

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KOLESTEATOMLU HASTALARDA
GENOMİK İNSTABİLİTENİN ARAŞTIRILMASI**

Zeynep Betül BULUT

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Hasan ACAR

KONYA-2012

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KOLESTEATOMLU HASTALARDA
GENOMİK İNSTABİLİTENİN ARAŞTIRILMASI**

Zeynep Betül BULUT

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Hasan ACAR

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 11202029
proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA-2012

S.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

Zeynep Betül BULUT tarafından savunulan bu çalışma, jürimiz tarafından Tıbbi Genetik Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: "Prof.Dr.Hasan ACAR"
Selçuk Üniversitesi


İmza

Danışman: "Prof.Dr.Hasan ACAR"
Selçuk Üniversitesi


İmza

Üye: "Prof.Dr.Hasan ACAR"
Selçuk Üniversitesi


İmza

Üye: "Prof.Dr.Tülin ÇORA"
Selçuk Üniversitesi


İmza

Üye: "Doç.Dr. Kayhan ÖZTÜRK"
Selçuk Üniversitesi


İmza

ONAY:

Bu tez, Selçuk Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu tarih ve sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

"Prof.Dr.Tevfik TEKELİ"
Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Tezimin deney materyallerinin toplanmasında yardımcı olan sayın Doç.Dr.Kayhan ÖZTÜRK'e, tezim için kıymetli fikirlerinden yararlandığım Doç.Dr Beyhan CENGİZ'e, tezimin sonuçlarının değerlendirilmesinde yardımcı olan sayın Doç.Dr Ercan KURAR'a, beni tez yazımından laboratuvar çalışmalarına kadar her türlü konuda destekleyen ağabeyim Süleyman NERGİZ'e, laboratuvar çalışmalarım esnasında desteğini gördüğüm sevgili arkadaşım V.Betül KOCABIYIK' a, maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen babam M. Ali BULUT' a ve sevgili kardeşlerim Halil İbrahim, Emine Sümeyye ve Abdullah Sinan'a teşekkürü bir borç bilirim.

Bu tezi rahmetli annem Lamia BULUT'a ithaf ediyorum...

BEYAN

Prof.Dr.Hasan ACAR'ın danışmanlığında gerçekleştirilen bu tez çalışmasının kendi çalışmamız olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışması ile elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Zeynep Betül BULUT

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	i
BEYAN	ii
SİMGELER VE KISALTMALAR	v
1.GİRİŞ	1
1.1.Kolesteatom	1
1.1.1. Tanım	1
1.1.2.Kolesteatomun Epidemiyolojisi	2
1.1.3.Kolesteatomun Etiyolojisi ve Oluşum Mekanizmaları	3
1.1.4.Kolesteatom Histopatolojisi	8
1.1.5. Kolesteatom Moleküler Biyolojisi	9
1.2. Genom ve Genetik Değişimler.....	11
1.2.1.Heterozigositenin Kaybı (LOH).....	13
1.2.2. Mikrosatellitler	15
1.3. Kolesteatomun Genetiği.....	16
1.3.1.Kolesteatomun Sitogenetiği	16
1.3.2.Kolesteatomun Moleküler Genetiği	17
2. GEREÇ ve YÖNTEM.....	18
2.1. Doku Örneklerinin Temini.....	18
2.2. Kolesteatom ve Cilt Dokularından DNA Eldesi	21
2.3. Kan Dokusundan DNA Eldesi	22
2.4. Kolesteatom ve Cilt Primer Hücre Kültürleri	22
2.5. Kullanılan STR Belirteçler (Mikrosatellit DNA Belirteçleri).....	24
2.6. PCR reaksiyonunun hazırlanması ve PCR şartlarının STR Belirleyicilere Göre Optimizasyonu	25
2.7. Jel Elektroforezi.....	26
2.8. LOH Analizi	27
3. BULGULAR.....	29

3.1.Hasta Bulguları	29
3.2. Hücre Kültür Bulguları.....	29
3.3. Klasik PCR Bulguları	31
3.4.Heterozigotluk Kaybı Bulguları.....	32
3.4.1.D6S273 STR Belirleyicisine Ait Bulgular.....	35
3.4.2.D6S473 STR Belirleyicisine Ait Bulgular	36
3.4.3.D8S261 STR Belirleyicisine Ait Bulgular	37
3.4.4.D9S157 STR Belirleyicisine Ait Bulgular	38
3.4.5.D6S162 STR Belirleyicisine Ait Bulgular	40
3.4.6.D15S126 STR Belirleyicisine Ait Bulgular	41
3.4.7.D15S153 STR Belirleyicisine Ait Bulgular	42
4.TARTIŞMA	44
5.SONUÇ VE ÖNERİLER.....	48
6.ÖZET	49
7.SUMMARY	50
8.KAYNAKLAR	51
9.EKLER	55
10.ÖZGEÇMİŞ.....	57

SİMGE ve KISALTMALAR

4F2	: Hücre Yüzeyi Antijeni
BBSHK	:Baş Boyun Skuamöz Hücreli Karsinoma
bp	: Baz Çifti
CDKN2A	: Siklin-Dependent Kinase İnhibitor 2A
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
EDTA	: Etilen di Amin Tetra Asetik Asit
EGF	: Epidermal Growth Factor
EGFR	: Epidermal Growth Factor Receptor
HLA	: İnsan Lökosit Antijeni
IL-1	: İnterlökin-1
KGF	: Keratinosit Grown Factor
KOM	: Kronik Otitis Media
Let-7a	: MikroRNA Prekürsörü
LINE	: Long Interspersed Nuclear Elements
LOH	: Heterozigosite Kaybı
MgCl₂	: Magnezyum Klorür
Mir-21	: MikroRNA-21
MMP-1	: Matrix Metalloproteinase-1
MMP-2	: Matrix Metalloproteinase-2
MMP-9	: Matrix Metalloproteinase-9

MSI	: Mikrosatellit İnstabilitesi
p-Akt	: Fosforlanmış Protein Kinase B
PBL	: Periferik Kan Lökositleri
PCR	: Polimeraz Zincir Tepkimesi
PTEN	: Phosphatase and Tensin Homolog Geni
RB1	: Retinoblastoma1
SINE	: Short Interspersed Nuclear Elements
STR	: Short Tandem Repeat
TBE	: Tris / Borik Asit / EDTA
TGF-α	: Tümör Growth Factor Alfa
TGF-β	: Tümör Growth Factor Beta
TNF-β	: Tümör Nekrozis Faktör Beta
VNTR	: Variable Number of Tandem Repeats
β2m	: Beta-2 mikroglobulin geni

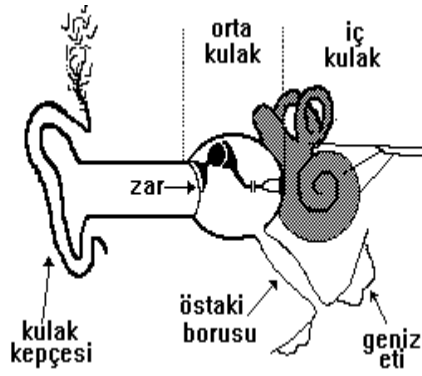
1. GİRİŞ

1.1. Kolesteatom

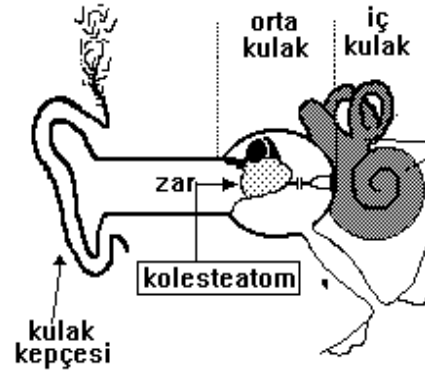
1.1.1.Tanım

Kolesteatom, literatürde yunanca iki isimden gelmektedir; *chole* (safra) ve *steatoma* (yağlı tümör). Ancak ne kolesterin ne de yağ içermektedir. İlk olarak Du Verney 1683 yılında *steatoma* adını verdiği kolesteatom benzeri lezyonu serebellum ve serebrum arasındaki kitle olarak tanımlamıştır. Fransız patolog Cruveilhier 1829 yılında avasküler tümör olarak ‘inci tümör’ şeklinde tanımlamıştır. 1838 yılında Alman fizyolog Johannes Muller, ilk defa kolesteatom terimini ortaya atmış ve kolesterin ve yağ içeren benign bir tümör olarak tanımlamıştır.

Kolesteatomun pek çok araştırmacı tarafından histopatolojik tarifi yapılmıştır. Fakat en kısa, kesin ve doğru tarif 1962 yılında Gray tarafından yanlış yerde gelişen deri şeklinde yapılmıştır. Hakikaten patogenezi ne olursa olsun kolesteatom, olmaması gereken yerde bulunan deriye ait, yassı epitel dokusudur (Jahn 1989) (Şekil1.1). 1993 yılında Strunk ise kolesteatom için yanlış yerde gelişen deri tanımını yapmıştır.



Şekil 1.1. (A) Tabii bir kulak kesitinde orta kulakta, zar ile iç kulak arasında ses iletimini sağlayan Çekiç-Örs-Üzengi kemikçikleri görülmektedir



Şekil 1.1. (B) Kolesteatomlu orta kulak iltihabı. Örs kemiğinin bir kısmı tahrip olmuş durumdadır

(<http://www.oocities.org/hotsprings/villa/1707/kolesteatom.htm>).

Günümüzde kolesteatomun tanımında değişiklikler yapılmıştır. Kolesteatomun patofizyolojisi net bir şekilde açıklanamamakla beraber multifaktöriyel olduğu sanılmaktadır ki pek çok teori önerilmekte ve araştırılmaktadır (Albin ve ark 1998). Kolesteatom hiperproliferatif olmasına rağmen neoplazi özelliklerini göstermez. Ayrıca metastaz yapmaz ve genetik olarak kararlı olduğu ifade edilmektedir (Diego 2012).

Kolesteatomlar invaziv özellikte lokal olarak yıkıcı ve ameliyat sonrası nüks oranı yüksek deri lezyonlarıdır. Agresif karakteri, biyolojisindeki bir ya da daha fazla bileşeninde (keratinosit, fibroblast, inflamatuvar hücreler) temel değişimin olabileceğini düşündürür (Parisier ve ark 1993). Ayrıca kolesteatom, agresif büyüme ve keratinosit düzensizliği ile karakterize epidermoid kist olarak da değerlendirilmektedir (Albino ve ark 1998).

1.1.2.Kolesteatomun Epidemiyolojisi

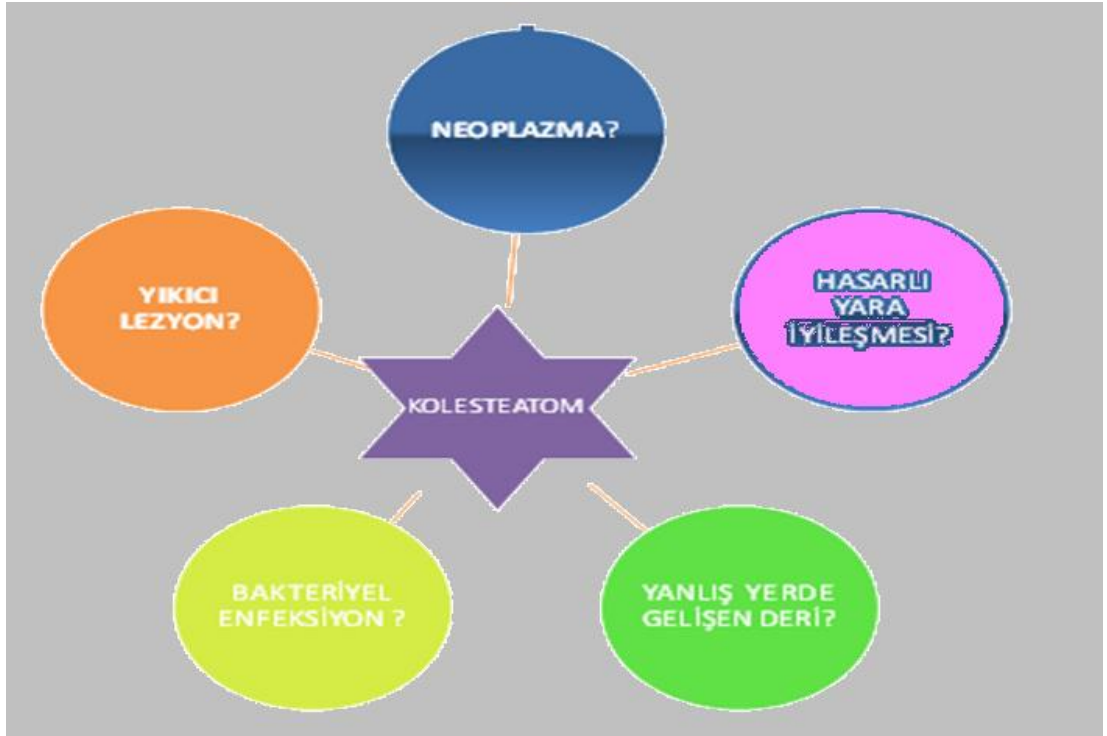
Kolesteatom ile ilgili ülkemizde yapılan epidemiyolojik çalışmalar yetersiz olup, kolesteatom prevalansı hakkında halen kesin rakamlar mevcut değildir. Finlandiya'da kolesteatom insidansı 100.000'de 9,2'dir (Kemppainen ve ark 1999). İsrail'de yapılan bir çalışmada kronik otitis media (KOM) prevalansı % 0,95 ve kolesteatom prevalansı % 0,4 olarak bulunmuş ve KOM'lu hastaların %41'inde kolesteatom geliştiği bildirilmiştir (Podoshin ve ark 1986). Kafkaslarda primer edinilmiş kolesteatom daha sık görülür iken Asya'da sekonder edinilmiş kolesteatomun daha sık görüldüğü ve daha sık komplikasyon riski olduğu bildirilmektedir (Lee ve ark 1999). Konjenital kolesteatom görülme yaşı 5,6 +/- 2,8 yaş olup çocuklardaki edinilmiş kolesteatom görülme yaşı ise 9,7 +/- 3,3 yaşlarıdır (Nelson ve ark 2002). Kolesteatom Kafkaslarda yüksek insidanda görülmekte olup bunu Afrika yerlileri takip etmekte ve Asya'da daha az (Hindistan hariç) görülmektedir (Potsic ve ark 2002). Kemppainen ve arkadaşları kolesteatomun alt sosyal gruplarda fazla görülmediğini bildirmişlerdir. Bununla beraber Tumarkin ekonomik faktörlerin kolesteatomun epidemiyolojisini yansıtan kronik orta kulak enfeksiyonlarının patogenezini etkileyebileceğini önermişlerdir (Tumarkin 1959). Ayrıca yarı damaklı hastalarda daha sık görüldüğü aynı çalışmada bildirilmektedir (Kemppainen ve ark 2002). Kolesteatomlu hastaların % 10-17'sinde karşı kulak

tutulumu bildirilmektedir. Eskimolarda önemli derecede daha az görüldüğü bildirilmektedir. Bu etnik grupta nazofarenksin daha geniş olması nedeni ile orta kulak havalanmasının daha iyi olduğu ve kronik orta kulak hastalığı sekellerinden koruduğu belirtilmektedir (Olszewska ve ark 2004).

1.1.3.Kolesteatomun Etiyolojisi ve Oluşum Mekanizmaları

Kolesteatom neoplastik bir lezyon mudur; eğer öyleyse benign yoksa malign midir? Defektif bir yara iyileşme süreci midir? Orta kulakta gelişen bir enfeksiyon mudur? (Albino ve ark 1998). En açık ifadeyle yanlış yerde gelişen deri olan kolesteatomun patolojisi ve genetiği hakkında spekülasyonlar halen sürmektedir (Şekil 1.3.).

Çok katlı yassı epitelin orta kulağa nasıl geldiği ve hiperkeratinize olmaya nasıl başladığı yapılan çok sayıda çalışmaya rağmen halen tartışmalı bir konudur.



Şekil 1.3. Kolesteatomun oluşum mekanizmasıyla ilgili sorular

Neoplazi yeni büyüme, yeni oluşum demektir. Neoplastik hücreler değişime uğramıştır ve normal büyümeyi kontrol eden faktörlerden bağımsız olarak çoğalmaya devam ederler. Tümör ise şişlik kabarıklık oluşturan her türlü lezyona verilen

isimdir. Benign tümör metastaz yapmayan, lokal eksize edilebilen, hayatta kalma süresini etkilemeyen tümördür. Malign tümör ise komşu organlara ve uzak bölgelere yayılarak (metastaz), onları harap eden, hayatta kalma süresini azaltıp ölüme neden olan tümördür. Benign neoplazmlar kaynaklandığı bölgede sınırlı kalırken, malign neoplazmların ilerleyici infiltrasyon, invazyon, harabiyet ve çevre dokulara penetrasyonla büyüdüğü görülür (Robins 2000).

Literatürde kolesteatomun benign ya da malign neoplazma olup olmadığına dair birbirleriyle çelişen tanımlamalar vardır. Huisman ve ark, kolesteatomun dereceli olarak genişleyip temporal kemiğin bitişiğindeki kemiklerin yıkımı gibi komplikasyonlara sebep olan bu kemiğin yıkıcı nonmalign lezyon olabileceğini (Huisman ve ark 2008), buna ilave olarak Hansen ve arkadaşları kolesteatomun orta kulak boşluğunda keratin üreten skuamöz epitelin varlığıyla karakterize agresif olma potansiyelinde nonneoplastik bir lezyon olduğunu belirtmişlerdir (Hansen ve ark 2011). Ancak Desloge ve ark ise kolesteatomun klinik göstergeleri olan invazyon, migrasyon, kontrolsüz çoğalma, değişmiş farklılaşması, agresifliği ve tekrarlanırlığı gibi özelliklerinden dolayı düşük dereceli skuamöz hücreli neoplazma ile ilişkili olabileceğini düşünmektedirler. Ancak bunun tamamen ne reddedilmemekte ne de kabul edilmekte olduğunu da belirtmektedirler (Desloge ve ark 1997). Ayrıca kolesteatomların orta kulakta gelişen benign tümörler olduğu da düşünülmektedir (Rash 2004).

Bununla beraber Hilton ve arkadaşları da kolesteatom keratinositlerinin farklılaşmış fenotiplerini bir neoplazma değil, bir hücre transformasyonu olarak yorumlayarak diğerlerinden farklı bir değerlendirme yapmışlardır (Hilton C ve ark 2010).

Kolesteatom örneklerinde daima bir enflamasyon gözlenmektedir. Bu enflamasyon mikroorganizmalar, mekanik travmalar gibi farklı uyaranlarla meydana gelen immün cevaplar ile meydana gelmektedir. Hasarlı dokuda yapısal ve fonksiyonel hasarın tamirinde enflamatuar bir cevap gereklidir. Erken ya da akut enflamasyon fazında fibroblast ve endotelial hücre proliferasyonu ile karakterize bir proliferatif faz vardır ve sonuçta matriks sentezi ve skar formasyonu meydana gelir. Kolesteatom gibi sürekli enflamatuar stimülasyonun olduğu durumlarda cevap kronikleşebilir ve doku davranışında patolojik değişikliklere neden olabilir.

Kolesteatom patogenezi bakteriyel enfeksiyon ve enflamasyon geçiren migratuar epitelin reaksiyonu olarak düşünülebilir. Çünkü kolesteatom orta kulak kavitesindeki enflamatuar reaksiyonlarla ilişkilidir ve sıklıkla enflamatuar granülasyon dokusu aktif kolesteatomda tutulan epitel boyunca görülebilmektedir. Kolesteatom stromasının aktif T-hücreler ve makrofajlar ile yoğun infiltrasyonu kronik enflamatuar cevabı göstermektedir. Subepitelyal konnektif doku enflamasyonu kolesteatom epitelinin hatalı davranışını artırıyor olabilir. Kolesteatom stromasında fagositik hücrelerin büyük bir kısmı dermal makrofajlara benzemektedirler. Bu hücreler muhtemelen aktif immün süreçleri düzenliyor olabilirler. Mast hücrelerine spesifik bir proteaz olan triptaz ekspresyonunu incelemişler ve kolesteatomda mast hücre yoğunluğunun diğer dokulardan yaklaşık olarak 3 ile 7 kat daha fazla olduğunu bildirmişlerdir (Albino ve ark 1998).

Kolesteatom patogenezindeki teorilerden biri hasarlı yara iyileşme süreci sonucunda oluşabildiğidir. Yara iyileşme sürecindeki olaylar ile kolesteatom arasındaki ilişki de araştırılmıştır. Yara iyileşmesinde 3 faz tanımlanmıştır: enflamatuar, proliferatif ve maturasyon. Kolesteatomun yara iyileşme sürecindeki bozulmaya bağlı olduğu, çünkü maturasyon safhasına geçmediği ve enflamatuar ve proliferatif fazda kaldığı belirtilmektedir. Normal iyileşme prosesinden farkı son işlem olan destek doku sentezinin olmayıp fibroblast hiperproliferasyonu şeklinde sürmesidir (Albino ve ark 1998). Yapılan bir çalışmaya göre kolesteatom epitelinde, sağlıklı deri epiteline kıyasla fazla salgılandığı saptanan TGF β ' dan yola çıkarak kolesteatomun nonmalign olduğunu ve kronik yara iyileşme süreci gibi davrandığını belirtmişlerdir (Huisman ve ark 2008).

