

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

**PROSTAT KANSERLİ HASTALARDA, PARAOKSONAZ
GEN POLİMORFİZMİNİN RİSK FAKTÖRÜ OLARAK
BELİRLENMESİ**

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

TUBA DENİZ

DANIŞMAN PROF. DR. UĞUR ÖZBEK

GENETİK ANABİLİM DALI

İSTANBUL-2006

TEZ ONAYI

Aşağıda tanıtımı yapılan tez, jüri tarafından başarılı bulunarak Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

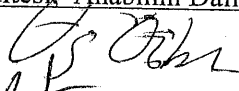
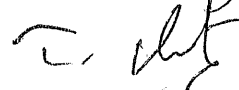

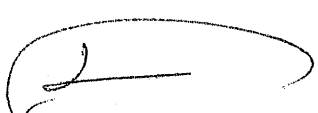
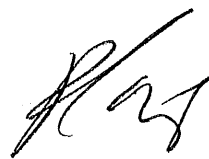
04. / 07 / 2006

Prof.Dr.Emine Kökoğlu
Enstitü Müdürü

Kurum : İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Program Adı : Genetik Ortak Programı
Programın seviyesi : Yüksek Lisans Doktora
Anabilim Dalı : Genetik Ana Bilimdalı
Tez Sahibi : Tuba Deniz
Tez Başlığı : Prostat kanserli hastalarda, Paraxonaz gen polimorfizminin risk faktörü olarak belirlenmesi
Sınav Yeri : İ.Ü. Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü (DETAE)
Sınav Tarihi : 04 / 07 / 2006

Tez Sınav Jürisi

Ünvanı Adı Soyadı Üniversitesi, Fakültesi/ Anabilim Dalı

1. Prof. Dr. Uğur Özbek (Tez danışmanı) 
2. Prof. Dr. Turgut Ulutin 
3. Prof. Beyhan Tüysüz 
4. Prof. Dr. Şükrü Palandüz 
5. Prof. Dr. Pınar Saip 

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 çalışmayla 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 haklarımı ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Tuba Deniz

İTHAF

“Aileme ithaf ediyorum”

TEŞEKKÜR

Yardım ve önerilerini benimle her zaman paylaşan, tez çalışmamın başından sonuna kadar verdiği değerli fikirlerle bana her zaman destek olan, her zaman örnek aldığım çok değerli tez danışmanım Prof. Dr. Uğur Özbek'e; Her zor anımda olduğu gibi tezimin hazırlanması sırasında da yanımda olan, bana her zaman yol gösteren, güler yüzüyle tecrübe ve fikirlerini paylaşan Dr. Naci Çine'ye; Bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşıp, güler yüzünü, sevgi ve anlayışını eksik etmeyen Dr. Müge Aydın Sayitoğluna; Bana her zaman anlayış gösterip, destek ve yardımlarını esirgemeyen Dr. Burçak Vural'a; Yardım ve önerilerini benimle her zaman paylaşan Dr. Duran Üstek'e; Güler yüzü, tatlı sohbeti ve fikirleriyle bana destek olan Fatmahan Atalar'a; Her zor anımda büyük bir içtenlikle yanımda olan, fikirlerini paylaşan, destek veren sevgili arkadaşlarım Özden Hatırnaz ve Ayşe Demirkan'a ve yardımları için Dr. Cumhuriyet G. Ekmekçi'ye teşekkür ederim.

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından T-530/21102004 nolu proje olarak desteklemiştir.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ.....	Vİİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	İX
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	X
ÖZET	Xİ
ABSTRACT.....	Xİİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Kanserin Tanımı ve Sınıflandırılması.....	3
2.2. Prostat Kanserinin Tanımı ve Sınıflandırılması.....	5
2.2.1. Prostat Kanserinin Etiyolojisi ve Klinik Özellikleri	5
2.2.2. Prostat Kanserinde Yaşın Önemi	9
2.2.3. Prostat Kanserinde Çevresel Faktörlerle Etnik Özellikler	10
2.2.4. Prostat Kanserinin Genetik Temeli	10
2.2.4.1. Kalıtsal Prostat Kanseri.....	11
2.2.4.2. Sporadik (Kalıtsal Olmayan) Prostat Kanseri	14
2.2.5. Paraoksonaz 1 Gen Polimorfizmlerinin Prostat Kanseri Gelişimindeki Rolü..	27
2.3. Paraoksonaz (PON) Gen Ailesi	27
2.3.1. Paraoksonaz (PON) Proteinleri.....	27
2.3.2. Paraoksonaz 1 (PON1) Proteini ve Fonksiyonu	28
2.3.3. PON1 Gen Yapısı.....	30
2.3.4. PON1 Geni Q192R ve L55M Polimorfizmleri	32
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	33
3.1. Gereç	33
3.1.1. Hasta Grubu	33
3.1.2. Sağlıklı Kontrol Grubu.....	34

3.1.3. Prostat Kanseri Hastalarına Ait Klinik Parametreler	34
3.1.4. Bilgilendirilmiş Onay Formu	35
3.1.5. Kimyasallar	36
3.1.6. PZR Materyali.....	36
3.1.7. Restriksiyon Enzimleri.....	36
3.1.9. Kullanılan Cihazlar	38
3.2. Yöntem.....	38
3.2.1. DNA Eldesi	38
3.2.2. PZR İle DNA Analizi.....	39
3.2.3. Restriksiyon Enzim Kesimi	42
3.2.4. Jel Elektroforezi ve Genotipleme.....	46
3.2.4.1 Jel Elektroforezi	46
3.2.4.2. Q192R Genotiplemesi.....	46
3.2.4.3. L55M Genotiplemesi	48
3.2.5. İstatistik Hesaplamalar.....	50
4. BULGULAR.....	51
4.1. Paraoksonaz 1 Geni Q192R ve L55M Polimorfizmlerinin Genotip Dağılımları ..	51
4.2. Hastalara Ait Klinik Parametrelere Göre Paraoksonaz 1 Geni Q192R ve L55M Polimorfizmlerinin Varyant Allel Dağılımları.....	55
4.3. Hastalara Ait Klinik Parametrelere Göre Paraoksonaz 1 Geni Q192R ve L55M Polimorfizmlerinin Sigara Kullanımı, Aile Öyküsü, Metastaz Durumu Açısından İstatistik Değerlendirilmesi.....	56
5. TARTIŞMA.....	57
KAYNAKLAR	59
HAM VERİLER	68
FORMLAR	72
ETİK KURUL KARARI	73
ÖZGEÇMİŞ	75

TABLULAR LİSTESİ

Tablo 2.1 PSA protein düzeylerinin değerlendirilmesi.	6
Tablo 2.2 Familial prostat kanseriyle ilişkili genler.	13
Tablo 2.3 Prostat kanserlerinde somatik gen değişimleri.	18
Tablo 3.1 Prostat kanseri hastalarının, örneklerin alındıkları andaki klinik parametreleri.	34
Tablo 3.2 PZR Reaksiyonlarında kullanılan primerler ve dizileri.	41
Tablo 3.3 PON1 geninin Q192R ve L55M polimorfizmleri için PCR ürünü ve restriksiyon enzim kesim ürünü boyları.	43
Tablo 4.1 Prostat kanseri hasta ve sağlıklı kontrol grubunda Q192R polimorfizmine ait genotiplerin dağılımı.	51
Tablo 4.2 Prostat kanseri hasta ve sağlıklı kontrol grubunda L55M polimorfizmine ait genotiplerin dağılımı.	53
Tablo 4.3 PON1 geni Q192R polimorfizminin genotip ve allel varyant dağılımı.	55
Tablo 4.4 PON1 geni L55M polimorfizminin genotip ve allel varyant dağılımı.	56

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1 Prostatın periferal bölgesindeki atrofının çoklu odak noktası, neoplazi ve prostatik karsinoma.	8
Şekil 2.2 Prostat kanseri gelişme olasılığının yaşla birlikte dramatik artışı.	9
Şekil 2.3 Prostat kanserinin doğal seyiri ile ilişkili genetik değişikliklerin özeti.	15
Şekil 2.4 Prostatik intraepitelyal neoplaziye öncü olan proliferatif inflamatör atrofi ve prostat kanseri.	16
Şekil 2.5 Prostat kanserinin moleküler patogenezi.	17
Şekil 2.6 Prostat hücrelerinde GSTP1 <i>caretaker</i> aktivite kaybı ve karsinojenler aracılı artmış genomik hasar savunmasızlığı.	20
Şekil 2.7 Antiandrojenler, Androjenden mahrum edici tedavi süresince prostat kanserinin androjen-bağımsız prostat kanserine progresyonu.	23
Şekil 2.8 Prostat kanser patogenezindeki moleküler olaylar.	26
Şekil 2.9 PON1 proteinin üç boyutlu yapısı.	28
Şekil 2.10 PON1 geninin kodlayan bölgeleri.	31
Şekil 3.1 PON1 geni dizisi üzerinde, Q192R polimorfizmi çalışmasında kullanılan primerlerin yerleşim bölgeleri.	40
Şekil 3.2 PON1 geni dizisi üzerinde, L55M polimorfizmi çalışmasında kullanılan primerlerin yerleşim bölgeleri.	40
Şekil 3.3 Q192R polimorfizminde PZR ürününde enzim kesiminin gösterilişi.	44
Şekil 3.4 L55M polimorfizminde PZR ürününde enzim kesiminin gösterilişi.	45
Şekil 3.5 Q192R genotiplemesinin şematik görüntüsü.	47
Şekil 3.6 L55M genotiplemesinin şematik görüntüsü.	49
Şekil 3.7 PON1 ₅₅ ve PON1 ₁₉₂ polimorfizmlerinin restriksiyon enzim analizleri.	49
Şekil 4.1 PON1 geni Q192R polimorfizmi genotiplerine ait agaroz jel görüntüleri.	52
Şekil 4.2 PON1 geni L55M polimorfizmi genotiplerine ait agaroz jel görüntüleri.	54

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

bç	: Baz çifti
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dNTP	: 2'-deoksinukleozid 5'-trifosfat (Deoksi ribonükleosit trifosfat)
EDTA	: Etilen diamin tetra asetat (Etilen Diamin Tetra Asetikasit)
g	: Gram
L	: Litre
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
ng	: Nanogram
OR	: Olasılıkların olasılığı (Odds ratio)
Pmol	: Pikomol
PZR	: Polimeraz zincir reaksiyonu (Polimerase chain reaction)
PIN	: Prostatik intraepitelyal neoplazi (Prostatic intraepithelial neoplasia)
PSA	: Prostat-spesifik antijen (Prostate-specific antigen)
RFLP	: Restriksiyon fragman uzunluk polimorfizmi (Restriction fragment length polymorphism)
RNA	: Ribonükleik asit
TNP	: Tek nükleotid polimorfizmi (SNP: Single nucleotide polymorphism)
U	: Ünite
UV	: Ultraviyole
V	: Volt
µl	: Mikrolitre
NH ₄ Ac	: Amonyum asetat
TSG	: Tümör supresör genler

ÖZET

Deniz T. Prostat Kanserli Hastalarda, Paraoksonaz Gen Polimorfizminin Risk Faktörü Olarak Belirlenmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Genetik ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul. 2006.

Paraoksonaz 1 (PON1) geninin kodlayan bölgelerinde bulunan polimorfizmlerin, genin düzenlenmesinde etkin rol oynayarak, gen ekspresyonunu ve tümör anjiyogenezisini etkileyerek prostat kanserinin oluşumunda etkili olabileceği düşünülmektedir. PON1 geninin kodlayan bölgesindeki Q192R ve L55M polimorfizmlerinin genin ekspresyonunda değişiklik oluşturduğu in vitro, populasyon temelli çalışmalarda gösterilmiş ve bu polimorfizmlerin prostat kanseri oluşumu için yatkınlık oluşturduğu bildirilmiştir. Bu çalışmamızda 120 prostat kanserli ve 100 sağlıklı kişiye ait DNA örneklerinde PON1 Q192R ve L55M polimorfizmlerinin sıklıklarını PZR-RFLP yöntemi ile saptandı. Hasta ve kontrol grupları arasında yapılan Fisher kare testlerinde Q192R polimorfizmi için istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmazken, L55M polimorfizmi istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p= 0,000023$). Prostat kanserli hastalarda LM genotip % 30,43 ve MM genotipi % 5,21 sıklığında görülürken, bu oran sağlıklı kontrollerde LM genotip için % 8 ve MM genotip için % 1 idi. Bu sonuçlar PON1 L55M genotipinin prostat kanser gelişimi için risk artışına neden olduğunu göstermiştir (OR 3,5, %95 GA).

Anahtar Kelimeler: Arildialkilfosfataz; Lipid Peroksidasyon; Oksidatif stres; Organofosfatlar; Arilesteraz

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından T530/21102004 no'lu proje olarak desteklemiştir.

ABSTRACT

Deniz T. Determination Of PON Gene Polymorphism As A Risk Factor In Prostate Cancer Patients. İstanbul University, Institute of Health Science, Anabilim Dalının İngilizce Adı Tezi. İstanbul. 2006.

Enzyme of paraoxonase have been found to related with development of prostate cancer. Especially coding region polymorphisms of Paraoxonase 1 (PON1) gene thought to be effects on tumor angiogenesis. Q192R and L55M polymorphisms have been shown to affect expression levels of PON1 gene in vitro analysis and also in different population based study. PON1 gene polymorphisms were associated with the development of prostate cancer. Therefore we analysed this polymorphisms in prostate cancer and control group. In this study, DNA was obtained from periferial blood samples of prostate cancer patients (n= 120) and control healty males (n= 100). Prostate cancer patients and controls were genotyped by using a PCR and RFLP method. In our study with tested by using the Fisher's exact test, Q192R polymorphism was not statistically associated with increased risk of prostate cancer but L55M polymorphism were statistically associated with increased risk of prostate cancer (p= 0.000023). LM genotype was 30.43 % and MM genotype was 5.21 % in prostate cancer patients and LM genotype was 8 % and MM genotype was 1 % in controls. Our results suggest that PON55/LM and PON55/MM genotypes had a significantly higher risk of prostate cancer (OR 3,5, 95% CI).

