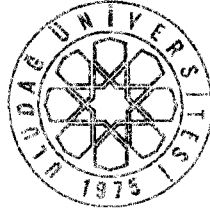


84842



T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MEME KANSERLİ HASTA VE AİLELERİNDE GENETİK YATKINLIĞIN ARAŞTIRILMASI

Gülşah ÇEÇENER

T.C. ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
DOKÜMANTASYON BÖLÜMÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

1999

T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MEME KANSERLİ HASTA VE AİLELERİNDE
GENETİK YATKINLIĞIN ARAŞTIRILMASI

Gülşah ÇEÇENER

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Bu tez 04/01/1999 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oybirliği ile kabul edilmiştir.

Danışman

Doç. Dr. Ünal EGELİ

Prof. Dr. Rahmi BİLALOĞLU

Prof. Dr. İsmet TAŞDELEN

İÇİNDEKİLER

	SAYFA
ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	iv
SİMGELER DİZİNİ.....	v
1.GİRİŞ.....	1
2.KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	2
2.1. Kanserin Tanımı.....	2
2.2. Kanserin Görülme Sıklığı.....	3
2.3. Kanserin Gelişimi.....	4
2.4. Kanserin Nedenleri	7
2.5. Kanserde Teşhis ve Tedavi.....	11
2.6. Meme kanseri.....	12
2.6.1. Etiyoloji.....	12
2.6.2. İnsidans.....	14
2.6.3. Endokrin Faktörler.....	15
2.6.4. Çevresel Faktörler ve Diyet.....	15
2.6.5. Kalıtsal Faktörler.....	16
2.6.6. Korunma.....	20
2.7. Kanser Gelişiminde Genlerin Rolü.....	21
2.7.1. Onkogenler	22
2.7.2. Tümör Baskılayıcı Genler.....	26
2.7.2.2.İnsan Kanserlerinde Tümör Baskılayıcı Genler...28	
2.7.2.3. Onkogen ve Tümör Baskılayıcı Genlerin.....	
Tıp Araştırmalarında Kullanılması.....	31
2.7.3. DNA Tamir Genleri.....	32
2.8. Frajil Bölgeler.....	33
2.8.1. Frajil Bölgelerin Tanımı.....	33

2.8.2. Frajil Bölgelerin Sınıflandırılması	35
2.8.3. Frajil Bölgelerin Oluşum Şekilleri.....	35
2.8.4. Frajil Bölge Ekspresyonunu Etkileyen Faktörler.....	37
2.8.5. Aphidicolin'in ve Kafein'in Frajil Bölgeler Üzerine	
Etkileri.....	38
2.8.6. Frajil Bölgeler ve Kanser.....	40
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	42
3.1. Aletler	42
3.2. Kitler	42
3.3. Kimyasal Maddeler.....	42
3.4.Örneklerin Toplanması.....	43
3.5.Örneklerin Kültürlerinin Hazırlanışı.....	50
3.5.1. Frajil Ajanların Hazırlanışı.....	51
3.5.2. Ethidium Bromide' in Hazırlanışı.....	51
3.5.3. Colcemide'in Hazırlanışı.....	51
3.6. Harvest İşlemi.....	52
3.6.1. Giemsa Boyasının Hazırlanışı.....	53
3.7. Preparatların Değerlendirilmesi.....	53
3.7.1. Giemsa Bantlama Yöntemi.....	53
3.7.1.1. PBS Solüsyonunun Hazırlanışı.....	53
3.7.1.2. Bantlama Boyasının Hazırlanışı.....	54
3.8. İstatistiksel Değerlendirme.....	57
4. BULGULAR.....	58
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	76
6. KAYNAKLAR.....	79
TEŞEKKÜR.....	101
ÖZGEÇMİŞ.....	102

ÖZET

Bu çalışmada 35 meme kanserli hasta, 35 meme kanserli hasta yakını, cinsiyeti ve yaşı uygun 20 normal kontrol bireyin periferik kan lenfositlerinden elde edilen metafaz figürlerinde, aphidicolin ve kafein ile indüklenen common fragil bölge ekspresyonu incelendi. Meme kanserli hastalarda ve birinci derece akrabalarında hasarlı hücre sayısı, kromozomal anomali ve fragil bölge ekspresyonu incelenerek elde edilen sitogenetik ve istatistiksel bulgular kontrol grubuna oranla anlamlı bulundu. Elde edilen bulgular meme kanserli hastalarda ve yakınlarında genetik insitabilitenin arttığını göstermektedir. Bundan dolayı fragil bölgeler, kansere genetik yatkınlığın belirlenmesinde uygun bir marker olabilir.

Anahtar kelimeler : Meme Kanseri, Fragil Bölgeler, Genetik Yatkınlık, Kromozomal Anomaliler, Aphidicolin, Kafein.

ABSTRACT

In this study, the expression of common fragile sites induced by aphidicolin and caffeine was evaluated on metaphase obtained from the peripheral blood lymphocytes of 35 women with breast cancer, their 35 clinically healthy female family member, and 20 sex-and age-matched normal controls. As a result of the cytogenetic and statistical evaluation, the number of damaged cells, chromosomal aberrations and expression frequencies of fragile sites detected in patients with breast cancer and their first-degree relatives were found to be significantly higher than those in the control group. Our findings indicate an increased genetic instability in women with breast carcinomas and their relatives. Therefore fragile sites may be used as a reliable marker for defining genetic susceptibility to cancer in general.

Key words : Breast cancer, Fragile sites, Genetic susceptibility, Chromosomal abnormalities, Aphidicolin, Caffeine

ÇİZELGELER DİZİNİ

	SAYFA
Çizelge 2.1: Proto-onkogenler.....	25
Çizelge 2.2: Onkogenler.....	26
Çizelge 2.3: Tümör Baskılayıcı Genler	28
Çizelge 2.4: İnsan Kanserlerinde p53 mutasyon oranı.....	30
Çizelge 2.5 :HGM10’da kabul edilen fragil bölgelerin kromozom lokalizasyonları.....	36
Çizelge 3.1:Meme kanserli hastalara, yakınlarına ve kontrol grubuna ait genel	
Bilgiler.....	47
Çizelge 3.2 Meme kanserinin histopatolojik sınıflaması.....	48
Çizelge 3.3: TNM sınıflandırma sistemine göre evreleme.....	50
Çizelge 4.1: Kromozomal aberasyon oranları (gap ve kırık/hücre).....	59
Çizelge 4.2: Kromozomal aberasyonların meme kanserli hasta, akraba ve kontrol.....	
grubunda istatistiki olarak karşılaştırılması.....	60
Çizelge 4.3: Meme kanserli hastalarda belirlenen gap ve kırık noktaları.....	64
Çizelge 4.4: Meme kanserli hastaların akrabalarında belirlenen gap ve kırık	
noktaları.....	65
Çizelge 4.5: Kontrol grubunda belirlenen gap ve kırık noktaları.....	66
Çizelge 4.6 : Meme kanserli hastalara ait fragil bölge oranları.....	68
Çizelge 4.7 : Meme kanserli hastaların yakınlarına ait fragil bölge oranları.....	69
Çizelge 4.8 : Sağlıklı kontrol grubuna ait fragil bölge oranları.....	70
Çizelge 4.9 : Meme kanserli hastalar, akrabaları ve kontrol grubunda belirlenen fragil	
bölgelerin ortalama, standart sapma ve p değerleri.....	71
Çizelge 4.10 : Fragil bölgelerin analizi.....	73

ŞEKİLLER DİZİNİ

	SAYFA
Şekil 2.1: Türkiye’deki kanser sıklığının yaşa göre dağılımı.....	3
Şekil 2.2: Kanserın görölme sıklığının cinsiyete göre dağılımı.....	4
Şekil 2.3: Genel olarak kanser oluşum mekanizması.....	5
Şekil 2.4: Meme tümör gelişimi ve metastası.....	7
Şekil 2.5: Çok aşamalı karsinogenezis modeli.....	8
Şekil 2.6: Hücre siklusu.....	9
Şekil 2.7: Hücre döngüsünde G ₁ evresinin sonlarındaki (R) restriksiyon noktası...10	
Şekil 2.8: Proto-onkogenden onkogene geçiş.....	24
Şekil 2.9: Retinoblastom geninin inaktivasyonu.....	27
Şekil 2.10: DNA Tamir Genleri.....	33
Şekil 2.11: Frajil bölgelerin oluşumu.....	37
Şekil 2.12: Kimyasal faktörlerin frajil bölge ekspresyonuna etkilerini gösteren şema...40	
Şekil 2.13: Kanserdeki frajil bölgeler.....	41
Şekil 3.1: Vakalarımıza ait pedigrı örnekleri.....	44-46
Şekil 3.2: Bantlama yapılmadan önce incelenmiş kromozom anomalilerini gösteren metafaz figürü.....	54
Şekil 3.3: 1 no’lu hasta olgumuza ait G Bantlama yapılmış metafaz figürü.....	55
Şekil 3.4: 15 no’lu hasta olgumuza ait G Bantlama yapılmış metafaz figürü.....	55
Şekil 3.5 : İnsan kromozomlarına ait 670 giemsa bandı içeren kromozom haritası.....	56

SİMGELER DİZİNİ

Kısaltmalar Dizini

ABD : Amerika Birleşik Devletleri

MÖ : Milattan Önce

MS : Milattan Sonra

DNA : Deoksiribonükleik asit

RNA : Ribonükleik asit

UV : Ultraviyole

FSH : Folikül stimüle edici hormon

BRCA1: Breast Cancer 1

BRCA2: Breast Cancer 2

FHIT : Fragile Histidine Triad

APC : Adenopolyposis Coli

HNPCC: Herediter Nonpolyposis Coli Cancer

HGM10: Human Gen Mapping 10

SSCP : Singe Strand Comformation Polymorphism

RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphism

1. GİRİŞ

Meme kanseri kadınlarda tipik postmenapozal bir hastalık olarak tanımlanır. Premenapozal dönemdeki kadınlarda ise genellikle zayıf ilerleme özelliği gösterir. Meme kanseri, erkeklerde de görülür, fakat görülme sıklığı kadınlardaki insidansın % 1'i kadardır (Kurzrock 1996).

Meme kanserleri birçok Avrupa ülkesinde ve A.B.D.'inde yaklaşık % 5 oranında görülmektedir (Newman 1998, Claus 1991). Tüm kanserlerin % 15'ini, gelişmiş ülkelerde ise % 30'a yakın kısmını teşkil etmektedir. Erken dönemlerde teşhis edildiğinde, bu kanser türü minimal mortaliteyi göstermektedir.

Meme kanseri saptanan olgularda kanser oluşum nedeni her ne kadar hormonların ve çevresel faktörlerin etkili olmasına bağlanabilirse de bu olgularda genetik bir anormalliğin bulunma olasılığını da düşündürür. Özellikle son yıllarda yapılan araştırmalar, kanserin genlerin hastalığı olduğu görüşünü kuvvetlendirmektedir.

Frajl bölgeler kromozomların belirli noktalarında lokalize olan ve boya almayan gap ve kırık bölgeleri olarak tanımlanmaktadır. (Hecht 1984, Yunis 1984, Hecht 1988, Yunis 1987, Hecht 1988, Popescu 1990). Asentrik fragman, delesyon, translokasyon, inversiyon ve triradial figür gibi kromozom kusurları da bu tanımlamaya girer. Frajl bölgelerde onkogenlerin ve tümör süpressör genlerin bulunduğu ve bu bölgelerin kanserleşme ve kansere genetik yakınlıkla ilişkili olabilecekleri son dönemde çeşitli çalışmalarda belirtilmiştir. (Ardisia 1993, Le Beau 1984, Yunis 1984, De Braekeler 1985, Hecht 1984, Thompson 1991, Vernole 1988, Liu 1989, Sandberg 1990, Egeli ve ark. 1997).

Bu çalışmada meme kanserli hastaların, birinci derece akrabalarının ve sağlıklı kontrol bireylerin lenfositlerindeki frajl bölgeler aphidicolin ve caffeine ile indüklenmiş ve frajl bölge ekspresyonu değerlendirilerek kansere genetik yakınlığın araştırılması amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

Tümörlere ilişkin ilk bilgiler Hipokrat tarafından açıklanmıştır. Hipokrat yengeç anlamına gelen “carcinos” kelimesini ülserler için kullanmış, malign olanlara da “carcinoma” demiştir.

Romalı hekim Celcus (M.Ö. 53,M.S.7) kanserlileri diğer tümörlerden ayırmış, meme kanserlilerine cerrahi tedavi uygulamıştır. M.S. 180 yıllarında Leonidas, yalnız tümörün değil çevredeki sağlam dokularında çıkarılması gerektiğini belirtmiştir.

Orta çağda tümörler konusunda fazla bir gelişme olmamıştır. İbni Sina, kanser olgusuna arsenik tedavisi uygulamış, İbni Zühr mide ve özefagus kanserleri hakkında bilgi vermiştir.

Rönesansla birlikte tıptaki gelişmeler hız kazanmıştır. Akromatik olmayan ilk mikroskop 1552 yılında, akromatik olanı da 1624’de yapılmıştır. Bundan sonra tıpta mikroskobun kullanılması yeni kavramların doğuşuna neden olmuş, Dutroched (1823), Schwann (1839), Schleiden (1838) hücreyi tanımlayarak bitki ve hayvanların en küçük yapısal birimi olduğunu belirtmişlerdir.

19. yüzyıldan sonra geniş ilerlemeler kaydedilmiş Dupugytren, kanserlerin bulaşıcı olabileceğini düşünerek tümör transplantasyonu yapmıştır. Cruveilhier tümörlerin normal dokulardaki soysuzlaşmadan ileri geldiğini belirtmiştir. Virchow, hücrenin hücreden bölünme ile oluşabileceğini “Omnis cellula a cellula” cümlesi ile tanımlamış ve tümör etyolojisinde kronik irritasyonların önemini belirtmiştir.

2.1 Kanserın Tanımı

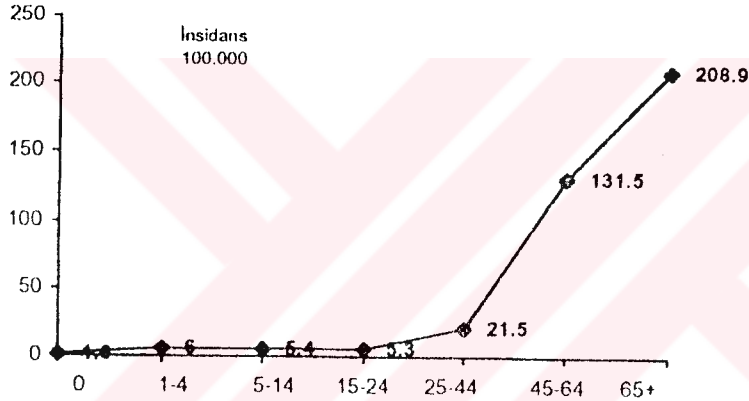
Kanser, yapısal düzenlerinde meydana gelen özel değişiklikler sonucu hücrelerin organizmanın denetim mekanizmalarına tabi olmadan çoğalarak bireylerin varlığını tehdit eder hale gelmesi olarak tanımlanabilir.

Kanser yeni bir hastalık değildir. İnsan ve hayvan kemiklerinden fosil olarak kalan binlerce yıl öncesine ait örneklerde de kanserin varlığı düşünülmüştür. Son yüzyıllarda yapılan bilimsel araştırmalarda kanserin genetik, hücresel, kimyasal ve teknolojik anlamda keşfedilmesi, teşhisi ve tedavisi sağlanmıştır.

2.2 Kanserin Görülme Sıklığı

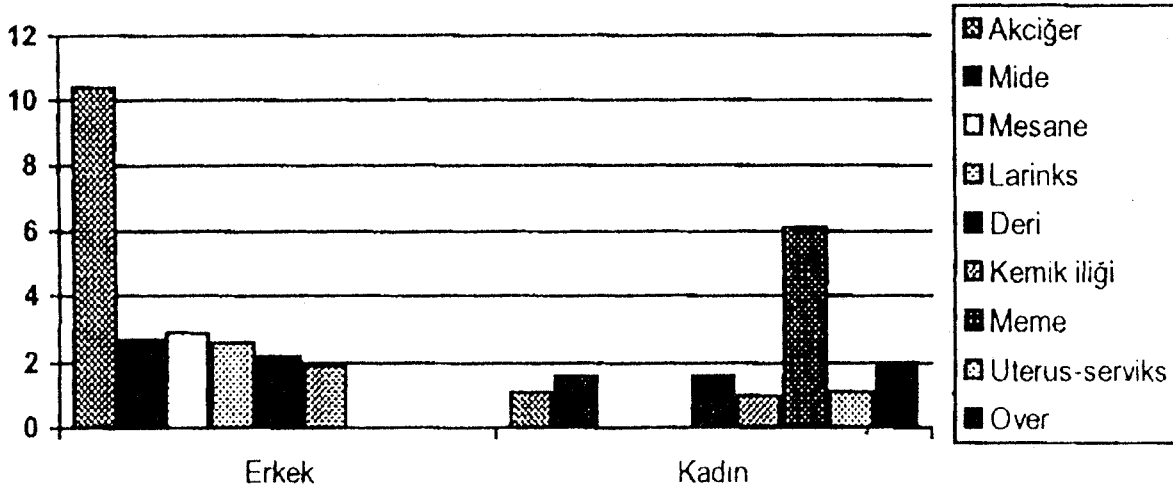
Kesin oranlara göre, yılda 1,5 milyondan fazla Amerikalı da kanser gelişmektedir. 500.000 kadarı ise o yıl içinde ölmektedir. Çoğunlukla kanser yaşamın ortalarında veya sonuna doğru gelişen bir hastalıktır. Bazı kanser ölümleri, özellikle güneş ışınlarına maruziyet, sigara ve alkol kullanımı gibi bireysel davranış değişikliklerinin düzenlenmesiyle engellenebilmektedir. Yine çoğu kanser erken dönemdeki teşhis ve tedavi ile de önlenmektedir.

Kanser her yaşta ve cinsite görülen bir hastalıktır. Ancak bazı kanser türlerine belirli yaşlarda, bazı kanser türlerine belirli cinsiyette ve hatta bazı kanser türlerine de belli meslek gruplarında daha sık rastlanmaktadır. Ülkemiz verilerine göre kanser sıklığının yaşa göre dağılımı Şekil 2.1’de gösterilmiştir.



Şekil 2.1. : Türkiye’deki kanser sıklığının yaşa göre dağılımı (Fırat 1995).

Bazı kanser türleri kadınlarda daha sık görülürken, bazıları da erkeklerde daha sıktır (Şekil 2.2). 1996 verilerine göre erkekte sık görülen bir kanser olan akciğer kanserinin insidansı 100.000’de 10.4 iken, kadında bu oran 1.1’dir. Buna karşılık kadınlarda meme kanseri görülme sıklığı 100.000’de 6.1’dir. Mesane kanseri erkekte 100.000’de 2.9 iken kadınlarda 100.000’de 0.38’dir. Başka bir tespiti göreyse 1992 yılında Türkiye’de kanser insidansı erkekte 100.000’de 8-200, kadında 100.000’de 4-120 oranında bulunmuştur (Fırat ve ark. 1995).



Şekil 2.2: Kanserin görülme sıklığının cinsiyete göre dağılımı (Fırat ve ark. 1995).

2.3 Kanserin Gelişimi

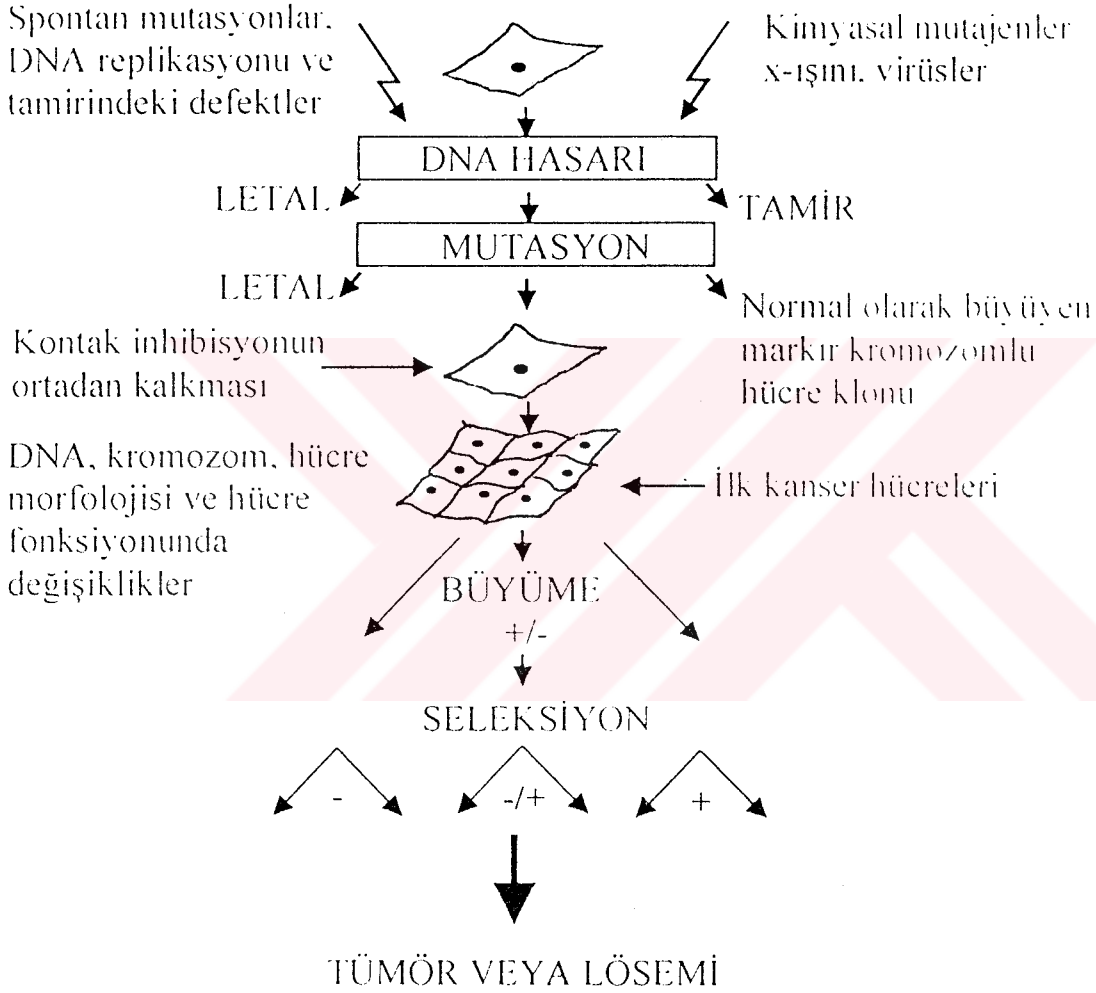
Bilindiği gibi hücreler çoğalırken komşu hücrelerde düzenli ilişki içinde olup kontak inhibisyona sahiptirler kanserli hücrelerde ise mekanizma ortadan kalktığı için düzensiz aşırı çoğalma görülür. Vücutta, hızlı gelişimi tümör olarak adlandırılan kümeleşmiş hücreleri meydana getirir (Şekil 2.3).

Genlerdeki mutasyonlar kanser oluşumuna neden olur. Genler normal süreçte, hücre bölünmesi ve gelişimi gibi hayati hücre fonksiyonlarını yapan proteinler için kodlanır. Mutant olduklarında, onkogenler veya kansere neden olan genler olarak görev yaparlar. Onkogenler hatalı proteinler üretirler. Böylece hücre bölünmesi artar ve diğer hücrelerle bağıllık (kontakt inhibisyon) ortadan kalkar.

Mutasyonlar biriktiğinde, onkogenler gelecek kuşaklara aktarılabilir. Meme, kolon, rektum ve prostat kanserleri bazı ailelerde oldukça sık görülmektedir. Tabii ki, kalıtım yoluyla geçiş tek neden değildir. Kalıtsal olarak geçen hatalı genler, kanser gelişimi için eğilime neden olur veya transforme olan hücrelere karşı zayıf savunma sağlayabilirler.

Birçok değişik onkogen, kolon ve rektum kanserlerine yol açan bir dizi olaylara karışır. Mesane, kemik, beyin, meme, serviks, akciğer ve ovaryum kanserleri de onkogenlerle ilişkilidir.

Biriken mutasyonlar ve kalıtım sonucu, farklı bir etki ile kromozomun bir parçasının kopup farklı bir kromozom bölgesine eklendiğinde bir onkogen ortaya çıkabilir. Bu hareket translokasyon olarak tanımlanır. Genlerdeki translokasyonlar mitozu içeren hatalara, viral enfeksiyonlara veya karsinojenlere neden olabilir.



Şekil 2.3:Genel olarak kanser oluşum mekanizması.

Vücudun kansere karşı doğal savunma mekanizması çoğu kanser de yavaş gelişir. Vücut kanser ilk baş gösterdiğinde kanser hücrelerine karşı doğal koruma gösterir. Normal hücrelerden bir kısmının transforme olması sonucu oluşan kanser

hücreleri farklı yüzey proteinleri içerirler. Bizim immün sistemimiz bu farklı proteinleri tanır ve yok eder.

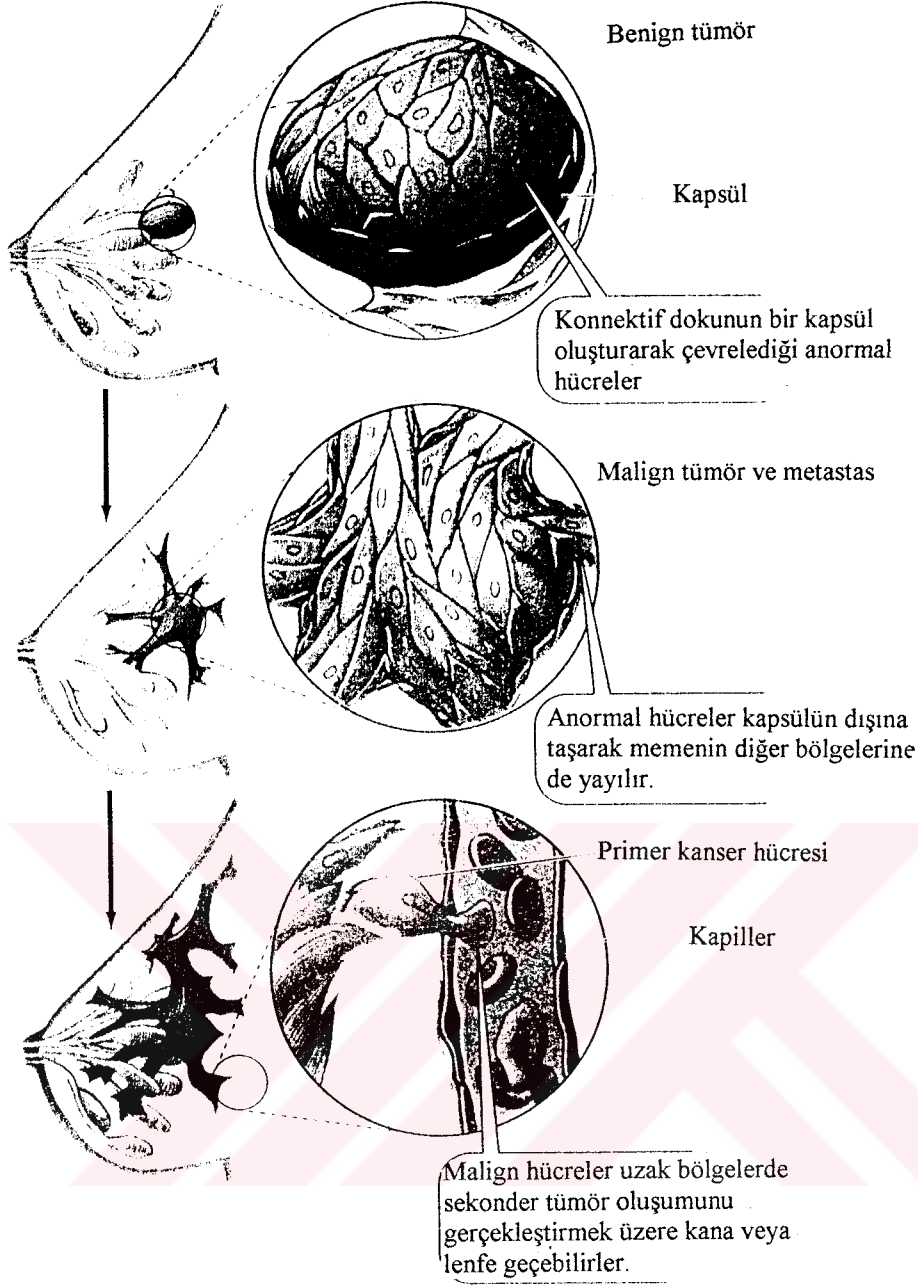
Binlerce kanser hücresi o gün içerisinde immün sistemimizin savunma mekanizması sayesinde yok edilir. Fakat bu mekanizma tüm anormal hücreleri yakalayamaz. Bazı hücreleri bu mekanizma tanıyamadığında doğal koruma baskı altına alınır ve tümör gelişir.

Bu hücreler, özelleşmiş fonksiyonları yapmayan sadece çoğalabilen hücrelerdir. Tümörler normal dokunun yapısına ve fonksiyonuna müdahale ederek ölüme neden olmaktadır. Benign ve malign olmak üzere iki tip tümör vardır.

Benign tümörler konnektif dokunun yavaş gelişen hücrelerini içeren tabakasından meydana gelir. Benign tümörler etkin cerrahi müdahale ile ortadan kaldırılabilir ve tekrar oluşumu ise gözlenmez.

Malign tümörler ise hızlı gelişen, çok aktif hareket ederek diğer dokularıda istila eden hücreleri içerir. Vücudun diğer orijinal bölgelerine hareket eden malign hücreler metastas olarak adlandırılır.

Metastas yapan hücreler kan damarlarından girişi hedeflediğinde, kan dolaşımı ile tüm vücuda taşınır. Vücutta primer tümör bölgesinden uzak bölgelerde bu metastas yapan hücreler konakladığında, gelişimlerini sürdürürler ve yeni tümörler meydana gelir (Şekil 2.4).



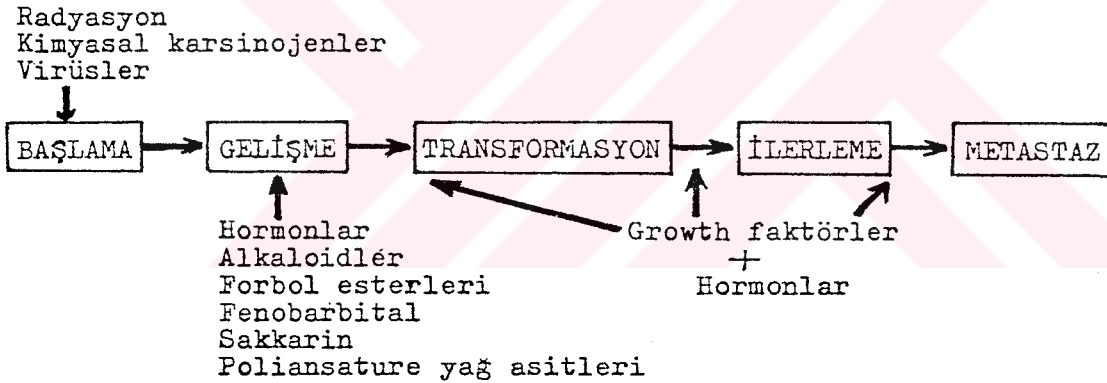
Şekil 2.4: Meme tümör gelişimi ve metastası (Benjamin 1997).

