

Asbest ve Erionite Bağlı Mezotelyomalı Hastaların Parafin Bloklarında p53 Tümör Supressör ve Ras Onkogen Mutasyonlarının Araştırılması

Investigation of p53 Tumour Suppressor and Ras Oncogene Mutations in Paraffin Blocks from Patients with Mesothelioma Related to Asbestos and Erionite

Hamiyet Dönmez Altuntaş

Prof., Ph.D.
Department of Medical Biology
Erciyes University Medical faculty
donmez@erciyes.edu.tr

Figen Öztürk

Prof., M.D.
Department of Pathology
Erciyes University Medical faculty
ozfigen@erciyes.edu.tr

Seçil İlhan Yılmaz

M.Sci.
Department of Medical Biology
Erciyes University Medical faculty
siyilmaz@erciyes.edu.tr

Recep Eröz

M.Sci.
Department of Medical Biology
Erciyes University Medical faculty

Özet

Amaç: Türkiye asbest ve erionit açısından oldukça zengin bölgelere sahiptir ve bu bölgelerde yaşayanlar çocukluklarından beri çevresel olarak asbest ve erionite maruz kalmaktadırlar. Bu çalışmanın amacı, asbest ve erionite maruz kalma ile ilişkili mezotelyomalı hastalardaki p53 tümör supressör ve ras onkogeni mutasyonlarını araştırmaktır.

Gereç ve Yöntemler: Asbest ve erionite maruz kalma ile ilgili olarak mezotelyoma ve malign mezotelyoma ön tanılı 41 hastaya ait 48 parafin blok örneğinde p53 tümör supressör geni ile K-ras ve N-ras proto-onkogenindeki mutasyonlarını incelemek üzere Multipleks polimeraz zincir reaksiyonu (MPZR) testi uygulanmıştır.

Bulgular: Mezotelyomalı ve malign mezotelyomalı parafin blok örneklerinin hiçbirinde, p53 tümör supressör genine ait ekzon 2-4, ekzon 5-6, ekzon 7-9, ve ekzon 10-11 için mutasyon belirlenmemiştir. Ayrıca, analizlenen mezotelyomalı ve malign mezotelyomalı parafin blok örneklerinde ekzon 2 (K-ras), ekzon 1 (N-ras) için mutasyon bulunamazken, mezotelyomalı iki hastanın parafin blok örneklerinde ekzon 1 (K-ras) için mutasyon (% 4.88) bulunmuştur.

Sonuç: Bu bulgular, insanlarda asbest ve erionit ile mezotelyomanın indüklenmesinde, p53 tümör supressör geni ve ras proto-onkogeni mutasyonlarının kritik bir rol oynayamayacağına işaret etmektedir.

Anahtar Kelimeler: **Asbest; Erionit; Gen, p53; Gen, ras; Mezotelyoma.**

Abstract

Purpose: Turkey have the rich regions related to asbestos and erionite, and their inhabitants have been environmentally exposed to asbestos and erionite since childhood. The aim of this study was to investigate the p53 tumour suppressor gene and ras oncogene mutations in patients with mesothelioma relation to asbestos and erionite exposure.

Material and Methods: The Multiplex polymerase chain reaction (MPZR) assay was employed to examine mutations in the p53 tumour suppressor gene and K-ras & N-ras proto-oncogene in 48 paraffin block samples from 41 patients with mesothelioma and malign mesothelioma relation to asbestos and erionite exposure.

Results: No mutations in exon 2-4, exon 5-6, exon 7-9, and exon 10-11 of the p53 tumour suppressor gene were determined in any of the paraffin block samples with mesothelioma and malign mesothelioma. Although no mutations were found in the exon 2 (K-ras) and exon 1 (N-ras) in the paraffin block samples analysed, mutations were found in the exon 1 (K-ras) in paraffin block samples of two patients with mesothelioma (4.88 %).

Conclusion: These results indicate the p53 tumour suppressor gene and ras proto-oncogene mutations may not play a critical role in the induction of mesothelioma by asbestos and erionite in humans.

Key Words: **Asbestos; Erionite; Mesothelioma; Genes, p53; Genes, ras.**

This research was supported by the Scientific Research Projects Committee of Erciyes University (EUBAP-TA-03-34)

Submitted : June 18, 2008
Revised : July 20, 2008
Accepted : September 05, 2008

Corresponding Author:

Prof. Dr. Hamiyet Dönmez-Altuntaş
Department of Medical Biology,
Faculty of Medicine, University of Erciyes
Kayseri, Turkey

Telephone: +90- 352 4374937 / 23327
E- mail: donmez@erciyes.edu.tr

Giriş

Asbest ve fibröz zeolit (erionit) akciğerlerde hastalık yapan en önemli minerallerdendir. Asbest sadece solunum yoluyla vücuda girdiğinde hastalık yapabilmektedir. Asbestin solunması mesleki olabileceği gibi çevresel yolla da olabilmektedir. Asbest maruziyeti sonucunda asbeste bağlı patolojiler oluşabilmekte ve sebep olduğu hastalıklar benign veya malign olabilmektedir (1, 2).

