

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

**MALİGN EPİTELYAL OVER TÜMÖRLERİNİN**  
**AGRESİVİTESİNDE VE İLAÇ DİRENÇLİLİĞİNDE**  
**ROL OYNAYAN GENLERİN EKSPRESYON**  
**DÜZEYLERİNİN TÜMÖR EVRELERİNE GÖRE**  
**PRİMER VE METASTATİK DOKULARDA**  
**BELİRLENMESİ**

**Mualla ÖZCAN ÇALIŞKAN**

**Doktora Tezi**

**Antalya, 2008**

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

**MALİGN EPİTELYAL OVER TÜMÖRLERİNİN**  
**AGRESİVİTESİNDE VE İLAÇ DİRENÇLİLİĞİNDE**  
**ROL OYNAYAN GENLERİN EKSPRESYON**  
**DÜZEYLERİNİN TÜMÖR EVRELERİNE GÖRE**  
**PRİMER VE METASTATİK DOKULARDA**  
**BELİRLENMESİ**

**Mualla ÖZCAN ÇALIŞKAN**

**Doktora Tezi**

**Tez Danışmanı**

**Doç. Dr. İbrahim KESER**

Bu çalışma Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından desteklenmiştir.

Proje No: 2005.03.0122.003

“Kaynakça Gösterilerek Tezimden Yararlanılabilir”

**Antalya, 2008**

## **Sağlık Bilimleri Enstitüsü Kurulu ve Akdeniz Üniversitesi Senato Kararı**

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

1. **Caliskan M.O**, Karauzum S.B, Mihci,E. Tacoy S., Luleci G. Subtelomeric chromosomal rearrangements detected in patients with idiopathic mental retardation and dysmorphic features. Genetic Counseling.16(2):129-138, 2005
2. Mendilcioglu I, **Ozcan M**, Bagci G, Simsek M, Kursun S, Luleci G, Taskin O. Triploidy in a growth discordant twin pregnancy after intracytoplasmic sperm injection treatment. Case report.. Fetal Diagn Ther. 21(1):65-7, 2006

**Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;**

Bu çalışma, jürimiz tarafından Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Tıbbi Genetik Programında doktora (PhD) tezi olarak kabul edilmiştir. / /2008

- Tez Danışmanı: Doç.Dr.İbrahim KESER**  
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
- Üye : Prof. Dr. Güven LÜLEÇİ**  
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
- Üye : Prof. Dr. Sibel BERKER KARAÜZÜM**  
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
- Üye : Doç. Dr. Tayup ŞİMŞEK**  
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı
- Üye : Doç. Dr. Oğuz ALTINGÖZ**  
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

**ONAY:**

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulunun ...../...../ 2008 tarih ve ...../..... Sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

**Prof. Dr. Nurettin OĞUZ**

Enstitü Müdürü

## ÖZET

Over kanseri, ölüme sebebiyet veren kanserler arasında 4. sırada yer alan jinekolojik malignansidir. Over kanserlerin büyük çoğunluğunu (%80-90), overin yüzey epitellerinden köken alan karsinomalar oluşturmaktadır. İlerlemiş evrede teşhis edilmiş over kanserlerinin tedavi oranı %20' den azdır ve 5 yıllık yaşam oranı % 30–40 arasındadır. Epitelyal over kanseri, jinekolojik malignansiler arasında en lenfofilik tümörlerdir. Lenf nodu metastazları erken evrede %12-%25 arasında iken, geç evrede ise %46-76 arasındadır. Bu nedenle son yıllarda epitelyal over kanserlerinde lenf nodu metastazları üzerine çok sayıda çalışma yapılmaktadır. Bu çalışmada, tümör progresyonu, agresivitesi ve metastazında önemli rol oynayan AMF/GPI, AMFR, CTGF, RAB25 ve RASSF2A genlerinin epitelyal over tümörlerinin agresivitesi ve lenf nodu ile diğer uzak organ metastazlarındaki rolünün ve MDR1 geninin ilaç dirençliliği üzerine etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Bu çalışmada, 35 olguya ait normal over veya tuba dokusu ve primer tümör dokusu çalışıldı. Ayrıca 35 olgunun 18' ine ait metastatik tümör dokusu da çalışıldı. Kantitatif gerçek zamanlı RT-PCR ile gen ekspresyon düzeyleri belirlendi. 35 olgunun 19' una (%54.28) ait primer tümör dokusunda ve 15' ine ait metastatik tümör dokusunun 7' sinde AMF/GPI geninin ekspresyon düzeyinde artış belirlendi. AMFR düzeyine bakıldığında, 35 olgunun 17' sine (%56.66) ait primer tümör dokusunda ve 16' sına ait metastatik tümör dokusunun 8' inde artış belirlendi. 35 olgunun 11' inde (%31.43) hem AMF/GPI hem de reseptörü olan AMFR geninin ekspresyonunda artış belirlendi. 35 olgunun 21' ine (%61.76) ait primer tümör dokusunda ve 14' üne ait metastatik tümör dokusunun 4' ünde CTGF gen ekspresyon düzeyinde artış belirlendi. RAB25 düzeyine bakıldığında 35 olgunun 28' ine (%80) ait primer tümör dokusunda ve 17' sine ait metastatik tümör dokusunun 10' unda ekspresyonda artış belirlendi. 35 olgunun 17' sine (%53.13) ait primer tümör dokusunda ve 14' üne ait metastatik tümör dokusunun 2' sinde RASSF2A geninin ekspresyonunda azalma belirlendi. RASSF2A geninin metilasyon profili metilasyon spesifik PCR tekniği ile araştırıldı. 35 örneğin 6' sında hem metile hem de metile olmayan allele spesifik PCR da amplifikasyon gösterilmedi. Bu olgulardan 3 tanesinde RASSF2A ekspresyonu varken 3 tanesinde ise ekspresyon olmadığı gözlenmiştir. Kantitatif gerçek zamanlı RT-PCR ile MDR1 düzeyine bakıldığında 35 olgunun 16' sında (%45.70) artış ve 17' sinde (48.57) ise azalma belirlendi.

Bu çalışma sonucunda, özellikle ileri evre tümör dokularında RAB25A, AMF/GPI, AMFR, ve CTGF gen ekspresyonlarında artış gözlenmesi, bu genlerin epitelyal over tümörlerinde agresivite ve metastaz ile ilişkili olabileceğini göstermektedir. RASSF2A gen ekspresyonunun, incelenen tüm borderline tümörlerde azalış göstermesi, RASSF2A geninin tümör oluşumunun erken evresinde rol alabileceğini göstermektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Epitelyal over kanseri, metastatik genler, metilasyon, ilaç dirençliliği, tümör agresivitesi, gen ekspresyonu

## ABSTRACT

Ovarian cancer is the fourth leading cause of cancer death in women. Carcinomas of the surface epithelium of the ovary comprise the large majority (80-90%) of cancers. The cure rate for ovarian cancer diagnosed at an advanced stage is less than 20% and 5-year survival rate is 30-40%. Epithelial ovarian cancers are the most lymphophilic tumors among the gynecologic malignancy. Lymph node metastasis ranges between 46%-76% in advanced stage and 12%-25% in early stage. Therefore, the lymph node metastasis are the most studied subjects in epithelial ovarian cancer in the last decades. In this study, we aimed detection of the roles of the AMF/PGI, AMFR, CTGF, RAB25 and RASSF2A genes in the tumor aggressivity and lymph node, the other distant organs metastasis in normal tissue, primary and metastatic epithelial ovarian cancer.

In this study, tumor and normal ovary or tuba tissue of the 35 patients were investigated. Among these 35 cases, only 18 cases had metastatic tumor as well as primary tumors and normal tissue. Expression levels of the genes were detected by quantitative real time RT-PCR. The expression level of the AMF/PGI gene increased in 19 of the 35 primary tumor tissues (54.28%) and 7 of the 15 metastatic tumor tissues. Evaluation of the AMFR gene expression level revealed increase in 17 of the 35 primary tumor tissues (56.66%) and 8 of the 16 metastatic tumor tissues. Both AMF/PGI and AMFR gene expression increased in 11 of the 35 primary tumor tissues (31.43%). The expression level of the CTGF gene increased in 21 of the 35 primary tumor tissues (61.76%) and 4 of the 14 metastatic tumor tissues. Evaluation of the RAB25 gene expression level revealed increase in 28 of the 35 primary tumor tissues (80%) and 10 of the 17 metastatic tumor tissues. The expression level of the RASSF2A gene decrease in 18 of the 35 primary tumor tissues and 2 of the 14 metastatic tumor tissues. The methylation profiles of the RASSF2A gene were investigated by methylation specific PCR technique. In 6 of the 35 samples, the PCR amplification were not observed both unmethylated and methylated allele specific PCR. Reexamination of the 6 samples by quantitative real time RT-PCR revealed that RASSF2A expression was observed in 3 samples but not in 3 samples. Evaluation of the MDR1 gene expression level by quantitative real time RT-PCR revealed increase in 16 of the 35 samples (45.70%) and decrease in 17 of the 35 tumor samples (48.57%).

In conclusion, detection of the increase in the expression levels of the RAB25, AMF/PGI, AMFR and CTGF genes especially in advanced stage of the primary tumor tissues demonstrated that these genes may be related to aggressivity and metastasis of the epithelial ovarian cancer. The detection of the decrease in the expression level of the RASSF2A gene in all borderline tumor tissues demonstrated that the RASSF2A gene may be play a role in the early stage of the tumor progression.

**Key Words:** Epithelial ovarian cancer, metastatic genes, methylation, drug resistance, tumor aggressivity, gene expression

## TEŞEKKÜR

Doktora çalışmam boyunca yol göstericiliği ve desteği için saygı değer danışman hocam Doç. Dr. İbrahim KESER'e,

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

Tez savunma sınavımda juri üyeliği yapan sayın hocalarım Prof. Dr. Sibel BERKER KARAÜZÜM' e, Doç. Dr. Oğuz ALTINGÖZ' e, Doç. Dr. Tayup ŞİMŞEK' e,

Doktora tez çalışmam ile ilgili resmi işlemleri yürüten Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü çalışanlarına,

Çalışmam süresince destekleri ve yardımları için Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Patoloji Anabilim Dalı ve Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı ekibine,

Yoğun çalışma gerektiren doktora sürecinde inançları ve göstermiş oldukları sabır ve destek için sevgili anneme ve babama içten teşekkürlerimi sunarım.

## İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	Sayfa
<b>ÖZET</b>	iv
<b>ABSTRACT</b>	v
<b>TEŞEKKÜR</b>	vi
<b>İÇİNDEKİLER DİZİNİ</b>	vii
<b>SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ</b>	ix
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b>	xi
<b>TABLolar DİZİNİ</b>	xii
<b>GİRİŞ ve AMAÇ</b>	1
<b>GENEL BİLGİLER</b>	
2.1. Kanserde Genetik Faktörler	2
2.1.1. Protoonkogenler	5
2.1.2. Tümör Baskılayıcı Genler	6
2.1.3. DNA Tamir Mekanizması ve Kanser	8
2.2. Overin Embriyolojisi	9
2.3. Overin Anatomisi	9
2.4. Overin Histolojisi	10
2.5. Over Kanserleri	11
2.5.1. Over Kanserlerinin Epidemiyolojisi	11
2.5.2. Over Kanserlerinin Sınıflandırılması	12
2.5.2. Over Kanserlerinin Etiyolojisi ve Risk Faktörleri	12
2.5.2.1. Yaş	13
2.5.2.2. Genetik Faktörler	13
2.5.2.3. Hormonal Faktörler	13
2.5.2.4. Diğer Faktörler	14
2.5.3. Over Kanserlerinin Tanısı, Evrelendirme ve Prognozu	14
2.6. Epitelyal Over Tümörleri	16
2.6.1. Epitelyal Over Tümörlerinin Sınıflandırılması	17
2.6.1.1. Seröz Tümörler	18
2.6.1.2. Müsinöz Tümörler	19
2.6.1.3. Endometrioid Tümörler	19
2.6.1.4. Berrak Hücreli Adenokarsinom	19
2.6.1.5. Brenner Tümörü	19
2.6.2. Epitelyal Over Tümörlerinde Genetik Değişimler	20
2.6.3. Epitelyal Over Tümörlerinde Metastaz	22
2.7. AMF/GPI ve AMFR	26
2.8. RASSF2A	28
2.9. RAB25	32
2.10. CTGF	33
2.11. MDR1	33
<b>MATERYAL ve METODLAR</b>	
3.1. Tümör ve Normal Dokulardan DNA İzolasyonu	35
3.1.1. Kullanılan Çözeltiler	35
3.1.2. İşlemler	36



3.2. Tümör ve Normal Dokulardan RNA İzolasyonu	36
3.2.1. Kullanılan Solüsyonlar	36
3.2.2. İşlemler	36
3.3. Kantitatif Gerçek Zamanlı RT-PCR	37
3.3.1. cDNA Eldesi	37
3.3.2. Kantitatif Gerçek Zamanlı RT-PCR Reaksiyonu	38
3.3.3. Kantitatif Gerçek Zamanlı RT-PCR Sonuçlarının Değerlendirilmesi	40
3.3.4. Metilasyon Spesifik PCR	40
3.3.4.1. Genomik DNA Modifikasyonu	35
3.3.4.2. PCR	41
3.3.4.3. Metilasyon Spesifik PCR Sonuçlarının Değerlendirilmesi	42
<b>BULGULAR</b>	
4.1. Epitelyal Over Tümörlü Olguların Klinik Değerlendirmesi	43
4.2. Kantitatif Gerçek Zamanlı RT-PCR Sonuçları	49
4.2.1. Epitelyal Over Tümörlerinde AMF/GPI Gen Ekspresyon Düzeyi	55
4.2.2. Epitelyal Over Tümörlerinde AMFR Gen Ekspresyon Düzeyi	56
4.2.3. Epitelyal Over Tümörlerinde AMF/GPI ve AMFR Gen Ekspresyon Düzeylerinin Birlikte Değerlendirilmesi	57
4.2.4. Epitelyal Over Tümörlerinde CTGF Gen Ekspresyon Düzeylerinin Değerlendirilmesi	59
4.2.5. Epitelyal Over Tümörlerinde RAB25A' nın Gen Ekspresyon Düzeylerinin Değerlendirilmesi	60
4.2.6. Epitelyal Over Tümörlerinde RASSF2A' nın Gen Ekspresyon Düzeylerinin ve Metilasyon Profilinin Birlikte Değerlendirilmesi	61
4.2.7. Epitelyal Over Tümörlerinde MDR1 Gen Ekspresyon Düzeylerinin Değerlendirilmesi	64
<b>TARTIŞMA ve SONUÇLAR</b>	66
<b>KAYNAKLAR</b>	71
<b>ÖZGEÇMİŞ</b>	77
<b>EKLER</b>	78
<b>Ek-1. Çalışkan M.O</b> , Karauzum S.B, Mihci,E. Tacoy S., Luleci G. Subtelomeric chromosomal rearrangements detected in patients with idiopathic mental retardation and dysmorphic features. Genetic Counseling.16(2):129-138, 2005	
<b>Ek-2. Mendilcioglu I, Ozcan M</b> , Bageci G, Simsek M, Kursun S, Luleci G, Taskin O. Triploidy in a growth discordant twin pregnancy after intracytoplasmic sperm injection treatment. Case report.. Fetal Diagn Ther., 21(1):65-7, 2006	

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

AMF/GPI	:Homo sapiens glucose phosphate isomerase
AMFR	:Homo sapiens autocrine motility factor receptor, transcript variant 2
RASSF2A	:Homo sapiens ras association (RalGDS/AF-6) domain family 2 protein isoform 2A
RAB25	: Homo sapiens RAB25, member RAS oncogene family
CTGF	: Connective Tissue Growth Factor
MDR1	: ATP-Binding Cassette, Subfamily B, Member 1;ABCB1
LOH	: Heterozigosite kaybı
MMP	: Matriks metalloproteaz
TIMPs	: Matriks metalloproteaz inhibitörleri
VEGF	: Vaskular endotelyal büyüme faktörleri
FGF	: Fibroblast büyüme faktörleri
RT-PCR	: Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction
PCR	: Polymerase Chain Reaction
PTEN	:Phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome ten
BRCA 1	: Meme kanseri geni 1 (Breast cancer 1 gene)
BRCA 2	: Meme kanseri geni 2 (Breast cancer 2 gene)
NaCl	: Sodyum klorür
NH <sub>4</sub> Cl	: Amonyum klorür
TBE	: Tris-Borik Asit-EDTA
WBL	: Lökosit lizis (White Blood Lysis)
NM23	: Nonmetastatic protein 23
KAI-1	: Kangail
KISS-1	: KiSS-1 metastasis-suppressor
MAPK	: Mitogene activated protein kinase
PI-3K	: Fosfotidil inositol 3-kinaz
CDK	: Siklin bağımlı protein kinaz
CDKI	: Siklin bağımlı protein kinaz inhibitörü
DNMT	: DNA metil transferaz
TIMPs	: Tissue inhibitory of matrix metalloproteinase

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. Hücre döngüsünde yer alan kontrol noktaları	3
Şekil 2.2. Kanser gelişiminde rol oynayan genler ve gelişim basamakları	5
Şekil 2.3. Biallelik gen inaktivasyon mekanizmaları	6
Şekil 2.4. Overin (yumurtalık) anatomik yerleşimi ve komşulukları	10
Şekil 2.5. Metastazın gelişim basamakları	24
Şekil 2.6. AMF/GPI ve reseptörünün VEGF ile olan etkileşimi ve anjiogenesis	27
Şekil 2.7. AMF/GPI ve reseptörünün apoptosisteki rolü	27
Şekil 2.8. Ras Sinyal yolağı	29
Şekil 2.9. RASSF ailesi üyeleri	30
Şekil 2.10. RASSF genlerinin tümör baskılanmasındaki rolü	31
Şekil 2.11. RAB25 aracılı hücre proliferasyonu ve canlılığının regülasyonu	32
Şekil 4.1. Applied Biosystem 7500 SDS yazılım programından analiz sonucu örneğı	49
Şekil 4.2. Primer tümör odaklarında AMF/GPI geninin mRNA düzeyi	55
Şekil 4.3. Metastatik tümör odaklarındaki AMF/GPI geninin mRNA düzeyinin primer tümör odaklarına göre kıyaslanması ile elde edilen sonuç	56
Şekil 4.4. Primer tümör odaklarında AMFR geninin mRNA düzeyi	56
Şekil 4.5. Metastatik tümör odaklarındaki AMFR geninin mRNA düzeyinin primer tümör odaklarına göre kıyaslanması ile elde edilen sonuç	57
Şekil 4.6. AMF/GPI ve AMFR genlerinin mRNA düzeylerinin birbiri ile karşılaştırılması	58
Şekil 4.7. Metastatik tümör odaklarındaki AMF/GPI ve reseptörü olan AMFR geninin mRNA düzeylerinin primer tümör odaklarına göre kıyaslanması ile elde edilen sonuç.	58
Şekil 4.8. Primer tümör odaklarında CTGF geninin mRNA düzeyi	59
Şekil 4.9. Metastatik tümör odaklarındaki CTGF geninin mRNA düzeyinin primer tümör odaklarına göre kıyaslanması ile elde edilen sonuç	60
Şekil 4.10. Primer tümör odaklarında RAB25 geninin mRNA düzeyi	60
Şekil 4.11. Metastatik tümör odaklarındaki RAB25 geninin mRNA düzeyinin primer tümör odaklarına göre kıyaslanması ile elde edilen sonuç	61
Şekil 4.12. Primer tümör odaklarında RASSF2A geninin mRNA düzeyi	62
Şekil 4.13. Metastatik tümör odaklarındaki RASSF2A geninin mRNA düzeyinin primer tümör odaklarına göre kıyaslanması ile elde edilen sonuç	62
Şekil 4.14.a Ov-4 nolu olgunun metile olmayan allele ait PCR sonuçları	63
Şekil 4.14.b Ov-4 nolu olgunun metile allele ait PCR sonuçları	63

<b>Şekil 4.15.a.</b> Ov-8 ve Ov-16 nolu olgunun metile olmayan allele ait PCR Sonuçları	<b>63</b>
<b>Şekil 4.15.b.</b> Ov-8 ve Ov-16 nolu olguların metile allele spesifik PCR sonuçları	<b>63</b>
<b>Şekil 4.16.a.</b> Ov-17 ve Ov-24 nolu olgunun metile olmayan allele ait PCR sonuçları	<b>64</b>
<b>Şekil 4.16.b.</b> Ov-17 ve Ov-24 nolu olgunun metile allele ait PCR sonuçları	<b>64</b>
<b>Şekil 4.17.</b> Primer tümör odaklarında MDR1 geninin mRNA düzeyi	<b>64</b>
<b>Şekil 4.18.</b> Metastatik tümör odaklarındaki MDR1 geninin mRNA düzeyinin primer tümör odaklarına göre kıyaslanması ile elde edilen sonuç	<b>65</b>

## TABLolar DİZİNİ

<b><u>Tablo</u></b>	<b><u>Sayfa</u></b>
<b>Tablo 2.1.</b> Köken aldıkları hücre tipine göre over tümörlerinin gruplandırılması	<b>12</b>
<b>Tablo 2.2.</b> Over tümörlerinin evrelendirilmesinde FIGO ve UICC-TNM evrelendirme sistemleri	<b>15</b>
<b>Tablo 2.3.</b> Epitelyal over tümörlerinin histolojik sınıflandırılması	<b>16</b>
<b>Tablo 2.4.</b> Epitelyal over tümörlerinde belirlenmiş genetik değişimler	<b>21</b>
<b>Tablo 4.1.</b> Olguların yaş gruplarına göre dağılımı	<b>43</b>
<b>Tablo 4.2.</b> Epitelyal over tümörlü olguların histopatoloji sonuçları	<b>44</b>
<b>Tablo 4.3.</b> Olguların histopatolojilerine göre dağılımı ve yüzdeleri	<b>49</b>
<b>Tablo 4.4.</b> Olguların primer tümör dokusundaki gen ekspresyon profilinin normal dokudaki gen ekspresyon profili ile kıyaslanması sonucu elde edilen veriler	<b>50</b>
<b>Tablo 4.5.</b> Olguların metastatik tümör dokusundaki gen ekspresyon profilinin primer tümör dokusundaki gen ekspresyon profili ile kıyaslanması sonucu elde edilen veriler	<b>53</b>

## GİRİŞ VE AMAÇ

Over kanseri, ölüme sebebiyet veren kanserler arasında 4. sırada yer alan jinekolojik bir malignansidir. Over kanserlerinin birçoğu ilk teşhis edildiğinde ileri evre olması ve nüks nedeniyle, hastaların 5 yıllık sağ kalım oranı % 30–40 arasındadır. Amerikan Kanser Birliği' nin verilerine göre, 2005 yılı içinde 22.220 kadında over kanseri gözlenmiş ve 16.210 kişi ise bu nedenle ölmüştür. Over kanseri, over yüzey epiteli, germ hücre, seks kordonları ve over stroması kökenli olarak 4 major kategoriye ayrılmaktadır.

Over kanserlerinin %90'ı overin yüzey epitelinden köken almakta ve epitelyal over kanseri olarak sınıflandırılmaktadır. Epitelyal over kanseri, %65-75 sıklıkla ve 20 yaş üzerinde görülmektedir. Seröz, müsinöz, endometrioid, berrak hücreli, brenner ve mikst olmak üzere sınıflandırılmaktadır.

Epitelyal over tümörleri oldukça lenfofilik olup, lenf nodu metastazları sık gelişmektedir. Lenf nodu metastazları erken evrede %12-25 arasında gözlenirken, geç evrede ise bu oran %46-76' lara kadar çıkmaktadır. Bu nedenle son yıllarda epitelyal over kanserlerinde lenf nodu metastazları üzerine çok sayıda çalışma yapılmaktadır.

Daha önce farklı kanser tiplerinde yapılan çalışmalar sonucunda AMF/GPI ve reseptörü olan AMFR, CTGF, RAB25A ve RASSF2A genlerinin ekspresyon düzeyindeki değişikliklerin özellikle metastaz olmak üzere tümör agresivitesi ve progresyonunda etkili oldukları gösterilmiştir.

Bu çalışmada, daha önceden farklı kanser tiplerinde yapılan çalışmalar sonucunda tümör gelişimi, agresivitesi ve metastazında rol oynadıkları gösterilen AMF/PGI, AMFR, CTGF, RAB25A ve RASSF2A genlerinin ekspresyon düzeylerinin tümör evrelerine göre kantitatif olarak belirlenmesi ve tümörün progresyonu üzerine etkilerinin gösterilmesi ve erken dönemde ilaç dirençliliği hakkında bilgi edinmek için MDR-1 gen ekspresyonunun tanımlanması ve yeni tedavi protokollerinin uygulanmasına olanak sağlayacak veriler elde etmek için amaçlanmıştır.

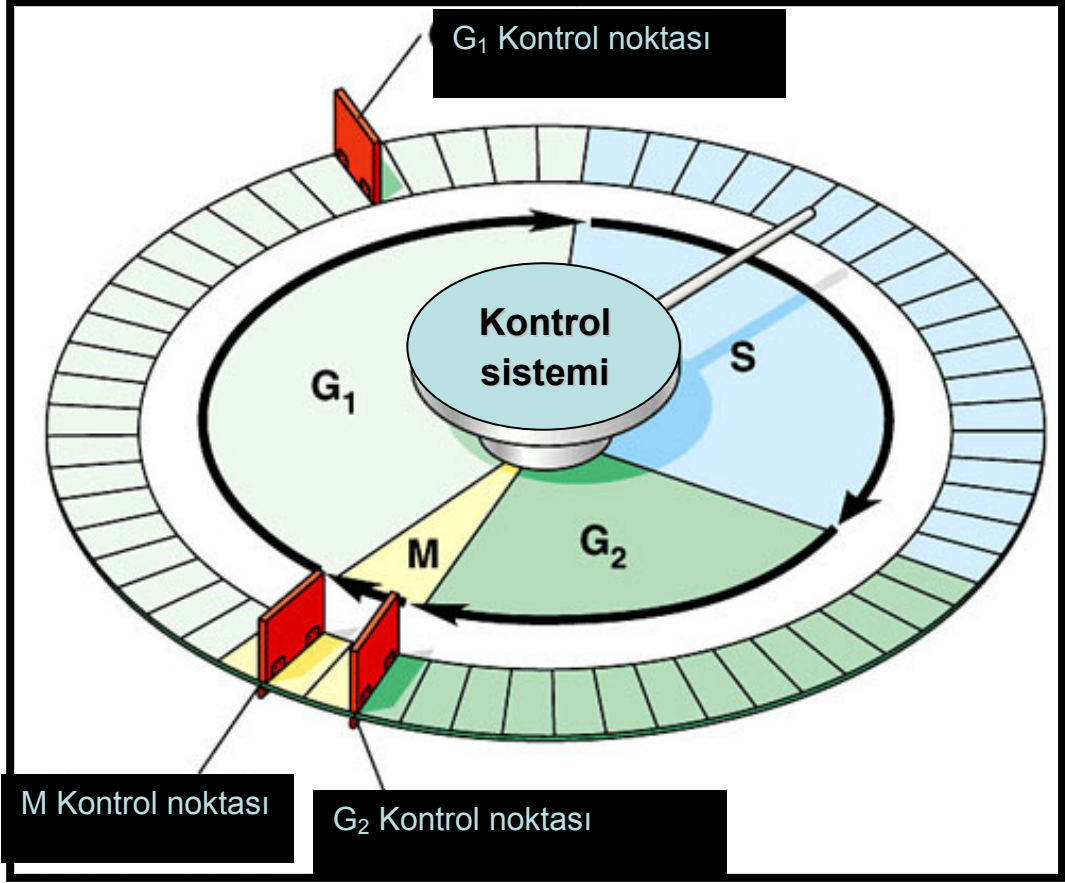
## GENEL BİLGİLER

Çok hücreli organizmalarda, organizmanın genel gereksinimleri doğrultusunda her hücrenin proliferasyonu, farklılaşması ve apoptozu düzenlenmektedir. Bu olayları düzenleyen mekanizmalardaki hatalar sonucunda, bir doku veya organdaki hasarlı hücrelerin kontrolsüz bir şekilde bölünerek çoğalması ile kanser oluşmaktadır.

### 2.1. Kanserde Genetik Faktörler

Normal hücreler farklı metabolik, biyokimyasal ve fizyolojik mekanizmalar ile karakterizedir. Spesifik hücre tipleri, dıştan gelen uyarılara karşı farklı yanıtlar oluştururlar. Farklılaşabilirler, bölünebilirler, apoptozu uğrayabilirler veya dinlenme evresinde kalabilirler. Kas ve sinir hücreleri hariç vücudumuzdaki sağlıklı tüm hücreler bölünebilmektedir.

Hücre bölünmesi, genetik kontrol altındadır ve farklı zamanlarda eksprese olan birçok gen tarafından düzenlenmektedir. G1, S, G2 ve M olmak üzere dört fazdan oluşan hücre bölünmesinin doğru bir şekilde ilerleyip ilerlemediği üç kontrol noktasında belirlenmektedir (Şekil 2.1). Bu kontrol noktalarından birisi, hücre döngüsünün G1/S evresinde bulunan ve “restriksiyon noktası” olarak adlandırılan kontrol noktasında, hücrenin yeterli büyüklükte olup olmadığı, hücre bölünmesi için uygun sinyalin bulunup bulunmadığı kontrol edilir. İkinci kontrol noktası olan G2 kontrol noktası, mitoz bölünmeye girişi belirleyen noktadır. Bu noktada yine hücre büyüklüğünün yeterli olup olmadığı ve DNA replikasyonunun tamamlanıp tamamlanmadığı kontrol edilir. Üçüncü kontrol noktası ise M kontrol noktasıdır. Bu noktada replikasyonu doğru bir şekilde tamamlanmış olan kromozomların iğ ipliklerine uygun bir şekilde bağlanıp bağlanmadığı kontrol edilir. Böylece, genomun integritesi sağlanır. Bu kontrol noktalarının herhangi birinde meydana gelen hata genomik instabiliteye yol açmaktadır (1,2, 3)



Şekil 2.1. Hücre döngüsünde yer alan kontrol noktaları

Restriksiyon noktasından geçiş ve S fazına giriş; siklin bağımlı protein kinazlar (CDK), siklinler ve siklin bağımlı protein kinaz inhibitörleri (CDKI) tarafından regüle edilmektedir. CDK/ siklin kompleksi hem negatif hem de pozitif yönde regüle edilmektedir. Bu regülasyon ile CDK uygun siklin ile etkileşime girmektedir. CDK aktivatör kinazlar, siklin bağımlı protein kinazları treonine residüellerinden fosforilleyerek aktif hale getirirken, spesifik CDK fosfotazlar tirozin residüellerinden defosforilleyerek inaktivasyonunu sağlarlar. Siklin bağımlı kinazlar (CDKs); protein kinaz aktivitesine sahip proteinlerdir. Aktif siklin bağımlı protein kinazlar, siklinler ile heterodimer yapıdadır. Bu heterodimerik yapıda; CDKs, kinaz ünitesini, siklinler ise aktivite edici ve spesifite belirleyici olarak fonksiyon görür. CDK aktivitesinin primer regülatörleri siklinlerdir. Siklinler, hücre döngüsünde konsantrasyon değişiklikleri gösteren proteinlerdir. CDK-holoenzim komplekslerinde substrat spesifitesi ve hücre fazı spesifitesini sağlar. Farklı siklinler hücre döngüsünün farklı fazlarında aktivitelerini göstermektedir. G<sub>1</sub>-S siklinler, D ve E tip; M fazı siklinleri B tip, S, G<sub>2</sub> ve M fazında aktivite gösteren siklinler ise A tip siklinlerdir. CDKI' lar; hücre döngüsünde CDK aktivitesinin negatif regülatörleridir. Birçok anti-proliferatif sinyallere yanıt olarak hücre döngüsünün sonlanmasına aracılık ederler. CDKI' lar



heterojen bir aileye ait olup, CDK-siklin kompleksleri ile geriye dönüşümsüz olarak etkileşime girerek CDK aktivitesini inhibe ederler. Böylece, kontrolsüz hücre proliferasyonu ve kanser oluşumunu inhibe etmektedirler (4, 5).

Hücrelerin bölünme yetenekleri sınırlıdır. Hücrede, normal doku bütünlüğünün sağlanabilmesi için, hücre bölünmesi ve apoptoz arasında bir dengenin olması gerekmektedir. Normal embriyonik gelişim için önemli olan apoptozun, hücre bölünmesinden fazla olması durumunda atrofi gelişimi gözlenmektedir. Diğer taraftan ise, hücre bölünmesinin apoptozdan fazla olması durumunda neoplazi yani kanser oluşumu gözlenmektedir (6).

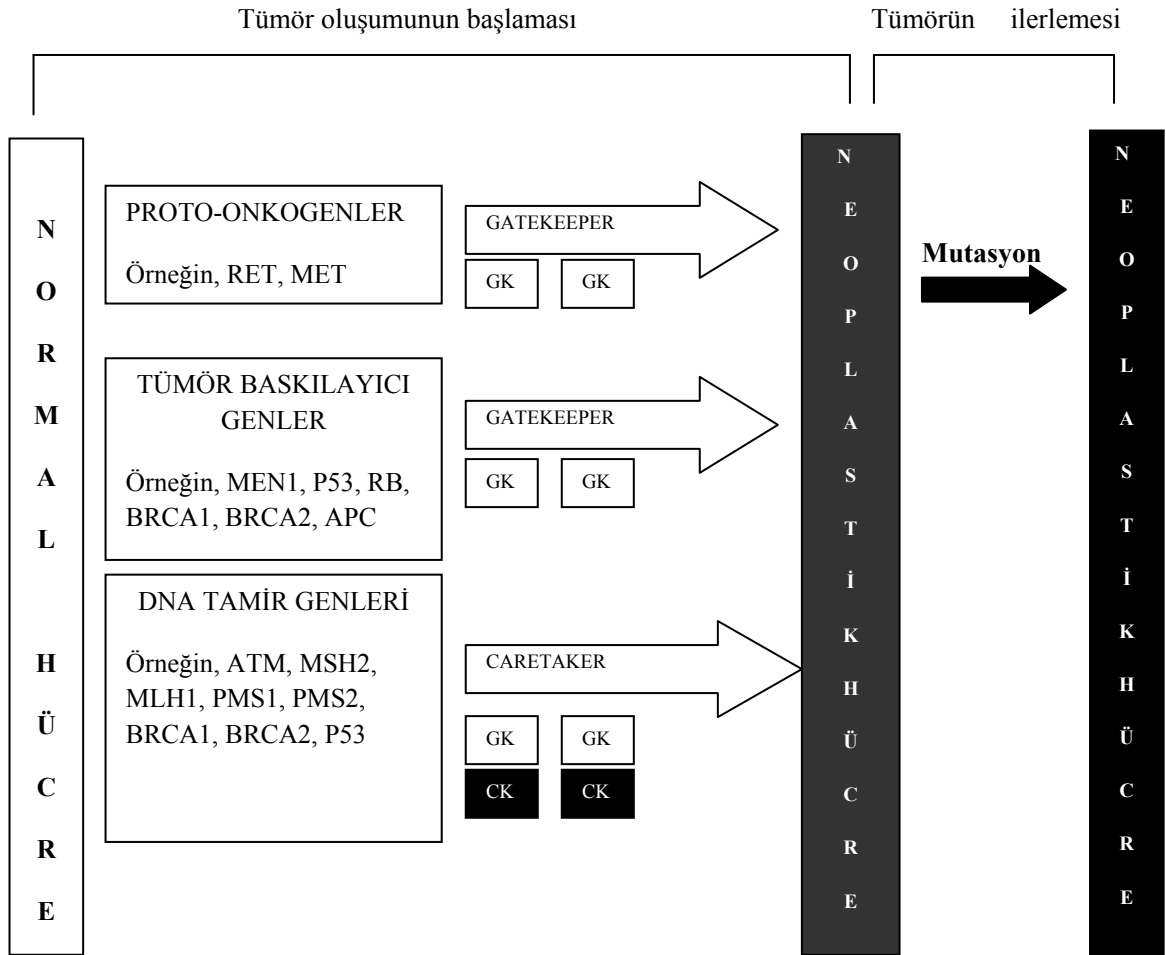
Kanser heterojen bir genetik hastalık olup, farklı genetik lokuslardaki kalıtsal veya somatik olarak kazanılmış genetik ve epigenetik değişiklikler sonucu ortaya çıkmaktadır. Meydana gelen bu değişimler, DNA tamir mekanizması ile tamir edilmez ise, apoptoz yolu ile mutasyona uğramış hücre ortadan kaldırılır. Eğer apoptoz gerçekleşmez ise, mutasyona uğramış olan hücre proliferasyona devam eder. Her yeni bölünme sonucunda eklenen yeni mutasyonlar sonucu hücre transforme olarak kanser hücresine dönüşür. Normal bir hücrenin malignant kanser hücrelerine dönüşümü için, bir hücrede ortalama 6-7 spesifik mutasyonun olması gerekmektedir. Bu mutasyonların bazıları hücre proliferasyonunu arttırmaktadır. Bazıları ise, ya DNA ya da kromozomal düzeyde tüm genomun stabilitesini etkilemektedir (7).

Kanser hücrelerinde, 5 farklı tipte genetik değişim gösterilmiştir (7):

1. Küçük değişimler: DNA' da meydana gelen küçük delesyonlar, insersiyonlar ve tek baz değişimleri kanser gelişimine neden olabilmektedir.
2. Sayısal kromozom değişiklikleri: Somatik olarak kromozom kayıpları ve artışları kansere neden olmaktadır. Birçok kanser hücresi aneuploid iken, bazı kanser hücreleri, bir kromozomun normal iki kopyasına sahipmiş gibi gözükabilir. Ancak yapılan moleküler çalışmalar bu homolog kromozomların her ikisinin de tek bir ebeveyne ait olduğunu göstermiştir. Bu durum uniparental dizomi mekanizması ile açıklanmakta ve heterozigosite kaybına (LOH:Loss of heterozygosity) neden olmaktadır. LOH genellikle mitotik rekombinasyon yoluyla tüm kromozomun kaybı ve diğer homolog kromozomun duplikasyonu sonucu meydana gelmektedir. LOH; tek baz değişimli mutasyonlara kıyasla daha sık meydana gelmektedir. LOH,  $10^{-5}$  sıklıkla, tek baz değişimi  $10^{-7}$  sıklıkla gözlenmektedir.
3. Yapısal kromozom değişiklikleri: Kanserde, daha çok somatik olmak üzere dengeli ve dengesiz translokasyonlar sıklıkla görülmektedir. Meme, kolon, prostat kanserleri gibi epitelyal hücre kökenli kanserlerde translokasyonlar rastgele olup kromozomal veya moleküler düzeyde spesifik bir kırık noktası bulunmamaktadır. Lösemilerde ve lenfomalarda ise spesifik translokasyonlar bulunmaktadır. Örneğin; kronik myeloid lösemilerde 22 numaralı kromozomda lokalize bcr geni ile 9 numaralı kromozomda lokalize abl onkogeninin füzyonuna yol açan (9;22) translokasyonu gözlenmektedir.
4. Amplifikasyonlar: Gen amplifikasyonları ilerlemiş neoplazmlarda daha sıklıkla görülmektedir. Amplikonlar, proliferatif aktiviteyi arttıran bir veya birden çok gen içerebilmektedir. Kopya sayısının artması yoluyla bu genlerin ekspresyonunda artma meydana gelmektedir.