Kolesteatom, inflamatuvar düzensizliğe karşı bir reaksiyon olarak orta kulakta gelişen skuamöz hiperproliferasyonel bir durumdur. Bu düzensizlik, dokuyu artmış invazyon ve proliferasyona yönlendiren internal ikinci mesaj sisteminin aktivasyonunun sonucudur. Bu hücresel olaylar orta kulaktaki immün hücreler ve sitokinlerden kaynaklanmaktadır. Bu düzende kronik enfeksiyonun varlığı bu kaskad için bir tetiktir/başlatıcıdır. İnflamasyon ve enfeksiyon arasındaki döngü kolesteatomu proliferasyona itecektir (Diego 2012).

Bir başka hipoteze göre kolesteatom epitelinin anormal büyümesi inflamatuvar bölgesinden salınan litik enzimler, lenfokinler ve sitokinlerle kombine toksin ve bakteriyel antijenler gibi dış faktörlerden kaynaklanmaktadır. Bu durum, kolesteatomun agresifliği ile tekrarlanan bakteriyel süperenfeksiyonlar arasında yakın bir ilişkiyi açıklayabilir (Albino ve ark 1998).

Schuknecht, kolesteatomun epitelyum kesesinin kuru olduğunu ve bundan dolayı keratinin, hastada komplikasyon göstermeden yavaşça birikebileceğini ve bir enfeksiyon olduğunda ise kolesteatomun hızlıca gelişeceğini önermiştir (Schuknecht 1974).

Kolesteatomun oluşum mekanizmaları olarak kısaca 4 mekanizmadan bahsedebiliriz:

1. Deri dokusunun kulak zarındaki bir delikten geçerek orta kulaktaki mukozanın yerini almasıyla kolesteatom oluşur.
2. Uzun süren seröz orta kulak iltihabları sonucu kulak zarının incelerek içeriye doğru kese veya cep gibi uzantı oluşturması ve orta kulağın derinliklerine yapışmasıdır. Bu ceplerde göç hareketi olmadığı zaman keratin birikmeye başlar ve kolesteatom gelişir.
3. Şiddetli darbe sonucu dış kulak yolunun kemik kısmı kırılıp deri tabakası içine sıkışıyorsa yine keratin birikmesiyle kolesteatom oluşur.
4. Doğuştan bir özür ile orta kulakta deri dokusu var ise zamanla keratin çoğalarak dev bir kolesteatom ortaya çıkar.

Kolesteatomun içinde üreyen bakteriler kötü kokulu akıntıya sebep olur. Kolesteatomun sınırındaki canlı yumuşak dokularda tepki olarak granülasyon dokusu adı verilen tamir dokuları meydana gelir. Granülasyon dokularında ortaya çıkan kimyasal maddeler ve biriken keratinin tazyiki kolesteatom kemiklerini eriterek tahrip etme özelliği kazandırır. Kolesteatom zamanla büyüdükçe çevresindeki kemikleri eriterek genişler. En sık olarak örs (incus) kemiğinin uzun kolunu eriterek üzengi (stapes) kemiği ile bağlantısını keser ve işitme kaybına sebep olur.

(<http://www.oocities.org/hotsprings/villa/1707/kolesteatom.htm>)

Kulak kavitesinde gördüğümüz kolesteatomları ikiye ayırabiliriz;

1)Edinilmiş kolesteatomlar (primer, sekonder)

2)Doğumsal kolesteatomlar

Edinilmiş kolesteatom genellikle timpanik membranın retraksiyonu veya perforasyonu sonucu gelişen kolesteatomlardır. Primer edinilmiş kolesteatomlar timpanik membranın dış yüzünü örten derinin orta kulağa girmesiyle oluşur.

Doğumsal kolesteatom orta kulağın embriyolojik gelişmesi sırasında orta kulak, petroz kemik ve mastoidde hapis kalan yassı epitelden gelişen kolesteatomlara doğumsal kolesteatom denir.

Literatürde bildirilen yeni bir vakaya göre bu sınıflamaya 3. bir grup daha ilave edilebilir. Grönland'da 7 çocuklu bir ailede annenin ve 3 erkek çocuğun edinilmiş orta kulak enfeksiyonu sonrası kolesteatom tedavisi gördüğü rapor edilmiştir. Literatüre göre bu vaka, dünyada edinilmiş kolesteatomun ailesel kümelenmesi olarak ilk rapordur. Bu vaka, kolesteatomun patogeneziinde rol oynayan diğer faktörlerle birlikte kalıtsal faktörlerin de etkin olabileceğini göstermiştir (Homøe ve Rosborg 2006).

Kolesteatomun gelişimi ile ilgili pek çok teori (İnvajinasyon teorisi, Epitelyal invazyon teorisi, Bazal hücre hiperplazisi teorisi, Skuamöz metaplazi teorisi) öne sürülmüş ve birçok çalışma yapılmış olmasına rağmen patogenezi halen tartışmalıdır.

Kolesteatomun tanısı için mikroskop altında akıntının temizlenmesi ve varsa retraksiyon poşlarının değerlendirilmesi gerekir. Kesin tanısı otomikroskopi ile kolesteatomun görülmesiyle konulur.

Kolesteatomlu hastaların genelde ortak şikâyetleri şunlardır;

1. Tekrarlayan orta kulak iltihabları
2. Kötü kokulu kulak akıntısı
3. İşitme kaybı şikâyetleri genellikle uzun süreden beri (aylar, yıllar) vardır. Hasta bu duruma öyle alışmıştır ki hemen hemen hiç yakınmaz ve çoğunlukla

yakınlarının baskısıyla hekime başvurur. Bazen dengesizlik ve yüz felci de olabilir. Uzun süren orta kulak iltihablarının yarısından çoğunda kolesteatom vardır.

Kolesteatomun klinik önemi kemik destrüksiyonlar yolu ile neden olduğu kafa içi komplikasyonlardır. Kolesteatomun başlangıcından yıllar sonra ise hastalık çevredeki yaşamsal önemi olan dokulara (beyin zarı, beyincik, beyin sapı, beyin) ulaşırken, hafif dengesizlik gibi ek yakınmalar ortaya çıkmaya başlar ve artık yaşam gerçek anlamda tehdit altındadır. Hastalık doğal seyrine bırakılırsa (çeşitli nedenlerle ameliyat ile tedavi edilmezse) menenjit, beyin absesi, beyin ampiyemi, sinüs tromboflebiti gibi tehlikeli hastalıklara yol açar ve hasta kaybedilebilir.

1.1.4. Kolesteatom Histopatolojisi

Kolesteatom, ektopik bazal germinatif tabakanın sürekli ürettiği deskuame epitel ve keratinin yaptığı kitlesel lezyon olarak tanımlanabilir. Histolojik olarak keratinize skuamöz hücre kistleri vardır. Lezyon temel olarak 3 yapı içerir; kistik yapı, matrix (kapsül ya da kolesteatom epiteli olarak adlandırılır) ve perimatrix (stroma ya da lamina propria). Matrix, kist benzeri yapılar ile döşeli keratinize skuamöz epitelden meydana gelir. Germinatif tabaka kolesteatom matriksi olarak da bilinir. Mitotik aktivitesi yüksek olup derinin yenilenmesini sağlar. Epitelyal hücreler yenilendikçe bu tabakada mitozlar gözlenir ve bu nedenle bu tabaka kolesteatomun üretici tabakası olarak da bilinir. Germinatif tabaka, bazal membran aracılığıyla konnektif doku, korion ile temastadır. Korion tabakası ince retiküler ve elastik lifler ile kemik düzleme yapışmıştır. Kolesteatomun patolojik tanısı için matriks, perimatriks ve kistik yapının birlikte görülmesi gereklidir. Tek başına keratin debris tanısı için yeterli değildir (Ferlito ve ark 1997).

1. Kolesteatom matriksi, bağ dokusu üzerine oturmuş iyi differansiye yassı epitel içermektedir.
2. Matriks epitelinin derin tabakaları, bağ dokusu içine doğru uzanan büyüme aktivitesi göstermektedir.
3. Kolesteatom etrafında her zaman, kemik ile temasta olan bir granülasyon dokusu tabakası yer almaktadır.

Bu granülasyon tabakası, kemik destruksiyonu oluşturan, kollajenaz gibi çok sayıda enzim üretmektedir (Bailey 2001).

Kolesteatom tedavisi cerrahidir. Ameliyatta kolesteatom tamamen çıkartılır ve erittiği kemik dokular yeniden şekillendirilerek işitme iyileştirilmeye çalışılır.

Ağızdan alınan mikrop öldürücü ilaçlar, keratin cansız olduğu için içine işlemez ve bu yüzden etkisizdir. Bazı kulak damlalarından az da olsa yarar sağlanarak daha az mikroplu bir ortamda ameliyat yapılması sağlanabilir. Bu nedenle ameliyat öncesi yoğun bir kulak temizliği ile birlikte mikrop öldürücü kulak damlaları ile tedavi çok yararlı olur.

1.1.5. Kolesteatom Moleküler Biyolojisi

Kolesteatom uzun yıllardan beri bilinip çalışılmasına rağmen moleküler temelli çalışmalar oldukça az ve sistemsizdir. Ayrıca kolesteatomun oluşumunun moleküler temeli net olarak ortaya konmamıştır.

Kolesteatomun klinik özellikleri invazyon, migrasyon, kontrolsüz çoğalma, değişmiş diferansiyasyon, agresiflik şeklinde sayılabilir (Desloge ve ark 1997). Prasier ve ark özellikle kolesteatomun agresif karakterinin sebebi olarak keratinosit, inflamatuvar hücreler ve fibroblast hücre gruplarından biri veya daha fazlasının biyolojisinde temel değişimlerin olabileceğini önermişlerdir. Bunlardan da fibroblastların kültürünü yaparak bunların invazif karakter kazandıklarını ve büyüme kontrolünü kayb ettiklerini belirtmişlerdir (Parisier ve ark 1993).

Yapılan başka bir çalışmada ise kolesteatom epitelinin yüksek oranda EGF (Epidermal Growth Factor) içermekte olduğu ve normal deriye göre daha invazif özellikte olduğunu göstermişlerdir (Yetişer ve ark 2002). Sudhoff ve arkadaşları ise kolesteatom epitelinde yüksek oranda lenfosit ve makrofaj bulunduğunu ve bu immün hücreler tarafından, IL-1 (İnterlökin-1), 4F2 (Hücre Yüzeyi Antijeni), TGF- α (Tumour Growth Factor), EGF ve EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) salındığını ve EGFR'nin kolesteatom epitelinin suprabazal tabakasındaki aşırı

salınımının hiperproliferatif özelliği oluşturduğunu bildirmişlerdir (Sudhoff ve ark 1994).

Kolesteatom formlarında p53 gen ekspresyonu incelenmiş ve kolesteatomda normal deri ya da kulak zarına göre 9-20 kat daha fazla eksprese edildiğini bildirmişlerdir (Albino ve ark 1998). Ancak Motamed ve ark (2002)'na göre ise p53 ekspresyonu kolesteatomda önemli değildir. Ayrıca kolesteatom epitelinde nükleer boyama yöntemi ile c-myc onkogen ekspresyonunun artmış olduğu bildirilmiştir (Holly ve ark 1995). C-jun proteini keratinosit proliferasyonunu artırmakta ve p53 apoptozisi indüklemektedir. Kolesteatomda c-jun protein ve p53 tanımlanmıştır (Shinoda ve ark 1995). C-jun proteini normal deride bazal tabakada lokalizedir ve p53 proteini kolesteatom epitelinde granüler tabakadaki keratinosit nükleusunda mevcuttur. Kolesteatomda bu iki proteinin rol aldığı bildirilmiştir.

Normal deri ile karşılaştırıldığında artmış ölü keratinosit ile orta kulakta keratin debrisleri toplanmaktadır. Epidermisteki keratinosit ölümü apoptozis olayı ile gerçekleşmektedir. Yapılan çalışmalarda normal deriye nazaran kolesteatom epitelinde suprabazal tabakada apoptotik hücre oranı daha fazla bulunmuştur. Deri epidermisine kıyasla kolesteatom epitelinde proliferasyon ve apoptozisin ikisinde birden önemli bir artış gözlenmiştir (Olszewska ve ark 2003). Yüksek apoptotik indeksin nükse yatkınlığı arttırdığını bildirmişlerdir (Choufani ve ark 1999). Bununla birlikte çeşitli sitokinlerin seviyesinin artması ile kolesteatom epidermisinde hiperproliferasyon meydana gelir ve keratin debrisler birikir (Miyazaki ve ark 1999).

Tip II integral proteinleri olarak da bilinen hücre yüzey peptidazları hücre büyümesi ve diferansiyasyonu kontrolünde önemli bir role sahip olabileceği bildirilmiştir. Kolesteatom örneklerinde dört farklı hücre yüzey peptidazının (aminopeptidaz A, aminopeptidaz N, dipeptidyl peptidaz IV ve nötral endopeptidaz) ekspresyonlarındaki değişikliğe bağlı olarak hücre büyüme ve diferansiyasyonu için sinyal iletiminde bozulmaya neden olabileceği bildirilmiştir (Desloge ve ark 1997).

Temporal kemiğin proteolitik erozyonu kolesteatom progresyonunda önemli bir rol oynamaktadır. Bu hastalarda MMP-1 (matrix metalloproteinase-1) ekspresyonunun arttığı, MMP-9 (matrix metalloproteinase-9)'un artmasına rağmen

anlamli olmadigi ve MMP-2 (matrix metalloproteinase-2)'nin ise artmadigini gostermisselerdir (Banerjee ve ark 1998).

Kolesteatomda lipid sentezi ve yıkımı arasındaki denge de bozulmuştur. Kolesteatomda lipopolisakkaritlerin yüksek oranda bulunduğunu ve kemik erozyonunda rol oynadığını bildirmişlerdir (Peek ve ark 2003).

1.2. Genom ve Genetik Değişimler

Genomik DNA (Deoksiribonükleik Asit) 'nın aslında %10'nundan daha az bir kısmı proteine kodlamaktadır. Genomun toplam uzunluğunun dörtte üç kadarı tek kopya DNA'dan oluşmaktadır. Genomun geri kalanı tekrarlayan DNA dizilerinden oluşur. Genomda bulunduğu tahmin edilen 20-25 bin genin çoğu tek kopya DNA şeklinde bulunur. Genomdaki tekrarlayan DNA dizileri ise, kromozom yapısının korunmasına katkı sağlamaktadır. Tekrarlayan DNA dizileri genom içinde bir veya birkaç bölgede kümeleştiği gibi genom boyunca tek kopya diziler arasında da yer alabilmektedir. Kümeleşmiş tekrarlayan diziler, art arda organize olan çeşitli kısa tekrarlardan meydana gelirler. Bu diziler satelit DNA olarak adlandırılırlar. Satelit DNA aileleri, genomdaki yerleşimlerine, art arda gelen tekrar dizilerinin toplam uzunluğuna ve diziyi oluşturan tekrar birimlerinin uzunluğuna göre farklılık göstermektedir.

Minisatellit DNA dizileri, değişken sayıdaki tekrarlayan dizilerdir. Bu dizilere VNTR (Variable Number of Tandem Repeats) de denilmektedir. 9-65 baz çifti uzunluğunda tekrar dizileri içerirler. Genomda 1-20 kilobaz arasında değişen yaklaşık 1000 kadar blok oluştururlar. Polimorfik özelliklerinden dolayı DNA analizlerinde tanı amaçlı (babalık testi, adli tıp, kalıtsal hastalıklarda mutant allelerin tesbiti gibi) kullanılabilirlerdir.

Mikrosatellit DNA dizileri, 2-10 baz çifti tekrar dizilerinden oluşmaktadır. Tüm genoma yayılmış halde 100.000'den fazla mikrosatellit DNA dizisi bulunmaktadır. Bu diziler de minisatellitler gibi polimorfik özelliklere sahip olduklarından minisatellitler gibi aynı amaçlar için kullanılabilirlerdir. Mikrosatellitler, genom içine yayılmış olmalarından dolayı genlerin kromozomal

lokalisasyonlarının saptanması için kullanılan bağlantı (linkage) analiz çalışmalarında belirleyici olarak kullanılmaktadır.

SINE (Short Interspersed Nuclear Elements), insan genomunda en yaygın bulunan tekrar dizileridir. En tipik örneği Alu tekrar dizileridir. 300 baz çiftlik tekrar dizilerinden oluşurlar ve genom içinde en az 500.000 Alu dizisi bulunmaktadır.

LINE (Long Interspersed Nuclear Elements), genomda 100.000 kopyası bulunan 6 kilobaz uzunluğundaki tekrar dizileridir.

(http://www.thd.org.tr/doc/kurs_pdf/molhem_01.pdf).

Genetik yapıdaki tek bir değişlikle ilk hücre topluluklarının kötüden en kötüye doğru ardı ardına geçirdiği mutasyon döngüleriyle gelişen bir süreç ile genetik rahatsızlıklar oluşabilmektedir. Çok hücreli organizmaların hücreleri birlikte yaşamaya/çalışmaya kodlanmıştır. Hücreler nasıl hareket edeceklerini söyleyen, sosyal denetimler olarak hizmet veren ayrıntılı bir sinyaller grubunu birbirlerine gönderir, alır ve yorumlarlar. Sonuç olarak her hücre sosyal sorumluluk çerçevesinde, organizmanın iyiliği için gerekli şekilde bölünerek, farklılaşarak, dinlenerek ya da ölerək uyum gösterir. Bu uyumun düzenini bozan moleküler karışıklıklar çok hücreli bir toplum için sorun oluşturur. Genetik yapıdaki değişiklikler (nükleotid ya da kromozomal seviyedeki delesyon, duplikasyon, inversiyon, translokasyon, insersiyon gibi mutasyonlar) fenotipi direk etkileyeceği gibi bazıları dolaylı olarak etkileyebilir. Sonuçta bu mutasyonların sebep olduğu genetik kararsızlığın (instabilitenin) pek çok hastalığı özellikle kanser oluşumunu tetikleyeceği düşünülmektedir. Çünkü genetik kararsızlık, hücrelerin kendilerini kötü huylu yapmaya sürükleyecek mutasyonlara uğrama olasılığını artırır (Alberts 2008). Neticede genomik kararsızlık genetik hastalıkların yaygın özelliklerinden birisidir.

Genetik kararsızlığın iki tipi olabilir:

1. Kromozomal instabilite: En yaygın tipidir.

a. Tümör hücreleri iğ ipliği kontrol noktalarını kaybederler. Bu durum birçok sayısal anomalinin kaynağıdır.

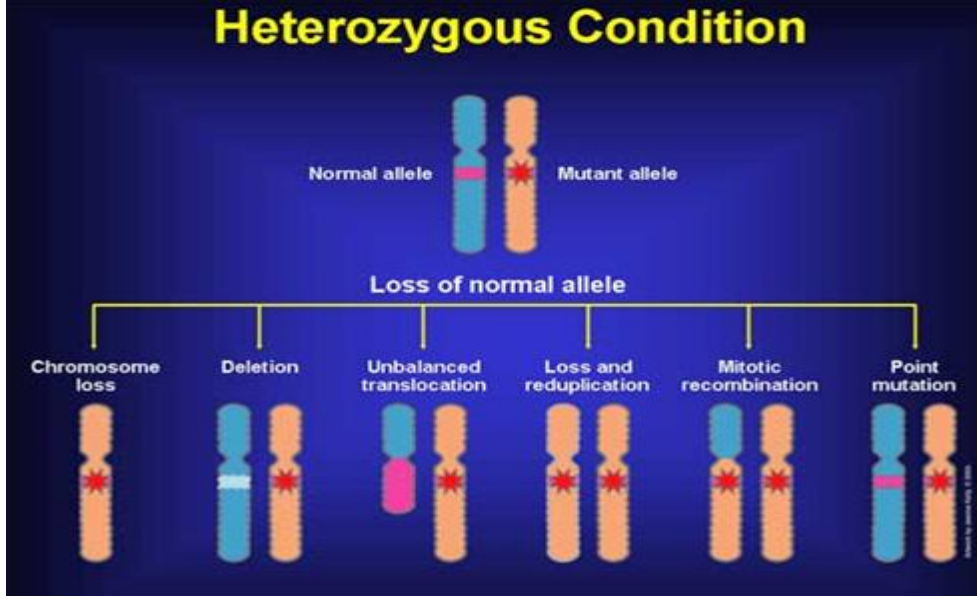
b. Tümör hücreleri, DNA hasarı oluşturmaya karşın hücre siklusuna devam edebilirler. Hasarlı DNA ile yapılan DNA replikasyonu ve mitoz sonucunda yapısal kromozom anomalileri oluşabilir.

c. Tümör hücreleri kromozom uç kısımlarını (telomer) korumak için çok kısa duruma geldikleri noktaya kadar replike olabilirler. Bu durum yapısal anomalilerin hepsine yol açabilir.

