

Akciğer Kanserine Bağlı Plevral Efüzyonların Ayırıcı Tanısında Telomeraz Aktivitesi Tayini

Telomerase Activity Assay of Pleural Effusions As A Potential Diagnostic Marker for Malignant Effusion in Lung Cancer

Günnur Dikmen*

Erkan Dikmen**

Murat Kara**

Ekber Şahin***

Nezih Özdemir***

Pakize Doğan*

*Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Ankara

**Kıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Göğüs Cerrahisi Anabilim Dalı, Kırıkkale

***Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, İbn-i Sina Hastanesi, Göğüs Cerrahisi Anabilim Dalı, Ankara

ÖZET

Amaç: Akciğer kanserli hastalarda plevral efüzyon varlığı ileri evre göstergesidir ve bu tip hastaların cerrahi tedavi sonrası sağ kalım oranları son derece düşüktür. Bu nedenle malign ve benign plevral efüzyonların ayırıcı tanısının yapılması, doğru tanının konup tedavinin planlanmasında önemlidir. Bu konuda sitolojik incelemenin tanısız yeterliliği sınırlı olduğundan daha duyarlı tanısız yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır. Bir çok çalışmada telomeraz ekspresyonunun vücut sıvılarında maligniteyi gösteren tanısız bir belirteç olarak kullanılabilmesi ileri sürülmektedir. Bu çalışmadaki amacımız, akciğer kanserli hastalardan alınan plevral efüzyon örneklerinde telomeraz aktivitesi tayin etmek ve sonuçları sitolojik inceleme ile karşılaştırmaktır.

Yöntem: Akciğer kanserlerinden (n=18) ve benign hastalıklardan (n=15) toplanan 33 plevral efüzyon örneğinin tanısı, sitolojik ve/veya histolojik inceleme ile konuldu. Telomeraz aktivitesi tayini PCR'a dayalı TRAP (The telomeric repeat amplification protocol) yöntemi kullanılarak yapıldı.

Bulgular: Telomeraz aktivitesi tayininin sensitivitesi %77.8, spesifitesi %80.0 ve tanısız doğruluğu %78.7 olarak bulundu. Sitolojik incelemenin sensitivitesi tek başına %66.7 iken, telomeraz aktivitesi ile kombine edildiğinde %88.9'a yükseldiği ve bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlemlendi (p = 0.046).

Sonuç: Plevral efüzyonlarda telomeraz aktivitesi tayininin, gerçekçi ve efektif tanısız bir metod olduğu ve akciğer kanseri tanısında sitolojik incelemeye yardımcı olarak kullanılabilmesi kanısına varıldı.

Anahtar Sözcükler: Akciğer kanseri, telomeraz, plevral efüzyon

20-25 Ekim 2002 tarihleri arasında İstanbul'da yapılan FEBS (Federation of European Biochemistry Society) kongresinde sunulmuştur.

ABSTRACT

Objective: The presence of malignant pleural effusion in lung cancer refers to an advanced stage and the survive of these patients after surgical resection is unfortunately poor. The nature of pleural effusion should be clarified in lung cancer as it is important for accurate diagnosis and an appropriate treatment protocol. However, diagnostic yield of cytological examination of pleural fluids may sometimes be limited in clinical practice so more sensitive diagnostic methods are needed. Telomerase has been proposed to be a diagnostic marker for malignancy in body cavity fluids in various papers. In this study, our aim is to evaluate the diagnostic efficacy of telomerase activity in pleural effusions of patients with lung cancer and to compare with the results of cytologic examination.

Patients and Method: A total of 33 pleural effusion samples were collected from patients with lung cancer (n=18) and with benign disease (n=15) in whom the diagnosis was confirmed with cytological and/or histological examinations. Telomerase activity was determined with PCR-based TRAP (The telomeric repeat amplification protocol) assay.

Results: The sensitivity and specificity of telomerase activity were found to be 77.8%, and 80.0%, respectively. Diagnostic accuracy of telomerase activity was 78.7%. The sensitivity rate of cytological examination when combined with telomerase activity (88.9%) was observed to be significantly greater than that of cytological examination alone (66.7%) (p = 0.046).