Key Words: Aryldialkylphosphatase; Lipid peroxidation; Oxidative stress; Organophosphates; Arylesterase

This study was supported by The Research Support Unit of İstanbul University as the project no T530/21102004.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Günümüzde meydana gelen ölümlerin büyük bir kısmının sebebi kanserlerdir. Bir çok kanser türü çevresel faktörlerle genetik faktörler arasındaki ilişki sonucu ortaya çıkar. Bu kanserlerin gelişimi nedensel açıdan incelendiğinde % 5-10 gibi kısmı genetik faktörlerle açıklanabilirken, % 90-95 gibi bir kısım da diyet, radyasyon, çeşitli kimyasal maddeler gibi çevresel faktörlerle genetik olarak kazanılmış yatkınlığın birlikteliği sonucunda ortaya çıkar (15, 71).

Kansere bireysel yatkınlıkta veya riskli grupların belirlenmesinde; karsinojen metabolizması, DNA tamir mekanizması, somatik hücre mutasyonları, sitogenetik transformasyonlar ve tümör supresör genlerdeki (TSG) değişimler çok büyük önem taşımaktadır (45). Kanser riskini belirlemeye yönelik yapılan çalışmalarda karsinojen-DNA eklentileri, spesifik genlerdeki mutasyon spektrumu, metabolik enzimleri kodlayan genlerdeki polimorfizmler gibi bireysel biyomarkerlar kullanılarak, genel populasyon riski ya da bireysel riskler belirlenebilmektedir (86).

Prostat kanseri özellikle Amerika Birleşik Devletleri (36), Finlandiya (29) gibi sanayisi gelişmiş batı ülkelerinde erkek popülasyonunda genellikle yaygın olarak teşhis edilen kanser türüdür. Kanser kökenli ölümlerde ikinci sırada olup, tüm dünyada dördüncü olarak görülen erkek kanseridir. Prostat kanserinin insidansı ve mortalitesi ırksal, etnik gruplar arasında, ülkeler arasında büyük farklılıklar gösterir (7, 29, 36, 60).

Prostat kanserinin ortaya çıkış sebeplerinin büyük bir kısmı bilinmese de, yapılan araştırmalarda prostat kanserinin gelişiminde, etnik özellikler, genetik özellikler, ileri yaş, androjen metabolizmasının düzensiz çalışması ve beslenme faktörleri gibi çok çeşitli risk faktörleri belirtilmiştir. Prostat kanserinin genetik ve ailevi yönü çeşitli ikiz konkordans çalışmalarında gösterilmiştir. Prostat kanserinin % 42'sinin genetik kökenli olabileceği ve yine, erkeklerde hastalığın başlangıç ve prognozunun belirlenmesinde çeşitli polimorfizmlerin tespitinin erken tanı için önem taşıdığı gösterilmiştir (7, 53, 60, 94).

Paraoksonaz 1 proteinini kodlayan PON1 geninin, kodlayan bölgesindeki, Q192R ve L55M polimorfizmlerinin, gen ekspresyonunu azaltarak, paraoksonaz 1 enziminin aktivitesini düşürebileceği yapılan araştırmalarla gösterilmiş ve bu

değişikliğin prostat kanseri oluşumunda etkili olabileceği düşünülmektedir. İnsanlardaki paraoksonaz (PON1) gen ekspresyonunun çeşitliliği sebebiyle, şüphesiz PON1 polimorfizmlerinin artmış kanser riskleriyle aralarında bağlantı olabileceğini akla getirmektedir (60).

Ülkemizde bu ilişkinin gösterildiği verilerin bulunmaması nedeni ile, bu çalışmada paraoksonaz 1 (PON1) geni Q192R ve L55M polimorfizmleri ile prostat kanseri arasındaki ilişkinin, prostat kanserli hastalarda ve sağlıklı kontrol grubunda araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanserin Tanımı ve Sınıflandırılması

Bireyin sağlıklı bir bütünlük içinde olabilmesi, hücrelerinin büyüme ve çoğalmasının sıkı bir kontrolünü gerektirir. Bazı durumlarda hücreler kontrolü kaybederek büyüme ve çoğalma denetiminin dışına çıkabilirler. Bu tür hücelere “transforme olmuş hücre” denir. İnsan vücudunu meydana getiren hücreler her gün bir çok mutasyona maruz kalmaktadırlar. Mutasyona uğrayan hücre, diğer hücrelerden daha hızlı bölünür ve mutant bir klon oluşur. Kanseri klonal gelişimin bir sonucudur. Kısaca kanser, aşırı bölünme, yayılma ve yayıldığı o bölgelerde klonlaşma özellikleriyle tanımlanabilir. Kanseri artmış hücresel çoğalmanın yanında azalmış hücre ölümü ile karakterizedir.

Kanseri, köken aldıkları doku veya hücre tipine göre sınıflandırılırlar. Epitelial hücrelerinden kökenlenen tümörler “karsinoma”, bağ dokusu ya da kas dokusundan kökenlenen tümörler “sarkoma” olarak adlandırılırlar (5).

Kanser hücrelerinin karakteristik özellikleri :

In vitro :

- a) Kültür ortamında çoğaltıldığında normal hücrelerin aksine birçok farklı fenotipik görünüm gösterirler.
- b) Kültür ortamındaki belli sınırlı miktardaki besin maddesi ve büyüme faktörüne rağmen çoğalmalarını devam ettirirler.
- c) Normal hücrelerde “kontakt inhibisyon” fenomeni vardır. Yani sağında solunda başka hücrelerle yaptığı temastan ötürü çoğalma durur. Kanseri hücrelerinde bu yoktur, çoğalmaya devam ederler.
- d) Normal hücreler kültür flaskının zemininde tek tabaka oluştururlarken kanseri hücreleri birkaç tabaka üst üste oluştururlar.
- e) Normal hücrelerin kültür ortamında çoğalabilmeleri için substrata bağlanmaları gerekir. Kanseri hücreleri çoğalmak için substrata gerek duymazlar.
- f) Glikoliz hızı normal hücelere göre artar.
- g) Hücrede siyalik asit miktarı azalır. Normal hücrede siyalik asit miktarı fazladır ve membrana (-) yük taşıma özelliği kazandırır.

In vivo :

- h) Vücutun bağışıklık sisteminden kaçabilirler
- i) Kanser hücreleri “laminin” adlı zar reseptörleri ile bazal laminaya bağlanırlar. Salgıladıkları kollegenaz enzimi ile bazal laminayı sindirirler. Dolaşım sistemine karışıp buradan bütün vücuda yayılırlar. Bu olaya “metastaz” denir. Normal hücreler ne laminin ne de kollegenaz salgırlar.
- j) İnvazyon (bölgesel yayılım)’ la başka dokular içine yerleşebilirler.

Kansere neden olan etkenler :

- a) Bazı retrovirüslerin hücreleri enfekte etmesi
- b) Genomdaki modifikasyonlar
- c) Onkogenlerin protein ürünlerinin kansere sebep olması
- d) Tümör supresör genlerindeki (TSG) mutasyonlar gibi etkenlerdir.

2.2. Prostat Kanserinin Tanımı ve Sınıflandırılması

2.2.1. Prostat Kanserinin Etiyolojisi ve Klinik Özellikleri

Prostat kanseri, Amerika Birleşik Devletleri ve endüstrisi gelişmiş Batı Avrupa ülkelerinde erkekler arasında tanısı en sık konulan kanser türüdür (94). Kanser sebepli meydana gelen ölümlerde ikinci sırada olup, tüm dünyada dördüncü olarak görülen erkek kanseridir ve artış gösteren bir insidansa sahiptir. Prostat kanseri tanısında ‘‘prostat-spesifik antijen (PSA)’’ in kullanılmaya başlamasından sonra 80’li yılların ortasından 90’lı yılların başlarına kadar olan zaman arasında prostat kanseri insidansında belirgin bir artış görülmüş bir müddet sonra düşmeye başlamıştır . Yapılan PSA testinin yaygınlaşmasıyla lokal-bölgesel hastalık insidansı artarken metastatik hastalık insidansı azalmaktadır .

Prostat kanseri iki formu olan tek solid tümördür. Bunlar histolojik ve klinik olarak gizli seyreden latent formlardır.

2002 yılında yapılan bir araştırmada, prostat kanseri teşhisi konan 189 000 erkek hastanın olduğu ve 30 200 erkek hastanın metastatik prostat kanseri nedeniyle öldükleri bildirilmiş (7, 43, 48, 75). Otopsi incelemelerinde, 30-40 yaş arasındaki erkeklerin % 29’u ve 60-70 yaş arasındaki erkeklerin % 64’ünde küçük prostatik karsinoma bulunduğu rapor edilmiştir (7, 43, 75, 94). Prostat kanseri riski 6’da 1 olup, metastatik prostat kanseri nedeniyle ölüm riski 30’da 1 dir (48). Dijital rektal muayene ve prostat-spesifik antijen (PSA)’lı tarama testi ile lokalize prostat kanserinin erken tedavisiyle birlikte, belirli yaşlardaki belirlenmiş oranlarda, prostat kanseri sebepli ölümlerde azalma meydana geldiği tespit edilmiş (11, 40).

Prostat kanserinin ortaya çıkış sebebinin büyük bir kısmı bilinmese de, yapılan araştırmalarda prostat kanserinin gelişiminde, etnik özellikler, çevresel özellikler, kişinin hayat tarzı, genetik özellikler, ileri yaş, androjen metabolizmasının düzensiz çalışması gibi çok çeşitli risk faktörleri belirtilmiştir. Ayrıca viral veya bakteriyel enfeksiyonlarında prostat kanseri gelişimine yol açabileceği düşünülmüştür (94).

İsveç, Danimarka ve Finlandiya’da 44 788 ikiz çiftleri arasında yapılan kanser riski çalışmasında, prostat kanser hastalarının % 42’sinin kalıtsal nedene dayandırılmasıyla birlikte, geri kalan kısmın çevresel faktörlere dayandırılacağı bildirilmiştir (60, 94).

Prostat bezi, erkeklerde idrar torbasının önünde, idrar yolunu kısmen kavrayacak biçimde bulunan, kestane şeklindeki organdır. Erkek üreme sisteminin önemli bir üyesi olan prostat, erkek üreme hücrelerinin hareket ve bölünme kabiliyetini sağlayan bir salgı oluşturmaktadır. Bu önemli görevi olan organda oluşan ileri prostat kanserlerinin belirtileri olarak, sık idrara çıkma isteği, idrar akımının yavaşlaması yada incilmesi, idrara ve spermaya kan karışması, bacaklarda görülen ödem, siyatik ve kemik ağrısı gibi lokal ağrıları gibi belirtileri sayabiliriz.

Prostat kanseri tanısında patolojik testler önemli olup, Prostat Spesifik Antijen (PSA) testinin bulunması ile prostat kanseri tanısında yeni bir çağ açılmakla birlikte, bu test ile kanser henüz bulgu vermediği erken aşamalarda saptanabilmektedir. Kişinin kanında Prostat Spesifik Antijen düzeyine bakılarak, PSA tetkiki yapılmaktadır. PSA kan testinin sonucu mililitrede nanogram (ng/ml) olarak verilir. PSA testi sonucu ne kadar yüksek çıkarsa, prostat kanseri riski de o kadar fazladır. PSA testi, bir erkeğin prostat kanseri olup olmadığının tahmininde kullanılmakta ancak kesin bir sonuç vermemektedir. Prostat bezi hücreleri tarafından yapılarak kana salınan PSA protein düzeyi için 4 ng/ml'nin altındaki değerler normal olarak değerlendirilirken, 4–10 ng/ml arasındaki değerler sınır ve 10 ng/ml'nin üzerindeki değerler yüksek değerler olarak kabul edilir (Tablo 2.1).