2.4 Kanserin Nedenleri

Kanserin oluşumunda tek neden söz konusu değildir. Kanser, çok sebepli (multi cause) ve çok adımlı (multi step) bir olaydır. Bu gerçeğe kanserin teşhisi ve tedavisi konusunda yapılan yoğun çalışmalarla son on yılda ulaşılabilmektedir. Bugün çevresel faktörleri (toksik kimyasalları ve radyasyonu) ve virüsleri, normal hücrelerin kanserli hücrelere değişimini gerçekleştiren ajanlar olarak düşünmekteyiz. Bu ajanlar önemli genlerde oluşturdıkları değişiklikler sonucu hücresel DNA da etkili olmaktadır. Meydana gelen bir hasar o hücre tarafından tamir edilemezse mutasyon

olarak açığa çıkar ve bu hücre kontakt inhibasyonun ortadan kalkması ile birlikte anormal bir şekilde çoğalarak ilk kanser hücrelerini oluşturur. Bu hücrelerin hücre morfolojisi, kromozom yapısı ve hücre fonksiyonlarında birtakım değişiklikler meydana gelmiştir. Bunların bir kısmı immün tarama (immün surveillance) olayı ile yok edilir, fakat geri kalan hücre veya hücreler aşırı şekilde çoğalarak sonuçta tümör veya lösemi oluşumu meydana getirirler (Şekil 2.3).

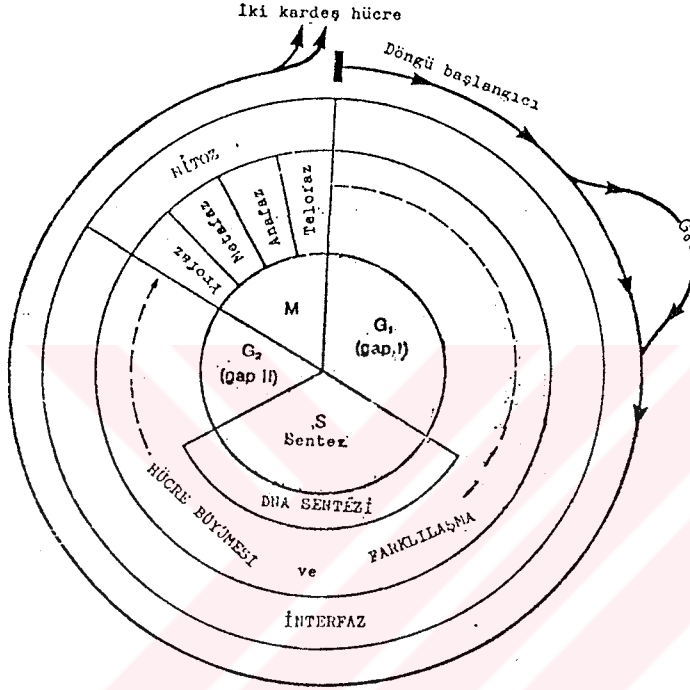
Kimyasal maddeler ve radyasyon hücrelerde transformasyon meydana getirdikleri için karsinojenler olarak adlandırılırlar. Havaya yerleşen sigara dumanı, taşıtlardan çıkan egsoz gazları, endüstriyel atıklar, bazı koruyucu kimyasallar karsinojenler olarak tanımlanır. Radyasyonun çeşitli formları karsinojenik olabilir. Bu formlar ultraviyole (UV) ışığı, radyoaktif atomlar (örneğin radon), ve X ışınlarıdır. Tüm radyasyon tipleri enerjinin değişik şekilleridir ve DNA da kimyasal değişikliklere neden olarak gen düzeyinde mutasyonlar meydana getirirler (Jackson 1989), (Şekil 2.5).



Şekil 2.5: Çok aşamalı karsinogenezis modeli.

Stem hücrelerdeki değişimler vücudun pek çok yerinde stem hücre ile tamamen farklılaşmış hücre arasındaki pek çok farklı evrede, hücreyi normal programından saptırabilmektedir. Böyle bir sapma sonucu oluşan kanser, özellikle kanser hücrelerinin sayısının artmasıyla oluşan hasar nedeniyle öldürücü olmaktadır. Yanlış hücre tipleri çoğaldıkça vücudun yaşam için önemli olan kısımlarını ele geçirir. Bunların da normal hücresel aktiviteyi engellemesi kaçınılmaz bir sonuçtur. Çoğu kanser hücresi, orjinal bölgesinden vücudun uzaktaki bölgelerine yayılabilmektedir.

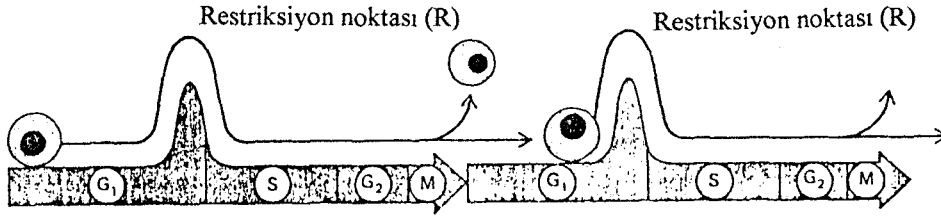
Çok hücreli diploid organizmaların yaşamı tek hücreli döllenmiş yumurta (zigot) ile başlar zigotun ve kardeş hücrelerin mitotik aktivitesi, organizma gelişiminin ve büyümesinin temelidir. Hücredeki bileşenlerin çoğu hücre bölünmeleri arasındaki “interfaz” evresinde sürekli olarak sentezlenir. İnterfaz G₁, S ve G₂ safhalarından oluşur. G₁ evresinde RNA ve protein, S evresinde DNA ve protein, interfazın son safhası olan G₂'de ise RNA ve protein sentezi olur. G₂ evresinin sonunda hücre volümü yaklaşık 2 kat artmış ve DNA replike olmuştur (Şekil 2.6).



Şekil 2.6: Hücre Siklusunu.

İnterfaz hücre siklusunun % 90'ını kapsar ve 16-24 saat sürer. Mitoz bölünme ise son bir iki saatte gerçekleşir. İnsan vücudunu oluşturan 10^{13} (yada 10^{14}) hücrenin bölünme hızları farklılık gösterir. Sinir, iskelet kası ve kırmızı kan hücreleri bir kez olgunlaştıktan sonra bir daha bölünmezler. Epitel hücreleri gibi bazı vücut hücreleri ise organizmanın yaşamı boyunca sürekli ve hızla bölünebilir. Fakat hücre siklus süreleri farklı olabilmektedir. Hücre döngüsü süresindeki bu farklılıklar G₁ evresinin uzunluğuna bağlıdır. Bazı hücrelerin aktivitesi, hücre siklusunu sırasında geçici yada sürekli olarak durdurulur. Bu tip hücreler bir anlamda döngüden çekilerek metabolizmalarını değiştirmekte ve büyümelerini durdurmaktadır. Bu görünüme “G₀”

evresi denilmektedir. Bu evreye DNA sentezinin başlamasından hemen önceki G_1 evresinde girilebilir.



Şekil 2.7: Hücre döngüsünde G_1 evresinin sonlarında (R) restriksiyon noktasının aşılmasıyla siklus sürdürülebilir.

Mitoz bir kez başladığında kesintisiz devam eden dinamik bir süreçtir. Aşamalara göre mitoz; profaz, metafaz, anafaz ve telofaz evrelerini kapsar. Son olarak sitoplazmik bölünme (sitokinezis) ile bölünme süreci tamamlanır. Böylece bir diploid hücreden yine iki tane diploid hücre oluşur.

Dokulardaki hücrelerin bölünme hızları, yeni hücrelere gereksinim duyulduğunda bölünmeye izin veren bazı mekanizmalarla kontrol edilir. Örneğin, karaciğerin bir parçasının kopmasından sonra sessiz olan hücreler hızla bölünmeye başlar ve normal kütesine ulaşır ulaşmaz bölünme durur. Aynı sınırlı bölünme şekli zedelenen deride de görülür. Hücre bölünmesinde böyle bir feedback kontrol mekanizması olmazsa organizmanın yapısı ve fonksiyonu çok çabuk bozulacaktır. Benzer düzenleyici mekanizmalar embriyogenezis boyunca hücre ve dokuların düzenli gelişimi için de önemlidir. Fibroblastlar doku kültür kablarında yüzeye yapışarak yayılır ve bölünürler. Bu süreç normalde hücrelerin birbirlerine dokunarak birleşik bir tabaka oluşturmaya dek sürer. Bu noktada hücreler daha fazla yayılamayacağından bölünme durur. Bu görünüm hücre bölünmesinin “kontakt” inhibisyonu olarak tanımlanır. Bir hücre diğerine dokunduğunda hipotetik “u” proteinini kapsayan bir sentez

mekanizmasını etkilemektedir. U protein konsantrasyonunun azalması hücrenin G₁ evresinde - R noktasında durmasına neden olmaktadır.

Kanser hücrelerinin belirgin özelliklerinden birisi normal hücrelerin bölünmesini düzenleyen kontrol mekanizmalarına anormal yanıt vermelidir. Bunlar konakçıyı öldürünceye kadar bölünmeyi kontrolsüz şekilde sürdürmektedir. Döngüsel (cyclic) nükleotid düzeyleri, plazma zar akışkanlığı, salgıladığı proteinler, hücre iskeleti ve iyon geçirgenlikleri farklıdır. Normal hücrelere göre protein yapıda growth faktörlere daha az gereksinim duyarlar. Bazı durumlarda growth faktörlerini kendileri oluşturabilir. Ayrıca bir populasyon olarak büyümeleri sınırsızdır. Halbuki normal bir fibroblast, kültürde 20-55 kez bölünebilmektedir.

Bir yaşam süresi içinde yetişkin bir insanda 10^{16} kadar hücre bölünmesi gerçekleşmektedir. Doğal olarak bu süreç içinde zaman zaman kendiliğinden (spontan) mutasyonlar da oluşmaktadır. Ortalama hızını kesin olarak hesaplamak zor olmasına karşın, her hücre bölünmesinde her bir gen için 10^{-6} mutasyon oranı genel olarak kabul edilmektedir. Böylece bir yaşam boyunca tipik bir gen için bir bireyde 10^{10} mutasyon olasılığı vardır. Bu açıdan kanser sorununa niçin olduğu değil niçin bu kadar ender olduğu sorusuyla girmek daha doğru olmalıdır.

2.5. Kanserde Teşhis ve Tedavi:

Kanserin tedavisindeki geleneksel medikal metodlar oldukça mücadeleci ve direktir. Malign neoplasmlarda cerrahi, radyasyon ile yakılma veya kimyasallarla zehirlenme şeklinde metodlar uygulanır. Cerrahi küçük tümörler için çoğunlukla etkilidir. Radyasyon terapisi etkilidir çünkü hücre bölünmesinin yoğun oranda olduğu kanser hücreleri, normal hücrelere oranla radyasyon hasarında kolaylıkla etkilenebilirler. Radyasyon metastas yapan hücreleri yok edebilir, fakat cerrah bu hücreleri bulamayabilir veya temizleyemeyebilir. Radyasyon tedavisindeki sakıncalı yön ise normal bölünen vücut hücrelerine de zarar verebilir olmasıdır.

Kemoterapi, hızlı bölünen hücreleri öldürmek için toksik kimyasalların kullanımına dayanır. İlaçların bazıları DNA'daki nükleotidlerin şekillerini değiştirirler. DNA sentezi sırasında ilaçlar DNA replikasyonlarına katılan ve hatalı proteinlerin üretilmesine neden olan kanser hücrelerinin DNA'sı ile birleşebilmektedirler. DNA replikasyonu gerçekleşmez ise kanser hücreleri tekrar üretilmeyebilir ve vücudun

doğal savunma mekanizması tarafından kolayca yok edilebilirler. Hatalı proteinler böylece azalır ve kanser hücrelerinin ölümü gerçekleşir. Ne yazık ki, hem radyasyon hem de kemoterapi normal hücelere de zarar verir ve saç dökülmesi, bulantı, kusma gibi yan etkilere neden olabilir.

Yeni teşhis teknolojileri oldukça küçük ve lokalize olan invasive olmayan tümörler üzerine yoğunlaşmıştır. Bu metodlar erken tespit ve cerrahi müdahale ile tümörü ortadan kaldırmaya izin verir. Örneğin, magnetic rasonance imaging (MRI) yöntemi tümörü tespit etmek için electromagnet olarak kullanılır. Computed tomography (CT) erken dönemde lokalize olan tümörlerden X ışınlarının bölgesel geçişini göstermek için kullanılır. Positron emission tomography (PET) ise normal dokudan kanserli olanları ayırdetmek için metobolik aktivitelerindeki değişiklikleri açıklar. Erken teşhis ve tedavideki yeni yöntemler sayesinde tüm kanserlerde 5 yıllık hayatta kalma süresinin oranı % 51 iken, 50 yıl önce bu oran % 20 idi (Benjamin 1997).

2.6 Meme Kanseri

2.6.1 Etiyoloji

Meme kanseri tabii sadece memelilerde olabilir. Fakat bütün memelilerde meme kanseri görülmemektedir. Örneğin ata, balinada, arslanda, tilkide, kedide meme kanseri görülmemekte, buna karşılık yalnız üç memeli grupta meme kanseri gelişmektedir : fare, köpek ve insan. Bu oluşumda etki yapan faktör nedir? Meme kanseri sadece bu memelilerde görüldüğüne göre meme kanserinin etiyojisinde rol oynayan faktörü bu hayvanlara özel bir faktörün yanında aramak gerekir. Başka bir deyimle fareyi fare yapan, köpeği köpek yapan, insanı insan yapan faktör ne ise bu üç memeli türde meme kanserine neden olan faktör de hemen hemen aynıdır. Bu faktör genetik bir faktördür. Acaba meme kanserinin etiyojisinde rol oynayan faktör de genetik bir faktörmüdür? Bu sorunun cevabı evet olabilir. Gerçekten de meme kanseri insidansı çok yüksek olan fare suşları vardır. Bu fare suşlarında meme kanseri görülme oranı %90 ile % 100 arasındadır. Aynı derecede olmamakla beraber insanda da böyle bir ilişki vardır. Anne, kız ve kız kardeşler arasında meme kanseri görülme oranı normal popülasyona göre iki kat daha fazladır. Buna karşılık meme kanserli kadınlarda genetik incelemeler kesin bir sonuca varmış değildir. Pedigriler oldukça

yetersizdir. Meme kanseri olan bir annenin kızı meme kanseri olacak olursa annesinden daha genç yaşta hastalığa yakalanabilmektedir.

Kadınlarda görülen kanserlerin % 32'sini ve kansere bağlı ölümlerin de % 19'unu meme kanseri oluşturmakta ve yaşamı boyunca her 9 kadından biri meme kanserine yakalanmaktadır. 1975 yılında dünyada 500.000' den fazla yeni meme kanseri tanısı konulmuştur. Bu sayının 2000 yılında yılda 1.000.000 olacağı tahmin edilmektedir, Erkek kadın oranı ise yaklaşık 1:100'dir.

Erkeklerde çok nadir görülmesi, seksin önemli bir faktör olduğunu göstermektedir. Prepubertal dönemde meme kanseri hemen hiç görülmez, 20 yaş altında çok nadirken, insidans 20 yaşından itibaren giderek artmakta ve 45-55 yaşlarında yılda 100.000' de 125 yeni olgu görülmektedir. 55 yaşından sonra artış daha belirginleşmekte ve 60-65 yaşlarında yılda 100.000' de 153, 80-85 yaşlarında ise 312 yeni vaka görülmektedir.

İnsanlarda meme kanseri coğrafi bir dağılım gösterir. Fakat gerçekte bu bir coğrafi dağılım değil, bir ırk dağılımıdır. Şöyleki Japonlarda meme kanserinin az görülmesine karşılık Avrupa'da ve İngiltere'de meme kanseri oranı Japonlardakine göre çok yüksek bulunmaktadır. İkinci Dünya savaşından sonra Amerikalı askerlerle evlenerek birçok Japon kızı Amerika ya göç etmiş bulunmaktadır. Uzun yıllar orada yaşadıkları halde gene de bu Japon kadınlarında meme kanseri görülme oranı Amerika'nın beyaz ırkına göre çok daha azdır.

Örneğin California'da yapılan bir araştırmada bu göç etmiş Japonlarda meme kanseri görülme oranı 100.000 de 5.3 olmasına karşılık aynı bölgedeki beyazlarda bu oran 27.6 olarak görülmektedir. Gene aynı bölgedeki Çinlilerde bu oran 100.000 de 6.8 dir. Bundan başka Japonlarda görülen meme kanserinin prognozu beyazlarda görülen meme kanseri prognozuna göre çok daha iyidir. Gerek görülme oranında gerekse prognozdeki farklılıklar genetik faktörlerin önemini göstermektedir.

Meme kanseri oluşumunda hormonal faktörlerinin etkili olduğu düşünülmektedir. Hipofizden salgılanan somatotropik hormon direkt olarak memenin üzerine etki eder ve memenin büyümesine neden olur. Bundan başka hipofizden salgılanan ve direkt olarak meme üzerine etki eden bir hormon da prolaktindir. Prolaktin memenin sekretuar epitelinin gelişmesine neden olur. Hipofizin meme üzerine bu direkt etkisinden başka diğer bazı endokrin organlar

aracılığıyla olan etkileri de vardır. Kesin olmamakla beraber tiroid hastalıkları ile meme kanseri arasında bir ilişki vardır. Meme kanserli hastaların % 10'unda geçirilmiş tiroid hastalığı vardır. Bu oran normal popülasyona göre oldukça yüksek bir orandır.

Gebelik ve laktasyon meme kanserine karşı koruyucu oldukları ileri sürülmektedir. Overler hipofizden salgılanan FSH (folikül stimüle edici hormon)'ın etkisi ile östrojen salgılar. Bu östrojen memedeki duktus gelişimine neden olur. FSH'ın yanında lutein stimulan hormon overlerdeki korpus luteum üzerine etki ederek progesteron salgılanmasına yol açar. Progesteron meme lobüllerinin yani asinilerin gelişmesine neden olur. Plasentadan salgılanan östrojen ve progesteronun da meme üzerine etki yapabildiği bilinmektedir.

2.6.2 İnsidans

Meme kanseri tüm kanserler içinde en sık görülen kanser türüdür. Doğan her 15 kız çocuğunun biri yaşamının bir döneminde meme kanseri olacaktır. Çok nadir olmakla beraber erkeklerde de görülebilir.

Türkiye'de, Avrupa'da ve Amerika'da kanserin sıklık sıralamasında ön sıralarda yer alan meme kanseri Japon kadınlarında çok az görülmekte, Eskimolarda ise hemen hemen hiç rastlanmamaktadır. Japonya'dan Amerika'ya göç eden ve orada yerleşen Japon kadınlarında meme kanseri insidansı yıllar geçtikçe artmaktadır. Bundan başka bu kadınların Amerika'da doğan ikinci kuşak kızlarında meme kanseri insidansı Amerika'ya Avrupa'dan göç etmiş olan kadınlardaki insidansa hemen hemen eşit olmaktadır. Bu Japonya'daki Japon kadınlarında meme kanserinin az görülmesinin sadece bir ırk etmenine bağlı olamayacağını göstermektedir. Nitekim bazı araştırmalar meme kanseri ile beslenme arasında bir ilişki olduğunu protein ve yağdan zengin besinlerle beslenenlerde meme kanserinin daha çok olabileceği düşüncesini destekler görülmektedir.

Meme kanseri etiyolojisinde hereditenin kesin bir rolü bilinmemekle beraber annesinde ya da teyzesinde, ya da kızkardeşinde meme kanseri olan kadınlarda meme kanseri olmayanlara göre dikkati çekecek kadar fazladır. Başka bir gözlemler annesinde meme kanseri olacak olursa kanserin klinik olarak ortaya çıkış yaşı anneye göre kızda daha erken olmaktadır.

Bazı fare türlerinde yavruya anne sütü ile geçen bir virüsün meme kanseri yaptığı saptanmışsa da insanlarda bunu kanıtlayacak bir bulgu yoktur. Meme kanseri etiyolojisinde östrojenin önemli bir yeri olduğu bilinmektedir. Östrojen ile meme kanseri arasındaki bu ilişki, östrojenin her zaman meme kanseri yapacağı anlamında olmamakla beraber hastalıkların yaklaşık 1/3 ininde meme kanseri östrojene bağlıdır.

2.6.3 Endokrin Faktörler

İlk adet, ilk gebelik ve menapoz yaşları ile meme kanseri insidansı arasında bağlantı kuran bir çok çalışma mevcuttur. Bir çalışmada ilk adetine 12 yaşından önce görenlerde 13 yaşından sonra görenlere göre meme kanseri insidansı yaklaşık 2 kat daha fazla bulunmuştur. Doğal menapozu 45 yaşından önce olanlarda meme kanseri gelişme rölatif riski 0.73 iken, doğal menapoz yaşı 55 olanlarda 1.48'dir. 35 yaş altında yapay olarak menapoz oluşturulması ile rölatif risk 0.36'ya düşmektedir.

Gebe kalmayan kadınlarda da bir veya birden çok kez gebe kalmış kadınlara göre meme kanseri insidansı daha yüksektir. Bir çalışma ilk gebeliği 30 yaş üstünde olanlarda, ilk gebeliği 18 yaş altında olanlara göre 4-5 kat meme kanseri geliştirme riski saptanmıştır.

Bu gözlemler sonucunda yüksek prolaktin ve yüksek östrojen seviyelerinin meme kanseri gelişme olasılığını arttırdığı söylenebilir. Progesteronun bu gelişmeyi inhibe edici rolü tam anlaşılamamıştır.

Östrojenin postmenapozal yerine koyma tedavisinde veya oral kontraseptif olarak kullanılması meme kanseri gelişme riskini çok az arttırmaktadır. Küçük doz östrojenin kısa süreli olarak post menapozal dönemde kullanılması nispeten güvenilirdir. Kombine oral kontraseptifler reproduktif yaşamın ortasında (yaklaşık 25-39 yaş) uzun yıllar kullanılması ile meme kanseri riski artmamaktadır. Buna karşılık, kombine oral kontraseptiflerin genç yaşlarda uzun yıllar kullanılması meme kanseri riskini arttırabilmektedir.

2.6.4 Çevresel Faktörler ve Diyet

Meme kanseri insidansının düşük olduğu Japon kadınlarında Kuzey Amerika'ya göç ettikten sonra yerli halk ile aynı oranda meme kanseri görülmesi,

çevresel faktörlerin de genetik faktörler kadar, hatta daha fazla etkili olduğunu düşündürmektir.

Diyet de önemli bir faktördür. Yağ veya kolesterol alımı ile steroid hormon metabolizması arasındaki muhtemel ilişki diyetteki yağın etyolojik ajan olabileceğine işaret etmektedir. Kişi başına yağ alımı ile meme kanserinden ölüm hızı arasında bir kolerasyon mevcuttur. Ayrıca % 10-20 oranında yağ ile beslenen ratlarda % 5'den daha az yağ ile beslenenlere göre mem kanseri çok daha fazla görülmekle birlikte, bu konu henüz tartışmalıdır. Buna karşılık, şişman kadınlarda meme kanseri riski 1.5-2 kat daha fazladır. Alkol alımı ile meme kanseri riski arasında da doza bağlı bir ilişki saptanmıştır. Orta derece alkol alımı bu riski %40-60 arttırmaktadır (Bland ve ark. 1991).

2.6.5. Kalıtsal Faktörler

Meme kanseri, annesinde meme kanseri olan kadınlarda normal popülasyona göre 2-3 kat daha sıktır. Aile hikayesi olanlarda meme kanseri daha erken yaşlarda görülmekte ve aile hikayesi olmayanlara göre daha sık bilateral meme kanseri oluşmaktadır.

Meme kanserinde herediter ve genetik predispozisyon üstüne yapılan araştırmalar sonucunda, meme kanserlerinin % 9'unda herediter özellik saptanmıştır.

Yeni bulunan iki gen (BRCA1 ve BRCA2) ailesel meme kanserlerinin başlıca nedeni olarak görülmektedir (Miki ve ark. 1994, Wooster ve ark. 1994). BRCA1 genindeki germinal mutasyonlar ailesel meme/over kanserlerinin % 50'sinden fazlasını ve tüm meme kanserlerinin % 5-10'unu oluşturmaktadır. BRCA1 geninin bir transkripsiyon faktörü olduğu düşünülmektedir. Futreal ve ark. (1994) ise bu genin ailesel olmayan meme kanserlerinde rol almadığını açıklamışlardır. (Futreal ve ark. 1994). Bu gen aynı dokuyu sadece ailesel kanserlerde etkiliyorsa bu konudaki ilk örneği oluşturacaktır. Ailesel meme kanseri açısından diğer önemli bir gen de BRCA2 genidir. Bu gendeki mutasyonların özellikle sadece meme kanseri gözlemlenen aileler açısından önemli olduğu sanılmaktadır. BRCA1 geninin aksine BRCA2 geninin somatik mutasyonları seyrek de olsa pankreas ve karaciğer kanserlerinde bulunmuştur. Diğer ilginç bir gözlemse, bu iki genin Dünya'daki bazı toplumlarda (örneğin Orta Avrupa'lı Aşkenazi yahudilerinde) çok sık (% 1 yaklaşan sıklıkta) görülmesidir (Szabo ve King

1997). Böyle toplumlarda aynı mutasyona sık olarak rastlandığı için toplum hekimliği açısından genel taramalar gündeme gelebilir.

3. kromozomun p14.2 bölgesi FRA3B olarak isimlendirilen bir fragil bölgeyi içermektedir. Son dönemdeki araştırmalarda meme ve diğer kanserlerde aynı bölgede tümör süpressör gen özelliği gösteren FHIT (Fragile Histidine Triad) geni belirlenmiştir. FHIT geninin invasive tümörlü 16 hastanın 6 sında, ductal insutu karsinomali 6 hastanın üçünde FRA3B bölgesinde heterozigotinin kaybı tespit edilmiştir (Ahmadian ve ark. 1997). 32 meme kanseri hastasının % 9'unun hücre hattında FHIT geninin 4. ve 5. exonunda SSCP (Single strand confirmation polymorphism) analiziyle homozigoz delesyonlar tespit edilmiştir.

Meme kanserinde içinde bulunduğu bir grup insan kanserlerinde 3. kromozomun kısa kolunda delesyonlar bulunmuştur. Son yıllardaki çalışmalar FHIT geninin aday tümör süpressör gen olmasından dolayı, bu gen üzerinde yoğunlaşmıştır. Hayashi ve ark. (1997) 61 Japon meme kanseri olgusunun % 38'nin FHIT geninde anormal transkripte bölgeleri incelenmiştir. Sekans analizi ile exon 5-8 de mutasyonları tespit etmişlerdir. FHIT geninin anormal transkribe edilmesinin nedenleri araştırıldığında yaş, tümör nodu-metastas durumu, tümör büyüklüğü, östrojen ve progesteron reseptörlerinin durumu, meme kanserinin ailesel hikayesi, hastaların yaşam koşulları, sigara ve alkol alışkanlıklarındaki farklılarının nedeni oluşturduğu açıklanmıştır. Bilateral meme kanserlerin insidansının ve doğum yapma sıklığının artışının da FHIT geninin anormal transkribe edilmesiyle ilgili olduğu gösterilmiştir (Hayashi ve ark. 1997).

Petrukhin ve ark. (1997) Aşkenazi orijinli meme ve meme-ovaryum kanserli ailelerde kolorektal kanserlerin insidansının arttığını gözlemişlerdir. APC genindeki germ-line missense mutasyon, I1307K, Aşkenazi yahudilerinin kolorektal kanserli hastalarında tespit edildi. 158 aileden 264 Aşkenazi yahudide kolon kanserlerinde spesifik fakat meme-ovaryum kanserli aileler de ilgisi görülen I1307K mutasyonu incelendi. Meme veya meme-ovaryum aile hikayesi bulunan bireylerde (264 bireyin 51'inde; % 19.3'ünde) BRCA1 (185 delAG veya 5382ins) veya BRCA2 (6174 delT) mutasyonu saptandı.

Bu topluluğun % 7 sinde (158 hastanın 11'inde) APC I1307K mutasyonu varlığı ortaya kondu. Çalışılan ailelerde (158'inin 42'sinde) birinci, ikinci veya üçüncü

kuşağında en az bir kolorektol kanser taşıyordu. Bu düşünceden yola çıkarak Aşkenazi yahudilerinde belirlenen APC I1307K mutasyonunun varlığı genetik yatkınlığın belirlenmesinde bir marker olabileceği düşünülür.

Eva ve ark. (1988) Meme kanserli hastalarda retinoblastom geninin 5. ve 6. ekzonunda 5 kilobazlık bölgeleri içeren homozigos internal duplikasyonlar tespit ederek meme kanserinin genetik mekanizmasıyla Rb geni arasındaki ilişkiyi açıklamışlardır.

Friedman ve ark. (1994) 10 ailede 10 ovaryum kanserli, 63 meme kanserli hastada germline mutasyonları araştırarak BRCA1 geninin kromozom 17q21 ile ilgili olduğunu ve BRCA1 in genetik kanıt olarak gösterilebilecek aday bir gen olduğunu açıklamışlardır. BRCA1 geninde 9 farklı mutasyonu SSCP ve sekans analizleriyle belirlemişlerdir. Bu mutasyonlardan yedisi gen boyunca yer alan protein ürünlerinin kesilmesine neden olmuştur.

Marcus ve ark. (1997) predizpozisyon genleri olarak nitelendirilen BRCA1 ve BRCA2 genlerinin kalıtsal meme kanserlerindeki rolünü araştırarak, BRCA1'in östrojeni indükleyebilen, antiproliferasyon ve tümör süppressör fonksiyonu ile hücre siklusunu etkileyebilen bir protein olduğunu açıklamışlardır. BRCA2 proteini hakkında bilinenler daha az olmasına rağmen, BRCA1'e benzer özellikler gösterdiğini bildirmişlerdir. BRCA1 genindeki mutasyonu tespit edilen hereditör meme kanserli hastaların insitu ve invaziv lobular, tubulobular, cibriform ("tubularlobular grup [TLG]) ve ductal karsinoma tiplerine ait olduğu belirtilmiştir. Buna karşın BRCA2 mutasyonu varlığı açıklanan hereditör meme kanserli hastaların TLG karsinomalı gruba ait oldukları açıklanmıştır.

BRCA1'in mRNA ve protein ekspresyonlarının hücre siklusunun G1 fazının sonunda ve S fazında spesifik bir artış gösterdiği belirtilmiştir (Kok ve ark. 1987, Marra ve ark. 1995, Sozzi ve ark. 1996). BRCA1'in biyolojik aktivitesi siklin dependent kinazlarla düzenlenmektedir (Marra ve ark. 1995). Apoptosis'deki rolü tartışılmaktadır (Easton ve ark. 1993). Fareler üzerinde yapılan çalışmalarda, BRCA1 in homozigot delesyonları farenin embriyonik gelişiminin 10 ve 13. günleri arasında nöroepitelium hücrelerinin ölümüne, aşırı çoğalmasına ve nöral tüp defektlerinin oluşumuna yol açmaktadır.

Thompson (1993) p53 ve meme kanseri ilişkisini, p53 geninin sıklıkla sporadik meme kanserinde anormal olmasıyla açıklamıştır. p53 ün tümör süppressör

fonksiyonunun kaybı meme kanserinin oluşumunda % 61 oranında etkili olduğu, mutant p53 ün bir onkogen gibi davranış gösterdiğinde % 15-46 oranında etkili olduğu açıklanmıştır. p53 ün etkisi daha çok zayıf prognoz gösteren invaziv meme kanserlerindedir. p53 genindeki anormallikler genellikle meme kanserlerinin pathogenezinde etkilidir.

