

T.C.  
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ  
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ  
KOORDİNASYON BİRİMİ



**PROJE BAŞLIĞI**

**NÖROENDOKRİN TÜMÖRLERDE DNA HASARI ve HASAR ONARIM  
KAPASİTESİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Proje No:**TOA-2013-4619

**Proje Türü**

Öncelikli Alan Araştırma Projesi

**SONUÇ RAPORU**

**Proje Yürütücüsü:**

Doç. Dr. Zuhâl Hamurcu  
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı/Temel Tıp Bilimleri Böl.

**Araştırmacının Adı Soyadı**

Prof. Dr. Bayram Fahri Prof.  
İç Hastalıkları Anabilim Dalı/Dahili Tıp Bilimleri Böl.  
Prof. Dr. Dönmez Altuntaş Hamiyet  
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı/Temel Tıp Bilimleri Böl.  
Prof. Dr. Gürsoy Şebnem  
İç Hastalıkları Anabilim Dalı/Dahili Tıp Bilimleri Böl.  
Prof. Dr. Özkan Metin  
İç Hastalıkları Anabilim Dalı/Dahili Tıp Bilimleri Böl.  
Prof. Dr. Öztürk Figen  
Tıbbi Patoloji/Cerrahi Tıp Bilimleri Böl.  
Doç Dr. Yurci Alper  
İç Hastalıkları Anabilim Dalı/Dahili Tıp Bilimleri Böl.  
Yard. Doç. Dr. Abdülrezzak İmmühan  
Nükleer Tıp Anabilim Dalı/Dahili Tıp Bilimleri Böl.  
Doç Dr. Karaca Halit  
İç Hastalıkları Anabilim Dalı/Dahili Tıp Bilimleri Böl.  
Araş. Gör . Bitgen Nazmiye  
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı/Temel Tıp Bilimleri Böl.

Ay 2016

KAYSERİ



## TEŐEKKÜR

Proje ekibi olarak, TOA-2013-4619 nolu projemizi destekleyen Erciyes Üniversitesi BAP birimine sonsuz teőekkürleimizi sunarız. Ayrıca proje ekibinde yer almayan prpjenin kabulünden sonra Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans öğrencisi olarak başlayın ve halen yüksek lisans öğrencisi olan **Nesrin Delibaşı**'na projede büyük bir öz veriyle ile çalıştığı için teőekkür ederiz.

## İÇİNDEKİLER

	<b>Sayfa No</b>
<b>ÖZET</b>	<b>5</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>6</b>
<b>1. GİRİŞ / AMAÇ VE KAPSAM</b>	<b>7-8</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER</b>	<b>9-14</b>
2.1.Nöroendokrin tümör (NET)	<b>9-10</b>
2.2.Kromogronin A ve Sinaptofizin: Kromogronin A	<b>10-11</b>
2.3.Ki 67	<b>11</b>
2.4.Komet Assay Tekniği	<b>12-14</b>
2.5.Komet Yöntemi ile DNA Hasarının Değerlendirilmesi	<b>14</b>
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM</b>	<b>15-17</b>
<b>4. BULGULAR</b>	<b>18-21</b>
<b>5. TARTIŞMA VE SONUÇ</b>	<b>22-24</b>
<b>6. KAYNAKLAR</b>	<b>28-28</b>

## NÖROENDOKRİN TÜMÖRLERDE DNA HASARI ve HASAR ONARIM KAPASİTESİNİN ARAŞTIRILMASI

### ÖZET

Komet assay yöntemi, DNA hasar ve tamir çalışmaları için kullanılan son derece basit ve duyarlı bir tekniktir. Nöroendokrin tümörler (NET) endokrin sistemin nöroendokrin hücrelerinden oluşan tümör grubunu temsil etmektedir. Bunların çoğu diğer kanserlere kıyasla çok yavaş büyüdüğünden, genellikle ölçülebilir boyuta gelmeleri ya da belirtilere neden olmaları yıllar sürer ve geç evrede tanı konduğunda hastaların sağ kalım şansı ve yaşam kalitesi üzerinde olumsuz etkilere yol açabilir. Çalışmamızda, komet assay yöntemi ile NET'lerde bazal düzeyde DNA hasarı (kırıkları) ve DNA hasar düzeyi (kırık oranı) ile Ki-67 arasındaki ilişkiye bakıldı. Çalışma, NET teşhisi konmuş ve herhangi bir tedavi almamış 13 hastada ve bu hastalara benzer yaş ve cinsiyette olan 7 sağlıklı kişide yapıldı. Hasta ve sağlıklı kontrollerden alınan periferik kan örneklerinde DNA hasarına bakmak için komet assay yöntemi kullanıldı. İstatistiksel analizler graph pad ve SPSS programı kullanılarak yapıldı. Komet assay analiz sonuçlarımıza göre NET'li hastalarda DNA hasar oranı sağlıklı kişilere göre yüksek bulundu ( $p < 0.05$ )

DNA kırıklarındaki artış, hücrelerdeki genomik kararsızlığın göstergesi, genetik kararsızlık da kanserin karakteristik bir özelliğidir. Komet analizi sonucu NET hastalarında yüksek bulunan DNA hasarı bu hastalarda genomik kararsızlığın bir göstergesi olup, bu durum kötü huylu sekonder tümör gelişimine yol açabilir.

**Anahtar Kelimeler:** Komet assay, DNA hasarı, Nöroendokrin tumors, genomik kararsızlı

## INVESTIGATION OF DNA DAMAGE AND DAMAGE REPAIR CAPACITY IN NEURONENDOCRINE TUMORS

### ABSTRACT

The comet assay method is an extremely simple and sensitive technique for DNA damage and repair studies. Neuroendocrine tumors (NET) represent the group of tumors composed of neuroendocrine cells of the endocrine system. Because many of these are very slowly growing compared to other cancers, they often take years or years to come to a measurable dimension or cause a diagnosis, and when diagnosed late, it can lead to adverse effects on survival and quality of life of patients. In our study, the correlation between Ki-67 and DNA damage (DNA fractures) and DNA damage level (DNA fracture rate) at baseline was examined by the comet assay method. The study was carried out on 13 patients with non-treatment and 7 healthy individuals of similar age and sex. The comet assay method was used to look for DNA damage in peripheral blood samples from patients and healthy controls. Statistical analyzes were done using graph pad and SPSS program. According to our results of comet assay, the DNA damage rate in NET patients was higher than that of healthy subjects ( $p < 0.05$ )

The increase in DNA breaks, the indication of genomic instability in cells, and genetic instability are characteristic features of cancer. High DNA damage in NET patients is a marker of genomic instability in these patients, which may lead to malignant secondary tumor development.

