absorption from the gut. Some of the single nucleotide polymorphisms (SNP) of *ABCB1* gene are associated with pharmacokinetic characteristics of TRL. The objective of this study was to determine the role of *ABCB1* C3435T polymorphism on TRL dose requirements, trough values and dose-adjusted trough TRL concentrations among Turkish renal transplant recipients. Renal transplant recipients receiving TRL ($n = 92$) were genotyped for *ABCB1*. TRL daily doses, trough concentrations, dose-adjusted trough concentrations, demographic features, and clinical data were obtained at 1, 6, and 12 months after renal transplantation. The frequency of the *ABCB1* 3435 CC genotype was 30.4%, whereas 47.8% of patients were 3435 CT and 21.7% of patients were 3435 TT. TRL daily doses were significantly lower among patients with the 3435 TT genotype at months 1 and 6. At 6 and 12 months after transplantation patients who were homozygous for the *ABCB1* 3435 CC showed significantly lower dose-adjusted trough TRL concentrations compared with subjects of 3435 TT and CT genotypes. Knowledge of *ABCB1* genotype may be useful to adjust the optimal dose of TRL in transplant patients, thereby rapidly achieving target concentrations.

IN RECENT YEARS, the inter- and intraindividual differences in the pharmacokinetics of calcineurin inhibitors have been determined to be related to the biologic activity of P-glycoprotein (P-gp) and cytochrome P450 (CYP) systems.^{1,2} Tacrolimus is a substrate of CYP3A4, CYP3A5, and P-gp, which are encoded by *CYP3A4*, *CYP3A5*, and *MDR1* (*ABCB1*) genes, respectively.³ Single nucleotide polymorphisms (SNPs) have been described for these genes.⁴ P-gp is a membrane efflux pump increasing the transport of drugs such as tacrolimus out of the cells. It is present in intestinal epithelial, hepatic luminal proximal renal tubule surface, adrenal gland, and pancreas cells.^{1,5} Intestinal P-gp, which is located almost within the brush border on the apical or luminal surface of the enterocyte, exports a many drugs from the cytoplasm into the intestinal lumen.⁶ Therefore, strong expression of P-gp lowers drug absorption, whereas decreased expression raises the absorption.³ Previous data have demonstrated that genetic polymorphisms are associated with the level of expression or function of P-gp, suggesting a genetic explanation for the interindividual variations observed in tacrolimus dose requirements.^{7,8} It has also been reported that the C3435T mutation

in the *ABCB1* gene is associated with decreased protein expression.⁷ However, there has not been a report of C3435T mutations in the *ABCB1* gene among Turkish renal transplant patients. Since this polymorphism might be expected to have an impact on the absorption, metabolism, and therapeutic efficacy of tacrolimus (TRL), we investigated its frequency in 92 stable Turkish renal transplant recipients. We sought to establish whether the presence of *ABCB1* C3435T polymorphism correlated with TRL dose requirements to achieve the

From the Central Laboratory (S.H.A., M.G.), Department of Medical Biology and Genetics (T.B., I.K., G.L.), Transplantation Center (M.T., L.Y.), and Department of Biostatistics (O.T.), Akdeniz University, Faculty of Medicine, Antalya, Turkey.

This study was completely supported by grants from Akdeniz University, Scientific Research Projects Fund, Antalya (project number: 2004.01.0108.005).

Address reprint requests to S. Halide Akbas, Akdeniz University, Faculty of Medicine, Central Laboratory, Antalya, Turkey, 07070. E-mail: halideakbas@akdeniz.edu.tr

0041-1345/06/\$-see front matter
doi:10.1016/j.transproceed.2006.02.070

1290

© 2006 by Elsevier Inc. All rights reserved.
360 Park Avenue South, New York, NY 10010-1710

Transplantation Proceedings, 38, 1290-1292 (2006)

target therapeutic range, with TRL trough and dose-adjusted trough blood concentrations and with serum creatinine levels.

MATERIALS AND METHODS

At 1, 6, and 12 months after renal transplantation we collated the data of 92 adult patients (29 women, 63 men), between the ages of 16 and 69 years (37.38 ± 10.74), who underwent kidney transplantation. The study was approved by the Ethics Committee. All patients provided informed consent to participate in the study. Only renal transplant recipients who had received a graft at least 1 year before the study and who had been on TRL immunosuppression for 1 year were eligible for participation. Basic immunosuppression consisted of a combination of TRL with mycophenolate mofetil and steroids. Our initial TRL dose was 0.15 mg/kg/d administered in two divided doses. Subsequent doses were adjusted to maintain the whole-blood concentrations of TRL within the recommended target range, namely, 10 to 20 ng/mL during the first 3 months and 5 to 15 ng/mL thereafter. We adjusted doses also in light of the patient's clinical condition, such as the risk of rejection and the occurrence of adverse effects. Dose-adjusted trough concentrations (ng/mL per mg/kg body weight) were calculated by dividing TRL trough concentrations by the corresponding daily dose on an mg/kg basis. The absence of medication known to interact with TRL was confirmed for all patients.

Serum creatinine concentrations were measured on a Modular PP analyzer by using a rate-blanked, compensated Jaffe method (Roche Diagnostics Systems, Switzerland). The TRL assays were performed using EMIT 2000 kits (Syva Company, Dade Behring, Germany) on a Cobas Integra 400 analyzer (Roche Diagnostics Systems, Switzerland). Genomic DNA was extracted from ethylenediamine-tetraacetic acid-anticoagulated whole blood using genomic DNA Purification Kit (Fermentas, Lithuania). Polymerase chain reaction followed by restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis were used to genotype ABCBI at exon 26 C3435T, as described previously.³ Direct sequencing was also used for quality control to verify the accuracy of the RFLP

assay.³ Statistical analysis was performed using the SPSS package (version 13.0, SPSS, Chicago, Ill, USA). Between-group differences were calculated by one-way analysis of variance for the ABCBI genotypes followed by the Tukey honestly significant difference post hoc test for multiple comparisons. A *P* value of < .05 was considered statistically significant.

RESULTS

The Turkish transplant patient population consists wholly of patients of Caucasian descent. There was no gender-related difference for the prevalence of the mutation; therefore, male and female patients were combined for further evaluations. Of the 92 transplant recipients who were treated with TRL, the ABCBI wild-type genotype (3435 CC) was observed in 28 patients (30.4%), whereas 44 patients were heterozygous (3435 CT) (47.8%) and 20 patients homozygous (3435 TT) (21.7%) for the mutation. As can be seen from the Table 1, there were no significant differences among the three groups in serum creatinine levels (mg/dL) and whole-blood trough TRL concentrations (ng/mL) at months 1, 6, and 12. TRL weight-adjusted daily doses (mg/kg/d) were significantly lower among patients with the 3435 TT genotype at 1 (*P* = .003) and 6 (*P* = .023) months after transplantation when compared with patients of the 3435 CC and 3435 CT genotypes. No significant differences were observed among the three groups in dose-adjusted trough TRL concentrations (ng/mL per mg/kg) at month 1 (*P* > .05). Patients who were homozygous for the ABCBI 3435 CC displayed significantly lower dose-adjusted trough TRL concentrations compared with the 3435 TT and CT genotypes at 6 (*P* = .04) and 12 (*P* = .03) months after transplantation.

