T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ GENETİK A.B.D.

KRONİK SERVİSİT VE SERVİKS KANSERLERİNDE MİTOKONDRİYAL DNA DELESYONLARININ İNCELENMESİ

Arş. Gör. Dr. Murat KARA

Tez Yöneticisi
Yrd. Doç.Dr. Abdulgani TATAR

Uzmanlık Tezi
ERZURUM 2009

ONAY

‘Kronik Servisit ve Serviks Kanserlerinde Mitokondriyal DNA Delesyonlarının İncelenmesi’ isimli çalışmamızın Tıbbi Genetik Anabilim Dalı’nın 30.01.2009 tarih ve 10 sayılı yazısı, Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu’nun 13.02.2009 tarih ve ‘1’ sayılı kararı ile Dahili Tıp Bilimleri Bölüm Kurulu’na yaptığımız 03.03.2009 tarih ve ‘23’ sayılı başvuru sonrasında Yrd. Doç. Dr. Abdulgani TATAR danışmanlığında Araş. Gör. Dr. Murat KARA tarafından tez olarak çalışılması uygun görülmüştür.

TEŞEKKÜR

Tezimin fikir aşamasından sonuçlanmasına kadar ki süreçte ilgi ve desteğini hep hissettiğim, değerli vaktini ve bilimsel desteğini sunan, tez danışmanım olarak beni yönlendiren Sn. Yrd. Doç. Dr. Abdulgani TATAR hocama en içten teşekkürlerimi sunarım. Tez çalışmam sırasında ana bilim dalı başkanlığı süresince destek ve hoşgörüsünü esirgemeyen, bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan değerli hocam Prof. Dr. Sıtkı ÖZTAŞ'a teşekkür ederim. Ayrıca uzmanlık eğitiminin bir bölümünü yaptığım Fırat Üniversitesindeki hocalarım Sn. Prof. Dr. Halit Elyas ve Doç. Dr. Hüseyin Yüce'ye, tez çalışmamda desteklerinden istifade ettiğim Sn. Yrd. Doç. Dr. Bünyamin BÖREKÇİ, Sn. Yrd. Doç. Dr. Adile Ferda DAĞLI ve Sn. Yrd. Doç. Dr. Sare ŞİPAL ALTAŞ'a teşekkürü bir borç bilirim.

Asistanlığım boyunca birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum, hiçbir zaman desteklerini esirgemeyen Dr. Ebru M.ÖZDEMİR, Dr. Neslihan DÜZKALE, Dr. Çiğdem Y.KAHRAMAN, Dr. Oğuzhan YARALI ve bölümümüz personeline, ayrıca Halk Sağlığı Anabilim Dalı sekreteri Yeliz ÇAKIR'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Bu günlere gelebilmem için maddi manevi hiç bir fedakârlıktan kaçınmayan canım annem, babam ve kardeşlerime teşekkür ederim. Çalışmalarım boyunca manevi desteğini her zaman yanımda hissettiğim, içten destekleri ve yardımları ile her işimi kolaylaştıran sevgili eşim Bilge KARA ve oğlum Şahan ve kızım Neva'ya şükranlarımı sunarım.

ÖZET

Bu çalışmanın amacı; kronik servisit ve servikal kanser tanısı almış olan hastalarda, muhtemel mitokondriyal DNA delesyonlarının varlığının araştırılması.

Bu çalışma Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, Patoloji Anabilim Dalı, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı ve Fırat Üniversitesi Patoloji Anabilim Dalı arasında gerçekleştirilmiştir. Çalışmada, kronik servisit ve servikal kanserli hasta grubu ile servikal doku açısından bir rahatsızlığı bulunmayan kontrol grubu bireyler değerlendirilmeye alınmıştır. Bu hastaların dokularından mtDNA izolasyonu yapılarak mitokondriyal DNA delesyonları PCR ile çalışılmıştır.

Çalışmaya 35 kronik servisitli hasta, 21 serviks kanserli hasta ve 16 kontrol grubu hastası olmak üzere toplam 72 kişi araştırmamıza dahil edilmiştir. Toplam 72 hastanın yaşları 28-79 arasında değişirken, yaş ortalamaları 52,3±11,4 olarak hesaplandı. Verilerin değerlendirilmesinde, hastalık tipi ile mtDNA sonuçları ki-kare ile test edildi. İstatistiksel önemlilik düzeyi $p< 0,05$ alındı.

Sonuç olarak; kronik servisitli hastalarda yüksek oranda (% 80,0) mitokondriyal DNA heteroplazmik delesyonların görülmesi, muhtemelen kronik enflamasyona bağlı olarak hücre içi ROS'un artışının bir sonucudur. Çalışmamızda servikal kanserli 4 hastada mitokondriyal delesyon görülmesinin sebebi ise bu hastalarda kansere eşlik eden enflamatuvar bir patolojinin bulunması ve ileri yaşa bağlı hücre içi ROS seviyesinin artışıdır.

Anahtar Kelimeler: Mitokondriyal DNA delesyonları, kronik servisit, servikal kanser

SUMMARY

The aim of this study was to investigate the evidence of deletions of possible mitochondrial DNA in the patients diagnosed as cervical cancer and chronic cervicitis.

This study was carried out between Pathology, Gynecology and Medical Genetics Departments of Medical Faculty of Atatürk University and Pathology department of Medical Faculty of Fırat University. In the study, the group of chronic cervicitis and the group of patient with cervical cancer and control group who do not have any disorder regarding cervical tissue were included in the study. Mitochondrial DNA isolation from cervical tissues was studied and following PCR studies were carried out.

The study group consisted 72 patients, whose ages ranged from 28 to 79 years. The mean age of the patient groups were 52,3 ± 11,4 years. The sample of this study consisted of 35 patients with chronic cervicitis, 21 patients with cervical cancer and 16 control cases. Chi-square test was used for the evaluation the mtDNA and the disease type. The statistical significant level was accepted as $p<0,05$.

In conclusion; the high rate of heteroplasmic deletions of mitochondrial DNA was seen as a result of possible increase of ROS inside the cell depending on chronic inflammation in the patients with chronic cervicitis. In our study, the reason of observing mitochondrial deletion in four patients with cervical cancer is the fact that there is an inflammatory pathology accompanying to cancer and the increase of ROS level inside the cell depending on the age.

Key Words: Mitochondrial DNA deletion, chronic cervicitis, cervical cancer

İÇİNDEKİLER

SAYFA NO

TABLO LİSTESİ	**VIII**
ŞEKİL LİSTESİ	**IX**
SİMGELER VE KISALTMALAR	**X**
1. GİRİŞ	**1**
2. GENEL BİLGİLER	**3**
2.1. Mitokondri ve mitokondriyal DNA'nın yapısı	**3**
2.1.1. Mitokondriyal DNA gen içeriği ve organizasyonu	**4**
2.1.2.Mitokondriyal DNA'nın, D-loop (displacement) bölgesi, replikasyonu, transkripsiyonu ve translasyonu	**8**
2.1.3. Maternal kalıtım	**10**
2.1.4. Homoplazmi ve heteroplazmi	**12**
2.2. Mitokondriyal mutasyonun Reaktif Oksijen Türleri (ROS) ile ilişkisi	**14**
2.3. Kanser ve p53 ilişkisi	**18**
2.4. Kanser ve Apoptozis ilişkisi	**20**
2.5. Mitokondriyal DNA mutasyonları ve Yaşlanma	**22**
2.6. Mitokondriyal DNA mutasyonları ve hastalıkları	**24**
2.7. Mitokondriyal DNA 4977-bç delesyonu	**30**
2.8. Serviks Kanseri	**31**
2.8.1. Serviks kanserinin epidemiyolojisi	**31**
2.8.2. Servikal kanser taramaları, servikal sitoloji	**33**
2.8.3. Serviks Kanserinin Evrelemesi	**35**
2.8.4. Servikal kanser ve enfeksiyon ilişkisi	**37**
2.8.5. Serviks kanseri ve mitokondriyal DNA mutasyon ilişkisi	**38**
2.9. Kronik Servisit	**39**
2.10. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	**40**
3. MATERYAL VE METOD	**42**
3.1. MATERYAL	**42**

3.1.1. Çalışma Grubu **42**

3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler **42**

3.1.3. Kullanılan Alet ve Cihazlar **43**

3.1.4. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması **44**

3.1.5. Mitokondriyal DNA 4977-bp delesyonundaki İncelenen Bölge **45**

3.1.6. Mitokondriyal DNA'nın 4977-bp delesyonu için kullanılan primer çiftleri **45**

3.2.METOD **47**

3.2.1. Taze Dokudan DNA İzolasyonu **47**

3.2.2. Parafine Gömülü Dokudan DNA İzolasyonu **47**

3.2.3. Spektrofotometrede DNA Konsantrasyonunun Ölçümü **48**

3.2.4. PCR Ürünlerinin Elde Edilmesi **49**

3.2.5. PCR Ürünlerinin Agaroz Jelde Yürütülmesi **50**

3.2.6. İstatistik **50**

4. BULGULAR: **51**

4.1.1. Laboratuvar Bulguları: **52**

5.TARTIŞMA: **60**

6. SONUÇLAR: **66**

7. KAYNAKLAR: **68**

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 1. Nükleer ve Mitokondriyal DNA arasındaki kodon farklılıkları……..... **10**

Tablo 2. Serviks Kanseri Evrelemesi (FİGO) ……..…..…… **36**

Tablo 3. Mitokondriyal DNA 4977-bp delesyonu için kullanılan primer çiftleri…..……. **45**

Tablo 4. Hasta ve kontrol grubunun demografik özellikleri……..... **51**

Tablo 5. Agaroz Jelde Görülen PCR ürünlerinin Değerlendirilmesi…….…….… **53**

Tablo 6. Hastalık tipi ile mitokondriyal DNA mutasyon sonucunun karşılaştırılması….. **54**

Tablo 7. Serviks kanserli hastaların yaş, hastalık tipi, patolojik tanı ve mtDNA 4977 bç delesyon sonucu ……..……..…….. **55**

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 1. İnsan Mitokondriyal DNA Haritası (16 569 bç)…….……..…..…....….**7**

Şekil 2. Mitokondriyal (maternal) kalıtımı gösteren örnek pedigri (soyağacı…….….**11**

Şekil 3. Mitoz bölünme sırasında, yabanıl-tip ve mutant mtDNA'nın dağılımları…….....**13**

Şekil 4. Solid tümörlerde mitokondriyal genomik delesyonlar……..…..…**30**

Şekil 5. Hastalık tipi ile ortalama yaş arasındaki ilişkinin grafiksel gösterimi…….**52**

Şekil 6. 15,36 ve 49 nolu hastalara ait mitokondriyal DNA 4977 bç delesyonunun PCR çalışması ile elde edilen ürünlerin jel örüntüsü……...……..……....**56**

Şekil 7. 30 ve 31 nolu hastalara ait mitokondriyal DNA 4977 bç delesyonunun PCR çalışması ile elde edilen ürünlerin jel görüntüsü……..……..**57**

Şekil 8. 26 ve 55 nolu hastalara ait mitokondriyal DNA 4977 bç delesyonunun PCR çalışması ile elde edilen ürünlerin jel görüntüsü…….……...**58**

Şekil 9. 48 ve 50 nolu hastalara ait mitokondriyal DNA 4977 bç delesyonunun PCR çalışması ile elde edilen ürünlerin jel görüntüsü…….……...**59**

SİMGELER VE KISALTMALAR

A	Adenin nükleotidi
ATP	Adenozin Trifosfat
bç	Baz çifti
C	Sitozin nükleotidi
CIN	Cervical İntra-epithelial Neoplasia
°C	Santigrat derece
ddH_2O	Deiyonize su
dk	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksinükleotit trifosfat
EDTA	Etilendiamintetraasetikasit
g	Gram
G	Guanin nükleotidi
HSV	Herpes simplex virüs
HPV	Human papilloma virus
mtDNA	Mitokondriyal DNA
K^+	Potasyum iyonu
Kaspaz	Aspartat spesifik sistein proteaz
kb	Kilo baz
kDa	Kilo dalton
M	Molar
mg	Miligram
Mg^{++}	Magnezyum iyonu
$MgCl_2$	Magnezyum klorür
ml	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
µg	Mikrogram

µl Mikrolitre

Na^+ Sodyum İyonu

NaCl Sodyum klorür

OXPHOS Oksidatif Fosforilasyon

PAP Papanicolaou smear

PCR Polimeraz zincir reaksiyonu

RE Restriksiyon endonükleaz

ROS Reaktif oksijen türleri

rpm Dakikada dönüş sayısı

SDS Sodyum dodesil sülfat

T Timin nükleotidi

Taq Thermus aquaticus

TBE Tris-Borik asit-EDTA

U Urasil nükleotidi

UV Ultraviyole

V Volt

WHO Dünya Sağlık Örğütü

1.GİRİŞ

Kanser; hücrenin kontrolsüz bir şekilde çoğalıp, komşu dokulara infiltre olması ve bu hücrelerin dolaşıma geçerek, kaynağını aldığı organdan daha uzak bölgelere metastazı ile karakterize bir hastalıktır. Kanser, dünyada önemi giderek artan bir sağlık sorunu olmaktadır. Kanser araştırmalarında erken tanı ve tedavi son derece önemli olup, kansere yakalanma riski yüksek olan bireylerin, kanser gelişmeden önce tespit edilebilmesi büyük önem taşımaktadır.

İnsan hücrelerinde, hücre bölünmesini ve hücre ölümünü kontrol eden birçok mekanizma bulunmaktadır. Bu mekanizmalar çok sayıda gen tarafından kontrol edilmektedir. Bu kontrol genlerindeki mutasyonlar sonucu hücre kontrolsüz bir şekilde çoğalır. Kanserde mutasyonlar tek bir somatik hücrede meydana gelir.

İnsan kanserleri; hücrenin DNA tamir mekanizmasındaki bozukluklar, tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu ve onkogenlerin aktivasyonu gibi genetik olaylar sonucunda çok basamaklı aşamalarla oluşmaktadır.

Yapılan çalışmalarda, mitokondriyal DNA mutasyonları ve kanser arasındaki ilişki dikkat çekicidir (1). Son dönemlerde bazı hastalıkların gelişiminde mitokondriyal genom bozuklukları tanımlanmıştır (2). Mitokondriyal DNA hastalıklarının klinik seyri, özellikle diyabet, merkezi sinir sistemi, kas ve kardiyak hastalıklarında önemli derecede değişkenlik gösterir. Mitokondriyal DNA mutasyonlarının kanser, yaşlanma ve nörodejeneratif hastalıklarda muhtemel bir role sahip olmasından dolayı, son zamanlarda daha çok ilgi görmeye başlamıştır.

Mitokondrilerin sayısı bulundukları dokuların oksidatif fosforilasyon ihtiyacına göre tüm dokularda farklılık gösterir. Nöron, kalp ve iskelet kasları gibi dokuların çok sayıda mitokondriye sahip olması, bu dokuların mitokondriyal patolojilerden kaynaklanan enerji bağımlı bozukluklardaki hassasiyetlerini açıklar (3).

Mitokondri;

- Enerji metabolizmasının işleyişinde
- Hücre homeostazının düzenlenmesinde
- Serbest oksijen radikallerinin üretiminde
- Hücre yaşlanmasında
- Programlı hücre ölümünün (Apopitozis) başlamasında

önemli roller oynar (4).

Mitokondriyal DNA mutasyonlarının, mesane, meme, kolon, mide, özafagus gibi solid tümörlerle ve akut ve kronik lösemi, lenfoma gibi hematolojik kanserlerle olan ilişkisi bir kaç çalışmada gösterilmiştir (5, 6).

Servikal kanser, kadınlarda kansere bağlı ölümlerin başında gelir ve dünya çapında kadın kanserleri içerisinde ikinci sıklıkla görülür (7, 8). Servikal kanserler çoğu risk faktörlerinin önlenebilir olmasından dolayı önlenebilir kanser formlarından biridir. Dünya çapında her yıl ortalama 500 bin yeni servikal kanser vakası ve 250 bin servikal kanserden ölüm tespit edilmektedir. Tüm servikal kanserlerin % 80'i az gelişmiş ülkelerde görülür (9, 10).

Biz bu çalışmamızda, kronik servisit ve servikal kanser tanısı almış olan hastalardan elde edilen DNA örneklerinde muhtemel mitokondriyal DNA delesyonlarının ortaya konulmasını amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Mitokondri ve mitokondriyal DNA'nın yapısı;

İnsan hücreleri iki tip DNA içerir. Birincisi Nükleer DNA (nDNA); yaklaşık olarak 3 milyar baz çifti (bç) içerir. İkincisi mitokondriyal DNA (mtDNA); her hücrede yaklaşık olarak 100-1000 kopyası bulunur ve 16 569 baz çifti (bç) içerir (11). Mitokondriyal DNA hücredeki total DNA'nın yaklaşık olarak sadece % 0,5-1'ini oluşturur (12).

Mitokondri klasik olarak küçük organel olarak düşünülmesine ve gösterilmesine rağmen, gerçekte bölünebilen, füzyon ve hareket kabiliyetleri olan kompleks alt birimlerden oluşmuş sitoplazmik bir organeldir.

Mitokondri 0,002-0,008 mm uzunluğunda, oval şeklinde, oksidatif fosforilasyon (OXPHOS) olarak bilinen süreçte hücrenin ihtiyacı olan enerjinin büyük bölümünün sağlanmasından sorumlu, membranla çevrili sitoplazmik bir organeldir. Bu yapılar sadece hücrenin enerji kaynağı olmayıp aynı zamanda apopitosizde de anahtar rol oynarlar. Apoptozise bağlı olarak, hücre yaşar ya da ölür (6, 13).

Mitokondri çift membrana sahip bir organeldir. Dış membran sitozolden mitokondriyayı ayırır. İç membran ise krista ile çevrilidir. Oksidatif fosforilasyon sistemin enzim kompleksi mitokondri iç membran içine gömülmüştür. Mitokondri, mitokondriyal matriks içine yerleşmiş kendi genomuna (mtDNA) sahiptir (14). Proteinlerin çoğu matriks içine kümelenmiştir. Bu bölüm Sitrik asit ve Trikloroasetik asit siklusu (TCA), yağ asitleri ve piruvatın oksidasyonu, Fe-S biyogenezisi ve Hemoglobin sentezi gibi metabolik işlemlerde gerekli olan çeşitli enzimleri içerir (15, 16). Ayrıca matrikste mitokondriyal ribozom, tRNA'lar, mitokondriyal genlerin ekspresyonunda görevli olan enzimler ve matriks granülleri de bulunur (15, 17).

Mitokondri, oksidatif fosforilasyon sırasında hücresel enerjinin % 90'nını karşılar. Bu çok basamaklı yol, hem mitokondriyal hem de nükleer genom kombinasyonu ile çalışmaktadır (6, 18). Her bir insan hücresi yaklaşık 3 milyar bç büyüklüğünde nükleer

genomun yanısıra yüzlerce veya binlerce 16,569 bç'lik mitokondriyal genom kopyasını içerir.

2.1.1. Mitokondriyal DNA gen içeriği ve organizasyonu:

Mitokondriyal DNA, çift zincirli kapalı sirküler yapıya sahip olup 16,569 bç büyüklüğünde bir DNA molekülüdür. Her bir ökaryot hücresinde, hücrenin ihtiyacı ve fonksiyonuna göre, yaklaşık olarak 100-1000 arasında değişen sayıda mitokondri bulunur ve herbir mitokondri içinde sayısı 2 ile 10 arasında değişen mitokondriyal DNA kopyası vardır (poliplasmi) (2, 19).

İnsan mitokondriyal DNA'sı, mitokondrinin protein sentezinde temel rol oynayan 37 gen içerir. Bunların 22'si tRNA geni, 2'si rRNA geni (12S ve 16S) ve 13'ü de oksidatif fosfarilasyon ve solunum zincirinde kullanılan polipeptid şifreleyen mRNA genleridir (20, 21). Gen kodlayan bölge dışında displacement-loop (D-loop) olarak adlandırılan 1124 bç büyüklüğünde bir bölge vardır (22). Bu bölge, mitokondriyal DNA'nın replikasyon ve transkripsiyonunun başlangıcı için gerekli olan temel dizileri içerir (5,7). Mitokondriyal DNA'nın gen organizasyonu ve yapısı çoğunlukla korunmuştur (14).

Mitokondrinin en iyi tanımlanan ve en iyi bilinen fonksiyonu oksidatif fosforilasyonda ATP (Adenosine Triphosphate)'ın üretilmesidir. Solunum zinciri olarak da bilinen bu süreç hem mitokondriyal DNA hem de nükleer DNA tarafından kodlanan bir dizi protein kompleks tarafından gerçekleştirilir (6, 15).

Solunum zinciri en az 90 polipeptid içerir ve bunlardan 13'ü mitokondriyal DNA tarafından kodlanır (21). Yani solunum zinciri komponentlerinin çoğu nükleer DNA'da kodlanmıştır ve translasyonlarından sonra sitozolden mitokondri içine alınırlar. Böylece oksidatif fosforilasyon, aynı hücre içindeki iki ayrı genomun (mitokondriyal ve nükleer) birlikte çalışması ile meydana gelen proteinlerin işbirliğiyle oluşturdukları tek bir biyokimyasal süreçtir. Fakat bu süreç hücrenin enerji ihtiyacını karşılamada kullanılan tek yol değildir. Solunum zincirindeki bir bozukluktan dolayı oksitatif fosforilasyon yetersiz

kaldığında, hücre glikoliz yoluyla da ATP üretebilir ve böylece kompensatuar mekanizma sağlanmış olur (6).

Nükleer DNA oksidatif fosfarilasyon sistemi için gerekli olan genlerin yanı sıra mitokondriyal DNA'nın replikasyonu ve transkripsiyonu için gerekli olan tüm genleri de kodlar (23). Fonksiyonel aktif kompleksleri üretmek için mitokondriyal DNA tarafından kodlanan alt birimler, sitoplazmadan mitokondri içine alındıktan sonra nükleer DNA tarafından kodlanan alt birimlerle etkileşmelidirler.

Mitokondriyal DNA tarafından sentezlenen 13 polipeptid, mitokondriyal solunum kompleks zincirindeki (Oksidatif Fosforilasyon) yolun, beş ana bileşeninin 4 temel komponentini oluştururlar.

Mitokondriyal DNA'da sentezlenen 13 polipeptid genindeki bu dört temel komponent;

- Kompleks - I (NADH-dehydrogenase-ubiquinone reductase)'in yaklaşık 46 subünit proteinin yedisi; ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5, ND6,
- Kompleks- III (ubiquinol-cytochrome *c* reductase)'ün 11 proteininin bir parçası olan Sitokrom-b (cytochromeb, cytb),
- Kompleks- IV (cytochrome *c* oxidase)'ün 13 proteininin 3 alt birimi COI, COII ve COIII ve
- Kompleks-V (ATPsentaz)'in yaklaşık 16 proteinin alt bölümünün ikisi olan ATPaz6 ve ATPaz8' dir.

Mitokondriyal genomun geri kalan tüm proteinleri nükleusta lokalize olmuştur (enzimler, yapısal proteinler, ribozomal proteinler, polimerazlar) (24).

Kompleks- II (succinate dehydrogenase-ubiquinone reductase)'ın tüm alt birimleri nükleer DNA tarafından kodlanır (25, 26).

