

**T.C.  
DİCLE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**HEPATİT B'Lİ HASTALARDA GENETİK ARAŞTIRMALAR**

**( DOKTORA TEZİ )**

**Araş.Gör. Halit AKBAŞ**

**DİCLE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ TIBBİ BİYOLOJİ VE  
GENETİK ANABİLİM DALI**

**DANIŞMAN**

**Yard.Doç.Dr. Hilmi İSİ**

**DİYARBAKIR**

**2009**

## TEŞEKKÜR

Tezimin planlanması ve hazırlanmasında büyük emekleri olan, tenkitleri ve tavsiyeleri ile bana rehberlik eden Anabilim Dalı Başkanımız değerli hocam Sayın Prof. Dr. Turgay BUDAK'a,

Çalışmalarım süresince ilgi ve yardımlarını gördüğüm hocam sayın Prof. Dr. Ali KELLE'ye,

Tez danışmanlığımı üstlenen, deneyimleri ile bana yol gösteren hocam Yrd. Doç. Dr. Hilmi İSİ'ye,

Çalışmalarım süresince yardım ve katkıları olan hocalarım sayın Doç.Dr. Kendal YALÇIN ve Yrd. Doç. Dr. Selahattin TEKEŞ'e,

Doktora öğrenimim süresince bilgi ve tecrübelerini paylaşan hocalarım sayın Yrd. Doç. Dr. M. Nail ALP ve Yrd. Doç. Dr.Diclehan ORAL'a, emek ve desteklerini esirgemeyen bütün iş arkadaşlarıma,

Çalışmalarım boyunca yardımlarını eksik etmeyen, bana güç veren ve hiç bir fedakarlıktan kaçınmayan aileme sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Diyarbakır-2009

Arş.Gör. Halit AKBAŞ

## İÇİNDEKİLER

### 1. ÖN SAYFALAR

1.1. Kapak	
1.2. İç Kapak	
1.3. Onay Sayfası.....	1
1.4. Teşekkür Sayfası .....	11
1.5. İçindekiler Dizini .....	111
1.6. Şekiller Dizini .....	V
1.7. Tablolar Dizini .....	VI
1.8. Kısaltmalar Dizini .....	VII

### 2. ÖZET SAYFALAR

2.1. Türkçe Özet .....	VIII
2.2. İngilizce Özet .....	X

### 3. TEZ METNİ

<b>3.1. GİRİŞ ve AMAÇ.....</b>	<b>1</b>
<b>3.2. GENEL BİLGİLER.....</b>	<b>5</b>
<b>3.2.1. HEPATİT.....</b>	<b>5</b>
3.2.1.1. HEPATİT B VİRÜSÜ .....	5
3.2.1.2. HEPATİT B VİRÜSÜNÜN GENOMİK YAPISI .....	6
3.2.1.3. VİRAL PROTEİNLER .....	7
<b>3.2.2. İNTERFERONLAR .....</b>	<b>8</b>
3.2.2.1. İNTERFERONLARIN TİPLERİ.....	8
3.2.2.2. İNTERFERONLARIN ETKİ MEKANİZMALARI .....	9
3.2.2.3. İNTERFERON TEDAVİSİNDE AMAÇLAR .....	10
3.2.2.4. İNTERFERONLARIN YAN ETKİLERİ .....	10
<b>3.2.3. p53 GENİ .....</b>	<b>10</b>
3.2.3.1. p53 GENİ VE PROTEİNİNİN YAPI VE ÖZELLİKLERİ .....	11
3.2.3.2. P53 GENİNİN AKTİVASYONU .....	12

3.2.3.3. P53 PROTEİNİNİN FONKSİYONLARI .....	13
3.2.3.4. P53 GEN MUTASYONLARI .....	13
3.2.3.5 P53 GEN POLİMORFİZMLERİ .....	14
3.2.3.6. p53 GENİ KODON 72 POLİMORFİZMİ.....	15
<b>3.2.4. KROMOZOM ANOMALİLERİ .....</b>	<b>15</b>
3.2.4.1. SAYISAL ANOMALİLER .....	15
3.2.4.2. YAPISAL ANOMALİLER .....	17
3.2.4.3. MİTOTİK İNDEKS .....	18
<b>3.3. GEREÇ VE YÖNTEM .....</b>	<b>19</b>
3.3.1. SİTOGENETİK ANALİZLERDE KULLANILAN KİMYASAL MADDELER .....	20
3.3.2. SİTOGENETİK ANALİZLERDE KULLANILAN SOLÜSYONLAR.....	20
3.3.3. DİĞER GEREÇLER .....	21
3.3.4 SİTOGENETİK YÖNTEM .....	22
3.3.5. MOLEKÜLER GENETİK ANALİZLERDE KULLANILAN KİMYASAL MADDELER.....	27
3.3.6. MOLEKÜLER GENETİK ANALİZLERDE KULLANILAN GEREÇLER.....	29
3.3.7. MOLEKÜLER GENETİK YÖNTEM .....	29
3.3.8. İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME .....	34
<b>3.4. BULGULAR .....</b>	<b>35</b>
<b>3.5. TARTIŞMA .....</b>	<b>40</b>
<b>3.6. SONUÇ .....</b>	<b>45</b>
<b>4. KAYNAKLAR .....</b>	<b>47</b>
<b>5. ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>56</b>

## ŞEKİLLER

	Sayfa
<b>Şekil 1.</b> <i>p53</i> proteininin bölgeleri .....	12
<b>Şekil 2.</b> Çalışma gruplarında görülen kromozomal anomalilerden, 3 numaralı kromozomun uzun kolunda kromatid gap bulunan [(chtg(3)(q26)] metafaz ve bu metafaza ait karyotip.....	24
<b>Şekil 3.</b> Çalışma gruplarında görülen kromozomal anomali türlerine ait metafaz ve karyotip görüntüleri: A) 3 numaralı kromozomda kromatid kırığı bulunan [chtb(3)(q21)] metafaz ve bu metafaza ait karyotip B) 47,XXX kromozom kuruluşuna sahip metafaz ve bu metafaza ait karyotip.....	25
<b>Şekil 4.</b> Çalışma gruplarında görülen kromozomal anomali türlerine ait metafaz ve karyotip görüntüleri: A) 6 numaralı kromozomun q kolunda görülen bir delesyona ait [46,XY,del(6)(pter→q21:)] metafaz ve karyotip. B) 5 ve 11 numaralı kromozomlar arasında görülen dengeli translokayona ait [46,XY,der(5)(5qter→5p51::11q10→11qter),del(11)(pter→q10:)] metafaz ve karyotip.....	26
<b>Şekil 5:</b> <i>p53</i> kodon 72 polimorfizmi için uygulanan PCR'a ait amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel görüntüleri.....	32
<b>Şekil 6:</b> <i>p53</i> kodon 72 polimorfizmine ait amplifikasyon ürünlerinin Bsh1236I restriksiyon enzimi ile kesim sonuçlarının agaroz jel elektroforezindeki B) 5 ve 11 numaralı kromozomlar arasında görülen dengeli translokayona ait [46,XY,der(5)(5qter→5p51::11q10→11qter),del(11)(pter→q10:)] metafaz ve karyotip görüntüleri.....	34

## TABLOLAR

	Sayfa
<b>Tablo 1.</b> PCR reaksiyon protokolü .....	31
<b>Tablo 2.</b> PCR şartları .....	31
<b>Tablo 3.</b> Hepatit B'li hasta ve kontrol bireylerinden oluşan toplam 88 bireyin gruplara göre dağılımı.....	35
<b>Tablo 4.</b> Çalışma Grubunun Demografik Özellikleri .....	36
<b>Tablo 5.</b> İnterferon alfa tedavisi uygulanan hastalarda, tedavi öncesi ve tedavi sonrası mitotik indeks .....	36
<b>Tablo 6.</b> İnterferon alfa tedavisi uygulanan kronik aktif hepatit B'li hastaların tedavi öncesi ve tedavi sonrası kromozomal anomali değerleri.....	37
<b>Tablo 7.</b> Kromozomal anomali ve mitotik indeks yönünden tedavi öncesi hasta grubu ve kontrol grubunun karşılaştırılması .....	38
<b>Tablo 8.</b> P53 kodon 72 polimorfizminin hepatit B'li hasta ve kontrol grubundaki genotip dağılımı.....	38
<b>Tablo 9.</b> Homozigot prolin genotipine sahip hasta ve kontrol bireyleri ile diğer genotiplere (Arg/Pro ve Arg/Arg) sahip hasta ve kontrol bireylerinde görülen mitotik indeks ve kromozomal anomali ilişkisi.....	39

**KISALTMALAR**

Arg	Arjinin
bp	Baz çifti (Base pair)
DNA	Deoxyribonucleic acids (Deoksiribonükleik asit)
dNTP	Deoksिनुकलितलर (Deoxynucleotides)
HBV	Hepatit B virüsü
HCC	Hepatosellüler karsinom
HBX	Hepatit B virüsündeki X geni
HepG2	Hepatoma G2 hücre serisi
HBcAg	Hepatit B' nin çekirdek antijeni
Kb	Kilo baz (Kilobase)
kD	Kilo dalton
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
Pro	Prolin
RFLP	Restriction fragment length polymorphism (Restriksiyon fragmentinin parça uzunluk polimorfizmi)
RNA	Ribonükleik asit

## ÖZET

### HEPATİT B'Lİ HASTALARDA GENETİK ARAŞTIRMALAR

**Arş.Grv. Halit Akbaş**

Bu çalışmada; Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Gastroenteroloji Kliniğinde kronik aktif hepatit B tanısı konmuş, interferon alfa-2a ve interferon alfa-2b tedavisi uygulanacak olan hastaların prospektif olarak, tedavi öncesi ve tedavi sonrası kromozomal anomali, mitotik indeks ve p53 geni kodon 72 polimorfizmi yönünden değerlendirilmesi ve kontrol grubu ile karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Bu amaçla 58 kronik aktif hepatit B hastası, uygulanan interferon tedavisine göre iki alt gruba ayrılarak; tedavi öncesi ve tedavi sonrası kromozom analizi ve mitotik indeks yönünden değerlendirilmişlerdir. Hastaların yaş, cinsiyet, sigara ve alkol kullanım kriterleri ile uyumlu ilaç kullanmamış 30 sağlıklı bireyden oluşturulan kontrol grubu da kromozom analizi ve mitotik indeks yönünden değerlendirilmiştir. P53 geni kodon 72 polimorfizmi için ise; tedavi öncesi bütün hastalar ve kontrol bireyleri PCR-RFLP tekniği ile analiz edilmişlerdir.

Kronik aktif hepatit B'li hastaların lenfosit kültürlerinde tedavi öncesi görülen kromozomal anomali ortalamasının kontrol grubuna oranla istatistiksel olarak anlamlı oranda yüksek ( $P<0.05$ ), mitotik indeksin ise düşük ( $P<0,001$ ) olduğu saptanmıştır.

İnterferon alfa-2a ve interferon alfa-2b tedavisine başlanmadan önce ve altı aylık tedavi süreci sonrasında mitotik indeks ve kromozomal anomali yönünden yapılan inceleme sonucunda istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı tespit edilmiştir ( $P>0,05$ ).

Kronik aktif hepatit B'li hastalarda ve sağlıklı kontrol bireylerinde p53 kodon 72 polimorfizmine bakıldığında; kontrol grubuna oranla hasta grubunda homozigot prolin genotipinin daha sık olduğu, homozigot arjinin genotipinin daha seyrek olduğu, heterozigot sıklığının ise farklı olmadığı görülmüştür. Hasta ve kontrol



gruplarının genotip dağılımlarındaki bu farklılığın istatistiksel açıdan anlamlı olduğu saptanmıştır ( $p<0.05$ ).

Gerek HBV'li hastalarda gerekse sağlıklı popülasyonlarda hepatosellüler karsinom'un gelişme riski ile ilişkili olduğu düşünülen homozigot prolin genotipine sahip hasta ve kontrol bireylerinin lenfosit kültürlerindeki kromozomal anomali oranının, diğer genotiplerde (Arg/Pro ve Arg/Arg) görülen kromozomal anomali oranına göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu tespit edilmiştir ( $p<0,05$ ). Mitotik indeks ortalamaları arasında ise hasta ve kontrol grupları arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark olmadığı saptanmıştır ( $p>0.05$ ).

Çalışma sonunda elde edilen bulgular, Kronik aktif hepatit B'li hastaların lenfosit kültürlerinde kontrol grubuna oranla kromozomal anomali oranının yüksek, mitotik indeksin ise düşük olduğu, hastalara uygun dozda uygulanan interferon alfa tedavisinin ise bu açıdan herhangi bir etkiye yol açmadığı kanısını uyandırmıştır.

P53 geni kodon 72 polimorfizmi yönünden homozigot prolin genotipi oranının, kontrol grubunda düşük çıkmasına karşın hasta grubunda yüksek çıkması ve bu genotipe sahip bireylerde kromozomal anomali oranının da yüksek olması, kronik aktif hepatit B' ye yakalanmada bu varyantın bir risk faktörü olarak değerlendirilebileceği sonucunu doğurmuştur. Daha hacimli çalışmalarla bu sonuçların desteklenmesine gereksinim vardır.

Ayrıca yapmayı planladığımız bu çalışmalarda p53 geni kodon 72 polimorfizmi ile hastalığın prognozu ilişkisinin de özenle dikkate alınması düşünülmektedir.

Anahtar sözcükler: hepatit B, kromozomal anomali, mitotik indeks, p53 geni, kodon 72 polimorfizmi.

## ABSTRACT

### GENETIC RESEARCH IN PATIENTS WITH HEPATITIS B

In this study, we aimed to prospectively evaluate the patients, diagnosed earlier with active hepatitis B in the Clinic of Gastroenterology, Medical Faculty, Dicle university and to receive interferon alpha-2a and interferon alpha-2b therapies, in terms of pre-and post-treatment chromosomal abnormality, mitotic index and p53 gene codon 72 polymorphism and compare the findings with controls.

To that end a total of 58 patients with chronic active hepatitis B were divided into two subgroups, depending on the interferon therapy given. They were evaluated in terms of pre-and post-treatment chromosome analysis and mitotic index. In addition, the controls that consisted of 30 healthy subjects who were consistent with patients, age, sex, smoking and alcohol habits and who had not used medicine, were also assessed for chromosomal analysis and mitotic index. For p53 gene codon 72 polymorphism, all the patients and subjects in the control group were analysed prior to the treatment by PCR-RFLP technique.

It was determined that the average value of chromosomal abnormality seen in lymphocyte cultures of patients with chronic active hepatitis B statistically was significantly higher than controls ( $p < 0.05$ ), whereas mitotic index was lower ( $p < 0.001$ ).

As a result of analyses performed before starting the treatment with interferon alpha-2a and interferon alpha-2b, and at the end of the treatment that lasted 6 months, it was determined that there was not any significant difference in terms of mitotic index and chromosomal abnormality ( $p > 0,05$ ).

When p53 gene codon 72 polymorphism was checked in patients with chronic active hepatitis B and healthy controls, it was observed that homozygous proline genotype was more common in patients with respect to controls, homozygous arginine frequency was rarer and that heterozygote frequency was not different. It

was determined that this differentiation in genotype distributions of patients and controls was statistically significant ( $p < 0,05$ ).

Both in patients with HBV and in healthy populations, the rate of chromosomal abnormality in lymphocyte cultures of controls and patients possessing homozygous proline genotype which is considered to be related to hepatocellular carcinoma risk was found to be significantly higher than chromosomal abnormality rate seen in the other genotypes (Arg/Pro and Arg/Arg) ( $p < 0,05$ ). It was also observed that there was not any significant difference between patients and controls for mitotic index rates ( $p > 0,05$ ).

The findings obtained as a result of the study have aroused the conviction that chromosomal abnormality rate was higher in lymphocyte cultures of patients with chronic active hepatitis B with respect to controls, while mitotic index was lower, and therefore, interferon alpha therapy applied at proper doses has not led to any effect in this respect.

The fact that homozygous proline genotype rate was found to be low in control group in terms of p53 gene codon 72 polymorphism, though high in patient group and that chromosomal abnormality rate was high in individuals possessing this genotype has led to the conclusion that this variant could be considered a risk factor for development of chronic active hepatitis B.

More extensive studies are required to support these findings.

Moreover, in those studies that we have planned to conduct, the relationship between p53 gene codon 72 polymorphism and prognosis of the disease is also thought to be taken into account carefully.

**Keywords:** hepatitis B, Chromosomal anomaly, mitotic index, p53 gene, polymorphism.

### 3.1. GİRİŞ ve AMAÇ

Tek önemli rezervuarı insan olan hepatit B virüsü (HBV) tüm dünyada yaygın olarak görülmektedir. Dünyada 2 milyar insan HBV enfeksiyonuna yakalanmakta ve bunların 350 milyonunda enfeksiyon kronikleşmektedir(1). Türkiye’de ise 4 milyon insanın HBV’yi taşıdığı tahmin edilmektedir (2). Hepatit B’ye bağlı akut hepatitlerin ortalama %10’unun kronikleştiği ve bunların önemli bir bölümünün siroza dönüştüğü; sirozlu olgularda da hepatosellüler karsinom (HCC) gelişme riskinin oldukça yüksek olduğu bilinen bir gerçektir. HBV taşıyıcılarında HCC gelişme riski sağlıklı popülasyona oranla yaklaşık 200 kat daha yüksektir. HBV kronik hepatite, siroza ve HCC’ye yol açarak her yıl dünyada yaklaşık 1 milyon kişinin ölümüne neden olmakta ve ölüm nedenleri arasında onuncu sırada yer almaktadır (3, 4).

Genel olarak HBV enfeksiyonuna maruz kalmak geniş bir enfeksiyon spektrumuna yol açmaktadır. HBV ile enfekte olan erişkinlerin %50-55’i virüsü elimine edebilmekte ve bunların %5-10’u kronik HBV taşıyıcısı olmaktadır. Bu kronik HBV taşıyıcılarının %20-30’unda kronik hepatit B ve %5’inde ise uzun süreli hastalık durumlarında karaciğer sirozu ve HCC gelişmektedir. İnatçı bir enfeksiyonla sonuçlanan bazı nadir vakalarda ise karaciğer hızla baskılanmakta ve nihayetinde iflas etmektedir. Kimi HBV taşıyıcısında hayatı tehdit eden bir enfeksiyon geliştirirken başka taşıyıcılarda virüsün zararsız olarak yaşamasını sağlayan veya enfeksiyonu zararsız bir klinik olgu olarak sınırlayan belirleyici faktörlerin, konağın sahip olduğu genetik faktörler olabileceği bildirilmiştir (5, 6).

HBV’nin, karaciğer kanserinin oluşumundaki direk ve dolaylı yolla meydana gelen kompleks rolü hala tartışılmaktadır. HBV-DNA sekanslarının konak hücre genomuna integrasyonu, cis-etkili mekanizma ile bazı hücresel genleri aktive edebilmektedir. Kritik genlerdeki mutasyonlar birkaç nükleotidin sekans değişikliklerinden, büyük DNA (Deoksiribonükleik asit) fragmentlerinin delesyon, amplifikasyon ve translokasyonlarını içeren büyük kromozomal anormallikere kadar yayılan farklı tiplerde genetik değişikliklerle sonuçlanabilmektedirler (7). HBV-

DNA integrasyonu sadece konak hepatosit genomunu değil aynı zamanda kan hücreleri gibi HBV taşıdığı bilinen diğer hücreleri de hedeflemektedir. Konak hücrede meydana gelen HBV-DNA integrasyonu, artan kromozomal instabilite ve genetik rekombinasyonlara yol açabilmektedir (8).

Hepatit B'li hastalarda yapılan araştırmalarda önemli oranda sitogenetik değişiklikler, kromozom hasarları ve düşük mitotik indeks tespit edilmiştir (9-12). Kronik viral enfeksiyonlarda immün sistem hücrelerinin sitogenetik instabilitesi, DNA tamir mekanizmasının inhibisyonu ve hedef hücrelerdeki apoptozis dengesinin bozulması ile ilişkilendirilmiştir. (13). Kronik HBV enfeksiyonunda, diğer bazı viral enfeksiyonlarda olduğu gibi periferik T hücrelerinde hücre ölümünün aktivasyonunun başlatıldığı ve apoptozisin geliştiği gözlenmiştir.(14).