Table 1. Influence of ABCBI Genotypes on Tacrolimus Trough and Dose-Adjusted Trough Blood Concentrations, Daily Doses, and Serum Creatinine Levels

	ABCBI Genotype ^a		
	3435 CC	3435 CT	3435 TT
Patient number, n (%)	28 (30.4)	44 (47.8)	20 (21.7)
Month 1			
Tacrolimus daily dose (mg/kg/d)	0.19 ± 0.04 ^b	0.17 ± 0.10	0.14 ± 0.07
Tacrolimus trough concentration (ng/mL)	11.67 ± 3.76	13.63 ± 5.01	13.38 ± 3.24
Serum creatinine (mg/dL)	1.42 ± 0.53	1.44 ± 0.51	1.44 ± 0.56
Dose-adjusted trough concentration (ng/mL per mg/kg)	89.21 ± 20.02	80.86 ± 38.02	89.73 ± 41.45
Month 6			
Tacrolimus daily dose (mg/kg/d)	0.11 ± 0.04 ^b	0.11 ± 0.07	0.09 ± 0.06
Tacrolimus trough concentration (ng/mL)	10.92 ± 3.83	9.06 ± 3.14	11.02 ± 3.50
Serum creatinine (mg/dL)	1.42 ± 0.54	1.47 ± 0.60	1.40 ± 0.44
Dose-adjusted trough concentration (ng/mL per mg/kg)	127.32 ± 33.06	135.11 ± 30.18	155.06 ± 30.20 ^c
Month 12			
Tacrolimus daily dose (mg/kg/d)	0.07 ± 0.03	0.07 ± 0.04	0.06 ± 0.03
Tacrolimus trough concentration (ng/mL)	7.01 ± 2.06	7.43 ± 1.98	7.04 ± 2.05
Serum creatinine (mg/dL)	1.37 ± 0.74	1.39 ± 0.57	1.34 ± 0.39
Dose-adjusted trough concentration (ng/mL per mg/kg)	110.37 ± 54.76	128.32 ± 82.97	143.61 ± 79.70 ^c

^aData are presented as mean values ± SD.

^bPercentage refers to the total number of cases.

^c*P* < .05 (analysis of variance).

DISCUSSION

The clinical use of the calcineurin inhibitor TRL is complicated by its narrow therapeutic range and highly variable pharmacokinetics among various individuals. Some patients do not reach target concentrations using recommended initial doses of TRL. They therefore have an increased risk of underimmunosuppression and acute rejection. The association of the *ABCB1* gene SNP with TRL dose requirements has been recognized as a genetic basis for the observed interindividual differences in pharmacokinetics.^{1,2,6} Our results also demonstrated a relationship between TRL dose requirements and *ABCB1* C3435T polymorphism in Turkish renal transplant recipients. Among 3435 T allele carriers, Macphee et al reported a weak association between *ABCB1* polymorphism in exon 26 and TRL dose requirements at 3 months after renal transplantation.⁶ The 3435 T allele carriers required lower TRL doses to maintain target blood concentrations. The homozygous carriers of the 3435 T allele show on average more than a twofold lower intestinal P-gp expression level compared to the CC genotype.⁶ In accordance with these findings, we observed that TRL daily doses (mg/kg/d) at 1 and 6 months after transplantation were significantly lower among patients with the 3435 TT genotype. In our study patients who were homozygous for the *ABCB1* 3435 TT mutation displayed significantly higher dose-adjusted trough TRL concentrations compared with those of 3435 CC and CT genotypes at months 6 and 12. Conversely, some researchers have reported that *ABCB1* polymorphism derived from the mutation at C3435T in exon 26 did not influence TRL pharmacokinetics in renal transplant patients.^{7,10,11} Some data suggest that the C3435T SNP is a silent polymorphism.⁷ Anglicheau et al reported that the conflicting results of their studies may be partly due to the high level of disequilibrium between the exon 12, 21, and 26 SNP.⁷ They suggested that the exon 26 SNP are strongly associated with exon 21 SNP and that these SNPs may have separate impacts on P-gp function.⁷

Despite the limited number of polymorphic patients among the Turkish population investigated in the present study, our results suggested that pharmacogenetic tests

could be used to predict the correct initial dose of TRL to rapidly achieve target concentrations. If our results are confirmed in larger studies, consideration of *ABCB1* C3435T genotype when designing TRL therapeutic regimens may improve the individualization of immunosuppressive therapy.

REFERENCES

1. Hoesdink DA, van Schaik RH, van der Heiden IP, et al: Genetic polymorphisms of the CYP3A4, CYP3A5, and MDR1 genes and pharmacokinetics of the calcineurin inhibitors cyclosporine and tacrolimus. *Clin Pharmacol Ther* 74:245, 2003
2. Zhang Y, Benet LZ: The gut as a barrier to drug absorption: combined role of cytochrome P450 3A and P-glycoprotein. *Clin Pharmacokinet* 40:139, 2001
3. Tada H, Tsuchiya N, Satoh S, et al: Impact of CYP3A5 and MDR1 (*ABCB1*) C3435T polymorphisms on the pharmacokinetics of tacrolimus in renal transplant recipients. *Transplant Proc* 37:1730, 2005
4. Kelly P, Kahan BD: Review: metabolism of immunosuppressant drugs. *Curr Drug Metab* 3:275, 2002
5. Anglicheau D, Verstrydt C, Laurent-Puig P, et al: Association of the multidrug resistance-1 gene single-nucleotide polymorphisms with the tacrolimus dose requirements in renal transplant recipients. *J Am Soc Nephrol* 14:1889, 2003
6. Macphee IA, Fredericks S, Tai T, et al: Tacrolimus pharmacogenetic polymorphisms associated with expression of cytochrome p4503A5 and P-glycoprotein correlate with dose requirement. *Transplantation* 74:1486, 2002
7. Hoffmeyer S, Burk O, von Richter O, et al: Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:3473, 2000
8. Zheng H, Webber S, Zeevi A, et al: The MDR1 polymorphisms at exons 21 and 26 predict steroid weaning in pediatric heart transplant patients. *Hum Immunol* 63:765, 2002
9. Haufroid V, Mourad M, Van Keuchelove V, et al: The effect of CYP3A5 and MDR1 (*ABCB1*) polymorphisms on cyclosporine and tacrolimus dose requirements and trough blood levels in stable renal transplant patients. *Pharmacogenetics* 14:147, 2004
10. Mai I, Perloff ES, Bauer S, et al: MDR1 haplotypes derived from exons 21 and 26 do not affect the steady-state pharmacokinetics of tacrolimus in renal transplant patients. *Br J Clin Pharmacol* 58:548, 2004
11. Tsuchiya N, Satoh S, Tada H, et al: Influence of CYP3A5 and MDR1 (*ABCB1*) polymorphisms on the pharmacokinetics of tacrolimus in renal transplant recipients. *Transplantation* 78:1852, 2004

NOVEL CYTOGENETIC FINDINGS REVEALED BY CONVENTIONAL CYTOGENETIC AND FISH ANALYSES IN LEUKAEMIA PATIENTS

S.B. Karazum^{1,*}, T. Bügen¹, I. Karadogan², S. Yakur², Z. Çetin¹, A. Uğur², G. Lülecî

¹Department of Medical Biology and Genetics, Faculty of Medicine, Akdeniz University, Antalya, Turkey

²Department of Internal Medicine and Haematology, Faculty of Medicine, Akdeniz University, Antalya, Turkey

Aim: To describe novel cytogenetic findings in four leukemia patients. **Methods:** Conventional cytogenetic (CC) and fluorescence *in situ* hybridization (FISH) analyses were performed on bone marrow samples of four leukemia patients. **Results:** In this study, t(3;10)(q11;q25) and t(2;22)(p21;q11.2) were detected as novel translocations. t(8;16;21)(q22.1;q13;q22) and t(1;6;9;22)(p36.1;p21.3;q34;q11) were found as variant translocations, and these variant translocations were confirmed by Interphase-FISH and Multicolour-FISH. **Conclusion:** Newly identified cytogenetic findings can lead us to characterize cytogenetic evolution of the haematological malignancies. Further investigations are certainly warranted to resolve the prognostic impact of these new cytogenetic abnormalities.

Key Words: haematological malignancies, conventional cytogenetics, FISH, new chromosomal abnormalities.

Conventional cytogenetics (CC) and fluorescence *in situ* hybridization (FISH) techniques are widely used for detection of cytogenetic anomalies, which play an important role in diagnosis of malignant haematological diseases, and are independent predictors of disease progression and survival [1]. Many chromosomal abnormalities, especially translocations and inversions have been commonly shown to result in formation of fusion genes with transforming effects, are closely associated with a particular subtype of leukaemia [2, 3]. Also rare chromosomal rearrangements have been continually discovered in some patients leading to identification of new genetic changes associated with diagnosis, classification, prognosis and treatment of leukaemia [4].

