



T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM ANABİLİM DALI

SERVİKS KANSERİNDE GLUTATYON-S-TRANSFERAZ M1,
GLUTATYON-S-TRANSFERAZ T1, GLUTATYON-S-TRANSFERAZ P1 VE
TOLL LİKE RESEPTÖR-9 GEN POLİMORFİZMLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Dr. Beray KIRAN

UZMANLIK TEZİ

BURSA – 2009



T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM ANABİLİM DALI

SERVİKS KANSERİNDE GLUTATYON-S-TRANSFERAZ M1,
GLUTATYON-S-TRANSFERAZ T1, GLUTATYON-S-TRANSFERAZ P1 VE
TOLL LİKE RESEPTÖR-9 GEN POLİMORFİZMLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Dr. Beray KIRAN

UZMANLIK TEZİ

Tez danışmanı: Doç. Dr. Hakan OZAN

BURSA – 2009

İÇİNDEKİLER

Türkçe Özet	i
İngilizce Özet	ii
Giriş	1
Gereç ve Yöntem	16
Bulgular	24
Tartışma ve Sonuç	33
Kaynaklar	41
Teşekkür	45
Özgeçmiş	46

ÖZET

Bu çalışmada, serviks kanserinde faz II detoksifikasyon reaksiyonlarında yer alan glutatyon S-transferaz M1 (GSTM1), glutatyon S-transferaz T1 (GSTT1) ve glutatyon S-transferaz P1 (GSTP1) enzimlerinin gen polimorfizmleri ve immün cevapda yer alan toll-like reseptör-9 (TLR-9) gen 1237 Timin/Sitozin (T/C) polimorfizm sıklıklarının belirlenmesini amaçladık.

Çalışmamıza serviks kanseri tanısı almış 46 hasta ve herhangi bir kanser hikayesi olmayan 52 kişi alındı. GSTM1 ve GSTT1 gen polimorfizmini değerlendirmek için multipleks PCR yöntemi kullanıldı. GSTP1 gen polimorfizmi ve TLR-9 geni 1237 T/C polimorfizmi için polimeraz zincir reaksiyonu-restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi (polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism=PCR-RFLP) yöntemi uygulandı. İstatistiksel değerlendirme Uludağ Üniversitesi Biyoistatistik Anabilim Dalı'nda SPSS13.0 programı kullanılarak yapıldı.

Çalışma ve kontrol grubu arasında GSTM1 ($p=0,739$), GSTT1 ($p=0,845$), GSTP1 ($p>0,05$) ve TLR-9 gen 1237 T/C ($p>0,05$) polimorfizm sıklıkları için istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı. Ayrıca GSTM1 null, GSTT1 null, GSTP1 İle/Val, Val/Val polimorfizmlerinin sıklığı ile hastaların patolojik bulguları arasında da istatistiksel anlamlı farklar bulunmadı. TLR-9 gen 1237 T/C polimorfizmi ile hastaların patolojik bulguları karşılaştırıldığında TT alelini taşıyan hastalarda, C alelini taşıyanlara göre sadece vajen tutulumu daha yüksek sıklıkta bulundu ve istatistiksel olarak anlamlıydı ($p=,042$). Diğer histopatolojik parametrelerde herhangi bir istatistiksel anlamlı bulgu saptanmadı.

Bulgularımız GSTM1, GSTT1, GSTP1 ve TLR-9 gen polimorfizmleri sıklığı ile serviks kanseri arasında anlamlı bir ilişki olmadığını göstermiştir.

Anahtar kelimeler: Serviks kanseri, glutatyon S-transferaz, GSTM1, GSTT1, GSTP1, toll like reseptör-9, TLR-9.

SUMMARY

Evaluation of Glutathione-S-Transferases M1, Glutathione-S-Transferases T1, Glutathione-S-Transferases P1 and Toll Like Receptor-9 Gene Polymorphisms in Cervical Cancer

In this study we aimed to detect the frequency of gene polymorphisms of glutathione-S-transferase M1 (GSTM1), glutathione-S-transferase T1 (GSTT1) and glutathione-S-transferase P1 (GSTP1) enzymes involved in the phase II detoxification reactions and 1237 thymine/cytosine (T/C) gene polymorphism of toll like receptor (TLR)-9 involved in immune response in cervical cancer.

Forty-six patients with a diagnosis of cervical cancer and 52 control subjects with no cancer history were enrolled in our study. Multiplex polymerase chain reaction (PCR) was used to evaluate the gene polymorphisms of GSTM1 and GSTT1. PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) method was applied for TLR 9 gene 1237 thymine/cytosine (T/C) polymorphism and GSTP1 gene polymorphism. Statistical analyses were performed at Uludag University Biostatistics Department by using SPSS version 13.0 software.

There was no statistically significant difference for the frequencies of gene polymorphism of GSTM1 ($p=0,739$), GSTT1 ($p=0,845$), GSTP1 ($p>0,05$) and TLR-9 gene 1237 T/C ($p>0,05$) between study and control groups. In addition, we couldn't find any statistical difference between the frequencies of GSTM1 null, GSTT1 null, GSTP1 Ile/Val and GSTP1 Val/Val polymorphisms and patients' pathological findings. When TLR-9 gene 1237 T/C polymorphism and pathological findings of the patients are compared only vaginal involvement was found in higher frequency in patients with TT allele than those with C allele and it was statistically significant ($p=0,42$). We couldn't detect any significant statistical finding in other histopathological parameters.

Our results showed that there was not any association between the frequencies of GSTM1, GSTT1, GSTP1 and TLR-9 gene polymorphisms and cervical cancer.

Key words: Cervical cancer, glutathione-S-transferase, GSTM1, GSTT1, GSTP1, toll like receptor-9, TLR-9.

GİRİŞ

Kanser, çeşitli çevresel ve kalıtsal faktörlerle normal hücre DNA'sının mutasyona uğraması sonucu ortaya çıkan bir hastalıktır. Çevresel ve kalıtsal faktörlerin kanser oluşumuna katkıları kanserin türüne ve yaşanılan çevreye göre değişmektedir. Kişinin genetik yapısı kanser gelişimine doğrudan yatkınlık oluşturabileceği gibi, çevresel faktörlerin zararlı etkilerine karşı kişinin daha duyarlı ya da daha dirençli olmasında da belirleyici bir faktördür.

Serviks kanseri, dünya genelinde önemli bir sağlık sorunu olup, kadınlar arasında görülen en yaygın ikinci kanser türüdür (1). Serviks kanseri etyolojisinde en önemli risk faktörü human papilloma virus (HPV) olmakla birlikte pek çok çevresel faktör ve bireylerin sahip oldukları genotipler de serviks kanseri gelişiminde rol oynamaktadır. Serviks kanseri öncül lezyonlarının bazı bireylerde gerilemesi, bazı bireylerde ise kanser gelişimine sebep olması çevresel faktörlerin etkinliğinin yanısıra genetik duyarlılığın da serviks kanserindeki önemini göstermektedir (2). Serviks kanseri riski ile ilişkili olduğu belirlenen genetik faktörler hakkında henüz yeterince çalışma bulunmamaktadır.

Vücudun antioksidan kapasitesinin korunması canlılığın devamı açısından çok önemlidir. Vücuda giren kanserojen ve toksik maddeler çeşitli spesifik enzimler tarafından detoksifiye edilirler. Bu enzimler, kanserojen ve toksik maddelerin DNA hasarına yol açan reaktif bölgelerine çeşitli kimyasallar ekleyip onları modifiye ederek, bu maddelerin atılımına kadar güvenli bir şekilde depo edilebilmesini sağlayıp toksik maddelerin hücreden atılımına yardım ederler. Bu enzimlerden glutatyon S-transferaz (GST) enzim ailesi, alkilleyici ve elektrofilik kanserojenlere glutatyon bağlayarak onların kanserojenik etkilerine karşı bir korunma mekanizması oluşturan faz II dimerik enzimlerdir (3, 4). GST genleri tarafından kodlanan GST enzimleri, çevresel kaynaklı kimyasallar ve doğal olarak oluşan birçok metabolitin detoksifikasyonundan sorumlu olup, dokuların oksidatif hasardan korunmasında rol oynayan önemli enzimlerdir. Bazı bireylerde görülen belirli

kanser türlerine yatkınlığın artması veya azalmasının ksenobiyotiklerin detoksifikasyonunda rol oynayan enzimlerin gösterdiği genetik polimorfizme bağlı olduğu düşünülmektedir (5, 6, 7). Son yıllarda yapılan çalışmalarda GST gen polimorfizmi ile serviks kanseri arasındaki ilişki incelenmiş ve GST gen polimorfizmi olan kadınlarda serviks kanseri riskinin arttığı gösterilmiştir (8, 9).

Toll-like reseptörler (TLR), birçok patojene karşı doğal immün cevabın oluşmasını sağlayan tip 1 transmembran protein reseptörüdür (10). İmmün hücrelerin yüzeyinde bulunan TLR'ler patojene özgü immün yanıtın oluşmasını sağlarlar (11). Patojenler tarafından sunulan moleküller immün sistem hücreleri üzerindeki TLR'ler tarafından tanınıp bağlandığında doğal immün sistem yanıtları gelişir. Aynı zamanda edinsel immün cevabın da aktive olmasını sağladıklarından konak immünitesinde çok önemli bir role sahiptirler (10). TLR gen ailesinde oluşan mutasyonların veya gen polimorfizmlerinin, çeşitli otoimmün hastalıkların, kronik inflamatuvar hastalıkların, enfeksiyöz hastalıkların ve bazı kanser türlerinin patogenezinde yer aldığı gösterilmiştir (12, 13). Bu genlerin içindeki genetik varyasyonların, hastalıkların patogenezinde önemli etkilerinin olabileceği düşünülmektedir.

Bu çalışma, serviks kanserinde faz II detoksifikasyon reaksiyonlarında yer alan GST enzimlerinden GSTM1, GSTT1 ve GSTP1 gen polimorfizmleri ile immün sistem cevabında rol oynayan TLR-9 gen 1237 T/C polimorfizminin görülme sıklıklarının belirlenmesi amacıyla yapılmıştır.

Serviks Kanseri

İnvaziv serviks kanseri sıklıkla, servikal epitelde metaplastik olayların anormal gelişimi ile başlayan, servikal intraepitelial neoplazi (CIN I, II, III) ve mikroinvaziv kanser ile devam eden bir sürecin sonunda oluşan hastalıktır. Serviks kanseri uzun bir preinvaziv hastalık evresinden sonra geliştiği için erken tanı ve tedavinin önemli olduğu kanserlerden birisidir. Serviks kanserinin önceden tespit edilebilmesi için tarama testi olarak Papanicolaou (Pap smear) testi kullanılmaktadır. Serviks kolay ulaşılabilir bir organ olduğu

ve pap smear testi ile serviks kanserleri erken evrede yakalanabildiği için, bu evrede yapılacak uygun tedavi ile hastaların yaşam şansı artmaktadır. (14, 15, 16).

Serviks Kanserinin Epidemiyolojisi

Serviks kanseri kadınlar arasında görülen en yaygın ikinci kanser türü olup, kadınlarda görülen kanserlerin %15'ini oluşturmaktadır (1, 17). Yılda yaklaşık 500.000 yeni serviks kanseri olgusu bildirilmekte ve bu olguların % 80–90'ı gelişmekte olan ülkelerde görülmektedir (9, 15). Gelişmekte olan ülkelerde serviks kanserinin görülme sıklığının yüksek olması, preinvaziv lezyonların kansere dönüşmeden saptanabilmesi ve tedavi edilebilmesi için gereken etkili tarama programlarının bulunmamasından kaynaklanmaktadır (17, 18, 19, 20). Gelişmekte olan ülkelerde serviks kanseri halen önemli bir mortalite nedeni iken ABD'de 2008 yılında serviks kanserinden dolayı beklenen tahmini ölüm sayısı 3870'dir. Gelişmiş ülkelerde ölüm oranının son yıllarda giderek azalması erken tanı ve tedavinin etkili şekilde uygulanmasına bağlanmaktadır (21).

Serviks kanseri özellikle iki yaş grubunda pik yapmaktadır. Birincisi 35–39 yaşlar arası ve ikincisi 60–64 yaşlar arası olup ortalama yaş 52,2'dir (22, 23).

Serviks Kanseri Etyolojisi ve Risk Faktörleri

Günümüzde serviks kanserinin etyolojik nedenleri kesin olarak bilinmemekle birlikte, bazı önemli risk faktörleri tanımlanmıştır (Tablo–1) (16, 24, 25). Epidemiyolojik çalışmalar serviks kanseri gelişiminde majör risk faktörünün HPV olduğunu göstermektedir (2, 16). Ayrıca pek çok çevresel faktör ve bireylerin sahip oldukları genotipler de serviks kanserinin gelişiminde rol oynamaktadır (2). Serviks kanseri öncül lezyonlarının bazı bireylerde gerilemesi, bazı bireylerde ise kanser gelişimine sebep olması, çevresel faktörlerin etkinliğinin yanı sıra genetik duyarlılığın da serviks kanserinde önemli olabileceğini düşündürmektedir.

Tablo-1: Serviks kanseri gelişiminde etkili olabilen risk faktörleri (16, 24, 25)

Human papillomavirus

Sigara

Diğer cinsel yolla bulaşan ajanlar

Yetersiz beslenme (vitamin-C, A, beta karoten ve folat eksikliği)

Düşük sosyoekonomik düzey

Siyah ırk

Erken yaşlarda cinsel ilişki

Çok sayıda seksüel partner

Eşin çok eşli olması

Kötü hijyen

Multiparite

Uzun süreli oral kontraseptif kullanımı

Human Papilloma Virus (HPV)

Serviks kanseri gelişimi için en önemli risk faktörü olan HPV, papillomavirus ailesine ait, 72 kapsomer ve 8000 baz çiftinden oluşan zarfsız bir DNA virusudur. İkozahedral (20 yüzlü) bir kapsül içinde çift sarmal DNA içerir (26). HPV enfeksiyonu dünya genelinde en sık rastlanılan cinsel yolla bulaşan hastalık etkenidir. Bulaş cinsel ilişki ile (deri teması) ve nadiren perinatal yolla olabilmektedir

Serviks kanseri vakalarında % 95–100 oranında HPV–DNA tespit edilmektedir (27). HPV'nin günümüze kadar 100'den fazla tipi tanımlanmıştır (1). Genital sistemle ilişkili yaklaşık 40 HPV tipi tanımlanmış olup serviks kanseri ve prekürsör lezyonları ile ilişkileri temel alınarak düşük riskli, orta riskli ve yüksek riskli olarak gruplandırılmaktadırlar (1). Özellikle serviks kanseri ile ilişkili olduğu bildirilen tipleri 16, 18, 31, 33 ve 35 'dir (16). Tüm dünyadaki serviks kanserlerinin %70'inde tip 16 ve 18'in sorumlu olduğu düşünülmektedir (15, 27). Servikal kanser vakalarının yaklaşık %50'si HPV 16 ile ilişkilidir (16, 27, 28).

HPV tiplerinin risk gruplarına göre dağılımı Tablo–2’de görülmektedir (23).