2. Mikrosatellit instabilitesi: DNA düzeyindeki instabilite bazı tümörlerde görülür.

1.2.1 Heterozigositenin Kaybı (Loss of heterozygosity, LOH)

Retinoblastoma 1 (RB1) lokusu yakınındaki bölgelerde DNA polimorfizmini araştıran genetikçiler, kalıtsal ve sporadik retinoblastoma hastalarından alınan tümör dokusundaki allellerin incelenmelerinde beklenmedik bir şey yakaladılar. Alyuvar hücreleri gibi normal dokularında heterozigot olan retinoblastomalı kişilerin, iki homolog 13. kromozomun sadece bir tanesinden gelen allellere sahip tümörler vardı; bu da genin 13q bölgesinde heterozigosite kaybını (LOH) gösteriyordu. Ailesel olanlarda, etkilenen ebveynden kalıtılmış olanlar anormal RB1 alleli olanlardı. Böylece heterozigosite kaybı, diğer allelde ikinci vuruşu temsil ediyordu. Heterozigosite kaybı, interstisyel delesyon yoluyla oluşabileceği gibi mitotik rekombinasyon ya da nondisjunction gibi diğer başka mekanizmalarda da meydana gelir (Şekil 1.4). Heterozigot bireylerde diğer normal RB1 allelinin kaybında en sık görülen mutasyonel mekanizma, heterozigozite kaybıdır. Heterozigosite kaybının görülmediği ikinci vuruş genellikle ya ikinci somatik gen mutasyonu ya da daha az görülen, mutasyona uğramamış allelin metilasyon yoluyla inaktivasyonudur. Heterozigosite kaybı, hem herediter hem de sporadik pek çok genetik hastalıkta özellikle tümörlerde görülebilir ve genellikle tümör süpresör genlerin neler oldukları bilinmese de varlığının kanıtı olarak gösterilebilirler (Nussbaum 2005).



Şekil 1.4. Heterozigotluk kaybı oluşum mekanizmaları

Heterozigotluğun kaybı (LOH) genetik temelli hastalıklarda özellikle kanserlerde en sık gözlenen moleküler genetik değişimdir. LOH analizi, tümör süpresör genleri ihtiva eden genomik bölgelerin tanımlanmasında ve tümör tiplerinin, patolojik evrelerinin karakterizasyonunda kullanılmaktadır (Hoque ve ark 2003). LOH, her bir kromozomun koluna spesifik polimorfik genetik belirleyicilerle tümörlerin alleltiplendirmesi ile analiz edilebilir (Vogelstein ve ark 1989). Çoğu araştırmacı, çeşitli kanserlerde aday tümör süpresör genleri tanımlamak için kromozomlara spesifik minimal bölge kayıplarının tanımlanmasına yoğunlaşmaktalar. 1995 yılından beri çok farklı neoplazmaların allel tiplendirilmesinde ortalama 120 mikrosatellit kullanılmıştır ve 2000 yılından önce bu sayı en fazla ortalama 280 mikrosatellite ulaşmıştır (Mao ve ark 1999).

Baş boyun skuamöz hücreli karsinomalarında (BBSHK), pek çok tümör süpresör ve onkogen gen fonksiyonları gösterilmiştir. LOH analiz sonuçları yeni tümör süpresör gen bölgelerine işaret etmektedir (Maestro ve ark 1993). BBSHK, tipik olarak şu değişiklikleri sırasıyla geçirir; normal epitelyum, displazi, karsinoma insitu, sonunda da invazif karsinoma şeklindedir. Bu tümörgenezis sırasında MSI ve LOH'u içeren birikmiş genetik değişimler olur (De Schutter ve ark 2007). Genel olarak pek çok lokustaki LOH zayıf klinik seyirle ilgilidir (Bockmuhl ve ark 1996).

Aksine pek çok çalışma LOH'un negatif prognostik rolü vardır şeklinde tanımlanmıştır (De Schutter ve ark 2007).

Delesyonlar, genel olarak amplikasyonlardan daha yaygındır ve klinik sonuçlar için özellikle önemli görünmektedir (Moc ve ark 1996). İnaktifleşmiş bir genin (tümör süpresör gen) ve aktifliği artmış (onkogen) bir genin belirlenmeleri için farklı yollar izlenir. Delesyon tespitinin temelinde anne ve babaya ait kromozomların birbirinden ayırt edilmesini sağlayan polimorfizm yatar. Mukayese için aynı hastanın sağlam ve tümörlü dokusundan alınan örneklerde DNA analiziyle hastanın bu dokularındaki polimorfizme dayanarak delesyon/insersiyon belirlenebilir. Polimorfizm tespitinde mikrosatellit belirleyiciler kullanılmaktadır.

Genetik temeli bilinmeyen hastalıkların ortaya konması için genom boyu taramalarda LOH analizinin önemli bir rolü vardır. LOH analizi için mikrosatellit belirleyiciler kullanılmaktadır. Mikrosatellitlerin belirli bir tür içerisinde polimorf olmaları ve temelde benzer olmasına rağmen bireyden bireye küçük farklılıklar içermeleri moleküler genetik alanında belirleyici olarak kullanılmalarını uygun hale getirmektedir.

LOH Analizi için çeşitli yöntemler vardır. Bunlar RFLP (Restriksiyon Fragment Length Polimorfizm), Southern Blot, PCR-Poliakrilamid Jel Sistemleri, SNP Array (Single Nükleotid Polimorfizm Dizileme), CGH Array (Comperative Genomik Hibridizasyon) ve Floresans Temelli PCR-Fragment Analiz Sistemleridir. Mevcut çalışma, başlangıç olarak PCR-poliakrilamid yöntemi ile optimize edildi ve daha sonra ise çalışmaya Floresans Temelli PCR-Fragment Analiz Sistemi ile devam edildi.

1.2.2. Mikrosatellitler

Çok hücrelilerde, sıralı tekrar gösteren nükleotid dizilimleri 1968 yılında yapılan çalışmalarla ortaya çıkarılmıştır. Minisatellit ve mikrosatellit olarak ikiye ayrılırlar. Mikrosatellitler ise genellikle 100-200 bp'ye ulaşan kısa yapılara sahiptir. Tekrar motifleri ise ikili, üçlü, dördü veya beşli şekilde olabilir (CA/GT)n veya (AGC/TCG)n gibi). Mikrosatellitler ökaryotik genoma geniş bir şekilde yayılmış ve bol olarak bulunurlar fakat bunun aksine minisatellitler, kromozomların telomerik ve

sentromerik bölgelerinde toplanma eğilimindedirler. Mikrosatellitler çoğu lokusta tekrar bölgesinin sayısında çok farklılıklar göstermesinden ötürü genetiğin birçok alanında moleküler belirleyici olarak önem arz etmektedirler.

Mikrosatellit tekrarların bulunduğu genom bölgelerindeki genetik varyasyonlar genellikle DNA kayması sonucunda meydana gelir. Mikrosatellit lokuslardaki mutasyonlar, DNA replikasyonu sırasında tekrarın bulunduğu kısımda yanlış eşleşme veya bir tekrarın atlanması sonucunda meydana geldiği düşünülmektedir. Diğer bir deyişle replikasyon sırasında DNA'nın iki iplikçisindeki tekrar kısmı beklenmedik bir eşleme yapabilir ve daha sonra bunun tamiri mikrosatellit lokusun uzaması veya kısalması ile sonuçlanır. En yaygın değişim yalnızca tek bir tekrar ünitesinin kaybı veya fazladan oluşması ile olur. Populasyon içerisindeki varyasyonun belirlenmesinde en önemli unsur mutasyon oranıdır. Tekrar bölgelerinin her iki tarafında bulunan bölgeler 'flanking' bölgesi olarak isimlendirilir ve buralarda meydana gelecek mutasyonlar çok önemlidir çünkü bu bölgeler primerlerin bağlanma noktalarıdır.

Mikrosatellitler ayrıca kriminolojik çalışmalarda, fertlerin akrabalık seviyelerinin ve ana ve babalarının belirlenmesinde, genomdaki genlerin haritalarının çıkarılmasında, populasyonun genetik parametrelerinin (gen akışı ve etkili populasyon büyüklüğü gibi) tahmini ve populasyon farklılıklarının belirlenmesi gibi çalışmalarda yoğun bir şekilde kullanılmaktadır. Bunun nedeni mikrosatellitlerin genomda yoğun bir şekilde dağılmış olmaları ve işlemlerinin kolay ve otomatik bir şekilde yapılıyor olmasıdır.

1.3. Kolesteatomun Genetiği

1.3.1. Kolesteatomun Sitogenetiği

Kolesteatom sitogenetiği ile ilgili sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Yapılan bir çalışmada Lavezzi, 44 kolesteatom vakasının 23 'ünde trizomi 7 tespit etmiş ve bu ekstra 7 kromozomunu artmış proliferatif aktivite ile ilişkili olabileceğini ve bundan dolayı da trizomi 7'nin prognostik marker ve kolesteatomun agresif davranışının indikatörü olabileceğini bildirmiştir (Lavezzi ve ark 1998). Kolesteatom

örneklerinde 3,7,8,17 numaralı kromozomlardaki copy number varyasyonları incelenerek proliferasyon ve kromozom copy number değişiklikleri arasında ilişki olup olmadığı araştırılmıştır. 7,8 ve 17 anozomilerinin hücre proliferasyon aktivitesi ve invazyonla ilişkili olabileceği belirtilmiştir (Ecsedi ve ark 2008). 10 kolesteatom ve 6 postaurikuler deri örneğinde flow sitometri ile DNA içeriklerini karşılaştırmışlardır. Bir kolesteatom örneğinde anormal anoploid DNA bulunmuş, oysaki diğerlerinde normal öploid DNA bulunmuştur. Kolesteatomun low-grade bir neoplazm olarak düşünölemeyeceği sonucuna varmışlardır (Desloge ve ark 1997).

1.3.2. Kolesteatomun Moleküler Genetiği

Kolestetaom patogeneziyle ilişkili aday genleri belirlemek için 5 kolesteatomlu ve 5 sağlıklı dış kulak derisinde mikroarray analizi yapılmış; 1327 genin fazla, 767 genin ise az eksprese edildiğini belirtmişlerdir (Kwon ve ark 2006). Diğer bir çalışmada mikroarray analizinde fazla eksprese bulunan 12 genin kolesteatom patogenezinin çeşitli mekanizmalarında rol oynayabileceğini belirtmişlerdir. Bunlar hücre proliferasyonu ve diferansiyasyonunda görevli calgranulin A, calgranulin B, psoriasin, thymosin beta-10 ile hücre invazyonunda görevli cathepsin C, cathepsin D, cathepsin H 'dir (Tokuriki ve ark 2003). Başka bir çalışmada ise kolesteatom hastalarında miR-21 ve let-7a mikroRNA'sının rolü araştırılmıştır. Normal deriye kıyasla özellikle çocuk hastalarda bu mikro RNA'ların seviyesi yüksek bulunmuş ve kolesteatomun proliferasyon ve invazyonuna sebep olacağı düşünülmüştür (Chen 2011). Kolesteatomun yolak mekanizmasının araştırıldığı 2009'daki çalışmada ise PTEN ve p-Akt arasında bir ilişki bulunmuş ve bu yolağın kolesteatomda etkili olabileceği düşünülmüştür (Yune 2009).

Bu tez çalışmasında genetik temeli bilinmeyen kolesteatomun genomik instabilitenin göstergesi olan LOH analizi için 7 STR (Short Tandem Repeat) belirteciyle genomdaki farklı bölgeler incelenmiştir. Çalışmada kullanılan belirleyiciler, kolesteatom epitelyal kökenli bir hastalık olduğu için epitelyal kökenli kanserlerde LOH oranı yüksek çıkmış çalışmalar referans alınarak seçilmiştir. Kolesteatomda LOH analizi ilk defa bu çalışmayla yapılmış olup hastalığın patogenezinin tanımlanmasına ve moleküler mekanizmasının aydınlatılmasına katkıda bulunacağı düşünülmüştür.

2. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma, Selçuk Üniversitesi Selçuklu Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalında gerçekleştirilmiştir. Çalışma için Selçuklu Tıp Fakültesi Etik Kurulundan onay alınmış (26.04.2011 tarihli, 2011/025 nolu etik kurul kararı) (Bkz. EK-A) ve çalışmaya dahil edilen olgulardan ve kontrollerden onamları (Bkz. EK-B) alınmıştır.

2.1. Doku Örneklerinin Temini

Bu çalışmada, Selçuk Üniversitesi Selçuklu Tıp Fakültesi Kulak Burun Boğaz Kliniği'nde kolesteatom tanısı konmuş hastaların dokuları kullanılmıştır. Hastaların cerrahi müdahale ile alınan normal ve kolesteatomlu doku örnekleri transport medyumunda ve normal dokusu yetersiz gelen hastaların ise periferik kan örnekleri EDTA'lı tüpte steril şartlarda laboratuara ulaştırılmıştır. Dokular DNA eldesine kadar geçen süre içerisinde -80 °C'de derin dondurucuda saklandı.

Bu çalışma, yaş ortalaması 36,2 olan 14'ü erkek, 25'i kadın toplam 39 hasta birey içermektedir. Hastaların klinik ve demografik özellikleri Tablo 1'de verilmiştir. Hastaların 6'sı çocuk, 11'i genç, 17'si orta yaşlı, 1'i ise yaşlıdır. Hastalığı nüks eden hasta sayısı 9; karşı kulak tutulumu olan hasta sayısı ise 3'tür. Hastaların tamamında orta kulak enfeksiyonu görülmektedir.

Çizelge 2.1. Doku örneklerinin elde edildiği bireylere ait yaş, cinsiyet, defekt bölgesi, sınıflandırılması, kulak tutulumu ve nüks durumunu belirten tablo.

Olgu No	Cinsiyet	Yaş	Yerleşim Yeri	Defekt Bölgesi	Sınıflandırması	Kulak Tutulumu	Nüks
O-5	E	5	Attik-Timpanik-Mastoid	Yok	Edinsel sekonder	Bilateral	Var
O-6	K	36	Attik-Timpanik-Mastoid	Fasiyal kanalda defekt	Edinsel sekonder	Unilateral	Yok
O-9	K	58	Attik-Timpanik-Mastoid	Fasiyal kanalda defekt- Lateral semisirküler kanal defekti	Edinsel sekonder	Unilateral	Yok
O-11	E	49	Attik-Timpanik-Mastoid	Fasiyal kanalda defekt- Lateral semisirküler kanal defekti- Tegmende defekt	Konjenital	Unilateral	Yok
O-12	E	17	Attik-Timpanik-Mastoid	Lateral semisirküler kanal defekti	Edinsel sekonder	Unilateral	Yok
O-13	K	48	Attik	Yok	Edinsel primer	Unilateral	Yok
O-14	E	28	Attik-Timpanik-Mastoid	Yok	Edinsel sekonder	Unilateral	Yok
O-15	K	9	Attik-Timpanik-Mastoid	Yok	Edinsel sekonder	Unilateral	Yok
O-16	E	27	Attik-Timpanik-Mastoid	Yok	Edinsel sekonder	Unilateral	Yok
O-18	K	27	Attik-Timpanik-Mastoid	Fasiyal kanalda defekt	Edinsel sekonder	Unilateral	Yok
O-19	K	53	Attik-Timpanik-Mastoid	Yok	Edinsel sekonder	Unilateral	Yok
O-20	K	26	Attik-Timpanik-Mastoid	Fasiyal kanalda defekt- Tegmende defek	---	Unilateral	Yok
O-21	K	32	Attik-Mastoid	Yok	Edinsel primer	Bilateral	Yok
O-22	K	32	Mastoid-Timpanik	Yok	Edinsel sekonder	Unilateral	Yok
O-23	E	47	Attik-Timpanik-Mastoid	Fasiyal kanalda defekt	Edinsel sekonder	Unilateral	Var
O-24	E	77	Attik-Timpanik-Mastoid	Fasiyal kanalda defekt	Edinsel sekonder	Unilateral	Yok
O-25	E	---	Attik-Timpanik-Mastoid	Yok	Edinsel sekonder	Unilateral	Var
O-26	K	52	Attik-Timpanik-Mastoid	Fasiyal kanalda defekt	Edinsel sekonder	Unilateral	Yok
O-27	E	49	Attik-Timpanik-Mastoid	Tegmende defekt- İntrakranial komplikasyon	---	Unilateral	Yok
O-28	K	48	Attik-Timpanik-Mastoid	Yok	Edinsel sekonder	Bilateral	Yok
O-30	K	---	Attik-Timpanik-Mastoid	Yok	Edinsel sekonder	Unilateral	Yok
O-31	K	59	Attik-Timpanik-Mastoid	Fasiyal kanalda defekt	Edinsel sekonder	Unilateral	Yok
O-33	K	19	Attik-Timpanik-Mastoid	Yok	Edinsel sekonder	Unilateral	Yok
O-34	K	---	---	---	---	---	---
O-36	E	---	---	---	---	---	---
O-37	K	50	Attik-Timpanik	Yok	Edinsel primer	Bilateral	Var
O-38	E	52	Attik-Timpanik-Mastoid	Yok	Edinsel sekonder	Unilateral	Yok
O-39	K	56	Attik-Timpanik-Mastoid	Fasiyal kanalda defekt	Edinsel sekonder	Unilateral	Yok
O-40	K	22	Attik-Timpanik-Mastoid	Yok	Edinsel primer	Unilateral	Var
O-41	E	37	Attik-Timpanik-Mastoid	Fasiyal kanalda defekt	---	Unilateral	Var
O-42	K	6	Attik-Timpanik-Mastoid	Yok	Konjenital	Unilateral	Yok
O-43	K	15	Attik-Timpanik-Mastoid	Fasiyal kanalda defekt- Lateral semisirküler kanal defekti	Edinsel sekonder	Unilateral	Var
O-44	K	43	Attik-Timpanik-Mastoid	Yok	---	---	---
O-45	E	19	Attik-Timpanik-Mastoid	Yok	Edinsel sekonder	Unilateral	Yok

Çizelge 2.1 (Devamı) Doku örneklerinin elde edildiği bireylere ait yaş, cinsiyet, defekt bölgesi, sınıflandırılması, kulak tutulumu ve nüks durumunu belirten tablo

0-46	K	15	Attik-Timpanik-Mastoid	Yok	Edinsel sekonder	Unilateral	Yok
0-47	K	39	Attik-Mastoid	Yok	Edinsel sekonder	Unilateral	Yok
0-48	K	50	Attik-Timpanik-Mastoid	Fasiyal kanalda defekt- Tegmende defekt	Edinsel sekonder	Unilateral	Var
0-49	E	33	Attik-Timpanik-Mastoid	Yok	Edinsel sekonder	Unilateral	Yok
0-50	K	----	Attik-Timpanik-Mastoid	Yok	Edinsel primer	Unilateral	Yok

---- Bilgiye ulaşamadı.

2.2. Kolesteatom ve Cilt Dokusundan DNA Eldesi

Kolesteatomlu ve normal dokularda LOH analizi için DNA izolasyonu yapıldı. Derin dondurucuda (-80 °C'de) saklanan taze doku örneklerinden Vivantis GF-1 Tissue DNA Extraction Kit (Kat. No. GF-TD-050) kullanılarak DNA eldesi aşağıdaki şekilde sağlandı.

Dokudan DNA izolasyonu için aşağıda belirtilen protokol uygulanmıştır.

- Bistüri ile parçalanmış 10-20 mg kadar doku örneği otoklavlanmış 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne alındı.
- Üzerine 250 µl doku parçalama tamponu (Tissue Lysis Buffer) ve 20 µl Proteinaz K eklendi. Vorteks yardımıyla karıştırılarak 12µl Lysis Enhancer eklendi.
- 1-3 saat 65°C'de doku tümüyle parçalanana kadar inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyondan alınan örneklere 2 katı hacimde bağlama çözeltisi (Binding Buffer) eklendi.
- 10 dakika 65°C'de inkübe edildi.
- Üzerlerine 200 µl etanol ilave edildi ve iyice karıştırıldı.
- Bu aşamadan sonra filtreli tüpler toplama tüplerine yerleştirildi ve sıvı haldeki doku örneği filtreli tüpe aktarıldı.
- 1 dakika 5000 g devirde santrifüj edildi.
- Toplama tüpündeki sıvı boşaltılarak 750 µl yıkama tamponu (Wash Buffer) konuldu.
- 1 dakika 5000 g devirde santrifüj edildi.
- Bu işlem iki kez yapıldı.
- Yıkama tamponunun tamamen uzaklaşmasını sağlamak için tüpler 10 saniye en yüksek hızda santrifüj edildi.
- Filtreli tüpler daha sonra 1,5 ml'lik temiz tüplere konuldu.
- DNA'yı filtreden geçirmek için 200 µl önceden 70 °C'ye ısıtılmış çözücü tampon (Elution Buffer) filtreli tüplere eklendi.
- Oda ısısında 2 dakika tutulduktan sonra 1 dakika 5000 g devirde santrifüj edildi.
- 1.5 ml'lik tüplerdeki izole edilen DNA, 4°C veya -20°C'ye kaldırılmıştır.
- Elde edilen DNA'lar saklanmak üzere -20°C'lik derin dondurucuya kaldırıldı.