Chromosome 3q rearrangements have been described in approximately 2% of patients with acute myeloid leukemia, and are generally associated with poor prognosis [5]. Also variant forms of the known and subtype specific translocation have been still described in myeloid malignancies. The complex variant of t(8;21) and variants of the t(9;22) occur in approximately 3% and 5-8% of cases with related disease, respectively [6, 7]. It is also suggested that these simple or complex variant translocations can be associated with prognosis of leukaemia [8].

In this study, we present novel cytogenetic findings using CC and FISH, and discuss their potential effect on diagnosis and prognosis of leukaemia.

MATERIALS AND METHODS

Patients. We studied bone marrow cells of 141 patients from Departments of Pediatric and Adult Haematology/Oncology, Faculty of Medicine in Akdeniz University during four years. Written informed consent was obtained from all patients before entry into the study. Of these patients, CC, molecular cytogenetic

and clinical data of four cases that were found to have new cytogenetic findings are presented here.

Conventional karyotyping. Bone marrow cells were harvested according to standard protocol [9]. 20 GTG banded bone marrow metaphases were analyzed from each case whenever possible.

FISH studies. FISH study was performed using directly fluorochrome labeled probes; BCR-ABL (Vysis) for t(9;22)(q34;q11.2), PML-RAR (Cyto-cell) for t(15;17)(q22;q11), AML1-ETO (Cyto-cell) for t(8;21)(q22;q22), CBFB-MYH11 (Cyto-cell) for inv(16)(p13;q22). For each patient, minimum 200 interphase cells were analyzed using fluorescent microscope and fusion signals of 5% or less were assumed as false positive according to our lab's cut-off value. Whole chromosome painting probes (chromosomes 4 and 11) (Cyto-cell) were used for t(4;11). To identify the complex karyotypes of two cases, M-FISH (Vysis) was applied.

RESULTS AND DISCUSSION

Three AML and one CML patients were found to have newly described cytogenetic findings. Cytogenetic, molecular cytogenetic and clinical outcomes of the patients are given in a Table.

Case 1. When the patient (case 1) was diagnosed as AML-M2 in March 2003, AML1-ETO fusion gene resulting from t(8;21) was detected by FISH (Fig. 1, a) and also a rearrangement including chromosome 8, 16, 21 and loss of Y were detected in the cytogenetic analysis (Fig. 1, b). To determine the karyotype, we performed M-FISH and the karyotype of the patient was found to be 45,X,-Y,t(8;16;21)(q22.1;q13;q22.1)[9]/46,X(t(8;16;21)(q22.1;q13;q22.1)[13]. In carrying t(8;21) interphase cell nuclei, two fused signals were expected in addition to normal 8 and 21 alleles. Whereas, only one fused signal was detected in addition to normal green and red signals due to the variant translocation of t(8;21) in this patient (see Fig. 1, a). In March 2003, remission was achieved by 7+3 standard therapy. Two courses of intermediate-dose Ara-C (IDAC) was administered as consolidation therapy in April 2003. Relapse occurred in December 2003. The patient died in a month. The patients with t(8;21) appear to have a favorable prognosis [10]. Variant translocations of t(8;21)(q22;q22) have been reported including chromo-

Received: June 2, 2005.

*Correspondence: Fax: +90 (242) 227 4482

E-mail: sibelkarazum@akdeniz.edu.tr

Abbreviations used: CC - conventional cytogenetics; FISH - fluorescence *in situ* hybridization.

Table. Patient's characteristics

Case No	Age/ Sex	Diagnosis	FISH Results	Conventional cytogenetic results	Treatment	Survival period	Clinical outcome
1	68/M	AML-M2	t(8;21)(+)	46,X,-Y,t(8;16)(p22;q13)(q22;q13) 46,X,Y,t(8;16;21)(q22.1;q13;q22)(18)	7 + 3 ST, IDAC	March 2008 – December 2001	Died
2	53/M	AML-M4	t(9;22)(-)	46,X,Y,t(2;22)(p21;q11.2)(9) 46,X,Y,t(3)	7 + 3 ST, HDAC, FLAG, IDA, EMA	June 2002 – March 2004	Died
3	37/F	AML-M5	t(9;22)(-)	46,XX,t(1;1)(p1;q25)(8) 46,XX,t(7)	7 + 3 ST, FLAG, HDAC	November 2001 – July 2002	Unknown
4	63/M	CML	t(9;22)(+)	46,XX,t(1;6)(p22;p36.1;p21.3;q34,q11)(10) 46,XX,t(9)	IFN, Gleevec	December 2000	Chronic phase CML

Notes: 7 + 3 ST – standard dose Cytarabine + Daunorubicin; HDAC – high dose Cytarabine; IDAC – intermediate dose Cytarabine; EMA – Etoposide-mitoxantrone-cytarabine; FLAG – Fludarabine-cytarabine-granulocyte colony stimulating factor; IFN – Interferon.

some regions 4q35, 5q31, 6q21, 10p15, 12q13, 12q24, 13q12, 14q24, 15q21, 17q23, 18q23 and 20q13 [11]. In this study, to our knowledge, we described a new variant including 16q13. Loss of Y has been observed as a secondary change in particular AML-M2 patients with t(8;21). It has been reported that the loss of Y chromosome can be neutral and related to the age [12, 13]. In a previous study, loss of Y was observed in all cells carrying variant t(8;21;14) and two courses of remission induction therapy with Ara-C + Idarubicin failed. Complete remission was achieved by the subsequent HDAC administration [11]. Similarly, in our patient, detected loss of chromosome Y in 9 of 22 metaphases carrying t(8;16;21), remission induction therapy failed. Remission was achieved by subsequent HDAC administration but the patient died because of the early relapse after eight months. The presence of loss of Y in 9 of 22 metaphases in our patient supports the loss of Y that can be one of the secondary event. We also have two other AML-M2 patients who have t(8;21) and loss of Y. Although one of them received repetitive induction chemotherapies using 7 + 3 and HDAC + mitoxantrone, he couldn't achieve remission. Three weeks after the last therapy the patient died due to intracranial bleeding. In the other case, remission was achieved by 7 + 3 induction and HDAC + mitoxantrone reinduction chemotherapies. The patient is being still followed receiving HDAC + mitoxantrone and HDAC consolidation chemotherapies. Failure of remission with standard therapy, early relapse and prolonged aplasia period in our case, who has variant t(8;21), can be explained by presence of the variant translocation and/or loss of Y. If poor response to therapy is considered in these three patients, loss of Y can be have clinical importance. However, the impact on prognosis and response to therapy of Y chromosome loss and variant translocations remains uncertain.

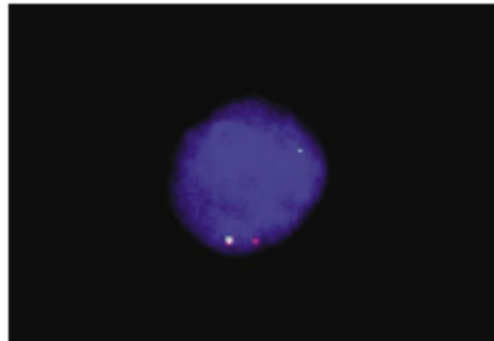


Fig. 1. a. FISH analysis of AML-M2 patient with t(8;16;21)(q22.1;q13;q22.1). Only one fused signal was detected in addition to normal 8 and 21 alleles due to the variant translocation of t(8;21) in this patient. Green, red and yellow signals indicate AML1, ETO genes and t(8;21) respectively