Türkiye asbest mineralleri açısından oldukça zengin bölgelere sahiptir. Bu bölgeler arasında Antakya, Sivas, Erzincan, Bursa, Eskişehir, Yozgat, büyük mineral depoları olarak bilinmektedir. Bunlara ilaveten İzmir, Çanakkale, Konya, Kayseri, Çorum, Çankırı, Adana ve Diyarbakır'ın kırsal yöreleri çevresel kökenli asbestle ilgili daha küçük mineral depoları olarak bilinir (3). Türkiye'de yaklaşık 113 asbest deposu (yığıntısı) bilinmektedir. Bunların %65'i krizotil, %39'u tremolit ve %1'i krokidolit içermektedir (2). Asbest endüstriyel alanda sadece küçük bir öneme sahip iken evde ve tarımsal kullanımda daha önemli bir rol oynamaktadır. Asbest içerikli toprağın duvarlara kireç yerine badana gibi sürülmesi, çatı toprağı olarak damlara serilmesi, bebeklerde pudra olarak kullanılması ve dışlerin temizlenmesinde kullanılması sonucunda insanlar çocukluklarından itibaren asbeste maruz kalmaktadırlar (4). Asbeste bağlı hastalıklar tozun solunmasından 10-40 yıl sonra ortaya çıkabilmektedir (5, 6). Asbest maruziyeti sonucunda kanser riski özellikle de akciğer kanseri ve mezotelyoma artmaktadır (7). Malign Plevral Mezotelyoma (MPM) hastalarının büyük kısmında asbest maruziyeti önemlidir ve uzun süre asbestin yüksek dozlarına maruz kalan bireylerin % 2-10'unda bu maligniteye rastlanmaktadır (8). Bazen kısa bir zaman periyodunda asbestin küçük bir dozuna maruz kalma ile de mezotelyoma ortaya çıkabilmektedir (9, 10).

Türkiye'nin Doğu ve Güneydoğu Anadolu bölgelerinde yaşayan insanlarda çevresel asbest maruziyeti nedeni ile yüksek bir MPM vakasına sahip oldukları rapor edilmiştir (4, 11- 13).

Bir kristalize aluminosilikat olan zeolit'lerin doğal 30 türü içinde sadece erionit ve mordenit lifsel (fibröz) yapıdadır. Erionit'in epidemiyolojik, *in vivo* ve *in vitro* olarak karsinojenik ve fibrojenik olduğu gösterilmiştir. Erionit'in şimdiye kadar bilinen en etkili kanser yapıcı minerallerden biri olduğu Dünya Sağlık Teşkilatına bağlı, Uluslararası Kanser Araştırma Kurumu (International Agency Research

on Cancer) tarafından kabul edilmiştir. Özellikle, Kapadokya bölgesindeki Karain, Tuzköy ve Sarıhıdır köylerinde çevresel olarak erionite maruziyet sonucunda yüksek oranda malign plevral ve peritoneal mezotelyoma hastalarının olduğu gösterilmiştir (2).

İnsan tümörlerinde p53 gen (tümör supressör gen) mutasyonları önemli bir yer tutar. p53 mutasyonları, farklı karsinojenlere maruz kalmayla ilişkili olarak farklı kanser tiplerinde değişebilmektedir. İnsanlarda, 393 amino asitlik p53 proteini genomik hasara karşı korunmada özel bir role sahiptir. Transkripsiyon faktörü olarak p53, tamir için gerekli zamanı kazanmak üzere hücre döngüsünü durduran ya da hasarlı hücreyi ortadan kaldırmak üzere apoptozu tetikleyen genlerin ifadenmesini artırır. Ayrıca, p53 proteini DNA tamir proteinlerine bağlanır ve DNA tamirinin farklı formlarında (homolog rekombinasyon tamiri, nükleotid eksizyon tamiri, baz eksizyon tamirini içine alan) doğrudan bir role de sahiptir. p53 geni, kromozom 17p13.1 lokalizasyonludur ve mutasyonlar açısından diğer tümör supressör genlerden farklılık gösterir. Bu gendeki sık mutasyon bölgeleri, DNA'yla bağlanan amino asitleri şifreleyen kodonlarda oluşur gibi görünmektedir (14).