HBV farklı viral proteinler sentezlemektedir. Bu proteinler virüslerin kendi hareket alanları bakımından ve kromozomal instabiliteyi etkilemeleri yönünden önemlidir. Örneğin HBV kor proteininin histonlarla ilişki kurabildiği, bu şekilde kromozomal yapıyı etkileyebildiği ve kromozom kondensasyonunu değiştirebildiği bildirilmiştir (15). Başka bir çalışmada hepatit B virüsündeki X geni (HBX) ile transfekte edilmiş olan insan hepatoma HepG2 hücre serilerinde, kromozomal değişiklikler ve mikronükleus formasyonunda artış görülmüş, HBX geninin konak genomuna yerleşebildiği ve hepatosellüler karsinomların çoğunda ekspresyonunun olduğu belirtilmiştir (16).

Tümör süpressör bir proteinin sentezinden sorumlu olan p53 geninin yabancıl tipi, hücrede oluşan DNA hasarına yanıt olarak hücre döngüsünü G1-S kontrol noktasında durduran veya apoptozisi indükleyen ve böylece genetik mutasyonların yavru hücrelere geçişini engelleyen fonksiyonlara sahiptir.

p53 genindeki mutasyon, delesyon ve polimorfizmler; HCC'li hastaların karaciğer tümör dokularında büyük oranda tespit edilmiştir (17-20). Hepatit B virüsü X proteininin (HBX) transkripsiyonel olarak p53 tümör süpressör genini inhibe ettiği bilinmektedir. Lin ve ark. yaptıkları bir çalışmada DNA hasarı varlığında HBX Proteininin; p53'ün aktivitesini baskılama yoluyla p21'in ekspresyonunu azaltarak hücre döngüsünün G(0)-G(1) kontrol noktasının regülasyonunu bozduğu ve böylece hepatoma hücrelerinin büyümesini teşvik ettiği sonucuna varmışlardır. Bu durum HBV ile ilişkili HCC'nin gelişmesinin altında yatan sorumlu moleküler

mekanizmalardan biri olabilir (21, 22-25). Buna ek olarak p53 proteininin de HBV enhancer/X promoterine bağlanıp onu baskıladığı bilinmektedir . Bu yüzden HBX ve p53, protein-protein interaksiyonları ile birbirlerini inhibe edebilmekte ve transkripsiyonel olarak baskılayabilmektedirler. Bu iki protein arasındaki karşılıklı inhibisyonların dengesi, HBV ile ilişkili malignensilerin gelişmesinde belirleyici bir rol oynayabilmektedir (22, 26). Aynı zamanda bu durum p53 geninin, HBV enfeksiyonlarının klinik seyri üzerinde etkili bir genetik faktör olabileceğini akla getirmektedir.

P53'ün prolin amino asiti yönünden zengin bölgesi, hedef genlerin p53'e bağlı transaktivasyonu için gereklidir (27, 28). p53 kodon 72 polimorfizmi, p53'ün prolin amino asiti yönünden zengin bölgesinde yer alan yaygın bir polimorfizm olup, arjinin yada prolin amino asitlerini kodlamaktadır (29). Bu allelik varyantlar proteinin; primer hücrelerdeki transformasyonu baskılamada, apoptozisi indüklemeye ve transkripsiyonu aktive etme yeteneğindeki fonksiyonunu değiştirmektedir (30-32). P53'ün kodon 72'deki polimorfik varyantının ekspresyonu ile (pro72 ve arg72) kanser hassasiyeti arasındaki ilişkiyi araştıran birbirleri ile uyumlu olmayan birçok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalarda, kodon 72 deki prolin allelinin akciğer, özefagus, mide, meme, nazofarinks, üreter, prostat ve deri kanseri için potansiyel bir risk faktörü olduğu bildirilmiştir (33-39). Bu çalışmalarla uyumlu olmayan yayınlar da mevcuttur (40-45). Benzer şekilde P53 kodon 72 deki prolin alleli ile HCC arasında ilişki olduğunu bildiren çalışmalar da yapılmıştır (46-49). Çin popülasyonunda yapılmış bir çalışmada P53 kodon 72 deki homozigot prolin alleli ile HCC'nin ilişkili bulunması, bu homozigotluğun HCC için potansiyel genetik risk faktörlerinden biri olabileceği ve bu polimorfizmin yüksek HCC riski taşıyan bireylerin taramasında belirleyici bir markır olarak kullanılabilmesi sonucunu doğurmuştur (50).

Kronik hepatit B tedavisinde bugün için en sık kullanılan ilaç interferondur. İnterferon tedavisi sırasında Flu-like sendromu, iştahsızlık saç dökülmesi, lökopeni ve trombositopeni gibi yan etkiler görülmekte, lökopeni ve trombositopeni saptanan hastalarda dozun azaltıldığı ya da tedaviye kısa süre ara verildiği bildirilmektedir (51-53).

Literatürde interferon tedavisi sırasında kromozom anomalisi ve sekonder malignite geliştiğini bildiren çalışmalar olmakla birlikte, interferonların antiklastojenik ve antitümör etkileri olduğuna dair çalışmalar da mevcuttur (54-59).

Yaptığımız literatür taramasında hepatit B'li hastaların kan hücrelerinde interferon tedavisi öncesi ve sonrası meydana gelen kromozomal anomaliler, mitotik indeks ve p53 geni kodon 72 polimorfizmi arasındaki ilişkiyi araştıran herhangi bir çalışmaya rastlamadık.

Bu çalışmada; Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Gastroenteroloji Kliniğinde hepatit B tanısı konmuş, interferon alfa 2a veya interferon alfa 2b tedavisi uygulanacak olan hastaların prospektif olarak, tedavi öncesi ve tedavi sonrası kromozomal anomali, mitotik indeks ve p53 geni kodon 72 polimorfizmi yönünden değerlendirilmesi ve kontrol grubu ile karşılaştırılması amaçlanmıştır.

## 3.2. GENEL BİLGİLER

### 3.2.1. HEPATİT

Hepatit; virüslerin, toksinlerin, kimyasal maddelerin, otoimmün olayların veya bakterilerin neden olduğu karaciğer inflamasyonudur. Klinikte görülen hepatitlerin büyük çoğunluğu virüslere bağlıdır. Viral hepatitler, genellikle akut kendi kendine düzelen bir hastalık olarak görülür. Daha az olarak ise, devam eden ya da tekrar eden hasar, diffüz skar, portal hipertansiyon ve karaciğer yetmezliğine yol açabilen kronik inflamasyona neden olur. Hepatotropik virüsler primer olarak hepatositleri enfekte ederler. Bilinen hepatotropik virüsler; A, B, C, D, E, G virüsleridir. Bu virüslerin hepsi akut hepatite neden olurlar. Ancak epidemiyolojileri, karaciğer hasarının spektrumu ve kronikleşme insidansı patojene göre değişir (60, 61).

#### 3.2.1.1. HEPATİT B VİRÜSÜ

HBV hepadnaviridae ailesinin orthohepadnavirüs cinsinde yer alan hepatotropik, zarflı ve kısmen çift sarmallı bir DNA virüsüdür. Genomik yapısı 3200 nükleotitten oluşur. Tüm hayvan DNA virüsleri içinde en küçük olanıdır. HBV enfekte ettiği hücrelerde birden fazla partikül oluşturması nedeniyle de farklıdır. Enfekte ettiği kişilerin serumlarının kısmen saflaştırılmış preparatlarının incelenmesi sonucunda, büyüklük, yapı ve miktar gibi özellikleri bakımından 3 farklı tipte partiküle rastlanmıştır.

1-Dane partikülleri: Yaklaşık 42 nm (42-47nm) çapında, enfektif özellikte, tam bir viryon formunda ve küresel şekildedir.

2 -Küresel partiküller: Yaklaşık 22 nm (16-25 nm) çapında, içinde nükleik asit içermeyen ve infektif özelliği olmayan partiküllerdir.

3 -Tübüler partiküller: Yaklaşık 22 nm çapında, 50-500 nm uzunluğunda, nükleik asit içermeyen, enfektif özelliği olmayan ve replikasyonun söz konusu olduğu kişilerin serumlarında bulunan partiküllerdir.

Her üç partikül de enfekte konak serumunda yüksek miktarda saptanabilirler; Hepatit B yüzey antijenine (HBsAg) sahiptirler ve immünojeniktirler. Dane partikülünün dış yüzeyi yaklaşık 7-8 nm genişlikte bir kılıf ile kaplıdır. Bu zarf, yüzey antijen protein, glikoprotein ve hücrelipidleri içerir. Viryonun iç bölümü



27-28 nm çapında elektronu yoğun küresel nükleokapsit içerir (62). C protein nükleokapsitin temel yapı proteini'dir. HBV'nin bu üç partikülünden enfeksiyöz olan form az üretilir. Hücre üç tipte de yüzey antijeni ortak olduğu için akut veya kronik hastaların serumlarında HBsAg düzeyi çok yüksek düzeyde gözlenirken Dane partikül, 0,1µg/ml' yi nadiren geçer (11). HBV serum içinde 30-32°C'de saklandığında 6 ay süre ile ve -22°C' de dondurulduğunda yıllarca enfektivitesini korur (63).

### **3.2.1.2. HEPATİT B VİRÜSÜNÜN GENOMİK YAPISI**

Genomun tamamı 3200 nükleotidden oluşur. Kısmen çift sarmallı sirküler bir DNA molekülüdür ve değişken uzunlukta tek sarmallı bir bölge içerir. Genom iki DNA sarmalı içerir: Uzun (L veya negatif) sarmal; tam uzunlukta'dır yani 3200 nükleotid taşır. Kısa (S veya pozitif) sarmal, 1800-2700 arası nükleotid taşır. Bu zincirler, ortak baz çiftlerine sahip olup sirküler bir yapı halinde bulunmakla birlikte her birinin 3' ve 5' uçları birleşik olmadığından aslında lineer moleküllerdir (64). Genetik bilginin tamamı uzun sarmal üzerinde kodlanmış olup, bu sarmal S, C, P, X kısaltmaları ile gösterilen 4 değişik protein kodlayan nükleik asit dizisine (open reading frame) sahiptir. Bunlar 4 farklı geni temsil eder.

#### **3.2.1.2.1. S GENİ:**

Üç farklı başlangıç koduna sahip olduğu için, Pre-S1, Pre-S2 ve S olarak üç farklı bölgeye ayrılır. Bu üç bölgeden özellikle Pre-S1 bölgesi 21-47 aminoasitler arasında hepatosit reseptörüne bağlanma alanına sahiptir. Bütün hepadnaviruslarda bu bölge viryon partiküllerinin bir araya gelmesi, salınımı ve sonraki süreçte hepatosit reseptörüne bağlanması sırasında anahtar rol alır. Pre-S2 bölgesi, 133-139 aminoasitler arasında bağlanma alanına sahiptir. Pre-S2'nin ürünleri virüs-konak hücre bağlanmasında rol alarak HBV' nin karaciğer hücresine tutunmasında etkili olmaktadır (62, 65).

#### **3.2.1.2.2. C GENİ:**

İki farklı başlangıç bölgesi olduğu için, Pre-C ve C olarak iki bölgeye ayrılır. Bu gen üzerindeki okuma işlemi Pre-C' den başlarsa oluşan P25 polipeptidi öncelikle

endoplazmik retikulumda parçalanıp daha sonrada C terminal bölgesinin modifikasyona uğraması sonucu HBeAg oluşur. Okuma C bölgesinde başlarsa P23 polipeptidi sitoplazmada kalıp modifiye olması ile hepatit B' nin çekirdek antijeni (HBcAg) oluşur. HBcAg genellikle nükleer yerleşimlidir ancak aktif hastalık döneminde veya viral replikasyonun çok yüksek olduğu zamanlarda sitoplazmada diffüz bir yayılım gösterir (66).

### **3.2.1.2.3. P GENİ:**

P geni X ve C genleri ile kısmen, S geni ile tamamen çakışır. Sonuç olarak uzun sarmal 1,5 defa okunmaktadır. Bu özellik nedeniyle HBV; bilinen en küçük genomik yapıya sahip olmakla birlikte, kendini kodlama kapasitesi en fazla olan hayvan virusudur. P geni DNA polimerazı şifreler, replikasyon RNA aracılığı ile olduğundan DNA polimeraz bir reverse-transkriptaz fonksiyonu da görür (63, 66).

### **3.2.1.2.4. X GENİ:**

En küçük gen bölgesidir. HBxAg' yi kodlar. HBxAg hepatositlerde geçici bir süre tespit edilebilmektedir. X proteininin transaktivasyon işlevli olduğu düşünülmektedir (66).

### **3.2.1.3. VİRAL PROTEİNLER:**

#### **3.2.1.3.1. Yüzey Proteinleri:**

Pre-S/S geninin ürünleri olup sentezlenen proteinler aminoasit sayısına göre L (large), M (middle), S (small) olarak ayrılır. Bu üç farklı konfigüratif yapının farklı görevleri vardır (67) .

**-L Tipi:** Hepatositlere tutunmada ve kor partiküllerinin kılıflaşmasında görevlidir.

**-M Tipi:** Pre-S2 glikan aracılığı ile HBV'nin hepatosite bağlanmasını sağlar ve HBV'nin hücre içine absorpsiyonunda görev alır.

**-S Tipi:** Kor partiküllerinin kılıflaşmasında görevlidir (63, 64).

### 3.2.1.3.2. Kor Proteinleri:

**-HBe Proteini:** Pre-C bölgesinden başlayan okuma sonucu oluşur. İmmün yanıtın asıl hedefi olan HBc üzerindeki immün baskının azalması, virüsün yaşamının uzamasında HBe'nin varlığı önemlidir.

**-HBc Proteini:** C gen bölgesince sentezlenir. Genelde intranükleer yerleşimlidir.

### 3.2.1.3.3. P Proteini:

P geni tarafından oluşturulur. Çok işlevlidir. Aminoterminal parçası, DNA negatif sarmal sentezini başlatacak olan terminal proteini oluşturur. Santral parça, DNA pozitif sarmal için DNA'ya bağımlı polimerazı oluşturur (65-68).

### 3.2.1.3.4. X Proteini:

Viral hücrel genleri transkriptive etme özelliği olan küçük sitoplazmik proteinlerdir. X proteini normal P53 (tümör supresör gen ürünü) işlevini bozar. Bunun da HBV' de gelişen karsinomlarla ilgili olduğu düşünülmektedir (69).

## 3.2.2. İNTERFERONLAR

İmmünomodülatör, antiviral ve antiproliferatif etkilere sahip olan sitokinlerdir. Çeşitli uyarılara cevap olarak ökaryotik hücrelerden salınan, geniş bir biyolojik aktiviteye sahip sitokinlerdir. Üç tip interferon bulunur.

### 3.2.2.1. İNTERFERONLARIN TİPLERİ

**3.2.2.1.1. İnterferon Alfa (IFN- $\alpha$ ):** Bazı antijen ve virüslerin uyarısı ile çoğunlukla monositler ve transforme B lenfositler tarafından üretilir. Aktiviteleri birbirlerine benzeyen, farklı genler tarafından kodlanmış 30 kadar alt tipi vardır. Klinikte en yaygın olarak kullanılan alfa interferondur.

**3.2.2.1.2. İnterferon Beta (IFN- $\beta$ ):** Virüslerin ve poliribonükleotidlerin uyarısıyla fibroblastlardan salgılanır. Tek tiptir. Aminoasitlerinin dizilişi IFN alfa ile benzerdir. Bu nedenle alfa ve beta IFN' ların hücre yüzeyindeki reseptörleri ortaktır. Antiviral ve immünomodülatör etkileri benzerdir.

**3.2.2.1.3. İnterferon Gama (IFN $\gamma$ ):** Uyarı ile T lenfositlerinden salınırlar. Antijenik ve kimyasal yapısı diğerlerinden farklıdır. Diğer IFN' lara göre immünomodülatör etkisi fazla iken, antiviral etkisi daha azdır.

### **3.2.2.2. İNTERFERONLARIN ETKİ MEKANİZMALARI**

Makrofajlar, doğal öldürücü hücreler (NK) ve sitotoksik T hücre aktivitelerini artırarak enfektif hücrelerin eliminasyonunu sağlarlar. Bu etkilerini özgül reseptörler aracılığıyla gösterirler. Başlıca 3 ana etkisi vardır: (25)

**3.2.2.2.1. Antiviral Etki:** Bu etki ile viral enfeksiyonun sınırlanıp, yayılması önlenir. Bunun için interferonlar virüsün hücreye girişini ve viral RNA ile protein sentezini inhibe ederler. Virüs ile enfekte olan hücrede IFN genleri aktive olur ve ekstraselüler sıvıya interferon salınışı gerçekleşir. IFN' lar burada yayılıp diğer hücrelerin yüzeylerindeki reseptörlere bağlanıp antiviral etki gösterirler. Reseptöre bağlanma ile antiviral genler aktive olur ve antiviral prosedürde artışla viral replikasyon durdurulur. Reseptöre bağlı interferonlar antiviral etkisini iki yeni enzimin sentezlenmesini kolaylaştırarak gösterir. Yeni sentezlenen bu iki enzim protein kinaz ve 2'-5' oligoadenilat sentetazdır. Bunlardan 2'-5' oligoadenilat sentetaz endonükleazı uyararak viral RNA' nın parçalanmasını sağlarken, protein kinaz fosforilasyon yoluyla protein sentezinin azalmasına neden olur. Sonuçta hem enfekte hücrelerdeki enfeksiyon kontrol altına alınır hem de nonenfektif hücreler korunmuş olur.

**3.2.2.2.2 İmmünomodülatör Etki:** İnterferonlar sitotoksik T, natürel killer hücreler ve makrofajları aktive ederek sitokin yapımını, immün globülin sentezini, HLA sınıf I ve II antijenlerinin hücre yüzeyindeki ekspresyonunu artırarak immünomodülatör etki gösterir. İnterferonlar HLA sınıf I moleküllerini artırıp virüs antijenlerinin sitotoksik T hücreler tarafından tanınmasını ve enfekte hepatositlerin yok edilmesini sağlarlar. İnterferon yokluğu veya defektif olması enfekte hepatosit tanınmasında bozukluğa ve enfeksiyonun eradike edilememesine neden olur.

**3.2.2.2.3. Antiproliferatif Etki:** İnterferonlar bu etkileriyle HBV' ye bağı HCC gelişimini önleyebilir. İnterferonların, normal hücrelerde reversibl, neoplazik hücrelerde ise irreversibl sitotoksik etkileri vardır. Onkojen virüslerin transforme edici etkilerini yok ederler. İnterferonlar bu etkileri nedeniyle KML, Kaposi Sarkomu gibi birçok kanser türlerinin tedavisinde de kullanılmaktadır (60, 70, 71).

### **3.2.2.3. İNTERFERON TEDAVİSİNDE AMAÇLAR**

- Viral replikasyon belirleyicilerinin yok edilmesi
- Bulaştırıcılığın azaltılması
- ALT'nin normal sınırlar içine çekilmesi
- Karaciğerde inflamasyonun azaltılması
- Klinikte görülen semptomların giderilmesi
- Hastalığın ilerleme hızının azaltılıp siroz ve HCC gelişiminin önlenmesi, yaşam süresinin uzatılması (58).

### **3.2.2.4. İNTERFERONLARIN YAN ETKİLERİ**

- 1-Sistemik Yan Etkiler: İlaç alımından birkaç saat sonra ateş, üşüme, bulantı, kusma, ishal görülebilir. Ateş tedavi öncesi verilen antipiretiklerle kontrol edilebilir. Saç dökülmesi, hipersensivite gözlenebilir.
- 2-Hematolojik Yan Etkiler: Trombosit, beyaz küre ve hematokritte düşme
- 3-Nörolojik Yan Etkiler: Kulak çınlaması, baş dönmesi, işitme azlığı, konsantrasyon güçlüğü ve nadiren de deliryum, koma görülebilir.
- 4-Psikolojik Yan Etkiler: Depresyon, irritabilite
- 5-Otoimmün Yan Etkiler: Otoantikör ve anti-interferon antikörlerinin gelişmesi, hipertiroidizm, hipotiroidizm, diyabet, hemolitik anemi görülebilir (58).

