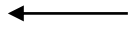


Adınızı soyadınızı giriniz

Tez kabul edildikten sonra yapılan **sabit ciltte sırt yazısı** bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak
Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya
(sol yandaki gibi) olacak .



Tez, Yüksek Lisans'sa, YÜKSEK LİSANS TEZİ;
Doktora ise DOKTORA TEZİ ifadesi kalacak



Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**FONKSİYONEL OLMAYAN HİPOFİZ ADENOMLARINDA
MOLEKÜLER MEKANİZMALARIN ARAŞTIRILMASI**

DERYA METİN ARMAĞAN

**DANIŞMAN
MELEK ÖZTÜRK SEZGİN**

**TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
TIBBİ BİYOLOJİ PROGRAMI**

İSTANBUL- 2018

TEZ ONAYI**DOKTORA TEZİ ONAYI**

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Tıbbi Biyoloji Programında Doktora öğrencisi Derya METİN ARMAĞAN tarafından Prof. Dr. Melek ÖZTÜRK SEZGİN' in danışmanlığında hazırlanan "Fonksiyonel Olmayan Hipofiz Adenomlarında Moleküler Mekanizmaların Araştırılması" başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından 10/09/2018 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavında başarılı bulunmuş ve Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı (Danışman)

Prof. Dr. Melek ÖZTÜRK SEZGİN
İ.Ü.-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

**Jüri**

Prof. Dr. Nurperi GAZİOĞLU
İstanbul Bilim Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Nöroşirürji Anabilim Dalı

**Jüri**

Prof. Dr. Pınar KADIOĞLU
İ.Ü.-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi
İç Hastalıkları Anabilim Dalı
Endokrinoloji Metabolizma ve Diyabet Bilim Dalı

**Jüri**

Doç. Dr. Nil ÇOMUNOĞLU ÜSTÜNDAĞ
İ.Ü.-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi
Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı

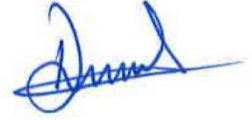
**Jüri**

Doç. Dr. Gülay BULUT
Bahçeşehir Üniversitesi
Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla 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 olmadığı beyan ederim.

Derya METİN ARMAĞAN



İTHAF

Anneme, Babama ve Eşıme ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Değerli destekleri için Anabilim Dalı başkanımız Prof. Dr.Turgut ULUTİN'e, doktora eğitimim ve bu çalışmanın her aşamasında, bilgi ve tecrübesiyle beni yönlendiren, hiçbir zaman desteğini benden esirgemeyen, akademik kişiliği ve çalışma prensipleri ile bana örnek olan, birlikte çalışmaktan her zaman mutluluk duyacağım değerli danışmanım Prof. Dr. Melek ÖZTÜRK SEZGİN'e teşekkür ederim. Cedars-Sinai Medical Center'da 3 aylık ziyaretçi öğrenci stajım boyunca hipofiz adenom çalışmaları ile önümde yeni ufuklar açan ve bilimsel fikirleriyle her zaman destek olan Prof. Dr. Shlomo MELMED ve tüm çalışma ekibine özellikle de ön çalışmamı gerçekleştirmemde desteğini esirgemeyen ve dostluğu ile her zaman yanımda olan Doç. Dr. Hiraku KAMEDA'ya teşekkürü bir borç bilirim. Çalışmamın önemli bir kısmını gerçekleştirmemde desteklerini esirgemeyen, maddi ve manevi katkıları ve bilimsel destekleri ile Prof. Dr. Pınar KADIOĞLU'na, Doç. Dr. Nil ÇÖMÜNOĞLU ÜSTÜNDAĞ'a, Doç. Dr. Gülay BULUT'a ve Prof. Dr. Nurperi GAZİOĞLU'na, çalışmalarım süresince yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Selma YILMAZER'e, Doç. Dr. Duygu GEZEN-AK'a, Prof. Dr. Matem TUNÇDEMİR'e, Doç. Dr. Fatma DAĞISTANLI'ya, desteklerini hep yanımda hissettiğim ve dostluklarını esirgemeyen M.Sc İrem L. ATASOY, M.Sc Ayşe Seda AKDEMİR'e, Barış SERGİ'ye ve İrem POLAT'a teşekkür ederim.

Tüm hayatım boyunca bana her konuda sonuna kadar destek olan, haklarını hiçbir zaman ödeyemeyeceğim, varlıklarıyla bana huzur veren sevgili aileme, en sıkıntılı anlarımda yanımda olan, beni destekleyen, her türlü konuda bana yardımcı olan ve yalnız bırakmayan sevgili eşime ve özellikle de benimle her zaman gurur duymuş olan ve yattığı yerde yine gurur duyduğuna inandığım sevgili anneme sonsuz teşekkür ediyorum.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TDK-2017-25404

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİİ
BEYAN.....	İV
İTHAF.....	V
TEŞEKKÜR.....	VI
İÇİNDEKİLER	Vİİ
TABLolar LİSTESİ.....	İX
ŞEKİLLER LİSTESİ	X
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	Xİİ
ÖZET	XİV
ABSTRACT.....	XV
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Hipofiz Bezi	4
2.1.1. Hipofiz Bezinin Embriyolojik Kökeni ve Anatomisi	4
2.1.1.1. Hipotalamohipofizyal portal sistem	6
2.1.2. Hipofiz Bezin Yapısı ve Fonksiyonu	8
2.1.2.1. Hipofiz Bezinin Anterior Lobu (Adenohipofiz)	8
2.1.2.2. Hipofiz Bezinin Posterior Lobu (Nörohipofiz)	13
2.2. Hipofiz Bezinin Hormonları	14
2.2.1. Büyüme Hormonu.....	14
2.2.2. Prolaktin.....	15
2.2.3. Gonadotropinler: FSH ve LH.....	15
2.2.4. Tiroid stimulan hormon (tirotropin).....	16
2.2.5. Adrenokortikotropik hormon	16
2.3. Hipofiz Adenomları	17
2.3.1. Hipofiz Adenomlarının WHO (Dünya Sağlık Örgütü) 2017 Sınıflandırılması	18
2.3.2. Akromegali.....	20
2.3.3. Cushing Hastalığı.....	20
2.3.4. Fonksiyonel Olmayan Hipofiz Adenomları	21
2.4. Hücre Döngüsü	22
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	35

3.1. p16, Rb, pRb-S608, E2F1, pE2F1-S364, p73 ve pATM-S1981 Proteinlerin Ekspresyon Seviyelerinin İmmunhistokimyasal Boyama Yöntemi ile Belirlenmesi ...	36
3.1.1. İmmünhistokimyasal boyamanın değerlendirilmesi	37
3.2. ATM, CCDN1(SiklinD1), CDKN2A(p16), CHEK2(Chk2), E2F1, RB1 ve Tp73 Genlerin mRNA Ekspresyon Seviyelerinin qRT-PCR Yöntemi ile Belirlenmesi.....	38
3.2.1. Total RNA İzolasyonu	38
3.2.2. Total RNA Konsantrasyon ve Saflık Ölçümü.....	39
3.3. E2F1 Protein Ekspresyon Seviyesinin Western Blot Yöntemi ile Karşılaştırılması	41
3.3.1. Total Protein İzolasyonu	41
3.3.2. Protein Konsantrasyonunun Hesaplanması.....	41
3.3.3. Western Blot Protokolü.....	41
3.4. İstatiksel Değerlendirme	42
4. BULGULAR.....	44
4.1. pATM-S1981, pRb-S608, Rb, pE2F1-S364, p16, E2F1 ve p73 Proteinlerin Ekspresyon Seviyelerinin İmmunhistokimyasal Boyama Sonuçları	44
4.1.1. Histopatolojik İHK sonuçları	44
4.2. Akromegali, Cushing ve NFA Hasta Gruplarında ATM, CCDN1(SiklinD1), CDKN2A(p16), CHEK2(Chk2), E2F1, RB1 ve Tp73 Genlerin mRNA Ekspresyon Seviyelerinin qRT-PCR Analiz Sonuçları	58
4.3. Akromegali, Cushing ve NFA Hasta Gruplarında E2F1 Protein Ekspresyon Seviyelerinin Western Blot Analiz Sonuçları	62
5. TARTIŞMA	63
KAYNAKLAR	69
FORMLAR	72
ASGARİ BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	72
ETİK KURUL KARARI	74
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	75
ÖZGEÇMİŞ	76

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 3-1: İHC analizinde kullanılan primer antikorlar	37
Tablo 3-2: qRT-PCR’da kullanılan primerler.....	40
Tablo 3-3: qRT- PCR reaksiyon içeriği.....	40
Tablo 3-4: qRT-PCR Sıcaklık Döngüsü	40
Tablo 4-1: Akromegali, Cushing Hastalığı ve NFA hasta gruplarında hastalık kriterlerinin (yaş, cinsiyet, mitoz, p53, Ki-67) frekans ve yüzde dağılımlarının karşılaştırılması.....	51
Tablo 4-2:Akromegali, Cushing ve NFA hasta grupları arasında hücre döngüsü düzenleyici proteinlerinin ekspresyonlarına ait verilerin (yaş, pATM-S1981, pRb-S608, Rb, E2F1364, p16, E2F1 ve p73) karşılaştırılması.....	51
Tablo 4-3: Akromegali, Cushing ve NFA hasta gruplarında hastalık kriterleri ve çalışılan hücre döngüsüne ait proteinlerin ekspresyonlarına ait veriler (yaş, Mitoz, p53, Ki-67, pATM-S1981, pRb-S608, Rb, E2F1364, p16, E2F1 ve p73) arasındaki ilişkiler.	54
Tablo 4-4: Akromegali hasta grubunda hastalık kriterleri ve çalışılan hücre döngüsüne ait proteinlerin ekspresyonlarına ait veriler (yaş, Mitoz, p53, Ki-67, pATM-S1981, pRb-S608, Rb, E2F1364, p16, E2F1 ve p73) arasındaki ilişkiler	55
Tablo 4-5: Cushing Hastalığı grubunda hastalık kriterleri (yaş, Mitoz, p53, Ki-67) ve pATM-S1981, pRb-S608, Rb, E2F1364, p16, E2F1 ve p73 proteinleri arasındaki ilişkiler	56
Tablo 4-6: Fonksiyonel Olmayan Hipofiz Adenom hasta gruplarında hastalık kriterleri (yaş, Mitoz, p53, Ki-67) ve pATM-S1981, pRb-S608, Rb, E2F1364, p16, E2F1 ve p73 proteinleri arasındaki ilişkiler	57

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Hipofiz bezinin ve hipotalamusun yerleşimi.....	4
Şekil 2-2: Hipofiz bezinin ve hipotalamusun bölümleri	5
Şekil 2-3: Hipotalamus ve hipofiz bezi arasındaki yapısal ve fonksiyonel nöroendokrin ilişkiler	7
Şekil 2-4: Anterior hipofizdeki asidofil, bazofil ve kromofob hücreler	9
Şekil 2-5: Hipotalamus-hipofiz düzenlenmesi ve hipofiz adenom patogenezi.....	18
Şekil 2-6: Hipofiz adenom oluşumunun basamakları.....	19
Şekil 2-7: Hipofiz adenom oluşumu ile ilgili hücre içi sinyal yolları.....	22
Şekil 2-8: Hücre döngüsünün evreleri	23
Şekil 2-9: Hücre döngüsünde siklinler ve Cdk'ların rolleri.....	25
Şekil 2-10: Senesens p53 ve p16– Rb yolları tarafından kontrol edilir	27
Şekil 2-11: Hücre döngüsünün G1-S geçişinin siklin D1, Cdk4 ve p16 tarafından düzenlenmesi	29
Şekil 2-12: DNA hasar yanıtı.....	31
Şekil 2-13: DNA hasarı ATM ve Chk2'yu aktiveleştirir	32
Şekil 2-14: Chk2 hücre döngüsü kontrolündeki anahtar proteinleri fosforiller.....	33
Şekil 3-1: Pozitif kontrol dokuları	37
Şekil 4-1:Akromegali, Cushing ve NFA hasta gruplarına ait hipofiz dokularında pATM-S1981 immunpozitif hücrelerin dağılımı.	44
Şekil 4-2: Akromegali, Cushing ve NFA hasta gruplarına ait hipofiz dokularında pRb-S608 immunpozitif hücrelerin dağılımı.	45
Şekil 4-3:Akromegali, Cushing ve NFA hasta gruplarına ait hipofiz dokularında Rb immunpozitif hücrelerin dağılımı.	46
Şekil 4-4: Akromegali, Cushing ve NFA hasta gruplarına ait hipofiz dokularında pE2F1-S364 immunpozitif hücrelerin dağılımı.	47
Şekil 4-5: Akromegali, Cushing ve NFA hasta gruplarına ait hipofiz dokularında p16 immunpozitif hücrelerin dağılımı.	48
Şekil 4-6: Akromegali, Cushing ve NFA hasta gruplarına ait hipofiz dokularında E2F1 immunpozitif hücrelerin dağılımı.	49
Şekil 4-7: Akromegali, Cushing ve NFA hasta gruplarına ait hipofiz dokularında p73 immunpozitif hücrelerin dağılımı.	50

Şekil 4-8: Akromegali, Cushing ve NFA hasta grupları arasında) CCDN1(SiklinD1) mRNA ekspresyonunun karşılaştırılması	58
Şekil 4-9: Akromegali, Cushing ve NFA hasta grupları arasında CDKN2A(p16) mRNA ekspresyonunun karşılaştırılması	59
Şekil 4-10: Akromegali, Cushing ve NFA hasta grupları arasında CHEK2(Chk2) mRNA ekspresyonunun karşılaştırılması	59
Şekil 4-11: Akromegali, Cushing ve NFA hasta grupları arasında ATM mRNA ekspresyonunun karşılaştırılması	60
Şekil 4-12: Akromegali, Cushing ve NFA hasta grupları arasında E2F1 mRNA ekspresyonunun karşılaştırılması	60
Şekil 4-13: Akromegali, Cushing ve NFA hasta grupları arasında RB1mRNA ekspresyonunun karşılaştırılması	61
Şekil 4-14: Akromegali, Cushing ve NFA hasta grupları arasında TP73mRNA ekspresyonunun karşılaştırılması	61
Şekil 4-15: Akromegali, Cushing ve NFA Hasta Gruplarında E2F1 Protein Ekspresyon Seviyelerinin Western Blot Analiz Sonuçları	62

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

γ -LPH	: γ -Lipotrofik Hormon
β -LPH	: β -Lipotropik Hormon
β -MSH	: β -Melanosit Stimüle Edici Hormon
α -MSH	: α -Melanosit Uyarıcı Hormon
$\alpha\beta$	: İnhibin
$\beta\beta$	: Aktivin
ACTH	: Adenokortikotropik Hormon
ADH	: Antidiüretik Hormon
ATM	: Ataxia-Telangiectasia, Mutated (ATM serin/threonin kinaz)
ATR	: Ataxia-Telangiectasia and Rad3-Related
CAK	: Cdk-Aktifleştiren Kinaz
cAMP	: Siklik Adenozin Monofosfat
CCDN1	: Siklin D1
CDK	: Siklin Bağımlı Kinaz
CDK1	: Siklin Bağımlı Kinaz 1
CDKN2A	: P16 Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A (Siklin Bağlı Kinaz 2A)
Chk1	: Checkpoint Kinase 1
Chk2	: Checkpoint Kinase 2
CHK2	: checkpoint kinase-2 (kontrol noktası kinaz-2)
CIP	: Cdk-Interacting Protein
CLIP	: Kortikotropin Benzeri Ara Peptid
CRH	: Kortikotropin Salgılatıcı Hormon
E2F1	: E2F transcription factor 1 (E2F transkripsiyon faktör 1)
E2F1	: E2F Transcription Factor 1 (E2F Transkripsiyon Faktör 1)
FIPA	: Ailevi İzole Hipofiz Adenomları
FSH	: Folikül Stimulan Hormon
GFAP	: Glial Fibriller Asidik Protein
GH	: Büyüme Hormonu
GHRH	: Büyüme Hormonu Salgılatıcı Hormon
GnRH	: Gonadotropin Salgılatıcı Hormon
HSCORE	: Histolojik Skorlama, H Skoru

IGF-1 : İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü-1
INK4 : İnhibitör of Cdk4
İHK : İmmünohistokimya
KIP : Kinase Inhibitor Protein
LH : Lüteinize Stimulan Hormon
LHRH : LH Salgılatıcı Hormon
MEN1 : Multipl Endokrin Neoplazi 1
met-enk : met-enkefalin
MSH : Melanosit Stimüle Eden Hormonlar
MSS : Merkezi Sinir Sistemi
NFA : Fonksiyonel Olmayan Hipofiz Adenomu
PAS : Periyodik Asit-Schiff
POMC : Proopiomelanokortin
PRH : Prolaktin Uyarıcı Hormon
PRL : Prolaktin
PTTG1 : Pituitary Tumor-Transforming Gene 1
qRT-PCR : Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
r : Korelasyon Katsayısı
Rb : Retinoblastoma protein
RB1 : Transcriptional Corepressor 1 (Transkripsiyonal Koreseptör 1)
T3 : Triiyodotironin
T4 : Tiroksin
TP53 : Tümör Baskılayıcı Protein 53
TP73 : Tümör Baskılayıcı Protein 73
TRH : Tirotropin Salgılatıcı Hormon
TSH : Tiroid Stimulan Hormon
U2OS : Kemik Osteosarkoma Epitel Hücreleri
VIP : Vazoaktif Intestinal Peptidin
WHO : Dünya Sağlık Örgütü
µl : Mikrolitre

ÖZET

Metin-Armağan, D. (2018). Fonksiyonel Olmayan Hipofiz Adenomlarında Moleküler Mekanizmaların Araştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji ABD. Doktora Tezi. İstanbul.

Fonksiyonel olmayan hipofiz adenom (NFA) oluşumunun moleküler mekanizması halen bilinmemektedir. Bu çalışmada NFA ve fonksiyonel hipofiz adenomlarında hücre döngüsü ve DNA hasar kontrol mekanizmalarına katılan proteinlerin ekspresyonları arasındaki ilişkiyi araştırdım. 20 Akromegali, 20 Cushing Hastalığı ve 27 NFA hasta gruplarında p16, Rb, pRb-S608, E2F1, pE2F1-S364, p73, Siklin D1, CHEK2 ve pATM-S1981'nin protein ve mRNA ekspresyonlarını immünohistokimya, western blot ve qRT-PCR yöntemleri ile analiz ettim. Tüm sonuçlar hastaların klinik ve histopatolojik bulgularıyla istatistiksel olarak karşılaştırıldı. NFA'da Siklin D1 mRNA ekspresyonu ile Rb protein ekspresyonu yüksek seviyelerde saptandı. Ayrıca, E2F1 ile pE2F1-S364 protein ekspresyon seviyeleri yüksek, p16 mRNA ve protein ekspresyonu düşük olarak tespit edildi. Cushing hasta grubunda ise CHEK2 mRNA ekspresyonu ile p16 mRNA ve protein ekspresyonları yüksek iken E2F1, pE2F1-S364 ve p73 protein ekspresyon düzeyleri düşük olarak gösterildi. Akromegali'de ise Siklin D1 ile CHEK2 mRNA ve Rb protein ekspresyonları düşük iken, pE2F1-S364 ve p73 protein ekspresyon seviyeleri yüksek olarak saptandı.

Cushing, Akromegali ve NFA hastalarında adenom oluşumuna katılan E2F1 mRNA ve protein ekspresyon seviyeleri, pE2F1-S364 ve p73 proteinlerinin ekspresyon düzeyleri ve ayrıca CHEK2 mRNA ekspresyonları arasındaki ilişki ilk kez bu çalışma ile gösterildi.

Bu çalışmanın bulguları hipofiz adenomlarının patogenezinde rol alan moleküler mekanizmaları aydınlatmaya yardımcı olacak hastalığın tedavisinde ve önlenmesinde yeni yaklaşımların geliştirilmesine olanak sağlayabilecektir.

Anahtar Kelimeler : Fonksiyonel olmayan hipofiz adenomu, pE2F1-S364, E2F1, CHEK2, p73

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TDK-2017-25404

ABSTRACT

Metin-Armağan, D. (2018). Investigation of Molecular Mechanisms in Nonfunctioning Pituitary Adenomas. İstanbul University, Institute of Health Science, Department of Medical Biology, Ph.D Thesis. İstanbul.

The molecular mechanism of nonfunctioning pituitary adenoma (NFA) formation is still unknown. In this study, I have investigated the relationship between NFA and functional pituitary adenomas and expression of mRNA and proteins which are involved in cell cycle and DNA damage control mechanisms.

In this study, I analyzed p16, Rb, pRb-S608, E2F1, pE2F1-S364, p73, CyclinD1 protein and mRNA expression in twenty acromegaly, twenty Cushing's disease and twenty-seven NFA patients with immunohistochemistry, western blotting, and qRT-PCR. The results were statistically evaluated with the clinical and histopathological findings of the patients. Cyclin D1 mRNA expression and Rb protein expression were high in NFA. In addition, whereas E2F1 and pE2F1-S364 protein expression levels were high, p16 mRNA and protein expression were low in NFA. In the Cushing group, CHEK2 mRNA expression and p16 mRNA and protein expression were high while E2F1, pE2F1-S364 and p73 protein expression levels were low. In acromegaly, expression of CHEK2 mRNA, Rb protein and Cyclin D1 mRNA was low, while pE2F1-S364 and p73 protein expression levels were high.

This is the first demonstration of the relationship between E2F1, pE2F1-S364, CHEK2 and p73 mRNA and protein expression levels involved in adenoma formation in NFA, Cushing, and Acromegaly patients.

The results of this study will help to elucidate the molecular mechanisms underlying pathogenesis of pituitary adenomas and will contribute for the development of new approaches in the treatment and prevention of disease.

Keywords: Nonfunctioning pituitary adenoma, pE2F1-S364, E2F1, CHEK2, p73

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University. Project No: TDK-2017-25404

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Hipofiz adenomları kafa içi tümörlerinin %15'ini oluşturur (Melmed 2011). Hipofiz tümörleri hiperplastik büyümelerden ziyade, tek bir öncül hücrenin çoğalmasından meydana geldiği ileri sürülen monoklonal selim adenomlardır. Bu monoklonal adenomlar farklılaştıkları hücre orjinlerini yansıtan spesifik hormonları salgırlar (Kovacs ve ark. 2001). Aşırı büyüme hormonu (GH) salgılayan somatotropinomalar gigantizm veya akromegaliye neden olurlar. Prolaktinomalar prolaktin (PRL) salgırlar, hipogonadizm ve galaktoreye neden olurlar. Adenokortikotropik hormon (ACTH) salgılayan kortikotropik tümörler Cushing hastalığı ile sonuçlanırlar, tiroid stimulan hormon (TSH) salgılayan tümörler tiroitroplardan meydana gelirler ve hipertiroidizme yol açarlar. Ayrıca, gonadotrop hücreler de adenom oluşumuna sebebiyet verirler fakat luteinizan hormon (LH) veya folikül-stimulan hormonları (FSH) az miktarda salgırlar veya hormon salgılamazlar, çoğu klinik olarak fonksiyonel olmayan adenomlardır (Melmed 2003).

Klinik olarak fonksiyonel olmayan (nonfonksiyonel, NFA) adenomlar tamamen semptomsuzdur ve erken teşhisleri zordur. Çoğunlukla otopside ya da büyük boyutlara ulaşanların bası etkisiyle ortaya çıkan önemli hipofiz yetersizliği veya görme ile ilişkili semptomların nedenlerinin araştırılması sırasında kafa içi manyetik rezonans görüntüleme veya bilgisayarlı tomografi incelemesinde tespit edilirler. Klinik olarak fonksiyonel olmayan adenomların dörtte üçü gonadotrop adenomlardır (Young ve ark. 1996). Nadiren, NFA'lar ACTH, GH, PRL veya TSH pozitif olarak bulunabilir, fakat bu hormonları klinik sendromlara neden olacak kadar yeterli miktarda salgılayamazlar; bu tümörler “sessiz” kortikotrop, somatotrop, laktotrop veya tirotrop adenomlar olarak adlandırılırlar (Yamada ve ark. 1991). Ayrıca, herhangi bir hormon ve transkripsiyon faktörü pozitifliği bulunmayan fonksiyon göstermeyen adenomlar ise hücresiz (null-cell) adenom olarak adlandırılırlar (Nishioka ve ark. 2015).

NFA'nın moleküler ve patolojik mekanizması henüz tam olarak bilinmemektedir. Gen ekspresyon ve proteomik analizler ile bu adenomların gelişiminde hücre döngüsündeki duraksama, senesens ve DNA hasarında rol alan çeşitli genlerin etkili olduğunu ileri süren çalışmalar vardır. Proteomik analiz sonuçlarına göre NFA'da,

MAPK sinyal yolağına, oksidatif strese, mitokondriyal fonksiyonlara ve hücre döngü kontrolüne katılan bazı proteinlerin rol aldıkları, ayrıca NFA alt tiplerine göre hatta kişiye özel fonksiyonel işlevleri olabildiği de vurgulanmıştır (Moreno ve ark. 2005) (Zhan ve ark. 2014)

Rathke kesesi hücrelerinden köken alan hipofiz progenitör hücrelerinin gelişimi ile özgün hormon sentezleyen farklılaşmış hücreye dönüşümü hücre döngüsü proteinleri tarafından sıkı bir şekilde kontrol edilir. Transkripsiyon faktörleri veya hücre döngüsü düzenleyicilerinin fonksiyon eksikliği hipofiz hipoplazisine ve hipofiz salgı bozukluklarından dolayı değişik klinik sonuçlara neden olur. Fare modellerinde, siklin bağımlı kinaz 1 (CDK1) ve PTTG1 (pituitary tumor-transforming gene 1) dahil olmak üzere hücre döngüsü düzenleyici genlerin delesyonu postnatal hipofiz hipoplazisi ile sonuçlanır. Hipofiz gelişimindeki bu önemli proteinler hipofiz adenomlarının gelişiminde de önemli rol oynamaktadır. NFA' da siklinler aşırı ifade olmasına rağmen hipofiz hücre döngüsü düzensizliği ile ilgili mekanizma halen belirsizliğini sürdürmektedir (Melmed 2011).

Hipofiz adenomları selim karakterlidir ve selim adenomların oluşumuna neden olan mekanizmalar tam olarak aydınlatılmamıştır. Adenomların gelişiminde etkili olan mekanizmalar için çeşitli hipotezler öne sürülmektedir. Bunlardan biri hücre döngüsünün kontrolünün bozulması ve hücre döngüsünün duraksaması, ve sonuçta hücrenin senesense girmesidir (Melmed 2011). Erken proliferatif duraksamanın veya hücre senesensinin yavaş büyüyen selim tümörlerde veya tümörün erken evresinde meydana geldiği, geç evrede ve malign tümörlerde bu duraksamanın olmadığı ileri sürülmüştür (Bartkova ve ark. 2006).

Hipofiz adenomları, özellikle inaktif mikroadenomlar, yıllarca durağan bir büyüme sergilerler. Hipofiz tümörlerinde hücre proliferasyonunun duraksamasına neden olan mekanizmanın, DNA hasarı ve buna bağlı olarak Rb fosforilasyonunu baskılayan CDK inhibitörü p21'in p53 aracılığıyla uyarılarak hücre döngüsünü G1 evresinde duraksatması ile ilişkili olduğu öne sürülmüştür (Melmed 2011) (Schmitt ve ark. 2002).

Fonksiyonel hipofiz adenomlarında immünohistokimya analizi ile yapılan bir çalışmada p16, pRb ve siklin D1'in ameliyat sonrası nüks ile ilişkili oldukları gösterilmiştir (Lee ve ark. 2014). Bir diğer çalışmada 36 insan gonadotrop orijinli NFA

doku örneklerinin tamamında DNA hasarı varlığı ve p16'nın ifade edildiği tespit edilmiş, p16'nın NFA ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Chesnokova ve ark. 2011).

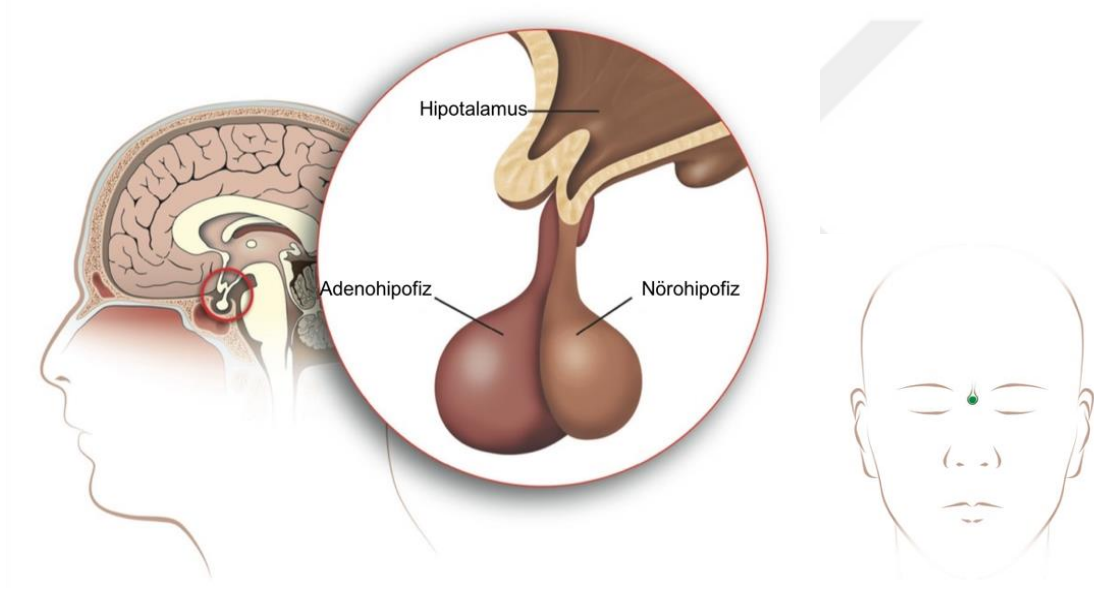
DNA hasarı sonrasında E2F1 ile fosforile Rb arasındaki paradoksal ilişkinin nasıl düzenlendiğinin araştırıldığı insan U2OS (kemik osteosarkoma epitel hücreleri) hücreleri ile yapılan bir çalışmada, sadece Serin364 bölgesinden fosforillenen E2F1'in fosforile-Rb ile kompleks oluşturduğu ve proapoptotik p73 genini hedefleyerek apoptozu teşvik ettiği gösterilmiştir. E2F1'in DNA hasarı ile ilişkili olarak apoptozdaki önemli rolü ortaya çıkarılmıştır. E2F1 üzerindeki Serin364 bölgesinin (E2F1'in serin 364 bölgesi CHK2 tarafından fosforilenmektedir) sadece primatlarda bulunduğu ve E2F1'in primatların DNA hasar yanıtı için çok önemli bir protein olduğu gösterilmiştir (Carnevale ve ark. 2012). Bir çalışmada, E2F1 aracılı POMC transkripsiyonunun ektopik Cushing sendromunda ACTH üretimini baskılamak için potansiyel bir hedef olduğu ve ayrıca başka bir çalışmada E2F1'in spesifik olarak PTTG1 promotoruna bağlandığı ve PTTG1'in doğrudan bir E2F1 hedefi olarak hareket edebileceğini göstermişlerdir (Araki ve ark. 2016; Zhou ve ark. 2009). Dahası, E2F1 aktivasyonunun, HMGA2 geninin aşırı ekspresyonu ile uyarılan hipofiz adenomlarından sorumlu olduğu saptanmış ve hipofiz adenom patolojisinde E2F1 aktivasyonunun kritik bir rol oynadığı ileri sürülmüştür (Fedele ve ark. 2006). Fakat NFA'da E2F1 ile ilgili bir çalışma bulunmamaktadır.