Tablo–2: HPV tiplerinin risk gruplarına göre dağılımı

Risk grubu	HPV tipleri
Düşük riskli	6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81
Orta riskli	26, 34, 53, 57, 66, 83
Yüksek riskli	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82

Onkojenik HPV enfeksiyonu viral genomun konakçı hücre genomuna entegrasyonu ile başlar ve servikal neoplastik hücrelerin oluşumu ile sonuçlanır. Bu hücrelerin çoğalması değişen derecelerde skuamöz intraepitelyal neoplazi (CIN) oluşumuna yol açar ve CIN’de invaziv kansere ilerleyebilir (25).

Serviks Kanseri Semptomları

Serviks kanserinin ilk semptomu genellikle kanla bulaşık aşırı seropürülan vaginal akıntıdır. Klasik semptomu ise ara ara olan irregüler kanama ve postkoital kanamadır (15, 29). Kansere dokusu büyüdükçe kanama epizodları ağırlaşır. İleri evre semptomları, üreterler, pelvik duvar ve siyatik sinirlerin tutulumuna bağlı böğüre ve bacağa vuran ağrı, mesane ve rektum invazyonuna bağlı dizüri, hematüri, rektal kanama veya konstipasyon gelişimidir (29). Ayrıca hastalarda tekrarlayan sistit, alt ekstremitelerde ödem, obstrüktif üropati, barsak obstrüksiyonu, ciddi anemi ve metastazlara bağlı nefes darlığı ve kaşeksi de gelişebilir (15, 25).

Serviks Kanseri Klinik Evrelendirme

Günümüzde Uluslararası Jinekoloji ve Obstetrik Federasyon (FIGO)’nun evreleme sistemi kullanılmaktadır. Bu tümör büyüklüğü ve hastalığın pelvisteki yayılımı esasına dayanan bir klinik evreleme sistemidir. Kanserin büyüklüğü ve yaygınlığı klinik olarak bir çok inceleme ile değerlendirilerek, hastalık evreleri I’den IV’e kadar kategorize edilmiştir. Evre I; servikte sınırlı büyümeyi temsil ederken, evre IV; kanserin metastaz ile uzak organlara yayılımını belirtir (25).

Evre 0: İn situ karsinom, intraepitelyal karsinom

Evre I: Karsinom kesin olarak servikse sınırlıdır.

Evre IA: Kanser invazyonu sadece mikroskopik olarak belirlenebilir. Ölçülen stromal invazyonun maksimum derinliği 5 mm, genişliği 7 mm'yi geçmemelidir.

Evre IA1: Stromal invazyon derinliği 3 mm'den küçüktür ve tümör 7 mm'den geniş değildir.

Evre IA2: Stromal invazyon derinliği 3–5 mm arasındadır ve tümör 7 mm'den geniş değildir.

Evre IB: Servikse sınırlı klinik lezyonlar veya evre IA'dan büyük prelinik lezyonlar

Evre IB1: 4 cm'den küçük klinik lezyonlar

Evre IB2: 4 cm'den büyük klinik lezyonlar

Evre II: Alt 1/3'ü haricinde vajen tutulumu veya pelvis yan duvarları haricinde parametrium infiltrasyonu

Evre IIA: Belirgin parametrium infiltrasyonu yok. Vajenin üst 2/3'üne kadar tutulum vardır.

Evre IIB: Belirgin parametrium infiltrasyonu vardır. Ancak pelvis yan duvarına ulaşmamıştır.

Evre III: Vajen alt 1/3'ünün tutulumu veya pelvis yan duvarlarına infiltrasyon; başka sebeplere bağlı olmayan tüm hidronefroz ve/veya nonfonksiyone böbrek vakaları

Evre IIIA: Pelvis yan duvarlarına ulaşmamıştır, fakat vajen alt 1/3'ü infiltredir.

Evre IIIB: Tümör pelvis duvarına ulaşmış veya hidronefroz veya nonfonksiyone böbrek vardır.

Evre IV: Tümör gerçek pelvisi aşmış veya klinik olarak mesane ve/veya rektum mukozası tutulum vardır.

Evre IVA: Tümörün komşu pelvik organlara yayılımı

Evre IVB: Uzak organlara yayılım (29).

Serviks Kanseri Tedavisi

Serviks kanseri tanısı konulduktan sonraki aşama hasta için en uygun tedavinin belirlenmesidir. Serviks kanserinin tedavi prensiplerinde hem primer lezyon hem de potansiyel yayılma alanları tedavi edilmelidir. Tedavi seçenekleri arasında cerrahi tedavi, radyoterapi ve kemoterapi yer almaktadır. Radyoterapi kanserli hastalara tüm evrelerde uygulanabilirken, cerrahi tedavi sadece Evre I ve IIA olan hastalara uygulanabilir. Erken evre invaziv kanserli (Evre I ve IIA) kadınlar cerrahi tedavi ve/veya radyoterapi ile tedavi edilebilir (25). Erken evrelerde cerrahi ve radyoterapinin 5 yıllık sağkalım oranları birbirine benzerdir (15, 19). Evre IIB ve III kanseri olanlar, cisplatin–temelli kemoterapi ile birlikte veya tek başına radyoterapi ile tedavi edilirler. Evre IV kanserli kadınlar genellikle palyatif radyoterapi ve/veya kemoterapi ile belirtileri ölçüsünde tedavi edilirler (25).

Cerrahi Tedavi

Erken evre (Evre I ve IIA) serviks kanserleri genellikle cerrahi ile tedavi edilebilir (16). Küratif cerrahi de, primer tümör dokusu ve tümör dokusunun tüm uzantıları birlikte çıkarılır. Palyatif cerrahi ise radyoterapinin başarısız olduğu ya da komplikasyonları (rektovaginal ve vezikovaginal fistül) nedeni ile yapılamadığı durumda semptomları ortadan kaldırmak için yapılan cerrahidir (15). Overin metastatik lezyonları nadir olduğu için, özellikle genç kadınlarda ooferektomi yapılmayabilir (15, 19, 29).

Radikal histerektomi sonrası en sık görülen komplikasyon mesane disfonksiyonudur. Ayrıca vezikovaginal fistül, üreterovaginal fistül, lenfokist oluşumu, mesane atonisi, bağırsak obstruksiyonu, tromboflebit, pelvik enfeksiyon ve kanamada gözlenebilir (16). Cerrahi tedavi sırasında en fazla mortaliteye neden olan komplikasyon pulmoner embolidir (29).

Radyoterapi

Serviks kanserlerinin tüm evrelerinde kullanılabilecek primer tedavi yöntemidir (15). İleri evre serviks kanserlerinde (Evre IIB ve IV) platin–temelli kemoterapi ile birlikte radyoterapi uygulanabilir. Primer küratif tedavi haricinde vaginal kanama ve kemik ağrıları gibi semptomları düzeltmek

içinde kullanılabilir (15). Kanserin evresine göre radyoterapinin etkinliği değişmektedir (19).

Radyoterapi, yeni tekniklerle beraber radikal cerrahiye ciddi bir alternatif olmaya başlamıştır. Radyoterapinin bir avantajı tüm evrelerde, hastanın yaşı, kilosu ve tıbbi durumuna bakılmaksızın uygulanabilmesidir. Ancak tedavi süresinin uzunluğu radyoterapinin dezavantajlarından (15). Radyoterapi hem intrakaviter (brakiterapi) hem de external (teleterapi) yolla uygulanabilmektedir (19).

Radyoterapi sonrası gelişen komplikasyonlar, vaginal kısılma, fibrozis ve epitel atrofisi nedeniyle seksüel disfonksiyon görülme olasılığı (15), tıbbi veya cerrahi girişim gerektirecek düzeyde kronik mesane ve bağırsak problemleri (16), rektovaginal ve vezikovaginal fistül (15) gelişimi sayılabilir.

Kemoterapi

Tedavide kullanımı sınırlı olan kemoterapinin serviks kanserinin primer tedavisinde yeri yoktur (15, 19). National Cancer Institute tarafından serviks kanseri tedavisi için radyoterapi gereken hastalarda tedaviye cisplatin temelli kemoterapinin de eklenmesinin uygun olacağı bildirilmiştir (29).

Serviks Kanserinde Prognostik Faktörler

Serviks kanserinin prognozunu etkileyen bazı faktörler belirtilmiştir. Prognozu belirleyen en önemli faktör FIGO evrelemesidir. Ayrıca erken evre tümörün boyutunun ve servikal stromal invazyon derinliğinin prognostik önemi gösterilmiştir. Bunlara ek olarak lenf nodlarına metastaz, histolojik grade ve lenfovasküler invazyon da prognostik faktörler arasındadır (30). En güvenilir prognostik faktörlerden birisi de lenf nodlarının durumudur (29, 30).

FIGO evreleme sistemi ile 5 yıllık sağkalım oranları;

Evre 1A1 % 98

Evre 1A2 % 95

Evre 1B1 % 85

Evre 1B2 % 75

Evre 2A % 75

Evre 2B % 65

Evre 3A % 30
Evre 3B % 30
Evre 4A % 10
Evre 4B <%5 (15).

Glutasyon

Glutasyon (GSH); glutamik asit, sistein ve glisinden oluşan bir tripeptiddir. Başta karaciğer olmak üzere çoğu dokuda yüksek düzeyde bulunur. DNA ve protein sentezleri, enzim aktivitelerinin düzenlenmesi, hücre içi ve hücre dışı transportlar gibi hücrenel fonksiyonları dışında antioksidan olarak hücre savunmasında da rol oynar.

Kanserojenik etkilerden korunmada glutasyonun önemli bir rolü vardır. Reaktif ara metabolitler olan epoksidler ve diğer bazı toksik bileşikler dokularda nükleofilik endojen bileşiklerle özellikle glutasyon ile konjuge edilerek inaktif duruma getirilirler.

Ksenobiyotik Metabolizması

Ksenobiyotik metabolizmasının amacı, ksenobiyotiklerin sudaki çözünürlüklerini artırmak ve bu şekilde vücuttan atılmalarını kolaylaştırmaktır. Ksenobiyotiklerin metabolizması için iki ayrı reaksiyon kullanılır. Faz I reaksiyon, genellikle ksenobiyotiklere ve kanserojenlere karşı ilk enzimatik savunma olarak bilinir. Faz I ksenobiyotiklerin sitokrom P-450 enzimlerince oksidasyon, hidroliz ve kopma tepkimelerinin gerçekleştiği basamaktır. Faz II ise faz I reaksiyonları sonucunda oluşan polar bileşiklerin konjugasyon tepkimelerinin gerçekleştiği basamaktır. Faz I basamağından çıkan ürünler reaksiyonlara girdiklerinden daha aktif ve toksik yapıya dönüşürler. Eğer reaktif moleküller faz II detoksifikasyona uğramazlarsa proteinlere, RNA ve DNA'ya zarar verebilirler. Faz I sistemin hızının artması ve faz II'nin konjugasyon hızının azalması kanser gibi hastalıkların oluşma riskini artırır. (3, 4, 31, 32, 33).

Glutasyon S Transferazlar

Glutasyon S-transferazlar (GST), endojen ve ekzojen kaynaklı, elektrofilik ve hidrofobik bileşiklerin GSH ile konjugasyonunu sağlayarak, genellikle daha kolay atılabilen ve daha az toksik metabolitlere dönüşümünü katalizleyen faz-II detoksifikasyon enzim ailesidir (Şekil-1) (3, 4, 34, 35).



Şekil-1: Ksenobiyotiklerin glutasyon ile konjugasyonunda rol oynayan glutasyon S transferaz katalizli reaksiyon (34)

GST'ler, GSH'nin endojen lipid peroksidasyon ürünlerine konjugasyonunda, selenyumdan bağımsız glutasyon peroksidaz aktivitesi aracılığı ile hidroperoksitlerin inaktivasyonunda önemli rol oynamaktadır. Böylece GST'ler oksidatif strese karşı hücrel korumada önemli bir rol oynar (7, 36).

GST'lerin insanlarda 5 tipi bildirilmiştir; alpha (A), mu (M), pi (P), theta (T) ve zeta (Z)'dir (9). GST tiplerinin subtipleri A1–A4, M1–M5, P1, T1–T2 ve Z1 arasında çok sayıda polimorfizm bildirilen tipler M1, M3, P1, T1, T2 ve Z1'dir (35).

GSTM1, benzopiren ve aflotoksin gibi kanserojen polisiklik aromatik hidrokarbonların (PAH) detoksifikasyonundan sorumludur (9, 36, 37, 38). GSTM1 geni 1p13.3 kromozomu üzerinde tanımlanmıştır. Bu genle ilgili olarak GSTM1–a, GSTM1–b ve GSTM1–0 şeklinde üç farklı alel gösterilmiştir (37). GSTM1–0 aleli delesyonludur, null alel olarak adlandırılıp homozigot etki gösterir (37, 39) GSTM1 null aleli enzim aktivitesi göstermezken, diğer iki alel enzim değişikliğine neden olmazlar (2, 37). GSTM1 null alellinde sitogenetik hasar gelişir (9).

GSTT1, 1,3 butadien, monohalometanları, etilen oksit gibi sigara içimi sonucu ortaya çıkan ve havada bulunan çevresel çok sayıda potansiyel kanserojenlerin detoksifikasyonunda rol oynar (9, 39). GSTT1 geni 22q11.2 kromozomu üzerinde tanımlanmıştır. Bu genle ilgili GSTT1-1 ve GSTT1-0 olarak adlandırılan iki alel gösterilmiştir. GSTT1-0 aleli delesyonludur ve null alel olarak adlandırılıp homozigot etki gösterir. GSTT1 null alelinde enzim aktivitesi görülmez (37).

GSTP1, geni 11q13,1 kromozomu üzerinde tanımlanmıştır (40). GSTP1 üç genotip halinde bulunmakta olup bunlar GSTP1 Ile105Ile (Ile/Ile)(AA), GSTP1 Ile105Val (Ile/Val)(AG), GSTP1 Val105Val (Val/Val)(GG)'dir. GSTP1 Ile/Ile bireylerde normal enzim fonksiyonu için bulunması gereken doğal genotiptir. GSTP1 gen polimorfizminde 105. pozisyondaki aminoasitte isoleüsin yerine valin aminoasidinin değişimi söz konusu olursa (GSTP1 Ile/Val veya GSTP1 Val/Val) GSTP1 enzim aktivitesi etkilenir (39, 40). GSTP1 Ile/Val (AG) heterozigot, GSTP1 Val/Val (GG) homozigot polimorfik genotipleri oluşturmaktadır.

Bireyler arasında görülen bazı kanser türlerine yatkınlığın artması veya azalmasının temelinde yatan nedenin, ksenobiyotiklerin detoksifikasyonunda rol oynayan enzimlerin gösterdiği genetik polimorfizm olabileceği ileri sürülmüştür (5, 6, 7). Özellikle son yıllarda yapılan çalışmalarda kanser riski ile ksenobiyotik metabolizma enzim polimorfizmleri arasında önemli ilişkiler gösterilmiş ve tüm bulgular kanser etyolojisinde genetiğin rolünü vurgulamıştır (7).