### **3.2.3. p53 GENİ**

1979 yılında, simian virüsü (SV40) ile transforme edilmiş hücrelerde yapılan araştırmalar sırasında viral bir antijenle birlikte çöken bir protein keşfedilmiştir (72, 73). Sonradan *p53* olarak adlandırılan bu proteinin, ilk çalışmalarda tipik onkogenlerin kodladığı onkoproteinler gibi hücre kültürlerinde hücreleri transforme edebilmesi nedeniyle, önceleri onun da bir onkogen ürünü sanılmasına yol açmıştır.

Daha sonraki çalışmalarda, proteinin yalnızca mutant şeklinin bu özelliği gösterdiği anlaşılmıştır. Kanser dokusunda *p53* mutasyonları ilk kez 1989 yılında kolon tümörlerinde saptanmıştır (74). Bu tümörlerde, hem *p53* geninin bulunduğu kromozom 17p13'deki allelik delesyon ve nokta mutasyonlarının Knudson'ın iki vuruş modeli ile uyumlu olması, hem de proteinin normal şeklinin hücre kültürlerinde transformasyonu baskılaması *p53*'ün başlangıçta sanıldığı aksine, tümör supressör aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir. Sonraki birçok çalışmada *p53*'ün insan tümörlerinin en az yarısında (kolon, karaciğer, kemik, beyin, özefagus kanserleri) mutasyona uğradığı anlaşılmıştır (72, 75).

### 3.2.3.1. p53 GENİ VE PROTEİNİNİN YAPI VE ÖZELLİKLERİ

*P53* geni kromozom 17p13.1 lokusunda 20 kb'lık (20303bç) DNA kesimi üzerinde bulunur (75). 2.6 kb (2629 bç) mRNA üretmek üzere kombine olmuş 11 ekson içerir (76). Kodladığı protein 393 amino asitten oluşur ve 53 kDa'luk nükleer protein ürünüdür. 1. eksonu kodlamayan (non-coding) bir eksondur. Bu bölgenin kararlı bir ilmek oluşturarak yabancı *p53*'e sıkı bir şekilde bağlanıp, mutant *p53*'e bağlanmadığı gösterilmiştir. Bu bağlanma, *p53* mRNA'sının tranlasyonunu spesifik olarak engelleyerek, hücrede *p53* proteini seviyesini bu yolla kontrol edebilmektedir (76-79).

*P53* proteini (53000 dalton), "upstream" regülatör bölgelerinde veya intronlarında *p53* bağlama bölgeleri olan genlerin ekspresyonunu aktive eden diziyeye özgü DNA bağlama proteinidir. *P53* proteini, hücre tipi hasar düzeyi benzerlik ve henüz tanımlanmamış birçok parametreye bağlı olarak farklı yollarla aktive edilen yüzlerce gende bulunan DNA tanıma sekanslarını bağlayan bir transkripsiyon faktörü olarak görev yapmaktadır (80-82).

*P53* proteini her biri spesifik fonksiyonlara sahip 5 bölgeye ayrılabilir (Şekil 1.). Bunlar;

**3.2.3.1.1. Amino terminali:** 1-39'a kadar olan amino asit rezidülerinden oluşan asidik bir transaktivasyon bölgesi ve Mdm2 proteini bağlanma bölgesidir (83). Bu bölge gen ekspresyonunu düzenler.

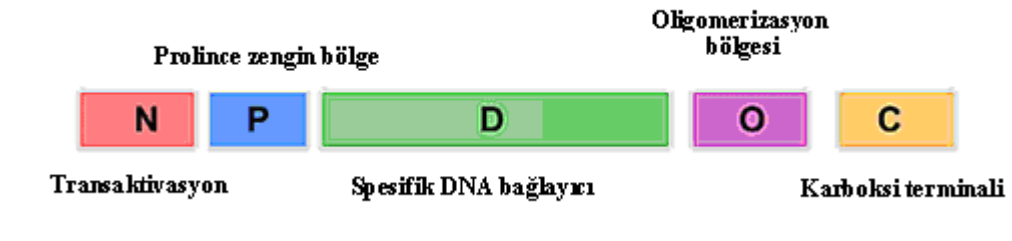
**3.2.3.1.2. Prolince zengin bölge:** 40-100'e kadar olan aminoasit rezidülerinden oluşan *p53*'ün çoğunluğunda korunmuş olan, tekrar eden prolin rezidüleri serilerini

içeren bölgedir (84). Bu bölge tranaktivasyon fonksiyonu ve apoptozis için de gereklidir ve p53'ün negatif regülasyonunda görev almaktadır (85).

**3.2.3.1.3. Merkezi (sentral) veya kor bölge:** 101-306'ya kadar olan aminoasit rezidülerinden oluşan diziye özgü DNA bağlama bölgesini kapsamaktadır (83). DNA bağlama bölgesindeki mutasyonlar p53'ün tümör supresör aktivitesini değiştirirler ve kanserde yaygındırlar (77).

**3.2.3.1.4. Oligomerizasyon (tetramerizasyon) bölgesi:** 307-355'e kadar olan aminoasit rezidülerinden oluşan bölgedir. Dimerizasyon için gerekli olan bir alfa-heliks tarafından izlenen beta zinciri içerir (83). Yaygın olmasa da, oligomerizasyon bölgesindeki mutasyonlar, tetramerizasyonu, DNA bağlayıcılığını ve tümör hücresi gelişmesinin inhibe edilmesini engeller (86).

**3.2.3.1.5. Karboksi terminali:** 356-393'e kadar olan aminoasit rezidülerinden oluşan bazik bölgedir. Üç adet nükleer lokalizasyon sinyali ve hasarlı DNA'ya bağlanan bir nonspesifik DNA bağlama bölgesi, ayrıca RNA'ya özel olarak bağlanan amino asitler içerir. Bu bölge, kor bölgenin DNA bağlama özelliğinin negatif regülasyonunda ve DNA tamir prosesinin p53 tarafından regülasyonunda görevlidir (81, 74). Bu bölgenin p53'ün apoptotik aktivitesini kontrol ettiği de gösterilmiştir (87).



**Şekil 1.** p53 proteininin bölgeleri (88).

### 3.2.3.2. P53 GENİNİN AKTİVASYONU

Normalde, sadece 20 dakikalık bir yarı ömre sahip olduğu için p53'ün hücrel konsantrasyonu düşüktür. Üstelik p53, protein fonksiyonu için aktivasyona ihtiyaç duyan latent bir formda bulunur (86). Düşük ribonükleozid trifosfat seviyeleri p53'ü stimüle etse de, p53'ü aktive eden başlıca upstream olaylar DNA hasarı ve hipoksidir. DNA hasarı, yükselmiş bir p53 seviyesi, daha uzun bir yarı ömür ve

transkripsiyon faktörü olarak aktivasyonla sonuçlanır. P53'ün DNA hasarını tam saptama mekanizması ve sonraki dahil olduğu sinyal transdüksiyon yolları iyi tanımlanmamıştır. Bununla birlikte, DNA ipliği kırıkları ve DNA tamir araçlarının p53'ü aktive ettiği düşünülmektedir (89). Hipoksi p53 proteininin konsantrasyonunu yükseltir ve aktive eder. Bu belki de hipoksik hücrelerin p53 aracılığıyla apoptozisine yol açar (86).

### **3.2.3.3. P53 PROTEİNİNİN FONKSİYONLARI:**

P53'ün fonksiyonları çeşitli ve komplekstir. P53 aktivasyonunu izleyen hücresel cevaplar: hücre siklusu regülasyonu, DNA tamiri ve apoptozistir. Bu konudaki genel düşünce, DNA hasara uğradığında, p53 aracılı yolların hasarı, hücre siklusunu durdurarak veya DNA tamiriyle düzeltmeye giriştiğidir. Eğer hasar tamir edilemeyecek kadar büyükse, p53'ü apoptoza teşvik eder.

Yabani p53'ün hücre siklusu üzerinde, p16, siklin D1, siklin bağımlı kinaz-4(Cdk4), retinoblastoma (Rb) yolu ve p21 (Waf1-cip1) yolunu da kapsayan birçok regülatör yolu içeren sayısız etkisi vardır (77).

Birçok faktör p53 aracılı apoptozu artırabilir veya engelleyebilir. Örneğin myeloid lösemik hücreler, yabani p53'ün aktivasyonu ile apoptoza uğrayabilirken, interlökin-6'nın varlığında apoptoza uğramazlar ki, bu da interlökin-6'nın p53 aracılı apoptozisi ortadan kaldırdığını akla getirmektedir (90).

Son zamanlardaki veriler, p53'ün hücre yaşlanmasında bir rolü olduğunu akla getirmektedir. Hücre kültürlerindeki mutant p53, hücrelerin yaşlanmasını erteleyerek hücrenin yaşamını uzatmaktadır (91).

P53, birçok viral proteinle (HBV-HBX proteini, HPV Onkoprotein E6, Adenovirüs Onkoproteini(E1B), SV 40 büyük T antijeni, onkogen ürünleriyle (Mdm2, C-Abl) ve transkripsiyon faktörleriyle (TFIIH, WT1, TATA Bağlayan protein) önemli fizyolojik yollarla karşılıklı olarak etkileşir (77).

### **3.2.3.4. P53 GEN MUTASYONLARI:**

İnsan p53 mutasyonlarının ilk kez 1990 yılında kolorektal kanserlerde dokümanite edilmesinden sonra, pek çok laboratuvar tarafından yapılan çalışmalarda, doku orijini ve etyolojiden bağımsız olmak üzere, insan kanserlerinin büyük



çoğunluğunda, bu genin mutant veya inaktif olduğu görülmüştür(92). p53 mutasyonları insan kanserlerinin yaklaşık %50'sinde bulunmuştur (82).

p53 mutasyonları; delesyon, insersiyon, trunkasyon (truncation-budanma) veya nokta mutasyonları şeklindedir. Tümörlerde genellikle yabancı allelin delesyona uğramasıyla oluşan, heterozigotluğun kaybı (LOH=loss of heterozygosity) sözkonusudur. Bütün mutasyonların %85'ten fazlası bir yanlış anlamlı (missense) proteinin üretimiyle sonuçlanan tek amino asit substitisyonlarıdır (85, 86).

p53 mutasyonlarının büyük çoğunluğu (%90'dan fazlası) sekans-spesifik DNA bağlayan kor bölgede oluşmakta ve yaklaşık %50'si bu bölgedeki 175, 248, 249, 273 veya 282 olmak üzere beş "hot spot" kodonu değiştirmektedir(86, 92). Neredeyse bütün belli başlı kanser tipleri (deri, akciğer, meme, mesane kanseri, gastrointestinal sistem ve hematolojik kanserler) DNA bağlayan bölgeye dağılmış olan mutasyonlar gösterirler. Genellikle kor bölgedeki mutasyonlar, direkt olarak DNA'ya bağlanan aminoasitlerde (örneğin 248. ve 273.) veya p53'ün konformasyonunu değiştirerek spesifik DNA bağlayıcılığını engelleyen (örneğin 143. ve 175.) amino asitlerde oluşan mutasyonlar olarak sınıflandırılabilir (91, 93).

Farklı mutasyon tiplerinin gösterdiği mutasyon frekansları içinde G:C→A:T transisyonları frekansı %42,6 ile en yüksek değerdedir. G:C→T:A transversiyonları %16,8 ile ikinci sıklıktaki mutasyon tipidir. Diğer mutasyonlar A:T→G:C transisyonları %10,7 , delesyonlar %8,9 , G:C→CG tranversiyonları %8 , A:T→T:A transversiyonları %5,6 , A:T→C:G transversiyonları %3,7 , insersiyonlar %2,6 , CC:GG→TT:AA double transisyonları % 0,7 olarak dağılım göstermektedir (92).

### 3.2.3.5 P53 GEN POLİMORFİZMLERİ

Günümüzde insanda 456 adet P53 polimorfizmi tanımlanmıştır. P53 geninin aminoasit dizilimini etkilemeyen başlıca polimorfizmleri: C21T (2. ekzon), G36A (4.ekzon) ve A213G (6. ekzon) nokta mutasyonlarıdır. (sessiz mutasyonlar) (94, 95). Aminoasit dizilimini etkileyen önemli polimorfizmler ise C47T (prolin-serin; 4. ekzon) ve G72C (arginin-prolin; 4. ekzon) polimorfizmleridir. Bunlardan özellikle G72C önemli olup basta serviks kanseri olmak üzere çeşitli kanser türleri ile ilişkisi üzerinde yoğun olarak durulmaktadır (96). Bu güne kadar saptanmış olan p53 gen mutasyonlarını ve polimorfizmlerini internetteki veri tabanlarında izlemek

mümkündür (97). Halen 16000'in üzerinde somatik ve 200'ün üzerinde germline p53 mutasyonu olduğu bilinmektedir.

### 3.2.3.6. p53 GENİ KODON 72 POLİMORFİZMİ

Yabancıl tip p53 kodon 72'de iki yaygın polimorfik varyant tanımlanmıştır. Bu polimorfizmler 72. aminoasit pozisyonunda ya prolin (p53 Pro) yada argininin (p53 Arg) yer değişimi ile sonuçlanan tek bir nükleotid substitusyonlarından kaynaklanmaktadır. Arginin (Arg, CGC) büyük polar ve prolin (CCC) küçük polar aminoasit rezidüsüdür (98, 99). Bu nonkonservatif aminoasit değişimi p53'ün proline zengin bölgesinde bulunan PXXP (P: prolin, X; herhangi bir amino asit) SH3-binding motiflerinden biriyle ilgili olup, p53'ün biyokimyasal ve fonksiyonel özelliklerini etkiler. p53 Pro, güçlü bir transkripsiyonel aktivatördür ama apoptosizi indükleyici özelliği p53 Arg'den daha azdır. Arg 72 varyantlarının, Pro 72 varyantlarına göre 5 misli daha fazla apoptozisi indüklemektedir. Farklı epidomiyolojik çalışmalarda; adenokarsinom gelişim riski ve Pro/Pro genotipi varlığı arasında bir ilişki bulunmuştur. İlginç olarak Arg/Arg genotipi'de epidermoid karsinomlu bireylerde fazla oranda tespit edilmiştir. Pro/Pro genotipi hepatosellüler karsinomlarla da ilişkili bulunmuştur. Çünkü bu genotipin apoptotik özelliği azdır (44, 94, 100, 101).

### 3.2.4. KROMOZOM ANOMALİLERİ

#### 3.2.4.1. SAYISAL ANOMALİLER

Somatik hücreler diploid sayıda ( $2n = 46$ ) olgun gamet hücreleri ise haploid sayıda ( $n = 23$ ) kromozom içermektedir. Gametlerdeki haploid ( $n$ ) ve normal somatik hücrelerin diploid ( $2n$ ) kromozom sayısı öploidi örnekleridir. Öploidi ve anöploidi olmak üzere iki grubu vardır:

**1) Öploidi:** Hücrelerdeki kromozom sayısının ( $n = 23$ ) tam katı kadar artış veya azalmalardır.

**a) Triploidi:** Temel kromozom sayısının üç kat oranında artmasıdır ( $3n = 69$ ).

**b) Tetraploidi:** Temel kromozom sayısının dört kat oranında artmasıdır.

**c) Endoredüplikasyon:** Sitoplazma bölünmesinin gerçekleşmemesi nedeniyle kendi katı kadar artmış kromozomların ikişer kromatidli kromozom çiftleri halinde olmasıdır.

**d) Yüksek Poliploidiler:** Karyotipte  $4n$ 'den daha fazla kromozom bulunmasıdır.

**2) Anöploidi:** Temel kromozom sayısının katları kadar olmayan artma ya da eksilmelerdir. Anöploidi, poliploidiye göre daha sık ortaya çıkar ve kromozomal sendromların büyük bir bölümünde gözlenen düzensizliktir.

**a) Hiperploidi:**  $2n + 1$  ve  $2n + 2$  gibi kromozom sayısındaki artmalardır.

**b) Hipoploidi:**  $2n - 1$  ve  $2n - 2$  şeklindeki kromozom sayısındaki azalmalardır.

**c) Miksploidi ya da Mozaisizm:** Aynı zigottan kaynaklanan organizma ya da herhangi bir dokunun değişik hücrelerinde, değişik kromozom kuruluşuna rastlanması durumudur.

Anöploidi, insanlarda rastlanan kromozomal hastalıkların en yaygını ve en çok klinik önemi olan tipidir. Spontan düşük olgularında, anöploidi oranı % 70 - 75 olarak bildirilmektedir. Somatik hücre ve gametlerde hücre bölünmesi sırasındaki hatalar sonucu ortaya çıkan anöploidinin oluşumu başlıca iki mekanizma ile açıklanmaktadır. Bunlar;

- Nondisjunction (Ayrılamama) ve

- Anafaz laggingdir (Anafazda geri kalma).

**a) Nondisjunction:** Birinci veya ikinci mayotik bölünme sırasında iki ayrı hücreye gitmesi gereken bir kromozom çiftinin her iki üyesinin birbirinden ayrılmayıp birlikte bir tek hücreye gitmesi olayıdır. Böylece söz konusu kromozomdan, gametlerin birinde hiç bulunmazken diğer gamette normalde bir tane bulunması gereken kromozomdan iki tane bulunmaktadır. Bu hatalı gamet, söz konusu kromozomdan bir tane içeren karşı cinsteki normal gametle birleşince, oluşan zigotta bu kromozomdan iki yerine üç tane bulunmakta ve böyle bir hücreye de trizomik hücre adı verilmektedir. Bu kromozomu taşımayan diğer hatalı gamet ise normal olarak bu kromozomdan bir tane taşıyan karşı cinsten gamet ile birleşince oluşan zigotta iki yerine bir kromozom bulunmakta ve böyle bir hücreye ise monozomik hücre adı verilmektedir.

**b) Anafaz lagging:** Anafazda, kutuplara göç sırasında ortaya çıkan hata sonucu, kromozomlardan bir tanesi yeni oluşan yavru hücrenin dışında kalmakta veya öteki

grup ile birlikte diğer hücrelere gitmektedir. Geride kalan kromozom hiçbir hücreye gidmeden ortadan kaybolmuş ise, yeni oluşan iki hücreden biri normal, diğeri ise monozomik olmaktadır. Geride kalan kromozom diğer hücreye katılmış ise hücre trizomik olmaktadır.

### 3.2.4.2. YAPISAL ANOMALİLER

Yapısal anomalilerin esas mekanizması kromozomda oluşan kırılmalardır. In vitro çalışmalar, iyonize radyasyonun, viral enfeksiyonların ve mutajenik kimyasal ajanların kromozom kırıklarına neden olduklarını göstermiştir. Kırıklar, ender olarak kendiliğinden meydana gelmektedir. Kırıklar sonucu oluşan kromozomal yeni yapılarda, genetik bilgi ve materyalin normal içeriği korunmuş ise yapısal anomali dengeli olarak, genetik bilgide eksilme veya artma söz konusu ise dengesiz olarak tanımlanmaktadır.

**1) Yer Değiştirme (Translokasyon):** Kromozom materyalinin, kromozomlar arasındaki değişimidir. Her iki kromozomda kırıkların oluşması ve normalin dışında bir yeniden düzenleme ile tamir edilmesi ya da mayoz sırasında homolog olmayan kromozomlar arasındaki rekombinasyondan kaynaklanmaktadır. Bu değişimde genellikle DNA kaybı olmaz ve kişi klinik olarak normaldir (Dengeli Translokasyon).

**2) Artma (Duplikasyon):** Homolog olan ya da olmayan iki kromozomdan birinden kopan bir parçanın diğer kromozoma eklenmesidir.

**3) Eksilme (Delesyon):** Bir kırılma sonucu kromozomun küçük bir parçasının kopmasıdır.

**4) Gap (Aralık):** Kromozomun herhangi bir bölgesinde kromatidin enini geçmeyen, kromozom ekseninden hafif sapsmış, boya almayan bir bölgenin görülmesidir.

*a) Kromatid gap:* Gap'in kromozomun bir kromatidinde görülmesidir.

*b) İzokromatid gap:* Gap'in kromozomun her iki kromatidinde görülmesidir.

**5) Kırık:** Kromozomun herhangi bir bölgesinde, bir kromatid enini aşan ve kromozom ekseninden sapan boyanmamış bölgelere denir.