**Key words:** Comet assay, DNA damage, neuroendocrine tumors, genomic instability.

## 1. GİRİŞ / AMAÇ VE KAPSAM

Kanser, genetik ve epigenetik değişikliklerin birikimi sonucu ortaya çıkan çok aşamalı bir süreçtir. Genetik değişiklikler ile kanser arasında bir ilişkinin varlığı birçok çalışmayla desteklenmiş olup, artık bugün pek çok kanser tipi ile genom kararsızlığı arasında bağlantı olduğu bilinmektedir (1, 2). Bu genomik kararsızlık ile ilişkilendirilmiş belirteçlerin, hastalık/kanserle ilişkili değişikliklerin erken tanısında kullanılmasının yararlı olabileceği ileri sürülmektedir (3). Komet tekniği (single-cell gel electrophoresis) bu amaç için en sık kullanılan yöntemler arasındadır (4). Bu teknik DNA hasar ve tamir çalışmaları için kullanılan son derece basit ve duyarlı bir tekniktir. Çift zincir kırıklarının yanı sıra tek zincir kırıklarının, onarımı tamamlanmamış DNA bölgelerinin, basit ve hassas bir şekilde belirlenmesinde kullanılır (4-6).

Nöroendokrin tümörler (NET) endokrin sistemin nöroendokrin hücrelerinden oluşan tümör grubunu temsil etmektedir. Bunların çoğu diğer kanserlere kıyasla çok yavaş büyür, genellikle ölçülebilir boyuta gelmeleri ya da belirtilere neden olmaları yıllar sürer ve geç evrede tanı

konduğunda hastaların sağ kalım şansı ve yaşam kalitesi üzerinde olumsuz etkilere yol açabilir (7). NET'lerde Kromogranin-A ve sinaptofizin immunohistokimyasal tanısal belirteçler olarak kullanılmaktadır. NET'lerin derecelendirilmesinde dolayısıyla prognostik değerlendirilmesinde ise Ki-67 kullanılmaktadır (8). Serumda lülen Kromogranin A düzeyleri tedavi sresinde tümör yükünün değerlendirilmesini ve hastanın takibini yönlendirmektedir.

Çalışmamızda geleneksel komet assay yöntemi ile NET'lerde bazal seviyede DNA kırıklarının araştırılması amaçlandı (4,5).Ayrıca, DNA hasar düzeyi (kırık oranı) ile Ki-67, kromogranin-A ve tümör evreleri (WHO 2010 sınıflamasına göre) arasındaki ilişkiye bakılarak NET'lerin prognozunun değerlendirilmesinde, tedavi seçeneğinin belirlenmesinde kromogranin A ve Ki-67'nin yanı sıra olası kırık oranının da ek bir belirteç olarak kullanılıp kullanılmayacağının araştırılması amaçlandı.



## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1.Nöroendokrin tümör (NET);

Nöroendokrin tümör (NET); çeşitli endokrin hücrelerin malin transformasyonun sonucu olarak vücudun hemen her bölgesinde gelişebilen, nöroendokrin sistemden köken alan tümörlerdir (7,9 ). NET'ler nadir görülen, lokasyonları ve salgıladıkları hormonlar nedeniyle çok çeşitli klinik durumlar ortaya çıkaran, çoğunlukla benign seyirli olmakla birlikte agresif seyirli de olabilecek tümörlerdir. Bu tümörleri bir grupta toplayan özellik köken aldıkları organın özelliklerini taşımalarına rağmen hepsinin ortak nöroendokrin yapı göstermeleridir. NET insidansı 35/100.000 kişi olup NET'ler tüm kanserlerin %0.5'ini oluşturur (10). ABD'deki yıllık prevalans 100.000'in üzerinde olup, bu rakam mide ve pankreas kanser prevalansından yüksektir (10) . Dünya Sağlık Örgütü (WHO)'nün ilk sınıflamasında gastro-entero-pankreatik (GEP) sistemin nöroendokrin tümörleri için “karsinoid” terimi kullanılmıştır. Daha sonra 2000 yılında modifiye edilmiş ve karsinoidin farklı histolojik

özelliklerinden dolayı nöroendokrin terimi kabul görmüştür. Buna göre, iyi diferansiye nöroendokrin tümörler: benign veya malign potansiyeli belirsiz tümörler; iyi diferansiye nöroendokrin karsinoma: düşük dereceli malignansiler ve az diferansiye nöroendokrin karsinoma (çoğunlukla küçük hücreli): yüksek dereceli malignansiler için kullanıldı. Daha sonra da prognozu belirlemede kullanılan klinik ve histolojik özelliklere göre alt gruplara ayrılmıştır. Klinik olarak daha anlamlı gruplar oluşturabilmek için organlara göre tümör boyutu, farklılaşma, lokal organ invazyonu, metastaz varlığı, anjiyoinvazyon, proliferatif aktivite, hormon salgılayıp salgılamadığı, klinik bir sendrom (karsinoid sendrom) veya hastalık (nörofibromatozis) eşlik edip etmediğine göre daha detaylı tanımlamalar yapılmıştır. Gastrik ve pankreatik nöroendokrin tümörler için bir “grading (derecelendirme (G))” sistemi önerilmiş, malign-benign ayrımı yapabilmek için klinik özellikler sınıflamaya dahil edilmiştir. En son 2010 yılında WHO yapılan sınıflamada neuroendokrin neoplasm (NEN) terimi kullanıldı ve patolojik derecelendirme sistemi esas değerlendirme kriterlerinden biri olarak kabul edildi. WHO tarafından Ki-67 ya da mitoz sayısına göre Yazım alanları gerektiği kadar uzatılabilir NEN’ler, NET G1: < % 2 Ki-67, NET G2: % 3-20 Ki-67, NET G3: > % 20 Ki-67 şeklinde 3 grupta sınıflandırıldı. Buna rağmen karsinoid teriminden de tamamen vazgeçilmeyip, iyi diferansiye nöroendokrin tümör terimi: karsinoid ile; iyi diferansiye nöroendokrin karsinoma terimi de: malign karsinoid ile eş anlamlı kullanılmaktadır. İyi diferansiye NET’ler benign veya malign olabilirler (11, 12).