Ras genlerindeki (onkogen) mutasyonlar, insan kanserlerindeki onkogenlerin en yaygın anormalliklerindedir ve nokta mutasyonu ile aktivasyonun en iyi örneğini oluştururlar. Çevresel ve mesleki olarak asbeste maruz kalma, akciğer karsinomalı ve malign mezotelyomalı hastalardaki ras onkogen mutasyonları ile ilişkilendirilmiştir (15-18).

Çeşitli tümörlerde p53 gen mutasyonları sıklıkla görülmesine rağmen, çevresel olarak asbeste ya da erionite bağlı mezotelyomaların p53 gen mutasyonları ile gelişip gelişmediği ve ras geni mutasyonlarının da bu tür mezotelyomalarla ilgili olup olmadığı tam olarak açıklığa kavuşmuş değildir (16, 17, 19-22). Bu retrospektif çalışmada çevresel olarak asbest ve erionit gibi mineral fibrillere maruz kalmayla ilişkili olarak gelişmiş mezotelyomalı ve malign mezotelyomalı hastalara ait parafin blok örneklerinde p53 ve ras gen mutasyonları araştırılmıştır. Bu çalışma sonucu ile elde edilecek bulguların, p53 ve ras genlerindeki genetik değişimlerinin asbest ve erionite bağlı mezotelyomaların bir özelliği olup olmadığına belirlenmesine katkıda bulunacağını düşünümekteyiz.

Gereç ve Yöntem

Sunulan çalışma, 2000-2006 yılları arasında Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesine başvuran ve Patoloji Anabilim Dalı'ndan elde edilen mezotelyoma ve malign mezotelyoma ön tanılı hastalara ait 48 parafin blok örneği üzerinde yapılmıştır. Bu araştırma, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulunun onayı ile gerçekleştirilmiştir.

Parafin Bloklarından DNA İzolasyonu. Her bir hastaya ait parafin bloklarından ince kesitler alınmış ve sonra bu kesitler ksilol ve etil alkol ile yıkanarak deparafinize edilmiştir. Yıkama işleminden sonra kesitlerin üzerine 50 mM Tris (pH:8.0), 1 mM EDTA, % 0.5 Tween 20 ve 500 µg/ml proteinaz K içeren yaklaşık olarak 500 µl sindirim tamponu eklenerek 37°C de 2-3 gün arası alınan kesitler eriyinceye kadar inkübe edilmiştir (23, 24). İnkübasyon sonunda, örnekler 95 °C'de 10 dakika tutularak Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) işlemine başlanılmıştır.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu. PZR, DNA içerisinde yer alan, dizisi bilinen iki segment arasındaki özgün bir bölgeyi enzimatik olarak çoğaltmak için uygulanan tepkimelere verilen ortak bir isimdir. Çalışmamızda, insan p53 ve ras onkogenleri için Multiplex PZR (MPZR) kitleri (Maxim Biotch, Inc.: MBI; Katalog No: MP-70123 ve MP-70125) kullanılmıştır.

p53 MPZR kiti, genomik DNA'nın p53 geninin ekzon 2-4, ekzon 5-6, ekzon 7-9, ve ekzon 10-11'i çoğaltmak üzere geliştirilmiştir. Kit içerisindeki PZR primerleri ve pozitif kontrol ile PZR işlemi sonunda, 1143 bç (ekzon 10-11), 777 bç (ekzon 7-9), 535 bç (ekzon 2-4) ve 392 bç (ekzon 5-6) PZR ürünleri oluşmaktadır. PZR ürünlerinin jel elektroforezi ile insersiyon ve delesyonlar belirlenebilir.

Ras geninin multipleks PZR denemesi, genomik DNA'nın insan K-ras onkogeninin 12., 13. ve 61. kodonlarını ve insan N-ras onkogeninin 61. kodonunu çoğaltmak üzere geliştirilmiştir. Kit içerisindeki PZR primerleri ve pozitif kontrol ile PZR işlemi sonunda, 162 bç (ekzon 1, K-ras), 133 bç (ekzon 2, K-ras) ve 103 bç (ekzon 2, N-ras) PCR ürünleri oluşmaktadır. PZR ürünlerinin jel elektroforezi ile ras onkogenindeki mutasyonlar belirlenebilir. Çalışmada p53 ve ras genleri için uygulanan PZR protokolleri Tablo I ve II'de verilmiştir.