*a) Kromatid kırığı:* Kırık olarak değerlendirilen düzensizliğin kromozomun bir kromatidinde görülmesidir. Bir kromozomun iki kromatidinden yalnızca birinde

kırılma olur ve hücre bölünmesi sırasında anafazda kromatitlerin kutuplara çekilmesi sonucu oluşan yavru hücrelerden biri kusurlu kromozom bulundurur.

**b) İzokromatid kırık:** Kırık olarak belirtilen bozukluğun, kromozomun her iki kromatidinde ve eş kesimlerinde görülmesidir. Bu durumda hücre bölünmesi sırasında anafazda kromatitlerin kutuplara çekilmesi sonucu oluşan yavru hücrelerin her ikisi de kusurlu kromozom bulundurur.

**6) İki sentromerli kromozom (disentrik kromozom):** Kromozomda bir yerine iki sentromerin bulunmasıdır.

**7) Sentromersiz kromozom:** (asentrik kromozom, asentrik fragment) Birbirine paralel duran, sentromerleri görünmeyen ya da bulunmayan kromozomlardır.

**8) Minik kromozom (minute):** Sentromersiz kromozomlardan daha küçük kromatid çiftleridir. Görünüşlerinden dolayı kromozom ya da kromatin damlacığı olarak tanımlanırlar.

**9) Halka kromozom (yüzük, ring):** Kromozomun iki ucunun birleşerek yüzük görünümü oluşturmasıdır.

**10) Yapışkanlık:** Kromozomların yığın haline gelmesidir.

**11) Satellit assosiasyonu:** Büyük ve küçük akrosentrik kromozomların metafaz plaklarında beklenenden daha sık olmak üzere kısa kollarındaki uyduları birbirine çevirmiş biçimde bir araya gelerek rozet biçimi toplanmalarıdır.

**12) İri satellitler:** D ve G Grubu kromozomlardaki satellitlerin normalden büyük görülmeleridir.

**13) Sentromer bölünmesinde asenkroni:** Sentromerlerin aynı zamanda bölünmemesidir (102).

### 3.2.4.3. MİTOTİK İNDEKS

Mitotik indeks incelenen bir dokuya ait sayılan 1000 hücrede bölünen hücre sayısının yüzde olarak hesaplanmasıdır. Mitotik indeks değerleri hücrelerin mitozaya giriş hızını gösterir (103, 104).

### 3.3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmanın materyalini Dicle üniversitesi Tıp Fakültesi Gastroenteroloji Kliniğinde kronik aktif hepatit B tanısı konmuş olup, altı ay boyunca interferon alfa-2a veya interferon alfa-2b tedavisi uygulanacak olan hasta bireylerle, sağlıklı kişilerden oluşan ilaç kullanmamış kontrol bireyleri oluşturmuştur. Kronik aktif hepatit B tanısı konmuş 58 bireyden oluşan hasta grubu, uygulanacak interferon tedavisine göre iki gruba ayrıldı. Bunlardan grup A'ya (n=29); PEG IFN alfa-2a (Pegasys®, Roche, Basel, İsviçre) 180 mcg veya 135 mcg altı ay boyunca haftada 1 kez subkutan, grup B'ye ise (n=29) PEG-IFN alfa 2b (Pegintron®, Schering, Las Piedras Puerto Rico) 1.5 mcg/kg/hafta altı ay boyunca haftada 1 kez subkutan başlandı.

Çalışma kapsamındaki 58 kişiden oluşan her kronik aktif hepatit B hastası için birer pedigri oluşturuldu. Pedigri analizinde hastaların yaş, cinsiyet, sigara ve alkol kullanım kriterleri ele alındı. Yine hastaların yaş, cinsiyet, sigara ve alkol kullanım kriterleri ile uyumlu 30 sağlıklı bireyden oluşan bir kontrol grubu oluşturuldu. Çalışma için oluşturulan grupların özellikleri aşağıda belirtilmiştir;

**1. Hasta grubu:** interferon tedavisi uygulanacak olan 58 kronik aktif hepatit B hastası

-Grup A (interferon alfa-2a kullananlar); altı ay interferon alfa-2a tedavisi uygulanacak olan 29 kronik aktif hepatit B hastası (dört hasta tedavi sonrası kontrole gelmedi)

-Grup B (interferon alfa-2b kullananlar); altı ay interferon alfa-2b tedavisi uygulanacak olan 29 kronik aktif hepatit B hastası (dört hasta tedavi sonrası kontrole gelmedi)

**2. kontrol Grubu:** hasta grubunun yaş ve cinsiyet ortalamalarına, sigara ve alkol kullanım kriterlerine uygun 30 sağlıklı birey.

Çalışmaya Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulunun B.30.2.DİC.0.01.00.00/49 sayılı onayı alınarak başlandı.

### 3.3.1. SİTOGENETİK ANALİZLERDE KULLANILAN KİMYASAL MADDELER

- 1- Nutrient Mixture F-10 Ham (Sigma)
- 2- Fetal Calf Serum (Sigma)
- 3- Phytohemagglutinin M (Biological Industries)
- 4- Colcemid. 10 µg/ml (Biological Industries)
- 5- Penisilin –Streptomisin (Biological Industries)
- 6- L-Glutamine 10ml (Biological Industries)
- 7- KCl-Potassium chloride (Sigma)
- 8- Acetic Acid Glacial (Merck).
- 9- Methanol (Merck).
- 10- Xylol (Merck).
- 11- Giemsa Stain (Sigma).
- 12- Heparin (Liquemine, Roche).
- 13- Ethyl alcohol (Tekel)
- 14- Serum fizyolojik (Baxter)
- 15- Trypsin Certified 25gr 1:250 (Sigma)
- 16- Pancreatin 25gr (Sigma)
- 17- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Sigma).
- 18- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Sigma).
- 21- Distile su (sigma)
- 22- Ethidium Bromide 1gr (sigma)

### 3.3.2. SİTOGENETİK ANALİZLERDE KULLANILAN SOLÜSYONLAR

- b- Hipotonik Solüsyonu: 1000 ml Distile su + 5.6 gr KCL (0,075 M. KCL)
- c- Carnoy fiksatif : 3 kısım metanol + 1 kısım acetic acit glacial.
- d- Fitohemaglutinine solüsyonu: 5mg. Phytohemagglutinine M + 5 ml steril triple distile su.
- e- Periferik kanda kromozom analizi için kullanılan kültür ortamı içeriği :
 

- Nutrient Mixture F-10 Ham	100 ml
-Fitohemaglutinin M solüsyonu	1.5 ml

-L-Glutamine	1 ml
-Penisilin-Streptomisin	1 ml
-Fetal Calf Serumu	20 ml

f- Söransan tamponu:

a- 11.88 gr. Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> + 1000 ml distile su. (A)

b- 9.08 gr. KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + 1000 ml distile su. (B)

A ve B solüsyonları karıştırılarak pH=6.8'e ayarlanır.

g- Tripsin solüsyonu: ~50-100 mg Trypsin +100 ml serum fizyolojik (37 °C)

h- Pankreatin solüsyonu: ~50-100 mg Trypsin +100 ml serum fizyolojik (37 °C)

ı- Boya Solüsyonları:

-G Bantlama için: 95 ml Söransan tamponu + 5 ml Giemsa Stain

-Düz Boya için: 95 ml distile su + 5 ml Giemsa Stain

### 3.3.3. DİĞER GEREÇLER

a- Zaman Ayarlı Santrifüj (Hettich Universal II).

b- Etüv (Heraeus).

c- Kuru Hava Sterilizatörü (Kötterman).

d- Mikroskop (Olympus).

e- Ikaros Görüntüleme Sistemi

f- Elektronik Duyarlı Terazî (0,1 mg'a hassas Bosch).

g- Değişik Çapta Enjektörler ve Pipetler

h.-Bunsen bek

ı- Şaleler.

i- 15 ml'lik konik santrifüj tüpleri.

j- Mezürler.

k-Vorteks

l- Lam.

m- Plastik eldiven

n- Laboratuvar saati

o- Buzdolabı

p- Lancet



### 3.3.4 SİTOGENETİK YÖNTEM

#### 3.3.4.1. Kromozom preparatlarının Elde Edilmesi

Bu çalışmada kromozomların elde edilmesi için makrokültür tekniğinin modifiye edilmiş şekli olan ve “mikrokültür” ya da “tüm kan tekniği” olarak bilinen lenfosit doku kültürü yöntemi uygulanmıştır (102,105). Çalışmanın uygulama aşamaları sırayla aşağıdaki gibidir.

**1-**Steril koşullarda hazırlanmış ve buzdolabında muhafaza edilmiş olan stok kültür solüsyonu kullanılacağı zaman buzdolabından çıkarıldı ve her bir kültür tüpüne steril ortamda 5 ml aktarıldı.

**2-**Heparinlenmiş, steril enjektör ile hastadan alınan venöz kandan kültür tüplerine 6 damla kan eklendi ve tüpün ağzı alevden geçirilerek kapatıldı ve 72 saatlik inkübasyon için etüve bırakıldı.

**3-**68. Saat’ te kültüre 0.5 µl EtBr eklenerek inkübasyona devam edildi.

**4-**İnkübasyonun 71. saatinde kültüre iki damla (0.1 ml) colcemid eklendi ve tekrar etüve kondu.

**5-**72. Saatte etüvden çıkarılan kültür vortekslenildikten sonra 1200 rpm’de 10 dakika santrifüj edildi.

**6-**Süpernatant atıldıktan sonra pelet, vorteksle karıştırılarak üzerine 10 ml hipotonik solüsyonu eklendi ve 10 dakika etüvde bekletildi.

**7-**Tüpler 1200 rpm’de 10 dakika santrifüj edilip süpernatant atıldıktan sonra pelet, vorteks yardımıyla karıştırılarak üzerine pastör pipetiyle 10 ml fiksatif eklendi.

**8-**Fiksatifle yıkama işlemi 3 defa tekrarlandı.

**9-**Son santrifüj işleminden sonra tüplerde yaklaşık 0.5 cc pelet bırakıldı.

**10-**Dip materyal pipetle iyice karıştırılır. Alkolde bekletilip temizlenmiş lamlara yaklaşık 30 cm yükseklikten 2-3 damla damlatılarak yayıldı. Yayma esnasında odanın nem oranı, sıcaklığı son derece önemli olduğu için optimal şartlar sağlandı.

**11-**Kurumaya bırakılmış preparatlar 3 gün etüvde 37 °C’ de bekletilerek yaşlandırıldı.

### 3.3.4.2. Boyama Yöntemleri

#### a. Direk Boyama (Solid Staining):

1970'li yıllara kadar rutin olarak kullanılan bir yöntemdir. Bu tip boyama ile kromozomların büyük bir kısmını tanımlamak mümkün değildir. Günümüzde sadece sayısal analizler ile kromozom kırık noktaları, gap ve frajil bölgelerin varlığını saptamada kullanılır.

Yaşlanmış preparatlar, Giemsa ile (5 ml Giemsa stain stock solüsyon + .95 ml Distile su) 5 dakika boyandı, iki ayrı distile su şalesinden geçirilip yıkandı, kurutulup incelemeye alındı.

#### b. Giemsa Bantlama (G – Banding, GTG)

Sitogenetik laboratuvarlarında sıkça başvurulan ve tanımlamada kullanılan en yaygın yöntemdir. Her kromozom, kendine özgü açık ve koyu bant bölgeleri içerir. Bu bölgeler premetafaz ve metafaz kromozomlarında sayıca farklıdır. İlk defa Paris kongresinde (1971) idiogramlar belirlenmiş ve en son şekli 1995 ISCN'de yayınlanmıştır (106).

Preparatları bantlamak için pankreatin solüsyonu hazırlandı, 37 °C etüvde iki saat bekletilerek ısınması sağlandı. Önce bir preparat 5 - 10 saniye pancreatin solüsyonundan geçirildi daha sonra distile su ile yıkandı (Gerektiğinde bu süreler azaltılıp artırılabilir). Daha sonra preparat boya solüsyonunda 5 - 6 dakika bekletildikten sonra iki ayrı şaledeki distile su serisinden geçirilip yıkandı ve kurutuldu. 10 X'lik mikroskop objektifinde, kromozomların bant seviyesi tespit edilmiştir. Kromozomların tanımlanması ISCN 1995 idiogramlarına göre gerçekleştirildi (106).

### 3.3.4.3. Sitogenetik Değerlendirme

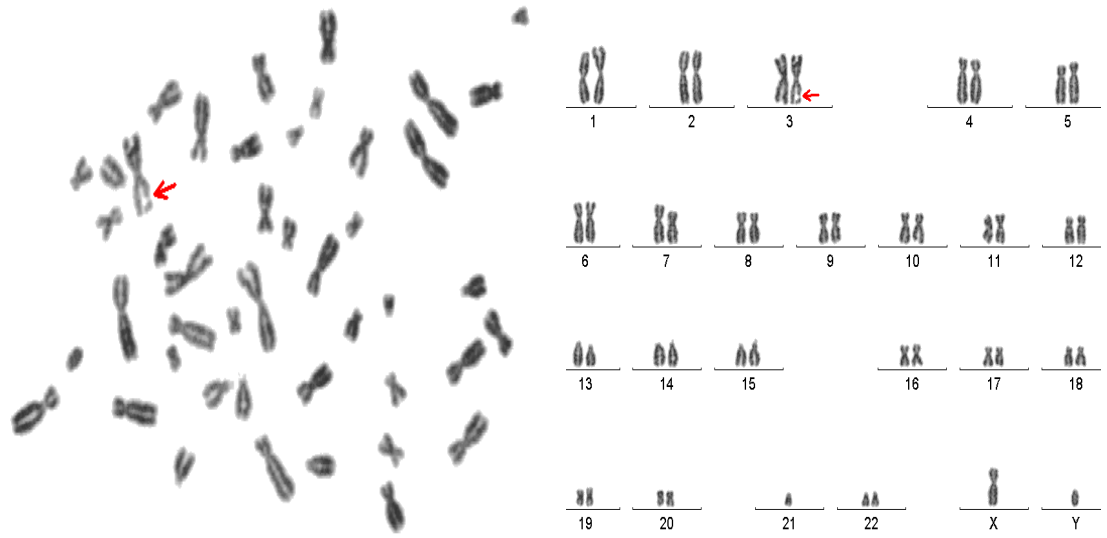
Üzerinde ait olduğu kişinin protokol ve preparat numarası yazılmış olan preparatlar, mikroskopta incelenmeye alınmıştır. Önce küçük büyütmele objektifle taranarak iyi nitelikli hücreler (metafaz plakları) önceden hazırlanmış bilgi işlem formuna yazılmıştır. Hücreler daha sonra immersiyon objektifi ile incelenerek şunlar yapılmıştır:

a. Her olgu için en az 20 hücreye ait metafaz plaklarındaki kromozomlar sayılarak (varsa yapısal düzensizlikleriyle birlikte) bilgi işlem formundaki özel bölümlere yazılmıştır.

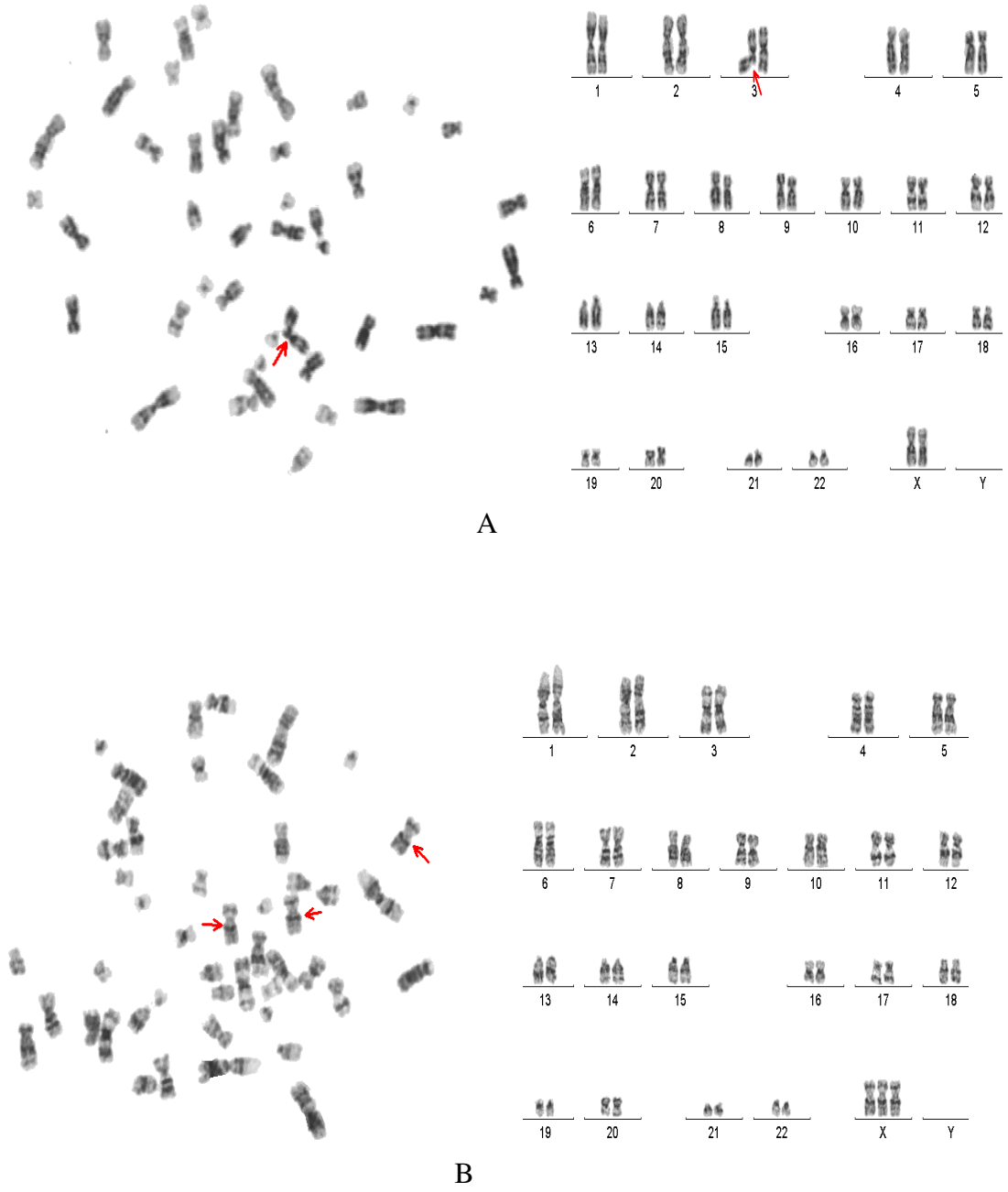
b. Mikroskop incelemesiyle ortaya çıkan bilgi işlem formundaki tablo değerlendirilmiş, sorunlu hücrelerin ve kromozom kusurlarının sayısına, tipine ve oranına bakılmıştır.

c. Karyotip yapılacak metafaz plakları kromozom analiz cihazında kameralı mikroskop aracılığı ile bilgisayar ortamına aktarılmış ve metafaz kromozomları tek tek ayrıştırılarak karyotip yapılmıştır.