Freeman ve ark. (1989) 708 meme kanserli hastadan oluşan çalışma grubunda meme kanserine yakalandıktan sonra beyaz kadınlara oranla yaşam süresinin zenci kadınlarda oldukça düşük olduğunu açıklamıştır.

Tryggvattur ve ark. (1988) 184 familial ve 572 sporadik meme kanserli bireyde yaptıkları çalışmada B kan grubunun familial meme kanserli hastalarda sporadik nedenli meme kanserli hastalara oranla daha fazla görüldüğü ve B kan grubuna ait bireylerin genellikle bilateral meme kanseri olduğunu tespit etmişlerdir. Ailesel meme kanserli hastalarda en az sıklık O kan grubu olarak bulunmuştur.

Ochi ve ark. (1988) 50 meme tümörlü hastanın periferik kan lenfositlerinde kromozomal frajilite çalışmasında frajilitenin 11 sağlıklı kontrol bireye oranla arttığını göstermişlerdir. Folik asit ve tymidine içeren kültür mediumunda gap ve kırık oranları hastalarda 6.02 ± 5.28 iken kontrol bireylerin oranları 2.0 ± 2.0 olarak belirlemiştir.

Hansen-Hagge ve ark. 'nın (1998) gerçekleştirdiği bir çalışmada insandaki 5q33-34 kromozom bölgesinin programlı hücre ölümü veya endositoz yoluyla lizozomal hareket, ribozom alt birimlerin birleşmesi, gen ekspresyonunun regülasyonu gibi önemli görevleri olduğunu vurgulamışlardır.

Garcia-Patino ve ark. (1998) ailesel meme kanserinde predispozisyon geni olarak tanımlanan BRCA1 geninin kolon kanserinde de etkili olduğu düşüncesinin açıklanmasından yola çıkarak 85 tümörde yaptıkları çalışmada 17q21 bölgesinde 7 mikrosatellite lokusundaki heterozigotinin kaybını tespit etmişlerdir. Bu çalışmada 17q21'de lokalize BRCA1 geni ve diğer genlerin kolon kanseri gelişiminde önemli rol oynayabileceği açıklanmıştır.

Valgardsdottir ve ark. (1996) meme kanserli hastalarda moleküler genetik ve sitogenetik çalışmada elde ettikleri bulguları bu iki metodu karşılaştırarak 85 meme kanserli bireye ait tümörler doku kültürü yapılarak değerlendirilmeye almışlardır. Karyotip analizi, fluorescence in situ hybridization ve moleküler analizler sonucu 7q, 16q ve 17.kromozomun her iki kolunda da allelik imbalans tespit edilmiştir.

Ardisia ve ark. (1993) 26 meme kanseri ve 15 sağlıklı kadın bireyin periferik kan lenfositlerinden elde edilen metafaz kromozomlarında aphidicolin ile indüklenen fragil bölge ekspresyonunu araştırmışlardır. Bu çalışmada hem aberasyonlu hücrelerin hem de hücre başına düşen gap ve kırık sayılarının ortalamaları hasta grubunda sağlıklı bireylere oranla anlamlılık göstermiştir ($p<0,001$; $p<0.05$). Bulgular meme kanserli bayan hastalarda genetik insitabilitede artışın olduğunu açıklamaktadır.

Mitchell ve ark. (1993) 9 meme kanserli hasta ve 9 sağlıklı kontrol bireyin periferik kan lenfositlerinin aphidicolin ile indüklenen kültürlerinde fragil bölge ekspresyon farklılıklarını araştırmışlardır. Ailesel meme kanserlerde genetik yatkınlığın belirlenmesinde uygun marker olabileceğini düşünerek gerçekleştirdikleri çalışmada anlamlılık tespit edememişlerdir ($p<0.61$).

Paz-y-mino ve ark. (1997) 20 duktal infiltrative meme kanserli, 20 serviks uterine kanserli ve 40 sağlıklı dişi bireylerden oluşan 80 kişilik çalışma grubunda aphidicolin ile indüklenen kromozomal anomalilerini karşılaştırmışlardır. Kanserde etkisi bilinen kromozom instabilitesi, kromozomlarda oluşan sayısal ve yapısal aberasyonlar değerlendirilerek açıklanmıştır. Meme kanserli hastalarda kontrol grubuna oranla aphidicolin ile indüklenen veya indüklenmeden spontan olarak meydana gelen kromozomal anomalilerinde artma belirlenmiştir ($p<0.001$). Serviks uterine kanserli hastalarda da benzer sonuçlar elde edilmiştir. Frajilitedeki artışın, kanserin ilerlemesinde ve biyolojik işleyişinde önemli rol alabileceği açıklanmıştır.

2.6.6. Korunma.

Günümüzde meme kanserinden korunulmasını sağlayacak kesin öneriler yoktur. Meme ve toraks bölgesine gereksiz radyasyon alınmasından kaçınılması, emzirmenin teşvik edilmesi ve besinlerdeki yağ miktarının azaltılması öneriler arasında yer alabilir. İlk gebelikten önce oral kontraseptiflerin kullanılması ile meme kanseri riskinin arttığı kesin değildir. Bu nedenle, doğum yapmamış kadınlarda oral kontraseptif kullanımının yasaklanması doğru olmaz. Menapozda östrojenlerin tek başına kullanılması ile meme kanseri riski az da olsa artmaktadır. Zaten günümüzdeki ilaçlar içinde östrojen ve progesteron birlikte mevcuttur. Kombine tedavinin zararlı olup olmadığı henüz bilinmediğinden, yararları da göz önüne alınarak kullanımı kısıtlamak şimdilik düşünülmemektedir (Donegan ve Spratt 1995).

Etiyoloji bahsinde evlenmiş ve geç evlenmiş olanlarda erken evlenmişlere göre (25 yaşından önce ilk çocuğunu doğuran kadınlara) meme kanseri insidansının arttığı belirtilmiştir. Bundan anlaşılacağına göre 25 yaşından önce ilk çocuğunu doğuran kadınlarda meme kanseri insidansı düşmektedir.

Meme kanserinden sekonder korunmanın temeli erken tanıyı sağlamaktır. Erken tanı, kişilerin kendini periodik muayene etmesi ve meme kanseri erken bulgularına karşı duyarlı olması ile sağlanabilir. Bunun dışında toplum taramaları fizik muayene ve mamografi ile yapılabilir. Kaynak sağlanabildiğinde özellikle 50-69 yaş grubuna fizik muayene ve mamografi ile tarama yapılması erken tanıda büyük aşama sağlayacaktır. Aile hikayesi pozitif olan bireylerde ise moleküler biyolojik testler ile mutasyon taraması yapılarak sağlıklı risk altındaki bireylerde erken tanı mümkündür.

2.7 Kanser Gelişiminde Genlerin Rolü

Kanser birbirini izleyen genetik değişimlerle oluşan çok aşamalı bir hastalıktır (Knudson 1985; Scrabble ve ark. 1990, Renan 1993). Bu genetik değişimler yıllardır kromozomal anormallikler (translokasyon, delesyon, çok kromozomluluk, inversiyon, amplifikasyon vb.) olarak tanımlanmaktadır. Yeni buluşlar, bu genetik anormalliklerin şans eseri olmadığını ve genetik değişimin (mutasyonun) spesifik genleri etkilediğini ortaya çıkarmıştır. Bu genler genel olarak proto-onkogenler, tümör baskılayıcı genler ve DNA onarım genleri olarak sınıflandırılabilir (Knudson 1985, Friedman ve ark.1988; Sage ve ark.1989). Moleküler genetik tekniklerindeki gelişmeler sayesinde kromozomal yapıda gözlemlenen büyük genetik değişikliklerin, kanser oluşumunda rol alan değişimlerden sadece küçük kısmı olduğu anlaşılmıştır. Genetik mutasyonların büyük kısmı yapısal olarak çok küçük bölgeleri etkiler ve çoğu zaman tümör baskılayıcı genlerin ve proto-onkogenlerin sadece bir bazının değişmesi biçiminde ortaya çıkar. Ancak, bu küçük değişiklikler hücre için bir kromozomu kaybetmek kadar önemli olabilir.

Tümör baskılayıcı genler ve proto-onkogenler hücrenin kaderini (çoğalma, farklılaşma, yaşlanma ve apoptosis/programlı hücre ölümü) belirleyen proteinleri kodlar (Hunter ve Pines 1994). Vücudumuzdaki hücreler, dış dünya ile sürekli iletişim halinde olan bedenimizin gereksinmelerine göre kaderlerini belirlerler. Kanser çoğunlukla dışarıdan gelen ve hücrelerin kaderini belirleyen sinyallere duyarsız hale gelen

hücrelerde ortaya çıkar. Dış etkenlerde devamlı temas halinde bulunan, deri, solunum sistemi ve sindirim sistemi gibi dokularda fiziksel kayıplar yüzünden devamlı hücre yenilenmesi gerekmektedir. Bu nedenle, deri, akciğer, mide ve bağırsak kanserleri en yaygın kanserlerdendir. Meme gibi bazı dokular ise hormonların etkisiyle periyodik olarak yenilenir. Kanser bu tip dokularda da çok yaygındır. Virütik enfeksiyonlara maruz kalan ve zararlı kimyasal maddelerin biriktiği ve işlendiği karaciğer gibi bazı dokularda da kronik hücre yenilenmesi ve sonuç olarak kanser ortaya çıkar. Son olarak, normal DNA tamiri işleminden kaçan ve yaşlanmayla orantılı olarak artan mutasyonlarla da oluşabilir.

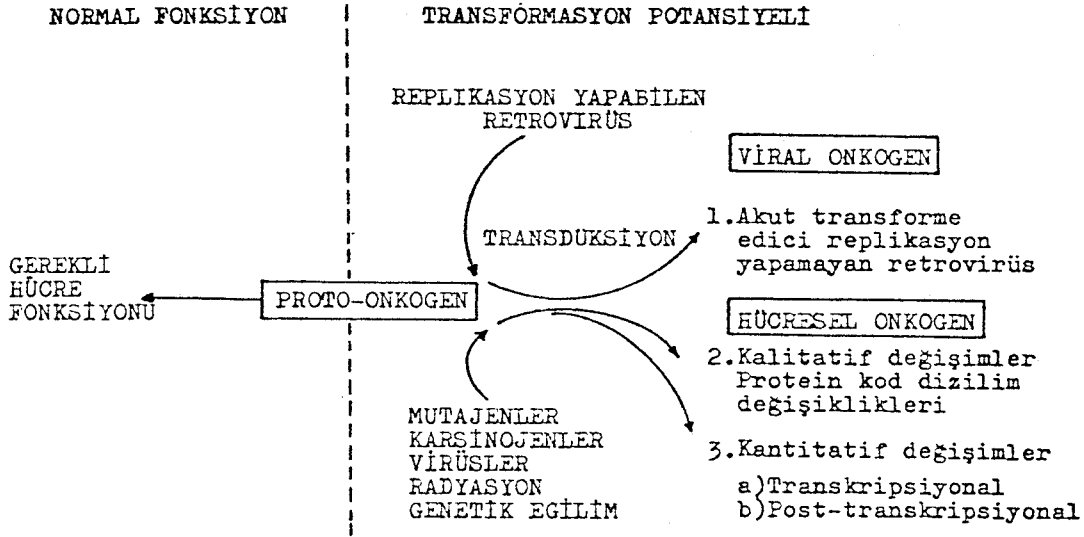
Moleküler genetikteki yenilikler bazı proteinleri hemen hemen bütün kanser tipleriyle ilişkilendirmiştir (ailesel, virüslerden dolayı oluşan, karsinojenlerin yol açtığı ve yaşlılıktan dolayı oluşan kanserler). Bu proteinlere en iyi örnek p53 proteindir. Bu protein doğrudan kanser yapan virüslerin proteinleriyle birleşerek (örneğin tip 16 ve 18 papilloma virüsünün E6 proteini), bazı karsinojenlerin oluşturduğu mutasyonlarla (örneğin morötesi ışığın oluşturduğu CC->TT mutasyonları) ve DNA'da zamanla biriken G->A değişimi gibi mutasyonlarla işlevini kaybedebilir. (Soussi 1990, Srivastava ve ark. 1990, Bressac ve ark 1991, Levine ve ark.1991, Ullrich ve Malkin 1992, Greenblatt ve ark. 1994) Onkogenler tarafından kodlanan proteinler genelde olmaları gerekenden daha aktif durumdadırlar. Bunun aksine tümör baskılayıcı genlerin proteinleri, normal formlarından daha az aktif veya tamamen inaktif durumdadırlar. Genellikle herhangi bir kanser hücresinde bir çok proto-onkogende ve tümör baskılayıcı gende mutasyon ortaya çıkar. Bu demektir ki tek bir mutasyon normal bir hücrenin kanserli bir tümöre dönüşmesi için yeterli değildir.

2.7.1 Onkogenler

Yıllardan beri mutasyon olarak bilinen bir hücre hasarı, karsinogenezis ya da onkogenezis olarak tanımlanan kanser prosesine yol açan değişmelerle ilgilidir. Fakat bugün kanserde genlerin nasıl değiştiği hakkındaki bilgiler, araştırmacıların retrovirüs adı verilen virüsleri bulmalarından sonra şekillenmeye başlamıştır. Bir insan DNA'sı yüzbine varan gen içermesine karşın retrovisler yalnızca on kadar gen içerir. Retrovirüs bir hücreyi enfekte ettiğinde bu az sayıdaki genlerden birinin ürünü olan "revers transkriptaz" enzimiyle RNA formundaki genetik materyalini DNA'ya dönüştürür. Bu,

DNA → RNA → protein şeklindeki bildiğimiz genetik bilgi akış yönünün tam tersi bir olaydır. Bundan dolayı bu virüslere geriye doğru anlamında “retro” adı verilmiştir. Daha sonra virüs, kendi DNA’sını hücre DNA’sına sokar. Vücudun bağışıklık sisteminden bu şekilde gizlenen viral genler, kendilerini yeni virüs olarak şekillendirecek olan viral proteinleri oluşturmak üzere hücreyi yönlendirir.

1911 yılında Peyton Rous isimli Amerikalı bilim adamı, tümör tipi bilinen bir civcivden sağlıklı bir civcive aktarıldığında benzer tümörün gelişimine neden olan bir etkeni açıkladı. Sonraki çalışmalar bu etkenin bir retrovirüs olduğu bu v-src denilen spesifik genin, tümör oluşumundan sorumlu olduğunu göstermiştir. Daha sonraki araştırmalar, laboratuarda çoğaltılmış hücreleri transforme ederek hızlı ve kontrolsüz şekilde çoğaltan pek çok retrovirüsü ortaya çıkarmıştır. Bilim adamları retrovirüslerde bulunan ve normal hücreleri, kanser hücrelerine dönüştürebilen bu genleri “ONKOGEN” olarak tanımlamışlardır. Öne sürülen teoriye göre kısaca v-onc olarak bilinen retroviral onkogenler normalde sessiz durumdadır. Ancak belirli faktörler hücreyi etkilediğinde onkogenler aktifleşmektedir. Bir RNA tümör virüsü esas olarak üç gen bölgesinden meydana gelmiştir. Bu genler gag, pol ve env gen bölgeleridir. Bu genlerden gag virüsün süruktürel proteinlerini, pol geni revers transkriptaz enzimini, env geni ise virüsün zarf proteinlerini kodlar. Kanser yapıcı retrovirüsler bu genlere ilaveten ökaryot genlerini de içerebilir. Retrovirüs içerisine entegre olan ve virüsün transformasyon özelliğinden sorumlu olan bu genlere transforming genler yada viral onkogenler adı verilir. Yani viral onkogenler hayvan yada insan hücrelerindeki hücresel genlerin (proto-onkogenler) virüs genomuna entegre olmuş şekilleridir (Stehlin ve ark.1976). Bu genlerin viral çoğalma yönünden virüse hiçbir katkısı yoktur hatta viral çoğalmayı negatif yönde etkilemektedir. Hücresel gene sahip bir retrovirüs DNA’sının hücre kromozomu içerisine entegre olması ile birlikte bu hücresel proto-onkogenler eksprese olarak aktif kanser genleri olan onkogenler haline dönüşebilmektedirler (Şekil 2.8).



Şekil 2.8: Proto-onkogenen onkogene geçiş (Huber 1989).

Hücrel proto-onkogenler ökaryot genomunda bulunan hücre büyümesi ve bölünmesini pozitif yönde etkileyen kısaca c-onc olarak adlandırılan genler olarak tanımlanır. Bu genlerde gerek fiziksel gerekse kimyasal ajanlar tarafından meydana getirilen nokta mutasyonları, gen rearregementleri ve delesyon olayları bu genlerin aktif kanser genleri olan onkogenler haline dönüşmesine sebep olmaktadır. Bu genlerde meydana gelen nokta mutasyonlar ve rearregement olayları sinyal iletiminin bozulmasına sebep olarak insanlarda muhtelif kanserlerin gelişimine yol açmaktadır (Çizelge 2.1).

Gerek proto-onkogenler gerekse onların mutasyona uğramış şekli olan onkogenler hücre büyümesi, bölünmesi ve farklılaşmasını pozitif yönde etkileyen genlerdir ve bu genlerin bazıları Çizelge 2.2’de gösterilmiştir.

Çizelge 2.1. : Bazı Proto-onkogenler (Kurzrock 1995).

Proto-onkogen	Neoplasm	Lezyon	Defekt
abl	Kronik myeloit lösemi	Translokasyon,t(9;22)	Fosforilasyon
alk	Anaplastik large- cell lösemi	Translokasyon,t(2;5)	Fosforilasyon
aml-1	Akut myeloit lösemi	Translokasyon,t(8;21)	Transkripsiyon
bcl-1	B-cell lenfoma	Translokasyon,t(11;14)	?
bcl-2	B-cell lenfoma	Translokasyon,t(14;18)	Apoptozis
bcl-3	Kronik lenfositik lösemi	Translokasyon,t(14;19)	Transkripsiyon
c-erbB-1	Squamous hücre karsinoması;astrocytoma	Amplifikasyon	Fosforilasyon
c-erbB-2	Meme, ovaryum, mide adenokarsinoma	Amplifikasyon	Fosforilasyon
evi-1	Akut myeloit lösemi	Rearrangement,inv(3)	Transkripsiyon
lck	Kolon karsinoması	?	Fosforilasyon
lyl-1	Akut lymfoblastik lösemi	Translokasyon,t(7;19)	Transkripsiyon
lyt-10	B-cell lenfoma	Translokasyon,t(10;14)	Fosforilasyon
myc	Burkitt lenfoması	Translokasyon,t(2;8)	Transkripsiyon
		t(8;14)	Transkripsiyon
		t(8;22)	Transkripsiyon
	Akciğer, meme ve serviks karsinoması	Amplifikasyon	Transkripsiyon
L-myc	Akciğer karsinoması	Amplifikasyon	Transkripsiyon
N-myc	Nöroblastom,küçük hücreli akciğerkarseri	Amplifikasyon	Transkripsiyon
pebp2b	Akut lymfoblastik lösemi	Rearrangement,inv(16)	Transkripsiyon
pml	Akut promyelositik lösemi	Translokasyon,t(15;17)	Transkripsiyon
H-ras	Kolon, akciğer ve pankreas karsinomu, melanoma	Nokta mutasyonu	G-proteini
K-ras	Akut myeloit ve lymfoblastik lösemi, tiroid karsinoması, melanoma	Nokta mutasyonu	G-proteini
N-ras	Tiroid,genital üriner karsinoma,melanoma	Nokta mutasyonu	G-proteini
ret	Tiroid karsinoması	Rearrangement	Fosforilasyon
K-sam	Mide karsinoması	Amplifikasyon	Fosforilasyon
sis	Astrocytoma	?	Fosforilasyon
src	Kolon karsinoması	?	Fosforilasyon
tel	Kronik myelomonositik lösemi	Translokasyon	Fosforilasyon
tal-1	Akut lymfoblastik lösemi	Translokasyon	Transkripsiyon
trk	Tiroid karsinoması	Rearrangement	Fosforilasyon

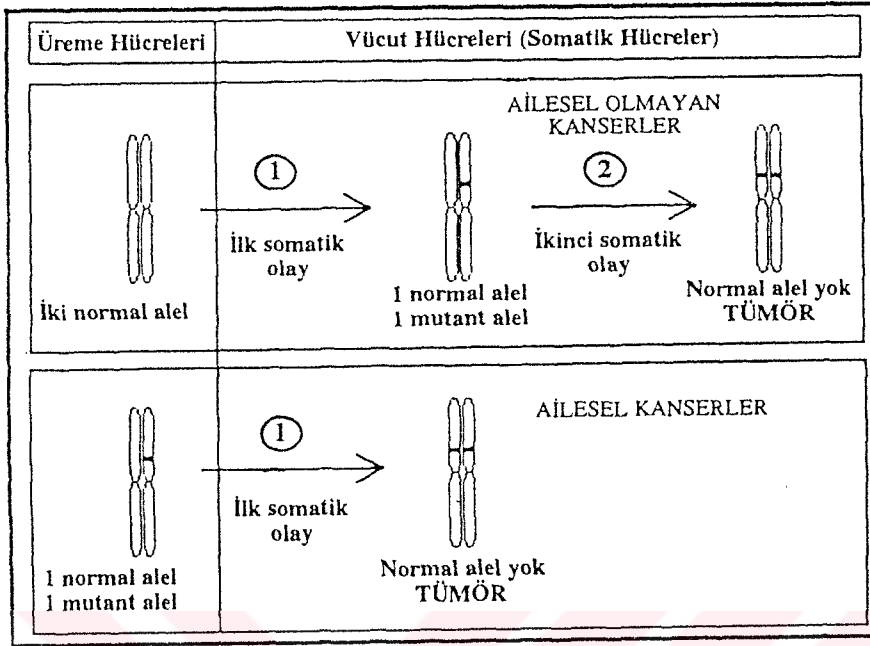
Çizelge 2.2. : Bazı Onkogenler (Kurzrock 1995).

Onkogen	Virüs	Onkogen ürünü
sis	Simian sarkoma virüsü	Büyüme faktörü
erbB	Avian eritroblastosis virüsü	Protein-tirozin kinaz
fms	SM feline sarkoma virüsü	
kit	HZ-4 feline sarkoma virüsü	
sea	Avian sarkoma virüsü(S13)	
ros	Avian sarkoma virüsü(UR2)	
src	Rous sarkoma virüsü(RSV)	
yes	Avian sarkoma virüsü(Y73)	
fgr	GR feline sarkoma virüsü	
fps	Fujinami sarkoma virüsü(FuSV)	
abl	Abelson murin lösemi virüsü	
crk	Avian sarkoma virüsü(CT10)	Adaptör
cbl	Murin Cas NS-I virüsü	
mos	Moloney murine sarkoma virüs	Protein serin/threonin kinaz
raf	3611 Murine sarkoma virüsü	
akt	Akt-8 murine lösemi virüsü	
H-ras	Harvey sarkoma virüsü	G-protein
K-ras	Kirsten sarkoma virüsü	
myc	Avian myelositomatozis virüsü (MC29)	Nüklear protein
myb	Avian myeloblastozis virüsü	
fos	FBJ murine sarkoma virüsü	
jun	Avian sarkoma virüsü (S17)	
ski	Avian karsinoma virüsü (SKV-770)	
qin	Avian sarkoma virüsü (S31)	
rel	Retikoloendoteliozis virüsü	
erbA	Avian eritroblastozis virüsü	
ets	E-26 avian myeloblastozis virüsü	

2.7.2 Tümör Baskılayıcı Genler

Tümör baskılayıcı genler ilk olarak kanserli bir hücreyi normal hücreye dönüştürebilecek genler olarak tanımlandı. Bu tanımlamaya göre tümör baskılayıcı genler, ya kromozomal delesyonlarla kaybedilmiş ya da daha küçük ölçekli mutasyonlarla (küçük delesyonlar, küçük insertionlar veya nokta mutasyonları) aktivitesini kaybetmiş genlerdir. (Sager, 1989). Bir tümör baskılayıcı genin inaktive olması genin bir alelindeki (genin iki kopyasından biri) bir mutasyonla başlar. Tamamen inaktive olması için diğer alelin de kaybolması gerekir (ikinci alelde mutasyon veya daha sıklıkla kromozom kaybı). Şekil 2.9 'da da gösterildiği gibi eğer

kanser kalıtsal değilse, iki alleldeki iki mutasyon somatik olarak (somatik hücrelerde ve genellikle doğumdan sonra) oluşur.



Şekil 2.9: Ailesel ve ailesel olmayan (sporadik) meme kanserlerinin oluşum mekanizması.

Ailesel olmayan kanserler, tüm kanserlerin büyük bir çoğunluğunu oluşturur (>85%). Tüm kanserlerin % 5-15'inin ise kalıtımla yeni kuşaklara geçtiği düşünülmektedir ve bu kanserler 'ailesel kanser' olarak tanımlanmaktadır. (Knudson 1985, Goldgar ve ark. 1994, Offit ve Brown 1994) Ailesel kanserlerde, bir tümör baskılayıcı genin inaktivasyonunun ilk basamağı, ailenin eski nesil bireylerinden birinin üreme hücrelerinde (sperm veya yumurta) meydana gelir. Bu mutasyon üreme hücresi vasıtası ile sonraki nesillerin % 50'sine geçer (eğer mutasyon yeni oluşmuşsa, kanser kalıtsal olur fakat klinik olarak ailesel olmaz). Kalıtsal kanserlerde tümör baskılayıcı gen inaktivasyonu doğmadan önce başladığı için tek bir olay (ikinci alelin inaktivasyonu) tümör baskılayıcı genin işlevini yok etmek için yeterlidir. Aynı hücrede iki alelin birden inaktive olması ihtimalinin bir alelden az olması kanser ailelerinde bireylerin kanser riskinin fazla olmasını açıklar. Ama kanser oluşumu için birden çok gende mutasyon olması gerektiği unutulmamalıdır. Bir başka deyişle, kalıtsal olarak herhangi bir genin bir alelinin inaktive olması kanser oluşumu için sadece küçük bir adımdır ve başka mutasyonlar da olması gerekmektedir (tümör baskılayıcı genin ikinci

alelinin de inaktive olması, başka tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu ve proto-onkogenlerin aktivasyonu).

2.7.2.2 İnsan Kanserlerinde Tümör Baskılayıcı Genler

İlk tümör baskılayıcı genin (Rb1, Retinoblastoma) ortaya konmasından bu güne kadar yirmiye yakın tümör baskılayıcı gen bulunmuştur. Çizelge 2.3’de bilinen tümör baskılayıcı genler özetlenmiştir. Çizelgede de görüldüğü gibi tümör baskılayıcı gen mutasyonları hem kalıtsal hem de kalıtsal olmayan kanserlerde görülebilmektedir. Onkogenler ise genellikle yalnızca kalıtsal olmayan kanserlerde rol almaktadır (kalıtsal mutasyonu kansere yol açtığı bilinen tek gen ret onkogenidir). Birçok tümör baskılayıcı gen, ailesel kanser bireylerinin genomik DNA’larının araştırılmasıyla bulunmuştur. Bunların birkaç tanesinin (BRCA1, MLH1, MSH2) şu ana kadar sadece kalıtsal mutasyonlar sergilediği görülmüştür. Bu genlerin büyük bir çoğunluğu (p53, Rb1, APC, BRCA2) iki tip kanserde de etkindir.

Çizelge 2.3. : Tümör Baskılayıcı Genler (Kurzrock 1995).

Tümör baskılayıcı genler	Kromozomal lokus	Neoplasm
Rb1	13q14	Retinoblastom, osteosarkom, meme, mesane ve akciğer
p53	17p12-13.3	Beyin tümörleri, meme, kolon ve akciğer karsinoması, osteosarkom
WT1	11p13	Wilm’s tümörü
DCC	18q21	Kolon karsinoması
NF-1	17q11.2	Nörofibromatozis tip I, nöroblastoma, glioma, meningioma
NF-2	22q12	Nörofibromatozis tip II
APC ve MCC	5q21-22	Kolon karsinoması
MEN-1	11q13	Paratiroid, pankreas, tükrük bezi ve adrenal korteks tümörleri
MEN-2	10q11	Papiller tiroid karsinoma
BRCA1	17q21	Meme ve ovaryum kanseri
BRCA2	13q12-13	Meme ve ovaryum kanseri
FHIT	3p14.2	Akciğer, kolon, meme, pankreas kanseri
RCC	3p14.2	Böbrek tümörleri
p73	1p36	Beyin tümörleri
PTEN	10q23	Glioblastoma, endometrium, prostat, melanoma, renal kanserler
VHL	3p25-26	Von Hippel Lindau Sendromu

İnsan kanserlerindeki rolü en iyi tanımlanmış tümör baskılayıcı gen p53’tür. (Greenblatt ve ark. 1994). P53 geni tarafından kodlanan protein ilk olarak 1979 yılında

kemirgen hayvanlarda SV40 virüsünün transforme edici bir proteininin (Large T antigen) hedefi olarak bulunmuştur. (Soussi ve ark. 1990). Bu genin insan kanserlerindeki rolü 1989 yılında. B. Vogelstein'in laboratuvarında kolon kanserinde bulunan mutasyonlarıyla açığa çıkmıştır. Geride bıraktığımız yıllar süresince yüzlerce çalışma p53 geninin insan kanserlerinde en çok mutasyona uğrayan gen olduğunu ortaya çıkarmıştır. (Greenblatt ve ark.1994). Çizelge 2.4'de de gösterildiği gibi bu gen birçok değişik kanser türünde mutasyona uğramaktadır. p53 mutasyonları çoğunlukla p53 proteininin orta kısmını kodlayan ekzonlarda olmaktadır. p53 bir transkripsiyon faktörüdür; orta bölgesi, bu proteinin spesifik olarak DNA'ya bağlanmasını ve hedef genlerinin aktivasyonunu sağlamaktadır. (Levine ve ark.1991,Ullrich ve ark.1992). p53 proteininin genomik DNA'nın değişmeden saklanmasıdaki rolü çok önemlidir. Hücreler genotoksik stres altına girerse p53 proteininin miktarı hücre çekirdeğinde artar. Bu artış, p53 proteininin hedef genleri olan mdm-2, p21WAF1/CIP1,GADD45 ve bax gibi genlerin transkripsiyonunun artmasına yol açar. P21 WAF1/CIP1 geninin kodladığı protein, siklin-bağımlı kinazları (cdk) inhibe ederek hücre döngüsünü G1/S evresinde durdurur (Hunter ve Pines 1994). GADD45 geninin kodladığı protein DNA tamirinde rol alır. p53 proteininin birçok hücrede, özellikle proto-onkogenlerin aktive olduğu durumlarda programlı hücre ölümüne (Apoptosis'e) neden olduğu bilinmektedir. Bu mekanizmada bax/bcl-2 yolunun izlendiği gösterilmiştir. p53 tarafından aktive edilen bax geni, bcl-2 genini inaktive ederek apoptosis başlatır. (Zhan ve ark. 1994). p53 proteininin, DNA'sı zarar görmüş hücrelerin çoğalma döngüsünü durdurarak DNA tamirine fırsat yarattığı düşünülmektedir. Apoptosis'in indüklenmesi ise DNA'yı tamir edememiş hücrelerin yok edilmesi açısından çok önemlidir. P53 genindeki mutasyonlar p53 proteininin görevini yapamamasına ve DNA'daki hedeflerine bağlanamamasına yol açar (Greenblatt ve ark. 1994). p53 mutasyonları SSCP ve DNA dizi analizi yöntemleriyle doğrudan incelenebilir. Genel olarak p53 mutasyonları yarı ömrü daha uzun olan mutant p53 proteininin oluşmasına neden olur.