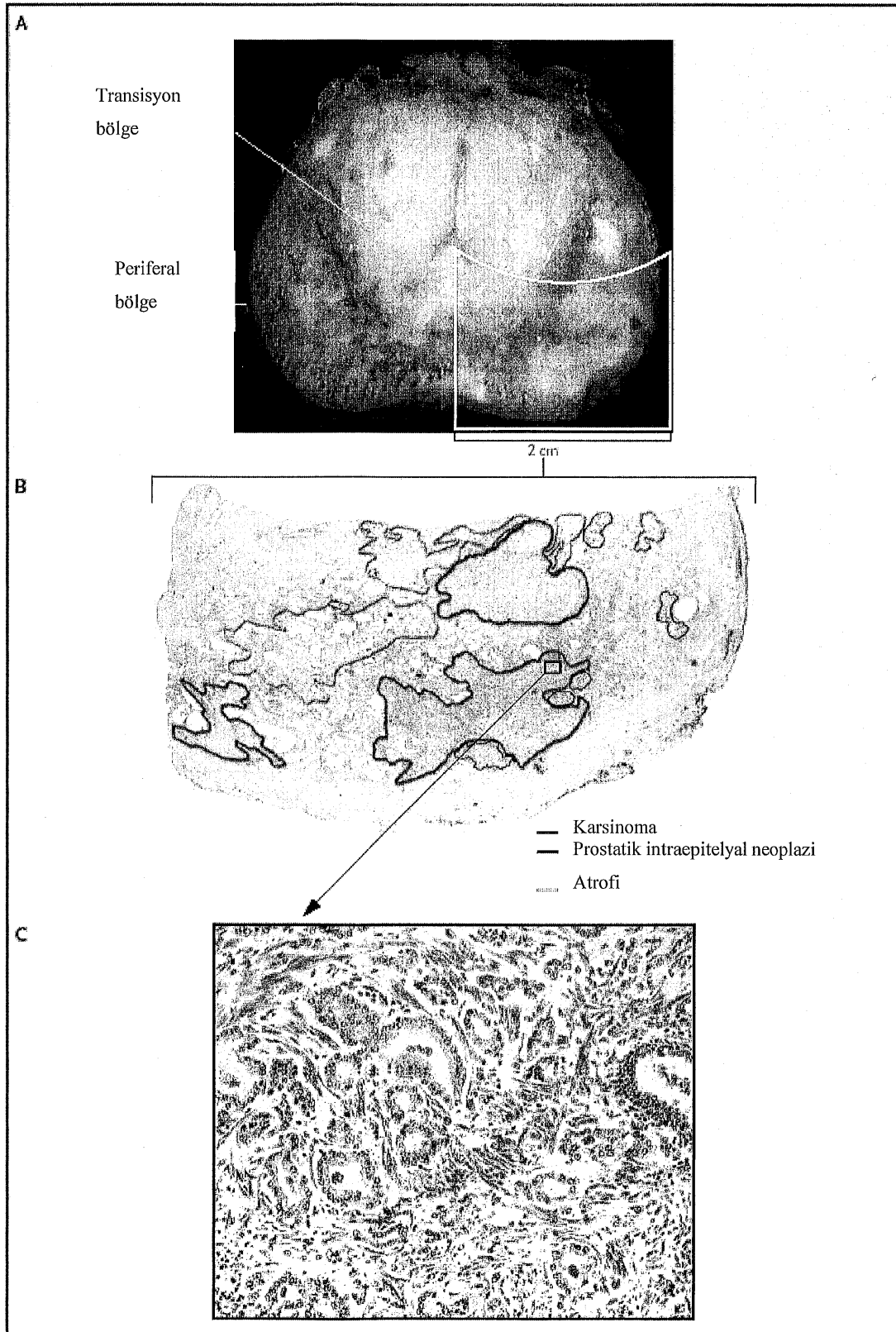
Tablo 2.1- PSA protein düzeylerinin değerlendirilmesi.

< 4 ng/ml	NORMAL
4 – 10 ng/ml	SINIR
10 ng/ml <	YÜKSEK

PSA tanıda tamamlayıcı rol oynasa da, kişide prostat kanserinden şüphe ediliyorsa biyopsi yapılması gerekmektedir. Eğer kişiye kanser tanısı konulursa *Gleason Score* ile kanserin ilerleme derecesi evrelendirilir (*Gleason Score* 6 ve üstü ayrıca 20-30 ng/ml PSA seviyesi saptanmışsa, bu durum kanserin prostat bezi dışınada yayıldığını göstermektedir).

Klinik olarak kanserin evrelendirilmesinde en çok kullanılan T1, T2, T3, T4 evreleme sistemidir. T1-T2'de kanserin prostat bezinde sınırlı kaldığını, T3 yakın dokularada metastaz yaptığını, T4'de uzak organlara da metastaz yaptığını gösterir.

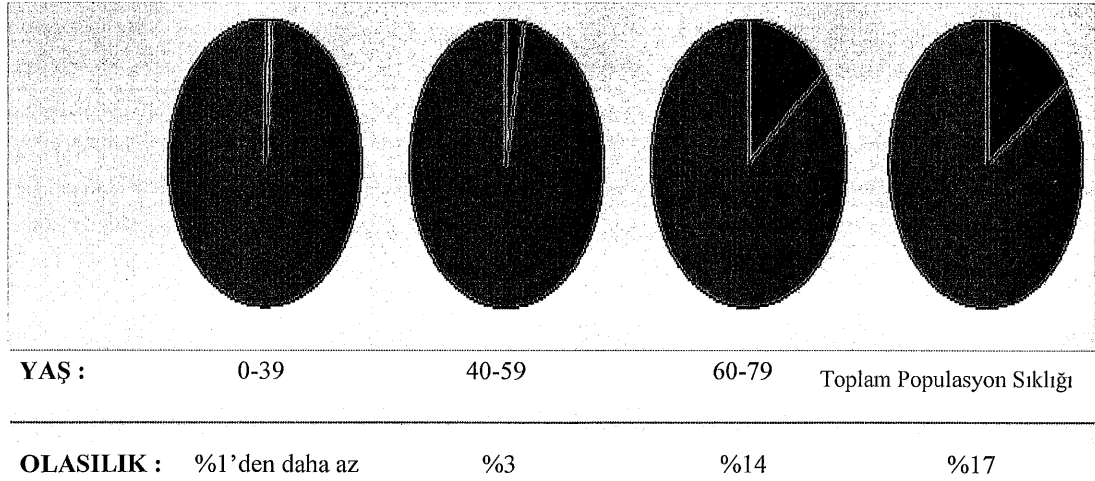
Prostatın periferal bölgesindeki gelişen atrofının çoklu odak noktası, yüksek-seviyede prostatik epitel hücreleri arasındaki neoplazi ve prostatik karsinoma oluşumu şekil 2.1'de belirtilmiştir. Şekil 2.1'in A bölgesinde radikal prostatektomiden sonra prostatın bir kısmı görünmektedir. Soluk sarımtırak kısımlar kanserli alanlar dır. Şekil 2.1'in B ve C bölgesinde ise A'da işaretlenen bölgenin hematoksin ve eozin ile boyanmasından sonraki, sırasıyla düşük ve yüksek-büyütmeli mikroskopik görüntüleri görülmektedir. Bununla birlikte transisyon bölgesinde çoğunlukla (>%90) *benign* prostatik hiperplazi gelişen yerler olduğu ve periferal bölgede çoğunlukla (>%70) prostat kanserinin geliştiği yerler olduğu bildirilmiştir (94).



Şekil 2.1- Prostatın periferal bölgesindeki atrofının çoklu odak noktası, neoplazi ve prostatik karsinoma (94).

2.2.2. Prostat Kanserinde Yaşın Önemi

Prostat kanserinin yaşla önemli bağlantısı bulunur. Genelde yaşlı erkeklerin hastalığı olarak bilinse de, erken yaşlarda da ortaya çıkabilmektedir. Kişilerde 50 yaşından sonra prostat kanser insidansı katlanarak artmaktadır. Yaşlara göre oranlama yaparsak, 40 yaşın altında prostat kanseri gelişmiş olması riski 1/10 000 iken, 40-59 yaş arasında 1/39'a yükselmekte ve 60-79 yaş arasında da 1/7 olarak görülmektedir (Şekil 2.2) (47).



Şekil 2.2- Prostat kanseri gelişme olasılığının yaşla birlikte dramatik artışı (47).

2.2.3. Prostat Kanserinde Çevresel Faktörlerle Etnik Özellikler

Epidemiyolojik bulgular, insanlarda prostat kanseri gelişiminde çevresel faktörlerin majör katkıda bulunduğunu destekler. Prostat kanseri insidansı önemli ölçüde değişkenlik gösterir.

Prostat kanseri insidansı ve mortalitesi yüksek olan Amerika Birleşik Devletleri ve Batı Avrupa'da siyah erkeklerin (özellikle Amerika'da yaşayanların) en yüksek insidans ve mortalite oranına sahip olduğu, halbuki en düşük oranı Asyalıların gösterdiği belirtilmiştir (43). Yalnız Kuzey Amerika'ya göç eden Asyalılar arasında, çevre ve yaşam tarzını kapsayan faktörler yüzünden prostat kanser riski artış gösterir (39, 79, 92, 94). Araştırmalarda Amerika Birleşik Devletleri'deki siyah erkekler arasında prostat kanseri insidans ve mortalitesi, beyaz ırka mensup olan insanlarınkinden de daha yüksek olduğu ve prostat kanserinin metastatik formunu daha geniş ölçüde gösterdikleri saptanmıştır. Uzak doğuda yaşayanların batı ülkelerinde yaşayanlara göre yaklaşık olarak 10/100 oranda daha az yakalanma riskine sahip.

2.2.4. Prostat Kanserinin Genetik Temeli

Lichtenstein ve ark. (53), Page ve ark. (70), Ahlbom ve ark. (4), Gronberg ve arkadaşlarının (38) yapmış oldukları ve benzer olarak yapılan çalışmalarda, insanlardaki diğer kanser türlerine nazaran, prostat kanseri riskinde yeralan kalıtsal öğelerin prostat kanseri oluşumunda önemli derecede etken olduğu, monozigotik ve dizigotik ikizlerdeki araştırmalarla ortaya çıkarılmıştır (4, 38, 53, 70, 94). Steinberg ve arkadaşları incelenen prostat kanserli erkek hastaların çoğunluğunun, hastalığa yakalanmış erkek kardeş veya babaya sahip olduklarını ve sonuç olarak birinci derecede akrabalarından etkilenmiş bir, iki, veya üç aile bireyinin bulunuşunun, prostat kanser riskini, sırasıyla, yaklaşık olarak, 2, 5, 11 kat arttırabileceğini bildirmişler (84) ve bu yapılan diğer çalışmalarla da teyit edilmiştir (34, 35, 52, 64, 73, 81, 93, 94). Böylece prostat kanseri riskinin ailevi olarak arttığı ve babalarında veya erkek kardeşlerinde prostat kanseri bulunan erkek bireylerin prostat kanserine yakalanma risklerinin önemli derecede arttığı açıkça gösterilmiştir.

Kompleks segregasyon analizleri, 55 yaşından önce kanser olduğu belirlenen hastaların çoğunda nadir görülen otozomal dominant allellerin kalıtılmasıyla, prostat kanserinin erken yaşta başlangıç göstermesinde sebep olabileceğini akıllara getirdi (16, 37, 77, 88, 94). Bazı çalışmalarda da ileri yaşta prostat kanseri tanısı almış ailelerde, X'e bağlı geçiş gösteren allelin sorumlu olabileceğini akıllara getirdi (23, 63, 94). Ailevi prostat kanserinin ilk moleküler genetik çalışmasında, belirlenmiş bazı bağlantı bölgeleri, polimorfik markörler olarak kullanıldı; kromozom 1q24-25 bölgesinde tanımlanan, herediter prostat kanseri (HPC1) geninin lokusu ayrıntılarıyla incelendi (80). Bazı analizler HPC1 ve prostat kanseri arasında bağlantı olduğunu onaylasa da bunun gösterilmediği çalışmalar da mevcuttur (69).

2.2.4.1. Kalıtsal Prostat Kanseri

Prostat kanser olgularının yaklaşık olarak % 10'luk kısmının kalıtsal prostat kanseri sınıfı içinde bulunduğu düşünülmektedir.

Kalıtsal prostat kanserlerinden sorumlu olan genler, RNASEL, MSR1, AR, CYP17, SRD5A2 dir (94).

HPC1 geniyle bağlantısı olduğu bulunan, RNASEL geni geniş ölçüde eksprese olan, viral ve hücrel RNA'nın degrade edilip RNA-bozulma olayının gerçekleşmesinde rol aldığı düşünülen, *latent* endoribonükleazı şifreler. RNASEL öncü metionin kodonunu etkileyen baz yer değiştirmesi mutasyonu, bir ailedeki prostat kanserli dört erkek kardeşte ve başka bir ailedeki prostat kanserli altı erkek kardeşin dördünde saptandı. Aynı mutasyon başka bir çalışma sonucunda, ailevi prostat kanserli hasta erkeklerin % 4,3'ünde görülürken, kontrol grubunda bu oran % 1,8 di. RNASEL genindeki diğer bir mutasyon, kodon 157'deki delesyondur; kodon 157 delesyonlu RNASEL alleli, Eşkenazi Yahudi popülasyonundaki prostat kanserli hastaların % 6,9'unda belirlenirken, prostat kanseri olmayan yaşlı erkeklerin % 2,9'unda saptanmıştır. Böylece daha az aktif enzimi kodlayan RNASEL'in mutant formu artmış prostat kanser riskiyle ilişkilendirilmiştir (74, 91, 94).

Prostat kanserinden sorumlu aday gen olarak gösterilen MSR1 (makrofaj-temizleyici reseptör1) geni 8p22'de tanımlanmıştır. MSR1 geni serumda oksitlenmiş yüksek-yoğunluklu lipoprotein, düşük-yoğunluklu lipoprotein, bakteriyel lipopolisakkarid ve lipoteikoik asit kapsayan çeşitli ligandları bağlayabilme kapasitesine

sahip, makrofaj-temizleyici reseptörün subformlarını kodlar. Araştırmalar sonucunda, MSR1 mutasyonlu hücre soyunun bazı ailelerdeki herediter prostat kanserine bağlantısı kurulurken, mutant bir MSR1 alleli herediter prostat kanseri olmayan erkeklerin yaklaşık % 3'ünde etkilenmemiş erkeklerin % 0,4'ünde saptandı (94, 97).

Androjen etki mekanizması ile ilişkili androjen-reseptör (AR) geni, sitokrom P-450c17 (CYP17) geni ve steroid-5- α -reduktaz tip II (SRD5A2) olarak adlandırılan üç genin polimorfik varyantlarının, yapılan genetik epidemiyolojik çalışmalarda prostat kanseri gelişim riski ile etkili oldukları bulunmuştur. Androjen reseptörünü kodlayan AR geninde polimorfik poliglutamin (CAG) tekrarlarının mevcuttur. Yapılan fonksiyonel çalışmalar, kısa poliglutamin tekrarlarının artmış androjen-reseptör transkripsiyonel transaktivasyon aktivitesiyle ilişkili olabileceğini göstermiştir (94). Nispeten yüksek prostat kanseri riskine sahip, siyah Amerikalı'ların daha kısa androjen-reseptör poliglutamin tekrarlarına sahip olmaya yatkın oldukları, halbuki nispeten düşük prostat kanseri riskine sahip Asya'luların daha uzun androjen-reseptör poliglutamin tekrarlarına sahip olmaya yatkın oldukları saptanmıştır. Birtakım genetik epidemiyolojik çalışmalar artmış prostat kanseri riski ve kısa androjen-reseptör poliglutamin tekrarlarının varlığı arasındaki kolerasyonu göstermiştir, ancak diğer çalışmalarda benzer ilişki gösterilememiştir (13, 94). Polimorfik poliglisin (GGC) tekrarları AR'nin karakteristik özelliği olup, prostat kanseri riskine etki edebileceği bildirilmiştir (18, 82, 94).