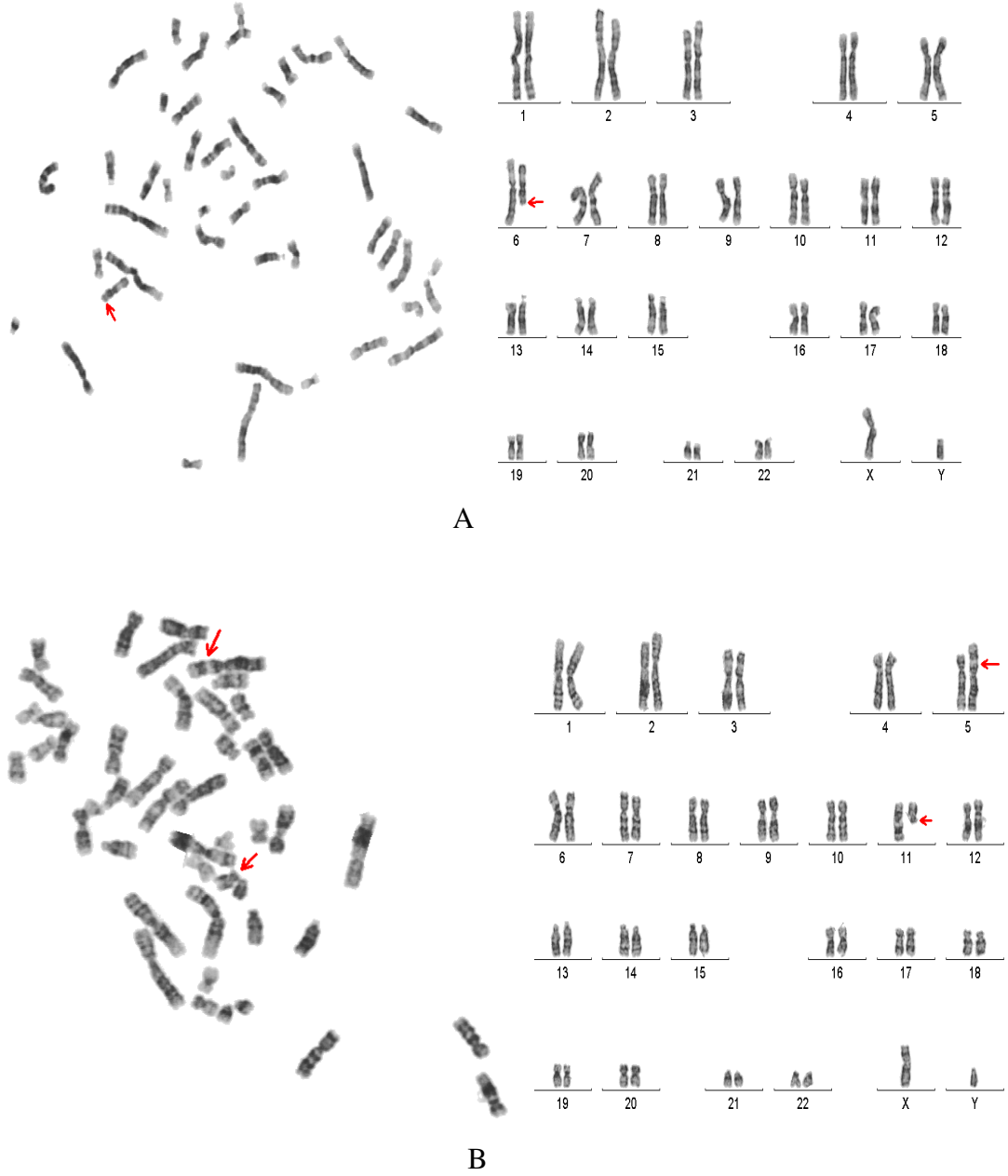
d. Karyotip, bir kez daha sayısal ve yapısal kromozom düzensizliği açısından değerlendirilmiş ve düzensizlik var ise hangi kromozomu tuttuğu saptanmaya çalışılmıştır. Çalışma gruplarında görülen kromozomal anomali türlerine ait örnek metafaz ve karyotip görüntüleri şekil 2, 3 ve 4'te gösterilmiştir.



**Şekil 2.** Çalışma gruplarında görülen kromozomal anomalilerden, 3 numaralı kromozomun uzun kolunda kromatid gap bulunan [(chtg(3)(q26)] metafaz ve bu metafaza ait karyotip.



**Şekil 3.** Çalışma gruplarında görülen kromozomal anomali türlerine ait metafaz ve karyotip görüntüleri: A) 3 numaralı kromozomda kromatid kırığı bulunan [chtb(3)(q21)] metafaz ve bu metafaza ait karyotip B) 47,XXX kromozom kuruluşuna sahip metafaz ve bu metafaza ait karyotip.



**Şekil 4.** Çalışma gruplarında görülen kromozomal anomali türlerine ait metafaz ve karyotip görüntüleri:

A) 6 numaralı kromozomun q kolunda görülen bir delesyona ait [46,XY,del(6)(pter→q21:)] metafaz ve karyotip.

B) 5 ve 11 numaralı kromozomlar arasında görülen dengeli translokayona ait [46,XY,der(5)(5qter→5p51::11q10→11qter),del(11)(pter→q10:)] metafaz ve karyotip

Mitotik indeks için kullanılacak olan preparatlar direk boyama (solid staining) yöntemi ile boyandı. Her örnek için 10X büyütme objektifinde iki preparat taranarak en az 1000 hücre sayıldı ve içerdikleri mitozlu hücrelerin sayısı ile birlikte, kromozom analiz formuna not edildi.

### **3.3.5. MOLEKÜLER GENETİK ANALİZLERDE KULLANILAN KİMYASAL MADDELER**

#### **3.3.5.1. DNA İzolasyon Tamponları :**

##### Liziz Tamponu (Reaktif A) pH 8.0

10 mM TRIS-HCL (Sigma)

320 mM Sucrose (Sigma)

5 mM MgCl<sub>2</sub> (Sigma)

Otoklav edilir

%1 Triton-X 100 (Sigma) eklenir, +4 °C' de saklanır.

##### Reaktif B pH 8.0

400 mM TRIS-HCL

60 mM EDTA (Sigma)

150 mM NaCl (Sigma)

Otoklav edilir

%1 SDS eklenir (Sigma), oda ısısında saklanır.

##### Sodium Perchlorate

5 M Sodium Perchlorate (MERCK)

Otoklav yapılmaz, oda ısısında saklanır.

#### **3.3.5.2. DNA Amplifikasyon Tamponları :**

##### 10x PCR Tamponu (MBI Fermentas)

750 mM tris-HCl (pH 8.8, 25 °C de)

200 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

%0.1 Tween 20

-20 °C' de saklanır.

Taq DNA Polimeraz Enzimi (MBI Fermentas) : -20 °C' de saklanır

dNTP Karışımı (pH 7.4)

2 mM dATP (Sigma)

2 mM dTTP (Sigma)

2 mM dCTP (Sigma)

2mM dGTP (Sigma)

-20°C' de saklanır.

Magnesium Chloride (MBI Fermentas) : 25mM, -20°C' de saklanır.

Amplifikasyon Primerleri : p53 geni 4.ekson primerleri;

**F: 5' ATC TAC AGT CCC CCT TGC CG 3'**

**R: 5' GCA ACT GAC CGT GCA AGT CA 3'** şeklindedir..

Formamide (Sigma) Oda ısısında saklanır.

Distile Su (Sigma): Oda ısısında saklanır.

Mineral Oil (Sigma): Oda ısısında saklanır.

### **3.3.5.3. Agaroz Jel Elektrophorez Tamponları :**

10 X TBE Elektrophorez Tamponu

90 mM Tris-Borate (Sigma)

10 mM Sodium-EDTA pH 8:3 (MERCK)

Otoklav edilir, oda ısısında saklanılır. 1X TBE ve 0.6 X TBE olarak kullanılır.

Etidium Bromür (Amresco) : 10 mg/ml konsantrasyonlu solüsyon, koyu renk bir şişede oda ısısında saklanır.

100 bp Moleküler Marker (Amresco): Baz çiftleri; 3000, 2000, 1500, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100. -20 °C' de saklanır.

### **3.3.5.4. Restriksiyon enzimi**

PCR ürününün ilgili bölgesinin kesimi için kullanılan *Bacillus sphaericus* bakterisinden elde edilen Bsh1236I (Fermentas Life Science) restriksiyon endonükleaz enzimi (10units/mikrolitre total 2500u) alındı. Bu enzimin kesme sekansları;

5' ...CG CG...3'

3' ...GC GC...5'

### 3.3.6. MOLEKÜLER GENETİK ANALİZLERDE KULLANILAN GEREÇLER

- a- Mikrosantrifüj
- b- Elektronik hassas terazi
- c- pH metre
- d- Hız ayarlı vorteks
- e- 37 °C'ye ve 65 °C'ye ayarlanabilecek su banyosu
- f- Etüv
- g- Enjektörler
- h- Pipetler
- i- Elektroforez aparatı
- j- Electrophoresis box
- k- Termal cyclers (Techne Cyclogene)
- l- UV lambası ve ilgili fotoğraflama ünitesi
- m- Steril 1.5 ml, 0.5 ml ve 0.2 ml'lik Eppendorf santrifüj tüpleri.

### 3.3.7. MOLEKÜLER GENETİK YÖNTEM

#### 3.3.7.1. Periferik Kandan DNA İzolasyon Yöntemi

Hücre Preperasyonu : 5-10 ml kan, sodyum-EDTA' lı tüplere alındı. Santrifüj 4°C için ön soğutmaya hazırlandı. 50 ml'lik polypropylene santrifüj tüplerine kan örnekleri aktarıldı ve üzerine 40 ml lizis tamponu (Reaktif A) eklendi. Elle hafifçe iki dakikalık bir süre için karıştırıldı. 4°C ye ayarlanmış santrifüjde 3000 rpm' de 10 dakika santrifüj edildi. Hücrelere zarar vermeden süpernatant döküldü.

Hücre Lizisi: Tüplere 2 ml Reaktif B eklendi ve hafifçe karıştırılarak hücre çökeltilerinin karışması sağlandı. Bu süspansiyon 15 ml'lik kapaklı polypropylen tüplerine aktarıldı.

Deproteinizasyon : Her bir tüpe 5M' lık Sodyum Perklorat' tan 500 µl eklendi. Tüpler kan döndürme (rotary mix) cihazına kondu ve oda ısısında 15 dakika karışması sağlandı. Daha sonra 65 °C' lik sıcak blokta 30 dakika inkübe edildi.



DNA Ekstraksiyonu : Her bir tüpe daha önceden  $-20^{\circ}\text{C}$ ' de bulunan Kloroform' den 2ml eklendi. 10 dakika oda sıcaklığında rotary mix'e konarak karışması sağlandı ve  $1400 \times g$ 'de 10 dakika santrifüj edildi.

DNA Presipitasyonu : DNA içeren faz (üstteki berrak tabaka) plastik pastör pipetleri kullanılarak 15 ml' lik yeni bir santrifüj tüpüne aktarıldı. DNA içeren volümün iki katı kadar soğuk etanol (önceden soğutulmuş) ilave edildi ve hafifçe karıştırılarak DNA' nın presipite olması sağlandı. Plastik öze yardımı ile presipite olan DNA alındı ve 3-5 dakika dışarda bekletilerek kuruması beklendi. Daha sonra DNA'nın bulunduğu plastik öze kesilerek 1.5 ml' lik ependorf tüplerine aktarıldı ve üzerine 200  $\mu\text{l}$  distile su konuldu.

### 3.3.7.2. PCR'da Kullanılan Primer Dizileri

Literatür bilgileri ışığında p53 ekzon 4'ü (kodon 72 polimorfizmi için) amplifiye etmek için gerekli olan primerler alındı (18). PCR deneylerinde kullanılacak olan oligonükleotidler, insan DNA'sı üzerindeki ilgili gen bölgesinin amplifikasyonunu gerçekleştirmek için kullanıldı. Satın alınan primerlerin nükleotid sekansı ve orijini aşağıda belirtilmiştir;

**F: 5' ATC TAC AGT CCC CCT TGC CG 3'**

**R: 5' GCA ACT GAC CGT GCA AGT CA 3'**

### 3.3.7.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile DNA Amplifikasyonu

PCR, DNA üzerinde incelenmesi istenen bölgenin oligonükleotid primerler kullanılarak çoğaltılması esasına dayanır. Bu yöntem ısı ile DNA molekülünün çift zincirinin birbirinden ayrılması (denatürasyon), primerlerin ayrılmış olan DNA zincirine bağlanması (annealing) ve DNA polimeraz enzimi tarafından hedef bölgenin sentezlenmesi (extension) olarak üç asamadan oluşur. Bu aşamaların 35-40 döngü halinde tekrarlanması sonucunda, incelenmek istenen DNA bölgesi çoğaltılmış olur. Çalışmada PCR için uygulanan protokol tablo 1'de belirtilmiştir.

**Tablo 1.** PCR reaksiyon protokolü

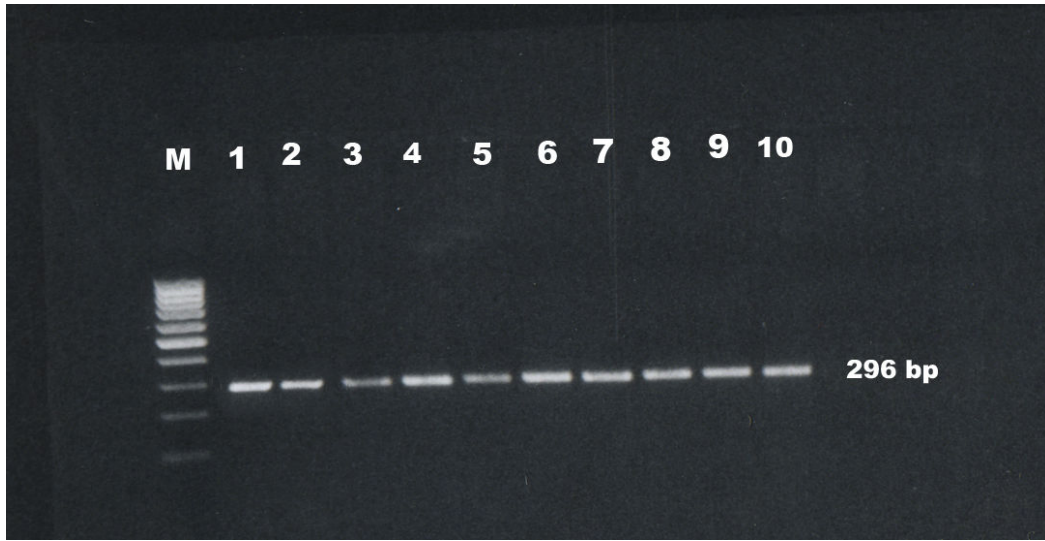
Stok:	Final volüm 50 µl:
10XPCR Buffer	5 µl
dNTP Mix (2 mM)	5 µl
Primer F	0,5 µl
Primer R	0,5 µl
MgCl <sub>2</sub>	2 µl
<i>Taq</i> DNA Polimeraz 5U/µl	0,5 µl
Distile su	33.5 µl
Genomik DNA	3 µl

Reaksiyonu buharlaşmadan korumak için tüplere alınmış PCR karışımının üzerine ince bir tabaka şeklinde mineral oil kondu ve DNA bu yağ tabakasını geçecek şekilde PCR karışımına en son eklendi. Ayrıca her PCR karışımında kontaminasyon riskini değerlendirmek için DNA konulmamış bir negatif kontrol hazırlandı. Yapılan PCR işlemlerinin hiç birinde herhangi bir kontaminasyona rastlanmadı. P53 ekson 4'ün amplifikasyonu için yukarıdaki şekilde PCR reaksiyon protokolü hazırlandı ve otomatik bir Thermal Cycler (Techne Cyclogene) kullanılarak aşağıda belirtilen PCR şartlarında amplifikasyon gerçekleştirildi (tablo-2).

**Tablo 2.** PCR şartları

PCR şartları:	
94 °C 4 dak.	1 döngü
94 °C 40 sn	35 döngü
56 °C 30 sn	
72 °C 30 sn.	
72 °C 10 dak	1 döngü

p53 kodon 72 polimorfizmi için uygulanan PCR'a ait amplifikasyon ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüleri şekil 5'te gösterilmiştir.



**Şekil 5:** p53 kodon 72 polimorfizmi için uygulanan PCR'a ait amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel görüntüleri. (M:100bp marker DNA, 1-10: 296 bp'lik amplifikasyon bantları)

#### 3.3.7.4. Agaroz Jel Elektroforezi:

Amplifikasyonu yapılan PCR ürünleri %2'lik Agaroz jelde, enzimle kesilmiş polimorfik bölgeler ise %3'lik Agaroz jelde değerlendirilmiştir.

##### Agaroz Jelin Hazırlanması :

- %3'lük Agaroz jel : 3 gr. Agaroz 100ml 1 X TBE (pH 8.3) tamponunda çözüldü.
- %2'lik Agaroz jel : 2 gr. Agaroz 100ml 1 X TBE (pH 8.3) tamponunda çözüldü.

Agaroz jel 1XTBE tamponunda kaynatılarak hazırlandı ve daha sonra 60-65 °C' ye kadar soğutuldu. Düz bir zemin üzerinde dengeli olması sağlanarak bırakılmış plak üzerine taraklar yerleştirildi ve jel bu plağa bir kerede döküldü. Oda ısısında 15-20 dakika donması için beklendi.

Jeldeki tarağı dikkatli bir şekilde çıkarılan plak, 1XTBE tamponu içeren elektroforez tankına yerleştirildi. 8 µl PCR ürününü, 2 µl jel yükleme tamponu ile karıştırılarak sıra ile jel üzerindeki kuyucuklara aplikasyon yapıldı. Agaroz jel bu tampon içerisinde yaklaşık olarak 45-60 dakika 90 voltta yürütüldü. Ethidium bromide ile boyanan jel, UV transillüminatör üzerinde izlenerek değerlendirildi ve daha sonra fotoğrafları çekildi.

Doğru bir değerlendirme yapılabilmesi için jelin ilk kuyucuğuna DNA size marker (boyutu bilinen işaret DNA'lar) yüklendi.

### 3.3.7.5. PCR-RFLP Analizi

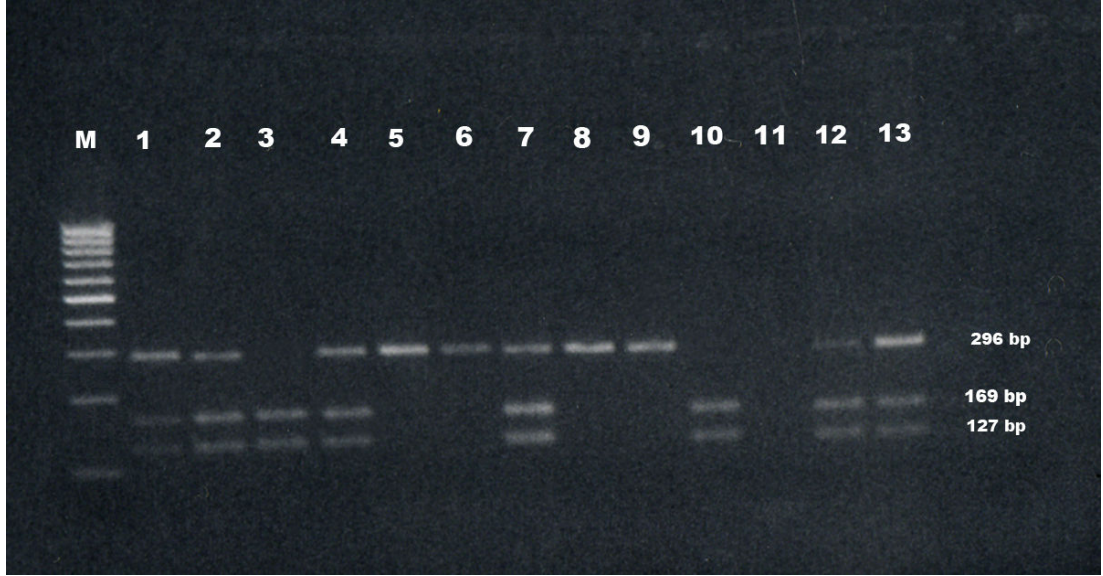
Bu çalışmada p53 geni 4. ekzondaki kodon 72 polimorfizmini belirlemek üzere Bsh1236I enzimi kullanılarak RFLP analizi yapıldı (44). Bu amaçla, çalışmaya dahil edilen hasta ve kontrol gruplarının amplifikasyon ürünleri Bsh1236I restriksiyon enzimi ile 37 °C'de 16 saatlik kesime tabi tutuldu. Bu işlem için 10X olan enzim, buffer'ı ile 2X olacak şekilde dilüe edildikten sonra kullanıldı. Elde edilen bu dilüe enzimin 2µl'si 8µl'lik amplifikasyon ürününe eklendi. İnkübasyon sıcaklığı ve süresi, restriksiyon enziminin satın alındığı firmanın önerisine göre ayarlandı. İnkübasyon süresi bittiğinde enzim aktivitesini sonlandırmak için örnekler 5 dakika -20°C'de tutuldu. Kesimi yapılan ürünler elektroforez işlemine kadar +4 °C'de bekletildi.

p53 geni 4. ekzondaki kodon 72 polimorfizminde beklenen fragmentler;

- CGC (arjinin) bölge varlığında kesim gerçekleşir, 169 ve 127 bp uzunluğunda fragmentler oluşur.
- CGC (arjinin) bölge yokluğunda, yani Prolin (CCC) varlığında ise kesim gerçekleşmez ve 296 bp uzunluğunda fragmentler oluşur.
- Heterozigotluk durumunda ise CGC/CCC (Prolin/Arjinin), üç çeşit fragment bir arada görülür (18). p53 kodon 72 polimorfizmine ait amplifikasyon ürünlerinin Bsh1236I restriksiyon enzimi ile kesim sonuçlarının agaroz jel elektroforezindeki görüntüleri Şekil-6 da gösterilmiştir.