Fonksiyonel olmayan hipofiz adenomlarının oluşum mekanizmaları henüz tam olarak bilinmemektedir, özellikle hücre döngüsü ve senesens mekanizmalarına katılan proteinlerin rolleri ile ilgili bilinmeyenler fazladır. Yukarıda verilen bilgiler ışığında bu mekanizmaların olası rollerini ortaya çıkarabilmek amacıyla bu çalışmada; fonksiyonel olmayan hipofiz adenomlarının gelişiminde etkileri olabileceği düşünülen fakat moleküler mekanizmadaki rolleri bilinmeyen, hücre döngüsünde kritik rollere sahip tümör baskılayıcı yolak ile ilişkili ve DNA hasar kontrol ve yanıtında önemli rol oynayan p16, Rb, pRb-S608, siklin D1, E2F1, pE2F1-S364, pATM-S1981, CHEK2 ve p73'ün mRNA ve protein ekspresyonları arasındaki ilişkiyi saptamayı amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Hipofiz Bezi

Hipofiz bezi, glandüler epitel dokusundan ve nöral dokudan oluşur. Hipofiz bezi 0.5 - 1.5 g ağırlığında bileşik endokrin bezdir. Sella tursika denilen sfenoid kemiğin eyer şeklindeki çöküntüsünde bulunur ve beyin tabanında orta hatta yerleşmiştir (Şekil 2-1). Hipofiz bezini, kısa bir sap olan infundibulum ve vasküler bir ağ hipotalamusa bağlar (Ross ve Pawlina 2016).



Şekil 2-1: Hipofiz bezinin ve hipotalamusun yerleşimi

(Society 2015'den uyarlanmıştır.)

2.1.1. Hipofiz Bezinin Embriyolojik Kökeni ve Anatomisi

Hipofiz bezi, embriyolojik olarak farklı iki dokudan oluşur:

Anterior lob (adenohipofiz), bez epiteli dokusu

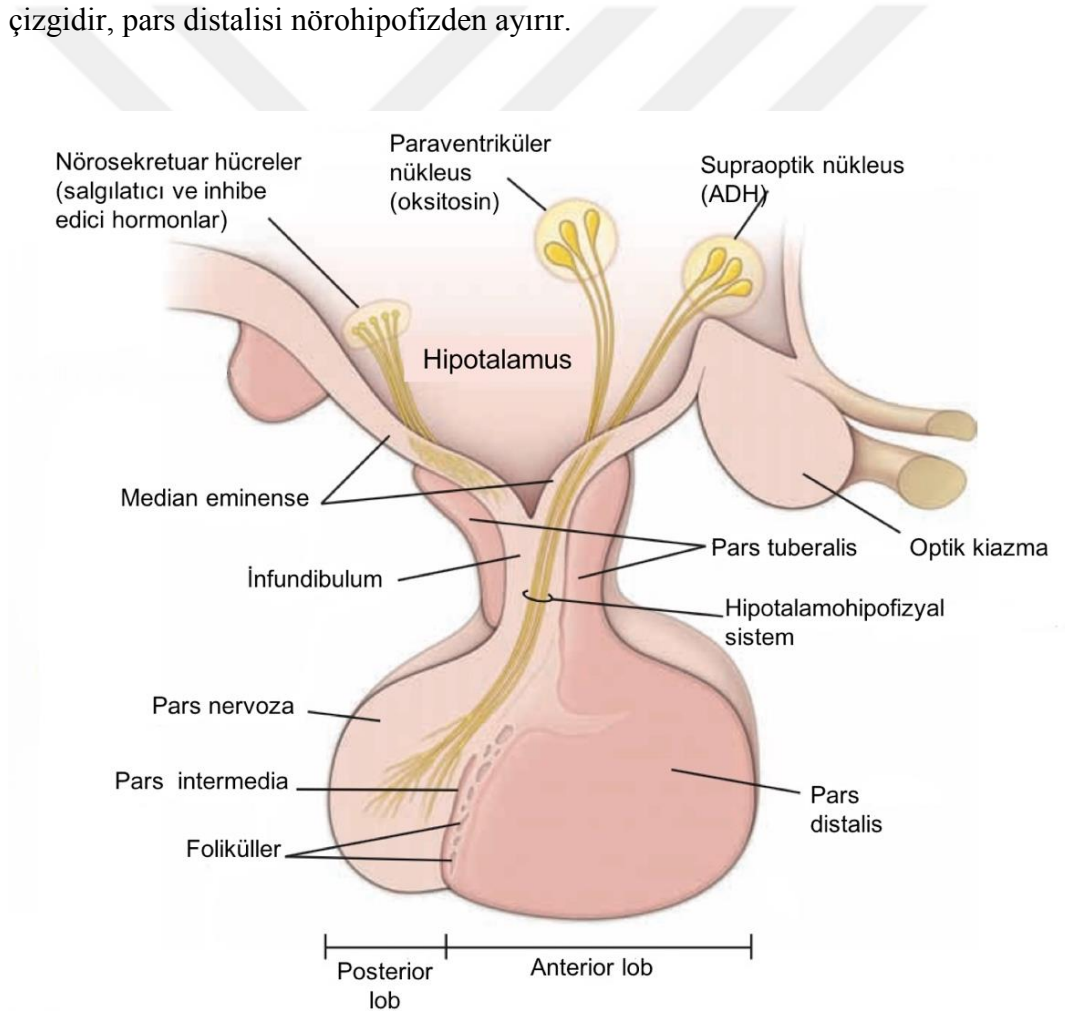
Posterior lob (nörohipofiz), nöral sekretuar doku

Bu iki kısım farklı embriyolojik kökenlidir. Hipofiz bezinin anterior lobu, orofarinks (ağız boşluğu) ektoderminin beyne doğru içeriye çökerek kese

oluşturmasından (Rathke kesesi) köken alırken, hipofiz bezinin posterior lobu geliştirmekte olan beynin üçüncü ventrikül tabanının (diensefalon) nöroektoderminin aşağı doğru büyümesinden (gelecekteki infundibulum) köken alır (Ross ve Pawlina 2016). Rathke kesesinin ağız boşluğu ile bağlantısı kaybolur. Fakat, nörohipofizin bağlantısı infundibular sap olarak varlığını devam ettirmektedir (Şekil 2-2).

Adenohipofiz, üç alt bölümden oluşur:

1. Pars distalis veya anterior lob, bezin esas kısmıdır.
2. Pars tuberalis, nöral kısım olan infundibular sapı kısmen veya bütünüyle yaka tarzında sarmaktadır. Birlikte hipofiz sapını oluştururlar.
3. Pars intermedia veya orta lob, yetişkinlerde iyi gelişmemiştir (rudimenter), ince bir çizgidir, pars distalisi nörohipofizden ayırır.



Şekil 2-2: Hipofiz bezinin ve hipotalamusun bölümleri

(Ross ve Pawlina 2016'dan uyarlanmıştır.)

Nörohipofiz iki alt bölümden oluşur:

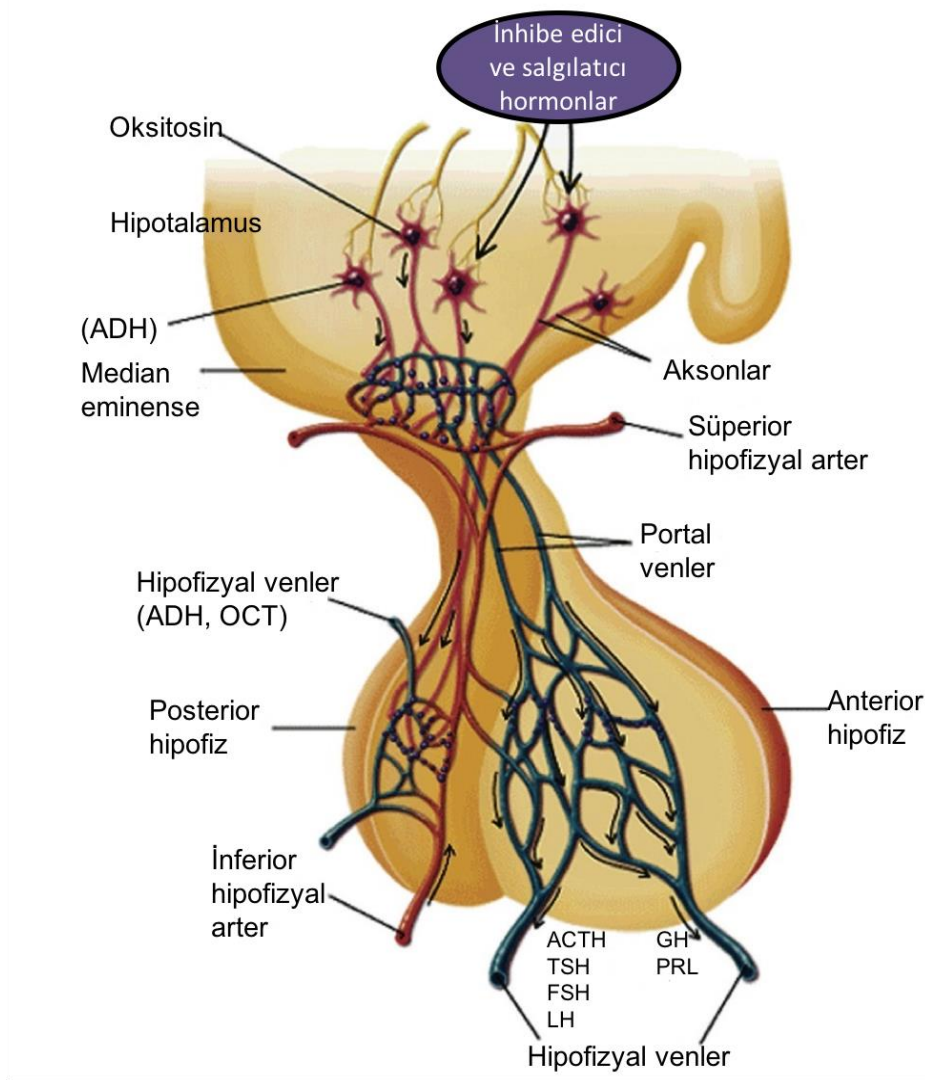
1. Pars nervosa veya nöral lob.
2. İfundibulum, iki bileşenden oluşur: infundibular uzantı ve hipotalamusun huni benzeri uzantısı olan median eminens.

Hipotalamusun nöroendokrin hücreleri, peptit yapısında salgılatıcı ve inhibe edici hormonlar veya faktörler aracılığıyla hipofiz bezi üzerinde pozitif veya negatif etkiler gösterirler. Salgılatıcı ve inhibe edici hormonların, aksonlar ile nörohipofize iletilen nörotransmitterlere göre çok kısa yanıt süresi vardır. Aksine, anterior hipofizin epitel hücrelerinden salgılanan hormonlar uzun bir yanıt oluşturma süresine sahiptir ve bu süre bir gün hatta bir ay kadar sürebilir (Kierszenbaum ve Tres 2016).

2.1.1.1. Hipotalamohipofizyal portal sistem

Hipotalamohipofizyal portal sistem, hipotalamus ve hipofiz bezi arasındaki önemli bağlantıyı sağlar. Pars tuberalis, median eminensi ve infundibulumu destekleyen arterler, fenestralı kapillerler (primer kapiller pleksus) oluşturur. Bu kapillerler, hipofizyal portal venler olarak adlandırılan portal venlere boşalırlar. Hipofizyal portal venler pars tuberalis boyunca ilerleyerek ikinci bir fenestralı sinüzoidal kapiller ağı (sekonder kapiller pleksus) oluştururlar. Bu damar sistemi, hipotalamik nöronların nöroendokrin salgılarını, median eminens ve infundibulumdaki salgılanma bölgelerinden doğrudan pars distalisin hücrelerine taşırlar (Şekil 2-3).

Hipofiz bezin kanının çoğu, diensefalon tabanındaki kavernöz sinüse ve buradan sistemik dolaşımda akar. Ancak bazı kanıtlar, kanın kısa portal venler aracılığıyla pars distalisten pars nervozaya ve pars nervozadan gelen kanın hipotalamusa doğru akabileceğini düşündürmektedir. Bu kısa yolaklar, hipofiz bezinin anterior lob hormonlarının, sistemik dolaşımın bütün döngüsünü yapmadan doğrudan beyne geri besleme sağlayabilecekleri bir yol sağlarlar (Ross ve Pawlina 2016).



Şekil 2-3: Hipotalamus ve hipofiz bezi arasındaki yapısal ve fonksiyonel nöroendokrin ilişkiler

(Ben-Shlomo ve Melmed 2017'den uyarlanmıştır.)

Özet olarak hipotalamohipofizyal portal sistemin esas görevleri şunlardır;

1. Primer kapiller pleksustan hipotalamik salgılatıcı ve inhibe edici hormonları anterior hipofizin hormon üreten hücrelerine taşınması,
2. Anterior hipofizde üretilen hormonları sekonder kapiller pleksus yoluyla genel kan dolaşımına iletilmesi,
3. Portal venler tarafından hipotalamus ile anterior hipofiz arasında fonksiyonel bir bütünlük sağlanmasıdır.

Ayrıca, alt hipofizyal arterden türeyen üçüncü bir kapiller pleksus, nörohipofizi besler. Bu üçüncü kapiller pleksus, hipotalamusta bulunan nöroendokrin hücrelerin

salgılarını alır. Oksitosin ve vazopressin (antidiüretik hormon) gibi salgı ürünleri aksonlar boyunca nörohipofize iletilir (Kierszenbaum ve Tres 2016).

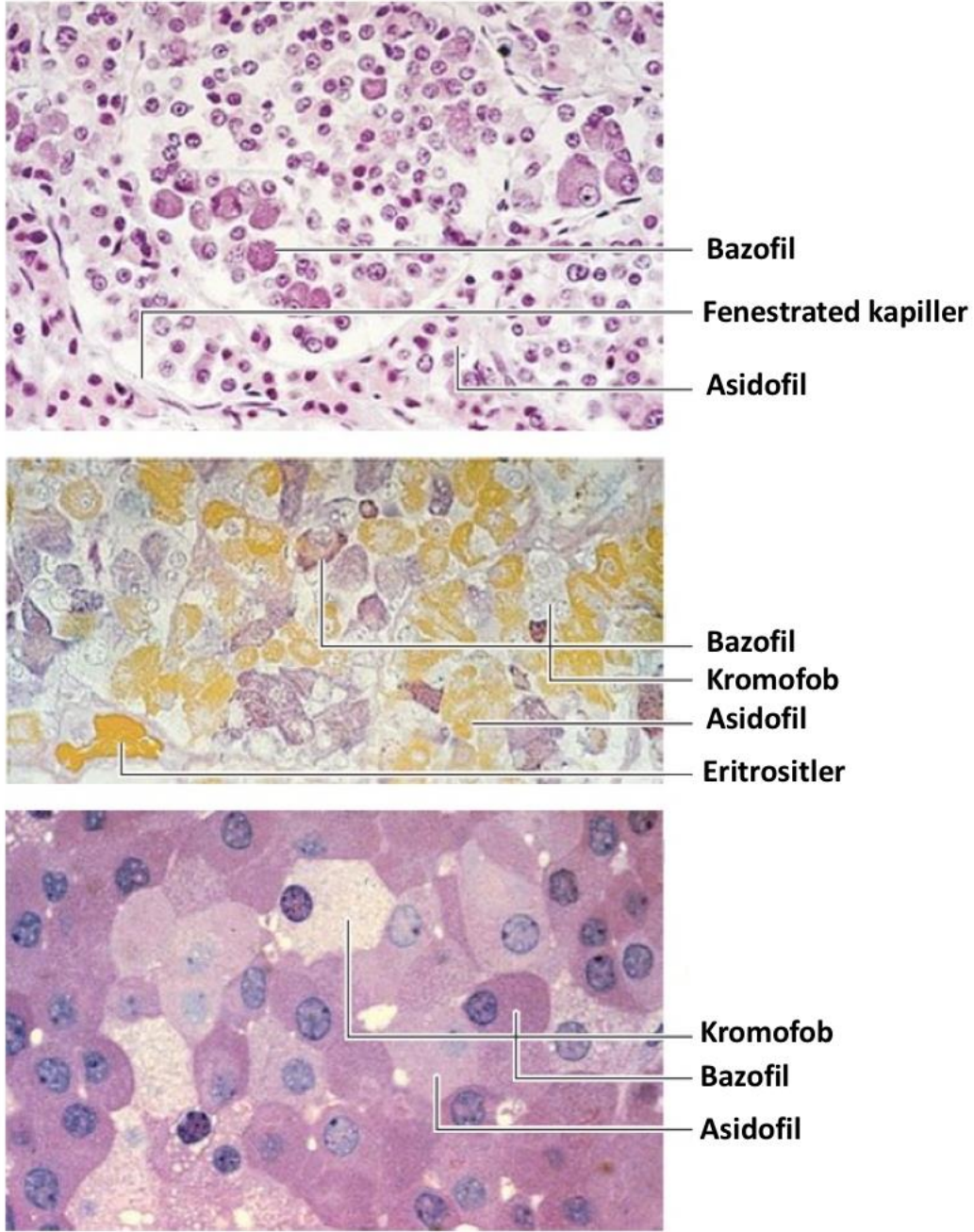
2.1.2. Hipofiz Bezin Yapısı ve Fonksiyonu

2.1.2.1. Hipofiz Bezinin Anterior Lobu (Adenohipofiz)

Hipofiz bezinin anterior lobu diğer endokrin bezleri ve bazı endokrin olmayan dokuları düzenler. Adenohipofizin büyük bir kısmı tipik endokrin bez dokunun organizasyonuna sahiptir. Hücreler kümeler ya da kordonlar halinde düzenlenmiştir ve bu kordonlar, fenestralı ve büyük çaplı sinüzoidal kapillerlerle birbirinden ayrılmışlardır. Bu hücreler, hipotalamustan gelen sinyallere yanıt verirler ve birkaç hipofiz hormonu sentezler ve salgırlar. Anterior lobun dört hormonu olan adrenokortikotropik hormon (ACTH), TSH; tirotropin, FSH ve LH, vücutta bulunan diğer endokrin bezlerin aktivitelerini düzenledikleri için tropik hormonlar olarak adlandırılır. Anterior lobun diğer iki hormonu ise büyüme hormonu (GH) ve prolaktin (PRL) tropik olarak kabul edilmez, çünkü bu hormonlar doğrudan endokrin olmayan hedef organlar üzerinde etki yaparlar (Ross ve Pawlina 2016).

Pars distalis

Pars distalis içindeki hücreler boyut, şekil ve boyama özelliklerine göre çeşitlilik gösterir. Hücreler, kordonlar ve kümeler halinde düzenlenmiştir ve aralarında kapillerler bulunur. Hipofiz bezinin ortasında çoğunlukta bulunan, bazik boya ile boyanan ve periyodik asit-Schiff [PAS] pozitif olan bazofiller (%10), bezin yan taraflarında yaygın olan asidik boya ile boyanan asidofiller (%40) ve sitoplazması boyanmayan kromofoblar (%50) olmak üzere üç hücre tipi tanımlanmıştır (Şekil 2-4).



Şekil 2-4: Anterior hipofizdeki asidofil, bazofil ve kromofob hücreler

(Kierszenbaum ve Tres 2016'den uyarlanmıştır.)

Asidofiller peptid hormon olan GH ve PRL salgılayan, bazofiller FSH, LH, TSH ve ACTH gibi glikoprotein hormonları salgılayanlar. Kromofoblar ise hormon içeriklerini boşaltan ve bundan dolayı tipik asidofil ve bazofil boyanma affinitesini kaybeden hücrelerdir. Anterior hipofizdeki hücrelerin tam olarak ayırt edilmesi özel antikörler kullanarak hücrelerdeki hormon içeriklerini gösteren immünohistokimyasal yöntemler ile yapılabilir (Kierszenbaum ve Tres 2016) (Ross ve Pawlina 2016).

Pars intermedia

Pars intermedia, Rathke kesesinin lümen kalıntısını temsil eden küçük kistik boşlukları çevreler. Pars intermedianın parankimal hücreleri kolloid dolu folikülleri çevrelemektedir. Bu folikülleri kaplayan hücreler ya folikül-stellat hücrelerden ya da çeşitli hormon salgılayan hücrelerden türemiş gibi görünmektedir. Elektron mikroskopik görüntüler, bu hücrelerin apikal bağlantı kompleksleri oluşturduğunu ve pars distalinde bulunan diğer veziküllerden daha büyük veziküllere sahip olduğunu göstermektedir. Bu foliküler kolloidin yapısı henüz belirlenmemiştir. Ancak, genellikle içinde hücre kalıntıları bulunur. Pars intermedia, bazofiller ve kromofobları içerir.

Pars intermedia hücrelerinin insanlarda işlevi bilinmemektedir. Fakat farklı canlı türlerindeki çalışmalarda, bazofillerin sitoplazmalarında dağınık halde ya α - ya da β -endorfini (morfin ile ilişkili bir bileşik) içeren veziküllere sahip oldukları bilinmektedir. Kurbağalarda bazofiller melanositlerde pigment üretimini ve melanoforlarda pigment dağılımını uyaran melanosit stimüle eden hormonlar (MSH) üretirler. İnsanlarda MSH fonksiyonel bir hormon değildir, ancak β -LPH'nin post-translasyonel işlenmesi sırasında oluşan bir yan üründür. MSH, insan pars intermediasında küçük miktarlarda bulunduğundan, pars intermedia bazofillerinin kortikotropolar olduğu ileri sürülmektedir (Ross ve Pawlina 2016).

Pars tuberalis

Pars tuberalis, anterior lobun sapa benzeyen infundibulum boyunca bulunan bir uzantısıdır. Hipotalamohipofizyal sistemin venlerini içeren büyük ölçüde vaskülarize bir bölgedir. Parankimal hücreler, küçük kümeler veya kordonlar halinde kan damarları ile bağlantılı şekilde düzenlenmiştir. Yassı hücre grupları ve kübik hücrelerle kaplı küçük foliküller bu bölgede dağınık halde bulunmaktadır. Bu hücreler sıklıkla ACTH, FSH ve LH immünoreaktivitesi gösterirler (Ross ve Pawlina 2016).

Hipofiz Bezin Anterior Lobundaki Hücreler

Somatotroplar (GH hücreleri) hipofiz bezinin anterior lobundaki parankimal hücrelerin yaklaşık %50'sini oluştururlar ve pars distalis içinde en çok bulunan hücrelerdir. Büyüme hormonu (GH; somatotropin) üreten, orta büyüklükteki oval hücrelerdir ve merkezi yerleşimli yuvarlak nükleusa sahiptirler. Sitoplazmalarında eozinofilik veziküllerin varlığından dolayı bu hücreler, asidofil olarak sınıflandırılır. Üç hormon, somatotroplardan GH salınmasını düzenler. Bu hormonlardan ikisi zıt hipotalamik hormonlardır: somatotroplardan GH salgılanmasını uyaran büyüme hormonu salgılatıcı hormon (GHRH) ve somatotroplardan GH salgılanmasını inhibe eden somatostatin. Son zamanlarda, GH salgılanmasının güçlü bir uyarıcısı olan ve GH salgılanmasıyla gıda alımını koordine eden, ghrelin adı verilen, 28-amino asitli bir peptid olan üçüncü bir hormon mideden izole edildi. Somatotroplardan kaynaklanan hormonal olarak aktif tümörler, GH hipersekresyonu ile ilişkilidir; çocuklarda gigantizme ve erişkinlerde akromegaliye neden olurlar (Ross ve Pawlina 2016).

Laktotroplar (PRL hücreleri, mammotroplar), hipofiz bezin anterior lobundaki parankimal hücrelerin %15-20'sini oluşturur. Prolaktin (PRL) üreten bu hücreler oval nükleusu olan büyük, poligonal hücrelerdir. Depolama evrelerinde, laktotroplar çok sayıda asidofilik vezikül içerir ve asidofilin histolojik özelliğini gösterirken bu veziküllerin içerikleri serbest bırakıldığında, laktotropun sitoplazması boyanmaz ve kromofobun histolojik özelliğini gösterirler. PRL sekresyonu, hipotalamus tarafından üretilen katekolamin olan dopaminin inhibe edici kontrolü altındadır. Ayrıca, prolaktin uyarıcı hormon (PRH), tirotropin salgılatıcı hormon (TRH) ve vazoaaktif intestinal peptidin (VIP) PRL sentezini ve salgılanmasını uyardığı bilinmektedir. Hamilelik ve emzirme döneminde bu hücreler hipertrofi ve hiperplazi geçirerek, hipofiz bezin boyutlarını arttırmaktadır. Bu nedenle, multipar kadınlarda hipofiz bezi daha büyüktür (Ross ve Pawlina 2016).

Kortikotroplar (ACTH hücreleri) de hipofiz bezin anterior lobundaki parankimal hücrelerin %15-20'sini oluşturur. Bu poligonal şekilli, orta büyüklükteki hücrelerin, yuvarlak ve eksantrik yerleşimli nükleusları vardır ve prekürsör bir molekül olan proopiomelanokortin (POMC) olarak bilinen ACTH'ı üretirler. Kortikotroplar bazofiller gibi boyanır ve ayrıca POMC ile ilişkili karbonhidrat parçaları nedeniyle periyodik asit-Schiff (PAS) reaktifi ile güçlü pozitif reaksiyon sergilerler. POMC,

kortikotrop içindeki proteolitik enzimlerle bölünerek, ACTH, β -lipotropik hormon (β -LPH), MSH, β -endorfin ve enkefalin gibi çeşitli parçalara ayrılır. ACTH salgılanması, hipotalamus tarafından üretilen kortikotropin salgılatıcı hormon (CRH) ile düzenlenmektedir (Ross ve Pawlina 2016).

Gonadotropik (FSH ve LH hücreleri), hipofiz bezin anterior lobundaki parankimal hücrelerin yaklaşık %10'unu oluşturur. Bu küçük oval hücrelerin yuvarlak ve eksantrik nükleuslu bulunur ve hem LH hem de FSH üretirler. Pars distalisin her tarafına dağılmış durumdadırlar ve hem bazik boyalarla hem de PAS reaktifi ile yoğun bir şekilde boyanırlar. Birçok gonadotrop, hem FSH hem de LH üretebilir. İmmünohistokimyasal çalışmalar ise, bazı gonadotropların sadece bir hormonu veya diğerini üretebildiğini göstermektedir. FSH ve LH salınımı, hipotalamus tarafından üretilen gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH) tarafından düzenlenmektedir (Ross ve Pawlina 2016).

Tirotropik (TSH hücreleri), hipofiz bezin anterior lobundaki parankimal hücrelerin yaklaşık %5'ini oluştururlar. Bu büyük, poligonal şekilli hücreler yuvarlak ve eksantrik yerleşimli nükleusludur ve tiroglobulin ve tiroid hormonlarının üretimini uyarmak için tiroid bezinin foliküler hücreleri üzerinde etki yapan TSH olarak adlandırılan tirotropik hormon üretirler. Tirotropik, sitoplazmik bazofili sergilemektedir ve PAS reaktifi ile pozitif olarak boyanmaktadır. TSH salınımı, aynı zamanda, PRL salgılanmasını uyaran TRH ile hipotalamik kontrol altındadır. Somatostatinin tirotropik üzerinde inhibitör etkisi vardır ve TSH salgılanmasını azaltır (Ross ve Pawlina 2016).

Folikül-Stellat (Yıldız) Hücreler, hipofiz bezin anterior lobunda hormon üreten beş tip hücreye ek olarak bulunan folikül-stellat hücreler, yıldız benzeri görünümü ve sitoplazmik uzantılarının hormon üreten hücreleri sarması ile karakterizedirler. Hücre kümeleri veya küçük foliküller oluşturma yetenekleri vardır ve hormon üretmezler. Folikül-stellat hücreler, konnexin-43 proteini içeren gap junctionlar ile birbirine bağlıdır. İmmünohistokimyasal ve elektrofizyolojik çalışmalar doğrultusunda, birbirlerine gap junctionlarla bağlı folikül-stellat hücre ağınsın pars tuberalisten pars distalise sinyal ilettiği hipotezi öne sürölmektedir. Bu sinyaller, hipofiz bezin anterior lobunda hormon salınımı düzenliyor olabilir. Folikül-stellat ağ hipofiz portal ven sistemine ek olarak işlev görüyor gibi görünmektedir. Son zamanlarda, gap junction bağlantılarının sadece folikül-stellat hücreleri değil, aynı zamanda hormon üreten

hücreleri de birbirine bağladığına dair in vitro bulgular hipofiz bezin anterior lobu için bu sinyal mekanizmasını desteklemektedir (Ross ve Pawlina 2016).

2.1.2.2. Hipofiz Bezinin Posterior Lobu (Nörohipofiz)

Hipofiz bezin posterior lobu merkezi sinir sisteminin (MSS) bir uzantısıdır ve hipotalamusun salgı ürünlerini depolar ve salgılar. Nörohipofiz olarak da bilinen hipofiz bezin posterior lobu, pars nervosa ve bunu hipotalamusa bağlayan infundibulumdan oluşmaktadır. Hipofiz bezin nöral lobu olan pars nervosa, hücre gövdeleri hipotalamusun supraoptik ve paraventriküler nükleuslarında yer alan yaklaşık 100.000 nörosekretuar nöronun miyelinsiz aksonlarını ve sinir sonlanmalarını içerir. Hipotalamohipofizyal yolu aksonlar oluşturur ve bu aksonlar iki açıdan eşsizdir. Birincisi, diğer nöronlar veya hedef hücreler üzerinde sonlanmazlar, pars nervosa'nın fenestralı kapiller ağına yakın mesafede sonlanırlar. İkincisi, hücre gövdesi, akson ve akson terminali gibi hücrelerin bütün bölümlerinde sekretuar veziküller içerirler. Yoğun sekretuar aktiviteleri nedeniyle, bu nöronlar iyi gelişmiş Nissl cisimciklerine sahiptir ve bu bakımdan ön boynuz ve gangliyon hücrelerini andırmaktadırlar.

Hipofiz bezinin posterior lobu bir endokrin bez değildir. Daha ziyade, hipotalamusun supraoptik ve paraventriküler nükleusların nöronlarının nörosekresyonları için depolama alanıdır. Supraoptik nükleusların nöronları esas olarak vasopressin veya antidiüretik hormon (ADH) ve paraventriküler nükleusların nöronları öncelikle oksitosin sentezler. Mielinsiz aksonlar nörosekretuar ürünleri pars nervozaya taşır (Ross ve Pawlina 2016).

Pituisit

Pituisitler hipofiz bezinin arka lobuna özgü tek hücrelerdir. Hipotalamik nörosekretuar nöronlarının birçok akson ve terminaline ek olarak, hipofiz bezinin posterior lobu fibroblastlar, mast hücreleri ve fenestralı kılcal damarlarla ilişkili pituisitler olarak adlandırılan özel glial hücreler içerir. Bu hücreler çok uzantıları olan, düzensiz şekilli ve astroglial hücrelere benzemektedir. Nükleusları yuvarlak veya ovaldır ve sitoplazmada pigment vezikülleri bulunur. Astroglia gibi, glial fibriller asidik proteinden

(GFAP) oluşan özel ara filamentlere sahiptirler. Pituisitler genellikle perivasküler aralıktaki sonlanan uzantılara sahiptir. Birçok uzantıları ve kanla ilişkileri nedeniyle pituisitlerin, MSS'nin geri kalan bölgelerinde astrositlerinkine benzer bir destek görevi vardır (Ross ve Pawlina 2016).