5. Ekzojen sekanslar: Servikal kanserler, Burkitt Lenfoma, Hepatoselüler karsinomalar gibi bazı kanserlerin gelişiminde; anormal hücre büyümesine yol açan genlere sahip olan bazı tümör virüsleri rol oynamaktadır.

Kalıtıl kanser sendromları üzerine yapılan genetik haritalama çalışmaları sonucunda, tümörün gelişimine yol açan birçok gen belirlenmiştir. Bu genler, fonksiyonel olarak farklı iki sınıfta incelenebilir. Bunlardan birisi; hücre büyümesi, proliferasyonu, hücre adhezyonu ve programlanmış hücre ölümünün regülatörleri olan tümör baskılayıcı genler ve proto-onkogenler olup “gatekeeper genler” olarak adlandırılırlar. Diğeri ise, genomik stabilitenin devamlılığını sağlayan DNA tamir genleri olup “caretaker genler” olarak adlandırılmaktadır. Tek bir gende meydana gelen mutasyon kanser gelişim için yeterli olmayabilir. Üst üste eklenen protoonkogen ve tümör baskılayıcı gen mutasyonları kansere yol açmaktadır (Şekil 2.2). Bu mutasyonlar, kimyasal etkenler, virüsler ve radyasyon gibi karsinojenik ajanlar sonucu oluşabilmektedir (8, 9).



Şekil 2.2. Kanser gelişiminde rol oynayan genler ve gelişim basamakları: GK: Gatekeeper CK: Caretaker (9)

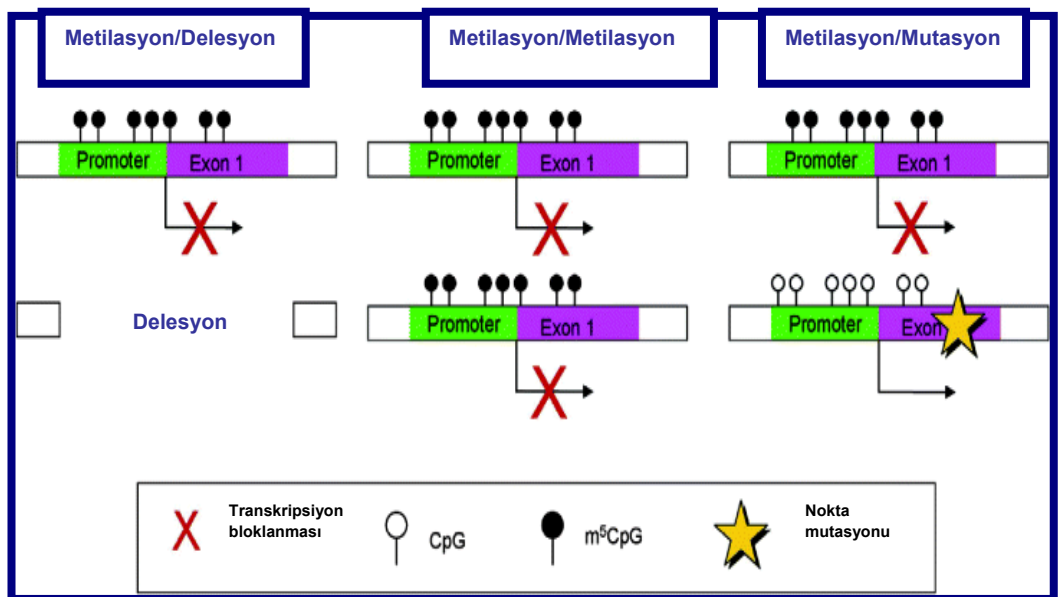
### 2.1.1. Protoonkogenler

Proto-onkogenler, normal bir hücrede hücre proliferasyonunu regüle etmektedir. Hücrede meydana gelen fonksiyon kazandırıcı bir mutasyon sonucunda onkogene dönüşürler. Aşırı veya uygun olmayan aktiviteleri sonucunda kanser oluşumuna yol açarlar. Kromozomlardaki sayısal artışlar, gen amplifikasyonları, kromozomal translokasyonlar ve aktive edici nokta mutasyonları veya bir retroviral insersiyonu sonucunda protoonkogenlerin onkogenik aktivasyonu gerçekleşebilir. Çok sayıda proto-onkogen mutasyonu bilinmektedir. Örneğin; neu (erb-B2) gen mutasyonları sonucu; meme, over, akciğer ve mide kanserleri; ras gen mutasyonları ile akciğer, kolon, pankreas karsinomları, lösemiler; myc gen mutasyonları sonucu Burkitt lenfoma, nöroblastoma, küçük hücreli akciğer kanseri; abl gen mutasyonları ile KML ve ALL gelişebilmektedir (10, 11).

### 2.1.2. Tümör Baskılayıcı Genler

Tümör baskılayıcı genler, genomun stabilitesinin devamlılığı, hücre proliferasyonunun ve apoptozun regülasyonu, DNA replikasyonunun düşük mutasyon oranı ile gerçekleşmesini sağlamaktadır. Hücrede değişiklik meydana gelmesi için tümör baskılayıcı genlerin her ikisinin inaktif hale gelmesi gerekmektedir. Tüm kromozom kayıpları, büyük delesyonlar, intragenik delesyonlar ve nokta mutasyonları tümör baskılayıcı genleri inaktif hale getirebilmektedir. Bunların dışında bu genlerin epigenetik olarak sessizleştirilmesi de kanser gelişiminde büyük rol oynamaktadır.

Tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu, Knodson'ın iki vuruş hipotezi ile açıklanabilir. Bu hipoteze göre, tümör baskılayıcı genin her iki alleli hipermetilasyon ile veya metilasyon ve delesyonun kombinasyonu sonucu inaktif hale gelebilir. Genetik ve epigenetik olayların kombinasyonu sonucunda tümör baskılayıcı genlerin her iki alleli inaktif hale getirilebilir. Biallelik inaktivasyon olarak tanımlanabilen bu mekanizmada, eğer tümör baskılayıcı bir genin bir alleli metillenmiş ise, ikinci allelin ya metilasyon ya delesyon ya da nokta mutasyonu sonucu inaktif hale gelebildiği görülmektedir (Şekil 2.3) (12, 13).



### Şekil 2.3. Biallelik gen inaktivasyon mekanizmaları

DNA metilasyonu, hem prokaryotik hem de ökaryotik organizmalarda meydana gelen doğal bir olaydır. Prokaryotlarda metilasyon ile genom, yabancı DNA' ları elimine etmek için kullanılan restriksiyon endonükleazlar tarafından parçalanmaktan korunmaktadır. Metilasyon normal gelişim için de gereklidir. Gen imprintingi, embriyonik gelişim, X kromozomlarından birinin sessizleştirilmesi ve hücre döngüsünün regülasyonunda rol oynamaktadır. Embriyonik gelişimin erken evresinde, metilasyon ve demetilasyon ile hücre büyümesi ve farklılaşması programlanabilir.

Birçok hayvan ve bitki hücresinde DNA metilasyonu, üniversal metil donorü olan S-adenozil metinoinin metil grubunun sitozinin primidin halkasının 5.pozisyonundaki karbon atomuna metil transferaz enzimi aracılığı ile eklenmesi ile meydana gelmektedir. Memeli DNA' sında metilasyonun büyük çoğunluğu 5'-CpG-3' dinükleotidlerin sitozin bazında meydana gelmektedir. Normal hücrelerde CpG metilasyonu, dokuya ve gelişim evresine spesifik gen ekspresyonunu, inaktif X kromozomun sessizleştirilmesini, genomik imprintingi ve ALU, LINE sekansları gibi intragenomik parasitik elementlerin ekspresyonuna karşı korumayı sağlamaktadır. CpG dinükleotidleri genom içinde CpG adaları olarak adlandırılan CpG' lerce zengin spesifik bölgelerde eşit olmadan dağılım gösterir. CpG adalarının birçoğu genlerin promotorlarına yakın lokalizedirler. Tüm genlerin yaklaşık yarısının promotorlarında bu CpG adaları bulunmaktadır. İnsanlarda tüm CpG bölgelerinin %50-70'i metillenmiş durumdadır. Geri kalan %20' lik kısım ise genlerin ilk ekzonlarında veya promotor içinde metillenmemiş olarak kalmaktadır (14, 15).

DNA replikasyonu esnasında, atasal DNA' nın metilasyon paterni, DNMT1 olarak adlandırılan metil transferaz enzimi ile yeni sentezlenmiş zincire kopyalanmaktadır. Ancak embriyonik kök hücreleri ve kanser hücrelerinde metillenmemiş DNA' nın tercihli olarak DNMT3a ve DNMT3b aracılı olarak *de novo* metilasyonu gerçekleşir. Gen transkripsiyonunun epigenetik olarak sessizleştirilmesi, kromatin konfigürasyonundaki yeniden şekillenme ve genin promotorunun metilasyonu ile meydana gelmektedir. Ökaryotik kromatinin yapısına baktığımızda 146 baz çiftlik DNA, oktomerik yapı oluşturan H2A, H2B, H3 ve H4 histon proteinlerinin etrafını kuşatarak nükleozom adı verilen yapıyı oluştururlar. Transkripsiyonel olarak aktif kromatin, metillenmemiş sitozinler ve asetillenmiş histonlar ile karakterizedir. Kromatin yapının çoğu transkripsiyonel olarak inaktif haldedir. Bu durumda sitozinler metillenmiştir. Metillenmiş olan sitozinlere baskılayıcı proteinler olan "metil-CpG bağlanma domain proteinleri" bağlanırlar. Bu proteinler, bölgeye "Histon deasetilazları" çekmektedir. Histon deasetilaz enzimleri, histonlar üzerindeki asetil grubunu uzaklaştırırlar.

Histon proteinlerinin aminoasit residüelerinin metilasyon profiline bağlı olarak histon metilasyonu kromatin yapıyı transkripsiyonel olarak aktif veya inaktif hale getirebilir. Histon H3' ün N-terminal kuyruğundaki Lizin 9, 27 ve 36 üzerinden trimetilasyonu ve Histon H4'ün Lizin 20 üzerinden metilasyonu kromatin yapının sessizleştirildiğini gösterir. Diğer taraftan Histon H3 proteininin Lizin 4 ve 79 üzerinden trimetilasyonu aktif olarak transkribe olan kromatin yapı ile ilişkilidir. Histon 3 proteininin Lizin 9 üzerinden metilasyonu heterokromatin yapının stabil olarak kalmasını sağlamaktır. Bu bölgede gerçekleşen demetilasyon genomik instabilite ve kansere yatkınlıkla ilişkilidir (15, 16).

Kanser hücreleri, normal hücrelerde metile olmayan CpG adalarında fokal hipermetilasyon ve global hipometilasyon ile karakterizedir. Sitozin üzerinde gerçekleşen metilasyon birçok yoldan kanser oluşumunu etkileyebilir. Bunlardan birincisi, metillenmiş sitozin nokta mutasyonlarını indükleyerek genlerin kodlayıcı bölgelerini değiştirebilir. Metillenmiş sitozin residüellerinde nokta mutasyonlarının oluşması birkaç yolla kolaylaşmaktadır. Metillenmiş sitozinler spontan olarak timine deamine (C-T transisyonu) olarak bir endojen mutajene dönüşür. Bu dönüşüm tamir edilmezse ve genin kodlayıcı bölgesinde meydana gelmiş ise hastalığa yol açan nokta mutasyonuna dönüşebilir. Tümör baskılayıcı genlerdeki “hot-spot” mutasyonlar ve germ hücre hattında meydana gelen ve hastalıkla ilişkili olduğu bilinen mutasyonların %30’ undan fazlası CpG dinükleotidlerinde meydana gelmektedir. Örneğin, TP53 geninde kodon 248, 273 ve 282’ de en yaygın görülen somatik mutasyonların birçoğu C-T transisyonu sonucu oluşur. Bu bölgedeki CpG’ ler, normal dokularda metillenmiş durumdadır. Yapılan çalışmalar göstermektedir ki, metillenmiş CpG’ de meydana gelen TP53 mutasyonları, tüm somatik mutasyonların yarısını ve tüm germline mutasyonlarının 1/3’ ünü oluşturmaktadır (13).

İkinci olarak genomda metillenmiş sitozinin azalması yani DNA’ nın hipometilasyonu genomik instabiliteye yol açmaktadır. DNA’ nın hipometilasyonu, kromozomal kırıklar, translokasyonlar ve allelik kayıplara yol açarak uygun olmayan mitotik rekombinasyona neden olmaktadır. Örneğin, MDR1 geninde olduğu gibi DNA’ nın hipometilasyonu bazı genlerin aşırı ekspresyonuna yol açar. Kromozomların perisentromerik bölgesinde meydana gelen metilasyon kaybı, birçok kanser türünde görülebilir.

Üçüncü olarak gen promotorlarının fokal olarak hipermetilasyonu gen transkripsiyonunu inaktif hale getirmektedir. Tümör baskılayıcı genlerin transkripsiyon başlama bölgesine yakın lokalize CpG adalarının metilasyonu, genin sessizleştirilmesi ile ilişkili iken, downstream gen sekanslarının metilasyonunun gen ekspresyonu üzerinde herhangi bir etkiye sahip değildir. Tümör baskılayıcı genlerin promotorlarındaki CpG’ lerin hipermetilasyonu ile kalıtsal olarak gen sessizleştirilmesi karsinogenezde önemli epigenetik olaylardan biridir. Tümör baskılayıcı genlerin epigenetik olarak sessizleştirilmesi kanserde önemli sinyal yollarının bozulmasına neden olur. Örneğin, akciğer, meme, mesane, over, lenfoma gibi kanserlerde RASSF1A ve SOCS1 genlerinin metilasyonu sonucu büyüme sinyali otonomisinde bozulma, gastrointestinal ve özafagus kanserinde CDH1 ve TIMP3 genlerinin metilasyonu sonucu tümör invazyonu ve metastazda artma gözlenmektedir (12).

DNA metilasyon durumunun belirlenmesi ve metilasyon derecesinin kantitatifte edilmesi, özellikle kanser çalışmalarında olmak üzere gen ekspresyon çalışmalarında ve diğer genetik hastalıkların belirlenmesinde oldukça önemlidir. Günümüze kadar, DNA metilasyonunu belirlemek için DNA dizi analizi, metilasyona spesifik PCR gibi yöntemler kullanılmaktadır. Her iki yöntemde de metillenmiş sitozinler üzerinde bisülfid konversiyonun yapılması gerekmektedir. Bisülfid konversiyonunda, DNA bisülfid ile muamele edildiğinde metillenmemiş olan sitozinler urasile dönüşmektedir. Metillenmiş sitozinler ise, muamele esnasında değişim göstermemektedir (17) .

### **2.1.3. DNA Tamir Mekanizması ve Kanser**

DNA tamir genlerindeki değişiklikler de kanser oluşumuna yol açmaktadır. Güneş ışığı, iyonize radyasyon gibi kanserojenik ajanlar DNA' da hasar meydana getirmektedir. Bunlar dışında, normal hücre bölünmesi esnasında da DNA' da hasar oluşabilmektedir. Ancak sağlıklı bir hücrede meydana gelen bu hasarlar DNA tamir mekanizması sayesinde tamir edilmektedir. Onarımın mümkün olmadığı durumlarda ise apoptoz ile hücre ölümü gerçekleşerek anormal hücrelerin proliferasyonu engellenmiş olmaktadır. DNA tamirinde rol oynayan genlerdeki mutasyonlar sonucu, proto-onkogen ve tümör baskılayıcı genlerde hataların birikimi söz konusu olacaktır. DNA tamir genlerindeki defekt sonucu artmış kanser riski taşıyan hastalığa örnek olarak Kseroderma pigmentosum verilebilir (18).

DNA tamir mekanizmasındaki bozulma, replikasyon hatalarına da yol açmaktadır. Hatalı DNA onarımı mikrosatellit instabilitesi olarak karşımıza çıkabilmektedir. Mikrosatellitler, genom boyunca bulunan 1-6 nükleotidden oluşan tekrar dizileridir. Bu dizilerin nükleotid tekrarları sabittir. DNA tamirindeki hata sonucu, bu dizilerde uzama veya kısalma olabilmektedir. Mikrosatellit instabilitesi de DNA tamir defektinin en iyi göstergesidir (19).

## **2.2. Overin Embriyolojisi**

Embriyonik dönemin 5-6. haftalarında primordial germ hücreleri yolk salk duvarının endoderminden göç etmeye başlar. Yaklaşık 10-100 endodermal kökenli primordial germ hücresi ameboid hareketlerle bağırsak tüpüne ve oradan da mezenter boyunca arka vücut duvarının sağ ve sol yanlarına göç eder (20). Bu göç esnasında mitoz bölünmelerle primordial germ hücre sayısı 2500-5000 olmaktadır. Fertilizasyondan 5 hafta sonra göç eden primordial germ hücrelerinin uyarımı sonucu mezodermal epitelin, mezonefrozun medial ve ventral sınırları boyunca kalınlaşması ile ürogenital kıvrım şekillenmektedir. Ürogenital kıvrımın mezodermal epiteli, gonadın epitel ve stromasını oluşturmak üzere proliferer olur. Gonadal gelişimin farklılaşmamış dönemi olarak adlandırılan bu dönemden sonra, dişi embriyoda farklılaşmamış gonadın medullası gerileyerek, korteksinden ovaryumlar gelişmektedir. Erkek embriyoda ise, medulla testisi oluşturmaktadır. Fetal ovaryumda, embriyonik gelişimin 12-15. haftalarında primordial germ hücrelerinde mayoz bölünme başlar ve I. mayotik bölünmenin profaz evresinde crossing overin tamamlanmasından sonra durur. Bir veya birden çok folikülün gelişme için uyarıldığı püberte evresine kadar bu bekleme süreci devam eder.

2. ayda primitif gonad over olarak adlandırılır. Gestasyonun 7-9. haftalarında overin dıştaki zonu, az sayıda küçük pregranüloza hücreleri ile karışık primitif germ hücre tabakalarının rastgele karışması ile meydana gelen son korteks şekline doğru genişler. Vasküler bağ doku septaları 12-15. haftalarda korteksin iç kısmında bulunan medüller mezenkimden yayılmaya başlar ve 20. haftada korteksin yüzeyel kısmına yayılır. Oositler ve pregranüloza hücrelerinden meydana gelen hücresel grupların ayrılması ile korteks oluşur. Aynı zamanda pregranüloza hücreleri, tek germ hücrelerinin çevresinde primordial folliküllere dönüşmeye başlar. Follikülogenezis gestasyonun 14-20. haftalarında korteksin iç kısmında başlar ve yavaş yavaş erken neonatal dönemde dış kortekse doğru ilerler (21).

## **2.3. Overin Anatomisi**

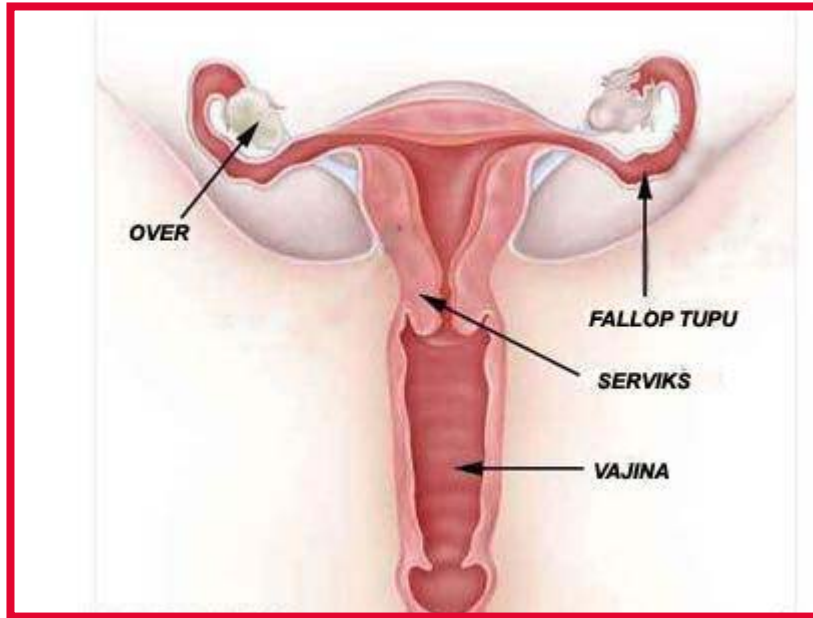
Overler, çift olup pelvik organlardır (Şekil 2.4). Uterusun her iki yanında lateral pelvik duvara yakın, uterus üzerinde bulunan periton katlantısı olan broad

ligamanının arkasında, rektumun önünde yer alırlar. Her iki over, anterior yüzünden iki katlı periton kıvrımıyla broad ligamanının arka yüzüne asılıdır (22).

Erişkinde overler ovoid şekilli olup, 2.5-5 cm uzunluğunda, 1.5-3 cm genişliğinde, 0.7-1.5 cm kalınlığında ve 4-8 gr ağırlığındadır. İç yüzünün üst kısmı fibriyalarla örtülüdür, kalan kısmı incebarsak kıvrımları ile komşudur. Ön kenarına mezoovaryum tutunur. Damarlar, sinirler ve lenfatikler “Hilus” olarak adlandırılan bu noktadan organa girerler (22-24).

Overlerin arterleri, aortanın dalı olarak şekillenmiştir. İfundibulopelvik ligament ve mezoovarial sınır boyunca uzanır. Uterus arterlerinin ovarian kolları anastomoz yapar. Yaklaşık 10 arterial dal over hilusuna penetre olur. İntraoveriyen venler arterlere eşlik etmektedir. Overin içindeki venler, hilusdaki ağa direne olurlar. Daha sonra mezoovaryumu çaprazlayarak infundibulopelvik ligament boyunca ilerler. Over venleri aynı zamanda uterin venlerin kolları ile anastomoz yaparlar. Sol overe ait ven sol renal vene, sağ overe ait ven ise vena kava inferiora direne olurlar (22).

Overin lenfatikleri, foliküllerin teka tabakalarından köken almaktadırlar. Olgun foliküllerin granuloza tabakaları lenfatiklerden yoksun iken korpus luteum ise zengin bir lenfatik ağa sahiptir. Overin lenfatikleri, damarlardan bağımsız olarak stromada ilerleyip hilusla pleksus yaparak kan damarlarına yakın olarak seyrederek. Mezoovaryuma, 4-8 efferent girmektedir. Burada tuba ve uterustan gelen dallarla subovaryan pleksusu oluştururlar. Buradan çıkan dallar böbreğin alt polü hizasında üst para-aortik lenf nodlarına direne olurlar. Aksesuar lenfatikler subovaryan pleksusu atlayarak broad ligamanı üzerinden internal iliak, eksternal iliak ve interaortik lenf nodlarına ya da round ligamanı üzerinden iliak ve inguinal lenf nodlarına direne olurlar (25).



Şekil 2.4. Overin (yumurtalık) anatomik yerleşimi ve komşulukları.

#### 2.4. Overin Histolojisi

Over, korteks ve medulla olmak üzere iki kısımdan oluşmaktadır. Korteksin dış kısmı aselüler kollojenaz bağ doku yapıda olup, folikülleri de içermektedir. İç kısmı

fibroblastlara benzeyen sıkı yerleşimli iğsi hücrelerden oluşmuş bir tabakadır. Medulla daha gevşek yapıdadır. Mezenkimal dokudan oluşan kan damarları, sinirler ve bunları çevreleyen epitel benzeri hücreleri içeren tabakadır. Bu hücreler hormonal etki gösterirler (26-28).

Overin yüzey epiteli, tüm overi çevreleyen kısmen psödostratifiye modifiye olabilen peritoneal hücrelerden oluşmaktadır. Bu epitel tabaka, keratin; EMA, Ber-EP4, CA-125, desmoplamin, vimentin, östrojen ve progesteron reseptörleri, epidermal büyüme faktörü ve FSH ile pozitif boyanma gösterirler (23, 27, 29). Hücreler basık, küboidal ya da kolunmar şekilli olabilir. Glikojen, asit ve nötral mukopolisakkaritler içerirler (30, 31). Yüzey epitel hücrelerinde mitoz bölünme yoktur. Yüzey epiteli kortikal invajinasyonlar yapıp, epitelyal inklüzyon glandlarını oluştururlar. Bu glandlarda displastik değişiklikler olabilir. Bazı araştırmacılara göre, yüzey epitelinden köken alan tümörlerin birçoğunun orijini bu invajinasyonlardır (32).

Over stroması; kortikal ve meduller olmak üzere iki kısımdan oluşmaktadır. Stromal hücreler, fibroblastları andırmakta olup, genellikle sarmal yapılar yapan ya da storiform şekil oluşturan sitoplazması az iğsi yapıda hücrelerdir. Bu hücreler sitoplazmik lipid içerebilirler. Bu hücrelerin bazıları miyoid özelliklere sahip olup, düz kas aktini ve desmini ile pozitif immünoaktivite gösterirler (27, 33, 34). Stromal hücreler değişen derecelerde kollojen ve yoğun bir retiküler ağ ile birbirinden ayrılırlar. Stromada ayrıca fibroblastik tipte hücrelerden geliştiği düşünülen luteinize stromal hücreler, enzimatik aktif stromal hücreler, desidual hücreler, endometrial stromal hücreler, desidual hücreler, düz kas hücreleri, olgun adipositler ve nöroendokrin hücreler bulunmaktadır (35).

Doğumda yaklaşık 400.000 primordial folikül over korteksi bulunur. Doğumdan sonra; follikülogenezis ve atreziye bağlı olarak sayıları azalır ve menapozda ise biter. Doğumdan sonra primordial foliküllerden yalnızca 400 tanesi ovülasyonda olgunlaşır. %99.9' u atrezi olur. Primordial hücreler, yolk sak endoderminden köken alan, overe göç eden ve overde oogonia ve oositleri oluşturacak olan germ hücrelerini içerirler. Primordial foliküller, ince bazal lamina üzerinde tek tabakalı, basık ve mitotik olarak inaktif granüloza hücreleri ile kuşatılmıştır ve içerisinde primer oositler bulunmaktadır. Oositler embriyonik gelişim esnasında mayoz bölünme 1. profaz evresinde durmaktadır (23, 27, 35).

## **2.5. Over Kanseri**

Jinekolojik kanserler, tüm kanserlerin %15' ini oluşturmaktadır. Kadın genital sistem kanserlerinden over kanseri sıklık itibariyle, serviks ve endometrium kanserinden sonra gelmektedir. Over kanseri, kansere bağlı ölümler arasında akciğer, meme ve kolondan sonra dördüncü sırada yer almaktadır. Kadınlarda görülen tüm kanserlerin %6' sı over karsinomudur. Kadın genital kanserlerinin ise %30' unu oluşturmaktadır (36).

### **2.5.1. Over Kanserlerinin Epidemiyolojisi**

Irklar göz önüne alındığında beyazlarda yıllık görülme insidansı ortalama 14.2/100.000 iken siyahlarda 9.3/100.000 olarak belirtilmektedir. Coğrafik bölgelere bakıldığında 15/100.000 olarak en yüksek oranda İsviçre' de, en düşük olarak ise 2/100.000 oranında Japonya' da olduğu görülmüştür. Endüstrileşmiş ülkelere görülme sıklığının endüstrileşmemiş ülkelere oranla daha yüksek olduğu bildirilmektedir (36-38). Sağlık Bakanlığının 2000 yılı istatistiklerine göre,



ülkemizde over kanserli olgu sayısı 634 olarak belirlenmiş olup sıklık %4.72 olarak verilmiştir (www.saglik.gov.tr).

Over kanserinin yaşam boyu görülme riski, %70'dir. Yaşa bağlı olarak da görülme sıklığı değişmektedir. Her yaşta görülebildiği gibi, 45-79 yaşları arasında en sık görülürken, 75-79 yaşları arasında pik yapmaktadır. Menopoz öncesi hastalarda görülen tümörlerin sadece %7' si malign iken menopoz sonrası dönemde bu oran %30' lara ulaşmaktadır.

Over kanserlerinin birçoğu ilk teşhis edildiğinde ileri evre olması ve nüks nedeniyle, 5 yıllık sağ kalım oranı % 30–40 arasındadır. 45 yaşından küçük olgularda 5 yıllık sağ kalım oranı %70 iken, 75-99 yaş arasındaki olgularda ise %20 ' dir. Amerikan Kanser Birliği' nin verilerine göre, 2005 yılı içinde 22.220 kadında over kanseri gözlenmiş ve 16.210 kişi ise bu nedenle ölmüştür (39).

### 2.5.2. Over Kanserlerinin Sınıflandırılması

Over tümörlerinin, embriyolojik olarak müllerian epitelini oluşturan yüzey çöломik epitel ve inklüzyon gland epitelinden, yolk salkı yani yumurta kesesinden göç eden totipotansiyel özellikteki germ hücrelerinden veya overin postnatal endokrin sistemi olan seks kordu içeren over stromasından köken aldığı ileri sürülmektedir. Over tümörleri, sınıflandırılmamış küçük bir grup tümörün yanısıra köken aldıkları hücre tipine göre 5 gruba ayrılmaktadır (Tablo 2.1) (36).

**Tablo 2.1.** Köken aldıkları hücre tipine göre over tümörlerinin gruplandırılması (36).

OVER TÜMÖRLERİ				
Köken	Yüzey epitel hücreleri	Germ hücreleri	Seks kord-stromal tümörler	Metastatik tümörleri
Sıklık	%65-70	%15-20	%5-10	%5
Yaş grubu	20 yaş üzeri	0-25 yaş arası	Tüm yaşlarda	Değişken
Tipleri	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Seröz tümör</li> <li>▪ Benign</li> <li>▪ Atipik proliferatif</li> <li>▪ Malign</li> <li>▪ Müsinöz tümör</li> <li>▪ Benign</li> <li>▪ Atipik proliferatif</li> <li>▪ Malign</li> <li>▪ Endometrioid tümör</li> <li>▪ Berrak hücreli tümör</li> <li>▪ Brenner tümör</li> <li>▪ Sınıflanamayan</li> <li>▪ Mikst tümörler</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Teratom</li> <li>▪ Benign, matür, kistik, solid</li> <li>▪ Malign (immatür)</li> <li>▪ Monodermal veya özelleşmiş</li> <li>▪ Disgerminom</li> <li>▪ Endodermal sinüs tümör</li> <li>▪ Koriokarsinom</li> <li>▪ Embriyonel karsinom</li> <li>▪ Mikst tümör</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Gonadoblastom</li> <li>▪ Granuloza-teka hücreli tümör</li> <li>▪ Granuloza hücreli tümörler</li> <li>▪ Tekoma</li> <li>▪ Fibroma</li> <li>▪ Sertoli-leyding hücreli tümör</li> </ul>	

### 2.5.2. Over Kanserlerinin Etiyolojisi ve Risk Faktörleri

İleri evre epitelyal over tümörlerinin orijini olarak over yüzey epitelyumu ve bunun inklüzyon glandlarının Müllarian metaplazisi olarak düşünülmesine rağmen BRCA gen mutasyonu belirlenmiş kadınlarda yapılan çalışmalar sonucunda ileri evre over kanserinin alternatif orijin bölgesi olarak fallopian tüpünün epitelyal yüzeyi olduğu gösterilmiştir. Düşük evreli epitelyal over tümörleri; kistadenomalar, borderline tümörler veya endometriosisden oluşmaktadır. Endometrioid ve berrak hücreli kanserlerin temelinde ise endometriosisin yattığı düşünülmektedir (40, 41).

Over kanserinde, karsinojenik proseslerin başlamasına ve ilerlemesine neden olan moleküler olaylar henüz tam olarak bilinmemektedir. Hormonal, ailesel ve çevresel faktörlerin over kanseri gelişiminde önemli rol oynadığı ileri sürülmektedir. Risk faktörlerinin anlaşılması; kanserin erken evrede belirlenmesini, uygun taramanın yapılmasını ve erken dönemde önlem alınmasını kolaylaştıracaktır.

Over kanseri ile ilişkili birçok risk faktörleri bulunmaktadır (42). Bunlar:

#### 2.5.2.1. Yaş

Over kanserinin, genç kadınlarda nadir görüldüğü ve ilerleyen yaşla beraber artış gösterdiği belirtilmiştir. Ailesel geçiş gösteren formların dışında, over kanserinin 40 yaşından önce görülmesi yaygın değildir (42).

#### 2.5.2.2. Genetik Faktörler

Over kanserlerinin çoğu sporadik olup, yaklaşık %5-10' unda ailesel geçiş gözlenmektedir (26). 50 yaşından önce over kanseri gelişen kadında, ailesel olma ihtimali yüksektir. İki tane over kanserli birinci derece yakını bulunan kadınların küçük bir bölümünde otozomal dominant geçişli üç sendromdan biri bulunabilir:

**1. Yere özgü (site-spesifik) ailevi over kanseri:** Tüm olguların %10-15' ini oluşturmaktadır. I.derece akrabalarından iki kişide over kanseri öyküsü bulunan bir kişinin riski %50' ye kadar yükselmektedir. I.derece akrabalarından bir kişide ve II.derece akrabalarından bir kişide over kanseri öyküsünün bulunması durumunda ise risk, 3-10 kat artmaktadır. I.derece akrabalarından bir kişide over kanseri varsa risk 2-4 kat artmaktadır (26).

**2. Meme-over ailevi kanser sendromu:** Bu tip ailelerde over kanseri, erken yaşlarda ortaya çıkmış meme ve over kanserli iki veya daha çok kişi ile karakterizedir. Bu kalıtsal sendrom, olguların %81' inde görülen 17q12-21 kromozomal bölgede lokalize BRCA1 gen mutasyonları ve daha az sıklıkla olmak üzere 13q kromozomal bölgede lokalize BRCA2 gen mutasyonları ile karakterizedir. Değişken penetranslı otozomal dominant kalıtım göstermektedir. Bu ailelerde meme ve over kanseri gelişme riski, meme kanseri için %35-85 (70 yaşında %82 ve 50 yaşında ise %50) iken over kanseri için ise %15-60 olarak tahmin edilmektedir (24, 27).

**3. Lynch II Sendromu:** Bu sendrom, hMSH2, hMLH1, hPMS1, hPMS2 DNA tamir genlerinin herhangi birinde meydana gelen kalıtsal mutasyon sonucu oluşmaktadır. Bu sendromda, hastada aynı anda barsak, over, endometrium ve meme kanserlerinden birkaçı aynı anda bulunmaktadır (42).

### 2.5.2.3. Hormonal Faktörler

Menopoz tedavisinde kullanılan ekzojen hormonlar, over kanseri riskini arttırmaktadır. Son yapılan çalışmalar göstermektedir ki, 5-10 yıldan fazla hormon tedavisi gören kişilerde over kanserinin görülme riski 1.5-2.0 kat artmaktadır.

İnfertilite ve ovülasyon indüksiyonu da over kanseri için risk faktörüdür.

Amenore, overyal yetmezlik gibi hipergonadotrofik hipogonadizm, polikistik over sendromu ve endometriosis de over kanseri için risk faktörü olarak gösterilmektedir (42).

### 2.5.2.4. Diğer Faktörler

Over kanserine neden olabilecek diğer risk faktörleri ise, beyaz ırktan olmak, hiç çocuk doğurmamış olmak, asbestos gibi çeşitli çevresel ajanlara maruz kalmak, sigara tüketimi, ağırlıklı olarak hayvansal yağlarla beslenmek ve yüksek kalorili diet almak ve aşırı kilolu olmak olarak sayılabilir.

Over kanser riskini arttıran faktörlerin yanı sıra riski azaltan faktörler de bulunmaktadır. Bunlar, doğum yapmış olmak, doğum kontrol hapı kullanmak, emzirme süresi ile doğru orantılı olarak azalma, tüp ligasyonu, ameliyatla rahimin çıkarılmasıdır (24, 40).

### 2.5.3. Over Kanserlerinin Tanısı, Evrelendirme ve Prognozu

Over kanserlerinde erken tanı oldukça zordur. Çünkü çoğu zaman şikayetler belirgin değildir. Karın ağrısı, şişkinlik, hazımsızlık erken evrelerdeki belirtilerdir. İleri evrelerde ise, komşu organlara ait bası bulguları, karın ağrısı, pelviste kitle ve aşağı doğru bası hissi ve vajinal kanama gibi spesifik olmayan şikayetler ortaya çıkabilir. Doktora başvurmaya neden olan en sık şikayet ise karın şişkinliğidir. Bu şikayet de, periton boşluğuna implantasyonu ve asit oluşumu ile ilişkilidir. Primer tümörün büyümesi ile komşu doku ve organlara doğru yayılım gösterir. Over tümörleri, para-aortik, mediastinal ve supraklaviküler lenf nodlarına yayılım gösterirler. İleri evrede ise başta akciğer, karaciğer ve gastrointestinal sistem olmak üzere uzak bölgelere metastaz gösterirler. Laparotomi yapıldığında olguların %50' sinde karşı overe metastazın olduğu belirlenir. Metastazı olan hastalar da birkaç ay- yıl içinde kaybedilir (36).

Over kanserinin tanısında, ultrasonografik muayene esnasında özellikle menopoz sonrası kadınlarda pelvik alanda 8 cm' den büyük ve hareketli olmayan kitle saptanması over kanserini düşündürmelidir. Şüphelenilen hastalardan, iyi bir aile öyküsü alınarak, iyi bir sistemik ve jinekolojik muayene ve smear testi yapılmaktadır. Damarlanmanın tespiti açısından, doppler ultrason ile komşu organları incelemeye yönelik radyolojik tetkikler yapılmaktadır. Ayrıca manyetik rezonans ve bilgisayarlı tomografi ile kitlenin daha iyi incelenmesi sağlanmalıdır.