### 3.3.7.6. Kesim Ürünlerinin Elektroforezi ve Fotoğrafların Elde Edilmesi

Bsh1236I enzimi ile inkübasyona bırakılmış olan örnekler %3'lük agaroz jel elektroforezine tabi tutuldu. 100 voltluk elektriksel alanda 40dk.'lık yürütme işleminden sonra Jel UV ışığı altında polaroid kamera ile fotoğraflandı ve gözlenen bantlar değerlendirildi.



**Şekil 6:** p53 kodon 72 polimorfizmine ait amplifikasyon ürünlerinin Bsh1236I restriksiyon enzimi ile kesim sonuçlarının agaroz jel elektroforezindeki görüntüleri. Homozigot prolin: 296bp'lik tek bant, Homozigot arjinin: 169 ve 127 bp'lik çift bant, Heterozigot arjinin/prolin 296,169 ve 127bp'lik üç bant görülür.(M: 100bp marker DNA, 5,6,8 ve 9; homozigot prolin, 3 ve 10; homozigot arjinin, 1,2,4,7,12 ve 13 heterozigot arjinin/prolin, 11; amplifikasyon ürünü negatif).

### 3.3.8. İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME

Gruplar arasındaki ortalamaların karşılaştırılmasında Student's t testi kullanıldı. Hasta ve kontroller arasındaki genotip dağılımlarındaki farklılıkların belirlenmesi Ki-kare testi ile yapıldı. Gruplar arasındaki parametrelerin karşılaştırılması için, One-Way-Anova, Kruskal-Wallis ve Student's t uygulandı. P değerinin <0.05 olması istatistiksel açıdan anlamlı olarak kabul edildi (107).

### 3.4. BULGULAR

Üzerinde istatistiksel analizler yapılan kronik aktif hepatit B'li hasta bireylerin sayısı 58, kontrol bireylerinin sayısı ise 30'dur. Kronik aktif hepatit B'li hastalar uygulanan ilaca göre; interferon alfa-2a kullananlar (grup A; n=29) ve interferon alfa-2b kullananlar (Grup B; n=29) olmak üzere iki gruba ayrılmıştır. Hastalar, kromozomal anomali ve mitotik indeks yönünden, interferon alfa tedavisi öncesi ve altı aylık tedavi sonrası olmak üzere ikişer kez incelemeye alınmışlardır. Sekiz hasta ise tedavi uygulamasına devam etmediğinden veya tedavi sonrası bize başvurmadığından, ikinci defa kromozomal anomali ve mitotik indeks yönünden değerlendirilememiştir. P53 geni kodon 72 polimorfizmi için ise; bütün hastalar ve kontrol bireyleri tedavi öncesinde değerlendirilmişlerdir. Hepatit B'li hasta ve kontrol bireylerinden oluşan toplam 88 bireyin gruplara göre dağılımı tablo-3'te gösterilmiştir.

**Tablo 3.** Hepatit B'li hasta ve kontrol bireylerinden oluşan toplam 88 bireyin gruplara göre dağılımı.

İlaç	Sitogenetik			P53 geni
	İnterferon	Tedavi öncesi	Tedavi sonrası	Tedavi öncesi
Hepatit B'li hasta	Alfa-2a	29	25	58
	Alfa-2b	29	25	
Toplam Hasta		58	50	58
Kontrol		30	-	30

Kronik aktif hepatit B'li 58 hastadan 38'inin erkek 20'sinin kadın olduğu, Kontrol bireylerinin ise 18'inin erkek 12'sinin de kadın olduğu belirlendi. Hasta grubunun yaş ortalaması  $35,03 \pm 13,76$  kontrol grubunun ise  $36,23 \pm 13,55$  olarak hesaplandı. Söz konusu iki grubun yaşları arasında istatistiksel yönden anlamlı bir fark görülmedi ( $P>0,05$ ). Çalışma grubunun demografik özellikleri tablo 4'te gösterilmiştir.

**Tablo 4.** Çalışma Grubunun Demografik Özellikleri

	Hasta	Kontrol	Toplam	P
Cinsiyet	n (%)	n (%)	n (%)	
Erkek	38 (65,5)	18 (60)	56 (125,5)	>0,05
Kadın	20 (34,5)	12 (40)	42 (74,5)	
Yaş	35,03 ± 13,76	36,23 ± 13,55	35,44 ± 13,62	>0,05

Kronik aktif hepatit B'li hastalar, interferon alfa-2a veya interferon alfa-2b tedavisinden birine başlamadan önce ve altı aylık tedaviden sonra, mitotik indeks yönünden değerlendirildi. İnterferon alfa-2a kullanan hasta grubunun, tedavi öncesi ve tedavi sonrası mitotik indeks ortalamaları arasında eşleştirilmiş Student's t testi sonucunda istatistiksel yönden herhangi bir fark tespit edilmedi ( $P>0,05$ ). Benzer şekilde interferon alfa-2b kullanan hastaların, tedavi öncesi ve tedavi sonrası mitotik indeks ortalamaları arasında istatistiksel yönden herhangi bir fark görülmedi ( $P>0,05$ ). İnterferon alfa tedavisi alan hastalar, alt grupları dikkate alınmadan birlikte değerlendirildiğinde de tedavi öncesi ve tedavi sonrası mitotik indeks ortalamaları arasında istatistiksel yönden herhangi bir fark görülmedi ( $P>0,05$ ). İnterferon alfa tedavisi uygulanan kronik aktif hepatit B'li hastaların tedavi öncesi ve tedavi sonrası mitotik indeks değerleri tablo-5'te gösterilmiştir.

**Tablo 5.** İnterferon alfa tedavisi uygulanan hastalarda, tedavi öncesi ve tedavi sonrası mitotik indeks

	Mitotik indeks			P
	İnterferon	Tedavi Öncesi	Tedavi Sonrası	
HepatitB'li hastalar	Alfa-2a	1,96 ± 0,98	2,01 ± 0,91	$P>0,05$
	Alfa-2b	2,14 ± 0,94	2,00 ± 0,63	$P>0,05$
	Toplam (interferon alfa)	1,989±0,93	2,01±0,77	$P>0,05$

interferon alfa-2a ve interferon alfa-2b tedavisine başlanmadan önce ve altı aylık tedavi sonrasında hepatit B'li hasta grubu, kromozomal anomali yönünden

değerlendirildi. İnterferon alfa-2a kullanan hasta grubunda, tedavi öncesi ve tedavi sonrası kromozomal anomali ortalamaları arasında, uygulanan eşleştirilmiş Student's t testi sonucunda istatistiksel yönden herhangi bir fark tespit edilmedi ( $P>0,05$ ). Benzer şekilde interferon alfa-2b kullanan hasta grubunda, tedavi öncesi ve tedavi sonrası kromozomal anomali ortalamaları arasında, uygulanan eşleştirilmiş Student's t testi sonucunda istatistiksel yönden herhangi bir fark tespit edilmedi ( $P>0,05$ ). İnterferon alfa tedavisi alan hastalar alt grupları dikkate alınmadan birlikte değerlendirildiğinde de tedavi öncesi ve tedavi sonrası kromozomal anomali ortalamaları arasında istatistiksel yönden herhangi bir fark görülmedi ( $P>0,05$ ). İnterferon alfa tedavisi uygulanan kronik aktif hepatit B'li hastaların tedavi öncesi ve tedavi sonrası kromozomal anomali değerleri tablo 6. da gösterilmiştir.

**Tablo 6.** İnterferon alfa tedavisi uygulanan kronik aktif hepatit B'li hastaların tedavi öncesi ve tedavi sonrası kromozomal anomali değerleri

	Kromozomal anomali			P
	İnterferon	Tedavi öncesi	Tedavi sonrası	
Hepatit B'li hastalar	Alfa-2a	1,8 ± 1,65	2 ± 1,89	$P>0,05$
	Alfa-2b	3 ± 2,46	3,2 ± 3,06	$P>0,05$
	Toplam (interferon alfa)	2,4 ± 2,26	2,6 ± 2,41	$P>0,05$

Yukarıdaki Tabol-5 ve Tabol-6 daki veriler birlikte değerlendirildiğinde, kronik aktif hepatit B'li hastalarda, interferon alfa-2a veya interferon alfa-2b tedavisinin mitotik indeks ve kromozomal anomali üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığı görülmektedir.

Kronik aktif hepatit B'li 58 hastada Tedavi öncesi görülen mitotik indeks ve kromozomal anomali ortalamaları ile 30 sağlıklı bireyden oluşan kontrol grubunun ortalamalarını karşılaştırmak amacıyla, iki bağımsız grubu karşılaştıran student's t testi uygulandı. Mitotik indeksin hasta grubunda, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı oranda düşük olduğu saptandı ( $p<0,05$ ). Bunun aksine kromozomal anomali ortalamasının hasta grubunda kontrol grubuna oranla istatistiksel olarak anlamlı oranda yüksek olduğu saptandı ( $p<0,05$ ). Kromozomal anomali ve mitotik



indeks yönünden tedavi öncesi kronik aktif hepatit B'li hastalarla kontrol grubunun ortalamaları Tablo-7'de gösterilmiştir.

**Tablo 7.** Kromozomal anomali ve mitotik indeks yönünden tedavi öncesi hasta grubu ve kontrol grubunun karşılaştırılması

	Tedavi öncesi hepatit B'li hasta grubu	Kontrol grubu	P
Mitotik indeks	1,989±0,93	3,15 ± 1,29	P < 0,05
Kromozomal anomali	2,4 ± 2,26	0,83 ± 0,68	P < 0,05

P53 kodon 72 polimorfizminin kronik aktif hepatit B'li hasta grubu ve sağlıklı bireylerden oluşan kontrol grubundaki dağılımı tablo-8'de gösterilmiştir. Buna göre kronik aktif hepatit B'li hasta grubunda homozigot arjinin (Arg/Arg) genotipi 7 bireyde (%12), heterozigot Arjinin/Prolin (Arg/Pro) genotipi 38 bireyde (%66) ve homozigot prolin (Pro/Pro) genotipi 13 bireyde (%22) olarak tespit edilmiştir. Kontrol grubu genotipler açısından incelendiğinde; homozigot arjinin (Arg/Arg) genotipi 7 bireyde (%23), heterozigot Arjinin/Prolin (Arg/Pro) genotipi 20 bireyde (%66) ve homozigot prolin (Pro/Pro) genotipi 3 bireyde (%10) olarak tespit edilmiştir.

**Tablo 8.** P53 kodon 72 polimorfizminin hepatit B'li hasta ve kontrol grubundaki genotip dağılımı

	Genotip			$\chi^2$	P
	Arg/Arg % (n)	Arg/Pro (%)	Pro/Pro (%)		
Hepatit	7 (12)	38 (66)	13 (22)	3,26	>0,05
Kontrol	7 (23)	20 (66)	3 (10)		

Tablo 8'den de anlaşılacağı gibi, hasta grubunda homozigot prolin genotipinin kontrol grubundan daha sık olduğu, homozigot arjinin genotipinin daha seyrek olduğu, heterozigot sıklığının ise değişmediği görülmüştür. Burada p53 kodon 72 polimorfizmindeki homozigot prolin (Pro/pro) genotipinin hasta grubunda kontrol grubuna göre daha sık görülmesi çok dikkat çekicidir. Ancak yapılan istatistiksel

değerlendirmede hasta ve kontrol gruplarının genotip dağılımlarındaki fark anlamlı bulunmamıştır ( $p>0,05$ ).

Homozigot prolin (Pro/Pro) genotipine sahip kronik aktif HBV'li hasta ve kontrol bireylerinde görülen kromozomal anomali ve mitotik indeks ortalamaları ile diğer genotiplere (Arg/Pro ve Arg/Arg) sahip kronik aktif HBV'li hasta ve kontrol bireylerinde görülen kromozomal anomali ve mitotik indeks ortalamaları Tablo-9'da karşılaştırılmıştır. Buna göre hem hasta hem de kontrol gruplarında homozigot prolin genotipine sahip bireylerde görülen kromozomal anomali oranı, diğer genotiplere (Arg/Pro ve Arg/Arg) sahip bireylerde görülen kromozomal anomali oranından istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek çıkmıştır ( $p<0,05$ ). Mitotik indeks bakımından ise istatistiksel olarak herhangi bir fark olmadığı saptanmıştır ( $P>0,05$ ).

**Tablo 9.** Homozigot prolin genotipine sahip hasta ve kontrol bireyleri ile diğer genotiplere (Arg/Pro ve Arg/Arg) sahip hasta ve kontrol bireylerinde görülen mitotik indeks ve kromozomal anomali ilişkisi

		Kromozomal anomali			Mitotik indeks		
	Genotip	n	Ortalama ( $\bar{X}\pm SD$ )	P	n	Ortalama ( $\bar{X}\pm SD$ )	P
Hasta	Pro/Pro	13	3,65 ± 2,84	<0,05	13	1,81±0,61	>0,05
	Diğer(Arg/pro ve Arg/Arg)	45	1,66 ± 1,43		45	2,01 ± 0,65	
Kontrol	Pro/Pro	3	2,66 ±2,30	<0,05	3	3,41 ± 1,61	>0,05
	Diğer(Arg/pro ve Arg/Arg)	27	0,44 ± 0,31		27	3,12 ± 1,28	

P53 geni kodon 72 polimorfizmi yönünden homozigot prolin genotipi oranının, kontrol grubunda düşük çıkmasına karşın hasta grubunda yüksek çıkması ve bu genotipe sahip bireylerde kromozomal anomali oranının yüksek olması, kronik aktif hepatit B' ye yakalanmada bu varyantın bir risk faktörü olarak değerlendirilebileceği sonucunu doğurmuştur. Daha hacimli çalışmalarla bu sonuçların desteklenmesine gereksinim vardır.

### 3.5. TARTIŞMA

HBV'nin karaciğer ve kan hücreleri başta olmak üzere, vücut hücreleri üzerinde genotoksik ve apoptotik etkiye sahip olduğu ve artan kromozomal hasarlara yol açtığı bazı çalışmalarla ortaya konmuştur (9, 10, 12, 15, 108).

Chen ve ark. karaciğer kanserli hücre serileri ile yaptıkları kontrollü bir çalışmada, kromozomal değişikliklerle HBV integrasyonu arasında anlamlı bir ilişki olduğunu ortaya koymuşlardır (109).

Virstiuk N.G., kronik viral hepatitli olgularda yüksek FAS/APO1 (CD95) ekspresyonu ile tümör nekroz faktör alfanın (TNF alfa) serum düzeyleri arasında saptadığı ilişkiye dayanarak; kronik viral hepatitin patogeneğinde apoptozisin de yer aldığını ileri sürmüştür (110).

Simon ve ark. kronik hepatit B taşıyıcılarının periferal kan lenfositlerinde yaptıkları bir çalışmada, sağlıklı bireylere oranla yüksek oranda kromozom kırıkları ve mitotik düzensizlik tespit etmişlerdir (10).

Ucur ve ark. sirozlu ve taşıyıcı HBV ve HCV'li hastaların periferal lenfositlerinde mitotik indeks ve kardeş kromatid değişimini inceledikleri bir çalışmada ise yüksek oranda kardeş kromatid değişimi ve düşük oranda mitotik indeks tespit etmişlerdir. Bunun HBV ve HCV'nin direk genotoksik etkisinin sonucu olduğunu ve bu genotoksitenin karaciğeri etkileyip, hepato sellüler karsinomun oluşumuna katkısının olabileceğini ileri sürmüşlerdir (12).

Özbakkaloğlu ve ark. kronik hepatit B taşıyıcılarında mitotik indeks ve kardeş kromatid değişimi yönünden yaptıkları araştırmada; kontrol grubuna göre taşıyıcılarda düşük oranda mitotik indeks ve yüksek oranda kardeş kromatid değişimi tespit etmişlerdir (111).

Özkal ve ark. hepatit B'li hasta ve kontrol gruplarının periferal kan lenfositleri üzerinde yaptıkları çalışmada kontrol grubuna göre HBV'li hasta ve taşıyıcılarda yüksek oranda kromozom kırıkları saptamışlardır (9).

Bu çalışmamızda kronik aktif hepatit B'li hastaların lenfosit kültürlerinde tedavi öncesi görülen kromozomal anomali ortalamasının kontrol grubuna oranla istatistiksel olarak anlamlı oranda yüksek olduğunu saptadık ( $P<0.05$ ). Bu sonuç Özkal ve ark. ile Simon ve ark.'larının elde ettiği sonuçlarla uyumluluk

göstermektedir. Mitotik indeksin ise hasta grubunda, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli oranda düşük olduğunu belirledik ( $P<0.05$ ). Bu sonuçlarımız da Uçur ve ark. ile Özbakkaloğlu ve ark.'nın elde ettiği sonuçlarla uyumluluk göstermekte olup, HBV'nin genotoksik ve apoptotik etkisini teyit etmektedir.

Literatürde interferon tedavisi sırasında kromozom anomalisi ve sekonder malignite geliştiğini bildiren çalışmalar olmakla birlikte, interferonların kanser oluşumunu engelleyen anti tümör etkileri olduğuna dair çalışmalar da mevcuttur (52-57, 112, 113).

Higano ve ark. kemik iliği transplantasyonu sonrasında kronik miyeloid lösemili hastalarda sitogenetik olarak oluşan yeniden nüksetmelerde, interferon alfa-2a kullanarak, hayati tehlike oluşturacak bir toksisite oluşturmadan büyük oranda kalıcı iyileşme sağlamışlardır (54).

Bolzan ve ark. rekombinant interferon alfa-2a'nın; bleomisin ile indüklenmiş kromozomal düzensizliklerin oluşumunu engelleme yönünde, güçlü bir inhibitör etkisi olduğunu tespit etmişlerdir (114).

Mertens ve ark. amniotik sıvı hücrelerinde yaptıkları in vitro çalışmada, rekombinant interferon alfa ve beta'nın doza bağlı olarak kardeş kromatid değişiminde azalmaya yol açtığını saptamışlardır (19).

Hamburger ve ark. İnsan kolon kanseri hücrelerinin mitojenle uyarılmış çoğalmalarının interferon tarafından inhibe edildiğini göstermişlerdir (115).

Jasny ve ark. ise hint geyiği hücrelerinde interferon muamelesi sonucu doz konsantrasyonu ile orantılı olarak kromozom gap ve kırıkları sayısında artış saptamışlardır (116).

Georgian ve ark. Normal hücreler ve tümör hücrelerinde hücre bölünmesi üzerine insan alfa interferonunun in vitro etkisini incelemişler ve hücre bölünmesi üzerinde dozla ilişkili olarak belirgin inhibe edici etki gözlemişlerdir (117).

Öztürk ve ark. periferik kan lenfositlerinden elde edilen kromozomlar üzerinde mitotik indeks, sitogenetik anomali ve kardeş kromatid değişimi bakımından interferon alfa-2a'nın in vitro etkisini araştırmışlar ve interferon alfa-2a'nın artan konsantrasyonlarında mitotik indekste azalma tespit etmişler, buna

karşılık sitogenetik anomali ve kardeş kromatid değişimi üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığını göstermişlerdir (52).

Çalışmamızda ise kronik aktif hepatit B'li hastalarda interferon alfa-2a ve interferon alfa-2b tedavisine başlanmadan önce ve altı aylık tedavi süreci sonrasında mitotik indeks ve kromozomal anomali yönünden yaptığımız inceleme sonucunda istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ( $P>0.05$ ). İnterferon alfa tedavisi alan hastalar, birlikte değerlendirildiğinde de tedavi öncesi ve tedavi sonrası mitotik indeks ve kromozomal anomali ortalamaları arasında istatistiksel yönden herhangi bir fark görülmedi ( $P>0,05$ ). Kromozomal anomali yönünden aldığımız bu sonuç Jasny ve ark.'larının sonuçları ile uyumlu olmayıp Öztürk ve ark.larının sonucu ile uyumluluk göstermiştir. Mitotik indekste anlamlı bir değişikliğin görülmemesi ise Öztürk ve ark.larının aldıkları sonuçlarla uyumsuzdur. Bu sonucumuz hastalara uygulanmış olan altı aylık interferon alfa-2a veya interferon alfa-2b konsantrasyonlarının tolere edilebilir sınırlar içinde kaldığını ve sitotoksik etkiye yol açmadığını göstermektedir.