Yaygın kanserlerde (kolon, akciğer, meme ve mesane kanserleri vb.) yapılan birçok çalışma, p53 mutasyonunun bu tip kanserlerde kötü bir prognostik gösterge olduğunu göstermiştir. (Greenblatt ve ark. 1994, Thor ve ark. 1992, Saitoh ve ark. 1994, Esrig ve ark. 1994). Bu nedenle p53'ün birçok tümör tipi için çok iyi bir tümör göstergesi olduğu düşünülmektedir. Germinal hücrelerdeki p53 mutasyonları, Li-

Fraumeni sendromu diye bilinen ve kansere yatkınlık gösteren bireylerde ve glioma hastalarının bir kısmında görülür (Srivastava ve ark. 1990, Santibanez-Koref ve ark.1991, Malkin ve ark. 1992, Sameshima ve ark.1992, Kyritsis ve ark. 1994). Sarkoma, adrenokortikal karsinoma, beyin ve meme kanserli bireylerim oluşturduğu Li-Fraumeni sendromlu ailelerde daha hiçbir kanser belirtisi olmadan germlinal p53 mutasyonları gösterilmiştir (Birch 1992, Eeles 1993, Malkin 1994).

Çizelge 2.4: İnsan Kanserlerinde p53 mutasyon oranı (Greenblatt ve ark. 1994)

Kanser	p53 mutasyon oranı (%)
Bütün tümörlerde	37
Akciğer	56
Barsak	50
Özofagus	45
Over	44
Pankreas	44
Deri	44
Mide	41
Baş ve boyun	37
Mesane	34
Sarkoma	31
Prostat	30
Karaciğer	29
Beyin	25
Adrenal	23
Meme	22
Endometrium	22
Mezotelyoma	22
Böbrek	19
Tiroid	13
Hematolojik	12
Karsinoid	11
Melanoma	9
Paratiroid	8
Rahim	7
Nöroblastoma	1
Wilms tümörü	0

Retinoblastoma geni, 1986 yılında çocuklarda ender olarak görülen ailesel retinoblastoma hastalığında belirlenmiştir. (Friend ve ark. 1986, Lee ve ark. 1987, Friend ve ark. 1988, Yandel ve ark. 1989, Sager1989, Haber ve Hausman 1991, Blanquet ve ark. 1991). Bu gen aynı zamanda somatik olarak ailesel olmayan retinoblastoma, akciğer, meme, karaciğer, prostat ve mesane kanserlerinde mutasyona uğramaktadır (Harbour ve ark. 1988, Lee ve ark. 1988, Xu ve ark. 1989, Reissmann ve ark. 1989, Bookstein ve ark. 1990, Horowitz ve ark. 1990, Cordon-Cardo ve ark.1992, Zhang ve ark. 1994). Rb1 geninin inaktivasyonu birçok moleküler biyoloji tekniğiyle (gen içindeki mikrosatelitlerde heterozigotluk kaybı taramasıyla, SSCP, DNA dizi analizi yolu ile) gösterilebilir. Rb1 geni 100 000 bazdan çok DNA bölgesini işgal

etmekte ve 105 kilodalton'luk bir protein kodlanmaktadır. Bu protein hücre döngüsünü olumsuz yönde denetlemekte ve hücre döngüsünün G1 evresinde S evresine geçmesini sağlayan E2F proteinini nötralize etmektedir. Rb1 genindeki mutasyonlar genellikle daha kısa proteinler oluşmasına yol açmakta ve p53'ün aksine immünolojik tekniklerle mutasyon arandığında negatif sonuç Rb1 proteininin inaktifliğini ve yokluğunu göstermektedir.

APC, DCC, MCC, MSH2, MLH1, p53 gibi birkaç gen kolorektal kanserlerde rol almaktadır. (Joslyn ve ark.1991, Groden ve ark. 1991, Kinzler ve ark. 1991, Nishisho ve ark. 1991, Miyoshi ve ark. 1992, Powell ve ark 1993, Liu ve ark. 1994, Nicolaides ve ark. 1994, Nagase ve ark. 1992, Service 1994, Papadopoulos ve ark. 1994, Jirincy 1994). DCC ve MCC genleri kolorektal kanserde geç ve somatik mutasyona uğradıkları için onlar hakkındaki bilgiler sınırlıdır. APC geni ailesel bir sendroma (adenomatous polyposis coli) neden olduğu için bulunmuştur. APC geni büyük bir protein kodlar. Kolorektal kanserde APC geninin hem somatik hem de germinal mutasyonları bulunmuştur Mutasyonlar APC geninin her tarafında görülseler de , tüm mutasyonların yüzde 65'i ekzon 15'in 5' yarısındadır. (Miyoshi ve ark. 1992). Bu mutasyonların büyük çoğunluğu normalden kısa proteinler oluşmasına neden olmaktadır. APC geni mide kanseri ve pankreas kanserinde somatik mutasyona uğramaktadır.

2.7.2.2 Onkogen ve Tümör Baskılayıcı Genlerin Tıp Araştırmalarında

Kullanılması

Kanser araştırmalarında moleküler biyoloji uygulamaları, bu genlerin karsinogenezisteki rollerinin anlaşılmasını sağlamıştır. Şüphesiz bu araştırmaların asıl hedeflerinden birisi, milyonlarca kanser hastasının bu bulgulardan yararlanabilmesidir. Çünkü tümörde onkogen ve tümör süpressör gen ile değişikliklerinin belirlenmesi tanı, tahmin ve izlenecek tedavi yöntemi için yararlı olabilecektir. Böylece immünohisto kimyasal teknikler kadar, tümörlerin DNA veya RNA'sını kapsayan moleküler hibridizasyon teknikleri, onkogen ve tümör süpressör genlerdeki ya da onların ürünlerindeki nicelik ve nitelik değişimleri kanser tanısında kullanılabilecektir.

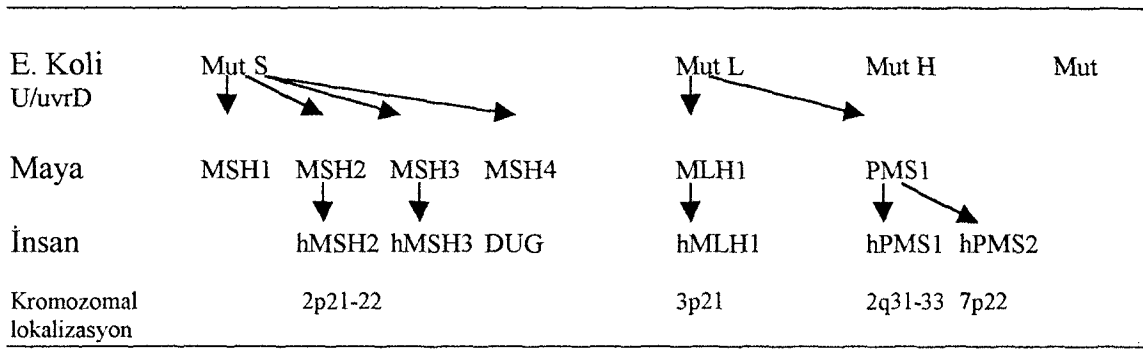
Onkogen ürünlerine özgü işaretli monoklonal antikorların kullanılması, tümörlerin bulunduğu yerlerin belirlenmesinde bir araç olmaktadır. Bu da kanser tanısında rol oynayabilir. Familial poliposis koli gibi bir malignansi gelişim riski

taşıyan kişilerden ve buna benzer Retinoblastoma ve Wilms tümörleri için resesif genlerden DNA problemleri oluşturularak kalıtsal eğilim taraması yapılabilir.

Yine onkogen ve tümör süpresör genlerdeki değişiklikler, hastalık prognozunda kullanılabilir. Nitekim göğüs kanserinde ras onkogeninin, servikal veya meme kanserinde myc onkogeninin ya da meme kanserinde bir erb B onkogen homoluğu olan EGF reseptörünün aşırı ekspresyonu ile hastalık arasında zayıf da olsa prognostik korelasyon olduğu gösterilmiştir. Benzer şekilde nöroblastomada N-myc'nin amplifikasyonu, myelodisplazi'de K-ras mutasyonları ve akut lenfoid lösemilerde abl onkogenini içeren Philadelphia kromozom translokasyonları zayıf bir prognostik korelasyon oluşturmaktadır.

2.7.3 DNA Tamir Genleri (Mismatch Repair Genleri)

DNA tamir genleri kanser oluşumundan sorumlu üçüncü ve en yeni gen sınıfını oluşturmaktadır. Bu gen sınıfında herediter kolon kanserli kişiler ve ailelerinde gerçekleştirilen moleküler genetik çalışmalarda muhtelif mutasyonlar olduğu ortaya çıkarılmıştır. Tıpkı tümör süpresör genlerde olduğu gibi bu genlerde heterozigotinin kaybı kolon kanserlerinin oluşumunu sağlamaktadır. Bu genlerde meydana gelen germline mutasyonlar, diğer genlerde mutasyonlara yatkınlığı doğurmakta ve bunun sonucu gerek proto-onkogenler gerekse tümör süpresör genlerdeki mutasyon insidansını arttırmaktadır. Bu mekanizma mutator fenotip olarak adlandırılmakta ve günümüzde bu mekanizmanın familial kanserlere sebep olduğuna inanılmaktadır (Marra ve Boland 1995). Bugüne kadar gerçekleştirilen moleküler genetik çalışmalarda E. coli'de mut S, mut L, mut H, mayalarda MSH1, MSH2, MSH3, MSH4, MLH1 ve PMS1, insanlarda hMSH2, hMSH3, DUG, hMLH1, hPMS1 ve hPMS2 gibi DNA tamir genleri belirlenmiştir. Şekil 2.10'da bu genler ve insan kromozomlarındaki lokalizasyonları gösterilmiştir.



Şekil 2.10: DNA Tamir Genleri.

Yeni bir gen ailesinin (başlıca MSH2 ve MLH1) mutasyonları ailesel non-polyposis kolorektal kanserinde (HNPCC) bulunmuştur. Bu genlerin tamamı bakteri ve mayadaki DNA bazlarının uyuşmazlıkları tamir eden proteinlerin insandaki homologlarını kodlamaktadır. MSH2 mutasyonları HNPCC hastalarında % 50 oranında ve MLH1 mutasyonları da %30 oranında gözlenmektedir. Bu genlerdeki mutasyonlar DNA'daki tekrar eden ünitelerin sayısında belirsizlik yaratmakta ve mutasyon yaratan (mutator) fenotipini oluşturmaktadır. Bu tip belirsizlikler aynı bireyin tümöründen ve normal dokusundan alınan örneklerin mikrosatelitler açısından incelenmesiyle ortaya çıkabilir. Ailesel kolon kanseri tüm kolon kanserlerinin % 15 kadarını oluşturduğu için bu genler risk analizi ve erken tanı açısından gitgide önem kazanmaktadır.

1998 yılında gerçekleştirilen bir çalışmada küçük hücre dışı akciğer kanserli hastalarda hMLH1 ve hPMS3 genlerinde defekt olduğu belirlenerek kolon kanserlerinden sonra ailesel akciğer kanserlerinin oluşumunda da DNA tamir genlerinin rolü olduğu gösterilmiştir (Benachenhau ve ark. 1998).

2.8 Frajil Bölgeler

2.8.1 Frajil Bölgelerin Tanımı

Kromozomlardaki frajil bölgeler sıklıkla oluşan gap, kırık ve rearrangement adı verilen değişmelerle açıklanır (Sutherland ve Hecht 1985). Frajil bölge terimi, F. Hecht'in 1969 yılında aynı ailedeki bireylerde 16. Kromozom üzerinde tespit ettiği frajilite ile ortaya atılmıştır. Periferik kan lenfosit kültürlerinde C grubuna ait bir kromozomun uzun kolunda yüksek sayıda lezyonlar açıklanmıştır. 9. kromozom üzerinde olduğu varsayılan kırılmaya eğilimli bölge zayıf bölge olarak tanımlanmıştır.

1968'de Lejeune 2. Kromozomun uzun kolunda frajil bölge bulan ilk kişidir. (Lejeune ve ark. 1968). Bir yıl sonra, Lubs (1969) X kromozomunun uzun kolunun telomerinde frajil bölge belirlemiştir. X kromozomundaki frajilite çoğunlukla erkek bireylerde görülmüş ve mental retardasyon ile karakterize olduğu tespit edilmiştir. 10 yıl sonra X kromozomundaki frajilitenin X' e bağlı zihin özürlü hastalarda varlığı kesinleşmiştir (Giraud ve ark. 1976, Harvey ve ark. 1977). Bugün ise X kromozomunda frajilitenin varlığı bize mental retardasyon ile karakterize olan fragile X veya Martin Bell sendromunu açıklamaktadır.

Lubs ve Samuelson (1967) Obe ve Luers (1972) ve Ferguson-Smith (1973)'in çalışmaları; spontan olarak oluşan kromozom kırıklarının insan kromozomları üzerinde düzensiz yerleştiklerini göstermiştir. Bu çalışmalardan sonra kromozomal frajilite konusundaki sitogenetik çalışmalar artmıştır. (Aula ve Von Koskull 1976, Ayme ve ark. 1976, Giraud ve ark. 1976). 1977'de Sutherland kullanılan doku kültürü mediumuna bağlı olarak frajil bölgelerin ekspresyonunda önemli değişiklik olduğunu saptamıştır. Eğer medium az miktarda folik asit ve timidin (medium TC 199) içerirse Frajil bölge ekspresyonunun arttığı gözlenmiştir. Sutherland 1979'da Frajil bölgelerin özelliklerini açıklamıştır. Buna göre bu bölgeler:

- Genellikle iki kromotidi de içerebilen değişken büyüklükteki boyanmayan gap bölgeleridir.

- Kromozom üzerinde sıklıkla aynı noktalarda görülürler.

- Mendel kurallarına uyan Dominant kalıtım gösterirler.

Frajilite asentrik fragmanların, kromozomal delesyonların, trifadial figürlerin, vs. varlığını gösterirler.

Kısaca özetlemek gerekirse, Frajil bölgeler herbiri kendine özgü kültür koşullarında karakterize edilen çeşitli sınıflara ayrılırlar (Sutherland 1979, Cheres ve Hustinx 1980, Schmid ve ark. 1980, Sutherland ve ark. 1980, Guichaova ve ark. 1982, Sutherland 1982, Sutherland ve ark. 1983). Günümüzde 100'den fazla frajil bölge bilinmektedir (Hecht ve ark. 1990). Bu bölgelerin bir kısmı çok az görülebilen tipten (rare fragile sites), diğerleri ise hemen hemen tüm insanlarda görülebilen (common fragile sites) tiptendir. (Luthardt 1982, Markkanen ve ark. 1982, Barbi ve ark. 1984, De la Chapelle and Berger 1983; Smeets ve ark. 1984, Yunis and Soreng 1984).

Frajil bölgelerin bir kısmının malignansilerin oluşumu ve gelişiminde önemli olduğu düşünülmektedir. Buna ek olarak, frajil bölgeler kromozomlarda değişimler oluşurken hot spots özelliğe sahiptir. Son olarak, bu bölgeler gen lokalizasyonunda ve bağlantı çalışmalarında uygun markerlar olarak nitelendirilebilirler.

2.8.2 Frajil Bölgelerin Sınıflandırılması

Frajil bölgelerin sınıflandırılması oldukça tartışmalı bir konudur (Sutherland ve Hecht 1985, Hecht 1986, Hecht ve ark 1990). Frajil bölgeler common ve rare olmak üzere iki tipte incelenmiştir. Common tip frajil bölgeler toplumda oldukça sık ekspresyon olur (Populasyonun % 50 sinden fazlasında görülür). Rare frajil bölgelerin toplumdaki ekspresyon sıklığı ise % 1-50 arasındadır. Rare frajil bölgeler folic asid sensitive, distamycin A inducible ve BrdU ihtiyacına göre sınıflandırılırken, common frajil bölgeler aphidicolin, 5 azacytidine ve BrdU muhteviyatına göre sınıflandırılır. 1990 yılında Human Gene Mapping konferansında listelenen 113 frajil bölgenin genlerdeki lokalizasyonları ve kabul edilen sembolleri belirtilmiştir (Çizelge 2.5).

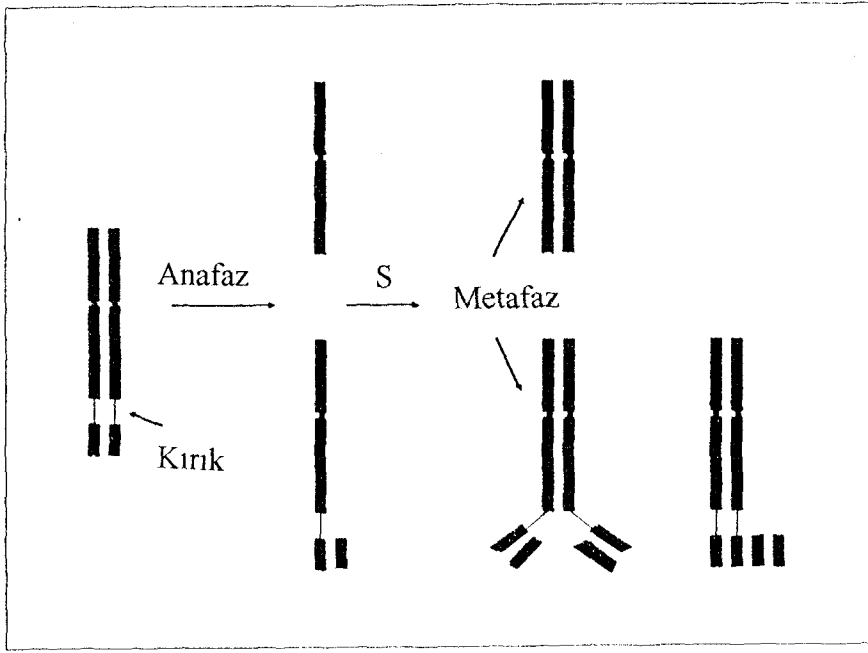
Bazı rare distamycin A-inducible frajil bölgelerin aynı zamanda BrdU indüksiyonuna hassas oldukları açıklanmıştır (Crocini 1983, Sutherland ve ark. 1984). Aphidicolin ile indüklenen common frajil bölgelerinde methotrexate, FUDR, BrdU ve caffeine ile indüklenemediği gösterilmiştir (Barbi ve ark. 1984, Daniel ve ark. 1984, Yunis ve Soreng 1984, Rao ve ark.1988, Fundia ve Larriba 1989). Her iki gruptaki frajil bölgelerin moleküler seviyede yapısal benzerlikler göstermektedir (Hecht ve ark. 1988).

2.8.3 Frajil Bölgelerin Oluşum Şekilleri

Mikroskobik düzeyde frajil bölgeler genel olarak kromatid veya kromozom kırıkları şeklinde görülürler. Ek olarak delesyona uğramış kromozomlar ve asentrik fragmanlar gibi kromozomlara ait kırıklardan oluşabilirler. Triradial figürler ise selektif endoreduplikasyondan meydana gelir (Lejeune ve ark. 1968). 1973 te Ferguson Smith bu triradial oluşumların frajil bölgelerdeki kırılmalar sonucunda non-disjunction sırasında meydana geldiğini açıklamıştır (Şekil 2.11).

Çizelge 2.5. : HGM10'da kabul edilen frajil bölgelerin kromozom lokalizasyonları (Hecht ve ark. 1990).

Lokalizasyon	Gen sembolü	Sınıf	Statü	Lokalizasyon	Gen sembolü	Sınıf	Statü
1 p36	FRA1A	C-APC	C	2 p24.2	FRA2C	C-APC	C
p32	FRA1B	C-APC	C	p16.2	FRA2D	C-APC	C
p31.2	FRA1C	C-APC	C	p13	FRA2E	C-APC	C
p31	FRA1L	C-APC	P	q11.2	FRA2A	R-FA	C
p22	FRA1D	C-APC	C	q13	FRA2B	R-FA	C
p21.2	FRA1E	C-APC	C	q21.3	FRA2F	C-APC	C
q12	FRA1J	C-5-Aza	P	q22.3	FRA2K	R-FA	P
q21	FRA1F	C-APC	C	q31	FRA2G	C-APC	C
q25.1	FRA1G	C-APC	C	q32.1	FRA2H	C-APC	C
q13	FRA1K	C-APC	P	q33	FRA2I	C-APC	C
q42	FRA1H	C-5-Aza	C	q37.3	FRA2J	C-APC	P
q44	FRA1I	C-APC	C				
3 p24.2	FRA3A	C-APC	C	4 p16.1	FRA4A	C-APC	C
p14.2	FRA3B	C-APC	C	p15	FRA4D	C-APC	P
q25	FRA3D	C-APC	P	q12	FRA4B	C-BrdU	T
q27	FRA3C	C-APC	C	q27	FRA4E	C-?	T
				q31	FRA4C	C-APC	C
5 p14	FRA5E	C-APC	P	6 p25.1	FRA6B	C-APC	C
p13	FRA5A	C-BrdU	T	p23	FRA6A	R-FA	P
q15	FRA5B	C-BrdU	T	p22.2	FRA6C	C-APC	P
q15	FRA5D	C-APC	C	q13	FRA6D	C-BrdU	T
q21	FRA5F	C-APC	C	q15	FRA6G	C-APC	P
q31.1	FRA5C	C-APC	C	q21	FRA6F	C-APC	C
				q26	FRA6E	C-APC	C
7 p22	FRA7B	C-APC	P	8 q13	FRA8F	R-?	P
p14.2	FRA7C	C-APC	C	q22.1	FRA8B	C-APC	C
p13	FRA7D	C-APC	C	q22.3	FRA8A	R-FA	C
p11.2	FRA7A	R-FA	C	q24.1	FRA8C	C-APC	C
q21.2	FRA7E	C-APC	P	q24.1	FRA8E	R-Dist.A	C
q22	FRA7F	C-APC	C	q24.3	FRA8D	C-APC	C
q31.2	FRA7G	C-APC	C				
q32.3	FRA7H	C-APC	C	10q21	FRA10C	C-BrdU	P
q36	FRA7I	C-APC	P	q22.1	FRA10D	C-APC	C
9 p21	FRA9C	C-BrdU	P	q23.3	FRA10A	R-FA	C
p21.1	FRA9A	R-FA	C	q25.2	FRA10B	R-BrdU	C
q12	FRA9F	C-5-Aza	P	q25.2	FRA10E	C-APC	P
q22.1	FRA9D	C-APC	C	q26.1	FRA10F	C-APC	C
q32	FRA9E	C-APC	C				
q32	FRA9B	R-FA	C				
11p15.1	FRA11I	R-Dist.A	P	12q13.1	FRA12A	R-FA	P
p15.1	FRA11C	C-APC	P	q21.3	FRA12B	C-APC	C
p14.2	FRA11D	C-APC	C	q24	FRA12E	C-APC	P
p13	FRA11E	C-APC	C	q24.13	FRA12D	R-FA	P
q13	FRA11H	C-APC	C	q24.2	FRA12C	R-BrdU	C
q13.3	FRA11A	R-FA	C				
q14.2	FRA11F	C-APC	C	13q13.3	FRA13A	C-APC	C
q23.2	FRA11B	R-FA	C	q21	FRA13B	C-BrdU	C
q23.3	FRA11G	C-APC	P	q21.2	FRA13C	C-APC	C
				q32	FRA13D	C-APC	C
14q23	FRA14B	C-APC	P	15q22	FRA15A	C-APC	T
q24.1	FRA14C	C-APC	C				
16p13.11	FRA16A	R-FA	C	17p12	FRA17A	R-Dist.A	C
p12.1	FRA16E	R-Dist.A	P	q23.1	FRA17B	C-APC	C
q22.1	FRA16B	R-Dist.A	C				
q22.1	FRA16C	C-APC	C	18q12.2	FRA18A	C-APC	P
q23.2	FRA16D	C-APC	C	q21.3	FRA18B	C-APC	C
19p13	FRA19B	R-FA	C	20p12.2	FRA20B	C-APC	P
q13	FRA19A	C-5-Aza	C	p11.23	FRA20A	R-FA	C
22q12.2	FRA22B	C-APC	C	X p22.31	FRAXB	C-APC	C
q13	FRA22A	R-FA	C	q22.1	FRAXC	C-APC	C
				q27.2	FRAXD	C-APC	C
				q27.3	FRAXA	R-FA	C



Şekil 2.11: Frajil bölgelerin oluşumu.

Kültüre edilen hücrelerdeki frajil bölgeler asentrik fragman, gap, kırık ve triradial figürlerin oluşumuna yol açar. İnsan sperm kromozomlarında da ekspresyon bu şekildedir. (Martin 1986, Benet ve ark 1989, Fuster ve ark 1989).

İlk olarak sıklıkla expresse olan common frajil bölgenin 3p14.2 de lokalize olduğu 1968'de Bragges tarafından incelenen metafaz plaklarında tespit edilmiştir. (Bragge 1968). Glover ve ark. (1984) tarafından kültür medyumuna aphidicolin (DNA polimerase α inhibitör) ilavesiyle common frajil bölgelerin yüksek seviyede indüklenbildiği gösterilmiştir.

2.8.4 Frajil Bölge Ekspresyonunu Etkileyen Faktörler

Frajilitenin tespiti için en önemli koşul frajil bölgeleri indükleyebilen kimyasal bir ajanın varlığıdır. Bu nedenle kimyasal maddelerin frajilite üzerine etkileri araştırılmıştır (Glover 1981, Glover ve ark. 1984, Tommerup ve ark.1981, Yunis ve Soreng 1984, Sutherland ve ark. 1985, Schmid ve ark. 1980; 1986, Pelliccia ve Rocchi 1986, Thertrup-Pedersen ve ark. 1980, Shabtai ve ark. 1987, Sutherland ve ark. 1985, Sutherland ve Baker 1986, Li ve Zhou 1985, Reidy 1987, Li ve ark. 1986, Yan ve ark. 1988, Porfirio ve ark. 1989).

1987'de Yunis ve ark. kafein ile indüklediği frajil bölge ekspresyonunda 16 mutagen ve karsinojenin etkisini test etmiştir. Tüm test edilen maddeler farklı moleküler

mekanizmaya sahiptir. Bu moleküler mekanizmalar fragil bölgelerin mutajenik aksiyonun hedefi olduğunu bildirir ve bu test edilen maddelerin fragil bölge ekspresyonunu indüklediği bulunmuştur. (Yunis ve Hoffman 1989).

Fragil bölge ekspresyonunu etkileyen diğer faktörler arasında serum konsantrasyonu, medyumun pH'ı, kültür süresi, kan örneğinin yaşı, doku kültüründeki virüs varlığı yer alır (Sutherland ve Hecht 1985, Sutherland ve ark. 1988, Popescu ve ark. 1990, Capoross ve ark. 1991).

Fragil bölge ekspresyonu araştırılan çalışmalar sonucunda farklı cinsiyete sahip bireyler arasında farklılık göstermemektedir (Sutherland ve ark 1985, Gree ve ark 1988). Yaş ile fragil bölge ekspresyonu arasındaki ilişki ise kesinleşmemiş olup, çalışmalar yaş ile ekspresyon arasında doğru orantılı olarak artış olabileceği yönündedir (Turner ve ark 1988). Çevresel faktörlerde fragil bölge ekspresyonunda değişim oluşturmaktadır.

Beslenme biçimi, alınan ilaçlar, enfeksiyon hali ve irradyasyon gibi etmenlerin fragil bölge ekspresyonunu etkilediği açıklanmıştır (Sutherland 1979, Sutherland ve Hecht 1985, Craig-Holmes ve ark 1987). Aşırı sigara kullanımının ve menstrual sikusun fragil bölge ekspresyonu üzerine önemli etkilerinin olduğu da bildirilmiştir (Kao-Shan ve ark. 1987, Furuya ve ark. 1991).

2.8.5. Aphidicolin'in ve Kafein'in fragil bölgeler üzerine etkileri

Aphidicolin 75 common fragil bölgeyi etkili bir şekilde indükler (Glover ve ark. 1984, Sutherland ve ark. 1989). Bir çok fragil bölgenin folat stresi altında çok düşük frekansta eksprese olduğu açıklanmıştır. Fakat aphidicolin Xq27'deki folat sensitiv rare fragil bölgesini indükleyememektedir (Glover ve ark. 1984).

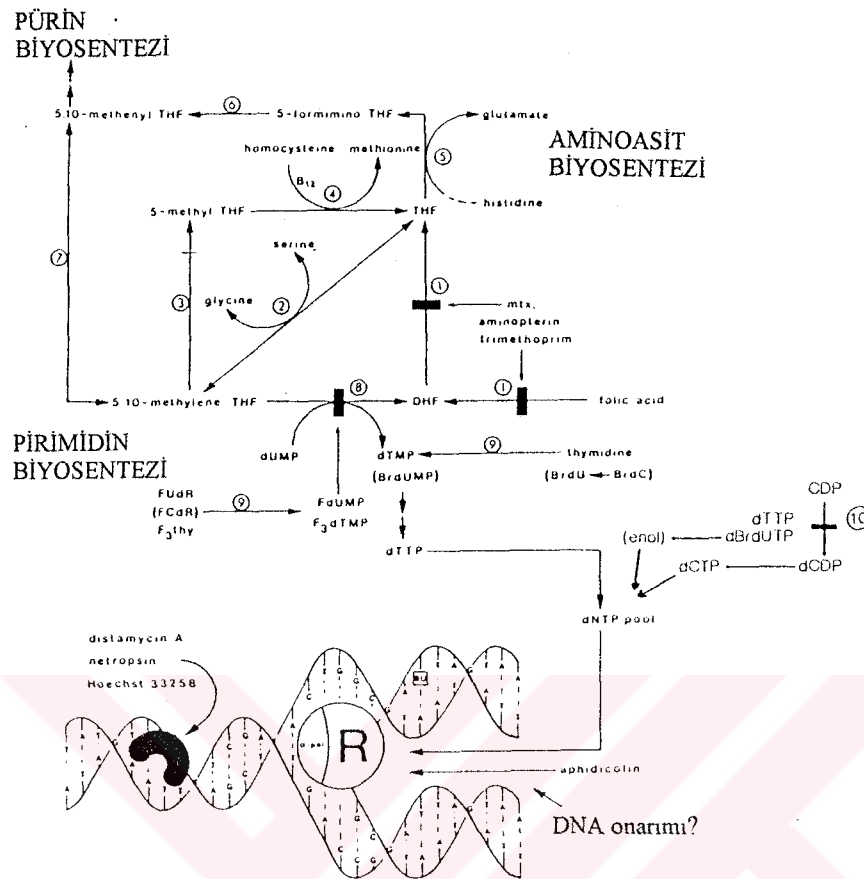
Aphidicolin *Cephalosporium aphidicola*'dan izole edilen bir tetrasiklik diterpenoid mikotoksindir. DNA replikasyonunda ve DNA onarım işleminde görev alan α DNA polimerazı inhibe eder (Ikegami ve ark. 1978, Snyder ve ark 1981, Cleaver 1982, Dresler ve ark 1986, Reidy 1988). Replikasyon çatalındaki ilerleme aphidicolin tarafından bloke edilir (Lönn ve ark 1983). Buna karşılık Aphidicolin'in DNA tamiri, mitokondrial DNA sentezi, RNA yada protein rol oynayan β ve γ polimeraz üzerine etkisi yoktur. Bundan dolayı ne deoksiribonükleotidlerin sentezine ne de DNA ligaz aktivitesine etki eder (Glover 1985).