CYP17 cinsiyet-steroid biyosentezindeki kilit reaksiyonları katalizleyen enzim sitokrom P-450c17 α 'yı kodlar. CYP17 allel varyantının prostat kanseriyle bağlantısı için yapılan, hem populasyon hem de genetik-bağlantı analizlerinin bir kısmında tutarsız sonuçlar çıksa da yapılan bazı bağlantı analizi verileri CYP17 allel varyantının prostat kanseriyle bağlantısını düşündürmektedir (17, 18, 94).

SRD5A2 prostatta testosteronu daha etkili olan dihidrotestosterona dönüştüren enzim olan, 5- α -reduktaz'ın predominant izozimini kodlamaktadır. SRD5A2'nin tanımlanan iki polimorfik varyantının, prostat kanserli erkekler için artmış prostat kanseri riski ile zayıf prognoz olarak bağlantısı kurulmuştur. Yapılan çalışmalar sonucunda AR, CYP17 ve SRD5A2'ye ilaveten bazı başka genlerin polimorfik varyantlarının da olası prostat kanseri riskine iştirak edebilecekleri bildirildi (18, 94). Familial prostat kanseriyle ilişkili genler Tablo 2.2'de belirtilmiştir.

Tablo 2.2- Familial prostat kanseriyle ilişkili genler. Tablodaki X sessiz mutasyonu ifade eder (94).

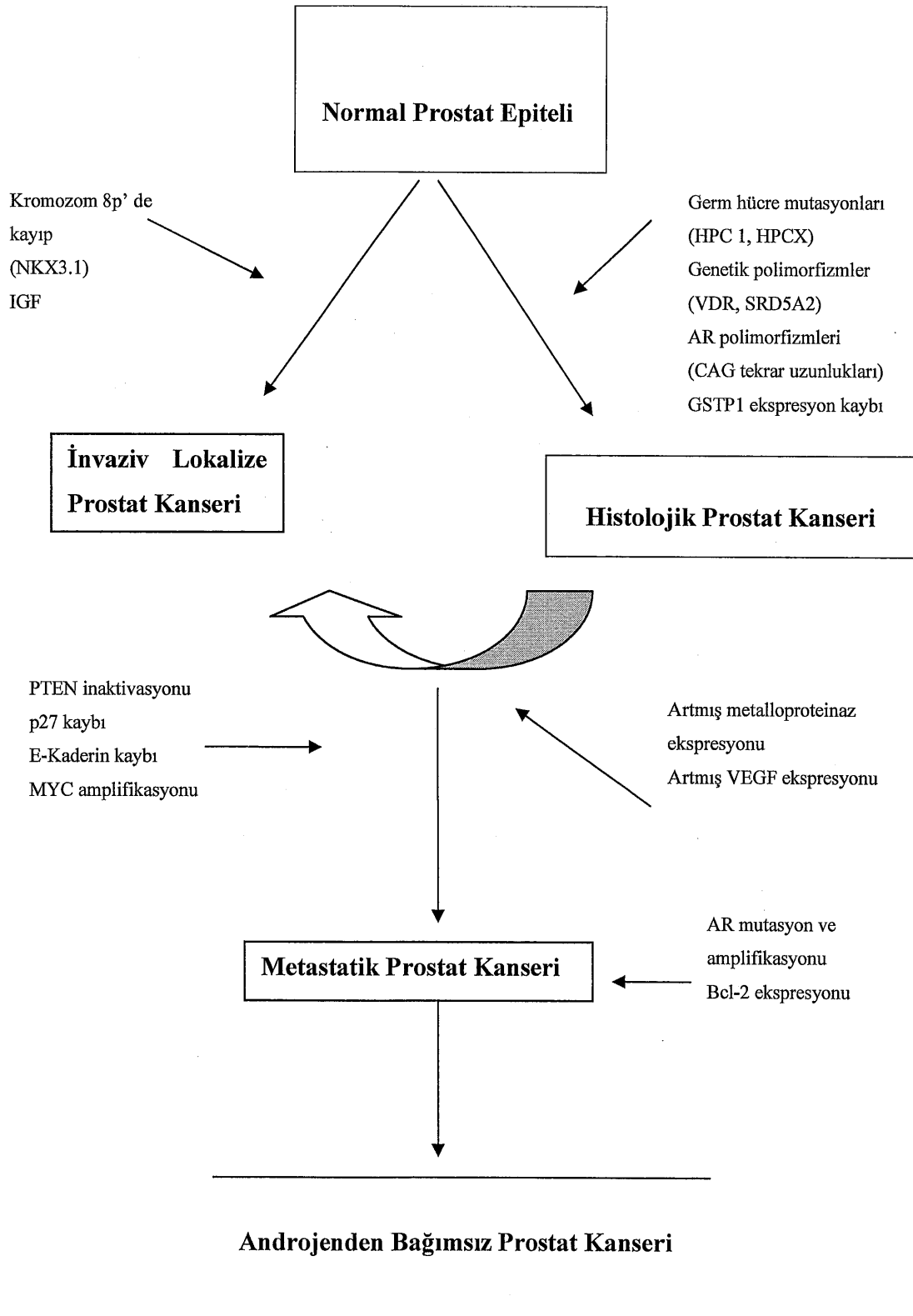
Gen	Lokalizasyon	Değişimler	Fenotipik Sonuçlar
<i>RNA5EL</i>	1q24-25	Baz yer değişimleri Met11le, Glu265X, Arg462Gln allellerine yol açar;Kodon 157'deki dört-baz delesyonu kodon 164' te erken protein trunkasyonuna neden olur.	İnterferon-indükleyici 2', 5'-oligoadenilat-bağımlı RNA-yıkma yolağına katılan endoribonukleazı kodlar; <i>RNAseL</i> -/- farelerde interferon- α antiviral aktivite azalmış.
<i>ELAC2</i>	17p11	Baz insersiyonu kodon 157' den sonra 67.amino acitte erken sonlanmaya yol açar;Baz yer değişimleri Arg781His, Ser217Leu, Ala541 Thr allellerine yol açar.	Bilinmiyor
<i>MSR1</i>	8p22	Baz yer değişimleri Arg293X, Pro36Ala, Ser41Tyr, Val113Ala, Asp174Tyr, Gly369Ser, His441Arg allellerine yol açar.	Sınıf A makrofaj-yıkıcı reseptörün altbirimlerini kodlar; <i>Msr-A</i> -/- farelerde <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> , Herpes simplex virüs tip 1 ağır enfeksiyonlarına karşı hassasiyetin artmış olduğu gözlenmiş.
<i>AR</i>	Xq11-12	Polimorfik poliglutamin (CAG) ve poliglisin (GGC) tekrarları	Androjen reseptör, androjen-bağımlı transkripsiyon faktörü kodlar;Farklı polimorfik alleller birbirinden farklı transkripsiyonel transaktivasyon aktiviteleriyle bağlantılı olabilmektedir.
<i>CYP17</i>	10q24.3	Transkripsiyonal promotordaki baz yer değişimleri (T→C transisyonu yeni Sp1 tanınma yerine yol açar.)	Cinsiyet-steroid biyosentezinde kilit reaksiyonları katalizleyen enzim olan, P-450c17 α' yı kodlar.
<i>SRD5A2</i>	2p23	Baz yer değişimleri Val89Leu ve Ala49Thr allellerine yol açar.	Prostatta testosteronu dihidrotestosterona dönüştüren predominant 5- α -reduktazı kodlamaktadır.

Prostat kanseri gelişimine yatkınlık oluşturan diğer bazı yüksek riskli genlerde tanımlanmıştır. Bu riski oluşturan genlere örnek olarak, 17p kromozomu üzerinde yer alan *ELAC2/HPC2* (32, 96), kromozom 1q24-25 üzerindeki *HPC1* (32, 74), Xq27-28'de yer alan (X'e bağlı geçiş gösteren) *HPCX* (32, 85), kromozom 1q42.2-43 üzerinde yer alan *PCAP* (32, 59) verilebilir.

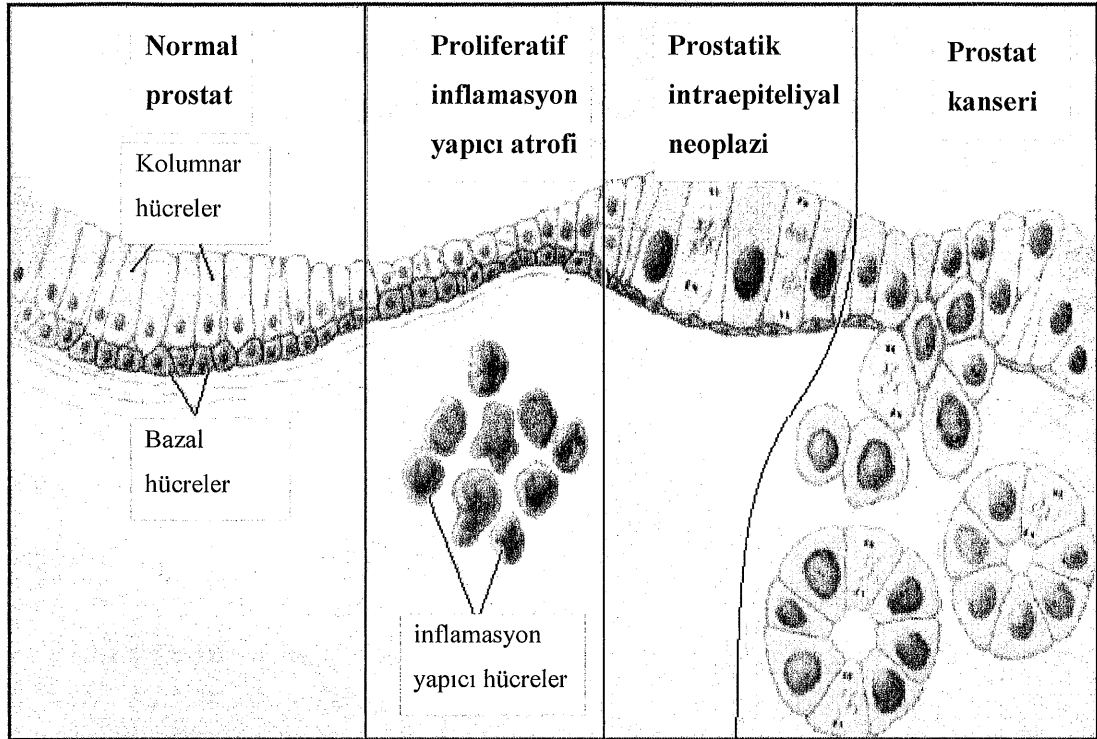
2.2.4.2. Sporadik (Kalıtsal Olmayan) Prostat Kanseri

Prostat kanseri vakalarının % 90'dan fazlasının herediter olmayan sınıfta içinde yer aldığı düşünülmektedir.