Örneklerin her biri için ayrı ayrı olmak üzere, p53 ile K-ras ve N-ras MPCR kitleri kullanılarak Thermal Cycler'da Multiplex PZR yapılmıştır. Sonra PZR'da çoğaltılan DNA örneklerinden 8.5 µl alınarak 2.5 µl bromfenol blue ile,

Tablo I. p53 ve ras genleri için uygulanan PZR protokolü

Stok	50 µl için kullanılan
2X MPCR Tampon Karışımı	25.0 µl
10X MPCR Primer	5.0 µl
Taq DNA Polimeraz (5U/ µl)	0.5 µl
Örnek DNA yada 10X Kit Kontrol DNA	5.0 µl
H ₂ O	14.5 µl

Tablo II. PZR cihazındaki (Thermal Cycler) kullanılan Protokoller

Isı	Zaman	Döngü
P53 onkogeni için:		
96 °C	1 dakika	} 2X
59 °C	4 dakika	
94 °C	1 dakika	} 50X
59 °C	2 dakika	
70 °C	10 dakika	1X
25 °C	Bekleme	
Ras onkogeni için:		
96 °C	1 dakika	} 2X
65 °C	4 dakika	
94 °C	1 dakika	} 50X
65 °C	2 dakika	
70 °C	10 dakika	1X
25 °C	Bekleme	

0.5 µg/ml etidyum bromür içeren % 2'lik agaroz jel elektroforezinde yürütülmüş ve jeller U.V. transillüminatöründe görüntülenmiştir.

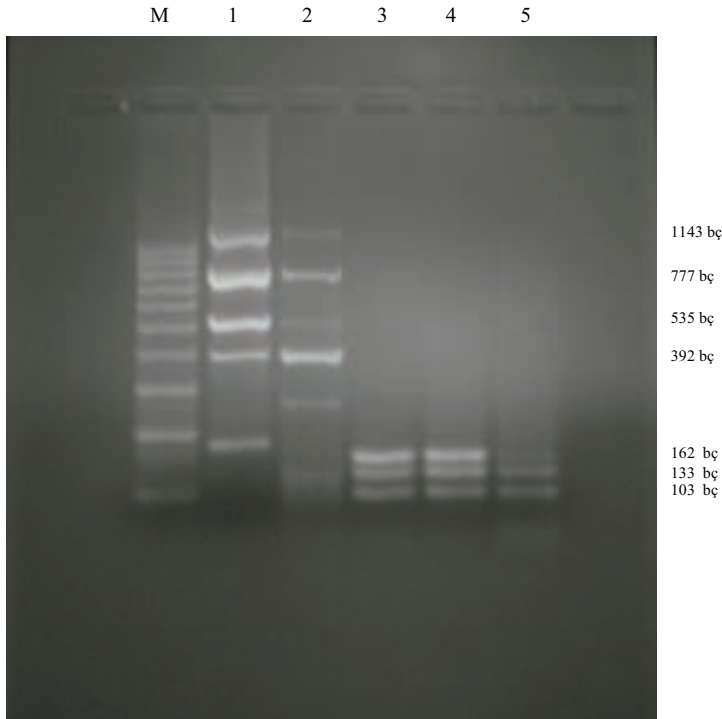
Bulgular

2000-2006 yılları arasında Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı arşiv kayıtlarında mezotelyoma ve malign mezotelyoma ön tanılı 118 hasta kaydı bulunmuştur. Ancak, bu kayıtlardan plevra ya da periton sıvısından hazırlanmış hazır preparatları olduğu için 19 hasta ve Patoloji Anabilim Dalı arşivinde blok ya da kasetleri bulunamadığı için 51 hasta olmak üzere toplam 70 hasta çalışılmamıştır. Dolayısıyla Patoloji Anabilim Dalı arşivinde bulunabilen 48 hastaya ait parafin blok örnekleri üzerinde çalışma gerçekleştirilmiştir. Bu parafin blok örneklerinden yedisinden iki kere örnek alındığından gerçek hasta sayısı 41'dir. Fakat bu hastalara ait iki ayrı kayıtlı parafin blok örnekleri üzerinde ayrı deneysel moleküler çalışmalar yapılmış ve aynı sonuçlar elde edilmiştir.

Tablo III. Hasta özellikleri ve p53 tümör supressör geni ve Ras proto-onkogeni Multipleks PZR (MPZR) testi sonuçları.