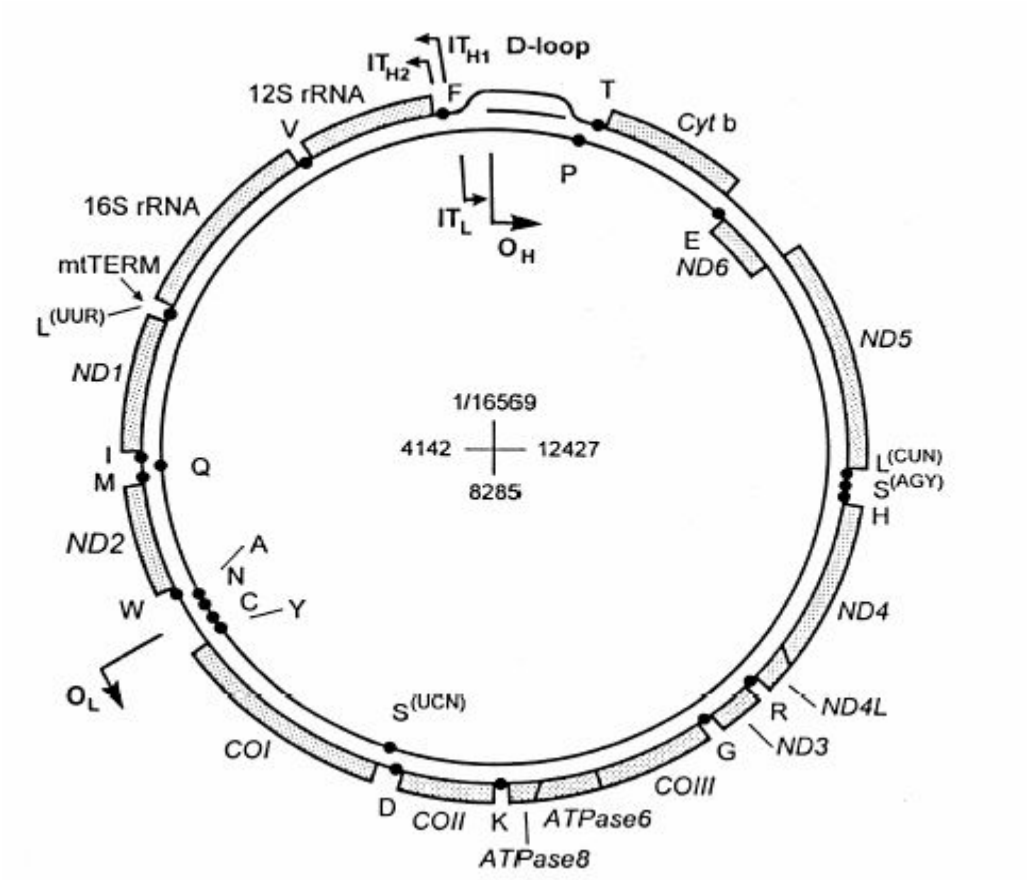
Mitokondriyal DNA, olağanüstü yoğunluktaki bir organizasyona sahiptir ve bu durum mitokondriyal DNA zincirine ileri derecede ekonomi sağlamaktadır.

Elektron transport zincirinin reaksiyonları ile üretilen enerji, iç ve dış mitokondriyal membran arasındaki mesafe içinde, mitokondriyal matriksten proton pompasını kullanır. Bu enerji kompleks-V tarafından kullanılan elektrokimyasal proton gradienti tarafından ATP üretilir (3, 27).

Mitokondriyal DNA'da, fonksiyonel olarak yalnızca iki yerde kodlanmayan bölge vardır. Birincisi; 1124 bç'lik D-loop denen bölge. Bu bölge H-zincir (ağır zincir) ve L-zincir (hafif zincir)'in transkripsiyon promotörlerini ve H-zincir replikasyonunun başlangıç bölgesini (OH) içerir. İkincisi; 30 nükleotid uzunluğundaki replikasyona duyarlı Leading zinciri; burası H-zincirinin sentezlendiği orijininden sonraki 2/3'lik kısımdır. Beş tRNA gen tarafından çevrilmiş olan bu bölge saç tokası şeklinde kararlı bir yapı oluşturur ve L-zincirin replikasyonunun orijini (OL) olarak görev yapar (25).

Mitokondriyal DNA'nın çift zinciri, farklı G+C içeriği ve denatürasyon gradientindeki yoğunluk esas alınarak ayırt edilir. Bu çift zincir, H-zincir (ağır zincir) ve L-zincir (hafif zincir) olarak adlandırılır (12). H-zinciri daha çok pürin (guanin) bazlarını, L-zinciri ise pirimidin (sitozin) bazlarını içerir. Bütün bazların % 44'ünü G ve C bazları oluşturur (14, 17).

Mitokondriyal DNA da bulunan 37 gen H-zincir ve L-zincirinde kodlanır. H-zincirinde 2 rRNA, 14 tRNA ve 12 polipeptid geni olmak üzere toplam 28 gen, L-zincirinde ise 8 tRNA ve 1 polipeptid geni olmak üzere toplam 9 gen kodlanır. Mitokondriyal DNA'da sentezlenen toplam 13 protein ürünü, oksidatif fosforilasyonun enzim kompleksini oluştururlar (14) (Şekil 1).



Şekil 1. İnsan Mitokondriyal DNA Haritası (16 569 bç). İnsan mitokondriyal DNA'sı, H-zincir (ağır zincir-dış halka) ve L-zinciri (hafif zincir- iç halka) olmak üzere çift zincirli, kapalı sirküler bir yapıya sahiptir. D-loop bölgesi 3 zincirli olarak gösterilmiştir.

OH: H- zincir replikasyon orijini, OL: L- zincir replikasyon orijini, IT_L: L-zincir transkripsiyon başlangıç noktası, IT_{H1}: H-zincir birinci transkripsiyon başlangıç noktası, IT_{H2}: H-zincir ikinci transkripsiyon başlangıç bölgesi, 12S ve 16S: mitokondril ribozomal RNAs, ND1-6: kompleks-I'in alt birimleri, CO I–III: kompleks IV' ün alt birimleri, Cyt. b: sitokrom- b,

2.1.2. Mitokondriyal DNA'nın, D-loop (displacement) bölgesi, replikasyonu, transkripsiyonu ve translasyonu:

Mitokondriyal DNA'da D-loop olarak adlandırılan 1124 bç büyüklüğünde, küçük bir bölge vardır. Bu bölge mitokondriyal DNA'nın transkripsiyon ve replikasyonun başlangıcı için gerekli olan temel dizileri içerir (3, 22). Mitokondriyal DNA'nın çift zinciri, H-zincir ve L-zincir'den oluşur (14).

Mitokondriyal DNA'nın replikasyonu ve transkripsiyonu nükleer DNA'dan bağımsızdır, mitokondri matriksinde başlar. Fakat mitokondriyal DNA'nın replikasyonu ve transkripsiyonu için gerekli olan tüm enzimler nükleer DNA tarafından kodlanır. Herbir mitokondriyal DNA zincirinin sentezi, çoğunlukla iki ayrı orijinden, farklı zamanlarda başlar. H-zincirin replikasyon orijini D-loop bölgesinde bulunur. L-zincirinin replikasyon orijini saat 8 hizasındadır. Replikasyon öncelikle H-zincir orijininden saat yönünde başlar. H-zincirinin 2/3'ü sentezlendikten sonra L-zincirinin replikasyon orijini açılır ve saatin tersi yönünde sentezlenmeye başlar (Bkz. Şekil 1). Mitokondriyal DNA'nın replikasyonu ve ekspresyonu nükleer genler tarafından kontrol edilir. Replikasyonu gerçekleştiren mitokondriyal DNA *polymerase γ* (POLG) enzimi, nükleer DNA'da kodlanır ve mitokondriye gönderilir (17, 20, 25). Ayrıca mitokondriyal DNA *thymidine kinase 2* (timidin kinaz 2) ve *deoxyguanosine kinase* (deoksiguanozin kinaz) enzimleri de replikasyondan sorumlu olup nükleusta kodlanan enzimlerdir (16).

Ökaryotlarda, nükleer DNA'da transkripsiyon için promoterler her gene spesifik iken mitokondriyal DNA'nın H ve L- zincirlerindeki transkripsiyonu polisistronik özellik gösterir. H ve L- zincirlerin transkripsiyonu birbirlerine ters yönde ilerler. Transkripsiyonda ağır zincir için 2, hafif zincir içinde 1 promoter bölgesi bulunur. Her iki zincir transkripsiyonu aynı anda gerçekleşir ve mtDNA'nın tamamı transkripsiyona uğrar. Sentezlenen RNA dizisi RNAase-p ile kesilir ve mRNA, tRNA ve rRNA'lar birbirinden ayrılarak serbest kalırlar. Mitokondriyal transkripsiyon mekanizması için en az iki bileşen gereklidir. Bunlardan birincisi mitokondriyal RNA polimeraz, ikincisi ise mitokondriyal

transkripsiyon faktörü (mtTF1)'dür. Poly-A kuyruğu mRNAs'lara transkripsiyon sonrası eklenir (17, 28).

Mitokondriyal DNA'nın translasyonunda ise, polisistronik transkripsiyon ürününden mRNA, tRNA ve rRNA oluşturulur. Mitokondrinin kendine has genetik kodları kullanarak 22 tRNA ile bu organele has protein sentezi yapılmaktadır. Protein sentezi sırasında ise sitoplazmadan mitokondriye herhangi bir tRNA gelmemektedir. Protein sentezinde, mtDNA'nın genetik kodu ile nükleer DNA'nın genetik kodu (üniversal kod) hemen hemen aynı olup, iki şifre sistemi arasında yalnızca dört kodon bakımından farklılık vardır. Mitokondride AUA, AUU ve AUG başlama kodonu iken üniversal kodonda AUG ve GUG başlama kodonudur. Fakat mitokondriyal mRNA'ların çoğunun UAA veya UAG sonlanma kodonuna sahip olmadığı tespit edilmiştir. Sonlanma kodonu muhtemelen AGA ve AGG kodlarıyla gerçekleşmektedir. Oysa bu kodonlar nükleer DNA kodonunda arjinini kodlamaktadır. Mitokondriyal mRNA'da Arjinin kodonu CGN'dir (17, 20) (Tablo 1).

Mitokondriyal DNA polimorfiktir, benzer etnik gruplar ve birçok farklı gruplar içerisindeki kişiler arasında bir kaç farklı dizi sıralaması vardır. Mitokondriyal DNA haplotipleri, polimorfizmin özel kalıplarının temelini oluştururlar ve bu durum mitokondrinin bazı hastalıklara duyarlılığını, yaşlanma sürecindeki etkilerini ve bazı mitokondriyal DNA mutasyonlarının ekspresyonunu gösterir. Mitokondriyal DNA haplotipleri dünya üzerindeki popülasyon hareketlerinde ve etnik grupların değerlendirilmesinde bir yol olarak kullanılmaktadır (16).

Tablo 1.Nükleer ve Mitokondriyal DNA arasındaki kodon farklılıkları.

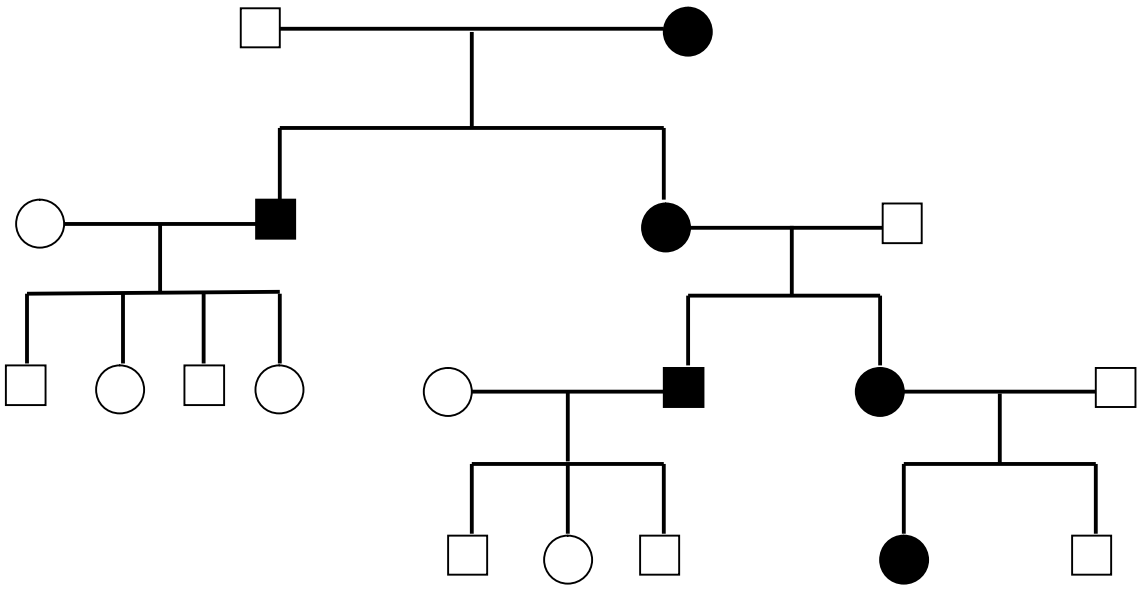
Kodon Türü	Nükleer DNA Kod	Mitokondriyal DNA Kodu
UGA	Dur	Trp
AGA	Arg	Dur
AGG	Arg	Dur
AUA	Ile	Met
Başlama kodu	AUG, GUG	AUG, AUU, AUG

2.1.3. Maternal kalıtım;

Fertilizasyonda, tüm mitokondriyal DNA oositlerden (dişi yumurtası) sağlanır. Sonuçta mitokondriyal DNA'nın kalıtsal geçiş örneği (nokta mutasyonu gibi) Mendel kalıtımından farklıdır. Anneden yavrularına geçen çok özel bir kalıtım şekli vardır. Bu kalıtıma maternal kalıtım adı verilmiştir. Maternal kalıtımda annenin mitokondriyal DNA'sı tüm yavrulara aktarılırken, babanın mitokondriyal DNA'sının bu kalıtıma katkısı olmamaktadır. Mitokondriyal genomda kalıtım maternaldir. Fertilizasyon sırasında spermin kuyruk bölümünde bulunan mitokondriler ovum içine giremediği için döllenmiş yumurtada sadece anneye ait mitokondri bulunur. Fertilizasyon sırasında oosite girebilen sperm hücresine ait bir kaç mitokondri, ubiquitine bağımlı mekanizma tarafından aktivitesi yok edilir (12).

Memeli sperm hücresinde mitokondriyal DNA kopya sayısı düşük (50-75) iken memeli oositteki kopya sayısı ($\geq 10^5$) oldukça yüksektir. Mitokondriyal genom poliploid'dir. Mitokondriler, oogenezde, hücre bölünmesi sırasında rastgele dağılmışlardır. Hücre bölünmesi sırasında mitokondriyal DNA'nın rastgele ayrılması ve çoğunlukla da etkili olduğu dokularda, mutant mitokondriyal DNA'nın mozaik dağılımı ile sonuçlanır ve bir hücrede bir kaç yüz ya da bin kadar kopyası bulunur (21).

Mitokondriyal DNA'ya ait nokta mutasyonunu taşıyan bir annenin, cinsiyet ayrımı olmaksızın tüm çocuklarına (hem erkek hem de kızlarına) bu mutasyon geçişi olur, yani sadece anneden yavrularına geçiş olaçaktır, babanın mitokondriyal DNA'sı ise mitokondriyal kalıtıma katkısı bulunmamaktadır (3) (Şekil 2).



Şekil 2. Mitokondriyal (maternal) kalıtımını gösteren örnek pedigri (soyağacı)

- Erkek — Etkilenmiş Erkek

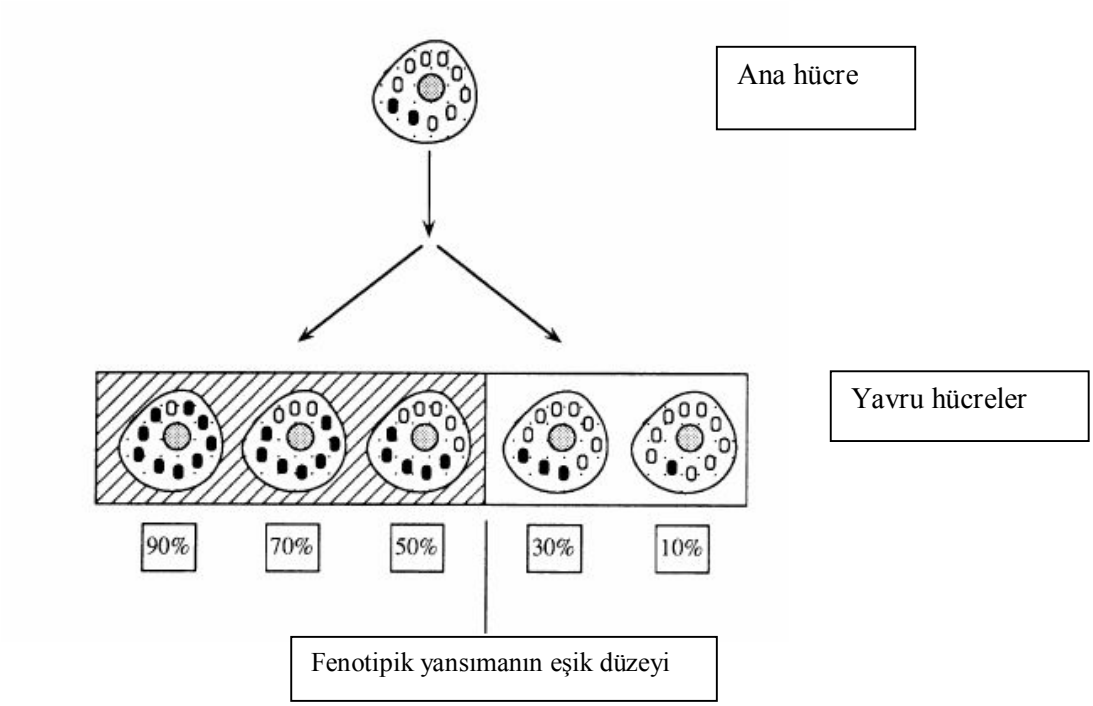
- Bayan — Etkilenmiş Bayan

2.1.4. Homoplazmi ve heteroplazmi;

Her bir memeli somatik hücresinde 100-1000 arasında değişen mitokondriyal DNA kopyası mevcuttur. Hücre bölünmesi sırasında, kardeş hücreler arasında mitokondriyal DNA molekülleri rastgele dağılırlar (19).

Normal dokularda mitokondriyal DNA moleküllerinin tüm kopyası aynı ise buna homoplazmi denmektedir. Bir kişide, bir dokuda, bir hücrede wild-tip (yabanıl tip) mitokondriyal DNA ve mutant mitokondriyal DNA'nın bir arada bulunması yani hem etkilenmiş hem de normal mitokondriyal DNA'nın aynı anda bulunmasına heteroplazmi denmektedir. Mitokondriyal DNA'nın belli mutasyonlarının klinik fenotipleri, çoğunlukla farklı dokulardaki mutant genomun ve yabanıl tipin hangi oranda bulunduğunun saptanması ile belirlenebilir. Bir patolojik fenotipin kendini göstermesi, mutant genomunun seviyesine bağlıdır buna *threshold effect* (eşik etkisi) denir (3, 25) (Şekil 3).

Bazı homoplazmik mutasyonların, hastalıkla ilişkili olabileceğinin kanıtlanmasına rağmen, patojenik geçişlerin büyük çoğunluğu heteroplazmiktir. Dokulardaki fonksiyon bozukluğu ve buna bağlı olarak klinik semptomların görülmesinden önce, kritik sayıdaki mutant mitokondriyal DNA molekülleri tespit edilebilir. Bu minimum eşik etki, dokudan dokuya farklılık gösterir ve dokuları farklı kombinasyonlarda ve farklı derecede etkileyebilir. Mutasyonların klinik görüntüsü heteroplazminin derecesine, doku hasarına ve farklı dokuların spesifik mutasyona yatkınlığına bağlı olabilir (19, 29).



Şekil 3. Mitoz bölünme sırasında, yabanıl-tip ve mutant mtDNA'nın dağılımları.

Mutant mDNA

Yabanıl tip mtDNA

2.2. Mitokondriyal mutasyonun Reaktif Oksijen Türleri (ROS) ile ilişkisi:

Son yıllarda, mitokondriyal genomun anormal ekspresyonu ya da gen mutasyon dengesizliği birçok malign tümör dokusunda tespit edilmiştir (30). Bir ökaryotik hücredeki oksijen tüketiminin yaklaşık % 90'ı mitokondriyal solunum esnasında kullanılmaktadır ve bu nedenle bir hücrenin veya dokunun metabolik hızı mitokondriyal fonksiyonla ilişkilidir. Mitokondriyal solunum zincirindeki yetersiz oksijen, süperoksit radikallerinin oluşmasına yol açar (31).

Bir organizma metabolizma için oksijene ihtiyaç duyar ve kaçınılmaz olarak da ROS üretirler. Hücrelerde ROS hem ekzojen hem de endojen etkenlere bağlı olarak üretilmektedir (32, 33). Bunlardan bazıları;

Endojen kaynaklı;

- İnflamasyon hücre aktivasyonları; nötrofil, eozinofil ve makrofajlara bağlı olanlar
- Peroksizomlar, mikrozomlar
- Sitokrom P450 metabolizması
- Oksidatif fosforilasyon

Ekzojen kaynaklı;

- Bazı peroksizom proliferative bileşikler,
- Barbitüratlar,
- Metal iyonları; demir, bakır, krom, kobalt, arsenik, nikel
- Radyasyon,
- Klorlanmış bileşikler
- Nongenotoksik karsinogenesis içeren çevresel ajanlar

ROS'un düşük konsantrasyonlarındaki faydaları;

- Enfeksiyöz ajanlara karşı savunmada
- Düz kasların gevşemesinde
- Hücresel sinyal sistemlerinin çok sayıda fonksiyonlarında hücresel yanıtta
- Mitojenik yanıt oluşturması ve hücre bölünmesini uyarması, bu etkisiyle ikincil haberci olarak mitoz bölünme fizyolojisinde
- Sitozolik kalsiyum konsantrasyonunun düzenlenmesinde
- Protein fosforilasyonunun düzenlenmesi
- NF-κB, AP-1 gibi belli transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonunda rol oynayabilir.

ROS'un yüksek konsantrasyonlarındaki zararları ise;

- Lipidlerde
- Membranlarda
- Proteinlerde
- Nükleik asitlerde
- Hücre yapılarında hasarın oluşmasında önemli bir rol oynayabilir.

Sonuçta hücrelerin ölmesi veya nekroza uğraması kaçınılmaz olabilir. ROS'un bu zararlı etkileri antioksidan enzimlere ek olarak non-enzimatik antioksidanların antioksidan aktiviteleri ile dengelenmektedir (32, 33).

Hücrenin antioksidan savunma sisteminin antioksidan enzimlerini;

- Katalaz,
- Süperoksit dismutaz,

- Glutatyon peroksidaz gibi enzimler oluştururken

Non-enzimatik antioksidanları ise;

- Vitamin E
- Vitamin C
- Betakaroten
- Selenyum
- Glutatyon
- Koenzim Q gibi enzimler oluşturmaktadır.