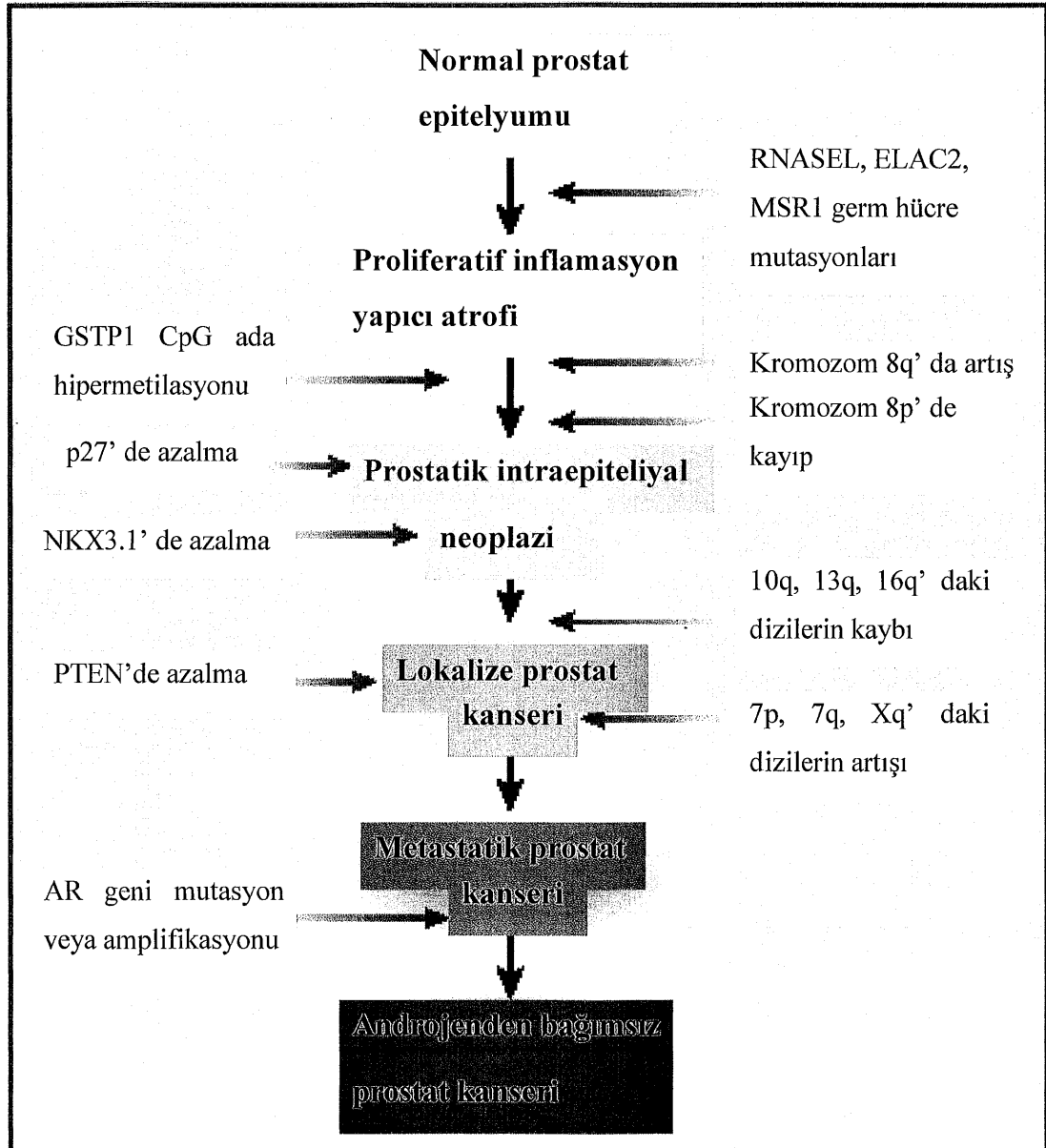
Prostat kanserinde somatik gen bozukluklarından bahsederseniz; prostat-kanser hücreleri bir çok somatik mutasyonlar, gen delesyonları, gen amplifikasyonları, kromozomal yeniden düzenlemeler ve DNA metilasyonunda değişiklikler içerir (Şekil 2.3, Şekil 2.4, Şekil 2.5, Tablo 2.3). Bu değişimler yıllar geçtikçe çoğalarak birikir (75, 94). Çoğunlukla 7p, 7q, 8q (prostat kanserlerinde en sık rastlanan 8. kromozomun uzun kolunda bulunan myc geninde amplifikasyon olup, bu artış metastaz riskini de arttırmaktadır) ve Xq'da artma ve 8p, 10q, 13q ve 16q'da kayıplar olarak kromozomal anormallikler şeklinde ortaya çıktığı bildirilmiştir (27, 94). Kromozomal anormalliklerde dikkat çeken heterojenlik farklı hastalarda, aynı hastada farklı lezyonlarda ve aynı lezyon içinde farklı alanlarda görülmüştür.



Şekil 2.3- Prostat kanserinin doğal seyiri ile ilişkili genetik değişikliklerin kısa bir özeti.



Şekil 2.4- Prostatik intraepiteliyal neoplaziye öncü olan proliferatif inflamasyon yapıcı atrofi ve prostat kanseri (94).



Şekil 2.5- Prostat kanserinin moleküler patogenezi (94).

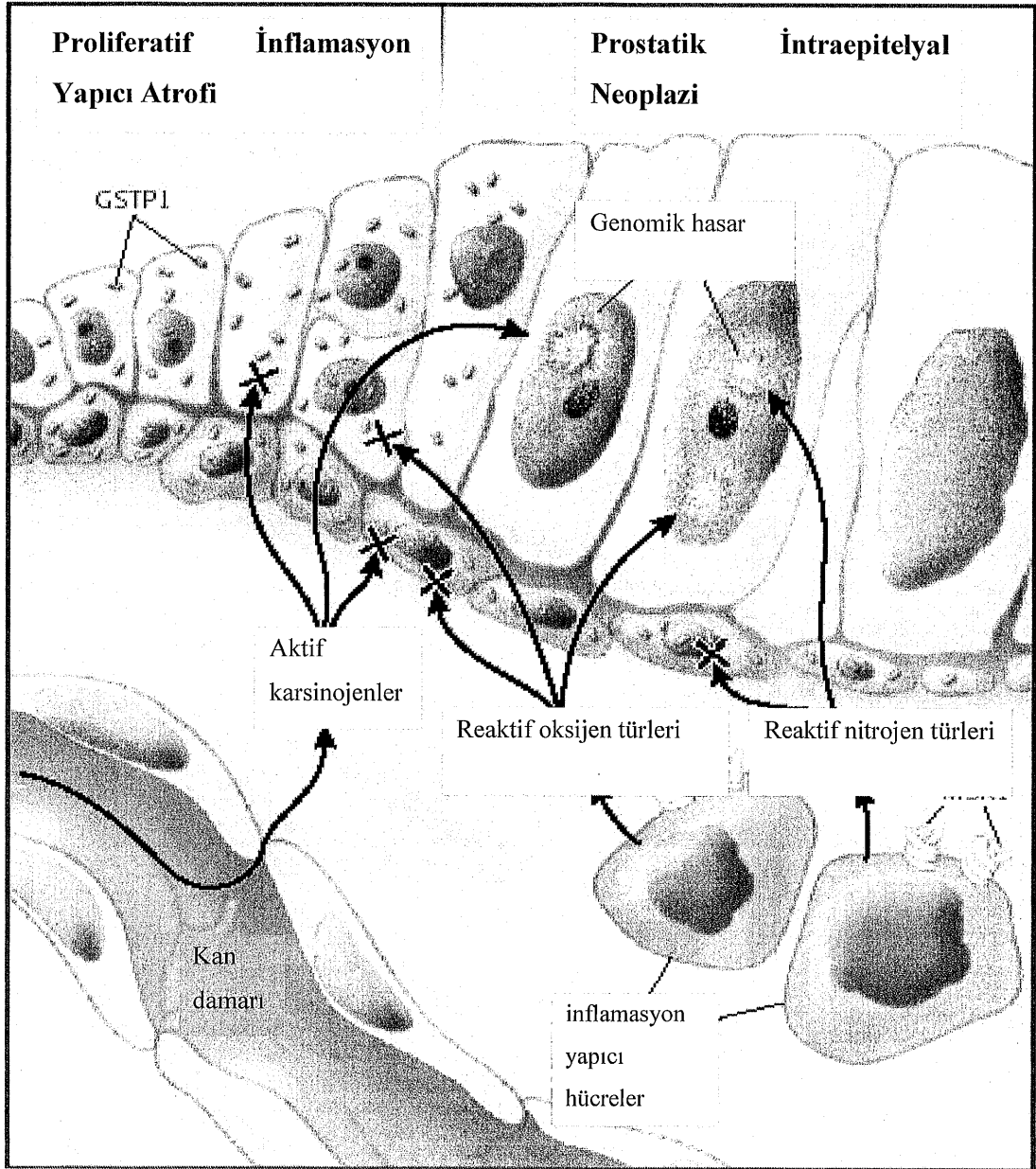
Tablo 2.3- Prostat kanserlerinde somatik gen değişimleri. TRAMP prostat kanserli transgenik fareleri ifade eder (94).

Gen	Lokalizasyon	Değişimler	Fenotipik Sonuçlar
<i>GSTP1</i>	11q13	CpG ada hipermetilasyonu (azalmış ekspresyon)	Karsinojen-detoksifikasyon enzimini kodlar; <i>Gstp1/2-/-</i> fareler topikal karsinojenlere maruz kaldıklarında artan deri tümörü gelişmesi göstermişlerdir.
<i>NKX3.1</i>	8p21	Allelik kayıplar (azalmış ekspresyon)	Normal prostat gelişimi için gerekli olan prostat-spesifik <i>homeobox</i> genini kodlar; <i>Nkx3.1+/-</i> ve <i>Nkx3.1-/-</i> farelerde prostatik hiperplazi ve displazi gözlenmiştir.
<i>PTEN</i>	10q23.31	Allelik kayıplar, mutasyonlar, muhtemel CpG ada hipermetilasyonu (azalmış ekspresyon, fonksiyon veya her ikisi de)	Protein ve lipid substratlarına karşı etkili fosfatazları kodlar; <i>Pten+/-</i> farelerde prostatik hiperplazi ve displazi gözlenirken, prostatik intraepitelyal neoplazi <i>Pten+/-</i> <i>Nkx3.1+/-</i> ve <i>Pten+/-Nkx3.1-/-</i> farelerde gelişmiş, <i>Pten+/-</i> -TRAMP farelerde azdır.
<i>CDKN1B</i>	12p12-13	Allelik kayıplar (azalmış ekspresyon)	p27, siklin-bağımlı kinaz inhibitörü kodlar; <i>Cdkn1b-/-</i> fareler prostatik hiperplaziye sahipken, <i>Pten+/-Cdkn1b-/-</i> farelerde prostat kanseri gelişmektedir.
<i>AR</i>	Xq11-12	Amplifikasyon, mutasyonlar (artmış ekspresyon, değişmiş fonksiyon)	Androjen reseptörü kodlar; <i>Pb-mAR</i> transgenik farelerde prostatik hiperplazi ve prostatik intraepitelyal neoplazi gözlenmiştir.

GSTP1

Araştırmacılar II-tipi glutatyon S-transferaz (GSTP)'ı kodlayan GSTP1'in promotör bölgesi CpG dizilerinin hipermetilasyonunun, prostatik karsinogenezi süresince genom-zarar verici strese, artmış genomik dengesizliğe maruz kalmaya yol açabileceği bağlantısını kurmuşlardır (68, 94). Glutatyon-S-transferaz Pi (GSTP) serbest radikaller gibi reaktif oksijen ürünlerini inaktive eden koruyucu bir enzim olup, GSTP ekspresyonunun bütün prostat intraepitelyal neoplazi ve prostat kanseri vakalarında görölmediği bildirilmiştir (62, 94). Normal prostat epitelyumunda, bazal hücrelerde

GSTP1 eksprese olup, kolumnar salgı yapan hücrelerde olmamasına rağmen enzim kolumnar epitelyal hücrelerde indüklenerek genom-zarar verici streslere maruz kalmaya neden olabilir. Buna karşın enzimin prostat-kanser hücrelerinde seyrek olarak bulunduğu ileri sürülmüştür. Prostat kanser hastalarının % 90'ından fazlasında, prostat-kanser hücrelerinde GSTP1'in bulunmaması GSTP1'de CpG ada dizilerinin hipermetilasyonuna ve bu somatik değişimin GSTP1'in transkripsiyonunu engellediği sonucuna varılmıştır. GSTP1'in bulunmayışı ve GSTP1'de CpG ada dizilerinin hipermetilasyonu prostatik intraepitelyal neoplazideki hücrelerin önemli bir özelliği olduğu ve bu özelliklerin prostat kanserinin belirtileri olduğu fikrine varılmıştır (54, 94). Prostat kanseri gelişimi süresince inaktive olmuş GSTP1 allellerini taşıyan hücrelerin biriktiği saptanmış, buna rağmen incelemeler GSTP1'in bir tümör-supressör gen gibi rol oynamadığını göstermiştir. GSTP1'in *caretaker* (bekçi) gen (51, 94) olarak işe yaradığı ve çeşitli karsinojenlerin (PhIP : 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo-[4,5-b]pyridine, çeşitli oksidanlar gibi) meydana getirdiği genomik hasara karşı prostat hücrelerini koruduğu düşünülmektedir (67, 94) (Şekil 2.6).



Şekil 2.6- Prostat hücrelerinde GSTP1 *caretaker* aktivite kaybı ve karsinojenler aracılı artmış genomik hasar savunmasızlığı. Besin karsinojenleri, karaciğer tarafından aktive edilen sitokrom P-450 enzimler ile ve oksidan karsinojenler, inflamasyon yapıcı hücreler (trimerik makrofaj-yıkıcı reseptör MSR1 olarak ifade edilerek belirtilen) tarafından ayrıntılı olarak dikkatle işlenip, bazal epitelyal hücrelerde ve π -cins glutasyon S-transferaz (GSTP1) tarafından proliferatif inflamator atrofi hücrelerinde detoksifiye edilebilir. Prostatik intraepitelyal neoplazi hücreleri GSTP1'den yoksun olup, karsinojenler aracılı genomik hasara uğramaktadır. Şekildeki kırmızı X'ler karsinojenlerin engellenmesi ve detoksifikasyonunu belirtmektedir (94).

NKX3.1

NKX3.1 kromozom 8p21'de lokalizedir. Büyük olasılıkla normal prostat gelişiminde gerekli olduğu için aday *gatekeeper* gen olup, prostat-spesifik *homeobox* genini kodlar. NKX3.1 DNA'yı engelleyerek PSA geninin ekspresyonunu baskılar. Yapılan çalışmalarda bir veya iki alleli etkilenmiş fareler prostatik epitelyal hiperplazi ve displazi gösterdi. Bazı çalışmalarda 8p21'deki DNA dizi kayıplarının (delesyon) prostat kanseriyle ilişkisi olabileceği düşünülse, prostat kanser progresyonunda NKX3.1 ekspresyon kaybının bağlantısının olamayacağını gösteren çalışmalarda bulunmaktadır (1).

PTEN/Akt

PTEN 10q23.31'e lokalizedir. Lokalize prostat kanserleri ve metastatik prostat kanserlerinde PTEN değişiklikleri saptanmış olup, prostat kanserlerinde kromozom 10q'daki heterozigosenin kaybı oldukça sık rastlanan genetik bir değişikliktir. Prostat kanseri progresyonu süresince protein ve lipid substratlarına karşı aktif fosfatazları kodlayan bir tümör supresör genidir. (65, 89, 94). Normal epitelyal hücrelerde, prostatik intraepitelyal hücrelerde PTEN mevcuttur; fakat prostat kanserlerinde sık olarak özellikle çok ilerlemiş olanlarında PTEN düzeyi düşüktür (61, 94).