Daha sonraki çalışmalarda aphidicolin'in DNA polimeraz δ 'da inhibe ettiği rapor edilmiştir (Byrner 1984 ve Lee ve ark 1984). Polimeraz α 'nın mı yoksa δ 'nın mı veya her ikisinde mi aphidicolin tarafından fragil bölge ekspresyonunu arttırdığı bilinmemektedir (Bender 1989).

Aphidicolin'in yanında, kafein'de common fragil bölgeler için benzer önemde indüktör özelliğine sahiptir (Yunis ve Soreng 1984, Rao ve ark 1988). Fakat fragil Xq27 gibi rare folat sensitiv fragil bölgelere etkisi gösterilmemiştir (Abruzza ve ark 1986, Glover ve ark 1986). Kafein hücre siklusunun G_2 safhasındaki onarım amaçlı mitotik gecikmeyi iptal etmesiyle ve replike olan hücrelerin DNA onarım yolunu inhibe etmesiyle fragiliteyi indükler (Das ve ark. 1984, Yunis ve Sareng 1984, Gonzalez-Fernandez ve ark 1985). Bu iki aktivite ile Kafein, G_2 -profaz esnasındaki onarım mekanizmalarının başarılı bir inhibitörüdür (Şekil 2.12).

Common fragil bölgeler bütün bireylerin kromozomlarında eksprese olabilir (Daniel ve ark 1984, Kahkönen 1988). Bu bölgelerin bir çoğu aphidicolin (Glover ve ark 1984) ve kafein (Yunis ve Sareng 1984) ile yüksek seviyede indüklenir. Kültür koşulları, çevresel ve genetik faktörlerde common fragil bölgelerin ekspresyonunu etkiler (Craig-Holmes ve ark 1987, Kao-Shan ve ark 1987, Rao ve ark 1988, Sugio ve Kuraki 1989). Farklı etnik gruplar arasındaki fragil bölge ekspresyonlarının anlamlı farklılıkları anlaşılmamıştır.

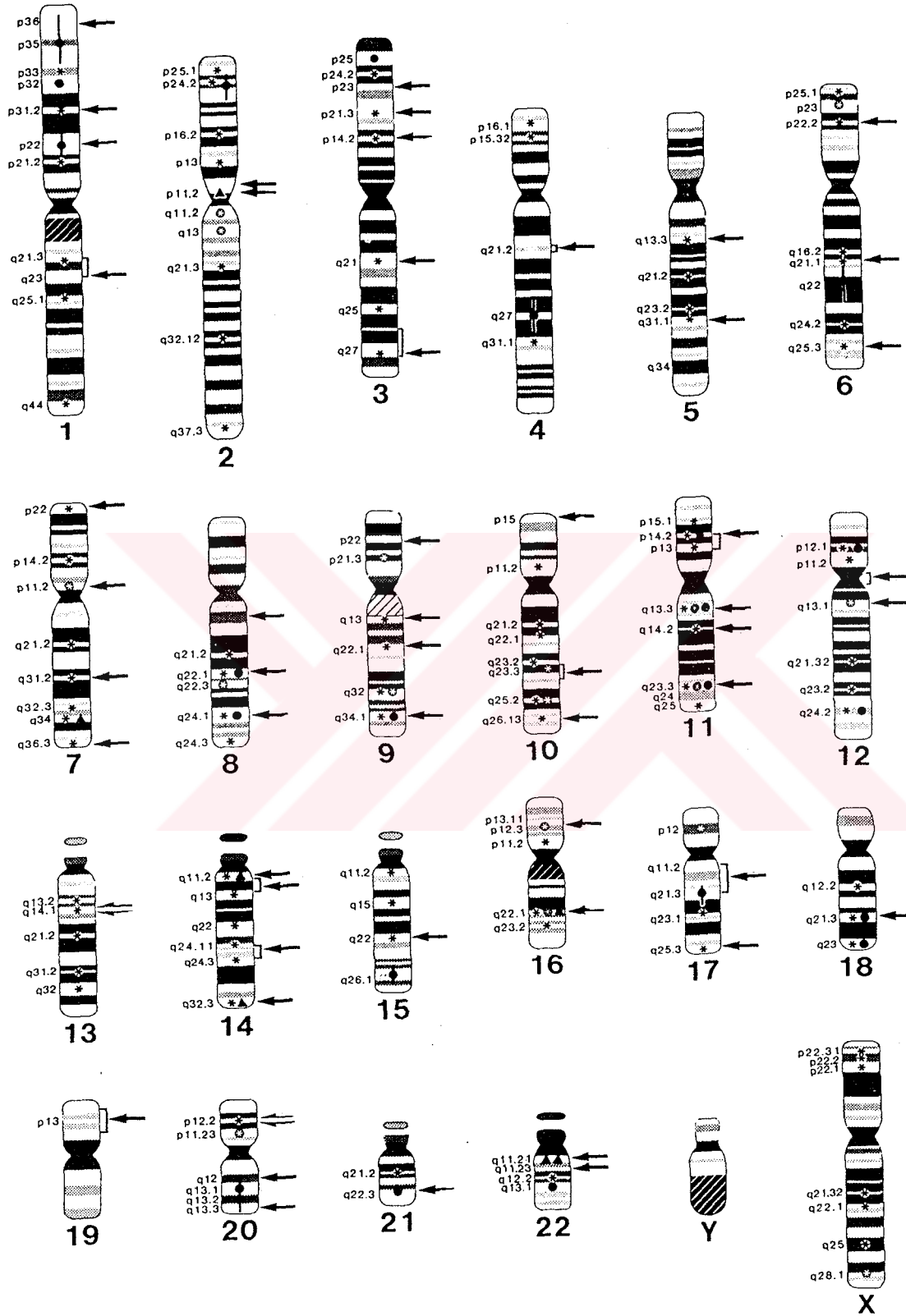
1984'te Zhou ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise epileptik hastalarla normal bireyler arasında 3p14 (FRA3B) deki fragil bölge ekspresyonunun anlamlı farklılık gösterdiği açıklanmıştır.



Şekil 2.12: Kimyasal faktörlerin fragil bölge ekspresyonuna etkilerini gösteren şema.

2.8.6 Frajil Bölgeler ve Kanser

Frajlil bölge ekspresyonu in vitro'da tüm somatik dokularda ve hatta mayotik hücrelerde araştırılmıştır. Ayrıca indüklenmeyen kemik iliği hücrelerinde de bulunmuştur. Frajlil bölgelerin kromozomal rearrangement'lar yoluyla kanserin oluşumunda rol oynadığı böylelikle proliferasyon üzerindeki etkilerinin büyük olduğu açıklanmıştır. Katı tümör ve lösemilerdeki kırıkların ve delesyonların yol açtığı kayda değer sayıdaki kromozomal rearrangementların varlığı bu fikri kuvvetlendirmektedir (Le Beau 1986, De Brakeleer 1987). Kansere spesifik kırılma noktaları ve frajlil bölge lokalizasyonları arasında ciddi bir paralellik olduğu açıklanmıştır (Hecht ve Glover 1984, Hecht ve Sutherland 1984, De Braekeleer ve ark. 1985), (Şekil 2.13).



Şekil 2.13: Kanserdeki Frajil Bölgeler, Genler ve Kromozomal Yeniden Düzenlenmeler (Yunis JJ 1990). Siyah yıldız; frajil bölgeleri (96 adet), beyaz yıldız; kalıtsal frajil bölgeleri (17 adet), siyah daire; protoonkogenleri (21 adet), ok ise; kansere spesifik olan 41 bölgeyi göstermektedir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Aletler

1. Kaba tartı (0.01 gr. hassasiyetle)
2. Hassas tartı (0.0001 gr. hassasiyetle)
3. Laminairflow (hepafiltre çapı-<0.3 μ)
4. pH metre
5. Etüv
6. Santrifüj
7. Karıştırıcı (Vorteks)
8. Su banyosu
9. Derin dondurucu

3.2. Kitler

1. RPMI 1640 Medium 10X, “Gibco 061-5140”
2. Fetal kalf serum, “Gibco-011-0629011”
3. Phytohemagglutinin L, “Seromed-M5030”
4. L Glutamine “Sigma G 3126”
5. Penicillin / Streptomycin, “Gibco 061-51440”
6. Giemsa stain, “Sigma GS 500”
7. Colcemid, “Sigma D-6279”
8. Heparin, “Sigma H-3149”

3.3. Kimyasal Maddeler

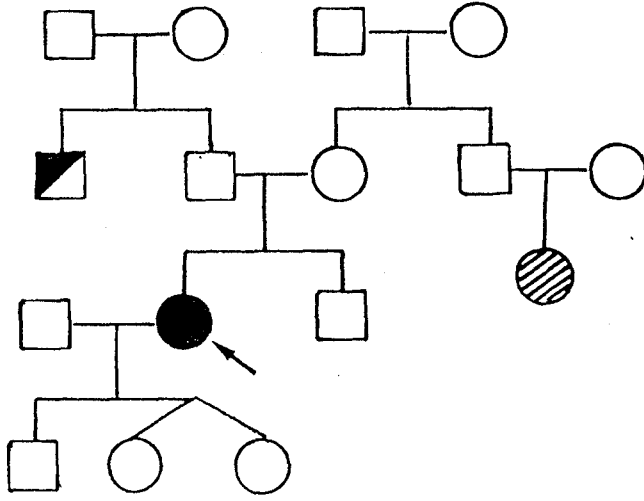
1. Aseton, “Merck 100014”
2. Sodyum bikarbonat “Merck 104928”
3. Potasyum klorür, “Merck 104938”
4. Glasiyal asetik asit, “Merck 100056”
5. Methanol, “Merck 106009”
6. KH₂PO₄, “Merck 105108”

7. Na_2HPO_4 , “Merck 106566”
8. Sodyum klorür, “Merck 101540”
9. Ksilol, “Merck 108681”
10. Sitrik asit, “Sigma C-0759”
11. Aphidicolin, “Sigma-A0781”
12. Dimetil sülfoksit (DMSO), “Merck 102952”
13. Caffeine, “Sigma C-8960”
14. Ethidium Bromide, “Sigma E-7637”
15. Sodyum hidroksit, “Merck 106495”
16. Hidroklorik asit, “Merck 100316”
17. İmmersiyon yağı “Merck 1046990500”
18. Tripsin, “Sigma T-4799”

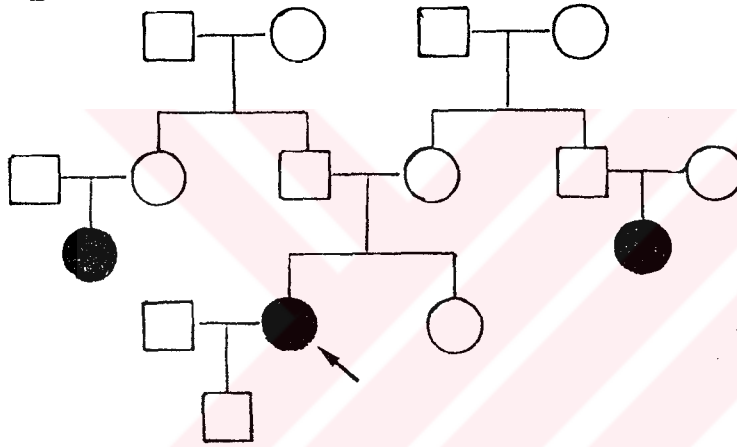
3.4. Örneklerin Toplanması

Çalışmamız 1996 yılının Aralık ayı ile 1998 Ocak ayı arasında Uludağ Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Genetik Laboratuvarında gerçekleştirildi. Çalışmamızda 35 meme kanserli hasta, ailesinde en az bir meme kanseri olgusu bulunan sağlıklı 35 kişi ve ailesinde hiçbir kanser vakası bulunmayan 20 sağlıklı kişiden heparinli venöz kan örneği alındı. Bu bireylerin tümü kadındı. Meme kanserli hastalar Uludağ Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Genel Cerrahi A.B.D. kliniğinde tedavi olan ve kanser tanısı kesinleşmiş bireylerdir. Kanserli hastalarımızın yaşları 33 ile 72 arasında değişmekte olup, yaş ortalaması 50.4 idi. Hastaların 7’sinin ailesinde bir veya birden fazla meme kanseri olgusu vardı. 12’ sinin ailelerinde ise kendilerinden başka en az 1 vakada akciğer, başboyun, prostat, karaciğer ve ovaryum gibi kanser tiplerinden biri görülmekteydi (Şekil 3.1, Çizelge 3.1).

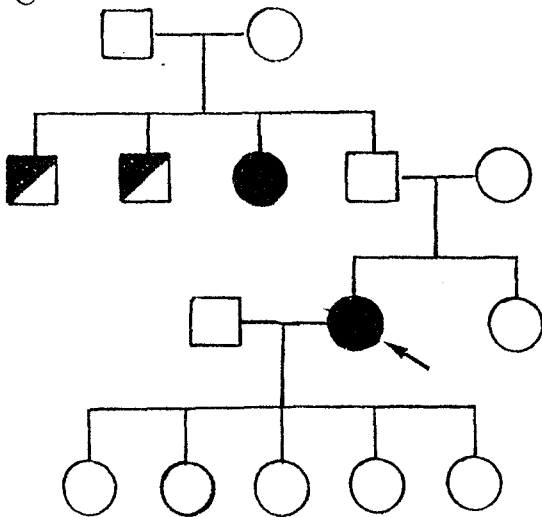
A



B



C



Şekil 3.1: Vakalarımıza ait pedigrî örnekleri.



Meme CA



Akciğer CA



Başboyun CA



Lösemi

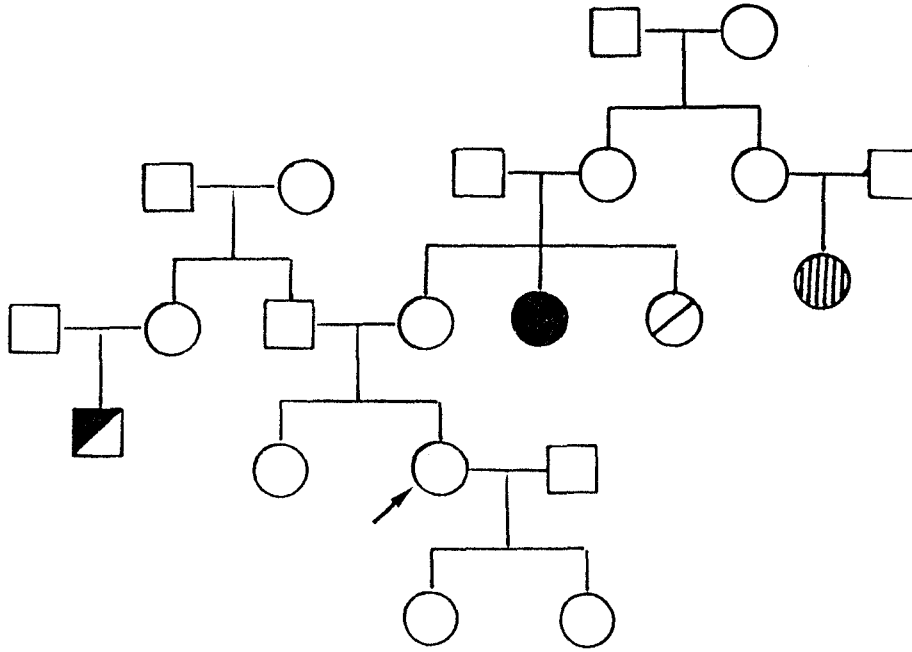


Karaciğer CA

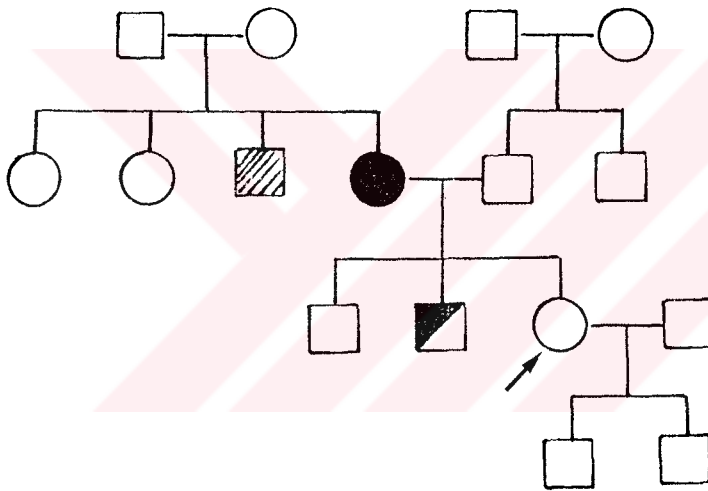


Pankreas CA

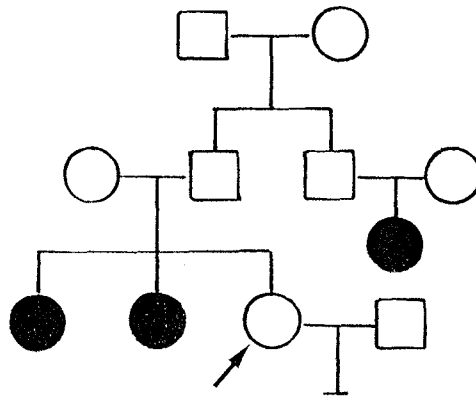
D



E

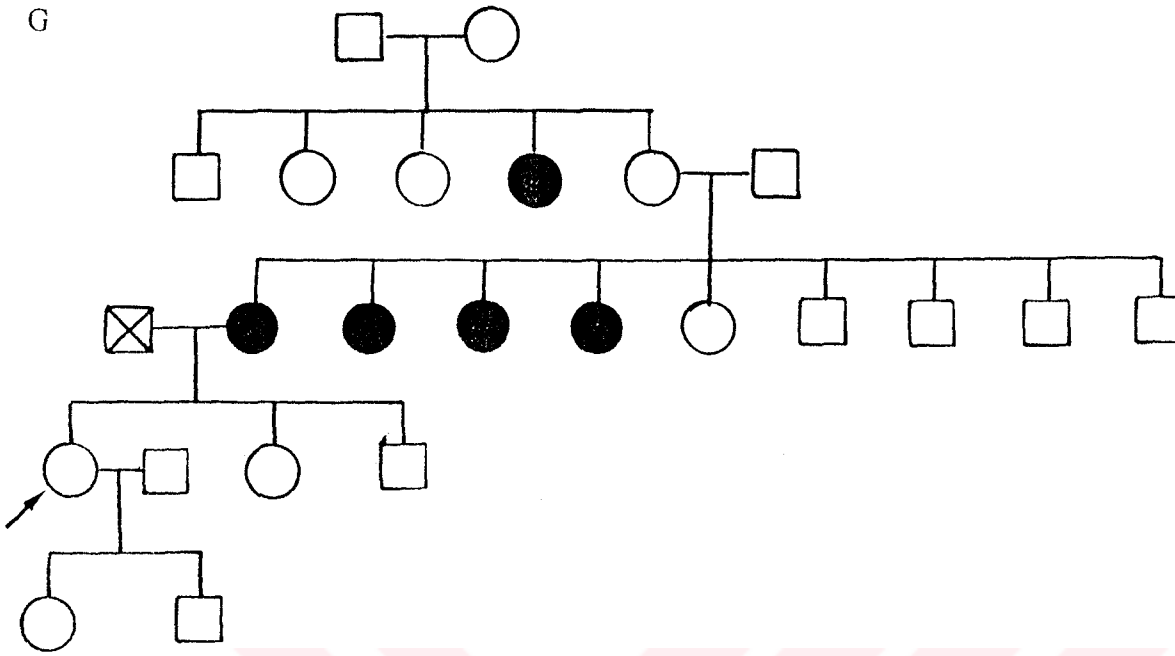


F



Şekil 3.1. - Devamı

G



Şekil 3.1. - Devamı

HASTALAR										AKRABALAR				KONTROL			
Vaka no	Yaş	Tümörün Orijini			Tümörün TNM lokalizasyonu	TNM Smiflan- dırması	Evre	Ailesel hikaye	Vaka no	Yaş	Ailesel hikaye*	Vaka no	Yaş	Ailesel hikaye			
		Duktal	Lobuler	Insitu											Invaziv	Intifiltration	
1	35	+	-	-	+	Sağ	T2N2M0	3A	+			1	40	A,M,C	1	53	-
2	51	+	-	-	+	Sol	T1N1M0	3A	-			2	25	A	2	73	-
3	63	-	+	-	+	Sağ	T1N1M0	1	-			3	47	A	3	44	-
4	54	-	+	-	+	Sol	T1N1M0	1	-			4	41	A	4	47	-
5	72	+	-	-	+	Sağ	T2N0M0	2A	-			5	49	K	5	42	-
6	37	+	-	-	+	Sol	T2N2M0	3A	+			6	53	K	6	44	-
7	53	+	-	-	+	Sol	T3N2bM0	3A	-			7	36	A	7	46	-
8	40	+	-	-	+	Sol	T3N1M1	4	+			8	46	T,E,E	8	39	-
9	60	+	-	-	+	Sol	T1cN2bMx	3A	+			9	41	A,T	9	35	-
10	41	+	-	-	+	Sol	T2N0M0	2A	+			10	40	A,D,F	10	48	-
11	64	+	-	-	+	Sağ	T2N1bM0	2B	+			11	31	A	11	47	-
12	64	+	-	-	+	Sağ	T1N2M0	3A	-			12	21	A	12	33	-
13	33	+	-	-	+	Sağ	T1N0M0	1	+			13	38	T	13	40	-
14	61	+	-	-	+	Sağ	T1N0M0	2C	-			14	51	K	14	24	-
15	41	+	-	-	+	Sağ	T4N0M0	2A	-			15	14	A	15	25	-
16	44	+	-	-	+	Sağ	T2N0M0	2B	-			16	49	K	16	26	-
17	49	+	-	-	+	Sol	T3N0M0	3A	-			17	32	A	17	39	-
18	39	+	-	-	+	Sol	T2N2bM0	1	-			18	19	A	18	44	-
19	45	+	+	-	-	Sağ	T1N0M0	1	+			19	39	K	19	34	-
20	47	+	+	-	-	Sağ	T1N0M0	1	-			20	48	K	20	34	-
21	37	+	-	-	+	Sağ	T1N0M0	2B	-			21	30	K	21	34	-
22	55	+	-	-	+	Sağ	T2N1bM0	0	-			22	56	K	22	34	-
23	45	+	-	+	-	Sol	T1sN0M0	3A	-			23	35	T	23	34	-
24	55	+	-	-	+	Sağ	T1N2M0	0	-			24	46	A	24	34	-
25	45	-	-	+	-	Sağ	T1sN0M0	1	-			25	42	A,E	25	34	-
26	40	+	-	-	+	Sağ	T1N0M0	1	-			26	48	K,K,E	26	34	-
27	62	+	-	-	+	Sol	T1N0M0	1	+			27	29	A	27	34	-
28	72	+	-	-	+	Sol	T1N1M0	2A	-			28	51	A,G	28	34	-
29	49	+	-	-	+	Sol	T2N1M0	2B	-			29	38	A	29	34	-
30	47	-	-	+	-	Sol	T1sN0M0	0	-			30	45	H	30	34	-
31	41	+	-	-	-	Sol	T2N0M0	2A	-			31	24	D,L,M	31	34	-
32	58	-	+	-	-	Sol	T1cN0M0	1	+			32	24	A	32	34	-
33	70	-	+	-	+	Sol	T2N0M0	2A	-			33	48	A,T	33	34	-
34	34	+	-	-	+	Sol	T1N0M0	1	+			34	42	A,C	34	34	-
35	61	+	-	-	+	Sol	T2N0M0	2A	+			35	48	T,T,T,A,B	35	34	-

*A:Annesi, C:Amcası, D:Dayısı, E:Kuzeni, F:Erkek kardeşi, G:Büyükannesi, H:Kızı, K:Kız kardeşi, L:Dedesı, T:Teyzesi, M:Halası, B:Babası

Meme kanseri gross karakterine (skirö, kolloid, medüller) histogenezine (duktal, lobüler, asiner) histolojik karakterine (adenokarsinoma, epidermoid karsinoma, sarkoma), invazyon karakterine (infiltratif, insitu) göre sınıflandırılabilir. TNM ve pTNM klasifikasyonundaki veriler kullanılarak preoperatif ve postoperatif evre saptanmalıdır Meme kanserinin histopatolojik sınıflama sistemi ve TNM'ye göre evrelemesi Çizelge 3.2 ve 3.3'de açıklandı (Hermanek ve Sobin 1987).

Çizelge 3.2. Meme kanserinin histopatolojik sınıflaması.

I.	Meme başının Paget hastalığı
II.	Memenin duktal karsinomu
	1.Noninfiltratif
	2.İntilratif
	a. Prodüktif fibrozis ile birlikte olan adenokarsinoma
	b. Medüller karsinom
	c. Komedo karsinom
	d. Kolloid karsinom
	e. Papiller karsinom
	f. Tübüler karsinom
III.	Lobüler karsinoma
	1.Noninfiltratif
	2.İntilratif
IV.	Memenin nadir karsinomaları
V.	Meme sarkomu

Hastaların TNM Sınıflandırılması aşağıdaki kriterler kullanılarak yapıldı.

T Primer Tümör

TX Primer tümör bilinmiyor

TO Primer tümör saptanamamış

Tis Karsinoma in situ: intraduktal karsinoma veya lobüler karsinoma in situ veya tümör saptanamamış Paget hastalığı

T1	En büyük çapı 2.0 cm veya daha küçük
T1a	0.5 cm veya daha küçük
T1b	0.5-1.0 cm
T1c	1.0-2.0 cm
T2	En büyük çapı 2.0-5.0 cm
T3	En büyük çapı 5.0 cm den büyük
T4	Tümör herhangi çapta fakat deri veya göğüs duvarı tutulumu mevcut
N	Regional lenf nodları
NX	Regional lenf nodları bilinmiyor
NO	Regional lenf nodu metastazı yok
N1	Aynı tarafta hareketli aksiller lenf nod(ları) metastazı
N2	Aynı tarafta birbirine veya başka dokulara fikse aksiller

nod(ları)metastazı

N3	Aynı tarafta internal mamarian lenf nod(ları) metastazı
M	Uzak metastaz
MX	Uzak metastaz bilinmiyor
MO	Uzak metastaz yok
M1	Uzak metastaz var

Çizelge 3.3: TNM Sınıflandırma Sistemine göre evreleme.

Evre 0	Tis	N0	M0
Evre I	TI	N0	M0
Evre IIA	T0	NI	M0
	TI	NI	M0
	T2	N0	M0
Evre IIB	T2	NI	M0
	T3	N0	M0
Evre IIIA	T0	N2	M0
	TI	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	NI,N2	MO
Evre IIIB	T4	Herhangi bir N	M0
	Herhangi bir T	N3	M0
Evre IV	Herhangi bir T	Herhangi bir N	MI

Hastalara ait TNM sınıflandırmasına göre yapılmış evreleme Çizelge 3.1’de verildi.

Akrabalardan oluşan grubumuzdaki bireylerin yaşları 19 ile 53 arasında değişmekte olup yaş ortalaması 39 idi. Bu grubun bireylerinin 29 tanesinin ailesinde sadece bir meme kanseri olgusu gelişmiş iken 6 bireyin ailesinde ise 2 veya ikiden fazla meme kanseri olgusu gelişmişti (Şekil 3.1, Çizelge 3.1).

Çalışmamızda incelediğimiz 2 grubumuzu karşılaştırmak amacı ile ailesinde herhangi bir kanser olgusu bulunmayan, yaş ortalamaları bu iki gruba uygunluk gösteren 20 kadından oluşan sağlıklı birey kontrol grubu olarak çalışıldı. Bu grubumuzun yaşları 24 ile 73 arasında değişmekte idi. Yaş ortalaması ise 40.9 olarak bulundu (Çizelge 3.1).

Çalışmamızda incelediğimiz bu üç grubu oluşturan tüm vakalardan antikoagulan olarak kullanılan heparinden geçirilmiş enjektörlerle yaklaşık 1’er cc kan örnekleri alındı. Alınan kanlardan 12 damlası hemen lenfositlerin üremesini sağlayan 37 °C lik ısısı olan, kültür ortamına ekildi.

3.5 Örneklerin Kültürlerinin hazırlanışı

Kültür ortamının içeriği şu şekildedir;

10 cc RPMI 1640 medyum (10 X)

10 cc Fetal Kalf serum

0,0584 L-glutamine

0,5 cc Penicillin-Streptomycin solüsyonu

2,5 cc Phytohemaglutinin L (1,2 mg / 5 cc distile su)

77 cc Steril distile su

Toplam 100 cc lik besiyeri pH % 20'lik Na_2CO_3 ile 7 olacak şekilde ayarlanır. Sterilitesi sağlanan kapaklı cam şişelere steril koşullarda aktarma yapılır ve hazır hale getirilen kültürler kısa sürede tüketilemeyecekse -20^0 C de saklanır. Kısa sürede tüketilebilecek ise $+4^0$ C de saklamak yeterlidir.

Ekim yapılan kültür örnekleri 37^0 C lik etüvde 72 saat süreyle inkübe edildi. Kültür süresinin bitiminden 6 saat öncesinde fragil bölge ekspresyonunu indüklemek amacıyla kültür ortamına Aphidicolin ve kafein fragil ajan olarak ilave edildi.

3.5.1 Fragil Ajanların Hazırlanışı

Aphidicolin: 1 mg aphidicolin 100 ml Dimetil sülfoksit (DMSO) içinde çözülür. Kültür ortamına bu çözeltiliden 0,03 ml katılır.

Kafein: 0,0015 gr kafein 100 cc etil alkolde çözülür. Bu çözeltiliden 1 cc alınarak 9 cc etanolde çözülür. Elde edilen 2. çözeltiliden kültür ortamına 0.05 cc katılır.

Kültür süresinin bitimine 2 saat kala kültüre mücrelerin metafaza geçişlerini azaltmak ve prometafazda daha fazla plak elde etmek ve High resolution bandig yapabilmek için ethidium bromide ilave edildi.

3.5.2 Ethidium Bromide' in Hazırlanışı

0,01 gr ethidium bromide 10 ml distile suda çözülür. Kültür ortamına bu çözeltiliden 0,1 cc katılır.

Kültür süresinin bitimine 1 saat kala kromozomların metafazda ilerleyerek anafaza geçmelerine engel olmak amacı ile iğ ipliklerini parçalama yeteneğinde olan kolsemid kültür ortamına katılır.

3.5.3 Colcemide'in Hazırlanışı;

1 gr colcemide 10 cc steril distile suda çözülür. Bu çözeltiliden kültür ortamına 0.05 cc katılır.

3.6 Harvest İşlemi

Periferik kandan kültüre ekim yapıldıktan 72 saat sonra harvest işlemine başlanır.