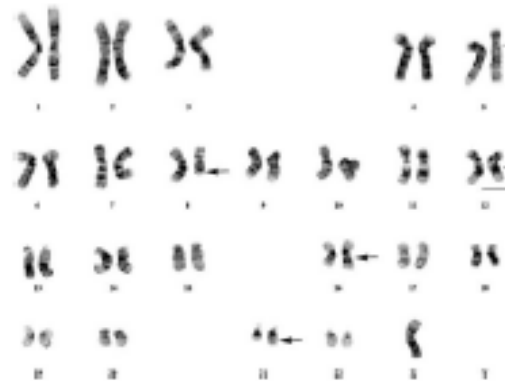


Fig. 1. b. Karyotype of AML-M2 patient with t(8;16;21)(q22.1;q13;q22.1). Arrows indicate breakpoints (Case 1)

Case 2. In June 2002, the patient was diagnosed as AML-M4. Since he also has splenomegaly and basophilia, t(9;22) was tested by FISH to exclude CML. FISH result was negative. The patient received 7 + 3 remission induction chemotherapy in June 2002. Two weeks after the first therapy, 7 + 3 standard therapy was restarted due to the first induction failure. Remission was achieved with reinduction. Cytogenetic examination of bone marrow on July 1, 2002 revealed t(2;22)(p21;q11.2) (Fig. 2). Consolidation chemotherapy using HDAC was administered four times in August, October, November 2002 and in January 2003. When relapse occurred on March 25, 2003, in addition to t(2;22), monosomy 7 was observed in the cytogenetic study of bone marrow. Although fludarabine-cytarabine-granulocyte colony-stimulating factor (FLAG)-IDA therapy was given, the patient did not achieve remission. Even remission was achieved by EMA chemotherapy, the patient died in March 2004 due to the prolonged aplasia. In our case, poor prognosis was consistent with the report that the presence of monosomy 7 may result in a worse response to induction chemotherapy in AML patients [14]. Furthermore, we report a novel translocation between chromosome 2 and 22 including these breakpoints. In most of previous studies, 2p21 has been reported as a partner breakpoint of 11q23. On the other hand, 2p21 involved in different breakpoints of chromosome 3 including q26, q27 and q29, have been reported in one AML, one primary myelofibrosis and one RAEB (refractory anemia with excess of blasts) case [15]. Although the gene involved in 2p21 is unknown, there might be an oncogene either in 2p21 or 22q11.2 region in order to form fusion gene. The other possibility is that the appearance of this rearrangement may be resulting from a genomic instability without oncogenic activity of these regions. Poor prognosis in our

case might be explained by monosomy 7 or presence of t(2;22)(p21;q11.2).

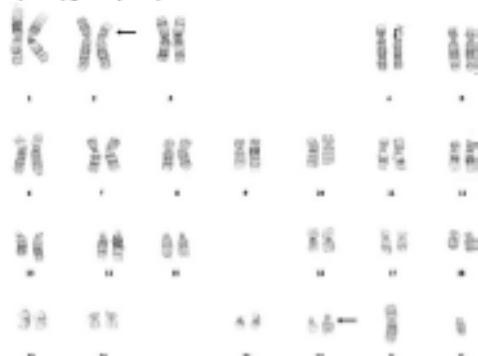


Fig. 2. Karyotype of AML M4 patient with t(2;22)(p21;q11.2). Arrows indicate breakpoints (Case 2)

Case 3. t(3;10)(q21;q25) was detected in the cytogenetic study in this patient who had been diagnosed as AML-M5 in November 2001 (Fig. 3). The remission was hardly achieved using the courses of 7+3 and FLAG as remission induction chemotherapies. Because of the neutrophilia observed after the first remission, to exclude CML blastic transformation t(9;22) was tested by FISH technique. The FISH result was found negative. t(3;10) was detected again in bone marrow by CC. Consolidation therapy using HDAC was given for three times in March, May and July 2002, but patient relapsed after six months. Although various chromosomal abnormalities have been described in AML-M5, t(3;10)(q21;q25) has never been described before. However, involving 3q21 and 10q25 breakpoint regions have been reported in leukaemia with different partner genes. Two genes which have been described in the 3q21 region are associated with oncogenic activity. *RPN1* and *GRB* genes, located in 3q21 region, might play a partner role in fusion gene with oncogenic activity [16]. The possible role of 10q25 in leukaemia is unknown. It might be speculated that possible proto-oncogene in 10q25 could be activated by a partner gene in 3q21 such as *RPN1* gene. In our case, since remission was hardly achieved and relapse occurred, this rearrangement may be related with unfavorable prognosis.

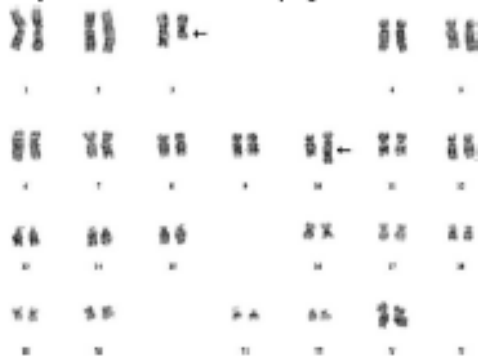


Fig. 3. Karyotype of AML M5 patient with t(3;10)(q21;q25). Arrows indicate breakpoints (Case 3)

Case 4. The patient was diagnosed to have CML in December 2000 and α -IFN and subsequently Gleeve were administered. t(9;22) was observed by FISH in August 2003. However; in the cytogenetic analysis, unexpected band patterns were detected on the end of q arm of chromosome 9 and chromosome 6p (Fig. 4). To find out the origins of the extra bands on der(9) and der(6), we performed M-FISH and the karyotype of the patient was designed as t(1;6;9;22)(p36.1;p21.3;q34;q11). Variant forms of Ph translocations are seen in 5–10% of CML cases, including simple and complex variant translocations [10]. Although it is generally believed that complex Ph translocations have no importance on disease prognosis, it is not elucidated clearly. Deletions of the flanking region the t(9;22) breakpoints in CML are associated with poorer survival. The deletions occur with a higher frequency in patients with variant Ph translocations than in those with classic Ph [17]. Therefore; detection of variant Ph translocation can be important for disease management. Complex three-way Ph translocations involving chromosome 1p36.1 and 6p21 have been described before; see <http://cgap.nci.nih.gov/chromosome/Mitelman-Search> Accessed October 3, 2004 [18, 19]. However; we described a new translocation t(1;6;9;22)(p36.1;p21.3;q34;q11) as a variant of the t(9;22). The case is still being followed as chronic phase CML in spite of the Gleeve use, and this situation can be related to the complex variant translocation detected in the patient.

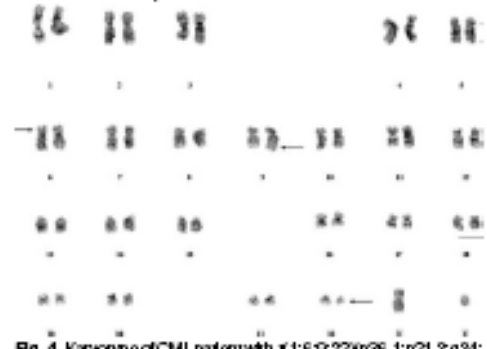


Fig. 4. Karyotype of CML patient with t(1;6;9;22)(p36.1;p21.3;q34;q11). Arrows indicate breakpoints (Case 4)

Conclusion. Newly described chromosomal abnormalities were correlated with clinical course of the patients, and the significance of the cytogenetic findings was emphasized once again in this study. Obviously, accumulation of data on new chromosomal abnormalities would provide the understanding of their molecular mechanism and their impact on prognosis and treatment of leukaemia.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by Akdeniz University Scientific Research Project Management Unit.