2.2. Hipofiz Bezinin Hormonları

2.2.1. Büyüme Hormonu

Büyüme hormonu, 191 amino asit uzunluğunda bir peptittir (22 kd). Büyüme hormonu, prolaktin ve insan plasental laktojen hormonları yapısal homoloji gösterirler. Bu üç hormonun aktivitesinde bazı benzerlikler bulunur. 24 saatlik uyku-uyanma periyodu boyunca, uykunun ilk iki saati sırasında maksimum salgılama ile kan dolaşımına bırakılır. İsmine rağmen büyüme hormonu, büyümeyi doğrudan etkilemez; hepatositlerde, somatostatin C olarak da bilinen insülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1) 'in üretimini uyararak görev yapar. IGF-1'in hücre membran reseptörü, insüline benzerdir (integral sitoplazmik protein tirozin kinaz domainleri ile iki glikoprotein dimerlerinden oluşur). Büyüme hormonunun salınması iki nöropeptid tarafından düzenlenir.

44 amino asitlik bir peptit olan GHRH uyarıcı etkiye, 14 amino asitlik bir peptit olan somatostatin ve yüksek kan şekeri seviyeleri ise inhibitör etkiye sahiptir. Hem GHRH hem de somatostatin hipotalamusta üretilir. Somatostatin, ayrıca pankreasta Langerhans adacığında üretilir.

IGF-1 (7.5 kd), kemik ve yumuşak dokuların genel büyümesini uyarır. Çocuklarda, IGF-1 uzun kemiklerin epifiz plaklarındaki büyümesini uyarır. Büyüme hormon işlevini belirlemek için kandaki IGF-1 değerleri önemlidir. IGF-1 serum seviyesindeki bir düşüş büyüme hormonunun salınmasını uyarır. IGF'in hedef hücreleri çok sayıda IGF bağlayıcı proteinleri ve proteazları salgırlar. Mevcut IGF-bağlayıcı proteinleri, proteazlar azaltarak IGF'nin hedef hücreler üzerindeki etkisini düzenler (Kierszenbaum ve Tres 2016).

2.2.2. Prolaktin

Prolaktin, 199 amino asitli tek zincirli bir proteindir (22 kd). Prolaktin, büyüme hormonu ve insan plasental laktojen hormonları bazı amino asitlerinde benzer yapısal homolojiye sahiptir ve aktivasyonları da birbirine benzemektedir.

Prolaktinin baskın etkisi, doğum sonrası laktasyonun başlatılmasını ve sürdürülmesini uyarmaktır. Laktasyonun üç aşaması vardır:

1. Mammogenez, meme bezinin büyümesi ve gelişmesi, öncelikli olarak östrojen ve progesteron tarafından prolaktin ve insan plasenta laktojeni ile uyumlu şekilde uyarılır.
2. Laktogenez, laktasyonun başlatılması, östrojen ve progesteron ile geliştirilen meme bezine etki eden prolaktin tarafından tetiklenir. Laktasyon hamilelik sırasında, yüksek östrojen ve progesteron seviyeleriyle inhibe edilir, bu hormonlar doğumda azalır. Ya östradiol veya prolaktin antagonistleri, laktasyonu durdurmak için klinik olarak kullanılır.
3. Galaktopoez, süt salgılanmasının devam etmesi için hem prolaktin hem de oksitosin gereklidir.

Anterior hipofizinin diğer hormonlarının aksine, prolaktinin salgılanması esas olarak uyarıdan ziyade inhibisyon ile düzenlenir. Ana inhibitör dopamindir. Dopamin sekresyonu prolaktin tarafından kendi sekresyonunu inhibe etmek için uyarılır. Prolaktin uyarıcı hormon (PRH) ve TRH tarafından prolaktin salınımı üzerine uyarıcı bir etki uygulanır. Prolaktin, her bir emzirme periyodunu takiben pulsatil bir tarzda asidofillerden salınır. Prolaktinin aralıklı ani yükselişi, süt sentezini uyarır (Kierszenbaum ve Tres 2016).

2.2.3. Gonadotropinler: FSH ve LH

Gonadotropin salgılayan hücreler olan gonadotroplar hem FSH hem de LH salgılar. Gonadotroplar anterior hipofizin toplam hücre popülasyonunun yaklaşık %10'unu oluşturur. Gonadotropinlerin salınması, hipotalamusun arkuat nükleusunda üretilen bir dekaeptit olan gonadotropin salgılatıcı hormon [GnRH, ayrıca LH salgılatıcı hormon (LHRH) olarak da adlandırılır] ile uyarılır. GnRH, portal damarlara 60 ila 90

dakikalık aralıklarla salgılanır. Tek bir bazofil hücre, pulsatil bir şekilde hem FSH hem de LH'ı sentezleyip ve salgılayabilir.

Kadınlarda, FSH folikülogenez adı verilen bir süreçle yumurtalık foliküllerinin gelişimini uyarır. Erkeklerde, FSH, testislerdeki Sertoli hücreleri üzerinde, androjenlerden östrojenlerin ve testosterona bağlanma afinitesi olan androjen bağlayıcı proteinin üretimini uyarmak için etki eder. Kadında, LH yumurtalık folikülü ve corpus luteum'da steroidogenezi uyarır. Erkeklerde, LH testisteki Leydig hücreleri tarafından testosteron sentezini kontrol eder.

FSH ve GnRH'nin serbest bırakılmasını engelleyen moleküller östradiol ve inhibindir. İnhibin erkek ve dişi hedef hücreler (Sertoli hücreleri ve granüloza hücreleri ve anterior hipofiz hücreleri) tarafından salgılanan α - ve β -peptid zincirleri tarafından oluşturulmuş heterodimer proteindir. Hem kadınlarda hem de erkeklerde FSH salınımı, aktivin adı verilen ve anterior hipofizde üretilen homodimer protein tarafından artırılır. Aktivin iki β zincirden oluşur. $\alpha\beta$ (inhibin) ve $\beta\beta$ (aktivin) dimerizasyonunun kontrolünün nasıl olduğu halen net olarak bilinmemektedir (Kierszenbaum ve Tres 2016).

2.2.4. Tiroid stimülan hormon (tirotropin)

Tirotropik hücreler, anterior hipofizinin toplam popülasyonunun yaklaşık % 5'ini temsil eder. TSH, tiroid fonksiyonunu ve büyümeyi düzenleyici hormondur. Hipotalamusta üretilen 3-amino-asit-peptid olan TRH (tirotropin salgılatıcı hormon), bazofillerden TSH sentezini ve salınmasını uyarır. TRH ayrıca prolaktinin salınmasını da uyarır. TSH salınımı, tiroid hormonları triiyodotironin (T3) ve tiroksin (T4) artmış konsantrasyonları tarafından inhibe edilir (Kierszenbaum ve Tres 2016).

2.2.5. Adrenokortikotropik hormon

ACTH veya kortikotropin, kısa bir sirkülasyon süresi (7 ila 12 dakika) olan, 39 amino asit uzunluğunda (4.5 kd) tek zincirli bir proteindir. Birincil görevi, adrenal korteksin zona fasikülata ve retikülarisinde büyümeyi ve steroid sentezini uyarmaktır. Adrenal korteksin zona glomerulozası anjiyotensin II'nin kontrolü altındadır.

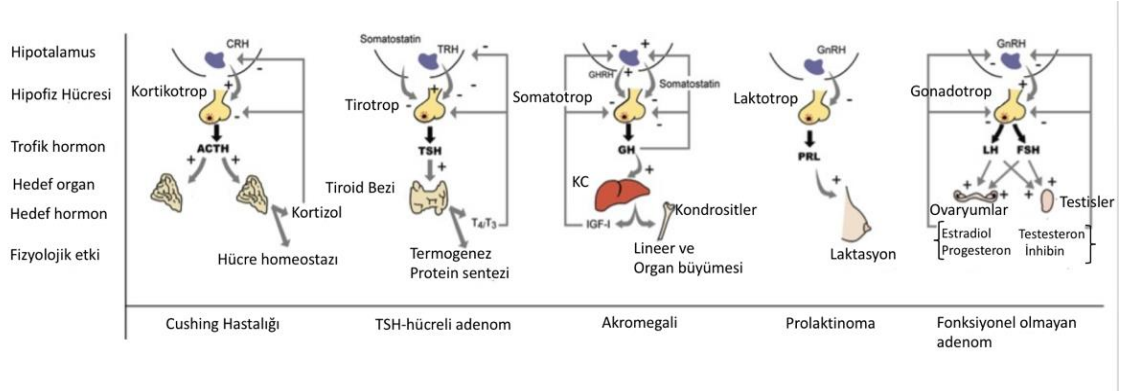
ACTH'nin adrenal korteks üzerindeki etkileri, siklik adenozin monofosfat (cAMP) aracılığı ile gerçekleşir. ACTH ayrıca böbreküstü bezinden başka cilt pigmentasyonu ve lipolizi artırarak görev yapar. ACTH, anterior hipofizde işlenen pro-opiomelanokortin (POMC) adı verilen 31 kd'lik glikozile büyük bir proteinden türetilmiştir. POMC ürünleri şunlardır; 1. N-terminal peptid (Fonksiyonu bilinmemektedir), ACTH ve β -lipotropik hormon (β -LPH). Bu üç POMC türevi anterior hipofiz tarafından salgılanır. 2. β -LPH kesim ürünleri, γ -LPH ve β -endorfinin dolaşıma bırakılır. β -LPH ve γ -lipotropik hormon (γ -LPH) lipolitik etkiye sahiptir, ancak insanlardaki yağ mobilizasyonunda rolleri bilinmemektedir. 3. γ -LPH, β -melanosit stimüle edici hormonun (β -MSH; insanlarda salgılanmayan) amino asit dizisini içerir. β -Endorfin, met-enkefalin (met-enk) dizilerini içerir. 4. ACTH, α -melanosit uyarıcı hormon (α -MSH) ve kortikotropin benzeri ara peptid (CLIP) 'e kesilir. Belirgin bir pars intermedia bulunan hipofiz türlerinde, α -MSH ve CLIP hormonları melanoforlardaki melanin granüllerinin dağılımına ve birçok balık, amfibi ve sürüngenlerin cildinin koyulaşmasına neden olur.

ACTH sirkadiyen bir şekilde salgılanır (sabahları maksimum seviye daha sonra azalır). ACTH'ın salınmasına etki eden çeşitli mekanizmalar vardır; 1. Hipotalamus tarafından CRH salgılanır. CRH, paraventriküler nükleuslarda ADH ile birlikte yerleşiktir. Hem ADH hem de anjiyotensin II, CRH'nin ACTH salınımı üzerindeki etkisini güçlendirmektedir. 2. Kandaki yüksek kortizol seviyelerinin neden olduğu inhibitör etki, CRH salınımını önleyerek veya bazofil kortikotropik hücreler (ACTH salgılayan hücreler) tarafından ACTH salınmasını bloke eder (Kierszenbaum ve Tres 2016).

2.3. Hipofiz Adenomları

Hipofiz adenomları kafa içi tümörlerinin %15-20'sini oluşturan ve anterior hipofiz hormon üreten hücrelerin neoplastik proliferasyonu sonucu oluşan, selim veya agresif olabilen adenomlardır. Bu adenomlar sıklıkla PRL, GH, ACTH nadiren FSH, LH veya TSH aşırı miktarlarda salgılayarak hiperfonksiyon gösterirler. Klinik olarak semptomun adlandırılması üretilen hormona bağlı olarak fonksiyonel adenomlar (akromegali, galaktore, hipertiroidizm, Cushing hastalığı) veya sadece kitle etkileriyle bası bulgularına yol açan fonksiyonel olmayan adenomlar olarak adlandırılır (Şekil 2-5).

Adenomun kitle etkisine bağlı baş ağrısı, görme bozukluğu, okülomotor sinirin fonksiyon bozukluğu, 3. kafa çifti sinir felci, hipopitüitarizme bağlı sekonder adrenal yetmezlik, santral hipotroidi ve hipogonadotropik hipogonadizme ait semptomlar ortaya çıkar.



Şekil 2-5: Hipotalamus-hipofiz düzenlenmesi ve hipofiz adenom patogenezi

(Melmed 2003'den uyarlanmıştır.)

Hipofiz adenomlarının büyük bir kısmı monoklonaldır ve her biri somatik mutasyonlu tek bir hücreden çıkar. Önceleri sporadik tümörler olarak düşünülen bu adenomlardan bazılarının daha sonradan ailevi sendromlarla birlikte olduğu görülmüştür. Bu ailevi sendromlar arasında en sık görülenler multipl endokrin neoplazi 1 (MEN1), ailevi izole hipofiz adenomları (FIPA) ve Carney kompleksidir (Yarman 2016).

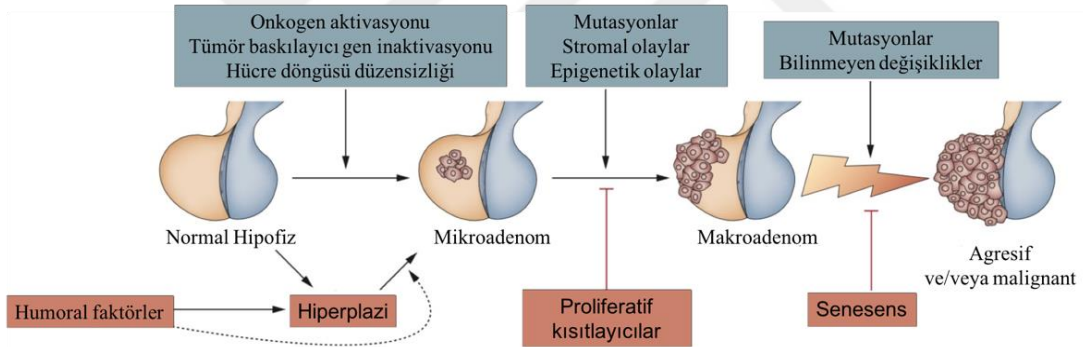
2.3.1. Hipofiz Adenomlarının WHO (Dünya Sağlık Örgütü) 2017 Sınıflandırılması

Hipofiz adenomları; GH ekspresse eden, PIT1 soyundan gelen adenohipofiz hücrelerinden kaynaklanan **Somatotrop adenom**, PRL ifade eden, bu adenohipofiz hücrelerinden kaynaklanan **Laktotrop adenom**, TSH ifade eden PIT1 soyu hücrelerinden kaynaklanan **Tirotrop adenom**, ACTH ifade eden, TPIT soyu adenohipofiz hücrelerinden kaynaklanan **Kortikotrop adenom**, FSH, LH ve veya alfa-subunit ifade eden, SF1 soyundan gelen adenohipofiz hücrelerinden kaynaklanan **Gonadotrop adenom**, immünohistokimyasal olarak hipofiz hormon ve transkripsiyon faktörlerinin hücre tipine göre diferansiyasyonu olmayan **Null cell adenom**, birden fazla hormon yapan adenohipofiz **Plurihormonal** ve aynı bez içinde iki farklı hücre tipi iki ayrı adenom ise

ikili (double) adenomlar, ikiden fazla olursa **multiple adenomlar** olarak sınıflandırılmışlardır.

Patolojik tanı koymak için GH, PRL, TSH-beta, ACTH, FSH-beta, LH-beta, Alfa-subunit hormonlarının ve PIT1, SF1, TPIT gibi transkripsiyon faktörlerinin immünohistokimyasal analizi yapılır. Hipofiz adenomlarında prognostik önemi olabilecek diğer parametreler ise tümör çapı, MRI invaziflik ve tümörün klinik durumudur. Adenohipofizyal hücrelerden kaynaklanan tümör, kraniospinal veya sistemik metastaz yapıyorsa hipofiz karsinomlarıdır (%0.1- 0.2).

Radyolojik olarak adenomlar çapına göre; 1 cm altında ise mikroadenom, 1-4 cm ise makroadenom ve 4 cm üzerindeki dev adenom olarak isimlendirilir (Şekil 2-6). Ayrıca MRI invaziflik durumu KNOSP Grade'e göre yapılır: noninvazif (GRADE 1-2), invazif (GRADE 3-4)'tür.



Şekil 2-6: Hipofiz adenom oluşumunun basamakları

(Melmed 2011'den uyarlanmıştır.)

WHO 2004 sınıflandırmasında agresif adenomlar için kullanılan atipik adenom terimi, WHO 2017'de yüksek riskli adenomlar olarak değiştirilmiştir. Bu adenomların tanısında rekürrens ve klasik tedaviye direnç göstermesi, Ki-67 ekspresyonunun yüksek olması (%3 ve üzeri), hızlı büyüme ve radyolojik invazyon durumları dikkate alınır. Bu gruba dahil olan adenomlar şöyledir: seyrek granüllü somatotrop adenom, erkeklerde laktotrop adenom, Crook hücreli adenom, sessiz kortikotrop adenom ve plurihormonal Pit-1 pozitif adenomlar (Lloyd ve ark. 2017; Mete ve Lopes 2017).

2.3.2. Akromegali

Akromegali büyüme hormonunun aşırı miktarda salınımı sonucu tipik klinik bulguların ortaya çıktığı morbidite ve mortalitenin yüksek olduğu bir hastalıktır. Büyüme hormonu salgılayan adenom, çocukluk ve ergenlik döneminde ortaya çıktığı zaman, epifiz plakların hala aktif olduğu bir zamanda, gigantizm (Yunanca gigas. dev; aşırı uzun boylu) görülür. Erişkinlerde aşırı büyüme hormonu salgılanırsa, epifiz plakları inaktif olduğunda, akromegali (Yunanca akro, uç veya ekstremite; mega, büyük) gelişir. Büyüme hormonu aşırılığı karaciğerden insülin-like growth hormon-1 (IGF-1) denen başka bir hormon salgılatır. IGF-1 ise cilt, bağ dokusu, kıkırdak, kemik ve organların büyümesini artırır. Akromegali'de eller, ayaklar, çene ve yumuşak dokular büyür. Uzun kemikler boyca büyümeyiz, ancak kıkırdak (burun, kulaklar) ve membranöz kemikler (mandibula ve kalvaryum) büyümeye devam eder ve bu da büyük biçim bozukluklarına neden olur. Hastalığın en sık nedeni hipofizin GH salgılayan adenomudur ve bu adenom tüm hipofiz adenomlarının %10-20'sini oluşturur. İnsidansı yılda milyonda 3-4'tür ve her iki cinsten eşit şekilde dağılımı eşittir. Ortalama tanı yaşı 30 yıl (15-80 yıl) ve tanıda gecikme süresi 9 yıldır (6.6-10.2 yıl) (Kierszenbaum ve Tres 2016; Yarman 2016).

2.3.3. Cushing Hastalığı

Vücutta uzun süre aşırı miktarda kortizol hormonu bulunması Cushing sendromu denilen hastalık tablosuna yol açar. Kortizol hormonu fazlalığı hipofizde bulunan bir adenomdan kaynaklanıyorsa, bu duruma Cushing hastalığı adı verilir. Bu hastalık Harvey Cushing isimli bilim adamı tarafından 1932 yılında tanımlandığı için bu isim verilmiştir. Hipofizin aşırı ACTH salgılayan adenomu tüm hipofiz adenomlarının %10-15'ini oluşturur. Hipofizdeki kortikotrop adenomun salgıladığı ACTH, aşırı kortizol salgılanmasına yol açmaktadır. Cushing hastalığı orta yaşlarda ve kadınlarda daha sıktır. Bu hastalık, adrenal korteksin zona fasikülata tarafından kortizol üretimindeki artış ile karakterizedir. Obezite, osteoporoz ve kas kaybı belirgin özellikleridir. Kronik hiperkortizolemi yaşam kalitesini aşikar olarak bozar ve tedavisiz vakalarda kardiyovasküler mortalite artar. Diğer yandan enfeksiyonlar ve psikiyatrik rahatsızlıklar nedeniyle morbiditesi yüksek olan bir hastalıktır. ACTH sekresyonundaki azalma, kortizolün sekresyonunda azalmaya ve hipoglisemiye yol açar. ACTH'ın kaybı adrenal

androjen sekresyonunu azaltır. Kadınlarda androjen eksikliği, pubik ve aksiller kıl kaybına neden olur. Bu etki erkeklerde görülmez çünkü androjenlerin testiküler sekresyonu tarafından telafi edilir (Kierszenbaum ve Tres 2016; Yarman 2016).

2.3.4. Fonksiyonel Olmayan Hipofiz Adenomları

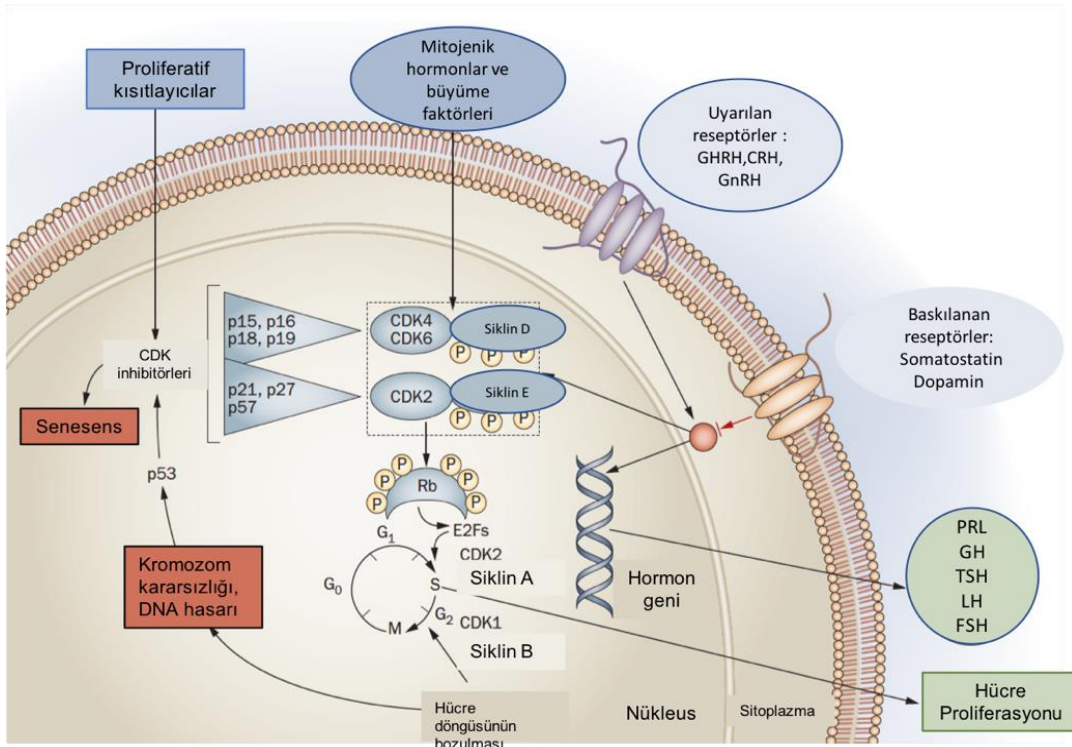
Klinik olarak fonksiyonel olmayan hipofiz adenomları bütün hipofiz adenomlarının neredeyse üçte birini temsil ederler ve çok büyük olmadıkça veya bası yaparak hormonal bozukluğa (hipofizer yetmezliğe) yol açmadıkça yıllarca tespit edilmeyebilir. Fonksiyonel olmayan hipofiz adenomları tamamen semptomsuzdur ve bu yüzden ya otopside ya da büyük boyutları nedeniyle ortaya çıkan önemli hipotalamik hipofiz bozukluklarının ve görsel semptomların nedenlerinin araştırılmasında kafa manyetik rezonans görüntüleme veya bilgisayarlı tomografi incelemesinde tesadüfi bulgular (insidental) olarak saptanırlar.

Klinik olarak fonksiyonel olmayan adenomların hasta dokularının immünohistokimyasal boyanma veya mRNA ekspresyon analizleri ile gonadotropin ve/veya onların glikoprotein altünitelerinin bulunmasına dayanılarak, bu adenomların dörtte üçünün gonadotrop adenomlar olduğu gösterilmiştir (Young ve ark. 1996). Optik kiazmaya bası nedeniyle görme defekti sık görülür ancak bu bası yavaş geliştiğinden genellikle hasta klinik bir şikayeti olmadıkça bunun farkına varamaz. Klinik olarak hastaların serum gonadotropin düzeyleri normal ise ve patolojik incelemelerde FSH ve/veya LH pozitif boyanmışsa bu gruba dahil adenomlardır. Nadiren, NFA'lar ACTH, GH, PRL veya TSH pozitif olarak bulunabilir, fakat bu hormonları klinik sendromlara neden olacak kadar yeterli miktarda salgılayamazlar; bu tümörler “sessiz” kortikotrop, somatotrop, laktotrop veya tirotrop adenomlar olarak adlandırılırlar (Yamada ve ark. 1991). Ayrıca, herhangi bir hormon ve transkripsiyon faktörü pozitifliği bulunmayan fonksiyon göstermeyen adenomlar ise hücresiz (null-cell) adenom olarak adlandırılırlar (Nishioka ve ark. 2015; Wass ve Karavitaki 2017; Yamada ve ark. 1991).

Adenohipofizin fonksiyonlarının karmaşık kontrolü hipotalamik, hipofiz içi ve çevresel sinyalleri kapsamaktadır. Hipotalamik serbestleştirici ve baskılayıcı hormonlar farklılaşmış adenohipofiz hücre tiplerini etkilemek için portal damarlardan geçerler ve hipotalamik hormonlar tarafından aktiflenen sinyal transdüksiyon kaskatları hipofiz hormon sentezini ve hücre replikasyonunu kontrol eder. Hipofiz içindeki otokrin ve

parakrin büyüme faktörleri ve çevresel endokrin hormonlar çoğunlukla hipofiz trofik hormon sentezinin ve hücre replikasyonunun negatif geribildirim kontrolünü kullanırlar.

Rathke kesesi hücrelerinden oluşan kökene-özü hipofiz hücre gelişimi yüksek derecede spesifik hipofiz progenitör hücrelerinin büyümesi ile hormon üreten ve böylece farklılaşmış hücreye dönüşümünü sağlayan, hücre döngüsü proteinleri tarafından sıkı bir şekilde kontrol edilir (Şekil 2-7) (Melmed 2011).



Şekil 2-7: Hipofiz adenom oluşumu ile ilgili hücre içi sinyal yolları

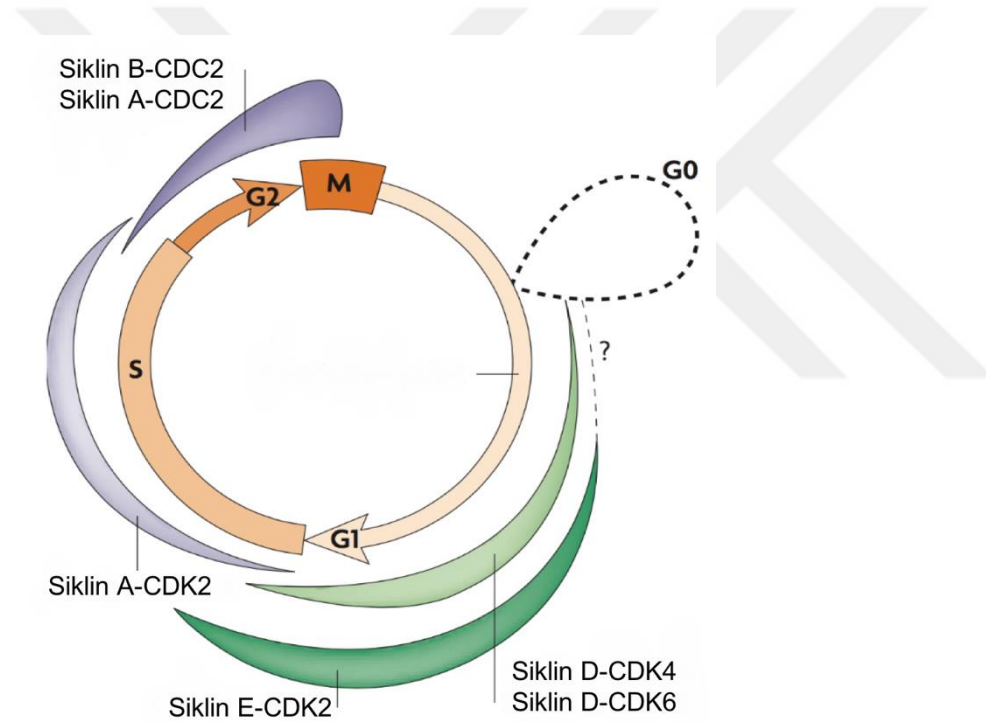
(Melmed 2011'den uyarlanmıştır.)

2.4. Hücre Döngüsü

Hücre bölünmesi birbiri ile bağlantılı dört süreçten oluşur (Şekil 2-8). Hücre büyümesi, DNA replikasyonu, sayıca iki katına çıkan kromozomların yavru hücrelere dağılması ve sitokinez. Hücre döngüsünün bu basamakları, korunmuş bir denetleyici sistem tarafından kontrol edilir. Bu sistem sadece hücre döngüsünün farklı olaylarını

düzenlemekle kalmaz, hücre döngüsünün, hücre çoğalmasını kontrol eden ekstrasellüler sinyallerle bağlantısını da sağlar.

Hücre Döngüsü Kontrol Noktaları: Hücre döngüsü kontrolleri, döngünün farklı evrelerindeki olayların, uygun düzenle gerçekleşebilmesi için, koordineli olarak döngüyü ekstrasellüler sinyaller ile hücre büyüklüğüne göre düzenler. Örneğin, replikasyon tamamlanmadan hücrenin mitozu girmemesi kritik öneme sahiptir. Hücrelerin çoğunda, hücre döngüsünün farklı evreleri arasındaki düzen, bir seri hücre döngüsü kontrol noktasına bağlıdır. Bu kontrol noktaları, hücre döngüsü sırasında bir önceki evredeki olaylar tamamlanmadan sonraki evreye geçişi engeller.



Şekil 2-8: Hücre döngüsünün evreleri

(Coller 2007'den uyarlanmıştır.)