GST gen polimorfizmleri akciğer, karaciğer, mesane, meme, kolorektal, mide, larinks, ve cilt kanseri gibi bir çok kanserde risk faktörü olarak araştırılmıştır (35). GSTM1 ve GSTT1 null alellerinin (non fonksiyonel) mesane ve akciğer kanseri için artmış riskle birlikte olduğu bildirilmiştir (6, 35). Serviks kanseri riski ile GST gen polimorfizmleri arasındaki ilişkiyi araştıran çok sayıda çalışma vardır (8, 9). Son zamanlarda serviks kanseri için tanımlanan birkaç aday belirteç arasında GST'de yer almaktadır (36).

Toll Like Reseptörler

İmmün sistem, doğal (antijene özgü olmayan, nonspesifik) ve edinsel (antijene özgü, spesifik) olmak üzere iki kısma ayrılan bir savunma sistemidir (41). Bu iki sistem birbiriyle denge içerisinde çalışarak konağı patojenlere karşı korumaktadır (10). Saldırgan patojenlere karşı ilk aşama doğal savunma sistemidir (13). Aynı zamanda patojenlerin yok edilmesi için edinsel immün sistemi hazırlar, immunolojik hafızayı oluşturur. TLR'ler hem doğal hem de edinsel immün sistem cevaplarını sağlayarak ve düzenleyerek anahtar rol oynarlar (12, 13, 42). Doğal immün sistem, bir patojenle karşılaşınca doğumdan itibaren ilk cevabı oluşturabilen savunma sistemidir. Ayrıca konağın kendisine ait olan ve olmayan antijenik yapıyı tanıma kapasitesine de sahiptir (10). Doğal immün yanıt hücreleri periferde bulunurlar ve hızlı yanıt oluştururlar. Antijene özgü olmayan bu yanıt sitokin salgıları, kompleman aktivasyonu, fagositoz ve yüzey savunma mekanizmalarından oluşmaktadır. Doğal immün yanıtta esas olarak dendritik hücreler, monositler, doğal öldürücü hücreler, lenfositler ve epitel hücreleri görev almaktadır (41, 43, 44). Edinsel immün sistem, spesifik ve antijenle tekrarlayan karşılaşmalarda daha hızlı ve güçlü cevap oluşturma gibi üstünlüğe sahiptir (10). Edinsel immün yanıt sekonder lenfoid organlardan yönetilir, antijene özgüdür, daha yavaş gelişir ve uzun sürelidir (41, 43, 44).

TLR, bakteri, virus ve mantar gibi birçok patojene karşı doğal immün cevabın oluşmasını sağlayan tip 1 transmembran protein reseptör ailesidir (10, 13, 44). TLR'ler aynı zamanda edinsel immün cevabın da aktive olmasını sağladıkları için konak immünitesinde önemli bir role sahiptirler (10). TLR "toll" olarak adlandırılan drosophila reseptörlerinin homologudur (44, 45). İmmün hücreler üzerinde bulunan ve patojeni tanıyan reseptörler ilk kez 1991 yılında Drosophila embriyosunun dorsaventral paterninde bulunarak toll adı verilmiştir (11, 13). "Toll" reseptör ailesinin ilk insan homoloğu 1997 yılında tanımlanmış ve şaşırtıcı bir şekilde doğal immün sistemin parçası olduğu görülmüştür (10, 46).

Günümüze kadar memelilerde 12 tane TLR tanımlanmıştır (45). TLR 3, 7, 8, 9 hücre içi kompartmanda bulunurken, diğerleri hücre dışında bulunmaktadır (45).

Mikroorganizmalara özgü 'patojen ile ilişkili moleküler paternler' (PAMP'ler), doğal immün sistem içerisinde yer alan hücrelerin yüzeyinde bulunan 'patern tanıyan reseptörler' (PRR'ler) olarak adlandırılan reseptörler tarafından tanınır ve bu reseptörlere bağlanır (13). Mikroorganizmaların PAMP'leri, doğal immün sistem hücrelerindeki PRR'ler tarafından tanındığında doğal immün sistem cevabı gelişir. TLR'ler, PRR'ler olarak fonksiyon göstermektedir (13, 47). Patojenler tarafından sunulan moleküller immün sistem hücreleri üzerindeki TLR'ler tarafından tanınıp bağlandığında doğal immün sistem yanıtları gelişir. Mikroorganizmalarda bulunan PAMP'lerden, bakteriyel lipoproteinler TLR-2 tarafından, viral dsRNA (çift sarmal RNA) TLR-3 tarafından, lipopolisakkaridler TLR-4 tarafından, bakteriyel flagellin TLR-5 tarafından, bakteri ve virüs DNA'sının sitozin guanin çifti (CpG motifleri) ise TLR-9 tarafından tanınmaktadır (42, 45).

TLR'ler, ekstraselüler lösinden zengin tekrar bölgeleri (LRR) ve intraselüler toll/interlökin (IL)-1 reseptör (TIR) bölümünün varlığı ile karakterizedir (11, 13, 45). TLR'in LRR bölgelerinde çok miktarda protein bulunur ve ligand tespiti ve sinyal transdüksiyonu ile ilgilidir. TLR'nin TIR bölümü, intraselüler sinyal için gereklidir. Bu alan yaklaşık 200 aminoasit içerir (13). TLR'ler ligandlar (PAMP'ler) tarafından aktive edilince, akım sinyalini başlatmak için adaptör moleküllere ihtiyaç duyarlar. TLR sistemindeki adaptör moleküller; myeloid diferansiasyon faktör 88 (MyD88), TIR adaptör protein (TIRAP), interferon indükleyen adaptör ile ilişkili TIR (TRIF), TRIF ilişkili adaptör molekül (TRAM)'dir. TLR'ler (1,2,5,6,7,8,9,10 ve kısmen 4) liganda bağlandığı zaman, MyD88 bağımlı yolda, MyD88 interlökin-1 reseptör ilişkili kinaz (IRAK) ve takiben tümör nekrozis faktör reseptör ilişkili faktör-6 (TRAF-6) içeren bir kompleks oluşturmak üzere TIRAP'la birleşir. Bu yolun sonunda ise nükleer faktör-kappa beta (NF κ β) aktive olur. NF κ β 'de tümör nekrozis faktör-alfa (TNF- α), IL-1, IL-6, IL-8 gibi sitokin ve proinflamatuvar ürünleri aktive eder (11, 48).

TLR-9 bakteriyel ve viral DNA'ya karşı hücre cevabını CpG motiflerini tanıyarak aracılık eder (12, 13, 42, 45). CpG DNA, immun sistemin patojenleri tanıdığı prototip molekül paternidir (48). Bakteriyel DNA'nın immunomodülitesi, CpG motiflerinin metile olmamasına bağlanabilir. Metile olmamış CpG DNA vertebralılarda göreceli olarak daha nadir bulunmaktadır ve herhangi bir immünstimulasyon etkisi yoktur (47, 48). CpG DNA, dendritik hücreleri IL-12 üretmek üzere aktive eder ve böylece bu sitokinde T helper 1 (Th1) immun cevabının oluşumuna yol açar (12, 48). CpG DNA, çeşitli hastalıklarda adjuvan ve antiinflamatuvar ajan olarak yeni ve ümit verici tedavi stratejisi olarak sunulmuştur (45, 48).

İnsan TLR genlerinin, kromozom 4p14 (TLR-1), 4q32 (TLR-2), 4q35 (TLR-3), 9q32-33 (TLR-4), 1q33.3 (TLR-5), 4p16.1 (TLR-6), Xp22.3 (TLR-7), Xp22 (TLR-8) ve 3p21.3 (TLR-9) üzerinde olduğu gösterilmiştir (10). TLR genleri ile ilgili çok sayıda polimorfizm belirlenmiştir (49). 3p21.3 kromozomu üzerinde yer alan TLR-9 ile ilgili tanımlanmış polimorfizmler 1237 T/C, 1486 T/C, 2848 G/A, 1174 G/A'dır (49, 50).

TLR gen ailesinde oluşan mutasyonlar ya da gen polimorfizmlerinin çeşitli otoimmun hastalıkların, kronik inflamatuvar hastalıkların, enfeksiyöz hastalıkların ve bazı kanser türlerinin patogenezinde yer aldığı gösterilmiştir (12). TLR sinyali, mikrobiyal mücadele için konakçıya gereklidir. Eğer TLR sinyali azalır, enfeksiyona duyarlılık artabilir. Eğer aşırı sinyal olursa, septik şok ve otoimmun hastalıklar görülebilir (13). TLR'de oluşan mutasyonlar ya da gen polimorfizmleri, doku hasarına neden olan proinflamatuvar sitokinlerin aşırı üretimini indükleyerek veya reglatuar T hücrelerinin fonksiyonunda artışa neden olarak protektif immunitiyi zayıflatıp mikrobiyal enfeksiyonu şiddetlendirir (12). Kanser, TLR sinyal yollarının bozulması sonucu ortaya çıkabileceği gibi, tümör hücrelerindeki TLR sinyalinin konakçı savunmasını bozarak kanserin ilerlemesiyle de birlikte olabileceği ileri sürülmüştür (12). TLR gen polimorfizmleri ve kanser ilişkisini araştıran az sayıda çalışma vardır. Tahara ve ark. (51) 2007 yılında Japon hastalarda TLR-2 polimorfizminin mide kanserine yatkınlık oluşturabileceğini bildirmişlerdir. Lee ve ark. (45) çalışmasında, servikal neoplazide TLR-9 ekspresyonunun

tümörün ilerlemedesinde rol oynayabileceği ve servikal skuamöz hücrelerdeki malign transformasyonu göstermek için yararlı bir belirteç olabileceği ileri sürölmüştür. Buna benzer bir çalışma Kim ve ark. (52) tarafından 2008 yılında yapılmış ve servikal neoplazide TLR-5 ekspresyonunun tümör ilerlemedesinde rol oynayabileceği ve servikal skuamöz hücrelerdeki malign transformasyonu göstermek için yararlı bir belirteç olabileceği ileri sürölmüştür. Ayrıca akciğer, mide ve meme kanserinde de TLR-9 ekspresyonunda artış gözlemlendiği bildirilmiştir (45).

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma, Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı Etik Kurul onayı alındıktan sonra başlatılmış ve Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı'nda Kasım 2008 – Şubat 2009 tarihleri arasında prospektif olarak yapılmıştır. Çalışma grubu olarak serviks kanseri tanısı almış 46 olgu, kontrol grubu olarak herhangi bir kanser hikayesi olmayan 52 olgu bu çalışmaya dahil edildi. Çalışma ve kontrol grubu olgularına çalışma hakkında bilgi verilerek aydınlatılmış onam belgeleri imzalatıldı.

Çalışma ve kontrol grubunda yer alan olguların yaş, gravida, parite, abortus, yaşayan çocuk sayısı, menopoz durumu, menopozda ise menopoz süresi, sistemik hastalık durumu ve sigara kullanımı dahil olmak üzere demografik bilgileri kaydedildi. Çalışma grubunda ayrıca serviks kanseri ile ilgili patolojik parametreler, tedavi şekilleri, ilk başvuru şikayetleri, hangi evrede olduğu, tedavi öncesi aspartat aminotransferaz (AST), alanin aminotransferaz (ALT), açlık glukoz, üre, kreatinin, tam kan sayımı, hastalısız sağkalım ve toplam sağkalım süreleri kaydedildi.

Çalışma ve kontrol grubundan alınan kan örnekleri DNA izolasyonu için 2 cc EDTA'lı steril falkon tüpüne aktarıldı. Tüplerin üzerine 1:3 oranında (6 ml) "lysis buffer" ilave edildi. Tüp birkaç defa ters yüz çevrilerek iyi bir şekilde karıştırıldıktan sonra +4°C de 15 dakika bekletildi. Örnekler oluşan nükleer pelleti çöktürmek için dakikada 1500 rpm'de 10 dk santrifüj edildi ve oluşan süpernatant döküldü. Pellet yeniden süspense edildi ve ikinci bir yıkama için yine 6 ml "lysis buffer" eklendi. Tüpler 10 dk süresince 1500 rpm'de santrifüj edildikten sonra süpernatant atıldı ve pellet tamamen süspense edildi. Bu aşamadan sonra Dr. Zeydanlı DNA izolasyon kiti (Türkiye) prosedürü uygulandı. Süspense olmuş örnek 1,5 ml'lik nükleaz içermeyen tüp içine alınarak üzerine 500 µl solüsyon B ve 20 µl solüsyon A (proteinaz-K) eklendi. Karışım vorteksenerek 42°C'de bir gece inkübe edildi. İnkübasyon sonrası üzerine 500 µl solüsyon C eklendi ve vorteksenerek 10.000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Oluşan 2 fazdan üstteki berrak faz

alınarak temiz, 1,5 ml'lik nükleaz içermeyen tüpe konuldu. Üzerine 500 µl solüsyon D konuldu. 10.000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Oluşan süpernatant atılarak üzerine 500 µl solüsyon E konulup 10.000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant atılarak tüpler kurumaya bırakıldı. Kuruduktan sonra 100 µl distile su eklenerek çalışılma zamanına kadar –20°C'de saklandı.

Polimeraz Zincir Reaksiyon Protokolü

PCR (Polymerase Chain Reaction), DNA içerisinde yer alan, dizisi bilinen iki segment arasındaki özgün bir bölgeyi enzimatik olarak çoğaltmak için uygulanan tepkimelere verilen ortak bir isimdir. PCR yöntemi, DNA molekülünün ısıyla denatüre edilerek tek zincirli hale gelmesi, tek zincirli DNA molekülüne uygun sıcaklıkta ilgili primerlerin yapışması ve DNA Tag polimeraz enzimi katalizörlüğünde ortamdaki dört deoksinükleotid trifosfatın (adenin, guanin, sitozin, timin) yeni zincire eklenmesi sonucunda ilgili gen bölgelerin çoğaltılması esasına dayanmaktadır.

Bu çalışmada izole edilen DNA'larda GSTM1 ve GSTT1 polimorfizmini belirlemek için multipleks PCR yöntemi kullanıldı. GST–P1 (Ile105Val) geni polimorfizmi ve TLR–9 geni 1237 timin/sitozin (T/C) promotör polimorfizmi, polimeraz zincir reaksiyonu–restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi (polymerase chain reaction–restriction fragment length polymorphism=PCR–RFLP) yöntemi ile genotiplendirildi. Bunun için PCR reaksiyonu karışımı hazırlandı. 30 µl'lik PCR karışımı 0,2 ml'lik PCR tüpünde aşağıdaki sıra ile karıştırıldı.

- dNTP (10 mM) 0,3 µL
- 10x PCR Buffer (Magnezyumlu) 2,5 µL
- 10 pmol/ml primer forward 1,0 µL
- 10 pmol/ml primer reverse 1,0 µL
- dH₂O 20 µL
- Hasta DNA'sı 5,0 µL
- Taq polimeraz enzimi (5 ünite/µl) 0,1 µl

Her bir gen polimorfizmi için Tablo-3'de gösterilen primerler kullanılarak PCR yapıldı (53, 54).

Tablo-3: TLR-9, GSTM1, GSTT1, GSTP1 gen polimorfizmleri primerleri.