REFERENCES

1. Kasakyan S, Tachdjian G, Movsessyan E, Daghashtyan S, Muradyan L, Aboum A, Hovhannisyan A, Muradyan A,

- Mikrtegyan H, Arutyunian R. Application of FISH technique for cytogenetic analysis in chronic myeloid leukemia patients. *Exp Oncol* 2003; 25: 74–6.
2. Rowley JD. The critical role of chromosome translocations in human leukemias. *Ann Rev Genet* 1998; 32: 495–519.
3. Sorzi G, Testi MA, Croce CM. Advances in cancer cytogenetics. *J Cell Biochem* 1999; 32–33: 173–82.
4. Lungescu A, Arghir A, Lups A, Mut Popescu D. Relationship between chromosomal changes complexity and disease aggressiveness in myeloid and lymphoid disorders. *J Cell Mol Med* 2002; 6: 389–98.
5. Charrin C, Bellisari A, Treille-Ritouet D, Theuil G, Magaud JP, Fiore D, Thomas X. Structural rearrangements of chromosome 3 in 57 patients with acute myeloid leukemia: clinical, hematological and cytogenetic features. *Hematol J* 2002; 3: 21–31.
6. Xue Y, Niu C, Chen S, Wang Y, Guo Y, Cio X, et al. Two cases of AML(M2) with a t(8;19)(q22;q13) a new cytogenetic variant. *Cancer Genet Cytogenet* 2000; 118: 154–8.
7. Sessarego M, Fagarza G, Bruzzone R, Ballesstrero A, Miglio M, Baegualupo A. Complex chromosome rearrangements may locate the bcr/abl fusion gene sites other than 22q11. *Haematologica* 2000; 85: 35–9.
8. Sinclair PB, Nachava EP, Lesenski M, Tallord N, Chung J, Reid A, Bench A, Champion K, Huntly B, Green AR. Large deletions at the t(9;22) breakpoint are common and may identify a poor-prognosis subgroup of patients with chronic myeloid leukemia. *Gen Blood* 2000; 95: 738–44.
9. Rooney DE, Czepulkowski BH. Human cytogenetics: malignancy and acquired abnormalities. A practical approach, vol 2. New York: Oxford University Press, 1992.
10. Chen Z, Sandberg AA. Molecular cytogenetic aspects of hematological malignancies: clinical implications. *Am J Med Genet* 2002; 115: 130–41.
11. Ishida F, Ueno M, Tanaka H, Makishima H, Suzuki K, Hosaka S, Hidaka E, Ishikawa M, Yamauchi K, Kitano K, Kiyosawa K. t(8;21;14)(q22;q22;q24) is a novel variant of t(8;21) with chimeric transcripts of AML1-ETO in acute myelogenous leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 2002; 132: B3–5.
12. Abdoievich D, Yehuda O, Ben-Neriah S, Orr R. Loss of Y chromosome. An age-related event or a cytogenetic marker of a malignant clone? *Cancer Genet Cytogenet* 1994; 76: 70–1.
13. Wiktor A, Rybicki BA, Piao ZS, Skuraf M, Barthel B, Maeda K, Van Dyke DL. Clinical significance of Y chromosome loss in hematologic disease. *Genes Chromosomes Cancer* 2000; 27: 11–6.
14. Brozak I, Bobinska M, Kardas I, Wozniak A, Bakerska A, Hellmann A, Limon J. Cytogenetic analysis and clinical significance of chromosome 7 aberrations in acute leukemia. *J Appl Genet* 2003; 44: 401–12.
15. Sancho JM, Ribera JM, Granada I, Navarro JT, Mills F, Feliu E. Myelofibrosis in myeloid malignancies with 3q26 cytogenetic abnormalities. *Haematologica* 2000; 85: 554–5.
16. Martinelli G, Ottaviani E, Buonamici S, Isidori A, Borsari G, Visani G, Piccakuga PP, Malagola M, Tassoni N, Rondoni M, Nucifora G, Tura S, Baccarani M. Association of 3q21q26 syndrome with different RPN1/EV11 fusion transcripts. *Haematologica* 2003; 88: 1221–8.
17. Reid A, Gribble SM, Huntly BJ, Andrews KM, Campbell L, Green CD, Wood ME, Green AR, Nachava EP. Variant Philadelphia translocations in chronic myeloid leukaemia can mimic typical blast crisis chromosome abnormalities or classic t(9;22): a report of two cases. *Br J Haematol* 2001; 113: 439–42.
18. Lau LC, Knight L, Tien SL, Lim P, Yong MH, Chong YY. Highly complex chromosomal rearrangement of chromosome 9 in a case of chronic myeloid leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 1998; 104: 153–6.
19. Mori N, Morosetti R, Spira S, Lee S, Ben-Yehuda D, Schiller G, Landolfi R, Mizoguchi H, Koeffler HP. Chromosome band 1p36 contains a putative tumor suppressor gene important in the evolution of chronic myelocytic leukemia. *Blood* 1998; 92: 3405–9.

НОВЫЕ ДАННЫЕ, ПОЛУЧЕННЫЕ МЕТОДАМИ СТАНДАРТНОГО ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКОГО И FISH-АНАЛИЗА У БОЛЬНЫХ ЛЕЙКЕМИЕЙ

Цель: представить новые цитогенетические данные у четырех больных лейкозами. **Методы:** для исследования образцов костного мозга были применены стандартный цитогенетический (ЦГ) анализ и метод флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH). **Результаты:** в данном исследовании были выявлены новые транслокации t(3;10)(q11;q25) и t(2;22)(p21;q11.2). Транслокации t(8;16;21)(q22.1;q13;q22) и t(1;6;9;22)(p36.1;p21.3;q34;q11) были идентифицированы как варианты и подтверждены методами Interphase-FISH и Multicolor-FISH. **Выводы:** полученные цитогенетические данные позволяют охарактеризовать цитогенетическую эволюцию онкогематологических заболеваний. Для оценки прогностического значения описанных цитогенетических аномалий необходимы дальнейшие исследования.

Ключевые слова: гематологические заболевания, стандартная цитогенетика, FISH, новые хромосомные аномалии.



Available online at www.sciencedirect.com



Annales de génétique 47 (2004) 129–138

ANNALES
DE GÉNÉTIQUE

www.elsevier.com/locate/jaugen

Consanguineous marriages in the province of Antalya, Turkey [☆]

Ö.M. Alper ^{a,*}, H. Erençin ^b, A. E. Manguoğlu ^a,
T. Bilgen ^a, Z. Çetin ^a, N. Dedeoğlu ^b, G. Lüleci ^a

^a Department of Medical Genetics, School of Medicine, Akdeniz University, Antalya 07070, Turkey

^b Department of Public Health, School of Medicine, Akdeniz University, Antalya 07070, Turkey

Received 28 February 2003; accepted 9 September 2003

Available online 23 October 2003

Abstract

To assess the trends in the frequency and the medical effects of consanguinity in the south coast of Turkish population using local and national data in the last 11 years. This cross-sectional study was carried out in Manavgat province, which is a major tourism center on the Mediterranean coast of Turkey. The authors studied consanguineous marriages in rural and urban population in the Mediterranean coast, Manavgat province, Turkey, via a 1500 random survey sample of married couples. There has been a significant increase in the incidence of consanguineous marriages in rural areas (40.7%) since 1989 in the southern population of Turkey. The results showed that the most frequent type of marriage was between the first cousins. It is found that there is no statistically significant difference between the consanguineous and non-consanguineous marriages in the different age groups. The results were discussed on the basis of educational status, reasons for having consanguineous marriages and the general medical effects as well as with the relation of congenital malformations. The custom of consanguineous unions in the Mediterranean population of Turkey is still extremely high, and preventive measures should be done to decrease its frequency and associated complications.

© 2003 Elsevier SAS. All rights reserved.

Keywords: Consanguinity; Marriage/statistic population surveillance; Epidemiology; Turkey

[☆] This study was supported by the Turkish Manavgat Rotary Club Foundation, Antalya, Turkey.

* Corresponding author. Present address: Institute for Molecular and Human Genetics, Georgetown University Medical Center, LCC M4000, 3900 Reservoir Road, NW, Washington, DC 20007, USA.

E-mail address: oa8@georgetown.edu (M. Alper).

1. Introduction

Consanguineous marriages not only have a greater risk of producing offspring which are homozygous for a deleterious recessive gene, but also individuals with increased susceptibility for polygenic or multifactorial diseases, sterility, stillbirths, spontaneous abortions, child deaths, infant mortality, as well as congenital malformations [8,17,25].