Kronik HBV enfeksiyonları HCC'nin en önemli etkenlerinden biridir. Yapılan çalışmalarda, birçok kanser türünde olduğu gibi HCC'li hatalardaki tümörlü karaciğer dokularında da p53 geninde delesyon mutasyon ve polimorfizmler tespit edilmiştir (16-19).

En önemli p53 polimorfizmi prolin (72Pro: CCC) veya arjinini (72Arg: CGC) kodlayan ekson 4 kodon 72'deki restriksiyon parça uzunluk polimorfizmidir (118). Bu polimorfizm 72. aminoasit pozisyonunda ya prolin (p53 Pro) yada argininin (p53 Arg) yer değişimi ile sonuçlanan tek bir nükleotid substitusyonlarından kaynaklanmaktadır. Bu nonkonservatif aminoasit değişimi p53'ün prolince zengin bölgesinde bulunan PXXP SH3-bağlanan motiflerinden biriyle ilgili olup, p53'ün biyokimyasal ve fonksiyonel özelliklerini etkiler. p53 Pro, güçlü bir transkripsiyonel aktivatördür ama apoptosizi indükleyici özelliği p53 Arg'den daha azdır. Arg 72 varyantları, Pro 72 varyantlarına göre 5 misli daha fazla apoptozisi indüklemektedir (94). Kodon 72 polimorfizmi ile birçok kanser türü arasında ilişki olduğunu bildiren çalışmalar mevcuttur (33-39). HCC'li hastalarda yapılan çalışmalarda normal popülasyonlara ve kontrol gruplarına oranla yüksek sıklıkta kodon 72 Pro varyantı bildirilmiştir (46-49).

Ezzikouri ve ark. Fas populasyonunda kodon 72 polimorfizmi yönünden yaptıkları çalışmada; HCC'li hastalarda kontrol grubuna oranla yüksek sıklıkta homozigot prolin (Pro/Pro) tespit etmiş ve bunun karaciğer kanserinin gelişme riskini 2.3 kat artırdığı sonucuna varmışlardır (46).

Keza Zhu ve ark. Çin populasyonunda kodon 72 pro alleli ile HCC'li hastalar arasındaki anlamlı ilişkiye dayanarak, kodon 72 Pro/Pro homozigotluğunun HCC için, potansiyel genetik risk faktörlerinin başında yer aldığını belirtmiş ve bu polimorfizmin yüksek HCC riski taşıyan bireylerin taramasında belirleyici bir markır olarak kullanılabileceğini belirtmişlerdir (119).

Yine Zhu ve ark. HBV'li hastalar üzerinde yaptıkları başka bir çalışmada, kronik HBV enfeksiyonlu hastalardaki HCC riski ile p53 kodon 72 polimorfizmi arasında bir ilişki olmadığını bildirmişlerdir. Bununla birlikte bu çalışma HBV ile enfekte olmuş hastalardaki HCC riski ile kodon 72 polimorfizminin ilişkili olduğunu göstermiş; özellikle de homozigot prolin allelinin artmış HCC riski ile ilişkili olduğunu belirtmiştir (120).

Yoon ve ark. kronik HBV enfeksiyonu olan hastalarda, HCC'li olanlar ile olmayanları iki gruba ayırarak MDM2 SNP 309 ve p53 Arg72Pro polimorfizmleri açısından inceledikleri bir çalışmada; MDM2 G/G ve P53 Pro/Pro genotiplerinin HCC'li olmayan gruba göre HCC'li grupta anlamlı derecede yüksek olduğunu tespit etmişlerdir. Buna dayanarak Kore'li kronik HBV enfeksiyonu olan hastalarda HCC'ni erken gelişmesi ile MDM2 SNP 309 ve p53 Arg72Pro arasında anlamlı bir ilişki olduğunu ileri sürmüşlerdir (121).

Çalışmamızda 58 hepatit B'li kronik aktif HBV'li hasta ve 30 sağlıklı kontrol bireyde p53 codon 72 polimorfizmini PCR-RFLP yöntemi ile inceledik. Kontrol grubuna oranla hasta grubunda homozigot prolin genotipinin daha sık olduğunu, homozigot arjinin genotipinin daha seyrek olduğunu, heterozigot sıklığının ise değişmediğini tespit ettik. Burada p53 kodon 72 polimorfizmindeki homozigot prolin (Pro/pro) genotipinin hasta grubunda kontrol grubuna göre daha sık görülmesi çok dikkat çekicidir. Ancak yapılan istatistiksel değerlendirmede hasta ve kontrol gruplarının genotip dağılımlarındaki fark anlamlı bulunmamıştır ( $p>0,05$ ). Bu durumu araştırma populasyonunun küçüklüğüne bağladık. Bu amaçla da çalışılan örnek sayısını artırmayı planladık. Hasta grubunda homozigot prolin genotip

sıklığında tespit ettiğimiz bu artış, Zhu ve ark.'larının, kronik HBV enfeksiyonlu hastalardaki HCC riski ile p53 kodon 72 polimorfizmi arasında bir ilişki olmadığını bildirdikleri çalışma grubu ile uyumlu görünmezken, HBV ile enfekte olmuş kronik olmayan hasta grubunun sonuçları ile uyumlu görünmektedir. Aynı şekilde Ezzikouri ve ark. ile Zhu ve ark. larının HCC vakaları üzerinde yayınlamış oldukları çalışmalarında uyumluluk göstermektedir. Yine bu sonuçlarımız Yoon ve ark.'larının HBV enfeksiyonu olan hastalarda HCC'nin erken gelişmesi ile MDM2 SNP 309 ve p53 Arg72Pro arasında anlamlı bir ilişki olduğunu ileri sürdüğü çalışması ile de uyumluluk göstermektedir. Bu durum; HBV'li hastalardaki p53 proteininin kodon 72 yönünden homozigot proline sahip olması durumunda, HBX proteininin baskılayıcı etkisine daha kolay bir hedef haline gelmesi ve böylece HCC oluşumuna zemin hazırlaması ile açıklanabilir.

Gerek HBV'li hastalarda gerekse sağlıklı popülasyonlarda HCC'nin gelişme riski ile ilişkili olduğu düşünülen homozigot prolin genotipine sahip kronik aktif hepatit B'li hasta ve kontrol bireylerinin lenfosit kültürlerindeki kromozomal anomali oranını, diğer genotiplere (Arg/Pro ve Arg/Arg) sahip kronik aktif hepatit B'li hasta ve kontrol bireylerinin lenfosit kültürlerindeki kromozomal anomali oranından istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek tespit ettik ( $p < 0,05$ ). Mitotik indeks bakımından ise istatistiksel olarak herhangi bir fark olmadığını saptadık ( $P > 0,05$ ). Bu sonuçlar hem kronik aktif hepatit B'li hastalarda hem de sağlıklı bireylerde homozigot prolin genotipinin diğer genotiplere oranla daha fazla kromozomal anomaliye yol açtığını akla getirmektedir. Daha hacimli çalışmalarla bu sonuçların desteklenmesine gereksinim vardır.

### 3.6. SONUÇ

1. İnterferon alfa-2a ve interferon alfa-2b uygulanan kronik aktif hepatit B'li hastalarda, tedavi öncesi ve tedavi sonrası mitotik indeks ortalamaları arasında istatistiksel yönden herhangi bir fark tespit edilmedi ( $P>0,05$ ).
2. İnterferon alfa tedavisi alan kronik aktif hepatit B'li hastalar bütün olarak birlikte değerlendirildiğinde de, tedavi öncesi ve tedavi sonrası mitotik indeks ortalamalarında istatistiksel olarak herhangi bir fark görülmedi ( $P>0,05$ ).
3. İnterferon alfa-2a ve interferon alfa-2b kullanan kronik aktif hepatit B'li hastalarda, tedavi öncesi ve tedavi sonrası kromozomal anomali bakımından, istatistiksel olarak herhangi bir fark tespit edilmedi ( $P>0,05$ ).
4. İnterferon alfa tedavisi alan kronik aktif hepatit B'li hastalar bütün olarak birlikte değerlendirildiğinde de, tedavi öncesi ve tedavi sonrası görülen kromozomal anomali oranlarında istatistiksel olarak herhangi bir fark saptanmadı ( $P>0,05$ ).
5. kronik aktif hepatit B'li hastalarda tedavi öncesi görülen mitotik indeks ortalamalarının, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı oranda düşük olduğu saptandı ( $p<0,05$ ).
6. Kronik aktif hepatit B'li hastalarda tedavi öncesi görülen kromozomal anomali ortalamasının kontrol grubuna oranla istatistiksel olarak anlamlı oranda yüksek olduğu saptandı ( $p<0,05$ ).
7. p53 codon 72 polimorfizminde kontrol grubuna oranla kronik aktif hepatit B'li hastalarda homozigot prolin genotipinin daha sık, homozigot arjinin genotipinin daha seyrek, heterozigot sıklığının ise farklı olmadığı tespit edildi. Ancak yapılan istatistiksel değerlendirmede hasta ve kontrol gruplarının genotip dağılımlarındaki fark anlamlı bulunmamıştır ( $p>0,05$ ). Bu durum araştırma popülasyonunun küçüklüğüne bağlanmıştır.
8. Homozigot prolin genotipine sahip kronik aktif hepatit B'li hasta ve kontrol bireylerinin lenfosit kültürlerinde görülen mitotik indeks ortalamaları ile diğer genotiplere (Arg/Pro ve Arg/Arg) sahip kronik aktif hepatit B'li hasta ve kontrol bireylerinin lenfosit kültürlerinde görülen mitotik indeks ortalamaları arasında istatistiksel olarak herhangi bir fark tespit edilmedi ( $p>0,05$ ).
9. Homozigot prolin genotipine sahip kronik aktif hepatit B'li hasta ve kontrol bireylerinin lenfosit kültürlerindeki kromozomal anomali oranının, diğer genotiplere



sahip (Arg/Pro ve Arg/Arg) kronik aktif hepatit B'li hasta ve kontrol bireylerinin kromozomal anomali oranından istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu tespit edildi ( $p<0,05$ ).

P53 geni kodon 72 polimorfizmi yönünden homozigot prolin genotipi oranının, kontrol grubunda düşük çıkmasına karşın hasta grubunda yüksek çıkması ve bu genotipe sahip bireylerde kromozomal anomali oranının yüksek olması, kronik aktif hepatit B' ye yakalanmada bu varyantın bir risk faktörü olarak değerlendirilebileceği sonucunu doğurmuştur.

#### 4. KAYNAKLAR

- 1- He YL, Zhao YR, Zhang SL, Lin SM. Host susceptibility to persistent hepatitis B virus infection. *World J Gastroenterol.* 2006 Aug 14;12(30):4788-93.
- 2- Balık İ. Hepatit B Epidemiyolojisi. 2. Viral Hepatit Sempozyumu Kitabı. Ankara, Nobel Tıp Kitabevi, 1994: 91-101.
- 3- Tabak F. Viral Hepatitlerin Epidemiyolojisi. Günümüzde Virüs Hepatitleri. İstanbul.1996: 21-30.
- 4- Taşyaran M. HBV İnfeksiyonu Epidemiyolojisi. Viral Hepatit. Tekeli E, Balık İ (Editörler). İstanbul, Viral Hepatitle Savaşım Derneği Yayınları, 2003: 121- 128.
- 5- Frodsham AJ. Host genetics and the outcome of hepatitis B viral infection. *Transpl Immunol* 2005; 14: 183-186
- 6- Schaefer S. Hepatitis B virus: significance of genotypes. *J Viral Hepat* 2005; 12: 111-124.
- 7- Levy,L., Renard,C., Wei,Y. and Buendia,M. (2002) Genetic alterations and oncogenic pathways in hepatocellular carcinoma. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 963, 21–36
- 8- Chatterjee,B. and Ghosh,P.K. (1989) Constructive heterochromatin polymorphism and chromosome damage in viral hepatitis. *Mutat. Res.*, 210, 49–57
- 9- Ozkal P, Ilgin-Ruhi H, Akdogan M, Elhan A.H., Kaçar S, Sasmaz N. The genotoxic effects of hepatitis B virus to host DNA. *Mutagenesis.* 2005 Mar;20(2):147-50.
- 10- Simon D, London T, Hann H.W. L, and Barbara B. Chromosome Abnormalities in Peripheral Blood Cells of Hepatitis B Virus Chronic Carriers' *Cancer Research* 51. 6179-6179. November 15. 1991.
- 11- Bariliak IR, Frolov VM, Pinskiĭ LL, Topol'nitskiĭ VS. Cytogenetic disorders iin patients with chronic hepatitis B and C . *Tsitol Genet.* 2000 Jul-Aug;34(4):3-5.
- 12- Ucur A, Palanduz S, Cefle K, Ozturk S, Tutkan G, Vatansever S, Erden S, Karan MA, Erten N, Guler K, Tascioglu C. Sister chromatid exchange and mitotic index in patients with cirrhosis related to hepatitis B and C viruses and in chronic carriers. *Hepatogastroenterology.* 2003 Nov-Dec;50(54):2137-40
- 13- Ryazantseva NV, Novitskii VV, Zhukova OB, Radzivil TT, Mikheev SL, Chechina OE, Zima AP, Shilov BV. Dysregulation of apoptotic death in the pathogenesis of virus-induced cytogenetic instability of blood lymphocytes. *Bull Exp Biol Med.* 2006 May;141(5):606-9.
- 14- Nakamura K, Yuh K, Sugyo S, Shijo H, Kimura N, Okumura M. Apoptosis observed in peripheral T lymphocytes from patients with chronic hepatitis B. *Gastroenterology.* 1996 Jul;111(1):156-64

- 15- 9(15)- Huang,J., Huang,T., Qui,H., Fang,X., Zhuang,T., Liu,H., Wang,Y., Deng,L. and Oiu,J. (2003) Effects of hepatitis B virus infection on human sperm chromosomes. *World J. Gastroenterol.*, **9**, 736–740.
- 16- Livezey KW, Negorev D, Simon D. Increased chromosomal alterations and micronuclei formation in human hepatoma HepG2 cells transfected with the hepatitis B virus HBX gene. *Mutat Res.* 2002 Aug 29;505(1-2):63-74.
- 17- Yu MW, Yang SY, Chiu YH, Chiang YC, Liaw YF, Chen CJ. A p53 genetic polymorphism as a modulator of hepatocellular carcinoma risk in relation to chronic liver disease, familial tendency, and cigarette smoking in hepatitis B carriers. *Hepatology.* 1999 Mar;29(3):697-702.
- 18- Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, Harris CC. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res* 1994; 54: 4855-4878
- 19- Teramoto T, Satonaka K, Kitazawa S, Fujimori T, Hayashi K, Maeda S. p53 gene abnormalities are closely related to hepatoviral infections and occur at a late stage of hepatocarcinogenesis. *Cancer Res* 1994; 54: 231-235
- 20- Fujimoto Y, Hampton LL, Wirth PJ, Wang NJ, Xie JP, Thorgeirsson SS. Alterations of tumor suppressor genes and allelic losses in human hepatocellular carcinomas in China. *Cancer Res* 1994; 54: 281-285
- 21- Lin J, Zhu MH, Zhu S, Qu JH, Li FM, Ni CR. The role of hepatitis B virus X gene and p53 on hepatocellular carcinoma cell growth *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi.* 2003 Feb;32(1):43-7
- 22- Seok Geun Lee<sup>1</sup> and Hyune Mo Rho. Transcriptional repression of the human p53 gene by hepatitis B viral X protein. *Oncogene* (2000) 19, 468 -471
- 23- Hsu IC, Metcalf RA, Sun T, Welsh JA, Wang NJ, Harris CC. Mutational hotspot in the p53 gene in human hepatocellular carcinomas. *Nature.* 1991 Apr 4;350(6317):427-8
- 24- Aguilar F, Harris CC, Sun T, Hollstein M, Cerutti P. Geographic variation of p53 mutational profile in nonmalignant human liver. *Science.* 1994 May 27;264(5163):1317-9
- 25- Li J, Liu Y, Dai JZ, Xu DP, Zhang LX. Transcriptional inhibitory effect of hepatitis B virus X protein on the expression of p53 tumor suppression gene. *Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi.* 2006 Mar;20(1):26-9
- 26- Ori A, Zauberman A, Doitsh G, Paran N, Oren M, Shaul Y. p53 binds and represses the HBV enhancer: an adjacent enhancer element can reverse the transcription effect of p53. *EMBO J.* 1998 Jan 15;17(2):544-53
- 27- Walker KK, Levine AJ. Identification of a novel p53 functional domain that is necessary for efficient growth suppression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 15335–40.
- 28- Venot C, Maratrat M, Dureuil C et al. The requirement for the p53 proline-rich functional domain for mediation of apoptosis is correlated with specific PIG3 gene transactivation and with transcriptional repression. *EMBO J* 1998; 17: 4668–79.