Conclusion: Detection of telomerase activity in pleural effusion is a reliable and effective diagnostic method and may be used as an adjunct to cytological examination in lung cancer.

Key Words: Lung cancer; telomerase; pleural effusion

GİRİŞ

Akciğer kanseri, kadınlarda ve erkeklerde kansere bağlı ölümlerin en önemli sebebidir. Tanı ve tedavideki gelişmelere rağmen, akciğer rezeksiyonunu takiben 5 yıllık sağ kalım oranları sadece erken evredeki hastalarda tatminkardır. Bu nedenle uygun metodlar ile doğru tanı konulabilmesi, akciğer kanserlerinde özellikle cerrahi tedavinin planlanması için çok önemlidir. Santral lokalizasyonlu akciğer tümörlerinde, bronkoskopi ile sitolojik veya histolojik inceleme için uygun örnek alınabilmektedir ve periferik yerleşimli tümörlere oranla daha kolay tanı koyulabilmektedir. Bununla birlikte, periferik akciğer tümörleri, parietal plevrayı invaze edip plevral efüzyona yol açabilir. Akciğerde kitle ile birlikte plevral efüzyon varlığı, ileri evre hastalığa işaret eder ve bu tip hastalar cerrahi rezeksiyondan yarar görmezler (1). Akciğer kanseri şüphesi bulunan olgularda, plevral efüzyonun incelenmesi hastanın cerrahi operasyondan fayda görmesi konusunda yol gösterici olmaktadır.

Telomerez, kendi RNA komponentini kalıp olarak kullanarak sentezlediği telomerik dizi

leri kromozomal uçlara ekleyen ribonükleoprotein yapıda bir DNA polimerazdır. İnsan tümörleri ve tümör hücre serilerinde yapılan çeşitli çalışmalarda, hücre immortalizasyonunun sağlanmasında telomerez aktivasyonunun kritik bir rol oynadığı ortaya konmuştur (2-4). Telomerez ekspresyonu; çeşitli tipteki tümörlerde, immortal hücre serilerinde ve erken dönemdeki akciğer kanserlerinde saptanmıştır (5,6). Malign ve benign plevral efüzyonların ayırıcı tanısında telomerez aktivitesi umut verici bir tümör belirteçidir (7-10).

Bu çalışmada, akciğer kanserli hastaların plevral efüzyon örneklerinde malignite tayininde telomerez aktivitesinin tanısai değerinin araştırılması amaçlanmış ve sonuçlar sitolojik inceleme ile karşılaştırılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Hastalar ve Plevral Efüzyon Örnekleri

Ocak 2001-Mart 2002 tarihleri arasında Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi İbni Sina Hastanesi ve Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde incelenen 33 hastadan (28 kadın, 5 erkek, ortalama yaş: 56.2 ± 11.5) plevral

efüzyon örnekleri alındı. Plevral efüzyonların niteliğine göre hastalar iki gruba ayrıldı. Grup 1; akciğer kanserli 18 (54.5%) hastadan alınan malign plevral efüzyon, Grup 2; 15 benign plevral efüzyondan oluşan kontrol grubunu (45.5%) oluşturmaktaydı.

Grup 1'deki toplam 18 hastanın (ortalama yaş: 60.8 ± 9.5) 11'inde (% 61.1) bronkoskopik incelemede endobronşiyal tümör izlenmedi, yedi hastada (%38.9) ise endobronşiyal tümör saptandı. Histopatolojik olarak 12 (%66.7) olgu adenokarsinom (AC), dört (%22.2) olgu epidermoid karsinom ve iki (%11.1) olgu ise küçük hücreli karsinom tanısı aldı.

Grup 2'deki (ortalama yaş: 50.6 ± 11.4) 15 hastada mevcut veya önceden bilinen kanser hastalığı yoktu. Hastaların sekizi ampiyem, beşi konjestif kalp yetmezliği, biri nefrotik sendrom ve biri de tüberküloz hastasıydı.