Parafin Blok	Ya (yıl)	Cinsiyet	Sigara	P53	Ras	Tanı	Metastaz	Alındığı Yer	Asbest / Zeolit Temas
1	45	K	-	-	-	Mezotelyoma, Akciğer Karsinomu	+	A	Ç
2	65	K	-	-	-	Asbestosis	?	ÜM	Ç
3		K		-	-	Mezotelyoma		P	
4	68	K	-	-	-	Peritoneal Karsinomatoz, Mezotelyoma	?	O	?
5	60	K	-	-	-	Over Karsinomu	+	O + OV	?
6	67	K		-	-	Malign Epitelyal Mezotelyoma			
7	62	E	+	-	-	Akciğer Karsinomu Sarkomatöz tip Mezotelyoma	+	A	?
8	40	E		-	-	Mezotelyoma		PR	
9		E		-	-	Mezotelyoma		A	
10	45	K	-	-	-	Mezotelyoma (reaktif lenf nodu)	+	P	Ç
11	75	K	-	-	-	Mezotelyoma	?	P	Ç
12	70	E	+	-	-	Malign Mezotelyoma	?	P	?
13				-	-	Malign Mezotelyoma		P	
14	65	K	-	-	-	Malign Mezotelyoma	?	P	Ç
15	40	K	-	-	-	Malign Mezotelyoma	?	P	?
16	74	K	-	-	-	Mezotelyoma	?	PP	Ç
17				-	-	Malign Mezotelyoma		P	
18	50	K	-	-	-	Malign Mezotelyoma	?	PR	Ç
19	55	E	+	-	-	Sarkomatöz tip Mezotelyoma,	+	A	Ç
20	55	E	+	-	-	Sarkomatöz tip Mezotelyoma (Reaktif lenf nodları)	+	A	Ç
21	64	K	-	-	-	Malign Mezotelyoma	?	BÖD	Ç
22	36	E	-	-	-	Akciğer Karsinomu, Malign Mezotelyoma	+	P	?
23	64	K	-	-	-	Malign Mezotelyoma	?	KC	Ç
24	57	E	+	-	-	Malign Mezotelyoma	-	P	Ç
25	57	E	+	-	-	Malign Mezotelyoma	-	P	Ç
26				-	-	Malign Epiteloid tip Mezotelyoma		P	
27	72	E	+	-	-	Sarkomatöz tip Mezotelyoma	?	TD	M
28				-	-	Mezotelyoma		TD	
29	65	K	-	-	-	Malign Mezotelyoma	+	P	Ç
30				-	-	Malign Epitelyal tip Mezotelyoma		P	
31				-	-	Malign Epitelyal tip Mezotelyoma		P	
32				-	-	Malign Epiteloid tip Mezotelyoma		P	
33				-	+	Epitelyal tip Mezotelyoma		TD	
34				-	-	Malign Epitelyal tip Mezotelyoma		P + TD	
35	69	K	-	-	+	Sarkomatöz tip Mezotelyoma	+	P	Ç
36	50	K	-	-	-	Malign Epitelyal tip Mezotelyoma	?	P	Ç
37	45	K	-	-	-	Malign Mezotelyoma	?	TD	Ç
38	45	K	-	-	-	Malign Mezotelyoma	?	TD	Ç
39	68	K	-	-	-	Malign Epiteloid tip Mezotelyoma	?	P?	?
40	69	K	-	-	+	Sarkomatöz tip Mezotelyoma	+	P	Ç
41				-	-	Mezotelyoma		PR	
42				-	-	Mezotelyoma Metastazı	+	TD	
43				-	-	Epitelyal tip Mezotelyoma		PP, D, TD	
44				-	-	Mezotelyoma		P	
45	64	E	+	-	-	Mezotelyoma	?	P	Ç
46				-	-	Mezotelyoma		P	
47				-	-	Mezotelyoma		P	
48	41	E	+	-	-	Mezotelyoma	?	KD + O	M

A: Akciğer; ÜM: Üst Mediasten; P: Plevra; PP: Paryetal Plevra; PR: Periton; O: Omentum; OV: Over; BÖD: Batın ön duvarı; KC: Kist cidarı; TD: Toraks duvarı; KD: Karın duvarı; D: Diafragma; Ç: Çevresel; M: Mesleksel. 19 ile 20, 21 ile 23, 24 ile 25, 30 ile 31, 35 ile 40, 37 ile 38 ve 46 ile 47 nolu parafin bloklar aynı hastalara aittir.