Bu antioksidanlar ROS'un etkisini azaltmaktadırlar. Oksidan ve antioksidan arasındaki dengenin bozulması 'Oksidatif stres' olarak adlandırılmış olup buda hücrelerde reaktif oksijen türlerinin seviyesinde artışa neden olmaktadır. Normal fizyolojik koşullar altında hücreler, antioksidanla reaktif oksijen türlerinin üretimini başarıyla dengelemektedir. Yani vücut biyolojik fonksiyonlarını sürdürebilmek için oksidan ve antioksidan sistemini dengede tutmaya çalışır. Bu dengenin hücresel oksidan lehine döndüğü zaman proteinlerde, lipitlerde, nükleik asitlerde oksidatif hasarlar meydana getirebilir ve sonuçta hücrenin yaşamasında ve fonksiyonlarında değişiklikler yapabilir (32).

Reaktif oksijen türlerinin primer kaynağının mitokondri olduğu ileri sürülmektedir. Çünkü normal aerobik metabolizmada harcanan mitokondriyal oksijenin % 5'i süperoksit anyon ya da hidroksil radikali gibi serbest radikallere dönüşür. Kronik enfeksiyonlar, reaktif oksijen türlerinin çok miktarda üretildiği olaylardandır. Kronik enfeksiyonlar sırasında nötrofil ve makrofaj gibi hem sayıları hem de aktiviteleri artmış olan iltihabi hücreleri, bakteriler ve bunların ürünlerine karşı çok miktarda reaktif oksijen türü üretirler. Özellikle polimorfonükleer lökositlerin çok miktarda hidrojen peroksit ve süperoksit radikal ürettiği rapor edilmiştir (34).

Mitokondriyal reaktif oksijen türlerinin oluşumu başlıca kompleks I ve kompleks III'de oluşan elektron kaçağı sonucu oluşur. Fakat insan deri hücrelerinde yapılan son çalışmalar kompleks II'nin de katkısının olabileceğini ortaya koymuştur (18). Mitokondriyal solunum zincirinin ROS üretiminde ana kaynak olması ve çıplak mtDNA molekülünün ROS kaynağı ile yakın ilişkide bulunması ve mtDNA'nın reaktif oksijen türlerinin hasarılara yatkın olması, kanser hücrelerinde reaktif oksijen türlerinin etki mekanizmasını açıklayabilir. Reaktif oksijen türlerinin artmasıyla sonuçlanan membran ve DNA hasarı, reaktif nitrojen türlerinin özellikle de nitrik oksidinde olaya eklenmesiyle daha da artmıştır. Bu olaylar kutanöz fizyolojinin düzenlenmesinde de rol oynamaktadır. Kanser hücrelerinde ROS artışında kısmen de olsa mitokondriyal fonksiyon bozukluğu, artan metabolik aktivite onkojenik situmülasyonun sorumlu olabileceği ileri sürmüştür (18). Nükleer DNA'ya karşın mitokondriyal DNA'nın koruyucu histonları yoktur ve DNA hasarına karşı yetersiz tamir mekanizmasına sahiptir (35).

Mitokondriyal DNA sekansındaki (dizisindeki) meydana gelen değişiklikler; elektron kaçışı ve mitokondriyal solunum kompleksindeki bozukluklar, artmış reaktif oksijen türleri üretimiyle daha fazla birliktelik gösterir (36, 37). Mitokondriyal DNA mutasyonları oksidatif fosforilasyonu engelleyerek ROS üretimini artırabilir.

Reaktif oksijen türleri mitokondriyal DNA'da oksidatif hasara ve mutasyonlara neden olabilir, tümörlerin pek çoğunda ROS üretiminde artış bulunmuştur ve kanserin patogenezinde önemli bir rol oynayan mitokondriyal DNA değişiklikleri tanımlanmıştır. Kanser hücrelerinde mitokondriyal DNA mutasyonları nükleer DNA mutasyonlarına göre daha fazla tespit edilmiştir (36, 37).

Dokularda yabanıl tip mitokondriyal DNA'ya karşı belli bir oranda mutant mtDNA biriktirdiği zaman (eşik etkisi), hücrenin enerji üretiminde azalma, daha fazla ROS üretimi, apopitosiz oranında artma gözlenir. Mutasyonlar mitokondri ve etkilenmiş dokuda şiddetli problemlere bağlı olarak bir kaç farklı hastalığın sebebi olabilir. Özelliklede beyin, kalp ve iskelet kası, endokrin, kan ve böbrek dokusu gibi yüksek enerji gerektiren dokular daha

duyarlı olduklarından, mitokondriyal DNA hasarı bu organlarda daha fazla klinik tablo ortaya çıkarır (38).

Mitokondriyal DNA anormalliklerinin neden olduğu mitokondriyal hastalıklar çok sayıda ve çeşitlidir. Bazı hastalıklar, kendilerini geç erişkinliğe kadar göstermezken bazıları doğumda görülebilir. Bu hastalıkların kliniği spesifik olan mutasyonun etkisine ve metabolik gereksinimlerine göre kişiden kişiye değişir ve teşhisi oldukça zorlaştırır. Oksidatif fosforilasyondaki azalma yaşa bağlı olduğu için bu hastalıkların birçoğu geç başlangıçlı ve ilerleyicidir. Ayrıca, diabetes mellitus, bazı kardiyovasküler hastalıklar, Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı ve daha birçok hastalıkta da mitokondride bir fonksiyon bozukluğu olduğu ileri sürülmüştür (39).

Oksidatif fosforilasyonu kodlayan genlerdeki mutasyonlar hücresel ATP üretimini etkiler ve hücrenin enerji dengesini bozar. Hidrojen peroksid ve diğer ROS'lar, mitokondriyal genomun replikasyonunu, transkripsiyonunu ve mitokondriyal biyogenezisini düzenleyen nükleer genlerin aktivasyonunu değiştirebilir (32).

2.3. Kanser ve p53 ilişkisi:

Hücre bölünmesi ve hücre ölümü birçok gen tarafından kontrol edilmektedir. Hücre proliferasyonu ve hücre ölümünü kontrol eden genlerde meydana gelen mutasyonların kanserden sorumlu olduğu yapılan birçok çalışmada gösterilmiştir. Kanserlerin birçoğu, tek bir somatik hücrede meydana gelen mutasyonlar sonucu oluşur ve daha sonra bu hücreler bölünerek kanser gelişimine neden olurlar. Nadir olarak herediter kanser sendromunda görülen, mutasyonlar sonucu oluşan kanserlerde ise mutasyonlar germ hücrelerine aktarılmakta ve kalıtsal hale geçmektedir (40).

Kansere neden olan genler, onkogenler ve tümör supresör genler olmak üzere iki temel alt gruba ayrılmaktadır. Onkogenler; normal hücresel genler olan proto-onkogenlerin mutant allelleri olmakla birlikte, telomerazları kodlayan veya apopitozisi engelleyen genler de olabilir. Onkogenlerin aktivasyonu, genellikle fonksiyon kazandıran mutasyon

özelliğine sahip olup, proliferasyonu stimüle etme, tümörün kanlanmasını arttırma ve apopitozu engelleme gibi mekanizmalarla malign transformasyonu gerçekleştirmektedir.

Tümör supresör genler ise; hücre büyümesini düzenleyerek, tümör gelişimini önleyen genlerdir. Genin her iki allelininin fonksiyonunu yitirmesi malignensiye neden olur ve heterojenite gösterirler. Tümör supresör genler tarafından kodlanan proteinlerde meydana gelen fonksiyon kaybı sonucu; anormal hücre büyümesi, kontrolsüz hücre bölünmesi ve defektif apopitozis ortaya çıkar. Kanser hücresi fenotipik olarak kontrolsüz ve aşırı proliferasyon özelliğine sahip olup, tek bir mutant hücre yaşamı tehdit eden bir hastalık gelişimine yol açmaktadır (40). Tümör supresör genleri arasında; RB1, TP53, BRCA1, BRCA2, NF1, NF2, DCC, VHL, MLH1, MLH2 sayılabilir (40).

p53, tümör supresör protein; DNA hasarına hücresel yanıtın önemli bir parçası olan bir DNA-bağlayıcı proteindir. DNA hasarının düzeltilmesini sağlayan ve hücre bölünmesini durduran genlerin transkripsiyonunu aktive eden bir transkripsiyon faktörü olmasının yanında, DNA'sı tamir edilemeyen hasarlı hücrelerde de apoptozise neden olur. Ayrıca p53 tümör supresör protein, genetik kararlılıkta ve yaşlılıkta da önemli roller oynar. p53'de fonksiyon kaybı olduğunda ise hasarlı DNA'nın yaşamasına ve bölünmesine izin vermekle birlikte potansiyel onkojenik mutasyonları aktif hale getirmiş olur (40, 41).

p53'ün hasarlanmış ya da enfekte olmuş hücreleri apoptozis ile elimine etme kabiliyeti çok hücreli organizmalarda hücre proliferasyonu için büyük önem taşımaktadır. p53 hücre büyümesini durdurur ya da apoptozise uğratır. Ayrıca tümör supresyonu için gereklidir. p53, hasara uğramış ya da neoplastik transformasyona yatkın DNA'larda büyümeyi inhibe edici aktivitesi ile hücre proliferasyonunu önler. Buna ek olarak p53 tümör supresyonu için gerekli olan DNA tamiri, diferansiasyonu ve anjiogenezis gibi hücresel olaylarda da rol oynamaktadır. p53 strese yanıt olarak hücresel cevapta rol oynadığı gibi tümörogenezisi önleyerek tümör oluşumunu engellemektedir. İnsan kanserlerinin yaklaşık % 50'sinde p53 gen mutasyonu bulunmaktadır, geriye kalan kanser vakalarının büyük çoğunluğunda ise p53 aktivitesi alternatif mekanizmalarla olaya katılmaktadır (42, 43). Bu mekanizmalar, ARF, HPV'nin E6 proteini veya Mdm2 gibi p53

inhibitörlerinin artmış ekspresyonunu içermektedir. Normal şartlarda p53 kısa ömürlü proteindir ve p53 inhibitör Mdm2 (insanlarda Hdm2)'de p53'ün kısa ömürlü durumda kalmasını sağlamaktadır. Hücreler DNA hasarı, onkojenlerin ekspresyonu, hipoksi ve nükleotid yıkımı gibi strese neden olabilecek durumlara maruz kaldıklarında p53'ün normal yapısı değişmektedir. p53 aktivasyonu, proteinlerin stabilizasyonunda, DNA'ya bağlanmasının arttırılmasında ve transkripsiyonel aktivitede gereklidir (43). p53'deki bu değişiklikler, yaygın posttranslasyonel modifikasyon ve protein-protein etkileşimi ile olmaktadır. Sonunç olarak, p53 aktivasyonu, gelen sinyalin ve hücresel içeriğin özelliğine göre hücre büyümesinin durmasına, yaşlanmaya ya da apoptozise yol açar. p53'ün apopitotik fonksiyonu ise tümör süpresyonunda önemli bir rol oynamatadır (43).

2.4. Kanser ve Apoptozis ilişkisi:

Apoptozis ya da programlanmış hücre ölümü, hücre içerisinde aspartate-specific cysteine proteases (kaspazlar) olarak bilinen bir sitozin proteazlar ailesinin aktivasyonu ve hücresel DNA'nın fragmentasyonu ile karakterize olan normal bir hücresel işlemdir. Özellikle immun sistemde lenfositlerin büyük bir çoğunluğunun kendi antijenlerine karşı reaksiyon göstermelerini önlemek için ortadan kaldırılmaları gerektiğinden, normal gelişimde önemli rol oynar. Kanserde ilk bulunan apopitotik gen, sporadik B-hücreli lenfomada belirlenmiştir (40).

Apoptozis ve nekroz, farklı biyokimyasal ve morfolojik özellikler gösteren, hücre ölümünün iki modelidir. Apoptozis, hücre büzüşmesi, nükleer ve sitoplazmik yoğunlaşma, kromatinin parçalara ayrılması ve fagositoz ile karekterize olan aktif bir süreçtir. Buna karşın nekroz ise, hücre ve organellerin şişmesi, plazma membranının patlaması ile hücre içerisindeki moleküllerin hücre dışına çıkması sonucu, enflamasyonla seyreden hücre ölümünün pasif formudur (44). Toksinlerin ölümcül düzeyleri, ya apopitotik ya da nekrotik hücre ölümünü başlatabilir. Apoptozis, sitokinler, glukokortikoidler, hipertermi, kemoterapötik ajanlar, iyonize radyasyon, growth faktörler, oksidanlar gibi değişik uyaranlarla başlayabilir (45).

Apoptozis, doku homeostazının korunmasında önemli bir role sahip olan, organizma tarafından düzenlenen enerji bağımlı, programlı ve kontrollü hücre ölümüdür.

Apoptozis veya programlanmış hücre ölümü; kanser gelişiminde, yaşlanmada, Alzheimer, ALS ve Parkinson hastalığı gibi nörolojik bozukluklarda önemli rol oynamaktadır. Birçok nörolojik hastalıkların en yaygın özelliği nöron hücrelerinin dejenerasyona uğramasıdır. Bu gibi hastalıklarda nöron hücre kayıbının apopitotik hücre ölüm yollarının uygunsuz aktivasyonu ile oluştuğu kabul edilmektedir (46).

Apoptozis; hem mitokondria (intrinsik yol) hem de ölüm reseptörlerinin aktivasyonu (ekstrinsik yol) ile indüklenmektedir. Her ne kadar apoptozisin kaspazdan bağımsız formları rapor edilmiş olmasına rağmen yukarıda bahsedilen her iki yolda hücre ölümü ile sonuçlanan kaspazlar aktivasyonunu indükler (43, 47).

p53, kaspazların aktivasyonuna neden olan bu iki farklı apopitotik sinyal yolları ile apoptozise neden olmaktadır. Kaspaz proteinazların aktivasyonu, apoptozis fazında en önemli olaydır. Kaspaz aktivitenin inhibisyonu apopitotik fenotipi önler ancak bazı durumlarda non-apopitotik hücre ölümüne de yol açabilir (43). Kaspazlar, nükleer laminayı PARP gibi DNA tamir enzimleriyle ve aktin, fodrin ve gelsolin gibi hücre iskeletinde bulunan proteinleri içeren birçok sayıda, yapısal hücresel proteinlerini bölerek hücre ölümüne sebep olur.

Ekstrinsik yol; TNF-R ailesine ait belli ‘ölüm reseptörlerini’ içermektedir ve DISC (ölümü indükleyen sinyal kompleksi) formasyonu aracılığıyla, apoptozise neden olan kaspaz- 8 ve 3’ün aktivasyonuna neden olmaktadır. Ölüm reseptörleri, TNF süper ailesine ait hücre yüzey reseptörleri olup apoptozisi tetikler. En iyi tanımlanan ölüm reseptörleri; Fas (CD95/APO-1), TNF reseptör 1 (P55) TRAMP, TRAIL-R1 ve TRAR-R2’dir (43, 47). p53 aracılı Fas indüksiyonu dalak, timüs, böbrek ve akciger gibi organlarda gösterilmesine rağmen kalp ve karaciğerde gösterilememiştir (43). Bu reseptör ailesinin p53 ile indüklenen ikinci üyesi (DR5/ KILLER) TRAIL’dir. DR5, DNA hasarına cevap olarak p53 tarafından indüklenir ve kaspaz-8 aracılığı ile hücre ölümünü hızlandırır. DR5 indüksiyonu hücre tipine spesifiktir.

İntrinsik yol ise; DNA hasarına olan cevabı harekete geçirir, mitokondriyal depolarizasyon ve mitokondriyal membranlar arası boşluktan sitoplazmaya sitokrom-c salınımı ile ilişkilidir. Sitokrom-c, APAF-1 ve procaspase-9, 'apoptosome' olarak adlandırılan kompleksi oluşturur ve böylece kaspaz-9 aktivasyonunun yanı sıra , kaspaz 7,6,3'ün de aktivasyonu artırılır (43). İntrinsik apopitotik yol; mitokondriyadan sitokrom-c salınımını yöneten proteinlerin Bcl-2 ailesi tarafından kontrol edilir (44).

Bcl-2 ailesi 3 sınıfa ayrılır. Bunlar;

1- Pro-survival proteinler: Bunlar yapısal olarak en çok (Bcl- XL gibi) Bcl-2'ye benzerler.
2- Pro-apoptotik proteinler: Bax ve Bak. Bunlarda yapısal olarak Bcl 2 ve Bcl XL'a benzerler ve kendilerinin pro-survival fonksiyonlarını antagonize ederler.
3- Pro-apoptotik "BH3- Only" proteinler.

Strese cevapta, Bax homodimer formdadır ve mitokondriden sitokrom-c salınır ve kaspaz-9 aktivasyonu ile sonuçlanır. p53 aracılı apoptozis, Bax hücre tipine bağlıdır. Bax sinir sisteminin gama-radyasyonuna karşı gelişen apopitotik cevabı için gereklidir (43). İntrinsik yol, büyüme faktörünün eksikliği ve DNA hasarı gibi stres uyarıcılar ile tetiklenir. Mitokondriyadan sitokrom-c salınımı, etkili kaspazları aktive eden ve bölen 'apoptozome kompleks' formasyonunun oluşumunu kolaylaştırır (47).

2.5. Mitokonriyal DNA mutasyonları ve Yaşlanma:

Son 15-20 yıl içerisinde yapılan birçok çalışmada, yaşlı bireylerin farklı dokularında mtDNA'nın nokta mutasyonları, duplikasyonları ve delesyonları bulunmuştur. Mitokondriyal DNA mutasyonlarının birçoğu 30 yaş sonrası oluşur ve insan vücudunda postmitotik dokularda yaşın artması ile birikirler. Yaşa bağlı bu mitokondriyal DNA mutasyonlarının bazıları mitokondriyal hastalıklı kişilerin dokularını başlangıçta etkilediği görülmüştür.

8470-8482 ile 13447-13459 nükleotid pozisyonlarındaki 5'- 3' uçlarındaki 13 bç kırılma bölgelerine sahip olan 4977 bç'lık delesyon bunların arasında en sık görülendir.

Bu mitokondriyal DNA delesyonu ilk olarak Kronik Progresif Eksternal Oftalmopleji (KPEO) , Kearns-Sayre syndrome ve Pearsons syndrom'lu hastaların kaslarında gösterilmiştir. MERRF ve MELAS' da mitokondriyal DNA'nın 8344 ve 3243 nükleotid pozisyonundaki iki nokta mutasyonuda ayrıca yaşlı bireylerin kas dokularında biriktiği de gösterilmiştir. Yaşlı bireylerin deri fibroblastlarında toplam mtDNA'nın % 25-50'sinde mtDNA'nın D-loop bölgesinde T414G transversiyonu olduğu rapor edilmiştir (19).

Yapılan başka bir çalışmada, yaşlı kişilerin karaciğer, beyin ve kas dokusundan elde edilen mitokondriyal DNA'nın D-loop bölgesinde oluşmuş altı farklı ardışık duplikasyonlar bulmuşlardır (19).

Yaşlanma somatik dokularda ROS' un artmış üretimi ile karakterizedir ve ROS'un üretiminde artma apoptosise geçişi hızlandırabilir. Aşırı oksidan üretiminin hücre ölümü ve oksidatif strese dönüştürebildiği gösterilmiştir. Mitokondriyal solunum zinciri aynı zamanda ROS'un ve normal fizyolojik ve patolojik durumlar altında serbest radikallerin hücre içi üretiminin ana kaynağıdır. Bundan başka doku hücrelerinde yaşla bağlı mitokondriyal yığının artması ROS'un seviyesinde artışa neden olabilir (48).

Mitokondriyal fonksiyonların azalması ve mitokondriyal ROS üretiminin artması yaşlanmanın önemli bir nedeni olarak görülmüştür. ROS normal fizyolojik durumlar altında mitokondriyal solunum sırasında çok düşük seviyede üretilir. ROS'un oluşturduğu mitokondriyal DNA'daki oksidatif hasar, somatik mitokondriyal DNA mutasyonlarının oluşmasına ve DNA zincirinde kırıklara neden olabilir. Bu mitokondriyal DNA mutasyonlarının birikmesi, solunum zincirinde fonksiyonu bozukluğuna neden olabilir ve sonuçta daha fazla mitokondriyal DNA mutasyonlarının birikmesine yol açabilir (48). DNA'nın oksidatif hasara maruz kalması tek veya çift zincirde kırıklara neden olur ve bu durum zincirdeki pirimidin ve pürin bazlarının değişimine yol açar. Doku hücrelerindeki mitokondriyal DNA ve nükleer DNA'da meydana gelen birçok modifikasyon memelideki yaşla artmaktadır.

İnsan ve hayvanlarda yapılan çalışmalarda yaşlanma ile mitokondriyal üretimde ROS'un artması ve mitokondriyal DNA mutasyonlarının birikmesi ile mitokondriyal

fonksiyonun azalması arasında ilişki olduğu gösterilmiştir. Ayrıca mitokondri memeli hücrelerinde apoptozis'in düzenlenmesi, işlemlerinin yürütülmesi ve başlatılmasında önemli bir rol oynar. Mitokondriyal DNA'nın oksidatif hasara nükleer DNA'dan daha fazla duyarlı olduğu birçok çalışmada belirtilmiştir. Kalp kaslarında ve diyaframdaki mitokondriyal DNA'daki oksidatif modifikasyonlar insanların yaşlarıyla arttığı bulunmuştur (43, 48).

Apoptozis hücre ölümünün programlı bir sürecidir. Mitokondri apoptozisde önemli bir rol oynar. Apoptozisdeki düzensizlikler, dejenaratif hastalıklar ve kanserin görülme sıklığında önemli artışlar ve fizyolojik fonksiyonların tedrici olarak azalması gibi yaşa bağlı değişikliklere katkısı olabileceği çalışmalarla gösterilmiştir. Ancak doku hücrelerinde yaşa bağlı olarak apoptozisin düzenleyici mekanizmasının nasıl ayarlandığı ve in vivo olarak apoptozisin yaşla nasıl artırıldığı veya baskılandığı hala açık değildir. Apoptozise bağlı olarak oluşan hücre kayıpları, yaşa bağlı hastalıklar ve yaşa bağlı fizyolojik fonksiyonların azalması ile ilişkili bulunmuştur. Nöronların kaybı, Parkinson hastalığı, Alzheimer hastalığı ve Amyotrofik lateral skleroz (ALS) gibi nörodejeneratif hastalıklarda, motor nöron bozuklukları ve demans gibi fonksiyonel bozukluklarla yakından ilişkilidir (49). Yaşlanma sırasında, üreme sisteminin bir kaç hücre tipi başta olmak üzere, santral sinir sistemi, kalp hücreleri, hepatosit ve lenfosit gibi çeşitli hücrelerde apoptozisin artmış olduğu gösterilmiştir (46, 48).

2.6. Mitokondriyal DNA mutasyonları ve hastalıkları:

Mitokondriyal genom genlerin 37'si maternal geçişli mtDNA tarafından, geri kalanlar ise nükleer DNA'da kodlanmaktadır (15).