	Primer (forward)	Primer (reverse)	Oluşan Ürün (Baz çifti)
TLR 9 (1237T/C)	5'-CCTGCTTGAGGTTGACTGT-3'	5'-CCCTGTTGAGAGGGTGACAT-3'	154
GST-M1	5'-TTCCTTACTGGTCCTCACATCTC-3'	5'-TCACCGGATCATGGCCAGCA-3'	219
GST-T1	5'-GAACTCCCTGAAAAGCTAAAGC-3'	5'-GTTGGGCTCAAATATACGGTGG-3'	459
Albumin (kontrol)	5'-GCCCTCTGCTAACAAGTCCTAC-3'	5'-GCCCTAAAAAGAAAATCCCCAATC-3'	350
GST -P1 (Ile105Val)	5'-ACCCCAGGGCTCTATGGGAA-3'	5'-TGAGGGCACAAGAAGCCCCT-3'	176

GSTM1 ve GSTT1 gen polimorfizmi için PCR döngü programı olarak aşağıdaki sıcaklık ve süreler kullanılarak PCR işlemi gerçekleştirildi.

- Kapak sıcaklığı, (cihaz tipine özel) 103°C,
1- Başlangıç denatürasyonu 94°C, 5 dakika
2- Denatürasyon 94°C, 1 dakika
3- "Annealing" 57°C, 1 dakika
4- "Extention" 72°C, 1 dakika
5- Son "Extention" 72°C, 10 dakika
(2., 3. ve 4. işlemler sırasıyla 34 siklus)

TLR-9 1237 T/C gen polimorfizmi ve GSTP1 (Ile105Val) gen polimorfizmi için PCR döngü programı olarak aşağıdaki sıcaklık ve süreler kullanılarak PCR işlemi gerçekleştirildi.

- Kapak sıcaklığı, (cihaz tipine özel) 103°C,
1- Başlangıç denatürasyonu 94°C, 5 dakika
2- Denatürasyon 94°C, 30 saniye
3- "Annealing" 60°C, 30 saniye
4- "Extention" 72°C, 30 saniye
5- Son "Extention" 72°C, 10 dakika.
(2., 3. ve 4. işlemler sırasıyla 37 siklus)

Jel Elektroforez Protokolü

Agaroz Jel Elektroforezi, DNA parçalarının ayrılması ve tanımlanması için kullanılan standart metotlardan biridir. Jeldeki DNA bantları, jelin bir floresans boya alan etidyum bromür ile boyanması ve jelin ultraviyole ışık altında direkt olarak incelenmesi ile saptanabilir. Çoğunlukla jel elektroforezinde bilinen büyüklükteki bir belirteç DNA kullanılarak moleküler büyüklüğü bilinmeyen DNA kolayca saptanabilir.

DNA parçacıklarının agaroz jelde elektroforetik yürüme hızları dört parametreye bağlıdır. Bunlar; DNA'nın moleküler olarak büyüklüğü, DNA'nın konformasyonu, agarozun konsantrasyonu ve uygulanan akımdır.

Bu çalışmada PCR ile çoğaltılmış ürünlerin tanımlanması için %2'lik agaroz jel elektroforezi uygulandı. %2'lik jel hazırlanması için 5 mL 10xTris–Borik Asit–EDTA (TBE) solüsyonu 45 ml dH₂O ile beher içinde karıştırıldı. Karışımın içine 1 gr agaroz eklendi. Çözelti mikrodalga fırında “medium–high” ayarında agaroz çözününceye kadar ısıtıldı. Eriyen jel içine 5 µl etidyum bromid eklenerek karıştırıldı. Jel elektroforez aparatına dökülerek soğumaya bırakıldı. Elektroforez tankı 1xTBE ile doldurularak jel yürütme işlemine hazır hale getirildi.

GSTM1ve GSTT1 çalışmalarında band görülen bireyler normal, band görülmeyen bireyler delesyonlu olarak değerlendirilmiştir.

TLR–9 ve GSTP1 PCR ürünleri agaroz jel elektroforezinde kontrol edilip, doğru gen bölgesinin amplifikasyonu görülünce restriksiyon endonükleaz ile kesim işlemi yapıldı.

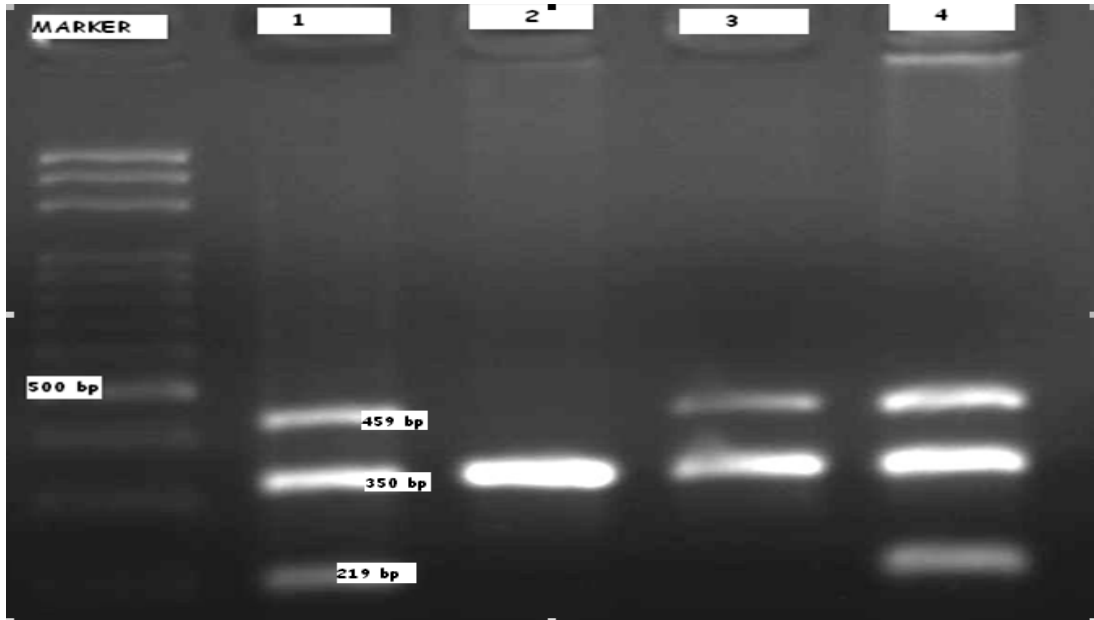
TLR–9 1237 T/C promotör polimorfizmi için BstN I (Genemark, Rusya) enzimi kullanıldı. BstN I enzimi için kesim yeri 5'...CC/WGG...3' ve 3'...GGW/CC–5' dizileridir (W; Adenin veya Timin).

GSTP1 (Ile105Val) gen polimorfizmi için Alw26 I (Genemark, Rusya) enzimi kullanıldı. 5'...GTCTC(N)1...3' / 3'...CAGAG(N)5...5' dizileridir (N; Adenin veya Sitozin veya Guanin veya Timin).

0,2 ml'lik tüplere 10 µl hacimdeki PCR ürünleri, 2 µl restriksiyon enzim buffer, 8 µl distile su ve her birey için 5 ünite/µl BstN I ve Alw26 I enzimi olacak şekilde karışım hazırlandı. Karışım enzimin optimum çalışma sıcaklığı olan 60°C'de 14–16 saat inkübasyona bırakıldı. Restriksiyon enzim kesim sonuçları % 4'lük agaroz jelde değerlendirildi. Bu jel için 2 gr agaroz tartılıp 1XTBE solüsyonu ile 50 ml total hacime tamamlandı. Agaroz istenilen konsantrasyonda hazırlandıktan sonra mikrodalga fırında kaynatıldı. İçerisine 5 µl etidyum bromid ilave edildi. İyice karıştırıldıktan sonra jel aparatına döküldü. BstN I enzimi ve Alw26 I ile kesim yapılmış ürünlere brom–fenol mavisi ile muamele edilerek jele yüklendi. 90–100V akımda 15 dk kadar yürütüldü.

Genotiplerin Belirlenmesi

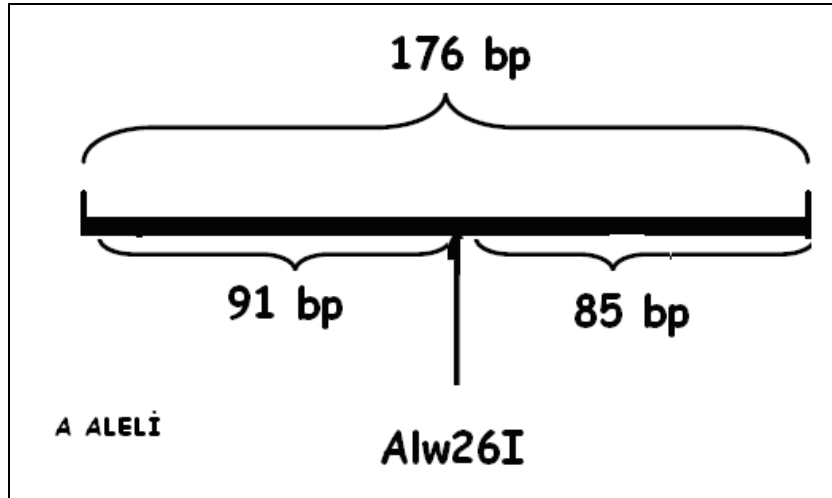
GSTM1 ve GSTT1'de PCR reaksiyonları sonucu GSTM1 için 219bp, GSTT1 için 459bp ve albumin (kontrol) için 350 bp'lik ürünler elde edilmesi beklendi (Şekil–2).



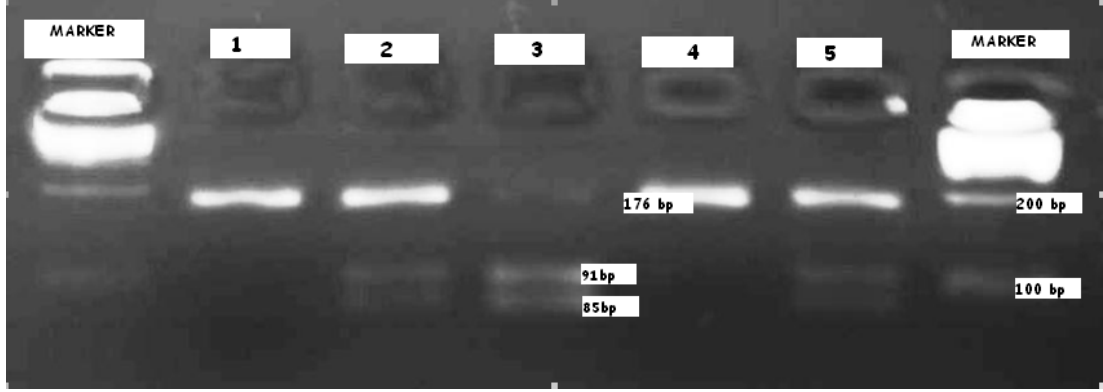
Şekil–2: Albumin (350 bp), GSTT1 (459 bp) ve GSTM1 (219 bp) PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü. İlk kuyucuk Ladder (marker), 1 ve 4 nolu kuyucuk hem GSTT1 hem de GSTM1 pozitif, 2 nolu kuyucuk hem GSTT1 hem de GSTM1 null, 3 nolu kuyucuk GSTT1 pozitif, GSTM1 null.

GSTM1 ve GSTT1 enzimlerinin delesyon taşıyıp taşımadığının belirlenmesi için kontrol gen olarak albumin geni kullanılmıştır. GSTM1 ve GSTT1 genleri delesyon taşımadıklarında sırasıyla 219 bp ve 459 bp'lik bantlar vermektedirler. Kontrol bandı olan albumin 350 bp'lik bir bant büyüklüğüne sahiptir. GSTM1 ve GSTT1 genlerinde aynı anda delesyon bulunduran örneklerde jel yürütmesi sonucunda sadece albumin gen bandı görülmektedir. Sadece GSTM1 ya da sadece GSTT1 delesyonu taşıyan örneklerde albumin gen bandı ve delesyon içermeyen genin bandı görülmektedir.

GSTP1 genine ait 176 bp'lik PCR ürünü 85 bp ve 91 bp iki ayrı ürün oluşursa İle/İle (AA) genotipi, 176 bp, 91 bp ve 85 bp üç ayrı ürün oluşursa İle/Val (AG) genotipi ve 176 bp şeklinde olursa Val/Val (GG) genotipi gösterir (Şekil-3). GSTP1 polimorfizminin değerlendirilmesi Şekil-4'de görülmektedir.

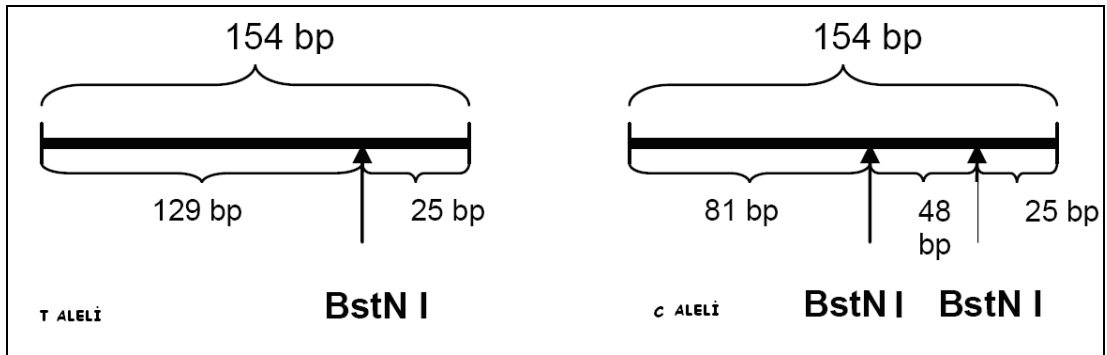


Şekil-3: GSTP1 genine ait PCR ürünleri

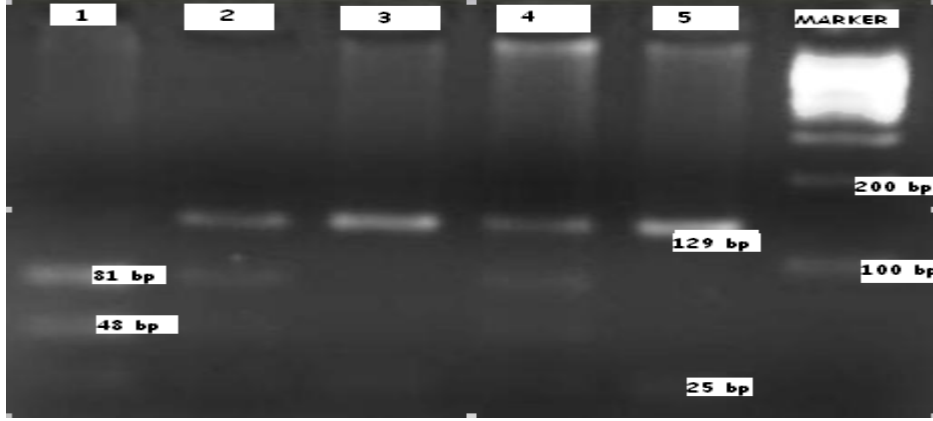


Şekil-4: Hasta ve kontrol grubundaki hastaların GSTP1 geninin PCR ürünlerinin Alw 26 I enzim kesimi sonrası % 3,5 agaroz jeldeki fotoğrafı. İlk ve son kuyucuk 100 bp DNA ladder (Marker), 3 nolu ve 5 nolu kuyucuk G/G genotipini (176 bp) , 2 nolu ve 5 nolu kuyucuk G/A genotip (176 bp, 91 bp, 85 bp), 3 nolu kuyucuk A/A genotip (91 bp, 85 bp) sahip bireyleri göstermektedir.