- 1- Kültür etüvden çıkarıldıktan sonra santrifüj tüplerine konur ve 1500 devirde 10 dakika santrifüj edilir.
- 2- Üstteki sıvı, yani süpernatant atılır, dipteki hücre kümesi üzerine daha önce hazırlanan 37°C de ısıtılmış 6-7 cc 0,075 M KCl hipotonik solüsyon olarak ilave edilir ve hafifçe altüst ederek karıştırılır.
- 3- 37°C de 10 dakika bekletilir.
- 4- 1500 devirde 10 dakika santrifüj edilir.
- 5- Süpernatant atılır. Hücrelerin üzerine taze olarak hazırlanmış 3 : 1 oranındaki soğutulmuş metanol asetik asitten (fiksatiften) yavaşça karıştırarak 6-7 cc ilave edilir.
- 6- Karışım $+4^{\circ}\text{C}$ de 20 dakika bekletilir.
- 7- 1500 devirde 10 dakika santrifüj edilir.
- 8- Süpernatant atılır.
- 9- Hücre kümesinin üzerine soğuk fiksatiften 6-7 cc yavaş ve karıştırılarak ilave edilir.
- 10- 1500 devirde 10 dakika santrifüj edilir.
- 11- Süpernatant atılır.
- 12- Yine hücre kümesinin üzerine soğuk fiksatiften 6-7 cc yavaş ve karıştırılarak ilave edilir.
- 13- 1500 devirde 10 dakika santrifüj edilir. Bu işlem hücreler beyazlaşınca kadar tekrarlanır. Genellikle 3 kez tekrarlamak yeterlidir.
- 14- Süpernatant atılır ve dipteki hücre kümesinin üzerini örtecek kadar fiksatif ilave edilir ve süspansiyon yapılır.
- 15- Alkolde yıkanarak hazırlanmış temiz olan 3 adet kuru lam üzerine hücre süspansiyonu damlatılır, kuvvetlice üflenerek süspansiyonun lama homejen yayılımı sağlanır ve havada kurutulur.
- 16- Kurutulan preparatlar giemsa boyasında 15 dakika boyanır.

3.6.1. Giemsa Boyasının Hazırlanışı

4 cc AB buffer fosfat tamponu

7 cc Giemsa solüsyonu

89 cc distile su

kariştirilir, kurutma kağıdı ile süzülerek kullanılır.

AB Buffer Fosfat Solüsyonu:

Sol A: 9,08 gr KH_2PO_4 1 litre distile suda çözülür.

Sol B: 9,47 gr Na_2HPO_4 1 litre distile suda çözülür.

200 cc A ve 800 cc B solüsyonu kariştirilir. pH 6.8'e ayarlanır.

3.7. Preparatların değeriendirilmesi

Her vakadan hazırlanan 3 preparattan iyi dağılmış, süperpozesi mümkün olduğunca az olan yada olmayan metafaz plaklarından 50 adet ışık mikroskopunun 100' lük objektifinde immersiyon yağı ile incelendi. Metafaz plaklarında gap, kırık, asentrik fragman ve exchange figür gibi yapısal kromozom anomalileri değeriendirilerek (Şekil 3.2) yerleri tespit edildi. Yapılan bu değeriendirmeler harvestten sonra 3 gün içerisinde tamamlandı. 4. gün preparatların yağı ksilol ile çıkartıldı. Daha sonra fiksatif kullanılarak preparatların boyalarında çıkartıldı. Boyaları çıkartılan preparatlar giemsa bantlama yöntemi ile bantlandılar.

3.7.1. Giemsa bantlama yöntemi

1. Preparatlar 0.1 gr tripsin ilave edilmiş ve 32 C' ye ısıtılmış 50 cc PBS solüsyonunda 17 sn bekletilir.
2. Bu süre sonunda preparatlar tripsinsiz soğuk yıkama PBS' sine batırılıp çıkarılır.
3. Preparatlar giemsa ile hazırlanan bantlama boyasında 5 dakika boyanır.
4. Distile suda yıkanır. Havada kurutulur

3.7.1.1. PBS solusyonunun hazırlanışı

8 gr NaCl

0.2 gr KCl

0.92 gr Na_2HPO_4

0.2 gr KH_2PO_4

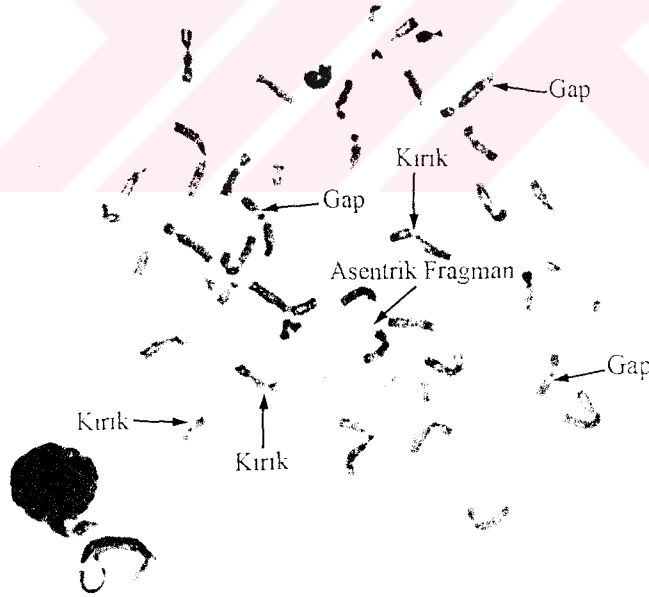
sırasıyla çözülerek 1000 cc distile suya tamamlanır. pH 7.2' ye ayarlanır.

3.7.1.2. Bantlama boyasının hazırlanışı

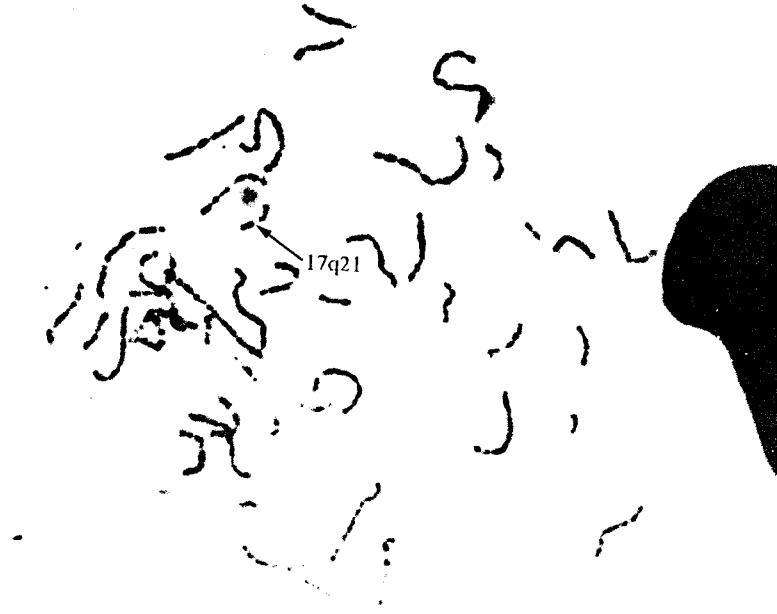
- 6 cc Giemsa
- 3 cc Methanol
- 4 cc 0.1 M sitrik asit
- 8 cc 0.2 M Na_2HPO_4
- 79 cc distile su

karıştırılarak süzöldükten sonra kullanılır.

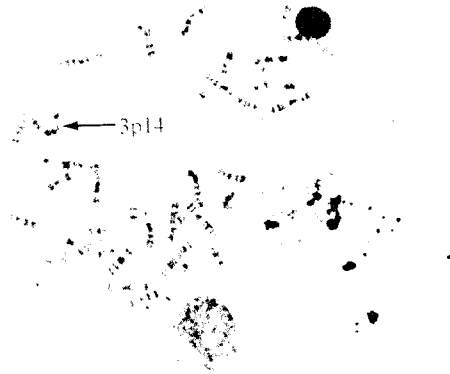
Bantlama işleminden sonra preparatlarda aberasyonlu metafaz plakları mikroskopta tekrar incelendi (Şekil 3.3-3.4). Gap ve kırık noktalarının kromozomal lokalizasyonları insan kromozomlarına ait 670 giemsa içeren haritadan tanımlandı (Şekil 3.5). Daha sonra her bir kromozom kırık noktasının çalışmamızda incelediğimiz gruplarda ve her bir vakada nasıl dağılım gösterdiği değerlendirildi. Bu inceleme sırasında aberasyonların fragil bölge olarak kabul edilebilmesi için hasta ve akraba gruplarında en az üç bireyde görülebilmesi kriter olarak kullanıldı.



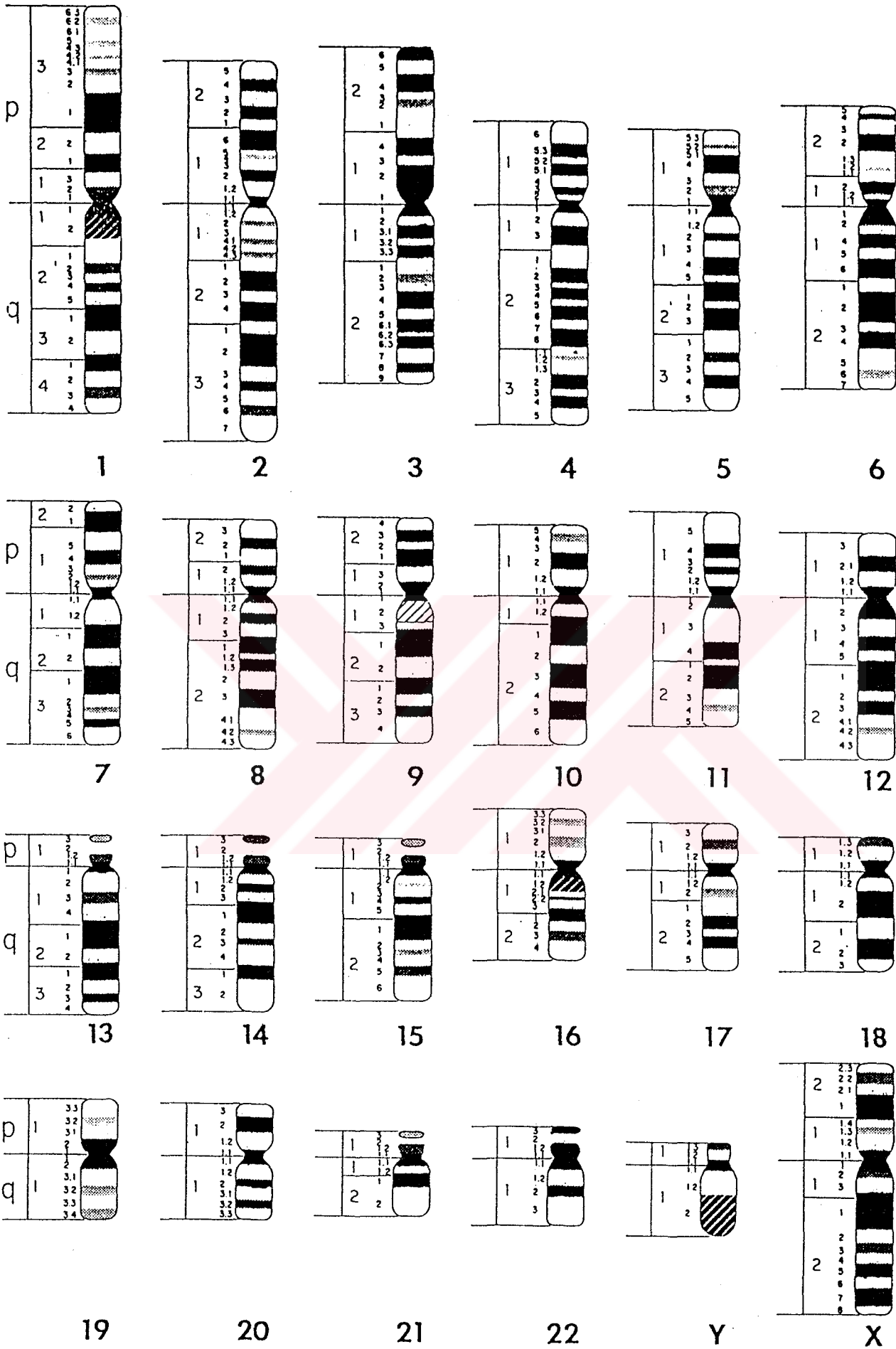
Şekil 3.2 : Bantlama yapılmadan önce incelenmiş kromozom anomalilerini gösteren metafaz figürü.



Şekil 3.3 : 1 no'lu hasta olgumuza ait G Bantlama yapılmış metafaz figürü.



Şekil 3.4 : 15 no'lu hasta olgumuza ait G Bantlama yapılmış metafaz figürü.



Şekil 3.5 : İnsan kromozomlarına ait 670 giemsa bandı içeren kromozom haritası.

3.8 İstatistiksel Değerlendirme

Araştırma sonuçları non parametrik bir test olarak kullanılan Mann-Whitney U testi ile değerlendirildi. Anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ olarak kabul edildi.



4. BULGULAR

Çalışmamızda meme kanserli hastalara, birinci derece yakınlarına ve kontrol grubuna ait elde edilen sitogenetik bulgular Çizelge 4.1’de verilmiştir. Bu çizelge de hastaların aberasyonlu hücre ve total aberasyon (gap, kırık ve asentrik fragman) oranlarına ait elde edilen sonuçlar, bunların ortalamaları ve standart sapmaları verilmiştir. Hastalarda elde edilen aberasyonlu hücre ve toplam aberasyon oranı ortalama ve standart sapma değeri 0.297 ± 0.164 ; 0.488 ± 0.374 , yakınlarda elde edilen aberasyonlu hücre ve toplam aberasyon oranı ortalama ve standart sapma değeri 0.232 ± 0.156 ; 0.457 ± 0.388 , kontrol grubunda ise sırasıyla 0.06 ± 0.06 ; 0.06 ± 0.07 olarak belirlendi. Çizelge 4.2’de ise tespit edilen hasarlı hücrelerin ve kromozomal aberasyonlarının hasta-kontrol, yakın-kontrol ve hasta-yakın arasındaki istatistiksel karşılaştırmaları belirtildi. Hasta-kontrol ve yakın-kontrol’deki değerler $p < 0.0001$ olarak bulunduğu oldukça anlamlıdır. Hasta-akraba arasında ise anlamlılık belirlenmedi ($p > 0.05$).

Çizelge 4.1. : Kromozomal aberasyon oranları (gap ve kırık /hücre).

HASTALAR										AKRABALAR										KONTROL											
Vaka No	İncelenen Metafaz	Aberasyonlu Hücre	Aberasyon oranı	Vaka No	İncelenen Metafaz	Aberasyonlu Hücre	Aberasyon oranı	Vaka No	İncelenen Metafaz	Aberasyonlu Hücre	Aberasyon oranı	Vaka No	İncelenen Metafaz	Aberasyonlu Hücre	Aberasyon oranı	Vaka No	İncelenen Metafaz	Aberasyonlu Hücre	Aberasyon oranı	Vaka No	İncelenen Metafaz	Aberasyonlu Hücre	Aberasyon oranı	Vaka No	İncelenen Metafaz	Aberasyonlu Hücre	Aberasyon oranı	Vaka No	İncelenen Metafaz	Aberasyonlu Hücre	Aberasyon oranı
1	50	0.66	1.18	1	50	0.18	0.36	1	30	0.07	0.07	0.07	0.07																		
2	50	0.56	0.94	2	30	0.53	1.20	2	30	0.07	0.07	0.07	0.07																		
3	40	0.35	0.63	3	40	0.20	0.23	3	50	0.08	0.10	0.10	0.10																		
4	50	0.16	0.16	4	50	0.18	0.30	4	30	0.17	0.23	0.23	0.23																		
5	50	0.26	0.54	5	50	0.42	1.24	5	30	0.06	0.06	0.06	0.06																		
6	50	0.06	0.08	6	50	0.44	0.78	6	50	0.14	0.14	0.14	0.14																		
7	50	0.22	0.20	7	30	0.10	0.10	7	30	0.03	0.03	0.03	0.03																		
8	40	0.08	0.08	8	30	0.33	0.77	8	30	0.03	0.03	0.03	0.03																		
9	50	0.34	0.54	9	50	0.34	0.92	9	30	0.13	0.13	0.13	0.13																		
10	50	0.44	0.62	10	40	0.35	0.80	10	30	0.13	0.13	0.13	0.13																		
11	50	0.36	0.50	11	30	0.06	0.06	11	30	0.00	0.00	0.00	0.00																		
12	30	0.54	1.00	12	30	0.00	0.00	12	30	0.00	0.00	0.00	0.00																		
13	50	0.40	0.68	13	30	0.07	0.07	13	30	0.00	0.00	0.00	0.00																		
14	30	0.50	1.05	14	30	0.23	0.26	14	50	0.00	0.00	0.00	0.00																		
15	30	0.47	1.47	15	30	0.17	0.17	15	50	0.02	0.02	0.02	0.02																		
16	30	0.47	1.20	16	30	0.06	0.06	16	50	0.04	0.04	0.04	0.04																		
17	50	0.18	0.38	17	50	0.16	0.22	17	50	0.02	0.02	0.02	0.02																		
18	40	0.05	0.05	18	40	0.05	0.05	18	50	0.00	0.00	0.00	0.00																		
19	30	0.36	0.36	19	30	0.03	0.03	19	30	0.20	0.20	0.20	0.20																		
20	40	0.20	0.30	20	40	0.05	0.05	20	50	0.00	0.00	0.00	0.00																		
21	30	0.26	0.43	21	30	0.07	0.07	21	50	0.00	0.00	0.00	0.00																		
22	30	0.13	0.17	22	30	0.05	0.05	22	50	0.02	0.02	0.02	0.02																		
23	30	0.07	0.07	23	40	0.35	0.48	23	50	0.00	0.00	0.00	0.00																		
24	30	0.20	0.16	24	50	0.32	0.56	24	50	0.00	0.00	0.00	0.00																		
25	30	0.37	0.33	25	50	0.44	1.18	25	50	0.00	0.00	0.00	0.00																		
26	50	0.20	0.32	26	40	0.45	0.83	26	50	0.00	0.00	0.00	0.00																		
27	30	0.00	0.00	27	50	0.48	0.98	27	50	0.00	0.00	0.00	0.00																		
28	50	0.48	0.68	28	50	0.36	0.44	28	50	0.00	0.00	0.00	0.00																		
29	40	0.28	0.33	29	50	0.08	0.08	29	50	0.00	0.00	0.00	0.00																		
30	50	0.42	0.92	30	40	0.43	0.55	30	50	0.00	0.00	0.00	0.00																		
31	50	0.40	0.64	31	40	0.28	0.90	31	50	0.00	0.00	0.00	0.00																		
32	40	0.33	0.33	32	40	0.13	0.18	32	50	0.00	0.00	0.00	0.00																		
33	30	0.13	0.20	33	50	0.30	0.48	33	50	0.00	0.00	0.00	0.00																		
34	50	0.18	0.22	34	40	0.30	0.70	34	50	0.00	0.00	0.00	0.00																		
35	40	0.28	0.33	35	50	0.14	0.14	35	50	0.00	0.00	0.00	0.00																		
Ort± SS		0.297±0.164	0.488±0.374			0.232±0.156	0.437±0.388			0.06±0.06	0.06±0.07																				

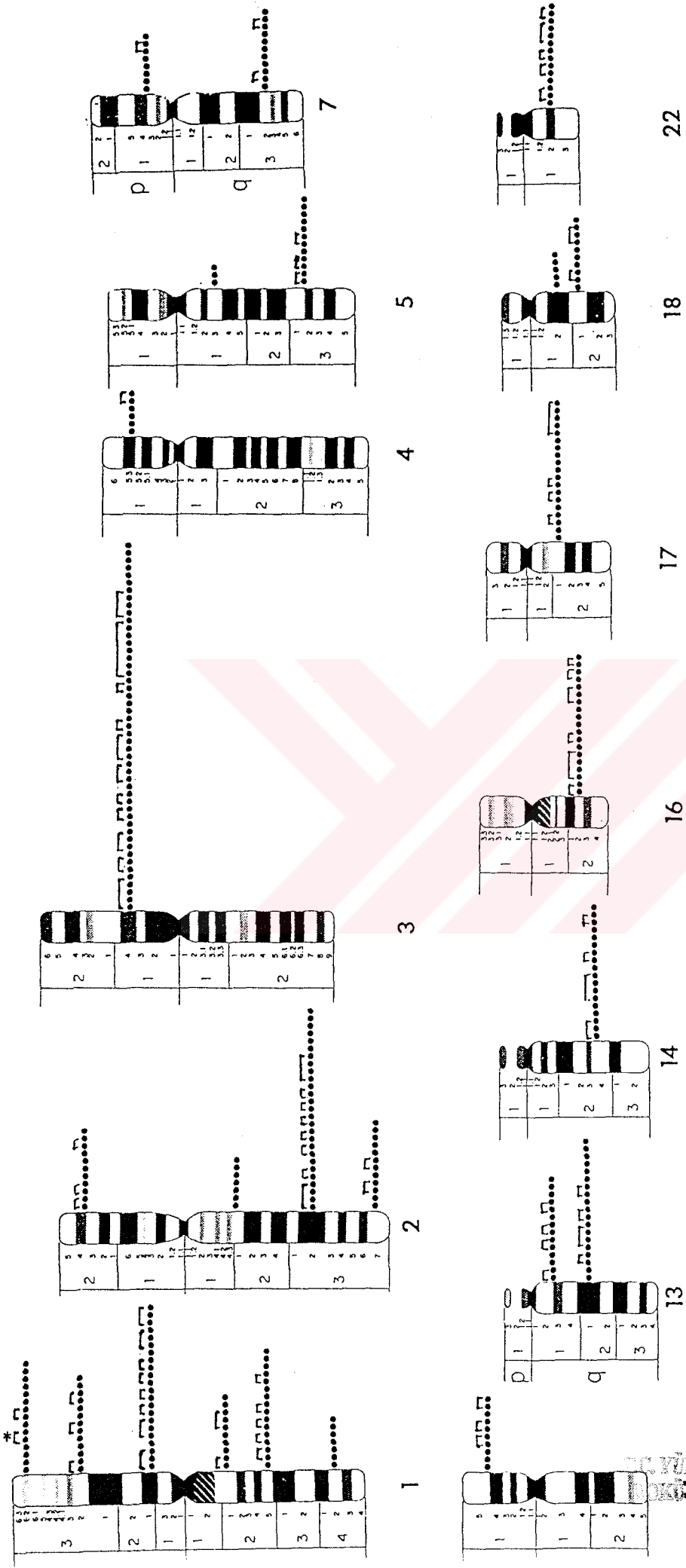
Çizelge 4.2. : Kromozomal aberasyonların meme kanserli hasta, yakını ve kontrol grubunda istatistiki olarak karşılaştırılması (p değerleri).

Karşılaştırılan grup	Aberasyonlu hücreler	Kromozomal Aberasyonlar
Hasta-Kontrol	<0.0001	<0.0001
Akraba-Kontrol	<0.0001	<0.0001
Hasta-Akraba	>0.05	>0.05



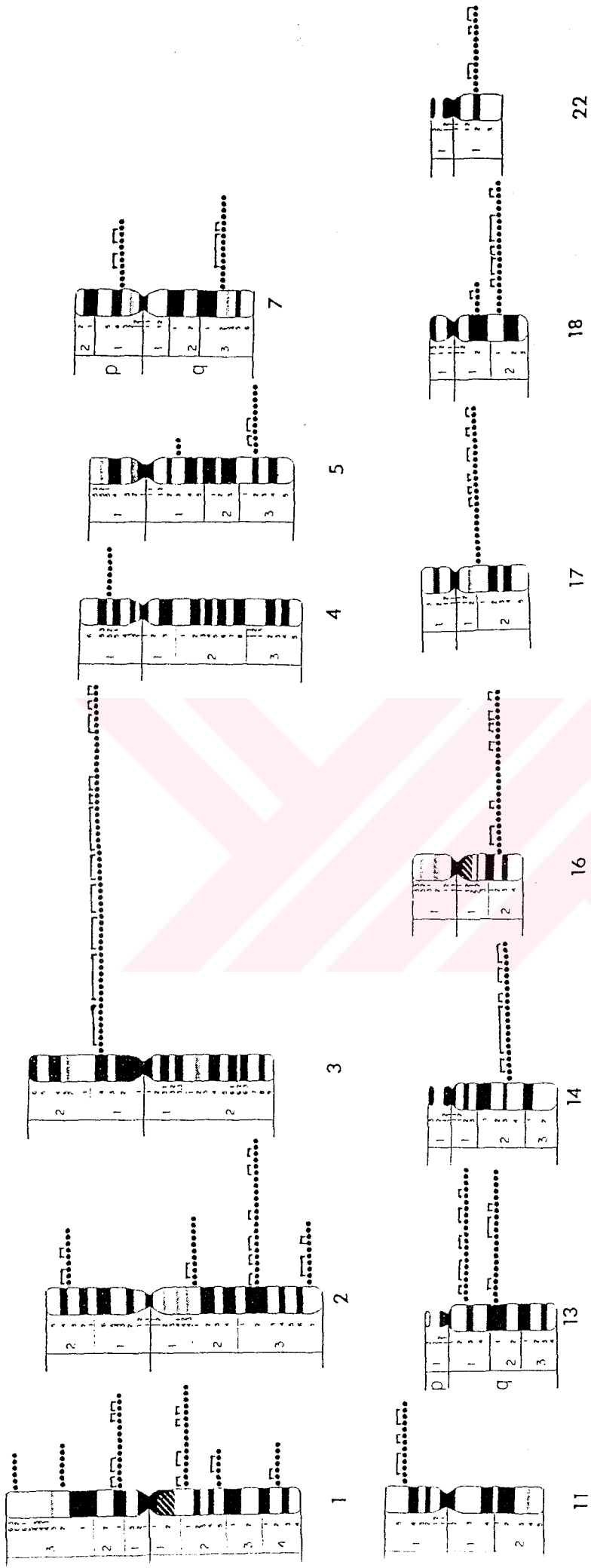
Hasta olgular ve akrabalarında belirlenen gap ve kırık noktalarının kromozomal lokalizasyonları Şekil 4.1 ve 4.2’de , her üç grupta saptanan kırık noktaları ise Çizelge 4.3-4.5’de verildi.





Şekil 4.1: Meme Kanserli Hastalarda Belirlenen Aberasyonların Kromozomlar Üzerindeki Lokalizasyonları.

- : Gap ve Kırık Noktaları
- * : Bir Bireyde Belirlenen Aberasyonlar.



Şekil 4.2: Meme Kanserli Hastaların Akrabalarında Belirlenen Aberasyonların Kromozomlar Üzerindeki Lokalizasyonları.

Çizelge 4.3. : Meme kanserli hastalarda belirlenen gap ve kırık noktaları.

Vaka No	Hasta
1	2x1p32, 1p36, 2x1q21, 1q25, 1q31-32, 1q42, 2x2p23, 4x2q31-33, 2q35, 5x3p14, 3q21-23, 3q28, 2x5q31-33, 6p22, 6q21, 7p13, 10q21-22, 17q21, 18q12, 18q21
2	3x1p21, 1p32, 1p36, 2x1q25, 1q42, 2p16, 2x2p23, 3x3p14, 3q27, 5q21-22, 2x5q31-33, 7p13, 2x7q32, 8q22-24, 9q22, 11p12-13, 15q21,
3	2x1q25, 2p16, 2q37, 2x3p14, 3q25-26, 6q27,
4	1p21, 1p36, 5q31-39, 7q32, 2x13q12-13
5	3x1p21, 1p32, 1p36, 1q21, 2x1q25, 2p24, 2q21, 2x2q31-33, 3p11-13, 3x3p14, 3p21, 3q27, 5p13-15, 7p22, 7q32, 8q22, 13q21, 14q24
6	1q42, 2q31-33, 2q37, 3p14
7	2q21, 2x3p14, 5p13, 13q12-13
8	2q21, 14q23-24
9	2x1p36, 1q21, 2x1q42, 1q42, 2p13, 2p21, 2x2q31-33, 2x2q37, 4p15, 9q12, 13q21
10	1q25, 2q44, 2x3p14, 6q21, 6q27, 3x7q21-22, 7q32, 11p14-15, 13q12-13, 13q21
11	1p32, 1p36, 1q25, 2x2q31-33, 5p13, 2x5q31-33, 11p14-15, 13q12-13, 4x13q21, 14q23-24, 17q21
12	2x1p32, 2x1p36, 2x1q25, 2x2q31-33, 2x3p14, 4x14q23-24, 2x16q23-24, 2x17q21, 2x18q21
13	2x1p21, 1p32, 1p36, 1q21, 1q25, 1q31-32, 2x2q31-33, 2q37, 3x3p14, 2x5p13, 5q13-15, 5q31-33, 7p13, 7q21-22, 1q23, 2x13q12-13, 2x13q21, 17q21
14	2x1p21, 1p36, 1q42, 2p13, 2p23, 2q21, 2x2q37, 7p13, 7q21-22, 2x13q12-13, 14q23-24, 2x17q21, 18q21, 22q12
15	2x1p21, 3x1q21, 2p13, 4x2q31-33, 2q37, 4x3p14, 3q25-26, 4p15, 5p13, 5q13-15, 5q35, 6q27, 12q14, 13q12-13, 13q21, 13q31, 2x14q23-24, 16q12-13, 16q21, 4x16q23-24, 2x17q21, 18q12, 2x22q12
16	2x1p21, 2p23, 2q31-33, 2q37, 3p14, 4p15, 5q31-33, 7p13, 11p12-13, 11q23, 2x13q12-13, 2x13q21, 15q21, 18q12
17	1p36, 1q42, 13q31
18	2q37
19	2q31-33, 5q31-33, 6q27, 15q21, 22q12
20	14q23-24, 13q21, 2x16q23-24, 17q21
21	2q31-33, 13q21, 18q21
22	13q21
23	-
24	2x3p14, 15q21
25	1p36, 2q21, 2q33, 3p14-21, 17q21, 2x22q12
26	3p14, 3q28, 4p14, 11p12-13, 13q21, 13q31, 17q21
27	-
28	1p36, 1q21, 2p13, 3p14, 3p24, 3q28, 2x4p15, 5q31-33, 7p12, 2x7p14, 7q31, 13q14, 14q24, 16q23, 17q21, 3x18q21, 2x22q12
29	1p21, 1p32, 1p36, 2x3p014, 7p22, 2x11p13-14, 13q21, 16q21, 18q12
30	3x1p21, 2x1p31-33, 1q25, 1q44, 8x3p14, 7q32, 3x11p14, 13q21, 2x14q24, 16q23, 5x17q21, 18q21, 20p12, 4x22q12
31	3x1p21, 1p32, 2x2p24, 2q37, 4x3p14, 2x7q32, 11p14, 3x16q23, 18q21, 2x22q12
32	1q21, 2p24, 2q21, 2q31-33, 2p14, 2x14q24, 2x16q23, 18q12
33	2q37, 3p14, 7q32
34	1p32, 1q25, 3p14, 3q31-33, 13q12-13, 2x16q23
35	2p13, 2q33, 7p13, 2x11p14-15, 13q13, 13q33

Çizelge 4.4. : Meme kanserli hastaların akrabalarında belirlenen gap ve kırık noktaları.