Nükleer genom; OXPHOS protein kompleksinin oluşması ve mitokondriyal DNA'nın ekpresyonu ve korunması için gerekli faktörlerin 200'den fazlasını kodlamaktadır. Nükleer genomda meydana gelen mutasyonların bazıları mitokondriyal DNA bozuklukları ile ilişkili hastalıklara yol açabilir. Bir mitokondriyal DNA mutasyonunun fenotiple olan ilişkisi, belli bir dokudaki hücrelerin normal ve mutant

mitokondriyal DNA oranına bağlıdır. Sonuçta azalmış penetrans, değişik ekspresyon ve pleiotropi genellikle mitokondriyal hastalıklar ile karakterizedir (50).

Nükleer DNA'da kodlanmış olan mitokondriyal genlerdeki mutasyonlar, mitokondriyal bozukluklara neden olabilir. Bu nükleer DNA'daki mutasyonlar oksidatif fosforilasyon genlerini ve yapısını etkileyebilir. Örneğin OXPHOS enziminin alt birimlerinde bulunan yapısal genlerdeki şiddetli mutasyonlar, sıklıkla çocuklarda ölümcül seyreden Leigh sendromu ile sonuçlanır (24).

Mitokondriyal DNA'da gelişebilecek olası mutasyonların oranı, nükleer DNA'nınkinden 10 kat daha yüksektir. Bu yüksek mutasyon oranı için birkaç sebep ileri sürülmüştür. Bunlardan;

- Birincisi, mitokondriyal genomda koruyucu histon proteinlerinin eksikliği.
- İkincisi, mitokondriyada DNA tamir mekanizmasının sınırlı olması.
- Üçüncüsü, mitokondrinin, reaktif oksijen türlerinin (ROS) major üretim yeri olması (11, 51).

İnsan malignensilerindeki tamir mekanizmasındaki bozukluklarda, tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu ve onkogenlerin aktivasyonu gibi genetik olaylar suçlanmakta yani kanser çok basamaklı aşamalarla oluşmaktadır ve bu yöndeki çalışmalar malignensilerin gelişimi hakkında yol gösterici olmuştur.

Son dönemlerde mitokondriyal genom bozukluklarının tanımlanması hastalıkların sebebini anlama açısından önemlidir. Mitokondriyal DNA hastalıklarının klinik belirtileri; özellikle de diyabet, merkezi sinir sistemi, kas ve kardiyak hastalıklarda önemli derecede değişkenlik gösterir. Mitokondriyal DNA'daki mutasyonların, kanserde, yaşlanmada ve nörodejenerasyon hastalıklarında muhtemel bir role sahip olmasından dolayı son zamanlarda daha çok ilgi çekici olmuştur.

Mitokondriyal DNA mutasyonlarının insan hastalıklarıyla ilişkisinin saptanması ile 1988'de ilk olarak ilgili çalışmalar başlamıştır (27). Wallace ve arkadaşları, bu yıllarda,

Leber hereditary optic neuropathy (LHON)'li bir ailede kompleks-1(ND4)'in alt birim-4 (subunit 4)'ünü kodlayan gende bir nokta mutasyonunu saptamışlar ve mitokondriyal miyopatili hastalardaki çeşitli delesyonları tanımlamışlardır (52).

Mitokondriyal DNA mutasyonları, mesane, meme, kolon, mide, karaciğer, böbrek, akciğer, pankreas, prostat, özofagus, tiroid, beyin, baş ve boyun kanserleri gibi solid tümörleri ve akut ve kronik lösemi, myelodisplastik sendromu ve lenfomalar gibi hematolojik kanserleri içermektedir (5, 6). Genelde mitokondriyal hastalıklara neden olan nokta mutasyonları, gen delesyonları ve mitochondrial microsatellite instability (mtMSI) insan neoplazmalarında ifade edilmiştir. Ancak bunların sıklığı çeşitli dokularda değişkenlikler gösterir (13, 53).

Mitokondriyal DNA'da 3 mutasyon tipi tanımlanmıştır (50). Bunlar;

1- Protein kodlayan mitokondriyal DNA'da missense mutasyonları yani OXPHOS proteinin aktivitesini değiştiren mutasyonlar. Mitokondriyal DNA missense mutasyonları nörolojik hastalıklarda, retinis pigmentoza ve optik atrofi gibi yaygın oftalmolojik bulgularla ilişkili olabilir.

Örnek olarak;

- LHON'na neden olan 11778G > A (ND4'de R340H) ve 3460G > A (ND1'de A52T) gibi missense mutasyonları verilebilir (54).

2- tRNA veya rRNA'daki tek baz mutasyonları yani mitokondriyal proteinleri değiştiren tek nükleotid mutasyonları.

Bu gruptaki hastalıklara örnek olarak,

- Myoklonik Epilepsi – Ragged Red Fiber (MERRF) (OMIM#545000)
- MELAS (OMIM #540000),
- Lethal İnfantil Mitokondriyal Miyopati (LIMM) (OMIM#551000)
- Aminoglikozid Ototoksisitesi (OMIM#580000)
- Kloramfenikol Toksisitesi (OMIM#515000)

- LHON (OMIM#535000)
- NARP (OMIM#551500)
- Parkinson hastalığı, Mitokondriyal tip (OMIM#556500)
- Alzheimer hastalığı, Mitokondriyal tip (OMIM#502500)
- Rekürren miyoglobulinüri (OMIM#550500)

verebiliriz.

3- Mitokondriyal DNA'daki delesyon ve duplikasyonlara bağlı patolojiler.

Bunlara örnek olarak;

- Kearns-Sayre Sendromu (OMIM#530000)
- Progressif Eksternal Oftalmopleji (OMIM#550000)
- Pearsons Marrow Pankreas Sendromu (OMIM#557000)
- Wolfram Sendromu, Mitokondriyal (OMIM#598500)
- Maternal kalıtım, Diabet ve İşitme Kaybı (OMIM#520000)
- Kronik interstisiyel nefropati (OMIM#551200)
- Renal tubulopati, Diabetes mellitus, Serebellar ataksi, mtDNA Duplikasyonu (OMIM#560000)

Mitokondriyal DNA mutasyonlarının çoğu, muhtemelen oksidatif stres tarafından indüklenmiş, T→C ya da G→A transisyonunu içeren nokta mutasyonlardır. Buna karşılık DNA delesyonları ve mtMSI, yanlış replikasyon sırasında da meydana gelebilir veya kendiliğinden oluşabilir (55).

Mitokondriyal DNA yeniden düzenlenmesi (rearrangement) delesyon ya da duplikasyon şeklinde olabilir ancak delesyonların hastalıkla daha fazla ilişkili olduğu gösterilmiştir. Mitokondriyal DNA'daki multiple delesyonlar nükleer gen defektleri tarafından oluşurken, intergenomik sinyal bozukluğu olan tek delesyonlar ise genellikle sporadik olaylarla oluşur. Bazı maternal geçişli rearrangementlar da tanımlanmıştır. Ancak bunlar oldukça nadir durumlarda görülürler (29). Bazı mutasyonlar kalıtsal olmasına rağmen, kanser hücrelerinde bulunan birçok mitokondriyal DNA mutasyonları kişinin yaşamı boyunca somatik hücrelerinde birikir.

Hem kalıtsal hem de somatik mtDNA mutasyonları, birçok dejenaratif hastalığın sebebi olarak gösterilmiştir. Birçok mutasyon, kalıtsal mitokondriyal hastalığa sahip bireylerin etkilenmiş dokularındaki mitokondriyal DNA'nın yapısal genlerinde ve tRNA genlerinde oluşur. Buna karşın, insan kanserlerinde bulunan bir çok mitokondriyal DNA mutasyonları, nokta mutasyonları için 'hot-spot' (sıcak bölge) olarak gösterilmiş olan D-loop bölgesinde lokalize olmuştur. D-loop mitokondriyal DNA'nın transkripsiyon ve replikasyonunun kontrolünü içerdiği için; bu bölgedeki mutasyonlar mitokondriyal genomun gen ekspresyonunda değişikliğe ve/veya kopya sayısında azalmaya sebep olabilirler (13, 56).

Mitokondriyal DNA mutasyonlarının neden olduğu hastalıkların en iyi bilinenleri; *Leber's Hereditary Optic Neuropathy (LHON), Mitochondrial Encephalopathy, Lactic Acidosis and Stroke-like episodes (MELAS), Myoclonic Epilepsy with Ragged Red Fibers (MERRF),* Maternal geçişli şeker hastalığı ve Maternal kalıtımlı kardiyomiyopati'dir (57).

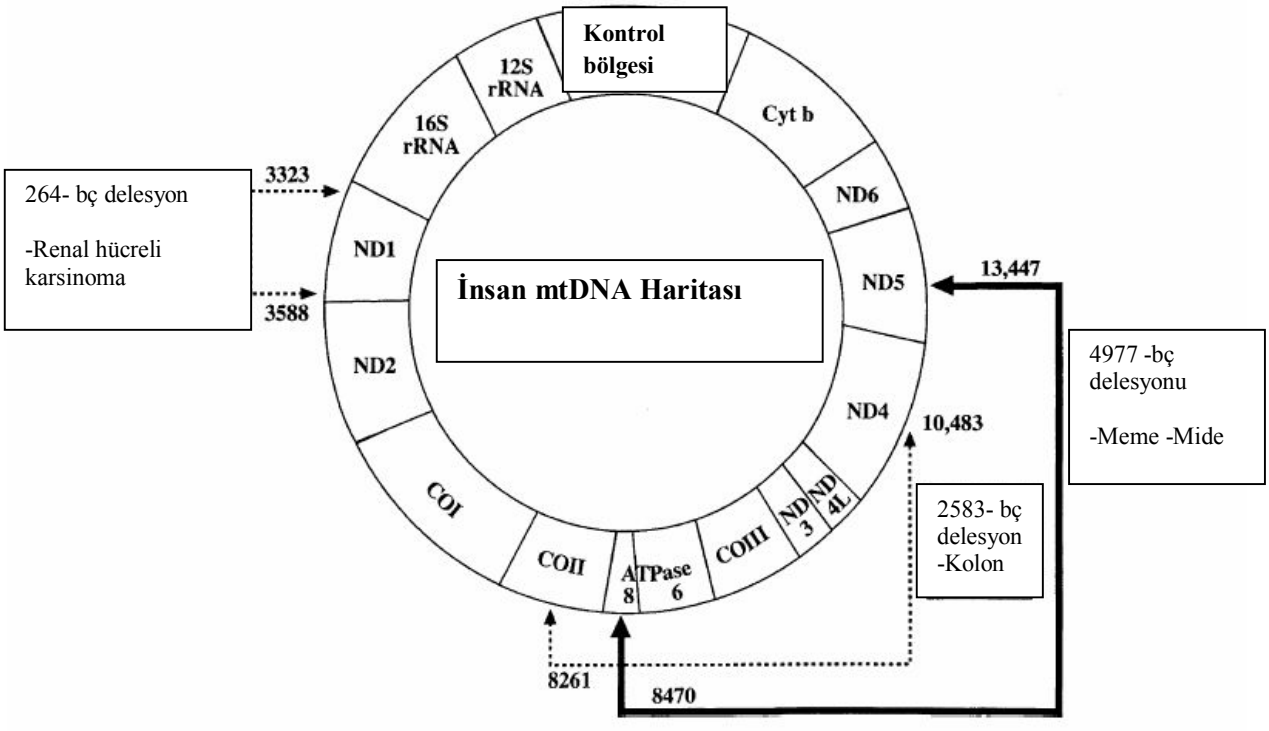
Mitokondriyal DNA mutasyonları ile kanser arasındaki ilişki dikkat çekicidir. Örneğin; kolorektal kanserlerin %70'inin somatik mtDNA mutasyonuna sahip olduğu, Polyak ve arkadaşları tarafından, 1998'deki yayınlarında bildirilmiştir (58). Yapılan son çalışmalarda, insan kanserlerinin bazı türlerinde, mitokondriyal DNA'nın somatik mutasyonlarının tespit edildiği rapor edilmiştir (5, 59) (Şekil 4).

Fliss ve arkadaşlarının yapmış oldukları bir çalışma sonucunda, akciğer kanserlerinde % 43, baş ve boyun kanserlerinde % 46, mesane kanserlerinde % 64 oranında (60), diğer çalışmalarda ise sindirim sistem kanserlerinden hepatoselüler karsinomada (61), özafagus kanserlerinde % 5-34 (62), mide kanserlerinde % 4-25 (63) ve kolorektal kanserlerin % 25-66 (64) oranında değişen mitokondriyal DNA mutasyonları gösterilmiştir (11). Ayrıca mitokondriyal DNA'nın D-loop bölgesinin mutasyonları kolon kanseri, hepatoselüler karsinoma, over, prostat kanserleri, mide kanserleri, baş ve boyun kanserleri, akciğer ve tiroid kanserleri gibi birçok tümörlerde tespit edilmiştir (65). D-loop bölgesi, transkripsiyon için major promotörleri ve replikasyon orijini leading zinciri içerdiği için mitokondriyal genomun ekspresyonu ve replikasyon için önemli bir bölgedir (11).

Moleküler bozukluklar ya bir mtDNA'nın delesyon ya da duplikasyon şeklinde yeniden düzenlenmesi ya da bir nokta mutasyonu şeklindedir (ya bir RNA ya da protein kodlayan gende). Bu mutasyonlar bir hücrenin mitokondriyal genomunun tüm kopyalarını etkiliyebilir (homoplazmi olarak adlandırılır), ya da aynı hücrede hem wild tip hem de mutasyon şeklinde karışık olabilir (heteroplazmi olarak adlandırılır) (66).

Mitokondriyal DNA mutasyonları, büyük olasılıkla mitokondriyal genomun solunum zinciriyle yakın ilişkisinden ve bazı DNA tamir mekanizmalarının eksikliğinden ve koruyucu histon proteinlerinden yoksun olmasından dolayı ortaya çıktığı düşünülmektedir (67). Ayrıca mitokondriyal DNA' da intron bölgesi bulunmadığı için mutasyonlar daima değişik gen ürünlerine yol açar (68).

Mitokondriyal DNA varyantları ile ilgili son çalışmalar Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı gibi kompleks hastalıkları, farklı kanserleri ve yaşla ilişkili hastalıkları içermektedir (69).



Şekil 4. Solid tümörlerde mitokondriyal genomik delesyonlar.

2.7. Mitokondriyal DNA 4977-bç delesyonu:

Mitokondriyal DNA 4977 bç delesyonu mitokondriyal DNA da en sık ve en fazla görülen delesyondur. Tiroid tümörleri, hepatoselüler karsinoma, özofagus karsinomu, mide kanserini içeren birçok farklı tip insan tümörlerinde gösterilmiştir (53, 70).

Hayatın ilk 30 yılında değişik dokularda bu delesyonun oluştuğu gösterilmiştir. Mitokondriyal DNA delesyonlarının büyüklüğü 1,3 kb ile 8 kb arasında olmasına rağmen en sık görülen 4,9 kb delesyonudur ve en yaygın delesyon olarak adlandırılır. Mitokondriyal DNA 4977 bç delesyonu D-loop bölgesi ve CO1 gen arasındaki hot-spot bölgede yerleştiği rapor edilmiştir (19, 71).

Mitokondri ve mitokondriyal DNA'nın tümörijenik fenotipin düzenlemesinde direkt bir rol oynadığı son çalışmalarda öne sürülmüştür. Mitokondriyal DNA'nın bozulması genellikle oksidatif fosforilasyonu inhibe eder ve özellikle beyin ve kasta kronik hastalıklara ve yaşlanmaya neden olabilir veya bu sürece yardım edebilir (72).

Mitokondriyal DNA'nın mutasyonlarının birikmesi yaşlanma ve dejeneratif hastalıkların gelişmesinde önemli bir faktördür. Yaşa bağlı olaylardaki farklı postmitotik dokularda birikme sadece mitokondriyal DNA'nın en yaygın olan 4977 bç delesyonunda gösterilmiştir. Yaşın ilerlemesi ile beyin, iskelet ve kalp kası gibi dokularda 4977 bç delesyonu biriktiği gösterilmiştir. Bu delesyonun dejenaratif hastalıklardan kronik ilerleyici ekternal oftalmopleji sendromu (chronic progressive external ophthalmoplegia syndrome) ve Kearns–Sayre sendromu gibi mitokondriyal miyopatilerde de varlığı gösterilmiştir (35).

En yaygın mtDNA delesyonu olarak adlandırılan 4977 bç delesyonu ya mitokondriyal oksidatif fosforilasyonun bozukluğu ile sonuçlanan genleri ve ya mtDNA'nın ATPaz 8 ve 6, COXIII, ND3, ND4, ND4L ve ND5 için kodlanan genlerin bir kısmını ortadan kaldırır. Bu da mitokondriyal oksidatif fosforilasyonun bozulması ile sonuçlanır (7, 53).

Mitokondriyal DNA 4977 bç delesyonu oluşturan muhtemel mekanizması mitokondriyal replikasyonu sırasında yanlış zincir eşleşmesidir (35).

2.8. Serviks kanseri:

2.8.1. Serviks kanserinin epidemiyolojisi;

Servikal kanser, kadınlarda kansere bağlı ölümlerin başında gelir ve dünya çapında kadın kanserleri içerisinde ikinci sıklıkla görülür (7, 8).

Dünya çapındaki servikal kanserler, çoğu risk faktörlerinin önlenebilir olmasından dolayı en sık önlenebilir kanser formlarından biridir. Buna rağmen servikal kanserler tüm gelişmekte olan ülkelerde en yaygın görülen kanser formudur ve dünyada da kadınlarda meme kanserinden sonra en sık görülen ikinci kanser türüdür. Kadınlarda tüm kanserlerin

yaklaşık olarak % 12'sini servikal kanserler oluşturmaktadır. Evrensel olarak her yıl ortalama 500 bin yeni vaka ve 250 bin de servikal kanserden ölüm tespit edilmektedir. Kültürel ve sosyoekonomik özelliklere bağlı olarak servikal kanser prevelansında bölgesel ve bölgesel içi farklılıklar gösterir. Tüm servikal kanserlerin % 80'i az gelişmiş ülkelerde görülür (9, 10). Türkiye de 2002 yılında kadınlar arasında yeni tanı alan kanser vakalarının % 3.13'ü oluşturduğu bulunmuştur (73). Serviks kanserinin Avrupa da yıllık görülme insidansı 13.2 / 100000 ve mortalite oranı 5.9/100000' dir (74).

Amerika Birleşik Devletlerinde her yıl ortalama 12.000 yeni vaka tanımlanmakta ve 4000 kişide bu hastalıktan ölmektedir. Etnik grup, ırk ve sosyoekonomik durum gibi demografik faktörler farklı popülasyonlarda hastalığın görülme sıklığındaki heterojen dağılımının nedeni olarak açıklanabilir ve ayrıca bu hastalarda farklı tedavi yaklaşımlarını ve taramalarındaki dengesizliği de yansıtabilir. Servikal kanser kadınlarda mortalite ve morbiditenin önemli bir nedenidir. Bu hastalık kişinin ve ailesinin kaliteli yaşamasını da etkilemektedir. Aynı zamanda dünya çapında sağlık bakım sistemlerine ağır yük getirmekte ve bu hastalığın teşhisi, tanısının konması için yapılan taramalar ve hastalığın takibi yüksek maliyet oluşturmaktadır (10).

Tahmini olarak yaşa bağlı servikal kanser oranı birçok gelişmiş ülkelerde her 100.000 kadında 3 ile 8 arasında değişirken birçok gelişmekte olan ülkelerde bu oran her 100.000 kadında 10 ile 25 arasında değişir (75).

Servikal kanserin sebebi ya da sebebiyle ilişkili olarak birçok risk faktör bildirilmiştir (9, 76).

Bunlar;

- Etnik faktörler
- Seksüel partner sayısı, birden çok cinsel partner (kendisinin ya da partnerinin)
- İlk cinsel ilişkinin yaşı, erken başlanan cinsel ilişki
- Steroid kontrasepsiyon, Uzun dönem OKS kullanımı
- Sigara içimi. İnvaziv servikal kanser riskini arttırdığı ve karsinogenik etkide HPV ile ilişkili olduğu kanıtı vardır.

- Malnutrisyon (kötü veya yetersiz beslenme)
- Düşük sosyoekonomik durum
- HPV, herpes simpleks tip II, klamidya trakomatis gibi infeksiyöz ajanlar
- Ve diğer nedenlerdir. Ançak bu faktörlerin biyolojik temeli kesin olarak açıklanamamıştır.

2.8.2. Servikal kanser taramaları, servikal sitoloji:

Servikal prekanseröz lezyonların histopatolojik sınıflaması için 1967'de Richart tarafından başlatılan Cervical İntra-epithelial Neoplasia (CIN) klasifikasyon World Health Organization (WHO, Dünya Sağlık Örğütü) sınıflamasında yer almıştır.

- CIN 1 hafif,
- CIN 2 orta ve
- CIN 3'de şiddetli displazi / karsinoma in situ'ya karşılık gelmektedir.

1990'da gözden geçirilmiş sınıflama Richart tarafından yüksek grade lezyonlar (CIN II / III) muhtemelen tam kanser prekürsörü olarak düşük grade lezyon (CIN 1 / HPV) bilinmeyen veya düşük progresif potansiyel olarak öne sürülmüştür. Servikal kanserler sitolojik (diskaryosis) ve ya histolojik (displazi veya CIN) olarak tanımlanabilen farklı evrelere ilerleyen sitolojik değişiklik ile uzun prekanseröz faza sahiptir.

CIN, invaziv servikal kanserlerin önlenmesinde etkili bir şekilde tedavi edilebilen prekanseröz bir durumdur. Servikal kanser ve CIN için tarama programına sahip ülkelerde yaşa bağlı servikal kanser insidansı ve mortalite oranları bu taramalara ve bulunan lezyonların tedavisine bağlı olarak % 60-% 90 azalmıştır (7).

Seksüel aktivitenin başladığı 2 yıl içinde servikal epitelyumda displastik değişiklikleri bulmak oldukça nadirdir. Genellikle bir dereceden diğerine ilerlemede gerekli değişiklikler için 3-5 yıl gereklidir. İnvaziv kanser gelişimi için tanımlanabilir sitogenetik anormallik için gerekli ortalama zaman 15-20 yıldır. Birçok CIN lezyonları zamanla geri dönüşlü olabilir. Geri dönebilme oranı diğer faktörler içinde en çok CIN'in derecesine ve kadının yaşına bağlıdır. Hastalığın gerilemesi 30 yaş altındaki kadınlarda 30 yaş üstündeki

kadınlara göre daha yaygındır. Müdahale olmaksızın erken prekürsör lezyonları 1/3'ü spontan olarak yok olur, 1/3'ü devam eder, 1/3' ü de CIN III'e veya CIN III'den invazive kansere ilerler (9).

Servikal sitoloji için 1988'de Ulusal Kanser Enstitüsü'nü (National Cancer Institute) tarafından "Bethesda Sistemi" (TBS) olarak yeni bir sitolojik sistem tanıtıldı. Bu sistem daha sonraları 1991 ve 2001'de yeniden revize edildi. Laboratuvarların birçoğu, Pap sürüntüsü test sonuçlarını bildirmek için Bethesda Sistemi'ni ya da bir modifikasyonunu kullanmaktadır. Bu Bethesda Sistemi'i ile laboratuvarla klinisyen arasındaki iletişimi kolaylaştıran ortak bir tanısal araç olarak kullanılması amaçlanmıştır (77, 78).