Over kanserinin tanısını güçlendiren diğer bir tetkik de tümör belirteçleridir. Tümör belirteçleri normal dokuda bulunmayan ancak malign dokulardan kana salınan maddeler olarak tanımlanabilir. Kullanılan ya da araştırma safhasında olan pekçok belirteç olmasına rağmen ideal bir tümör belirteci henüz saptanmamıştır. Over kanserinde en çok kullanılan tümör belirteci, CA-125' dir. CA-125 düzeyinin yüksek saptanması tanıyı desteklemektedir. Ancak sigara içimi, erken gebelik ve endometriozis gibi durumlarda da yükselebilmesi, CA-125' in güvenilirliğini kısıtlamaktadır.

Over tümörlerinin evrelendirilmesinde, Tablo 2.2' de görüldüğü gibi FIGO ve UICC-TNM evrelendirme sistemleri kullanılmaktadır (24).

Over kanserlerinin prognozunda en önemli faktör hastalığın evresidir. Evre I' de 5 yıllık yaşam %70, evre II' de %25, Evre III' de %18 ve evre IV' de ise %0' dır.

**Tablo 2.2.** Over tümörlerinin evrelendirilmesinde FIGO ve UICC-TNM evrelendirme sistemleri

TNM Klinik Sınıflandırması*		Özellikleri
T-Primer Tümör TNM Kategorisi	FIGO Evresi	
Tx		Değerlendirmesi yapılamayan primer tümör
T0		Primer tümör bulgusu yok
T1	I	Overlerle sınırlı tümör
T1a	IA	Tümör bir over ile sınırlıdır. Kapsül sağlamdır. Over yüzeyinde tümör yoktur.
T1b	IB	Tümör her iki overde, kapsül sağlam, over yüzeylerinde tümör yoktur.
T1c	IC	Tümör bir veya her iki overle sınırlı olmakla birlikte kapsül yırtılması, yüzeyde tümör olması, periton yıkamasında veya asit sıvısında malign hücre görülmesi gibi durumlardan biri vardır.
T2	II	Bir veya her iki over tutulumu ve beraberinde pelvik yayılımı olan tümörler.
T2a	IIA	Uterus ve/veya tüplere yayılım ve/veya implantasyon
T2b	IIB	Diğer pelvik dokulara yayılım
T2c	IIC	Periton yıkaması veya asitte malign hücre ile birlikte pelvik yayılımı (2a veya 2b)
T3 ve/veya N1	III	Mikroskopik olarak doğrulanan pelvis peritoneal metastazlar ve/veya bölgesel lenf nodu olan bir veya her iki overde yerleşen tümörler
T3a	IIIA	Pelvis dışında mikroskopik periton metastazları
T3b	IIIB	Pelvis dışında en büyük çapı 2 cm veya daha küçük olan makroskopik periton metastazları
T3c ve/veya	IIIC	Pelvis dışında en büyük çapı 2 cm' den daha büyük olan periton metastazları ve/veya bölgesel lenf nodu metastazları
N1		
M1	IV	Periton metastazları dışında uzak metastazlar

#### N-Bölgesel lenf nodları

NX	Bölgesel lenf nodları değerlendirilememekte.
N0	Bölgesel lenf nodu metastazı yok.
N1	Bölgesel lenf nodu metastazı mevcut.

#### M-Uzak metastaz

MX	Uzak metastaz değerlendirilememekte.
M0	Uzak metastaz yok.

M1 Uzak metastaz mevcut.

#### EVRE GRUPLARI\*

Evre IA	T1a	N0	M0
Evre IB	T1b	N0	M0
Evre IC	T1a	N0	M0
Evre IIA	T2a	N0	M0
Evre IIB	T2b	N0	M0
Evre IIC	T2c	N0	M0
Evre IIIA	T3a	N0	M0
Evre IIIB	T3b	N0	M0
Evre IIIC	T3c	N0	M0
	Herhangi bir T	N1	M0
Evre IV	Herhangi bir T	Herhangi bir N	M1

\*: TNM/FIGO Evreleme Sistemi-2002

## 2.6. Epitelyal Over Tümörleri

Over tümörlerinin sıklıkla köken aldığı hücre tipi, overin yüzey epiteldir. Menapoz sonrası tanısı konulan olguların %80'inde epitelyal kökenli over tümörleri görülmektedir (39).

Epitelyal over tümörleri, oldukça heterojen olup köken aldıkları hücre tipine göre farklı gruplarda incelenmektedir. Epitelyal over tümörlerinin, köken aldıkları hücre tipine göre sınıflandırması Tablo 2.3 'de görülmektedir.

**Tablo 2.3.** Epitelyal over tümörlerinin histolojik sınıflandırılması

EPİTELYAL OVER TÜMÖRLERİ	
Histolojik tipi	Hücre Tipi
Seröz	Endosalpingeal
Müsinöz	Endoservikal
Endometrioid	Endometrial
Berrak hücreli	Müllerian
Brenner	Transitional
Karışık epitelyal	Karışık
Andifferansiye karsinoma	Anaplastik

### 2.6.1. Epitelyal Over Tümörlerinin Sınıflandırılması

Epitelyal over tümörlerinin herbir histolojik sınıfı; benign, borderline ve malign olmak üzere üç gruba ayrılmaktadır. Müsinöz ve endometrioid borderline tümörler, invaziv karsinoma ile ilişkili iken, seröz borderline tümörler ise seröz karsinoma ile ilişkilidir. En yaygın görülen histolojik alt tip, seröz papiller tümörler (tüm kanserlerin %50-60' ı) iken en az görülen ise endometrioid (%25), berrak hücreli (%4) ve müsinöz (%4) over tümörleridir (43).

Over tümörlerinin histolojik alt tiplerine göre sınıflandırması aşağıdaki gibi yapılmaktadır:

#### Seröz Tümörler

<b>Malign</b>	Adenokarsinom Yüzey papiller adenokarsinomu Adenokarsinofibrom (malign adenofibrom)
<b>Borderline</b>	Papiller kistik tümör Yüzey papiller tümörü Adenofibrom, kist adenofibrom
<b>Benign</b>	Kistadenom Papiller kistadenom Yüzey papillomu Adenofibrom, kistadenofibrom

#### Müsinöz Tümörler

<b>Malign</b>	Adenokarsinom Adenokarsinofibrom (malign adenofibrom)
<b>Borderline</b>	İntestinal tip Endoservikale benzeyen
<b>Benign</b>	Kistadenom Adenofibrom, kistadenofibrom Müsinöz kistik tümör ve mural nodüller Müsinöz kistik tümör ve psödomiksoma peritonei

#### Endometrioid Tümörler

<b>Malign</b>	Adenokarsinom-NOS Adenokarsinofibrom Malign müllerian mikst tümör Adenosarkom Endometrial stromal sarkom İndifferansiye over sarkomu
<b>Borderline</b>	Kistik tümör Adenofibrom, kistadenofibrom

**Benign** Kistadenom  
Adenofibrom, kistadenofibrom

#### **Berrak hücreli tümörler**

**Malign** Adenokarsinom  
Adenokarsinofibrom (Malign adenofibrom)  
**Borderline** Kistik tümör  
Adenofibrom, kistadenofibrom

#### **Brenner tümörler**

**Malign** Transizyonel hücreli karsinom (non-Brenner tip)  
Malign Brenner tümörü  
**Borderline** Brenner tümörü  
Prolifere tip  
**Bening** Brenner tümörü  
Metaplastik tip

#### **Mikst Tümörler**

#### **Sınıflanamayan Tümörler**

##### **2.6.1.1. Seröz Tümörler**

Seröz tümörler, over yüzey epitelinin invajinasyonu ile gelişmektedir. Tuba epiteline benzeyen hücre tiplerinden oluşur (20). Seröz sıvı salgılama özelliğine sahiptirlerdir. Seröz tümörlerinin yaklaşık %30' u bilateraldir (36).

Tüm over tiplerinin %30' unu oluşturmaktadır. Seröz kistadenom-adenofibrom, borderline seröz tümörler ve seröz karsinom olmak üzere 3 gruba ayrılırlar.

En sık görülen tipi seröz kistadenom ve adenofibromdur. Bunlar benign over tümörlerinin %30' unu, tüm epitelyal over tümörlerinin %16' sını ve tüm seröz over tümörlerinin %58' ini oluşturmaktadır. Çapları 1-10 cm' dir. Ortalama görülme yaşı 41' dir. Seröz kistadenom-adenofibromların %12-23' ü bilateraldir (22, 24).

Borderline seröz tümörler, seröz tümörlerin %10' unu oluşturur. %37 oranında bilateraldirler. Düşük malign potansiyelli bir tümördür. %50' si 40 yaşından önce görülür. Makroskobik olarak, kistik, solid, papiller gelişim veya bunların kombinasyonu şeklinde görülebilir. Bu tümör tipinde nekroz ve kanama alanları yoktur. Kist genellikle seröz sıvı veya müsinöz sıvı içermektedir. Bu tip tümöre sahip olguların %40' ında ekstraovarian implantlara sahiptir. Abdominal kavitede multiple odaklı, pelvis omentum ve lenf nodlarını içeren komşu dokularda sekonder oluşumlarla birlikte olabildiği gösterilmiştir. İstisna olarak abdominal kavite dışına metastazlar görülmektedir. İmplantlar, invaziv ve invaziv olmayan olmak üzere histolojik olarak iki gruba ayrılır. İnvaziv implantlar, keskin kenarlı irregüler glandlar oluşturan atipik hücreler ile karakterizedir. Mikroinvazyon odaklı borderline malign tümörler, tek hücreler, kribriform glandlar veya stromaya uzanan papiller yığınlar ve

epitel ile stroma arasında boş alanlarla tanımlanabilirler. Lenfatik invazyonlar görülebilir. Hastalığın görülme yaşı erken olup, evre I' dir. Bazen gebe hastalarda da görülebilir. İnvaziv olmayan implantlarda, tek veya yığın halinde atipik hücreler, psammoma cisimleri, nekroz, kolesterol yarıkları veya kanamayla birlikte olabilir (24,36).

Maligın seröz karsinomlar, overin invaziv epitelyal tümörlerinden olup iyi diferansiye olmuş tümörlerde tuba epiteline benzer görünümde hücre gruplarından oluşurlar. Nükleus her büyük büyütme sahada 0-2 mitozlu, yuvarlakta ovale tek formdur. Seröz karsinomların %80' inde laminasyon gösteren kalsifiye psammom cisimleri bulunur. Makroskopik olarak çapı 20 cm' nin altında değildir. Tüm maligın over tümörlerinin %50' sini oluştururlar. Genellikle, 45-65 yaşları arasında görülmektedir (24).

#### **2.6.1.2. Müsinöz Tümörler**

Tüm over tümörlerinin %25' ini oluşturmaktadırlar. Orta yaşta daha sık görülmektedir. Bu tümörlerin %80' i benign veya borderline ve %15' i ise maligındır. Benign olanların %5' i ve maligın olanların ise %10'u bilateraldir. Makroskopik olarak seröz tümörlere benzerler. Ancak bunlar daha büyük ve daha multioküler olma eğilimindedir. Glikoproteinlerce zengin jelatinöz sıvı içeren büyük kitleler oluştururlar. Mikroskopik olarak kistik yapıları döşeyen epitelin apikal yüzeylerinde sekresyon vaküülleri izlenen, silyasız, yüksek prizmatik epitel hücrelerinden oluştuğu gözlenir. Sınır lezyonlar ve maligın lezyonlarda peritona yayılım oluşur. Batın içindeki organlarda yapışıklıklar, barsak tıkanıklıkları oluşur (24, 36, 43, 44).

#### **2.6.1.3. Endometrioid Tümörler**

Over tümörlerinin %20' sini oluştururlar. Solid yada kistik yapıda olabilirler. Endometrioid tip tümörü bulunan olguların %15' inde endometriosiz görülmektedir. %40' unda bilateral tümör oluşumu söz kounsudur. Genellikle maligın olarak seyretmektedir. Bu tümör bulunan bulunan olguların %15-30' unda aynı anda endometrium karsinomu da bulunmaktadır. Diğer tip over karsinomları taklit edebilmektedir. Bazen seks kord yapılarına benzeyen mikroskopik görünüm olabilmektedir. Beş yıllık sağ kalım oranı %40-50' dir (22, 45).

#### **2.6.1.4. Berrak Hücreli Tümörler**

Geniş berrak epitel hücreleri ile karakterizedir. Müllerian kanal kökenli ve endometrioid karsinomun bir varyantı olarak düşünölmektedir. Genellikle solid ama bazen de kistik yapıda olabilmektedir. Solid yapıda olanlarda, tümör hücreleri adalar veya tubüller yaparlar. Kistik yapılarda ise kist iç yüzeyi döşemektedir. Daha çok agresif davranış gösterirler. Overle sınırlı tümörlerde 5 yıllık sağ kalım oranı %50' dir. Benign ve borderline tipi çok nadirdir (45,46).

#### **2.6.1.5. Brenner Tümörler**

Epiteli mesaneyi döşeyen hücrelere benzeyen, nadir olarak görölen ve genellikle benign olarak seyreden tümördür. Genellikle tek taraflı, solid, veya kistik olabilen tümörlerdir. 1 cm ile 20-30 cm çapta olabilmektedir. Genellikle düzgün yüzeyli ve kapsüllüdür. %90' ı tek taraflıdır. Müsinöz glanlarda bulunabilmektedir. Yüzey epiteli kaynaklı veya embriyogenesiz esnasında germinal çıkıntı içinde sıkışan ürogenital epitelden de kaynaklanabilmektedir. Çoğu benign formda olmak üzere



sınırdaki ve malign tipleri de görülebilmektedir. Benign ve borderline komponent içermeyen malign tipine transisyonel karsinom adı verilmektedir (22, 24).

### 2.6.2. Epitelyal Over Tümörlerinde Genetik Değişimler

Epitelyal over kanserinin moleküler mekanizmasının tam olarak aydınlatılmasıyla ve özellikle erken evre biyolojik belirteçlerin belirlenmesi ile hastalığın tedavisine yönelik oldukça spesifik ve etkili tedavi yöntemleri seçilebilmektedir. Ancak yapılan çalışmalar da göstermektedir ki epitelyal over tümörlerinin histolojik alt tiplerinde farklı genetik değişimler bulunmaktadır (Tablo 2.4) (47, 48, 49)

Overin yüzey epitel hücrelerinde, Müllerian inklüzyon kist hücrelerinde meydana gelen genetik değişiklikler ve endometriosis epitelyal over kanserinin histolojik alt tiplerinin gelişim kaynakları olarak gösterilmektedir. Over yüzey epitel hücrelerinde homeobox (HOX) genlerinin anormal ekspresyonları, bu hücrelerin endometriosis yada müllerian inklüzyon kistleri yönünde farklılaşmasına neden olmaktadır. Fare over epitel hücrelerinde yapılan çalışmalarda, HOX9 gen ekspresyonundaki değişimin yüksek dereceli seröz tümör, HOX10'un endometrioid tümör ve HOX11'in ise müsinöz tümör oluşumuna yol açtığı gösterilmiştir (50).

Seröz epitelyal over kanseri, over yüzey epitelinden, over korteksinin Müllerian inklüzyon kistlerinden veya endometriosisden köken almaktadır. p53 ve K-ras gen mutasyonları seröz epitelyal over kanserinin gelişiminde primer olarak rol oynamaktadır. p53 geni, 17p13.1 kromozomal bölgede lokalizedir. Hücre döngüsünde, DNA tamir ve apoptozda önemli rol oynayan bir tümör baskılayıcı gendir. Seröz epitelyal over tümörlerinde p53 gen mutasyonları yaklaşık %60 sıklıkla görülmektedir. düşük dereceli seröz tümörlerde de K-ras gen mutasyonları %67 sıklıkla görülmektedir (51).

Müsinöz over tümörleri iki değişim sonucu gelişebilmektedir. Bunlardan birisi, over korteksindeki Müllerian epitellerinde HOX11A gen ekspresyonu sonucu müsinöz tümörler oluşabilir. İkinci olarak ise, proto-onkogen aktivasyonuna neden olan gen mutasyonlarıdır. Müsinöz tümörlerde en sık görülen gen mutasyonu, K-ras gen mutasyonlarıdır. K-ras geninin 12. ve 13. kodonlarında %68 sıklıkla mutasyon belirlenmiştir. Kodon 12 gen mutasyonları daha sık olmak üzere, müsinöz kistadenomalarda %56, borderline müsinöz tümörlerde %73 ve müsinöz karsinomalarda ise %85 sıklıkla görülmektedir (52).

Endometrioid epitelyal over tümörlerinin endometriosisin ilerlemesi sonucu oluşabileceği gösterilmiştir. Endometriosisin moleküler mekanizması tam olarak aydınlatılmamıştır. Meta analizler sonucunda, gen polimorfizmlerinin endometriosis ile bağlantılı olamayacağı gösterilmiştir. Spesifik gen mutasyonları belirlenmiştir. HOX10A geninin metilasyonunun endometriosis ile ilişkili olduğu belirlenmiştir. PTEN genini içeren kromozomal lokustaki değişimler, endometriosisli olgularda gösterilmiştir. Endometriosisin endometrioid over tümörüne doğru ilerlemesi, PTEN gen ekspresyon kaybı, DNA tamir gen kayıpları ile ilişkilidir. Wnt/ $\beta$ -katenin ve PI3K/PTEN sinyal yolları endometrioid tip epitelyal over tümörleri ile ilişkilidir. Endometrioid over tümörleri bu değişimler ile

ilişkili olarak iki grupta incelenebilir. Bunlardan biri, Wnt/ $\beta$ -katenin ve PI3K/PTEN sinyal yollarında herhangi bir değişim olmaksızın p53 gen mutasyonları evre I ve II tümörlerin oluşumudur. Diğerisi ise, p53 geni etkilenmeksizin Wnt/ $\beta$ -katenin ve PI3K/PTEN gen mutasyonları sonucu evre I tümörlerinin gelişimidir (53).

**Tablo 2.4.** Epitelyal over tümörlerinde belirlenmiş genetik değişimler

<b>Histolojik Tümör Tipi</b>	<b>Bilinen Moleküler Genetik Değişiklikler</b>
Düşük dereceli seröz karsinoma	*BRAF ve KRAS gen mutasyonları (%67) Mikrosatellit instabilitesi 1p, 4p, 5q, 6p, 8p, 9q, 12q, 13q, 15q, 16p, 17p, 17q, 18p, 18q, 19p, 20p and Xp' de LOH
Yüksek dereceli seröz karsinoma	*p53 gen mutasyonları (%50-80) BRCA1/2 gen mutasyonları HER2/neu (%10-20) ve AKT2 (%10-17) gen amplifikasyonları ve aşırı ekspresyonları p16 gen inaktivasyonu (%10-17)
Müsinöz karsinoma	*KRAS gen mutasyonları (>%60) p53 gen mutasyonları
Endometrioid karsinoma	*PTEN geninde LOH veya mutasyonlar (%20) $\beta$ -Katenin gen mutasyonları (%16-54) KRAS gen mutasyonları (%4-5) Mikrosatellit instabilitesi (%13-50) 10q23.3' de LOH
Berrak hücreli karsinoma	*KRAS gen mutasyonları (%5-16) Mikrosatellit instabilitesi (%13) TGF- $\beta$ RII gen mutasyonları (%66)
Malignant karışık tümörler	*p53 gen mutasyonları (>%90)
Malignant Brenner tümör	Henüz belirlenmemiş.
Andiferansiye karsinomalar	Henüz belirlenmemiş.

Epitelyal over tümörlerinin erken evrelerde tespit edilebilmesi ve prognozunun belirlenmesini sağlayacak biyolojik belirteçleri belirlemeye yönelik olarak yapılan gen ekspresyon çalışmaları sonucu önemli veriler elde edilmiştir. Hough ve arkadaşları, SAGE ve immünohistokimya yöntemleri ile yüksek dereceli seröz epitelyal over tümörlerinde, Klaudin-3, Klaudin-4, ApoJ, APOE, HLA-DR, Glutasyon peroksidaz-3, Mesotelin, MUC1 ve HE4 gen ekspresyonlarında 10 katlık bir artışın olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca, PAI-1, Galektin-1, Vineksin- $\beta$  genlerinin ekspresyon düzeylerinde azalma belirlemişlerdir (54). Sonuç olarak bu genlerin epitelyal over tümörlerin prognozunu belirlemede kullanılabileceğini göstermişlerdir. Lu ve arkadaşları da, semikantitatif RT-PCR, global gen ekspresyon analizi ve immünohistokimya yöntemleri ile epitelyal over tümörlerinde biyolojik belirteçleri belirlemeye yönelik olarak farklı evrelerde ve histolojik alt tiplerde olan 42 epitelyal

over tümör dokusu çalışmışlardır. Klaudin-3, Vaskular endotelial büyüme faktörü (VEGF), MUC1 ve CA125 ekspresyon düzeylerindeki artış belirlemiştir (55). Epitelial over tümörlerinin taranmasında, bu genlerin kombine olarak kullanılması ile bir biyolojik belirteç panelinin oluşturulabileceği gösterilmiştir. Shayesteh ve arkadaşları ise, neoplazide rol oynadığı bilinen bir lipid kinaz olan Fosfotidilinozitol 3'-kinazın (PI3K) epitelial over tümörlerinde rol oynayan önemli bir onkogen olduğunu belirlemiştir. Epitelial over tümör örneklerinin %6.6' sında somatik mutasyonlar ve %24.5' inde ise amplifikasyon olduğunu belirlemiştir (56).

Epitelial over tümörlerinde global gen ekspresyon çalışmaları ile ekspresyon değişiklikleri belirlenmiş olan spesifik genlere yada sinyal yollarına yönelik tedavi protokollerinin geliştirilmesi ile etkili bir tedavi olanağı sağlanabilir.

### **2.6.3. Epitelial Over Tümörlerinde Metastaz**

Tümörün gelişim basamakları; proliferasyon, transformasyon, invazyon ve metastaz olarak sıralanabilir. Metastaz, tümör hücrelerinin primer tümör odağından ayrı bir doku ya da organda oluşturdukları ikincil tümör odakları olarak tanımlanmaktadır. Kanserde metastaz, malignansinin ilerlemesinde son basamak olarak ifade edilmektedir.

Metastazda malign hücrelerin vücut içine yayılımı; vücut boşluklarına veya yüzeylere doğrudan yerleşimiyle (transçölemik metastaz), lenfatik yolla ve hematojen yolla gerçekleşmektedir. Vücut boşluklarından, en sık periton boşluğu olmakla birlikte plevral, perikarda, subaraknoid ve eklem boşluklarına yayılım göstermektedir. Bu tip yayılım en sık over tümörlerinde ve gastrointestinal sistem tümörlerinde gözlenmektedir. Lenfatik yolla yayılım ise en sık tercih edilen yayılımdır. Özellikle malign epitelial tümörlerde lenfatik yolla yayılım görülür. Hematojen yayılım özellikle malign mezenşimal tümörlerin tercih ettikleri yoldur. Hematojen metastazlar özellikle, karaciğer ve akciğere olur. Venöz invazyonda, tümör hücreleri primer tümör bölgesinin doğal akım yönünü izler. Renal hücreli karsinom özellikle venöz invazyonu tercih etmektedir. Arteriyal yayılım ise, tümör hücrelerinin pulmoner kapiller yatağı veya pulmoner arteriovenöz şantları geçtiği zaman meydana gelir (36).

Tümör metastazının genetik orijini açıklamaya yönelik olarak iki hipotez ileri sürülmektedir. Bunlardan birisi; "Seed-and-soil" hipotezidir. Bu hipoteze göre, tümör genetik olarak heterojen yapıda olup metastaz olayı genetik olarak metastatik fenotip kazanmış klonlardan kaynaklanmaktadır. Bu klonların da fenotipi, metastazın yerini belirlemektedir. İkinci hipoteze göre ise, metastatik hücreler primer tümörden farklı genetik olarak seçilmiş klonlar değildir. Primer tümör hücreleri ile genetik olarak aynı tümör hücre klonlarından rastgele olaylarla metastaz olayı gerçekleşmektedir. Bu hipotezlerden "seed-and-soil" hipotezi daha çok kabul görülen hipotez olmasına rağmen, meme kanseri gibi bazı kanser tiplerinde yapılan çalışmalar gen ekspresyon profili çalışmaları sonucunda, primer tümör ile metastatik hücrelerin gen ekspresyon profilinin aynı olduğu gösterilmiştir. Epitelial over kanserlerinde, primer tümör ve ve bu tümörlerin oluşturdukları metastazların genetik yapı ve gen ekspresyon profilleri arasındaki farklılıkları göstermeye yönelik oldukça az yayın bulunmaktadır (57). Hibb ve arkadaşları, 17 seröz papiller over kanserli olgunun primer tümörleri ile omentum metastazlarında gen ekspresyon profillerinin aynı olduğunu göstermişlerdir (58). Bayani ve arkadaşları da, karşılaştırmalı genomik hibridizasyon tekniği ile primer ve metastatik tümör örneklerindeki kromozomal değişimlerin aynı

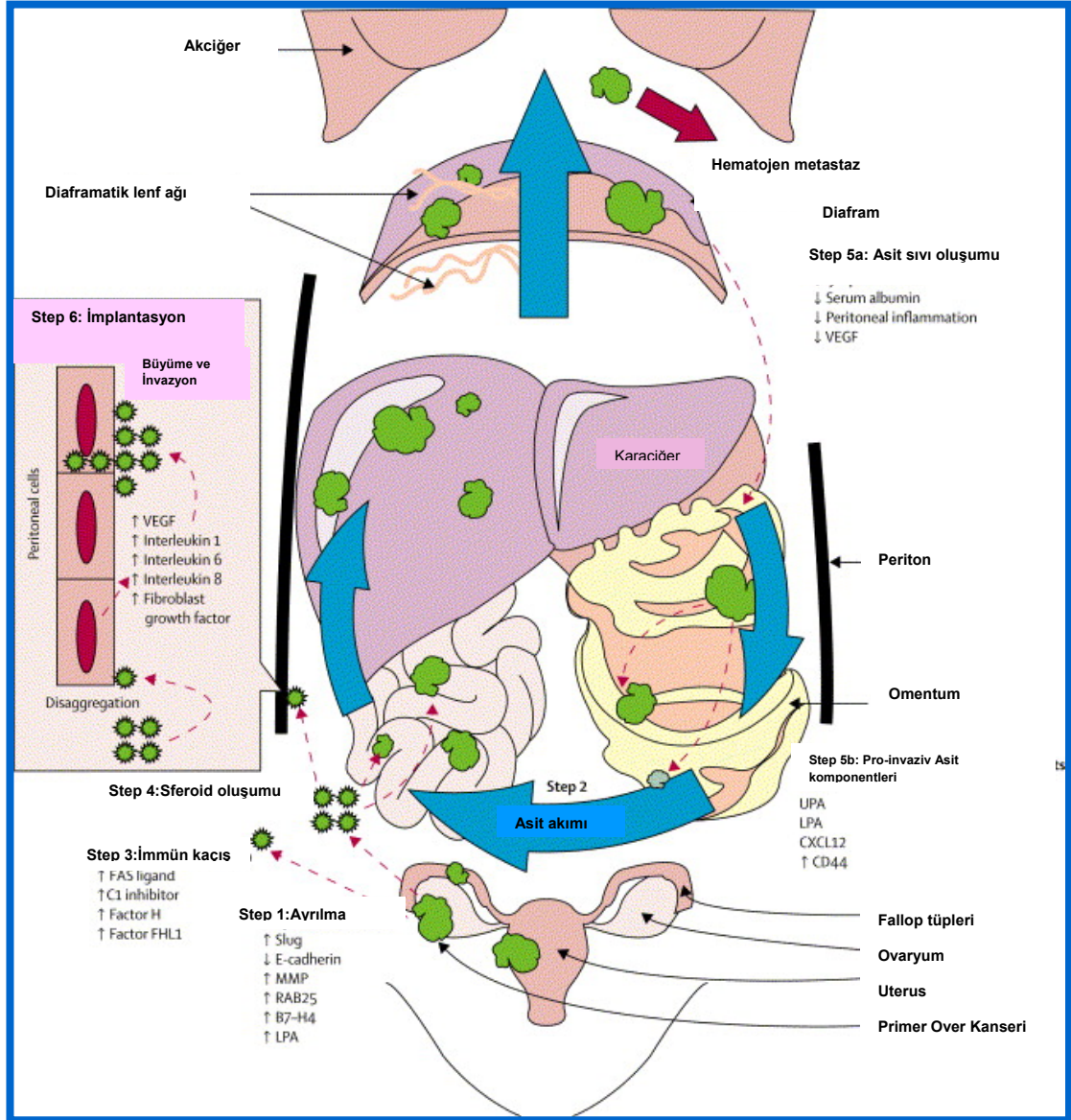
olduğunu göstermişlerdir (59). Bu iki çalışma, epitelyal over tümörlerinde metastaz için ikinci hipotezi doğrulamaktadır. Ancak bir başka çalışmada, karşılaştırmalı genomik hibridizasyon yöntemi ile primer tümör odağında kompleks kromozomal değişimler belirlenirken metastatik tümör odağında ise normal kromozomal yapının belirlenmesi epitelyal over tümörlerinde metastaz mekanizmasının açıklanmasına yönelik olarak daha fazla çalışmanın yapılması gerekliliğini göstermektedir.

Epitelyal over tümörleri oldukça lenfofilik olup, lenf nodu metastazları sık gelişmektedir. Lenf nodu metastazları erken evrede %12-25 arasında gözlenirken, geç evrede ise bu oran %46-76' lara kadar çıkmaktadır. Bu nedenle son yıllarda epitelyal over kanserlerinde lenf nodu metastazları üzerine çok sayıda çalışma yapılmaktadır. Omentum metastazları ise diğer kanser tiplerinde de görülmesine rağmen, en sık epitelyal over tümörlerinde görülmektedir. Bunun nedeni, tam olarak bilinmemesine rağmen, overlerin peritoneal kaviteye oldukça yakın olmasından dolayı olabileceği ileri sürülmektedir. Epitelyal over tümörlerinin bilateral olması sıklıkla görülmektedir. Bu durum ya bir overdeki tümörün diğer overe metastazı ile yada her iki tümöründe primer tümör olması ile açıklanabilir. Seröz adenokarsinomaların %57.5' i bilateral iken, müsinöz tümörlerin %21.3' ü, berrak hücreli tümörlerin %13.3' ü, endometrioid tümörlerin %28.6' sı ve diğer epitelyal over tümörü tiplerinin ise %35.6' sı bilateraldir (57).

Epitelyal over tümörlerinde metastaz, her basamağında farklı molekülün rol oynadığı çok basamaklı olaylar zinciri sonrasında ortaya çıkmaktadır.

Metastazın birinci basamağında tümör hücresinin primer tümör odağından ayrılması gerçekleşmektedir. Bu basamakta hücre ile ekstraselüler matriks etkileşimi önemlidir. Hücre-ekstraselüler matriks etkileşimini kaybeden bir hücre apoptosise gitmektedir ve bu olay da anoikis olarak tanımlanmaktadır. Kanser hücrelerinin ekstraselüler matriks etkileşimi olmaksızın proliferasyon yapabilme özellikleri metastaz için oldukça önemlidir. Over kanserinde apikal vezikül trafiğinden rol oynayan RAB25 geninin aşırı ekspresyonunun, apoptozu ve anoikisi önlediği, tümör agresivitesine yol açtığı gösterilmiştir. T-hücre yanıtının negatif regülatörü olarak bilinen hücre yüzey proteini B7-H4' de, malignant transformasyona yol açmakta ve hücreyi anoikise karşı dirençli kılmaktadır. Metastazın bu ayrılma basamağında, metastatik hücrenin ayrılması sırasında matriks metalloproteinazlardan (MMP) MMP1 ve MMP14, tümör hücresinin sağ kalımını arttırmaktadır. Tümör hücresinde metastatik potansiyelin gelişebilmesi için, epitelyal-mezenşimal dönüşümün olması gerekmektedir. Over kanserinde, epitelyal hücreler depolarize olarak hücre-hücre kontaklarını kaybederler ve fibroblast benzeri morfolojik özellik kazanırlar. Epitelden mezenşimal hücreye dönüşüm metastatik kanser hücresine sağ kalım avantajı sağlamaktadır. Over kanser hücrelerinde ve sağlıklı over yüzey epitelinde, endotelin 1 ve reseptörünün aşırı ekspresyonu ve E-kaderin gen ekspresyonunun kaybı epitel hücresinin mezenşimal hücreye dönüşümünü sağlayan faktörlerdir.  $\alpha(v)\beta6$  integrinin aşırı ekspresyonu ekstraselüler matriksin plazminojen bağımlı degradasyonunu arttırmakta ve hücre ekstraselüler matriks adhezyonunun zayıflaması ile tümör hücresinin primer odaktan ayrılması gerçekleşmektedir. Tümör hücresinin ayrılması ve motilitesini sağlayan diğer bir faktörde, hepatosit büyüme faktörüdür. Over kanserlerinde bu büyüme faktörünün reseptörü olan c-Met' in aşırı ekspresyonunun hepatosit büyüme faktörü indüklü hücre motilitesine yol açtığı gösterilmiştir. E-kadherin ekspresyon değişikliği de metastazın bu basamağında oldukça önemlidir. Normal over yüzey epitelinde ekspresyonu gözlenmeyen E-kadherin gen

ekspresyonunun, metastatik over tümörlerinde primer tümör odağına göre arttığı gösterilmiştir (57).



Şekil 2.5. Metastazın gelişim basamakları (57)

Tümör hücrelerinin lokal olarak gelişmesi ve metastazı için anjiogenez yani damarlanmanın olması gerekmektedir. 1-2 milimetre boyutlarındaki solid tümörlerde vaskularizasyon yoktur. Birçok solid tümör tipinde anjiogenez yokluğunda tümör ancak 1-2 milimetre oranına kadar büyüebilir ve damarlanma olmayan tümör nekroza uğramaktadır. Tümörde yaşanan hipoksi durumu anjiogenik değişime yol açmaktadır. Hipoksi durumu iki faktör sonucu oluşur. Birinci olarak; tümör dokusunda gözlenen yüksek oranda hücresel proliferasyon tümör dokusunun merkezindeki hücrelerin kan damarlarından uzaklaşmasına yol açarak hipoksia oluşur. İkinci olarak; tümör dokusunda kan damarlarının yapısından dolayı defektif tümör mikro sirkülasyonu hipoksi durumunun oluşumuna yol açar (60). Birçok

büyüme faktörü ve sitokinler, endotelial hücre büyümesi ve migrasyonunu uyarak anjiogenezi sağlamaktadır. Bunlardan en önemlisi, vaskular endotelial büyüme faktörü (VEGF), bazik fibroblast büyüme faktörü (bFGF), platelet kökenli endotelial hücre büyüme faktörü/timidin fosforilaz (PD-ECGF), anjiopietin 1 (Ang-1) ve 2 (Ang-2), ephrin gen ailesi üyeleri, tümör hücreleri tarafından salınan anti-anjiogenik moleküller olan trombospondin 1, anjiostatin, endostatin gibi moleküllerdir. Anjiogeneizde primer olarak VEGF rol oynamaktadır. VEGF, endotelial hücre proliferasyonu, migrasyonu ve damar oluşumunu sağlamaktadır. Over kanser hücrelerinde VEGF geninin aşırı ekspresyonu anjiogenezin major aracısı olup, bu olguların serum VEGF düzeyi prognostik faktör olarak kullanılabilir (61).

Transçölemik metastaz, malignant asit sıvısı oluşumu ile ilişkilidir. Ayrıca, tümör hücreleri tarafından lenfatik damarların tıkanması, peritoneal kaviteden lenfatik drenajın azalması, peritoneal kavite astarının kılcal damarlarının hiperpermeabilitesi de asit sıvısının oluşmasına neden olmaktadır. Over karsinoma ksenograft modellerinde VEGF gen inhibitörlerinin kullanılması asit sıvısı oluşumunu azalttığı gösterilmiştir. Otokrin motiliti faktör ve reseptörünün, VEGF aracılı asit birikimine yol açtığı ileri sürülmektedir (61, 62). Asidik sıvı içinde bulunan diğer moleküllerin de epitelyal over tümör hücrelerinin invazyonuna yol açtığı gösterilmiştir. over kanserli olguların asidik sıvıları içinde yüksek konsantrasyonda bulunan Lisofosfatidik asitin, proteaz ekspresyonunu arttırarak, anjiogenik faktörlerin ve integrin ekspresyonunu arttırarak, apoptosis inhibe ederek metastaza yol açmaktadır. asidik sıvı içinde yüksek konsantrasyonlarda bulunan CXCR4 kemokin reseptörü ve ligandı CXCL12 integrin  $\beta$ 1 ekspresyonunu indükleyerek kanser hücrelerinin migrasyonuna yol açmaktadır (63).

Tümör hücrelerinin peritoneal implantasyonunu sağlayan mekanizmalar da henüz tam olarak aydınlatılmış değildir. Tümör hücrelerinin peritoneal yüzeye tutunmasıyla, metastatik hücre proliferasyonunda ve mezotelyuma invazyonunda rol oynamaktadırlar. Matrik metalloproteazlar (MMP), stromal invazyonda önemli rol oynamaktadırlar. MMP2 geninin aşırı ekspresyonunun epitelyal over kanserlerinin peritoneal invazyonunu sağladığı gösterilmiştir. Klaudin 3, klaudin 4 ve endotelin 1 gen ekspresyonlarındaki değişiklikler, MMP2 ve MMP14 gen ekspresyonunu arttırarak tümör hücre invazyonuna yol açmaktadır. Ayrıca peritoneal hücrelerden ve bu hücrelerin ilişkide olduğu immün ve stromal hücrelerden serözal inflamasyona yanıt olarak salınan interlökin 1, 6 ve 8 gibi sitokinler ve kemokinler kanser hücrelerinin implantasyonunu indüklemektedir (64).

Son 10 yılda kanserli olgularda metastaz olayının erken evrede belirlenmesi ve tedavisinde gelişmeler olmasına rağmen, kanser nedeniyle ölümlerde metastaz halen major sebep olarak gözlenmektedir. Bu nedenle metastatik potansiyeli belirleyen parametrelerin belirlenmesi klinik olarak çok önemlidir. Overin yüzey epitelyumu kanserlerinin mekanizmasının ortaya çıkarılması için hem proliferasyon hem de metastazında rol oynayan genlerin karakterizasyonu ve biyolojik mekanizmalarının aydınlatılmasına ihtiyaç duyulmaktadır. Bu nedenle diğer kanser türlerinde fonksiyonu gösterilmiş olan AMF/PGI ve reseptörü AMFR, CTGF, RAB25A, RASSF2A ve MDR1 genlerinin epitelyal over tümörlerindeki rolünü gösterebilmek için bu çalışma planlanmıştır.