Vaka No	Akrabalar
1	2q37,3p14,3q28,4p15,11p14-15,13q21,15q21,17q21,22q12
2	2x1p21,1p36,2x1q21,1q25,1q25,1q31-32,1q42,2q21,2x2q31-33,4x2q37,7x3p14,5q31-33,11q12-13,11q23,13q12-13,13q21,16q21-23,17p13,18q21,22q12
3	2q31-33,3x13q21
4	1q21,1q25,1p32,2x5q31-33,7q32,7p13,2x13q12-13,17q21
5	3x1q21,2x1q42,2x2p15-16,3x2p24,3x2q21,2x2q31-33,8x3p14,3p24,5p13,5q14-15,3x5q31-33,6q21-22,7p22,12q24,4x13q12-13,14q24,4x16q21-23,18q12,18q21,3x22q12
6	1q21,3x1q25,2p15-16,2q13,3x2q31-33,2q37,6x3p14,3p21,3p24,2x5q21,5q31-33,12q21,13q12-13,3x14q24,16q21-23,18q21
7	1q42,2q31-33
8	2q21,2q31-33,7q32,16q21-23,17q21,18q12
9	3x1p21,1p32,1p36,1q42,2x2q31-33,5x3p14,4p15,5q31-33,6q22,2x6q27,3x13q12-13,2x16q21-23,17p13,17q21,17q25,20p12,22q12
10	1p21,1p36,4x3p14,4q31,5p13,6q21-22,13q21,16q21-23,17q21,20p12
11	13q21
12	-
13	16q21-23,22q12
14	1p36,2p24,4p15,5q11-12,16q21-23,22q12
15	1p32,2q31-33,5q31-33,17q21
16	-
17	1p21,1p36,3q28,12q24,13q21,13q32
18	16q21-23
19	-
20	13q21,16q21-23
21	4p15,17q21
22	1p21
23	2x1q21,2x2q31-33,4x3p14,6p22,7p14,7q32,12q24,13q13,13q21,16q24,17q21,18q21
24	1p21,1p32,2p24,2x3p14,5q21,13q21,16q21-23,2x17q21,2x18q21,20p12,20q12,22q12
25	2x1p21,2x1q21,1q23-24,2p24,2q31-33,8x3p14,4p15-16,5p13,5q31-33,6q26,6x7q32,8q24,4x11p13-14,3x13q12-13,4x13q21,8x14q23-24,16q22,3x18q21,20p12,22q12
26	2x1p21,1p36,2q21,2x2q31-33,2x3p14,4p16,2x6q27,7p14,2x7q32,11p13,11q13-14,11q23-24,13q13,2x13q21,2x16q22-23,16q24,2x18q21,2x22q12
27	1p21,1p32,2x1q21,2q21,2q33,2q37,3x3p14,6p22,6p24,3x7p14,2x7p22,7q32,3x7q36,2x11p13-14,11q23,2x13q13,2x14q24,16q23,1p13,2x17q21,2x18q12,5x18q22,20p12
28	2x2p24,2q21,3p14,4p15,7p14,7q32,13q21,14q24,2x16q23,2x17q21,18q21,20p12,3x22q12
29	1p32,12q21,17q21
30	1q21,1q44,2p13,2q21,2x2q31-33,3p14,3q21,4p15,6p22,11p13-14,13q21,3x14q24,3x17q21
31	1p31,1q21,2p13,2q21,4x3p14,3x11p13-14,13q12,13q21,2x16q23,2x17q21,18q12,18q21,22q12
32	2q33,7q32,17q21
33	2p24,2x3p14,3x7p14,11q13,13q13,13q21,16q23,2x17q21,2x18q21,20p12
34	1q21,1q44,2x2p24,2q21,2q37,2x3p14,7q32,11p13,11p13,13q13,4x14q24,2x16q23,18q21,22q12
35	7p13-14,13q21,20p12

Çizelge 4.5. : Kontrol grubunda belirlenen gap ve kırık noktaları.

Vaka No	Kontroller
1	2p24,3p14
2	2p24
3	1q44,3p14,5q31-33
4	1p21,1p32,1p36,1q21,3p14,5q31-33
5	2q37,13q12-13
6	-
7	-
8	-
9	-
10	-
11	-
12	-
13	-
14	-
15	-
16	-
17	-
18	-
19	1p31-33,1q44,2p24,2q37,3p14,14q24
20	-

Çalışmamızda materyal ve metod bölümünde belirtilen kritere göre yapılan sitogenetik değerlendirme sonrası 1p21, 1p32, 1p36, 1q21, 1q25, 1q44, 2p24, 2q21, 2q31-33, 2q37, 3p14, 4p15, 5q13, 5q31-33, 7p14, 7q32, 11p14, 13q12-13, 13q21, 14q24, 16q21-23, 17q21, 18q12, 18q21 ve 22q12 fragil bölgeleri saptandı.

Çizelge 4.6'da meme kanserli hastalara ait fragil bölge oranları, Çizelge 4.7'da meme kanserli hastaların yakınlarına ait fragil bölge oranları, Çizelge 4.8'de ise kontrol grubuna ait fragil bölge oranları verildi. Total fragil bölge oranları hastalarda % 0,24, yakınlarda % 0,26 ve kontrol grubunda % 0,031 olarak belirlendi ve Çizelge 4.9'de ise fragil bölgelerin ortalamaları, standart sapmaları ve p değerleri verildi. İstatistiksel anlamlılıkları ise total oranlarda $p < 0,001$ olarak saptandı.



Çizelge 4.9. : Meme Kanserli Hastalar, Akrabaları ve Kontrol Grubunda Belirlenen Frajl Bölgelerin Ortalama, Standart Sapma ve p Değerleri.

FRAJİL BÖLGELER	Ortalama ± Standart Sapma		
	HASTALAR	AKRABALAR	KONTROL
1p21	0.1494 ± 0.256*	0.01006±0.01953	0.00165±0.00738
1p32	0.00757± 0.01308	0.00451± 0.00939	0.00330±0.01016
1p36	0.00946± 0.01336*	0.00446±0.01019	0.00165±0.00738
1q21	0.007± 0.01887	0.01063±0.01918*	0.00165± 0.00738
1q25	0.00943±0.01552*	0.00380±0.01211	0.0000±0.0000
1q42	0.00437± 0.00911	0.00494±0.01136	0.00265±0.00842
2p23-24	0.0717±0.1394	0.00543±0.01482	0.00495±0.01209
2q21	0.00503±0.01049*	0.00760±0.01441*	0.0000±0.0000
2q31-33	0.01943±0.02919****	0.01637±0.2131****	0.0000±0.0000
2q37	0.00900±0.01612	0.00734±0.02362	0.00330±0.01016
3p14	0.3120±0.03959***	0.03817± 0.05931*	0.00595±0.01248
4p15	0.00417±0.01080	0.00560±0.01075*	0.0000±0.0000
5q13	0.00209±0.00715	0.00171±0.00568	0.0000± 0.0000
5q31-33	0.00760±0.1389	0.00740±0.01510	0.00265±0.00842
7p13-14	0.00546±0.01158*	0.00657±0.01547*	0.0000±0.0000
7q32	0.00666±0.01229*	0.00966±0.02288*	0.0000±0.0000
11p14-15	0.00629±0.01573	0.00829±0.01992*	0.0000±0.0000
13q12-13	0.01000±0.01857*	0.01294±0.02123*	0.00165±0.00738
13q21	0.01300±0.02041***	0.01460±0.02068****	0.0000±0.0000
14q24	0.01197±0.02208*	0.01357±0.03463	0.00165±0.00738
16q21-23	0.01343±0.03169*	0.01763±0.02062****	0.0000±0.0000
17q21	0.01323±0.02363***	0.01729±0.01954****	0.0000±0.0000
18q12	0.00389±0.00985	0.00337±0.00988	0.0000±0.0000
18q21	0.00646±0.01447*	0.01309±0.02267***	0.0000±0.0000
22q12	0.01023±0.02225*	0.01046±0.01791**	0.0000±0.0000
TOPLAM	0,239 ± 0,222****	0,255 ± 0,258****	0,031 ± 0,062

* p < 0,05

** p < 0,01

*** p < 0,005

****p < 0,001

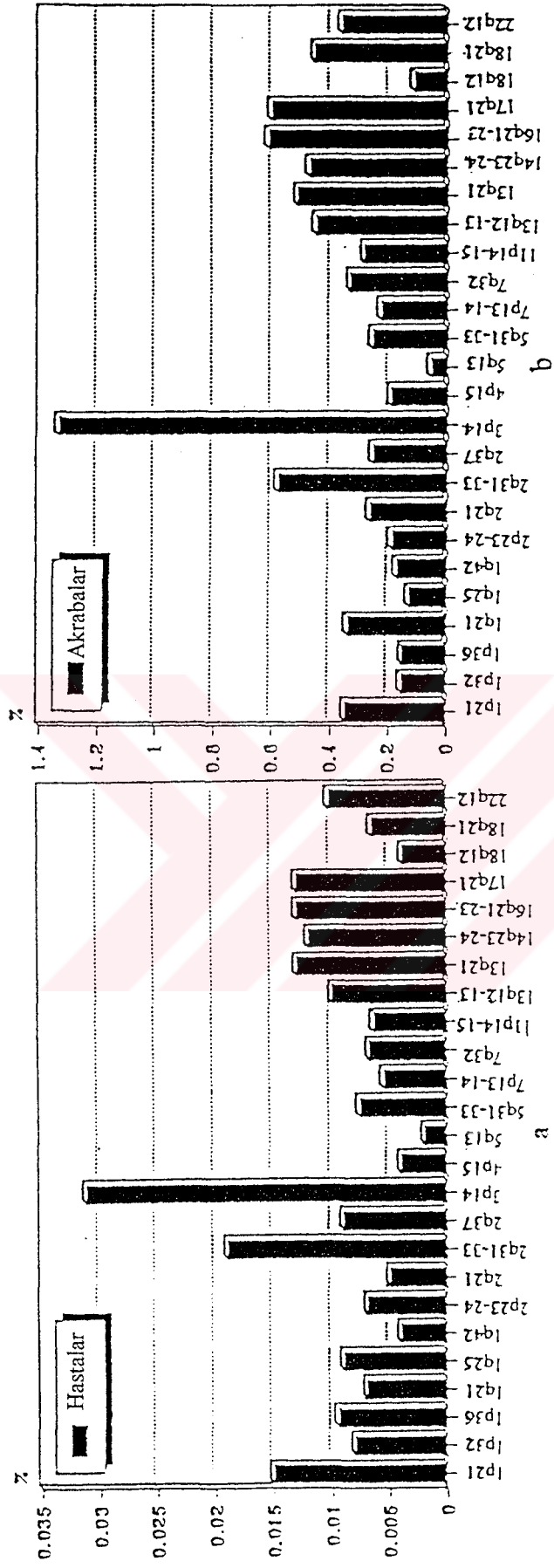
Çizelge 4.10’da frajil bölgeler analiz edildi. Hasta ve yakınlarında belirlenen frajil bölgelerin sayıları (kaç kez görüldükleri), kaç olguda, hangi oranda görüldükleri ve frajil bölge sıklıkları verildi.

Şekil 4.3’te meme kanserli hastalara ve yakınlarına ait frajil bölge sıklıkları grafik üzerinde açıklandı. Şekil 4.4’te ise frajil bölgelerin hasta ve yakınlarında kaç kez görüldükleri sayılarla elde edilen grafik verildi.

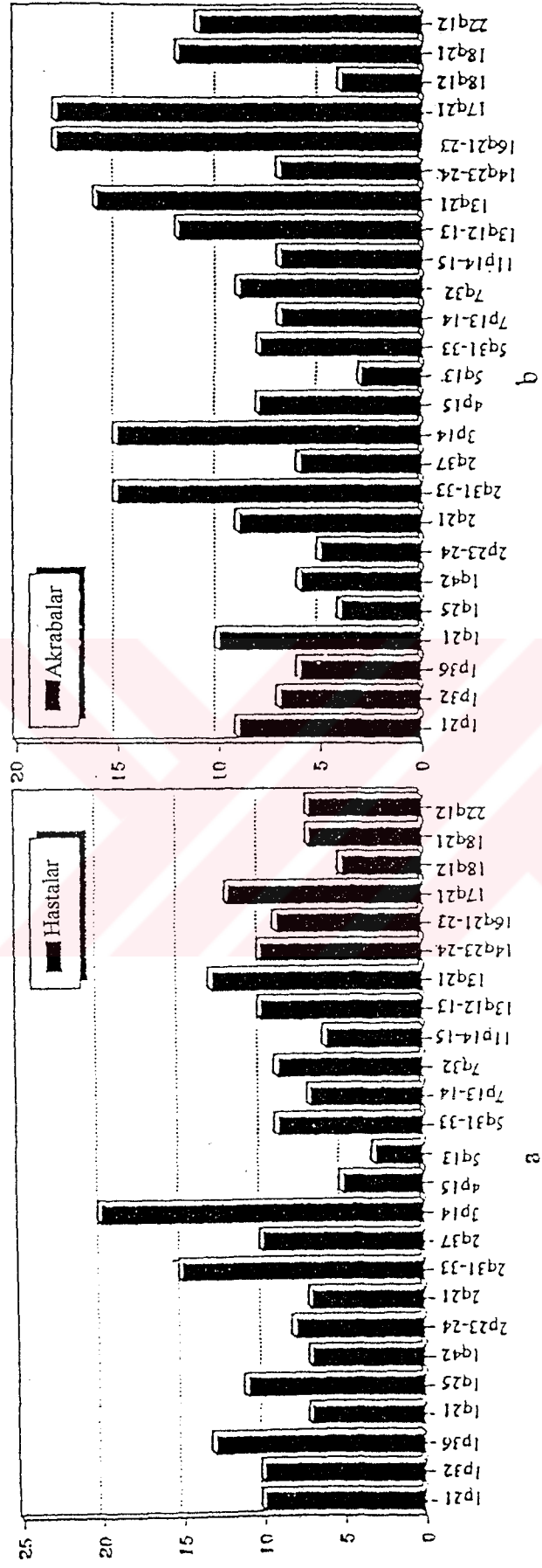


Çizelge 4.10 :Frajil bölgelerin analizi.

Frajil Bölgeler	Frajil Bölge Sayısı		Her bireydeki Frajil Bölge sayısı ve yüzdesi		Frajil Bölge Sıklıkları	
	Hasta	Akraba	Hasta	Akraba	Hasta	Akraba
1p21	22	15	10(28.6)	9(25.7)	0.523	0.352
1p32	13	7	10(28.6)	7(20)	0.265	0.158
1p36	15	6	13(37.1)	6(17.1)	0.331	0.156
1q21	10	16	7(20)	10(28.6)	0.245	0.372
1q25	16	6	11(31.4)	4(11.4)	0.33	0.133
1q42	7	7	7(20)	6(17.1)	0.153	0.176
2p23-24	11	9	8(22.9)	5(14.3)	0.241	0.19
2q21	7	11	7(20)	9(25.7)	0.176	0.266
2q31-33	27	23	15(42.9)	15(42.9)	0.68	0.579
2q37	12	10	10(28.6)	6(17.1)	0.315	0.257
3p14	49	58	20(57.2)	15(34.3)	1.092	1.336
4p15	6	8	5(14.3)	8(22.9)	0.146	0.196
5q13	3	3	3(8.6)	3(8.6)	0.073	0.06
5q31-33	12	11	9(25.7)	8(22.9)	0.266	0.259
7p13-14	8	11	7(20)	7(20)	0.191	0.23
7q32	11	15	9(25.7)	9(25.7)	0.233	0.338
11p14-15	10	13	6(17.1)	7(20)	0.22	0.29
13q12-13	14	21	10(28.6)	12(34.3)	0.35	0.453
13q21	19	21	13(37.1)	16(45.7)	0.455	0.516
14q23-24	18	22	10(28.6)	7(20)	0.419	0.475
16q21-23	19	26	9(25.7)	18(51.4)	0.47	0.617
17q21	19	25	12(34.3)	18(51.4)	0.463	0.605
18q12	5	5	5(14.3)	4(11.4)	0.136	0.118
18q21	10	21	7(20)	12(34.3)	0.226	0.458
22q12	14	16	7(20)	11(31.4)	0.358	0.366



Şekil 4.3 : Fragil Bölgelerin Hastalarda (a) ve Yakınlarında (b) Görülme Sıklıkları.



Şekil 4.4 : Meme Kanseri Hastalarda (a) ve Akrabalarında (b) Belirlenen Fajil Bölgelerin Sayıları

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Mevcut çalışmamız meme kanserli hastalar ve bunların birinci derece akrabalarında kromozomal insitabilitesinde artış olduğunu göstermiştir (Çizelge 4.9). Bu bulguları common fragil bölgelerin insan somatik genomunda insitabiliteyi yansıtan bölgeler olabileceğini düşündürmektedir.

Son yıllarda bazı araştırmacılar tarafından bu konuda pozitif bulgular (Ardisia ve ark.1993, Porfirio ve ark.1989, Paz-y-Mina ve ark.1997), bazı araştırmacılar tarafından negatif bulgular elde edilmiştir (Mitchell ve ark.). Yapılan çalışmalarda, değişik kanser tiplerine sahip hastaların (Ardisia ve ark.1993, Porfirio ve ark.1989, Paz-y-Mina ve ark.1997, Liu ve ark.1989, Dave ve ark.1994, Le Beau.1988, Tunca ve ark.1997, Zorluoğlu ve ark. 1997) ve onların birinci derece akrabalarının (Liu ve ark. 1989, Vernole ve ark. 1994, Egeli ve ark. 1997, Tunca ve ark.1997, Zorluoğlu ve ark.1997) normal hücrelerinde fragil bölge ekspresyon farklılıklarına işaret edilmektedir. Bazı araştırmacılar ise fikri fragil bölgelerin tüm insanların genomunda bulunmasından dolayı reddetmektedir. Fakat fragil bölgeler tüm insanların genomunda bulunmalarına rağmen farklı sıklıklarda görülürler (Çizelge 4.6-4.8). Bu nedenle fragil bölge çalışmaları karakteristiktir.

1993'te Mitchell ve arkadaşları meme kanserli hastalar üzerinde gerçekleştirdiği fragil bölge çalışmasında sağlıklı kontrol grubu bireylere göre fragil bölge ekspresyon sıklıklarında anlamlı bir farklılık saptayamamışlardır. Bu durumun nedeni vaka sayısının azlığı olabilir. Çünkü fragil çalışmalarında vaka sayısının fazlalığı istatistiki anlamlılığın ortaya konması için en önemli faktörlerden birisidir. Bizde bu düşünceden hareketle toplam 90 bireyden (35 hasta, 35 yakın ve 20 kontrol) oluşan grupta çalışmamızı gerçekleştirdik (Çizelge 4.1).

Çalışmamızda gerçekleştirilen sitogenetik ve istatistiki testlerle hasta ve yakınlarına ait gruplarda kontrol grubuna göre özellikle fra (3)(p14), (1)(p36), (2)(q31-33), (5)(q31-33), (16)(q22-23) bölgelerinin ekspresyon sıklığının anlamlı şekilde arttığı belirlendi. Yapılan moleküler genetik çalışmalarda bu bölgelerde onkogen, tümör süpressör ve mismatch repair genlerinin bulunduğu gösterilmektedir. Fra (3)(p14) ekspresyon sıklığı akciğer, baş boyun, kolorektal ve ovaryum kanserlerinde bildirilmiştir. (Liu ve ark.1989, Egeli ve ark.1997, Tunca ve ark.1997, Zorluoğlu ve ark 1997, Kok ve ark 1987). Bu bölgenin tüm kanser tiplerinde primer bölge olduğu

düşünülmektedir. RFLP analizi ile birçok tümör dokusunda 3p14 ve 3p21 kromozom bant bölgelerinde delesyon olduğu gösterilmiştir (Kok ve ark 1987). Bu bölgelerde bilindiği gibi putativ tümör süpressör gen olan FHIT ve mismatch repair genlerinden hMLHI lokalizedir (Sozzi ve ark 1996, Marra ve ark 1995).

Mevcut çalışmamızda bazı frajil bölgelerin ekspresyonunda hasta ve yakınların kontrol grubu ile karşılaştırılması sonucu anlamlı farklar gözlenmiştir. (Çizelge 4.9-4.11, $p < 0.05$). Bu bölgeler fra(2)(q21), fra(2)(q31-33), fra(3)(p14), fra(7)(p13-14), fra(7)(q32), fra(13)(q12-13), fra(13)(q21), fra(16)(q21-23), fra(17)(q21), fra(18)(q21) ve fra(22)(q12) bölgeleridir ve kanımızca meme kanserleri için spesifiktir. Çünkü bu bölgeler onkogenlerin, tümör süpressör genlerin ve mismatch repair genlerinin bulunduğu bölgelerdir.

Bilindiği gibi kanserin oluşum mekanizmasında tümör süpressör genler önemli yer tutmaktadır. Tümör süpressör genlerin içinde yer alan BRCA1 (17q21) ve BRCA2 (13q12-13) genleri meme kanserinden birinci derecede sorumlu olan genlerdir (Easton ve ark 1993, Narod ve ark 1995). Bu genlerdeki somatik ve germline mutasyonları meme kanserine veya predispozisyonuna neden olur. Mevcut çalışmamızda BRCA1 ve BRCA2 gen bölgelerinde frajilite belirlenmesi bu yüzden oldukça anlamlıdır. Biz kanserde önemli rolü olan bu genlerle bizim tespit ettiğimiz frajil bölgeler arasında korelasyonun rastlantısal olmadığını düşünmekteyiz. Bu ilişkinin genetik predispozisyonu işaret eden ve meme kanserinde erken tanıda fikir verebilecek bir parametre olabileceğini düşünmekteyiz.

Aphidicolin bir α ve δ DNA polimeraz inhibitörüdür. Bu ajan DNA sentezinde ve replikasyonunda direkt olarak etkilidir (Lön ve ark 1983, Reidy 1988). Aynı zamanda aphidicolin DNA onarım mekanizmasında da inhibitör etkisi göstermektedir. Bu etkilerin sonucunda aphidicolin kromozom instabilitesinde değişiklik yaparak kromozomal aberasyonların oluşmasına neden olmaktadır. Çalışmamızda kromozom hasarları ve frajil bölge sıklıkları aynı dozda aphidicolin verilen sağlıklı kontrol bireylerde hastalar ve yakınlarına oranla oldukça düşük değerlerde bulunmuştur. Kontrol bireylerde değerlerin stabil olması aphidicolinin DNA sentez ve onarım inhibitörü olarak bu bireylerin kromozomal DNA'larında etki göstermediğini açıklamaktadır. Çeşitli araştırmacılar akciğer, baş boyun kanserliler ve bunların ilk generasyonlarındaki bireylerinde yaptıkları çalışmalarda DNA onarım kapasitesindeki

imbalansı işaret etmişlerdir. (Liu ve ark. 1989, Egeli ve ark. 1997, Marra ve ark. 1995, Stimson ve ark 1989). Liu ve ark. (1989)ve Egeli ve ark (1997) akciğer kanserli hasta ve yakınlarının periferik kan lenfosit kültürlerinde gerçekleştirdikleri çalışmalarda bu bireylerdeki fragil bölge ekspresyonundaki artışın genetik predispozisyonu gösterdiğini belirtmişlerdi.

Son yıllarda gerçekleştirilen moleküler genetik çalışmalarda kolon kanserli hastalarda hPMS1, hPMS2, hMLH1 ve hMLH2 gibi mismatch repair genlerinde germline mutasyonlarının varlığı bildirilmiştir. (Marra ve ark. 1995). Frajilite saptadığımız hPMS1 geninin lokalize olduğu 2q31-33 band bölgesinde kolorektal kanserli hastalar ve birinci derece akrabalarında yapılan çalışmalarda fragil bölge ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir (Tunca ve ark. 1997, Zorluoğlu ve ark. 1997).

Sonuç olarak common fragil bölgeler insan genomundaki stabil olmayan bölgelerdir. Çalışmamız bu bölgelerin ekspresyonunun meme kanserinin erken tanısında ve meme kanserine genetik yatkınlığın belirlenebilmesinde fikir veren uygun bir marker olabileceğini göstermektedir. Ayrıca bu tür çalışmalar kanserin erken tanısında, kanser oluşumunun biyolojik mekanizmasının açıklanmasında ve kanser tedavisinde yardımcı olabilir. Ancak bu tip çalışmaların moleküler genetik çalışmalarla da desteklenmesi gerekmektedir.

6. KAYNAKLAR

ABRUZZO, M., P.A. HUNT, M. MAYER, P.A. JACOBS, J.C.C. WANG, R.W. ERBE 1986. A comparison of fragile X expression in lymphoblastoid cultures. *Am J Hum Genet*, 38:533-539.

AHMADIAN, M., I. WISTUBA, et al. 1997. Analysis of the FHIT Gene and FRA3B region in sporadic Breast Cancer, preneoplastic lesions, and familial Breast Cancer probands. *Cancer Res*, 57:3664-3668.

ARDISIA, C., G. VENTI, M.V. COLOZZA, et al. 1993. Expression of aphidocolin - induced fragile sites in Lymphocytes of patients with breast cancer. *Cancer Genet Cytogenet*, 67:113-116.

AULA, P., H. VON KOSKULL 1976. Distribution of spontaneous chromosome breaks in human chromosome. *Hum Genet*, 32:143-148.

AYME, S., J.F. MATTEI, G.M. MATTEI, Y. AURRAN, F. GIRAUD 1976. Nonrandom distribution of chromosome breaks in cultured lymphocytes of normal subjects. *Human Genetik*, 31:161-175.

BARBI, G., P. STEINBACH, W. VOGEL 1984. Nonrandom distribution of methotrexate-induced aberrations in human chromosome. Detection of further folic acid sensitive fragile sites. *Hum Genet*, 68:290-294.

BENACHENHOU, N., G. SEBASTIEN, G.F. IZABELLA, L. DANISAN, D. SINNETT 1998. High resolution deletion mapping reveals frequent allelic losses at the DNA mismatch repair loci hMLH1 and hMSH3 in non-small cell lung cancer. *Int. J. Cancer*, 77:173-180.

BENDER, M.A. 1989. Time course of enhancement of chromosomal aberration production in human lymphocytes by post-treatment with aphidicolin following X-irradiation in G2. *Mutat Res*, 213:175-183.

BENET, J., A. GENESCA, J. NAVARRO, R. MIRO, J. EGOZCUE, C. TEMPLADO 1989. Expression of fragile sites in human sperm and lymphocyte chromosomes. *Hum Genet*, 81:239-242.

BENJAMIN, C.L., G.K. GARMAN, J.H. FUNSTON 1997. *Human Biology*, The McGraw-Hill Printed in USA, p 103-107.

BERGER, R., C.D. BLOOMFIELD, G.R. SUTHERLAND 1985. Report of committee on chromosome rearrangements in neoplasia and on fragile sites. Eight International Workshop on Human Gene Mapping. *Cytogenet Cell Genet*, 40:490-535.

BIRCH, J.M. 1992. Germline mutations in the p53 tumor suppressor gene : scientific, clinical and ethical challenges. *British Journal of Cancer*, 66:424-6.

BLAND, K.I., E.M. COPELAND 1991. *The Breast Comprehensive of Bening and Malignant Disease*, Philadelphia, Saunders.

BLANQUET, V., N. CREAU-GOLDBERG, J. DE GROUCHY 1991. Molecular detection of constitutional deletions in patients with retinoblastoma. *American Journal of Medical Genetics*, 39:355-61.

BOOKSTEIN, R., P. RIO, S.A. MADREPERLA, et al., 1990. Promoter deletion and loss of retinoblastoma gene expression in human prostate carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 87:7762-6.

BRESSAC, B., M. KEW, J. WANDS, and M. ÖZTÜRK 1991. Selective G to T mutations of p53 gene in hepatocellular carcinoma from southern Africa. *Nature*, 350:429-436.

BYRNES, J.J. 1984. Structural and functional properties of DNA polymerase delta rabbit bone marrow. *Mol Cell Biochem*, 62:13-24.

CAPOROSSO, D., S. BACHETTI, B. NICOLETTI 1991. Synergism between aphidicolin and adenoviruses in the induction of breaks at fragile sites on human chromosomes. *Cancer Genet Cytogenet*, 54:39-53.

CLAUS, E.B., N. RISCH, W.D. THOMPSON 1991. Genetic analysis of breast cancer in the cancer and steroid hormone study. *Am J Hum Genet*, 48:232-242.

CLAUS, E.B., N. RISCH, D. THOMPSON 1994. Autosomal dominant inheritance of early-onset breast cancer. Implication for risk prediction. *Cancer*, 73:643-51.

CLEAVER, J.E. 1982. Specificity and completeness of inhibition of DNA repair by novobiocin and aphidicolin. *Carcinogenesis*, 3:1171-1174.

COOPER, M.G. 1997. *The Cell. A Molecular Approach*. ASM press, Washington D.C USA, pp 561-577.

COX, T.M., J. SINCLAIR J. 1997. *Molecular Biology in Medicine*. Blackwell Science Ltd, Oxford UK, pp 176-179.

CORDON-CARDO, C., D. WARTINDER, D. PETRLAK, et al., 1992. Altered expression of the retinoblastoma gene product prognostic indicator in bladder cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 84:1251-61.

CRAIG-HOLMES, A.P., L.C. STRONG, A.GOODACRE, S. PATHAK 1987. Variation in the expression of aphidicolin-induced fragile sites in human lymphocyte cultures. *Hum Genet*, 76:134-137.

CROCI, C. 1983. BrdU-sensitive fragile site on the long arm of chromosome 16. *Am J Hum Genet*, 35:530-533.

DANIEL, A., L.EKBLOM, S. PHILLIPS 1984. Constitutive fragile sites 1p31, 3p14, 6q26 and 16q23 and their uses as controls for false-negative results with the fragile-X. *Am J Med Genet*, 18:483-491.

DAS, S.K., C.C. LAU, A.B. PARDEE 1984. Comparative analysis of caffeine and 3-aminobenzamide as DNA repair inhibitors in Syrian baby hamster cells. *Mutat Res*, 131:71-79.

DAVE, B.J., T.C.HSU, W.K. HONG, S. PATHAK 1994. Nonrandom distribution of mutagen-induced chromosome breaks in lymphocytes of patients with different malignancies. *Int J Oncol*, 5:733-740.

DE BRAEKELEER, M. 1985. Fragile sites and chromosome breakpoints in constitutional rearrangements. *Clin Genet*, 27:523-524.

DE BRAEKELEER, M. 1987. Fragile sites and chromosomal structural rearrangements in human leukemia and cancer. *Anticancer Res*, 7:417-422.

DE LA CHAPELLE, A., and R. BERGER 1983. Seventh international workshop on human gene mapping. Report of the committee on chromosomal rearrangements in neoplasia and on fragile sites. *Cytogenet Cell Genet*, 37:274-311.

DONEGAN, W.L., J.S. SPRATT 1995. *Cancer of the Breast*, WB Saunders Company, 4th edition.

DRESLER, S.L., M.G. FRATTINI 1986. DNA replication and UV-induced DNA repair synthesis in human fibroblasts are much less than DNA polymerase α inhibition by butylphenyl-deoxyguanosine triphosphate. *Nucl Acid Res*, 14:7093-7102.

EASTON, D., D. FORD, J. PETO 1993. Inherited susceptibility to breast cancer. *Cancer Surg* 18:95-113.

EELES, R.A. 1993. Presictive testind for germline mutations in the p53 gene:are all the questions answered? *European Journal of Cancer*, 29A:1361-5.

EGELİ, Ü., M. KARADAĞ, B. TUNCA, N. ÖZYARDIMCI 1997. The expression of common fragile sites and genetic predisposition to squamous cell lung cancers. *Cancer Genet Cytogenet*, 95: 153-158.

ESRIG, D., D. ELMAJIAN, S. GROSHEN, et al., 1994. Accumulation of nuclear p53 and tumor progression in bladder cancer. *The New England Journal of Medicine*, 331:1259-65.

FERGUSON-SMITH, M.A. 1973. Inherited constriction fragility of chomosome 2. *Ann Genet*, 16:29-34.

FREEMAN, H.P., and T.J. WASFIE 1989. Cancer of the Breast in poor black women. *Cancer*, 63:2562-2569.

FRIEDMAN, S.H., T.P. DRYJA, R.A. WEINBERD 1988. Oncogenes and tumor suppressing genes. "J.S. Flier, L.H. Underhill (Editors), *Seminars in Medicine for the Beth Israel Hospital, Boston*, 618-22.