Servikal sitolojik anormallikler, köken alınan epitel hücre tipine göre " skuamöz hücreli" ve " glandüler hücreli" lezyonlar olmak üzere iki ana grupta incelenir (77). Bunlar;

1. **Skuamöz hücreli lezyonlar;**

- Atipik skuamöz hücreler (ASC, atypical squamous cells),
  - Önemi belirli olmayan atipik skuamöz hücreler; ASC-US
  - Atipik skuamöz hücreler-yüksek dereceli Lezyon; ASC-H
- Düşük dereceli skuamöz intraepitelyal lezyon (L-SIL, Low grade squamous intraepithelial lesion)
- Yüksek dereceli'li skuamöz intraepitelyal lezyon (H-SIL, high grade squamous intraepithelial lesion)
- Skuamöz hücreli karsinoma

2. **Glandüler hücreli lezyonlar;**

- Atipik endoservikal hücreliler
- Atipik endometriyal hücreliler
- Atipik glandüler hücreliler
- Endoservikal adenokarsinoma in situ (AIS)
- Adenokarsinoma

Yüksek dereceli'li skuamöz intraepitelyal lezyon; CIN 2 ve 3, karsinoma in situ, orta ve ilerlemiş displazileri kapsamakta olup persistan yüksek riskli enfeksiyon ile

beraberdir**.** Düşük dereceli skuamöz intraepitelyal lezyon ise; HPV, orta derecede displazi, CIN 1 ile beraberdir (79).

Prekürsör lezyonların (CIN gibi) erken teşhis ve tedavisi için yapılan düzenli taramalar servikal kanserin insidansını azaltmaya yardımcı olacaktır. Ayrıca servikal kanserlerin erken evresinde hayatta kalma oranları yaklaşık olarak evre 4'de %20-30, evre 3'de %50, evre 2'de %75, evre 1'de % 90 olduğu için yapılan düzenli servikal sitoloji taramalarıyla kanser mortalitesinde de düşme olacaktır (80).

2.8.3. Serviks Kanserinin Evrelemesi;

Öncelikle invaziv kanserin tanısı yapılır, hastalığın klinik durumunun evrelendirmesi The International Federation of Gynaecology and Obstetrics (FIGO)'ya göre sınıflandırılır. Bu da hastalığın prognoz ve tedavisi için yol göstericidir. FIGO'nun klinik evrelemesi primer tümörün büyüklüğüne ve vajina, parametriyum ve diğer uzak organlara hastalığın yayılmasına göre yapılır (75) (Tablo 2).

Tablo 2.Serviks Kanseri Evrelemesi (FİGO)

Preinvazif karsinom	
Evre 0 İn situ karsinom	intraepiteliyal karsinoma (Evre 0, tedavi istatistiklerine kesinlikle dahil edilmemelidir)
İnvazif karsinom	
Evre 1 Karsinom	servikste sınırlıdır.
Evre Ia	yalnızca mikroskobik olarak tanı koyulabilen "preklinik karsinom"
Evre Ia1	minimal mikroskobik stromal invazyon.
Evre Ia2	yalnızca mikroskobik olarak saptanabilen ve ölçülebilen lezyonlar; karsinom, kaynaklandığı gland veya yüzey epitelinin bazal memranından 5 mm'den daha az derinlikte ve 7 mm'den daha az genişlikte yayılım göstermelidir.
Evre Ib	Bundan geniş lezyonlar olarak sınıflandırılır. Evre Ib Klinik olarak görünsün / görünmesin, Ela2'den geniş yaylım gösteren lezyonlar.
Evre Ib1	tümör çapı <4 cm
Evre Ib2	tümör çapı >4 cm +
Evre II	Karsinom kollumu aşmış ancak pelvis duvarına ulaşmamıştır, vaginanın 1/3 alt kısmı dışındaki bölümü tutulmuştur.
Evre IIa	parametriyal tutulum gözlenmiyor
Evre IIb	parametriyal tutulum var
Evre III	Karsinom pelvis duvarına ulaşmıştır. Rektal tuşede tümör dokusu ile pelvis duvarı arasına girilmez. Tümör vagina 1/3 alt kısmını da içermektedir. Hidronefroz ve non-fonksiyone böbrek bu evreye girer.
Evre IIIa	karsinom pelvis duvarına ulaşmamıştır
Evre IIIb	pelvis duvarı tutulmuştur ve / veya hidronefroz veya nonfonksiyone böbrek
Evre IV	Karsinom gerçek pelvisi aşmış veya rektum ya da mukozasını klinik olarak tutmuştur. Ancak mukozada mevcut büllöz ödem Evre IV için yeterli değildir.
Evre IVa	komşu organlara yayılım
Evre IVb	uzak organ yayılımı

2.8.4. Servikal kanser ve enfeksiyon ilişkisi:

Serviksde görünen kanseröz skuamöz lezyonların ve prekanserözün kabul edilen ana nedeni, seksüel bulaşıcı faktörler ve ya human papilloma virüs (HPV) ve herpes simplex virüs (HSV) gibi kofaktörlerdir (81).

Enfeksiyon ajanının seksüel geçişle ilgili kanıtları, penil kanserlilerin eşlerinde serviks kanser riskinin hayatın ileri dönemlerinde arttığını gösteren çalışmalara dayanmaktadır. Bu bulgular penil ve serviks kanseri arasında mortalite ve insidans ilişkilerini gösteren korelasyon çalışmalarıyla daha da desteklenmiştir (82).

Servikal kanserin gelişmesinde majör risk faktörü içeren human papiloma virüsü (HPV)'dür. Serviks kanseri-HPV enfeksiyon ilişkisi akciğer kanseri - sigara ilişkisinden daha sıkı bir ilişkidir (82). HPV-DNA serviksin squamöz hücreli kanserin % 91'in üzerinde gösterilmiştir (8). Human papiloma virüsü E6 ve E7 proteinleri immortal primer insan epitelyal hücrelerde etkili olduğu saptanmıştır. Human papiloma virusü E6 p53 ile etkileşir ve ubiquitine bağlı yolakta bozukluk oluşturur. Human papiloma virüsü E6'nın diğer ana fonksiyonu katalitik telomeraz (hTERT) alt biriminin ekspresyonun aktive etmektir. Aynı zamanda E7'nin aktivasyonu pRb fonksiyonunun iptal edilmesine öncülük eder. Human papiloma virüsü E7 ayrıca siklin bağımlı kinaz (cdk)'ın yanı sıra siklin-A ve E' de bağlanır yani bunlar tümör supresör genleri olan p53 ve pRB'nin ürünlerini inaktife ederek hücre büyüme regülasyonunu engelleyebilir (81, 83). Dolayısıyla E6 ve E7 primer HPV onkogenlerdir. E6'nın p53'e bağlanması, p53'ün hücre içinde bozulmasına neden olur. Sadece yüksek-risk HPV-E6 p53'ün yıkımını sağlayabilir. Aynı şekilde sadece yüksek- risk HPV-E7'nin Rb'ye bağlanması transkripsiyon regülasyonunda aksamaya ve kontrolsüz hücre proliferasyonuna neden olur (84).

Seksüel geçişli HPV enfeksiyonunun hem CIN ile hem de servikal kanser arasında güçlü bir ilişki olduğu ileri sürülmüştür. Bu ilişki gelişmekte olan ülkelerde olduğu kadar gelişmiş olan ülkelerde de HPV enfeksiyonunun insidansındaki birlikteliği yansıtmaktadır (10).

2.8.5. Serviks kanseri ve mitokondriyal DNA mutasyon ilişkisi:

Servikal ve uterus kanserlerinde mitokondriyal DNA ile ilgili çalışmalar sınırlıdır. İnvaziv servikal kanser dünyadaki kadınların özellikle de gelişmekte olan ülkelerde kadın sağlığını bozan bir hastalık olarak devam etmektedir. Hala bu ülkelerdeki kadınlarda ölümlerin de en yaygın sebebidir (76).

Servikal kanserlerin yaklaşık olarak % 90'nı skuamöz hücreli (epidermoid) karsinoma, % 10'unu da adenokarsinoma oluşturmaktadır (8, 13). Adenoskuamöz ve küçük hücreli karsinomayı içeren diğer tipleri ise nadirdir. Son 20 yıldır adenokarsinomanın skuamöz hücreli karsinomaya oranında bir artış olmuştur. Bu da muhtemelen skuamöz hücreli karsinomanın görülme sıklığındaki azalmayla ilişkili olabilir. Servikal adenokarsinoma endoservikal epitelyumundan, özellikle de endoservikal kanal içinden ortaya çıkmaktadır (13).

Servikal kanser etkili tarama programları ile çoğunlukla önlenebilir bir kanser olup, servikal kanser taramaları için papanicolaou smear (pap) etkili bir testtir. Pap smear testi servikal sitoloji taraması premalign lezyonların erken saptanması servikal kanser oranlarının ciddi biçimde düşmesine neden olmuştur. Tarama için en ideal yaş seksüel aktivitenin başlamasına bağlı olarak prekanseröz lezyonların yüksek riskinden dolayı 30-40 yaş arasıdır ve prekanseröz lezyonlar bir kanser gelişiminden 10 yıl veya daha öncesinden saptanabilir (73).

Servikal kanserin mortalite oranını etkili pap testleri ile azaltmasına rağmen, gelişmekte olan ülkelerde gelişmiş ülkelerle karşılaştırıldığında bu oran daha azdır. Bu gerçek ise servikal kanserle olan ilişkisindeki bilgi eksikliğinden kaynaklanmaktadır. Benzer biçimde Türkiye'de servikal kanser için düzenli bir tarama programları yoktur (9, 73). İnsanda değişik jinekolojik malignensilerde mitokondriyal mikrosatellite instabilitesi (mtMSI) ve somatik mtDNA mutasyonları ile ilişkili çalışmalardan birçok veriler elde edilmiştir (4).

Somatik D-loop mtDNA mutasyonları, parafin içine gömülü örneklerden elde edilen uterus seröz karsinomada, endometrial kanserlerin % 48,4'ünde, meme kanserlerin % 29,4'de, servikal karsinomaların % 25,4'ünde ve bir veya daha fazla mtMSI taşıyan over karsinomaların ise yaklaşık % 21,9'unda rapor edilmiştir (4, 85).

Liu ve arkadaşları, malign over dokusundan izole edilmiş DNA'nın sekanslamasıyla yüksek oranda (% 60) mtDNA mutasyonları tespit etmişlerdir (86). Li ve arkadaşları, 5 skuamöz servikal karsinoma, 10 endometrial karsinoma ve 17 epitelyal ovarian kanser ve benign tümörler, 4 uterin myoma ve 4 ovaryen epitelyal kanserlerinde mitokondriyal DNA mutasyon oranlarını analiz etmişlerdir. Bu mitokondriyal DNA mutasyon oranı malign tümörler için % 68.8 ve benign tümörler için %25'di. Her ikisinde de mitokondriyal DNA mutasyonları sitokrom-b genlerinde lokalize olan hot-spot bölgesindeydi. Uterus seröz karsinoma örneklerinde ve bunların normal bitişik endometriyum örneklerinde mtDNA'nın D-loop bölgesindeki değişiklikler tümörlerin % 63'ünde ortaya çıkmıştır. Servikal kanserinde de mitokondriyal D-loop bölgesinde mononükleotid tekrarları (D310)'ında hot-spot mutasyonu gözlenmiştir (1).

2.9. Kronik Servisit:

Kronik servisit, eritem, ödem, ektoservikste küçülme, endoservikal glandların ve skuamöz epitelin inflamasyonu ile karakterize bir klinik sendromdur (87). Kronik servisit jinekolojik hastalıkların en sık rastlanılanı olup, kadınların %50'sinden çoğunlukla da üretkenlik çağında görülmektedir. Bu kadar sık görülmesine rağmen tanıda etiyolojik ajanı tespit etmede ve tedavide önemli sorunlar mevcuttur.

Kadınların en az 1/3'ünde bakteriyel sebep olarak en sık izole edilen *Chlamydia trachomatis (CT) ve Neisseria gonorrhoeae (GC)* dir. Diğer patojenler arasında ise *Mycoplasma genitalium, Mycoplasma hominis, Ureaplasma urealyticum, bacterial vaginosis, herpes simplex virus (HSV), cytomegalovirus (CMV), Trichomonas vaginalis ve adenovirus* sayılabilir (87, 88).

Servisit bazen pelvik inflamasyon hastalık (PİD), endometrit gibi komplikasyonlarla da sonuçlanabilir. Bazı araştırmalarda servikal kanserin patogenezisinde servikal inflamasyonun neden olduğu bildirilmiştir (88).

2.10. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR):

Polimeraz zincir reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction, PCR) yöntemi; çoğaltılması istenen herhangi bir gen veya DNA bölgesinin *in vitro* şartlarda çoğaltılması yani bir bakıma in vitro klonlanmasıdır. İlk olarak 1985 yılında Kary Mulis ve arkadaşları tarafından ortaya atılmış ve daha sonra geliştirilerek uygulanmaya başlamıştır**.** Bu yöntem tek bir hücreden elde edilen DNA örneğini bile çoğaltabilecek kadar güçlü bir yöntemdir. Polimeraz zincir reaksiyonu işlemi için DNA örneği, çoğaltılacak bölgeye spesifik bir çift primer, deoksiribonükleik asitler (dNTP), ısıya dayanıklı DNA polimeraz enzimi, uygun pH ve iyon koşullarını sağlayan tampon karışımları gereklidir. Bu maddeler belirli oranlarda uygun bir tüpün içinde karıştırılır ve bu tüpler PCR cihazına yerleştirilerek işlem başlatılır (89).

PCR işlemi 3 aşamada oluşur.

1- Çift sarmal DNA'nın denatürasyonu
2- Primerlerin bağlanması (Annealing)
3- Primerlerin uzaması (Extension)

Denatürasyon aşamasında; çift sarmal olan DNA 95-100 ^{0}C 'de ısıtılarak DNA çift sarmalını bir arada tutan hidrojen bağlarından ayrılır ve DNA tek sarmal hale gelmesi sağlanır.

Primerlerin bağlanma basamağında; ortalama 17-19 baz uzunluğundaki her bir primer denatüre haldeki DNA üzerindeki doğru hedefle eşleşene kadar bağlanma işlemi yapılır. Bir çift olarak dizayn edilen primerlerin uzunluğu arttıkça spesifikliği artar ancak uzunluk artınca bağlanma işlemi zorlaşır. Primer çiftlerinden her biri DNA'nın bir zincirine bağlanarak bir fermuar gibi ilgilenilen bölgenin çoğaltılmasını sağlarlar. Bu işlemde primerin baz kompozisyonuna göre 40-60 ^{0}C arasında gerçekleştirilir.

Primerlerin uzama aşamasında da; serbest halde ortamda bulunan nükleotidler primerlere bağlanarak ilgilenilen bölgenin amplifiye edilmesini sağlarlar. Bu işlemde Thermus aquaticus (Taq) adlı bakteriden elde edilen Taq polimeraz enzimi rol oynar. Bu işlem için optimum sıcaklık 70-75^{0}C'dir. Yukarda bahsedilen 3 aşama bir döngü olarak adlandırılır, bir döngü 3-5 dakika sürer ve tüm PCR işlemi ortalama 20-40 döngüden oluşur.

İlk birkaç döngü primerlerin hedef DNA'daki yapışabilecekleri tarama safhasıdır, yani amplifikasyon ilk birkaç döngüden daha sonra başlar. Her döngüde bir önceki DNA miktarı iki katına çıkar. Yani döngü sayısını n olarak kabul edersek çoğaltılmış DNA miktarı 2^n olarak kabul edilir. PCR uygulamalarında standart ısı uygulamasını sağlamak amacıyla her döngü için gerekli ısıyı düzenli olarak ayarlayan otomatik aletler (thermocycler) geliştirilmiştir (89).

3. MATERYAL VE METOD

3.1. MATERYAL

3.1.1. Çalışma Grubu

Bu çalışma 2008-2009 yılında Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, Patoloji Anabilim Dalı, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı ve Fırat Üniversitesi Patoloji Anabilim Dalı arasında gerçekleştirilmiştir. Çalışmada, kronik servisit ve servikal kanserli hasta grubu ile servikal bir hastalığı bulunmayan kontrol grubu bireyler arasında olan 20-79 yaş aralığında bireyler değerlendirilmeye alınmıştır.

Çalışmaya Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalında kronik servisit, serviks kanseri tanısı alan hastalar ve Patoloji Anabilim dalında kronik servisit, serviks kanseri tanısı almış hastalar ile Fırat Üniversitesi Patoloji Anabilim Dalından alınan arşivlenmiş servikal kanser tanılı parafin bloklardaki dokular dahil edilmiştir. Kronik servisit, serviks kanseri ön tanısı ile biyopsi alınan veya tedavi amaçlı opere edilen hastaların biyopsi veya operasyon örneklerinden ve patoloji anabilim dalı tarafından kronik servisit ve servikal kanser tanısı almış hastaların dosyaları retrospektif olarak değerlendirilerek hastaların parafin dokuları kullanılmıştır. Ayrıca patoloji tanısı serviks kanseri çıkmayan veya farklı bir endikasyonla opere edilen hastaların örnekleri kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Hastaların bilgileri hastane arşivindeki dosyalardan temin edilmiştir.

3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

DNA izolasyonu için

- Dokudan DNA izolasyonu kiti (Gentra)
- Etanol (MERCK)
- İsopropanol (MERCK)

PCR için

- 3 takım Primer (Biobasic)

- Taq DNA polimeraz (Fermentas)
- dNTP miks (Biobasic)
- Mineral oil (Sigma)

Agaroz jel hazırlanması için

- 10X gel loading dye
- Agaroz (Sigma)
- EDTA (Sigma)
- Trizma bazı (Sigma)
- Ethidium bromide (Sigma)
- Borik asit (Sigma)
- Marker DNA (Fermentas-gene ruler 100 bp DNA ladder): Marker DNA fragment büyüklükleri; 1031- 900 - 800 - 700 – 600 – 500 – 400 – 300 – 200 – 100 – 80 bp (base pairs)

3.1.3 Kullanılan Alet ve Cihazlar

- Elektronik terazi (Precisa 160 M)
- Santrifüj (Nüve CN180, NF048)
- Spektrofotometre (WPA UU 1101)
- pH metre (Jenway 3010)
- Soğutmalı santrifüj (Harrier 18/80)
- Otomatik pipetler 0,5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl (Brand)
- Mikropipet uçları 0,5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl (Labtips)
- 0,5 ml'lik ependorf tüpü (Axygen)
- 2 ml'lik ependorf tüpü (Axygen)
- Su banyosu (Nüve BM402)
- Plastik pastör pipeti
- Isıtmalı manyetik karıştırıcı (Velp Scientifica)
- Electrophoretic gel system (Bio-Rad Sub-cell GT)

- Thermal cycler (Sanyo DNA Amplifier)
- Buzdolabı (REGAL PDD 1280)
- Yatay elektroforez sistemi (Biolab-wealtec elite 300 plus)
- Jel görüntüleme ve analiz sistemi (Syngene)
- Cam mezür
- Cam erlen mayer
- Cam şale

3.1.4. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

10X TBE:

- 108 gr Trizma bazı
- 55 gr Borik asit
- 40 ml 0,5 M EDTA (pH:8,0)
- 800 ml distile suda ısıtılarak çözündürülür ve total volüm distile su ile 1000ml'ye tamamlanır.

1X TBE;

- 10X TBE stok solüsyonundan ayrı bir kaba alınarak distile su ile 1/10 oranında seyretildi.

0,5 M EDTA:

- 186 gr EDTA 800 ml distile suda ısıtılarak çözündürülür. pH NaOH ile 8,0'e ayarlanır. Total volüm 1 L'ye tamamlanır.

Ethidyum bromide:

- 1 mg/mL konsantrasyonunda hazırlanıp alüminyum folyoya sarılarak +4 ^{0}C'de saklandı.

3.1.5. Mitokondriyal DNA 4977-bp delesyonundaki İncelenen Bölge:

mtDNA'nın 4977-bp delesyonunu gösterebilmek için hazırlanan primerler "http://www.mitomap.org/" adresli veri kaynağından gen dizileri esas alınarak hazırlanmıştır. Her bir primerle PCR sonucu elde edilen ürünler % 1,8'lik Agaroz jelde marker DNA ile yürütülerek kontrol edilmiştir.

3.1.6. Mitokondriyal DNA'nın 4977-bp delesyonu için kullanılan primer (Oligonükleotidler) çiftleri (F; forward, R; reverse):

Çalışmada kullanılacak olan Primer çiftleri (Oligonükleotid), ticari olarak Bio Basic Inc. firmasına yaptırılmıştır. Bu primer çiftleri pozitif ve negatif bölgesi olmak üzere 2 adet kontrol bölgesi ve 1 adet delesyon bölgesini içermekteydi. PCR çalışmalarında kullanılacak olan oligonükleotidler, insan mtDNA'sı üzerindeki ilgili gen bölgesinin amplifikasyonunu gerçekleştirmek için kullanıldı. Satın alınan primerlerin nükleotid sekansı tablo 3'de belirtilmiştir.

Tablo 3.Mitokondriyal DNA 4977-bp delesyonu için kullanılan primer çiftleri. (F; forward, R; reverse)

Primer 1	**470 bazlık fragment, delesyon bölgesi**	
F	5- CGG TCA ATG CTC TGA AAT CTG TG-3	8164–8186
R	5- TCG AGT GCT ATA GGC GCT TGT C -3	13611–13588
Primer 2:	**1029 bazlık fragment, delesyon bölgesi dışındaki pozitif kontrol bölgesi**	
F	5- TAT AGT GGA GGC CGG AGC AG -3	6251-6270
R	5- GAA TGA GCC TAC AGA TGA TA -3	7280-7261
Primer 3	**564 bazlık fragment, delesyon bölgesi içindeki negatif kontrol bölgesi**	
F	5- TGA GGG TCT TAC TCT TTT AGT -3	9981
R	5- GGT GTG AGC GAT ATA CTA GT -3	10545

Primer 1 bölgesi (90), mitokondriyal DNA'da 4977 bç büyüklüğünde delesyon olup olmadığının incelenmesi için kullanıldı. Delesyon olması durumunda 470 baz büyüklüğünde dizi görülmesi gerekmektedir.

Primer 2 kullanılan delesyon bölgesi dışındaki pozitif kontrol bölgesi, doku örneklerinden izole elde edilen DNA materyali içerisinde mitokondriyal DNA'nın var olup olmadığını göstermek için kullanıldı. Agaroz jelde 1029 bazlık parça gözlenmesi PCR işleminin başarılı olduğunu gösterdi. 1029 bazlık DNA dizisi gözlenemediği taktirde örneklerin DNA izolasyonlarının veya PCR işleminin başarısız olduğu kabul edilerek bu örneklerin DNA izolasyon işlemleri veya PCR işlemi tekrarlandı.

Primer 3 kullanılan delesyon bölgesi içindeki negatif kontrol bölgesi ise heteroplazmiyi ve ya yapılan işlemlerde hata olup-olmadığını göstermek amacıyla kullanıldı. Agaroz jelde bu bölge 564 bazlık bir DNA fragmenti olarak gözlendi.