2.3. Kan Dokusundan DNA Eldesi

Hastaların kanından, tümörlü dokuya kıyas olarak normal doku için DNA izole edildi. Hastaların kan doku örnekleri Vivantis blood DNA Extraction Kit (Kat. No: GS-BD-100) kullanılarak DNA eldesi aşağıdaki şekilde sağlandı.

Kandan DNA izolasyonu için aşağıda belirtilen protokol uygulanmıştır.

- 200 µl Binding Buffer (bağlama çözeltisi) + 200 µl kan + 20 µl proteinaz K karıştırılarak vortekslendi.
- 65°C'de 10 dk inkübe edildi.
- Üzerine 200 µl % 100 etanol eklenip 10 sn vortekslenerek spin kolona yüklendi.
- 500 µl yıkama tamponu (wash buffer 1) eklendi ve 5000 g'de 1 dk spin sonrası süpernatant atıldı.
- Üzerine 500 µl yıkama tamponu (wash buffer 2) eklendi ve 5000 g'de 1 dk spin sonrası süpernatant atıldı.
- Üzerine 500 µl yıkama tamponu (wash buffer 2) eklendi ve 14000 g'de 3 dk spin sonrası süpernatant atıldı.
- Üzerine önceden ısıtılmış (65°C'de) 100 µl çözücü tampon (Elution Buffer) eklenerek 5000 g'de 1 dk spin sonrası DNA izole edilmiş olur.

2.4. Kolesteatom ve Cilt Primer Hücre Kültürleri

Çalışma kapsamında LOH analizi için yeterli miktarda DNA olmalıdır. Bazı hastaların hem kolesteatom hem de cilt dokuları DNA analizi için yeterli olmadığından bunların LOH analizinde zorluk çıkma ihtimalinden dolayı her hastanın aynı zamanda primer hücre kültürleri yapılmıştır.

Primer hücre kültür eldesi için öncelikle aşağıdaki protokol uygulanmıştır:

- Hastalardan ameliyat esnasında alınan doku örnekleri daha önceden içine 5ml; %96 RPMI (Hyclone Kat. No. SH30027.01) ve %4 penisilin streptomisin solusyonu (Gibco Kat No.11120-037) içeren büyüme besiyerinde 15 ml'lik tüpler içine konularak laboratuara ulaştırıldı.
- Laboratuara gelen doku örneği PBS solusyonuyla yıkandıktan sonra bistiüriyle kıyılarak küçük parçalara ayrıldı.

- Kıyılmış dokular daha önceden hazırlanmış kollajenaz enzimlerinin olduğu solüsyonla yaklaşık 3ml ile pipetaj yapılarak muamele edildi.

Kollajenaz Solüsyonunun Hazırlanışı: 10'ar ml DMEM/F12 (Gibco Kat. No: 11320-074) besiyeri içine 100'er mg kollajenaz tip II (Stemcell Technologies Kat. No. 17101-015) ve IV (Stemcell Technologies Kat. No: 07909) koyuldu. Her bir kollajenaz tipinden 1'er ml alınıp 10ml'ye tamamlanarak dokunun büyüklüğüne göre uygun hacimde kullanıldı. Hazırlanan solüsyon belirli hacimlere bölünerek - 20 °C'de saklandı.

- 37°C'de 1 saat su banyosunda inkübasyon yapıldı.
- Buzdolabında 4°C'de bir gece bekletildi.
- Ertesi gün 37°C'de 2 saat tutuldu. Ara ara hücelere pipetaj yapıldı.
- Enzimi inaktif hale getirmek için %2'lik FBS'li (Fetal Bovin Serum-Biological Industries Kat. No. 04-007-1B) PBS ile muamele edildi.
- 1200 g 5 dk santrifüj edildi.
- Üst kısım atılarak üzerine FBS'siz PBS koyuldu.
- 1200 g 5 dk santrifüj edildi.
- Üst kısım atılarak % 0.25 Trypsin (Biological Industries Kat. No.03-053-1B) ile pipetaj yapılarak muamele edildi.
- %2' lik FBS'li PBS ile muamele edildi
- 1200 g 5 dk santrifüj edildi.
- Üst kısım atılarak alttaki hücreler 1 ml besiyeri (%1 PSA, % 10 FBS, %89 RPMI) içinde homojen hale getirilerek bunun 1/5'i dondurma besiyerinde (%10 DMSO, %90 FBS) - 80°C'de saklandı.
- Geri kalanı ise hücre kültür flaskına aktarıldı ve %5 CO₂'li hücre kültürü için uygun etüve bırakıldı.
- İlk besiyeri hücrelerin flask yüzeyine tutunmasına bağlı olarak 7-15 gün sonra değiştirildi.

Ayrıca kollajenazsız protokol de uygulanmıştır. Gelen doku örneği bistiiriyle kıyılarak hücre flasklarına medyumuyla beraber koyularak etüve bırakılmıştır.

Bu protokolda hem RPMI hem de KSF besiyerleri kullanılarak hücre kültürü yapılmıştır.

2.5. Kullanılan STR Belirleyiciler (Mikrosatellit DNA Belirleyicileri)

Bu çalışmada kullanılan STR belirleyicileri D6S273, D6S473, D8S261, D9S157, D9S162, D15S126, D15S153 'tür. Bu belirleyicilerin dizisi, genomdaki lokalizasyonu, ürün büyüklüğü Tablo 2'de gösterilmektedir. Bu belirleyiciler, yapılan çalışmalarda epitelyal kökenli kanserlerde yüksek LOH oranı bulunan STR belirleyicilerinden seçilmiştir.

Çizelge 2.2. LOH analizinde kullanılan STR belirleyicilerinin dizisi, genomdaki lokalizasyonu ve ürün büyüklüğü gösterilmektedir.

STR *	Dizin (5'-3') **	Lokalizasyonu	Ürün büyüklüğü (bp)
D6S273	CCCAGTTTAAGGAGTTTGGC TAGGGCAGTCAGCCTTGTG	6p-6qterm	120-140
D6S473	AGCAAGGCAAGCCACAT TGGGGATGCCAGATAACTATAT	6p21.3	166-196
D8S261	AGTACCTGAAAGGGTGGG GATCAGTGTAGGCTC	8p23-p21	124-144
D9S157	AGAACTTGGTATTTCTGCC GCCACCTTGAGGAGTTTT	9p23-p11	133-149
D9S162	AGCTGAATAACACGCAGGTG ATTTTGTGATGACAATGGAATGC	9p22	172-196
D15S126	GTAAGCCAAGATGGCACTAC GCCAGCAATAATGGGAAGTT	15q21	188-218
D15S153	TGCCACTGTCTTGAAAATCC TATGGCCCAGCAATGTGTAT	15q22.3	198-208

* Primerler, forward 5' ucu FAM floresans molekülü ile işaretlenmiştir

** Primerlerin dizisi <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/> internet adresinden alınmıştır.

2.6. PCR Reaksiyonunun Hazırlanması ve PCR Şartlarının STR Belirleyicilere Göre Optimizasyonu

PCR tepkimesinde kullanılan STR belirleyicilerinin en verimli çalışabilecekleri bağlanma sıcaklıkları ve MgCl₂ konsantrasyonları tespit edilmiştir.

Çizelge 2.3. LOH Analizi için kullanılan STR belirleyicilerin klasik PCR için optimize edilmiş MgCl₂ konsantrasyonları ve programı

STR	MgCl ₂	PCR PROGRAMI
D6S273	1.0	94 °C / 94 °C 57 °C 72 °C / 94 °C 55 °C 72 °C / 72 °C
D6S473		5dk / 20sn 30sn 20sn / 20sn 30sn 20sn 7dk 10 döngü 25 döngü
D8S261	0.75	94 °C / 94 °C 54 °C 72 °C / 94 °C 52 °C 72 °C / 72 °C 5dk / 20sn 30sn 20sn / 20sn 30sn 20sn 7dk 10 döngü 25 döngü
D9S157	2.0	94 °C / 94 °C 62 °C 72 °C / 94 °C 60 °C 72 °C / 72 °C 5dk / 20sn 30sn 20sn / 20sn 30sn 20sn 7dk 10 döngü 25 döngü
D9S162	2.0	94 °C / 94 °C 64 °C 72 °C / 94 °C 62 °C 72 °C / 72 °C 5dk / 20sn 30sn 20sn / 20sn 30sn 20sn 7dk 10 döngü 25 döngü
D15S126	0.75	94 °C / 94 °C 62 °C 72 °C / 94 °C 59 °C 72 °C / 72 °C 5dk / 20sn 30sn 20sn / 20sn 30sn 20sn 7dk 10 döngü 25 döngü
D15S153	1.5	94 °C / 94 °C 62 °C 72 °C / 94 °C 60 °C 72 °C / 72 °C 5dk / 20sn 30sn 20sn / 20sn 30sn 20sn 7dk 10 döngü 25 döngü

Kullanılan PCR cihazı: Applied Biosystems GeneAmp 2700 model

Klasik PCR Karışımı Hazırlanması:

Solusyon	Miktar (µl)
10X PCR Tamponu (Vivantis buffer A)	3,20
50 mM MgCl (Vivantis)	1,50
dNTP (10 nM) (A,T,G,C her birinden)	0,24
Primer (F+R) (10 pmol)	0,60
At Max Taq Polimeraz Enzimi (Vivantis)	0,40
Distile su	20,46
Kalıp DNA	4,00
TOPLAM	30,40

2.7. Jel Elektroforezi

Elde edilen PCR ürünlerini değerlendirmek amacıyla %2'lik agaroz (A 5093, Sigma) jele yüklendi.

Jel elektroforezi için yapılan işlemler şunlardır:

- Agaroz jel için 50xTAE (Tris, Asetik asit, EDTA) stok tamponu hazırlandı.
- 50xTAE tamponu; 241 gr Tris; 57,1 Asetik asit; 18,612 gr EDTA 100 ml dH₂O içerisinde çözerek hazırlandı.
- Hazırlanan 50xTAE stok tamponu 1/50 oranında sulandırılarak 1xTAE tamponu haline getirildi.
- Elde edilen PCR ürünlerini değerlendirmek için %1,5' lik agaroz jel için 100 ml 1X TAE (Tris/ Asetik Asit / EDTA) tamponunun içine 1,5 gr agaroz (Vivantis Kat. No. PC0701-100g) konuldu.
- Agaroz TBE solüsyonu ile mikrodalgada eritildi ve 50-60°C'ye kadar soğutulduktan sonra etidyum bromid ilave edildi.
- Jel tankına uygun taraklar yerleştirildikten sonra karışım, jel tablasına dökülerek soğumaya bırakıldı. Elde edilen PCR ürünlerinden 5 µl alınarak yükleme boyası (6x loading dye) ile karıştırılarak kuyucuklara yüklendi ve 45 dk 100 voltluk elektrik akımında yürütüldü.
- Bant uzunluklarını belirlemek amacıyla 100 bp' lik DNA markırı kullanıldı.
- Yürütmeden sonra jel U.V. translüminatörde görüntülendi.

Her bir STR belirleyicisi, farklı bant büyüklüğünde görüntülenmiştir. Bu optimize edilen PCR reaksiyonu ve programına göre her bir hastanın normal ve kolesteatomlu DNA'larından PCR kurulmuş ve agaroz jel elektroforezinde uygun

yerde bantlar görülen örnekler LOH analizinde kullanılmış, bant görülemeyenler ise LOH analizine alınmamıştır. Elde edilen PCR ürünlerinin LOH analizine geçmeden önce DNA konsantrasyonları nanodropta (Thermo Scientific Nanodrop 2000c) ölçüldü. Bunun için 1,5 µl PCR ürünü alıp nanodropta ölçüldü. Her bir hastaya ait normal ve kolesteatom dokusundan elde edilen PCR ürünleri belirli oranlarda sulandırılarak kapiller elektroforezinde fragment analizi yapılarak LOH analizi gerçekleştirildi.

2.8. LOH Analizi

Hastaların normal ve kolesteatom dokusuna ait, bir zincirinin 5' ucu FAM işaretli, agaroz jelde uygun yerde bant görülen PCR ürünlerinin fragment analizi ABI 310 cihazında gerçekleştirildi. Bunun için her bir hastanın normal ve kolesteatomlu PCR ürünleri için aşağıdaki karışım hazırlandı.

Kapiller Elektroforezi için hazırlanan reaksiyon:

Solusyon	Miktar (µl)
Formamid	25,0
Size Standart (Gene scan 500 Rox™)*	0,3
PCR ürünü**	0,5

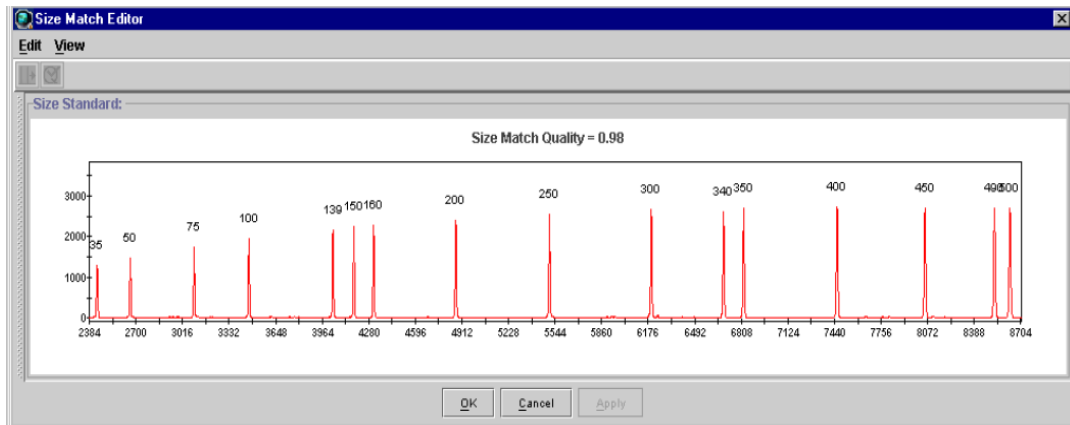
* GeneScan® 500 ROX : 35 bp ile 500 bp arasında standartlar girilmiştir.

** Her bir PCR ürünü belli oranlarda sulandırılarak 0.5 µl alınmıştır.

Kapiller Elektroforez için aşağıda belirtilen protokol uygulanmıştır:

- Reaksiyon hazırlandı.
- 94 °C 'de 2 dk denatüre edildi.
- Buzun üzerinde 2 dk tutulur ve cihaza yüklenir.
- Cihazın bilgisayara yüklü 310 Data Collection programından örnekler kaydedildi.
- 47cm kapillerini ve mikrosatellit lokusu analizi için kullanılan POP-4 polimerini (POP™ Performance Optimized Polymer, %4) cihaza yerleştirip her bir hasta PCR ürünü karışımı cihaza yüklendi.

- Her örneğin fragment analizi işlemi bittikten sonra sonuçlar GeneMapper (ABI) ile kontrol edildi. Öncelikle her iki örneğin de iç DNA büyüklük standartları kontrol edildi ve gerekli bilgiler cihaza girildi (Şekil 2.1). Daha sonra her bir hastaya ait kontrol ve kolesteatom örnekleri standartlarla karşılaştırıldı.
- Bilgisayara yüklü GeneMapper IVV3.2 programında analiz metod kısmında Microsatellit Default, size standart kısmında ise CE-GS-HD-GS500 seçilerek örneklerin analizi yapıldı (Şekil 2.2).



Şekil 2.1. Size Standart

Samples	Status	Sample Name	Sample Type	Specimen Cate	Analysis Method	Panel	Size Standard	Matrix	Run Name	SGO	SFNF	SQ
1		21k3	Sample	no export	Microsatellit Default	None	CE_G5_HID_GS500	MTX_D_4.mtx	Run Folder-5	■	■	■
2		21n3	Sample	no export	Microsatellit Default	None	CE_G5_HID_GS500	MTX_D_4.mtx	Run Folder-5	■	■	■
3		5k3	Sample	no export	Microsatellit Default	None	CE_G5_HID_GS500	MTX_D_4.mtx	Run Folder-5	■	■	■
4		5n3	Sample	no export	Microsatellit Default	None	CE_G5_HID_GS500	MTX_D_4.mtx	Run Folder-5	■	■	■
5		14k4	Sample	no export	Microsatellit Default	None	CE_G5_HID_GS500	MTX_D_4.mtx	Run Folder-5	■	■	■
6		14N4	Sample	no export	Microsatellit Default	None	CE_G5_HID_GS500	MTX_D_4.mtx	Run Folder-5	■	■	■
7		24K5	Sample	no export	Microsatellit Default	None	CE_G5_HID_GS500	MTX_D_4.mtx	Run Folder-5	■	■	■
8		24N5	Sample	no export	Microsatellit Default	None	CE_G5_HID_GS500	MTX_D_4.mtx	Run Folder-5	■	■	■
9		22K1	Sample	no export	Microsatellit Default	None	CE_G5_HID_GS500	MTX_D_4.mtx	Run Folder-5	■	■	■
10		22N1	Sample	no export	Microsatellit Default	None	CE_G5_HID_GS500	MTX_D_4.mtx	Run Folder-5	■	■	■
11		16k6	Sample	no export	Microsatellit Default	None	CE_G5_HID_GS500	MTX_D_4.mtx	Run Folder-6	■	■	■
12		16n6	Sample	no export	Microsatellit Default	None	CE_G5_HID_GS500	MTX_D_4.mtx	Run Folder-6	■	■	■
13		16k8	Sample	no export	Microsatellit Default	None	CE_G5_HID_GS500	MTX_D_4.mtx	Run Folder-7	■	■	■
14		16N8	Sample	no export	Microsatellit Default	None	CE_G5_HID_GS500	MTX_D_4.mtx	Run Folder-7	■	■	■
15		18K	Sample	no export	Microsatellit Default	None	CE_G5_HID_GS500	MTX_D_4.mtx	Run Folder-5	■	■	■
16		18N	Sample	no export	Microsatellit Default	None	CE_G5_HID_GS500	MTX_D_4.mtx	Run Folder-5	■	■	■
17		25K	Sample	no export	Microsatellit Default	None	CE_G5_HID_GS500	MTX_D_4.mtx	Run Folder-5	■	■	■
18		25N	Sample	no export	Microsatellit Default	None	CE_G5_HID_GS500	MTX_D_4.mtx	Run Folder-5	■	■	■
19		9K1	Sample	no export	Microsatellit Default	None	CE_G5_HID_GS500	MTX_D_4.mtx	Run Folder-4	■	■	■
20		9N1	Sample	no export	Microsatellit Default	None	CE_G5_HID_GS500	MTX_D_4.mtx	Run Folder-4	■	■	■
21		16k3	Sample	no export	Microsatellit Default	None	CE_G5_HID_GS500	MTX_D_4.mtx	Run Folder-5	■	■	■
22		16n3	Sample	no export	Microsatellit Default	None	CE_G5_HID_GS500	MTX_D_4.mtx	Run Folder-5	■	■	■

Şekil 2.2. GeneMapper Programında kaydedilmiş örnekler.

3. BULGULAR

3.1. Hasta Bulguları

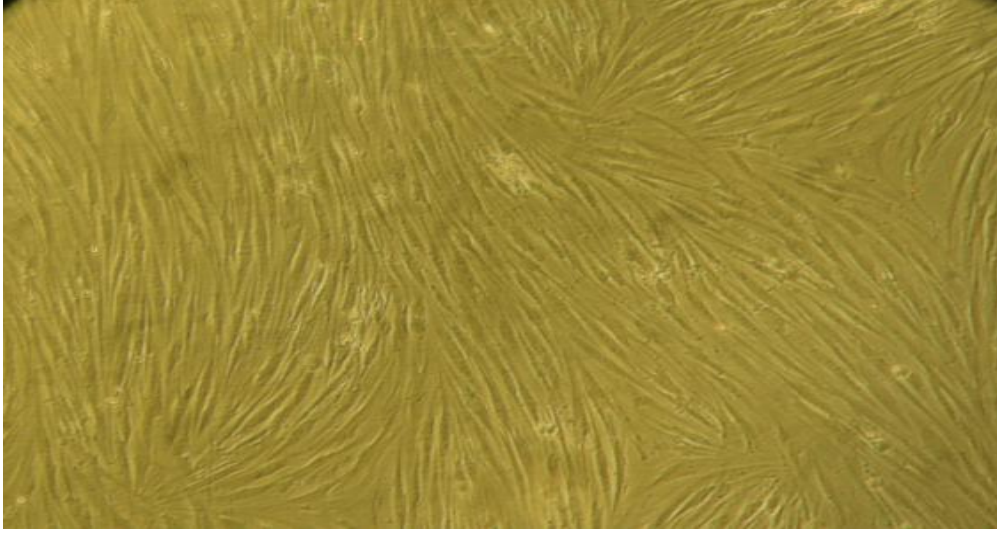
Çalışmamıza dahil edilen hastaların yaş aralığı 5-77, yaş ortalaması ise 36,2'dir. Toplamda olgu grubu 39 hastadan oluşmaktadır ve hastaların kolesteatomlu ve normal dokularıyla beraber periferik kan dokusu kullanılmıştır. Hastalara ait veriler Tablo 3.1'de özetlenmiştir.