## **2.7. AMF/PGI (Homo sapiens glucose phosphate isomerase) ve Reseptörü AMFR (Homo sapiens autocrine motility factor receptor, transcript variant 2)**

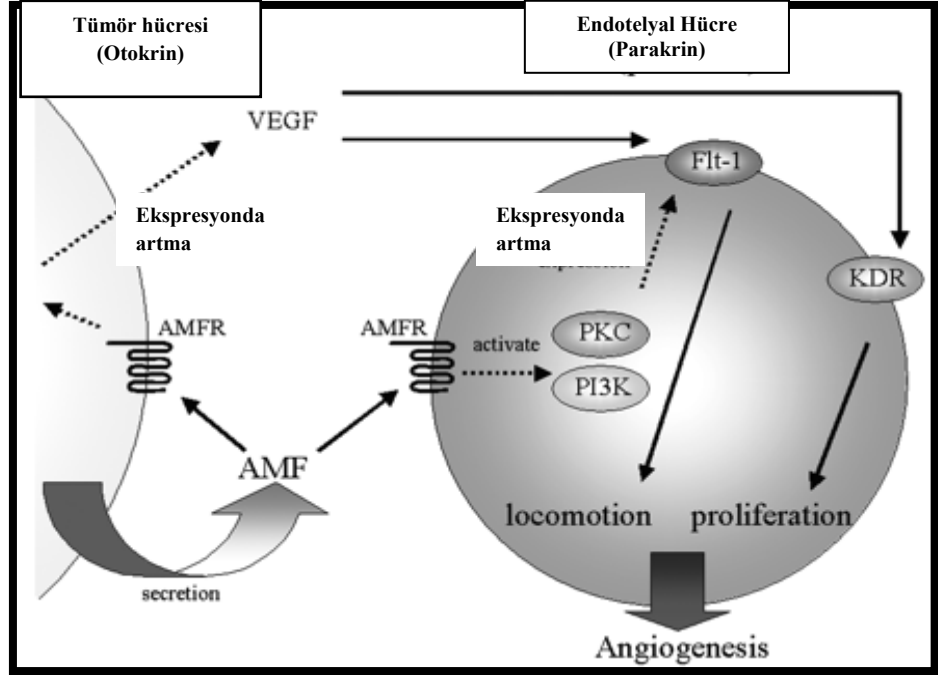
Otokrin motiliti faktör (AMF/PGI), insana ait A2058 melonama hücre hattının kültür besiyerinden pürifiye edilmiştir. Kromozomal lokalizasyonu 19q13.1' dir. Malignant ve neoplastik hücreler tarafından sentezlenen ekstraselüler fosfohekzo isomerazdır. Bu protein, 55 kDa ağırlığında bir sitokin olup, otokrin tarzda hücrelerin hareketini uyarmaktadır. Reseptörü yoluyla sitokin benzeri aktivite göstermektedir. Primer olarak sitoplazmada tubular veziküllerde lokalizedir. AMF/PGI, reseptörü AMFR ile malignant hücre yüzeyinde birlikte bulunurlar. Gastrointestinal kanserlerde, böbrek, meme, kolorektal ve akciğer kanseri gibi malignant tümörlerde serum ve idrarda düzeyinin artmış olduğu gösterilmiş olup tümör belirteci olarak ifade edilmiştir (65).

PGI (Fosfoglikoz izomeraz); glikolitik yolağın ikinci enzimidir. Glikolizis ve glikoneogenez esnasında glikoz 6-fosfat ve frukroz 6-fosfatın interkonversiyonunu katalizlemektedir. Bakteri ve ökaryotlarda oldukça korunmuştur. Hücre içinde glikoz metabolizmasında rol oynarken hücre dışında sitokin olarak fonksiyon görmektedir (66).

AMFR; endoplazmik retikulumda ubiquitin E3 ligaz aktivitesi gösteren ve hücre yüzeyine internalize olmuş bir reseptördür. Kromozomal lokalizasyonu 16q21' dir. AMFR geni, 78 kDa bir glikoprotein kodlamaktadır. Kodlanan proteinin, p53 tümör baskılayıcı gene homoloji gösteren bazı sekansları vardır. Ligandı olan AMF' nin bağlanmasıyla uyarılması sonucu; hücresel adhezyon, proliferasyon, hücre motilitesi, normal fibroblast hücrelerinde hücre-hücre kontaktı ve apoptosiste değişiklikler meydana gelmektedir. Yapılan çalışmalar sonucunda AMFR' nin aşırı ekspresyonunun, akciğer, özafagus, mide, kolon, rektum, karaciğer ve deri kanserinde olmak üzere tümörün ilerlemiş evresi ve hastaların azalmış yaşam süresi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Pozitif AMFR ekspresyonu kötü prognoz ile önemli derecede ilişkilidir (67).

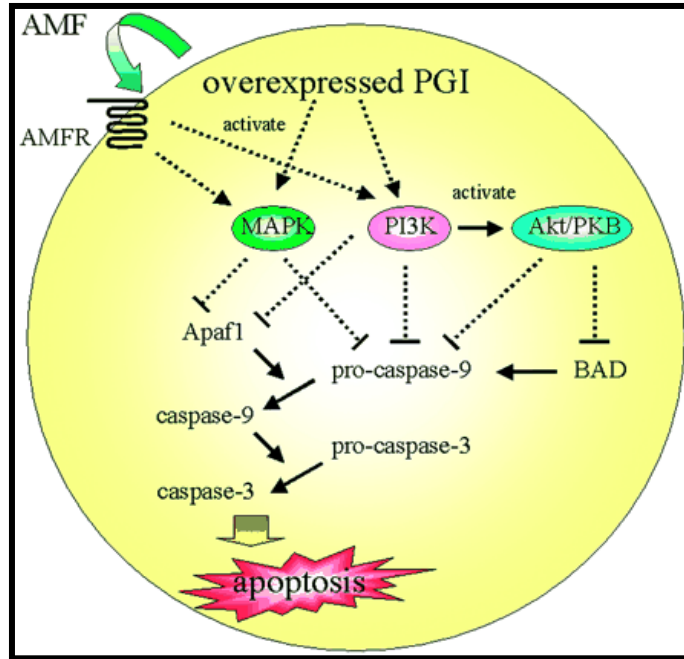
AMF/PGI; tümör hücrelerinin migrasyonu, invazyonu ve metastazında önemli rol oynamaktadır. Tümör hücreleri, normal hücrelere kıyasla daha çok glikolize ihtiyaç duymaktadırlar. Glikolitik metabolizmanın daha çok fonksiyon görmesi, pek çok onkogenik sinyal yolağının aktivasyonuna yol açar. Bu da birçok tümör tipinde, tümörün agresivitesinde artışa ve kötü prognoza neden olur.

AMF/PGI ve reseptörü olan AMFR' nin aşırı ekspresyonu, kanser progresyonu, metastazı ve anjiyogenesizi sırasında migrasyon bağımlı prosesler ile ilişkilidir. Solid tümörlerin büyümesi ve metastazı, anjiogeneze bağlıdır. bFGF, aFGF, TGF- $\beta$ , TNF, VEGF ve reseptörleri anjiogeneze basamaklarında stimülatör ve inhibitör olarak fonksiyon görürler. AMF/PGI/AMFR ile VEGF/VEGFR sinyalleri arasında, tümör anjiogenezi ve asit birikiminde karşılıklı bir etkileşim bulunmaktadır (65, 66) (Şekil 2.6). AMF/PGI aracılı asit birikimi, endotelial ve mezotelial tabakaların permeabilitesini, direkt veya indirekt olarak arttırarak meydana gelmektedir. VEGF, anjiogenezin primer regülatörüdür. VEGF reseptörlerinden Flt-1 veya KDR, tümör anjiogenezi ve metastazında önemlidir. AMF, endotelial hücrelerde protein kinaz C' yi ve fosfotidil inositol 3'-kinazı aktive ederek, doza ve zamana bağlı olarak Flt-1 ekspresyonunu arttırmaktadır (66).



Şekil 2.6. AMF/PGI ve reseptörünün VEGF ile olan etkileşimi ve anjiogenesis (65).

AMF/PGI aşırı ekspresyonu, anti-apoptotik etki ile ilişkilidir. AMF/PGI' nın aşırı ekspresyonu, MAPK, PI3K ve Akt/PKB sinyal yolağı üzerinden apoptozun baskılanmasına neden olmaktadır (65) (Şekil 2.7).



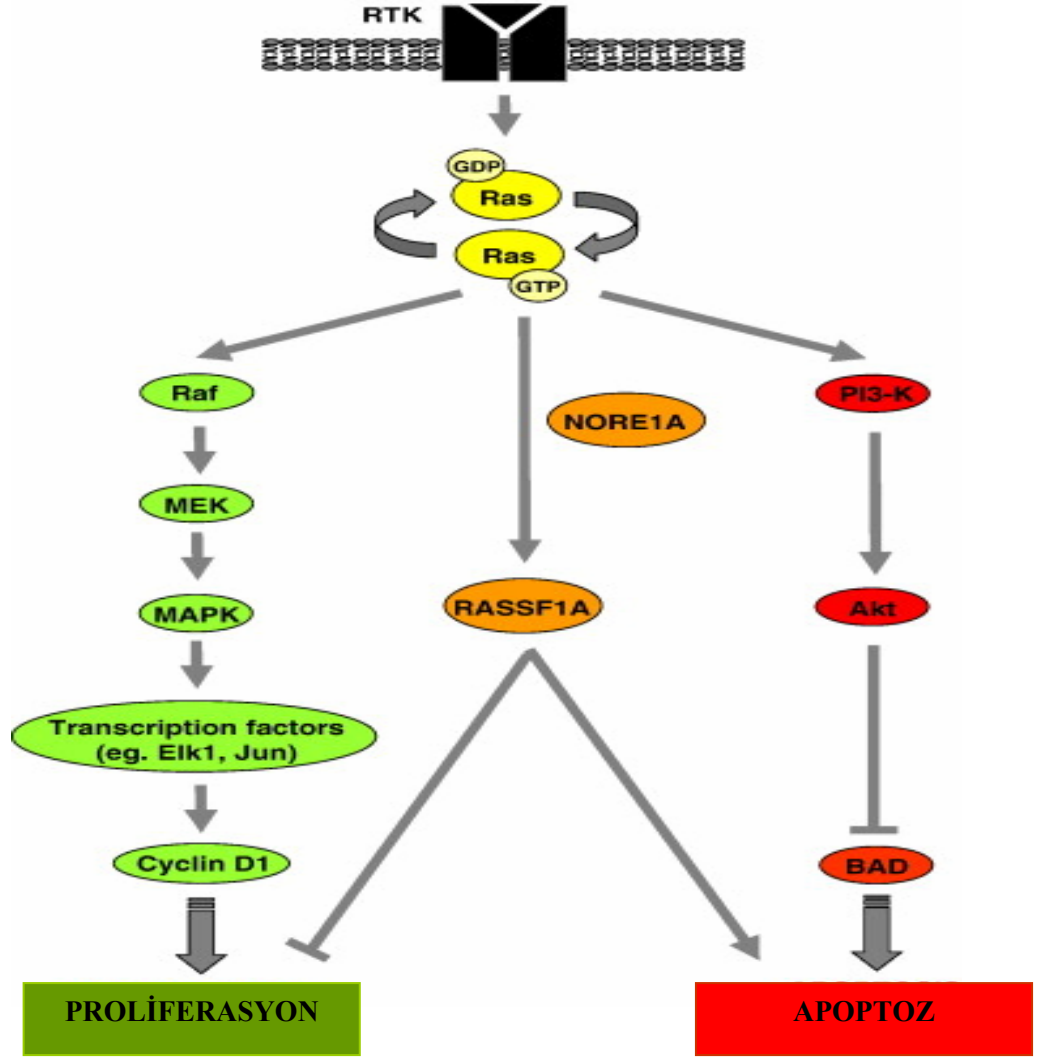
Şekil 2.7. AMF/GPI ve reseptörünün apoptosisteki rolü (65)



Sonuç olarak diyebiliriz ki; AMF/PGI multifonksiyonel bir protein olup, anjiyogenezis, anormal peritoneal sıvı birikimi ve anti-apoptotik etkiler gibi malignan tümör davranışlarının oluşmasında önemli rol oynamaktadır (49). NIH-3T3 fibroblastlarda, AMF/PGI aşırı ekspresyonunun transformasyon ve hücre canlılığını indüklediği gösterilmiştir (50). Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, kolorektal kanser ve pankreatik kanserlerde yapılan çalışmalar ile, AMF/PGI ve reseptörü olan AMFR' nin metastatik prostepte önemli rol oynadığı gösterilmiştir. Bu çalışmalar sonucunda, yüksek düzeyde AMFR gen ekspresyonu gözlenen olguların sağ kalım oranının, düşük düzeyde ekspresyon olan olgulardan önemli derecede kötü olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, AMFR geninin ekspresyon düzeyindeki artışın, tümörün yeniden nüks etmesi ile ilişkili olduğu olduğu gösterilmiş (68-70).

## **2.8. RASSF2A (Homo sapiens ras association (RalGDS/AF-6) domain family 2 protein isoform 2A)**

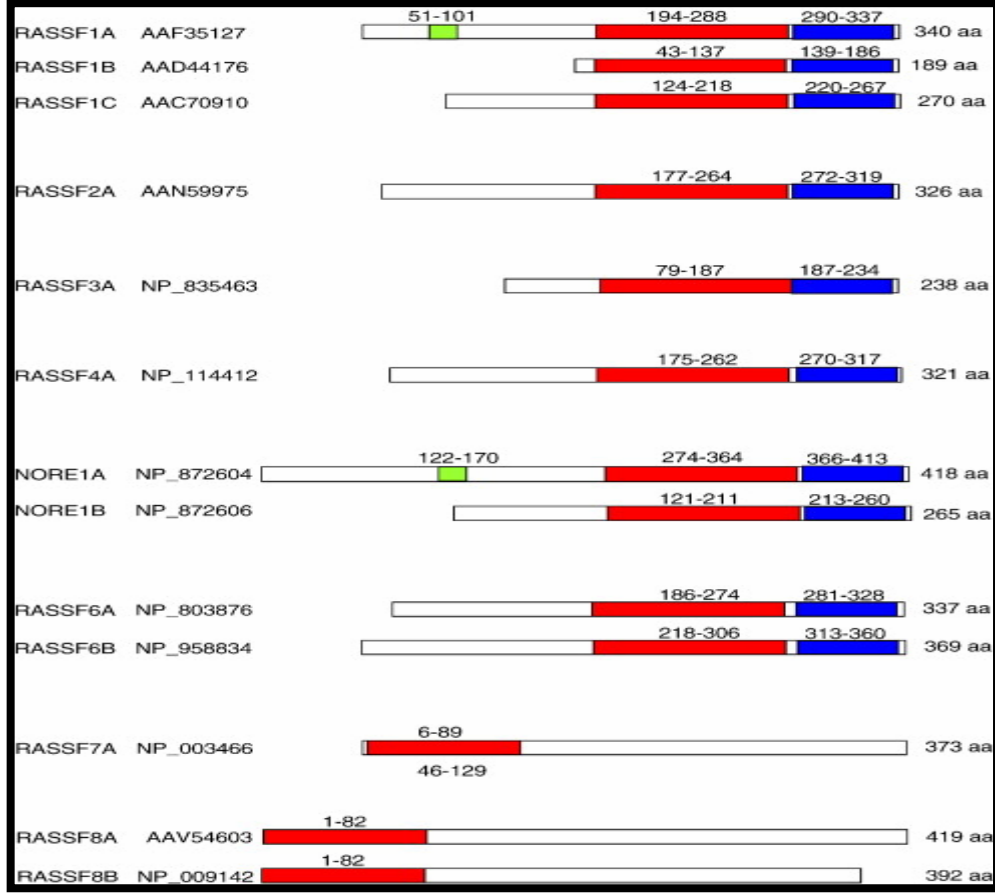
Ras genlerinde meydana gelen mutasyonlar ile kanser gelişimi arasında direkt bir ilişki bulunmaktadır. B-Raf, PI3-K gibi Ras efektör genlerinde de meydana gelen mutasyonlar kanser gelişimine yol açmaktadır. 2000 yıllarında Ras-association domain family 1 (RASSF1) olarak adlandırılan yeni Ras efektör gen ailesi bulunmuştur. Ras proteinleri PI-3K, MAPK, Rho GTPaz gibi çeşitli önemli sinyal yollarındaki aktivasyonları ile hücre proliferasyonu, morfolojisi ve canlılığında önemli rol oynamaktadır (71) (Şekil 2.8).



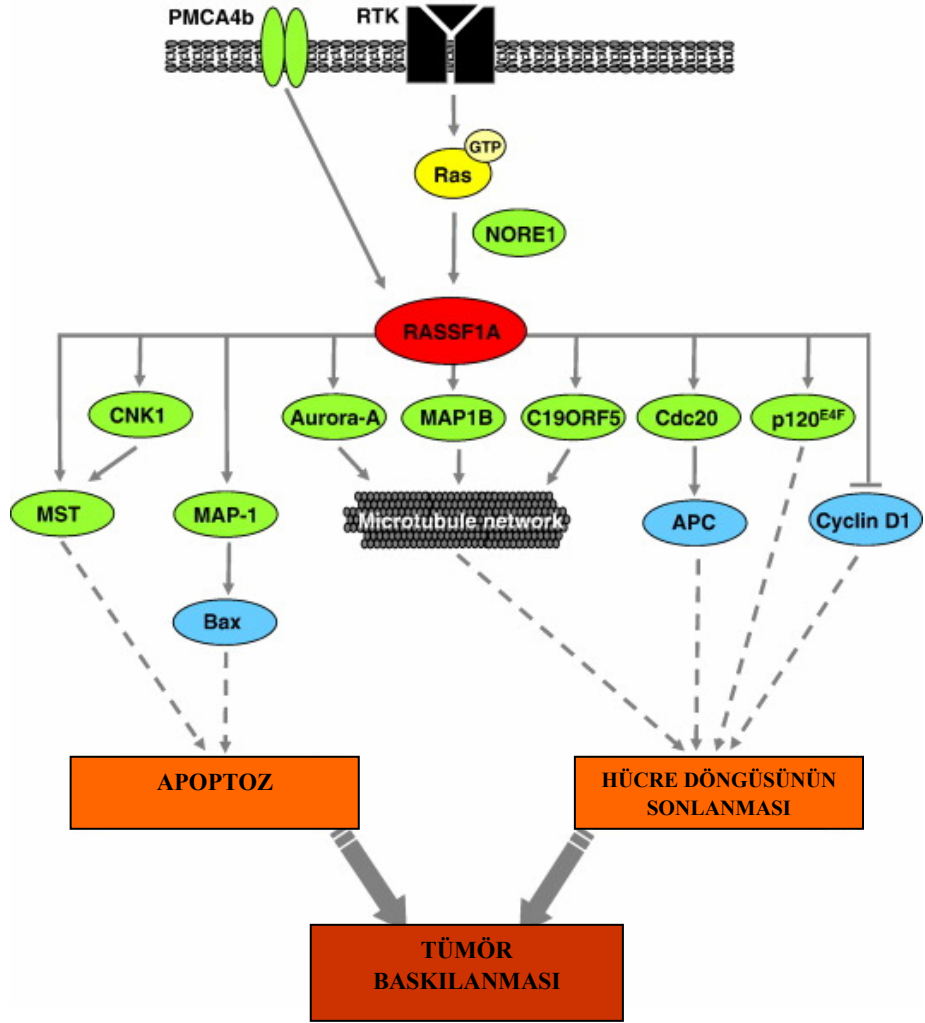
Şekil 2.8. Ras Sinyal yolağı (71)

Ras gen ailesinde yer alan genlerde meydana gelen mutasyonların kanser oluşumuna yol açtığı bilinmektedir. Kanserlerin yaklaşık %30' unda Ras genlerinde mutasyon belirlenmiştir. Ras GTPaz' lar, ekstraselüler sinyallere yanıt olarak hücre bölünmesi, farklılaşması, hareketi ve apoptosisini içeren birçok fonksiyonun regülasyonunu sağlar. Ras proteinleri hücrede iki formda bulunurlar. Bunlardan birisi GTP bağlı aktif form diğeri ise GDP bağlı inaktif formdur. Aktif formda iken Ras proteini downstream efektör proteinler ile etkileşime girebilir. Raf ve Fosfotidil inositol 3 Kinaz (PI3-K) gibi Ras efektör proteinler, Ras bağlanma domainleri yoluyla Ras' ın GTP bağlı formuna spesifik olarak bağlanabilir. Raf proteinler, serin-threonin kinaz olup hücre proliferasyonunu aktive eden MEK-ERK sinyal yolağını kontrol etmektedir. PI-3K ise, BAD gibi Bcl ailesi üyeleri tarafından indüklenen apoptosisi inhibe eden Protein kinaz B ve Akt aktivasyonu için gereklidir. Bu iki protein; Ras ile Ras-bağlanma domaini (RBD) aracılığı ile Ras ile etkileşime girerler. Diğeri bir Ras efektör grubu ise, RalGDS/AF6 Ras ilişkili domain (RA) olarak adlandırılan korunmuş motife sahip proteinlerdir. Son zamanlarda, RA domainine sahip yeni genler belirlenmiştir. Ras ilişkili domain ailesi (RASSF) olarak adlandırılan bu ailenin 8 üyesi bulunmaktadır. RASSF1-RASSF8 olarak

adlandırılmaktadırlar (Şekil 2.9). RASSF ailesi üyelerinden en iyi çalışılan ve bilinen RASSF1A' dır. RASSF genleri tümör baskılayıcı gen olarak fonksiyon görmektedir (Şekil 2.10)(72).



Şekil 2.9. RASSF ailesi üyeleri (72)



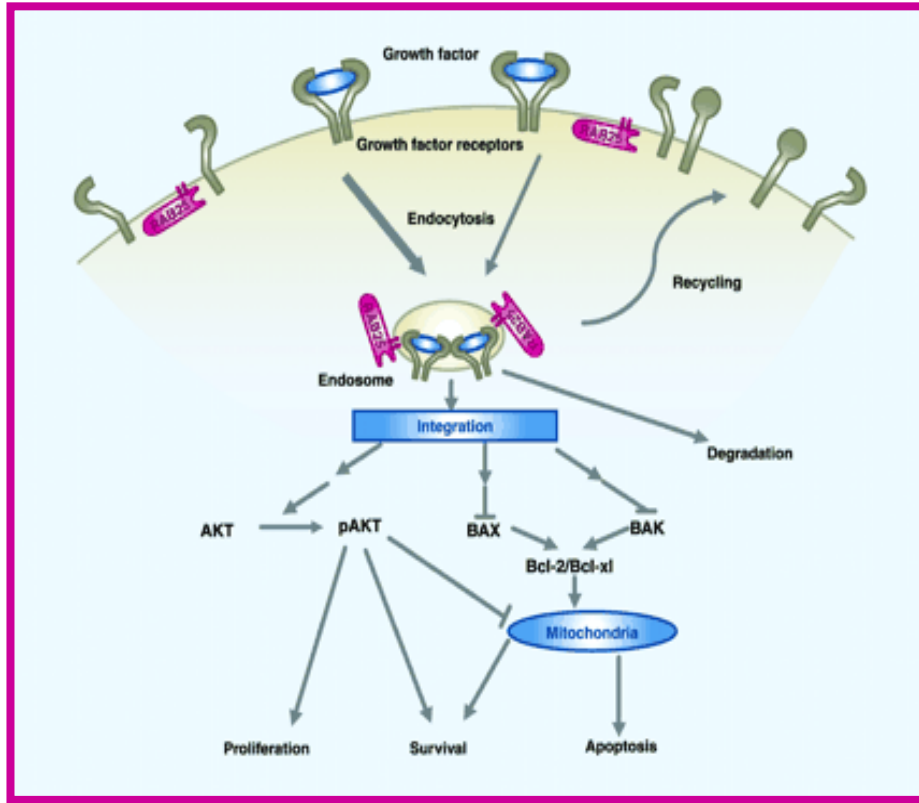
Şekil 2.10. RASSF genlerinin tümör baskılanmasındaki rolü (71)

RASSF2, 20p13' de lokalize bir tümör baskılayıcı genidir. RASSF2A, RASSF2B ve RASSF2C olarak adlandırılan üç izoformu bulunmaktadır. Bu izoformlardan sadece RASSF2A' da 5' CpG adası bulunmaktadır. Bu nedenle sadece RASSF2A transkripti, translasyona uğramaktadır. RASSF2A, RA domain ve asidik coiled-coil SARA domaini içeren 326 aminoasitten oluşan bir proteindir. KRAS ile etkileşim halinde bulunmaktadır. KRAS geninin efektor domainindeki mutasyon iki proteinin etkileşimini bozmaktadır. Beyin, akciğer, periferal kan lökositlerinde yüksek düzeyde ekspresyon gösterirken, plesanta, iskelet kası, böbrek, karaciğer, timus, prostat, testis ve ovaryumda ekspresyonu düşüktür. RASSF2, apoptosis ve hücre döngüsünün sonlanmasına aracılık ederek RAS sinyal yolağını negatif olarak regüle etmektedir (72).

## 2.9. RAB25 (Homo sapiens RAB25, member RAS oncogene family)

RAB guanozin trifosfatazlar (GTPase) RAS süper ailesinin küçük GTPaz' larıdır. İnsan genomunda RAB gen ailesinin 60 farklı üyesi vardır. RAB gen ailesi üyeleri, vezikül trafiğinde rol oynamaktadır. RAB25, RAB11 alt ailesine aittir. RAB25; 1q22' de lokalizedir. Gastrointestinal mukoza boyunca ileum ve kolonda, akciğer ve böbrekte en yüksek düzeyde eksprese olduğu gösterilmiştir. RAB 25 ekspresyonu, beyin, karaciğer, kalp ve iskelet kasında bulunmamaktadır. RAB proteinleri, GTP bağlı formda iken aktif, GDP bağlı formda ise inaktiftir.

RAB25, hücre proliferasyonun ve canlılığının düzenlenmesinde rol oynamaktadır. Dinlenme evresindeki hücrelerde, RAB25 ve büyüme faktörü reseptörleri, hücre yüzeyinde lokalizedir. Büyüme faktörlerinin uygun ligandları ile aktivasyonu sonucunda, RAB25 proteinleri, reseptörün internalizasyonunu, veziküllerin oluşmasını ve nükleus, lizozom, proteozomu içeren spesifik hücresel kompartmanlarda makromolekül trafiğini ve hücre yüzeyine yeniden taşınmasını düzenlerler. RAB25; AKT aktivasyonunu sağlarken, bilinmeyen mekanizmalar yoluyla BAX ve BAK düzeylerinin azalmasına neden olur. Bu etkisi yoluyla, proliferasyonun artmasına, apoptosisin azalmasına ve tümör hücrelerinin agresivitesinin artmasına yol açar (Şekil 2.11) (73, 74).



Şekil 2.11. RAB25 aracılı hücre proliferasyonu ve canlılığının regülasyonu (74).

## 2.10. CTGF (Connective Tissue Growth Factor)

CTGF 6q23.1' de lokalizedir. CCN gen ailesinin 6 üyesinden birisidir. Yaklaşık 3 kb büyüklüğünde olup 5 ekzon ve 4 introndan oluşmaktadır. Kalp, beyin, plesanta, karaciğer, kas, böbrek ve akciğerde eksprese olmaktadır. 38 kDa ağırlığında sistince zengin ve hücre yüzeyindeki integrinlere bağlanabilen heparin bağlanma proteini kodlamaktadır. Kondrositlerin gelişimi, proliferasyonu ve farklılaşması, endotelial hücrelerin proliferasyonu ve migrasyonu ve apoptozun regülasyonundan sorumludur. Hücrel proliferasyon, migrasyon, adhezyon, ekstraselüler matriks oluşumu, anjiogenez ve tümörigenezin regülasyonunda önemli rol oynamaktadır. Bu proteinin ekspresyonunun, sistemik skleroderma, arterosklerosis, renal hastalıklarda arttığı gösterilmiştir. Meme kanseri, pankreatik kanserler, melanomalar, kondrosarkoma gibi bazı kanser tiplerinde de ekspresyonunda artış gözlenmesine rağmen, bu proteinin kanser gelişiminde ve progresyonundaki rolü hakkında net bir bilgi bulunmamaktadır. Meme kanseri hücrelerinde CTGF' in aşırı ekspresyonunun tümör büyüklüğü ve metastazı ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (75).

## 2.11. MDR1 (ATP-Binding Cassette, Subfamily B, Member 1; ABCB1)

Konvansiyonel kanser kemoterapisi, tümör hücreleri tarafından gösterilen çoklu ilaç dirençliliği (MDR) ile önemli oranda sınırlanmaktadır. Tümörlerin kemoterapötik ajanlara karşı olan direnci iki yolla olur. Bunlardan birisi, iç direnç olup melanoma, karaciğer kanseri ve renal hücre kanserinde olduğu gibi tümör hücrelerinin tipik olarak birçok ajana duyarsızlığı söz konusudur. Diğeri ise kazanılmış dirençtir. Kazanılmış dirençte ise, tümörlerin kemoterapiye kısa bir duyarlılık göstermesinden sonra dirençli hale gelmesi görülmektedir. Kemoterapötik ilaçların hücre içine alınması, ATP-bağımlı ve ATP-bağımsız olarak gerçekleşmektedir. Kazanılmış direnç, çoklu ilaç-direnci (MDR) gen ailesi ile ortaya çıkmaktadır. Bu genler, büyük organik bileşiklerin taşınmasından görev yapan ATP-bağımlı pompaları kodlarlar. Bunlar ABC (ATP-binding cassette) transporter gen ailesi üyelerinden; MDR1 (P-gp:P-glikoprotein), MRP1 (Multidrug resistance associated protein,) ve BCRP (Breast cancer resistance protein) proteinleridir. Bu gen ailesinde yer almayan LRP' de (Lung resistance protein) çoklu ilaç-dirençliliğine yol açmaktadır. Bu proteinler, ya kemoterapötik ilaçların hızla hücre dışına atılmasına ve hücre içindeki etkinliğinin kaybolmasına neden olarak yada ilacın hedef organellerden uzak hücrel dağılımına yol açarak çoklu ilaç dirençliliğine neden olmaktadır (76).

Kanser kemoterapisine dirençli genlerden üzerinde en çok çalışılan MDR1 genidir. MDR1 geni, 7q21-21.1 bölgesinde lokalizedir. MDR1 geninin aşırı ekspresyonu sonucu, kemoterapötik ilaçların alınımı ve birikiminde azalmanın meydana gelmesi ile kemoterapiye dirençlilik ortaya çıkmaktadır. MDR1 geninin ekspresyonundaki artışın açıklanmasına yönelik çeşitli mekanizmalar ileri sürülmektedir. MDR1 geninin promotor bölgesindeki polimorfizmler, gen ekspresyonu ve kemoterapiye yanıtı etkilemektedir. C3435T polimorfizminin MDR1 gen ekspresyonu üzerine etkili olduğu ve T3435T genotipinin varlığında C3435T ve C3435C genotiplerine göre gen ekspresyonunun yüksek olduğu gösterilmiştir. Gen ekspresyonunu etkileyen diğeri bir mekanizma ise, p53 ve MDR1 genleri arasındaki ilişkidir. p53 gen mutasyonları, MDR1 gen promotorunun aktivasyonuna yol açarak radyasyon ve kemoterapiye karşı dirençliliğe yol açmaktadır. Reaktif oksijen

türevlerinin de NF-kB, TNF- $\alpha$ , insülin ve EGF üzerinden MDR1 ekspresyonunu arttırdığına ilişkin görüşler bulunmaktadır (77).

## MATERYAL ve METOD

Tez kapsamında, epitelyal over kanserli 35 olgudan cerrahi müdahale sonucunda elde edilen değişik evrelerdeki primer odağa ait tümör dokusu, aynı kişinin eğer varsa metastatik odağa ait dokusu ve normal dokudan RNA izole edilerek, AMF/PGI, AMFR, CTGF, RAB25, RASSF2A ve MDR1 genlerinin ekspresyon düzeylerindeki farklılıklarının belirlenebilmesi için kantitatif gerçek zamanlı RT-PCR yöntemi uygulandı. Ayrıca, RASSF2A geninin ekspresyon düzeyine bağlı olarak metilasyon profilindeki değişiklikleri belirlemek için aynı dokulardan DNA izolasyonu yapılarak metilasyon spesifik PCR yöntemi gerçekleştirildi. Elde edilen verilerle, hem hastanın kendi farklı evredeki dokuları hem de hastalar arasında evre ve gen ekspresyon profilleri karşılaştırıldı.

### 3.1. Tümör ve Normal Dokulardan DNA İzolasyonu

#### 3.1.1. Kullanılan Çözeltiler

**Tampon A Karışımı:** Bu çözeltinin hazırlanabilmesi için, 0.1 M Tris HCl ve 0.5 M EDTA solüsyonları kullanıldı.

**0.1 M Tris HCl (pH:7.4):** 1.211 gr Tris Baz (Sigma) 100 ml distile su içerisinde çözüldü. Saf HCL kullanılarak solüsyonun pH' ı 7.4'e ayarlandı. Solüsyon otoklavlandı. Oda ısısında saklandı.

**0.5 M EDTA (pH:7.4):** 18.6120 gr EDTA (Sigma), 100 ml distile su içerisinde çözüldü. NaOH solüsyonu kullanılarak pH' ı 7.4' e ayarlandı. Solüsyon otoklavlandı. Oda ısısında saklandı.

1000 µl 0.1 M Tris-HCl ve 40 µl 0.5 M EDTA solüsyonları karıştırılarak Tampon A karışımı hazırlandı. Hazırlanan karışım, -20 °C' de saklandı.

**%10 Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) Çözeltisi:** 10 gr Sodyum dodesil sülfat (Sigma) 100 ml distile su içerisinde çözüldü. Hazırlanan çözelti, 0.2 milimetre çapındaki filtreden (Orange Scientific) geçirildi. Solüsyon oda ısısında saklandı.

**Proteinaz K Çözeltisi:** 10 mg Proteinaz K (Sigma) 10 ml steril distile su içerisinde çözüldü. -20 °C' de saklandı.

**Ayrıştırma Tamponu:** 10 ml Tampon A, 840 µl Proteinaz K ve 340 µl SDS çözeltisi karıştırıldı. Elde edilen karışım, 1,5 mililitrelik ependorfa bölünerek -20 °C' de saklandı.



**Doymuş NaCl Çözeltisi:** 20 gr NaCl 50 ml steril distile su içerisinde çözüldü. Oda ısısında saklandı.

### **İzopropanol (Sigma)**

**%70' lik Etanol:** 70 ml %96' lık alkol alınıp üzerine 30 ml distile su ilave edildi. +4 °C'de saklandı.

#### **3.1.2. İşlemler**

1. 20 mg kadar büyüklüğe sahip doku, steril petri kabında bistüri yardımı ile parçalandı. Doku, içerisinde 600 µl ayrıştırma tamponu bulunan steril 2 ml' lik ependorf tüp içine alındı. Ependorfun ağzı parafilm ile kapatıldı.
2. 65 °C' ye ayarlı su banyosu içinde dokular homojen bir görünüme sahip olana kadar inkübasyon yapıldı. Dokuların daha kolay parçalanabilmesi için arada bir vorteks işlemi yapıldı.
3. Dokular iyice parçalanıp homojen bir görüntü oluşunca 180 µl doymuş NaCl çözeltisi ilave edilip iyice vortekslendi.
4. 10000 rpm' de 15 dakika santrifüj santrifüj edildi.
5. Santrifüj sonrası, içinde DNA' nın bulunduğu üst faz temiz bir 2 ml' lik ependorfa alındı. 1:2 hacimde izopropanol eklendi. Yavaş yavaş alt-üst yapılarak DNA' nın presipite olması sağlandı.
6. DNA presipite olduktan sonra, 13000 rpm' de 5 dakika santrifüj yapıldı.
7. Süre sonunda üst faz atıldı. Üzerine %70' lik etanolden 500 µl eklendi.
8. 13000 rpm' de 5 dakika santrifüj edildi.
9. Santrifüj sonunda üst faz atıldı ve dipte kalan DNA' da etanolün uzaklaştırılması için 37°C' ye ayarlı etüvde 15 dakika kurumaya bırakıldı.
10. Etanol uzaklaştırıldıktan sonra elde edilen DNA' nın miktarına göre steril distile su ilave edildi. 37°C' ye ayarlı etüvde 15 dakika bekletilerek DNA' nın çözünmesi sağlandı.
11. Elde edilen DNA örneklerinin 260/280 nm dalga boylarında spektrofotometrik ölçümleri yapıldı.

#### **3.2. Tümör ve Normal Dokulardan RNA İzolasyonu**

##### **3.2.1. Kullanılan Solüsyonlar**

Trizol (Sigma)  
Kloroform (Sigma)  
İzopropanol (Sigma)  
%70' lik Etanol

##### **3.2.2. İşlemler**

1. 30 mg büyüklüğündeki doku steril petri kabı içinde bistüri yardımı ile parçalandı.
2. 2 ml' lik steril ependorf içine 500 µl Trizol konuldu. Parçalanmış doku trizol içine eklendi. Doku, homojen bir görünüm alınca kadar homojenizatör yardımı ile iyice parçalandı.

3. Tamamen homojen bir hale geldikten sonra üzerine 500 µl daha Trizol ilave edildi.
4. Üzerine 200 µl Kloroform ilave edilerek oda ısısında 5 dakika süre ile alt-üst yapıldı.
5. Süre sonunda 12000 rpm' de 15 dakika oda ısısında santrifüj yapıldı.
6. Santrifüj sonunda üç faz oluşmaktadır. En üstte oluşan faz, RNA' nın bulunduğu faz olup temiz bir 2 ml' lik ependorfa alındı. Üzerine 1:1 oranında İzopropanol eklendi ve alt-üst edilerek karışması sağlandı.
7. Oda ısısında 10 dakika bekletildi.
8. Süre sonunda 12000 rpm' de 5 dakika oda ısısında santrifüj edildi.
9. Süre sonunda üst faz atıldı. Tüpün dibine çökmüş olan RNA üzerine 1 ml Trizole 1 ml olacak şekilde %70' lik etanolden eklendi.
10. 12000 rpm' de 5 dakika oda ısısında santrifüj yapıldı.
11. Süre sonunda üst faz atıldı.
13. Alkolün uçması için tüpler 37°C' ye ayarlı etüvde 15 dakika bekletildi.
14. Elde edilen RNA miktarına göre RNaz içermeyen steril distile su eklendi.
15. Oda ısısında 5 dakika bekletilerek RNA' nın çözünmesi sağlandı.
16. 260/280 nm dalga boylarında spektrofotometrik ölçüm yapılarak RNA miktarı belirlendi.