## **2.2.Kromogranin A ve Sinaptofizin: Kromogranin A**

Kromogranin A (CgA) endokrin ve nöroendokrin hücrelerin merkezi büyük yoğun veziküllerinde (large dense core vesicles, LDCV) yer alan diğer peptidlerle beraber depolanan ve aktif olarak salgılanan glikoproteinlerin kromogranin ailesine ait üyesidir. Bu nedenle tanıda histolojik tümör belirteci olarak tedavi sırasında da tümör kitlesini yansıtan takip kriteri olarak kullanılır. CgA, sinaptofizin ile birlikte nöroendokrin diferansiyasyon için genel bir

belirteç olarak telakki edilir ve CgA boyanmasının kaybolması daha az diferansiye histolojiyle koroledir. CgA GEP-NET hastalarında kullanılan en yararlı test olarak bilinir. Histopatolojik tanıkromogranin A (CgA), sinaptofizin ve nöron spesifik enolaz (NSE) gibi antikorklaryardımlıyla immünhistokimyasal olarak konur.

Nöronlar ve nöroendokrin hücreler peptid içeren veziküller içerirler. Kromograninler endokrin hücrelerde veziküllerin (hücre içi kesecik) içinde bulunan peptidlerdir ve vasostatin adlı hormonların prekürsörüdür. Bu veziküllerindepoladığı ve salgıladığı asidik özellikteki çözünebilen proteinlere “granin” denir. “Granin” ailesi kromogranin A, kromogranin B ve kromogranin C gibi proteinleri içerir. Kromogranin A 439 aminoasitlik bir glikoproteindir. Vasostatin adlı hormonların prekürsörüdür. Sadece prolaktinoma da bulunmaz. Diğer tüm endokrin hücrelerde bulunur. Sinaptofizin ise nöroendokrin hücrelerde ve nöronlarda presinaptik veziküllerde bulunan bir membran glikoproteindir.

### **2.3.Ki-67:**

MKI67 geni tarafından kodlanan Ki-67 veya MKI67 olarak bilinen bir proteindir.

Proliferasyon için hücrel bir belirleyicidir. “Ki” kısaltmasını ilk kez bulunduğu

Almanya'nın Kiel isimli sehrinden almıştır. Ki-67 proteini hücrenin iki mitoz arasındaki hazırlık fazı olarak tanımlanabilecek interfaz (G1, S, G2) sırasında hücre nükleusunda bulunur

ve mitoz sırasında kromozomların yüzeyinde yer alır. Sadece dinlenen hücrelerde (G0)

bulunmaz. Ayrı ayrı tümör çeşitlerinde yapılan birçok çalışmada Ki-67 proliferasyon

indeksinin sağkalım ve rekürrens için önemli bir gösterge olduğu kabul edilmistir. Ki-67

proteini genelde MIB1 isimli antikor ile isaretlenir.

tümör belirteçlerinin ölçümü tanıda, progresyonu ve tedaviye yanıtı belirlemede önemlidir.

Kromograninler nöroendokrinve endokrin hücrelerin granüler veziküllerinde depolanırlar.

Kromogranin ailesininin çok çalışılan üyesi kromogranin A (CgA)'dır. CgA'nın

nöroendokrin tümörlerde genel olarak en yararlı, en duyarlı ve en özgül tümör belirteci olduğu belirtilmiştir.

#### **2.4.Komet Assay Tekniği**

DNA'da oluşan hasarların tamir edilememesi veya yanlış tamir edilmesi genomda kararsızlığa yola açar. Genetik kararsızlık kanserin en belirgin özelliğidir. Mutasyonlar genomun bütünlüğünü sağlayan genlerde veya tümör gelişimi süresince somatik hücrelerde meydana gelebilir. Oluşan hasar DNA onarım sistemleri tarafından onarılmakla birlikte, hasarın çok fazla olduğu veya onarım sistemlerinin yetersiz kaldığı durumlarda DNA üzerinde oluşan hasar mutasyona ve sonuç olarak genomik kararsızlığa, bu da hücre ölümüne kadar varan etkilere yol açar. DNA hasarının yaşlanma, kanser, kardiyovasküler hastalıklar, immun sistem hastalıkları, dejeneratif hastalıklar gibi doku fonksiyonlarının bozulması ile ortaya çıkan hastalıkların etyolojisinde önemli rol oynadığı ileri sürülmüştür (13,14). Hatta NET'lerin patogenezinde de nokta mutasyonu, delesyon, metilasyon, kromozom kaybı, missense gibi mutasyonların etkili faktörler olabileceği rapor edilmiştir (15). DNA'da ekzojen veya endojen faktörlerin etkisiyle meydana gelen tüm değişiklikler "DNA hasarı" olarak adlandırılır. Endojen kaynaklı serbest radikaller ve bunların reaksiyon ürünleri DNA'da önemli baz oksidasyonlarına, tek ve çift zincir kırıklarına ve delesyonlar gibi çeşitli mutasyonlara sebep olur. Bu olaylar, proto-onkogen aktivasyonu, tümör-süpressör gen inaktivasyonu ile sonuçlanabilir (16,17). Somatik hücrelerdeki DNA hasarını araştırmada çeşitli yöntemler kullanılmıştır. Yoğun olarak kullanılan yöntemler, mitojenle uyarılmış periferik kan lenfositlerindeki kromozomal hataların, MN (mikronukleus) ve SCE (Sister Chromatid Exchange) frekanslarının incelenmesidir (18, 19).