Tablo 3.1. Olgu grubundaki hastalara ait veriler.

	Kolesteatomlu Hastalar
Olgu sayısı (çocuk/ yetişkin)	6/9
Yaş ortalaması (çocuk/yetişkin)	11,2/25,0
Cinsiyet (E/K)	14/25
Konjenital/Primer edinilmiş/sekonder edinilmiş	3/5/27
Bilateral/Unilateral kulak tutulumu	3/35
Nüks olan/Nüks olmayan	9/29

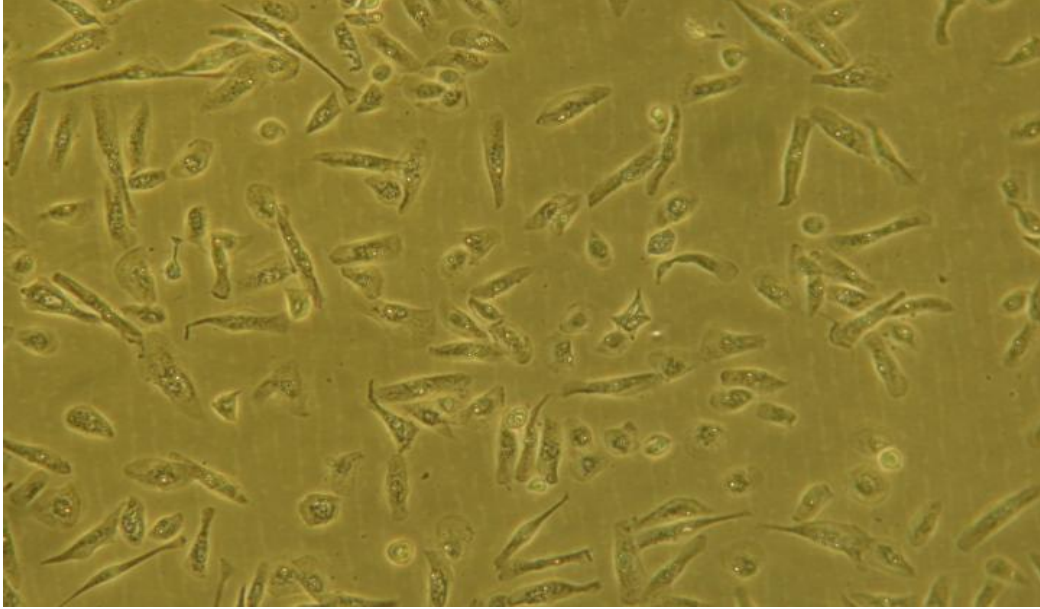
3.2. Hücre Kültürü Bulguları

Hücreler uzun süre kültüre edilmesine rağmen, tutunmanın başarısız olduğu gözlenmiş; bu nedenle kollejanın kullanıldığı protokol değiştirilmiştir. Değiştirilen protokolda gereç ve yöntemde anlatılan kollajenaz basamakları iptal edilerek kollajenazsız primer kültürü gerçekleştirilmiş ve hücrelerin bu metotta daha sağlıklı tutunduğu gözlenmiştir. Bu nedenle bu protokole devam edilmiştir. Bu şartlarda da hem kolesteatom dokusunda hem de cilt dokusunda fibroblast hücreleri yaygın bir şekilde gözlenmiştir (Resim 3.1).

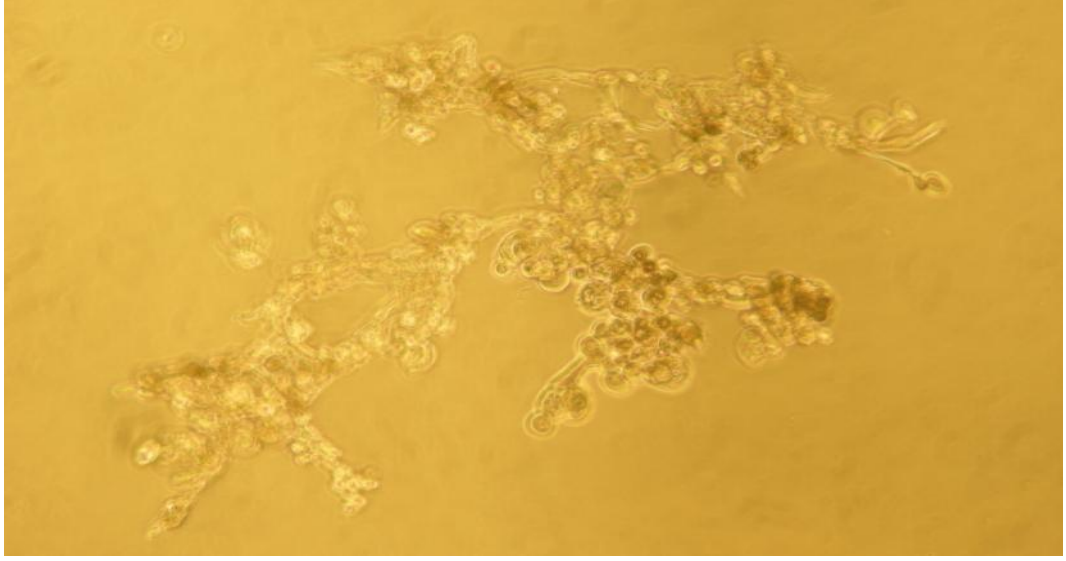


Resim 3.1. Primer kolesteatom hücrelerine ait fibroblast hücreleri (20X büyütme).

Hedeflenen hücre grubu keratinositler olduğu için kullanılan besiyeri RPMI yerine keratinosit hücrelerine spesifik KSF besiyeri olarak değiştirildi. Bunun üzerine hem cilt hem kolesteatom dokusunda da keratinositler elde edildi (Resim 3.2).



Resim 3.2. Primer cilt dokularına ait keratinosit hücreleri (20X büyütme).

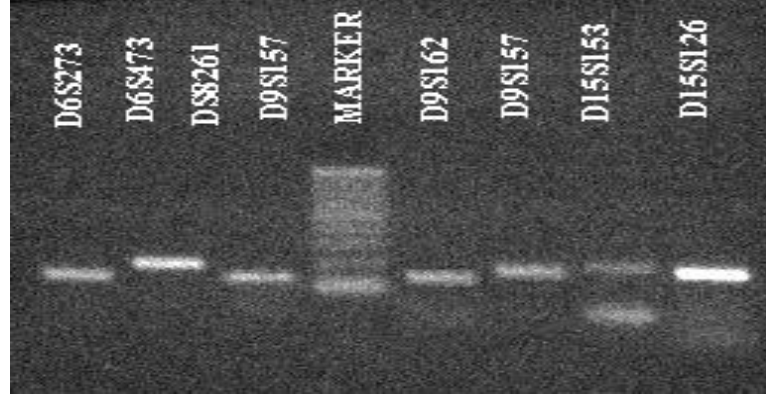


Resim 3.3. Primer kolesteatom dokularına ait keratinosit hücreleri (20X büyütme).

Ancak çalışmanın primer amacı LOH analizi olması nedeniyle her bir vakadan yeterli doku örneği temin edilemediğinden kültür üzerinde yeterince yoğunlaşamadı.

3.3. Klasik PCR Bulguları

Yapılan çalışmalarda epitelyal kökenli kanserlerde LOH oranı yüksek bulunan STR belirleyicilerinden seçilen bu çalışmadaki 7 STR belirleyicisi (D6S273, D6S473, D8S261, D9S157, D9S162, D15S126, D15S153) klasik PCR yöntemiyle gereç ve yöntemde anlatıldığı gibi optimize edilen sıcaklık ve $MgCl_2$ şartlarında çoğaltılarak bantlar elde edilmiştir (Şekil 3.1). Optimizasyon işleminden sonra her bir hastanın kontrol ve kolesteatom örneklerinin PCR'si yapılmış ve her bir STR belirleyicisine özgü bantlar elde edilen örnekler LOH analizinde kullanılmıştır.



Şekil 3.1. D6S273, D6S473, D8S261, D9S157, D9S162, D15S126, D15S153 isimli STR belirleyiciler için yapılan optimize olmuş PCR sonuçlarının agaroz jel elektroforezi sonrası görüntüsü.

3.4. Heterozigotluk Kaybı Bulguları

Hastalara ait DNA örnekleri, 7 adet STR belirleyicisi (D6S273, D6S473, D8S261, D9S157, D9S162, D15S126, D15S153) kullanarak heterozigotluk kaybı yönünden incelenmiştir.

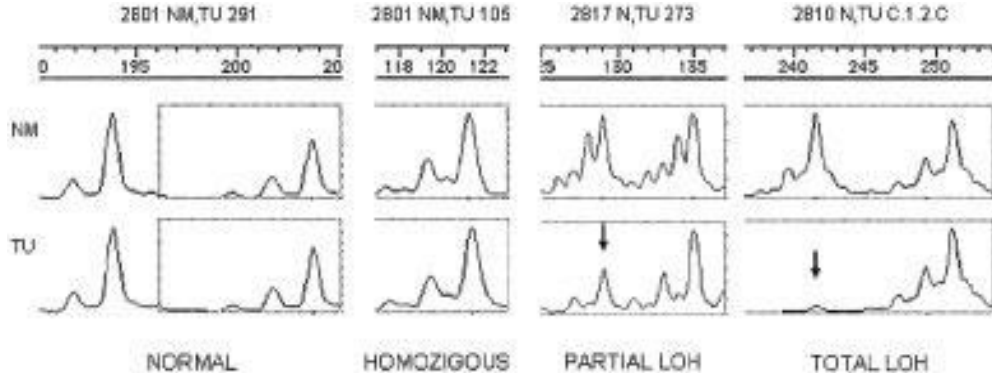
Bu çalışmada 39 hastada 7 STR belirleyicisi ile yapılan analizler sonucunda toplam 273 analiz (run) yapılmıştır. Bunların 60'ı (% 22) ya PCR ürünüdeki ya da LOH analizindeki deneysel başarısızlıktan dolayı çalışmaya dahil edilmemiştir. 213'ünde (% 78) anlamlı sonuçlar bulunmuştur. 43'ü (% 15,8) ise bilgi vermeyen homozigot sonuçlardır (non-informatif). 7'sinde (% 2,6) mikrosatellit instabilitesi (MSI); 1'inde (% 0,5) heterozigotluk kaybı (LOH) vardır (Tablo 3.2.).

Çizelge 3.2. Heterozigotluk kaybı analizleri sonucu elde edilen bulguların tablo gösterimi. Sol sütunda STR belirleyiciler, üst satırda hasta numaraları görülmektedir.

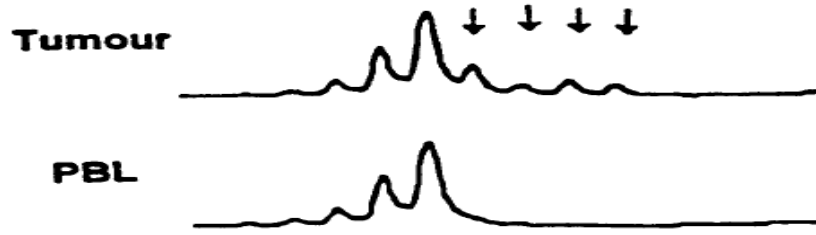
	5	6	9	11	12	13	14	15	16	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	30	31	33	34	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	
D6S273	■		■				■	■													■	■					■													
D6S473	■	■		■	■			■					■					■		■			■				■	■												
D8S261	■	■	■		■	■	■				■		■				■			■	■					■			■	■	■				■		■	■	■	
D9S157			■		■			■	■							■				■	■								■		■	■					■		■	■
D9S162	■							■			■	■	■	■	■	■			■		■	■				■	■	■	■	■	■						■	■	■	■
D15S126	■		■	■		■	■	■	■			■	■	■	■	■					■	■							■		■						■	■	■	■
D15S153	■		■	■	■		■	■	■	■			■	■	■	■			■		■	■							■									■	■	■

- heterozigotluk kaybını gösteren örnekler
- mikrosatellit instabilitesi gösteren örnekler
- heterozigot örnekler
- bilgi vermeyen homozigot örnekler
- deneysel başarısızlık

Fragment analizinde grafiklerde 5 sonuç değerlendirilmektedir (Şekil 3.2). Grafiklerde normal dokuyla kolesteatom dokusunun piklerini karşılaştırarak normal heterozigot, bilgi vermeyen homozigot, mikrosatellit instabilitesi (MSI), heterozigotluk kaybı (LOH), kısmi heterozigotluk kaybı şeklinde sonuçlar görülmektedir.



Şekil 3.2. A) LOH analizinin muhtemel sonuçları (Maleno I. ve ark 2004 makalesinden alınmıştır).



B) Mikrosatellit İnstabilitesi. Tümörlü bölgedeki oklar allel kazanımını göstermektedir (Feenstra M ve ark 1999 makalesinden alınmıştır).

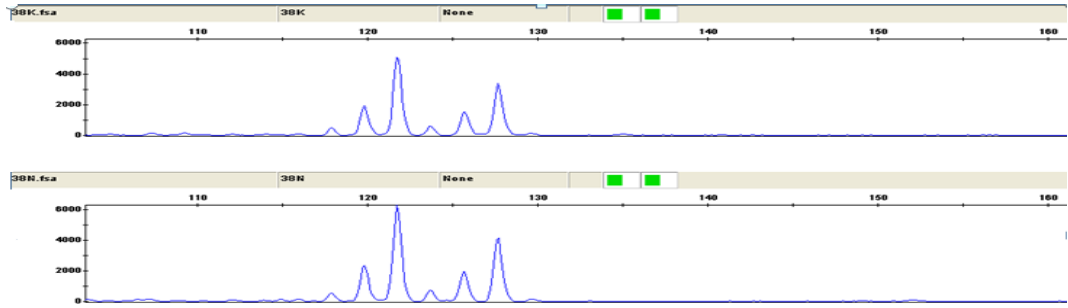
Sadece bir hastada D15S153 adlı sadece bir STR belirleyicisinde LOH gözlenmiştir. D6S273 adlı belirleyici ile 1 hastada, D6S473 adlı belirleyici ile 2 hastada, D8S261 adlı belirleyici ile 1 hastada, D9S157 adlı belirleyici ile 2 hastada, D9S162' de ise 1 hastada MSI'ya rastlanmıştır. D15S126 adlı belirleyicide ise hiçbir hastada MSI ve LOH gözlenmemiştir.

LOH ve MSI gözlenen hastaların klinik ve demografik özellikleri şu şekildedir; hem LOH ve hem de MSI gözlenen 16 no'lu hasta 27 yaşında olup kolesteatom sekonder edinilmiştir, kulak tutulumu unilateral olup nüks görülmemektedir. İki STR belirleyicisinde MSI gözlenen 5 no'lu hasta 5 yaşında olup kolesteatom sekonder edinilmiştir, kulak tutulumu bilateral olup genomik

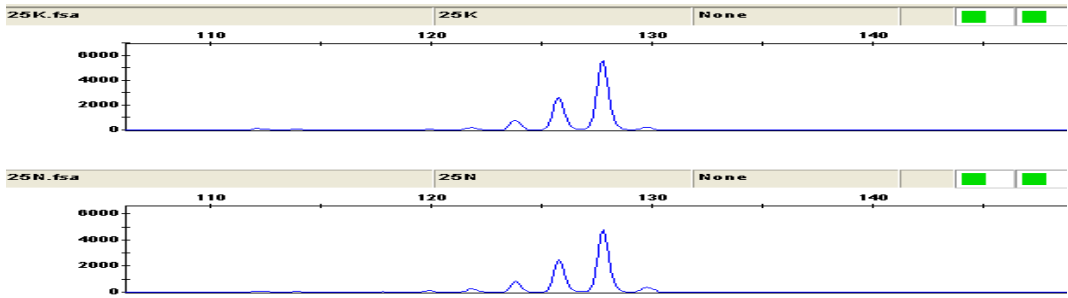
instabilite görülen hastaların içinde tek nüks gösteren hastadır. MSI gözlenen bir hasta 50 yaşında diğeri ise 32 yaşında olup kolesteatom primer edinilmiştir. Diğer MSI gözlenen hastalar ise 28 ve 77 yaşlarında olup kolesteatom sekonder edinilmiştir. Bu hastaların hepsinde kulak tutulumu unilateraldir ve hiçbirinde nüks görülmemiştir.

3.4.1. D6S273 STR Belirleyicisine Ait Bulgular

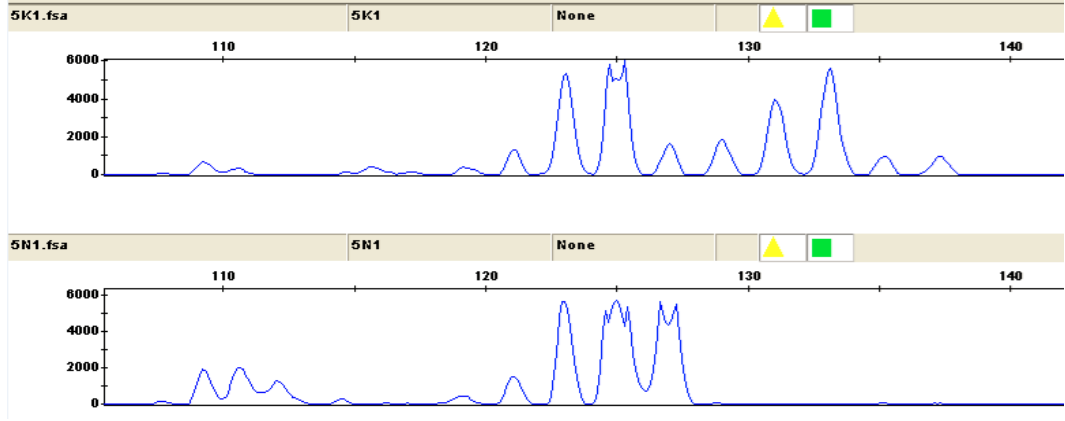
D6S273 120-140 bp büyüklüğünde ve 6.kromozomun 6p-6qterm'de lokalizedir. Kolesteatom hastalarının 2'si bilgi vermeyen homozigot (non-informatif), 29'u normal heterozigottur. 1'inde MSI vardır. Hastaların hiçbirinde LOH gözlenmemiştir. MSI gözlenen hastada nüks görülmüş ve kolesteatom sekonder edinilmiştir.



Şekil 3.3. 38 no'lu hastada D6S273'te normal heterozigot



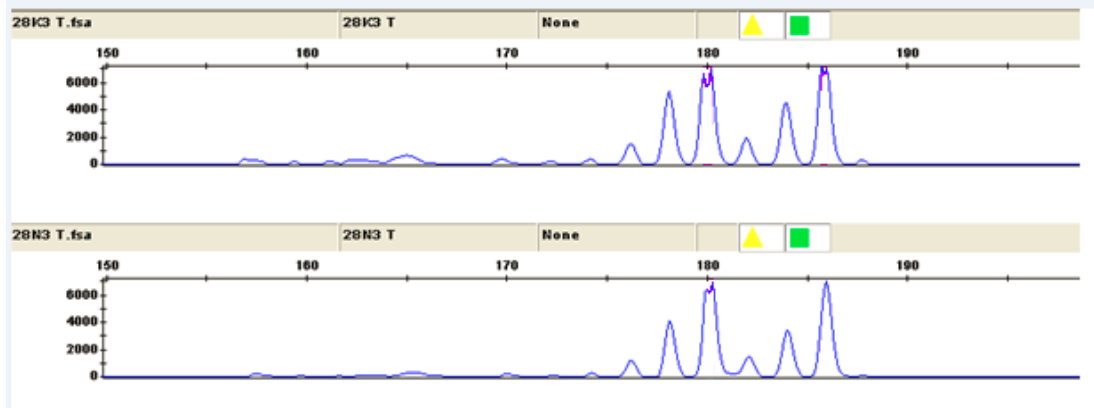
Şekil 3.4. 25 no'lu hastada D6S273'te normal homozigot



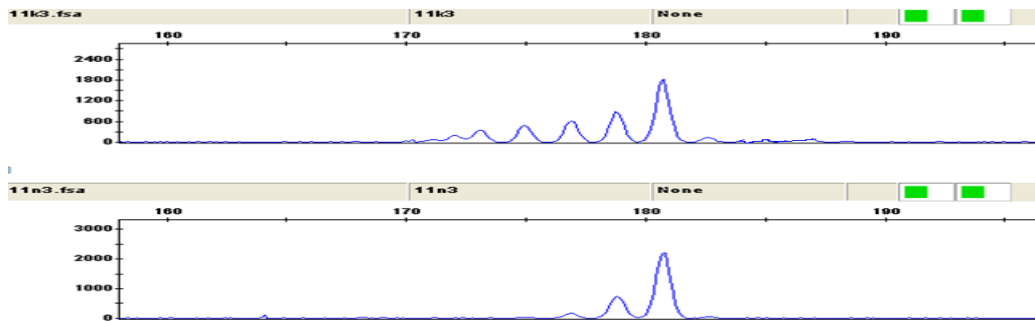
Şekil 3.5. 5 no'lu hastada D6S273'te MSI

3.4.2. D6S473 STR Belirleyicisine Ait Bulgular

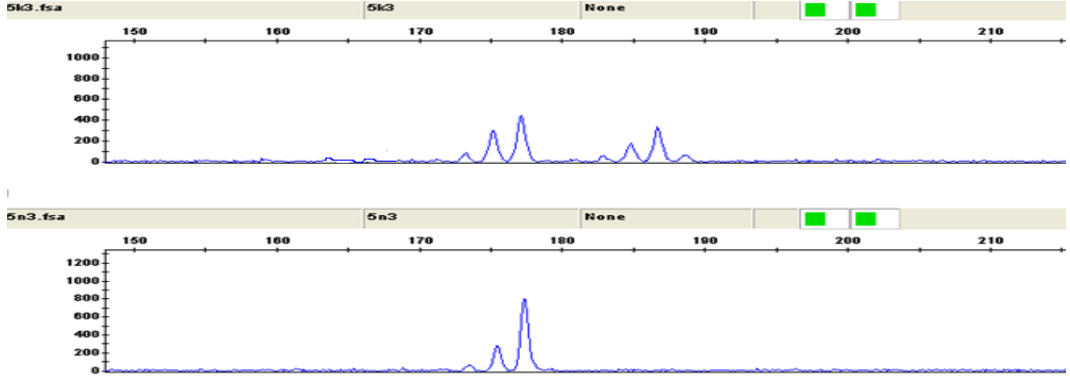
D6S473 166-196 bp büyüklüğünde 6.kromozomun 6p21.3'te lokalizedir. Kolesteatom hastalarının 5'i bilgi vermeyen homozigot (non-informatif), 28 'i normal heterozigottur. 2'sinde MSI vardır. Hastaların hiçbirinde LOH gözlenmemiştir. MSI gözlenen hastada nüks görülmüş ve kolesteatom sekonder edinilmiştir. Diğerinde nüks yoktur ve kolesteatom primer edinilmiştir.