Şekil 1. p53 tümör supressör geni ve K-ras proto-onkogeni için pozitif kontrollere ve 3 hastaya ait Multipleks PZR (MPCR) testi sonuçlarının agaroz jel görüntüsü. **M:** DNA boyut Markır (1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, ve 100 baz çifti (bç)); **1:** p53 tümör supressör geni için pozitif kontrol (1143, 777, 535, ve 392 bç); **2:** 48 nolu hastaya ait p53 tümör supressör geni (mutasyon negatif); **3:** ras proto-onkogeni için pozitif kontrol (162, 133 ve 103 bç); **4:** 20 nolu hastaya ait ras proto-onkogeni (mutasyon negatif); **5:** 40 nolu hastaya ait K-ras proto-onkogeni mutasyonu (ekzon 1, 162 bç mutasyonu pozitif).

Bu çalışmada, asbest ve erionite maruz kalma ile ilgili mezotelyoma ve malign mezotelyomalı 41 hastaya ait 48 parafin blok örneğinde p53 tümör supressör geni ve ras proto-onkogenindeki mutasyonları incelemek için, Multipleks PZR testi uygulanmıştır. Mezotelyoma ve malign mezotelyoma ön tanılı parafin blok örneklerinin hiçbirinde, p53 tümör supressör genine ait ekzon 2-4, ekzon 5-6, ekzon 7-9, ve ekzon 10-11 ve ekzon 2 (K-ras), ekzon 1 (N-ras) için mutasyon belirlenemezken, epitelyal tip mezotelyoma ve sarkomatöz tip mezotelyoma ön tanılı iki hastanın (Tablo III'de 33 ve 35 ya da 40 nolu) parafin blok örneklerinde ekzon 1 (K-ras) için mutasyon (% 4.88) bulunmuştur (Şekil 1). Hasta özellikleri ve p53 tümör supressör geni ve ras proto-onkogeni Multipleks PZR testi sonuçları Tablo III'de gösterilmiştir. Ayrıca, 48 parafin blok örneklerine ait hastaların dosyaları arşivden istenmiş, ve ancak 29 örneğe ait hasta dosyalarına ulaşılabilmektedir. Dosyalar incelenerek ilgili hasta bilgileri Tablo III'e eklenmiştir. Hastaların çoğunluğunun çevresel olarak asbest/erionite maruz kaldığı gözlenmiştir.

Tartışma

Asbest ve erionite mesleki nedenler ya da çevresel yollarla maruziyet sonucunda akciğer ve göğüs hastalıkları ortaya çıkmaktadır (1, 2). Malign mezotelyoma genel popülasyonda nadir bir hastalık olup, yaklaşık 1,0-2,2 olgu/milyon/yıl sıklığında iken, endüstrileşmiş toplumlarda sıklık 2-5 kat artmaktadır. Asbest maruziyetinden sonra en erken 3,5 yıl en geç 73 yıl sonra mezotelyoma ortaya çıkmaktadır (2, 6).

MPM vakası Türkiye'nin karşı karşıya kaldığı en büyük sağlık problemlerinden biridir. Türkiye'nin Doğu ve Güneydoğu Anadolu bölgelerinde yaşayan insanlarda çevresel asbest maruziyeti nedeni ile yüksek bir MPM vakasına sahip oldukları rapor edilmiştir. Bu bölgelerde daha çok tremolit türü mineralin maruziyeti söz konusudur. Asbest içeren madde hem bölgesel hem de herhangi bir yerde satmak amacıyla erkek popülasyon aracılığıyla dağlardan çıkarılır. Evlerin duvarlarına badana maddesi olarak sürülür. Uygulama genellikle toz haline getirilmiş materyali su içinde karıştıran kadınlar tarafından yapılır. Bu işlem her yıl tekrar edilir. Sonuç olarak, ev sakinleri tekrar tekrar erken bir yaştan itibaren asbeste maruz kalırlar (4, 11-13). Yine, özellikle Kapadokya bölgesindeki bazı köylerde, çevresel olarak erionite maruziyet sonucunda malign plevral ve peritoneal mezotelyomalı hastaların yüksek oranda olduğu gösterilmiştir (2).

Asbestin genotoksik etkisi ile ilgili olarak, asbeste mesleksel ve çevresel olarak maruz kalmış kişiler üzerinde yapılmış bazı sitogenetik çalışmalar vardır. Asbeste mesleksel olarak maruz kalmış işçilerin (25-27) ve çevresel olarak maruz kalmış kişilerin (28) kültüre edilmiş lenfositlerinde kardeş kromatid değişiminin (KKD: Sister chromatid exchange) arttığı gösterilmiştir. Atalay ve arkadaşları (29) malign mezotelyomalı hastaların plevral efüzyon hücrelerinde KKD frekansının kontrollerden anlamlı derecede yüksek olduğunu bulmuşlardır. Genotoksisite testi olarak mikronukleus (MN) testinin kullanıldığı başka bir çalışmada ise, krizotil asbeste çevresel olarak maruz kalmış kişilerde kalsifiye plevral plaklar görülmesine rağmen, bu kişilerin kültüre edilmiş lenfositlerindeki MN değerlerinin kontrollerden farklı olmadığı gösterilmiştir (30).