Bununla birlikte bu sitogenetik yöntemleri kısıtlayan; hücre popülasyonunun proliferasyonu, gerekli kan miktarının çokluğu, daha yoğun ve uzun laboratuvar işlemleri gibi bazı etkenler vardır. Comet yöntemi ise tek hücre seviyesinde, DNA tek ya da çift sarmalındaki kırıkların belirlenmesinde kullanılan duyarlı bir yöntemdir ve diğer birçok yöntemler göre aşağıda belirtilen avantajlara sahiptir (20)

Komet assay tekniğinin avantajları:

1. Değişik hücre ve doku gruplarına uygulanabilir.
2. Hızlı bir yöntemdir, çabuk sonuç alınır.
3. Hassas ve güvenilir bir yöntemdir.
4. Hücrelerdeki DNA kırıklarını görsel olarak ortaya koyar.
5. Maliyeti düşüktür.
6. Araç gereç gereksinimi azdır

Genotoksik taramalarda comet yöntemi giderek daha fazla kabul görmektedir (5). Bu yöntemle DNA sarmal kırıklarının saptanması ve onarım kapasitesi, hassas, hızlı ve güvenilir bir şekilde gerçekleştirilebilmektedir. Bu ilk olarak Rydberg ve Johanson (21) tarafından DNA sarmal kırıklarının ölçülmesi amacıyla kurulmuştur. Daha sonra Östling ve Johanson (22) tarafından geliştirilen teknikle yalnızca DNA çift zincir kırıkları tayin edilmiştir. Singh ve ark. (23) tarafından protokolde birtakım değişiklikler yapılarak yöntem alkali lizing koşullarında uygulanmıştır. Alkali elektroforez uygulaması ile çift zincir kırıklarının yanı sıra tek zincir kırıklarının basit ve hassas bir şekilde belirlenmesi sağlanmıştır (24, 25). Bu protokol, bugün dünya genelinde en yaygın kullanılan genotoksikite protokolü haline gelmiştir.

Singh ve arkadaşlarının geliştirdikleri comet tekniğinde, hücreler agara gömüldükten sonra DNA çift sarmalının açılması ve hücrelerin lizis edilmesi için en az 1 saat süreyle alkali çözeltide bekletilmektedir (23). Böylece DNA'nın negatif yüklü kırık uçları elektroforez

sırasında pozitif yüklü uca yani anoda doğru göç ederler. Hasarsız DNA oldukça büyüktür ve bu akım ile kuyruk bırakmadan göç eder. Hasar nedeniyle parçalanan daha küçük kısımlar ise geride kalarak kuyruk oluştururlar bu kuyruğun kuyruklu yıldız benzemesi nedeniyle yönteme “komet” ismi verilmiştir. (26,27). DNA göçü hem DNA'nın büyüklüğüne hem de DNA'daki kırık sayısına bağlıdır. Kuyruk uzunluğu hasara bağlı olarak artar ancak elektroforez koşullarına bağlı olarak maksimuma ulaşır. Düşük hasar seviyelerinde DNA'da göçten çok yayılma görülürken, kırık sayısının artmasıyla DNA parçaları kuyruğa doğru göç etmeye başlar ve çok hasarlı hücrelerde (apoptotik) baş ve kuyruk tamamen ayrılmış olur (28-30).

### **2.5.Komet Yöntemi ile DNA Hasarının Değerlendirilmesi**

Komet yönteminde hasarsız hücrelerin (lenfosit) incelemesinde yuvarlak, kenarları daha az yoğun olmak üzere ortası parlak bir ışık görünümü (çekirdek) vardır. Bu hücrelerin görünümü nonmigration (NM) olarak değerlendirilir. Eğer DNA hasarı oluşmaya başlamışsa, normalde düzgün kenarlı olan görüntü DNA kırıklarının çekirdek dışına göçünün de başlaması nedeni ile düzensiz kenarlı bir görünüm alır (stretch ya da yeni adı ile low migration). Hasar arttıkça lenfositler kuyruklu yıldız (comet high migration) şeklini alırlar. Son aşama ise apoptozistir. Hasarın şiddetine göre merkezden kenara doğru uzama olur. Bu comet (kuyruk) uzunluğu hasar ile doğrudan ilişkilidir. Ayrıca kuyruktaki floresan yoğunluğu da hasarın derecesi ile paralellik gösterir (28,29) .

Komet yönteminde lamların değerlendirilmesi komet görüntü analiz sistemi (comet software) ile yapılabileceği gibi gözle değerlendirme gibi farklı yöntemlerden de yararlanılabilmektedir. Gözle değerlendirmede hücreler hasarlı ve hasarsız olarak ayrılırlar. Hasarlı hücreler ise hasar seviyelerine göre farklı kategorilere ayrılabilir. Bazı çalışmalarda hücreler; hasarsız, az hasarlı ve çok hasarlı olarak üç sınıfa ayrılabilirdiği gibi, bazıları ise hücreleri daha detaylı bir şekilde değerlendirerek 5 kategoriye ayırmışlardır (30, 31) . Gözle değerlendirme; 5 dakikada 1000

hücre sayılabilecek kadar hızlı olduğundan ve bilgisayar programı gerektirmediğinden ucuz ve kolay bir yöntemdir. Bu konuda yapılan değerlendirmeler, gözle değerlendirmenin software kullanımı kadar etkili ve kullanılabilir olduğunu göstermektedir (28-31).