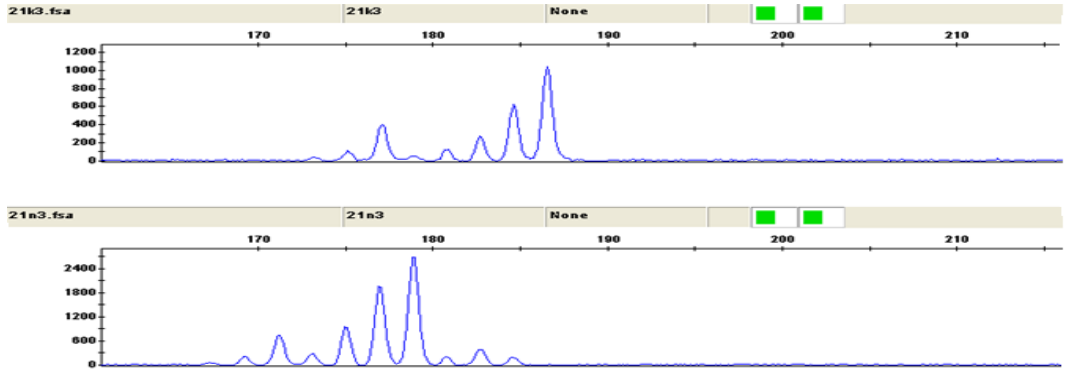
Şekil 3.6. 28 no'lu hastada D6S473'te normal heterozigot



Şekil 3.7. 11 no'lu hastada D6S473'te normal homozigot



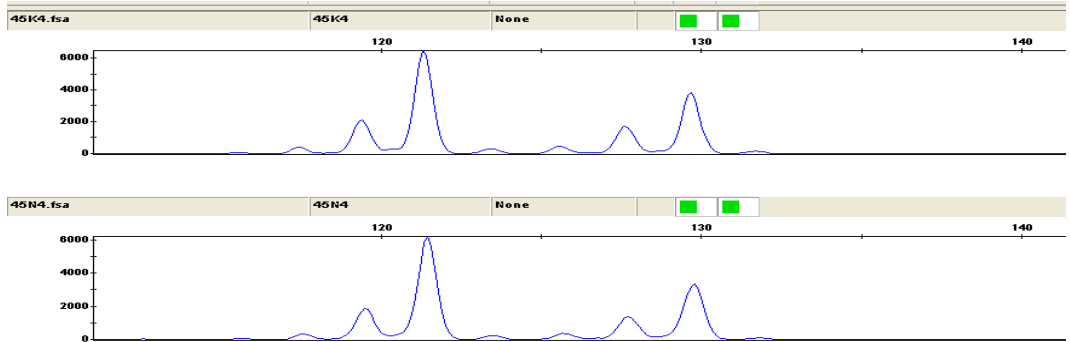
Şekil 3.8. 5 no'lu hastada D6S473'te MSI



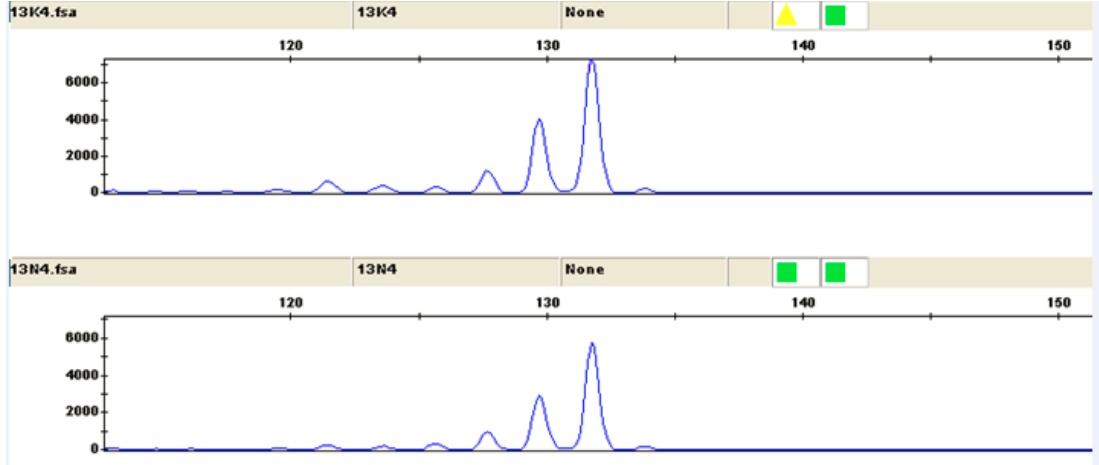
Şekil 3.9. 21 no'lu hastada D6S473'te MSI

3.4.3. D8S261 STR Belirleyicisine Ait Bulgular

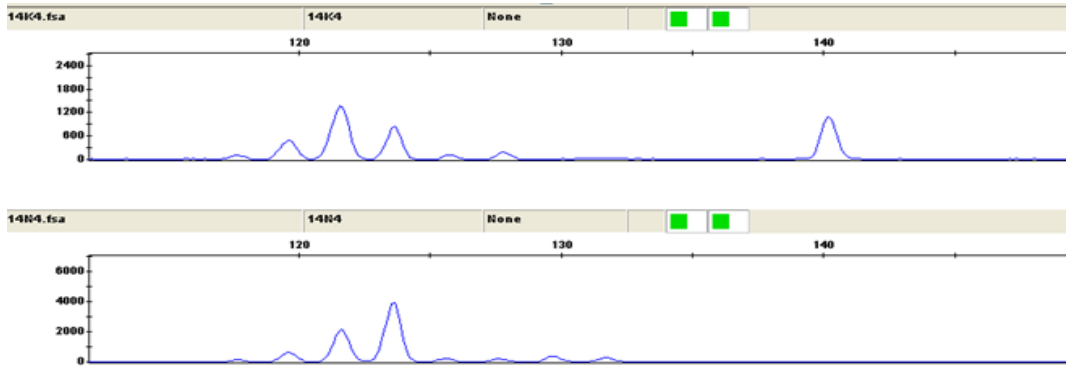
D8S261 124-144 bp büyüklüğünde 8.kromozomun 8p23-p21'de lokalizedir. Kolestatom hastalarının 15'i bilgi vermeyen homozigot (non-informatif), 18'i normal heterozigottur. 1'inde MSI vardır. Hastaların hiçbirinde LOH gözlenmemiştir. MSI gözlenen hasta edinsel primerdir.



Şekil 3.10. 45 no'lu hastada D8S261'de normal heterozigot



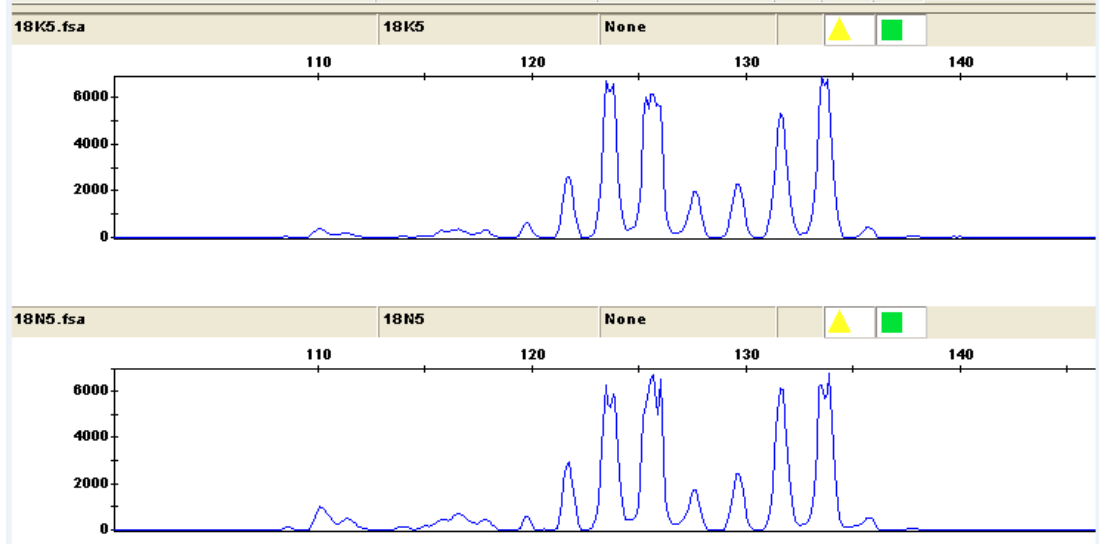
Şekil 3. 11. 13 no'lu hastada D8S261'de normal homozigot



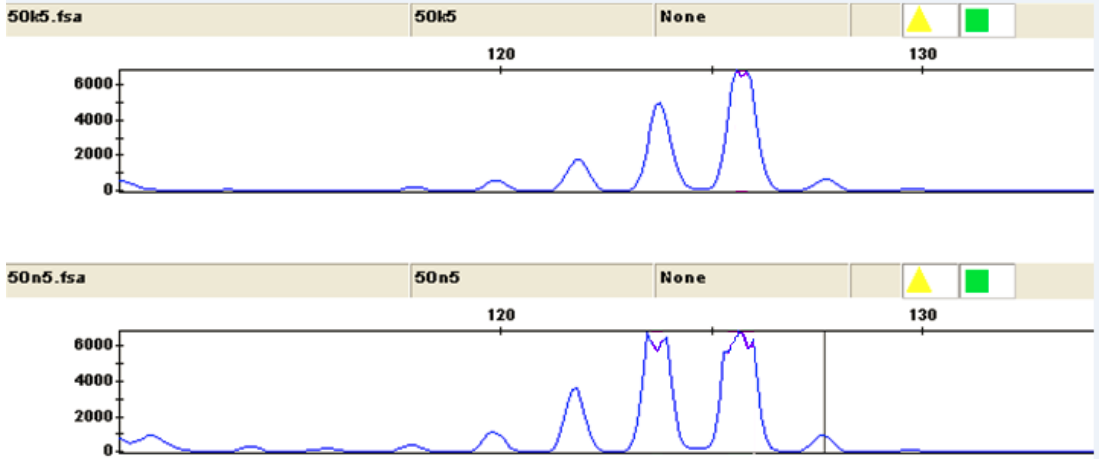
Şekil 3. 12. 14 no'lu hastada D8S261'de MSI

3.4.4. D9S157 STR Belirleyicisine Ait Bulgular

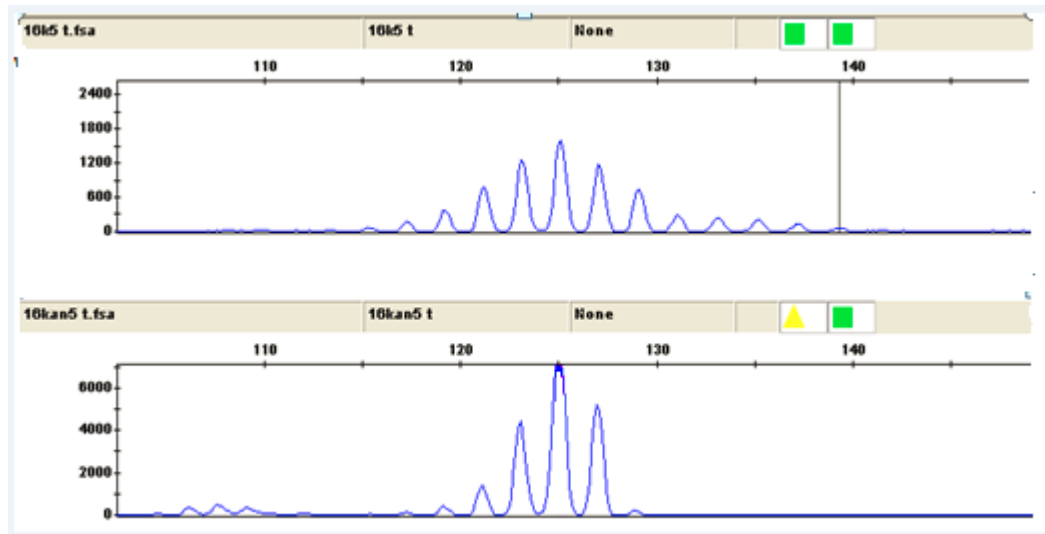
D9S157 133-149 bp büyüklüğünde 9.kromozomun 9p23-p11'de lokalizedir. Kolesteatom hastalarının 8'i bilgi vermeyen homozigot(non-informatif), 25'i normal heterozigottur. 2'inde MSI vardır. Hastaların hiçbirinde LOH gözlenmemiştir. MSI gözlenen hastaların ikisi de edinsel sekonderdir.



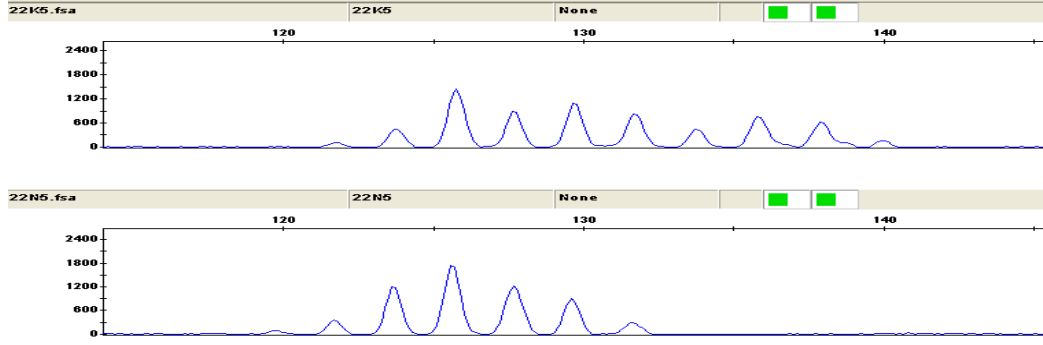
Şekil 3.13. 18 no'lu hastada D9S157'de normal heterozigot



Şekil 3.14. 50 no'lu hastada D9S157'de normal homozigot



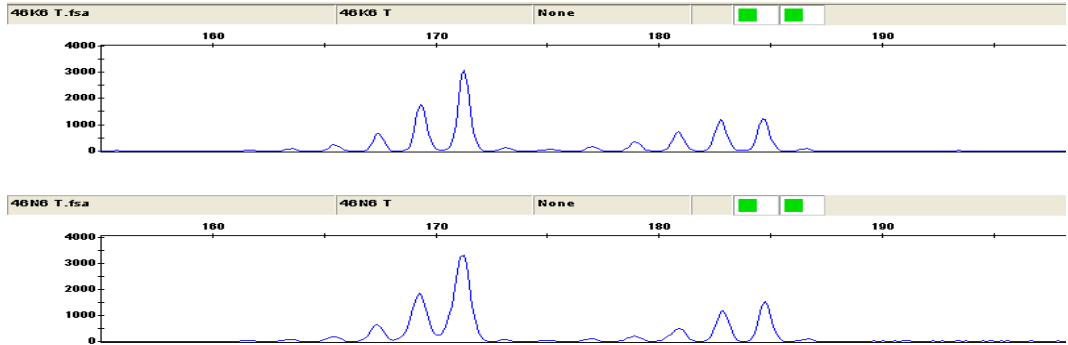
Şekil 3.15. 16 no'lu hastada D9S157'de MSI



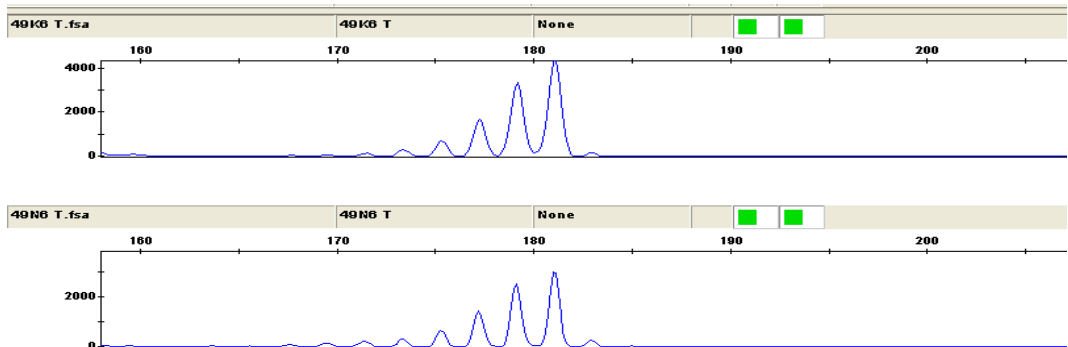
Şekil3.16. 22 no'lu hastada D9S157'de MSI

3.4.5. D9S162 STR Belirleyicisine Ait Bulgular

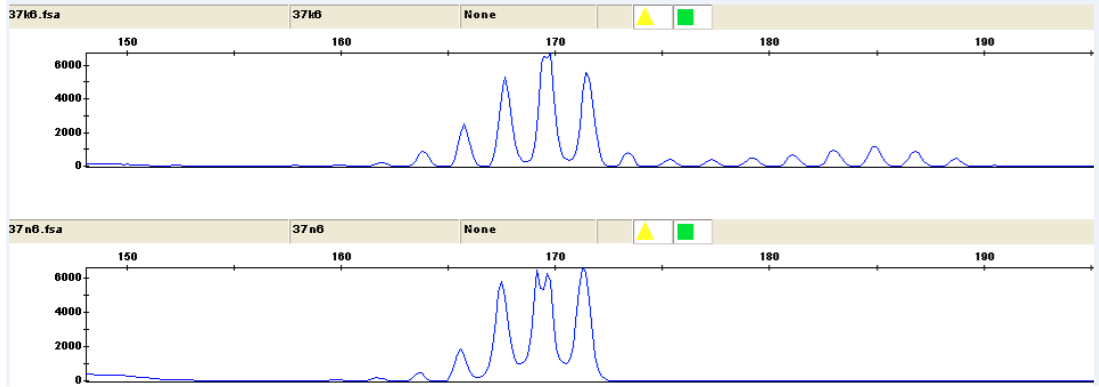
D9S162, 172-196 bp büyüklüğünde 9. kromozomun 9p22'de lokalizedir. Kolesteatom hastalarının 7'si bilgi vermeyen homozigot (non-informatif), 19'u normal heterozigottur. 1'inde MSI vardır. Hastaların hiçbirinde LOH gözlenmemiştir. MSI gözlenen hastada kolesteatom pirmer edinilmiştir.