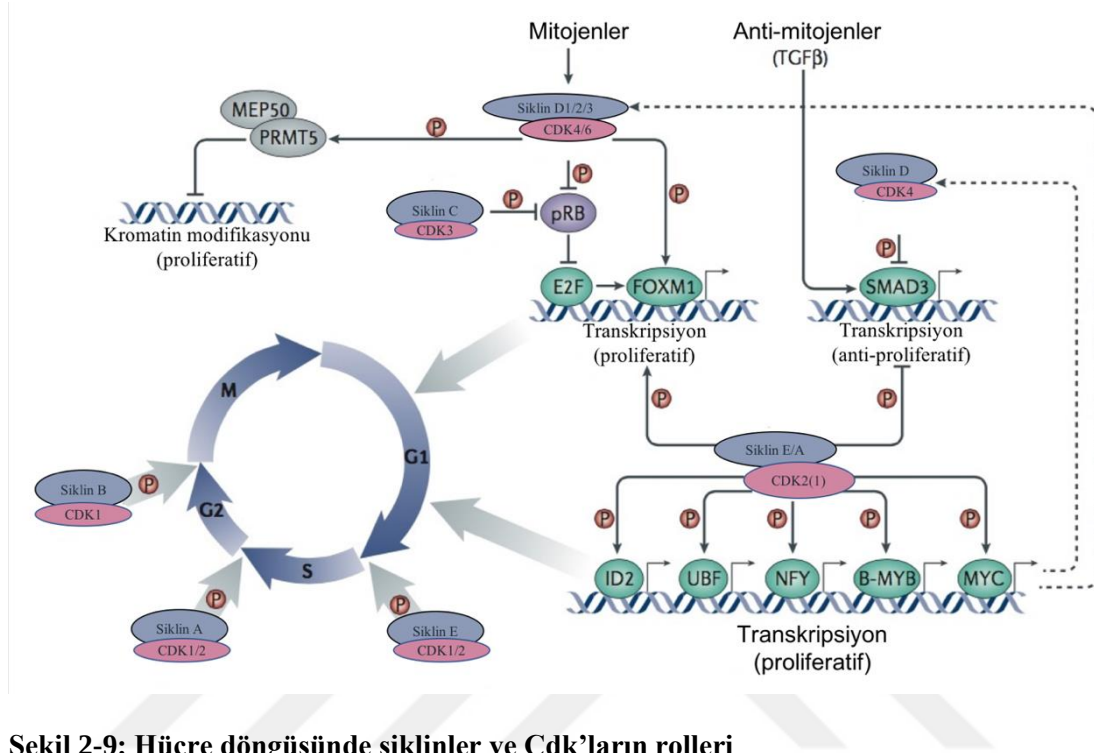
Hücre döngüsünde **DNA hasarı kontrol noktası** olarak adlandırılan kontrol noktaları, hasara uğramış DNA'nın kopyalanarak yavru hücrelere geçmemesi için gereklidir. Bu kontrol noktaları, replike olmamış veya hasarlı DNA'lara duyarlıdır ve DNA replikasyonunun tamamlanması ya da DNA onarımı ile hücre döngüsünün devam etmesini düzenlerler. DNA hasarı kontrol noktaları, hücre döngüsünün G1, S ve G2 evrelerinde görev yapar. Örneğin, G2'deki kontrol noktası DNA replikasyonu

tamamlanmadan veya hasara uğramış DNA tamir edilmeden mitozun başlamasına engel olur. Hasarlı DNA'lar hücre döngüsünü duraksatan bir sinyal yolağını aktive eder. Böylece, G2'deki kontrol noktasının işletilmesiyle genom tamamen replike olmadan veya hasarlı DNA tamir edilmeden M evresine geçiş engellenir. Fakat bundan sonra G2'deki inhibisyon ortadan kalkar ve hücre mitozla geçerek, tümüyle replike olmuş kromozomları yavru hücrelere dağıtır. Benzer şekilde, G1 kontrol noktasında duraklama, hasarlı DNA'nın, S evresine girmeden onarılabilmesine imkan sağlar ve DNA'nın hasarlı olarak kopyalanmasını engeller. S evresi kontrol noktası, DNA'nın bütünlüğünü sürekli denetler ve hasarlı DNA'nın onarılmadan kopyalanmasını engeller ayrıca kalite kontrol işlevi ile DNA replikasyonu sırasında ortaya çıkabilen, yanlış bazların eklenmesi veya DNA zincirlerinin eksik kopyalanması gibi hataların tamir edilmesine olanak sağlar (Cooper ve Hausman 2015).

Siklin ve Siklin-Bağımlı Kinaz Aileleri: Siklinler her hücre döngüsü boyunca sentezlenip yıkılan bir protein ailesidir. Bugüne kadar hücre döngüsü ilerlemesinde direkt olarak sekiz adet siklin proteini ilişkili bulunmuştur ve siklin A1 ve A2, B1, B2 ve B3, C, D1, D2 ve D3, E1 ve E2, F, G1 ve G2 ve H olarak isimlendirilmişlerdir. Tüm siklinler, yaklaşık 150 aminoasitten oluşan ve spesifik Cdk'ların N-ucuna bağlanan bir homoloji bölgesine sahiptir (Akiprik 2012).

Yüksek ökaryotlarda hücre döngüleri sadece çeşitli siklinler tarafından değil, aynı zamanda Cdk'lar (siklin bağımlı kinazlar) tarafından da kontrol edilir. Cdk moleküllerinin ekspresyon düzeyleri hücre döngüsü boyunca sabit kalır. Cdk'lar bir serin/threonin kinaz ailesi üyesidir ve bugüne kadar, Cdk1 (cdc2), Cdk2, Cdk3, Cdk4, Cdk5, Cdk6, Cdk7, Cdk8 ve Cdk9 olmak üzere dokuz Cdk tanımlanmıştır (Akiprik 2012). Cdk ailesinin üyeleri, hücre döngüsünün farklı basamakları boyunca spesifik siklinlere bağlanarak aktive olurlar. Örneğin, G1'den S'ye geçiş, **siklin D** ve E ile bağlanan Cdk2, Cdk4 ve Cdk6 tarafından düzenlenir. Cdk4 ve Cdk6'nın D-tipi siklinlerle (siklin D1, D2 ve D3) oluşturduğu kompleksler, G1 restriksiyon noktasından geçişte kritik bir role sahiptir. E tipi siklinler (E1 ve E2), G1'in ilerleyen evresinde ifade edilir ve Cdk2/siklin E kompleksleri G1'den S'ye geçiş ve DNA sentezinin başlaması için gereklidir. Cdk2'nin A tipi siklinler (A1 ve A2) ile yaptığı kompleksler, hücrelerin S evresinin sonlarından başlayarak ve G2 evresi boyunca görev alırlar. Mitozun

başlatılması ve M evresinin aşamalarının sırasıyla geçilmesi, Cdk1'in A ve B tipi (B1, B2, B3) siklinlerle yaptığı kompleksler sayesinde gerçekleşmektedir (Şekil 2-9).



Şekil 2-9: Hücre döngüsünde siklinler ve Cdk'ların rolleri

(Hydbring ve ark. 2016'dan uyarlanmıştır.)

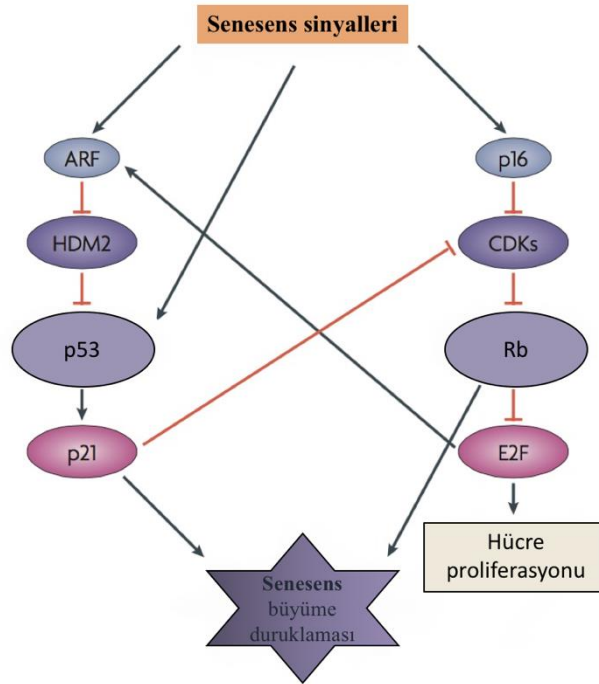
Farklı Cdk/siklin kompleksleri hücre döngüsünün farklı evrelerinde görev almalarına rağmen, genetiği değiştirilmiş farelerde yapılan Cdk ve siklin hakkındaki çalışmalar şaşırtıcı oranda bir esnekliği ortaya çıkarmıştır. Herhangi bir Cdk veya siklinin yokluğunu diğer Cdk ve siklinler telafi edebilmektedirler. En ilginç olan bulgu ise, interfaz Cdk proteininin (Cdk2, Cdk4 ve Cdk6) hiçbirinin bulunmadığı hücrelerin bile hücre döngüsünü tamamlayarak çoğalabilmeleridir. Bu hücrelerin incelenmesiyle, diğer Cdk'lerin yokluğunda Cdk1'in tüm siklinlere bağlanabildiği ve hücre döngüsünün tüm evrelerinde ilerlemeyi düzenleyebildiği gözlemlenmiştir. Buna karşılık, Cdk1'in yokluğunda fare embriyoları gelişmemektedirler. Bundan dolayı Cdk1, memeli hücrelerinde (mayalarda olduğu gibi) bulunması zorunlu olan tek Cdk'dir ve diğer Cdk'lerin yokluğunu telafi edebilmektedir.

Hücre döngüsü ilerlemesi sırasında, Cdk'ların aktivitesi en az dört moleküler mekanizma ile düzenlenir. Regülasyonun ilk aşaması, Cdk'ların siklinler ile

bağlanmasıdır. Spesifik Cdk/siklin komplekslerinin oluşumu, siklin sentezi ve parçalanması yoluyla kontrol edilir. İkinci olarak, Cdk/siklin komplekslerinin aktivasyonu için, Cdk üzerindeki, 160'ıncı pozisyon yakınında bulunan korunmuş treonin amino asidinin fosforilasyonu gereklidir. Cdk'lerin bu aktive edici fosforillenmesi CAK (Cdk-aktifleştiren kinaz) olarak adlandırılan ve Cdk7' nin siklin H ile kompleks oluşturmasıyla meydana gelen bir enzim tarafından katalizlenir. Cdk7/siklin H kompleksi, RNA polimeraz II'nin transkripsiyonu başlatması için gerekli olan transkripsiyon faktörü TFIIH ile de bağlanır. Cdk ailesinin bu üyesinin, hücre döngüsü regülasyonu yanı sıra, transkripsiyonda da yer aldığı anlaşılmaktadır.

CAK tarafından, aktifleştirici fosforillenmenin aksine, Cdk regülasyonunun üçüncü mekanizması, Weel protein kinaz tarafından katalizlenen, Cdk amino ucuna yakın tirozinlerin, inhibe edici fosforillenmesini kapsar. Örneğin, Cdk1 ve Cdk2'nin her ikisi de, omurgalılarda tirozin-15 ve treonin-14'ün fosforillenmesi ile inhibe edilir. Bu Cdk'lar daha sonra, Cdc25 protein fosfataz ailesinin üyeleri tarafından, bu aminoasitlerin defosforillenmesiyle aktifleşirler. Cdk'lerin fosforillenmesi yoluyla regülasyonuna ilaveten, aktiviteleri, Cdk inhibitörleri ya da CKI'ler olarak adlandırılan inhibitör proteinlerin Cdk/siklin komplekslerine bağlanması yoluyla da kontrol edilebilir (Cooper ve Hausman 2015). Siklin ve siklin bağımlı kinazlar hücre döngüsünün pozitif yönde denetleyicileri iken CKI'ler ise negatif yönde denetleyiciler olarak görev yaparlar (Akkiprik 2012). Memeli hücrelerinde, iki Cdk inhibitör ailesi, farklı Cdk/siklin komplekslerinin düzenlenmesinden sorumludur. INK4 (inhibitör of Cdk4) ailesinin üyeleri [p14, p15 (INK4B), p16 (INK4A), p18(INK4C), p19(INK4D)] özel olarak Cdk4 ve Cdk6'ya bağlanır ve inhibe ederler, yani Ink4 CKI'lar G1'deki restriksiyon noktasından geçişi inhibe ederler. CIP (Cdk-interacting protein) / KIP (kinase inhibitör protein) ailesi üyeleri [p21(CIP1/WAF1/SDI1), p27(KIP1), p57(KIP2)] ise, Cdk ve siklinlere birlikte bağlanarak Cdk2/siklin A, ve E komplekslerinin inhibe ederler, ve böylece S evresine girişi ve S ve G2 evreleri boyunca ilerlemeyi engellerler. Dolayısıyla, Ink4 ve Cip/Kip proteinlerinin kontrolü, Cdk aktivitesinin düzenlenmesinde ek bir mekanizma sağlar. Çok sayıdaki Cdk denetim biçiminin birleşik etkileri, hem kontrol noktalarının kontrolüne, hem de hücre çoğalmasını düzenleyen ekstraselüler çeşitli uyarılara yanıt olarak, hücre döngüsü kontrolünden sorumludur.

G1-Cdk'lerin Regülasyonu; Hayvan hücrelerinin çoğalması, G1'in geç safhasındaki restriksiyon noktasından hücrelerin ilerlemesini kontrol eden, çeşitli ekstraselüler büyüme faktörü tarafından düzenlenir. Büyüme faktörlerinin yokluğunda, hücreler restriksiyon noktasını geçemezler ve durağan hale gelirler, çoğunlukla G0 olarak bilinen dinlenme durumuna geçerler. Bu durumdan çıkmaları ve tekrar hücre döngüsüne girmeleri ancak büyüme faktörü uyarılarına cevaben gerçekleşir. Hücre döngüsü ilerlemesinin ekstraselüler büyüme faktörleri tarafından kontrol edilmesi, büyüme faktörü reseptörlerinin uyardığı hücre içi sinyal yollarının, hücre döngüsü mekanizmasının bileşenlerini denetlediği anlamına gelir (Şekil 2-10).



Şekil 2-10: Senesens p53 ve p16– Rb yolları tarafından kontrol edilir

(Campisi ve d'Adda di Fagagna 2007)

Büyüme faktörü sinyal iletimi ve hücre döngüsünün işleyişi arasında önemli bir ilişki D-tipi siklinler ile sağlanmıştır. Siklin D sentezi Ras/Raf/MEK/ERK yolağıyla iletilen büyüme faktörü uyarısına yanıt olarak başlar ve büyüme faktörlerinin varlığı süresince sentez devam eder. Ancak, siklin D çok çabuk parçalandığı için, büyüme faktörleri ortamdan çekildiğinde hücre-içi konsantrasyonları hızla azalır. G1'de, büyüme faktörleri bulunduğu sürece Cdk4,6/siklin D kompleksleri hücrelerin restriksiyon

noktasından geçişini sağlar. Eğer hücre döngüsünün bu kilit düzenlenme noktasından önce büyüme faktörleri ortamdan uzaklaşırsa, siklin D seviyeleri hızla düşer ve hücreler G1'den S'ye geçemeyerek G0'a girerler ve durağan hale gelirler. Siklin D1'in uyarılabilirliği ve hızlı dönüşüm özelliği, hücre döngüsü mekanizması ile büyüme faktörü sinyali arasında bağlantı kurar ve böylece, ekstraselüler büyüme faktörlerinin, hücrelerin G1'den ilerlemesini kontrol etmelerine olanak sağlar (Cooper ve Hausman 2015).

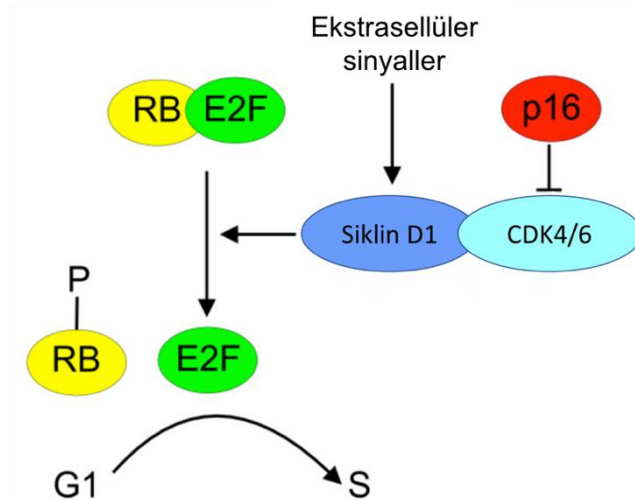
Hücre döngüsünün denetiminde iki önemli ubiquitin ligaz fonksiyonu gösteren çok alt üniteli SCF ve APC kompleks yapıları vardır. Bu kompleksler yıkıma uğrayacak proteinleri tanıyarak hedef protein üzerlerindeki lizin rezidülerine kovalent olarak ubiquitin zincirleri ekler. Bu şekilde yıkılım için proteozomlar tarafından tanınma sağlanmış olur. SCF kompleksi geç G1'den, erken mitoz evresine kadar aktiftir ve G1 siklinleri, Cdk inhibitörleri ve diğer hücre döngüsü proteinlerinin yıkımını yönlendirir. Bu proteinler döngüyü denetleyen bir Cdk tarafından fosforile edildikten sonra SCF için hedef olurlar. APC kompleksi ise mitoz fazında rol alır ve mitotik siklinleri içeren anahtar mitotik proteinlerinin yıkımını sağlar (Akkiprik 2012).

Siklin D1, büyüme faktörü sinyal iletiminin önemli hedeflerinden biri olduğundan, siklin D regülasyonundaki bozukluklar, kanser hücrelerinin karakteristik özelliği olan kontrolsüz çoğalmaya neden olur. İnsan kanserlerinin çoğunun, hücre döngüsü regülasyonundaki bozukluklar sonucu, diğer büyük bir kısmının da büyüme faktörü reseptörleri tarafından aktive edilen hücre-içi sinyal yollarındaki anormalliklerden kaynaklandığı bulunmuştur. Örnek olarak, lenfomalar ve meme kanserleri de dahil birçok insan kanserinin gelişimine, siklin D1'in sürekli, kontrol edilemeyen ekspresyonu ile sonuçlanan mutasyonlar katkıda bulunmaktadır. Benzer şekilde, Cdk4, 6/siklin D komplekslerine bağlanan Ink4 Cdk inhibitörlerini (örn., p16) inaktive eden mutasyonlara da, insan kanser hücrelerinde sıklıkla rastlanmaktadır.

Siklin D, büyüme kontrolü ve kanser arasındaki bağlantıyı kuvvetlendiren diğer bir gerçek de, birçok insan tümörlerinde, Cdk4, 6/siklin D1 komplekslerinin önemli bir substrat proteininin sıklıkla mutasyona uğramış olmasıdır. Rb olarak adlandırılan bu protein, ilk kez, nadiren görülen çocukluk çağı göz tümörü olan retinoblastomdan sorumlu bir genin ürünü olarak tanımlanmıştır. Daha sonraki çalışmalar, fonksiyonel Rb protein eksikliğine yol açan mutasyonların, sadece retinoblastom ile sınırlı olmadığını, yaygın insan kanserlerinin çoğunda da rol aldığını göstermiştir. Rb, tümör baskılayıcı

gendir. Ras ve siklin D1 gibi onkogen proteinler hücre çoğalmasını desteklerken, tümör baskılayıcı genlerden kodlanan proteinler, hücre döngüsü ilerlemesini yavaşlatan fren rolü oynarlar. Tümör baskılayıcı genler tarafından kodlanan hücre döngüsü düzenleyicilerine verilebilecek diğer örnekler, Ink4 Cdk inhibitörleri ve p53'dür.

Rb ile ilgili daha sonraki çalışmalar, DNA sentezi ve hücre döngüsü ilerlemesi için gerekli genlerin ekspresyonu ile hücre döngüsü mekanizmasının eşleşmesi için Rb'nin anahtar rol oynadığını ortaya çıkarmıştır. Hücreler döngüde ilerlerken, Rb'nin aktivitesi, fosforilasyonundaki değişikliklerle denetlenir. Örnek olarak, hücre G1'deki restriksiyon noktasından geçerken, Rb Cdk4, 6/siklin D kompleksleri tarafından fosfatlanır. G0'da ya da G1'in erken safhasında bulunan fosfat eklenmemiş formdaki Rb, siklin E'yi kodlayan gen de dahil olmak üzere, hücre döngüsü ilerlemesinde rol alan bir çok genin ekspresyonu düzenleyen **E2F** transkripsiyon faktörleri ailesinin üyelerine bağlanır. E2F, Rb'nin varlığında ya da yokluğunda hedef dizilerine bağlanır. Ancak, Rb baskılayıcı rol oynar ve Rb/E2F kompleksi E2F tarafından kontrol edilen genlerin transkripsiyonunu engeller. Rb'nin Cdk4,6/siklin D kompleksleri tarafından fosforillenmesi, E2F'den ayrılmasına neden olur ve böylece, E2F hedef genlerinin transkripsiyonunu aktive eder (Şekil 2-11).



Şekil 2-11: Hücre döngüsünün G1-S geçişinin siklin D1, Cdk4 ve p16 tarafından düzenlenmesi

(Peurala ve ark. 2013'den uyarlanmıştır.)

Rb, bu yolla, hücre döngüsü ilerlemesinde gerekli genler üzerinde etkili olan E2F'nin, baskılayıcıdan aktivatöre dönüşünü sağlayan bir çeşit moleküler şalter gibi hareket eder. Rb'nin Cdk4,6/siklin D fosfatlanması yoluyla kontrolü, gen ekspresyonundaki bu ciddi kontrol ile, büyüme faktörlerinin G1'deki varlığını bağdaştırır (Cooper ve Hausman 2015).

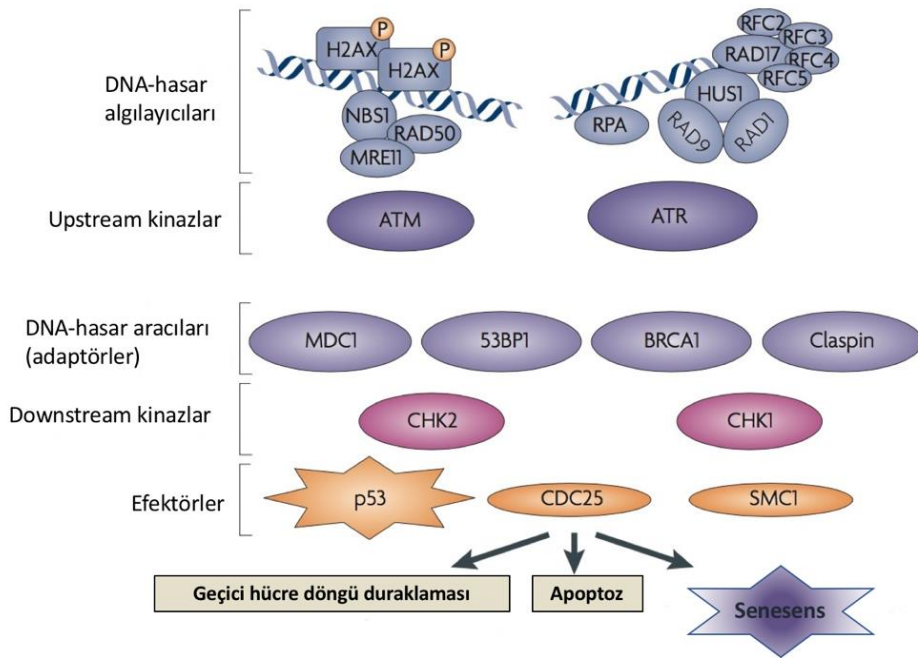
E2F ailesi transkripsiyon faktörleri ve onların dimerizasyon partner proteinleri G1-S transkripsiyonunun düzenleyicisi olarak rol oynamaktadırlar. E2F fonksiyonunun yanlış düzenlenmesi sıklıkla kanserde bulunmuştur. E2F aile üyeleri genel olarak transkripsiyon aktivasyonu (E2F1, E2F2 ve E2F3A) ve baskılanması (E2F3B, E2F4, E2F5, E2F6, E2F7 ve E2F8) ile ilişkilidir. E2F baskılayıcı kompleksler sessiz hücrelerde, farklılaşmış hücrelerde ve hücre döngüsünün G1 evresinde hedeflerinin transkripsiyonunu baskılar. E2F proteinleri, hücre döngüsü sırasında çeşitli süreçler için ihtiyaç duyulan genlerin, geçici ekspresyonlarını kontrol eder. Bu yüzden, E2F-bağlı transkripsiyonun seviyesi hücre proliferasyonu için çok önemlidir (Bertoli ve ark. 2013).

DNA Hasarı Kontrol Noktaları: Hücre çoğalması büyüme faktörleri tarafından düzenlendiği gibi hücre döngüsünün ilerlemesini engelleyen bir takım sinyaller ile de kontrol edilir. DNA hasarı kontrol noktaları, hasar görmüş veya eksik olarak kopyalanmış DNA'yı tanıyarak hücre döngüsünün ilerlemesini duraksatırlar, böylece genomun bütünlüğünün korunmasında önemli bir rol oynarlar. G1, S ve G2 evrelerinde işlev gören bu kontrol noktaları, DNA replikasyonu ve hücre bölünmesine geçmeden önce hasarın tamiri için zaman sağlarlar (Cooper ve Hausman 2015).

Eğer hasar çok ciddi ise hücre apoptoza veya geri dönüşümü olmayan bir senesens benzeri duruma girer. Kontrol noktası işlevini, çoğunlukla bir siklin/Cdk kompleksinin inaktivasyonu veya aktivasyonunda gecikmeye yol açma şeklinde yerine getirmektedir (Akkiprik 2012). DNA hasarı oluştuğunda, aynı aileden ATR (ataxia-telangiectasia and Rad3-related) ve ATM (ataxia-telangiectasia mutated) adlı iki protein kinaz aracılığıyla hücre döngüsü duraksatılır. ATR ve ATM uyardığı sinyal iletim yolağı hücre döngüsünü duraksatmakla birlikte, DNA tamirinin başlatılmasına ve bazı durumlarda programlı hücre ölümüne sebep olur (Cooper ve Hausman 2015).

ATM ve ATR hasar tipine özgü olarak aktive edilirler. Ultraviyole radyasyon hasarı veya tamamlanmamış DNA replikasyonu ATR tarafından, iyonize radyasyon

hasarı veya temel olarak çift zincir kırıkları ise ATM tarafından saptanır. Hücrede tek bir DNA molekülünün kırılması bile ATM molekülünün aktivasyonu için yeterlidir. ATR ve ATM hasarlı DNA'yı içeren kromatin yapıya bağlanabilme özelliğinde, multiprotein kompleksleridir. Hasarlı DNA ile etkileşen ve aktifleşen ATM veya ATR hücre döngüsü kontrol noktaları ve DNA tamiri ile ilişkili pek çok proteini fosforilleyerek aktivitelerini düzenler (Şekil 2-12) (Akkiprik 2012).



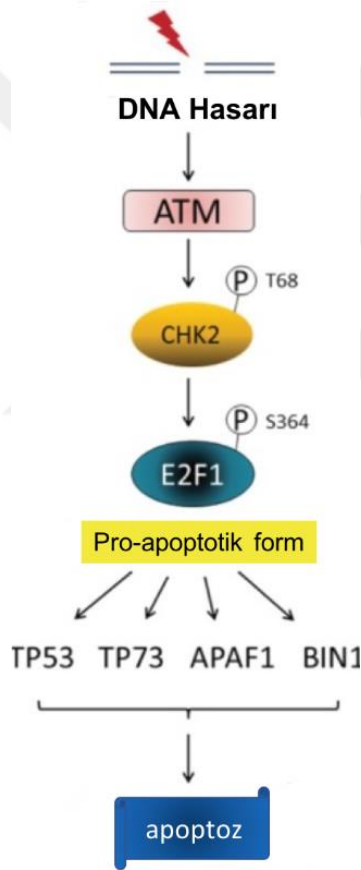
Şekil 2-12: DNA hasar yanıtı

(Campisi ve d'Adda di Fagagna, 2007'den uyarlanmıştır.)

Kontrol noktası terimi ilk olarak tomurcuklanan maya *Saccharomyces cerevisiae*'deki bulgulara dayalı olarak keşfedilmiştir ve DNA hasarına yanıt olarak, tamir için zaman sağlayan hücre döngüsü ilerlemesini durduran düzenleyici yolağı bulunmuştur. 1994'de ilk olarak tomurcuklanan mayada birçok kontrol noktası yanıtına katılan bir kinaz keşfedilmiştir ve Rad53 olarak isimlendirilmiştir. 1998/1999'da 5 farklı laboratuvar tarafından insandaki homologunun bulunduğu bildirilmiştir. İnsandaki geni ilk klonlayan Elledge ve arkadaşları tarafından bu kinaz Chk2 (Checkpoint kinase 2)

olarak isimlendirilmiştir. Chk2 proteinlerin genel yapısı tüm ökaryotlarda benzerdir (Bartek ve ark. 2001).

Mitoza girmeye hazırlanan bir hücre UV radyasyona maruz kaldığında ATR kinaz aktifleşir ve hücre G2 evresinde bekletilir. ATR bir kontrol noktası kinazı olan Chk1(Checkpoint kinase 1)'i fosforilleyerek aktifleştirir. Benzer şekilde G1 evresinde hücrenin iyonize radyasyona maruz kalması sonucu hasarın ATM tarafından tanınmasının ardından diğer bir kontrol noktası kinazı olan Chk2 fosforillenerek aktifleştirilir (Akkiprik 2012). Chk2'nun ATM tarafından Thr68'daki fosforilasyonu daha sonraki aşamalar için ön koşuldur (Şekil 2-13) (Bartek ve ark. 2001).



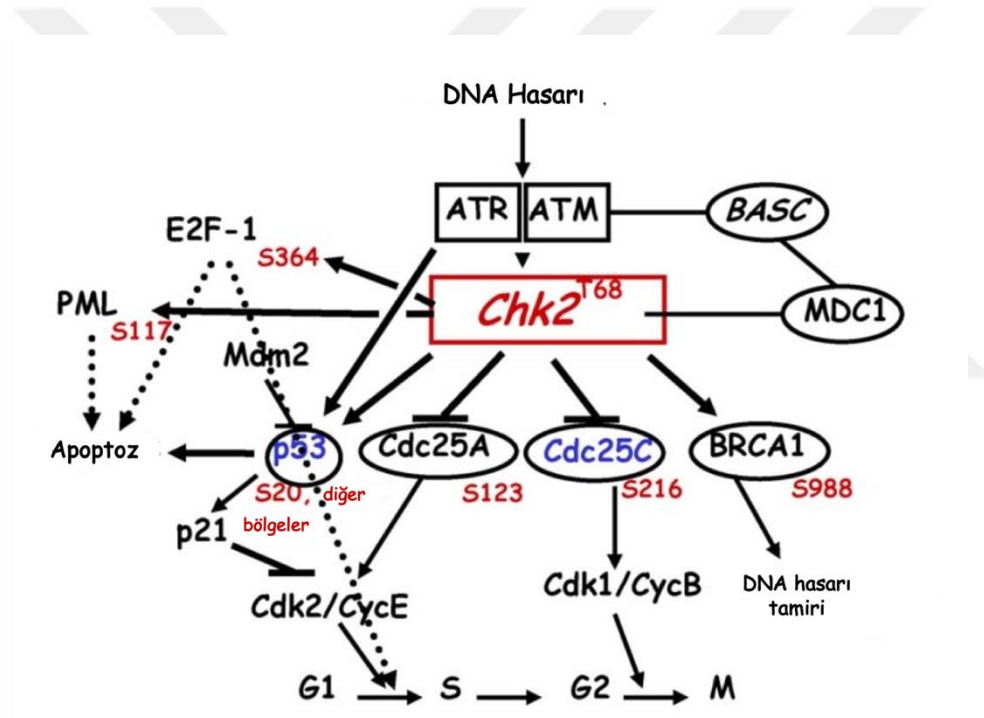
Şekil 2-13: DNA hasarı ATM ve Chk2'yu aktifleştirir

(Sakamuro ve ark. 2015'den uyarlanmıştır.)

Chk1 ve Chk2, Cdc25 fosfatazları fosfatlayarak inhibe olmalarını ya da yıkımlarını sağlayarak, hücre döngüsünü duraksatırlar. Cdc25 fosfatazlar, Cdk1 ve Cdk2 üzerindeki kısıtlayıcı fosforilasyonları kaldırarak hücre döngüsünün ilerleyebilmesi için

gereklidirler. Dolayısıyla, DNA hasarı Cdk2'yi kısıtlayarak G1 ve S evrelerinde hücre döngüsünü duraksatırken, ek olarak Cdk1'i kısıtlayarak G2'de duraksamaya sebep olur.