Son yıllardaki yapılan çalışmalarda, asbest/erionit maruziyeti ile ilişkili MPM hastalarında ras, p53 and p21 genlerindeki mutasyonlar araştırılmıştır. Ancak, genel görüş mezotelyoma gelişimiyle bu onkogen ve tümör supressör genlerin önemli sayılabilecek ilgileri olmadığı

yönündedir (16, 17, 20-22, 31). Bizim sonuçlarımızda da, çevresel olarak asbest ve erionite maruz kalmış mezotelyoma ön tanılı hastalardan, epitelyal tip mezotelyoma ve sarkomatöz tip mezotelyoma tanılı iki hastanın parafin blok örneklerinde K-ras ekzon 1 için mutasyon olduğu (% 4.88) ve ayrıca mutasyon bulunan hastalardan sarkomatöz tip mezotelyomalı hastada metastaz olduğu bulunmuştur.

Proto-onkogenlerin aktivasyonunun ve tümör supressör genlerin inaktivasyonunun malign mezotelyomaların patogeneğinde kritik olayları regüle etmek için çok aşamalı bir süreç içerisinde meydana geldiği (31, 32) ve yukarıdaki çalışmaların sonuçları göz önüne alındığında, mezotelyomalarda p53 ve ras gen mutasyonlarının varlığı çelişkilidir. Ancak sunulan çalışmada elde edilen sonuçlara göre, mezotelyoma ve malign mezotelyoma ön tanılı hastalara ait parafin blok örneklerinde p53 mutasyonu bulunmaması ve sadece 2 hastada K-ras mutasyonu bulunması literatürle uyumlu görünmektedir. Sonuç olarak, insanlarda asbest ve erionite maruz kalma ile ilişkili mezotelyoma ve malign mezotelyomada p53 tümör supressör geni ve ras proto-onkogeni mutasyonlarının kritik bir rol oynayamayacağını ve sonuçlarımızın ileri çalışmalarla desteklenmesi gerektiğini düşünmekteyiz.