Şekil 3.17. 40 no'lu hastada D9S162'de normal heterozigot



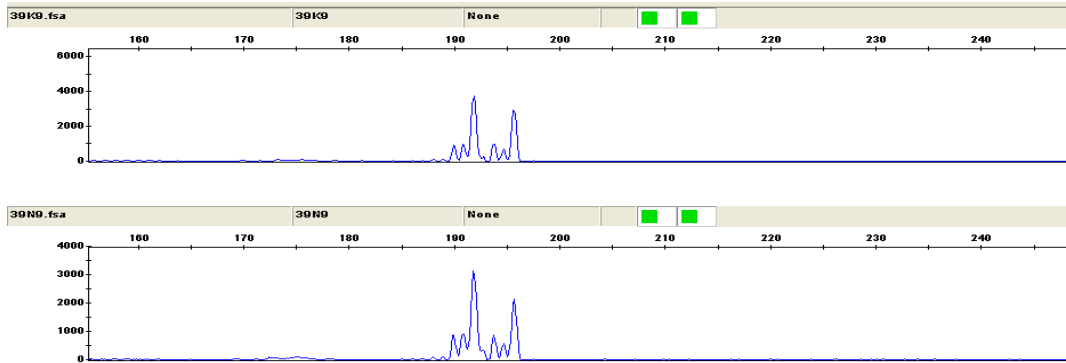
Şekil 3.18. 49 no'lu hastada D9S162'de normal homozigot



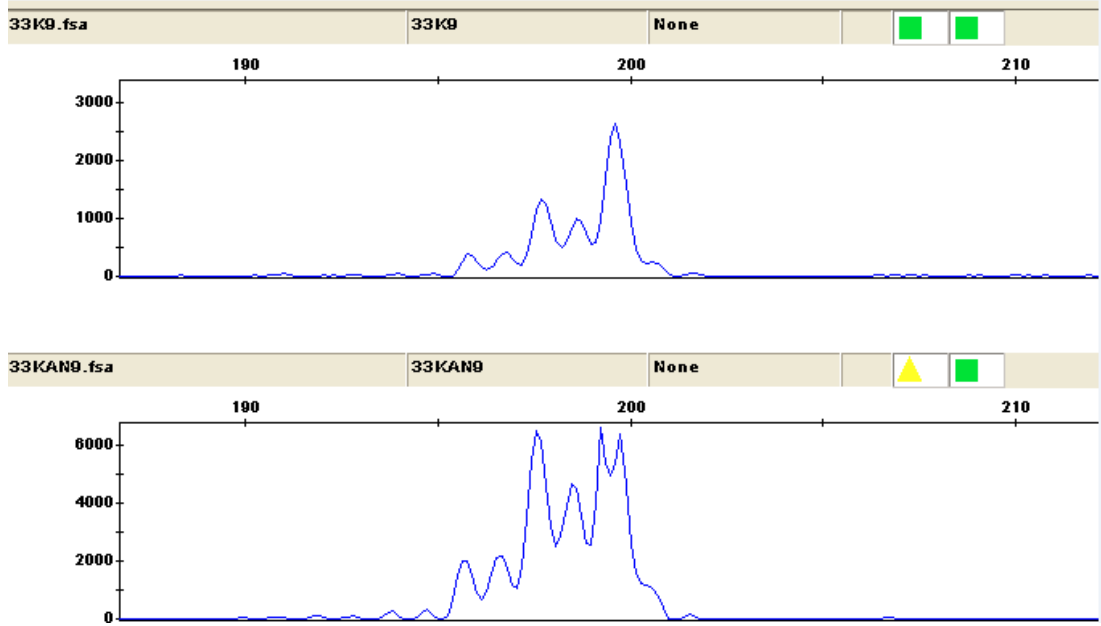
Şekil 3.19. 37 no'lu hastada D9S162'de MSI

3.4.6. D15S126 STR Belirleyicisine Ait Bulgular

D15S126, 188-218 bp büyüklüğünde 15.kromozomun 15q21'de lokalizedir. Kolestomat hastalarının 2'si bilgi vermeyen homozigot (non-informatif), 18'i normal heterozigottur. Hiçbir hastada LOH ve MSI gözlenmemiştir.



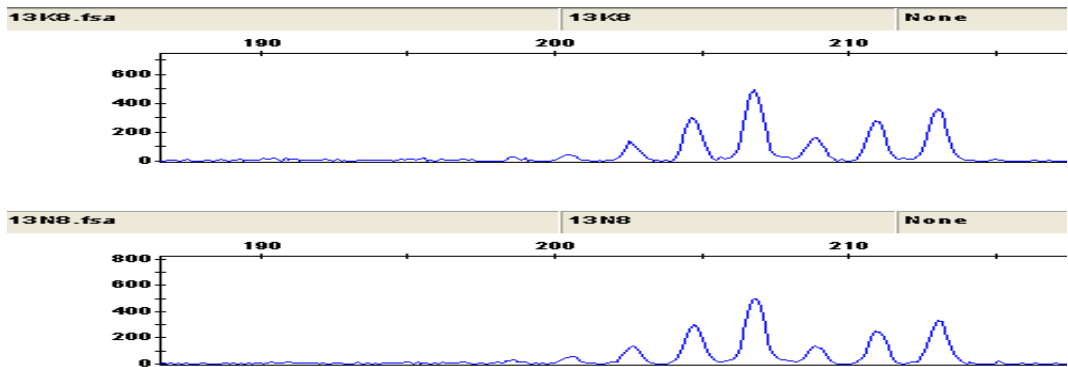
Şekil 3.20. 39 no'lu hastada D15S126'da normal heterozigot



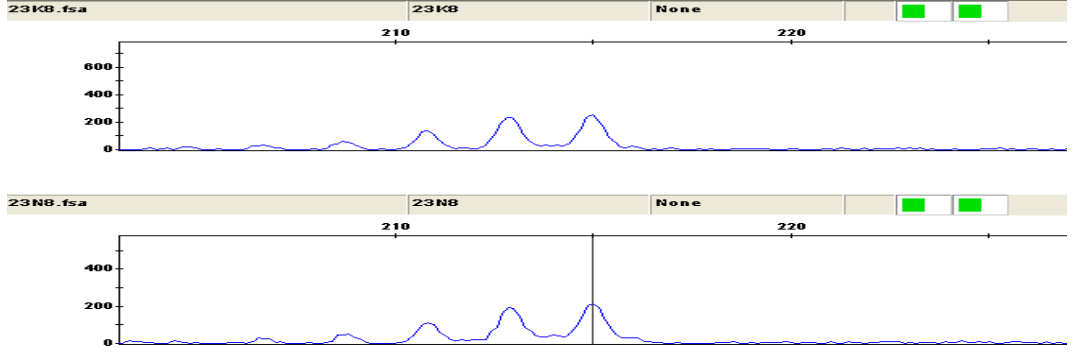
Şekil 3.21. 33 no'lu hastada D15S126'de normal homozigot

3.4.7. D15S153 STR Belirleyicisine Ait Bulgular

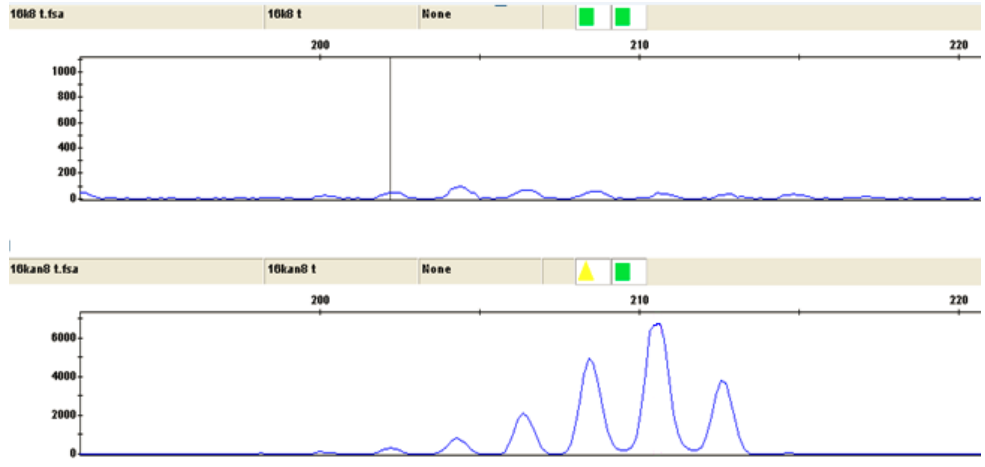
D15S153, 198-208 bp büyüklüğünde 15.kromozomun 15q22.3'te lokalizedir. Kolestomat hastalarının 4'ü bilgi vermeyen homozigot (non-informatif), 23'ü normal heterozigottur. Hiçbir hastada MSI gözlenmemiştir. 1 hastada LOH gözlenmiştir. LOH gözlenen hastada kolesteatom sekonder edinilmiştir.



Şekil 3.23. 13 no'lu hastada D15S153'te normal heterozigot .



Şekil 3.24. 23 no'lu hastada D15S153'te normal homozigot



Şekil 3.25. 16 no'lu hastada D15S153'te LOH.

4.TARTIŞMA

Yanlış yerde gelişen deri olarak kısaca tarif edilen kolesteatom; orta kulak boşluğunda iyileşme, yara süreci ve epidermal çoğalma kontrolünün bozulduğu hiperproliferatif bir hastalıktır. Çok katlı yassı epitelin orta kulağa nasıl geldiği ve hiperkeratinize olmaya nasıl başladığı yapılan çok sayıdaki çalışmalara rağmen halen tartışmalı bir konudur.

Kolesteatomun moleküler biyolojisi ve genetiğini açıklamak için yapılan çalışmalara rağmen kolesteatomun altında yatan moleküler mekanizma özellikle hiperproliferasyonu tetikleyen mekanizma halen net değildir. Mevcut çalışmada kolesteatom tanısı konmuş hastaların genomunu, epitelyal kökenli kanserlerde yüksek oranda LOH bulunan 7 STR belirleyicisiyle taranarak kolesteatomun genomik açıdan stabil olup olmadığı gösterilmiştir.

Literatürdeki kolesteatomya dair çalışmaları kabaca üç kısma ayırabiliriz. Birincisi moleküler biyolojisine dair olup belli moleküllerin ekspresyonuna ait pek çok çalışma mevcuttur. İkincisi genomu tarama şeklinde yapılan daha gross çalışmalar olup bunlar kısıtlıdır ve bizim çalışmamız da bu kısımda değerlendirilebilir. Üçüncüsü ise hücre kültürüyle bağlantılı çalışmalar olup bunlar da az sayıdadır.

Örneğin normal deriye kıyasla yüksek oranda EGFR eksprese edildiği (Bujia ve ark 1996), 4F2 antijeninin yüksek bulunduğu (Sudhoff ve ark 2000), IFN γ R'nin matrikste aşırı salındığı (Ottaviani ve ark 1999) gösterilmiş ve bunların hücre hiperproliferasyonuna sebep olduğu bildirilmiştir. Kolesteatomda EGFR'nin yanı sıra IL-1, TGF α , KGF (Keratinosit Grown Factor) gibi büyüme hormonlarının da yüksek oranda eksprese edildiği bulunmuştur (Ishibashi ve ark 1997, Yetişer ve ark 2002). Ayrıca normal deriye kıyasla kolesteatomda Involukrin, galektin3, Erb-2, Bcl-x1, fas/APO-1, c-myc gibi proteinlerin yüksek oranda bulunduğunu göstermişlerdir (Sudhoff ve ark 1997, Kojima ve ark 1999, Park 1999, Sheikholeslam-Zadeh ve ark 2001, Sakamoto ve ark 2004). Bunların ise yüksek proliferativite, apoptozis ve hücre proliferasyonu, antiapoptotik gibi etkilerle ilişkili olduğu bildirilmiştir.

Literatürdeki kolesteatom genom taramasına dair yapılan çalışmalarda ise hastalığın genetik açıdan stabil olup olmadığı ve neoplazma olarak tanımlanıp

tanımlanamayacağı konusunda çelişkiler vardır. 1991’de Bollmann ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada 13 hastanın 9’unda interaktif sitometri yöntemiyle DNA anöploidisi tespit ederek bunu, genomun kararsızlığı hatta bir neoplazma olarak değerlendirmişlerdir (Bollmann ve ark 1991). Başka bir çalışmada ise kolesteatom olgularında trizomi 7 bulunmuş ve bunun hastalığın proliferativitesiyle ilişkili olduğunu öngörmüşlerdir (Lavezzi ve ark 1998). 2008’de Escedi ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise kromozomal dengesizlik tespit etmişlerdir. 7,8 ve 17. kromozomlardaki anöploidinin artmış proliferasyonla ilişkili olabileceğini bildirmişlerdir. (Ecsedi ve ark 2008). Bu sonuçlar, 6 hastanın farklı bölgelerinde LOH ya da MSI şeklinde genomik kararsızlık tespit ettiğimiz bizim çalışmamızın sonuçlarıyla uyumluluk göstermektedir. Ancak bu, 1997’deki bir çalışmanın sonucuyla çelişmektedir. Flow sitometriyle DNA içeriğine bakılan 11 örnekte sadece 1 anoploidi bulunmuş ve bundan dolayı kolesteatomun genetik açıdan kararlı olduğu ve bir neoplazma olamayacağı şeklinde yorumlamışlardır (Desloge RB ve ark 1997). 2003 ve 2006 yıllarında yapılan iki çalışma ise mikroarray temelli olup kolesteatomun gen ekspresyon profilini çizmekte; hastalığı herhangi bir şekilde tanımlamamaktadır (Tokuriki ve ark 2003, Kwon ve ark 2006).

Literatürde hücre kültürüne dair çalışmalar çok azdır. İlk kolesteatom hücre kültürü 1983’te yapılmış ve kolesteatom keratinositlerini elde etmişlerdir (Proops ve Parkinson 1983). Prasier ve ark özellikle kolesteatomun agresif karakterinin sebebi olarak keratinosit, inflamatuvar hücreler ve fibroblast hücre gruplarından biri veya daha fazlasının biyolojisinde temel değişimlerin olabileceğini önermişlerdir. Bunlardan da fibroblastların kültürünü yaparak bunların invazif karakter kazandıklarını ve büyüme kontrolünü kaybettiklerini belirtmişlerdir (Parisier ve ark 1993). Başka bir çalışmada ise kolesteatom keratinositlerini izole ederek TNF α uyarısıyla sağlıklı ve farklılaşmış keratinositlerin farkını ortaya koymak için IL-8 ekspresyon farklılığını incelemişlerdir. Kolesteatom keratinositlerinin farklılaşmış fenotiplerini bir neoplazma değil, yalnızca bir hücre transformasyonu olarak yorumlayarak diğerlerinden farklı bir değerlendirme yapmışlardır (Hilton ve ark 2010). Diğer bir çalışmada ise kolesteatomlardan fibroblastları izole ederek bu hücrelerde gen ekspresyon analizi yapmışlardır (Yoshikawa 2006). Albino ve ark ise kolesteatom patogenezinin mast hücrelerini sorumlu tutmaktadır (Albino ve ark 1998). Mevcut çalışmamızda ise sorumlu tutulan tüm hücreleri bir arada analiz eden

bir yöntem kullanılmıştır. Kolestetaom bileşimindeki hücreleri ayrı ayrı izole ederek çalışmak daha doğru sonuca ulaştırabilecektir. Bunun için bu çalışmada da primer hücre kültürü ile keratinosit hücreleri elde edilmiştir. Ancak çalışmanın primer amacı LOH analizi olması nedeniyle her bir vakadan yeterli doku örneği temin edilemediğinden kültür üzerinde yeterince yoğunlaşamadı. Bununla beraber patolojik doku ve hücre temelli ileriki çalışmalar için primer hücre kültüründen izole edilen keratinosit hücre kültürü devam etmektedir.

Mevcut çalışmamızla literatürde ilk defa kolesteatomda LOH analiziyle belirli bölgelerde genom taranmıştır. LOH, genetiği bilinmeyen hastalıklarda özellikle kanserde çok sık kullanılan bir metod olmasına rağmen kolesteatomda daha önce hiç çalışılmamıştır. Bu çalışmada kullanılan STR belirleyicileri farklı epitel kökenli kanserlerde çalışılan ve yüksek oranda heterozigotluk kaybı tespit edilmiş belirleyicilerdir.

Larinks Skuamöz hücreli Kanserde yapılan LOH analizinde D8S261'in LOH oranı %54,5 olup bu bölgenin yakınlarında tümör süpresör gen bulunabileceğini ve preinvazif fazdan invazif karsinomaya geçişte katkıda bulunacağını öngörmüşlerdir (Yoo ve ark 2004). Bizim çalışmamızda ise bu bölgede 1 hastada MSI görülmüş, LOH görülmemiştir.

HLA kompleksi 6p21.3'te lokalizedir ve bu bölgenin heterozigotluk kaybı tümör hücrelerinin immün kaçışına sebep olmaktadır. Bu bölgelerin analizi için D6S273 ve D6S473 STR belirleyicileri kullanılmıştır. Ayrıca D15S126 ve D15S153 STR belirleyicileri de β 2m genini (beta-2 mikroglobulin) çevrelemektedir ve β 2m ile HLA sınıf 1 ekspresyonuyla ilişkili bulunmuştur. Bu bölgelerin alelik kaybı başta baş boyun kanserleri olmak üzere pek çok kanserde yüksek bulunmuştur. Kolorektal ve mesane kanserlerinde en yüksek; böbrek kanserinde ise nisbeten düşük LOH frekansı bildirilmiştir (Maleno ve ark 2011). Bizim çalışmamızda ise D6S273 ve D6S473 belirleyicilerinde hiçbir kolestetaom hastasında LOH gözlenmezken; 2 hastada MSI gözlenmiştir. 1 hastada ise D15S153'te LOH gözlenmiştir.

Baş boyun skuamöz hücreli kanserlerde 9p21 bölgesinin kaybının hastalığın relaps riskiyle ilişkili olabileceği bildirilmiştir (Graveland ve ark 2012). Ve bu bölgede CDKN2A adlı hücre döngüsünde negatif düzenleyici gen lokalizedir.

Kolestetaom nüks gösteren epitelyal kökenli bir hastalıktır. Çalışmamızda bu bölgeleri kapsayan D9S157 ve D9S162 STR belirleyici kullanılmıştır. D9S157’de 2 hastada, D9S162’de ise 1 hastada MSI gözlenmiştir. Bu hastada ise bir nüks bildirilmemiştir.

Bu çalışmalarda kısmi LOH olarak kabul edilen normal allele kıyasla bir alleldeki azalmış yoğunluğun asıl sebebinin tümör dokusunun, normal stromayla kontamine olabileceği vurgusu yapılmaktadır (Field ve ark 1995). Ayrıca PCR temelli tekniklerin alellik duplikasyonla (MSI), düşük dereceli amplifikasyonu (LOH) yeterince ayıramadığı sebep gösterilmiştir (Ah-See ve ark 1994). Ancak günümüzde bu ayrımı belirgin yapan sistemler vardır. Hücre kültürüyle kolesteatomun patolojisinden sorumlu tutulan hücrelerin eldesiyle daha sağlıklı sonuçlar elde edilecektir.

Yapılan bir çalışmada KI-67 ekspresyonunun çocuk kolesteatomlarında daha fazla olduğu ve çocuklarda kolesteatomun daha agresif seyretmesinde rol aldığı bildirilmiştir (Hildman ve ark 1999). Bu sonuç bizim hasta bulgularımızla uyumludur. Olguların içinde tek nüks gösteren 5 yaşındaki hastada D6S273 adlı STR belirleyicide MSI görülmüştür.

Sonuç olarak elde edilen veriler kolesteatomun patogenezinde alellik duplikasyonların ve alellik kayıpların önemli olabileceğini düşündürmektedir. Daha önce kolesteatomda bu tarz çalışmanın olmaması elde edilen verileri literatürdeki verilerle kıyaslamayı zorlaştırmaktadır. Bu nedenle bu veriler, daha kapsamlı çalışmalara öncülük edecektir. Daha kapsamlı çalışmalar, kolesteatomun patogenezinin aydınlatılmasına yön verecektir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Kolesteatom patogenezinde neyin etkili olduğunun belirlenmesi için mevcut çalışma yapılmıştır. Kolesteatom hastalarında STR belirleyicileriyle genomda LOH taranmıştır; 1 hastanın bir bölgesinde (D15S153) LOH tespit edilmiştir. Bununla beraber 6 hastada bazı bölgelerde MSI'ye de rastlanmıştır. MSI gözlenen belirleyiciler D6S273, D6S473, D8S261, D9S157, D9S162 'dir.

Genomu daha geniş çapta tarayacak STR belirleyicileriyle de kolesteatomun genomik instabilitesi hakkında daha fazla veri elde edilmesi mümkün olacaktır. Bu veriler ışığında allelik kayıp ya da kazanım olan bölgelere yoğunlaşarak bu bölgelerdeki genlerin kolesteatom patogenezinde ilişkisi çalışılabilir. Ayrıca bu, hastalığın gelişim yollarının anlaşılmasına da katkı sağlayacaktır. Kromozomal ya da moleküler düzeyde genetik belirleyiciler de tanımlanabilir.

Kolesteatomda hücre kültürü çalışmalarına yoğunlaşarak hastalığın patogenezinin asıl sorumlu olduğu düşünülen hücre grupları izole edilerek yapılan çalışmalar daha sağlıklı olacaktır. Kolesteatomun temel bileşenleri olan fibroblast, keratinositler, mast hücrelerinin bir ya da daha fazlasının hastalıktan sorumlu olduğu düşünülürse bu hücrelerin kültürlerinin eldesiyle patogenezinde yeni ufuklar açılacaktır.