### **3. GEREÇ VE YÖNTEM**

#### **Çalışma Grubu:**

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Endokrinoloji, Gastroenteroloji, Genel Cerrahi, Tıbbi Onkoloji, Göğüs Hastalıkları Bölümlerine başvuran, NET teşhisi konmuş herhangi bir tedavi almamış toplam 13 gönüllü hasta ve bu hastalarla benzer yaş ve cinsiyete sahip olan 7 gönüllü sağlıklı kişide çalışıldı. NET'lere nadir rastlandığı için projede belirttiğimiz sayıda tedavi almamış yeterli hasta sayısına ulaşılamadı.

#### **Kan örneklerinin alınması:**

Hasta ve sağlıklı kişilerin yazılı onayları alındıktan sonra, heparinli vacutainer tüplere 5 ml periferik kan örnekleri alındı. Daha sonra kan örneklerinin güneş ışığından korunması için

tüpler hemen alüminyum folyo ile sarıldı, kan alım ünitesinden çalışılmak üzere laboratuvara taşındı.

### **Periferel Kan Örneklerinden Lökosit İzolasyonu:**

Kan örnekleri 1:1 oranında soğuk PBS ile seyreltildi. Temiz bir epondorf içerisine 400 µL soğuk histopak kondu. Sonra kan örneğinin 400 µL'si, 400 µL histopak üzerine yavaşça yayıldı ve 1640 rpm'de 5 dakika santrifüj yapıldı. Santfifüj sonrası oluşan lökosit içeren beyaz tabaka temiz epondorf tüpüne alındı.

### **Lamların Hazırlanması**

% 0.65'lik hazırlanmış olan HMA beher içerisine konarak 300 °C'de hot plate üzerinde ısıtıldı. Sonra Rodajlı lamlar Bu beher içerisine hızlı bir şekilde batırılıp çıkarılarak lamlaragaroze jelle (HMA) kaplandı.

### **Hücrelerin HMA ile Kaplanmış Lama Yayılması:**

İzole edilen lökositlerin 100 µL'si üzerine 37 °C'deki PBS içine hazırlanmış % 0.65'lik LMA'dan 100 µL ilave edildi ve karıştırıldı. Sonra bu karışım HMA ile kaplanmış lamların üzerine yayıldı. Üzerine lamel kapatıldı ve agarın donması için 30' buzdolabında bekletildi.

Bu işlem sırasında her numuneden ikişer lam değerlendirileceği için her birey için iki lam hazırlandı.

### **Hücrelerin Liziz Edilmesi:**

Lökositler lam üzerinde agoroze jelle gömüldükten sonra, preparatlar yüksek yoğunlukta tuz ve deterjan taze hazırlanmış soğuk lizis solusyonunda 1 saat + 4°C'de inkübe edildi.

### **Elektroforez ve nötralizasyon:**

Lizis tamponundan çıkarılan lamlar elektroforez tamponu içeren şale içerisine yerleştirildi ve 30 dakika + 4°C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonrası preparatlar, elektroforez tankına yerleştirilerek 30 dakika 15 Voltta elektrikli ortamda yürütüldü. Elektroforez sonrası lamlar, nötralizasyon tamponu içeren şale içerisine yerleştirildi ve lamlar üç kez nötralizasyon



tamponu ile yıkandı. Sonra lamlar %50, %75 ve %100'lük soğuk etanol serilerinden geçirilerek fiske edildi.

### **Boyama:**

Lamlar etidyum-bromür ile boyandı, boyandıktan hemen sonra 30 dakika içerisinde görüntüleme yapıldı.

### **Görüntüleme**

Proje kapsamında alınan kamera ataçmanlı floresan mikroskopta x 20 büyütmede her bir numune için rastgele seçilen ortalama 10 farklı sahadan, 10 ayrı fotoğraf çekilerek hücrelerin DNA'ları analiz edildi. Her bir hasta için toplam 100 hücre fotoğraflandı.

### **İstatistiksel Analiz**

Verilerin istatistiksel değerlendirilmesi için graph-pad programı kullanıldı. Sonuçlar ortalama  $\pm$  standart sapma (mean  $\pm$  SD) olarak verildi.  $P < 0.05$  istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

#### 4. BULGULAR

Her bir hastadan ve sağlık kontrollerden iki perparat hazırlandı. Bu preparatlardan rastgele olarak toplam 100 hücrenin görüntüsü floresan mikroskop kullanılarak alındı (Şekil 1).

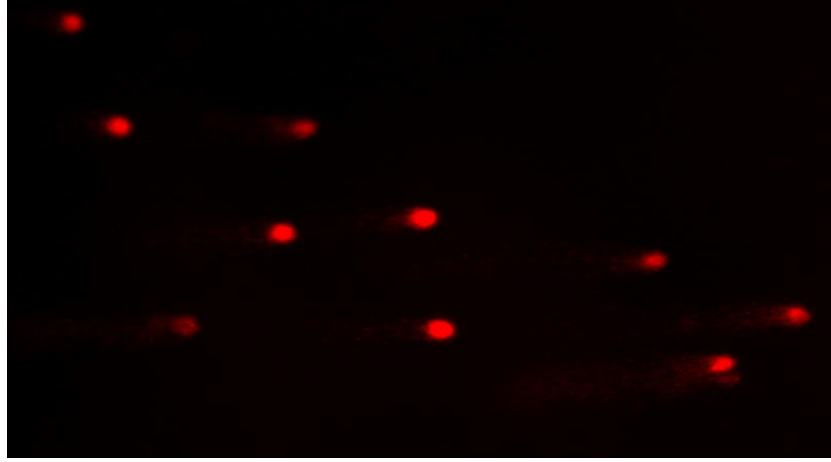
Floresan mikroskop altında alınan görüntülerden, Andrew R. Collins'e (27) göre 5 sınıfa ayrılarak analiz yapıldı. Her hastadan toplam 100 hücredeki DNA hasarı (comet) 0'dan 4'e kadar skorlandı (Şekil 2). Sonra aşağıda verilen formüll kullanılarak arbitrary unit değeri hesaplandı.

Arbitrary units; total DNA zincir kırıklarını ifade eden bir birim olarak kullanılmaktadır (27).