### 3.3. Kantitatif Gerçek Zamanlı RT-PCR

#### 3.3.1. cDNA Eldesi

##### Kullanılan Kit

Taqman Reverse Transcription Reagents (Applied Biosystems)

##### Kit İçeriği

10X Reverse transkripsiyon tamponu  
MgCl<sub>2</sub> (25 mM)  
dNTP karışımı (25 mM)  
10XRandom Hekzamer (50 mM, 5 nmol)  
Multiscribe Reverse Transkriptaz (50 U/µl)  
RNaz İnhibitörü (200 U/µl)

##### cDNA reaksiyonu için PCR karışımı

10X Reverse transkripsiyon tamponu	5 µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	11 µl
dNTP karışımı (25 mM)	2,5 µl
10XRandom Hekzamer (50 mM, 5 nmol)	2,5 µl
RNaz İnhibitörü (200 U/µl)	3 µl
Multiscribe Reverse Transkriptaz (50 U/ml)	1.25 µl
Nükleaz içermeyen distile su	14,75 µl
RNA	2 µg

Toplam hacim 50 µl olarak PCR reaksiyonu kuruldu.

### PCR Koşulları:

25 °C' de	10 dakika	1 döngü
48°C' de	60 dakika	1 döngü
4 °C' de		∞

#### 3.3.2. Kantitatif Gerçek Zamanlı RT-PCR Reaksiyonu:

Tez kapsamında ekspresyonu belirlenecek tüm genlerin kantitatif gerçek zamanlı RT-PCR reaksiyonunda kullanılan primer ve prob dizaynları software programı kullanılarak yapıldı. Primer ve prob dizisinin kantitatif gerçek zamanlı RT-PCR için uygun olup olmadığı kontrol edildi. Reaksiyonda iç kontrol olarak Ribozomal RNA' ya ait primer ve prob kullanıldı. PCR reaksiyonu kurarken, her iki genin aynı tüp içerisinde çalışılması hem hedef genin hem de ribozomal RNA' nın ekspresyon miktarının aynı anda belirlenmesi sağlanmıştır.

Tez kapsamında kullanılan genlerin primer ve prob dizileri aşağıda verilmektedir.

#### 1. AMF/PGI (Homo sapiens glucose phosphate isomerase)

İleri Primer:5'-gCTgCTgCCACATAAaggTCTTT-3'

Geri Primer:5'-CAgATgATgCCCTgAACgAA-3'

Prob:5'-6-FAM-CCAACCAACTCTATTgTgTTCACCAAgCT-TAMRA-3'

#### 2. AMFR (Homo sapiens autocrine motility factor receptor, transcript variant 2)

İleri Primer:5'-CTTTTCCTACACAgCggTCAgAT-5'

Geri Primer:5'-gCgAggACTgAggTCCAgTg-3'

Prob: 5'-6-FAM-AAggCCAgtGACCaggAAgA-TAMRA-3'

#### 3. RAB25 (Homo sapiens RAB25, member RAS oncogene family)

İleri Primer: 5'-CCCgAATgTTCgCTGAAAAC-3'

Geri Primer: 5'-CTTTCaggACAgTCTCAAaggCTA-3'

Prob: 5'-6-FAM-TCCTggAgACCTCAgCCCTggA-TAMRA-3'

#### 4. RASSF2A (Homo sapiens ras association (RalGDS/AF-6) domain family 2 protein isoform 2A)

İleri Primer: 5'-TgAAggCCAgaAATTTACAgCTC-3'

Geri Primer: 5'-AggTTACAgCCAgaAgTgCCAga-3'

Prob: 5'-6-FAM-ACCgggAggAAgAAgACgAgTTCA-TAMRA-3'

#### 5. CTGF (Connective Tissue Growth Factor)

İleri primer: 5'-GAGGAAAACATTAAGAAGGGCAAA-3'

Geri Primer: 5'-CggCACAggTCTTGATGA-3'

Prob:5'-6-FAM-TTTgAgCTTTCTggCTgCAAC -3'

#### 6. MDR1 (ATP-Binding Cassette, Subfamily B, Member 1;ABC1)

İleri Primer:5'-TGCTCAgACAggATgTgAgTT-3'

Geri primer: 5'-TAgCCCCTTTAACTTgAgCAg-3'

Prob:5'-6-FAM- AAAACACCAATGGAGCAT-3'

**Kullanılan Solüsyonlar:**

Universal Master Mix (Applied Biosystems)

**Kantitatif Gerçek Zamanlı RT-PCR Reaksiyonu:**

Miktar	Stok Derişim	Kullanılan
Üniversal Master Mix	2X	10 µl
Gene Spesifik Primer İleri	10 pmol/µl	0,2 µl
Gene Spesifik Primer Geri	10 pmol/µl	0,2 µl
Gene Spesifik Prob	10 pmol/µl	0,05 µl
Ribozomal RNA Spesifik Primer İleri	10 pmol/µl	0,2 µl
Ribozomal RNA Spesifik Primer Geri	10 pmol/µl	0,2 µl
Ribozomal RNA Spesifik Prob	10 pmol/µl	0,05 µl
Nükleaz içermeyen distile su		5,1 µl
cDNA		4 µl

Toplam hacim 20 µl olarak PCR reaksiyonu kuruldu.

Hazırlanan PCR reaksiyonu, aşağıda belirtilen PCR koşulları altında kantitatif gerçek zamanlı RT-PCR cihazında (Applied Biosystems) gerçekleştirildi.

**PCR Koşulları:**

50 °C	2 dakika	}	1 Döngü
95 °C	10 dakika		1 Döngü
95 °C	45 saniye	}	1 Döngü
62 °C	45 saniye		
72 °C	1.5 dakika		
95 °C	45 saniye	}	1 Döngü
61 °C	45 saniye		
72 °C	1.5 dakika		
95 °C	45 saniye	}	1 Döngü
60 °C	45 saniye		
72 °C	1.5 dakika		
95 °C	45 saniye	}	1 Döngü
59 °C	45 saniye		
72 °C	1.5 dakika		
95 °C	45 saniye	}	1 Döngü
58 °C	45 saniye		
72 °C	1.5 dakika		
95 °C	45 saniye	}	1 Döngü
57 °C	45 saniye		
72 °C	1.5 dakika		
95 °C	45 saniye	}	1 Döngü
56 °C	45 saniye		
72 °C	1.5 dakika		
95 °C	45 saniye	}	40 Döngü
55 °C	45 saniye		
72 °C	1.5 dakika		

### 3.3.3. Kantitatif Gerçek Zamanlı RT-PCR Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Sonuçlar  $2[-\Delta\Delta C(T)]$  ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ ) metodu kullanılarak hesaplandı (78). Bu metotta; her bir örnek için ayrı ayrı olarak, hedef genin Ct değeri ile internal kontrol olarak kullanılan rRNA' nın verdiği Ct değerleri birbirinden çıkarılarak  $\Delta Ct$  değerleri belirlendi. Benzer şekilde her bir olgudan alınan normal doku örnekleri için de  $\Delta Ct$  değerleri belirlendi.  $\Delta\Delta Ct$  değeri ise; tümör dokusu için belirlenen  $\Delta Ct$  değeri ile normal doku için belirlenen  $\Delta Ct$  değerinin çıkartılmasıyla elde edildi.  $2^{-\Delta\Delta CT}$  değeri ile de genlerin ekspresyonlarındaki artış veya azalış miktarı belirlendi.

### 3.3.4. Metilasyon Spesifik PCR

Tez kapsamında yer alan epitelyal over kanserli olguların, normal over veya tuba dokusundan, primer tümör odağından ve varsa metastatik tümör odağından yukarıda anlatıldığı gibi DNA izolasyonu yapıldı. Bu örneklerde RASSF2A ekspresyonu ile genin promotor bölgesinin metilasyonu arasında bir ilişkinin bulunup bulunmadığını göstermek için metilasyon spesifik PCR gerçekleştirildi.

Metilasyon spesifik PCR çalışmasında, bisülfid muamelesi ile metillenmiş sitozinler değişmez iken metillenmemiş sitozinler ise urasile dönüşmektedir. Metile ve metile olmayan allele spesifik primerler kullanılarak yapılan metilasyon spesifik PCR ile değişimler belirlenebilmektedir (17).

Bu çalışmada, kantitatif gerçek zamanlı RT-PCR yöntemi ile ekspresyon değişikliğini incelediğimiz RASSF2A geninin metilasyon profili belirlenmeye çalışılmıştır.

#### 3.3.4.1. Genomik DNA Modifikasyonu

Metilasyon analizi için gerekli olan DNA modifikasyonu için EZ-DNA Methylation Kit (Zymo Research) kullanıldı.

#### **EZ DNA Methylation-Gold Kit (Zymo Research)**

#### **Kit İçeriği**

CT Conversion Reagent  
M-Dilution Buffer  
M-Dissolving Buffer  
M-Binding Buffer  
M-Wash Buffer  
M-Desulphonation Buffer  
M-Elution Buffer  
Zymo-Spin™ IC Columns  
Collection Tubes

#### **CT Conversion Reagent Hazırlanması:**

CT Conversion Reagent içeren tüpe; 900 µl distile su, 300 µl M-Dilution Buffer ve 50 µl M-Dissolving Buffer eklenerek oda ısısında 10 dakika süre ile hızlı bir şekilde vorteks yapıldı.

### **M-Wash Buffer Hazırlanması:**

M-Wash Buffer içine 24 ml %100 etanol eklendi.

### **İşlemler:**

1. DNA' ların OD değerleri, spektrofotometrede 260 nm dalga boyunda ölçüldükten sonra 20 µl final hacimde 1000 ng DNA olacak şekilde her bir DNA örneği hazırlandı.
2. 20 µl DNA örneği içeren PCR tüpüne daha önceden hazırlanmış olduğumuz CT Conversion Reagent' dan 130 µl eklendi. Pipetaj yaparak veya tüpü elimizde alt-üst yaparak karışması sağlandı.
3. PCR cihazında aşağıdaki programa göre inkübasyona bırakıldı.

98 °C	10 dak.
64 °C	2.5 saat
4 °C	20 saate kadar

4. Kit içinde yer alan collection tüp içine Zymo-Spin<sup>tm</sup> IC Columns yerleştirildikten sonra 600 µl M-Binding Buffer konuldu.
5. Her bir örnek bu kolonlara eklendi. Tüp birkaç kez alt-üst yapılarak karışması sağlandı.
6. 10000 g' ye ayarlı mikrosantrifüjde 30 saniye santrifüj yapıldı. Altta biriken sıvı kısım atıldı.
7. Kolon üzerine 100 µl daha önceden hazırlanmış M-Wash Buffer konuldu.
8. 14000 g' de 30 saniye santrifüj edildi.
9. Kolon içine 200 µl M-Desulphonation Buffer konuldu. 20 °C-30 °C' de 15-20 dakika inkübasyona bırakıldı.
10. Süre sonunda 14000 g' de 30 saniye santrifüj yapıldı.
11. Kolona 200 µl M-Wash Buffer konuldu.
12. 14000 g' de 30 saniye santrifüj yapıldı.
13. Bir kez daha 200 µl M-Wash Buffer konuldu.
14. 14000 g' de 30 saniye santrifüj yapıldı.
15. Kolon 1.5 ml' lik mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildi. Kolonun tam orta kısmına 10 µl M-Elution Buffer konuldu.
16. 14000 g' de 30 saniye santrifüj yapıldı.
17. Modifikasyonu yapılmış her bir DNA örneği -20 °C saklandı.

### **3.3.4.2. PCR**

Modifiye yapılmış DNA örnekleri kullanılarak, aşağıda dizileri ve PCR koşulları verilmiş olan metile ve metile olmayan allele spesifik primerler kullanılarak PCR reaksiyonu gerçekleştirildi. PCR ürünleri, etidium bromid ilaveli %2' lik agaroz jelde yürütüldü ve UV altında görüntülendi.

### **Metile Allele Spesifik Primerler:**

İleri: 5'-ATTCgTCgTCgTTTTTAggCg-3'

Geri:5'-AAAAACCAACgACCCCCgCg-3'

### Metile Allele Spesifik PCR Koşulları:

95 °C	10 dakika	} 35 Döngü
95 °C	30 saniye	
58 °C	30 saniye	
72 °C	30 saniye	
72 °C	10 dakika	

### Metile Olmayan Allele Spesifik Primerler:

İleri: 5'-AATTTgTTTTgTTTTTAggTgg-3'

Geri:5'-AAAAACCAACAACAACCCAC-3'

### Metile Olmayan Allele Spesifik PCR Koşulları:

95 °C	10 dakika	} 35 Döngü
95 °C	30 saniye	
54 °C	30 saniye	
72 °C	30 saniye	
72 °C	10 dakika	

### 3.3.4.3. Metilasyon Spesifik PCR Sonuçlarının Değerlendirilmesi:

Metilasyon profilinde değişiklik belirlediğimiz örneklerinin sonuçları, kantitatif gerçek zamanlı RT-PCR sonuçları ile değerlendirildi.

## BULGULAR

### 4.1. Epitelyal Over Tümörlü Olguların Klinik Değerlendirmesi

Tez çalışmasının yapıldığı projenin kapsamı 50 olgudan oluşmaktadır. Tez süresinin kısıtlı olması nedeniyle bu tezde, 35 olguya ait normal doku, primer tümör dokusu ve 35 olgunun 18' inden elde edilen metastatik tümör dokusuna ait veriler değerlendirilecektir. Çalışmaları devam eden proje tamamlandığında tüm veriler final raporunda değerlendirilecek ve literatüre sunulacaktır.

Tez kapsamında çalışılan epitelyal over tümörlü olguların yaş aralıklarının, 30-89 arasında olduğu görüldü. On yıllık aralıklarla düzenlenen yaş grupları Tablo 4.1' de verilmektedir. En fazla olgunun ( 13 olgu,) %37.14 ile 40-49 yaş arasında olduğu bulundu. En az sayıda olgu ise 30-39 yaş aralığında ve 80-89 yaş aralığında 1 olarak belirlendi. İncelenen olguların patolojik değerlendirilmesi Tablo 4.2' de yer almaktadır.

Çalışılan olguların histopatolojilerine göre dağılımı ve sıklığı Tablo 4.3' de gösterilmektedir. Çalışması tamamlanan 35 olguda 5 farklı histopatolojiye sahip kanser tipi gözlemlendi. Seröz adenokarsinom tipi 16 olgu (%45.71) ile ilk sırada yer almaktadır. Olguların 27 tanesi evre IIIC, 1 tanesi evre IIIB, 3 tanesi evre IA, 2 tanesi evre IB ve 1 tanesi ise evre IC' dir. Olguların, 25 tanesi pT3c/pN1, 2 tanesi pT3c/pN0, 3 tanesi pT1a/pN0, 2 tanesi pT1b/pN0, 1 tanesi ise pT3c/pN0 TNM değerine sahipti. Tez süresince 35 olgunun sadece 18'ine ait metastatik tümör dokusu çalışılabilmiştir.

**Tablo 4.1.** Olguların yaş gruplarına göre dağılımı

Yaş Aralığı	Olgu Sayısı	Yüzde (%)
30-39	1	2.86
40-49	13	37.14
50-59	7	20
60-69	7	20
70-79	6	17.14
80-89	1	2.86
<b>Toplam</b>	<b>35</b>	<b>100</b>



**Tablo 4.2.** Epitelyal over tümörlü olguların histopatoloji sonuçları

OLGU NO	YAŞ	TANI	LOK*	DIF*	OMENTUM	LD* MET	FIGO	TNM
OV-1	46	Seröz adenokarsinom	Bilateral	az	+	+	IIC	pT3c pN1
OV-2	49	Mikst tipte over karsinom (End+seröz)	Bilateral	az	+	+	IIC	pT3 pN1
OV-3	74	Seröz papiler adenokarsinom	Bilateral	orta	+		IIC	
OV-4	45	Müsinöz adenokarsinom	Sol	iyi	-	-	IA	pT1a pN0
OV-5	47	Mikst tipte over karsinom (End+seröz)	Bilateral	az	+	+	IIC	pT3c pN1
OV-6	55	Borderline müsinöz tümör, intestinal tip, sol	Sol	İyi	-	-	IB	pT1b pN0
OV-7	48	Seröz papiller kistadenokarsinom	Bilateral	orta	+	+	IIC	pT3c pN1
OV-8	63	Mikst tipte over karsinomu (Endo+seröz)	Bilateral	Az	+	+	IIC	pT3c pN1
OV-9	47	Seröz adenokarsinom	Bilateral	orta	+	-	IIIB	pT3b

								pN0
OV-10	64	Seröz papiller karsinom	Sol	Orta	+	+	IIC	pT3c
								pN1
OV-11	54	Seröz papiller kistadenokarsinom	Bilateral	orta	+	+	IIC	pT3c
								pN1
OV-12	73	Mikst tipte over karsinomu (berrak+seröz)	Bilateral	Orta-az	+	-	IIC	pT3c
								pN0
OV-13	69	Seröz adenokarsinom	Bilateral	orta	+	+	IIC	pT3c
								pN1
OV-14	79	Seröz adenokarsinom	Bilateral	orta	+	+	IIC	pT3c
								pN1
OV-15	64	Yüzeysel seröz papiller karsinom	Bilateral		+	-	IIC	pT3c
								pN1
OV-16	47	Endometrioid adenokarsinom	Sol	Orta	-	-	IA	pT1a
								pN0
OV-17	48	Endometrioid adenokarsinom	Bilateral	Orta	+	+	IIC	pT3c

								pN1
OV-18	65	Mikst tipte over karsinomu (berrak+seröz)	Bialetaral	Orta-az	+	-	IIIC	pT3c pN0 M1(Beyin)
OV-19	42	Müsinöz adenokarsinom, endoservikal tip	Sol	iyi	+	+	IIIC	pT3c pN1
OV-20	53	Borderline seröz papiller kistik tümör, bilateral	Bilateral	İyi	-		IC	pT1c pN0
OV-21	43	Borderline müsinöz tümör, bilateral	Bilateral	İyi	-		IB	pT1b pN0
OV-22	44	Borderline müsinöz tümör, sol	Sol	İyi	-		IA	pT1a pN0
OV-23	77	Seröz adenokarsinom	Bilateral	Az	+	-	IIIC	pT3c pN?
OV-24	47	Endometrioid tip malign adenofibrom	Sol	İyi	+	-	IIIA	pT3a pN0
OV-25	68	Mikst tipte over karsinom (End+seröz)	Bilateral	az	+	+	IIIC	pT3

								pN1
OV-26	50	Endometrioid adenokarsinom	Bilateral	Az	+	-	IIC	pT3c
								pN0
OV-27	40	Seröz papiller kistadenokarsinom	Bilateral	Az	+	+	IIC	pT3c
								pN0
OV-28	69	Andiferansiye tip adenokarsinom	Bilateral		+	+	IIC	pT3c
								pN1
OV-29	78	Seröz papiller kistadenokarsinom	Bilateral	orta	+	+	IIC	pT3c
								pN1
OV-30	72	Yüzeysel seröz papiller karsinom	Bilateral		+	-	IIC	pT3c
								pN1
OV-31	35	Endometrioid adenokarsinom	Sol	orta	-	+	IIC	pT3c
								pN1
OV-32	54	Müsinöz adenokarsinom	Bilateral	orta	+	+	IIC	pT3c
								pN1
OV-33	56	Seröz adenokarsinom	Bilateral	az	+	+	IIC	pT3c
								pN1
OV-34	63	Endometrioid tip kist adenokarsinom		orta	+	+	IIC	pT3c

								pN1
OV-35	78	Seröz papiller kistadenokarsinom	Bilateral	Orta	+	-	IIIC	pT3c
								pN1

\*LOK: Lokalizasyon

\*DIF: Diferansiye

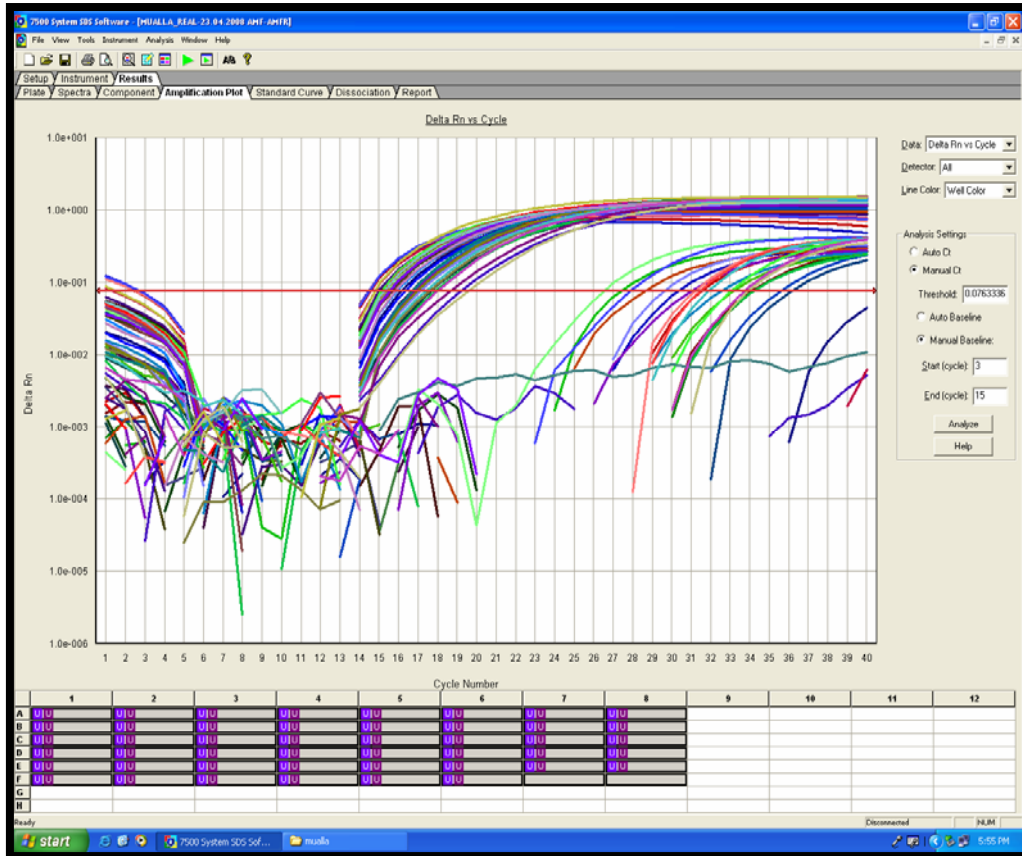
\*LD: Lenf düğümü metastazı

**Tablo 4.3.** Olguların histopatolojilerine göre dağılımı ve yüzdeleri

Histopatolojik Tip	Olgu Sayısı	Yüzde (%)
Seröz adenokarsinom	15	42.86
Borderline seröz papiller kistik tümör	1	2.86
Müsinöz adenokarsinom	3	8.57
Borderline müsinöz tümör	3	8.57
Mikst tipte over karsinom	6	17.14
Endometrioid tip adenokarsinom	6	17.14
Andiferansiye	1	2.86
<b>Toplam</b>	<b>35</b>	<b>100</b>

#### 4.2. Kantitatif Gerçek Zamanlı RT-PCR Sonuçları:

Çalışılan her bir genin ekspresyon düzeyi, Applied Biosystem 7500 SDS yazılım programında analiz yapılarak bulundu. İnternal kontrol olarak kullanılan rRNA'nın ekspresyon düzeyi ile her bir genin ekspresyon düzeyi kıyaslandı. Şekil 4.1'de bir analiz sonucu örneği verilmektedir.



**Şekil.4.1.** Applied Biosystem 7500 SDS yazılım programından analiz sonucu örneği.

**Tablo 4.4.** Olguların primer tümör dokusundaki gen ekspresyon profilinin normal dokudaki gen ekspresyon profili ile kıyaslanması sonucu elde edilen veriler

OLGU NO	TANI	EVRE	LD MET	OMENTUM MET	AMF/PGI GENİ İÇİN ΔΔCT	AMFR GENİ İÇİN ΔΔCT	CTGF GENİ İÇİN ΔΔCT	RAB25 GENİ İÇİN ΔΔCT	RASSF2A GENİ İÇİN ΔΔCT	MDR1 GENİ İÇİN ΔΔCT
OV-1	Seröz adenokarsinom	IIC	+	+	9.81	6.01	6.56	9.73	2.95	1.24
OV-2	Mikst tipte over karsinom (End+seröz)	IIC	+	+	3.47	3.47	1.78	5.79	2.02	0.99
OV-3	Seröz papiller adenokarsinom	IIC	?	+	7.85	6.81	8.17	6.43	1.74	0.75
OV-4	Müsinöz adenokarsinom	IA	-	-	5.74	8.92	6.17	10.32	1.13	1.48
OV-5	Mikst tipte over karsinom (End+seröz)	IIC	+	+	9.37	6.4	1.14	1.08	4.27	2.79
OV-6	Borderline müsinöz tümör, intestinal tip, sol	IB	-	-	5.14	0.64	4.91	0.46	İnformatif sonuç elde edilemedi.	2.32
OV-7	Seröz papiller kistadenokarsinom	IIC	+	+	3.17	0.5	0.17	5.17	0.54	1
OV-8	Mikst tipte over karsinomu (Endo+seröz)	IIC	+	+	6.31	3.31	7.04	5.65	4.5	4.47
OV-9	Seröz adenokarsinom	IIIB	-	+	11.22	9.42	7.82	1.95	1.79	2.3
OV-10	Seröz papiller karsinom	?	?		1.95	3.87	9.2	3.56	5.55	1.04
OV-11	Seröz papiller kistadenokarsinom	IIC	+	+	8.35	7.62	9.95	10.66	5.76	3.77
OV-12	Mikst tipte over karsinomu (berrak+seröz)	IIC	-	+	6.29	5.02	2.89	1.37	2.73	1.19
OV-13	Seröz adenokarsinom	IIC	+	+	3	0.95	1	1.35	0.38	1.56
OV-14	Seröz adenokarsinom	IIC	+	+	0.61	3.74	5.27	5.29	2.13	0.39
OV-15	Yüzeysel seröz papiller karsinom	IIC	-	+	3.72	2.88	5.04	4.74	4.48	3.58
OV-16	Endometrioid adenokarsinom	IA	-	-	11.30	3.24	5.44	2.92	Tekrarlı çalışmalar sonucunda ekspresyon belirlenmedi.	3.39

OV-17	Endometrioid tip malign adenofibrom	IIC	+	+	11.72	5.87	6.44	10.3	0.08	1.19
OV-18	Mikst tipte over karsinomu (berrak+seröz)	IIC	-	+	1.91	11.7	11.23	9.16	1.82	3.77
OV-19	Müsinöz adenokarsinom, endoservikal tip	IIC	+	+	İnformatif sonuç elde edilemedi.	3.64	1.63	9.46	0.12	5.28
OV-20	Borderline seröz papiller kistik tümör, bilateral	IC	-	-	7.11	İnformatif sonuç elde edilemedi.	4.61	1.44	3.42	0.81
OV-21	Borderline müsinöz tümör, bilateral	IB	-	-	11.19	0.54	2.42	9.03	2.01	3.81
OV-22	Borderline müsinöz tümör, sol	IA	-	-	0.32	İnformatif sonuç elde edilemedi.	İnformatif sonuç elde edilemedi.	0.62	İnformatif sonuç elde edilemedi.	0.21
OV-23	Seröz adenokarsinom	IIC	+	+	8.96	7.14	1.89	8.63	0.97	0.64
OV-24	Endometrioid tip malign adenofibrom	IIC	+	+	1.38	2.38	5.50	4.98	Tekrarlı çalışmalar sonucunda ekspresyon belirlenmedi.	0.56
OV-25	Mikst tipte over karsinom (End+seröz)	IIC	+	+	8.24	3.51	0.53	2.13	2.21	1.55
OV-26	Endometrioid adenokarsinom	IIC	+	+	1.86	İnformatif sonuç elde edilemedi.	2.04	8.01	9.09	1.4
OV-27	Seröz papiller kist adenokarsinom	IIC	+	+	1.47	1.96	2.26	1.73	4.32	4.9
OV-28	Andiferansiye tip adenokarsinom	IIC	+	+	0.13	4.68	0.99	0.33	1.59	0.82
OV-29	Seröz papiller kistadenokarsinom	IIC	+	+	3.01	1.69	0.43	1.95	2.15	1.25
OV-30	Yüzeysel seröz papiller karsinom	IIC	-	+	0.52	İnformatif sonuç elde edilemedi.	0.74	2.76	1.01	0.57
OV-31	Endometrioid adenokarsinom	IIC	+	+	9.12	İnformatif sonuç elde edilemedi.	0.62	İnformatif sonuç elde edilemedi.	İnformatif sonuç elde edilemedi.	2.78
OV-32	Müsinöz adeno karsinom	IIC	+	+	0.18	1.29	1.14	2.04	Tekrarlı çalışmalar sonucunda	0.06



									<b>ekspresyon belirlenmedi.</b>	
OV-33	Seröz adenokarsinom	IIC	+	+	<b>3.32</b>	<b>13.53</b>	<b>2.22</b>	<b>10.08</b>	<b>6.53</b>	<b>0.98</b>
OV-34	Endometrioid tip kist adenokarsinom	IIC	+	+	<b>5.42</b>	<b>2.98</b>	<b>5.77</b>	<b>4.64</b>	<b>2.52</b>	<b>1.63</b>
OV-35	Seröz papiller kistadenokarsinom	IIC	-	+	<b>9.46</b>	<b>3.24</b>	<b>7.21</b>	<b>1.44</b>	<b>0.23</b>	<b>2.79</b>

**Kırmızı: Gen ekspresyonundaki azalmayı ifade etmektedir.**

**Yeşil: Gen ekspresyonundaki artışı ifade etmektedir.**

**LD MET: Lenf düğümü metastazı**

**Tablo 4.5.** Olguların metastatik tümör dokusundaki gen ekspresyon profilinin primer tümör dokusundaki gen ekspresyon profili ile kıyaslanması sonucu elde edilen veriler

OLGU NO	TANI	EVRE	AMF/PGI GENİ İÇİN $\Delta\Delta CT$	AMFR GENİ İÇİN $\Delta\Delta CT$	CTGF GENİ İÇİN $\Delta\Delta CT$	RAB25 GENİ İÇİN $\Delta\Delta CT$	RASSF2A GENİ İÇİN $\Delta\Delta CT$	MDR1 GENİ İÇİN $\Delta\Delta CT$
OV-1	Seröz adenokarsinom	IIC	0.6	2.47	7.85	0.66	3.69	4.66
OV-2	Mikst tipte over karsinom (End+seröz)	IIC	4.19	4.1	3.91	3.47	1.58	1.48
OV-3	Seröz papiller adenokarsinom	IIC	4.25	5.7	1.1	2.67	2.94	1.13
OV-5	Mikst tipte over karsinom (End+seröz)	IIC	2.25	İnformatif sonuç elde edilemedi	İnformatif sonuç elde edilemedi	6.3	İnformatif sonuç elde edilemedi	5.56
OV-7	Seröz papiller kistadenokarsinom	IIC	10.75	10.64	2.44	6.05	1.2	2.8
OV-8	Mikst tipte over karsinomu (Endo+seröz)	IIC	6.72	3.29	İnformatif sonuç elde edilemedi	3.25	İnformatif sonuç elde edilemedi	İnformatif sonuç elde edilemedi
OV-9	Seröz adenokarsinom	IIIB	0.26	0.32	6.61	0.55	2.17	3.52
OV-11	Seröz papiller kist adenokarsinom	IIC	0.16	0.81	4.14	1.3	0.92	6.69
OV-13	Seröz adenokarsinom	IIC	0.26	4.1	0.12	5	0.2	4.23
OV-14	Seröz adenokarsinom	IIC	0.58	0.53	0.23	0.12	İnformatif sonuç elde edilemedi	1.82
OV-17	Endometrioid tip malign adenofibrom	IIC	5.58	1.81	6.93	2.55	0.4	1.75
OV-18	Mikst tipte over karsinomu (berrak+seröz)	IIC	2.67	6.51	İnformatif sonuç elde edilemedi	0.04	İnformatif sonuç elde edilemedi	3.55
OV-23	Seröz adenokarsinom	IIC	0.1	0.81	2.27	2.73	0.42	0.51
OV-24	Endometrioid tip malign adenofibrom	IIC	İnformatif sonuç elde edilemedi.	0.12	0.2	12.21	Primer tümör dokusunda ekspresyon gözlenmediği için kıyaslama yapılmadı.	1.19
OV-25	Mikst tipte over karsinom (End+seröz)	IIC	İnformatif sonuç elde edilemedi.	7.08	3.13	6.86	0.12	0.55
OV-28	Andiferansiye tip	IIC	İnformatif	İnformatif	İnformatif	İnformatif	1.87	12.67

	adenokarsinom		sonuç elde edilemedi.	sonuç elde edilemedi.	sonuç elde edilemedi.	sonuç elde edilemedi		
OV-33	Seröz adenokarsinom	IIC	3.98	10.39	0.46	10.14	4.79	2.79
OV-35	Seröz papiller kistadenokarsinom	IIC	1.64	0.61	5.76	0.72	1.24	1.67

**Kırmızı: Gen ekspresyonundaki azalmayı ifade etmektedir.**

**Yeşil: Gen ekspresyonundaki artışı ifade etmektedir.**

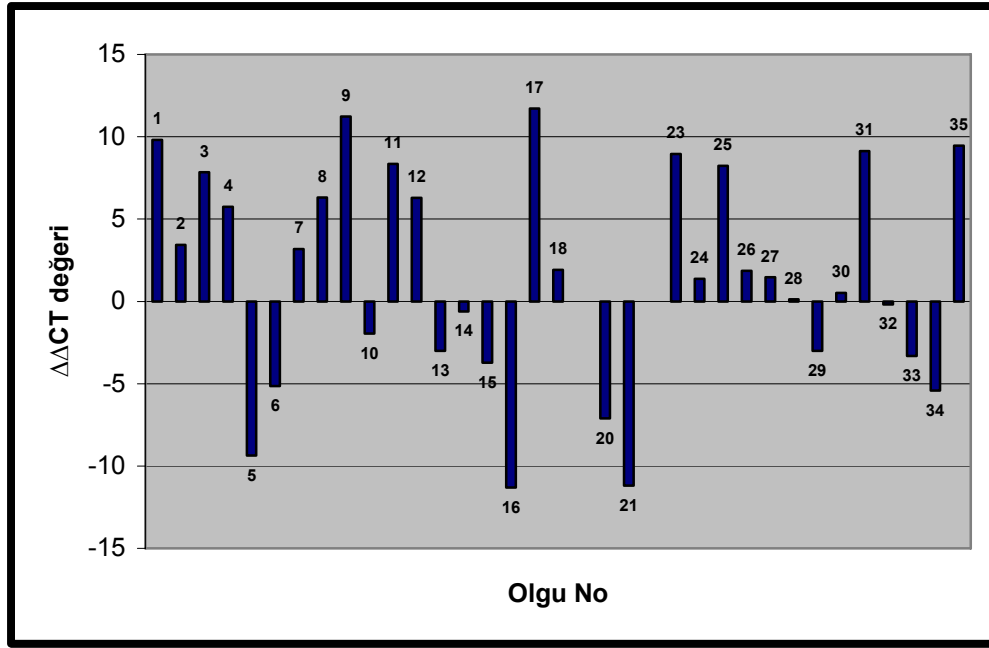
**LD MET: Lenf düğümü metastazı**

**End: Endometrioid**

Çalışmaya alınan normal doku, tümör doku ve metastatik doku örneklerinde AMF/PGI ve bunun reseptörü AMFR, ayrıca CTGF, RAB25, RASSF2A ve MDR1 genlerinin ekspresyon düzeyleri kantitatif gerçek zamanlı RT-PCR ile aynı standartlar içinde değerlendirildi (Tablo 4.4 ve Tablo 4.5). Herbir gene ait ekspresyon düzeyleri aşağıda ayrı başlıklar halinde verilmektedir.

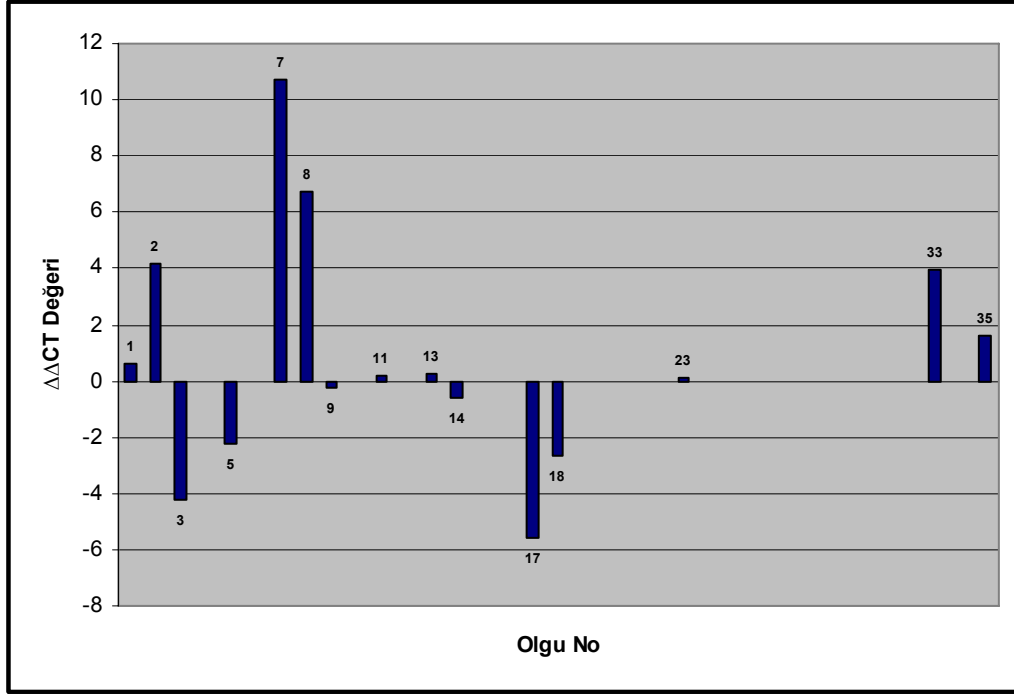
#### 4.2.1. Epitelyal Over Tümörlerinde AMF/PGI Gen Ekspresyon Düzeyi

35 olgunun 19' unda (%54.28) AMF/PGI ekspresyon düzeyinde artış, 14 olguda (%40) ise azalış belirlendi (Tablo 4.4) (Şekil 4.2). 1 olguda ise gen ekspresyonunda herhangi bir değişiklik gözlenmedi. 1 olgudan da informatif sonuç elde edilemedi.