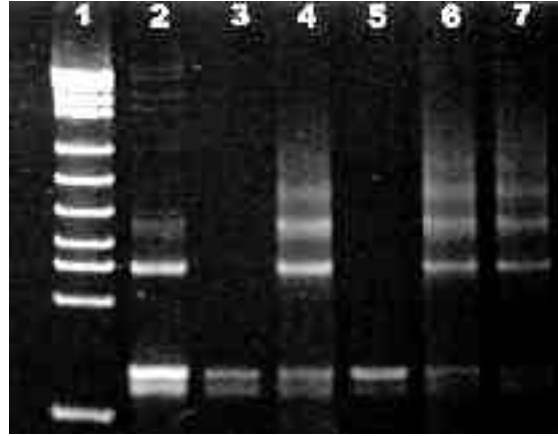
Telomeraz Aktivitesi Tayini

Plevral efüzyon örnekleri alındıktan sonraki 3 saat içinde laboratuara ulaştırıldı. 2000 rpm'de 10 dk santrifüj edilmesiyle elde edilen hücre pelletleri, buzda soğutulmuş 10 mM PBS (Fosfat buffered saline, pH: 7.4) ile 2 kez yıkandı. 200 µl buzda soğutulmuş CHAPS (3-((3-klomidopropil)-dimetil-amonyo) 1-propansülfonat) (Sigma) lizis buffer ile homojenize edilen hücre pelletleri, 30 dk buz üzerinde inkübe edildikten sonra örnekler 13000 g'de, 4°C'de, 30 dk santrifüj edildi. Süpernatantlardaki protein konsantrasyonları Bradford yöntemiyle tayin edildi (11).

Telomeraz aktivitesi tayininde TRAP (Telomeric Repeat Amplification Protocol) yöntemi kullanıldı (2). İki µl süpernatant (3µg protein / ml), 50 µM dNTP (Operon Technologies), 0.1 mg TS primeri (5'-AATCCGTCGAGCAGAGTT-3') ve 1x TRAP Buffer içeren 43 µl reaksiyon karışımına eklendi. Otuz dakika oda ısısında bekletildikten sonra, 0.1 µg CX primeri (5'-CCCTTACCCTTACCCTTACCCTAA-3') ve 2 U Tag-DNA Polimeraz (Sigma) içeren 5µl amplifikasyon karışımı PCR tüplerine eklendi. Telomeraz ürünleri, 94°C'de 30 sn, 50°C'de

30 sn ve 72°C'de 90 sn olacak şekilde 33 PCR siklusu ile amplifiye edildi (Perkin- Elmer Gene Amp PCR System 2400, Roche). 20 µl PCR ürünleri, %12'lik poliakrilamid jelde, 0.5 x TBE (Tris-Borat-EDTA) içinde 200V'da 120 dk yürütüldü ve SYBR Green I (Molecular Probes) nükleik asit jel boyası ile 30 dk boyanarak görüntüledi.

Altı baz çiftlik merdiven tarzında artış gösteren örnekler telomeraz (+) kabul edildi. Pozitif kontrol olarak HeLa hücreleri, negatif kontrol olarak ise CHAPS lizis tamponu kullanıldı (Şekil 1). Telomeraz aktivitesi sonuçları ile sitolojik / histolojik sonuçlar karşılaştırıldı.



Şekil 1. TRAP metodu ile plevral efüzyon örneklerinde telomeraz aktivitesi tayini.

1. Marker (pUC 18 Msp I, 26-SOLbp), 2. Pozitif kontrol (HeLa), 3. Negatif kontrol (CHAPS lizis buffer), 4. Telomeraz (+) akciğer kanseri (epidermoid Ca), 5. Telomeraz (-) ampiyem, 6. Telomeraz (+) akciğer kanseri (adeno Ca), 7. Telomeraz (+) akciğer kanseri (küçük hücreli kanser).

İstatistiksel Analiz

Sonuçların analizinde Fisher's exact test kullanıldı. P değerinin 0.05'in altında bulunması anlamlı olarak kabul edildi. Tüm istatistiksel analizler SPSS 10.0 versiyonu kullanılarak yapıldı.