Prostat kanserlerinde yaygın olarak PTEN ve NKX3.1'in her ikisinde de somatik allelik kayıpları ortaya çıkarılmıştır. Bununla birlikte PTEN ve NKX3.1'in yalnız birinin yetersizliğinin bile prostat hücrelerinin anormal proliferasyonuna öncülük edebileceği bildirilmiştir (94).

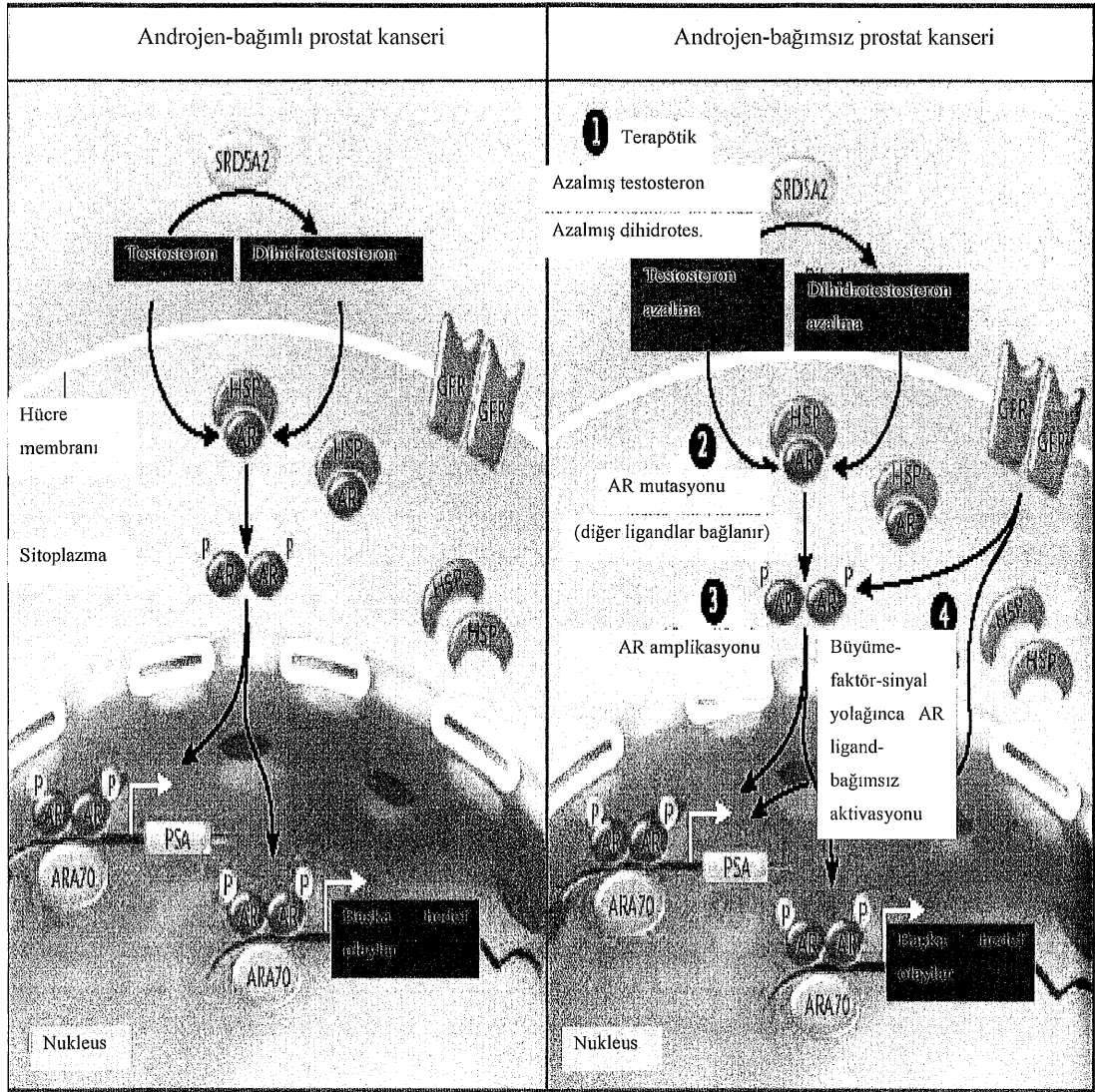
CDKN1B

Prostat kanserlerinde, özellikle daha kötü prognoz gösteren prostat kanserlerinde CDKN1B geni tarafından kodlanan siklin-bağımlı kinaz inhibitörüyle p27 seviyesinde azalma yaygındır (98). Kromozom 12p12-13'te DNA dizilerinin kaybı lokalize prostat kanserlerinin % 23'ünde, bölgesel lenf düğümlerinde prostat kanser metastazlarının % 30'unda tanımlanmıştır (50). PI3K-Akt sinyal yolağı ile p27 seviyesi baskılandığı ve PI3K-Akt engellenmesiyle, PTEN CDKN1B, haberci RNA, p27 protein düzeylerini arttırabilmektedir. Bu sebeple, düşük p27 seviyeleri PTEN fonksiyon kayıpları,

CDKN1B değişimlerinin bir sonucudur. Fare modellerinde de bu etkileşimler incelenmiş ve desteklenmiştir (26).

Androjen Reseptörü (AR)

Prostat kanserinin hem androjen-bağımlı hem de androjen-bağımsız iki formu vardır. Androjenlerin kanser hücreleri içindeki etkilerini engelleyen bir dizi ilaçlar olsada ne yazık ki kanser çoğunlukla androjen-bağımsız hale gelir ve hormonun yokluğunda da hücreler büyümelerini sürdürürler. Metastatik prostat kanserleri genellikle antiandrojenler, androjen baskılamasıyla tedavi edilsede çoğunlukla androjen-bağımsız prostat kanserinin hücrelerinin ortaya çıkması kaçınılmaz olabilmektedir (Şekil 2.7). Androjenlerin yokluğunda reseptörlerin androjen-bağımsız prostat kanseri hücrelerinin proliferasyonunu harekete geçirdiğine dair kanıtlar mevcuttur. Androjen reseptörlerin aşırı ekspresyonuna eşlik eden AR amplifikasyonu, androjenlerin düşük düzeydeki sirkülasyonuna prostat-kanser hücrelerinin duyarlılığının artışıyla androjen-bağımsız prostat-kanser hücrelerinin büyümesine öncü olabileceği fikrini düşündürmüştür (94, 99).



Şekil 2.7- Antiandrojenler, Androjenden mahrum edici tedavi (veya her ikisi) süresince prostat kanserinin androjen-bağımsız prostat kanserine progresyonu. Testosteron ve dihidrotestosteronun seviyelerindeki terapötik indirgemenin ardından (1), androjen reseptörünün (AR) ligand-bağlanma yerindeki mutasyonlar ile androjen-bağımsız prostat kanserinin ortaya çıkması arasında ilişki kuruldu ve bu da diğer ligandlar tarafından reseptör aktivasyonuna olanak sağlar (2), androjen reseptörlerinin azalmış ekspresyonuna eşlik eden AR amplifikasyonu (3) ve ligand-bağımsız androjen-reseptör aktivasyonu (4). GFR büyüme-faktör reseptörü, PSA prostat-spesifik antijeni, HSP ısı-şok protein, P fosfat, SRD5A2 steroid-5- α -reduktaz tip II ve ARA70 androjen-reseptör-bağlantılı protein 70'ni ifade eder (94).

p53

En önemli tümör süpresör genlerden biri olan p53 mutasyonu radikal prostatektomi ve radyoterapide kötü prognozla ilişkilidir. Yapılan incelemelerle bu genin kaybı, mutasyonu lokal ileri tümörlerde ve metastatik tümörlerde gösterilmiştir (83, 94).

myc

Kromozom 8q üzerindeki genlerdeki artış metastaz riskini arttırıp, myc geni (8q24 üzerinde lokalize) lokal ileri tümörlerde ve metastatik tümörlerde artış göstererek büyür ve salınımı önemli derecede artar (95).

p27

12p12'de lokalize olan tümör süpresör gen olup, radikal prostatektomili hastalarda bu genin ekspresyonunun kaybı gözlemlenmiştir (98).

bcl-2

Hücre ölümünü önleyen bir onkogen olup, prostat hücrelerinin çoğunluğunda (bilhasa androjen bağımsız olanlarda) salınmaktadır (90).

VEGF (Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü)

Kanserlerde salınılan en aktif proanjyogenik gen olan VEGF, prostat kanseri vakalarının çoğunluğunda salınır ve prostat kanseri derecesiyle artmış vasküler endotelial büyüme faktörü salınımı arasında önemli derecede ilişki saptanmıştır (78).

E-Kaderin

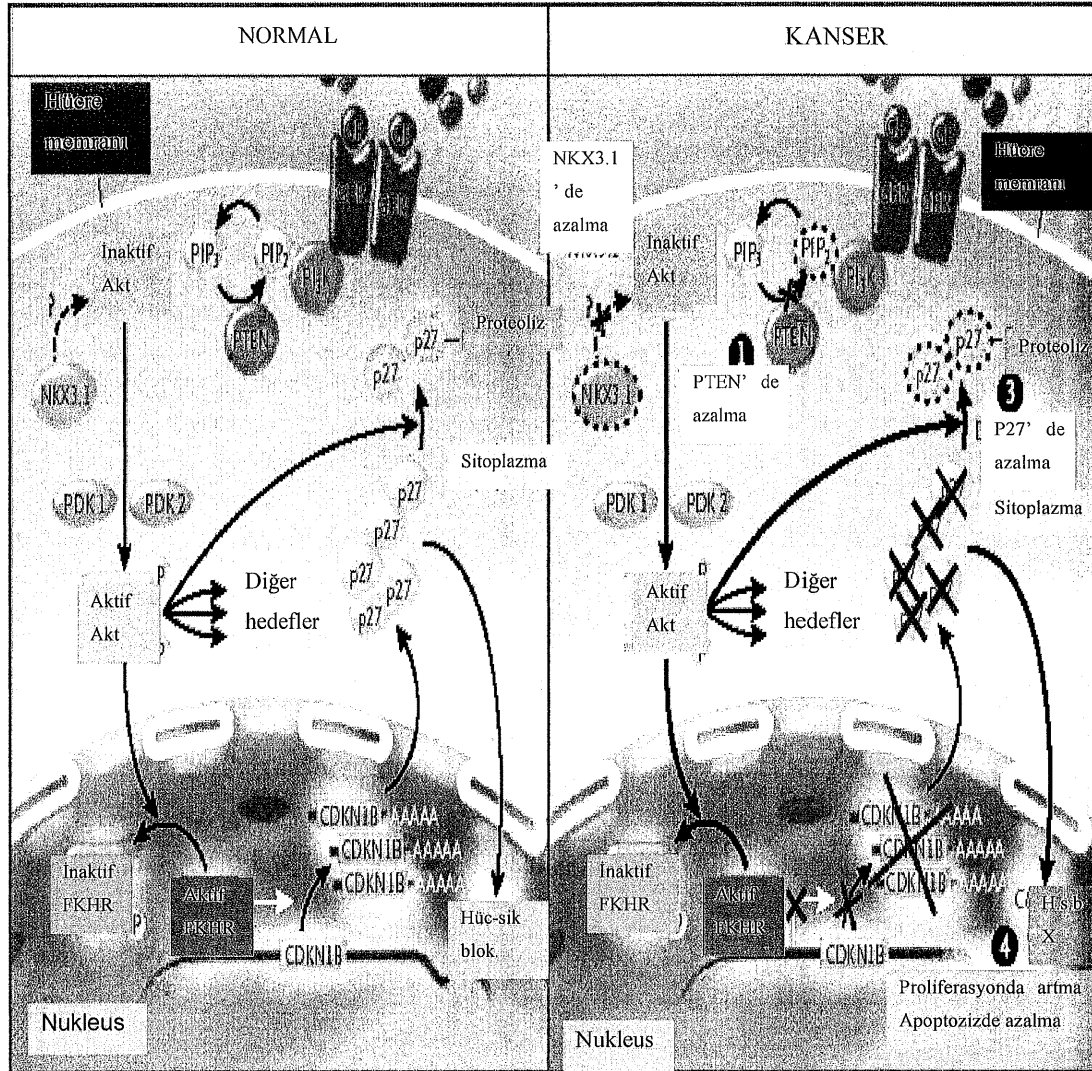
Kromozom 16q23'e lokalize olup, prostat kanserinde bu bölgenin kaybı bildirilmiştir. Hücreler arası adhezyon proteinlerinden olan E-Kaderinlerin salınımlarının prostat kanserlerinin çoğunda (bilhasa kötü huylu tümörlerde) önemli derecede azaldığı saptanmıştır (46).

Metalloproteinazlar

Metalloproteinazlar sellüler matriksi parçalayıp anjiyogenezizi teşvik eden enzimler olup, salınımları sonucu prostat kanserinin prostatik intraepitelyal neoplazi (PIN) formundan invaziv lokalize prostat kanseri formuna geçişine neden olduğu fikrine varılmıştır (87).

Telomeraz

Kök hücrelerdeki kromozomların telomer bölgeleriyle ilgili olarak, telomer kısalması telomeraz enzimiyle önlenir, prostat kanserlerinin çoğunda telomeraz enziminin eksprese edildiği bildirilmiştir (8).