Memeli hücrelerinde G1 kontrol noktasındaki duraksama, Chk2 ve ATM tarafından fosforillenen, p53 olarak bilinen diğer bir proteinin etkisi ile gelişir. Fosforillenme, p53'ü, kararlı hale getirir ve DNA hasarı p53 miktarında hızlı artışa neden olur. p53 proteini bir transkripsiyon faktörüdür ve ekspresyon artışı, Cip/Kip ailesinden Cdk kısıtlayıcısı p21 geninin uyarılmasına yol açar. p21 proteini Cdk2'nin siklin E veya siklin A komplekslerini inhibe ederek hücre döngüsünün duraksamasına neden olur (Şekil 2-14).



Şekil 2-14: Chk2 hücre döngüsü kontrolündeki anahtar proteinleri fosforiller

(Ahn ve ark. 2004'den uyarlanmıştır.)

İnsan kanserlerinde p53'ü kodlayan gen sıklıkla mutasyona uğramış durumdadır. Bu mutasyonlarla p53 işlev kaybı, hasarlı DNA'ya yanıt olarak G1'de duraksamayı engeller ve hasarlı DNA replike olarak onarılmadan yavru hücrelere geçer. Hasarlı DNA'ların kalıtımı, mutasyon sıklığında artışa ve genel bir genom kararsızlığına neden olarak kanser gelişimine katkıda bulunur. p53 genindeki mutasyonlar insan kanserlerinde en yaygın genetik değişikliktir. Bu durum, hücre döngüsü düzenlenmesinin çok hücreli

organizmaların hayatında ne kadar kritik bir öneme sahip olduğunun göstergesidir (Cooper ve Hausman 2015).



3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 06/04/2017-133989 tarih ve sayılı onayı ile yapılmıştır (Sayfa 74).

Çalışmadaki deneyler İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda (2017-2018) gerçekleştirilmiştir. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları Bilim Dalı ve Beyin ve Sinir Cerrahisi Anabilim Dalı polikliniklerinden takipli hastaların dosyaları geriye dönük taranarak akromegali, Cushing sendromu ve fonksiyonel olmayan hipofiz adenomu tanısı ile takipli hastalar saptandı. Bu hastalardan takiplerine düzenli gelen ve Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Beyin ve Sinir Cerrahisi Anabilim Dalı'nda opere edilmiş ve Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda operasyon materyellerine ait parafin blokların bulunduğu saptanan 67 hasta (20 Akromegali, 20 Cushing Hastalığı, 27 Fonksiyonel Olmayan Hipofiz Adenomu) “yazılı olur formları” alındıktan sonra çalışmaya dahil edildi.

Tüm hasta gruplarına ait parafine gömülü arşiv doku kesitlerine p16, Rb, pRb-S608, E2F1, pE2F1-S364, p73, Siklin D1, pChk2-Thr68 ve pATM-S1981 antikoları kullanılarak immünohistokimyasal boyama uygulandı. Hasta arşiv dosyalarından taranarak elde edilen hastaların klinik, histopatolojik ve laboratuvar bulguları, proliferasyon indeksleri, tümör boyutu, radyolojik veya patolojik olarak saptanan tümör invazyonu gibi özellikleri ile adenom dokularındaki proteinlerin ekspresyonları ile aralarındaki ilişkisi değerlendirildi.

3 hasta grubundan (Akromegali, Cushing Hastalığı, Fonksiyonel Olmayan Hipofiz Adenomu) yedişer hastaya ait toplam 21 hasta hipofiz tümör dokusundan (İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları Bilim Dalı'nda -80°C'de muhafaza edilen operasyon materyellerine) qRT-PCR yöntemi ile p16 (CDKN2A), RB1, E2F1, TP73 (Tümör protein 73), ATM, Siklin D1 (CCND1) ve CHEK2 genlerinin mRNA ekspresyonları araştırıldı.

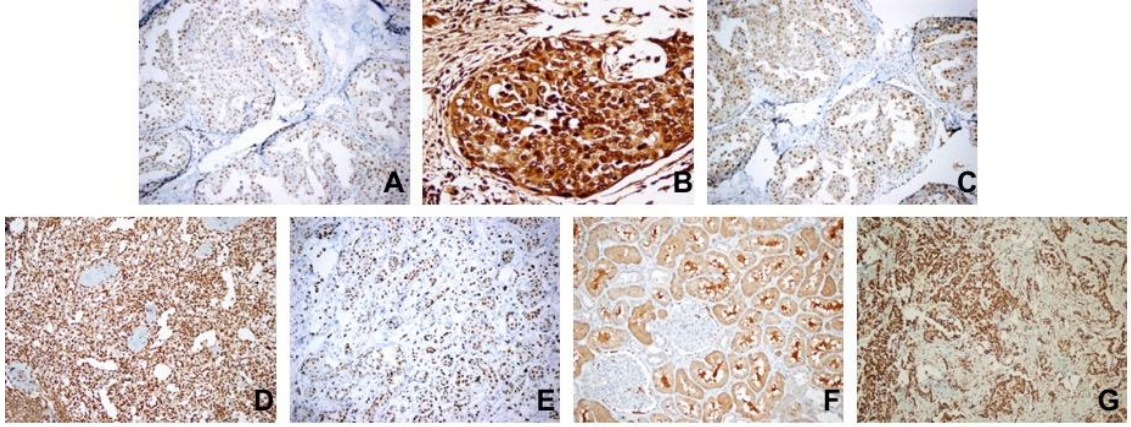
Ayrıca 3 ayrı hasta grubuna ait beşer hasta rastgele seçilerek toplam 15 hastaya ait hipofiz tümör dokusundan (İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları Bilim Dalı'nda -80°C'de muhafaza edilen operasyon materyellerine) western blot analizi ile E2F1 protein ekspresyonu araştırıldı.

3.1. p16, Rb, pRb-S608, E2F1, pE2F1-S364, p73 ve pATM-S1981 Proteinlerin Ekspresyon Seviyelerinin İmmünohistokimyasal Boyama Yöntemi ile Belirlenmesi

Akromegali, Cushing ve NFA hasta gruplarında p16, Rb, pRb-S608, E2F1, pE2F1-S364, p73 ve pATM-S1981 proteinlerin ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi amacıyla immünohistokimyasal (İHK) boyama işlemi yapıldı. İHK için Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı arşivinden 67 hastanın adenom doku materyellerine ait parafin bloklardan elde edilen 4 mikron kalınlığındaki kesitler pozitif şarjlı lamlara alındı.

p16, Rb, pRb-S608, E2F1, pE2F1-S364, p73 ve pATM-S1981 antikorları ile (Tablo 3-1), İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı arşivinden sağlanan pozitif kontrol preparatları (Şekil 3-1) kullanılarak en uygun sulandırma ve boyanma optimizasyon işlemleri yapıldı. Son sulandırmalar Tablo 3-1’ de verildi. pChk2-Thr68 ve Siklin D1 antikorları pozitif kontrol dokularında çeşitli optimizasyon uygulamalarına rağmen çalışmadı. Bu nedenle bu ilki antikor İHK çalışmasından çıkarıldı.

İHK için, otomatik preparat boyama cihazı (Ventana medica Systems, Tuscon, AZ, USA) ve indirekt avidin biotin peroksidaz yöntemi kullanıldı. Pozitif şarjlı lam üzerine alınmış 4 mikronluk kesitler gece boyunca 40⁰C’e ayarlı etüvde bekletildi. Kesitlerin parafini giderildikten sonra azalan oranlardaki alkol serisinden geçirildikten sonra distile su içine alındılar. Antijeni iyileştirme işlemi için 10mmol/L’lik tamponlu sitrat çözeltisi kullanıldı ve 30 dakika boyunca 36⁰C’de bekletildi. Daha sonra kesitler p16, Rb, pRb-S608, ve E2F1, pE2F1-S364, p73 ve pATM-S1981 antikorları 1 saat boyunca muamele edildi. Yıkama sonrası hematoksilen ile zıt boyama yapıldı. İmmün reaksiyonların analizleri mikroskop altında değerlendirildi.



Şekil 3-1: Pozitif kontrol dokuları

A) pATM-S1981; meme duktal karsinom dokusu, 1:100, x200 büyütme B) pE2F1-S608; meme duktal karsinom dokusu, 1:100, x400 büyütme C) pRB-S608; meme duktal karsinom dokusu, 1:75, x200 büyütme D) E2F1; insan dalak dokusu, 1:100, x200 büyütme E) Rb; meme duktal karsinom dokusu, 1:1000, x200 büyütme F) p73; insan böbrek dokusu, 1:50, x200 büyütme G) p16; meme duktal karsinom dokusu, 1:100, x100 büyütme,

Tablo 3-1: İHC analizinde kullanılan primer antikorlar

<u>Primer Antikorlar</u>	<u>Firma</u>	<u>Katalog no</u>		<u>İHK</u> <u>(s.o.)</u>
ATM (phospho S1981)	Abcam	ab81292	Rabbit monoklonal IgG	1:100
p73 [EP436Y]	Abcam	ab40658	Rabbit monoklonal IgG	1:50
Rb (phospho S608)	Abcam	ab60025	Rabbit polyclonal IgG	1:75
Rb [EPR17512]	Abcam	ab181616	Rabbit monoklonal IgG	1:1000
E2F1 [EPR3818(3)]	Abcam	ab179445	Rabbit monoklonal IgG	1:100
E2F1 S364	Rockland	600-401-690	Rabbit poliklonal IgG	1:100
p16 (1E12E10)	Santa Cruz	sc-81156	Mouse monoklonal gG	1:100

(s.o. Sulandırma oranı)

3.1.1. İmmünohistokimyasal boyamanın değerlendirilmesi

İmmün boyamanın değerlendirilmesi rastgele seçilen beş alanda BHS Olympus mikroskobu kullanılarak her alanda en az 100 hücre sayılarak manuel olarak gerçekleştirildi. Bu bölgelerdeki çeşitli yoğunluklardaki hücrelerin yüzdesi iki araştırmacı tarafından farklı zamanlarda puanlandı ve ortalaması alındı. İmmün boyanmanın yoğunluğu; negatif (0), zayıf (1+), orta (2+) ve güçlü (3+) boyanma olarak değerlendirildi ve aşağıdaki formülü kullanarak boyanmanın yoğunluğuna göre çarparak her örnek için bir histolojik skor (H skoru, HSCORE) elde edildi. Histolojik skora ΣPi (i+1) (i; yoğunluk skorunu temsil eder ve Pi, ilgili hücrelerin yüzdesidir) formülü kullanılarak yarı kantitatif histolojik skor (H skoru) hesaplandı.

3.2. ATM, CCDN1(SiklinD1), CDKN2A(p16), CHEK2(Chk2), E2F1, RB1 ve Tp73 Genlerin mRNA Ekspresyon Seviyelerinin qRT-PCR Yöntemi ile Belirlenmesi

21 (7 Akromegali, 7 Cushing ve 7 NFA) hasta dokularından total RNA izolasyonu yapıldı ve ATM, CCDN1(SiklinD1), CDKN2A(p16), CHEK2, E2F1, RB1 ve TP73 genlerinin mRNA ekspresyonunu belirlemek için kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) yöntemi kullanıldı.

3.2.1. Total RNA İzolasyonu

Hasta gruplarından total RNA izolasyonu için PureZOL (Bio-Rad, PureZOL™ RNA Isolation Reagent, #732-6880, USA) kullanıldı ve aşağıdaki işlem sırası uygulandı.

Tüm aşamalar oda sıcaklığında yapıldı.

1. 50-100 mg'lik dokuya 1 ml eklendi ve homojenizatör (Fisherbrand motorized tissue grinder, #12-1413-61, USA) kullanılarak hızlıca homojen hale getirildi ve 3 defa 10 saniye vortekslendi.
2. Lizat 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. 12,000 x g'de 10 dakika 4°C'de santrifüj edildi ve üst faz yeni bir 2 ml'lik tüpe aktarıldı.
3. 1ml PureZOL için 0.2 ml olacak şekilde kloroform (Sigma-Aldrich, 24216-2.5L-R USA) eklendi, 15 saniye boyunca kuvvetlice çalkalandı (Bu basamakta vorteks yapılmamalı).
4. 5 dakika oda sıcaklığında periyodik olarak karıştırılarak inkübe edildi.
5. 12,000 x g'de 15 dakika 4°C'de santrifüj edildi.
6. Karışım; üst renksiz sulu faz, beyaz renk interfaz ve kırmızı organik faz olmak üzere üç faza ayrıldı. RNA sulu fazda iken, DNA ve proteinler ise interfaz ve organik fazdadır. Sulu fazın hacmi ilk basamakta kullanılan purezol hacminin %60'ı olmalıdır (600 µl).
7. İnterfazı bozmadan, sulu faz (500 µl) hemen yeni bir RNaz içermeyen tüpe alındı (sulu fazın bir kısmı bırakılmalı).
8. 1ml PureZOL için 0.5 ml izopropil alkol eklendi, iyice karıştırıldı ve 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
9. 12,000 x g'de 10 dakika 4°C'de santrifüj edildi.
10. RNA tüpün altında ve yanda beyaz pellet bulunur, üst faz atıldı.

11. RNA pelletini yıkamak için her 1ml PureZOL için 1 ml %75 etanol eklendi.
12. Örnek vorteklendi ve 4°C’de 5 dakika 7,500x g’de santrifüj edildi ve üst faz atıldı.
13. 10 dakika boyunca RNA pelleti kurutuldu (Pelleti tamamen kurutmaktan kaçınılmalıdır).
14. Pellet uygun miktar (50 µl) RNaz içermeyen suda çözöldü. Pellet tamamen çözöölünceye kadar birkaç kez pipetaj yapıldı, 55-60°C’de 10 dakika inkübe edildi.
15. RNA -80°C’de saklandı.

3.2.2. Total RNA Konsantrasyon ve Saflık Ölçümü

RNA konsantrasyonunu ve saflığını tespit etmek için MultiScan GO Mikroplaka Spektrofotometresi (Thermo Scientific, USA) kullanıldı. RNA konsantrasyonu 260 nm’deki optik yoğunlunluğundan, saflığı da 260 nm/280 nm’deki OD oranından tespit edildi. RNA konsantrasyonu ve saflığı aşağıdaki formüller kullanılarak hesaplandı.

$$\text{RNA konsantrasyonu (ng/µl)} = \text{OD 260 nm} \times \text{seyreltme faktörü} \times 40$$

$$\text{RNA saflığı} = \text{OD 260/OD 280}$$

qRT-PCR’da her bir grup için eşit miktarda (100 ng) total RNA kullanıldı.

3.3.3. Kantitatif-Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR)

İzole edilen total RNA içeriğinde bulunan mRNA molekülleri ters-transkripsiyonla cDNA segmentlerine çevrildi ve ardından ilgili cDNA bölgesi çoğaltıldı. Bu çalışma için SYBR Green One-Step kiti (Biorad, USA) kullanıldı. Bütün deneylerin ikili biyolojik tekrarları gerçekleştirildi. Çalışmada kullanılan primerler Tablo 3-2’de, reaksiyon içeriği Tablo 3-3’de ve sıcaklık döngüsü Tablo 3-4’de yer almaktadır.

Tablo 3-2: qRT-PCR’da kullanılan primerler

Gen	İleri/Geri	Dizi	Uzunluk (bp)
E2F1 <i>NM_005225.2</i> <i>Homo sapiens</i>	İleri	TCCAAGAACCACATCCAGTG	20
	Geri	CTGGGTCAACCCCTCAAG	18
RB1 <i>NM_000321.2</i> <i>Homo sapiens</i>	İleri	TTTATTGGCGTGCGCTCTTG	20
	Geri	GGGAAAGACAAATCTGTTCCAG	22
CHEK2 <i>NM_001349956.1</i> <i>Homo sapiens</i>	İleri	GAAAGAAGCTACCTGCAAGCTC	22
	Geri	ACCGTTTTTCATGAAGGTACTGC	22
ATM <i>NM_001351834.1</i> <i>Homo sapiens</i>	İleri	GTTATTTACTGGGTCAGCCTGC	22
	Geri	GGTGGTCAGTGCCAAAGTCA	20
CCDND1 (Siklin D1) <i>NM_053056.2</i> <i>Homo sapiens</i>	İleri	CCAGAGTGATCAAGTGTGACCC	22
	Geri	TTGACTCCAGCAGGGCTTCG	20
CDKN2A (p16) <i>NM_001363763.1</i> <i>Homo sapiens</i>	İleri	ATCGCGATGTCGCACGGTA	19
	Geri	GGGGATGTCTGAGGGACCTT	20
TP73 <i>NM_001204192.1</i> <i>Homo sapiens</i>	İleri	GACCCCAGCCTCGTCAGTTTT	21
	Geri	AACCCTTGGGAGGTGAAATACTC	23

Tablo 3-3: qRT- PCR reaksiyon içeriği

İçerik Adı	Hacim (µl)
Reverse Transkriptaz Enzimi	0,125
SYBR Green Reaksiyon karışımı	5,0
İleri Primer, 5 µM	1,0
Ters Primer, 5 µM	1,0
Kalıp RNA, 50 ng	*
DEPC-uygulanmış dH ₂ O, 10 µl hacime tamamlanacak şekilde	*
Toplam	10,0

*RNA miktarına göre hesaplanır.

Tablo 3-4: qRT-PCR Sıcaklık Döngüsü

Basamak	Koşullar
cDNA Sentezi	50°C sıcaklıkta 15 dk
Başlangıç Denatürasyonu	95°C sıcaklıkta 5 dk
Takip Eden Basamak için 40 Döngü	
Denatürasyon	95°C sıcaklıkta 30 sn
Uzama	55°C sıcaklıkta 40 sn
Son Uzama	72°C sıcaklıkta 30 sn

3.3. E2F1 Protein Ekspresyon Seviyesinin Western Blot Yöntemi ile Karşılaştırılması

15 hastaya ait (5 Akromegali, 5 Cushing ve 5 NFA) tümör dokularından total protein izolasyonu yapıldı ve Western blot analizi ile E2F1 (Abcam, ab179445) protein ekspresyon seviyeleri tespit edildi. Yükleme kontrolü olarak her membrana Aktin (Protein Tech, 66009-1-Ig) uygulanarak Western Blot yöntemi uygulandı.

3.3.1. Total Protein İzolasyonu

1. Dokuya 300ul RIPA buffer (Sigma, R 0278) ve 3ul proteaz ve fosfataz inhibitör karışımından (Thermo Scientific #78440) eklendi ve homojenizatör (Fisherbrand motorized tissue grinder, #12-1413-61, USA) kullanılarak doku homojen hale getirildi.
2. Daha sonra, buz üzerindeki doku lizati 2 saat boyunca sallayıcı alet üzerinde bekletildi.
3. 13200 rpm devirde 20 dakika 4°C’de santrifüj edildi ve elde edilen üst faz yeni steril bir tüplere aktarıldı. İzole edilen proteinler -80°C’de saklandı.

3.3.2. Protein Konsantrasyonunun Hesaplanması

Protein örneklerinin konsantrasyon tayini BCA Protein Assay Kit (Pierce, A.B.D.) protokolüne uygun olarak gerçekleştirildi.

3.3.3. Western Blot Protokolü

1. Elde edilen örnekler, 95°C’de 10 dk kaynatılarak denatüre edildi.
2. Protokolde kullanılacak jel, jel yürütme sistemine yerleştirildi.
3. Jel üzerindeki ilk kuyucuğa belirteç eklendi.
4. Protein örnekleri sırasıyla kuyulara yüklendi.
5. Örnekler, önce 80 V’ta daha sonra 120 V’ta yürütüldü.
6. Ardından proteinler membrana aktarıldı.
7. Membranlar %5 yağsız süt tozu içeren TBS-T ile bloklandı.

8. Bloklama işlemini takiben membran TBS-T içerisinde 3 defa 5 dk'lık süreler ile yıkandı.
9. Birincil antikor, %0.5 yağsız süt tozu içeren TBS-T solüsyonu içerisinde 1:500 sulandırma olacak şekilde hazırlandı ve membran, birincil antikor ile +4⁰C'de bir gece boyu muamele edildi.
10. Birincil antikor ile muamele sonrasında membran TBS-T içerisinde 3 defa 5 dk'lık süreler ile yıkandı.
11. İkincil antikor, %0.5 yağsız süt tozu içeren TBS-T solüsyonu içerisinde 1:2000 sulandırma olacak şekilde hazırlandı.
12. Membran, ikincil antikor ile oda sıcaklığında muamele edildi.
13. Bantlar, görüntüleme kiti (Bio-Rad Clarity Western ECL, USA.) kullanılarak görüntülendi.

3.4. İstatiksel Değerlendirme

İHK analizinin biyoistatistiksel çözümlemesinde, ele alınan ölçütler ortalama, standart sapma, frekans ve yüzde değerleri ile tanımlanmıştır. Gruplar arası frekans ve yüzdelerin kıyaslanmasında ki-kare ve “Fisher Kesin Olasılık Testi” kullanılmıştır. Normal dağılıma sahip değişken ortalamalarının karşılaştırılması için, -ikiden fazla grup ortalamasının karşılaştırılmasında “Tek yönlü Varyans analizi” (*One-Way ANOVA*) ile anlamlı fark bulunan değişkenlerde, gruplar arasındaki farkların yorumlanması için grupların ikili kıyaslamalarında ise post-hoc “Bonferroni” testleri kullanılmıştır. Değişkenler arasındaki bağıntıları araştırmak için “Spearman Korelasyon Yöntemi” kullanılmıştır. Biyoistatistiksel analizlerde SPSS (Sürüm:23) paket programı kullanıldı. Yorumlamalarda anlamlılık sınırı $p=0.05$ alındı.

Korelasyon Katsayısı (r) Yorumlama İlkeleri kullanılarak analizler yapıldı.

A.Katsayının sayısal değeri aşağıda verilen değerlere göre yapıldı.

<i>Korelasyon Katsayısı (r)</i>	<i>Bağıntı</i>
0 – 0,25	Yok
0,25 – 0,40	Çok zayıf
0,41 – 0,50	Zayıf
0,51 – 0,75	Orta Güçte

0,76 – 0,85	Güçlü
0,86 – 0,95	Çok güçlü
0,96 – 1,00	Tam

B. Katsayının işareti

r 'nin (+) işareti taşıması değişkenlerin bir paralellik içerisinde değiştiğini yani ilişkinin aynı yönde olduğunu, (-) işareti taşıması ise değişkenlerin ters yönde bir ilişkiye sahip olduğunu göstermektedir.

C. Katsayının geçerliliği (p olasılığının değerlendirilmesi ; *)

Hesaplanan korelasyon katsayısının geçerli bir kat sayı olup-olmadığı, eldeki katsayının sayısal değerine ve denek sayısı temeline dayanan özel bir t testi ile yapılır ve sonuçta ulaşılan p değerine göre yorumlanır.

$p > 0,05$	-	Geçerli değil
$p < 0,05$	*	Geçerli
$p < 0,01$	**	Geçerli

Örneklerin qRT-PCR deneylerinden elde edilen Ct değerleri göreceli ekspresyon seviyelerini belirlemek üzere $\Delta Ct = 2^{(Ct_{Referans\ Gen} - Ct_{Hedef\ Gen})}$ formülüne konuldu. Hesaplamalar ve sonuçlara ait grafikler Microsoft Office Excel 2016 programında yapıldı. Her bir gruba ait ham veriler GraphPad InStat DTCG 3.06 (GraphPad Software, Inc. San Diego USA) yazılımında tek yönlü ANOVA metodu kullanılarak karşılaştırıldı, Gruplar arasındaki farkların yorumlanması için grupların ikili kıyaslamalarında ise post-hoc “Dunn's Multiple Comparisons” testleri kullanılmıştır. $p < 0,05$ istatistiksel açıdan anlamlı fark olarak kabul edildi.

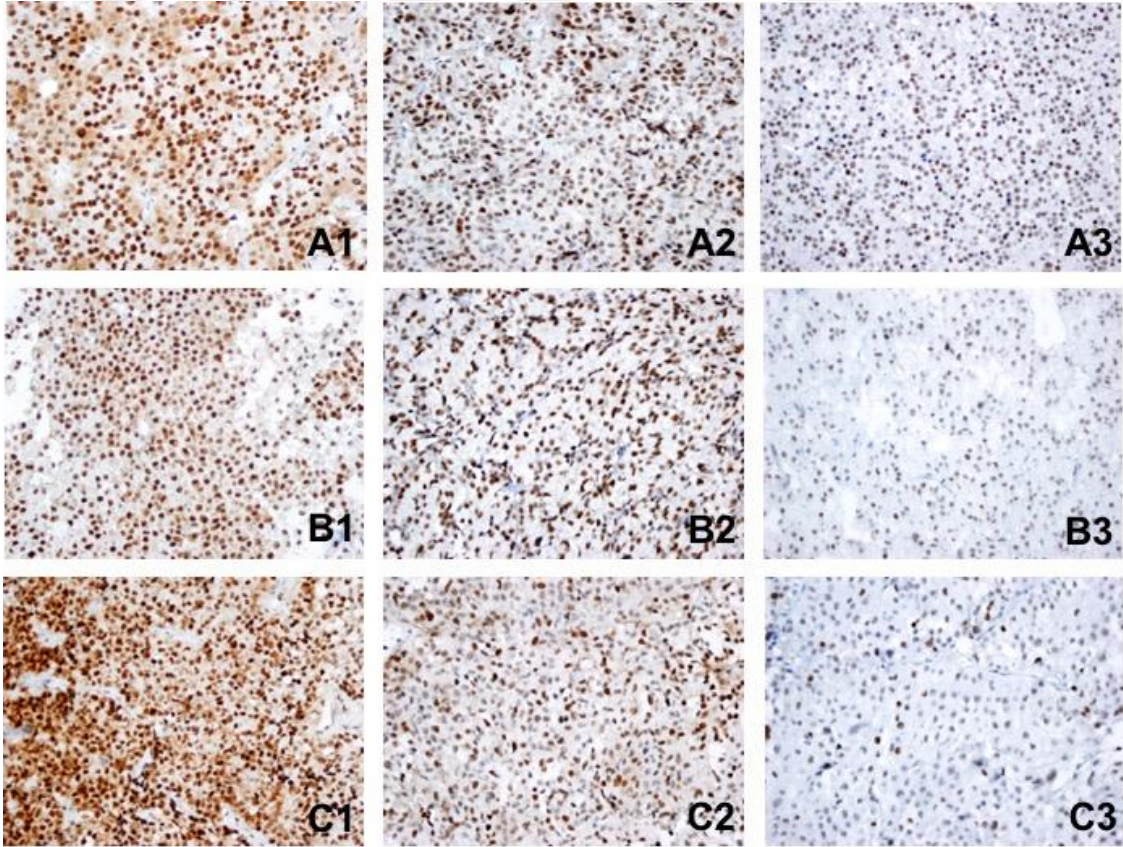
Western blot bandı yoğunluklarının karşılaştırmaları, Image J 1.44a yazılımı (Wayne Rasband, Ulusal Sağlık Enstitüsü, USA) kullanılarak hesaplandı. Bu program, alan ve piksel değerlerini ölçerek her bir protein bandı için mutlak yoğunluk değerini hesaplar. Beta aktin mutlak yoğunluk oranına göre hedef protein mutlak yoğunluğu, "Beta aktine göre bant yoğunlukları" olarak tanımlanır ve her bir hastalık grubu arasındaki protein ekspresyonunu karşılaştırmak için kullanıldı. Hesaplamalar ve sonuçlara ait grafikler Microsoft Office Excel 2016 programında yapıldı. Her bir grubun nispi protein ekspresyonu, GraphPad InStat DTCG 3.06 tek yönlü ANOVA yöntemi kullanılarak karşılaştırıldı. $p < 0,05$ istatistiksel açıdan anlamlı fark olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. pATM-S1981, pRb-S608, Rb, pE2F1-S364, p16, E2F1 ve p73 Proteinlerinin Ekspresyon Seviyelerinin İmmunhistokimyasal Boyama Sonuçları

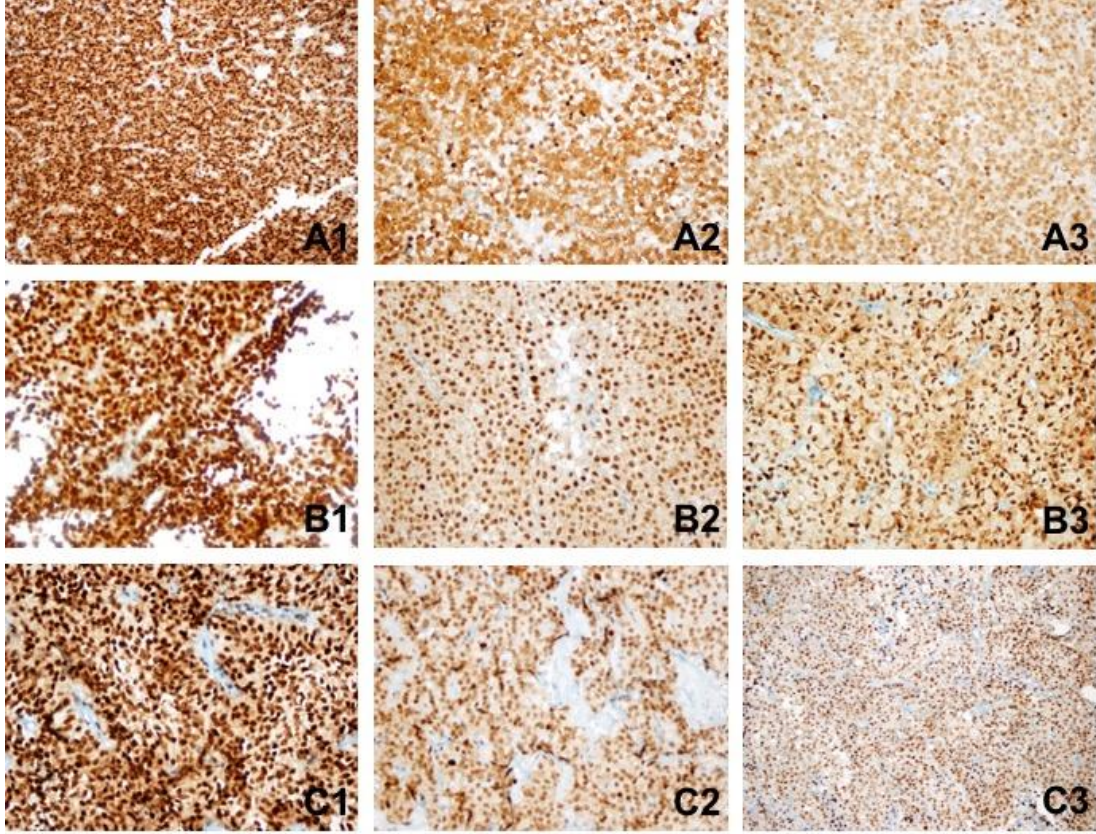
4.1.1. Histopatolojik İHK sonuçları

Akromegali, Cushing ve NFA hasta gruplarında pATM-S1981 (Şekil 4-1), pRb-S608 (Şekil 4-2), Rb (Şekil 4-3), pE2F1-S364 (Şekil 4-4), p16 (Şekil 4-5), E2F1 (Şekil 4-6), ve p73 (Şekil 4-7) proteinlerinin ekspresyonlarının H-skora ile histopatolojik değerlendirilmesi yapıldı.