The frequency of consanguineous marriages has decreased considerably over the past few years, but such marriages are still very common in certain areas of the world. Consanguineous marriages can be seen all over the different ethnic and religious groups to a varying degree. Among Muslims, religious traditions are the least commonly cited reason for such marriages and, in general, parents are the prime decision-makers for marriages of both sons and daughters [12,15].

The screening of consanguineous marriages in Turkey was first conducted by Şaylı in 1969 and still constitutes a major problem in Turkey and other investigations are summarized in Table 1. These studies indicate that the frequency of consanguineous marriages ranged from 11.5% to 46% overall in the eastern part and that the ratio decreased to 11.7% in the western parts of the country [5,22] which is shown in Fig. 1. Studies on the prevalence of consanguinity in Antalya region, Mediterranean coast, were initiated by Guz in 1989. The total was found to be 35.2%, while 39.4% in the rural and 28.3% in the urban areas were observed recently [10].

We, therefore, decided to establish the ratio and the factors involved in consanguineous marriages in Manavgat, near Antalya, which is a major tourism center on the Mediterranean coast of Turkey. We were expecting to find a low level of prevalence of consanguinity in this region, because of a high level of economic development as well as increasing level of urbanization. We also compared the importance of the subject in terms of health education and health care.

2. Materials and methods

This cross-sectional study was carried out in Manavgat province on the Mediterranean coast of Turkey (near Antalya), which had a total population of 78,635 in 2001. There were a total of 26,931 unmarried and married women between the ages of 20 and 44 in Manavgat, according to the Manavgat Health Center records. For the selection of samples, the cluster-sampling method was used to achieve statistically significant data [6]. Based on calculations, the rate of homogeneity (ρ_{oh}) value was 0.3, the design effect was 5.2 and the standard deviation was 0.03. Each cluster consisted of 15 households. The P value was taken as 35% due to the previous consanguinity screening study in Antalya by Guz, in 1989. A total of 1500 urban and rural married women were selected. Those who were born in Manavgat were included in the study, and were interviewed by one of the authors at woman's home. During each home visit, a questionnaire was completed, which included age, level of education, relation with husband, reasons for marriage with a relative reproductive performance, outcome of pregnancy, child deaths and congenital malformations among living and dead children. Rural areas are defined as regions of farming where villages are present; urban areas are the centers or parts of cities. During the survey, a total

Table 1
 Consanguinity screening research results in Turkey

Year	Author	Regions of Turkey	Number of families	Percent of consanguinity
1969	Şaylı	Ankara	762	27.8
		Ordu	163	27.4
		Sivas	292	31.6
		Turkey	1000	28.4
1972	Bajrami	Ankara	597	26.1
		Diyarbakır	2110	37.1
		Other	620	30.0
		Turkey	3327	33.8
1973	Bajrami	Diyarbakır	490	34.3
1983	Bajrami	Ankara	642	28.04
		Diyarbakır	11,194	35.02
		Erzincan	14,384	16.32
		Turkey	26,420	24.53
1983	Şaylı	Ankara	5000	31.24
1983	Sengin	İzmir	10,857	13.77
1985	Budak	Diyarbakır	438	46.9
1987	Ulucay Tunçbilek	West	2,681,990	11.55
		South	997,640	31.02
		Middle	1,839,960	25.90
		North	935,450	23.91
		East	1,416,880	34.98
1989	Göz Bajrami	Turkey	7,872,120	23.06
		Antalya	2604	35.2
1990	Özdemir	Sivas	56,664	21.25
1992	Tümeleler Baki	Sivas	4340	15.45
		Trabzon	999	20.0
1993	Kılıçarslan	Sivas	723	27.52
1995	Düzcan	Sivas	1000	23.5
1997	Demirel	Konya	1120	23.2
1999	Şimşek	Düzce	1000	11.7

of 17 individuals did not answer the questions which had no significant effect on the results. In this study, marriages were classified into three groups; first cousin marriages (children of parent), other consanguinity (half-first and the second degree cousins, distant consanguineous marriages, if known) and non-consanguineous marriages. The data were hand coded and processed by an IBM computer using EpiInfo version 5.0 and SPSS statistical programs. Chi square test and Student's *t*-test were used to test the significance of the results.

3. Results

The results showed that for Manavgat, Turkey, the overall frequency of consanguinity was 24.2% in urban, and 40.7% in rural areas, and the total rate of consanguinity was found to be 33.9% (Table 2). The most frequent consanguinity type was first cousins: which was

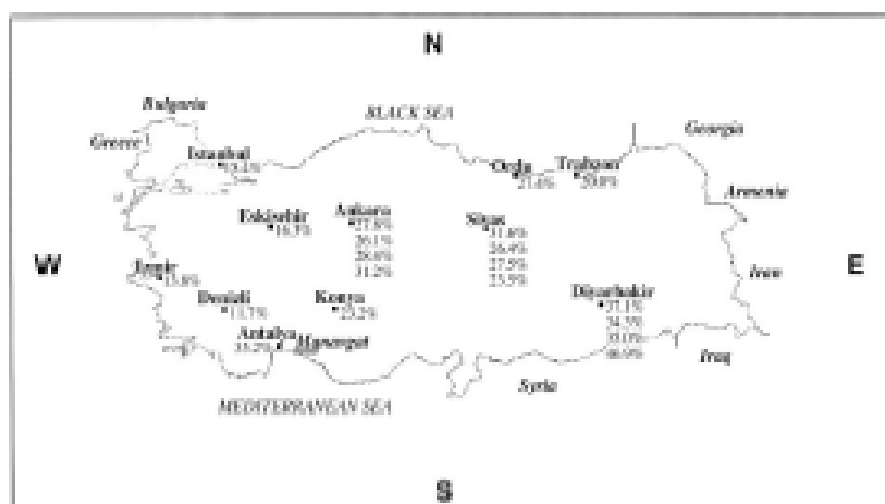


Fig. 1. General frequency of consanguineous marriages all over the Turkish population, between the period of 1969 and 1999.

about 15.7% in the rural areas. This was followed by other consanguinities (25.0%) and non-consanguineous marriages (59.3%). The frequency of consanguinity in the urban areas was much lower than that of the rural areas. According to the survey, married women included in the study fall into five age groups which are shown in Table 3. Our data show that there is no statistically significant difference between the consanguineous and non-consanguineous marriages in the different age groups. Younger women married their

Table 2
Number and frequency of consanguineous marriages according to regions

Region	First cousin, <i>n</i>	Percent	Other consanguineous, <i>n</i>	Percent	Non-consanguineous, <i>n</i>	Percent	Total, <i>n</i> (%)
Urban	53	8.6	96	15.6	467	75.8	661 (41.0)
Rural	139	15.7	221	25.0	524	59.3	884 (58.0)
Total	192	12.8	317	21.1	991	66.1	1500 (100.0)

$$\chi^2 = 44.20, P = 0.0000000$$

Table 3
Frequency of consanguinity among different age groups of women

Age	First cousin, <i>n</i> (%)	Other consanguineous marriages, <i>n</i> (%)	Non-consanguineous marriages, <i>n</i> (%)	Total, <i>n</i> (%)
20–24	21 (12.4)	39 (23.1)	109 (64.5)	169 (11.3)
25–29	37 (11.9)	69 (22.3)	204 (65.8)	310 (20.7)
30–34	42 (13.0)	63 (19.6)	217 (67.4)	322 (21.5)
35–39	42 (12.4)	64 (18.9)	233 (68.7)	339 (22.6)
40–44	50 (13.9)	82 (22.8)	228 (63.3)	360 (24.0)
Total	192 (12.8)	317 (21.1)	991 (66.1)	1500 (100.0)

$$\chi^2 = 2.7, P = 0.605$$

relatives just as much as older women did. This also implies that there were no differences in marriage customs during the last 28 years.

On the basis of educational status, our data showed that consanguineous marriages decreased among women with secondary or higher education and was significantly increased in woman with only primary education and were illiterates (Table 4).

The underlying causes of inbreeding are summarized in Table 5. Family pressure was determined as the second main factor in both urban and rural areas of this region.