Şekil 2.8- Prostat kanser patogenezindeki moleküler olaylar. Normal prostatta, NKX3.1, PTEN ve p27 prostat hücrelerinin büyüüp, hayatta kalmasını düzenler. PTEN' in yetersiz düzeyi (1) ve NKX3.1'deki azalma (2) çeşitli mekanizmalarla p27 düzeylerinde azalmaya neden olup (3), proliferasyonu artırır ve apoptozizi azaltır (4). GF büyüme faktörü, GFR büyüme-faktör reseptörü, PIP₃ fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfat, PIP₂ fosfatidilinositol 4,5-difosfat, PI₃K fosfatidilinositid 3-OH kinaz, PTEN fosfataz ve tensin homoloğu, Akt protein kinaz B, PDK1 3-fosfoinositid-bağımlı protein kinaz-1, PDK2 3-fosfoinositid-bağımlı protein kinaz-2 ve FKHR *forkhead* transkripsiyon faktörü ifade eder. Kırmızı X işaretleri bloke edilen süreçleri ve üretilmeyen molekülleri, noktalı dış çizgiler indirgenen molekül düzeylerini ve A' lar haberci RNA'nın poli-A kuyruğunu gösterir. Sağdaki şekilde soru işareti ve noktalı ok daha tam olarak kanıtlanmayan NKX3.1 interaksiyonunu göstermektedir (94).

2.2.5. Paraoksonaz 1 Gen Polimorfizmlerinin Prostat Kanseri Gelişimindeki Rolü

Araştırmalarda ilgili polimorfizmlerin varlığında genin ekspresyonunun etkilenip, düşük düzeyde paraoksonaz enziminin oluşmasına neden olduğu, böylece de paraoksonaz'ın görevini tam yapamayıp, oluşan serbest radikalleri yok edememesiyle, oksidatif stresin olduğu gözlemlenmiştir. Yapılan çalışmalar bu polimorfizmlerin prostat kanserinin başlangıç ve ilerlemesinde etkili olabileceğini düşündürmektedir.

2.3. Paraoksonaz (PON) Gen Ailesi

İnsanlarda 7. kromozomun uzun kolunda, q21.3 bölgesinde bir araya gelen, birbirine komşu oldukları bildirilen, PON1, PON2, PON3 olarak adlandırılmış, üç adet PON geni bulunmaktadır ve bu üç gen PON gen ailesi olarak adlandırılır. Farelerde de 6. kromozom üzerinde üç gen birbirine komşu olacak şekilde konumlanmıştır (42).

2.3.1. Paraoksonaz (PON) Proteinleri

PON1, PON2, PON3 genlerinin proteinleri, amino asitlerinin dizileri açısından birbirleriyle yaklaşık olarak % 53 oranında homoloji göstermektedir. Her üç proteinin dokulardaki ekspresyonları, dağılımları birbirinden farklıdır. İmmünohistokimyasal yöntemle

PON1 proteini : karaciğer, plazmada,

PON2 proteini : karaciğer, beyin, kalp, böbrek, aortik düz kas hücreleri, testis dokularında (endotel tabakasında)

PON3 proteini : karaciğer, plazmada buldukları gösterilmiştir (42).

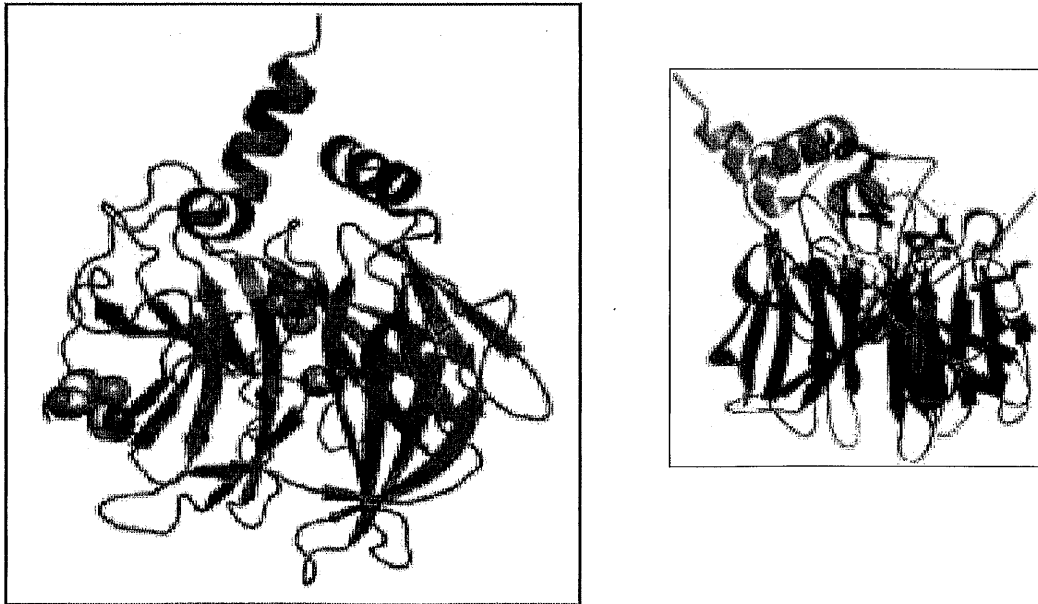
PON2, hücre içinde hidroperoksitlerin üretimini azaltır ve hücre-aracılı LDL oksidasyonunu önler. PON3 ve PON1'den sonra daha detaylı olarak tanımlanmıştır; endotel ve vasküler duvar hücrelerinde ekspresyonu ve bu hücrelerde antioksidan aktivite göstermesi nedeniyle araştırmacıların ilgisini çekmiştir (12).

PON3 karaciğerde sentez edilip, serumda yüksek–yoğunluklu lipoproteinler ile birlikte bulunmaktadır. Paraoksonaz 1'e nazaran arilesteraz aktivitesi sınırlıdır ve paraoksonaz aktivitesi yoktur ama statin gibi laktonları hidroliz edebilir (72).

Araştırmalar, PON polimorfizmlerinin oksidatif hasara bağlı hastalıklarda önemli bir role sahip olduğunu göstermiştir. Yapılan çalışmalarda paraoksonaz enziminin koruyucu etkisinin sadece prostat kanserini önlemekle kısıtlı olmadığı, insanlardaki koroner arter hastalıkları, ateroskleroz gibi çeşitli kalp hastalıkları ve bazı kanser türlerinde paraoksonazla ilişkili olabileceği sonucuna varılmıştır.

2.3.2. Paraoksonaz 1 (PON1) Proteini ve Fonksiyonu

İnsan serum paraoksonaz 1 proteini, molekül ağırlığı 43 kDa (Bazı yayınlarda çoğunlukla 39,6 kDa büyüklüğünde olarak belirtilmiş.) olup, 354 amino asitten (Bazı yayınlarda 355 olarak belirtilmiş) oluşan bir glikoproteindir (31). Eş anlamlı olarak kullanılan isimleri arasında arildialkylfosfataz, kalsiyum-bağımlı organofosfataz yer alır. mRNA'sı 2396 baz çifti (bç) dir. Üç karbonhidrat zincirine sahiptir. Aminoasit içeriği bakımından incelendiğinde yüksek miktarda lösin amino asidini içerdiği bulunmuştur. Yapısındaki üç sistein amino asidinden 284. pozisyondaki serbest iken, diğer ikisi (Cys 42-352) arasında disülfid bağı bulunmaktadır (Şekil 2.9) ve serbest bulunan sistein, substratın tanınıp bağlanması için gereklidir (55).



Şekil 2.9: PON1 proteinin üç boyutlu yapısı (3, 12).

Maksimum paraoksonaz aktivitesi için kalsiyum gereklidir. PON1'in üç boyutlu yapısı iki adet kalsiyum iyonu bulunmaktadır (41). Bu iki adet kalsiyum iyonlarından biri yapısal kalsiyum olup yapıdan uzaklaştırılması, tersinmeyen denatürasyona neden olmaktadır. Diğer kalsiyum iyonu katalitik etkinlikte görevlidir ve bu kalsiyum iyonu bir su molekülüyle fosfat iyonunun oksijeni ile etkileşmektedir (Şekil 2.9). Paraoksonaz 1'in organofosfat substratlarına karşı hidrolitik aktivitesi kalsiyuma bağımlı iken, lipid peroksitlerin birikimini önlemede kalsiyumun gerekli olmadığı bildirilmiştir (49).

Paraoksonaz 1 proteini karaciğer ve pankreasta yüksek, beyin ve akciğerde az miktarda eksprese olmaktadır.

Karaciğerde sentezlenen ve dolaşıma katılan paraoksonaz 1'in HDL yapısında yer almaktadır. PON1, hidrofobik N-terminal bölgesi aracılığıyla HDL lipidlerine kolayca bağlanabilmektedir. PON1'i bağlayan HDL alt birimleri, apolipoprotein AI (Apo AI) ve Apo J (klusterin) proteinlerini de içerdiğinden, Apo AI ve Apo J'nin bağlanmada rol oynayabileceği düşünülmektedir (25).

Serum paraoksonaz (PON1) aromatik esterleri, organofosfatları, laktonları ve *cyclic-carbonate* ilaçların hidrolizini katalizleyen bir enzimdir ve LDL (düşük yoğunluklu lipoprotein)'nin oksidasyonuna karşı koruyucu özelliği olan HDL (yüksek yoğunluklu lipoprotein) ile ilişkili enzimdir. Bu özelliğinden dolayıda pestisid zehirlenmesine karşı koruyucu özelliği olan bir arilesterazdır. Serum paraoksonaz 1 pestisidler, arilesterler, nörotoksinler yani sinir ajanları (*nerve gases, nerve agent*) (soman, sarin) gibi çeşitli organofosfor bileşiklerin hidrolizlerini katalizlerken, bireylerin bu gibi kimyasalların toksisitesine karşı gösterdikleri duyarlılık değişiminde önemli derecede etkili olduğunu akla getirmektedir ve yapılan çalışmalar sonucunda Q192R paraoksonaz 1 geni polimorfizminin, R allelinin paraoksonun hızlı olarak meydana gelen hidroliziyle, Q allelinin ise yavaş olarak meydana gelen hidroliziyle ilişkili olduğu saptandı (10, 20, 58). İlave olarak paraoksonaz 1'in diazokson, parationun aktif metaboliti olan paraoksona karşı olan substrat spesifik etkileşimide önemlidir(20).

Serum paraoksonaz kansere sebep olan (karsinojenik) yağda-çözünür radikalleri elimine eder (60). Fenolik esterler üzerine etkilidir.

Başlıca üç fonksiyonu vardır. Bunlar : 1) Arildialkilfosfataz aktivitesi,
 2) Arilesteraz aktivitesi,
 3) Hidrolaz aktivitesidir.

Serum paraoksonaz 1 aktivitesi, yeni doğan ve prematüre infantlarda erişkin düzeydeki yarısı kadardır. Erişkin düzeydeki seviyeye doğumdan bir yıl sonra ulaşılır, ancak yapılan çalışmaların çoğunda ileri yaşlarda paraoksonaz 1 aktivitesinin azaldığı belirlenmiştir (22, 25).

PON1 aktivitesi bireyler arası ve etnik gruplar arasında değişkenlik gösterir (10). Serumdaki paraoksonaz düzeyi ve aktivitesinin bireyler arasında değişken oluşunun bir nedeninin PON genindeki kodlama ve promotor bölgelerinde çok sayıda polimorfizmin bulunmasından kaynaklandığı bilinmektedir. Bu bireyler arasındaki bu değişkenliğin diğer bir sebebi ise kişilerin beslenme şekli ve alışkanlıklarıdır. Sigara içiminin PON1 derişimi ve aktivitesini azalttığı ve bu etkisinin geri dönüşümsüz olduğu saptanmıştır. Serum PON1 düzeyleri gebelik, akut faz reaktanları ve Apo AI metabolizmasını etkileyen bozukluklardan etkilenmektedir. Lipid düşürücü statin ve fibrat grubu ilaçlarla yapılan in vitro ve İn vivo çalışmalarda ise çelişkili sonuçlar elde edilmiş, bir kısmında paraoksonaz 1 sentezi ve aktivitesi artarken diğerlerinde azaldığı gözlenmiştir (22, 25).

2.3.3. PON1 Gen Yapısı

PON1 geni insanda 7q21.3'e lokalizedir (20, 44, 60). Genin 9 ekzonu ve 8 intronu bulunmaktadır. Ekzon ve intron bağlantı yerleri *equivalent* pozisyonda meydana gelmektedir. Genin boyutu 26,86 kb dır (mRNA 2393 bp) .

İnsanlarda yapılan çalışmalarda paraoksonaz 1 geninde, promotör ve kodlayan bölgelerinde, çeşitli polimorfik kısımlar saptanmıştır. Bu nedenle insanlardaki ekspresyonu da çeşitlidir. Promotör bölgedeki, (-107)T/C, (-907)G/C gibi polimorfizmlerle; kodlayan bölgedeki M54L, I102V, Q192R, L55M gibi polimorfizmlerin etkisiyle insanlardaki PON1 gen ekspresyonunun etkilendiği yapılan çalışmalarda belirgin bir şekilde gösterilmiş ve hayvan deneyleriyle desteklenmiştir (Şekil 2.10) (20).

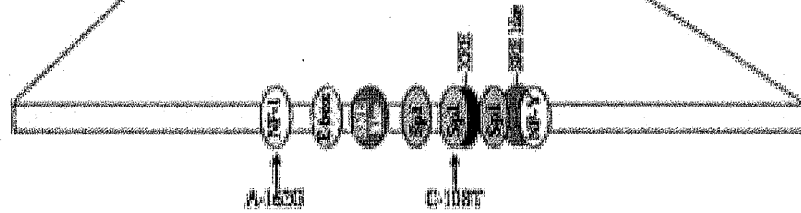
A



B



C



Şekil 2.10- PON1 geninin kodlayan bölgeleri. A) PON1 geni ekzon ve intronlarının genel görüntüsü. B) PON1 geninin promotör ve kodlayan bölgesindeki polimorfizmlerin yeri. C) PON1 geninin transkripsiyonu için gerekli olan promotörün yaklaşık 200 bp' lik bölgesinin büyütülmesi (24, 33)

2.3.4. PON1 Geni Q192R ve L55M Polimorfizmleri

Yapılan çalışmalarda, Paraoksonaz 1 enzim aktivitesi varyasyonlarından sorumlu olan Gln192Arg (Q/R) ve Leu55Met (L/M) olarak isimlendirilen en az iki mutasyon yerinin bulunduğu rapor edilmiştir (10).