6.ÖZET

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Kolesteatom Hastalarında Genomik İnstabilitenin Araştırılması

Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

YÜKSEK LİSANS TEZİ/ KONYA- 2012

Kolesteatom, olmaması gereken yerde bulunan ve hatta yanlış yerde gelişen deriye ait yassı epitel dokusudur. Kolesteatomlar invaziv özellikte lokal olarak yıkıcı ve ameliyat sonrası nüks oranı yüksek deri lezyonlarıdır. Çok katlı yassı epitelin orta kulağa nasıl geldiği ve hiperkeratinize olmaya nasıl başladığı yapılan çok sayıdaki çalışmalara rağmen halen tartışmalı bir konudur.

Genetik temeli bilinmeyen hastalıkların ortaya konması için genom boyu taramalarda LOH analizinin önemli bir rolü vardır. LOH, her bir kromozomun koluna özgü polimorfik genetik belirleyicilerle tümörlerin alleltiplendirmesi ile analiz edilebilir. LOH analizi için mikrosatellit belirleyiciler kullanılmaktadır. Mikrosatellitlerin belirli bir tür içerisinde polimorf olmaları ve temelde benzer olmasına rağmen bireyden bireye küçük farklılıklar içermeleri moleküler genetik alanında marker olarak kullanılmalarını uygun hale getirmektedir.

Bu çalışmada genetik temeli bilinmeyen kolesteatomun genomik instabilitesinin araştırılması için LOH analizi adı altında 39 kolesteatom tanısı konmuş hastanın 7 STR belirleyicisiyle (D6S273, D6S473, D8S261, D9S157, D9S162, D15S126, D15S153 isimli STR belirleyiciler) genomdaki bu bölgeler incelenerek kapiller elektroforeziyle fragment analizi yapılmıştır. Çalışmada kullanılan belirleyiciler, kolesteatom epitelyal kökenli bir hastalık olduğu için epitelyal kökenli kanserlerde LOH oranı yüksek çıkmış çalışmalar referans alınarak seçilmiştir. 1 hastanın 1 bölgesinde (D15S153) LOH tespit edilmiştir. Bununla beraber 6 hastada bazı bölgelerde MSI'ye de rastlanmıştır. MSI gözlenen belirleyiciler D6S273, D6S473, D8S261, D9S157, D9S162 'dir. Kolesteatomda LOH analizi ilk defa bu çalışmayla yapılmış olup hastalığın patogenezinin tanımlanmasına ve moleküler mekanizmasının aydınlatılmasına katkıda bulunacağı düşünülmüştür.

Anahtar Sözcükler: fragment analizi; kolesteatom; LOH (Heterozigotluk kaybı); mikrosatellit; STR (kısa ardışık tekrarlar).

7. SUMMARY

Investigation of genomic instability in cholesteatoma patients

Cholesteatoma, squamous epithelium of the skin tissue, has been existed and also developed in the wrong place. They are locally invasive and destructive skin lesions which have high rate of recurrence after surgery. How squamous epithelium comes to middle ear and starts to hiperkeratinize is still controversial issue despite numerous studies.

To establish the genetic basis of unknown diseases, LOH analysis has an important role in genome-wide screening. LOH can be analyzed by allelotype of tumours via each arm of a chromosome-specific polymorphic genetic markers. Microsatellite markers are used for LOH analysis. Microsatellites are polymorphic in a certain type and basically similar although they contain small differences among individuals in the field of molecular genetic that makes them appropriate to use as genetic markers.

In this study to investigate the genetic instability of the unknown genetic basis of cholesteatoma, capillary electrophoresis fragment analysis also called LOH analysis was performed by examining these loci in the genome. Markers used in this study, because cholesteatoma is a disease of epithelial origin, were selected by reference of a high percentage of LOH in cancers of epithelial origin to work out. We found one LOH region (D15S153) in only one patient. In addition to LOH, microsatellite instability was observed in 6 out of 39 cases in some regions resulting in increased size of one allele. These markers of observed MSI regions are D6S273, D6S473, D8S261, D9S157, D9S162. To our knowledge, this is the first study assembling a genome-wide LOH analyse of cholesteatoma that is thought to contribute to the identification of pathogenesis and the clarification of molecular mechanism of the disease.

Key Words: cholesteatoma; fragment analyse; LOH (loss of heterozygosity); microsatellit; STR (short tandem repeat).

8. KAYNAKLAR

1. Ah-See KW, Cooke TG, Pickford IR, Soutar D, Balmain A An allelotype of squamous carcinoma of the head and neck using microsatellite markers. *Cancer Res.* 1994 Apr 1;54(7):1617-21.
2. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Hücrenin Moleküler Biyolojisi-2008-TÜBA-978-9944-252-22-5 s.13-1321.
3. Bailey, 2001s.1787. Strunk CL, Lambert PR. Cholesteatoma. In: Bailey B. *Head and Neck Surgery: Otolaryngology*. Volume 2. 3rd ed. New York, NY: Lippincott-Raven; 2001. p.17-1797
4. Banerjee AR, James R, Narula AA. Matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 in cholesteatoma and deep meatal skin. *Clin Otolaryngol Allied Sci.* 1998;23(4):345-7.
5. Bockmuhl U, Schwendel A, Dietel M, Peterse I: Distinct Patterns of Chromosomal Alterations in High- and Low-Grade Head and Neck Squamous Cell Carcinomas' *Cancer Research*.56, 5325-9, December I, 1996.
6. Bujia J, Kim C, Holly A, Sudhoff H, Ostos P, Kastenbauer E. Epidermal growth factor receptor (EGF-R) in human middle ear cholesteatoma: an analysis of protein production and gene expression. *Am J Otol.* 1996 ;17(2):203-6. *cancer research* 53, 57755779, December 1, 1993.
7. Chen X, Qin Z. Post-transcriptional regulation by microRNA-21 and let-7a microRNA in paediatric cholesteatoma. *J Int Med Res.* 2011;39(6):2110-8.
8. Choufani G, Mahillon V, Decaestecker C, Lequeux T, Danguy A, Salmon I, Gabius HJ, Hassid S, Kiss R. Determination of the levels of expression of sarcolectin and calcyclin and of the percentages of apoptotic but not proliferating cells to enable distinction between recurrent and nonrecurrent cholesteatomas. *Laryngoscope.* 1999;109(11):1825-31.
9. De Schutter H, Spaepen M, Mc Bride WH, Nuyts S. The clinical relevance of microsatellite alterations in head and neck squamous cell carcinoma: a critical review. *Eur J Hum Genet.* 2007 Jul;15(7):734-41. Epub 2007 May 2. Review.
10. Desloge RB, Carew JF, Finstad CL, Steiner MG, Sassoon J, Levenson MJ, Staiano-Coico L, Parisier SC, Albino AP. DNA analysis of human cholesteatomas. *Am J Otol.* 1997;18(2):155-9.
11. Desloge RB, Finstad CL, Sassoon J, Han JC, Parisier SC, Albino AP. Altered regulation of cell surface peptidases in human cholesteatoma. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 1997;116(1):58-63.
12. Diego A. Preciado *Biology of cholesteatoma: Special considerations in pediatric patients. International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology* 76 (2012) 319–321.
13. Ferlito A, Devaney KO, Rinaldo A, Milroy CM, Wenig BM, Iurato S, McCabe BF. Clinicopathological consultation. Ear cholesteatoma versus cholesterol granuloma. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1997 ;106(1):79-85)
14. Field JK, Kiaris H, Risk JM, Tsiriyotis C, Adamson R, Zoumpourlis V, Rowley H, Taylor K, Whittaker J, Howard P Allelotype of squamous cell carcinoma of the head and neck: fractional allele loss correlates with survival. *Br J Cancer.* 1995 Nov;72(5):1180-8.
15. Graveland AP, Golusinski PJ, Buijze M, Douma R, Sons N, Kuik DJ, Bloemena E, Leemans CR, Brakenhoff RH, Braakhuis BJ. Loss of heterozygosity at 9p and p53 immunopositivity in surgical margins predict local relapse in head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Cancer.* 2011 Apr 15;128(8):1852-9. doi: 10.1002/ijc.25523.
16. Hansen T, Unger R, Gaumann A, Hundorf I, Maurer J, Kirkpatrick J, Kriegsmann J, Expression of Matrix-Degrading Cysteine Proteinase Cathepsin K in Cholesteatoma *Mod Pathol* 2001;14(12):1226–31

17. Hildmann H, Sudhoff H. Cholesteatoma in children. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 1999 5;49 Suppl 1:S81-6.
18. Hilton C., Ondrey F., Wuertz B, . Levine S Interleukin-8 Production in Response to Tumor Necrosis Factor-Alpha by Cholesteatoma Keratinocytes in Cell Culture.
19. Holly A, Sittinger M, Bujia J. Immunohistochemical demonstration of c-myc oncogene product in middle ear cholesteatoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 1995;252(6):366- 9.
20. Homøe P ,Rosborg J. 2006 Family cluster of cholesteatoma *J Laryngol Otol.* 2007 Jan;121(1):65-7. Epub 2006 Oct 24.
21. Hoque MO, Lee CC, Cairns P, Schoenberg M, Sidransky D. Genome-wide genetic characterization of bladder cancer: a comparison of high-density single-nucleotide polymorphism arrays and PCR-based microsatellite analysis. *Cancer Res* 2003; 63: 2216-22.
22. <http://www.oocities.org/hotsprings/villa/1707/kolesteatom.htm>.
23. http://www.thd.org.tr/doc/kurs_pdf/molhem_01.pdf.
24. Huisman MA, de Heer E, Ten Dijke P, Grote JJ. Transforming growth factor beta and wound healing in human cholesteatoma. *Laryngoscope.* 2008 Jan;118(1):94-8.
25. Ishibashi T, Shinogami M, Kaga K, Fukaya T. Keratinocytgrowth factor and receptor mRNA expression in cholesteatoma of the middle ear. *Acta Otolaryngol.* 1997;117(5):714-8.
26. Jahn AF. Cholesteatoma: what is it, how did it get there, and how do we get rid of it? *Otolaryngol Clin North Am* 1989; 22(5): 847-6.
27. Kempainen HO, Puhakka HJ, Laippala PJ, Sipila MM, Manninen MP, Karma PH. Epidemiology and aetiology of middle ear cholesteatoma. *Acta Otolaryngol.* 1999;119.
28. Kwon KH, Kim SJ, Kim HJ, Jung HH. Analysis of gene expression profiles in cholesteatoma using oligonucleotide microarray. *Acta Otolaryngol.* 2006 Jul;126(7):691-7.
29. Lee ST. Cholesteatoma in an Asian population. *Acta Otolaryngol.* 1991;111(3):536-41.
30. Maestro R, Gasparotto D., Vukosavljevic T , Barzan L, S u l f a r o S., Boiocchi M. Three Discrete Regions of Deletion at 3p in Head and Neck Cancers [cancer research 53, 57755779, December 1, 1993.
31. Maleno I, Aptsiauri N, Cabrera T, Gallego A, Paschen A, López-Nevot MA Garrido FFrequent loss of heterozygosity in the β 2-microglobulin region of chromosome 15 in primary human tumors. *Immunogenetics.* 2011 Feb;63(2):65-71. Epub 2010 Nov 18.
32. Mao X, Barfoot R, Hamoudi RA, Easton DF, Flanagan AM, Stratton MR. Allelotype of uterine leiomyomas. *Cancer Genet Cytogenet* 1999; 114: 89-95.
33. Miyazaki H, Kojima H, Tanaka Y, Shiwa M, Koga T, Moriyama H. Terminal differentiation of epithelial cells in middle ear cholesteatoma: investigation of patterns of expression of protein kinase C-delta and protein kinase Ceta. *Laryngoscope.* 1999;109(11):1785-92.
34. Moch, H., Presti, J. C., Jr., Sauter, O., Buchholz, N., Jordan, P., Mihatsch, M. J., and Myers EN, Park K, Chun Y, Lee D, Hwang S. Signal transduction pathway in human middle ear cholesteatoma. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 1999 Jun;120(6):899-904.
35. Nussbaum R., McInnes R., Willard H. Thompson ve Thompson. 6.baskı. Türkiye: Güneş Kitabevi. 2005; s.321-3.

36. Olszewska E, Chodynicky S, Chyczewski L [Evaluation of epithelial proliferation and apoptosis in cholesteatoma of adults]. *Otolaryngol Pol.* 2003;57(1):85-9.
37. Olszewska E, Wagner M, Bernal-Sprekelsen M, Ebmeyer J, Dazert S, Hildmann H, Sudhoff H. Etiopathogenesis of cholesteatoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2004;261(1):6- 24.
38. Parisier SC, Agresti CJ, Schwartz GK, Han JC, Albino AP. Alteration in cholesteatoma fibroblasts: induction of neoplastic-like phenotype. *Am J Otol.* 1993 Mar;14(2):126-30.
39. Park HJ, Park K. Expression of Fas/APO-1 and apoptosis of keratinocytes in human cholesteatoma. *Laryngoscope.* 1999;109(4):613-6.
40. Peek FA, Huisman MA, Berckmans RJ, Sturk A, Van Loon J, Grote JJ. Lipopolysaccharide concentration and bone resorption in cholesteatoma. *Otol Neurotol.* 2003;24(5):709-13.
41. Potsic WP, Samadi DS, Marsh RR, Wetmore RF. A staging system for congenital cholesteatoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2002;128(9):1009-12.
42. Proops D.W, Parkinson E. K Tissue culture of human cholesteatomatous keratinocytes *Clin. Otolaryngol.* 1983. 8, 165-70.
43. Rash EM. Recognize cholesteatomas early. *Nurse Pract.* 2004 Feb;29(2):24-7, quiz 27-9.
44. Robins K.C. *Temel Patoloji 6. Baskı. Çeviri Editörü: Prof. Dr. Uğur Çevikbaş Nobel Tıp Kitabevi; 2000. s.133-5.*
45. Sakamoto T, Kondo K, Yamasoba T, Suzuki M, Sugasawa M, Kaga K. Overexpression of ErbB-2 protein in human middle ear cholesteatomas. *Laryngoscope.* 2004;114(11):1988-91
46. Schuknecht HF. *The Pathology of the ear 1974; Harvard University Press, Boston, Massachusetts; 1974.p. 160.*
47. Sheikholeslam-Zadeh R, Decaestecker C, Delbrouck C, Danguy A, Salmon I, Zick Y, Kaltner H, Hassid S, Gabius HJ, Kiss R, Choufani G. The levels of expression of galectin- 3, but not of galectin-1 and galectin-8, correlate with apoptosis in human cholesteatomas. *Laryngoscope.* 2001;111(6):1042-7.
48. Shinoda H, Huang CC. Expressions of c-jun and p53 proteins in human middle ear cholesteatoma: relationship to keratinocyte proliferation, differentiation, and programmed cell death. *Laryngoscope.* 1995;105(11):1232-7.
49. Sudhoff H, Bujia J, Holly A, Kim C, Fisseler-Eckhoff A. Functional characterization of middle ear mucosa residues in cholesteatoma samples. *Am J Otol.* 1994;15(2):217-21.
50. Sudhoff H, Fisseler-Eckhoff A, Stark T, Borkowski G, Luckhaupt H, Cooper J, Michaels L. Argyrophilic nucleolar organizer regions in auditory meatal skin and middle ear cholesteatoma. *Clin Otolaryngol Allied Sci.* 1997;22(6):545- 9
51. Tumarkin A. On the nature and significance os hypocellularity of the mastoid. *J Laryngol Otol.* 1959,73:34-7.
52. Vogelstein B, Fearon ER, Kern SE, Hamilton SR, Preisinger AC, Nakamura Y, White R. Allelotype of colorectal carcinomas. *Science* 1989; 244: 207-11.
53. Yetiser S, Satar B, Aydin N. Expression of epidermal growth factor, tumor necrosis factor-alpha, and interleukin-1alpha in chronic otitis media with or without cholesteatoma. *Otol Neurotol.* 2002;23(5):647-52.

54. Yoo WJ, Cho SH, Lee YS, Park GS, Kim MS, Kim BK, Park WS, Lee JY, Kang CS J Loss of heterozygosity on chromosomes 3p,8p,9p and 17p in the progression of squamous cell carcinoma of the larynx Korean Med Sci.2004 Jun;19(3):345-51.
55. Yoshikawa M, Kojima H, Wada K, Tsukidate T, Okada N, SaitoH, Moriyama H. Identification of Specific Gene Expression Profiles in Fibroblasts Derived From Middle Ear Cholesteatoma. Arch Otolaryngol Head Neck Surg. 2006;132:734-742.
56. Yune TY, Byun JY.Expression of PTEN and phosphorylated Akt in human cholesteatoma epithelium. Acta Otolaryngol. 2009 May;129(5):501-6.

9. EKLER

EK-A

**T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SELÇUKLU TIP FAKÜLTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARLARI**

Toplantı Sayısı: 03

Toplantı Tarihi : 26.04.2011

Karar Sayısı 2011-25 Selçuklu Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof.Dr.Hasan ACAR'ın, proje yürütücülüğünü yaptığı "Kolestoatomlu hastalarda genomik instabilitenin araştırılması" başlıklı araştırmasının değerlendirilme talebi ile ilgili 22.04.2011 tarihli dilekçesi ve ekleri görüşüldü.

Yapılan inceleme ve görüşmelerden sonra; Selçuklu Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof.Dr. Hasan ACAR'ın, "Genetik temeli bilinmeyen kolesteatomdaki genetik insabilitenin göstergesi olan LOH'un analizi ile genomdaki farklı bölgeleri incelemeyi amaçlamak" temel amaçlı olan "Kolestoatomlu hastalarda genomik instabilitenin araştırılması" başlıklı araştırmasının uygun olduğuna oy birliği ile karar verildi.

ASLI GİBİDİR
26.04.2011
Zeynep ANDI ÖNDER
Raportör
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

BİLGİLENDİRİLMİŞ ONAY FORMU

Araştırmamızda, ~~kolesteatomlu~~ hastalarda, hastalığa sebep olan genetik ~~bozuklukların~~ moleküler genetik yöntemlerle araştırılması amaçlanmaktadır. Çalışmamızda da elde edilen verilere göre bu hasta ~~gruplarında~~ hastalığın moleküler mekanizmasının aydınlatılması hedeflenmektedir.

Araştırmanın 12 ay içinde tamamlanması hedeflenmektedir.

Kulak Burun Boğaz Anabilim dalında ameliyat edilen ~~kolesteatoma~~ tanısı konmuş 15 hastadan dokular alınacaktır. Yapılacak tetkik ve tahliller sonucunda hastadan ~~hiçbir şekilde~~ maddi yük talep edilmeyecektir.

~~Hastalar için~~ alınarak çalışmaya dahil edileceklerdir. Hastaların kimliği gizli tutularak bilgi ve bulgulardan yararlanılacaktır. Araştırma sırasında gözlenen bulgular gerekirse yayın olarak kullanılacaktır.

Araştırmada yer alacak kolesteatoma hasta sayısı en az 15 olarak düşünülmektedir.

Çalışma süresi içinde herhangi bir nedenle Salçuklu Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik A.B.D başkanı ~~Prof.Dr.Hassan ACAR'a~~ Oda : (332) 2415000- 40130 GSM: (533)346 06 35 ~~no.lu~~ telefonlardan ulaşılabılır.

Gönüllü istemediği durumda araştırmadan çıkarılacaktır. Kullanılacak materyal bozulduğu ve yeniden materyal alımı mümkün olmadığı durumlarda hasta araştırma dışı bırakılacaktır.

Gönüllü araştırmadan istediği zaman vazgeçme hakkına sahiptir.

Gebe hastalar çalışmaya ~~dahil~~ edilmeyecektir.

Yukarıda belirtilen araştırmadan önce verilmesi gereken bilgileri gösteren metni okudum. Bunlar hakkında bana yazılı ve sözlü açıklamalar yapıldı. Bu konularda söz konusu Klinik Araştırmaya kendi rızamla, hiçbir ~~şeyi~~ ve zorlama olmaksızın katılmayı kabul ediyorum.

Tarih

Gönüllünün Adı soyadı, İmzası, Adresi (varsa telefon/faks no.)

Velayet veya vesayet altında bulunmaları için veli veya vasisinin ~~Adı, Soyadı,~~ imzası (varsa telefon/faks no.)

Açıklamaları yapan araştırmacının Adı soyadı, İmzası:

Herhangi bir nedenle başvurulacak doktorun Adı soyadı, İmzası (varsa telefon/faks no.)

Rıza alma işlemine bağandan sonra kadar tasdik eden kişinin ~~Adı, Soyadı, İmzası, Görevi.~~

10.ÖZGEÇMİŞ

1985'te Ankara'da doğdu. İlk ve ortaokulu Ankara'da tamamladı. 2003'te Özel Nene Hatun Fen Lisesi'nden, 2008'de Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden mezun oldu. 2009'da yüksek lisansa Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nde Tıbbi Genetik Anabilim Dalında başladı.