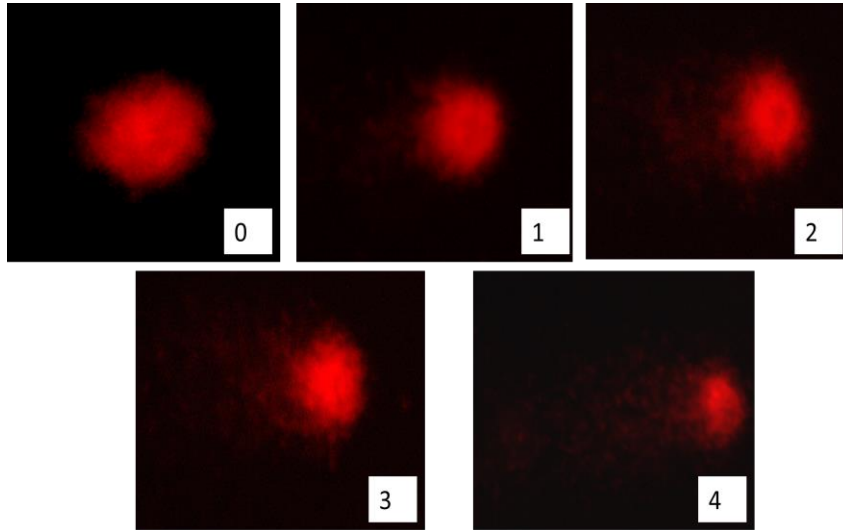
$$\text{Arbitrary Unit (AU)} = N_0 \times 0 + N_1 \times 1 + N_2 \times 2 + N_3 \times 3 + N_4 \times 4 / 100$$

N değeri her bir sınıfta sayılan nukleus sayısını gösterir (27).

Hem hastalarıda hem de sağlık kontrollerde Arbitrary Units değeri hesaplandı ve DNA hasarı arbitrary units olarak ifade edildi.



**Şekil 1.** Hazırlanan preparattan floresans mikroskop altında örnek bir görüntü.



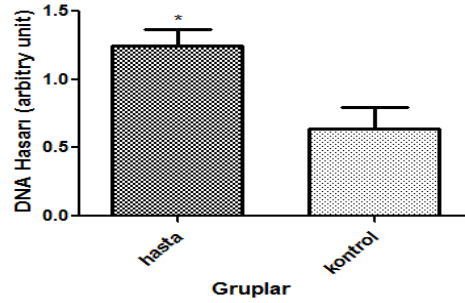
**Şekil 2:** Floresan mikroskop altında komet görüntüleri.0; hasarsız DNA, 1; az hasarlı DNA, 2;orta hasarlı DNA, 3; hasarlı DNA, 4; çok hasarlı DNA

Hem hastalarda hem de sağlıklı kontrollerde AU değerleri hesaplandıktan sonra istatistiksel analiz yapıldı. Analiz sonucuna göre hastalar DNA hasarının (zincir kırıkları sağlıklı bireylerdeki total DNA hasarına (zincir kırıkları) göre anlamlı

düzeyde yüksek olduğu bulundu ( $p=0,0107$ ;  $p < 0.05$ ) (Tablo 1, Şekil 3). Hasta ve kontrol gruplarının yaşları arasında fark bulunmadı ( $p > 0.05$ ).

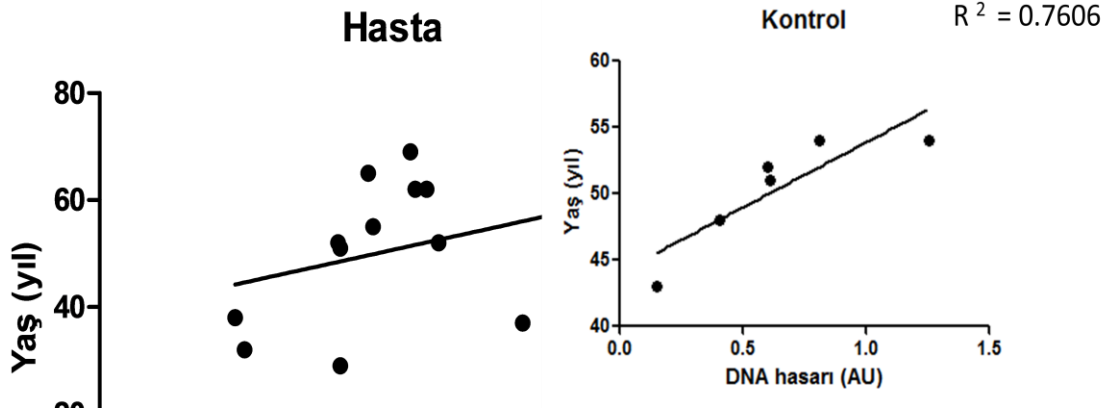
**Tablo 1.** Hasta ve kontrollerden comet assay yöntemi ile elde edilen total DNA hasarı.

Grup	DNA Hasarı (arbitrary Units) Ort $\pm$ SD	Yaş (yıl)
Hasta (n=13)	1.25 $\pm$ 0.12	50.62 $\pm$ 3.578
Kontrol (n=7)	0.64 $\pm$ 0.15	50.17 $\pm$ 1.869



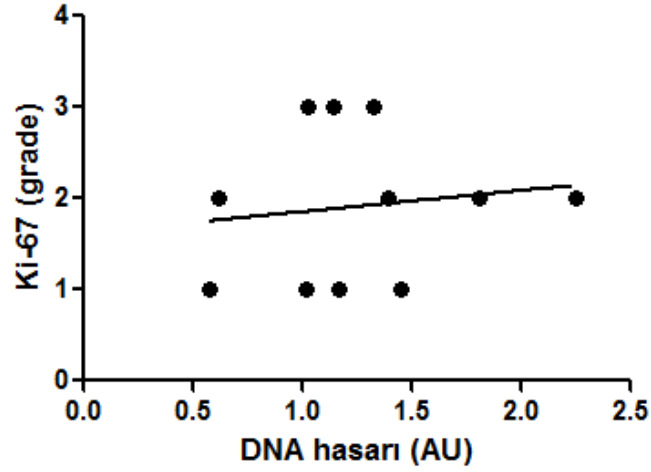
**Şekil 3.** Hasta grubunda DNA hasarı (arbitrary units) kontrol grubuna göre istatistiksel açıdan önemli oranda yüksek bulundu.