Şekil 4.2. Primer tümör odaklarında AMF/GPI geninin mRNA düzeyi

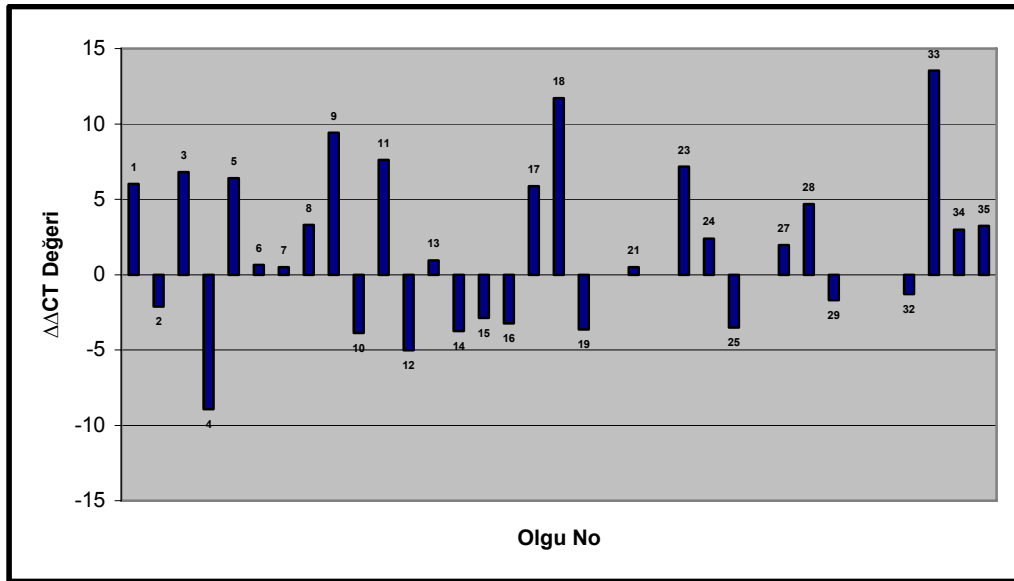
Metastatik tümör dokusu çalışılan 18 olgunun 15' inden informatif sonuç elde edilmiştir. Metastatik tümör dokularının 7' sinde (%46.66) primer tümör dokusuna kıyasla ekspresyonda artış gözlenirken, 5 dokuda (%33.33) ise azalma belirlenmiştir. 3 metastatik tümör dokusunda (%20) ise ekspresyonda herhangi bir değişim gözlenmemiştir (Şekil 4.3 ve Tablo 4.5).



Şekil 4.3. Metastatik tümör odaklarındaki AMF/GPI geninin mRNA düzeyinin primer tümör odaklarına göre kıyaslanması ile elde edilen sonuç

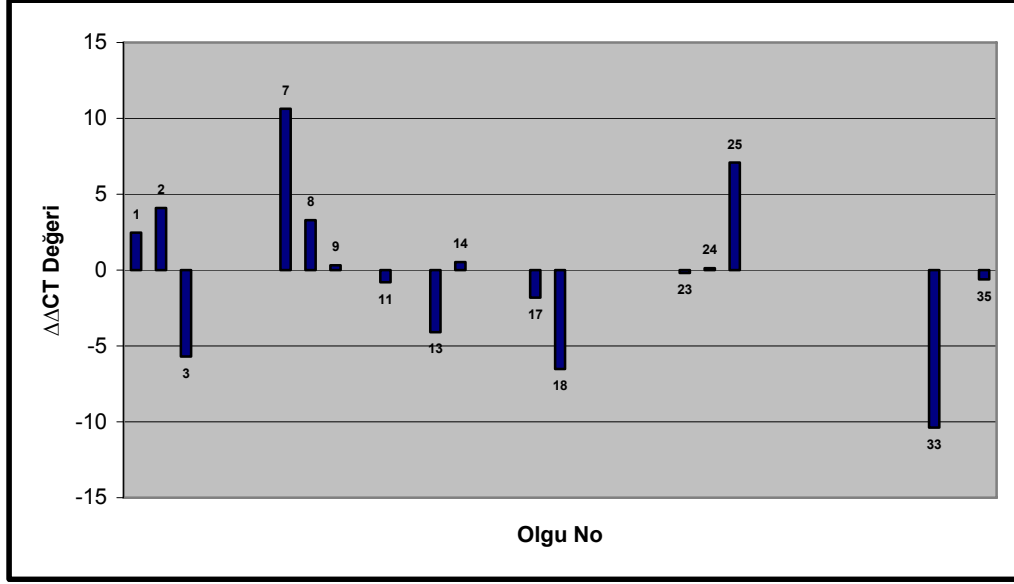
#### 4.2.2. Epitelyal Over Tümörlerinde AMFR Gen Ekspresyon Düzeyi

AMFR gen ekspresyon çalışmasında 35 olgunun 17'inde (%56.66) AMFR mRNA düzeyinde artış gözlenirken, 12 örnekte (%34.29) ise azalma belirlenmiştir. 1 örnekte ise, normal dokuya kıyasla ekspresyonda herhangi bir değişim gözlenmemiştir (Şekil 4.4, Tablo 4.4). En yüksek ekspresyon artışı Ov-33'de, en düşük ekspresyon azalışının ise Ov-2, Ov-13, Ov-29 ve Ov-32' de olduğu bulundu. 5 olgudan da informatif sonuç alınamamıştır.



Şekil 4.4. Primer tümör odaklarında AMFR geninin mRNA düzeyi

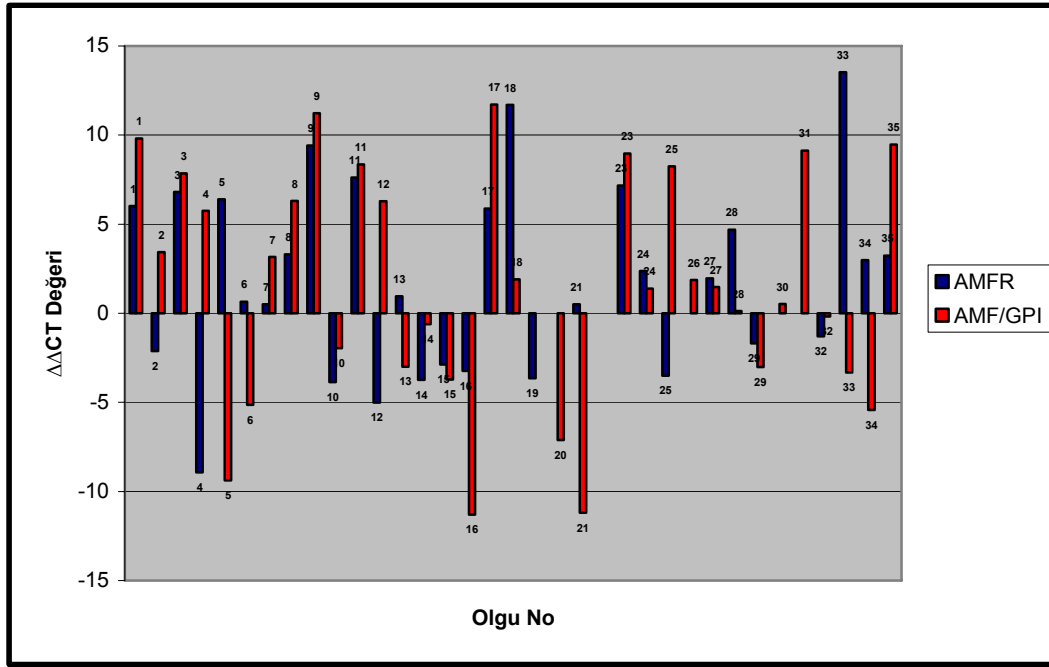
Metastatik tümör dokusu çalışılan 18 olgunun 16' sından informatif sonuç elde edilmiştir. Metastatik tümör örneğinin 8' inde (%50) primer tümör dokusuna kıyasla ekspresyonda artış gözlenirken, 7 örnekte (%43.75) ise azalma belirlenmiştir. 1 metastatik tümör dokusunda (%6.25) ise ekspresyonda herhangi bir değişim gözlenmemiştir (Şekil 4.5 ve Tablo 4.5).



Şekil 4.5. Metastatik tümör odaklarındaki AMFR geninin mRNA düzeyinin primer tümör odaklarına göre kıyaslanması ile elde edilen sonuç

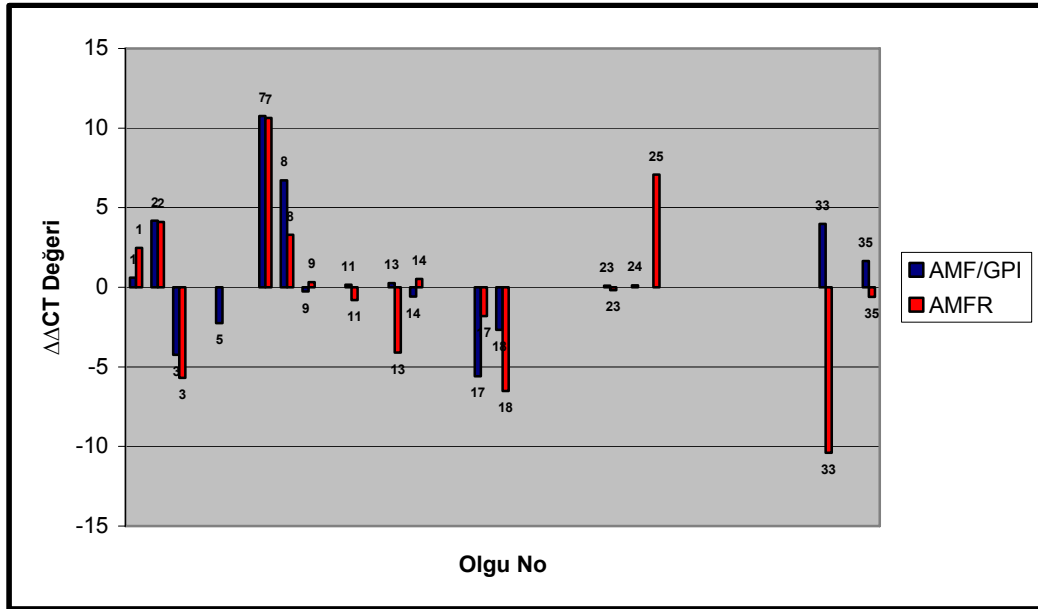
#### 4.2.3. Epitelyal Over Tümörlerinde AMF/PGI ve reseptörü AMFR'nin Gen Ekspresyon Düzeylerinin Birlikte Değerlendirilmesi:

Her iki genin ekspresyon düzeylerindeki değişiklikler birlikte kıyaslandığında, 35 olgunun 11' inde (%31.43) her iki genin ekspresyonunun tümör örneklerinde paralel olarak arttığı gözlemlendi. Ov-2, Ov-4, Ov-12 ve Ov-25 nolu olgularda AMF ekspresyonunda artış, reseptöründe ise ekspresyonda azalış tespit edildi. Ov-5, Ov-33 ve Ov-34 nolu olgularda ise tam tersi durum gözlemlendi. Ayrıca Ov-28 nolu örnekte, AMF ekspresyonunda artış gözlenirken, reseptöründe bir değişiklik gözlenmedi (Şekil 4.6 ve Tablo 4.4).



Şekil 4.6. AMF/GPI ve AMFR genlerinin mRNA düzeylerinin birbiri ile karşılaştırılması

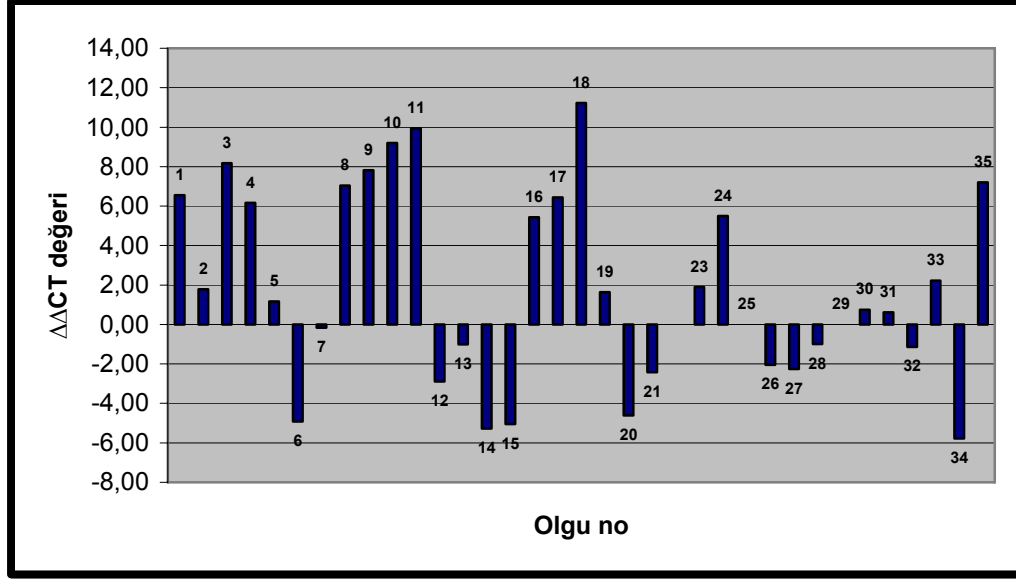
Metastatik tümör örneklerinde AMF/PGI ve reseptörünün ekspresyon düzeyleri birlikte değerlendirildiğinde, 4 olguda AMF/PGI ve reseptörünün ekspresyonlarının birlikte artış ve 3 olguda ise azalış gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 4.7 ve Tablo 4.5).



Şekil 4.7. Metastatik tümör odaklarındaki AMF/GPI ve reseptörü olan AMFR geninin mRNA düzeylerinin primer tümör odaklarına göre kıyaslanması ile elde edilen sonuç.

#### 4.2.4. Epitelyal Over Tümörlerinde CTGF Gen Ekspresyon Düzeylerinin Değerlendirilmesi:

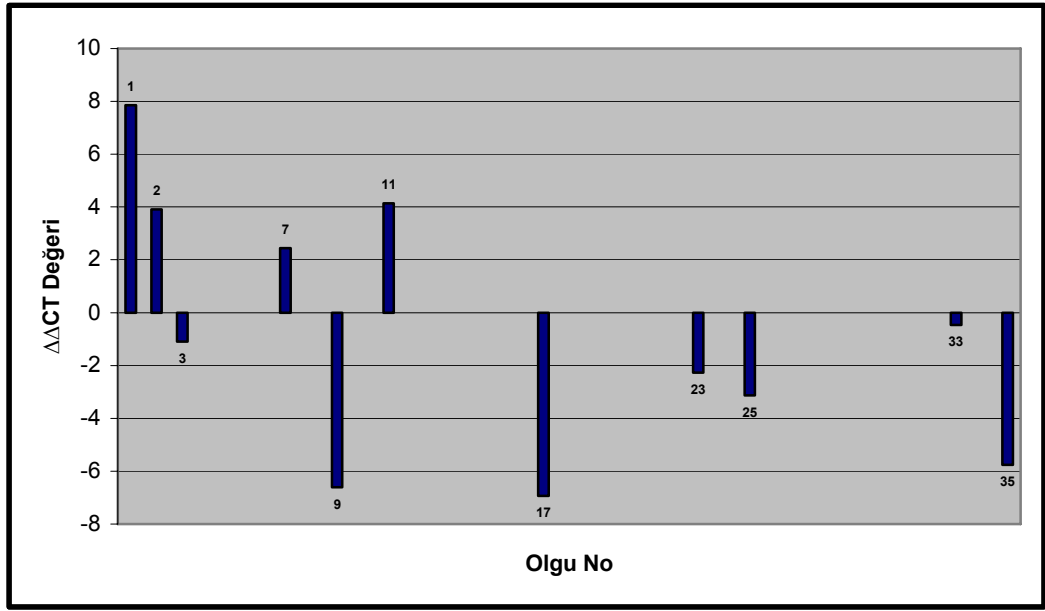
Çalışılan 35 olgunun 21'ine ait tümör dokusunda (%61.76) gen ekspresyonunda artış gözlenirken, 12 tümör dokusunda (%35.29) ise azalış belirlendi. 1 örnekte herhangi bir ekspresyon farklılığı gözlenmedi. 1 tümör örneğinde ise bilgi verici sonuç alınamadı (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. Primer tümör odaklarında CTGF geninin mRNA düzeyi

Metastatik tümör dokusu çalışılan 18 olgunun 14' ünden informatif sonuç elde edilmiştir. Metastatik tümör örneğinin 4' ünde (%28.57) primer tümör dokusuna kıyasla ekspresyonda artış gözlenirken, 7 örnekte (%50) ise azalma belirlenmiştir. 3 metastatik tümör dokusunda (%21.43) ise ekspresyonda herhangi bir değişim gözlenmemiştir (Şekil 4.9 ve Tablo 4.5).

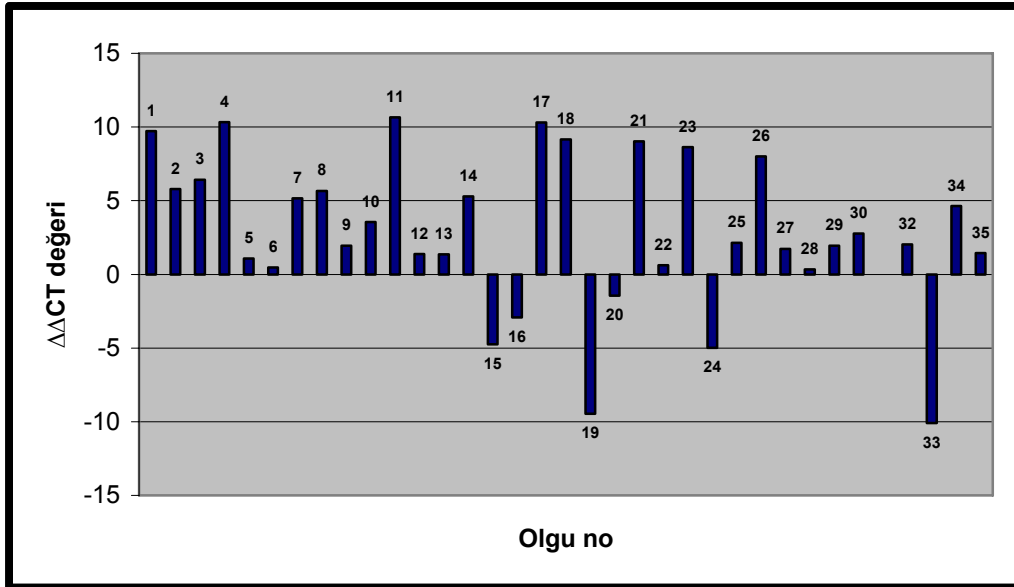




Şekil 4.9. Metastatik tümör odaklarındaki CTGF geninin mRNA düzeyinin primer tümör odaklarına göre kıyaslanması ile elde edilen sonuç

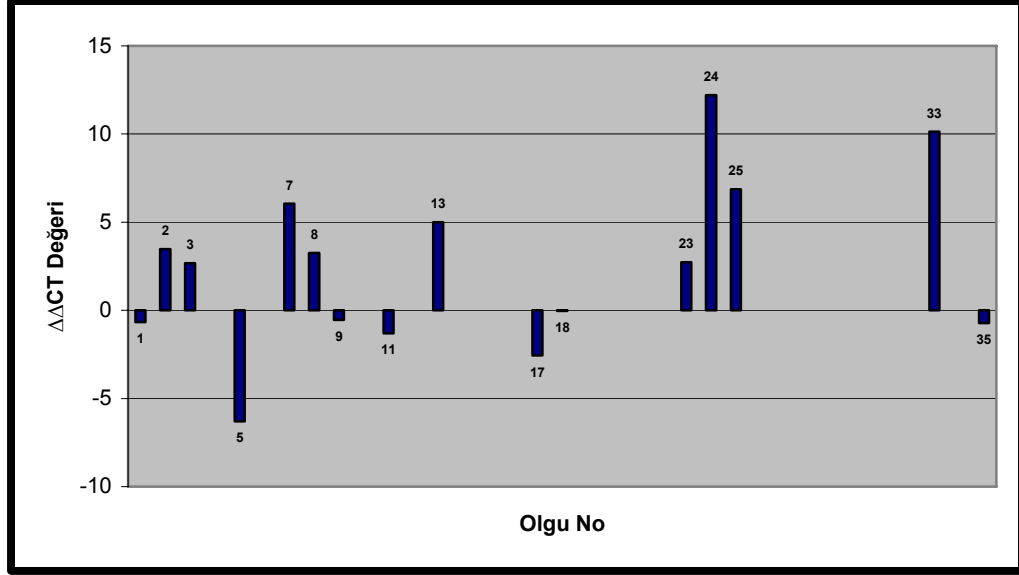
#### 4.2.5. Epitelyal Over Tümörlerinde RAB25' in Gen Ekspresyon Düzeylerinin Değerlendirilmesi:

Çalışılan 35 olgunun 28' inin (%80) tümör dokusunda normal dokularındaki gen ekspresyon düzeyi ile kıyaslandığında önemli oranda artış belirlenirken, 6 tümör dokusunda (%17.14) ise, azalma belirlendi. 1 tümör dokusunda ise bilgi verici sonuç alınmadı (Şekil 4.10 ve Tablo 4.4).



Şekil 4.10. Primer tümör odaklarında RAB25 geninin mRNA düzeyi

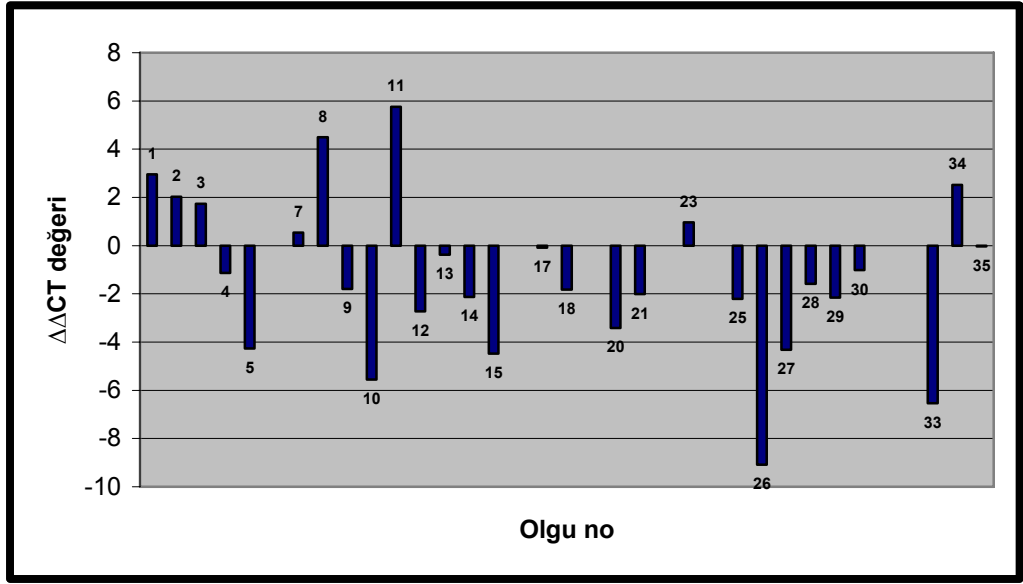
Metastatik tümör dokusu çalışılan 18 olgunun 17' sinden informatif sonuç elde edilmiştir. Metastatik tümör örneğinin 10' unda (%58.82) primer tümör dokusuna kıyasla ekspresyonda artış gözlenirken, 5 örnekte (%29.41) ise azalma belirlenmiştir. 2 metastatik tümör dokusunda (%11.76) ise ekspresyonda herhangi bir değişim gözlenmemiştir (Şekil 4.11 ve Tablo 4.5).



Şekil 4.11. Metastatik tümör odaklarındaki RAB25 geninin mRNA düzeyinin primer tümör odaklarına göre kıyaslanması ile elde edilen sonuç

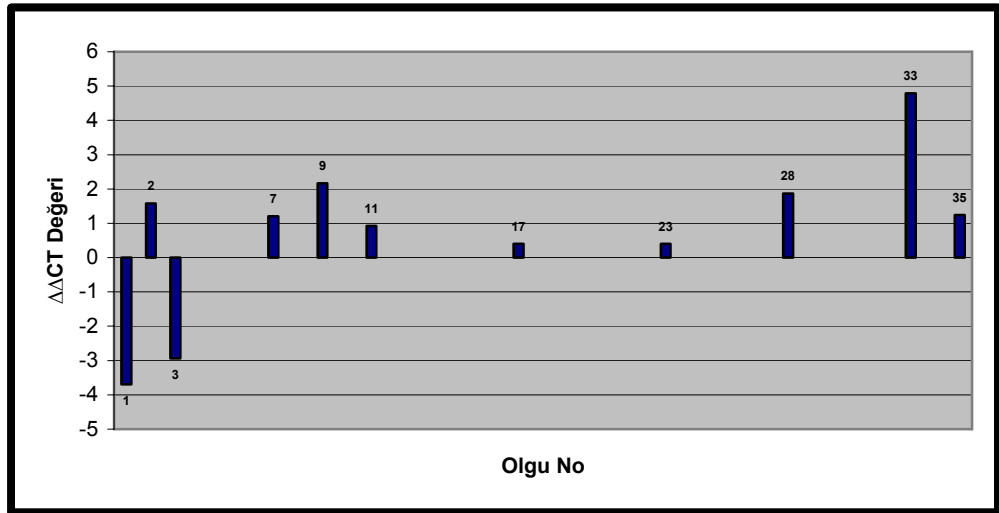
#### 4.2.6. Epitelyal Over Tümörlerinde RASSF2A' nın Gen Ekspresyon Düzeylerinin ve Metilasyon Profiline Birlikte Değerlendirilmesi:

Çalışmaya katılan 35 olgunun 17' sine (%53.13) ait primer tümör dokusunda normal dokularına kıyasla ekspresyonda azalma, 9'unda (%28.13) ise ekspresyon düzeyinde artış gözlemlendi. 3 olguda ekspresyonda bir değişiklik belirlenmedi. 3 olguda ise tekrarlı yapılan kantitatif gerçek zamanlı RT-PCR sonucunda ekspresyonun olmadığı gözlemlendi (Şekil 4.12 ve Tablo 4.4). 3 tümör dokusunda ise bilgi verici ekspresyon sonucu elde edilemedi.



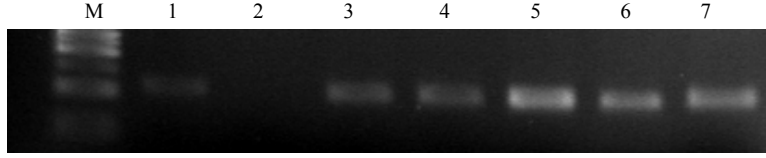
Şekil 4.12. Primer tümör odaklarında RASSF2A geninin mRNA düzeyi

Metastatik tümör dokusu çalışılan 18 olgunun 14' ünden informatif sonuç elde edilmiştir. Metastatik tümör örneğinin 7' sinde (%38.88) primer tümör dokusuna kıyasla ekspresyonda artış gözlenirken, 2 örnekte (%11.11) ise azalma belirlenmiştir. 4 metastatik tümör dokusunda (%22.22) ise ekspresyonda herhangi bir değişim gözlenmemiştir (Şekil 4.13 ve Tablo 4.5).

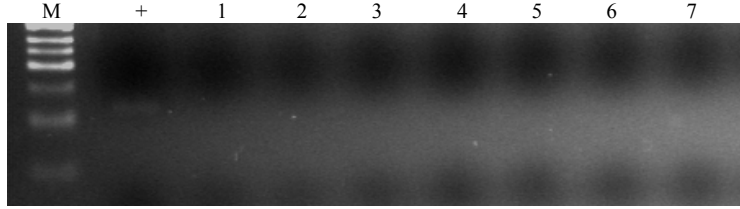


Şekil 4.13. Metastatik tümör odaklarındaki RASSF2A geninin mRNA düzeyinin primer tümör odaklarına göre kıyaslanması ile elde edilen sonuç

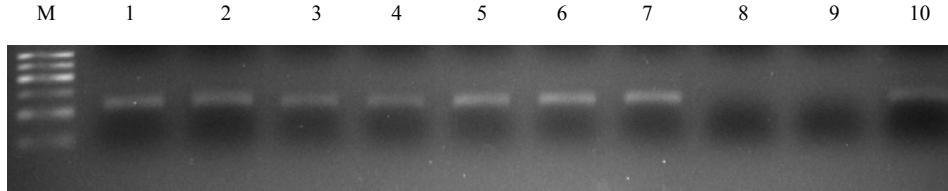
Tüm örneklerde yapılan metilasyon spesifik PCR çalışması sonucunda, Ov-4, Ov-8, Ov-16, Ov-17, Ov-24, Ov-32 numaralı örneklerde metile ve metile olmayan allele spesifik PCR sonucunda herhangi bir amplifikasyon gözlenmedi (Şekil 4.14.a, b, Şekil 4.15.a, b, Şekil 4.16.a, b). Ov-16, Ov-24 ve Ov-32 numaralı olgularda tümör örneklerinde ekspresyonun olmadığı belirlenirken, Ov-4, Ov-8, Ov-17' de ise bir ekspresyonun olduğu gözlemlendi.



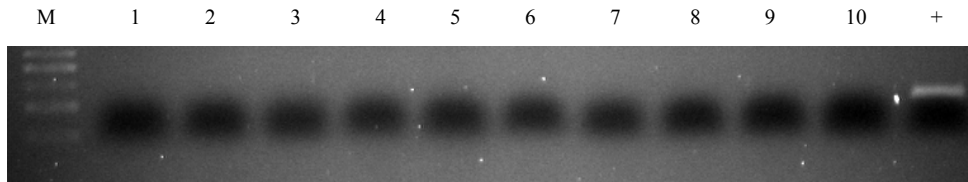
**Şekil 4.14.a** Ov-4 nolu olgunun metile olmayan allele ait PCR sonuçları: M: Markır; 1: Normal doku; 2: Primer tümör dokusu



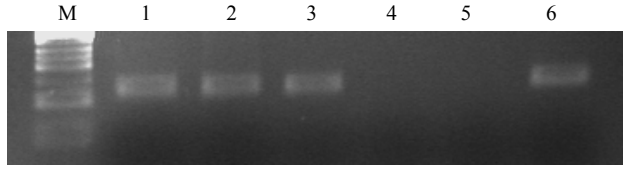
**Şekil 4.14.b** Ov-4 nolu olgunun metile allele ait PCR sonuçları: 1: Normal doku; 2: Primer tümör dokusuna; M: Markır; +: Pozitif kontrol



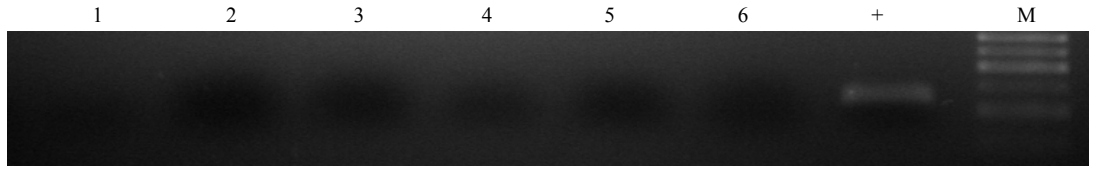
**Şekil 4.15.a.** Ov-8 ve Ov-16 nolu olgunun metile olmayan allele ait PCR sonuçları: 7: Ov-8 nolu olgunun normal dokusu; 8: Ov-8 nolu olgunun primer tümör dokusu; 9: Ov-16 nolu olgunun primer tümör dokusu; 10: Ov-16 nolu olgunun normal dokusu; M: Markır



**Şekil 4.15.b.** Ov-8 ve Ov-16 nolu olguların metile allele spesifik PCR sonuçları: 7: Ov-8 nolu olgunun normal dokusu; 8: Ov-8 nolu olgunun primer tümör dokusu; 9: Ov-16 nolu olgunun primer tümör dokusu; 10: Ov-16 nolu olgunun normal dokusu; M: Markır; +: Pozitif kontrol



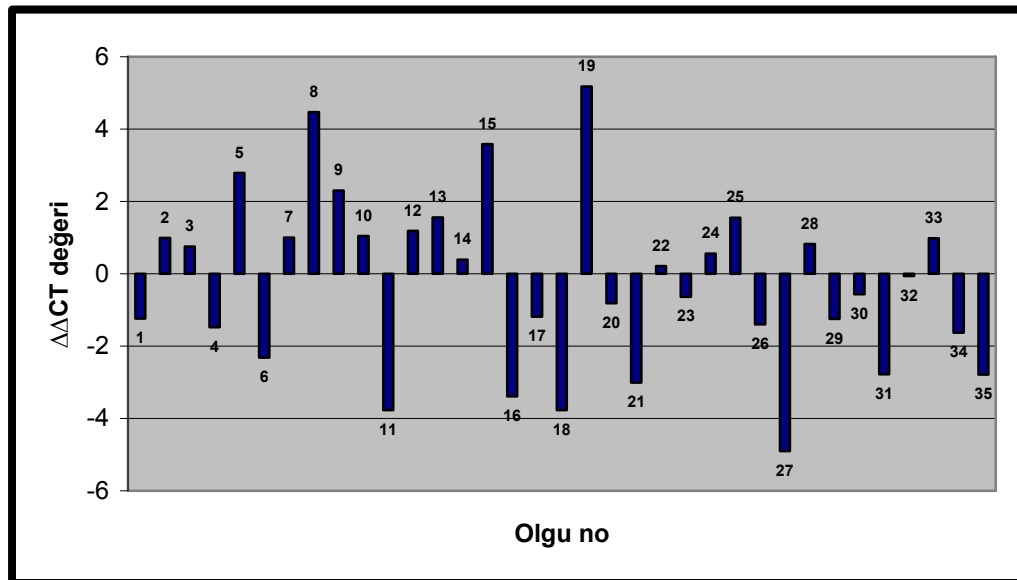
**Şekil 4.16.a.** Ov-17 ve Ov-24 nolu olgunun metile olmayan allele ait PCR sonuçları: 3: Ov-17 nolu olgunun normal dokusu; 4: Ov-17 nolu olgunun primer tümör dokusu; 5: Ov-24 nolu olgunun primer tümör dokusu; 6: Ov-24 nolu olgunun normal dokusu; M: Markır



**Şekil 4.16.b.** Ov-17 ve Ov-24 nolu olgunun metile allele ait PCR sonuçları: 3: Ov-17 nolu olgunun normal dokusu; 4: Ov-17 nolu olgunun primer tümör dokusu; 5: Ov-24 nolu olgunun primer tümör dokusu; 6: Ov-24 nolu olgunun normal dokusu; M: Markır; +: Pozitif kontrol

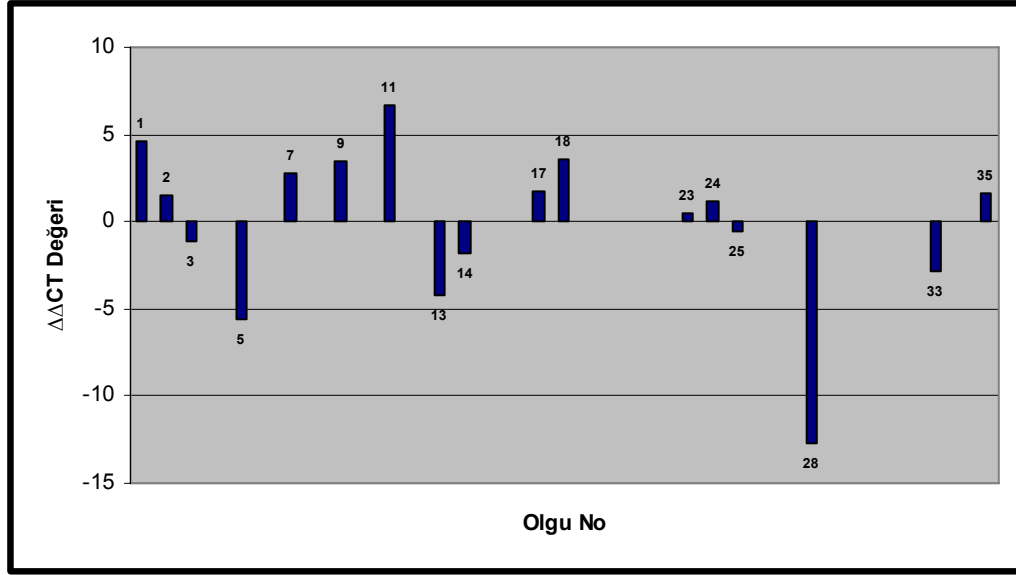
#### 4.2.7. Epitelyal Over Tümörlerinde MDR1 Gen Ekspresyon Düzeylerinin Değerlendirilmesi:

Çalışılan 35 doku örneğinin 16'sında (%45.71) normal doku ile kıyaslandığında tümör dokusunda ekspresyon düzeyinde artış, 17'sinde (%48.57) ise azalış olduğu gözlemlendi. 2 örnekte ise herhangi bir fark görülmedi. MDR1 için en yüksek ekspresyon Ov-19 örneğinde gözlenirken, en düşük ekspresyon seviyesi Ov-27 örneğinde saptandı (Şekil 4.17 ve Tablo 4.4).



**Şekil 4.17.** Primer tümör odaklarında MDR1 geninin mRNA düzeyi

Metastatik tümör dokusu çalışılan 18 olgunun 17' sinden informatif sonuç elde edilmiştir. Metastatik tümör örneğinin 11' inde (%64.70) primer tümör dokusuna kıyasla ekspresyonda artış gözlenirken, 6 örnekte (%35.30) ise azalma belirlenmiştir (Şekil 4.18 ve Tablo 4.5).



Şekil 4.18. Metastatik tümör odaklarındaki MDR1 geninin mRNA düzeyinin primer tümör odaklarına göre kıyaslanması ile elde edilen sonuç

## TARTIŞMA ve SONUÇLAR

Over kanseri, ölüme sebebiyet veren kanserler arasında 4. sırada yer alan jinekolojik kanserdir. Köken aldıkları hücre tipine göre sınıflandırılan over tümörlerinin %90' ı overin yüzey epitelinden oluşmaktadır. Epitelyal over tümörlerinin görülme sıklığı, %65-70' dir (50).