- 29- Matlashewski GJ, Tuck S, Pim D et al. Primary structure polymorphism at amino acid residue 72 of human p53. *Mol Cell Biol* 1987; 7: 961–3
- 30- de la Calle-Martin O, Fabregat V, Romero M et al. AccII polymorphism of the p53 gene. *Nucleic Acids Res* 1990; 18: 4963.
- 31- Thomas M, Kalita A, Labrecque S et al. Two polymorphic variants of wild-type p53 differ biochemically and biologically. *Mol Cell Biol* 1999; 19: 1092–100.
- 32- Dumont P, Leu JI, Della Pietra AC. 3rd et al. The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential. *Nat Genet* 2003; 33: 357–65
- 33- C.E. Irarrazabal, C. Rojas, R. Aracena, C. Marquez and L. Gil, Chilean pilot study on the risk of lung cancer associated with codon 72 polymorphism in the gene of protein p53, *Toxicol. Lett.* 144 (2003), pp. 69–76.
- 34- T. Hiyama, S. Tanaka, Y. Kitadai, M. Ito, M. Sumii and M. Yoshihara *et al.*, p53 Codon 72 polymorphism in gastric cancer susceptibility in patients with Helicobacter pylori-associated chronic gastritis, *Int. J. Cancer* 100 (2002), pp. 304–308.
- 35- A. Sjalander, R. Birgander, G. Hallmans, S. Cajander, P. Lenner and L. Athlin *et al.*, p53 polymorphisms and haplotypes in breast cancer, *Carcinogenesis* 17 (1996), pp. 1313–1316.
- 36- M.H. Tsai, C.D. Lin, Y.Y. Hsieh, F.C. Chang, F.J. Tsai, W.C. Chen and C.H. Tsai, Prognostic significance of the proline form of p53 codon 72 polymorphism in nasopharyngeal carcinoma, *Laryngoscope* 112 (2002), pp. 116–119.
- 37- Y. Kuroda, H. Tsukino, H. Nakao, H. Imai and T. Katoh, p53 Codon 72 polymorphism and urothelial cancer risk, *Cancer Lett.* 189 (2003), pp. 77–83.
- 38- K. Suzuki, H. Matsui, N. Ohtake, S. Nakata, T. Takei and H. Nakazato *et al.*, A p53 codon 72 polymorphism associated with prostate cancer development and progression in Japanese, *J. Biomed. Sci.* 10 (2003), pp. 430–435.
- 39- Y.C. Chen, L. Xu, Y.L. Guo, H.J. Su, Y.M. Hsueh and T.J. Smith *et al.*, Genetic polymorphism in p53 codon 72 and skin cancer in southwestern Taiwan, *J. Environ. Sci. Health Part A Tox. Hazard Subst. Environ. Eng.* 38 (2003), pp. 201–211.
- 40- L.M. Pierce, L. Sivaraman, W. Chang, A. Lum, T. Donlon and A. Seifried *et al.*, Relationships of TP53 codon 72 and HRAS1 polymorphisms with lung cancer risk in an ethnically diverse population, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 9 (2000), pp. 1199–1204.
- 41- M.T. Wu, M.C. Chen and D.C. Wu, Influences of lifestyle habits and p53 codon 72 and p21 codon 31 polymorphisms on gastric cancer risk in Taiwan, *Cancer Lett.* 205 (2004), pp. 61–68
- 42- E.N. Papadakis, D.N. Dokianakis and D.A. Spandidos, p53 codon 72 polymorphism as a risk factor in the development of breast cancer, *Mol. Cell Biol. Res. Commun.* 3 (2000), pp. 389–392

- 43- G.A. Toruner, A. Ucar, M. Tez, M. Cetinkaya, H. Ozen and T. Ozcelik, P53 codon 72 polymorphism in bladder cancer—no evidence of association with increased risk or invasiveness, *Urol. Res.* 29 (2001), pp. 393–395.
- 44- S.P. Huang, W.J. Wu, W.S. Chang, M.T. Wu, Y.Y. Chen and Y.J. Chen *et al.*, p53 Codon 72 and p21 codon 31 polymorphisms in prostate cancer, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 13 (2004), pp. 2217–2224.
- 45- D.P. O'Connor, E.W. Kay, M. Leader, G.J. Atkins, G.M. Murphy and M.J. Mabruk, p53 codon 72 polymorphism and human papillomavirus associated skin cancer, *J. Clin. Pathol.* 54 (2001), pp. 539–542.
- 46- Ezzikouri S, El Feydi AE, Chafik A, Benazzouz M, El Kihal L, Afifi R, Hassar M, Pineau P, Benjelloun S. The Pro variant of the p53 codon 72 polymorphism is associated with hepatocellular carcinoma in Moroccan population. *Hepatol Res.* 2007 Sep;37(9):748-54. Epub 2007 Jun 15
- 47- Zhu ZZ, Cong WM, Zhu GS, Liu SF, Xian ZH, Wu WQ, Zhang XZ, Wang YH, Wu MC. Association of p53 codon 72 polymorphism with genetic susceptibility to hepatocellular carcinoma in Chinese population. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi.* 2005 Dec;22(6):632-5.
- 48- Anzola M, Cuevas N, López-Martínez M, Saiz A, Burgos JJ, de Pancorbo MM. Frequent loss of p53 codon 72 Pro variant in hepatitis C virus-positive carriers with hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett.* 2003 Apr 25;193(2):199-205.
- 49- Yoon YJ, Chang HY, Ahn SH, Kim JK, Park YK, Kang DR, Park JY, Myoung SM, Kim do Y, Chon CY, Han KH. MDM2 and p53 polymorphisms are associated with the development of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Carcinogenesis.* 2008 Jun;29(6):1192-6. Epub 2008 Apr 4.
- 50- Zhu ZZ, Cong WM, Liu SF, Dong H, Zhu GS, Wu MC. Homozygosity for Pro of p53 Arg72Pro as a potential risk factor for hepatocellular carcinoma in Chinese population *World J Gastroenterol.* 2005 Jan 14;11(2):289-92.
- 51- Kanber Y., Kalaycı A.G., Yıldırım H., Kronik B Hepatitli Çocuklarda İnterferon tedavisinin Hematolojik yan Etkileri. *O.M.Ü. Tıp Dergisi* 19(3): 168-173. 2002
- 52- Dincer D. Demir K. Kaymakoğlu S. Et all. Kronik Viral Hepatit Tedavisinde İnterferonun Hematolojik Parametrelere Etkisi. *Viral Hepatit Dergisi* 2000: 3: 172-174. in Kanber Y., Kalaycı A.G., Yıldırım H., Kronik B Hepatitli Çocuklarda İnterferon tedavisinin Hematolojik yan Etkileri. *O.M.Ü. Tıp Dergisi* 19(3): 168-173. 2002
- 53- Raffaele I. Paqualina P. Salvatore B. et al. Side effect of alfa –interferon therapy and impact on health-related quality pf life in children with chronic viral hepatitis. *Pediatr Infect Dis J.* 1997; 16: 984-990 in Kanber Y., Kalaycı A.G., Yıldırım H., Kronik B Hepatitli Çocuklarda İnterferon tedavisinin Hematolojik yan Etkileri. *O.M.Ü. Tıp Dergisi* 19(3): 168-173. 2002
- 54- Öztürk Ş., Palandüz Ş., Karan M.A., ve ark. İnterferon alfa 2a'nın insan kromozomları üzerine in vitro etkisinin araştırılması. *İst Tıp Fak. Dergisi* 1998 cilt 61, Sayı 1, Sayfa(lar) 029-033

- 55- Branford S, Hughes T, Milner A, Koelmeyer R, Schwarzer A, Arthur C, Filshie R, Moreton S, Lynch K, Taylor K. Efficacy and safety of imatinib in patients with chronic myeloid leukemia and complete or near-complete cytogenetic response to interferon-alpha. *Cancer*. 2007 Aug 15;110(4):801-8.
- 56- Higano CS, Chielens D, Raskind W, Bryant E, Flowers ME, Radich J, Clift R, Appelbaum F. Use of alpha-2a-interferon to treat cytogenetic relapse of chronic myeloid leukemia after marrow transplantation. *Blood*. 1997 Oct 1;90(7):2549-54.
- 57- Deininger MW. Cytogenetic studies in patients on imatinib. *Semin Hematol*. 2003 Apr;40(2 Suppl 2):50-5.
- 58- Baisch H, Otto U, Klöppel G. Antiproliferative and cytotoxic effects of single and combined treatment with tumor necrosis factor alpha and/or alpha interferon on a human renal cell carcinoma xenotransplanted into nu/nu mice: cell kinetic studies. *Cancer Res*. 1990 Oct 1;50(19):6389-95
- 59- Sancéau J, Poupon MF, Delattre O, Sastre-Garau X, Wietzerbin J. Strong inhibition of Ewing tumor xenograft growth by combination of human interferon-alpha or interferon-beta with ifosfamide. *Oncogene*. 2002 Oct 31;21(50):7700-9.
- 60- Kont A. Çocukluk çağı kronik hepatit B hastalığının klinik seyir ve tedavisi ile serum CD 95 (FAS) ve nitrik oksid düzeyleri arasındaki ilişkinin belirlenmesi Tıpta Uzmanlık Tezi. Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı 2007.
- 61- Leblebicioğlu H. Hepatit B virusu mikrobiyolojisi, patogenez, epidemiyoloji klinik, tedavi ve korunma. *Modern tıp seminerleri*. Usluer G (Editör). Ankara Güneş Kitabevleri, 2002: 16-23.
- 62- Kıyan M. Hepatit B Virusü. *Viral Hepatit*. Tekeli E, Balık İ. İstanbul, Viral Hepatitle Savaşım Derneği yayınları, 2003: 86- 120.(58 den)
- 63- Yenen OŞ. *Viral Hepatitler. Enfeksiyon Hastalıkları*. Topçu AW (Editör) İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri, 1996: 664-690. (58 den)
- 64- Cherry JD, Nielsen K, Vargas J. Hepatitis B and D. In: Feigin RD, Cherry JD (Eds). *Textbook of Pediatric infectious diseases (4 th Edition)*. Toronto, WB Saunders Company, 1998; 162: 1685-1698. (58 den)
- 65- Will H. HBcAg and HBeAg expression, how, where, why or why no?. *J Hepatol*. 1991; 13: 66-67. (58 den).
- 66- Brunell PA. Hepatitis. In: Berman R, Kliegman RM, Nelson WE, Vaughan VC (Eds). *Nelson Textbook of Paediatrics*. London, WB Saunders Company, 1996; 818-822. (58 den)
- 67- Karaoğlan M: Kronik Hepatit B Enfeksiyonu Olan Çocuklarda Çeşitli Tedavi Yöntemleri ve İmmün Yanıtla İlgisi. Uzmanlık tezi, Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi, Gaziantep. 2000. (58 den)
- 68- Kanra G, Cengiz BA. Hepatit B virüs enfeksiyonu. *Katkı Pediatri Dergisi*. 1998: 19: 594-609. (58 den)

- 69- Kandemir Ö: Kronik Hepatit B’de interferon tedavisinin etkinliği. Uzmanlık tezi, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Adana. 1998. (58 den)
- 70- Robinson WS. Hepadnaviridea. In: Mandell G (Eds). Principles and Practice of Infectious Disease. New York, Churchill Livingstone company, 1995: 1406-1437.
- 71- Balık İ. Kronik Hepatit B’nin Seyri ve İnterferon Tedavisi. Viral Hepatit. Tekeli E, Balık İ (Editörler). İstanbul, Viral Hepatitle Savaşım Derneği yayınları, 2003: 135-155.
- 72- Durhan E. Kolon kanseri tanılı olgularda PCR-RFLP metodu ile p53 gen mutasyonlarının saptanması. Yüksek Lisans Tezi Afyon Kocatepe Üniversitesi · Fen Bilimleri Enstitüsü. 2006
- 73- Linzer, D. I., Maltzman, W, Levine, A.J., 1979, “The SV40 A gene is required for the production of a 54,000 MW cellular tumor antigen”, Virology, Vol. 98, pp.308.
- 74- Baker, S. J., Fearon, E.R., Nigro, J.M., Hamilton, S.R., Preisinger, A.C., Jessup, J.M., VanTuinen, P, Ledbetter, D.H., Barker, D.F., Nakamura, Y., 1989, “Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas”, Science, Vol. 244, pp. 217.
- 75- Hainaut, P., Soussi, T., Shomer, B., Holstein, M., Greenblatt, M., Hoving, E., Harris, C., C., and Montesano, R :, 1997, “atabase of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines: updated compilation and future prospects”, Nucleic Acids Research, October, Vol. 25, pp. 151-157.
- 76- Özgöz A. Mesane kanseri tanılı olgularda p53 geni mutasyon analizi. Yüksek Lisans Tezi Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. 2005.
- 77- Smith ND, Rubenstein JN, Eggener SE, Kozlowski JM. The p53 tumor suppressor gene and nuclear protein: basic science review and relevance in the management of bladder cancer. J Urol. 2003 Apr;169(4):1219-28.
- 78- Prokocimer M, Rotter V. Structure and function of p53 in normal cells and their aberrations in cancer cells: projection on the hematologic cell lineages. Blood. 1994 Oct 15;84(8):2391-411.
- 79- [http://p53.free.fr/p53\\_info/gene/p53GENE](http://p53.free.fr/p53_info/gene/p53GENE) 17.01.2009
- 80- Vousden KH, Lu X. Live or let die: the cell's response to p53. Nat Rev Cancer. 2002 Aug;2(8):594-604
- 81- Oren M. Decision making by p53: life, death and cancer. Cell Death Differ. 2003 Apr;10(4):431-42
- 82- Soussi T, Lozano G. p53 mutation heterogeneity in cancer. Biochem Biophys Res Commun. 2005 Jun 10;331(3):834-42
- 83- [http://p53.free.fr/p53\\_info/p53PROT.html](http://p53.free.fr/p53_info/p53PROT.html)
- 84- Ko L.J., Prives C., 1996 p53 puzzle and paradigm Genes Dev 10(9), 1054-1072.

- 85- Cadwell C, Zambetti GP. The effects of wild-type p53 tumor suppressor activity and mutant p53 gain-of-function on cell growth. *Gene*. 2001 Oct 17;277(1-2):15-30.
- 86- Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell*. 1997 Feb 7;88(3):323-31
- 87- <http://www.bimcore.emory.edu/home/Kins/chem441/gabe/p53/text1.html>
- 88- The TP53 Web Site. [http://p53.free.fr/p53\\_info/p53\\_Protein.html](http://p53.free.fr/p53_info/p53_Protein.html) 17.01.2009
- 89- Guidos CJ, Williams CJ, Grandal I, Knowles G, Huang MT, Danska JS. V(D)J recombination activates a p53-dependent DNA damage checkpoint in scid lymphocyte precursors. *Genes Dev*. 1996 Aug 15;10(16):2038-54
- 90- Yonish-Rouach E, Resnitzky D, Lotem J, Sachs L, Kimchi A, Oren M. Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6. *Nature*. 1991 Jul 25;352(6333):345-7.
- 91- Cho Y, Gorina S, Jeffrey PD, Pavletich NP. Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations. *Science*. 1994 Jul 15;265(5170):334-5.
- 92- Cetin-Atalay R., Ozturk M.(2000) p53 mutations as fingerprints of environmental carcinogens. *Pure Appl Chem* 72(6), 995-999
- 93- Wong KB, DeDecker BS, Freund SM, Proctor MR, Bycroft M, Fersht AR. Hot-spot mutants of p53 core domain evince characteristic local structural changes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Jul 20;96(15):8438-42
- 94- Özbey Ü, Türk popülasyonunda şizofreni ve akciğer kanserli hastalar arasında p53 gen polimorfizm farklılıklarının araştırılması. Doktora Tezi Fırat Üniversitesi · Sağlık Bilimleri Enstitüsü. 2007.
- 95- Andersson S, Rylander E, Strand A, Sallstrom J, Wilander E. (2001). The significance of p53 codon 72 polymorphism for the development of cervical adenocarcinomas. *Br J Cancer* 85:1153.
- 96- Levine AJ. (1997). P53: The cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88:323
- 97- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispmim.cgi?id=191170>
- 98- Matlashewski GJ, Tuck S, Pim D, Lamb P, Schneider J, Crawford LV. (1987). Primary structure polymorphism at amino acid residue 72 of human p53. *Mol Cell Biol* 7(2):961- 3.
- 99- Wang YC, Lee HS, Chen SK, Chang YY, Chen CY. (1999). Prognostic significance of p53 codon 72 polymorphism in lung carcinomas. *Eur J Cancer* 35(2):226-30.
- 100- Papiol S, Arias B, Barrantes-Vidal N, Guitart M, Salgado P, Catalan R, Fananas L.(2004). Analysis of polymorphisms at the tumor suppressor gene p53 (TP53) in contributing to the risk for schizophrenia and its associated neurocognitive deficits. *Neurosci Lett* 363(1):78-80.



- 101- Robles AI, Linke SP, Harris CC. (2002). The p53 network in lung carcinogenesis. *Oncogene* 21(45):6898-907.
- 102- Başaran, N.: Tıbbi Genetik (Ders kitabı).7.Baskı, Güneş&Nobel Tıp Kitabevi, Bölüm 9;161, 1999.
- 103- Akbaş E. , Çelik A. , Derici E. , Söylemez F. Sigara Kullanımının Lenfosit Yaşam Süresi ve Genotoksik etkilerinin incelenmesi. *Turkish Journal of Geriatrics Geriatri*4(1): 15-18, 2001
- 104- İsi H., Öktüren-Oral D., Bengisu-Türkyılmaz A., Balkan M., Bleomycin'in Kronik Olarak Radyasyona (X-Işını) Maruz Kalan Bireylerde Mitotik İndeks'e Etkisi. *Dicle Tıp Dergisi* 2004 Cilt:31, Sayı:2, (4-8).
- 105- Lüleci,G.,Başaran,S.: Sitogenetik Uygulama Yöntemleri. Meteksan, Ankara, 1990.
- 106- Mitelman F., An International Sytem For Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN)1995.
- 107- Çelik M.Y. Biyoistatistik Araştırma İlkeleri (Ders Kitabı), 1. Baskı; D.Ü. Rektörlüğü Basımevi, 1999.
- 108- Huang,J., Huang,T., Qui,H., Fang,X., Zhuang,T., Liu,H., Wang,Y., Deng,L. and Oiu,J. (2003) Effects of hepatitis B virus infection on human sperm chromosomes. *World J. Gastroenterol.*, 9, 736–740.
- 109- Chen PJ, Chen DS. Hepatitis B virus infection and hepatocellular carcinoma: molecular genetics and clinical perspectives. *Semin Liver Dis.* 1999;19(3):253-62.
- 110- Virstiuk NG. Apoptosis of peripheral blood lymphocytes in patients with chronic viral hepatitis] *Lik Sprava.* 2001 Sep-Dec;(5-6):60-3.
- 111- Özbakkaloğlu B , Severcan B, Sürücüoğlu S , Kronik Hepatit B Taşıyıcılığının Hücre Bölünmesi ve Kardeş Kromatid Değişimi Üzerine Etkisi. *İnfeksiyon Dergisi* 1998;12(4): 497-500.
- 112- Bartram CR, Mortier W, Schmidt A. Human fibroblast interferon does not induce chromosomal abnormalities. *Lancet.* 1981 Jun 20;1(8234):1372.
- 113- Willis, R.J.: Clinical pharmacokinetics of interferons. *Clin Pharmacokinet* 19: 390 (1990).
- 114- Bolzán AD, Correa MV, Bianchi MS. Effect of recombinant interferon-alpha on bleomycin-induced chromosome damage in hamster cells. *Mutat Res.* 2002 Aug 29;505(1-2):43-50.
- 115- Hamburger.A.W., Condon M.E. O'Donnel. K.: İnhibition of mitogen stimulated Growth of human colon cancer cels by interferon. *Br J Cancer* 58: 147 (1998).
- 116- Jasny. B.R., Fonatsh, C.: Chromosomal aberrations in muntjac cells resulting from exposure to interferon. *J İnterferon Res.* 5: 257 (1995).

- 117- Georgian L., Moraru I., Ghyka. G., et al.: The use of differential staining of sister chromatid to estimate the vitro effect of human alfa interferon on cell division in normal and tumour cells. *Virologie* 37: 257 (1986).
- 118- Scheider-Stock, R., Boltze, C., Peters, B., Szibor, R., Landt, O., Meyer, F., 2004, "Selective Loss of Codon 72 Proline p53 and Frequent Mutational Inactivation of the Retained Arginine Allele in Colorectal Cancer", *Neoplasia*, September/October, Vol. 6, pp. 529-535.
- 119- Zhu ZZ, Cong WM, Liu SF, Dong H, Zhu GS, Wu MC. p53 gene codon 72 polymorphism and genetic susceptibility to hepatocellular carcinoma in Chinese population. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 2005 Jan 12;85(2):76-9.
- 120- Zhu ZZ, Cong WM, Liu SF, Xian ZH, Wu WQ, Wu MC, Gao B, Hou LF, Zhu GS. A p53 polymorphism modifies the risk of hepatocellular carcinoma among non-carriers but not carriers of chronic hepatitis B virus infection. *Cancer Lett*. 2005 Nov 8;229(1):77-83.
- 121- Yoon YJ, Chang HY, Ahn SH, Kim JK, Park YK, Kang DR, Park JY, Myoung SM, Kim do Y, Chon CY, Han KH. MDM2 and p53 polymorphisms are associated with the development of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Carcinogenesis*. 2008 Jun;29(6):1192-6. Epub 2008 Apr 4.

## 5. ÖZGEÇMİŞ

**Adı** : Halit

**Soyadı** : AKBAŞ

**Doğum Tarihi** : 23.03.1972

**Doğum yeri** : Şenköy Beldesi/Midyat/Mardin

**Medeni Hali** : Evli ve iki çocuk babası

### **Eğitimi:**

**1991** : Ankara Keçiören Çevre Sağlık Meslek Lisesi

**1996** : Dicle Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü

**1999** : Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Genel Biyoloji Yüksek Lisans

**2002** : Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Ve Genetik Yüksek lisans

**2007** : Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Ve Genetik Doktora

Doktora Konusu: Kronik Aktif Hepatit B’li Hastalarda İnterferon Tedavisi Öncesi ve Sonrası Sitogenetik Anomali, Mitotik İndeks ve P53 Geni Kodon 72 polimorfizminin karşılaştırılması.

### **Çalıştığı Kurumlar:**

1991-1992 : Rize İkizdere Merkez Sağlık Ocağı (Çevre Sağlığı Teknisyeni)

1992-1996 : Diyarbakır Sağlık Müdürlüğü ve bağlı birimlerde (Çevre Sağlığı Teknisyeni)

1996-1999 : Diyarbakır Devlet Hastanesi Biyokimya Laboratuvarı (Biyolog)

1999- \_\_\_\_ : Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Ve Genetik A.B.D. (Araştırma Görevlisi).

### **Üyesi Bulunduğu Dernekler:**

- Tıbbi Biyoloji ve Genetik Derneği
- Tıbbi Genetik Derneği

### **Katıldığı Kurslar:**

1) Tanıda DNA teknikleri Kursu, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya A.B.D. Mayıs 2000