DNA hasarı (DNA zincir kırıkları) ile yaş arasında lineer regresyon analizi yapıldığında, hastaların yaşları ve DNA hasarı arasında ilişki bulunamazken, kontrol grubunda yaşa bağlı olarak DNA hasarının lineer olarak arttığı bulundu ( $p=0,0235$ ;  $p < 0.05$ ,  $r^2 = 0,7606$ ) (Şekil 4).



Şekil 4. Hasta ve kontrol grublarında DNA hasarı ve yaş arasındaki ilişki.

Hasta grubunda patoloji laboratuvarında yapılan ki-67 boyaması sonucu elde edilen grade değerleri ile DNA hasarı (arbitrary units) arasında bir ilişki bulunamadı (Şekil 5).



Şekil 5. Hastaların DNA hasarı ile Ki-67 değerleri arasında fark bulunamadı.

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

DNA'da oluşan hasarların tamir edilememesi veya yanlış tamir edilmesi genomda kararsızlığa yol açar. Genetik kararsızlık kanserin en belirgin özelliğidir. Mutasyonlar genomun bütünlüğünü sağlayan genlerde veya tümör gelişimi süresince somatik hücrelerde meydana gelebilir. Oluşan hasar DNA onarım sistemleri tarafından onarılmakla birlikte, hasarın çok fazla olduğu veya onarım sistemlerinin yetersiz kaldığı durumlarda DNA üzerinde oluşan hasar mutasyona ve sonuç olarak genomik kararsızlığa, bu da hücre ölümüne kadar varan etkilere yol

açar (1, 2).

DNA hasarının yaşlanma, kanser, kardiyovasküler hastalıklar, immun sistem hastalıkları, dejeneratif hastalıklar gibi doku fonksiyonlarının bozulması ile ortaya çıkan hastalıkların etyolojisinde önemli rol oynadığı ileri sürülmüştür (13, 14). Hatta NET'lerin patogenezinde de

nokta mutasyonu, delesyon, metilasyon, kromozom kaybı, missense gibi mutasyonların etkili faktörler olabileceği rapor edilmiştir (15).

DNA'da ekzojen veya endojen faktörlerin etkisiyle meydana gelen tüm değişiklikler "DNA hasarı" olarak adlandırılır. Endojen kaynaklı serbest radikaller ve bunların reaksiyon ürünleri DNA'da önemli baz oksidasyonlarına, tek ve çift zincir kırıklarına ve delesyonlar gibi çeşitli mutasyonlara sebep olur. Bu olaylar, proto-onkogen aktivasyonu, tümör-süpressör gen inaktivasyonu ile sonuçlanabilir (16,17). Komet tekniği (single-cell gel electrophoresis) bu amaç için en sık kullanılan yöntemler arasındadır (4). Bu teknik Çift zincir kırıklarının yanı sıra tek zincir kırıklarının hassas bir şekilde belirlenmesinde kullanılır (4,5).

Genetik değişiklikler ile kanser arasında bir ilişkinin varlığı birçok çalışmayla desteklenmiş olup, artık bugün pek çok kanser tipi ile genom kararsızlığı arasında bağlantı olduğu bilinmektedir (1, 2). Bu genomik kararsızlık ile ilişkilendirilmiş belirteçlerin, hastalık/kanserle ilişkili değişikliklerin erken tanısında kullanılmasının yararlı olabileceği ileri sürülmektedir (3).

Bu çalışmadaki hedeflerimizden biri hastalarda olası DNA hasarı bulunması durumunda, hastalığın bir belirteci olan Ki-67 değeri ile DNA hasarı arasında bir ilişki olup olmadığını araştırmaktır. Böylece NET2lerin tanısının konmasında DNA hasarının da bir belirteç olarak kullanılabilmesi önerilecektir. Ancak araştırmamızda Ki-67 ile DNA hasarı arasında herhangi bir ilişki bulunamadı.

Çalışmamızda kontrol grubunda yaşa bağlı olarak DNA hasarında lineer bir artış bulunurken, hastalarda DNA hasarı ile yaş arasında bir korelasyon bulunamamıştır. Bu verilerimiz NET'lerde yüksek bulunan DNA hasarı hastalığın bir sonucu mu? yoksa yüksek olan DNA hasarı mı hastalığa yol açan etkenlerden biri midir? Sorusu yanıtız kalmaktadır.

Yapılan literatür incelemesine göre NET'lerde genom hasarı ve DNA onarım kapasitesi ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanılamamıştır. Elde ettiğimiz bu verilerin NET'lerin patogeneze katkıda bulunacağını düşünmekteyiz. Ancak, çalışmamız literatürde bir ilk olduğu için çalışmamızı destekleyecek ilave çalışmaların yapılması gerektiğini önermekteyiz. NET'ler nadir görülen, lokasyonları ve salgıladıkları hormonlar nedeniyle çok çeşitliklinik durumlar ortaya çıkaran, çoğunlukla benign seyirli olmakla birlikte agresif seyirli de olabilecek tümörlerdir (10). Çalışma sonucumuza göre NET'lerde sağlıklı kontrollere göre DNA hasarında belirgin bir artış olduğu bulundu. Bu sonuçlarımız, benign tümörlerin ilerleyen dönemlerde agresif özellik gösterme riskini artırabileceğine işaret etmektedir.



## 6. KAYNAKLAR

1. Saunders WS, Shuster M, Huang X, Gharaibeh B, Enyenihi AH, Petersen I, Gollin SM. Chromosomal instability and cytoskeletal defects in oral cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97 :303–308, 2000.
2. Gollin S.. Mechanisms leading to chromosomal instability, *Semin Cancer Biol.*15: 33–42, 2005.
3. Kyrtopoulos SA. Biomarkers in environmental carcinogenesis research: striving for a new momentum, *Toxicol Lett.* 162: 3–15, 2006.