Kaynaklar

1. Balcı K. *Göğüs Hastalıkları*. Konya: Atlas Kitabevi; 1993. s.575-593.
2. Barış Yİ. *Asbestos And Erionite Related Chest Diseases*. Semih Ofset, Ankara 1987, ss 36-102.
3. Ulusu E, Yılmaz S. *Türkiye’de Asbest Envanteri*. MTA Enstitüsü Yayınları (No:157), Ankara: MTA Enstitüsü Matbaası; 1975.
4. Müller KM, Fischer M. *Malignant pleural mesotheliomas: An environmental health risk in southeast Turkey*. *Respiration* 2000, 67: 608-609.
5. Barış Yİ, Karakoca Y, Demir U. *Çevresel ve Mesleki Akciğer Hastalıkları*. In: Barış Yİ, editör. *Solunum Hastalıkları Temel Yaklaşım*. Ankara: Kent Matbaa; 1995. s.247-276.
6. Light RW. *Malignant and Benign Mesotheliomas*. In: Light RW, editor, *Pleural Diseases (3rd ed)*. Baltimore: Williams and Wilkins; 1995. p.117-128.
7. Demiroglu H. *Hazards of white asbestos*. *Lancet* 1998, 352: 322-323.
8. Sahin AA, Cöplü L, Selçuk ZT, et al. *Malignant pleural mesothelioma caused by environmental exposure to asbestos or erionite in rural Turkey: CT findings in 84 patients*. *AJR Am J Roentgenol* 1993; 161: 533-537.
9. Şenyiğit A, Coşkunsel M, Topçu F, Işık R, Babayiğit C. *Malignant pleural mesothelioma: Evaluation of clinical, radiological and histological features in 136 cases*. *Tüberküloz ve Toraks Dergisi* 2000; 48: 26-34.
10. Wagner JC, Sleggs CA, Marchard P. *Diffuse pleural mesothelioma and asbestos exposure in the North Western Cape Province*. *Br J Ind Med* 1960; 17: 260-271.
11. Şenyiğit A, Bayram H, Babayiğit C, et al. *Malignant pleural mesothelioma caused by environmental exposure to asbestos in the Southeast of Turkey: CT findings in 117 patients*. *Respiration* 2000; 67:615-622.
12. Yılmaz UM, Utkaner G, Yalniz E, Kumcuoglu Z. *Computed tomographic findings of environmental asbestos-related malignant pleural mesothelioma*. *Respirology* 1998; 3: 33-38.
13. Yazicioglu S, Ilcayto R, Balci K, Sayli BS, Yorulmaz B. *Pleural calcification, pleural mesotheliomas, and bronchial cancers caused by tremolite dust*. *Thorax* 1980; 35: 564-569.
14. Vahakangas K. *TP53 mutations in workers exposed to occupational carcinogens*. *Hum Mutat* 2003; 21:240-251.
15. Porta M, Ayude D, Alguacil J, Jarrod M. *Exploring environmental causes of altered ras effects: fragmentation plus integration?* *Mol Carcinog* 2003; 36:45-52.
16. Kitamura F, Araki S, Suzuki Y, Yokoyama K, Tanigawa T, Iwasaki R. *Assessment of the mutations of p53 suppressor gene and Ha- and Ki-ras oncogenes in malignant mesothelioma in relation to asbestos exposure: a study of 12 American patients*. *Ind Health* 2002; 40:175-181.
17. Ni Z, Liu Y, Keshava N, Zhou G, Whong W, Ong T. *Analysis of K-ras and p53 mutations in mesotheliomas from humans and rats exposed to asbestos*. *Mutat Res* 2000; 468:87-92.
18. Wang X, Christiani DC, Mark EJ, et al. *Carcinogen exposure, p53 alteration, and K-ras mutation in synchronous multiple primary lung carcinoma*. *Cancer* 1999; 85:1734-1739.
19. Cote RJ, Jhanwar SC, Novick S, Pellicer A. *Genetic alterations of the p53 gene are a feature of malignant mesotheliomas*. *Cancer Res* 1991; 51:5410-5416.
20. Isik R, Metintas M, Gibbs AR, et al. *p53, p21 and metallothionein immunoreactivities in patients with malignant pleural mesothelioma: correlations with the epidemiological features and prognosis of mesotheliomas with environmental asbestos exposure*. *Respir Med* 2001; 95: 588-593.
21. Olut A, Firat P, Ertugrul D, Gungen Y, Emri S. *Ras oncoprotein expression in erionite- and asbestos-induced Turkish malignant pleural mesothelioma patients- a pilot study*. *Respir Med* 2001; 95: 697-698.
22. Mor O, Yaron P, Huszar M, et al. *Absence of p53 mutations in malignant mesotheliomas*. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997; 16: 9-13.

23. Wrigt DK, Manos MM. *Sample preparation from paraffin-embedded tissues. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, editors. Polymerase Chain Reaction Protocols: A Guide to Methods and Applications. San Diego: Academic Pres; 1990. p.153-158.*
24. Dönmez H, Kemaloğlu YK, Akyol G, İnal E, Menevşe A. *Clinical and histopathological characteristics in subjects with laryngeal cancer infected by human papillomavirus. KMJ Kuwait Medical Journal 2000; 32:136-139.*
25. Lee SH, Shin M, Lee KJ, Lee SY, Lee JT, Lee YH. *Frequency of sister chromatid Exchange in chrysotile-exposed workers. Toxicol Lett 1999; 108: 315-319.*
26. Fatma N, Jain AK, Rahman Q. *Frequency of sister chromatid exchange and chromosomal aberrations in asbestos cement workers. Br J Ind Med 1991; 48: 103-105.*
27. Rom WN, Livingston GK, Casey KR, et al. *Sister chromatid exchange frequency in asbestos workers. J Natl Cancer Inst 1983; 70: 45-48.*
28. Dönmez H, Özkul Y, Uçak R. *Sister chromatid exchange frequency in inhabitants exposed to asbestos in Turkey. Mutat Res 1996; 361:129-132.*
29. Atalay F, Baltacı V, Alpas I, Savas I, Atıkcın S, Balci S. *Sister chromatid exchange rate from pleural fluid cells in patients with malignant mesothelioma. Mutat Res 2000; 465: 159-163.*
30. Dönmez-Altuntaş H, Baran M, Oymak FS, et al. *Investigation of Micronucleus Frequencies in Lymphocytes of Inhabitants Environmentally Exposed to Chrysotile Asbestos. Int J Environ Health Res 2007; 17: 45-51.*
31. Toyooka S, Kishimoto T, Date H. *Advances in the molecular biology of malignant mesothelioma. Acta Med Okayama 2008; 62: 1-7.*
32. Murthy SS, Testa JR. *Asbestos, chromosomal deletions, and tumor suppressor gene alterations in human malignant mesothelioma. J Cell Physiol 1999; 180:150-157.*