Based on the survey, reproductive behavior among women in consanguineous (first cousin) and non-consanguineous marriages was compared and is shown in Table 6. The average pregnancies per mother in consanguineous and non-consanguineous marriages were 2.89 ± 1.17 and 2.44 ± 1.16 , respectively ($t = 5.00$, $P = 0.000$). There were no differences in the mean numbers of spontaneous abortions and stillbirths between the two groups. As can be seen in Table 7, the congenital malformation rate in consanguineous

Table 4
Frequency of consanguinity according to educational level

Educational level (year)	Consanguineous marriages, n (%)	Non-consanguineous marriages, n (%)	Total, n (%)
None	78 (39.4)	120 (60.6)	198 (13.2)
<5	381 (36.6)	672 (63.4)	1050 (70.7)
6–8 ***	14 (20.0)	56 (80.0)	70 (4.7)
9–11 *	26 (18.1)	118 (81.9)	144 (9.6)
≥11 **	3 (10.7)	25 (89.3)	28 (1.8)
Total	509 (33.9)	991 (66.1)	1500 (100.0)

* $P = 0.00000047$, $\chi^2 = 34.99$.

** $P = 0.00083$, $\chi^2 = 16.70$.

*** $P = 0.0116$, $\chi^2 = 8.91$.

Table 5
Underlying causes of consanguinity in rural and urban areas of Manavgat

Reasons for marriage with a relative	Urban, n (%)	Rural, n (%)	Total, n (%)
Economic	1 (0.7)	2 (0.5)	3 (0.6)
Family pressure	63 (42.6)	90 (25.1)	152 (30.2)
Love	77 (52.0)	267 (74.4)	344 (67.8)
Other causes	7 (4.7)	0 (0.0)	7 (1.4)
Total	148 (29.2)	359 (70.8)	507 (100.0)

Table 6
Medical effects of consanguinity

	First cousin, n (S.D.)	Other consanguineous marriages, n (S.D.)	Non-consanguineous marriages, n (S.D.)	Total, n (S.D.)
Number of pregnancies	2.89 (1.80)	2.89 (1.69)	2.44 (1.61)	2.60 (1.66)
Number of live births	2.49 (1.54)	2.38 (1.37)	2.04 (1.27)	2.17 (1.34)
Spontaneous abortions	0.25 (1.00)	0.42 (1.02)	0.37 (1.17)	0.38 (1.13)
Number of stillbirths	0.06 (0.26)	0.09 (0.09)	0.51 (0.29)	0.06 (0.31)

n stands for mean value, S.D. stands for standard deviation.

Table 7
Rate of congenital malformations in all children born to the family in consanguineous marriages

	Presence of congenital malformations, n (%)	Absence of congenital malformations, n (%)
Consanguineous	60 (11.8)	49 (88.2)
Non-consanguineous	45 (4.5)	946 (95.5)
Total	105 (7.0)	1395 (93.0)

$\chi^2 = 26.03$, $P = 0.0000003$.

Table 8
Main medical effects of consanguinity

	Percent
Mental retardation	13.3
Non-syndromic deafness and speech disorders	14.3
Ophthalmic anomalies	12.4
Multiple malformations	11.4
Cardiac anomalies	8.6
Hemoglobinopathia	7.6
Others	30.4
Total	100.0

marriages was higher than that of the unrelated families. The types of congenital malformations are summarized in Table 8.

4. Discussion

Consanguineous marriages occurred among Muslims, Christians and Hindus to a varying degree within the sub-groups of each religion. Consanguineous unions are strongly preferred in much of west and south Asia and also have both a social and an economic impact in the population groups that practice this type of marriage [2,9,14,16,23,24]. Generally, it is widely favored in a large majority of the world's Islamic populations, like Pakistan, India. Ninety-nine percent of the Turkish population is Muslim, and Islam in Turkey is a much gentler religion when compared to other Muslim countries.

Turkey, Anatolia, is a sort of gravitational center between the west and east, a point of junction between continental Europe and Afro-Asian continent. Anatolia is composed of mainly four regions, each region having different traditions and family structure. These have strong influences on the prevalence of inbreeding in Turkey [11,12,22]. Up to date, various factors are found to be main reasons for having high incidence of consanguineous marriages in Turkey.

The general rate of frequency on consanguinity ranges from 11.5% to 46% in the Turkish population (Fig. 1). Although consanguineous marriage is widespread, it is particularly common in the eastern and south eastern regions, depending on various factors such as socioeconomic status, and strong conservative traditional influence and origin (unpublished observation) [7,12]. Reports to date indicate that the prevalence of consanguineous marriages is highest in eastern Anatolia (30–40%) when compared to the regions

of western Anatolia (11–13%). Ulusoy and Tunçbilek [22] have estimated an 8.3% reduction between the years in 1968 and 1983 in the overall consanguinity rates in the Turkish population [6,21]. In both surveys, the prevalence of consanguineous unions appeared to be unchanged over the past 20–30 decades.

As a population characteristic of Turkey, most of its Mediterranean population had been living in small, isolated villages for about 80 decades. Considerable migration began from villages to big cities about 20 years ago. More interestingly, the Mediterranean population of Turkey is under the influence of several factors including tourism, urbanization, economy, farming, etc. As our survey is carried out in Manavgat, Antalya, a low prevalence of consanguinity was expected towards the year 2000. Due to the previous data published by Güz in 1989, it was expected that increasing urbanization, tourism, higher levels of education, modern trends and smaller families would help to decrease the level of consanguinity in Antalya [10]. Although this specific region is mainly under the influence of development, a significant increase in the incidence of consanguineous marriages over the years has been observed [5,10]. However, only few surveys were done to learn about the impact of industrial development on consanguinity of the Turkish population. This approach is worth analyzing in Turkey, where industrialization was late in relation to other eastern European countries. According to the records of the Turkish Institute of Population Research Center (TIPRC), the migration to the Mediterranean coast was 2.16% between the period of 1990 and 2000. As Antalya is one of the rapidly growing cities in the Mediterranean coast of Turkey when compared to overall population, the increase rate is around 1.83%, in the same period. Our region, Manavgat province, underwent industrial and tourist development earlier than other Mediterranean regions. It has the highest density of population and occupied a central position geographically. As the consanguinity rate is significantly high, the disadvantages of the consanguineous marriages will be understood by time, and the economic progress still has no effect in these social areas, unless it will be seen in the future generations (unpublished observation).

There was no difference in the frequency of consanguineous marriages among the 20–44-year-old women and their number of pregnancies. The traditional customs did not change over the past years and there was no effect on the consanguineous marriages. Our data correlate with the findings of Güz, in Antalya and other studies in the Turkish population [3,7,10]. However, in Pakistan, which is a well-studied Muslim country, consanguineous marriages were found to be more frequent at ages below 18 and having higher number of pregnancies, also reported a higher mean number of children, which correlates with some of the investigations in the Turkish population [15,19].

Consanguineous unions were more common among women who are illiterate or had only primary level education, or living in rural areas and whose parents were also consanguineous. Our study shows that the consanguinity level significantly decreases among women with secondary education and among university graduates. Our results are confirmed by other studies previously performed in the Turkish population [3,7,19] and strongly correlates with other Muslim countries survey results [14,16,23]. Maternal education is strongly associated with increase in maternal age and also one of the major determinants for the future of inbreeding in most of the populations.

Up to date, population specific national surveys showed that various factors are playing a role in consanguineous unions. One of the main factors is the lack of suitable mates

outside the family. This is due to geographical localization like in rural areas, or cultural isolation, so that marriage to a relative may be the only possibility. Most of the consanguineous couples more frequently lived in smaller towns and in an extended family environment. Another important reason is the preservation of property, especially land, and the desire to keep it within the family. A third reason is the popular belief that intra-familial marriage offers advantages in terms of compatibility of the bride with her husband's family, where the bride finds it reassuring to marry into a known family background. Family pressure and falling in love are the major reasons stated for consanguinity in our study. Family pressure indicates a coercion by parents to marry relatives so that property is kept within the family, which may be mainly correlated with the economical status. Findings suggest that consanguinity is a social concern for the well being of the family and daughter. Economic factors may be more prevalent in rural areas.