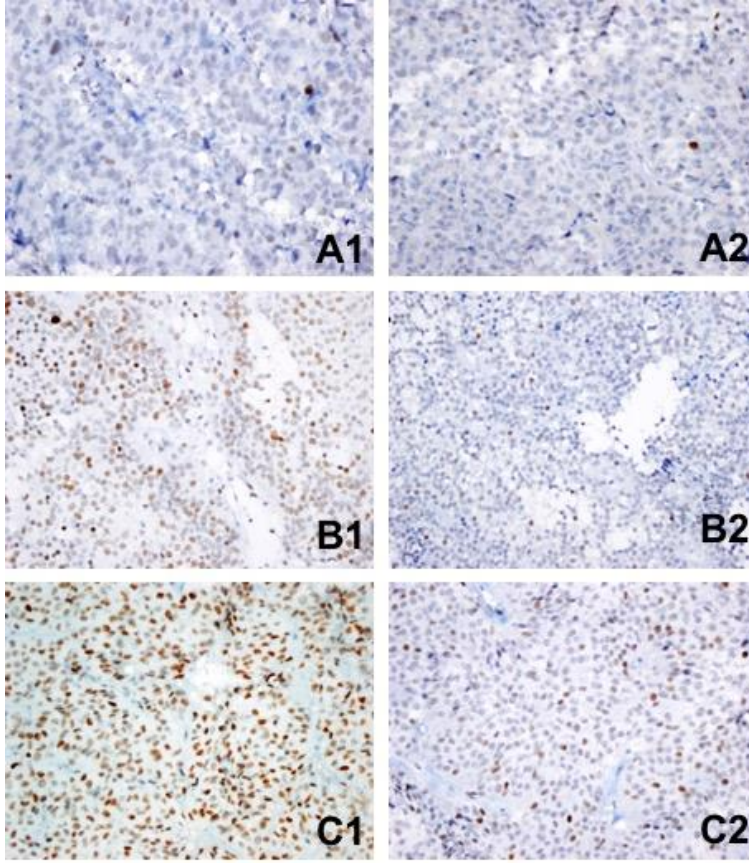
Şekil 4-1: Akromegali, Cushing ve NFA hasta gruplarına ait hipofiz dokularında pATM-S1981 immunpozitif hücrelerin dağılımı.

AKROMEĞALİ; A1 (H-skor:370), A2 (H-skor:315), A3 (H-skor:250). CUSHİNG; B1 (H-skor:360), B2 (H-skor:320), B3 (H-skor:160). NFA; C1 (H-skor:360), C2 (H-skor:150), C3 (H-skor:310). Büyütme: X400.



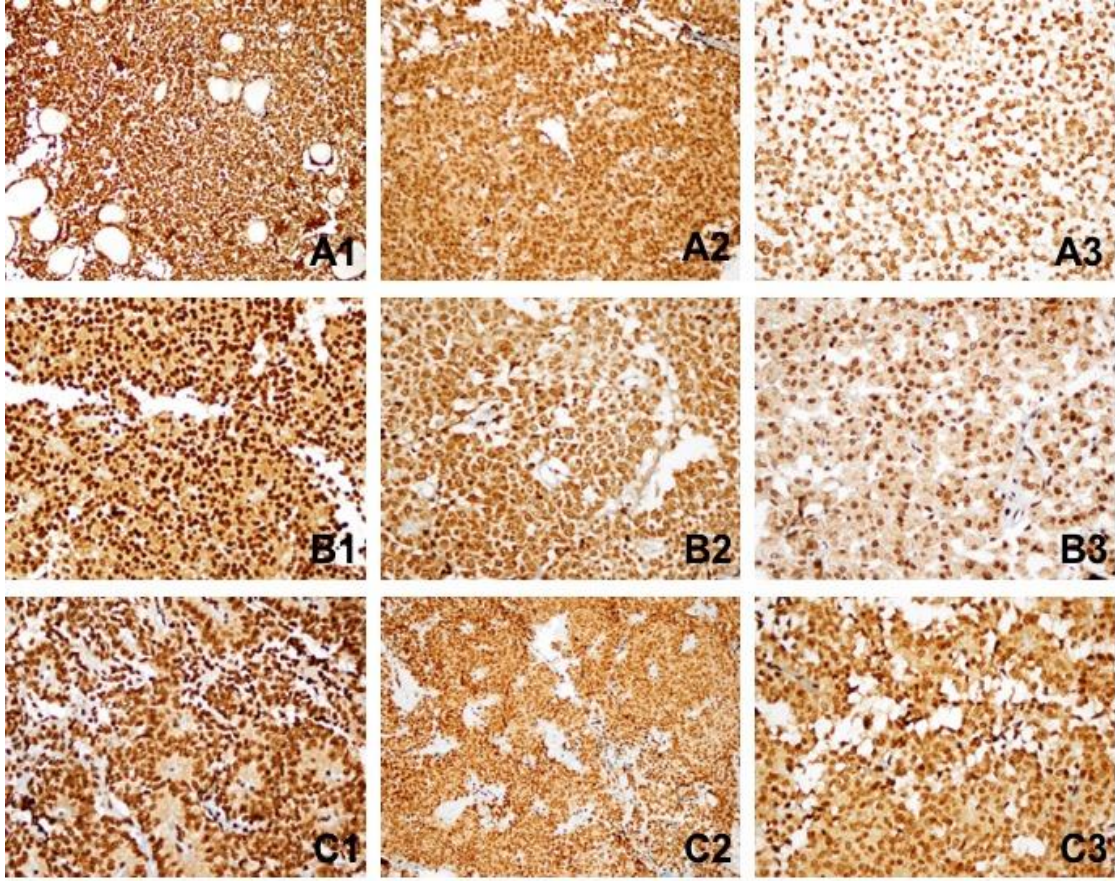
Şekil 4-2: Akromegali, Cushing ve NFA hasta gruplarına ait hipofiz dokularında pRb-S608 immunpozitif hücrelerin dağılımı.

AKROMEGALİ; **A1** (H-skor:380), Büyütme: x200. **A2** (H-skor:300), Büyütme: x400. **A3** (H-skor:270), Büyütme: x400. CUSHİNG; **B1** (H-skor:395), Büyütme: x400. **B2** (H-skor:280), Büyütme: x400. **B3** (H-skor:220), Büyütme: x400. NFA; **C1** (H-skor:395), Büyütme: x400. **C2** (H-skor:320), Büyütme: x400. **C3** (H-skor:220) Büyütme: x200.



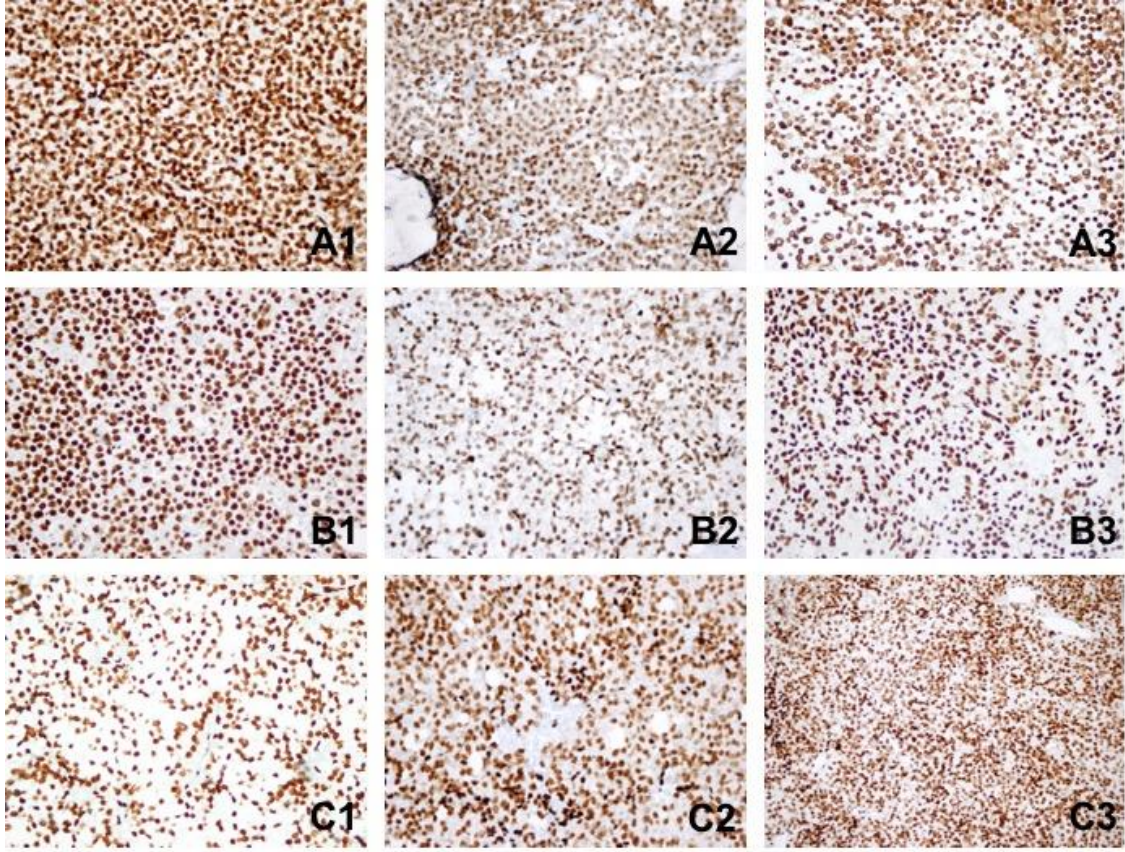
Şekil 4-3: Akromegali, Cushing ve NFA hasta gruplarına ait hipofiz dokularında Rb immunpozitif hücrelerin dağılımı.

AKROMEGALİ; **A1** (H-skor:148), **A2** (H-skor:122). CUSHİNG; **B1** (H-skor:225), **B2** (H-skor:150). NFA; **C1** (H-skor:270), **C2** (H-skor:161), Büyütme: x400.



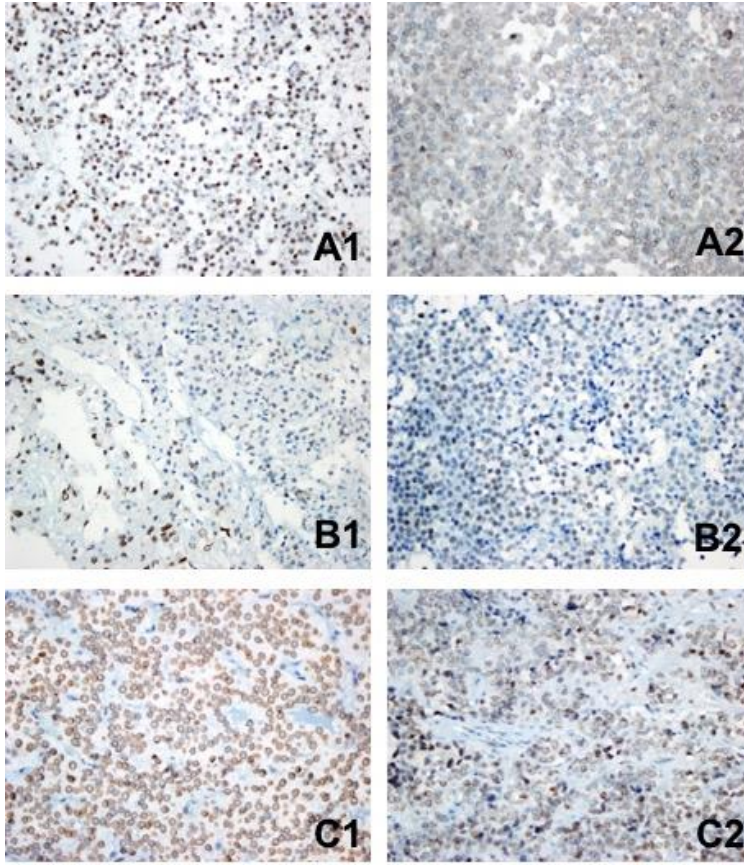
Şekil 4-4: Akromegali, Cushing ve NFA hasta gruplarına ait hipofiz dokularında pE2F1-S364 immunpozitif hücrelerin dağılımı.

AKROMEGALİ; **A1** (H-skor:400), Büyütme: x200. **A2** (H-skor:330), Büyütme: x400. **A3** (H-skor:254), Büyütme: x400. CUSHİNG; **B1** (H-skor:398), Büyütme: x400. **B2** (H-skor:305), Büyütme: x400. **B3** (H-skor:240), Büyütme: x400. NFA; **C1** (H-skor:395), Büyütme: x400. **C2** (H-skor:320), **C3** (H-skor:290), Büyütme: x400.



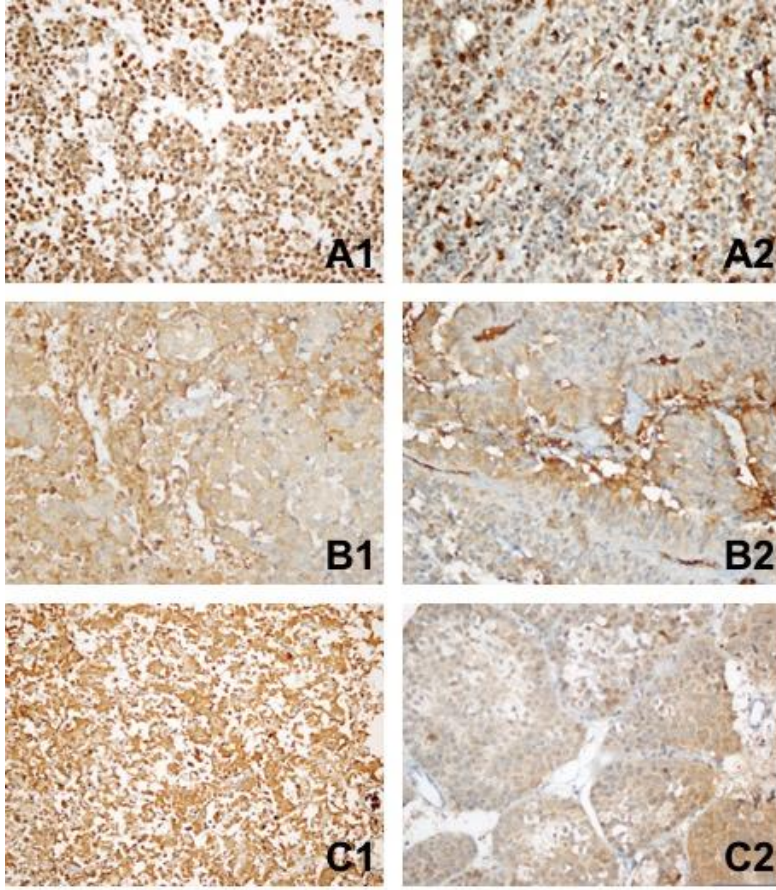
Şekil 4-5: Akromegali, Cushing ve NFA hasta gruplarına ait hipofiz dokularında p16 immunpozitif hücrelerin dağılımı.

AKROMEGALİ; **A1** (H-skor:395), Büyütme: x400. **A2** (H-skor:300), Büyütme: X40. **A3** (H-skor:300), Büyütme: x400. CUSHİNG; **B1** (H-skor:395), Büyütme: x400. **B2** (H-skor:290), Büyütme: X40. **B3** (H-skor:320), Büyütme: x400. NFA; **C1** (H-skor: 390), **C2** (H-skor:305), Büyütme: x400. **C3** (H-skor:290) Büyütme: x200.



Şekil 4-6: Akromegali, Cushing ve NFA hasta gruplarına ait hipofiz dokularında E2F1 immunpozitif hücrelerin dağılımı.

AKROMEGALİ; **A1** (H-skor: 200), **A2** (H-skor:160), CUSHİNG; **B1** (H-skor:150), **B2** (H-skor:120), NFA; **C1** (H-skor:290), **C2** (H-skor:200), Büyütme: x400.



Şekil 4-7: Akromegali, Cushing ve NFA hasta gruplarına ait hipofiz dokularında p73 immunpozitif hücrelerin dağılımı.

AKROMEGALİ; **A1** (H-skor:290), Büyütme: x400. **A2** (H-skor:200), Büyütme: x400. CUSHİNG; **B1** (H-skor:270), Büyütme: x400. **B2** (H-skor:160), Büyütme: x400. NFA; **C1** (H-skor:300), Büyütme: x200. **C2** (H-skor:190), Büyütme: x400.

4.1.2. İHK istatistiksel Analiz Sonuçları

Tablo 4-1’de gösterildiği gibi, Akromegali, Cushing hastalığı ve NFA hasta grupları arasında, cinsiyet ile ileri düzeyde anlamlı farklılık olduğu, özellikle Akromegali ve Cushing hasta gruplarında kadınların oranının anlamlı yüksek olduğu (sırasıyla %65 ve %95), buna karşılık NFA hasta grubunda ise erkeklerin %74 gibi yüksek bir oranda bulunduğu gözlemlendi ($p < 0.001$). Mitoz, p53 ve Ki-67 değerlerinde Akromegali, Cushing ve NFA hasta grupları arasında anlamlı bir fark bulunmadığı saptandı ($p > 0.05$).

Tablo 4-1: Akromegali, Cushing Hastalığı ve NFA hasta gruplarında hastalık kriterlerinin (yaş, cinsiyet, mitoz, p53, Ki-67) frekans ve yüzde dağılımlarının karşılaştırılması

		Akromegali		Cushing Hastalığı		Fonksiyonel Olmayan Hipofiz Adenomu		Kikare	p
		Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%		
Cinsiyet	E	7	35.0	1	5.0	20	74.1	23.08	0.000***
	K	13	65.0	19	95.0	7	25.9		
Mitoz	0	14	70.0	12	63.2	11	40.7	4.60	0.331
	1	5	25.0	6	31.6	14	51.9		
	2	1	5.0	1	5.3	2	7.4		
p53	0	9	45.0	7	36.8	13	48.1	1.95	0.745
	1	8	40.0	8	42.1	12	44.4		
	2	3	15.0	4	21.1	2	7.4		
Ki-67	1	10	50.0	6	31.6	17	63.0	4.39	0.111
	2	10	50.0	13	68.4	10	37.0		

Akromegali, Cushing hastalığı ve NFA hasta grupları arasında hücre döngüsü düzenleyici proteinlerinin ekspresyonlarına ait veriler (yaş, pATM-S1981, pRb-S608, Rb, E2F1364, p16, E2F1 ve p73 tek yönlü ANOVA/Kruskal-Wallis ile kıyaslandı. Bulgular Tablo 4-2’de verildi.

Tablo 4-2: Akromegali, Cushing ve NFA hasta grupları arasında hücre döngüsü düzenleyici proteinlerinin ekspresyonlarına ait verilerin (yaş, pATM-S1981, pRb-S608, Rb, E2F1364, p16, E2F1 ve p73) karşılaştırılması.

Değişkenler	Akromegali		Cushing Hastalığı		NFA		p
	Ort	SD	Ort	SD	Ort	SD	
Yaş	43.20 c***	10.11	46.95 c***	12.02	58.44 ab***	10.96	.000
pATM-S1981	301.25	66.58	271.84	57.98	288.56	48.91	.283
pRb-S608	299.80	78.92	313.11	49.89	310.85	64.59	.788
Rb	113.90 c*	14.58	126.21	28.21	137.48 a*	40.51	.043
pE2F1-S364	365.60 b*	34.34	335.16 ac*	54.65	364.44 b*	29.79	.027
p16	359.25	27.83	362.37 c*	30.34	339.33 b*	31.32	.021
E2F1	119.50	26.50	105.53 c**	12.01	136.48 b**	43.27	.007
p73	228.00 b**	102.83	147.37 a**	77.88	179.15	75.45	.015

Yukarıdaki tabloda tek yönlü varyans analizi testi ile anlamlı bulunan değişkenlerin, post-hoc ikili kıyaslamalarında Bonferroni çoklu kıyaslama testi kullanıldı ve farklı olanların anlamlılık düzeyleri a, b ve c harfleri sırasıyla; Akromegali, Cushing Hastalığı ve NFA'ya karşılık olarak, “*”; anlamlılık düzeylerine (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$) karşılık olarak gösterildi.

Normal dağılıma sahip değişken ortalamalarının karşılaştırılması için ANOVA sonuçlarına göre Akromegali, Cushing Hastalığı ve NFA hasta grupları arasında “Yaş, Rb, pE2F1-S364, p16, E2F1 ve p73” ekspresyonlarında istatistiksel olarak çeşitli düzeylerde anlamlı farklılıklar olduğu saptandı (sırasıyla; *** $p=0.000$, * $p=0.043$, * $p=0.027$, * $p=0.021$, *** $p=0.007$ ve ** $p=0.015$). pATM-S1981 ve pRb-S608 değerleri arasında gözlenen farklılıkların ise istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptandı ($p > 0.05$).

ANOVA ile anlamlı fark bulunan değişkenlerde gruplar arasındaki farkların yorumlanması için hasta gruplarının ikili kıyaslamalarında post-hoc “Bonferroni” testinin sonuçları aşağıda verildi. NFA hasta grubunun, Cushing ve Akromegali hasta gruplarına göre yaş ortalaması daha yüksek (sırasıyla $p=0,002$, $p=0,000$) tespit edildi. Rb protein ekspresyonu NFA grubunda Akromegali grubuna göre anlamlı şekilde yüksek ($p=0,038$) iken, pE2F1-S364 protein ekspresyonu ise Cushing grubunda, NFA ve Akromegali gruplarına göre anlamlı derecede düşük (sırasıyla $p=0,049$, $p=0,059$) bulundu. Aksine p16 proteinlerinin ekspresyonu ise Cushing grubunda, NFA grubuna göre anlamlı derecede yüksek ($p=0,038$) idi. Diğer yandan, E2F1 protein ekspresyonu NFA grubunda Cushing grubuna kıyasla ileri derecede anlamlı olarak yüksek bulundu ($p=0,006$). Akromegali hasta grubunda p73 protein ekspresyonu Cushing hasta grubuna göre anlamlı şekilde daha yüksek ($p=0,013$) idi.

Hipofiz adenomlarına sahip üç farklı hasta grubu (Akromegali, Cushing hastalığı ve NFA) ile tüm diğer özellikler ile aralarındaki ilişkiler ve düzeyleri “Nonparametrik Spearman Korelasyon” testi kullanılarak araştırıldı ve Tablo 4-3’de verildi. Yaş ile Ki-67 arasında çok zayıf ($r=-0,29$) ve ters yönde bir ilişki saptandı ($p=0,019$). pATM-S1981 ile Rb ve pE2F1-S364 arasında çok zayıf ($r=0,24$) ve aynı yönde bir ilişki bulundu (sırasıyla $p=0,048$ ve $p=0,049$). Rb ile p16 arasında aynı zamanda Rb ile p73 çok zayıf (sırasıyla $r=-0,33$ ve $r=-0,27$) ve ters yönde bir ilişki saptandı (sırasıyla $p=0,006$ ve $p=0,026$). Mitoz ve p53 arasında zayıf ($r=0,45$) ve aynı yönde bir ilişki ($p=0,000$) var iken mitoz ve Ki-67 arasında çok zayıf ($r=0,31$) fakat aynı yönde bir ilişki bulundu ($p=0,013$). Ki-67 ile p53

arasında çok zayıf ($r=0,40$) ve aynı yönde bir ilişki ($p=0,001$) olduğu saptandı (Tablo 4-3).

Akromegali hasta grubu ile hastalığın değişken parametreleri (yaş, pATM-S1981, pRb-S608, Rb, E2F1-364, p16, E2F1, p73) ile arasındaki ilişkiler Tablo 4-4'de verildi. pE2F1-S364 ile mitoz arasında orta güçte ($r=-0,53$) ve ters yönde bir ilişki ($p=0,016$), p16 ve E2F1 arasında orta güçte ($r=0,56$) ve aynı yönde bir ilişki saptandı ($p=0,011$). p53 ve p73 arasında zayıf ($r=-0,45$) ve ters yönde bir ilişki bulundu ($p=0,047$). p53 ve mitoz arasında orta güçte ($r=0,56$) ve aynı yönde bir ilişki ($p=0,011$) saptanırken p53 ile Ki-67 arasında zayıf ($r=0,45$) fakat aynı yönde bir ilişki ($p=0,045$) bulundu (Tablo 4-4).

Cushing hastalığı grubunda değişkenler arası ilişkiler aşağıdaki tabloda sunuldu. pATM-S1981 ile Rb arasında zayıf ($r=0,48$) aynı yönde bir ilişki ($p=0,040$) var iken pRb-S608 ile p73 arasında orta güçte ($r=-0,54$) ters yönde bir ilişki ($p=0,016$) vardı. p53 ile mitoz arasında orta güçte ($r=0,51$) aynı yönde bir ilişki ($p=0,026$) saptandı (Tablo 4-5).

NFA hasta gruplarında değişkenler arası ilişkiler aşağıdaki tabloda sunulmuştur (Tablo 4-6). Yaş ile pATM-S1981 arasında zayıf ($r=0,48$) ve aynı yönde bir ilişki ($p=0,011$) saptandığı halde yaş ile pRb-S608 ve E2F1 arasında çok zayıf (sırasıyla $r=-0,40$ ve $r=-0,39$) ve ters yönde bir ilişki saptandı (sırasıyla $p=0,041$ ve $p=0,042$). pRb-S608 ile E2F1 arasında zayıf ($r=0,43$) ve aynı yönde bir ilişki ($p=0,026$) bulundu. Rb ile p16 arasında zayıf ($r=-0,46$) ve ters yönde bir ilişki ($p=0,016$) saptandı. Mitoz ile p53 arasında zayıf ($r=0,41$) ve aynı yönde bir ilişki ($p=0,033$) bulunmasına rağmen Ki-67 ile mitoz arasında çok zayıf ($r=0,40$) ve aynı yönde bir ilişki ($p=0,040$) saptandı.

Tablo 4-3: Akromegali, Cushing ve NFA hasta gruplarında hastalık kriterleri ve çalışılan hücre döngüsüne ait proteinlerin ekspresyonlarına ait veriler (yaş, Mitoz, p53, Ki-67, pATM-S1981, pRb-S608, Rb, E2F1364, p16, E2F1 ve p73) arasındaki ilişkiler.

		Yaş	pATM-S1981	pRB-S608	Rb	pE2F1-S364	p16	p73	E2F1	Mitoz	p53	Ki-67
Yaş	r=	1,000	,190	-,111	,072	-,009	-,171	,006	-,088	,113	,072	-.288*
	p=		,127	,377	,565	,946	,169	,960	,483	,368	,568	,019
pATM-S1981	r=	,190	1,000	,102	.244*	.243*	-,121	-,033	-,041	,197	,217	-,025
	p=	,127		,414	,048	,049	,335	,793	,743	,116	,082	,846
pRb-S608	r=	-,111	,102	1,000	,116	,053	,161	-,229	,181	,199	,190	,077
	p=	,377	,414		,356	,673	,197	,064	,149	,112	,130	,541
Rb	r=	,072	.244*	,116	1,000	,107	-.332**	-.274*	,051	,043	,010	,103
	p=	,565	,048	,356		,393	,006	,026	,688	,731	,937	,415
pE2F1-S364	r=	-,009	.243*	,053	,107	1,000	-,019	-,047	,160	-,049	-,172	-,029
	p=	,946	,049	,673	,393		,879	,706	,204	,696	,171	,819
p16	r=	-,171	-,121	,161	-.332**	-,019	1,000	-,112	,034	-,110	,034	-,131
	p=	,169	,335	,197	,006	,879		,371	,789	,385	,786	,297
p73	r=	,006	-,033	-,229	-.274*	-,047	-,112	1,000	,066	,025	-,153	,019
	p=	,960	,793	,064	,026	,706	,371		,601	,841	,224	,880
E2F1	r=	-,088	-,041	,181	,051	,160	,034	,066	1,000	,136	-,053	-,030
	p=	,483	,743	,149	,688	,204	,789	,601		,281	,675	,815
Mitoz	r=	,113	,197	,199	,043	-,049	-,110	,025	,136	1,000	.451**	.306*
	p=	,368	,116	,112	,731	,696	,385	,841	,281		,000	,013
p53	r=	,072	,217	,190	,010	-,172	,034	-,153	-,053	.451**	1,000	.403**
	p=	,568	,082	,130	,937	,171	,786	,224	,675	,000		,001
Ki-67	r=	-.288*	-,025	,077	,103	-,029	-,131	,019	-,030	.306*	.403**	1,000
	p=	,019	,846	,541	,415	,819	,297	,880	,815	,013	,001	

Değişkenler arası bağıntılar Spearman Korelasyon analizi ile araştırıldığında yukarıdaki tabloda “*” ile işaretlenmiş olan korelasyon katsayıları anlamlı ilişkileri göstermektedir. (r: ilişki düzeyi, p: anlamlılık düzeyi)

Tablo 4-4: Akromegali hasta grubunda hastalık kriterleri ve çalışılan hücre döngüsüne ait proteinlerin ekspresyonlarına ait veriler (yaş, Mitoz, p53, Ki-67, pATM-S1981, pRb-S608, Rb, E2F1364, p16, E2F1 ve p73) arasındaki ilişkiler

		Yaş	pATM-S1981	pRB-S608	Rb	pE2F1-S364	p16	p73	E2F1	Mitoz	p53	Ki-67
Yaş	r=	1,000	-,055	-,209	-,285	,202	,063	,260	-,230	-,395	-,136	-,295
	p=		,816	,377	,222	,394	,793	,267	,329	,085	,567	,206
pATM-S1981	r=	-,055	1,000	,153	,421	,062	-,085	-,185	-,207	-,112	,239	,104
	p=	,816		,520	,065	,796	,723	,434	,382	,638	,311	,662
pRB-S608	r=	-,209	,153	1,000	,396	,089	,346	-,102	,073	,078	,137	,427
	p=	,377	,520		,084	,708	,135	,669	,760	,743	,564	,060
Rb	r=	-,285	,421	,396	1,000	-,088	,037	,091	,043	,010	,098	,364
	p=	,222	,065	,084		,712	,875	,703	,858	,968	,682	,115
pE2F1-S364	r=	,202	,062	,089	-,088	1,000	,403	-,128	-,075	-.531*	-,239	-,271
	p=	,394	,796	,708	,712		,078	,591	,753	,016	,310	,248
p16	r=	,063	-,085	,346	,037	,403	1,000	,034	.556*	-,086	,012	-,255
	p=	,793	,723	,135	,875	,078		,887	,011	,717	,961	,278
p73	r=	,260	-,185	-,102	,091	-,128	,034	1,000	,238	,026	-.450*	,139
	p=	,267	,434	,669	,703	,591	,887		,313	,912	,047	,558
E2F1	r=	-,230	-,207	,073	,043	-,075	.556*	,238	1,000	,131	-,058	,035
	p=	,329	,382	,760	,858	,753	,011	,313		,583	,808	,883
Mitoz	r=	-,395	-,112	,078	,010	-.531*	-,086	,026	,131	1,000	.556*	,443
	p=	,085	,638	,743	,968	,016	,717	,912	,583		,011	,050
p53	r=	-,136	,239	,137	,098	-,239	,012	-.450*	-,058	.556*	1,000	.453*
	p=	,567	,311	,564	,682	,310	,961	,047	,808	,011		,045
Ki-67	r=	-,295	,104	,427	,364	-,271	-,255	,139	,035	,443	.453*	1,000
	p=	,206	,662	,060	,115	,248	,278	,558	,883	,050	,045	