Epitelyal over tümörlerinin %80' i benign formda olup, 20-45 yaş arası daha sık görülmektedir. Malign formda olanlar ise daha çok yaşlı kadınlarda, 40-65 yaşları arasında ortaya çıkmaktadır (39). Tez çalışması kapsamında yer alan 35 epitelyal over kanserli olguların yaş aralığı 30-89 arasında değişmekte olup, en fazla olgunun (%37.14) 40-49 yaş arasında olduğu gözlenmiştir. Olgu sayısının az olmasına karşın, bu oranın literatürle uyumlu olduğu görülmektedir.

Epitelyal over tümörleri, histopatolojilerine göre yedi farklı grupta toplanmaktadır (Tablo 4.3). En sık görülen alt tip, %50-60 oranla seröz tümörlerdir (22). Çalışma kapsamında, seröz tümörlerin %45.5 sıklıkla görülmesi literatürle uyumluluk göstermektedir.

Epitelyal over tümörlerinin bilateral olması sıklıkla görülmektedir. Bu durum ya bir overdeki tümörün diğer overe metastazı ile yada her iki tümöründe primer tümör olması ile açıklanabilir. Seröz adenokarsinomaların %57.5' i bilateral iken, müsinöz tümörlerin %21.3' ü, berrak hücreli tümörlerin %13.3' ü, endometrioid tümörlerin %28.6' sı ve diğer epitelyal over tümörü tiplerinin ise %35.6' sı bilateraldir (79). Çalışma kapsamında yer alan 16 seröz epitelyal over tümörünün 15' i (%93.15), 6 müsinöz over tümörünün 2' si (%33.3), 6 endometrioid tip over tümörünün 2' si (%33.3) bilateraldir. Müsinöz ve endometrioid tip over tümörleri için belirlenen oran literatür ile uyumludur.

Epitelyal over kanseri, jinekolojik malignansiler arasında en lenfofilik tümörler olup lenf nodlarına kolay metastaz yapabilme özelliğine sahiptir. Lenf nodu metastazları erken evrede %12-25 arasında iken, geç evrede ise %46-76 arasındadır. Metastaz ile sağkalım süresi arasında doğru orantılı bir ilişki bulunmaktadır. Bu nedenle son yıllarda epitelyal over kanserlerinde lenf nodu ve diğer uzak organ metastazları üzerine çalışmalar yoğunlaşmış durumdadır (36). Bu çalışmalar ile over kanserinin gelişimi, ilerlemesi ve metastazında rol oynayan gen veya genlerin ekspresyon profillerinin belirlenmesi ile erken tanıya yönelik biyolojik markırların gösterilmesi ve yeni tedavi protokollerinin geliştirilmesi amaçlanmaktadır.

Over kanserlerinin gelişimi ve ilerleyişinde sayısal ve yapısal kromozom abnormaliteleri, gen amplifikasyonları, genlerdeki nokta mutasyonlar gibi birçok genetik faktör ile metilasyon gibi epigenetik faktörler işe karışmaktadır. Bizim çalışmamızda, diğer kanser tiplerinin farklılaşması, progresyonu ve metastazında rol oynadığı ileri sürülen bazı genlerin (AMF/GPI, AMFR, CTGF, RAB25A, RASSF2A, MDR1) epitelyal over kanserlerindeki rollerini gösterebilmek için kantitatif gerçek zamanlı RT-PCR yöntemi ile olguların normal dokuları, primer tümör dokuları ve metastatik tümör dokularındaki ekspresyon profilleri araştırıldı.

Ayrıca RASSF2A geninin promotöründeki CpG adacığının metilasyon durumu ve ekspresyon düzeyi arasındaki ilişki ortaya konuldu. Elde edilen sonuçlar, olguların histopatolojik bulguları ile birlikte değerlendirildi. Tez kapsamında yer alan olgular 2006 yılından itibaren toplanmaya başlanıldığı için, genlerin ekspresyon profili ile olguların 5 yıllık sağkalım süreleri arasında bir kıyaslama yapılamadı.

Tez kapsamında yer alan genlerden biri olan AMF/PGI ve reseptörü olan AMFR' nin aşırı ekspresyonunun, kanser progresyonu, anjiyogenez ve özellikle metastaz sırasında migrasyon bağımlı prosesler ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, kolorektal kanser ve pankreatik kanserlerde yapılan çalışmalar ile, AMF/PGI ve reseptörü olan AMFR' nin metastatik proseste önemli rol oynadığı gösterilmiştir. Bu çalışmalar sonucunda, yüksek düzeyde AMFR gen ekspresyonu gözlenen olguların sağkalım oranının, düşük düzeyde ekspresyon olan olgulardan önemli derecede düşük olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, AMFR geninin ekspresyon düzeyindeki artışın, tümörün yeniden nüks etmesi ile ilişkili olduğu da gösterilmiştir (67-70). Jiang ve arkadaşları, meme kanserinde AMF/PGI ekspresyonunun normal dokulara kıyasla oldukça yüksek düzeyde eksprese olduğunu göstermişlerdir. Yüksek düzeyde ekspresyon belirledikleri olgularda lokal rekürrensi gözlemlendiği ve kötü prognoza sahip olduğu bildirilmiştir (71). Endo ve arkadaşlarının dil squamous hücre karsinomunda yapmış olduğu bir çalışmada ise, immünohistokimya yöntemi ile AMFR gen ekspresyonuna bakılmış ve olguların %42' sinde AMFR genine ait immünoaktivite gösterilmiştir. Böylece AMFR' nin önemli bir prognostik faktör olabileceğini ileri sürmüşlerdir. Literatür bilgisine göre, şimdiye kadar AMF/PGI ve reseptörünün epitelyal over tümörlerinin gelişimi ve progresyonundaki rolünü gösteren bir çalışma bulunmamaktadır. Epitelyal over kanserlerinde ilk olan bu çalışmamızda, 35 olgunun 19' una (%54.28) ait primer tümör dokusunda normal dokuya kıyasla ekspresyonda artış belirlendi. 35 olgunun 18' ine ait metastatik tümör dokusu ile primer tümör dokusu kıyaslandığında, 7 metastatik tümör örneğinde artış gözlenmiştir. Primer tümör odağında artış belirlenen bu olguların, evrelerine bakıldığında biri hariç (Ov-4) hepsinin evre III olduğu ve omentum metastazlarının bulunduğu görülmektedir. 6 borderline tümörün sadece birinde artış gözlenmesi, AMF gen ekspresyonundaki artışın ileri evrelerde olabileceğini göstermektedir. Daha fazla borderline epitelyal over tümörlerinde çalışmanın yapılması gerekmektedir. Bu bulgu diğer kanser tiplerinde yapılan çalışmalar ile elde edilen literatür bilgisi ile uyumlu olarak AMF gen ekspresyonundaki artışın, epitelyal over kanserinde de, tümörün agresivitesi ve metastazında önemli olduğunu göstermektedir.

35 olgunun 17' sinde (%56.66) primer tümör dokularında normal dokularına kıyasla AMFR gen ekspresyonunda artış belirlenmiştir. 35 olgunun 16' sına ait metastatik tümör dokusunun ise 8' inde primer tümör dokularına kıyasla ekspresyonda artış gözlenmiştir. AMF ve reseptörü olan AMFR' nin gen ekspresyon profilleri birlikte değerlendirildiğine, 35 olgunun 11' inde (%31.43) her iki genin ekspresyonunun primer tümör örneklerinde paralel olarak artmış olduğu gözlenmiştir. Ov-2, 4, 7, ve 25 nolu olgularda, AMF /PGI ekspresyonunda artış varken, AMFR' de ise azalmanın olduğu görülmüştür. Bu olgulardan sadece biri (Ov-4) evre I, diğerleri ise evre III' dür. Yine Ov-5, 6, 13, 33 ve 34 nolu olgularda ise AMFR ekspresyonunda artış, AMF düzeyinde azalış saptanmıştır. Yine bunlardan biri (Ov-6) evre I iken, diğerleri ise evre III' dür. Bu veriler bize, AMF/PGI sitokini ve reseptörünün sinyal yolağında beklendiği gibi büyük oranda (11 olguda) paralel



çalıştığını, diğer olgularda ise farklı yolları etkilemiş olabileceğini düşündürmektedir. Olgu sayısının az olmasına karşın her iki ilişkili genin ekspresyon düzeylerinin epitelyal over kanserli 11 olguda paralel artışının önemli bir bulgu olduğunu ve yeni çalışmalar için temel oluşturacağını düşünmekteyiz.

Projede çalışılan RASSF2 geni; tümör baskılayıcı gen olarak fonksiyon görmektedir. RASSF2 geninin 3 farklı transkriptinden biri olan RASSF2A, fonksiyonel olarak aktif bir formdur. RASSF2A proteinin özellikle akciğer kanser hücre hattında ekspresyonunun down-regüle edildiği gösterilmiştir. RASSF2A geninin ekspresyon kaybı, promotöründeki CpG adacığının hipermetilasyonu yoluyla gerçekleşmektedir. Kolorektal kanser hücre hattında RASSF2A'nın hipermetile olduğu gösterilmiştir (72). Promotör hipermetilasyonu ayrıca, küçük hücreli olmayan akciğer tümörlerinde de gösterilmiştir. Literatür taramasına göre şimdiye kadar over kanserlerinde RASSF2A yönelik gen ekspresyonu ve metilasyon çalışması yapılmamıştır. Bizim bu çalışmamızda, 35 olgunun 17'sine (%53.13) ait primer tümör dokusunda normal dokuya kıyasla ekspresyonda azalma belirlenmiştir. Özellikle 6 borderline tümör örneğinin 3'ünde ekspresyonda azalma görülürken, 3'ünde ise ekspresyonunun hiç olmadığı belirlenmiştir. Bu bulgu da, RASSF2A geninin özellikle over tümörünün gelişiminde erken evrelerde rol oynadığını ve erken evre biyolojik belirteci olarak kullanılabileceğini göstermektedir. Ayrıca evre III olan bir tümör örneğinde, tekrarlanan kantitatif gerçek zamanlı RT-PCR çalışması sonucu ekspresyon olmadığı belirlendi. Azalış belirlenen 17 olguda yapılan metilasyon spesifik PCR sonucunda, genin promotör bölgesinde metilasyonun olmadığı gözlemlendi. Ancak, aynı RNA ve cDNA örneklerinde çalışılan ve diğer genlere ait ekspresyonları gözlenen 3 olguda RASSF2A gen ekspresyonu gözlenmedi. Tekrarlanmış metilasyon çalışmalarında da metile ve metile olmayan allele spesifik amplifikasyon görülmedi. Bu bulgu bize bu 3 olguda ilgili gen bölgesinin homozigot delesyonu olabileceğini düşündürmektedir. RASSF2 geni 20p13 bölgesinde lokalizedir. Okada ve arkadaşlarının epitelyal over tümürlü olgularda yapmış oldukları LOH analizi sonucu 20p'de LOH belirlemişlerdir (73). Bu bulguda göstermektedir ki karşılaştırmalı genomik hibridizasyon, FISH, Gap-PCR gibi tekniklerle ekspresyon belirlemediğimiz olgularda delesyon olup olmadığı teyit edilerek, sonuçlar desteklenmelidir.

Bazı tip kanserlerde yapılan çalışmalar sonucunda, CTGF geninin; tümörün gelişiminde, progresyonunda ve metastazında rol oynadığı bildirilmiştir. Ancak bazı kanser tiplerinde ekspresyonunda artış ve bazılarında da azalmanın belirlenmesi tümör gelişimindeki rolünün tam olarak aydınlatılmadığını göstermektedir. CTGF proteini, integrinlere bağlanan bir proteindir. Kolorektal kanser hücre hatlarında yapılan çalışma sonucunda, CT26 hücrelerinin CTGF antisensisi ile transfeksiyonundan sonra, CTGF düzeyindeki azalmanın, karaciğer metastazında artışa yol açtığı belirlenmiştir (74). Liu ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada, gastrik kanser dokularında immünohistokimya yöntemi ile CTGF gen ekspresyonuna bakılmış, 122 vakanın 58'inde yüksek düzeyde CTGF ekspresyonu, 64'ünde ise düşük düzeyde ekspresyon belirlemişler. Yüksek düzeyde ekspresyon belirledikleri olguların oldukça fazla lenf nodu metastazlarının olduğu ve 5 yıllık sağ kalım oranlarının da önemli derecede düşük olduğu görülmüştür (75). Literatürde over kanseri ile ilgili şimdiye kadar yapılmış tek bir çalışma bulunmaktadır. Kikuchi ve arkadaşlarının yapmış olduğu bu çalışmada, immünohistokimya yöntemi ile 103 vakanın 84'ünde CTGF ekspresyonunda önemli oranda azalma belirlenmiş. CTGF

ekspresyonundaki azalmanın, evre III ve IV' den ziyade daha çok evre I ve evre II' de olduğu gösterilmiştir (76). Bizim yapmış olduğumuz çalışmada ise, 35 olgunun 21' ine (%54) ait primer tümör dokusunda ve 14' üne ait metastatik tümör dokusunun 4' ünde gen ekspresyonunun artmış olduğu belirlendi. Evre I olan iki tümör dokusunda artışın olması, CTGF geninin tümör gelişiminin erken evresinde de rol oynadığını gösterebilir. İki çalışma arasında hem yöntem hem de olgu sayısından kaynaklanan farklar bulunmasına, bizim olgu sayımızın az olmasına karşın, fonksiyonu çok iyi bilinmeyen CTGF genin ekspresyonunun, çalışılan 35 epitelyal over kanseri örneğinden yaklaşık %54'ündeki artışın gerçek zamanlı gösterilmesi bakımından, bulgularımızın önemli olduğunu göstermektedir. Olgu sayısı artırıldıkça, genin ekspresyonundaki artış ve azalışların daha gerçekçi değerlendirileceği, farklı sinyal yollarının aydınlatılacağı ve bireydeki ve bireyler arasındaki bulguların daha objektif değerlendirileceği düşüncesindeyiz.

Tümör agresivitesinde rol oynayan genlerden biri de RAB25 genidir. RAB25, hücre proliferasyonun ve canlılığının düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır. Cheng ve arkadaşlarının seröz epitelyal over kanserlerinde yapmış oldukları array-CGH çalışması sonucu, RAB25' in lokalize olduğu 1q22 bölgesinin amplifiye olduğu gösterilmiştir. Bunun üzerine yapmış oldukları ekspresyon çalışması sonucunda da, seröz epitelyal over kanserinde özellikle evre III ve evre IV' de ekspresyonun arttığı gösterilmiştir. Ekspresyondaki artış, kanser hücrelerinde apoptozun azalmasına ve hücre proliferasyonunun artmasına yol açmaktadır (77). Kantitatif gerçek zamanlı RT-PCR ile yapmış olduğumuz çalışmada, 35 olgunun 28'ine (%80) ait primer tümör dokusu ile 17' sine ait metastatik tümör dokusunun 10' unda (58.82) ekspresyonda artış olduğu belirlendi. Çalışmamızda, diğer çalışmalardan farklı olarak ilk kez primer tümör dokuları ile birlikte metastatik tümör dokuları da çalışılarak RAB25 gen ekspresyonu iki doku arasında kıyaslanmıştır. Metastatik dokularda ekspresyonda artış belirlenen 10 örneğin primer tümör dokularında da artmış olduğu gözlenmiştir. Literatürle uyumlu olarak evre III' de gözlenen artış ile birlikte 6 borderline tümör dokusunun 3' ünde de artışın belirlenmesi tümörün erken evrelerinde de etkili olduğunu göstermektedir. Artışlar genin lokalize olduğu 1q22 bölgesinin amplifikasyonu ile gerçekleşebileceği gibi, azalışların da genin fonksiyonunu indirgeyen yine bu bölgenin delesyonu veya diğer tip yapısal değişiklikleri ile açıklanabilir. İleri bir çalışmada, FISH tekniğinden yararlanarak bu bölgeye spesifik problemlerin kullanılması ile bu bölgedeki amplifikasyonların veya delesyonların belirlenmesi hedeflenmektedir. Çalışılan örnek sayısının az olmasına karşın, bulgularımız literatürle paralellik göstermektedir.

Ekspresyonunda artış olmasını beklediğimiz AMF/GPI ve reseptörü olan AMFR, CTGF ve RAB25 genlerinin en az üçünün 16 olguya ait primer tümör örneğinde artış göstermesi, tümörün multigenik heterojen bir hastalık olduğunu bu çalışma ile de söyleyebiliriz. Çalışmamızda tümör dokularından makroskopik olarak kesim yapılarak alınan parçalardan RNA ve DNA izolasyonu yapılmıştır. Özellikle çalışmada yer alan borderline tümörleri de düşünecek olursak, tümör dokusunda sadece tümör hücrelerin değil normal hücrelerin de bulunması söz konusudur. Bu nedenle, lazer mikrodiseksiyon yönteminin kullanılması sonucu sadece tümör hücrelerinin çalışılması ile daha gerçek sonuçların alınabileceği düşüncesindeyiz.

Kanserin ortaya çıkışı kadar, kanserin tedavisi de önemlidir. Kanser tedavi protokollerinden birisi de kemoterapidir. Her kanser tipi kendisine uygulanan tedaviye farklı yanıt verebilmektedir. Bu farklı yanıtların temelinde bireyin

farmakogenomik yapısı önem kazanmaktadır. Kanserin tedavisi sırasında, birçok kanserde görülen relaps olayı, multi-drug resistansı (MDR) olarak tanımlanır. Bu olayda sorumlu genlerden biri MDR1 genidir. MDR1 geni proteini hücreye alınan kemoterapötikleri dışarı pompalayan bir fonksiyon görmektedir. Bu nedenle ekspresyon düzeyindeki artış ile tedaviye yanıt alma arasında zıt bir durum sözkonusudur. Tümör hücrelerinde yüksek MDR1 ekspresyonu paclitaxel tedavisinde kötü yanıt ile koreledir (78). Çalışmamızda 35 olgunun 16' sında (%45.70) normal doku ile kıyaslandığında ekspresyon düzeyinde artış ve 17' sinde (%48.57) ise azalma gözlenmiştir. En yüksek ekspresyon artış seviyesi Ov-19, en düşük ise Ov-27 nolu örneklerde saptanmıştır. Her iki tümör dokusu evre III olup gen ekspresyonu ile prognoz arasında bir ilişki olmadığı görülmektedir. 35 olgunun 17' sine ait metastatik tümör dokusunun 11' inde ekspresyonda artış görülürken 6' sında ise azalma belirlendi. Olguların büyük çoğunluğu kemoterapide tüm kürlarini almasına rağmen tez kapsamına en son alınan olguların kemoterapileri henüz bitmediğinden hastaların tamamında kemoterapiye verdikleri yanıt ile MDR1 gen ekspresyonu arasında bir kıyaslama yapılmadı. MDR1 ekspresyonunda artış gözlenen olguların tamamı evre III olması, ekspresyon artışı ile kötü prognoz arasında ilişki olduğunu göstermektedir. Evre I olan 6 borderline tümör dokusunda MDR1 ekspresyonundaki azalma ise bu bulgunun diğer bir kanıtıdır. MDR1 ekspresyonunda artış gözlenen olgulardan sadece bir tanesinde (Ov-5) 6 kürden oluşan karboplatin+paclitaxel tedavisinden sonra CA-125 seviyesindeki artış nedeniyle kemoterapiye devam edilmiştir. MDR1 ekspresyonunda artış gözlenen diğer olguların ise kemoterapiye yanıt verdikleri görülmüştür. Olgu sayısının az olmasına rağmen, olguların yarısındaki ekspresyon artışının hastaların tedavisinde önemli bulgu olduğu görülmektedir. MDR1 bulgularının tümör ve metastatik doku örneklerinden elde edilmesi; operatif materyallerde ekspresyon düzeyinin belirlenmesi (hem artış hem de azalışların) tedavi protokollerini seçmek için önemli bir markır olabileceği sonucunu ortaya koymaktadır.

Sonuç olarak, çalışmamız, farklı kanserlerin gelişiminde proto-onkogen, metastatik gen ve tümör baskılayıcı gen olarak fonksiyon gören genlerin ekspresyon düzeylerindeki artış ve azalışlarının, epitelyal over kanserinde de gösterilmiş olması, normal doku, primer tümör ve metastaz örneklerinde farklı evrelerde farklı düzeylerde bulunması, örnek sayısının artırılması ile birer belirteç olabileceğini göstermektedir. Ayrıca, tümör ve metastatik örneklerdeki MDR1 geni ekspresyon düzeylerinin belirlenmesinin tedaviyi yönlendirmede önemli katkı sağlayacağı ve yeni kemoterapötiklerin kullanılmasına olanak vereceği düşüncesindeyiz.

## KAYNAKLAR

1. Collins K., The cell cycle and cancer. Proc Natl Acad Sci USA,1997.94 (7):p.2276-78.
2. Garret, MD. Celle cycle control and cancer. Current Science, 2001. 81(5): p515-22
3. Vogelstein B., Kinzler K. The genetic basis of human cancer. Cell cycle control: An overview. Springer. Part. 2.2002;p145-163.
4. Hashiguchi Y, Tsuda H, Inoue T. Alteration of cell cycle regulators correlates with survival in epithelial ovarian cancer patients. Hum Pathol 2004;35:165-75
5. Milde-Langosch K, Riethdorf S. Role of cell-cycle regulatory proteins in gynecological cancer. J Cell Physiol 2003;196:224-44.
6. Schulz WA. Molecular Biology of Human Cancers. Apoptosis and replicative Senescence in Cancer. Springer. Part 2. 2005; p.145-165
7. Vogelstein B., Kinzler K. The genetic basis of human cancer. Basic concepts in cancer genetics. Springer. Part 1. 2005; p.3-7
8. Vogelstein B., Kinzler K. The genetic basis of human cancer. Basic Familial cancer syndromes. Familial cancer syndromes:Role of catetaker and Gatekeepers . Springer Part 3. 2005; p.209-211
9. Pearson PL., Luijt RB. The genetic analysis of cancer. Journal of medicine. 1998;243-417.
10. Schulz WA. Molecular Biology of Human Cancers. Control on cell cycle. Onkogenes . Part 2. 2005; p.177-197.
11. Kopnin, B.P, Targets of Oncogenesand Tumor Supressors:for understanding basic mechanisms of carcinogenesis.Biochemistry, 2000;65(1);p.2-27.
12. Schulz WA. Molecular Biology of Human Cancers. Tumor supressor genes. Part 1. 2005; p.91-112.
13. Vogelstein B., Kinzler K. The genetic basis of human cancer. Control on cell cycle. Tumor supressor genes. Springer. Part 2. 2005; p.197-209.
14. Schulz WA. Molecular Biology of Human Cancers. Cancer Epigenetics. Part 1. 2005; p.167-193

15. Gronbek K., Hother C, Jones P. Epigenetic changes in cancer. *APMIS* 115;2007:1039-1059
16. Vogelstein B., Kinzler K. The genetic basis of human cancer. *Genomic Imprinting and cancer* . Springer. Part. 1.2002;p43-57.
17. Olek A, Oswald J, Walter J. A modified and improved method for bisulfite based cytosin methylation analysis. *Nucleic Acids Res* 1996;24:5064-6.
18. Schulz WA. *Molecular Biology of Human Cancers. DNA damage and DNA repair. Part 1.* 2005; p.47-71
19. Vogelstein B., Kinzler K. The genetic basis of human cancer. *Basic concepts in cancer genetics. Tumor Genom Instability.* Springer. Part 1. 2005; p.129-131.
20. Robby SJ., et al.:Embryology of the female genital tract. In Kurman R (ed): *Blaustein's pathology of the female genital tract.* 5 th ed. Newyork, Springer-Verlag, 2002, pp3-31.
21. Russel, P: *Common Epithelial Tumors of the Ovary* In Fox H(ed): *Haines and Taylor Obstetrical and Gynaecological pathology, Vol. I.*3rd ed. Churchill Livingstone, Edinburgh, London, Melburn ans Newyork. 1987, pp 542-620.
22. Soidman JD, Russel P, Kurman RJ. *Surface epithelial tumors of the ovary,* Chapter 18, *Blaustein' s Pathology of the Female Genital Tract* Ed Kurman RJ. 5th ed.p791-904 Springer, Newyork, 2002
23. Tavassoli FA, Devilee P. *WHO Histologycal Classification of the Tumors of the ovary. Pathology and Genetics of the Breast and Female Genital Organs*p113-145, Lyon, 2003.
24. Clement PB.: *Anatomy and Histology of the Ovary.* In Kurman R (ed): *Blaustein's Pathology of the Female Genital Tract,* 5th ed. New York, Springer-Verlag, 2002, pp 649-650.
25. Clement PB.: *Histology of the Ovary.* In Sternberg SS (ed):*Histology for pathologists,* 2nd ed. Lippincott-Raven, New York,1997, pp 929-959.
26. Reeves G: *Specific stroma in the cortex and medulla of the ovary. Cell types and vascular supply in relation to follicular apparatus and ovulation.* *Obstet Gynecol* 1971; 37: 832-844.
27. Rosai J.: *Rosai and Ackerman's Surgical Pathology.* Vol 2, 9th ed. Mosby. Edinburgh, London, New York, Oxford. 2004, pp 1649-1709.
28. Crum CP.: *The Female Genital Tract.* In Cotran RS (ed): *Robbins Pathologic Basis of Disease.* 6th ed. W.B. Saunders Company. Philadelphia. 1999, pp 1036-1037
29. Zheng W, Magid MS, Kramer EE, Chen YT.: *Follicle-stimulating hormone receptor is expressed in human ovarian surface epithelium and fallopian tube.* *Am J Pathol* 1996; 148:47-53.
30. Blaustein A, Lee H.: *Surface cells of the ovary and pelvic peritoneum: a histochemical and ultrastructural comparison.* *Gynecol Oncol* 1979; 8:34-43.

31. McKay DG, Pinkerton JHM, Hertig AT, Danziger Z.: The adult human ovary: a histochemical study. *Obstet Gynecol* 1961; 18:13-39.
32. Scully RE.: Ovary. In: Henson DE, Albores-Saavedra J, eds. *The pathology of incipient neoplasia*. Philadelphia: Saunders, 1986; 279-293.
33. Czernobilsky B, Shezen E, Lifschitz-Mercer B, Fogel M, Luzon A, Jacob N, Skalli O, Gabbiani G.: Alpha smooth muscle actin in normal human ovaries, in ovarian stromal hyperplasia and in ovarian neoplasms. *Virchows Arch [Cell Pathol]* 1989; 57:55-61.
34. Lastarria D, Sachdev RK, Babury RA, Yu HM, Nuovo GJ.: Immunohistochemical analysis for desmin in normal and neoplastic ovarian stromal tissue. *Arch Pathol Lab Med* 1990; 114: 502-505
35. Clement PB.: Ovary. In Sternberg SS (ed) : *Histology for pathologists*, 1st ed. Lippincott-Raven, New York, 1992, pp765-792.
36. Demirbağ N. Over Tümörleri. *Patoloji. Nobel Tıp Kitabevleri*. 2004;163-165
37. Schulz WA. *Molecular Biology of Human Cancers. Invasion and metastasis. Part 1*. 2005; p.193-217.
38. Chang A, Ganz P,. *Oncology. An evidence-Based Approach. Cancer Metastasis*. Springer. 2006;pp244-254.
39. Kuzey GM. Over ve Fallopiyan Tüp Hastalıkları Patolojisi. *Temel Patoloji. Güneş Kitabevi*. 2007; 673-72
40. Moysich KB, Mettlin C, Piver MS, Natarajan N, Menezes RJ and Swede H. Regular Use of Analgesic Drugs and Ovarian Cancer Risk. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* Vol. 10, 903-906, August 2001
41. Kumar V, Abbas A.K, Fausto N; The female genital tract, chapter 22, in *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease*, 7th ed, p1059-1118, Elsevier Saunders, Philadelphia, 2005
42. Colombo N., Gorp TV., Parma G., Amant F. Ovarian cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 2006;60:159-179.
43. Guerrieri C, Hogberg T, Wingren S, Fristedt S, Simonsen E, Boeryd B.: Mucinous borderline and malignant tumors of the ovary. A clinicopathologic and DNA ploidy study of 92 cases. *Cancer* 1994; 74:2329-2340.
44. Riopel MA, Ronnett BM, Kurman RJ.: Evaluation of diagnostic criteria and behavior of ovarian intestinal-type mucinous tumors: atypical proliferative tumors and intraepithelial, microinvasive, invasive and metastatic carcinomas. *Am J Surg Pathol* 1999; 23:617-635.
45. Kao GF, Norris HJ: Unusual cystadenofibromas: endometrioid, mucinous, and clear cell types. *Obstet Gynecol* 1979;54:729-736
46. Bell Da, Scully RE.: Benign and borderline clear cell adenofibromas of the ovary. *Cancer* 1985; 56:2911-2931.

47. Chien JR, Aletti G, Bell DA, Keeney GL, Shridhar V, Hartmann L. Molecular pathogenesis and therapeutic targets in epithelial ovarian cancer. *J Cell Bio.* 2007; 102:1117-1129.
48. Pothuri B, Leitao M, Barakat R. Genetic analysis of ovarian carcinoma histogenesis. *Gynecol Oncol* 2001; 80:277.
49. Nnene IO, Nieto JJ, Crow JC. Cell cycle and apoptotic proteins in relation to ovarian epithelial morphology. *Gynecol Oncol* 2004;92:247-251.
50. Jorboe EA., Folkins AK., Drapkin R., Ince TA., Agoston ES. Tubal and ovarian pathways to pelvic epithelial cancer: a pathological perspective. *Histopathology* 2008: 1365-2559.
51. Lee Y., Miron A., Drapkin R. A candidate precursor to serous carcinoma that originates in the distal fallopian tube. *J. Pathol.* 2007;211:26-35
52. Cuatrecasas M., Villanueva A., Matias-Guiu X., Prat J. K-ras mutations in mucinous ovarian tumors:a clinicopathologic and molecular study of 95 cases. *Cancer* 1997;79:1581-1586.
53. Wu R., Hendrix-Lucas N., Kuick R. Mouse model of human ovarian endometrioid adenocarcinoma based on somatic defects in the Wnt/beta-catenin and PI3K/Pten signaling pathways. *Cancer Cell* 2007;11:321-333.
54. Hough CD., Sherman Baust CA., Pizer E.S. Large scale serial analysis of gene expression reveals genes differentially expressed in ovarian cancer. *Cancer Res.* 2000,60(22):6281-87.
55. Lu K. Patterson AP., Wang L., Marquez RT. Selection of potential markers for epithelial ovarian cancer with gene expression arrays and recursive descent partition analysis. *Clin Cncer Res* 2004;10(10):3291-3300.
56. Shayesteh L., Lu Y., Kuo ML., Baldocchi R. PIK3CA is implicated as an oncogene in ovarian cancer. *Nat. Genet* 1999;21(1):99-102.
57. Tan SP., Agarwal R., Kaye SD. Mechanisms of transcoelomic metastasis in ovarian cancer. *Lancet Oncol* 2006;7:925-34.
58. Hibs K., Skubitz KM. Differential gene expression in ovarian carcinoma: Identification of biomarkers. *Am. J. Pathol.* 2004 (165):397-414.
59. Bayani J. Brenton JD. Parallel analysis of sporadic primary ovarian carcinomas by spectral karyotyping, comparative genomic hybridization and expression analysis. *Cancer Res* 2002;62:3466-76.
60. Alvarez A., Krigman H., Whitaker RS., Dodge R., Rodriguez G. The prognostic significance of angiogenesis in epithelial ovarian carcinoma. *Clin Cancer Research* 1999;(5):587-91
61. Neufeld G., Cohen T., Gengrinovitch S., Poltoraz Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J* 1999;13:9-22.

62. Zebrowski B., Liu W., Raminez K. Markedly elevated levels of vascular endothelial growth factor in malignant ascites. *Ann Surg Oncol* 1999;6:373-78.
63. Scotton CJ., Wilson JL., Milliken D. Epithelial cancer cell migration: a role for chemokine receptors? *Cancer Res* 2001;01:4961-65.
64. Kamat AA., Fletcher M., Gruman LM. The clinical relevance of stromal matrix metalloproteinase expression in ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 2006;12:1707-14.
65. Yanagawa T., Funasaka T., Tsutsumi S., Watanabe H., Raz A. Novel roles of the autocrine motility factor/phosphoglucose isomerase in tumor malignancy. *Endocrine Related Cancer* 2004, 11:749-759.
66. Funasaka T., Raz A. The role of autocrine motility factor in tumor and tumor microenvironment. *Cancer Metastasis Rev.* 2007;26:725-735.
67. Tsutsumi S., Hogan V., Nabi I.R, Raz A. Overexpression of the autocrine motility factor/phosphoglucose isomerase induces transformation and survival of NIH-3T3 fibroblasts. *Cancer Research* 2003, 63: 242-249.
68. Takanami I., Takeuchi K., Watanabe H., Yanagawa T., Takagishi K. Autocrine motility factor receptor gene expression and cell motility in lung cancer cell lines. *Oncology Reports* 2002, 9: 125-128.
69. Takanami I, Takeuchi K, Watanabe H, Yanagawa T, Takagishi K, Raz A. Significance of autocrine motility factor receptor gene expression as a prognostic factor in non-small-cell lung cancer. *Int J Cancer.* 2001 Nov 20;95(6):384-7.
70. Nakamori S., Watanabe H., Kameyama M., Imaoka S., Furukawa H., Ishikawa, Sasaki Y, Kabuto T, Raz A. Expression of the autocrine motility factor receptor in colorectal cancer as a predictor for disease recurrence. *Cancer*, 1994 Oct 1;74(7):1855-62.
71. Jiang W., Raz A., Douglas Jones A., Manuel R. Expression of Autocrine Motility Factor (AMF) and Its Receptor, AMFR, in Human Breast Cancer. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry.* 2006;54(2): 231-241.
72. Park H.W, Kang HC, Kim HJ, Jang SG, Kim K, Yoom HJ, Jeong SY, Park JG. Correlation between hypermethylation of the RASSF2A promotor and K-ras/BRAF mutation in microsatellite-stable colorectal cancers. *Int. J. Cancer.* 2006;120
73. Okada S, Tsuda H, Takarabe T, Yoshikawa H, Taketani Y, Hirohashi S. Allelotype analysis of common epithelial ovarian cancers with special reference to comparison between clear cell adenocarcinoma with other histological types. *JPN J Cancer Res* 2002;93(7):798-806.
74. Lin BR, Chang CC, Che TF, Chen ST, Chen RJ, Yang CY, Jeng YM, Liang JT, Lee PH, Chang KJ, Chau YP, Kuo ML. Connective tissue growth factor inhibits metastasis and acts as an independent prognostic marker in colorectal cancer. *Gastroenterology.* 2005 Jan;128(1):9-23.



75. Liu LY, Han YC, Wu SH, Lv ZH. Expression of connective tissue growth factor in tumor tissues is an independent predictor of poor prognosis in patients with gastric cancer. *World J Gastroenterol.* 2008 Apr 7;14(13):2110-4.
76. Kikuchi R, Tsuda H, Kanai Y, Kasamatsu T, Sengoku K, Hirohashi S, Inazawa J, Imoto I. Promoter hypermethylation contributes to frequent inactivation of a putative conditional tumor suppressor gene connective tissue growth factor in ovarian cancer. *Cancer Res.* 2007 Aug 1;67(15):7095-105.
77. Cheng JM, Ding M, Aribi A, Prabodh S, Krishna R. Loss of RAB25 expression in breast cancer. *Int. J. Cancer.* 2006; 118:2957-2964
78. Gren H, Söderkvist P, Rosenberg P, Horvath G, Peterson C. Mdr-1 single nucleotide polymorphisms in ovarian cancer tissue:G2677T/A correlates with response to paclitaxel chemotherapy. *Clin Cancer Res* 2006;12(3):854-59.

## ÖZGEÇMİŞ

Mualla Özcan Çalışkan, 01.04.1976 tarihinde Antalya' da doğmuştur. 1990-1993 tarihleri arasında lise öğrenimini Antalya Çağlayan Lisesi' nde tamamlamıştır. 1998 yılında Akdeniz Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü' nden mezun olmuştur. 1999 yılında Akdeniz Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Bilim Dalı' nın açmış olduğu Yüksek Lisans Programına Yüksek Lisans öğrencisi olarak başlamış ve daha sonra araştırma görevlisi olarak atanmıştır. 2002 yılında yüksek lisans programından mezun olmuş ve aynı Anabilim Dalı' nda 2002 yılında Tıbbi Genetik doktora programına başlamıştır.

## **EKLER**

## SUBTELOMERIC CHROMOSOMAL REARRANGEMENTS DETECTED IN PATIENTS WITH IDIOPATHIC MENTAL RETARDATION AND DYSMORPHIC FEATURES

BY M.O. CALISKAN<sup>1</sup>, S.B. KARAUZUM<sup>1</sup>, E. MIHCI<sup>2</sup>, S. TACOY<sup>2</sup> AND G. LULECI<sup>1</sup>

**Summary:** *Subtelomeric chromosomal rearrangements detected in patients with idiopathic mental retardation and dysmorphic features:* Cryptic aberrations involving the subtelomeric regions of chromosomes are thought to be responsible for idiopathic mental retardation (MR) and multiple congenital anomalies, although the exact incidence of these aberrations is still unclear. With the advent of chromosome-specific telomeric Fluorescence *In Situ* Hybridization (FISH) probes, it is now possible to identify submicroscopic rearrangements of distal ends of the chromosomes that can not be detected by conventional cytogenetic methods. In this study, cryptic subtelomeric chromosomal aberrations were detected in two of ten patients with idiopathic MR and dysmorphic features by using FISH probes of subtelomeric regions of all chromosome arms. A cryptic unbalanced *de novo* translocation was detected between the subtelomeric regions of the chromosome 10p and 18p in a patient with severe mental retardation, sensorineuronal deafness and several dysmorphic features. In the other patient, with mild mental retardation and dysmorphic features, a *de novo* subtelomeric deletion of chromosome 2q was found. In conclusion, in both familial and sporadic cases with idiopathic MR and dysmorphic features, the detection of chromosomal aberrations including subtelomeric rearrangements is of great importance in offering genetic counseling and prenatal diagnosis.