Agaroz jelde; primer 1 ve primer 2'nin görülmesi primer 3'ün görülmemesi mitokondriyal DNA'da 4977 bç'lik bir delesyon olduğunu, primer 2 ve primer 3'ün görülmesi primer 1'in görülmemesi mitokondriyal DNA'nın normal olduğunu ve primer 1, primer2 ve primer 3'ün aynı anda görülmesi ise mitokondriyal DNA'da heteroplazmi olduğunu göstermektedir (Bkz. Tablo 5).

3.2. METOD

3.2.1. Taze Dokudan DNA İzolasyonu

Kronik servisit veya servikal malignite tanısı almış veya almamış bireylerden alınan 5 mg'lık taze dokudan DNA izolasyonu kiti (GENTRA-Genomic DNA Purification Kit) kullanılarak DNA ekstraksiyonu yapıldı. Bunun için önce 5 mg doku steril petri kabında steril büstürü ile küçük parçalara ayrıldı. Üzeri etiketlenmiş 1,5 ml'lik ependorf tüpüne parçalanmış doku örneğine aktarıldı ve 300 µl cell lizis solusyonu ilave edilerek homojenize edildi. Maksimum ürün elde etmek için 1,5 µl Proteinaz K solusyonu (20 mg/ml) eklenip 25 kere alt üst edildi, 55 ^{O}C'de 1 gece doku partikülleri kaybolana kadar bekletildi. Sonra 1,5 µl RNAase A solusyonu (4 mg/ml) eklendi, örnek 25 kez altüst edildi ve daha sonra 37 ^{O}C'de 30 dk inkübe edildi. Oda ısısında soğutuldu. Protein presipitasyon solüsyonu 100 µl eklendi. Vorteksle yüksek devirde 20 sn karıştırılır. Sonra 13000 rpm devirde 3 dk. santrifüj edildi. Protein presipitasyonu ile sıkı bir pellet oluşturulması sağlandı (Oluşmayan örneklerde 5 dk. buzda bekletilip sonra tekrar vortexlenip 13000 rpm devirde 3 dk. santrifüj edildi).

Yeni bir 1,5 ml'lik ependorf tüpüne 300 µl %100'lük isopropanol koyuldu, süpernatant üzerine aktarıldı. Yaklaşık 50 kez alt üst edildi. Bu aşamada DNA görüldü. Sonra 13000 rpm devirde 3 dk. santrifüj edildi. Süpernatant kısmı atılıp temiz bir absorban kâğıda tüp ters çevrilip kurutuldu. 300 µl % 70' lik ethanol eklenerek birkaç kez alt üst edilip DNA yıkandı. 13000 rpm devirde 3 dk. santrifüj edildi absorban kağıda tüp ters çevrilerek 30 dk. oda ısısında kurutuldu. Tüp içerisine 50 µl DNA Hidratasyon solusyonu eklenerek sulandırıldı. DNA çözünmesi için oda ısısında bir gece bekletildi. Örnek daha sonra -20 ^{O}C saklandı.

3.2.2. Parafine Gömülü Dokudan DNA İzolasyonu;

Kontrol grubu için parafin bloklardan alınan örnekler DNA izolasyonu kiti (Dr. Zeydanlı DZDNA- Parafine Gömülü Dokudan DNA İzolasyon kiti) kullanılarak DNA ekstraksiyonu yapıldı.

Bunun için önce örnek gömülü parafin bloklardan 0,2 µm kesitler alınarak 1,5 ml nükleaz free eppendorf tüpüne aktarıldı. Üzerine 1 ml Ksilen eklendi. Tüp hafifçe alt üst edilerek parafinin çözülmesi sağlandı. Bu şekilde oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi. Doku 5000 rpm'de 3 dk santrifüj edilerek çöktürüldü ve süpernatant pipet yardımıyla uzaklaştırıldı.

Pelet üzerine tekrar 500 µl Ksilen eklendi ve tüp alt üst edilerek yine santrifüj yapıldı, parafinin iyice temizlenmesi sağlandı. Süpernatant pipet yardımıyla uzaklaştırıldı. Pelet üzerine Ksilen'i uzaklaştırmak için 1 ml % 99'luk alkol koyuldu ve alt üst edilerek karıştırıldı, 5000 rpm'de 1 dk santrifüj edilerek doku çöktürüldü. Süpernatant pipet yardımıyla uzaklaştırıldı. İkinci yıkama 750 µl % 75'lik alkolle ve 3. yıkama işlemi ise 750 µl dH_2O ile yapıldı. Her defasında tüp hafifçe çalkalanıp, çöktürülüp ve süpernatant uzaklaştırıldı.

Bu işlemlerle doku parafinden arındırılmış oldu. Daha sonra 1,5 ml nükleaz free tüp içine 500 µl Sol B, 25 µl Sol A ve doku örneği koyuldu. Vortekslendikten sonra 42°C'de 1 saat inkübe edildi.

Tüpler üzerine 500 µl Sol C koyuldu. Vortekslendikten sonra 10.000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Oluşan 2 fazdan, üst kısımdaki berrak faz alınarak (~500 µl) temiz bir 1,5 ml nükleaz free tüpe koyuldu. Üzerine 500 µl Sol D eklendi. Hafifçe vortekslenerek 10.000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi.

Süpernatant atıldı ve üzerine 500 µl Sol E koyuldu. 10.000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant atıldı. Tüpler 37°C etüv de kurutuldu. Kuruduktan sonra 50 µl distile su ile sulandırıldı.

3.2.3. Spektrofotometrede DNA Konsantrasyonunun Ölçümü

İzole edilen DNA'ların 1/600 dilüsyonları hazırlandı ve UV spektrofotometre cihazında DNA için spektrum aralığı 260 nm ve protein için 280 nm dalga boylarında absorbans değerleri ölçüldü. 260 nm dalga boyunda okunan absorbans değerlerinden, örneklerdeki DNA konsantrasyonu hesaplandı. 260 nm OD (optical density) ölçümünün 280 nm OD ölçümüne oranı bize DNA'mızda protein ya da RNA kontaminasyonu olup

olmadığı hakkında bilgi verir. A_{260}/A_{280} oranının 1,8 ile 2,0 arasında olması beklenir. OD değerinin 2,0'nin üzerinde olması RNA kontaminasyonuna, 1,8'in altında olması da protein kontaminasyonuna işaret eder. Bu durumda PCR sonuçlarının sağlıklı çıkması için DNA'ların saf olması gerekmektedir.

Polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılmak üzere DNA'lar DNA hidrasyon solüsyonu ile 50 ng/ µl olacak şekilde sulandırıldı. Her bir örnek için kontrol amaçlı 2 defa okuma yapılmıştır. Bu yöntemle DNA örneklerinin saflığı kontrol edildi ve miktarı saptandı.

3.2.4. PCR Ürünlerinin Elde Edilmesi

Her bir birey için 3 tane 0,5 ml'lik PCR tüpü etiketlenerek hazırlandı. Bunlardan birinci tüp delesyon bölgesi için, ikinci tüp pozitif kontrol bölgesi için, üçüncü tüp ise negatif kontrol bölgesi için tüpler kullanıldı. Polimeraz zincir reaksiyonu için 50 µl'lik miks hazırlandı, bunun içinde her tüpe sırası ile 23 µl steril bidistile su, 10 µl DNA çözeltisi, 5 µl 10X Taq buffer, 6 µl $MgSO_4$, 2 µl dNTP miks, 1,5 µl Forward primer, 1,5 µl Reverse primer, 1 µl Taq DNA polimeraz eklendi. Tüpler PCR cihazına yerleştirilmeden önce üzerlerine buharlaşmayı önlemek için 40 µl mineral oil eklendi. Polimeraz zincir reaksiyon cihazında tüpler aşağıdaki programlara göre çalıştırıldı.

PCR Protololü:

Program 1: 95 ^{O}C'de 1 dakika olmak üzere 1 siklüs
Program 2: 94 ^{O}C'de 25 saniye
60 ^{O}C'de 35 saniye
72 ^{O}C'de 1 dakika olmak üzere 31 siklüs
Program 3: 72 ^{O}C'de 10 dakika olmak üzere 1siklüs

PCR işlemi bitirildikten sonra her bir tüpten 15 µl PCR ürünü alınarak etiketlenmiş 0,5 ml'lik ependorf tüplerine aktarıldı ve üzerine 3 µl DNA boyası (10X gel loading dye) eklendi. Böylece PCR ürünleri agaroz jelde yürütülmeye hazır hale getirildi. Marker DNA,

0,5 ml'lik bir PCR tüpüne 5 µl distile su üzerine 1 µl DNA boyası ve 1µl marker DNA eklenerek hazırlandı.

3.2.5. PCR Ürünlerinin Agaroz Jelde Yürütülmesi

PCR'la elde edilen ürünlerin yürütülmesi için önce % 1,8'lik agaroz jel hazırlandı. Bunun için önce hassas terazide 1,8 gr agaroz tartılarak cam erlen mayere aktarıldı ve agarozu çözdürmek için tampon solusyon olarak üzerine 100 ml 1XTBE eklendi. Bu karışım ısıtıcılı manyetik karıştırıcıda agaroz tamamen eriyip şeffaf hale gelinceye kadar karıştırıldı. DNA'nın jelde görüntülenmesi için de şeffaflaşan çözeltiye 30 µl ethidium bromide eklendi ve çözelti karıştırıcıdan alınarak yaklaşık 50^{O}C'ye kadar soğutuldu. Daha sonra jel tablasına döküldü ve üzerine 15 kuyucuklu tarak yerleştirildi ve donması için beklendi. Jel tamamen donduktan sonra tarak çıkartıldı ve jel 1XTBE ile doldurulmuş elektroforez tankına yerleştirildi. Daha sonra yukarda söylenen şekilde hazırladığımız PCR ürünleri ve marker DNA her bir kuyucuğa bir PCR ürünü yerleştirilmek sureti ile jele yüklendi ve 90 V akımda katottan anoda doğru 2 saat yürütüldü. Süre sonunda elektroforez tankından çıkarılan jel transillüminatör üzerine yerleştirilerek UV ışık altında görüntülendi, elde edilen görüntü cihazın kamerası vasıtası ile bilgisayara aktarıldı. Görüntülemede delesyon bölgesi için 470 bazlık bir fragment, delesyon bölgesi dışındaki pozitif kontrol bölgesi için 1029 bazlık fragment, delesyon bölgesi içindeki negatif kontrol bölgesi için ise 564 bazlık fragment gözlendi ve bu rakamlar kodlanarak kaydedildi.

3.2.6. İstatistiksel analizler

Veriler sayı, yüzde, ortalama ve standart sapma olarak verildi. Bütün istatistiksel testler "SPSS® for Windows computing program, Version 12.0'' ile gerçekleştirildi. Hastalık tipi ile mDNA sonuçları ki-kare ile test edildi. İstatistiksel önemlilik düzeyi $p< 0,05$ alındı.

4. BULGULAR:

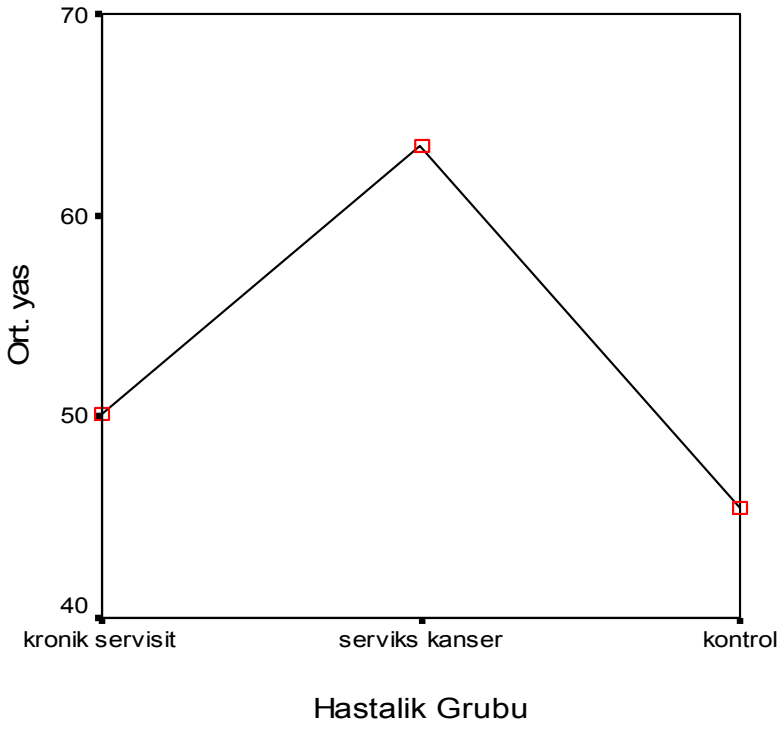
Çalışmamızda hastalık grubu olarak kronik servisit, serviks kanseri tanısı almış hastalar ile servikal hastalığı olmayan kontrol grubu kişiler seçilmiş olup bu kişilerin dokularından mtDNA izolasyonu yapılarak mitokondriyal DNA delesyonları çalışıldı. Çalışmaya 35 kronik servisitli hasta, 21 serviks kanserli hasta ve kontrol grubu olarakta kronik servisit ve serviks kanseri tanısı dışında, herhangi bir nedenle biyopsi alınan gönüllü 16 birey olmak üzere toplam 72 kişi dahil edilmiştir.

Toplam 72 hastanın yaşları 28-79 arasında değişirken, yaş ortalamaları 52,3 ± 11,4 olarak hesaplandı. Hasta gruplarına göre yaş dağılımı ise; kronik servisitli 35 hastanın yaşları 40-72 arasında değişirken, yaş ortalamaları 50,2 ± 8,9 olarak hesaplandı. Serviks kanseri olan 21 hastanın yaşları 47-79 arasında değişirken, yaş ortalamaları 62,4 ± 9,9 olarak hesaplandı. Kontrol grubu 16 hastanın yaşları 28-61 arasında değişirken, yaş ortalamaları 45,5 ± 8,6 olarak hesaplandı. Hasta ve kontrol grubunun demografik özellikleri tablo 4'de verilmiştir. Hastalık tipi ve ortalama yaş arasındaki ilişki şekil 5'de gösterilmiştir.

Tablo 4.Hasta ve kontrol grubunun demografik özellikleri.

(Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.)

	Kronik servisit	Servikal kanser	Kontrol	Toplam
N	35	21	16	72
yaş	50,2 ± 8,9 (40-72)	62,4 ± 9,9 (47-79)	45,5 ± 8,6 (28-61)	52,3 ± 11,4 (28-79)



Şekil 5. Hastalık tipi ile ortalama yaş arasındaki ilişkinin grafiksel gösterimi.

4.1.1. Laboratuvar Bulguları

Hasta ve kontrol grubundan alınan örneklerin değerlendirilmesinde;

Hasta ve kontrol grubu doku örneklerinden mitokondriyal DNA elde edildi. Elde edilen mitokondriyal DNA'dan üç bölge çalışıldı. Birinci bölge mitokondriyal DNA'nın 4977 bç delesyon bölgesi olup, beklenen delesyon durumunda PCR ürünü olarak 470 bazlık DNA fragmenti elde edilmiştir. İkinci bölge delesyon bölgesi dışında kalan pozitif kontrol bölgesi, PCR ürünü olarak 1029 bazlık DNA fragmenti elde edilmiştir. Üçüncü bölge delesyon bölgesi içindeki negatif kontrol bölgesi, PCR ürünü olarak 564 bazlık DNA fragmenti elde edilmiştir. Elde edilen PCR ürünleri % 1,8'lik agaroz jel kullanılarak, DNA marker rehberliğinde gösterildi (Tablo 5).

Tablo 5. Agaroz Jelde Görülen PCR ürünlerinin Değerlendirilmesi.

	Normal	Heteroplazmi	Homoplazmi
1.bölge- (a)		470 bç	470 bç
2.bölge- (b)	1029 bç	1029 bç	1029 bç
3.bölge- (c)	564 bç	564 bç	

Kronik servisitli 35 hastadan alınan materyalden elde edilen mitokondriyal DNA'da yapılan çalışmada, 22 hastada heteroplazmi (% 80,0), 7 hastada normal (% 20,0) bulunurken, hiçbir kronik servisitli hastada 4977 bç'lik homoplazmik delesyon bulunamadı.

Serviks kanserli 21 hastada yapılan mitokondriyal DNA çalışmasında, 17 hastada normal (% 81), 2 hastada heteroplazmi (% 9,5), 2 hastada 4977 bç'lik homoplazmik delesyon (% 9,5) bulundu.

Kontrol grubu olarak 16 bireyin doku örneğinde yapılan mitokondriyal DNA çalışmasında, 5 hastada heteroplazmi (% 31,2), 11 bireyde normal (68,8) bulunurken hiçbir kontrol grubu bireyde 4977 bç'lik homoplazmik delesyon bölgesi bulunamadı.

Hastalardan elde edilen bulgularla ilgili tablo (Tablo 6,7) ve fotoğraflar (Şekil 6,9) aşağıdadır.

Hastalik tipi ile mitokondriyal DNA mutasyon sonucunun karşılaştırılması tablo 6 ve tablo 7'de özetlenmiştir.

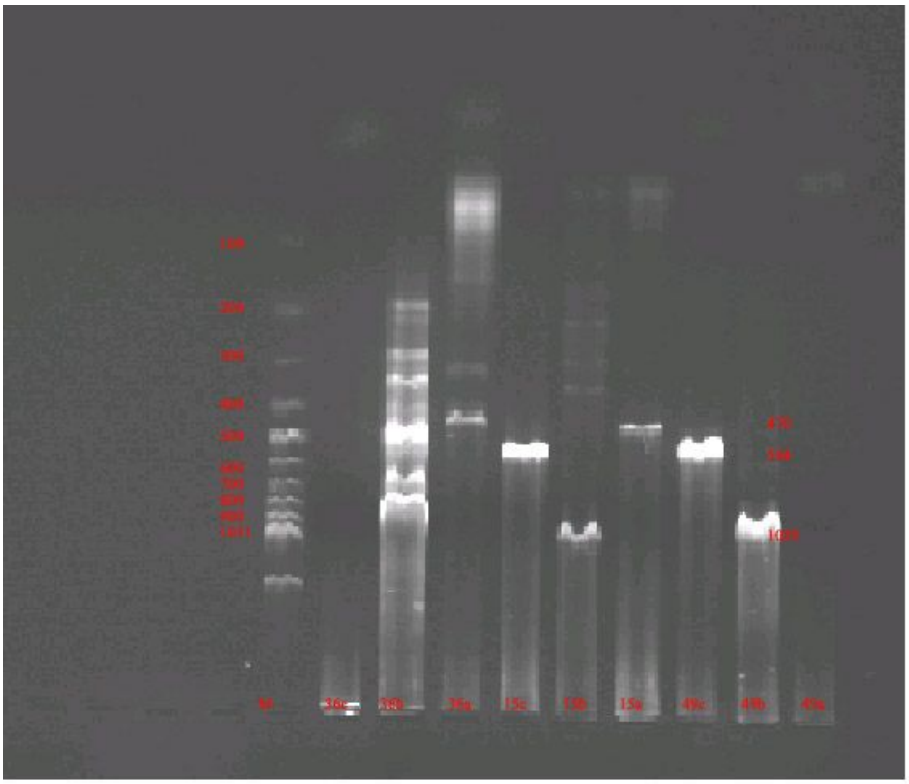
Tablo 6. Hastalık tipi ile mitokondriyal DNA mutasyon sonucunun karşılaştırılması

	mtDNA mutasyon sonucu						
	NORMAL		HOMOPLAZMİ		HETEROPLAZMİ		Toplam
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı
Kronik servisit	7	20,0	0	0,0	28	80,0	35
Serviks kanser	17	81,0	2	9,5	2	9,5	21
Kontrol	12	75,0	0	0,0	4	25,0	16
Toplam	36	50,0	2	2,8	34	47,2	72

Ki-kare:30,8 p=0.001

Tablo 7. Serviks kanserli hastaların yaş, hastalık tipi, patolojik tanı ve mtDNA 4977 bç delesyon sonucu.

Hasta sıra no	Adı ve soyadı	Yaş	Hastalık tipi	Patolojik Tanı	mtDNA 4977 bç delesyon sonucu
5	E.A	57	Serviks kanser	Adenokarsinoma	HETEROPLAZMİ
10	R.Ç	73	Serviks kanser	Yassı Epitel hücreli karsinoma	DELESYON
16	P.C	47	Serviks kanser	Yassı Epitel hücreli karsinoma	HETEROPLAZMİ
57	P.C	47	Serviks kanser	Yassı Epitel hücreli karsinoma	NORMAL
58	C.A	63	Serviks kanser	Yassı Epitel hücreli karsinoma	NORMAL
59	T.Ş	47	Serviks kanser	Yassı Epitel hücreli karsinoma	NORMAL
60	B.B	60	Serviks kanser	Yassı Epitel hücreli karsinoma	NORMAL
61	A.İ	79	Serviks kanser	Yassı Epitel hücreli karsinoma	DELESYON
62	M.B	62	Serviks kanser	Yassı Epitel hücreli karsinoma	NORMAL
63	N.G	69	Serviks kanser	Yassı Epitel hücreli karsinoma	NORMAL
64	E.Ç	59	Serviks kanser	Yassı Epitel hücreli karsinoma	NORMAL
65	İ.Z	76	Serviks kanser	Yassı Epitel hücreli karsinoma	NORMAL
66	A.Y	63	Serviks kanser	Yassı Epitel hücreli karsinoma	NORMAL
67	S.K	60	Serviks kanser	Yassı Epitel hücreli karsinoma	NORMAL
68	E.D	66	Serviks kanser	Yassı Epitel hücreli karsinoma	NORMAL
69	Z.Ö	70	Serviks kanser	Yassı Epitel hücreli karsinoma	NORMAL
70	P.K	51	Serviks kanser	Yassı Epitel hücreli karsinoma	NORMAL
71	G.G	53	Serviks kanser	Yassı Epitel hücreli karsinoma	NORMAL
72	L.S	66	Serviks kanser	Yassı Epitel hücreli karsinoma	NORMAL
76	S.A	64	Serviks kanser	Adenokarsinoma	NORMAL
77	A.A	79	Serviks kanser	Adenokarsinoma	NORMAL



Şekil 6. 15, 36 ve 49 nolu hastalara ait mitokondriyal DNA 4977 bç delesyonunun PCR çalışması ile elde edilen ürünlerin jel görüntüsü**.**

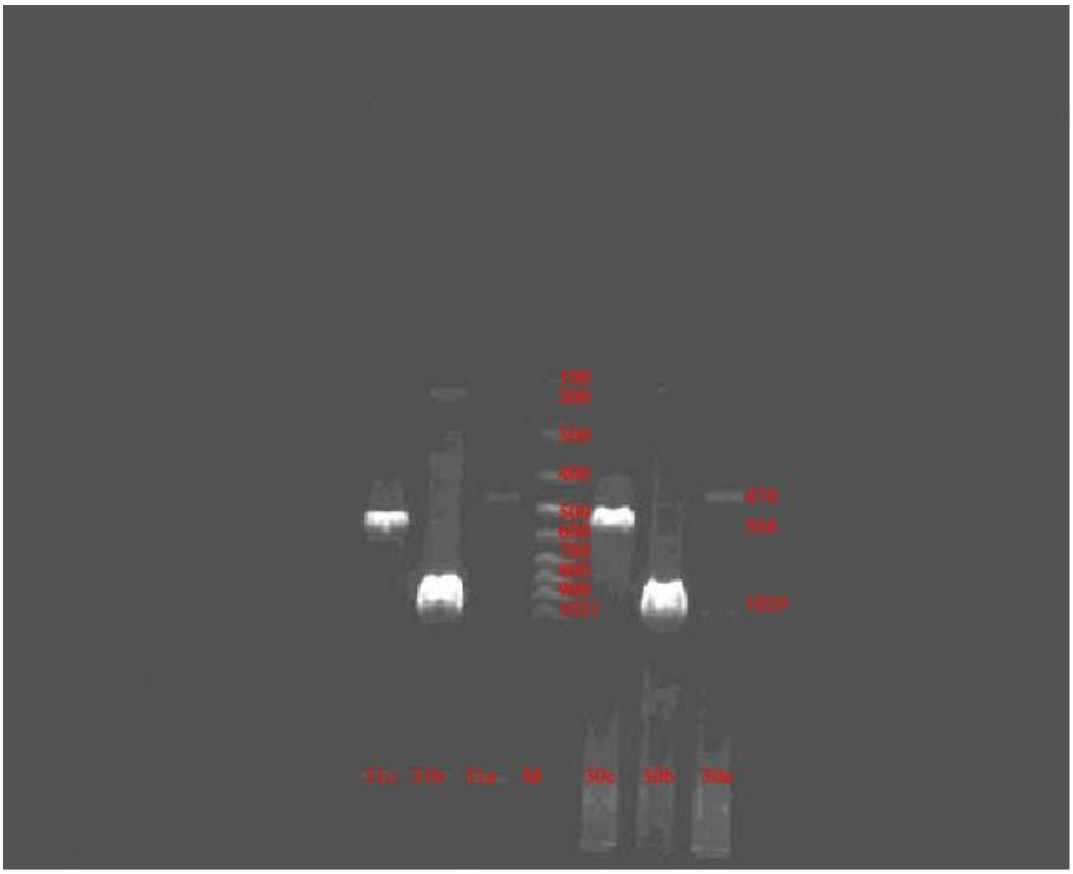
a; delesyon bölgesi- 470 bç, b; pozitif kontrol bölgesi-1029 bç, c; negatif kontrol bölgesi-564 bç

15, 36 ve 49 nolu hastalarda yapılan mitokondriyal DNA 4977 bç delesyon çalışması sonuçu;

15 nolu vakada, jelde a, b ve c bandları görüldüğünden heteroplazmi olarak değerlendirildi.