Ultraviyole ışıkta 154 baz çiftlik (bp) TLR-9 genine ait PCR ürününde, C aleline sahip gen bölgeleri 2 yerden kesilirken T aleline sahip gen bölgeleri 1 yerden kesildi (Şekil-5). Örneklere ait 129 bp ve 25 bp hizasında iki bant var ise T/T, 129bp, 81bp, 48 bp ve 25bp hizasında 4 bant var ise T/C, 81bp, 48 bp ve 25bp hizasında 3 bant var ise C/C olarak genotiplendirme yapıldı (Şekil-6).



Şekil-5: Oklar BstN I enzimi için kesim noktaları gösterir. Üründe T aleli varlığında enzimle kesim sonrası iki ayrı ürün oluşurken, C aleli varlığında enzimle kesim sonrası üç ayrı ürün oluşur.



Şekil-6: Hasta ve kontrol grubundaki hastaların TLR-9 genin PCR ürünlerinin BstN I enzim kesimi sonrası % 3,5 agaroz jeldeki fotoğrafı. Son kuyucuk 100 bp DNA ladder (Marker), 1 nolu kuyucuk C/C genotipine (81bp, 48 bp, 25 bp), 3 nolu ve 5 nolu kuyucuk T/T genotip (129 bp, 25 bp), 2 nolu ve 4 nolu kuyucuk T/C genotip (129 bp, 81 bp, 48 bp, 25 bp) sahip bireyleri göstermektedir.

Sonuçların istatistiksel olarak değerlendirilmesi Uludağ Üniversitesi Biyoistatistik Anabilim Dalı'nda 'SPSS for Windows Version 13.0' istatistik programı kullanılarak yapıldı. Çalışmada sürekli değer alan değişkenler (yaş, menopoz yılı, gravida, parite, abortus, yaşayan çocuk sayısı gibi değişkenler) ortalama, standart deviasyon, minimum–maximum değerleriyle birlikte verildi. Sürekli değişkenlerden, normal dağılım gösteren değişkenlerin iki grup arası karşılaştırmaları parametrik testlerden bağımsız örneklem t testi, normal dağılım göstermeyen değişkenlerin iki grup arası karşılaştırmalarında non-parametrik test olan Mann–Whitney U testi kullanıldı.

Kategorik değer alan değişkenlerin (GSTM1, GSTT1, GSTP1, TLR-9 ve hastaların histopatolojik parametreleri) gruplarla olan karşılaştırmalarında Pearson ki-kare ve Fisher'in kesin ki-kare testi ile karşılaştırmalar yapıldı ve çapraz tablolarla gösterildi. Çalışmada anlamlılık düzeyi olarak $p < 0,05$ alındı.

BULGULAR

Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Doğum Anabilim Dalına başvuran ve serviks kanseri tanısı alan 46 hasta çalışma grubunu, herhangi bir kanser hikayesi olmayan 52 kişi kontrol grubunu oluşturdu. Çalışma ve kontrol gruplarının demografik verileri Tablo-4'de verilmiştir.

Tablo-4: Çalışma ve kontrol grubunun demografik verileri.

Demografik Özellik	Çalışma grubu Ort ± SD	Kontrol grubu Ort ± SD	P
Yaş (yıl) (Yaş aralıkları)	53,73 ± 10,35 (34-77)	51,32 ± 8,86 (37-75)	,118
Menopoz (yıl)	10,35 ± 8,91	9,90 ± 8,93	,926
Gravida	4,32 ± 2,17	3,59 ± 2,14	,039 *
Parite	3,26 ± 1,65	2,40 ± 1,05	,001 *
Abortus	1,06 ± 1,34	1,19 ± 1,58	,828
Yaşayan	2,89 ± 1,49	2,17 ± 0,75	,001 *

Ort: ortalama, SD: standart deviasyon

* p < 0,05

Çalışma ve kontrol grubu yaş, menopoz yılı ve abortus sayısı (p>0,05) açısından farklılık göstermezken çalışma grubunda gravida (p=0,039), parite (p=0,001) ve yaşayan çocuk sayısı (p=0,001) kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksekti.

Çalışma ve kontrol gruplarının menopoz durumu, sistemik hastalık varlığı ve sigara kullanımı verileri Tablo-5'de gösterilmiştir. Çalışma grubunda 39 (%84,8) olgunun menopozda olduğu, 5 (%10,9) olgunun sigara kullandığı, 24 (%52,2) olgunun başka bir sistemik hastalığı olduğu gözlemlendi. Kontrol grubunda 21 (% 40,4) olgunun menopozda olduğu, 18 (%34,6) olgunun başka bir sistemik hastalığı olduğu, 8 (% 15,4) olgunun sigara kullandığı saptandı. Çalışma grubundaki 4 (%8,7) olgunun aile hikayesinde jinekolojik kansere rastlandı.

Tablo–5: Çalışma ve kontrol gruplarının menopoz durumu, sistemik hastalık varlığı ve sigara kullanımı verileri.

		Çalışma grubu N (%)	Kontrol grubu N (%)	P
Menopoz	Var	39 (% 84,8)	21 (% 40,4)	,001*
	Yok	7 (%15,2)	31 (% 59,6)	
Sistemik hastalık	Var	24 (% 52,2)	18 (% 34,6)	,080
	Yok	22 (% 47,8)	34 (% 65,4)	
Sigara kullanımı	Var	5 (%10,9)	8 (%15,4)	,511
	Yok	41(% 89,1)	44 (% 84,6)	

* p < 0,05

Sigara kullanımı ve sistemik hastalık açısından her iki grup arasında anlamlı bir farklılık saptanmazken ($p>0,05$) çalışma grubunda menopozal kadın sayısı anlamlı olarak fazlaydı ($p<0,05$) (Tablo–5).

Çalışma grubunun tedavi öncesi laboratuvar değerleri Tablo–6’da gösterilmiştir.

Tablo–6: Çalışma grubuna ait tedavi öncesi laboratuvar değerleri.

	Tedavi öncesi değerler Ortalama±SD
Hemogram	11,31 ± 1,44
Lökosit	7567,42 ± 4147,01
Platelet	261081,08 ± 93416,74
AST	22,52 ± 11,07
ALT	20,50 ± 12,09
Açlık glukoz	106,51 ± 40,41
Üre	28,77 ± 15,64
Kreatinin	0,92 ± 0,72

SD: standart deviasyon

Çalışma grubunun ilk başvuru şikayetleri Tablo–7’de gösterilmiştir.

Tablo-7: Çalışma grubunun ilk başvuru şikayetleri

Şikayet	N	%
Postmenopozal kanama	20	44,4
Postkoital kanama	10	22,2
Karın ağrısı	6	13,4
Adet düzensizliği	8	17,8
İnkontinans	1	2,2

Çalışma ve kontrol grupları arasındaki GSTM1, GSTT1, GSTP1 ve TLR-9 1237 T/C polimorfizm dağılımları Tablo-8'de gösterilmiştir.

Tablo-8: Çalışma ve kontrol grubunda GSTM1, GSTT1, GSTP1 ve TLR-9 gen 1237 polimorfizmlerinin dağılımı.

		Çalışma grubu N (%)	Kontrol grubu N (%)	P
GSTM1	Null	25 (% 54,3)	30 (% 57,7)	,739
	Pozitif	21 (% 45,7)	22 (% 42,3)	
GSTT1	Null	15 (% 32,6)	16 (% 30,8)	,845
	Pozitif	31 (% 67,4)	36 (% 69,2)	
GSTP1	AA Homozigot doğal	27 (% 58,7)	22 (% 44,0)	> 0,05
	AG Heterozigot	15 (% 32,6)	26 (% 52,0)	
	GG Homozigot mutant	4 (% 8,7)	2 (% 4,0)	
TLR-9 1237 T/C	TT Homozigot doğal	34 (% 73,9)	39 (% 75)	>0.05
	TC Heterozigot	11 (%23,9)	13 (% 25,0)	
	CC Homozigot mutant	1 (% 2,2)	0 (% 0)	

Çalışma grubu ve kontrol grubu arasında GSTM1 ($p=0,739$), GSTT1 ($p=0,845$), GSTP1 ($p>0,05$) ve TLR-9 1237 T/C ($p>0,05$) polimorfizmleri açısından istatistiksel bir fark saptanmadı ($p>0,05$).

Çalışma grubunda GSTP1 için mutant olan G alelini bulunduran GG ve AG genotipleri ile homozigot, doğal (wild) AA aleli ayrı olarak incelendiğinde, mutant G alelini 19 (%41,3) olgunun, homozigot AA alelini ise 27 (%58,7) olgunun taşıdığı tespit edildi. TLR-9 1237 T/C için mutant olan C alelini bulunduran TC ve CC genotipleri ile homozigot, doğal (wild) TT aleli ayrı olarak istatistiğe alındığında mutant C alelini 12 (%26,1) olgunun, homozigot olan TT alelini ise 34 (%73,9) olgunun taşıdığı gözlemlendi (Tablo-9).

Tablo-9: Çalışma ve kontrol grubunun GSTP1 ve TLR-9 genlerinin mutant ve doğal tiplerinin sıklıkları.

		Çalışma grubu N (%)	Kontrol grubu N (%)	P
GSTP1 G ALELİ TAŞIYANLAR (GG + AG)	Var	19 (41,3)	28 (% 53,8)	,215
	Yok	27 (58,7)	24 (% 46,2)	
GSTP1 HOMOZİGOT DOĞAL (AA)	Var	27 (58,7)	24 (% 46,2)	,215
	Yok	19 (41,3)	28 (% 53,8)	
TLR9 C ALELİ TAŞIYANLAR (CC + TC)	Var	12 (26,1)	13 (% 25,0)	,902
	Yok	34 (73,9)	39 (% 75,0)	
TLR9 HOMOZİGOT DOĞAL (TT)	Var	34 (73,9)	39 (% 75,0)	,902
	Yok	12 (26,1)	13 (% 25,0)	

GSTP1 için mutant olan G alelini bulunduran GG ve AG genotipleri ile doğal tip olan AA aleli değerlendirildiğinde çalışma ve kontrol grubu arasında fark saptanmadı ($p=0,215$). Benzer şekilde TLR-9 1237 T/C genotipi için mutant olan C alelini bulunduran TC ve CC genotipleri ve doğal tip olan TT aleli çalışma ve kontrol grubu arasında istatistiksel bir fark saptanmadı ($p=0,902$).

Çalışma grubundaki olguların serviks kanseri evreleri Tablo-10'da görülmektedir.

Tablo–10: Çalışma grubunun serviks kanseri evreleri

Serviks Kanseri Evreleri	N	%
Evre 1A	0	0
Evre 1B1	8	17,4
Evre 1B2	1	2,2
Evre 2A	3	6,5
Evre 2B	23	50
Evre 3A	4	8,7
Evre 3B	3	6,5
Evre 4A	3	6,5
Evre 4B	1	2,2

Çalışma grubundaki olguların histopatolojik parametreleri Tablo–11’de görülmektedir. Tüplerde, sol overde ve paraaortik lenf nodlarında metastatik tutulum gözlenmedi.

Çalışma grubunun histopatolojik parametreleri GSTM1, GSTT1, GSTP1 ve TLR–9 gen polimorfizmi verileri Tablo–12 ve 13’de gösterilmiştir. GSTM1 null aleli, GSTT1 null aleli, GSTP1’in G aleli taşıyan homozigot mutant ve heterozigot genotipleri ve TLR–9’un C aleli taşıyan homozigot mutant ve heterozigot genotipleri ile histoloji, grade, sigara kullanımı, sistemik hastalık olup olmaması, soygeçmişte jinekolojik kanser hikayesi olup olmaması, paraservikal tutulum, vajen tutulumu, parakolpos tutulumu, uterus tutulumu, tüp tutulumu, sağ ve sol over tutulumu, pelvik lenf nodu tutulumu, paraaortik lenf nodu tutulumu, lenfatik tutulum, vasküler tutulum, perinöral tutulum, cerrahi sınır tutulumu ve rekürrens arasında istatistiksel bir anlam bulunamadı. Vajen tutulumu açısından sadece TLR–9 homozigot dogal TT alelini taşıyan olgular, C alelini taşıyanlara göre daha yüksek sıklıkta olup istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=,042$).

Tablo-11: Çalışma grubuna ait histopatolojik parametreler.

Patolojik parametreler	N	%
Histolojik Tanı		
SCC	36	78,3
Adeno CA	10	21,7
Grade		
Düşük	10	58,8
Yüksek	7	41,2
Paraservikal tutulum		
Var	30	73,2
Yok	11	26,8
Vajen tutulumu		
Var	32	78,0
Yok	9	22,0
Parakolpos tutulumu		
Var	7	17,1
Yok	34	82,9
Uterus		
Var	8	47,1
Yok	9	52,9
Tüpler		
Var	0	0
Yok	17	100
Sağ over		
Var	1	5,9
Yok	16	94,1
Sol over		
Var	0	0
Yok	17	100
Pelvik lenf nodu tutulumu		
Var	1	10,0
Yok	9	90,0
Paraaortik lenf nodu tutulumu		
Var	0	0
Yok	10	100
Lenfatik tutulum		
Var	7	58,3
Yok	5	41,7
Vasküler tutulum		
Var	3	25,0
Yok	9	75,0
Perinöral tutulum		
Var	5	41,7
Yok	7	58,3
Cerrahi sınır		
Var	1	8,3
Yok	11	91,7
Rekürrens		
Var	5	10,9
Yok	41	89,1
Canlı / Ölü		
Canlı	44	95,7
Ölü	2	4,3

Tablo-12: Çalışma grubunun histopatolojik parametreleri, GSTM1 ve GSTT1 gen polimorfizm verileri.