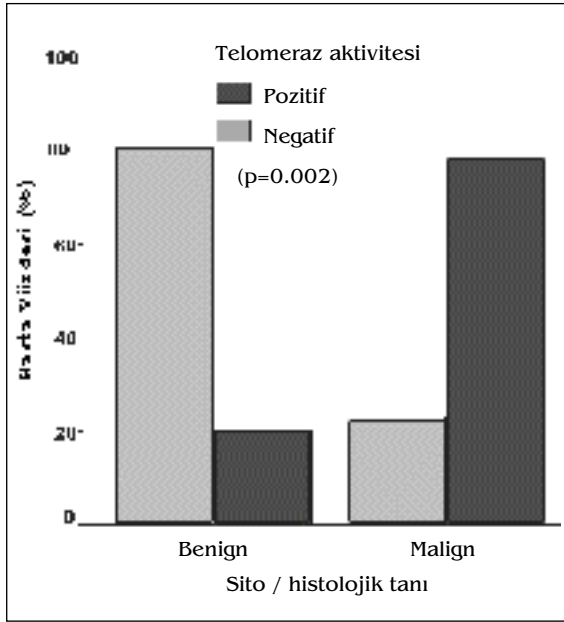
BULGULAR

Sitolojik inceleme, Grup 1'deki 18 hastanın 12'sinde (%66.7), Grup 2'deki 15 hastanın tamamında (%100) tanısıldı (p=0.078) (Tablo I).

Tablo I. Hastaların patolojik özellikleri ile birlikte gruplara göre sitolojik inceleme ve telomeraz aktivitesi sonuçları.

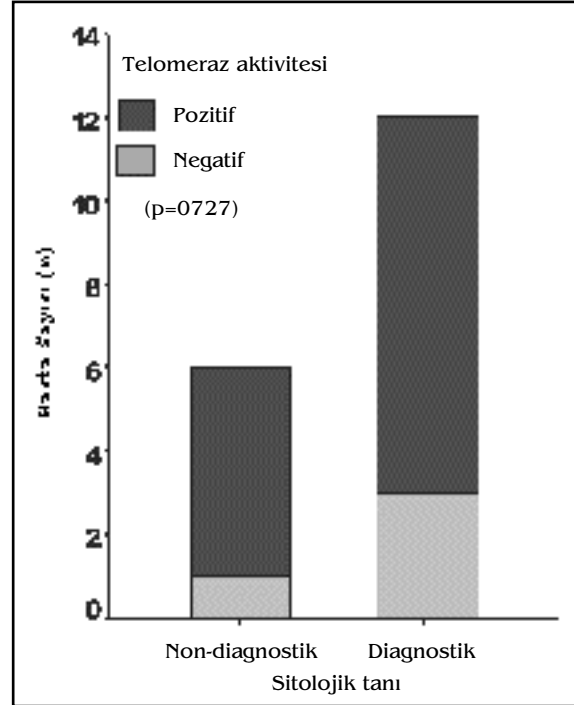
	(n)	Tanısal Sitoloji n / (%)	Telomeraz aktivitesi n / (%)
Grup 1 (Akciğer kanseri)	18	12 (66.7)	14 (77.8)
Adeno karsinom	12	7 (58.3)	10 (83.3)
Epidermoid karsinom	4	3 (75)	2 (50)
Küçük hücreli karsinom	2	-	2 (100)
Group 2 (Benign plevral efüzyon)	15	15 (100)	3 (20)
Ampiyem	8	-	2 (25)
Kalp yetmezliği	5	-	-
Nefrotik sendrom	1	-	-
Tüberküloz	1	-	1 (100)

Telomeraz aktivitesi ise Grup 1'deki hastaların 14'ünde (%77.8), Grup 2'deki hastaların ise sadece 3'ünde (%20) pozitif bulundu ($p=0.002$) (Şekil 2).



Şekil 2. Benign ve malign efüzyon gruplarında telomeraz aktivitesi sonuçları.

Sitolojik olarak yalnız negatif bulunan akciğer kanseri kaynaklı 6 plevral efüzyon örneğinden 5'inde (%83.3) telomeraz aktivitesi saptandı. Bunun yanısıra telomeraz aktivitesi saptanamayan 4 malign efüzyondan 3'ünde (%75) ise sitolojik inceleme tanısıldı ($p=0.727$) (Şekil 3). Sadece sitolojik inceleme ile hastaların % 66.7'sine (12/18) doğru tan



Şekil 3. Akciğer kanserine bağlı plevral efüzyonlarda telomeraz aktivitesi ve sitolojik inceleme arasındaki ilişki.

konulabilirken, sitolojik inceleme ile telomeraz aktivitesi kombine edildiğinde bu oranın %88.9'a (16/18) yükseldiği ve istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlemlendi ($p=0.046$).