Değişkenler arası bağıntılar Spearman Korelasyon analizi ile araştırıldığında yukarıdaki tabloda “*” ile işaretlenmiş olan korelasyon katsayıları anlamlı ilişkileri göstermektedir. (r: ilişki düzeyi, p: anlamlılık düzeyi)

Tablo 4-5: Cushing Hastalığı grubunda hastalık kriterleri (yaş, Mitoz, p53, Ki-67) ve pATM-S1981, pRb-S608, Rb, E2F1364, p16, E2F1 ve p73 proteinleri arasındaki ilişkiler

		Yaş	pATM-S1981	pRB-S608	Rb	pE2F1-S364	p16	p73	E2F1	Mitoz	p53	Ki-67
Yaş	r=	1,000	,353	,015	0,000	-,093	,262	-,072	-,293	,024	,269	-,321
	p=		,139	,950	1,000	,705	,278	,769	,224	,921	,266	,180
pATM-S1981	r=	,353	1,000	,328	.476*	,418	-,028	-,183	-,081	,403	,164	-,342
	p=	,139		,170	,040	,075	,911	,454	,749	,097	,516	,165
pRB-S608	r=	,015	,328	1,000	,204	,032	,296	-.542*	-,151	,303	,181	-,091
	p=	,950	,170		,401	,897	,219	,016	,550	,221	,473	,719
Rb	r=	0,000	.476*	,204	1,000	,382	-,333	-,390	,030	,083	-,269	-,091
	p=	1,000	,040	,401		,106	,163	,099	,907	,745	,280	,719
pE2F1-S364	r=	-,093	,418	,032	,382	1,000	-,184	,057	,138	,301	-,164	,183
	p=	,705	,075	,897	,106		,452	,817	,584	,225	,516	,468
p16	r=	,262	-,028	,296	-,333	-,184	1,000	-,362	-,187	-,004	,093	-,403
	p=	,278	,911	,219	,163	,452		,128	,458	,989	,712	,097
p73	r=	-,072	-,183	-.542*	-,390	,057	-,362	1,000	,078	-,024	,225	,375
	p=	,769	,454	,016	,099	,817	,128		,759	,924	,369	,125
E2F1	r=	-,293	-,081	-,151	,030	,138	-,187	,078	1,000	,162	,328	,117
	p=	,224	,749	,550	,907	,584	,458	,759		,521	,184	,645
Mitoz	r=	,024	,403	,303	,083	,301	-,004	-,024	,162	1,000	.508*	,293
	p=	,921	,097	,221	,745	,225	,989	,924	,521		,026	,224
p53	r=	,269	,164	,181	-,269	-,164	,093	,225	,328	.508*	1,000	,333
	p=	,266	,516	,473	,280	,516	,712	,369	,184	,026		,164
Ki-67	r=	-,321	-,342	-,091	-,091	,183	-,403	,375	,117	,293	,333	1,000
	p=	,180	,165	,719	,719	,468	,097	,125	,645	,224	,164	

Değişkenler arası bağıntılar Spearman Korelasyon analizi ile araştırıldığında yukarıdaki tabloda “*” ile işaretlenmiş olan korelasyon katsayıları anlamlı ilişkileri göstermektedir. (r: ilişki düzeyi, p: anlamlılık düzeyi)

Tablo 4-6: Fonksiyonel Olmayan Hipofiz Adenom hasta gruplarında hastalık kriterleri (yaş, Mitoz, p53, Ki-67) ve pATM-S1981, pRb-S608, Rb, E2F1364, p16, E2F1 ve p73 proteinleri arasındaki ilişkiler

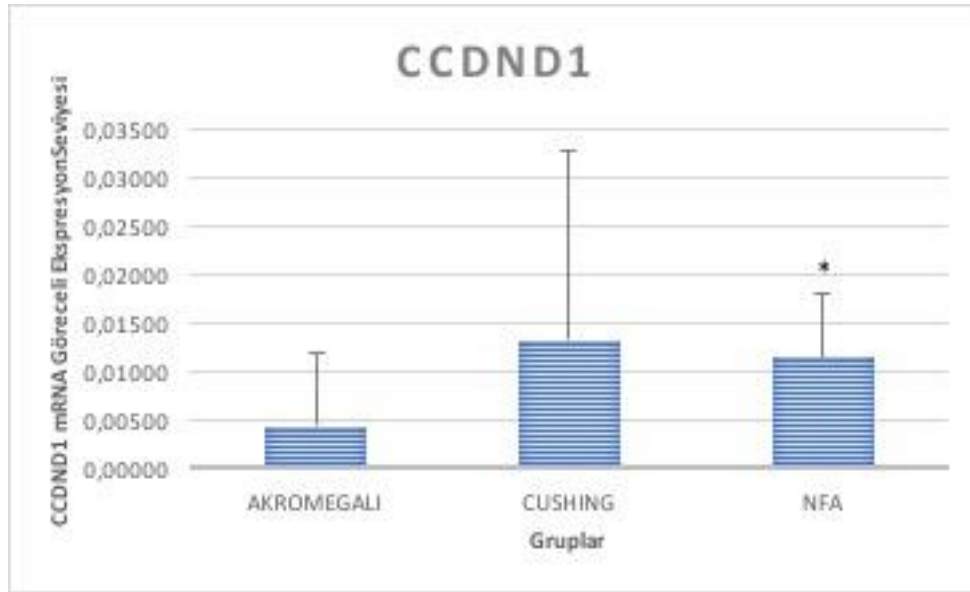
		Yaş	pATM-S1981	pRB-S608	Rb	pE2F1-S364	p16	p73	E2F1	Mitoz	p53	Ki-67
Yaş	r=	1,000	.481*	-.397*	-,066	-,098	-,210	-,007	-.394*	,069	,177	-,153
	p=		,011	,041	,743	,626	,293	,971	,042	,733	,378	,447
pATM-S1981	r=	.481*	1,000	-,114	,183	,101	-,212	,052	-,020	,344	,273	,069
	p=	,011		,571	,360	,617	,288	,798	,922	,079	,168	,732
pRB-S608	r=	-.397*	-,114	1,000	-,068	-,086	,054	-,186	.427*	,169	,205	-,059
	p=	,041	,571		,737	,671	,790	,352	,026	,399	,305	,769
Rb	r=	-,066	,183	-,068	1,000	,205	-.459*	-,311	,052	-,138	,131	,113
	p=	,743	,360	,737		,305	,016	,115	,798	,494	,514	,573
pE2F1-S364	r=	-,098	,101	-,086	,205	1,000	-,128	-,247	,141	,010	-,094	,104
	p=	,626	,617	,671	,305		,526	,213	,482	,959	,643	,604
p16	r=	-,210	-,212	,054	-.459*	-,128	1,000	-,156	,184	-,029	-,193	-,099
	p=	,293	,288	,790	,016	,526		,437	,358	,887	,335	,624
p73	r=	-,007	,052	-,186	-,311	-,247	-,156	1,000	-,176	,140	-,126	-,040
	p=	,971	,798	,352	,115	,213	,437		,380	,487	,531	,844
E2F1	r=	-.394*	-,020	.427*	,052	,141	,184	-,176	1,000	,020	-,109	,095
	p=	,042	,922	,026	,798	,482	,358	,380		,921	,589	,637
Mitoz	r=	,069	,344	,169	-,138	,010	-,029	,140	,020	1,000	.412*	.398*
	p=	,733	,079	,399	,494	,959	,887	,487	,921		,033	,040
p53	r=	,177	,273	,205	,131	-,094	-,193	-,126	-,109	.412*	1,000	,347
	p=	,378	,168	,305	,514	,643	,335	,531	,589	,033		,077
Ki-67	r=	-,153	,069	-,059	,113	,104	-,099	-,040	,095	.398*	,347	1,000
	p=	,447	,732	,769	,573	,604	,624	,844	,637	,040	,077	

Değişkenler arası bağıntılar Spearman Korelasyon analizi ile araştırıldığında yukarıdaki tabloda “*” ile işaretlenmiş olan korelasyon katsayıları anlamlı ilişkileri göstermektedir. (r: ilişki düzeyi, p: anlamlılık düzeyi)

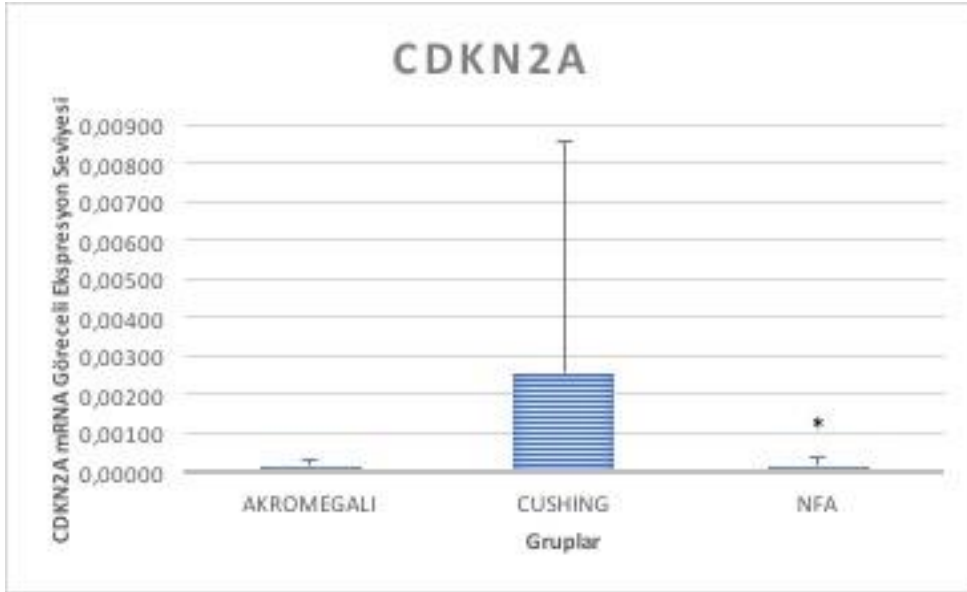
4.2. Akromegali, Cushing ve NFA Hasta Gruplarında ATM, CCDN1(SiklinD1), CDKN2A(p16), CHEK2(Chk2), E2F1, RB1 ve Tp73 Genlerin mRNA Ekspresyon Seviyelerinin qRT-PCR Analiz Sonuçları

ATM, CCDN1(SiklinD1), CDKN2A(p16), CHEK2(Chk2), E2F1, RB1 ve TP73 genlerinin mRNA ekspresyon sonuçları Akromegali, Cushing ve NFA hasta grupları arasında karşılaştırıldı. CCDN1(SiklinD1), CDKN2A(p16), CHEK2(Chk2) mRNA ekspresyonlarının hasta grupları arasında anlamlı farklılıklar olduğu saptandı ($p<0.05$) fakat ATM, E2F1, RB1 ve TP73 mRNA ekspresyonlarının gruplar arasında gözlenen farklılıklarının ise istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edildi ($p>0.05$) (Şekil 4-11, Şekil 4-12, Şekil 4-13, Şekil 4-14).

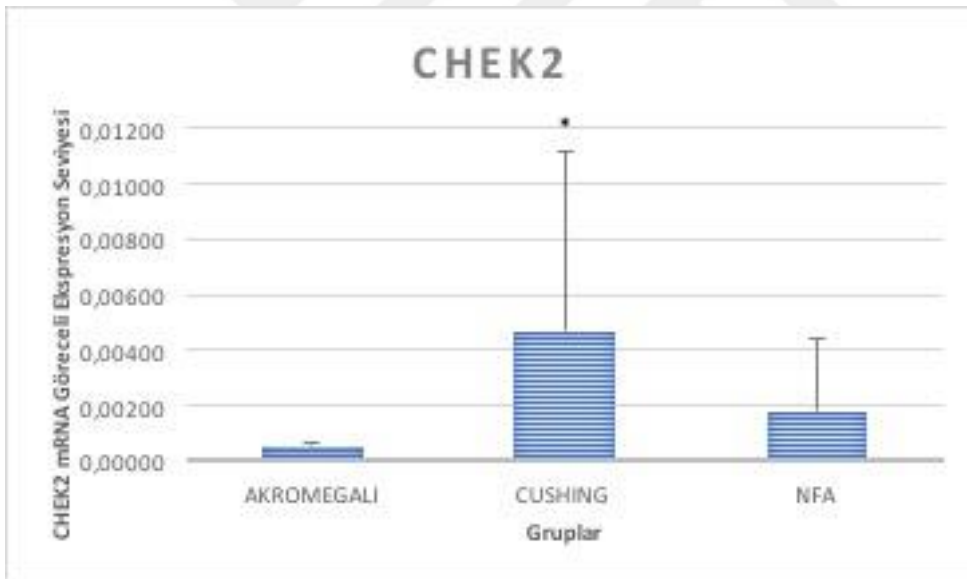
NFA hasta grubunda CCDN1(SiklinD1) mRNA ekspresyonu Akromegali hasta grubuna göre anlamlı olarak daha yüksek ($p=0.017$) (Şekil 4-8) olmasına rağmen CDKN2A(p16) mRNA ekspresyonu ise NFA hasta grubunda, Cushing grubuna kıyasla anlamlı olarak düşük bulundu ($p=0.013$) (Şekil 4-9). Diğer yandan, Cushing hasta grubunda CHEK2(Chk2) mRNA ekspresyonu Akromegali hasta grubuna göre anlamlı derecede yüksek olarak saptandı ($p=0.012$) (Şekil 4-10).



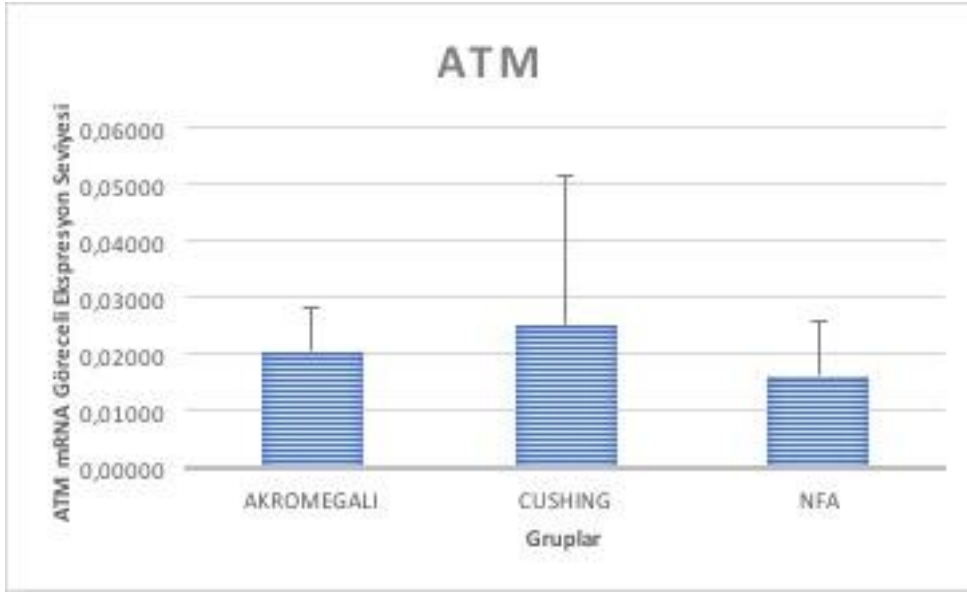
Şekil 4-8: Akromegali, Cushing ve NFA hasta grupları arasında) CCDN1(SiklinD1) mRNA ekspresyonunun karşılaştırılması



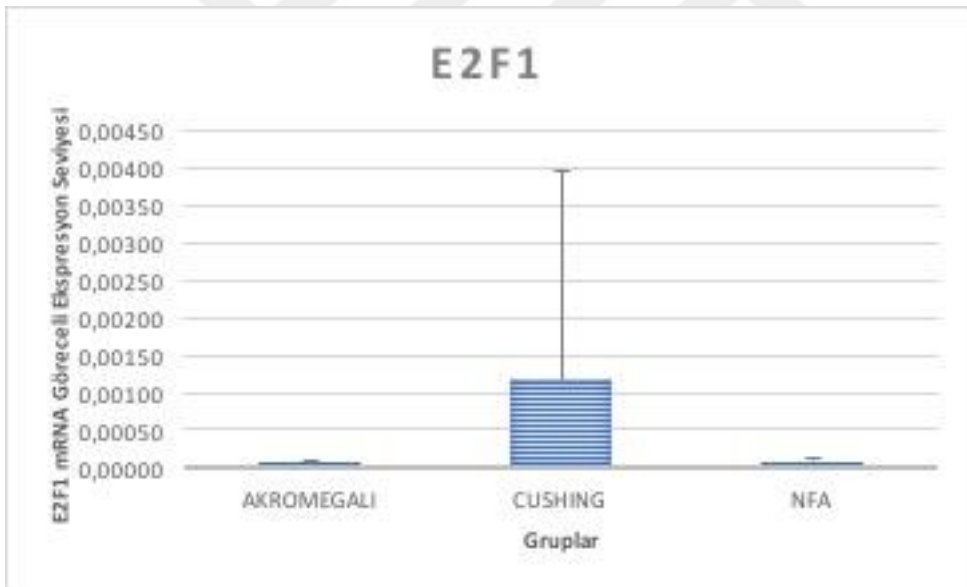
Şekil 4-9: Akromegali, Cushing ve NFA hasta grupları arasında CDKN2A(p16) mRNA ekspresyonunun karşılaştırılması



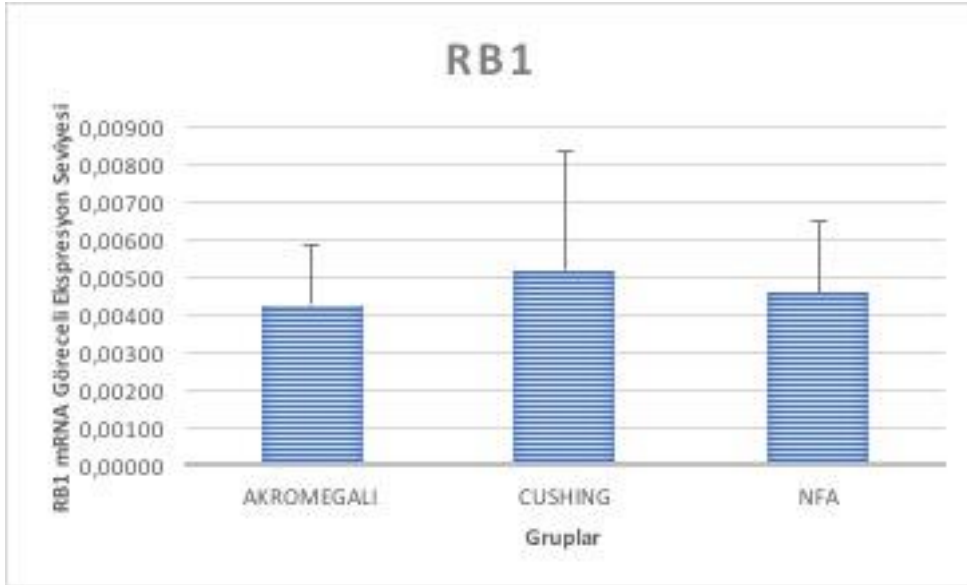
Şekil 4-10: Akromegali, Cushing ve NFA hasta grupları arasında CHEK2(Chk2) mRNA ekspresyonunun karşılaştırılması



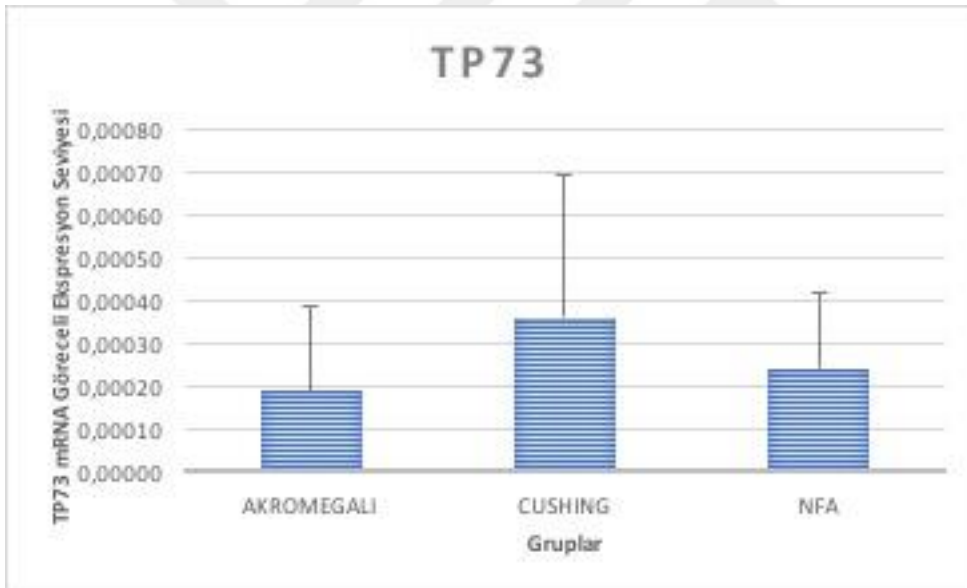
Şekil 4-11: Akromegali, Cushing ve NFA hasta grupları arasında ATM mRNA ekspresyonunun karşılaştırılması



Şekil 4-12: Akromegali, Cushing ve NFA hasta grupları arasında E2F1 mRNA ekspresyonunun karşılaştırılması



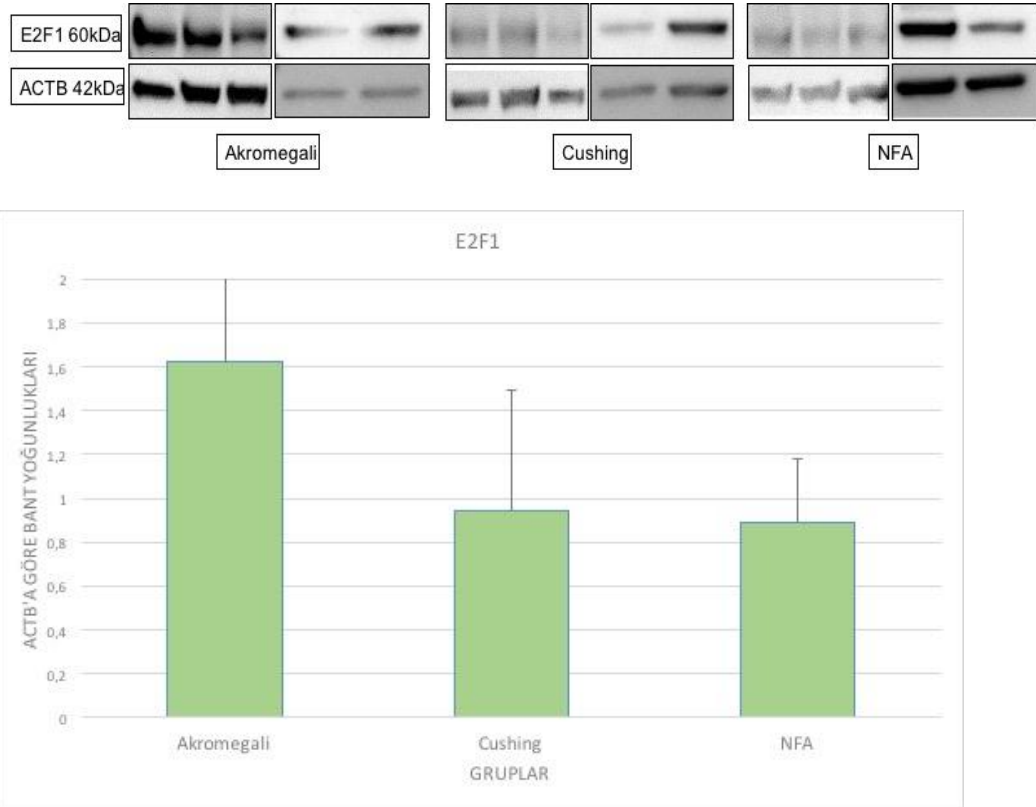
Şekil 4-13: Akromegali, Cushing ve NFA hasta grupları arasında RB1mRNA ekspresyonunun karşılaştırılması



Şekil 4-14: Akromegali, Cushing ve NFA hasta grupları arasında TP73mRNA ekspresyonunun karşılaştırılması

4.3. Akromegali, Cushing ve NFA Hasta Gruplarında E2F1 Protein Ekspresyon Seviyelerinin Western Blot Analiz Sonuçları

E2F1 protein ekspresyonu Akromegali, Cushing ve NFA hasta grupları arasında istatistiksel olarak herhangi bir farklılık göstermemektedir ($p>0.05$) (Şekil 4-15).



Şekil 4-15: Akromegali, Cushing ve NFA Hasta Gruplarında E2F1 Protein Ekspresyon Seviyelerinin Western Blot Analiz Sonuçları

5. TARTIŞMA

Çalışmamızda hipofiz adenomlarında, hücre döngüsünde kritik rollere sahip tümör baskılayıcı yolak ile ilişkili ve DNA hasar kontrol ve yanıtında önemli rol oynayan p16, Rb, pRb-S608, siklin D1, E2F1, pE2F1-S364, pATM-S1981, CHEK2 ve p73'ün mRNA ve protein ekspresyonları arasındaki ilişki incelendi.

Hipofiz adenomları kafa içi tümörlerinin %15-20'sini oluşturan ve anterior hipofiz hormon üreten hücrelerin neoplastik proliferasyonu sonucu ortaya çıkan selim veya agresif adenomlardır. Bu adenomlar sıklıkla PRL, GH, ACTH nadiren FSH, LH veya TSH aşırı miktarlarda salgılayarak hiperfonksiyon gösterirler. Üretilen hormona bağlı olarak fonksiyonel adenomlar (örneğin akromegali ve Cushing hastalığı) veya sadece kitle etkileriyle bası bulgularına yol açan fonksiyonel olmayan adenomların (NFA) oluşum mekanizması halen tartışmalıdır.

Hipofiz adenomları selim karakterlidir ve selim adenomların oluşumuna neden olan mekanizmalar tam olarak aydınlatılmamıştır. Adenomların gelişiminde etkili mekanizmalar için çeşitli hipotezler öne sürülmektedir. Bunlardan biri hücre döngüsünün kontrolünün bozulması ve hücre döngüsünün duraksaması böylece hücrenin senesense girmesidir (Melmed 2011). Erken proliferatif duraksama veya hücre senesensinin yavaş büyüyen selim tümörün erken evresinde meydana geldiği, geç evresinde ve malign tümörlerde olmadığı birçok araştırmacı tarafından vurgulanmaktadır (Bartkova ve ark. 2006) .

NFA'ların moleküler ve patolojik mekanizması da henüz tam olarak bilinmemektedir. Gen ekspresyon ve proteomik analizler ile bu adenomların gelişiminde hücre döngüsündeki duraksama, senesens ve DNA hasarında rol alan çeşitli genlerin etkili olduğunu ileri süren çalışmalar vardır. Proteomik analiz sonuçlarına göre NFA'da, MAPK sinyal yolağında, oksidatif strese, mitokondriyal fonksiyonlarda ve hücre döngüsü kontrolünün bozulmasına yol açan proteinlerin rol aldıkları, ayrıca NFA alt tiplerine göre hatta kişiye özel fonksiyonel işlevleri olabildiği de vurgulanmıştır (Moreno ve ark. 2005)(Zhan ve ark. 2014).

Hipofiz adenomları, özellikle inaktif mikroadenomlar yıllarca durağan bir büyüme sergilerler. Hipofiz tümörlerinde hücre proliferasyonunun duraksamasına neden

olan mekanizmanın, DNA hasarı ve buna bağlı olarak Rb fosforilasyonunu baskılayan CDK inhibitörü p21'in p53 aracılığıyla uyarılarak hücre döngüsünü G1 evresinde duraksatması ile ilişkili olduğu öne sürülmüştür (Melmed 2011), (Schmitt ve ark. 2002).

CDK inhibitorlerinin 2 ailesi-INK4a/ARF (p16, p15, p18) ve cip/kip inhibitorler (p21, p27, p57)- hücre döngüsünün G1 ve S evreleri boyunca tümör baskılayıcı rol oynarlar. Bu proteinler CDK kinaz aktivitesini engellerler. Böylece, pRb'nin inaktivasyonunu ve fosforilasyonunu engellemiş olurlar. Örneğin, normalde CDK4 tarafından gerçekleştirilen Rb fosforilasyonunu ve inaktivasyonunu inhibe eden p16 kodlayan genin, hipofiz tümör biyopsi analizlerinde hipermetile ve transkripsiyonel olarak sessiz olduğu bulunmuştur (Simpson ve ark. 2004). Fonksiyonel hipofiz adenomlarında immünohistokimya analizi ile yapılan bir çalışmada p16, Rb ve siklin D1'in ameliyat sonrası nüks ile ilişkili oldukları gösterilmiştir (Lee ve ark. 2014). Bir diğer çalışmada 36 insan gonadotrop orijinli NFA doku örneklerinin tamamında DNA hasarı ve p16 ekspresyonu tespit edilmiştir, fakat p21 saptanmamıştır (Chesnokova ve ark. 2011).

Bu çalışmada Akromegali, Cushing ve NFA hasta gruplarında özellikle senesenste etkili ve adenom gelişiminde rol alan p16'nın mRNA ve protein ekspresyonları araştırıldı. Cushing hasta grubunda yüksek p16 mRNA ve protein ekspresyonları saptandı. NFA'lara kıyasla, Cushing hastalarında p16'nın yüksek ekspresyonu hücre döngüsünün erken aşamada duraksaması ile ayrıca daha önceki çalışmalarda gösterildiği gibi hastaların büyük çoğunluğunda mikroadenom (Tani ve ark. 2010; Yarman 2016) görülmesi ile ilişkili olabilir. Diğer yandan, p16 mRNA ve protein ekspresyonu NFA hasta grubunda Cushing hasta grubuna göre anlamlı şekilde düşük olması ve ayrıca Siklin D1 mRNA ekspresyonun da yüksek olması NFA'ların çoğunlukla makroadenom olmalarının altında yatan neden olabilir. NFA hastalarında Rb ile p16 arasındaki zayıf ve ters yöndeki ilişkiyi gösteren bulgu da bu yorumu desteklemektedir. p16 mRNA ve protein ekspresyonun yüksek olduğu Cushing hasta grubunda Rb hipofosforillenmiş halde ve aktif formda olduğundan E2F1 ile kompleks halde ve G1 evresinde duraksamış olabilir. Kortikotrop adenomlar NFA'lara kıyasla erken proliferatif duraksamaya giriyor olabilir.

Hücre döngüsünün çeşitli evrelerinin çoklu-karmaşık kontrolü siklin-bağımlı kinazları uyaran siklinler tarafından düzenlenir. Siklinler aktiflendiği zaman, bu kinazlar

hücre döngüsünün en önemli negatif düzenleyicisi ve tümör baskılayıcı olan Rb proteinini fosforilleyip inaktifleştirirler. Rb'nin aktif olan hipofosforile formu E2F transkripsiyon faktörlerine bağlanarak hücre döngüsü ilerlemesini G1/S evresi boyunca engeller. Rb'nin bu fonksiyonu hasarlı DNA'nın replikasyonunu engellemede rol oynar. Buna karşın Rb proteinini siklin ve CDK kompleksi tarafından fosforillendiği zaman E2F transkripsiyon faktörlerinden ayrılarak hücre döngüsü ilerlemesine olanak sağlar (Attwooll ve ark. 2004).