Patolojik parametreler	Özellikler	Sayı	GSTM1 Null alel N %	GSTM1 M1 (+) N (%)	P	GSTT1 Null alel N (%)	GSTT1 T1 (+) N (%)	P
Histoloji	SCC N (%)	36 78.3	17 47.2	19 52.8	,084	10 27.8	26 72.2	,257
	Adenoca N (%)	10 21.7	8 80.0	2 20.0		5 50.0	5 50.0	
Grade	Düşük N (%)	10 58.8	3 30.0	7 70.0	,350	2 20.0	8 80.0	,058
	Yüksek N (%)	7 41.2	4 57.1	3 42.9		5 71.4	2 28.6	
Sigara	Var N (%)	5 10.9	4 80.0	1 20.0	,357	1 20.0	4 80.0	>0,05
	Yok N (%)	41 89.1	21 51.2	20 48.8		14 34.1	27 65.9	
	Var N (%)	24 52.2	13 54.2	11 45.8		7 29.2	17 70.8	
Sistemik hastalık	Yok N (%)	22 47.8	12 54.5	10 45.5	>0,05	8 36.4	14 63.6	,755
	Var N (%)	4 8.7	1 25.0	3 75.0		1 25.0	3 75.0	
Soygeçmiş	Yok N (%)	42 91.3	24 57.1	18 42.9	,318	14 33.3	28 66.7	>0,05
	Var N (%)	30 73.2	16 53.3	14 46.7		9 30.0	21 70.0	
	Yok N (%)	11 26.8	6 54.5	5 45.5		4 36.4	7 63.6	
Paraservikal tutulum	Var N (%)	32 78.0	16 50.0	16 50.0	,466	10 31.3	22 68.7	>0,05
	Yok N (%)	9 22.0	6 66.7	3 33.3		3 33.3	6 66.7	
	Var N (%)	7 17.1	2 28.6	5 71.4		3 42.9	4 57.1	
Parakolpos tutulumu	Yok N (%)	34 82.9	20 58.8	14 41.2	,219	10 29.4	24 70.6	,659
	Var N (%)	8 47.1	5 62.5	3 37.5		5 62.5	3 37.5	
	Yok N (%)	9 52.9	7 77.8	2 22.2		4 44.4	5 55.6	
Tüpler	Var N (%)	0 0	0 0	0 0		0 0	0 0	
	Yok N (%)	17 100.0	12 70.6	5 29.4		8 47.1	9 52.9	
	Var N (%)	1 5.9	1 100.0	0 0		1 100.0	0 0	
Sağ over	Yok N (%)	16 94.1	11 68.8	5 31.2	>0,05	7 43.8	9 56.2	,471
	Var N (%)	0 0	0 0	0 0		0 0	0 0	
	Yok N (%)	17 100.0	12 70.6	5 29.4		8 47.1	9 52.9	
Sol over	Var N (%)	1 10.0	1 100.0	0 0	>0,05	1 100.0	0 0	,400
	Yok N (%)	9 90.0	6 66.7	3 33.3		3 33.3	6 66.7	
	Var N (%)	0 0	0 0	0 0		0 0	0 0	
Paraaortik lenf nodu	Yok N (%)	10 100.0	7 70.0	3 30.0	>0,05	4 40.0	6 60.0	>0,05
	Var N (%)	7 58.3	3 42.9	4 57.1		2 28.6	5 71.4	
	Yok N (%)	5 41.7	3 60.0	2 40.0		2 40.0	3 60.0	
Lenfatik tutulum	Var N (%)	3 25.0	1 33.3	2 66.7	>0,05	1 33.3	2 66.7	>0,05
	Yok N (%)	9 75.0	5 55.6	4 44.4		3 33.3	6 66.7	
	Var N (%)	5 41.7	3 60.0	2 40.0		1 20.0	4 80.0	
Perinöral tutulum	Yok N (%)	7 58.3	3 42.9	4 57.1	>0,05	3 42.9	4 57.1	,576
	Var N (%)	1 8.3	0 0	1 100		1 100.0	0 0	
	Yok N (%)	11 91.7	6 54.5	5 45.5		3 27.3	8 72.7	
Cerrahi sınır	Var N (%)	5 10.9	2 40.0	3 60.0	,640	2 40.0	3 60.0	>0,05
	Yok N (%)	41 89.1	24 58.5	17 41.5		13 31.7	28 68.3	
	Var N (%)	1 8.3	0 0	1 100		1 100.0	0 0	
Rekürrens	Yok N (%)	11 91.7	6 54.5	5 45.5	>0,05	3 27.3	8 72.7	,333
	Var N (%)	5 10.9	2 40.0	3 60.0		2 40.0	3 60.0	
	Yok N (%)	41 89.1	24 58.5	17 41.5		13 31.7	28 68.3	

Tablo-13: Çalışma grubunun histopatolojik parametreleri ile GSTP1 ve TLR-9 gen polimorfizm verileri.

Patolojik parametreler	Özellikler	Sayı	GSTP1 G aleli taşıyanlar (GG+AG) N (%)	GSTP1 Homozigot (doğal, AA) N (%)	P	TLR9 C aleli taşıyanlar (CC+TC) N (%)	TLR9 Homozigot (doğal, TT) N (%)	P
Histoloji	SCC N (%)	36 78.3	14 38.9	22 61.1	,719	9 25.0	27 75.0	,706
	Adeno ca N (%)	10 21.7	5 50.0	5 50.0		3 30.0	7 70.0	
Grade	Düşük N (%)	10 58.8	6 60.0	4 40.0	,637	3 30.0	7 70.0	>0,05
	Yüksek N (%)	7 41.2	3 42.9	4 57.1		2 28.6	5 71.4	
Sigara	Var N (%)	5 10.9	2 40.0	3 60.0	>0,05	1 20.0	4 80.0	>0,05
	Yok N (%)	41 89.1	17 41.5	24 58.5		11 26.8	30 73.2	
Sistemik hastalık	Var N (%)	24 52.2	9 37.5	15 62.5	,584	7 29.2	17 70.8	,619
	Yok N (%)	22 47.8	10 45.5	12 54.5		5 22.7	17 77.3	
Soygeçmiş	Var N (%)	4 8.7	2 50.0	2 50.0	>0,05	1 25.0	3 75.0	>0,05
	Yok N (%)	42 91.3	17 40.5	25 59.5		11 26.2	31 73.8	
Paraservikal tutulum	Var N (%)	30 73.2	13 43.3	17 56.7	,736	6 20.0	24 80.0	,128
	Yok N (%)	11 26.8	4 36.4	7 63.6		5 45.5	6 54.5	
Vajen tutulumu	Var N (%)	32 78.0	13 40.6	19 59.4	>0,05	6 18.8	26 81.2	,042*
	Yok N (%)	9 22.0	4 44.4	5 55.6		5 55.6	4 44.4	
Parakolpos tutulumu	Var N (%)	7 17.1	3 42.9	4 57.1	>0,05	1 14.3	6 85.7	,651
	Yok N (%)	34 82.9	14 41.2	20 58.8		10 29.4	24 70.6	
Uterus	Var N (%)	8 47.1	3 37.5	5 62.5	>0,05	1 12.5	7 87.5	,050
	Yok N (%)	9 52.9	4 44.4	5 55.6		6 66.7	3 33.3	
Tüpler	Var N (%)	0 0	0 0	0 0		0 0	0 0	
	Yok N (%)	17 100	5 29.4	12 70.6		6 35.3	11 64.7	
Sağ over	Var N (%)	1 5.9	0 0	1 100.0	>0,05	1 100.0	0 0	,353
	Yok N (%)	16 94.1	5 31.3	11 68.7		5 31.3	11 68.7	
Sol over	Var N (%)	0 0	0 0	0 0		0 0	0 0	
	Yok N (%)	17 100	5 29.4	12 70.6		6 35.3	11 64.7	
Pelvik lenf nodu	Var N (%)	1 10.0	1 100.0	0 0	,300	0 0	1 100.0	>0,05
	Yok N (%)	9 90.0	2 22.2	7 77.8		3 33.3	6 66.7	
Paraaortik lenf nodu	Var N (%)	0 0	0 0	0 0		0 0	0 0	
	Yok N (%)	10 100	3 30.0	7 70.0		3 30.0	7 70.0	
Lenfatik tutulum	Var N (%)	7 58.3	2 28.6	5 71.4	>0,05	2 28.6	5 71.4	,558
	Yok N (%)	5 41.7	2 40.0	3 60.0		3 60.0	2 40.0	
Vasküler tutulum	Var N (%)	3 25.0	1 33.3	2 66.7	>0,05	1 33.3	2 66.7	>0,05
	Yok N (%)	9 75.0	3 33.3	6 66.7		4 44.4	5 55.6	
Perinöral tutulum	Var N (%)	5 41.7	2 40.0	3 60.0	>0,05	1 20.0	4 80.0	,293
	Yok N (%)	7 58.3	2 28.6	5 71.4		4 57.1	3 42.9	
Cerrahi sınır	Var N (%)	1 8.3	0 0	1 100.0	>0,05	0 0	1 100.0	>0,05
	Yok N (%)	11 91.7	4 36.4	7 63.6		5 45.5	6 54.5	
Rekürrens	Var N (%)	5 10.9	3 60.0	2 40.0	,635	1 20.0	4 80.0	>0,05
	Yok N (%)	41 89.1	16 39.0	25 61.0		11 26.8	30 73.2	

Çalışma grubunda uygulanan tedavi yöntemleri Tablo–14’de gösterilmiştir.

Tablo–14: Çalışma grubunda tedavi yöntemleri.

Tedavi Yöntemleri	N	%
Cerrahi	4	8,7
Cerrahi+External RT+BT+KT	11	23,9
Cerrahi+External RT+BT	3	6,5
External RT+BT+KT	25	54,4
External RT+BT	3	6,5

Çalışma grubundaki olguların ortalama (\pm SD) hastalıksız ve toplam sağkalım süreleri Tablo–15’de gösterilmiştir. Hastalardan 44’ünün (%95,7) halen yaşadığı, 2’sinin (% 4,3) ise öldüğü tespit edildi.

Tablo–15: Çalışma grubundaki ortalama (\pm SD) hastalıksız ve toplam sağkalım süreleri

	Ortalama \pm SD
Hastalıksız sağkalım	2,00 \pm 1,41
Toplam sağkalım	3,02 \pm 2,88

SD: standart deviasyon

TARTIŞMA VE SONUÇ

İnsanlardaki kalıtsal genetik kusurlar, kimyasalları aktive eden ve detoksifiye eden enzimlerin yapısını ve düzeyini etkileyen kişisel genetik farklılıklar, DNA hasarının onarım kapasitesini etkileyen polimorfik/genetik değişiklikler, kanser riskini arttırabilen başlıca genetik faktörlerdir (2, 7). Toplumda %1'den daha yüksek sıklıkta bulunan genetik çeşitlilik tipi ya da gen seçenekleri polimorfizm olarak tanımlanır ve mutasyonlardan daha sık rastlanır.

Serviks kanseri dünya genelinde yaygın olarak görülen kanserlerin başında gelmektedir. Serviks kanseri özellikle gelişmekte olan ülkelerde tarama programlarının yetersizliğinden dolayı daha sık görülmektedir. Serviks kanserinin etyolojisinde çok sayıda faktörün rol oynadığı düşünülmektedir. Risk faktörleri arasında, bazı HPV tipleri ile enfeksiyon, erken yaşta cinsel ilişki, çok sayıda cinsel partner, düşük sosyoekonomik düzey, grandmultiparite, sigara kullanımı, yetersiz beslenme (vitamin A, C, beta karoten ve folat eksikliği), uzun süreli oral kontraseptif kullanımı yer almaktadır (25). Çalışmamızda, hasta grubunda gravida ($p=0,039$), parite ($p=0,001$) ve yaşayan çocuk sayısının ($p=0,001$) kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha yüksek olduğu saptandı.

Serviks kanserinin gelişiminde ve ilerlemesinde bir çok genetik faktörün de rolünün olabileceği düşünülmekle birlikte bunlar hakkında yeterince veri bulunmamaktadır. Bazı kanser türlerine yatkınlığın artması veya azalmasının temelinde yatan nedenin ksenobiyotiklerin detoksifikasyonunda rol oynayan enzimlerin gösterdiği genetik polimorfizm olabileceği ileri sürülmüştür (5, 6). Özellikle son yıllarda yapılan çalışmalarda kanser riski ile ksenobiyotik metabolizma enzim polimorfizmleri arasında önemli ilişkiler gösterilmiş ve tüm bulgular kanser etyolojisinde genetiğin rolünü vurgulamıştır (7).

GST'ler faz II ksenobiyotik reaksiyonda rol oynayan, elektrofilik ksenobiyotikleri inaktive ederek vücuttan atılmak üzere GSH ile konjugasyonunu katalizleyen enzimlerdir (3, 4, 55). GST oksidatif strese karşı hücrel korumada önemli bir rol oynar (7, 36) GST gen ailesine ait enzimler kanserojenik potansiyele sahip birçok endojen ve ekzojen kimyasallara karşı hücre savunmasının önemli bir bölümünü oluştururlar (2). GST gen polimorfizmleri akciğer, karaciğer, mesane, meme, kolorektal, mide, larinks ve cilt kanseri gibi bir çok kanserde risk faktörü olarak araştırılmıştır (35). Son yıllarda yüksek riskli kadınlarda serviks kanseri taraması için kullanılması önerilen belirteçlerden birisi GST'dir (36).

HPV enfeksiyonu serviks kanseri için önemli bir risk faktörü olmakla beraber, bazı enfekte kadınlarda invaziv lezyon gelişmemesi HPV enfeksiyonunun tek başına yeterli bir faktör olmadığını ve sigara içimi gibi diğer kofaktörlerinde serviks kanseri gelişiminde önemli bir rol oynadığını düşündürmektedir (39). Aktif sigara içiminin yanı sıra, pasif sigara içimi de serviks kanseri için bağımsız risk faktörü olarak bildirilmektedir. Sigara içimi, servikal HPV enfeksiyonunun daha uzun sürmesine yol açmakta ve onkojenik enfeksiyonun temizlenme potansiyelini düşürmektedir. Sigaradan kaynaklanan nikotin ve kotinin gibi maddelerin servikal mukusta yoğun olarak saptandığı ve bu mukusun mutajenik olabileceği bildirilmiştir (39).

GST'ler, sigara tütününde bulunan karsinojenlerin (monohalometanlar, polisiklik aromatik hidrokarbonlar, etilen oksit, benzopiren, nitrozamine (9) detoksifikasyonunda önemli rol oynarlar (38, 39). Yapılan moleküler çalışmalarda, sigara içimi sonucu ortaya çıkan metabolik ürünlerin prokarsinojen ve muhtemel kanser gelişimi ile ilgili olduğu düşünülmüştür (36). GST gen delesyonunda, GST enzim aktivitesinin yokluğuna bağlı olarak sigara içimi sonucu ortaya çıkan karsinojenlerin detoksifiye edilemediği ve bu durumun akciğer, serviks ve diğer sigaraya bağlı kanserlerde artışa neden olduğu öne sürülmüştür (2, 36, 40). Ayrıca bir çalışmada sigara içen ve içmeyen grupların servikal epitelleri karşılaştırıldığında, sigara içenlerin epitellerinde DNA hasarında artış olduğu gösterilmiştir (8). ABD'de sigara içimi ile serviks kanseri birlikteliği anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur (2).

Literatürde GST gen polimorfizmlerinin akciğer, karaciğer, mesane, meme, kolorektal, mide, larinks ve cilt kanseri gibi çeşitli organ kanserlerinde araştırıldığı çok sayıda çalışma bulunmaktadır (35). GSTM1 ve GSTT1 (6) null alellerinin mesane ve akciğer kanseri için artmış riskle birlikte olduğu görülmüştür (35). Özellikle GSTM1 null genotipi olanlarda akciğer, mesane ve kolon kanserleri riskinin arttığı bildirilmektedir (38).