4. Gajski G, Garaj-Vrhovac V, Orescanin V. Cytogenetic status and oxidative DNA-damage induced by atorvastatin in human peripheral blood lymphocytes: standard and Fpg-modified comet assay. *Toxicol Appl Pharmacol.* 231:85-93, 2008.
5. Kushwaha S, Vikram A, Trivedi PP, Alkaline GB. Endo III and FPG modified comet assay as biomarkers for the detection of oxidative DNA damage in rats with experimentally induced diabetes. *Mutation Research* 726: 242– 250, 2011
6. Fikrová P, Stětina R, Hronek M, Hyšpler R, Tichá A, Zadák Z. *Wien Klin Wochenschr.* Application of the comet assay method in clinical studies. 123: 693-9. 2011.
7. Öberg K. The Genetics of Neuroendocrine Tumors *Seminars in Oncology*, 40: pp 37-44, 2013.
8. Lindholm DP, Öberg K. Biomarkers and Molecular Imaging in Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Tumors *Horm Metab Res.* 43: 832–837, 2011.
9. Boris G., Naraev A, Jonathan R., Strosberg B, Thorvardur R., Halfdanarson A. *Oncology Current Status and Perspectives of Targeted Therapy in Well-Differentiated Neuroendocrine Tumors.* 83:117–127, 2012.
10. Modlin IM, Gustafsson BI, Pavel M, Svejda B, Lawrence B, Kidd M. A nomogram to assess small-intestinal neuroendocrine tumor ('carcinoid') survival. *Neuroendocrinology.* 92: 143-57, 2010.
11. Pavel M, Kidd M, Modlin I. Systemic Therapeutic Options for Carcinoid *Semin Oncol.* 40: 84-99, 2013.
12. Emily K. Bergsland. The Evolving Landscape of Neuroendocrine Tumors. *Semin Oncol* 40:4-22, 2013.
13. Dizdaroglu M. Oxidatively induced DNA damage: mechanisms, repair and disease. *Cancer Lett.* 327: 26-47, 2012.

14. Decordier I, Loock KV, Kirsch-Volders M. Phenotyping for DNA repair capacity. *Mutat Res.* 705:107-29, 2010.
15. Introduction: Recent Advances in the Genetics, Diagnosis, and Treatment of Neuroendocrine Tumors. *Seminars in Oncology.* 40: 1-3, 2013.
16. Evans MD, Dizdaroglu M, Cooke MS. Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. *Mutat Res.* 567:1-61, 2004.
17. Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J.* 10: 1195-214, 2003.
18. Mahmoodi M, Soleyman-Jahi S, Zendejdel K, Mozdarani H, Azimi C, Farzanfar F, Safari Z, Mohagheghi MA, Khaleghian M, Divsalar K, Asgari E, Rezaei N. Chromosomal aberrations, sister chromatid exchanges, and micronuclei in lymphocytes of oncology department personnel handling anti-neoplastic drugs. *Drug Chem Toxicol.* 27: 1-6, 2016.
19. Hamurcu Z, Cakir I, Donmez-Altuntas H, Bitgen N, Karaca Z, Elbuken G, Bayram F. Micronucleus evaluation in mitogen-stimulated lymphocytes of patients with acromegaly. *Metabolism*, 60:1620-6. doi: 10.1016/j.metabol.2011.03.013, 2011
20. Rydberg B, Johanson J. Estimation of DNA strand breaks in single mammalian cells. In: *DNA repair mechanisms*, Ed: P.C. Hanawalt, E.C. Friedberg, C.F. Fox, Academic Press, New York, p: 465-468, 1978.
21. Ostling O, Johanson KJ. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biophys Res. Commun.* 123: 291-298, 1984.
22. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 175: 184-191, 1988.
23. Hoffmann H, Hogel J, Speit, G. The effect of smoking on DNA effects in the comet assay: A Meta-Analysis. *Mutagenesis*, 20: 455-466, 2005.

24. Valverde, M., Rojas, E. Environmental And Occupational Biomonitoring Using The Comet Assay. *Mutation Research* 681: 93–109, 2001.
25. McArt DG, McKerr G, Howard CV, Saetzler K, Wasson GR. Modelling the comet assay. *Biochem Soc Trans.* 37: 914-7, 2009.
26. Fairbairn, DW, Olive, P.L., O’neill, K.L. The Comet Assay: A Comprehensive Review, *Mutat. Res.* 339, 37-59, 1995.
27. Collins AR. The comet assay for DNA damage and repair. *Mol Biotech*, 26:249-61, 2004.
28. Collins AR, Duthie SJ, Dobson VL. Direct enzymic detection of endogenous oxidative base damage in human lymphocyte DNA. *Carcinogenesis*. 14: 1733-5, 1993.
29. Balasubramanyam M, Adaikalakoteswari A, Sameermahmood Z, Mohan V. Biomarkers of oxidative stress: methods and measures of oxidative DNA damage (COMET assay) and telomere shortening. *Methods Mol Biol.* 610: 245-61, 2010.
30. Alessandra de Santana Braga Barbosa Ribeiro, Cláudio Carlos da Silva, Flávia de Castro Pereira , Aliny Pereira de Lima, Cesar Augusto Sam Tiago Vilanova-Costa , Simone Santos Aguiar , Luiz Alfredo Pavanin , Aparecido Divino da Cruz, Elisângela de Paula Silveira-Lacerda. Mutagenic and Genotoxic Effects of cis-(Dichloro) tetraammineruthenium(III) Chloride on Human Peripheral Blood Lymphocytes. *Biol Trace Elem Res* 130:249–261, 2009.
31. Annovazzi L, Caldera V, Mellai M, Riganti C, Battaglia L, Chirio D, Melcarne A, Schiffer D. The DNA damage/repair cascade in glioblastoma cell lines after chemotherapeutic agent treatment. *Int J Oncol.* 46: 2299-308, 2015.