36 nolu vakada, jelde a ve b bandları görüldüğünden homoplazi delesyon olarak değerlendirildi.

49 nolu vakada, jelde b ve c bandları görüldüğünden normal olarak değerlendirildi.

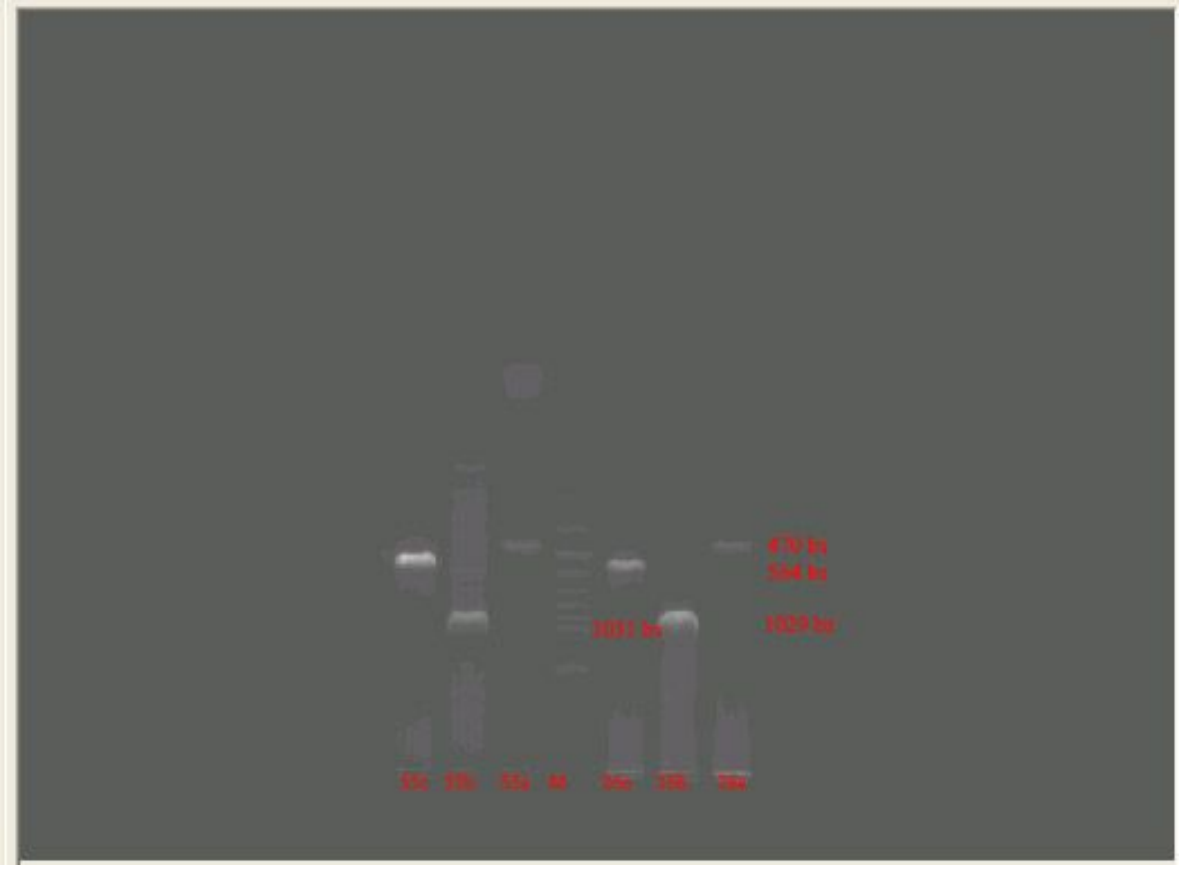


Şekil 7. 30 ve 31 nolu hastalara ait mitokondriyal DNA 4977 bç delesyonunun PCR çalışması ile elde edilen ürünlerin jel görüntüsü.

a; delesyon bölgesi- 470 bç, b; pozitif kontrol bölgesi-1029 bç, c; negatif kontrol bölgesi-564 bç

Marker (M) DNA büyüklükleri sırası 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1031 bp uzunluklarındadır.

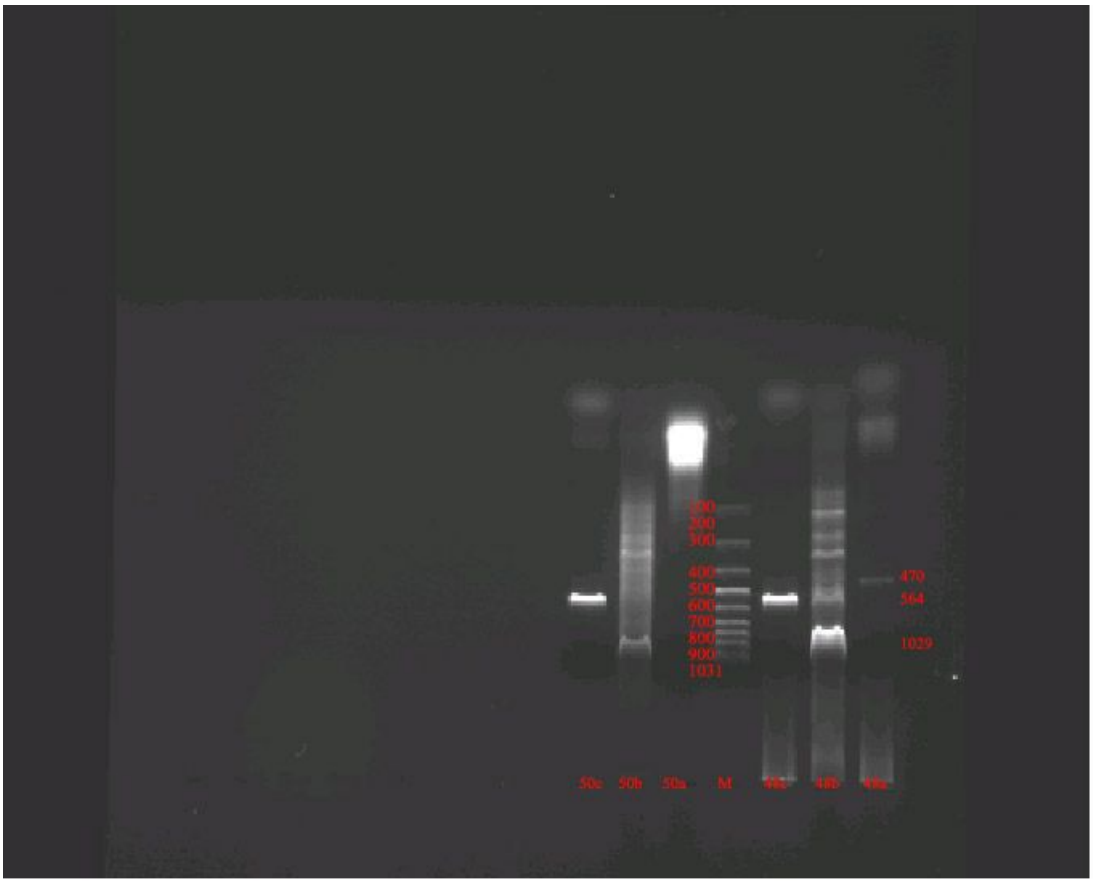
30 ve 31 nolu hastalarda yapılan mitokondriyal DNA 4977 bç delesyon çalışması sonuçu, her iki vakada jelde a, b ve c bandları görüldüğünden heteroplazmi olarak değerlendirildi.



Şekil 8. 26 ve 55 nolu hastalara ait mitokondriyal DNA 4977 bç delesyonunun PCR çalışması ile elde edilen ürünlerin jel görüntüsü.

a; delesyon bölgesi- 470 bç, b; pozitif kontrol bölgesi-1029 bç, c; negatif kontrol bölgesi-564 bç

26 ve 55 nolu hastalarda yapılan mitokondriyal DNA 4977 bç delesyon çalışması sonuçu, her iki vakada jelde a, b ve c bandları görüldüğünden heteroplazmi olarak değerlendirildi.



Şekil 9. 48 ve 50 nolu hastalara ait mitokondriyal DNA 4977 bç delesyonunun PCR çalışması ile elde edilen ürünlerin jel görüntüsü.

a; delesyon bölgesi- 470 bç, b; pozitif kontrol bölgesi-1029 bç, c; negatif kontrol bölgesi-564 bç

48 ve 50 nolu hastalarda yapılan mitokondriyal DNA 4977 bç delesyon çalışması sonuçu;

48 nolu vakada, jelde a, b ve c bandları görüldüğünden heteroplazi olarak değerlendirildi.

50 nolu vakada, jelde b ve c bandları görüldüğünden normal olarak değerlendirildi.

5. TARTIŞMA:

Mitokondriyal mutasyonlar ve mitokondriyal fonksiyon bozuklukları hastalıkların etiyolojisi ve patogenezisinde önemli bir yere sahiptir.

Nükleusta kodlanan mitokondriyal protein genlerindeki mutasyonların sadece nörodejeneratif hastalıkların değil aynı zamanda hematolojik ve oftalmolojik hastalıkların da nedeni olduğu saptanmıştır ve böylece mitokondriyal hastalık tanımı genişlemiştir.

Mitokondriyal DNA mutasyonlarının kanserlerle ve enfeksiyonlarla olan ilişkisini ortaya koyan çalışmalar birçok hasta grubunda gösterilmeye çalışılmıştır (5, 18). Bizde bu çalışmada muhtemel mitokondriyal DNA delesyonları ile kronik servisit ve serviks kanser arasındaki ilişkiyi ortaya koymaya çalıştık.

Mitokondriyal DNA mutasyonları ve serviks kanser arasındaki ilişkiyi araştıran çalışmalar çok azdır (91). Bu çalışma mitokondriyal DNA delesyonları ile kronik servisit arasındaki ilişkiyi araştıran ilk çalışmadır.

Mitokondriyal DNA'da 4977 bç delesyonu en sık ve en fazla görülen delesyon olup özellikle tiroid tümörleri, hepatoselüler karsinoma, özafagus karsinomu, mide kanserini içeren birçok farklı tip tümörlerde gösterilmiştir (53, 70).

Bizim çalışmamızda kronik servisitli 35 hastanın yaşları 40-72 arasında değişirken, yaş ortalamaları 52,2 ± 8,6 olarak hesaplandı. Servikal kanser tanısı almış 21 hastanın yaş ortalamaları 62,4 ± 9,9 ve yaş aralığı 47-79 yaş idi. Bu hastalarda görülen mitokondriyal DNA delesyonunun yaşlanmayla veya enfeksiyona maruz kalma ile ilişkisini araştırmak için, yaş ortalamaları 45,5 ± 8,6 olan yaşları 28-61 aralığında değişen kronik servisit ve serviks kanser tanısı almamış 16 birey kontrol grubu olarak çalışmaya dahil edildi.

Mitokondriyal DNA mutasyonlarının birikimi yaşlanma ve dejenaratif hastalıkların gelişimi ile direk ilişkili bir durumdur. Yaşın ilerlemesi ile beyin, iskelet ve kalp kası gibi dokularda 4977 bç delesyonun biriktiği gösterilmiştir (35).

Servikal kanser meme kanserinden sonra, kanser ölümlerinin ikinci sık nedenidir. Kanser ölümlerinin yaklaşık olarak % 10'nu oluşturur (73). Servikal kanserlerle ilgili mitokondriyal çalışmalar az sayıdadır (91). Liu ve arkadaşları (55) malign over dokusunda yaptıkları DNA dizilemelerinde % 60 oranında mtDNA mutasyonları tespit etmişlerdir. Bu mtDNA mutasyon oranı malign tümörler için % 68.8 ve benign tümörler için % 25'di. Her ikisinde de mtDNA mutasyonları sitokrom-b genlerinde lokalize olan hot-spot bölgesindeydi.

Mitokondriyal DNA mutasyonlarının en çok çalışıldığı kanserlerden biri kolorektal kanserdir. Kolorektal kanserin gelişmesinde ve ilerlemesinde mtDNA mutasyonlarının etkili olduğu rapor edilmiştir. Bu alandaki yapılan bir çalışmada, 10 kolorektal kanser hücre hattında mtDNA genom dizilemesi sonucu bu hücre hattının 7'sinde 12 farklı mutasyon bulunmuştur. Bu 12 mutasyonun 8'i protein kodlayan genlerde (ND1, ND5, ND4L, COX-altbirim- II, COX-altbirim-III, sitokrom b) ve 4'ü rRNA genlerinde bulunmuştur (12S rRNA ve 16S rRNA). Bu mutasyonların çoğunluğu T→C veya G→A dönüşümü şeklinde olmuştur. Protein kodlayan genlerdeki 8 mutasyonun 6'sı missense mutasyon, 1'i nonsense mutasyonu ve 1'i bir baz çiftinin araya girmesi şeklindeydi (58).

Kırk beş sporadik kolorektal karsinomada çalışan Habano ve arkadaşları (92) 20 karsinomalı hastanın yaklaşık % 44'ünde D-loop bölgesinde polisistidin demetinde değişiklikler tespit etmişlerdir. Ayrıca NADH dehihrogenaz geninde polisistidin (C)6 ya da poliadenozin(A)8 demetinde frameshift mutasyonlarını (çerçeve kayma mutasyonları) da tanımladılar (92). Czarnecka ve arkadaşları (13) kolon kanserli hastalarda yaptıkları çalışmada MELAS'ın patogenezisinde de bulunan homoplazmik A3243G mutasyonunu gösterdiler. Diğer birçok çalışmalarda kolorektal kanserli hastaların tümör örneklerinde mtDNA'daki büyük ölçekli değişikliklerden ziyade daha çok missense ya da frameshif mutasyonları vurgulanmıştır.

Mide kanseri ile mtDNA mutasyon oranı arasındaki çalışma çok azdır. Maximo ve arkadaşları (93) mide karsinomalı hastalardan yaptıkları çalışmada mtDNA mutasyon oranını yaklaşık olarak % 81 oranında bulmuşlardır. Bu mutasyonların büyük bir

bölümünün D-loop bölgesi ve ND1 ve ND5 genlerinde olduğunu tanımladılar ve bu genlerdeki değişimleri gösterdiler. Lee ve arkadaşları (56) 31 mide kanser örneğinde, mtDNA'nın D-loop bölgesinde % 51 oranında mutasyon buldular.

Petros ve arkadaşları (36) prostat intraepithelial neoplasia (PİN) hastalarının, idrar ve plazma örneklerinde mtDNA mutasyonlarını göstermişlerdir. Prostat adenokarsinomasındaki mutasyonların kanser gelişiminin erken döneminde oluştuğu ve hastalığın erken evresinde hastaların vücut sıvılarından tespit edilebileceği sonucunu çıkarmışlardır.

Parrelle ve arkadaşları (59) meme invazif duktal karsinomasına sahip 18 hastada uyguladıkları ince iğne aspirasyonunda % 61 oranında somatik mtDNA mutasyonunu göstermişlerdir.

Over kanserlerinde mtDNA mutasyonları ile ilgili yapılan çalışmalarda, Liu ve arkadaşları D-loop bölgesi, 16S rRNA, 12S rRNA ve sitokrom b genlerinde ve çoğu T→C veya G→A değişimi olan çeşitli mutasyonları over tümör dokusunda gösterdiler (86).

Bizim çalışmamızda incelediğimiz mitokondriyal DNA 4977 bç delesyon bölgesi, farklı araştırmacılar tarafından çeşitli dokularda araştırılmıştır. Wu ve arkadaşları mitokondriyal DNA'da 4977 bç delesyonu araştırmak için 31 gastrik kanserli hastada yaptıkları çalışmada, gastrik kanserli 31 hastanın 17'sinde (% 55) kanser olmayan mide dokusunda tespit etmişlerdir. Gastrik kanser örneklerinin sadece 3'ünde (% 10) mitokondriyal DNA delesyon taşıdığını bulmuşlardır. Bu incelemeler gastrik kanser dokusunda 4977 bç delesyonun daha az sıklıkta biriktiğini göstermiştir (70).

Bizim 21 servikal kanserli hastada yaptığımız mitokondriyal DNA 4977 bç delesyon analizi çalışmamızda, 17 hastada normal (% 81), 2 hastada heteroplazmi (% 9,5), 2 hastada delesyon (% 9,5) bulduk. Bu çalışma sonuçları Wu ve arkadaşlarının gastrik kanserde yaptıkları mitokondriyal DNA'nın 4977 bç delesyon çalışmasında buldukları % 10'luk oranlarıyla paralellik göstermiştir. Bununla beraber mitokondriyal DNA 4977 bç homoplazmi delesyonu tespit ettiğimiz 2 hastanın yaşları sırası ile 73 ve 79 idi.

Heteroplazmi bulunan 2 hasta 47 ve 57 yaşlarındaydı. Bu bireylerdeki delesyonların muhtemel bir sebebi de yaşa bağlı mitokondriyal DNA mutasyonununun birikimi olabileceği düşünülmektedir.

Serviks kanserli hastalarda, bulduğumuz delesyon ve heteroplazminin nedeni olarak birkaç neden ileri sürülebilir. Birincisi, hastaların yaşlarının yüksek olmasıdır. İkincisi bu hastaların, yaşa bağlı olarak daha fazla enfeksiyona maruz kalması sonucu, mitokondri tarafından ROS üretilmesi, bunun sonucunda mitokondriyal DNA mutasyonlarının artması ve bu mitokondriyal DNA mutasyonlarının hücrede birikmesi olarak sıralanabilir. Diğer hastalarda delesyon görülmemesinin sebebi ise, mitokondriyal DNA mutasyonlarının eşik düzeyi aştığı durumlarda hücrelerin apoptozise girmesi olabilir (70).

Dai ve arkadaşları (53) akciğer kanserli hastalarda mitokondriyal DNA'da 4977 bç delesyonunu göstermek için yaptıkları çalışmada akciğer kanserli dokuda % 54,1, kanser dokusuna bitişik dokularda % 59,5, histolojik olarak normal akciğer dokusunda % 30,0 oranında mtDNA delesyonu tespit etmişlerdir. Ancak tümör ve normal akciğer doku arasında delesyonun sıklığı açısından önemli bir fark olduğu gösterilememiştir.

Kanseri de içeren birçok kronik hastalığın patogeneziyle hücresel ROS'ların artışı arasında bağlantı kurulmuştur. ROS'a bağlı oluşan oksidatif hasara karşı hücrenin antioksidan savunma sisteminin olmasına rağmen, yaşam döngüsü içerisinde oksidatif hasar hücrelerde birikir ve bu birikme sonucu DNA'da, proteinlerde ve lipitlerde hasarlar meydana gelir. Bundan dolayı da ROS'a bağlı oksidatif hasarın nörodejeneratif hastalıklarda, artritlerde, arteriyosklerozda ve kanser gibi yaşa bağlı hastalıkların gelişiminde önemli bir rol oynadığı ileri sürülmüştür (33).

Çanakçı ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada 30 kronik periodontitisli hastanın 24'ünde (% 80) 4881 bç büyüklüğünde mitokondriyal DNA delesyonunun olduğunu göstermişlerdir. Kronik periodontitis hastalığında enfeksiyon ile artan ROS'un dişeti dokusunda 4881 bç büyüklüğündeki mitokondriyal DNA delesyonunun oluşmasıyla ilişkili olabileceği fikrini ileri sürmüşlerdir. Diş eti dokusundaki kronik enflamasyon sonucu açığa çıkan reaktif oksijen türlerinin neden olduğu mitokondriyal DNA delesyonunun kronik

periodontitis hastalığının şiddetinden etkilendiğini belirtmiş ve bir süre sonra delesyonlu DNA'nın replikatif üstünlüğü nedeniyle oranının artması sonucu hastalığın şiddetini etkileyebileceğini ileri sürmüşlerdir (94).

Bu çalışmada, kronik servisitli 35 hastada mitokondriyal DNA 4977 bç delesyonu, 28 hastada heteroplazmik delesyon (% 80,0) saptanırken, 7 hastada heteroplazmi saptanamamış (% 20,0) ve hiçbir hastada homoplazmik delesyon görülmemiştir. Kronik servisitli hastalarda yüksek oranda heteroplazmi (% 80,0) bulunması anlamlıydı. Kronik enflamasyon sırasında bu dokularda muhtemel ROS artışına bağlı olarak mitokondriyal DNA mutasyonlarının oluşumu tezini desteklemektedir. Mitokondriyal DNA mutasyonlarına bağlı patojenik geçişlerin büyük çoğunluğunun heteroplazmik olduğu bilinmektedir. Dokulardaki fonksiyon bozukluğu ve klinik bulguların görülmesinden önce minimum eşik etkinin aşılması gerekir (19, 29). Bu fikir mitokondriyal hastalıkları tanımlamada ve hastalığın ekpresyonunda mutasyon yüzdesinin önemli olduğunu gösterebilir.