Kanser çalışmalarında en çok çalışılan GST enzim ailesinin üyeleri GSTM1, GSTT1 ve GSTP1'dir. GSTM1, polisiklik aromatik hidrokarbonların (PAH) detoksifikasyonundan sorumludur (9, 36, 37, 38). GSTT1, monohalometanları ve etilen oksit gibi çok sayıda potansiyel kanserojenleri metabolize eder (9). GSTM1 ve GSTT1 gen ürünlerinin, çeşitli elektrofilik ürünlerin bağlanmasını sağlayarak DNA'daki mutasyona karşı koruyucu olduğu düşünülmektedir (35). GSTM1 ve GSTT1 null alelleri, bu genlerin homozigot olarak delesyona uğramasından kaynaklanmaktadır (37). Null aleller enzim aktivite yokluğu ile karakterizedir (2, 37). GSTM1 null genotipi sıklığı Avrupalılarda % 39–62 oranında, doğu Asyalılarda % 33–63 oranında, Afrikalılarda % 23–45 oranında bildirilmiştir (9). GSTT1 null genotipi sıklığı beyaz ırkta % 13–28 arasında bildirilmiştir (56). Beyaz ırkta (%16,1) GSTT1 null genotipi görülme sıklığı Japonlara (%50,8) göre daha düşüktür (6). Ada ve ark. (57) Türk popülasyonundan 133 sağlıklı kişide yaptıkları çalışmada GSTM1 ve GSTT1 gen polimorfizmi sıklığı incelenmiş ve GSTM1 null genotipi sıklığı %51,9 ve GSTT1 null genotipi sıklığı %17,3 olarak saptanmıştır. Türk popülasyonunda saptanan gen polimorfizmi sıklığının, beyaz ırkta gözlenen gen polimorfizm sıklığı ile aynı oranda olduğu tespit edilmiştir.

Çalışmamızda GSTM1 null alelinin görülme sıklığı kontrol grubunda % 57,7, çalışma grubunda ise % 54,3 olarak saptandı. GSTT1 için null alel görülme sıklığının kontrol grubunda % 30,8, hasta grubunda ise % 32,6 olduğu görüldü. Her iki grupta da GSTM1 null alelinin sıklığı beyaz ırka benzerlik göstermekteyken, GSTT1 null aleli görülme sıklığı beyaz ırktan yüksek bulunmuştur. GSTM1 ve GSTT1 null alelleri görülme sıklığı açısından çalışma ve kontrol grubu arasında istatistiksel anlamlı bir fark saptanmadı.

Lee ve ark. (35) Kore popülasyonunda yaptıkları çalışmada, GSTM1 null genotipi ile servikal kanser gelişimi arasında anlamlı bir birliktelik saptanmamıştır. GSTM1 null genotipi ile yüksek riskli HPV enfeksiyonu olan Koreli kadınlarda ise serviks kanseri için artmış riskten bahsedilmiş ve sonuç olarak HPV enfeksiyonunun neden olduğu servikal karsinogenezis üzerinde GSTM1 genotipinin modüle edici etkisinin olduğu bildirilmiştir.

Literatürde serviks kanseri ile GST gen polimorfizmi birlikteliğinin saptandığı ve serviks kanseri için artmış riskten bahseden çalışmalar da bulunmaktadır. Joseph ve ark. (8) çalışmasında serviks kanseri hastaları ile kontrol grubunda GSTM1 ve GSTT1 gen polimorfizmleri araştırılmış ve serviks kanseri hastalarında GSTM1 ($p=0,0001$) ve GSTT1 ($p=0,09$) delesyonlu genotiplerin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak daha yüksek olduğu saptanmıştır. Aynı çalışmada HPV16 (+)'liği olan kişilerde GSTM1 ve GSTT1 delesyonlarının daha yüksek olduğu bildirilmiştir.

Serviks kanseri hastaları ile sağlıklı kontrol grubunda GSTT1 ve GSTM1 gen polimorfizmlerinin araştırıldığı bir çalışma da Kim ve ark. (6) tarafından yapılmıştır. Bu çalışmada GSTT1 null genotipi sıklığı serviks kanseri hastalarında (%66,3), kontrol grubuna (%50,8) göre anlamlı şekilde yüksek bulunurken, GSTM1 null genotipi açısından serviks kanserli hastalar (%52,5) ile kontrol grubu (%53) arasında anlamlı bir farklılık saptanmamıştır. Yaş grubuna göre de değerlendirilen hastalardan 40 yaşından küçük olanlarda kontrollere göre hem GSTT1 hem de GSTM1 null genotipinin anlamlı şekilde daha yüksek bulunduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre GST gen pozitifliğinin genç yaş grubundaki kadınlar için servikal karsinogeneziste koruyucu rol oynayabileceği bildirilmiştir.

Au ve ark. (2) tarafından ABD'de yapılan bir çalışmada, serviks kanseri hastalarında GSTM1 null genotipinin belirgin olarak daha yüksek olduğu saptanmıştır. Serviks kanseri hastalarında GSTM1 null genotipinin GSTM1 pozitifliği olan gruba göre 3 kat daha fazla olduğu bildirilmiş ve sonuçta GSTM1 null genotipi taşıyanlarda serviks kanseri riskinde 3 kat artış olduğu gösterilmiştir (2, 58). Aynı çalışmada sigara içimi ile serviks kanseri birlikteliği anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur.

Sobti ve ark. (39) tarafından Hindistan popülasyonunda yapılan bir çalışmada, serviks kanseri hastaları ile kontrol grubunda GSTM1, GSTT1, GSTP1 polimorfizmine bakılmış ve GSTM1 null genotipi, GSTT1 null genotipi ve GSTP1 (İle/Val) genotipleri ile serviks kanseri ile kontrol grubu arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunmamıştır. Bununla birlikte GSTM1 null genotipi, GSTT1 null genotipi ve GSTP1 (İle/Val) genotiplerine sahip pasif sigara içicilerde serviks kanseri riskinin arttığı bildirilmiştir ve bu riskin GSTM1 null genotipi olanlar için 7 kat, GSTT1 null genotipi olanlar için 10,2 kat ve GSTP1 (İle/Val) genotipinde 6,4 kat artmış olduğu gösterilmiştir. Çalışma sonucunda GSTM1 null genotipi, GSTT1 null genotipi ve GSTP1 (İle/Val) genotiplerinin serviks kanseri için risk faktörü olarak bulunmamasına rağmen bu genlerdeki polimorfizmle sigara içme alışkanlığı birlikte analiz edilince kanser riskinin arttığı bildirilmiştir.

Uedaa ve ark. (36) Japon popülasyonunda servikal skuamöz intraepitelyal lezyonlu (SIL) hastalarla kontrol grubunda GSTT1 ve GSTM1 genotipini araştırdıkları çalışmalarında SIL'li hastalarla kontrol grubu arasında GSTM1 null genotipi arasında anlamlı farklılık saptanamamışsa da yüksek grade skuamöz intraepitelyal lezyon (HGSIL) olan hastalarda GSTT1 null genotipi düşük grade skuamöz intraepitelyal lezyon (LGSIL) ve kontrollerle karşılaştırıldığında anlamlı şekilde yüksek bulunmuş ve GSTT1 null genotipinin serviks kanseri hastalarında daha yaygın olduğu bildirilmiştir.

Goodman ve ark. (59) SIL ile GSTM1 ve GSTT1 null genotiplerini araştırdılar ve GSTM1 null genotipinin SIL'li hastalarda GSTM1 (+) olan gruba göre yüksek sıklıkta olduğu ancak istatistiksel olarak anlamlı olmadığını bildirmişlerdir. GSTT1 null genotipi ile servikal neoplazi arasında anlamlı bir ilişki saptanamamıştır. Öte yandan literatürde GSTM1 ve GSTT1 null genotiplerinin serviks kanseri ile birlikteliği olmadığını öne süren çalışmalar mevcuttur (38, 60, 61, 62). Çalışmamızda GSTM1 ve GSTT1 null genotipleri görülme sıklığı açısından çalışma ve kontrol grubu arasında istatistiksel anlamlı bir fark saptanmadı. Histopatolojik parametreler açısından da GSTM1 ve GSTT1 null genotiplerinin sıklığı gruplar arasında farklılık göstermemektedir.

Singh ve ark. (9) Hindistan popülasyonunda yaptıkları çalışmada, serviks kanseri hastalarında GSTM1 ve GSTT1 null genotipleri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak daha yüksek bulunmuştur. Aynı çalışmada serviks kanserli hastalarda GSTM1 ve GSTT1 null genotipi ile sigara alışkanlığı aralarında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır. Bizim çalışmamızda da Singh ve ark. sonucuna benzer şekilde serviks kanserli sigara içen hastalar ile GSTM1, GSTT1, GSTP1 gen polimorfizmleri arasında anlamlı bir ilişki saptanmadı.

Jee ve ark. (40) Kore popülasyonunda yaptıkları çalışmada sigara içen serviks kanseri ile GSTP1 polimorfizmi araştırıldığında GSTP1 AA genotipli sigara içicilerde GSTP1 G aleli pozitif sigara içmeyenlere kıyasla serviks kanseri riskinin 3,9 kat arttığı bildirilmiştir. Sigara içen kadınlardaki GSTP1 polimorfizmi, servikal kanser gelişiminde daha yüksek riskle ilişkilidir. Çalışma ve kontrol grubu arasında GSTP1 genotip görülme sıklığı açısından önemli bir değişkenlik saptanmamıştır. (Kontrol grubu: AA (%66,8), AG (%31,6), GG (%3,9), Hasta grubu: AA (%64,3), AG (%31,6), GG (%4,1)) (40). Çalışmamızda Jee ve ark. sonuçlarına benzer şekilde çalışma ve kontrol grubunda GSTP1 genotipleri görülme sıklığı açısından anlamlı bir farklılık olmadığı ve GSTP1 genotipleri sıklığının serviks kanseri hastalarına ait histopatolojik parametrelerin varlığında anlamlı bir artış göstermediği görülmüştür.

TLR'ler, birçok patojene karşı doğal immün cevabın oluşmasını sağlayan bir grup tip 1 transmembran proteindir (10). TLR'ler patern tanıyan reseptörler olarak bilinmektedir (47). Patojenler tarafından sunulan moleküller immün sistem hücreleri üzerindeki TLR'ler tarafından tanınıp bağlandığında doğal immün sistem yanıtları gelişir. TLR genine ait polimorfizmlerin bazı kanser türlerinin patogenezinde yer aldığı gösterilmiştir (12). Neoplastik süreçlerin, TLR sinyal yollarının bozulması sonucu ortaya çıkabileceği ileri sürülmüştür (12). Bununla birlikte tümör hücrelerindeki TLR sinyali konakçı savunmasını bozarak kanserin ilerlemesiyle de birlikte olabilir (12). Bilinen TLR ve kanser ilişkileri Tablo-16'da gösterilmiştir (12). TLR gen polimorfizmleri ve kanserleri araştıran az sayıda çalışma vardır. Tahara ve

ark. (51), 2007 yılında, Japon hastalarda TLR-2 polimorfizminin mide kanserine yatkınlık oluşturabileceğini bildirmişlerdir. Akciğer kanserinde de TLR-9 ekspresyonunda artış olduğu gözlenmiştir (45). Hasan ve ark. (42) HPV 16'nın TLR-9 transkripsiyonunu azaltarak konakçı immun cevabını baskıladığını göstermişlerdir.

Tablo-16: TLR ve kanser ilişkisi (12).

TLR	Kanser hücrelerinde ekspresyon	TLR fonksiyonu
TLR-2/TLR-9	Mide kanseri	Kanser progresyonu
TLR-4	Meme kanser	Kanser progresyonu
TLR-9	Glioma	Tümör hücre apoptozu
TLR-7/TLR-9	Kronik lenfositik lösemi(CLL)	CLL hücre ölümü
TLR-3	Meme kanseri	Tümör hücre apoptozu
TLR-2 /TLR-3/TLR-4	Laringeal karsinom	Bilinmiyor

Tümör hücrelerinin immün gözetimden nasıl kaçtığı halen tam olarak anlaşılamamıştır. TLR-9 ekspresyonu ile kanserin başlangıcı ve ilerlemesi arasındaki ilişki de tam olarak anlaşılamamakla beraber Huang ve ark. (63) TLR sinyalizasyonunun tümörün immün gözetiminden kaçışına yol açan bir dizi olaya neden olduğunu ileri sürmüşlerdir. Servikal neoplazide TLR-9'un tümör progresyonunda rol oynayabileceği ve servikal skuamöz hücrelerdeki malign transformasyonu göstermek için yararlı bir belirteç olabileceği ileri sürülmüştür (45). Lee ve ark. (45) SIL, serviks kanseri ve normal skuamöz servikal dokuda yaptıkları immunohistokimyasal çalışmada, TLR-9 ekspresyonunun LGSIL'li hastalarda %20 oranında, HGSIL'li hastalarda %75 oranında, invaziv serviks kanserlerinin % 100'ünde olduğu tespit edilmiştir. Normal skuamöz epitel hücresinde ise TLR-9 tespit edilememiş veya düşük düzeyde gözlenmiştir. Servikal neoplazilerin derecesi arttıkça, TLR-9 ekspresyonu da artmaktadır.

Kim ve ark. (52) SIL, serviks kanseri ve normal skuamöz servikal dokuda yaptıkları immunhistokimyasal çalışmada, TLR-5 ekspresyonunun

LGSIL'de %33 oranında, HGSIL'de %41,7 oranında, invaziv serviks kanserinde %45 oranında olduğu tespit edilmiştir. Normal skuamöz epitel hücrelerinde ise TLR-5 tespit edilememiş veya zayıf düzeyde gözlenmiştir. Serviks kanserinde TLR-5 ekspresyonu pik yapmaktadır. TLR-5 boyanma skoru ile yaş, FIGO evresi, tümör boyutu, lokal rekürrens ve lenf nodu metastazı açısından anlamlı bir ilişki saptanmamıştır. TLR-9 ve serviks kanseri arasındaki ilişkiyi araştıran az sayıda çalışma vardır ve bu çalışmalar immünohistokimyasal yöntemle yapılmıştır. Çalışmamız serviks kanseri ile TLR-9 1237 T/C gen polimorfizmini inceleyen ilk çalışma olma özelliğini taşımaktadır.

Çalışmamızda, çalışma grubunda TLR-9 polimorfizmi için, TT homozigot doğal genotipi görülme sıklığı % 73,9, TC heterozigot genotipi görülme sıklığı % 23,9, CC homozigot mutant genotipi görülme sıklığı % 2,2 olarak saptandı. Kontrol grubunda TLR-9 polimorfizmi için, TT homozigot doğal genotipi görülme sıklığı % 75, TC heterozigot genotipi görülme sıklığı %25,0, CC homozigot mutant genotipi görülme sıklığı % 0 olarak saptandı.