Moreno ve ark çalışmalarında Siklin D1'in NFA'da aşırı ifade edildiğini belirtmişlerdir (Moreno ve ark. 2005). Bu çalışmada da aynı şekilde, Siklin D1 mRNA ekspresyonu NFA hasta grubunda Akromegali hasta grubuna göre daha yüksek olarak saptanmıştır Simpson ve ark çalışmalarında Rb'nin en çok NFA'larda ifade edilmesine rağmen, GH- salgılayan adenomların yaklaşık %25'inde Rb gen promotörlerinin hipermetilasyonu nedeniyle Rb ekspresyonun düşük olduğunu göstermişlerdir (Simpson ve ark. 2000). Bu çalışmada da benzer olarak, NFA hasta grubunda Rb proteininin ekspresyonu Akromegali hasta grubuna kıyasla yüksek bulunmuştur. Rb, tümör baskılayıcı işlevini klasik yolla hücre döngüsündeki E2F1'i baskılayarak gerçekleştirmesine rağmen, bu yoldan bağımsız mekanizmalar ile hücre döngüsü kontrolüne katıldığı ileri sürülür (Indovina ve ark. 2015). Bu çalışmanın bulguları farklı proteinler ile henüz bilinmeyen olası ilişkilerle Rb'nin NFA'da hücre döngüsü, senesens ve apoptozu kontrol ettiğini düşündürmektedir. Bu konuda yapılacak ileri proteomik çalışmalar konuya açıklık getirebilir.

E2F proteinleri, hücre döngüsü sırasında çeşitli süreçler için ihtiyaç duyulan genlerin, geçici ekspresyonlarını kontrol eder. Bu yüzden, E2F-bağlı transkripsiyonun seviyesi hücre proliferasyonu için çok önemlidir. E2F komplekslerinin farklı tipleri ya transkripsiyonu aktive eder ya da baskılar. E2F baskılayıcı kompleksler sessiz hücrelerde, farklılaşmış hücrelerde ve hücre döngüsünün G1 evresinde hedeflerinin transkripsiyonunu baskılar (van den Heuvel ve Dyson 2008). Bir çalışmada, E2F1 aracılı POMC transkripsiyonunun ektopik Cushing sendromunda ACTH üretimini baskılamak için potansiyel bir hedef olduğu ve ayrıca başka bir çalışmada E2F1'in spesifik olarak PTTG1 promotoruna bağlandığı ve PTTG1'in doğrudan bir E2F1 hedefi olarak hareket edebileceğini göstermişlerdir (Araki ve ark. 2016; Zhou ve ark. 2009). Dahası, E2F1 aktivasyonunun, HMGA2 geninin aşırı ekspresyonu ile uyarılan hipofiz adenomlarından

sorumlu olduğu saptanmış ve hipofiz adenom patolojisinde E2F1 aktivasyonunun kritik bir rol oynadığı ileri sürülmüştür (Fedele ve ark. 2006). Fakat NFA’da E2F1 ile ilgili bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmada, ilk kez NFA ile Cushing ve Akromegali hasta grupları arasında E2F1 mRNA ve protein ekspresyonları karşılaştırıldı. Akromegali hasta grubunda p16 ve E2F1 arasında aynı yönde bir korelasyon bulgusu her iki proteinin Akromegali’deki adenom gelişime doğrudan katıldığını göstermektedir. Ayrıca NFA hasta grubunda E2F1 protein ekspresyonu yüksek olmasına rağmen Cushing hasta grubunda düşük saptandı, dahası p16 protein seviyesi de NFA hasta grubunda düşük iken Cushing hasta grubunda yüksek olarak tespit edildi. Bu veriler doğrultusunda NFA ve Cushing hasta grubunda E2F1 ve p16 ekspresyon seviyelerinin birbirine zıt yönde olması bu iki adenoma ait hücre proliferasyon ve senesens mekanizmasına farklı faktörlerin ve proteinlerin katılabileceğini düşündürdü. Ayrıca, çalışılan Rb’nin aktif hipofosforile formunun NFA’larda yüksek olması, diğer yandan E2F1 ve Siklin D1 ekspresyonlarının da yüksek olması bu adenomların senesens mekanizmasının karmaşık olması ve henüz aydınlatılmaması nedeniyle daha ileri proteomik çalışmalar gerekliliğini ortaya koymaktadır.

G1 evresinde hücrenin iyonize radyasyona maruz kalması sonucu DNA hasarının ATM tarafından tanınmasının ardından diğer bir kontrol noktası kinazı olan Chk2 fosforillenerek aktive edilir (Akkiprik 2012). Memeli hücrelerinde G1 kontrol noktasındaki duraksama, Chk2 ve ATM tarafından fosforillenen, p53 etkisi ile gelişir. Fosforillenme, p53’ü, kararlı hale getirir ve DNA hasarı p53 miktarında hızlı artışa neden olur. p53 proteini bir transkripsiyon faktörüdür ve ekspresyonundaki artış, Cip/Kip ailesinden Cdk kısıtlayıcısı p21 geninin uyarılmasına yol açar. p21 proteini Cdk2’nin siklin E veya siklin A komplekslerini baskılayarak hücre döngüsünün duraksamasına neden olur (Cooper ve Hausman 2015). Carnevale ve ark’nın, yapmış oldukları bir çalışmada, U2OS hücrelerinde Chk2 tarafından fosforillenen pE2F1-S364’ün proapoptotik p73 genini hedefleyerek apoptozu uyardığı gösterilmiştir. E2F1’in DNA hasarı ile ilişkili olarak apoptozdaki önemli rolü ortaya çıkarılmıştır (Carnevale ve ark. 2012). Yakın zamanlardaki bir çalışmada p73’ün bazı izoformlarının hücre proliferasyonunu düzenleme işlevlerinin yanında kolorektal karsinomalarda hücre göçünü ve invazyonu engellediği de gösterilmiştir (Bae ve ark. 2018). Bu çalışmada ilk kez pE2F1-S364 ve p73 proteinlerinin ekspresyon seviyeleri Akromegali, Cushing ve NFA hasta grupları arasında kıyaslandı. NFA ve Akromegali’de Cushing grubuna göre

pE2F1-S364 protein ekspresyonu yüksek tespit edildi. Diğer yandan, p73 protein ekspresyonu ise Akromegali’de Cushing’ e göre yüksek olarak saptandı. Bu çalışmada Akromegali grubunda pE2F1-S364 ile uyumlu bir şekilde yüksek seviyede saptanan ve pE2F1-S364 tarafından uyarılan p73’ün, bu hasta grubunda apoptozu uyarak adenomların proliferasyonunu engellemiş olabileceği düşünüldü. Akromegali hastalarında saptanan pE2F1-S364 ile mitoz arasındaki ters yöndeki korelasyon bulgusu da bu yorumu güçlendirmektedir.

Cushing, Akromegali ve NFA hasta grupları arasında CHEK2 mRNA ekspresyon seviyeleri ilk kez bu çalışmada gösterildi. Cushing hasta grubunda Akromegali hasta grubuna kıyasla daha yüksek tespit edildi. Kortikosteroidlerin seviyelerindeki artış DNA hasarına neden olduğundan (Roussel-Gervais ve ark. 2016). DNA tamir görevinde yer alan CHEK2’nun artışı bu yol ile açıklanabilir. Ayrıca kortikosteroidler, farklı hücre ve dokuya veya konsantrasyona bağlı olarak, pozitif veya negatif olarak hücre çoğalmasını düzenler. Birçok dokuda, kortikosteroidler düşük konsantrasyonlarda büyümeyi uyarır, ancak yüksek konsantrasyonlarda hücre döngüsü ilerlemesini bloke eder. CHEK2’nun artışı, p16 ekspresyonunu artırarak bu yolak üzerinden hücre döngü kontrolünün bozulmasına ve duraksamaya neden olabileceği düşünüldü. Ancak bu hasta gruplarında Chk2 protein düzeylerinin belirlenmesi konuya daha fazla açıklık getirecektir.

Bu çalışmada NFA, Cushing ve Akromegali hasta grupları arasında hipofiz adenomlarının altında yatan moleküler patolojinin aydınlatılmasında önemli yer tutan hücre döngüsü mekanizmasını kontrol eden proteinlerin rolü araştırıldı. İlk kez bu çalışma ile Cushing, Akromegali ve NFA hasta grupları arasında E2F1 mRNA ve protein ekspresyon seviyeleri, pE2F1-S364 ve p73 proteinlerinin ekspresyon düzeyleri ve ayrıca CHEK2 mRNA ekspresyon seviyeleri gösterildi. NFA’da Siklin D1 mRNA ekspresyonu ile Rb protein ekspresyonu daha önceki çalışmalardaki gibi yüksek saptandı. Ayrıca, E2F1 ile pE2F1-S364 protein ekspresyon seviyeleri de yüksek fakat p16 mRNA ve protein ekspresyonu düşük olarak tespit edildi. Cushing hasta grubunda ise CHEK2 mRNA ekspresyonu ile p16 mRNA ve protein ekspresyonları yüksek olarak saptandı. E2F1, pE2F1-S364 ve p73 protein ekspresyon düzeyleri düşük olarak gösterildi. Akromegali’de ise Siklin D1 ile CHEK2 mRNA ve Rb protein ekspresyonları düşük tespit edildiği halde pE2F1-S364 ve p73 protein ekspresyon seviyeleri yüksek olarak saptandı.

Sonuç olarak bulgularımız hipofiz adenomlarının patogeneğinde rol oynayan hücre döngüsü düzenleyicileri, senesens ve DNA hasar kontrolünde görevli proteinlerin moleküler mekanizmalarının anlaşılmasına ışık tutacak, tedavide ve hastalığın önlenmesinde yeni yaklaşımların geliştirilmesine olanak sağlayabilecektir.



KAYNAKLAR

- Ahn, J., Urist, M. ve Prives, C. (2004). The Chk2 protein kinase. *DNA Repair (Amst)*, 3(8-9), 1039-1047.
- Akkiprik, M. (2012). Hücre Döngüsü. İçinde L. Türkeri, A. Özer, ve F. Narter (Ed.), *Moleküler Üroloji*. İstanbul: Üroonkoloji Derneği; 207-217
- Araki, T., Liu, N. A., Tone, Y., Cuevas-Ramos, D., Heltsley, R., Tone, M., ve Melmed, S. (2016). E2F1-mediated human POMC expression in ectopic Cushing's syndrome. *Endocr Relat Cancer*, 23(11), 857-870.
- Attwooll, C., Lazzerini Denchi, E., ve Helin, K. (2004). The E2F family: specific functions and overlapping interests. *EMBO J*, 23(24), 4709-4716.
- Bae, W. K., Hong, C. S., Park, M. R., Sun, E. G., Lee, J. H., Kang, K., Chung, I. J. (2018). TAp73 inhibits cell invasion and migration by directly activating KAI1 expression in colorectal carcinoma. *Cancer Lett*, 415, 106-116.
- Bartek, J., Falck, J. ve Lukas, J. (2001). CHK2 kinase--a busy messenger. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2(12), 877-886.
- Bartkova, J., Rezaei, N., Liontos, M., Karakaidos, P., Kletsas, D., Issaeva, N., Gorgoulis, V. G. (2006). Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints. *Nature*, 444(7119), 633-637.
- Ben-Shlomo, A. ve Melmed, S. (2017). Hypothalamic Regulation of Anterior Pituitary Function. İçinde S. Melmed (Ed.), *The Pituitary*. London: Elsevier.
- Bertoli, C., Skotheim, J. M. ve de Bruin, R. A. (2013). Control of cell cycle transcription during G1 and S phases. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 14(8), 518-528.
- Campisi, J. ve d'Adda di Fagagna, F. (2007). Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8(9), 729-740.
- Carnevale, J., Palander, O., Seifried, L. A. ve Dick, F. A. (2012). DNA damage signals through differentially modified E2F1 molecules to induce apoptosis. *Mol Cell Biol*, 32(5), 900-912.
- Chesnokova, V., Zonis, S., Zhou, C., Ben-Shlomo, A., Wawrowsky, K., Toledano, Y., Melmed, S. (2011). Lineage-specific restraint of pituitary gonadotroph cell adenoma growth. *PLoS One*, 6(3), e17924.
- Coller, H. A. (2007). What's taking so long? S-phase entry from quiescence versus proliferation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8(8), 667-670.
- Cooper, G. M. ve Hausman, R. E. (2015). *The Cell Cycle The Cell: A Molecular Approach*. Washington, D.C: Sinauer Associates.
- Fedele, M., Pierantoni, G. M., Visone, R. ve Fusco, A. (2006). E2F1 activation is responsible for pituitary adenomas induced by HMGA2 gene overexpression. *Cell Div*, 1, 17.
- Hydbring, P., Malumbres, M. ve Sicinski, P. (2016). Non-canonical functions of cell cycle cyclins and cyclin-dependent kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 17(5), 280-292.
- Indovina, P., Pentimalli, F., Casini, N., Vocca, I. ve Giordano, A. (2015). RB1 dual role in proliferation and apoptosis: cell fate control and implications for cancer therapy. *Oncotarget*, 6(20), 17873-17890.
- Kierszenbaum, A. L. ve Tres, L. L. (2016). *Histology and cell biology : an introduction to pathology*. Philadelphia, PA: Elsevier.
- Kovacs, K., Horvath, E. ve Vidal, S. (2001). Classification of pituitary adenomas. *J Neurooncol*, 54(2), 121-127.

- Lee, E. H., Kim, K. H., Kwon, J. H., Kim, H. D. ve Kim, Y. Z. (2014). Results of immunohistochemical staining of cell-cycle regulators: the prediction of recurrence of functioning pituitary adenoma. *World Neurosurg*, 81(3-4), 563-575.
- Lloyd, R. V., Osamura, R. Y., Klöppel, G. ve Rosai, J. (2017). *WHO classification of tumours of endocrine organs*. Lyon: International Agency for Research on Cancer 2017.
- Melmed, S. (2003). Mechanisms for pituitary tumorigenesis: the plastic pituitary. *J Clin Invest*, 112(11), 1603-1618.
- Melmed, S. (2011). Pathogenesis of pituitary tumors. *Nat Rev Endocrinol*, 7(5), 257-266.
- Mete, O. ve Lopes, M. B. (2017). Overview of the 2017 WHO Classification of Pituitary Tumors. *Endocr Pathol*, 28(3), 228-243.
- Moreno, C. S., Evans, C. O., Zhan, X., Okor, M., Desiderio, D. M. ve Oyesiku, N. M. (2005). Novel molecular signaling and classification of human clinically nonfunctional pituitary adenomas identified by gene expression profiling and proteomic analyses. *Cancer Res*, 65(22), 10214-10222.
- Nishioka, H., Inoshita, N., Mete, O., Asa, S. L., Hayashi, K., Takeshita, A., Yamada, S. (2015). The Complementary Role of Transcription Factors in the Accurate Diagnosis of Clinically Nonfunctioning Pituitary Adenomas. *Endocr Pathol*, 26(4), 349-355.
- Peurala, E., Koivunen, P., Haapasaari, K. M., Bloigu, R. ve Jukkola-Vuorinen, A. (2013). The prognostic significance and value of cyclin D1, CDK4 and p16 in human breast cancer. *Breast Cancer Res*, 15(1), R5.
- Ross, M. H. ve Pawlina, W. (2016). *Histology : a text and atlas : with correlated cell and molecular biology*. Philadelphia: Wolters Kluwer.
- Roussel-Gervais, A., Couture, C., Langlais, D., Takayasu, S., Balsalobre, A., Rueda, B. R., Drouin, J. (2016). The Cables1 Gene in Glucocorticoid Regulation of Pituitary Corticotrope Growth and Cushing Disease. *J Clin Endocrinol Metab*, 101(2), 513-522.
- Sakamuro, D., Folk, W. P. ve Kumari, A. (2015). To die, or not to die: E2F1 never decides by itself during serum starvation. *Mol Cell Oncol*, 2(2), e981447.
- Schmitt, C. A., Fridman, J. S., Yang, M., Lee, S., Baranov, E., Hoffman, R. M., Lowe, S. W. (2002). A senescence program controlled by p53 and p16INK4a contributes to the outcome of cancer therapy. *Cell*, 109(3), 335-346.
- Simpson, D. J., Hibberts, N. A., McNicol, A. M., Clayton, R. N. ve Farrell, W. E. (2000). Loss of pRb expression in pituitary adenomas is associated with methylation of the RB1 CpG island. *Cancer Res*, 60(5), 1211-1216.
- Simpson, D. J., McNicol, A. M., Murray, D. C., Bahar, A., Turner, H. E., Wass, J. A., Farrell, W. E. (2004). Molecular pathology shows p16 methylation in nonadenomatous pituitaries from patients with Cushing's disease. *Clin Cancer Res*, 10(5), 1780-1788.
- Society, T. P. (2015). Acromegaly. Erişim 07.05.2018
https://www.pituitarysociety.org/sites/all/pdfs/Pituitary_Society_Acromegaly_brochure_100.pdf
- Tani, Y., Inoshita, N., Sugiyama, T., Kato, M., Yamada, S., Shichiri, M., Hirata, Y. (2010). Upregulation of CDKN2A and suppression of cyclin D1 gene expressions in ACTH-secreting pituitary adenomas. *Eur J Endocrinol*, 163(4), 523-529.

- Van den Heuvel, S. ve Dyson, N. J. (2008). Conserved functions of the pRB and E2F families. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9(9), 713-724.
- Wass, J. A. H. ve Karavitaki, N. (2017). Nonfunctioning and Gonadotrophin-Secreting Adenomas. İçinde S. Melmed (Ed.), *The pituitary*. London: Elsevier; 589-603
- Yamada, S., Kovacs, K., Horvath, E. ve Aiba, T. (1991). Morphological study of clinically nonsecreting pituitary adenomas in patients under 40 years of age. *J Neurosurg*, 75(6), 902-905.
- Yarman, S. (2016). *Hipofiz Hastalıkları ve Vakaları*. İstanbul: İstanbul Tıp Kitapevi.
- Young, W. F., Jr., Scheithauer, B. W., Kovacs, K. T., Horvath, E., Davis, D. H., ve Randall, R. V. (1996). Gonadotroph adenoma of the pituitary gland: a clinicopathologic analysis of 100 cases. *Mayo Clin Proc*, 71(7), 649-656.
- Zhan, X., Wang, X., Long, Y. ve Desiderio, D. M. (2014). Heterogeneity analysis of the proteomes in clinically nonfunctional pituitary adenomas. *BMC Med Genomics*, 7, 69.
- Zhou, C., Wawrowsky, K., Bannykh, S., Gutman, S. ve Melmed, S. (2009). E2F1 induces pituitary tumor transforming gene (PTTG1) expression in human pituitary tumors. *Mol Endocrinol*, 23(12), 2000-2012.

FORMLAR**ASGARİ BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU**

07.09.2015 Versiyon no:1

Cerrahpaşa Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Endokrinoloji-Metabolizma ve Diyabet Bilim Dalı, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Beyin Cerrahisi Anabilim Dalı, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı ve Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda yürütülecek olan "Fonksiyonel Olmayan Hipofiz Adenomlarında Moleküler Mekanizmaların Araştırılması" başlıklı çalışmayı başlatmış bulunmaktayız.

1. Mevcut araştırmada fonksiyonel olmayan hipofiz adenomlarının gelişiminde etkileri olabileceği düşünülen moleküler mekanizmaları araştırmayı hedefledik.
2. Araştırma amacıyla size ek bir ilaç uygulanmayacaktır.
3. Araştırma amacıyla geriye dönük dosyanızdan takip ve tedaviniz için yapılmış olan laboratuvar verileriniz ile yaşıyorsunuz, ek hastalıklarınız, takiplerinizi gibi ek bilgileriniz elde edilecek ancak veriler kimliğinizi açık edebilecek bir şekilde kullanılmayacaktır.
4. Araştırmanın giderleri için gönüllünün kendisinden ücret talep edilmeyecek, gönüllünün bağlı bulunduğu sosyal güvenlik kuruluşuna bir araştırma gideri yüklenmeyecektir.
5. Çalışmaya katıldığınız için size ek bir ödeme de yapılmayacaktır.
6. Araştırma sonuçlarının eğitim ve bilimsel amaçlarla kullanımı sırasında kişisel bilgileriniz gizli tutulacaktır.
7. Bu araştırmaya katılmak tamamen isteğe bağlıdır ve reddettiğiniz zaman size uygulanan tedavide herhangi bir değişiklik olmayacaktır.
8. Çalışma için gerekli koşulları taşıdığımız takdirde çalışmaya dahil edilmek için yazılı onayınız alınacaktır. Gönüllü yazılı onay vermiş olsa da araştırmanın herhangi bir döneminde araştırmadan vazgeçmekte özgürdür.
9. İzleyiciler, yoklama yapan kişiler, Etik Kurul, Kurum ve diğer ilgili sağlık otoritelerinin gönüllünün orijinal tıbbi kayıtlarına doğrudan erişimlerinin bulunabilir, ancak bu bilgilerin gizli tutulacaktır. Yazılı bilgilendirilmiş gönüllü olur formunun imzalanmasıyla gönüllü veya yasal temsilcisinin söz konusu erişime izin vermiş olacaktır.
10. İlgili mevzuat gereğince gönüllünün kimliğini ortaya çıkaracak kayıtlar gizli tutulacak, kamuoyuna açıklanamayacak; araştırma sonuçlarının yayımlanması halinde dahi gönüllünün kimliği gizli kalacaktır.

11. Araştırma konusuyla ilgili ve gönüllünün araştırmaya katılmaya devam etme isteğini etkileyebilecek yeni bilgiler elde edildiğinde gönüllünün veya yasal temsilcisi zamanında bilgilendirilecektir.
12. Gönüllünün araştırma hakkında, kendi hakları hakkında veya araştırmayla ilgili herhangi bir advers olay/sorun hakkında daha fazla bilgi temin edebilmesi için MSc Derya METİN ARMAĞAN'a İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda ulaşabilirsiniz.
13. Gönüllünün araştırmaya devam etmesi için öngörülen süre 2 yıldır. Araştırmaya katılması beklenen tahmini gönüllü sayısı 72'dir.
14. Gönüllülerden elde edilmiş olan dosyalardaki verileri tedaviye yanıt için ileride kullanılabilecek veri oluşturulacaktır.
15. Moleküler biyoloji incelemeleri İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ABD' da yapılacaktır.
16. *"Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formundaki tüm açıklamaları okudum. Bana, yukarıda konusu ve amacı belirtilen araştırma ile ilgili yazılı ve sözlü açıklama aşağıda adı belirtilen hekim tarafından yapıldı. Araştırmaya gönüllü olarak katıldığımı, istediğim zaman gerekçeli veya gerekçesiz olarak araştırmadan ayrılabileceğimi biliyorum. Söz konusu araştırmaya, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın kendi rızamla katılmayı kabul ediyorum."*

Gönüllünün:

adı -soyadı

imzası

tarikh:

17. Araştırma ekibinde yer alan ve yetkin araştırmacının:

adı -soyadı

imzası

tarikh

18. Olur işlemine tanık olan kişinin:

adı -soyadı

imzası

tarikh

19. Gerekiyorsa yasal temsilcinin:

adı -soyadı

imzası

tarikh

Not: Bu form iki nüsha olarak hazırlanmıştır. İmzalandıktan sonra bir nüshası gönüllüye verilecektir; diğer nüsha hasta dosyasında saklanacaktır.

ETİK KURUL KARARI

Tarih ve Sayı: 06/04/2017-133989



T.C.
CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu



Sayı :83045809-604.01.02-
Konu :Dokt.Öğr.Derya Metin
Armağan'ın etik kurul kararı A-
12

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞINA

İlgi :14.03.2017 tarih, 66018902-050.99-101536 sayılı yazı

Anabilim Dalmız öğretim üyesi Prof.Dr.Melek Öztürk SEZGİN'in danışmanlığında Doktora Öğrencisi Derya Metin ARMAĞAN'ın yürütücülüğünde Prof.Dr.Pınar KADIOĞLU, Prof.Dr.Nurperi GAZİOĞLU, Prof.Dr.Necmettin TANRIÖVER ve Doç.Dr.Nil Çomunoğlu ÜSTÜNDAĞ'ın yardımcılıklarında "Fonksiyonel Olmayan Hipofiz Adenomlarında Moleküler Mekanizmaların Araştırılması" başlıklı Doktora Tezi (Rerospektif/Araştırma Fonu) hakkında ilgi yazınız ve ekleri 04 Nisan 2017 tarihinde toplanan Fakültemiz Klinik Araştırmalar Etik Kurulunca müzakere edilmiş olup; Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) desteği alınması koşuluyla etik açıdan uygun olduğuna karar verilmiştir.

Bilgilerinizi rica ederim.

e-İmzalı
Prof. Dr. Özgür KASAPÇOPUR
Başkan

e-İmzalı
Prof. Dr. Emine Gülderen ŞAHİN
Bölüm Başkanı

EK :
1 dosya elden teslim edilecektir.

Doğrulamak için:<http://194.27.128.66/envision.Sorgula/belgedogrulama.aspx?V=BE8RNKZJ8>

Ayrıntılı bilgi için iritibat : Güler SOYDANER Dahili : 22300

İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi 34303 Cerrahpaşa/ İSTANBUL
Tel : 0 (212) 414 30 00 21107- 21108 Fax : 0 (212) 632 00 33
e-posta : ctfpersonel@istanbul.edu.tr Elektronik Ağ : www.istanbul.edu.tr

Bu belge 5070 sayılı Elektronik İmza Kanununa 5. Maddeye gereğince güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

FONKSİYONEL OLMAYAN HİPOFİZ ADENOMLARINDA MOLEKÜLER MEKANİZMALARIN ARAŞTIRILMASI

ORIJİNALLIK RAPORU

%6	%4	%3	%3
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	%1
2	www.noropsikiyatriarsivi.com İnternet Kaynağı	%1
3	Submitted to Gaziantep Aniversitesi Öğrenci Ödevi	%1
4	www.muhteva.com İnternet Kaynağı	<%1
5	library.neu.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
6	"Poster Özetleri / Poster Abstracts", Turkish Journal of Biochemistry, 2015 Yayın	<%1
7	polen.itu.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
8	dspace.trakya.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Derya	Soyadı	METİN ARMAĞAN
Doğ.Yeri	Kangal	Doğ.Tar.	05.09.1987
Uyruğu	TC	TC Kim No	31967291682
Email	deryametin@ymail.com	Tel	05385715499

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora	İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ABD	2018
Yük.Lis.	İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ABD	2013
Lisans	Çanakkale 18 Mart Üniversitesi	2010
Lise	İbrahim Turhan Yabancı Dil Ağırlıklı Lisesi	2005

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	YÖKDİL Puanı
İngilizce	Çok iyi	Çok iyi	Çok iyi	80

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	67,3	68,6	65,9

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office	Çok iyi

Yayınlar

Metin-Armağan D, Gezen-Ak D, Dursun E, Atasoy İL, Karabay A, Yilmazer S, Öztürk M. Okadaic acid–induced tau hyperphosphorylation and the downregulation of Pin1 expression in primary cortical neurons. J Chem Neuroanat. 2018 May 31;92:41-47. doi: 10.1016/j.jchemneu.2018.05.006.

Atasoy İL, Dursun E, Gezen-Ak D, **Metin-Armağan D**, Öztürk M, Yilmazer S. Both secreted and the cellular levels of BDNF attenuated due to tau hyperphosphorylation in primary cultures of cortical neurons. J Chem Neuroanat. 2017 Mar;80:19-26. doi: 10.1016/j.jchemneu.2016.11.007.

Dagistanli F.K., Ozkaya H.M., Kucukyoruk B., Biceroglu H., **Metin D.**, Gazioglu N., Oz B., Kadioglu P., Ozturk M. 2016. “Preoperative somatostatin analogue treatment might trigger apoptosis and autophagy in tumor tissues of patients with acromegaly: a pilot study”. Exp Clin Endocrinol DOI:10.1055/s-0042-107243 2016 Jun 20.

Sözlü Sunum

Derya Metin, Duygu Gezen-Ak, Erdinç Dursun, İrem L Atasoy, Selma Yılmaz, Melek Öztürk. The Relationship Between The Expression of Pin1 and Tau Hyperphosphorylation in Primary Cortical Neurons. XIII. National Neuroscience Congress, Konya, Turkey, April 30 – May 03, 2015.

Posterler

Derya Metin, Duygu Gezen-Ak, Erdinç Dursun, İrem L Atasoy, Selma Yılmaz, Melek Öztürk. The Effect of Okadaic Acid Induced Tau Hyperphosphorylation on Pin1 Expression in Primary Cortical Neurons. Alzheimer’s Association International Conference (AAIC), Boston, United States, July 13-18, 2013.

M. Ozturk, **D. Metin**, F. Kaya-Dagistanli, D. Gezen-Ak, E. Dursun, S. Ilvan, H. Unal. Association of caspase-9 promoter region polymorphisms and breast cancer, Federation of European Biochemical Societies (FEBS) Congress, Saint Petersburg, Russia, July 06-11, 2013.

İrem L Atasoy, Erdinc Dursun, Duygu Gezen-Ak, **Derya Metin**, Melek Öztürk, Selma Yılmaz. The effects of Tau hyperphosphorylation on the release of brain derived neurotrophic factor (bdnf) in primary cortical neuron cultures, Alzheimer’s Association International Conference (AAIC), Boston, United States, July 13-18, 2013.

F. Kaya Dagistanli, B. Kucukyoruk, H. Biceroglu, **D Metin**, N. Gazioglu, B. Oz, P. Kadioglu, M. Ozturk. The effect of octreotide treatment on apoptosis and autophagy in acromegalic patients. Electron Microscopy Congress, Sabancı University, İstanbul, Turkey, September 02-04, 2015.

Ödüller ve Burslar

Cedars-Sinai Medical Center, Dr. Shlomo Melmed'in Endokrinoloji Laboratuvarında ziyaretçi öğrenci bursu (11 Ekim 2016 - 17 Aralık 2016) Los Angeles, California, USA.

Kongreler ve Sempozyumlar

Certificate of Attendance – 5th International Congress of the Molecular Biology Association of Turkey, Boğaziçi University, Turkey, 2017

Certificate of Attendance - 2nd Istanbul Pituitary Symposium, Istanbul University Pituitary Center, Turkey, 2017

Certificate of Attendance - Genome Biology & Practical Bioinformatic Course, Istanbul University, Turkey, 2016

Certificate of Attendance - 22nd National (Electron) Microscopy Congress EMK, Sabancı University, Turkey, 2015

Certificate of Attendance - EMBO Young Scientists' Forum, Yeditepe University, Turkey, 2012

LLP-Erasmus-Intensive Programme Classic and Modern Methods for Molecular Diagnostic in Human Pathology/ Brasov, 2011

T.C. Ministry of Health Certificate of utilization of experimental animals, Turkey, 2011
Workshop- Development and Function of the Nervous system, Boğaziçi University, Turkey, 2011

Certificate of Attendance - XII. National Congress of Medical Biology and Genetics, Turkey, 2011

Certificate of Attendance- Current Approach to Programmed Cell Death, Acıbadem University, Turkey, 2011

T.C. M.E.B. Public Education Centre Chess Course Certificate, Turkey, 2010

The Scientific and Research Council of Turkey (TUBITAK) Nature Training Certificate Tübitak and Mustafa Kemal University- Certificate of Nature Training in the neighbourhood of the Amanos and Antakya, 2008

1.Symposium of Genetically Modified Organisms Orta Doğu Teknik University, 2008

Üyelikler

Member of The Pituitary Society

Member of Molecular Cancer Research Association (MOKAD)

Member of European Association for Cancer Research (EACR)

Member of Association of Medical Biology