Kronik enfeksiyon reaktif oksijen türlerinin çok miktarda üretildiği kaynaklardan biri olarak bilinmektedir. Kronik enfeksiyon sırasında iltihabi hücreler, bakteriler ve bunların ürünlerine karşı çok miktarda reaktif oksijen türü üretirler. Özellikle polimorfonükleer lökositlerin çok miktarda hidrojen peroksit ve süperoksit radikal ürettiği çalışmalarda bildirilmiştir (34).

Kontrol grubu olarak aldığımız 16 bireyin 11'inde delesyon saptanmamış (% 68,8) iken, 5 hastada heteroplazmi (% 32,2) saptanmıştır. Kontrol grubunda tespit ettiğimiz mtDNA mutasyonları, kronik servisit ve servikal kanser tanısı almamış bu hastalarda, bu tanılar dışındaki mevcut patolojilerin, bu dokularda oluşturduğu, kronik enflamasyondan kaynaklanmasının muhtemel olduğu düşünülmektedir. Patolojik tanı olarak kronik servisit ve serviks kanseri tanısı almamış bu hastalarda başka patolojiler mevcuttu. Örneğin Heteroplazmi çıkan 5 hastanın patolojik sonuçları genel olarak sağ overde kitle, adenomyozis, naboth kisti, prolifere endometrium ve servikal polip gibi tanılar almışlardı. Ayrıca bir hastada bir kaç tanı bir aradaydı. Kontrol grubu olarak sayımız sınırlı kalmıştır.

Kronik enflamasyonun engellenmesi ve antioksidan ajanların uygulanması, hücredeki mutant mtDNA oranının düşmesine yol açabilir. Nitekim her bir hücre bölünmesinde delesyonlu mtDNA'ların gittiği hücrelerde mutant mtDNA'ların oranı eşik düzeyi geçmesi durumunda bu hücreler apoptozise gidebileçektir. Böylece sağlıklı mtDNA taşıyan hücrelerin oranı artaçaktır.

Çalışmamızda ortaya koymaya çalıştığımız kronik servisit ve servikal kanserli hastalarda elde ettiğimiz mitokondriyal DNA mutasyon sonuçları bu hasta gruplarında patogenezin detaylandırılmasında bir parametre olması açısından ilk çalışma olmaktadır. Bu hasta gruplarında muhtemel diğer mitokondriyal DNA mutasyonlarında araştırılması ve biyokimyasal sonuçlarının ortaya konulması klinik yaklaşımın güçlenmesini sağlayaçaktır.

6. SONUÇLAR:

1. Kronik servisitli hastalarda mtDNA'da 4977 bç büyüklüğünde heteroplazmik delesyon yüksek oranda (% 80,0) tespit edildi.

2. Kronik servisitli hastaların, uzun süre enfeksiyonlara maruz kalması, iltihabi hücrelerin sayısında ve aktivasyonunda artışa neden olmakta ve bunun sonucu olarak reaktif oksijen türleri artmakta ve oksidatif hasar meydana gelmektedir. Yüksek düzeyde ROS, mitokondriyal DNA'da hasar oluşturmaktadır.

3. Servikal kanserli hastalarda, 4977 bç mitokondriyal DNA homoplazmik delesyonun varlığı 2 hastada tespit edilmiştir (% 9,5). Servikal kanserli hastalarda, 4977 bç mitokondriyal DNA delesyonun varlığı, malignite ile değil, yaşa bağlı hücre içi mutajenlerin birikimi ile ilişkilendirilmiştir. Bu hastalarda eşik düzeyi geçen mutant mtDNA'lı hücreler ise muhtemelen apoptozise girerek ortadan kalkmıştır.

4. Kronik servisitlerde, enflamasyonun devam etmesi oksidatif stresi uyarırır. Hücre içinde oksidatif stres ürünlerinin artması ile mitokondriyal DNA mutasyonları gelişmeye başlar. Hücre içindeki mitokondriyal DNA'ların bir kısmının mutasyona uğraması heteroplazmi şeklinde görülür. Heteroplazminin, eşik seviyeyi aşması ile hücrenin bazal metabolizması bozulur ve hücre apoptozise gider.

5. Serviks kanserli hastalarda belirgin olarak mtDNA patolojilerinin görülmemesi, servikal kanserlerle mtDNA 4977 bç mutant delesyonun ilişkisiz olduğunu göstermiştir.

6. Kontrol grubu olarak servikal dokuda herhangi bir patoloji bulunmayan fakat farklı endikasyonlar nedeniyle histerektomi yapılan hastaların servikal dokularından örnekler alınmıştır.

7. Mitokondriyal DNA patolojilerinin ortaya konması, hem kronik servisit hem de serviks kanserinin erken tanısında ve tedavisinde katkı sağlayacaktır.

8. Sitolojik, moleküler ve görsel metodlar gelecekte servikal kanser taramalarında ve özelliklerine göre ayırmada önemli bir rol oynayabilir.

9. Mitokondriyal hastalık alanı hızla genişlemektedir. Ancak hala hastalıkların patogenezisindeki moleküler mekanizmalar hakkında ve bu hastalıklarda hastaları nasıl tedavi edebileceğimiz konusunda bizi aydınlatacak ileri çalışmaların yapılmasının faydalı ve katkı sağlayıcı olacağı kanaatindeyiz.

7. KAYNAKLAR:

1. Parrella P, Seripa D, Matera MG, Rabitti C, Rinaldi M, Mazzarelli P, et al. Mutations of the D310 mitochondrial mononucleotide repeat in primary tumors and cytological specimens. Cancer Lett. 2003 Feb 10;190(1):73-7.

2. Gomez-Zaera M, Abril J, Gonzalez L, Aguilo F, Condom E, Nadal M, et al. Identification of somatic and germline mitochondrial DNA sequence variants in prostate cancer patients. Mutat Res. 2006 Mar 20;595(1-2):42-51.

3. DiMauro S. Mitochondrial DNA medicine. Biosci Rep. 2007 Jun;27(1-3):5-9.

4. Semczuk A, Lorenc A, Putowski L, Futyma K, Bryk J, Miotla P, et al. Clinicoprognostical features of endometrial cancer patients with somatic mtDNA mutations. Oncol Rep. 2006 Nov;16(5):1041-5.

5. Penta JS, Johnson FM, Wachsman JT, Copeland WC. Mitochondrial DNA in human malignancy. Mutat Res. 2001 May;488(2):119-33.

6. Carew JS, Huang P. Mitochondrial defects in cancer. Mol Cancer. 2002 Dec 9;1:9.

7. Kalliala I, Nieminen P, Dyba T, Pukkala E, Anttila A. Cancer free survival after CIN treatment: comparisons of treatment methods and histology. Gynecol Oncol. 2007 Apr;105(1):228-33.

8. Sharma H, Singh A, Sharma C, Jain SK, Singh N. Mutations in the mitochondrial DNA D-loop region are frequent in cervical cancer. Cancer Cell Int. 2005;5:34.

9. Saloney Nazeera MIS, Richard Todd. Colposcopy and cervical pre-malignancy. Current Obstetrics & Gynaecology. 2004;14(2):104-14.

10. Subramanya D, Grivas PD. HPV and cervical cancer: updates on an established relationship. Postgrad Med. 2008 Nov;120(4):7-13.

11. Kose K, Hiyama T, Tanaka S, Yoshihara M, Yasui W, Chayama K. Somatic mutations of mitochondrial DNA in digestive tract cancers. J Gastroenterol Hepatol. 2005 Nov;20(11):1679-84.

12. Fernandez-Silva P, Enriquez JA, Montoya J. Replication and transcription of mammalian mitochondrial DNA. Exp Physiol. 2003 Jan;88(1):41-56.

13. Czarnecka AM, Golik P, Bartnik E. Mitochondrial DNA mutations in human neoplasia. J Appl Genet. 2006;47(1):67-78.

14. Taanman JW. The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. Biochim Biophys Acta. 1999 Feb 9;1410(2):103-23.

15. Ryan MT, Hoogenraad NJ. Mitochondrial-nuclear communications. Annu Rev Biochem. 2007;76:701-22.

16. Schapira AH. Mitochondrial disease. Lancet. 2006 Jul 1;368(9529):70-82.

17. Öztas S, Yakan B. Mitokodriyon & Mitokondriyal DNA Patolojileri. Erzurum Atatürk Üniversitesi Kazım Karabekir Eğitim Fakültesi Ofset Tesisleri. 2000;1:1-75.

18. Birch-Machin MA. The role of mitochondria in ageing and carcinogenesis. Clin Exp Dermatol. 2006 Jul;31(4):548-52.

19. Wei YH, Lee HC. Oxidative stress, mitochondrial DNA mutation, and impairment of antioxidant enzymes in aging. Exp Biol Med (Maywood). 2002 Oct;227(9):671-82.

20. Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MH, Coulson AR, Drouin J, et al. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. Nature. 1981 Apr 9;290(5806):457-65.

21. Greaves LC, Taylor RW. Mitochondrial DNA mutations in human disease. IUBMB Life. 2006 Mar;58(3):143-51.

22. Suzuki M, Toyooka S, Miyajima K, Iizasa T, Fujisawa T, Bekele NB, et al. Alterations in the mitochondrial displacement loop in lung cancers. Clin Cancer Res. 2003 Nov 15;9(15):5636-41.

23. Scarpulla RC. Nuclear control of respiratory chain expression in mammalian cells. J Bioenerg Biomembr. 1997 Apr;29(2):109-19.

24. Wallace DC. The mitochondrial genome in human adaptive radiation and disease: on the road to therapeutics and performance enhancement. Gene. 2005 Jul 18;354:169-80.

25. Zeviani M, Antozzi C. Mitochondrial disorders. Mol Hum Reprod. 1997 Feb;3(2):133-48.

26. DiMauro S. Mitochondrial diseases. Biochim Biophys Acta. 2004 Jul 23;1658(1-2):80-8.

27. Dimauro S, Davidzon G. Mitochondrial DNA and disease. Ann Med. 2005;37(3):222-32.

28. Clayton DA. Nuclear gadgets in mitochondrial DNA replication and transcription. Trends Biochem Sci. 1991 Mar;16(3):107-11.

29. Mancuso M, Filosto M, Choub A, Tentorio M, Broglio L, Padovani A, et al. Mitochondrial DNA-related disorders. Biosci Rep. 2007 Jun;27(1-3):31-7.

30. Bartnik E, Lorenc A, Mroczek K. Human mitochondria in health, disease, ageing and cancer. J Appl Genet. 2001;42(1):65-71.

31. Raha S, Robinson BH. Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing. Trends Biochem Sci. 2000 Oct;25(10):502-8.

32. Klaunig JE, Kamendulis LM. The role of oxidative stress in carcinogenesis. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2004;44:239-67.

33. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. Chem Biol Interact. 2006 Mar 10;160(1):1-40.

34. Fantone JC, Ward PA. Role of oxygen-derived free radicals and metabolites in leukocyte-dependent inflammatory reactions. Am J Pathol. 1982 Jun;107(3):395-418.

35. Mohamed SA, Wesch D, Blumenthal A, Bruse P, Windler K, Ernst M, et al. Detection of the 4977 bp deletion of mitochondrial DNA in different human blood cells. Exp Gerontol. 2004 Feb;39(2):181-8.

36. Petros JA, Baumann AK, Ruiz-Pesini E, Amin MB, Sun CQ, Hall J, et al. mtDNA mutations increase tumorigenicity in prostate cancer. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Jan 18;102(3):719-24.

37. Ott M, Gogvadze V, Orrenius S, Zhivotovsky B. Mitochondria, oxidative stress and cell death. Apoptosis. 2007 May;12(5):913-22.

38. Crimi M, Rigolio R. The mitochondrial genome, a growing interest inside an organelle. Int J Nanomedicine. 2008;3(1):51-7.

39. DiMauro S, Davidzon G, Hirano M. A polymorphic polymerase. Brain. 2006 Jul;129(Pt 7):1637-9.

40. Roderick R. McInnes RLN, Huntington F. Willard, Cornelius F. Boerkoel III,. Thompson & Thompson Genetics in Medicine. Çeviri: Aktaş D. Tıbbi Genetik. İstanbul: Güneş kitabevi Ltd.Şti. 2005:311-324. 2005.

41. Jeong JH, Nakajima H, Magae J, Furukawa C, Taki K, Otsuka K, et al. Ascochlorin activates p53 in a manner distinct from DNA damaging agents. Int J Cancer. 2009 Jun 15;124(12):2797-803.

42. Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network. Nature. 2000 Nov 16;408(6810):307-10.

43. Haupt S, Berger M, Goldberg Z, Haupt Y. Apoptosis - the p53 network. J Cell Sci. 2003 Oct 15;116(Pt 20):4077-85.

44. Orrenius S. Mitochondrial regulation of apoptotic cell death. Toxicol Lett. 2004 Apr 1;149(1-3):19-23.

45. Ozben T. Oxidative stress and apoptosis: impact on cancer therapy. J Pharm Sci. 2007 Sep;96(9):2181-96.

46. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. Science. 1995 Mar 10;267(5203):1456-62.

47. Schuler M, Green DR. Mechanisms of p53-dependent apoptosis. Biochem Soc Trans. 2001 Nov;29(Pt 6):684-8.

48. Lee HC, Wei YH. Oxidative stress, mitochondrial DNA mutation, and apoptosis in aging. Exp Biol Med (Maywood). 2007 May;232(5):592-606.

49. Calabrese V, Guagliano E, Sapienza M, Panebianco M, Calafato S, Puleo E, et al. Redox regulation of cellular stress response in aging and neurodegenerative disorders: role of vitagenes. Neurochem Res. 2007 Apr-May;32(4-5):757-73.

50. Zhang XN, Qi M. Mitochondrion and its related disorders: making a comeback. J Zhejiang Univ Sci B. 2008 Feb;9(2):90-2.

51. Tan DJ, Bai RK, Wong LJ. Comprehensive scanning of somatic mitochondrial DNA mutations in breast cancer. Cancer Res. 2002 Feb 15;62(4):972-6.

52. DiMauro S, Schon EA. Mitochondrial DNA mutations in human disease. Am J Med Genet. 2001 Spring;106(1):18-26.

53. Dai JG, Xiao YB, Min JX, Zhang GQ, Yao K, Zhou RJ. Mitochondrial DNA 4977 BP deletion mutations in lung carcinoma. Indian J Cancer. 2006 Jan-Mar;43(1):20-5.

54. Wong LJ. Diagnostic challenges of mitochondrial DNA disorders. Mitochondrion. 2007 Feb-Apr;7(1-2):45-52.

55. Liu VW, Yang HJ, Wang Y, Tsang PC, Cheung AN, Chiu PM, et al. High frequency of mitochondrial genome instability in human endometrial carcinomas. Br J Cancer. 2003 Aug 18;89(4):697-701.

56. Lee HC, Yin PH, Lin JC, Wu CC, Chen CY, Wu CW, et al. Mitochondrial genome instability and mtDNA depletion in human cancers. Ann N Y Acad Sci. 2005 May;1042:109-22.

57. Simon DK, Johns DR. Mitochondrial disorders: clinical and genetic features. Annu Rev Med. 1999;50:111-27.

58. Polyak K, Li Y, Zhu H, Lengauer C, Willson JK, Markowitz SD, et al. Somatic mutations of the mitochondrial genome in human colorectal tumours. Nat Genet. 1998 Nov;20(3):291-3.

59. Parrella P, Xiao Y, Fliss M, Sanchez-Cespedes M, Mazzarelli P, Rinaldi M, et al. Detection of mitochondrial DNA mutations in primary breast cancer and fine-needle aspirates. Cancer Res. 2001 Oct 15;61(20):7623-6.

60. Fliss MS, Usadel H, Caballero OL, Wu L, Buta MR, Eleff SM, et al. Facile detection of mitochondrial DNA mutations in tumors and bodily fluids. Science. 2000 Mar 17;287(5460):2017-9.

61. Yin PH, Lee HC, Chau GY, Wu YT, Li SH, Lui WY, et al. Alteration of the copy number and deletion of mitochondrial DNA in human hepatocellular carcinoma. Br J Cancer. 2004 Jun 14;90(12):2390-6.

62. Kumimoto H, Yamane Y, Nishimoto Y, Fukami H, Shinoda M, Hatooka S, et al. Frequent somatic mutations of mitochondrial DNA in esophageal squamous cell carcinoma. Int J Cancer. 2004 Jan 10;108(2):228-31.

63. Habano W, Sugai T, Nakamura SI, Uesugi N, Yoshida T, Sasou S. Microsatellite instability and mutation of mitochondrial and nuclear DNA in gastric carcinoma. Gastroenterology. 2000 May;118(5):835-41.

64. Bianchi NO, Bianchi MS, Richard SM. Mitochondrial genome instability in human cancers. Mutat Res. 2001 Mar;488(1):9-23.

65. Yu M, Shi Y, Zhang F, Zhou Y, Yang Y, Wei X, et al. Sequence variations of mitochondrial DNA D-loop region are highly frequent events in familial breast cancer. J Biomed Sci. 2008 Jul;15(4):535-43.

66. Lightowlers RN, Chinnery PF, Turnbull DM, Howell N. Mammalian mitochondrial genetics: heredity, heteroplasmy and disease. Trends Genet. 1997 Nov;13(11):450-5.

67. Wardell TM, Ferguson E, Chinnery PF, Borthwick GM, Taylor RW, Jackson G, et al. Changes in the human mitochondrial genome after treatment of malignant disease. Mutat Res. 2003 Apr 9;525(1-2):19-27.

68. von Wurmb N, Oehmichen M, Meissner C. Demonstration of the 4977 bp deletion in human mitochondrial DNA from intravital and postmortem blood. Mutat Res. 1998 Dec 3;422(2):247-54.

69. Covarrubias D, Bai RK, Wong LJ, Leal SM. Mitochondrial DNA variant interactions modify breast cancer risk. J Hum Genet. 2008;53(10):924-8.

70. Wu CW, Yin PH, Hung WY, Li AF, Li SH, Chi CW, et al. Mitochondrial DNA mutations and mitochondrial DNA depletion in gastric cancer. Genes Chromosomes Cancer. 2005 Sep;44(1):19-28.

71. Ro LS, Lai SL, Chen CM, Chen ST. Deleted 4977-bp mitochondrial DNA mutation is associated with sporadic amyotrophic lateral sclerosis: a hospital-based case-control study. Muscle Nerve. 2003 Dec;28(6):737-43.

72. Dani SU, Dani MA, Simpson AJ. The common mitochondrial DNA deletion deltamtDNA(4977): shedding new light to the concept of a tumor suppressor mutation. Med Hypotheses. 2003 Jul;61(1):60-3.

73. Yaren A, Ozkilinc G, Guler A, Oztop I. Awareness of breast and cervical cancer risk factors and screening behaviours among nurses in rural region of Turkey. Eur J Cancer Care (Engl). 2008 May;17(3):278-84.

74. Haie-Meder C, Morice P, Castiglione M. Cervical cancer: ESMO clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow-up. Ann Oncol. 2008 May;19 Suppl 2:ii17-8.

75. Sankaranarayanan R, Thara S, Esmy PO, Basu P. Cervical cancer: screening and therapeutic perspectives. Med Princ Pract. 2008;17(5):351-64.

76. Moodley M, Moodley J, Chetty R, Herrington CS. The role of steroid contraceptive hormones in the pathogenesis of invasive cervical cancer: a review. Int J Gynecol Cancer. 2003 Mar-Apr;13(2):103-10.

77. O'Meara AT. Present standards for cervical cancer screening. Curr Opin Oncol. 2002 Sep;14(5):505-11.

78. Quddus MR, Sung CJ, Eklund CM, Reilly ME, Steinhoff MM. ASC:SIL ratio following implementation of the 2001 Bethesda System. Diagn Cytopathol. 2004 Apr;30(4):240-2.

79. Lindeque BG. Management of cervical premalignant lesions. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol. 2005 Aug;19(4):545-61.

80. Myers E, Huh WK, Wright JD, Smith JS. The current and future role of screening in the era of HPV vaccination. Gynecol Oncol. 2008 May;109(2 Suppl):S31-9.

81. Longworth MS, Laimins LA. Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia. Microbiol Mol Biol Rev. 2004 Jun;68(2):362-72.

82. Franco EL, Duarte-Franco E, Ferenczy A. Cervical cancer: epidemiology, prevention and the role of human papillomavirus infection. CMAJ. 2001 Apr 3;164(7):1017-25.

83. Li TT, Zhao LN, Liu ZG, Han Y, Fan DM. Regulation of apoptosis by the papillomavirus E6 oncogene. World J Gastroenterol. 2005 Feb 21;11(7):931-7.

84. Schiffman M, Castle PE, Jeronimo J, Rodriguez AC, Wacholder S. Human papillomavirus and cervical cancer. Lancet. 2007 Sep 8;370(9590):890-907.

85. Wang Y, Liu VW, Tsang PC, Chiu PM, Cheung AN, Khoo US, et al. Microsatellite instability in mitochondrial genome of common female cancers. Int J Gynecol Cancer. 2006 Jan-Feb;16 Suppl 1:259-66.

86. Liu VW, Shi HH, Cheung AN, Chiu PM, Leung TW, Nagley P, et al. High incidence of somatic mitochondrial DNA mutations in human ovarian carcinomas. Cancer Res. 2001 Aug 15;61(16):5998-6001.

87. Sheeder J, Stevens-Simon C, Lezotte D, Glazner J, Scott S. Cervicitis: to treat or not to treat? The role of patient preferences and decision analysis. J Adolesc Health. 2006 Dec;39(6):887-92.

88. Lusk MJ, Konecny P. Cervicitis: a review. Curr Opin Infect Dis. 2008 Feb;21(1):49-55.

89. Solak M, Bağcı H, Şengil A, Öztaş S. Moleküler Genetik ve Rekombinant DNA Teknolojisi. 2000. p. 117-20.

90. Levin BC, Cheng H, Reeder DJ. A human mitochondrial DNA standard reference material for quality control in forensic identification, medical diagnosis, and mutation detection. Genomics. 1999 Jan 15;55(2):135-46.

91. Chen D, Zhan H. Study on the mutations in the D-loop region of mitochondrial DNA in cervical carcinoma. J Cancer Res Clin Oncol. 2008 Jun 27.

92. Habano W, Nakamura S, Sugai T. Microsatellite instability in the mitochondrial DNA of colorectal carcinomas: evidence for mismatch repair systems in mitochondrial genome. Oncogene. 1998 Oct 15;17(15):1931-7.

93. Maximo V, Soares P, Seruca R, Rocha AS, Castro P, Sobrinho-Simoes M. Microsatellite instability, mitochondrial DNA large deletions, and mitochondrial DNA mutations in gastric carcinoma. Genes Chromosomes Cancer. 2001 Oct;32(2):136-43.

94. Canakci CF, Tatar A, Canakci V, Cicek Y, Oztas S, Orbak R. New evidence of premature oxidative DNA damage: mitochondrial DNA deletion in gingival tissue of patients with periodontitis. J Periodontol. 2006 Nov;77(11):1894-900.