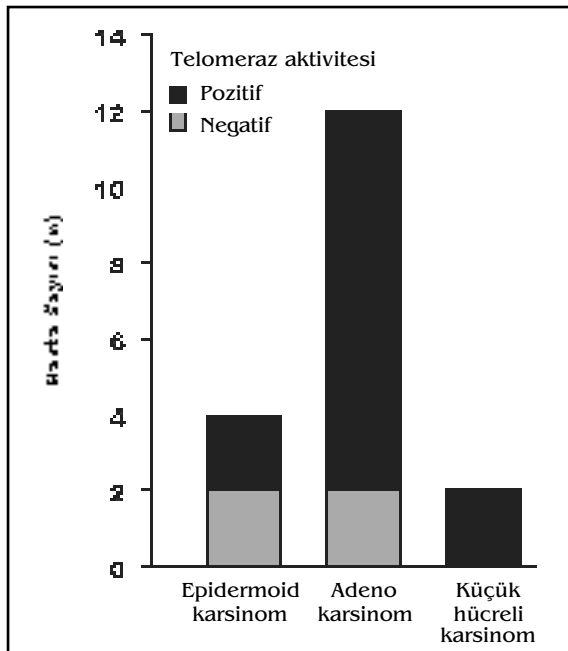
Sitolojik incelemenin sensitivitesi %66.7, spesifitesi %100 bulunurken, bu oranlar telomeraz aktivitesi için %77.8 ve %80 olarak bulundu (Tablo II). Telomeraz aktivitesinin pozitif prediktif değeri 0.82 ve negatif pre-

Tablo II. Sitolojik inceleme ve telomeraz aktivitesi için sensitivite, spesifite ve tanısal doğruluk oranları.

	Sensitivite (%)	Spesifite (%)	Tanısal doğruluk (%)
Sitolojik inceleme	66.7	100	81.8
Telomeraz aktivitesi	77.8	80	78.7

diktif değeri 0.75, tanısal doğruluğu ise %78.7 olarak bulundu.

Sitolojik inceleme, adeno kansere bağlı efüzyonların %58.3'ünde (7/12) ve epidermoid karsinoma bağlı efüzyonların %75'inde (3/4) tanımlandı. Diğer taraftan, telomeraz pozitifliğinin adeno kansere bağlı efüzyonlarda epidermoid karsinoma oranla daha fazla olduğu saptandı. Telomeraz aktivitesi adeno kansere bağlı efüzyonların %83.3'ünde (10/12) pozitif iken, epidermoid karsinoma bağlı efüzyonların %50'sinde (2/4) pozitif bulundu ancak aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0.276$) (Şekil 4). Küçük hücreli akciğer kanserine bağlı 2 plevral efüzyon örneğinin 2'sinde de (%100), hem telomeraz aktivitesi hem de sitolojik inceleme tanımlandı.



Şekil 4. Akciğer kanseri hücre tiplerine göre telomeraz aktivitesi.

TARTIŞMA

Malign plevral efüzyonu olan hastalarda cerrahi rezeksiyonun sonuçları yüz güldürücü değildir (1). Bu nedenle akciğerde kitle ile beraber plevral efüzyonu bulunan hastalardan alınan efüzyon örneklerinin malign hücre içerip içermediğinin belirlenmesi, tedavinin planlanmasında önemlidir. Bu tip hastalarda tanı torakoskopi ile %78, sitolojik incelemeyle ise %34 oranında konulabilmektedir (12). Bundan dolayı akciğer kanserli hastalardaki plevral efüzyonların ayırıcı tanılarının yapılabilmesi için daha hassas yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır.