FRIEND, S.H., R. BERNARDS, S.ROGELJ, et al., 1986. A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. *Nature*, 323:643-6.

FUNDIA AF, I.B. LARRIPA 1989. Coincidence of fragile site expression with fluorodeoxyuridine and bromodeoxyuridine. *Cancer Genet Cytogenet*, 41:41-48.

FURUYA, T., J. HAGIWARA, H. OCHI, H. TOKUHIRO, R. KIKAWADA, T. KARUBE, S. WATANABE 1991. Changes of common fragile sites on chromosomes according to the menstrual cycle. *Hum Genet*, 86:471-474.

FUSTER, C., R. MIRO, C. TEMPLADO, L. BARRIOS, V. MORENO, J. EGUZCUE 1989. Fragile sites and breakpoints in constitutional rearrangements and in human sperm chromosomes. *Hum Genet*, 82:330-334.

FUTREAL, P.A., Q. LIU, D. SHATTUCK-EIDENS, C. COCHRAN, et al., 1994. BRCA1 mutations in primary breast and ovarian carcinomas. *Science*, 266:120-2.

FIRAT, D., and M. HAYRAN, 1995. Cancer statistics in Turkey and in the world 1990-1992. Turkish Association for cancer Research and Control, İz Matbaacılık, Ankara.

GARCIA-PATINO, E., B. GAMENDIO, M. LLEONART, et al. 1998. Loss of heterozygosity in the region including the BRCA1 gene on 17q in colon cancer. *Cancer Genet Cytogenet*, 104:119-123.

GARCIA-SAGREDO, J.M., C. SAN ROMAN, G. GALLEGU GOMEZ MEI LIEDO 1983. Fragile chromosome 16(q22) cause a balanced translocation at the same point. *Hum Genet*, 65:211-213.

GIRAUD, F., S. AYME, J.F. MATTEI, M.G. MATTEI 1976. Constitutional chromosomal breakage. *Hum Genet*, 34:125-136.

GLOVER, T.W. 1981. FUdR induction of the X chromosome fragile site: Evidence for the mechanism of folic acid and thymidine inhibition. *Am J Hum Genet*, 33: 234-242.

GLOVER, T.W., C. BERGER, J. COYLE, B. ECHO 1984. DNA polymerase- α inhibition by aphidicolin induces gaps and breaks at common fragile sites in human chromosomes. *Hum Genet*, 67:136-142.

GLOVER, T.W. 1985. Biochemistry of fragile site expression. In Sutherland GR and Hecht F. Fragile sites an human chromosomes. Oxford Press, New York, pg 80-94.

GLOVER, T.W., C.K. STEIN 1988. Chromosome breakage and recombination at fragile sites. *Am J Hum Genet*, 43:265-273.

GOLDGAR, D.E., D.F. EASTON, L.A. CANNON-ALBRIGHT, et al., 1994. Systematic population based assessment of cancer risk in first degree relatives of cancer probands. *Journal of the National Cancer Institute*, 86:1600-8.

GONZALEZ-FERNANDEZ, A., P. HERNANDEZ, J.F. LOPEZ-SAEZ 1985. Effect of caffeine and adenosine on G2 repair: mitotic delay and chromosome damage. *Mutat Res*, 14:275-281.

GOULIAN, M., B. BLEILE, B.Y. TSENG 1980. Methotrexate-induced misincorporation of uracil into DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 77:1956-1960.

GREEN, R.J., D.L. PHILLIPS, A.T.L. CHEN, L.A. REIDY, A.H. RAGAB 1988. Effects of folate in culture medium on common fragile sites in lymphocyte chromosome from normal and leukemic children. *Hum Genet*, 81:9-12.

GREENBLATT, M.S., W.P. BENNET, M. HOLLSTEIN, et al., 1994. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Research*, 54:4855-78.

GRODEN, J., A. THLIVERIS, W. SAMOWITZ, et al., 1991. Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene. *Cell*, 66:589-600.

GUICHAOUA, M., M.G. MATTEI, J.F. MATTEI, F. GIRAUD 1982. Aspects genetiques des sites fragiles autosomiques. A propos de 40 cas. *J Genet Hum*, 30:183-197.

HAHN, F.E. 1975. Distamycin A and netropsin. In: Antibiotics vol.III. "J.W. Corcoran and F.E. Hahn (Editörs), Berlin, Heidelberg, New York, Springer, pp. 79-100.

HANN, S.A., M. SCHUTTE, A.T. HOQUE, et al., 1996. DPC4, a candidate tumor suppressor genet at human chromosome 18q21.1. *Science*, 271(5247): 350-353.

HANSEN-HAGGE, T.E., et al. 1998. An evolutionarily conserved gene on human chromosome 5q33-34, UBH1, encodes a novel deubiquitinating enzyme. *Genomics*, 49:411-418.

HARBOUR, J.W., S.L. LAI, J. WHANG-PENG, et al., 1988. Abnormalities in structure and expression of the human retinoblastoma gene in SCLC. *Science*, 241:353-7.

HARRISON, C.J., E.M. JACK, T.D. ALLEN, R. HARRIS 1983. The fragile X: a scanning electron microscope study. *J Med Genet*, 20:280-285.

HARVEY, J., C. JUDGE, S. WIENER 1977. Familial X-linked mental retardation with an X chromosome abnormality. *J Med Genet*, 14:46-50.

HAYASHI, S., K. TANIMOTO, et al. 1997. Abnormal FHIT transcripts in human breast carcinomas: a clinipathological and epidemiological analysis of 61 Japanese cases. *Cancer Res*, 57:1981-1985.

HECHT, F. 1986. Rare, polymorphic, and common fragile sites: a classification. *Hum Genet*, 74:207-208.

HECHT, F., K.H. RAMESH, D.H. LOCKWOOD 1990. A guide to fragile to sites on human chromosomes. *Cancer Genet Cytogenet*, 44:37-45.

HERMANEK, P., L.E. SOBIN 1987. TNM Classification of malignant tumors. 4th edition, Berlin, Springer-Verlag.

HOROWITZ, J.M., S.H. PARK, E. BOGENMANN, et al., 1990. Frequent inactivation of the retinoblastoma antioncogene is restricted to a subset of human tumor cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 87:2775-9.

HORI, T., E. TAKAHASHI, M. MURATA 1988. Nature of distamycin A-inducible fragile sites. *Cancer Genet Cytogenet*, 34:189-194.

HUNTER, T., J. PINES 1994. Cyclins and cancer II: cyclin D and CDK inhibitors come of age. *Cell*, 79:573-82.

IKEGAMI, S., T. TAGUCHI, M. OHASHI, M. OGURO, H. NAGANO, Y. MANO 1978. Aphidicolin prevents mitotic cell division by interfering with the activity of DNA polymerase α . *Nature*, 274:458-460.

JACKSON, M.H. 1989. *Environmental Health Reference Book*, Butterworths, Part 13.

JACKY, P.B., and G.R. SUTHERLAND 1983. Thymidylate synthetase inhibition and fragile site expression in lymphocytes. *Am J Hum Genet*, 34:1276-1283.

JIRICNY, J. 1994. Colon cancer and DNA repair: have mismatches met their match? *Trends in Genetics*, 10:164-8.

JOSLYN, G., M. CARLSON, A. THLIVERIS, et al., 1991. Identification of deletion mutations and three new genes at the familial polyposis locus. *Cell*, 66:601-13.

KAHKONEN, M. 1988. Population cytogenetics of folate-sensitive fragile sites. Common fragile sites. *Hum Genet*, 80:344-348

KAO-SHAN, C.S., J. WHANG-PENG, E.C. LEE, B.A. CHABNER 1987. Increased fragile sites and sister chromatid exchanges in bone marrow and peripheral blood of young cigarette smokers. *Cancer Res*, 47:6278-6282.

KINZLER, K.W., M.C. NILBERT, L.K. SU, et al., 1991. Identification of FAP Locus genes from chromosome 5q21. *Science*, 253:661-5.

KOK, K., J. OSINGA, B.M. DARIS, et al. 1987. Deletion of DNA sequence at the chromosomal region 3p21 in all major types of lung cancer. *Nature*, 330:578-581.

KNUDSON, J.R. 1985. Hereditary cancer, oncogenes and antiancogenes. *Cancer Research*, 45:1437-43.

KUNZ, B.A. 1982. Genetic effects of deoxyribonucleotide pool imbalances. *Environ Mutagenesis*, 4:695-725.

KURZROCK, R., M. TALPAZ 1996. *Molecular Biology in Cancer Medicine*. Martin Dunitz Ltd, UK, chapter 16, pp 98-111.

KUWANO, A., and T. KAJII 1987. Synergistic effect of aphidicolin and ethanol on the induction of common fragile sites. *Hum Genet*, 75:75-78.

KYRITSIS, A.P., M.L. BONDY, M. XIA, et al., 1994. Germline p53 gene mutations in subsets of glioma patients. *Journal of the National Cancer Institute*, 86:344-9.

LE BEAU, M. 1986. Chromosomal fragile sites and cancer-specific rearrangements. *Blood*, 67:849-858.

LE BEAU, M.M. 1988. Chromosomal fragile sites and cancer specific breakpoints. *Cancer Genet Cytogenet*, 31:55-61.

LEE, E.Y.-H.P., H. TO, J. SHEW, et al. 1988. Inactivation of the retinoblastoma susceptibility gene in human breast cancers. *Science*, 241:218-221.

LEE MYW, Y., C.K. TAN, K.M. DOWNEY, A.G. SU 1984. Further studies on calf thymus DNA polymerase purified to homogeneity by a new procedure. *Biochemistry*, 23:1906-1913.

LEJEUNE, J., J. LAFOURCADE, R. BERGER, D. ABONYI, M.O. RETHORE 1968. Endoreduplication selective du bras long du chromosome 2 chez une femme et sa fille. *CR Acad Sci Paris*, 266:24-26.

LEJEUNE, J., N. LEGRAND, J. LAFOURCADE, M.O. RETHORE, O. RAOUL, C. MAUNOURY 1982. Fragilac du chromosome X et effets de la triméthoprimine. *Ann Genet*, 25:149-151.

LEE, EYHP., H. TO, J.Y. SHEW, et al., 1988. Inactivation of the retinoblastoma susceptibility gene in human breast cancers. *Science*, 241:218-21.

LEE, W.H., R. BOOKSTEIN, F. HONG, et al., 1987. Human retinoblastoma susceptibility gene. Cloning, identification and sequence. *Science*, 235:1394-9.

LEVINE, A.J., J. MOMAND, C.A. FINLAY, 1991. The p53 tumour suppressor gene. *Nature*, 351:453-6.

LIN, S.J., X.T. ZHOU 1985. Human chromosome hot points IV. Uridine-induced hot point breaks at 3p14 and 16q23-24 and increased expression of fragile site Xq27 in folate-free medium. *Hum Genet*, 71:363-365.

LIN, S.J., Y. WU, X. ZHOU 1986. Human chromosome hot points. V. The effect of four nucleosides on chromosomes in folate-free medium. *Hum Genet*, 74:101-103.

LIN, S.J., C. FIGUEIREDO, L.J. SCIORRA, M. LEE 1987. Study of human chromosome V. The effect of four thymidine concentration and timing on the expression of uridine induced constitutive fragile sites. *Hum Genet*, 76:173-175.

LIU, B., R.E. PARSONS, S.R. HAMILTON, et al., 1994. hMSH2 mutations in hereditary nonpolyposis colorectal cancer kindreds. *Cancer Research*, 54:4590-4.

LIU, C., G. WANG, P. LI 1989. The expression frequency of common fragile sites and genetic susceptibility to lung cancers. *Cancer Genet Cytogenet*, 42: 107-117.

LON, U., S. LON 1983. Aphidicolin inhibits the synthesis and joining of short DNA fragments but not the union of 10-kilobase DNA replication intermediates. *Proc Natl Acad Sci USA*, 80: 3996-3999.

LUBS, H.A. 1969. A marker X chromosome. *Am J Hum Genet*, 21:231-244.

LUBS, H.A., J. SAMUELSON 1967. Chromosome abnormalities in lymphocytes from normal human subjects. A study of 3720 cells. *Cytogenetics*, 6:402-411.

LUTHARDT, F.W. 1982. In vitro induced expression of genomic "hot spot" at 3p14. *Am J Hum Genet*, 31:134A.

MAGENIS, R.E., F. HECHT, E.W. LOVRIEN 1970. Heritable fragile site on chromosome 16: Probable localization of haptoglobin locus in man. *Science*, 170:85-87.

MALKIN, D., K.W. JOLLY, N. BARBIER, et al., 1992. Germline mutations of the p53 tumor-suppressor gene in children and young adults with second malignant neoplasms. *The New England Journal of Medicine*, 326:1309-15.

MALKIN, D. 1994. Germline p53 gene mutations and cancer Pandora's box or open sesame? *Journal of the National Cancer Institute*, 86:326-8.

MARCUS, J.N., D.L. PAGE, et al. 1997. BRCA1 and BRCA2 hereditary breast carcinoma phenotypes. *Cancer*, 80(3):543-556.

MARKKANEN, A., K. HEINONEN, S. KNUUTILA, A. DE LA CHAPELLE 1982. Methotrexate-induced increase in gap formation in human chromosome band 3p14. *Hereditas*, 96:317-319.

MARRA, G., C.R. BOLAND 1995. Hereditary non-polyposis colorectal cancer: The syndrome, the genes, and historical perspectives. *J Nat Cancer Inst*, 87(15):1114-1125.

MARTIN, R.H. 1986. A fragile site 10q25 in human sperm chromosomes. *J Med Genet*, 23:279.

MIKI, Y., J. SWENSEN, D. SHATTUCK-EIDENS, et al., 1994. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science*, 266:66-71.

MITCHELL, E., B. WOODHOUSE, J.M. BIRCH, M. SANTIBANEZ KOREF 1993. The expression of aphidicolin induced fragile sites in familial breast cancer patients. *Cancer Genet Cytogenet*, 67:108-112.

MIYOSHI, Y., H. ANDO, H. NAGASE, et al., 1992. Germ-line mutations of the APC gene in 53 familial adenomatous polyposis patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 89:4452-6

NAGASE, H., Y. MIYOSHI, A. HORII, et al., 1992. Correlation between the location of germ-line mutations in the APC gene and the number of colorectal polyps in familial adenomatous polyposis patients. *Cancer Research*, 52:4055-7.

NAROD, S.A., D. FORD, P. DEVILEE, et al. 1995. An evaluation of genetic heterogeneity in 145 breast-ovarian cancer families: Breast Cancer Linkage Consortium. *Am J Hum Genet*, 56:254-264.

NEWMAN, B., M.A. AUSTIN, M. LEE, M. KING 1998. Inheritance of human breast cancer evidence for autosomal dominant transmission in high risk families. *Proc Natl Acad Sci USA*, 85:3044-3048.

NICOLAIDES, N.C., N. PAPADOPOULOS, B. LIU, et al., 1994. Mutations of two PMS homologues in hereditary nonpolyposis colon cancer. *Nature*, 371:75-80.

NISHIDA, C., P. REINHARD, S. LINN 1988. DNA repair synthesis in human fibroblasts requires DNA polymerase J. *Biol Chem*, 263:501-510.

NISHISHO, I., Y. NAKAMURA, Y. MIYOSHI, et al., 1991. Mutations of chromosome 5q21 genes in FAP and colorectal cancer patients. *Science*, 253:665-9.

OBE, G., H. LUERS 1972. Inter-and intrachromosomal distribution of achromatic lesions and chromatid breaks in human chromosomes. *Mutat Res*, 16:337-339

OCHI, H., S. WATANABE, T. FURUYA, S. TSUGANE 1988. Chromosome fragility of lymphocytes from breast cancer patients in relation to epidemiologic data. *Jpn. J. Cancer*, 79:1024-1030.

OFFIT, K., K. BROWN 1994. Quantitating familial cancer risk a resource for clinical oncologists. *Journal of Clinical Oncology*, 12:1724-36.

PAPADOPOULOS, N., N.C. NICOLAIDES, Y.F. WEI, et al., 1994. Mutation of a mutL homolog in hereditary colon cancer. *Science*, 263:1625-9.

PAZ-Y-MINA, C., P. MA SERANA, S. MA EUGENIA, et al. 1997. Comparative study of chromosome aberrations induced with aphidocolin in women affected by breast cancer and cervix uterine cancer. *Cancer Genet Cytogenet*, 94:120-124.

PELLICCIA, F., and A. ROCCHI 1986. DAPI-inducible common fragile sites. *Cytogenet Cell Genet*, 42:174-176.

PETRUKHIN, L., J. DANGEL, L. VANDERVEER, J. COSTALAS, A. BELLACOSA, G. GRANA, M. DALY, and A. GODWIN 1997. The I1307K APC Mutation does not predispose to colorectal cancer in Jewish Ashkenazi breast and breast-ovarian cancer kindreds. *Cancer Res*, 57:5480-84.

POPESCU, N.C., D. ZIMONJIC, A. DIPAOLO 1990. Viral integration fragile sites and prorooncogenes in human neoplasia. *Hum Genet*, 84:383-386.

POPESCU, N.C. 1994. Chromosome fragility and instability in human cancer. *Crit Rev Onc*, 5 : 121-140.

PORFIRIO, B., B. TEDESCHI, P. VERNOLE, D. CAPOROSI, B. NICOLETTI 1989. The distribution of Msp I-induced breaks in human lymphocyte chromosomes and its relationship to common fragile sites. *Mutat Res*, 213:117-124

POWELL, S.M., G.M. PETERSEN, A.J. KRUSH, et al., 1993. Molecular diagnosis of familial adenomatous polyposis . *The New England Journal of Medicine*, 1982-7.

RAO, P.N., N.A. HEEREMA, C.G. PALMER 1988. Fragile sites induced by FUdR, caffeine and, aphidicolin. Their frequency, distribution and analysis. *Hum Genet*, 78:21-26

REIDY, J.A. 1988. Role of deoxyuridine incorporation and DNA repair in the expression of human chromosomal fragile sites. *Mutat Res*, 200:215-220.

REIDY, J.A 1988. Aphidicolin, DNA repair and fragile sites. *Hum Genet*, 78:198

REISSMANN, P.T., M.A. SIMON, W.H. LEE, et al., 1989. Studies of the retinoblastoma gene in human sarcomas. *Oncogene*, 4:839-43.

RENAN, M.J. 1993. How many mutations are required for tumorigenesis? Implications from human cancer data *Molecular carcinogenesis*, 139-46.

SAGE, R. 1989. Tumor suppressor gene: the puzzle and the promise *Science*, 246:1406-12.

SAITOH, S., J. CUNNINGHAM, E.M.G. DE VRIES, et al., 1994. p53 gene mutations in for breast cancers in midwestern US women: null as well as missense type mutations are associated with poor prognosis. *Oncogene*, 9:2869-75.

SAMESHIMA, Y., Y. TSUNEMATSU, S. WATANABE, et al., 1992. Detection of novel s of germ-line p53 mutations in diverse cancer prone families identified by selecting patients with childhood adrenocortical carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute*, 84:703-7.

SANDBERG, A.A. 1990. *The Chromosomes in Human Cancer and Leukemia*. Elsevier Science Publishing Co, New York, USA.

SANTIBANES-KOREF, M.F., J.M. BIRCHS, A.L. HARTLEY, et al., 1991. p53 germline mutations in Li Fraumeni syndrome. *The Lancet*, 338:1490-1.

SCHERES, J.M.J.C., and T.W.J. HUSTINX 1980. Heritable fragile sites and lymphocyte culture medium containing BrdU. *Am Hum Genet*, 32:628-629

SCHMID, M., C. KLETT, A. NIEDERHOFER 1980. Demonstration of a fragile site in human chromosome 16 with distamycin A. *Cytogenet Cell Genet*, 28:87-94.

SCHMIS, M., W. FEICHTINGER, A. JESSBERGER, J. KOHLER, R. LANFE 1986. The fragile site (16)(q22). Induction by AT-specific DNA -ligands and population frequency. *Hum Genet*, 74:67-73.

SCRABLE, H.J., C. SAPIENZA, W.K. CAVENEE 1990. Genetic and epigenetic losses of heterozygosity in cancer predisposition and progression. *Advances in cancer Research*, 54:25-62.

SERVICE, R.F. 1994. Stalking the start of colon cancer. *Science*, 263:1559-60.

SHABTAI, F., D. KLAR, S. BICHACHO, J. HART, I. HALBRECHT 1983. Familial fragility on chromosome 16 (fra16q22) enhanced by both interferon and distamycin A. *Hum Genet* 63:341-344.

SHABTAI, F., J. ORLYN, J. HART, S. BICHACHI, I. HALBRECHT 1987. Alpha-interferon and fragility at 16q22. A study on 15 selected controls and 146 selected patients. *Hum Genet*, 75:48-52.

SMEETS, DFCM., JMJC SCHERES, TWJ HUSTINX 1984. The fragile site on chromosome 3. *Hum Genet* 67:351.

SNYDER, R.D., J.D. REGAN 1981. Aphidicolin inhibits repair of DNA in UV-irradiated human fibroblasts. *Biochem Biophys Res Com.*, 99:1088-1094

SOUSSI, T., C. CARON DE FROMENTEL, P. MAY 1990. Structural aspects of the p53 protein in relation to gene evolution. *Oncogene*, 5:945-52.

SOZZI, G., M.L.VERONOSE, M. NEGRINI, R. BAFFA, M.G. COTICELLI, H. INOUE, S. TORNIELLI, S. PILOTTI, L. DE GREGORIO, U. POSTORINO, M.A. PIEROTTI, M. OHTA, K. HUEBNER, C.M. CROCE 1996. The FHIT gene at 3p14.2 is abnormal in lung cancer. *Cell* 85:1-20.

SRIVASTAVA, S., Z. ZOU, K. PIROLLO, et al., 1990. Germ-line transmission of mutated p53 gene in a cancer-prone family with Li-Fraumeni syndrome. *Nature*, 348:747-9.

STEHLIN, D., H.E. VARMUS, J.M. BISHOP 1976. DNA related to the transforming gene(s) of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA. *Nature*, 260:170-3.

STIMSON, P., M.D. SCHANTZ, T.C. HSU 1989. Mutagen-induced chromosome fragility with in peripheral blood lymphocytes of head and neck cancer patients. *Head and Neck* 11:337-342.

SUGIO, Y., T. KUROKIT 1989. Family sites on human chromosomes: Demonstration of their dependence on the type of tissue culture medium. *Science*, 197:265-266.

SUTHERLAND, G.R. 1979. Heritable fragile sites on human chromosomes I. Effect of composition of culture medium on expression. *Am J Hum Genet*, 31:125-135.

SUTHERLAND, G.R. 1979. Heritable fragile sites on human chromosomes II. Distribution, phenotypic effects, and cytogenetics. *Am J Hum Genet*, 31:136-148.

SUTHERLAND, G.R., E. BAKER, R.S. SESHADRI 1980. Heritable fragile sites on human chromosomes V. A new class of fragile site requiring BrdU for expression. *Am J Hum Genet*, 32:542-548.

SUTHERLAND, G.R. 1982. Heritable fragile sites on human chromosomes. VIII. Preliminary population cytogenetic data on the folic-acid-sensitive fragile sites. *Am J Hum Genet*, 34:452-458.

SUTHERLAND, G.R., P.B. JACKY, E. BAKER, E. MANUEL 1983. Heritable fragile sites on human chromosomes X New folate-sensitive fragile sites. 6p23,9p21,9q32 and 11q23. *Am J Hum Genet*, 35:432-437

SUTHERLAND, G.R., P.B. JACKY, E. BAKER 1984. Heritable fragile sites on human chromosomes XI. Factors affecting expression of fragile sites at 10q25, 16q22 and 17p12. *Am J Hum Genet*, 36:110-122.

SUTHERLAND, G.R., M.I. PARSLow, E. BAKER 1985. New classes of common fragile sites induced by 5-azactidine and bromodeoxyuridine. *Hum Genet*, 69:233-237.

SUTHERLAND, G.R., E. BAKER, A. FRATINI 1985. Excess thymidine induces folate sensitive fragile sites. *Am J Med Genet*, 23:433-443.

SUTHERLAND, G.R., F. HECHT 1985. *Fragile sites on human chromosomes*. Oxford University Press, New York.

SUTHERLAND, G.R., E. BAKER 1986. Effects of nucleotides in expression of folate sensitive sites. *Am J Med Genet*, 23:409-417.

SUTHERLAND, G.R., J.F. MATTEI 1987. Report of the committee on cytogenetic markers. Ninth International Workshop on Human gene Mapping. *Cytogenet Cell Genet* 46:316-324.

SUTHERLAND, G.R. 1988. The role of nucleotides in human fragile site expression. *Mutat Res*, 200:207-213.

SUTHERLAND, G.R., D.H. LEDBETTER 1988. Report of the committee on cytogenetic markers. *Human Genet Mapping* 9.5 (1988); Update to the Ninth International Workshop on Human Gene Mapping. *Cytogenet Cell Genet*, 49:221-223.

SUTHERLAND, G.R., D.H.LEDBETTER 1989. Report of the committee on cytogenetic markers. *Human Genet Mapping* 10 (1989). *Cytogenet Cell Genet*, 51:452-458.

SZABO, C.I., and M.C. KING 1997. Population genetics of BRCA1 and BRCA2. *Am J Hum Genet*, 60(5):1013-20.

TAKAHASHI, E., T. HORI, M. MURATA 1988. Population cytogenetics of rare fragile sites in Japan *Hum Genet*, 78:121-126.

THESTRUP-PEDERSEN, K., V. ESMANN, J.R. JENSEN, J. HASTRUP, K. THORLING, A.K. SAEMUNDSEN, S. BISBALLE, G. PALLESEN, M. MADSEN, M.G. MASUCCI, I. ERNBERG 1980. Epstein-Barr-virus-induced lymphoproliferative disorder converting to fatal Burkitt-like lymphoma in a boy with interferon-inducible chromosomal defect. *Lancet* II:997-1002.

THOMPSON, A.M. 1993. p53 and breast cancer. *The Breast*, 2:8-10.

THOMPSON, M., R. MCLINES, H. WILLARD 1991. *Genetics in Medicine*. W.B. Saunders Company, Philadelphia, USA.

THOR, A.D., D.H. MOORE II, S.M. EDGERTON, et al., 1992. Accumulation of p53 tumor suppressor gene protein: an independent marker of prognosis in breast cancers. *Journal of the National Cancer Institute*, 84:845-55.

TOMMERUP, N., H. POULSEN, K. BRONDUM-NIELSEN 1981. 5-fluoro-2-deoxyuridine induction of the fragile site on Xq28 associated with X linked mental retardation. *J Med Genet*, 18:374-376.

TOMMERUP, N., K.B. NIELSEN, M. MIKKELSEN 1981. Marker X chromosome induction in fibroblasts by FUDR. *Am J Med Genet*, 9:263-264.

TRYGGVADOTTIR, L., H. TULINIUS, J. ROBERTSON 1998. Familial and sporadic breast cancer cases in Iceland: A comparison related to ABO blood groups and risk of bilateral breast cancer. *Int. J. Cancer*, 42:499-501.

TUNCA, B., Ü. EGELİ, A. ZORLUOĞLU, T. YILMAZLAR, A. KIZIL 1997. Expression of fragile sites in lymphocytes of colon cancer patients and their relatives. NATO Advanced Study Institute. "DNA Damage and Repair: Oxygen Radical Effects, Cellular Protection and Biological Consequences" Abstract Book p122, October 14-24, Antalya, Turkey.

TURNER, G., M.W. PARTINGTON 1988. Fragile X expression age and the degree of mental handicap in the male. *Am J Med Genet*, 30:423-428.

ULLRICH, S.J., C.W. ANDERSON, W.E. MERCER, et al., 1992. The p53 tumor suppressor protein, a modulator of cell proliferation. *The Journal of Biological Chemistry*, 267:15259-62.

VALGARDSDDOTTIR, R., et al. 1996. Molecular genetics and cytogenetics of breast carcinomas: Comparison of the two methods. *Cancer Genet and Cytogenet*, 92:37-42.

VERNOLE, P., B. TEDESCHI, B. NICOLETTI 1994. Fragile sites induction by aphidicolin may be increased in parents of neuroblastoma patients. *Cancer Genet Cytogenet*, 50: 35-44.

WOOSTER, R., S.L. NEUHAUSEN, J. MANGION, Y. QUIRK, et al. 1994. Localization of a breast cancer susceptibility gene, BRCA2, to chromosome 13q12-13, *Science*, 265,2088-2090.

XU, H.J., S.X. HU, T. HASHIMOTO, et al., 1989. The retinoblastoma susceptibility gene product: a characteristic pattern in normal cells and abnormal expression in malignant cells. *Oncogene*, 4:807-12.

YAN, Z., X. LI, X. ZHOU 1988. Synergistic effect of hydroxyurea and excessive thymidine on the expression of the common fragile sites at 3p14 and 16q23. *Hum Genet*, 80:382-384.

YUNIS, J.J. 1983. The chromosomal basis of human neoplasia *Science*, 221:227-236.

YUNIS, J.J. 1984. Recurrent chromosomal defects are found in most patients with acute nonlymphocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet*, 11:125-137.

YUNIS, J.J., and A.L. SORENG 1984. Constitutive fragile sites and cancer. *Science*, 226:1199-1204.

YUNIS, J.J., W.R. HOFFMAN 1989. Nuclear enzymes fragile sites and cancer. *J. Gerontology*, 44:37-44.

YANDELL, D.W., T.A. CAMPBELL, S.H. DAYTON, et al., 1989. Oncogenic point mutations in the human retinoblastoma gene, their application to genetic counseling. *The New England Journal of Medicine*, 321:1689-95.

ZHAN, Q., S. FAN, I. BAE, et al., 1994. Induction of bax by genotoxic stress in human cells correlates with normal p53 status and apoptosis. *Oncogene*, 9:3743-51.

ZHANG, X., H.J. XU, Y. MURAKAM, et al., 1994. Deletions of chromosome 13q, mutations in retinoblastomal and retinoblastoma protein state in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Research*, 54:4711-82.

ZORLUOĞLU, A., B. TUNCA, Ü. EGELİ, T. YILMAZLAR, A. KIZIL 1997. The Expression of fragile sites and genetic predisposition to the rectum cancers. 37th World Congress of Surgery of the ISS/SIC, August 24-30, Acapulco, Mexico, Abstract Book p108.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın planlanmasında ve yürütülmesinde yardım ve önerilerini esirgemeyen danışmanım Sayın Doç. Dr. Ünal EGELİ'ye, çalışmamın her aşamasında emeği olan tecrübelerinden faydalandığım Sayın Araş. Gör. Berrin TUNCA'ya, çalışmadaki vakaların belirlenmesini sağlayan Sayın Prof. Dr. İsmet TAŞDELEN'e ve çalışmam sırasında manevi yönden daima destek olan aileme teşekkürü borç bilirim.



ÖZGEÇMİŞ

09.11.1973 tarihinde Bursa’da doğdu. İlkokulu Atatürk İlkokulu’nda, ortaokul ve liseyi Bursa Kız Lisesi’nde tamamladı. 1991 yılında Uludağ Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümüne girmeye hak kazandı. 1995 yılında bu bölümden Biyolog ünvanı alarak mezun oldu. 1996 yılında Uludağ Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji A.B.D.’nda Yüksek Lisans’a başladı. 1996 yılının Eylül ayında Araştırma Görevlisi kadrosuna atandı. Halen Araştırma Görevliliğini sürdürmektedir.