Çalışmamızda da TLR 1237 T/C gen (TT, TC, CC) polimorfizmi ile serviks kanseri hastalarına ait patolojik parametreler arasında anlamlı bir ilişki olup olmadığı da araştırıldı. Vajen tutulumunun TLR-9 1237 T/C homozigot doğal TT alelini taşıyan hastalarda, C alelini taşıyanlara göre anlamlı olarak daha sık olduğu görüldü. (p=,042)

Sonuç olarak GSTM1, GSTT1, GSTP1 VE TLR-9 1237 T/C gen polimorfizmleri sıklığının serviks kanserinde artmadığı saptanmıştır. Ancak serviks kanser hastalarında vajen tutulumunun TLR-9 1237 T/C homozigot doğal TT alelini taşıyan hastalarda daha sık görülmesi, daha geniş gruplarda TLR-9 1237 T/C homozigot doğal TT alelinin prognostik öneminin değerlendirilmesinin önemli olabileceğini düşündürmektedir.

KAYNAKLAR

1. Simonetti AC, Melo JHDL, Souza PRE, Bruneka D, Filho JLL. Immunological's host profile for HPV and chlamydia trachomatis, a cervical cancer cofactor. *Microb Infect* 2009; (article in press)
2. Au WW. Life style, environmental and genetic susceptibility to cervical cancer. *Toxicology* 2004;198:117–20.
3. Seidegard J, Ekström G. The Role of human glutathione–S–transferases and epoxide hydrolases in the metabolism of xenobiotics. *Environ Health Perspect* 1997;105:791–9.
4. Hirvonen A. Polymorphisms of xenobiotic–metabolizing enzymes and susceptibility to cancer. *Environ Health Perspect.* 1999;107:37–47.
5. Malats N, Camus–Radon AM, Nyberg F, Ahrens W, Constantinescu V, Mukeria A, et al. Lung cancer risk in nonsmokers and GSTM1 and GSTT1 genetic polymorphism. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000;9:827–33.
6. Kim JW, Lee CG, Park YG, Kim KS, Kim IK, Sohn YW et al. Combined analysis of germline polymorphisms of p53, GSTM1, GSTT1, CYP1A1, and CYP2E1. *Cancer* 2000;88:2082–91.
7. Reszka E, Wasowicz W, Gromadzinska J. Genetic polymorphism of xenobiotic metabolising enzymes, diet and cancer susceptibility. *Br J Nutr* 2006;96:609–19.
8. Joseph T, Chacko P, Wesley R, Jayaprakash PG, James FV, Pillai MR. Germline genetic polymorphisms of CYP1A1, GSTM1 and GSTT1 genes in Indian cervical cancer: Associations with tumor progression, age and human papillomavirus infection. *Gynecol Oncol* 2006;101:411–17.
9. Singh H, Sachan R, Devi S, Pandey SN, Mittal B. Association of GSTM1, GSTT1 and GSTM3 gene polymorphisms and susceptibility to cervical cancer in a North Indian population. *Am J Obstet Gynecol* 2008; 198:303e1–e6.
10. Turul T, Ersoy F. Dostu düşmanı ayıran bir doğal immünite bileşeni: toll–like reseptörler (TLR). *Hacettepe Tıp Dergisi* 2004;35:114–18.
11. Hopkins PA, Sriskandan S. Mammalian toll–like receptors: to immunity and beyond. *Clin Exp Immunol.* 2005;140:395–407.
12. Chen K, Huang J, Gong W, Iribarren P, Dunlop NM, Wang JM. Toll–like receptors in inflammation, infection and cancer. *Int Immunol.* 2007;7:1271–85.
13. Carpenter S, O'Neill LAJ. How important are toll–like receptors for antimicrobial responses? *Cell Microbiol.* 2007;9:1891–1901.
14. Control of cancer of the cervix uteri. *Bulletin of The World Health Organization* 1986;64:607–18.
15. Comprehensive cervical cancer control. A guide to essential practice. *World Health Organization* 2006.
16. Han AC, Merzouk M, Belch RZ. Update on cervical cancer. *Cancer Ther.* 2005;3: 243–48.

17. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002 CA Cancer J Clin. 2005;55:74–108.
18. Cervical cancer screening in developing countries. Report of a WHO consultation. World Health Organization 2002; Geneva.
19. Planning and implementing cervical cancer prevention and control programs: A manual for managers. Alliance for Cervical Cancer Prevention (ACCP). 2004.
20. National Cancer Control Programmes Policies and Managerial Guidelines. World Health Organization 2002, 2nd Edition, Geneva.
21. Cancer Facts & Figures 2008. Atlanta: American Cancer Society; 2008.
22. Jemal A, Thomas A. Murray T, et al. Cancer statistics. 2002. CA Cancer J Clin 2002;52:23–47.
23. Güner H, Taşkıran Ç. Serviks kanseri epidemiyolojisi ve human papilloma virüs. TJOD 2007;4: 11–19.
24. Castle PE, Wacholder S, Lorincz AT, Scott DR, Sherman ME, Glass AG, et al. A prospective study of high-grade cervical neoplasia risk among human papillomavirus-infected women. J Natl Cancer Inst 2002;94:1406–14.
25. Sankaranarayanan R, Ramani S, Wesley R. A Practical Manual on Visual Screening for Cervical Neoplasia (Servikal Neoplazilerde Gözle Tarama Pratik El Kitabı). Özgül N (Çeviri editörü). 1. baskı. Ankara: Ankara Form Matbaacılık; 2005.9–14.
26. Arvas M. Genital HPV enfeksiyonu ve servikal karsinogenezis, İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi sürekli tıp eğitimi etkinlikleri No:63, Mart 2008.111–16.
27. Bosch FX, Sanjose SD. Human papillomavirus and cervical cancer—burden and assessment of causality. J Natl Cancer Inst Monographs 2003;31:3–13.
28. Stanley MA, Pett MR, Coleman N. HPV: from infection to cancer. Biochem Soc Trans 2007;35:1456–60.
29. Disaia PJ, Creasman WT. Clinical Gynecologic Oncology (Klinik Jinekoloji Onkoloji). Ayhan A (Çeviri editörü). 6. baskı. Ankara: Güneş Kitabevi; 2003. 53–111.
30. Rock AJ, Jones HW. Te Linde's Operative Gynecology. Tavmergen E (Çeviri editörü). 9. baskı. İzmir: Güven Kitabevi; 2005. 1251–1314.
31. Raunio H, Pelkonen O: Cancer Genetics. Genetic factors in the activation and inactivation of chemical carcinogens. Drugs, Diet and Disease 1995;1:229–58.
32. Orhan H, Şahin G. Glutasyon S-transferazların klinik ve toksikolojik önemi. T Klin Tıp Bilimleri 1995;15:303–15.
33. Liska DJ. The detoxification enzyme systems. Altern Med Rev 1998;3:187–98.
34. Tozkoparan B, Aytaç SP. Kanser kemoterapisinde terapötik hedef olarak glutasyon S-transferazlar. Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Dergisi 2007;27:139–64.
35. Lee SA, Kim JW, Roh JW, Choi JY, Lee KM, Yoo KY, et al. Genetic polymorphisms of GSTM1, p21, p53 and HPV infection with cervical cancer in Korean women. Gynecol Oncol 2004;93:14–18.

36. Uedaa M, Hungb YC, Teraia Y, Saitoc J, Nunobikid O, Nodad S, Ueki M. Glutathione-S-transferase and p53 polymorphisms in cervical carcinogenesis. *Gynecol Oncol* 2005;96:736–40.
37. Rebbeck TR. Molecular epidemiology of the human glutathione S-transferase genotypes GSTM1 and GSTT1 in cancer susceptibility. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1997;6:733–43.
38. Chen C, Madeleine MM, Weiss NS, Daling RJ. Glutathione S-transferase *M1* genotypes and the risk of squamous carcinoma of the cervix: a population-based case-control study. *Am J Epidemiol* 1999;150:568–72.
39. Sobti RC, Kaur S, Kaur P, Singh J, Gupta I, Jain V, Nakahara A. Interaction of passive smoking with GST (GSTM1, GSTT1, and GSTP1) genotypes in the risk of cervical cancer in India. *Cancer Gen Cyto* 2006;166:117–23.
40. Jee SH, Lee JE, Kim S, Kim JH, Lee SJ, Namkoong SE, et al. GSTP1 polymorphism, cigarette smoking and cervical cancer risk in Korean women. *Yonsei Med J* 2002;43:712–16.
41. Tosi MF. Innate immune responses to infection. *J Allergy Clin Immunol* 2005;116:241–49.
42. Hasan UA, Bates E, Takeshita F, Biliato A, Accardi R, Bouvard V et al. TLR9 expression and function is abolished by the cervical cancer-associated human papillomavirus type 16. *J Immunol* 2007;178:3186–97.
43. McInturff JE, Modlin RL, Kim J. The Role of toll-like receptors in the pathogenesis and treatment of dermatological disease. *J Invest Dermatol* 2005;125:1–8.
44. Roeder A, Kirschning JC, Rupec RA, Schaller M, Korting HC. Toll-like receptors and innate antifungal responses. *Trends Microbiol* 2004;12: 44–49.
45. Lee JW, Choi JJ, Seo ES, Kim MJ, Kim WY, Choi CH, et al. Increased toll-like receptor 9 expression in cervical neoplasia. *Mol Carcinog* 2007;46:941–47.
46. Medzhitov R, Hurlburt PP, Janeway CA Jr. A human homologue of the drosophila toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 1997;388:394–97.
47. Uenishi H, Shinkai H. Porcine toll-like receptors: The front line of pathogen monitoring and possible implications for disease resistance. *Dev Comp Immunol* 2009;33:353–61.
48. Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annu. Rev. Immunol* 2003;21:335–76.
49. Lammers KM, Ouburg S, Morré SA, Crusius JBA, Gionchetti P, Rizzello F, et al. Combined carriership of TLR9 –1237C and CD14 –260T alleles enhances the risk of developing chronic relapsing pouchitis. *World J Gastroenterol* 2005;11:7323–29.
50. Hamann L, Glaeser C, Hamprecht A, Gross M, Gomma A, Schumann RR. Toll-like receptor (TLR)–9 promotor polymorphisms and atherosclerosis. *Clin Chim Acta* 2006;364:303 – 7.
51. Tahara T, Arisawa T, Wang F, Shibata T, Nakamura M, Sakata M, et al. Toll-like receptor 2 –196 to 174del polymorphism influences the

- susceptibility of Japanese people to gastric cancer. *Cancer Sci* 2007;98: 1790–94.
52. Kim WY, Lee JW, Choi JJ, Choi CH, Kim TJ, Kim BG, et al. Increased expression of toll-like receptor 5 during progression of cervical neoplasia. *Int J Gynecol Cancer* 2008;18:300–5.
 53. Abbas A, Delvinquiere K, Lechevrel M, Lebailly P, Gauduchon P, Launoy G, Sichel F. GSTM1, GSTT1, GSTP1 and CYP1A1 genetic polymorphisms and susceptibility to esophageal cancer in a French population: different pattern of squamous cell carcinoma and adenocarcinoma. *World J Gastroenterol* 2004;10: 3389–93.
 54. Hong J, Leung E, Fraser AG, Merriman TR, Vishnu P, Krissansen GW. TLR2, TLR4 and TLR9 polymorphisms and Crohn's disease in a New Zealand Caucasian cohort. *J Gastroenterol Hepatol* 2007;22:1760–66.
 55. Ketterer B, Harris J.M, Talaska G, Meyer D.J, Pemple S.E, Taylor J.B, Lang N.P, Kadlubar F.F. The Human glutathione S-transferase supergene family, its polymorphism, and its effects on susceptibility to lung cancer. *Environ Health Perspect* 1992;98:87–94.
 56. Norppa H. Genetic susceptibility, biomarker responses, and cancer. *Mutat Res* 2003;544:339–48.
 57. Ada AO, Süzen SH, Iscan M. Polymorphisms of cytochrome P450 1A1, glutathione S-transferases M1 and T1 in a Turkish population. *Toxicology Lett* 2004;151:311–15.
 58. Au WW, Sierra-torres CH, Tying SK. Acquired and genetic susceptibility to cervical cancer. *Mutat Res* 2003;544:361–64.
 59. Goodman MT, McDuffie K, Hernandez B, Bertram CC, Wilkens LR, Guo C, et al. CYP1A1, GSTM1, and GSTT1 polymorphisms and the risk of cervical squamous intraepithelial lesions in a multiethnic population. *Gynecol Oncol* 2001;81:263–69.
 60. Sharma A, Sharma JK, Murthy NS, Mitra AB. Polymorphisms at GSTM1 and GSTT1 gene loci and susceptibility to cervical cancer in Indian population. *Neoplasma* 2004;51:12–6.
 61. Niwa Y, Hirose K, Nakanishi T, Nawa A, Kuzuya K, Tajima K, Hamajima N. Association of the NAD(P)H: quinone oxidoreductase C609T polymorphism and the risk of cervical cancer in Japanese subjects. *Gynecol Oncol* 2005;96:423–29.
 62. Warwick A, Sarhanis P, Redman C, Pemble S, Taylor JB, Ketterer B, et al. Theta class glutathione S-transferase GSTT1 genotypes and susceptibility to cervical neoplasia: interactions with GSTM1, CYP2D6 and smoking. *Carcinogenesis* 1994;15:2841–45.
 63. Huang B, Zhao J, Li H, et al. Toll-like receptors on tumor cells facilitate evasion of immune surveillance. *Cancer Res* 2005;65:5009–14.

TEŞEKKÜR

Uludağ Üniversitesi Tıp Fakóltesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı'nda aldığım uzmanlık eğitimim süresince, bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, başta tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Hakan Ozan olmak üzere değerli hocalarım Prof. Dr. Candan Cengiz, Prof. Dr. Ahmet Esmer, Prof. Dr. Mehpere Tüfekçi, Prof. Dr. Şakir Küçükkömürcü, Prof. Dr. Yalçın Kimya, Prof. Dr. Gürkan Uncu, Prof. Dr. Osman Haldun Develiođlu ve değerli uzmanlarım Uzm. Dr. Kemal Özerkan, Uzm. Dr. Aral Atalay, Uzm. Dr. Bilge Çetinkaya Demir'e, tez çalışmam sırasında bana yardımcı olan Genetik Anabilim Dalı'ndan Sayın Doç. Dr. Tahsin Yakut ve Dr. Mutlu Karkucak'a, İstatistik Anabilim Dalı'ndan Dr. Çağatay Büyükuysal'a, rotasyonlarım sırasında emeği geçen tüm hocalarıma, tüm çalışma arkadaşlarıma ve gösterdikleri büyük fedakarlık için canım aileme teşekkürlerimi sunarım.

ÖZGEÇMİŞ

22.07.1978 yılında Beyşehir'de doğdum. İlköğrenimimi Seydişehir Alüminyum İlkokulunda, orta öğrenimimi Seydişehir Mahmut Esat Ortaokulu'nda, lise öğrenimimi İzmir Kız Lisesi'nde tamamladım. Tıp eğitimimi, 1996–2002 yılları arasında Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde aldım. 2004 Nisan dönemi Tıpta Uzmanlık Sınavı ile Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalında uzmanlık eğitimi hakkı kazandım.