Kim ve ark. (2) tarafından geliştirilen PCR'a dayalı TRAP (Telomeric repeat amplication protocol) yöntemi ile örneklerdeki az sayıda malign hücrenin tespit edilebilmesi mümkün hale gelmiştir. TRAP ile incelenen malign tümörlerin %85'inde telomeraz aktivitesi tespit edilirken, normal somatik hücrelerde enzimatik aktivite izlenmemektedir (3,13). Literatürde akciğer tümörlerindeki telomeraz aktivitesiyle ilgili yayınlar olmakla birlikte, plevral sıvıların ayırıcı tanısında telomeraz aktivitesinin bir belirteç olarak kullanılmasını ile ilgili az sayıda araştırma mevcuttur (14-17). Bu çalışmalarda malign plevral efüzyonlarda telomeraz aktivitesinin sensitivitesi %52-91 olarak bildirilmektedir (7-10). Bizim çalışmamızda ise bu oran %77 olarak bulunmuştur.

Çalışmamızda sitolojik incelemenin tanısal değerinin Grup 1 ve Grup 2 arasında farklılık göstermediği tespit edildi ($p=0.078$). Telomeraz pozitifliği ise Grup 1'de Grup 2'ye oranla anlamlı derecede fazla bulundu ($p=0.002$). Sitoloji ile telomeraz aktivitesi arasındaki korelasyon anlamlı değildi ($p=0.727$). Bu iki yöntem birbirine göre belirgin bir üstünlük sağlamamakla birlikte, kombine olarak kullanıldıklarında, tek başına sitolojik inceleme ile elde edilen sonuçlara göre duyarlılığın arttığı saptandı.

Telomeraz aktivitesinin plevral efüzyonlardaki yanlış negatiflik oranının literatürde %9-33

arasında olduğu bildirilmektedir (7-10). Bizim çalışmamızda ise bu oran %23 olarak bulundu. Deney ortamında hemoglobin, musin, RNaz, proteaz gibi Taq polimeraz inhibitörlerinin bulunması, örneklerin yeterli sayıda malign hücre içermemesi veya uygunsuz koşullarda saklanan örnekler yanlış negatif sonuçlara yol açabilmektedir (3,18).

Normal somatik hücrelerde telomeraz ekspresyonu izlenmemekle birlikte, cildin bazal hücreleri, intestinal kriptler, saç folikülleri ve endometriyum gibi proliferasyon gösteren hücreler ile inflamatuvar hücreler (lökosit, lenfosit) ve hematopoetik kök hücrelerde düşük düzeyde telomeraz aktivitesi izlenmektedir (13,20). Literatürde yanlış pozitiflik oranı %5-11 arasında bildirilmektedir (7-9). Çalışmamızda ise bu oran % 20 (3/15) bulundu. İki ampiyem ve bir tüberküloz olgusunda izlenen bu yalancı pozitifliğin, yoğun lenfosit ve lökosit infiltrasyonuna bağlı olabileceği düşünüldü (20,21).

Çalışmamızda adeno karsinoma bağlı efüzyonlarda, epidermoid karsinoma oranla telomeraz pozitifliği daha yüksek bulundu, ancak istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı. Küçük hücreli kanserde ise telomeraz pozitifliği oranı %100 olarak bulundu. Hiyama ve ark. (14) benzer şekilde telomeraz aktivitesini küçük hücreli akciğer kanserlerinde %100, küçük hücreli olmayan kanserlerde ise % 80 oranında pozitif bulmuştur.

Sonuç olarak, eldeki veriler plevral efüzyon örneklerinde telomeraz aktivitesi tayininin malignite ayırıcı tanısında oldukça sensitif olduğunu göstermektedir. Telomeraz aktivitesi tayini akciğer kanserlerine bağlı olarak gelişen plevral efüzyonların ayırıcı tanısında sitolojiye yardımcı bir parametre olarak kullanılabilir.

KAYNAKLAR

1. Sawabata N, Matsumura A, Motohiro A, Osaka Y, Gennga K, Fukai S, et al. Malignant minor pleural effusion detected on thoracotomy for patients with non-small cell lung cancer: Is tumor resection beneficial for prognosis. *Ann Thorac Surg* 2002; 73: 412-415.

2. Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PLC, et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 1994; 226: 2011-2015.
3. Shay JW, Wright WE. Telomerase activity in human cancer. *Curr Opin Oncol* 1996; 8: 66-71.
4. Lee JC, Jong HS, Yoo CG, Han SK, Shim YS, Kim YW. Telomerase activity in lung cancer cell lines and tissues. *Lung Cancer* 1998; 21: 99-103.
5. Shay JW, Gazdar AF. Telomerase in the early detection of cancer. *J Clin Pathol* 1997; 50: 106-109.
6. Piatyszek MA, Kim NW, Weinrich SL, Hiyama K, Hiyama E, Wright WE, et al. Detection of telomerase activity in human cells and tumors by a telomeric repeat amplification protocol. *Methods Cell Sci* 1995; 17: 1-15.
7. Mu XC, Brien TP, Ross JS, Lowry CV, McKenna BJ. Telomerase activity in benign and malignant cytologic fluids. *Cancer (Cancer Cytopathol)* 1999; 87: 93-9.
8. Dejmeek A, Yahata N, Ohyashiki K, Ebihara Y, Kakihana M, Hirano T, Kawate N, Kato H. In situ telomerase activity in pleural effusions: a promising marker for malignancy. *Diagn Cytopathol* 2001; 24: 11-15.
9. Yang CT, Lee MH, Lan RS, Chen JK. Telomerase activity in pleural effusions: diagnostic significance. *J Clin Oncol* 1998; 16:567-73.
10. Braunschweig R, Yan P, Guilleret I, Delacretaz F, Bosman FT, Mihaescu A, Benhattar J. Detection of malignant effusions: comparison of a telomerase assay and cytological examination. *Diagn Cytopathol* 2001; 24: 174-80.
11. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 77: 248-254.
12. Canto A, Ferrer G, Romagosa V, et al. Lung cancer and pleural effusion: Clinical significance and study of pleural metastatic locations. *Chest* 1985; 87: 649.
13. Hiyama K, Hirai Y, Koizumi S, Akiyama M, Hiyama E, Piatyszek MA, Shay JW, Ishioka S, Yamakido M. Activation of telomerase in human lymphocytes and hematopoietic progenitor cells. *J Immunol* 1995; 155: 3711-3715.
14. Hiyama K, Hiyama E, Ishioka S, Yamakido M, Ina K, Gazdar AF, Piatyszek MA, Shay JW. Telomerase activity in small-cell and non-small-cell lung cancers. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87: 895-902.
15. Albanell J, Lonardo F, Rusch V, Engelhardt M, Langenfeld J, Han W, Klimstra D, Venkatraman E, Moore MA, Dmitrovsky E. High telomerase activity in primary lung cancers: association with increased cell proliferation rates and advanced pathologic stage. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89: 1609-1615.
16. Marchetti A, Bertacca G, Buttitta F, Chella A, Quattrocchio G, Angeletti CA, Bevilacqua G. Telomerase

- activity as a prognostic indicator in stage I non-small cell lung cancer. Clin Cancer Res 1999; 5: 2077-2081.
17. Taga S, Osaki T, Ohgami A, Imoto H, Yasumoto K. Prognostic impact of telomerase activity in non-small cell lung cancers. Ann Surg 1999; 230: 715-720.
18. Zheng PS, Iwasaka T, Yamasaki F, Ouchida M, Yokoyama M, Nakao Y, Fukuda K, Matsuyama T, Sugimori H. Telomerase activity in gynecologic tumors. Gynecol Oncol 1997; 64: 171-175.
19. Ramirez RD, Wright WE, Shay JW, Taylor RS. Telomerase activity concentrates in the mitotically active segments of human hair follicles. J Invest Dermatol 1997; 108: 113-117.
20. Gollahon L, Holt SE. Alternative methods of extracting telomerase activity from human tumor samples. Cancer Lett 2000; 159: 141-149.
21. Braunschweig R, Guilleret I, Delacretaz F, Bosman FT, Mihaescu A, Benhattar J. Pitfalls in TRAP assay in routinedetection of malignancy in effusions. Diagn Cytopathol 2001; 25: 225 - 230.

Yazışma adresi:

Dr. Pakize Doğan
Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya
Anabilim Dalı, Ankara
Tel: 0 312 305 16 52 Fax: 0 312 225 28 19
e-mail: pakize@hacettepe.edu.tr