**Key-words:** Idiopathic mental retardation – Dysmorphic features – FISH – Cryptic subtelomeric aberrations.

### INTRODUCTION

Mental retardation (MR) is a common disorder and affects 1-3 % of the population, although the pathogenesis is poorly understood. MR is related with both genetic and environmental factors. Genetic factors are involved in many of the cases with idiopathic MR who had dysmorphic features, growth retardation, and malformations. Chromosomal rearrangements have been reported in up to 40 % of individuals with severe MR and in only 5-10 % of patients with mild MR (1, 18).

Most subtelomeric regions of the chromosomes are enriched with CpG islands and are believed to have the highest gene density in the genome (8, 11, 14, 15, 16). Several studies have reported that cryptic subtelomeric rearrangements resulting in gene-dosage imbalance might represent a significant cause of idiopathic MR cases who have had apparently normal karyotypes with GTG-banding (10, 18). The incidence of these cryptic rearrangements is still unclear, although it ranges from 6 to 7.4 % of idiopathic MR cases in some studies (2, 19).

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

(2) Department of Pediatrics, Akdeniz University, Faculty of Medicine, Antalya, Turkey.

The telomere regions of the chromosomes are G-band negative and morphologically similar. Therefore, abnormalities in these regions are thought to be particularly difficult to detect by using conventional cytogenetic methods (8, 11, 14, 15, 16). Thus, alternative methodologies, such as Fluorescence *In Situ* Hybridization (FISH), Spectral Karyotyping (SKY) or Comparative Genomic Hybridization (CGH), are required for high-resolution screening of telomeric regions (3, 5, 11, 17).

In this study, we aimed to investigate the cryptic subtelomeric rearrangements by FISH using specific probes for subtelomeric regions in 10 patients with idiopathic MR and dysmorphic features who were selected with regard to a checklist proposed by De Vries *et al.* (6).

## MATERIALS AND METHODS

### PATIENTS

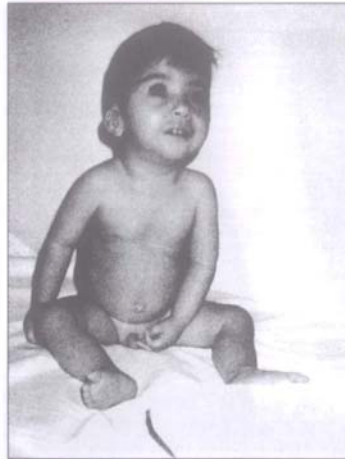
All 10 patients were selected by clinical geneticists according to following criteria (6):

1. Family history of MR.
2. Prenatal onset of growth retardation.
3. Postnatal growth abnormalities.
4. Two or more facial dysmorphic features.
5. Non-facial dysmorphisms and congenital abnormalities.

All patients in this study had at least 4 of these criteria. The clinical reports of two patients are presented in detail.

### Patient 1

A 2-year-old male was born from a normal, uncomplicated pregnancy and delivery. He was the third child of healthy, unrelated parents. The mother had one miscarriage before the affected boy was born. There was no family history of MR and/or dysmorphic features. His birth weight was 2100 g and height was 47 cm. APGAR scores were 7 at 1 min and 9 at 5 min. At 5 months of age, he underwent surgical treatment for bilateral inguinal hernia and cryptorchidism. He was treated with various antibiotics for recurrent bronchopneumonic infections at 6 and 7 months of age. All developmental milestones were delayed. Physical examination at the age of 2 years, height was 58 cm (< 3<sup>rd</sup> percentile), weight 4.2 kg (< 3<sup>rd</sup> percentile), and occipitofrontal circumference 39.5 cm (< 3<sup>rd</sup> percentile). He had a round face, hypertelorism, small nose, short palpebral fissures, bilaterally low-set and dysplastic ears, preauricular pits, mild glossoptosis, micrognathia, mandibular hypoplasia and pectus excavatum (Fig. 1). He had bilateral clinodactyly of the fifth



fingers of both hands and cutaneous syndactyly of left third and fourth toes. He had swallowing difficulties. A magnetic-resonance imaging scan of his brain was normal. Brain stem auditory-evoked potentials demonstrated sensorineural deafness. Two-dimensional echocardiography of the heart revealed a subaortic ventricular septal defect.

Figure 1: Frontal view of the Patient 1 at 2 year of age showing unusual facial appearance.

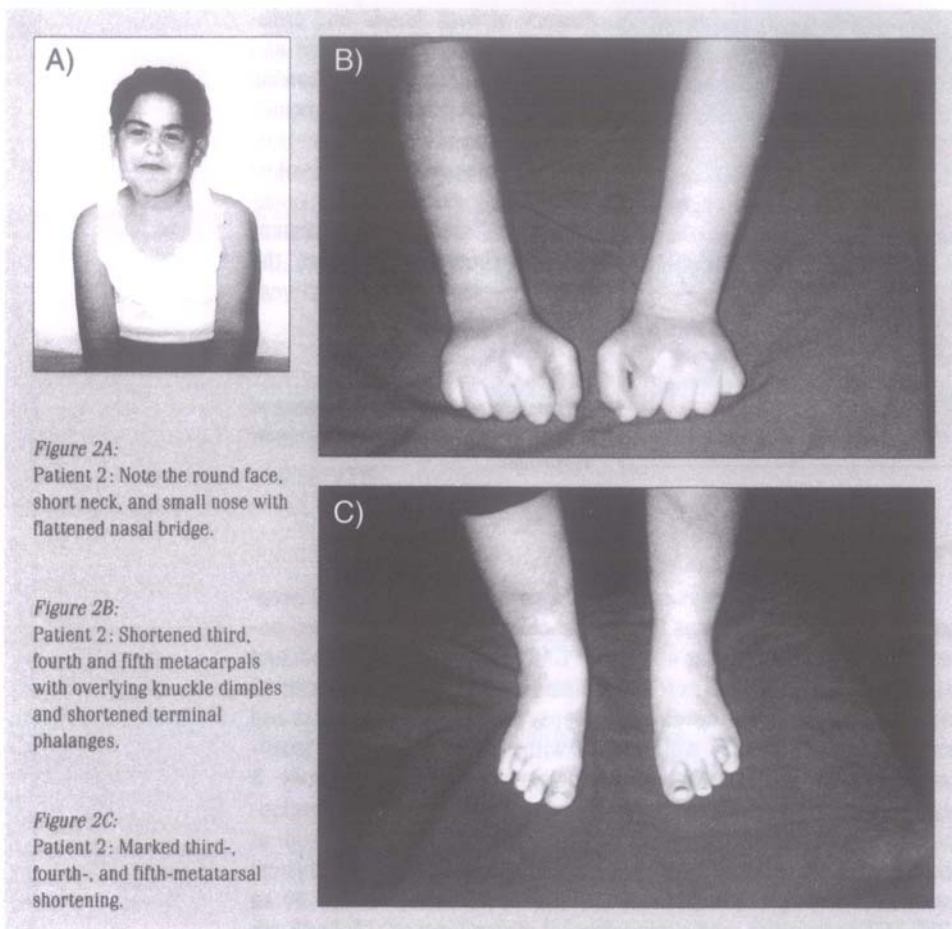
### Patient 2

A 7-year-old female was born from a normal, uncomplicated pregnancy and delivery. She was the second child of healthy unrelated parents. Her birth weight was 4000 g. APGAR scores were 8 at 1 min and 9 at 5 min. She had complex febrile seizures starting from the age of 12 months. Afterwards she developed epilepsy despite normocalcemia and normoglycemia, and she was treated with carbamazepin. Electroencephalography was consistent with primary generalized epilepsy. A magnetic-resonance imaging scan of her brain was normal. All developmental milestones were delayed, and she attended a special school at the age of 7 years because of moderate learning difficulties. Physical examination, height was 121 cm (75<sup>th</sup>-90<sup>th</sup> percentile), weight 30 kg (25<sup>th</sup>-50<sup>th</sup> percentile), and occipitofrontal circumference (OFC) 53 cm (75<sup>th</sup>-90<sup>th</sup> percentile). She had a round face, low and flattened nasal bridge, prognathism, dental crowding and short neck, moderately mild lumbar lordosis (Fig. 2A). She had shortened third, fourth and fifth metacarpals with overlying knuckle dimples and shortened terminal phalanges (Fig. 2B). Her feet were small and broad, with shortening of the third, fourth and fifth metatarsals (Fig. 2C). Plasma calcium, phosphate, urea, creatinine, magnesium, vitamin D, PTH and thyroid functions were all normal.

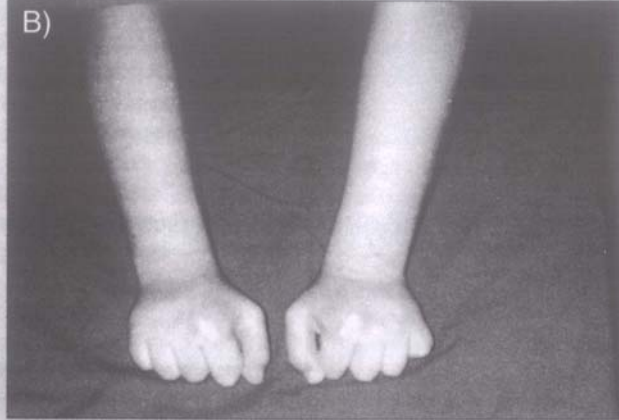
### CYTOGENETIC STUDIES

Metaphase chromosomes were prepared from peripheral blood lymphocyte cultures using standard cytogenetic laboratory procedures. Chromosome analyses were performed according to routine procedure using GTG-banding at ISCN 600 band resolution levels (13).





*Figure 2A:*  
Patient 2: Note the round face, short neck, and small nose with flattened nasal bridge.



*Figure 2B:*  
Patient 2: Shortened third, fourth and fifth metacarpals with overlying knuckle dimples and shortened terminal phalanges.



*Figure 2C:*  
Patient 2: Marked third-, fourth-, and fifth-metatarsal shortening.

### FLUORESCENCE *IN SITU* HYBRIDIZATION (FISH) STUDIES

In this study, FISH was carried out by two independent probe systems. Firstly, the Chromoprobe Multiprobe T System (Cytocell Ltd., Adderbury, England) was used to screen the subtelomeric regions in ten patients. The protocol recommended by the manufacturer was used. Hybridized metaphase spreads were analyzed using a Zeiss Axioplan 2 epifluorescence microscope. Images were captured by CCD camera and analyzed using an imaging system with MacProbe software v.4.1.

Secondly, FISH studies were performed using chromosome specific subtelomeric probes (Vysis) for confirmation of some chromosomal rearrangements. The FISH protocol recommended by the manufacturer was used.

## RESULTS

All patients' karyotypes were found to be normal by conventional GTG-banding analysis. Subtelomeric chromosomal rearrangements were detected in 2 of 10 patients. One patient had a cryptic unbalanced *de novo* translocation between subtelomeric regions of chromosome 10p and 18p. Another patient had *de novo* subtelomeric deletion of chromosome 2q. The results and a summary of the phenotypic characteristics of the cases with aberrations were listed in Table I. The parents of both cases were found to have a normal karyotype by conventional GTG-banding and FISH analysis.

Table I: Results and characterization of the two cases in which aberrations were detected.

Case	Gender	MR	Dysmorphology	Growth retardation	Family history of MR	Subtelomere FISH	G-Band	Parents
1	Male	Severe	Yes	Prenatal-Postnatal	No	10p monosomy/18p trisomy	46, XY	Normal
2	Female	Mild	Yes	Postnatal	No	2q Deletion	46, XX	Normal

### PATIENT 1

46, XY.ish der(10)t(10;18)(pter;pter), representing a partial monosomy of 10pter (Fig. 3A) and a partial trisomy of 18pter (Fig. 3B). Retrospective cytogenetic analysis of the proband using GTG-banding (600 band levels) revealed a normal male karyotype.

His parents were examined by Multiprobe-T System, but they were found to be normal.

### PATIENT 2

46, XX.ish del(2)(qter)(D2S2986), representing a deletion of 2qter (Fig. 4A). Careful retrospective cytogenetic analysis of the proband's karyotype using GTG-banding (600 bands level) confirmed the deletion.

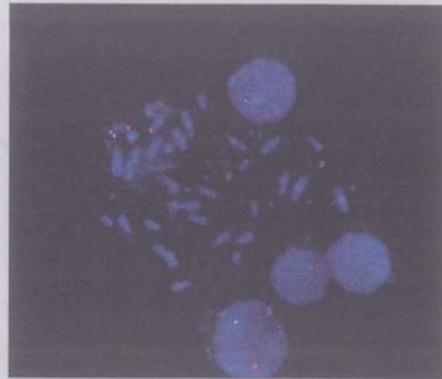
The subtelomeric deletion of chromosome 2q detected by the Multiprobe-T System, was confirmed by FISH with the Vysis probe, because the deletion of the locus D2S2986 in the 2qter region is a variant in common (Fig. 4B). Her parents were examined by Multiprobe-T System to check whether this deletion is a *de novo* rearrangement or not. The subtelomeric deletion of chromosome 2q and other chromosomal rearrangements were not observed in her parents' chromosomes.

## DISCUSSION

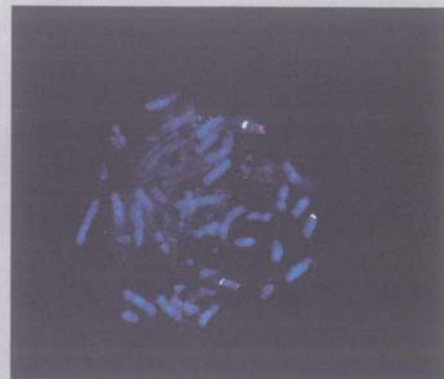
Recently, a five-item clinical checklist has been suggested in order to improve the rate of detection of subtelomeric rearrangements in



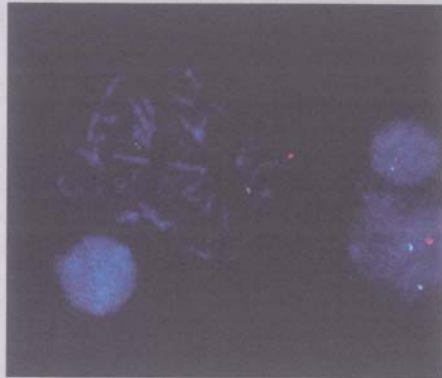
patients with idiopathic MR and dysmorphic features (6). We detected subtelomeric chromosomal rearrangements in two patients with idiopathic MR and dysmorphic features in a screening of 10 patients. In our study, this checklist was applied in this cohort. Although we have studied a small case group, the frequency of the subtelomeric rearrangements was found as 20 %.



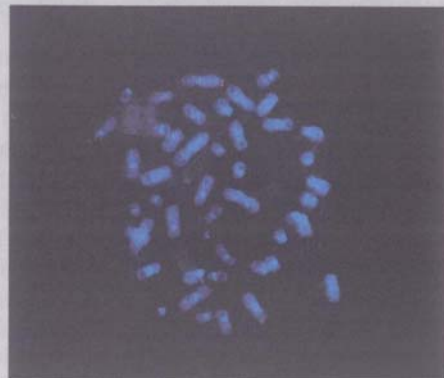
*Figure 3A:* Patient 1: A metaphase showing a partial monosomy of 10pter which occurred as a result of unbalanced cryptic t(10p;18p) detected by FISH using Multiprobe T-System. Red signals indicate q arm of chromosomes and green signals indicate p arm of chromosomes.



*Figure 3B:* Patient 1: A metaphase showing a partial trisomy of 18pter which occurred as a result of unbalanced cryptic t(10p;18p) detected by FISH using Multiprobe T-System. Red signals indicate q arm of chromosomes and green signals indicate p arm of chromosomes.



*Figure 4A:* Patient 2: A metaphase showing a deletion of 2qter detected by FISH using Multiprobe T-System. Red signals indicate q arm of chromosomes and green signals indicate p arm of chromosomes.



*Figure 4B:* Patient 2: A metaphase showing a deletion of 2qter detected by FISH using 2q subtelomeric region specific Ysis Probe. Red signal indicates q arm of chromosome.

In the majority of FISH analyses in many studies, chromosomal polymorphism is present. Because subtelomeric 2q harbors a polymorphic site, the specific probes for this region show a polymorphic pattern. The deletion of the locus D2S2986 in the 2q subtelomeric region detected by the current Cytocell Multiprobe-T System is a common variant (12). The frequency of this polymorphism is ranging from 1.5-8.2 %. However, genes that are located in 2q subtelomeric region were associated with some clinical findings. Therefore, deletion of genes below this polymorphic region can cause important phenotypic effects. When subtelomeric deletion of chromosome 2q is detected, it is necessary to reexamine the deletion by FISH using different probe. Another commercial subtelomeric 2q probe (Vysis) is located proximal to the probe used in the Multiprobe T-System, and this probe is not reported to be polymorphic. Also, the parents should be analyzed by FISH, to find out whether the rearrangement is inherited or not. In this way, a clinically significant subtelomeric deletion of chromosome 2q could not be misinterpreted as a polymorphism or normal variant. In a previous study, subtelomeric deletion of chromosome 2q in 9 of 150 patients with idiopathic MR and developmental disorders, were detected by FISH using Multiprobe-T System. However, this deletion was not observed by FISH studies with 2qter specific Vysis probe in these cases and evaluated as polymorphism (7).

The true subtelomeric deletion of chromosome 2q is associated with Albright hereditary osteodystrophy (AHO)-like syndrome. The clinical features of AHO are short stocky build, round face, metacarpophalangeal abnormalities, seizures, hypocalcaemia, and hyperphosphataemia. In the AHO-like syndrome, cutaneous ossification has not been detected and calcium and phosphate levels are normal. An important finding of this syndrome is the presence of limb abnormalities. One or more genes involved in neurodevelopment and skeletal morphogenesis lay in the distal 2q region. *PAX3*, *LOBO1*, and *Glypican 1* genes which are involved in skeletal, limb and neuronal development have been proposed as candidate genes for the limb abnormalities and possibly for MR (4, 20). L.C.Wilson *et al.* found deletion of 2q37 in five patients. In 1 of 5 patients, the 2q37 deletion was detected by only FISH analysis. These authors revealed that the clinical findings of their patient were consistent with AHO-like syndrome. This patient had severe MR, round face, shortened fourth and fifth metacarpals, shortening of the third and fourth metatarsals, low, flattened nasal bridge, dental crowding, lumbar lordosis (21). The dysmorphic features of our patient with subtelomeric deletion of chromosome 2q were consistent with this patient's features and with AHO-like syndrome phenotypes.

In our other case, we detected cryptic unbalanced *de novo* translocation between subtelomeric regions of chromosome 10p and 18p. This translocation resulted in a partial monosomy for subtelomeric region of chromosome 10p and partial trisomy for subtelomeric region of chro-

mosome 18p. Because the parents were found to have a normal karyotyping by GTG-banding (600 band levels) and FISH analysis, this unbalanced *de novo* translocation may be originated from parental germ-line mosaicism as a result of unequal crossing-over between homologue chromosome/unequal sister chromatid exchange and/or abnormal post-zygotic mitotic division. Joly *et al.* (9) defined the partial monosomy of 10p in 1 of 17 patients with MR, dysmorphic features and a normal karyotype by using CGH analysis. This patient had unbalanced translocation (10;12)(p12;p12) inherited from the mother that led to monosomy for the distal 10p and trisomy for the distal 12p. This result was confirmed by FISH analysis. The derivative chromosome 10 was detected in the retrospective GTG analysis of the original karyotype of the proband. She had also severe MR, low birth weight, hypotonia, swallowing difficulties, severe myopia and perineal angioma (9). Only swallowing difficulties out of these clinical features are consistent with our patient's findings. Major features of cytogenetically visible 10p deletion syndrome, which are consistent with our patient's features, are micrognathia, preauricular pits, hypertelorism, short downslanting palpebral fissures, pectus excavatum, congenital heart defects, cryptorchidism, feeding difficulty, deafness, and growth, motor, speech, and mental retardation. According to this result, the candidate genes, responsible for these features, might be located in the subtelomeric region of 10p. No clinical findings associated with partial trisomy of 18p subtelomeric region were reported previously. However, Wilson *et al.* (22) discussed a patient with trisomy 18pter-q11 in their study. This patient had several dysmorphic features including foot and hand anomalies (22). According to these finding, bilateral clinodactyly of the fifth fingers of both hands, cutaneous syndactyly of left third and fourth toes of our patient might have occurred due to the partial trisomy for subtelomeric region of chromosome 18p. The candidate genes, responsible for foot and hand anomalies, might be located in the subtelomeric region of 18p.

Our study has demonstrated the importance of clinical selection criteria for the pre-selection of patients with idiopathic MR. It also supported the view that conventional GTG-banding analysis is inadequate for detecting clinically significant submicroscopic subtelomeric chromosomal rearrangements, and confirmed the diagnostic utility of FISH with unique subtelomeric probes. In conclusion, we suggest the use of subtelomeric chromosomal screening of children with idiopathic MR and dysmorphic features. In both familial and sporadic cases, the detection of chromosomal aberrations including subtelomeric rearrangement is of great importance in offering genetic counseling and prenatal diagnosis. By similar studies, the identification of chromosomal regions and genes involved in neurodevelopment and defined MR syndromes can improve the understanding of the biology of the mental functions and dysmorphology.



## ACKNOWLEDGEMENTS

This work was presented as a master thesis to Akdeniz University, Institute of Health Sciences, and was supported by Akdeniz University Scientific Research Projects Management's Unit, with project no: 20.01.0122.05

## REFERENCES

- ANDERLID B.M., SCHOUMANS J., ANNEREN G., SAHLEN S., KYLLERMAN M., VUJIC M., HAGBERG B., BLENNOW E., NORDENSKJOLD M.: Subtelomeric rearrangements detected in patients with idiopathic mental retardation. *Am. J. Med. Genet.*, 2002, 107, 275-284.
- BACINO C.A., KASHORK C.D., DAVINO N.A., SHAFER L.G.: Detection of a cryptic translocation in a family with mental retardation using FISH and telomere region-specific probes. *Am. J. Med. Genet.*, 2000, 92, 250-255.
- BAKER E., HINTON L., CALLEN D.F., ALTREE M., DOBBIE A., EYRE H.J., SUTHERLAND G.R., THOMPSON E., THOMPSON P., WOOLLATT E., HAAN E.: Study of 250 children with idiopathic mental retardation reveals nine cryptic and diverse subtelomeric chromosome anomalies. *Am. J. Med. Genet.*, 2002, 107, 285-293.
- BIJLSMA E.K., AALFS C.M., SLUITJER S., OUDE LUTTIKHUS M.E., TREMBATH R.C., HOOVERS J.M., HENNEKAM R.C.: Familial cryptic translocation between chromosomes 2qter and 8qter: further delineation of the Albright hereditary osteodystrophy-like phenotype. *J. Med. Genet.*, 1999, 36, 604-609.
- CLARKSON B., PAVENSKI K., DUPUIS L., KENNEDY S., MEYN S., NEZARATI M.M., NIE G., WEKSBERG R., WITHERS S., QUERCIA N., TEEBI A.S., TESHIMA I.: Detecting rearrangements in children using subtelomeric FISH and SKY. *Am. J. Med. Genet.*, 2002, 107, 267-274.
- DE VRIES B.B., WHITE S.M., KNIGHT S.J., REGAN R., HOMPFRAY T., YOUNG I.D., SUPER M., MCKEOWN C., SPLITT M., QUARRELL O.W., TRAINER A.H., NIERMEIJER M.F., MALCOLM S., FLINT J., HURST J.A., WINTER R.M.: Clinical studies on submicroscopic subtelomeric rearrangements: a checklist. *J. Med. Genet.*, 2001, 38, 145-150.
- FAN Y.S., ZHANG Y., SPEEVAK M., FARRELL S., JUNG J.H., SIU V.M.: Detection of submicroscopic aberrations in patients with unexplained mental retardation by fluorescence *in situ* hybridization using multiple subtelomeric probes. *Genet. Med.*, 2001, 3, 416-421.
- GRANZOW M., POPP S., KELLER M., HOLTGREVE-GREZ H., BROUGH M., SCHOELL B., RAUTERBERG-RULAND I., HAGER H.D., TARIVERDIAN G., JAUCH A.: Multiplex FISH telomere integrity assay identifies an unbalanced cryptic translocation der(5)t(3;5)(q27;p15.3) in a family with three mentally retarded individuals. *Hum. Genet.*, 2000, 107, 51-57.
- JOLY G., LAPIERR J.M., OZLOU C., GOSSET P., AURIAS A., DE BLOIS M.C., PRIEUR M., RAOUL O., COLLEAUX L., MUNNICH A., ROMANO S.P., VEKEMANA M., TURLEAU C.: Comparative genomic hybridisation in mentally retarded patients with dysmorphic features and a normal karyotype. *Clin. Genet.*, 2001, 60, 212-219.
- JOYCE C.A., DENNIS N.R., COOPER S., BROWNE C.E.: Subtelomeric rearrangements: results from a study of selected and unselected probands with idiopathic mental retardation and control individuals by using high-resolution G-banding and FISH. *Hum. Genet.*, 2001, 109, 440-451.
- KNIGHT S.J., LESE C.M., PRECHT K.S., KUC J., NING Y., LUCAS S., REGAN R., BRENNAN M., NICOD A., LAWRIE N.M., CARDY D.L., NGUYEN H., HUDSON T.J., RIETHMAN H.C., LEDBETTER D.H., FLINT J.: An optimized set of human telomere clones for studying telomere integrity and architecture. *Am. J. Hum. Genet.*, 2000, 67, 320-332.
- KNIGHT S.J., FLINT J.: Perfect endings: a review of subtelomeric probes and their use in clinical diagnosis. *J. Med. Genet.*, 2000, 37, 401-409.
- LULECI G., BASARAN S., BAGCI G., KESER I.: Kromozomların boyanması ve bantlanması. In: *Sitogenetik Uygulama Yöntemleri*. Meteksan, 1990, 1-33.
- ROSENBERG M., HUI L., MA J., NUSBAUM H.C., CLARK K., ROBINSON L., DZIADZIO L., SWAIN P.M., KEITH T., HUDSON T.J., BIESECKER L.G., FLINT J.: Characterization of short tandem repeats from thirty-one human telomeres. *Genome Res.*, 1997, 7, 917-923.
- SACCONE S., DE SARIO A., WIEGANT J., RAAP A.K., DELLA VALLE G., BERNARDI G.: Correlations between isochores and chromosomal bands in the human genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1993, 90, 11929-11933.

16. SACCONI S., DE SARIO A., DELLA VALLE G., BERNARDI G.: The highest gene concentrations in the human genome are in telomeric bands of metaphase chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1992, *89*, 4913-4917.
17. SISMANI C., ARMOUR J.A., FLINT J., GIRGALLI C., REGAN R., PATSALIS P.C.: Screening for subtelomeric chromosome abnormalities in children with idiopathic mental retardation using multiprobe telomeric FISH and the new MAPH telomeric assay. *Eur. J. Hum. Genet.*, 2001, *9*, 527-532.
18. SLAVOTINEKA., ROSENBERG M., KNIGHT S., GAUNT L., FERGUSSON W., KILLORAN C., CLAYTON-SMITH J., KINGSTON H., CAMPBELL R.H., FLINT J., DONNAI D., BIESECKER L.: Screening for submicroscopic chromosome rearrangements in children with idiopathic mental retardation using microsatellite markers for the chromosome telomeres. *J. Med. Genet.*, 1999, *36*, 405-411.
19. SPELEMAN F., CALLENS B., LOGGHE K., VAN ROY N., HORSLEYS W., JAUCH A., VERSCHRAEGEN-SPAE M.R., LEROY J.G.: Subtelomeric familial translocation t(2:7)(q37;q35) leading to partial trisomy 7q35→qter: molecular cytogenetic analysis and clinical phenotype in two generations. *Am. J. Med. Genet.*, 2000, *93*, 349-354.
20. SYRROU M., KEYMOLEN K., DEVRIENDT K., HOLVOET M., THOELLEN R., VERHOFSTADT K., FRYNS J.P.: Glypican 1 gene: good candidate for brachydactyly type E. *Am. J. Med. Genet.*, 2002, *108*, 310-314.
21. WILSON L.C., LEVERTON K., OUDE LUTTIKHUIS M.E., OLEY C.A., FLINT J., WOLSTENHOLME J., DUCKETT D.P., BARROW M.A., LEONARD J.V., READ A.P.: Brachydactyly and mental retardation: an Albright hereditary osteodystrophy-like syndrome localized to 2q37. *Am. J. Hum. Genet.*, 1995, *56*, 400-407.
22. WILSON G.N., HELLER K.B., ELTERMAN R.D., SCHNEIDER N.R.: Partial trisomy 18 with minimal anomalies: lack of correspondence between phenotypic manifestations and triplicated loci along chromosome 18. *Am. J. Med. Genet.*, 1990, *36*, 506-510.

## ADDRESS FOR CORRESPONDENCE:

Guven Luleci  
Akdeniz University, Faculty of Medicine, Department of Medical Biology and Genetics  
TR-07070, Antalya, Turkey.  
Tel.: +90 242 2274343 / 44359  
Tel.: +90 242 2274484  
Fax: +90 242 2274482  
E-mail: luleci@akdeniz.edu.tr

## Triploidy in a Growth Discordant Twin Pregnancy after Intracytoplasmic Sperm Injection Treatment

### Case Report

Inanc Mendilcioglu<sup>a</sup> Mualla Ozcan<sup>b</sup> Gulseren Bagci<sup>b</sup> Mehmet Simsek<sup>a</sup>  
Sinan Kursun<sup>a</sup> Guven Luleci<sup>b</sup> Omur Taskin<sup>a</sup>

Departments of <sup>a</sup>Obstetrics and Gynaecology, and <sup>b</sup>Genetics, Akdeniz University, School of Medicine, Antalya, Turkey

### Key Words

Intracytoplasmic sperm injection · Selective feticide · Triploidy · Growth discordant · Twin

### Abstract

**Objective:** We report on a case of a triploidy in one fetus of a twin pregnancy who presented with the findings of growth discordance. **Methods:** Three weeks' difference between fetuses in ultrasonographic measurements in the first trimester was observed in a twin pregnancy following intracytoplasmic sperm injection (ICSI) treatment for male infertility. Hydrocephaly developed in the growth-discordant fetus subsequently. Amniocentesis for both fetuses and selective feticide for the abnormal one was performed at 19 weeks' gestation through a single insertion. Fetal karyotype of the abnormal one was 69,XXX and the healthy one was 46,XX. **Conclusion:** Early developed growth discordance in a twin pregnancy may be a sign of chromosomal abnormality such as triploidy. Those cases should be karyotyped without delay to decrease preterm delivery risk of possible selective feticide.

Triploidy is characterized rather by having an extra set of haploid chromosomes resulting in a total of 69 chromosomes which accounts for 1% of all conceptions in human [1].

Most cases abort spontaneously in the first trimester and the prevalence of triploid pregnancy at 16–20 weeks is estimated to be around 0.002% [2].

According to the parental origin, triploidy can present in two phenotypes with distinct placental and ultrasound findings [3–5]. The most common type is of paternal origin which presents with enlarged and partially multicystic placenta with a relatively well-grown fetus. The other type is characterized by having an extra haploid chromosome set originating from mother which presents with small, but normal, placenta and intrauterine growth restriction.

Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) is the most important treatment of male factor infertility. Chromosomal abnormalities are found to be 3.0% in ICSI offspring which is mainly related to higher level of sex chromosome aneuploidies [6]. We present a case of a twin pregnancy following ICSI treatment where one fetus is triploid and the other one has normal karyotype.

Copyright © 2006 S. Karger AG, Basel

### KARGER

Fax +41 61 306 12 34  
E-Mail karger@karger.ch  
www.karger.com

© 2006 S. Karger AG, Basel  
1015-3837/06/0211-0065\$23.50/0

Accessible online at:  
www.karger.com/ftd

Inanc Mendilcioglu, MD  
Department of Obstetrics and Gynaecology  
School of Medicine, Akdeniz University, Dumlupinar Bulvari  
TR-07070 Arapsuyu, Antalya (Turkey)  
Tel. +90 242 2430450, Fax +90 242 2274490, E-Mail imendilcioglu@yahoo.com





Fig. 1. Hydrocephaly in one twin with triploidy.

### Case Report

The patient was a 22-year-old woman, gravida 1, para 0 who conceived by ICSI treatment due to male infertility. Initial ultrasound at 8 weeks' gestation showed a dichorionic twin pregnancy with one embryo with positive fetal heart rate and one empty sac. At 12th gestational week, two viable fetuses consistent with 12 weeks and 9 weeks were detected in ultrasound scan. At week 19, growth discordance and smaller placentation were prominent and hydrocephaly was revealed in the smaller fetus (fig. 1). The normally developing fetus was consistent with 19 weeks' gestation, while the abnormal fetus was showing measurements consistent with 15–16 weeks except for wider BPD due to hydrocephaly. We counseled the parents about prognosis of the abnormal fetus and parents opted to have amniocentesis and selective feticide. Amniocentesis for both fetuses and selective feticide for the abnormal one were performed through a single insertion. Ultrasound-guided intracardiac KCl injection was done into the fetus with hydrocephaly. Amniocentesis revealed 69,XXX in the growth-discordant fetus and 46,XX in the normal fetus. No maternal or fetal complication occurred during the rest of the pregnancy. At 38th gestational week with elective cesarean delivery, a girl weighing 3,280 g was delivered. The baby has had normal neurological and constitutional development by one year of age.

### Discussion

Despite the earlier reports confirming the safety of ICSI on karyotype abnormalities, recent data has showed increased incidence in karyotype anomalies in offspring born after ICSI compared with the normal population [7]. Chromosomal abnormalities were found in 3% of prenatally tested ICSI fetuses, of which 1.6% were de novo and

1.4% were inherited. De novo abnormalities are mostly due to sex chromosome anomalies [6]. Regarding chromosomal anomalies, risks have been divided into two groups: ICSI dependent and ICSI independent [8].

ICSI-independent problems are: (1) the microinjection of sperm carrying a chromosomal anomaly; (2) the transmission of a genetic defect (such as Yq deletion or cystic fibrosis); (3) male gamete structural defect; (4) anomalies of sperm-activating factor; (5) potential for incorporating sperm mitochondrial DNA, and (6) female gamete anomalies.

ICSI-dependent problems include: (1) injection of foreign, sperm-associated plasmid DNA into the ooplasm and the risk of transgenic offspring or assimilation of infectious particles; (2) injection of biochemical contaminants (from medium); (3) mechanical oocyte activation; (4) physical and biochemical disturbance of ooplasm; (5) damage to the separating chromosomes in the second meiotic spindle, and (6) human errors in sperm selection and site of injection.

Triploidy has been one of the most common cause of spontaneous abortions. No increased risk of having triploid conceptus has been attributed to ICSI so far. However, in most reports karyotype testing was performed only either prenatally or at birth excluding spontaneous abortions. The rate of pregnancy losses has been reported to be 17.5% following ICSI [9]. Chromosome analysis of spontaneous abortions after in vitro fertilization and ICSI revealed that 48% of ICSI abortions showed a chromosomal abnormality [10]. Monosomy X was found to be the most common chromosomal abnormality. No triploidy risk due to ICSI has been reported.

Regarding ultrasound and placental findings, our case is most likely digynic which presents with small placenta and asymmetrical fetal growth retardation. Due to limitations we were not able to test the parental origin of the triploidy. The most prominent finding was the size discordance between two fetuses beginning from very early weeks of gestation. Asymmetrical fetal growth retardation and size discordance was also described in a twin pregnancy where one was triploid and the other was normal [11]. Additionally they observed an atrioventricular canal defect and bilateral cleft lip and palate in the triploid fetus. As the triploid fetus was inappropriate for pathological examination at birth, no additional anomaly could be detected in our case.

Selective termination of an anomalous fetus gestation poses increased risk of preterm delivery to the remaining fetus, especially after 20 weeks' gestation [12]. Thus, we performed the selective feticide as early as possible once

the fetal abnormality was ensured and used just a single insertion for all the procedures to lower the risk of pre-term birth.

As a conclusion, twin gestations showing significant growth discordance even without any malformation be-

ginning from early pregnancy should be tested for karyotype by chorionic villus sampling or amniocentesis as soon as possible to facilitate a better outcome for healthy co-twin.

## References

- 1 Doshi N, Surti U, Szulman AE: Morphologic anomalies in triploid liveborn fetuses. *Hum Reprod* 1983;14:716-723.
- 2 Fergusson-Smith MA, Yates JRW: Maternal age-specific rates for chromosomal aberrations and factors influencing them: report of a collaborative European study on 52,965 amniocenteses. *Prenat Diagn* 1984;4:5-44.
- 3 Jauniaux E, Brown R, Rodeck C, Nicolaides KH: Prenatal diagnosis of triploidy during the second trimester of pregnancy. *Obstet Gynecol* 1996;88:983-989.
- 4 McFadden DE, Kwong LC, Yam IY, Langlois S: Parental origin of triploidy in human fetuses: evidence for genomic imprinting. *Hum Genet* 1993;92:465-469.
- 5 Dietzsch E, Ramsay M, Christianson AL, Henderson BD, de Ravel TJ: Maternal origin of extra haploid set of chromosomes in third trimester triploid fetuses. *Am J Med Genet* 1995;58:360-364.
- 6 Bonduelle M, Van Assche E, Joris H, Keymolen K, Devroey P, Van Steirteghem: Prenatal testing in ICSI pregnancies: incidence of chromosomal anomalies in 1586 karyotypes and relation to sperm parameters. *Hum Reprod* 2002;17:2600-2614.
- 7 Aboulghar H, Aboulghar M, Mansour R, Seirour G, Amin Y, Al-Inany H: A prospective controlled study of karyotyping for 430 consecutive babies conceived through intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 2001;76:249-253.
- 8 Patrizio P: Intracytoplasmic sperm injection (ICSI): potential genetic concerns. *Hum Reprod* 1995;10:2520-2523.
- 9 Simpson JL, Lamb DJ: Genetic effects of intracytoplasmic sperm injection. *Semin Reprod Med* 2001;19:239-249.
- 10 Causio F, Fischetto R, Sarcina E, Geusa S, Tartagni M: Chromosome analysis of spontaneous abortions after in vitro fertilization (IVF) and intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2002;105:44-48.
- 11 Gassner R, Metznerbauer M, Hafner E, Vallazza U, Philipp K: Triploidy in a twin pregnancy: small placenta volume as an early sonographical marker. *Prenat Diagn* 2003;23:16-20.
- 12 Lynch L, Berkowitz RL, Stone J, Alvarez M, Lapinski R: Preterm delivery after selective termination in twin pregnancies. *Obstet Gynecol* 1996;87:366-369.