The main risk of non-random marriages, which increases with the degree of consanguinity, is the expression in the offspring of various autosomal recessive disorders. This occurs because both parents may be carriers of the same deleterious gene. As a result, such marriages have a significant implication for recessive diseases, congenital malformations and decreased reproductivity. They also have both a social and an economic impact in the population groups that practice this type of marriage [17]. With regard to the effect of consanguinity on reproductivity, the findings are conflicting. Several authors have reported a significant increase in sterility and in the rate of abortions, stillbirths, perinatal losses and neonatal deaths in consanguineous families both in Turkey and other Muslim countries [3,4,11,13,20]. Whereas, others have found that consanguinity had either no or only a slight, not statistically significant, effect on these parameters. Therefore, our results are similar with one of the national surveys which was held in one of the closest cities in the Mediterranean coast [7]. Differences might be caused by misunderstanding by the mothers of the definitions in the questionnaire independent of maternal education. Although the effect of consanguinity on past reproductive wastage was not found to be significant, it was definitely associated with increased incidence of congenital malformations. The significant association has also been described from other parts of the Muslim world [1,2,13]. Several studies have shown that the rate of congenital malformations among the offspring of consanguineous marriages is approximately 2.5 times higher than that among the offsprings of unrelated parents. A similar rate (2.6) was observed in our study [18] (Table 6). The malformations which have been found to be common are as follows: cardiovascular, those relating to central nervous system, ophthalmic, urogenital, gastrointestinal, skeletal, cutaneous abnormalities and also multiple malformations [4].

In our survey, we found that the rate of hemoglobinopathies at 7.60% for thalassemia, 0.90% for the carriers of sickle cell anemia and 14.3% for non-syndromic deafness and speech disorders (Table 7). Somewhat conflicting results were obtained in relation to reproductive wastage, but the overall picture suggested that it has a significant relationship with the occurrence of various congenital malformations and developmental disorders. As this is a high ratio for Manavgat, we believe that a genetic screening program for carriers is critical. This should allow for premarital and prenatal testing, provide prenatal and genetic counselling services, and educate as many young people as possible. There were some restrictions in our study which may affect the results. The survey was carried out using a pre-structured questionnaire, distorted answers to questions, such as not telling the truth

about having a child with mental retardation and similar others. Moreover, medical records of families in Health centers of Manavgat province were not available to include in our study.

In conclusion, consanguineous marriages may be considered as an indicator of traditional behaviors, and are mostly practised among people who marry at a younger age and with lower educational level. As the consanguinity distribution is not homogenous all over the country, the relative carrier frequency of recessive genes is expected to be higher in the southern and the eastern parts of Turkish population. All health workers, professionals, as well as family members should be aware of the dangers, and try to reduce the burden of consanguinity.

Acknowledgements

We thank all the subjects of our investigation and their families for the time they generously gave us. We would like to thank Dr. Wayne Criss for the comments that helped to shape the final presentation.

References

- [1] S.S. Agarwal, U. Singh, P.S. Singh, S.S. Singh, V. Das, A. Sharma, P. Mehra, Chandrawati, G.K. Malik, G.K. Mirza, Prevalence and spectrum of congenital malformations in a prospective study at a teaching hospital, *Indian J Med Res* 94 (1991) 413–419.
- [2] M. Al-Salem, N. Rawashdeh, Consanguinity in North Jordan prevalence and pattern, *J. Biosoc. Sci.* 25 (1993) 353–356.
- [3] A. Baki, A. Karagözel, E. Başar, T. Çakmakcı, F. Uçar, A. Ömüröğlü, Consanguineous marriages in the province of Trabzon, Turkey, *East African Med. J.* 69 (1992) 94–96.
- [4] N. Başaran, H. Hazan, A. Başaran, S. Artan, J.D. Stevenson, B.S. Şeyli, The effect of consanguinity on the reproductive wastage in the Turkish population, *Clin. Genet.* 36 (1989) 168–173.
- [5] N. Başaran, B.S. Şeyli, A. Başaran, M. Solak, S. Arma, J.D. Stevenson, Consanguineous marriages in the Turkish population, *Clin. Genet.* 4 (1998) 339–341.
- [6] S. Barnett, T. Woodz, W.M. Liyanage, D.L. Smith, A simplified general method for cluster-sample survey of health in developing countries, *World Health Stat. Q.* 44 (1991) 98–106.
- [7] S. Demirel, N. Kaplanoğlu, A. Acar, S. Bodur, F. Poydik, The frequency of consanguinity in Konya, Turkey and its medical effects, *Genet. Counsel.* 8 (1997) 295–301.
- [8] A.E.H. Emery, *Methodology in Medical Genetics*, Churchill Livingstone Press, Edinburgh, 1976.
- [9] E. Côtin, F. Clerget-Darposes, Association studies in consanguineous populations, *Am. J. Hum. Genet.* 58 (1996) 861–866.
- [10] K. Özte, N. Dedeoğlu, G. Lökci, The frequency and medical effects of consanguineous marriages in Antalya-Turkey, *Hereditas* 111 (1989) 79–83.
- [11] A. Hancıoğlu, E. Tunçbilek, Socio-demographic characteristics of consanguineous marriages and their effects on childhood mortality in Turkey, *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi* 41 (1989) 139–153.
- [12] A. Hancıoğlu, B. Akadli Ergöçmen, Some social aspects of Turkish marital unions and their relationship with early age mortality, *Müsbil. Derg.* 14 (1992) 3–25.
- [13] E. Hussain, The impact of consanguinity and inbreeding on perinatal mortality in Karachi, Pakistan, *Pediatr. Perinatal Epidemiol.* 12 (1998) 370–382.
- [14] E. Hussain, A.H. Buttke, The prevalence and demographic characteristic of consanguineous marriages in Pakistan, *J. Biosoc. Sci.* 30 (1998) 261–275.

- [15] R. Hussain, A.H. Bittler, Consanguineous marriage and differentials in age at marriage, contraceptive use and fertility in Pakistan, *J. Biosoc. Sci.* 31 (1999) 121–138.
- [16] R. Hussain, A.H. Bittler, Sociodemographic correlates of consanguineous marriage in the Muslim population of India, *J. Biosoc. Sci.* 32 (2000) 433–442.
- [17] A.G. Moulaly, F. Vogel, *Human Genetics, Problems and Approaches*, Springer-Verlag, Berlin, 1982.
- [18] B. Say, Türk halkında bazı konjenital malformasyonların görülme sıklığı (The frequency of congenital malformations in Turkish population), Hacettepe Üniversitesi Yayınları, 1971 C-12.
- [19] S. Şimşek, M. Türe, B. Tuğral, N. Mercan, H. Türe, B. Akdağ, Consanguineous marriages in Denizli, Turkey, *Ann. Hum. Biol.* 26 (1999) 489–491.
- [20] E. Tunçbiklik, I. Koş, Consanguineous marriage in Turkey and its impact on fertility and mortality, *Ann. Hum. Genet.* 58 (1994) 321–329.
- [21] E. Tunçbiklik, Clinical outcomes of consanguineous marriages in Turkey, *Turk. J. Pediatr.* 43 (2001) 277–279.
- [22] M. Utanç, E. Tunçbiklik, Consanguineous marriages in Turkey and their effects on child death, *Nüfusbilim Der.* 9 (1987) 7–26.
- [23] R. Vardi-Salimcik, Y. Friedlander, T. Cohen, Consanguinity in a population sample of Israeli Muslim Arabs, Christian Arabs, and Druze, *Ann. Hum. Biol.* 29 (2002) 422–431.
- [24] A. Wakil, M. Ahmad, Biosocial perspective of consanguineous marriages in rural and urban Sindh, Pakistan, *J. Biosoc. Sci.* 28 (1996) 305–313.
- [25] J. Zlotogora, Problems in diagnosis and delineation of inherited disorders in highly inbred populations, *Am. J. Med. Genet.* 41 (1991) 451–453.