Akrabalık ilişkisi bulunmayan 381 (201 erkek, 180 kadın) gönüllü Türk birey ile gerçekleştirilen bir çalışmada, yüksek etkili R (Arg) ve L (Leu) allellerinin frekansları, sırasıyla, 0,31 ve 0,72 olarak saptandı ve bu allellerin frekansının Kafkas popülasyonlarından biraz daha yüksek fakat Doğu popülasyonlarından çok daha düşük olduğu belirlendi (10).

Genetik polimorfizmlerden dolayı, bireyler arasındaki serum PON1 aktivitesi 10-40 kat arasında değişen farkla değişkenlik gösteriyordu (20, 58). Bireyler arasındaki bu değişkenliğe ilaveten, Q192R, L55M gibi nokta mutasyonlarının proteindeki değişikliklere öncülük etmesinden dolayı, serum PON1 aktivitesi bakımından ırklar arasında da dikkate değer ölçüde farklılıklar vardır (2, 10, 44).

Kodon 192'de adenin bazının yerine guanin bazının geçmesi (A→G mutasyonu), proteinde glutamin (Q genotipi) amino asidinin yerini arjinin (R genotipi) amino asidinin almasına sebep olup, bireylerde yüksek enzim aktivitesine yol açar (2, 44).

İkinci sık görülen polimorfizm, kodon 55'te lösin (L genotipi) amino asidinin metionin (M genotipi) amino asidine yer değiştirmesidir (2, 44). Önceki çalışmalarda sadece Gln192Arg (Q192R) polimorfizminin PON1 aktivitesini etkilediğine inanılıyordu fakat yapılan sonraki çalışmalarda L55M polimorfizminin de paraoksonaz 1 enziminin serumdaki konsantrasyonunu düşürmesiyle, enzim aktivitesini etkileyebileceğini göstermiştir (14, 56).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Hasta Grubu

Sağlık Bakanlığı Şişli Eğitim ve Araştırma Hastanesi Üroloji Bölümü (n=93) ve Kartal Devlet Hastanesi Onkoloji Bölümü' nde (n=27) patoloji servislerinde prostat kanseri tanısı almış toplam 120 olguda çalışma gerçekleştirilmiştir.

Prostat kanseri tanısı konmuş çalışılan 120 olgunun (erkek) yaş ortalaması $70,04 \pm 8,3$ 'dür (min: 48 – maks: 89 yaş).

Hastalara ait klinik parametreler (tanı sırasındaki aile öyküsü, metastaz durumu, sigara kullanımı, sağ kalım vb.) ilgili bölümlerin arşivlerinden elde edilmiştir. Hastaların kendisinden ve/veya ebeveynlerinden bilgilendirilmiş onay formları alınmıştır (3.1.4. bilgilendirilmiş onay formu örneği, sayfa 35'de verilmiştir).

3.1.2. Sağlıklı Kontrol Grubu

Sağlıklı kontrol grubu olarak İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Genetik ABD’nda gönüllülerce oluşturulmuş DNA bankasına ait 100 örnek kullanılmıştır. Oluşturulan bu banka Türkiye coğrafyasının tüm bölgelerini kapsamaktadır. Ortalama yaş $61,06 \pm 8,9$ (min: 50 – maks: 88 yaş) dır. Kişilere ait yaş, cinsiyet, aile hikayesi gibi bilgiler belirlenmiş ve katılan bireyler çalışma hakkında bilgilendirilerek “bilgilendirilmiş onay formu” için imzaları alınmıştır.

3.1.3. Prostat Kanseri Hastalarına Ait Klinik Parametreler

Çalışmaya dahil edilen yaş ortalaması $70,04 \pm 8,3$ olan prostat kanseri hastalarına ait ailevi ve klinik veriler Tablo 3.1’de gösterilmiştir.

Tablo 3.1- Prostat kanseri hastalarına ait klinik parametreler.

Klinik Parametreler		Kişi Sayısı
Ailede kanser	Var	38
	Yok	82
Metastaz	Var	47
	Yok	73
Sigara	İçen	50
	İçmeyen	70

3.1.4. Bilgilendirilmiş Onay Formu

Hasta Bilgilendirme Formu

Tarih:../../...

Sayı:

Sayın Bay.....

- 1.Çalışmakta olduğumuz “Prostat Kanseri hastalarda paraoxonase gen polimorfizminin risk faktörü olarak belirlenmesi” isimli proje Prostat Kanseri ile ilgili bir projedir. Sizin bu proje için seçilmenizin sebebi hasta popülasyonu temsil etmenizdir.
- 2.Yapılması planlanan çalışma için Prostat Kanseri belirlenen olguların periferik kanlarından elde edilen DNA ile ilgili deneyler gerçekleştirilecektir.
3. Periferik kanınızdan izole edilen DNA'nız saklanacaktır.Toplam 100 Prostat Kanseri hastasından oluşturulan DNA bankasında PON1 geni polimorfizm analizi yapılacaktır.
- 4.Çalışma süresi 1 yıldır.Bu süre içinde dilerseniz çalışmadan çıkma hakkınız bulunmaktadır.Bu durumda sayıyı tamamlamak amacıyla yerinize yeni Prostat Kanseri hastaları bulunacaktır.
- 5.Bu çalışma direkt olarak size tıbbi bir yarar sağlamayacaktır.
- 6.Bu çalışmanın size maddi bir getirisi olmayacağı gibi sizden ya da kurumunuzdan herhangi bir ücret talep edilmeyecektir.
- 7.Bu çalışmada yukarıda belirtilen analizlerden başka bir analiz yapılmak istenmesi halinde size ulaşılarak ayrı bir onay alınacaktır.
- 8.Elde edilen bilgi şifre korumalı bir bilgisayar programında korunacak olup çalışma kapsamındaki araştırmacılar dışında kimse ile paylaşılmayacaktır.
- 9.Oluşturulan bu DNA bankasında kişi isimleri kullanılmayacak,örnekler numaralı olarak saklanacaktır.
- 10.Sonuçlar doktorunuza gönderilecektir.
- 11.Çalışma süresince ve sonrasında dilediğiniz zaman bu çalışma ile ilgili bilgi alma hakkına sahip bulunmaktasınız.

3.1.5. Kimyasallar

Agaroz	Sigma, Almanya
Amonyum Asetat	Sigma, Almanya
Borik Asid	Sigma, Almanya
Bromfenol Mavisi	Sigma, Almanya
Etanol	Carlo Erba
Etidyum Bromid	Sigma, Almanya
Fenol:Kloroform:Izoamil alkol (25: 24:1)	Fluka, İsviçre
Hidrojen Peroksit (%35)	Merck, Almanya
Proteinaz K	Appligene-Oncor, USA
Sodyum Asetat	Sigma, Almanya
Sodyum Dodesil Sülfat (SDS)	Sigma, Almanya
Tris Baz	Sigma, Almanya

3.1.6. PZR Materyali

Taq DNA polimeraz (5U/μl)	Fermentas, USA
10X PZR buffer (10mM Tris-HCl pH:8.8)	Fermentas, USA
25mM MgCl ₂	Fermentas, USA
10mM dNTP miks	Fermentas, USA
Primerler	IDT Inc., USA
<i>50bp DNA Ladder</i>	Fermentas, USA

3.1.7. Restriksiyon Enzimleri

Hsp92 II (10u/μl)	Promega	R7161
BspPI (2u/μl)	Fermentas	ER1322

3.1.8. Kullanılan Tampon Ve Çözeltiler

Agaroz Jel Yükleme Solusyonu (6X)

%15	fikol
%0.05	bromfenol mavisi
%0.05	ksilen siyanol

DNA izolasyon inkübasyon buffer (pH:8.0)

75µM	NaCl
25µM	EDTA

Proteinaz K 20 mg/ml

Sodyum Dodesil Sülfat %10

Tris-asetik asid-EDTA (TAE) (50X) (1L)

242 g	Tris Base
57.1 ml	Glasiyal Asetik Asid
100 ml	0,5M EDTA

Tris-EDTA (TE) solusyonu

10mM	TrisHCL (pH:8.0)
1mM	EDTA

Eritrosit Parçalama Çözeltisi (RBL) (1X) (1L)

8,74 gr	NH ₄ Cl
1 gr	KHCO ₃
200 ml	EDTA (0,5 M)

Beyaz Hücre Parçalama Çözeltisi (WBL) (400ml)

10 ml	NaCl (4M)
20 ml	EDTA (0,5M)

3.1.9. Kullanılan Cihazlar

Buzdolabı ve derin dondurucu (+4 ve -20°C) (Arçelik)
CCD kamera-bilgisayar donanımı (Mitsubishi, Macintosh centis 650)
Çalkalamalı su banyosu (Memmert)
Çeker ocak
Distile su cihazı (Kermanlar)
Elektroforez aleti/Güç kaynağı (Stratagene)
Hassas terazi (Shimadzu)
Isı bloğu (VWR-scientific)
Masaüstü mini santrifuj (Hettich, Eppendorf 5415c)
Otoklav (Kermanlar)
Otomatik pipetler (Gilson, Eppendorf)
PZR cihazı (Termal döngü aleti) (Techne, Eppendorf, Perkin Elmer 480)
Spektrofotometre (Biotech Photometer, WPA)
Vorteks (Kermanlar)

3.2. Yöntem

3.2.1. DNA Eldesi

Klinik olarak Prostat Kanseri tanısı almış 120 hastadan ve 100 sağlıklı kişinin oluşturduğu kontrol grubundan, pıhtılaşmayı engelleyen EDTA'lı tüpe 10ml periferik venöz kan örneği alındı. Kan örnekleri DNA izolasyonu aşamasına kadar +4°C buzdolabında bekletildi. Çalışmamızda kandan DNA eldesi için “tuzla çöktürme yöntemi” kullanıldı. İlk olarak kırmızı kan hücrelerinin (eritrositlerin) uzaklaştırılması amacıyla tüm örnekler 50ml'lik falkon tüplerine alındı ve üzerlerine 1/3 oranında kırmızı kan hücresi lizis solusyonu (RBL) (eritrosit membranını parçalar) eklenerek 15 dakika +4°C buzdolabında bekletildi. Daha sonra 1500rpm'de 15 dakika santrifüj edildi.Üst sıvı döküldü, elde edilen pelet süspanse edildi. Aynı işlem bir kez daha 1/2 oranında RBL ilave edilerek tekrarlandı. 1500rpm'de 10 dakika santrifüj edildi.

Yıkanan beyaz hücrelerin zarlarını ve zarlarında bulunan yağ ve protein bileşenlerini uzaklaştırmak amacı ile 1/1 oranında beyaz kan hücresi lizis solusyonu (WBL), 500µl % 10'luk sodyumdodesil sülfat (SDS) ve 50µl proteinaz K eklenerek bir gece 56°C'de sıcak su banyosunda inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün örneklerin üzerine, protein ve lipidlerin çöktürülmesi için 3700µl, 9,5M amonyum asetat (NH₄Ac) eklenerek, iyice karıştırıldı ve -20°C derin dondurucuda 20 dakika bekletildi. 4500 devirde ve +4°C'de santrifüj edilerek proteinler çöktürüldü. Süpernatant (üst sıvı) temiz, yeni bir falkon tüpe aktarılarak üzerine 1/3 oranında % 100 steril etanol eklendi ve DNA'nın yüzeye yükselmesi beklendi. Yükselen DNA steril bir pipet ucu yardımı ile yakalanarak 1,5'luk ependorf tüplerine aktarıldı ve tuz kalıntılarını arındırmak amacı ile üzerine 500µl %70 etanol eklenerek en yüksek devirde santrifüj edildi. Tüpün dibine çöktüğü gözlenen DNA'nın üzerindeki alkol hızla uzaklaştırıldı ve üzerine DNA'nın yoğunluğuna göre 50-100µl Tris-EDTA (TE) (pH:8) solusyonu eklenerek bir gece oda ısısında DNA'nın çözünmesi beklendi. Daha sonra ependorf tüpleri parafilm ile sarılarak +4°C buzdolabında ileride kullanılmak üzere saklandı.

3.2.2. PZR İle DNA Analizi

Kary Mullis tarafından 1980 yılında tasarlanmış olan Polimeraz Zincirleme Reaksiyonu (PZR) in vitro bir amplifikasyondur. çoğaltılmak istenen DNA dizisinin her iki ucuna uygun ve komplementer seçilen primerler ile kalıp DNA hedef alınarak sentez yapılır. Bir döngüde zincir ayrışması (denatürasyon), primer hibridizasyonu ve DNA sentezi işlemleri birbirini izler. Döngüler istenen sayıda tekrarlanır. "n" sayıda tekrarlanan döngülerin sonunda çift sarmallı hedef DNA teorik olarak 2ⁿ sayıda çoğalmış olur.

PON1 geni Q192R ve L55M polimorfizmlerinin saptanması amacı ile örneklerimizi genin ilgili bölgeleri için dizayn edilmiş primer çiftleri ile PZR uygulandı (Şekil 3.1, Şekil 3.2, Tablo 3.2).

ttccattatagctagcacgaaggctccatcccacatcttgattttaggaatagacagtgaggaatgccagttaataatcctgtaatgttc
aataccttcaccttatatattatgtgtgtatgtttaattgcagttgaatgatattgttgcctgtggacctgagcactttatggcaca
aatgacactatcttgaccctacttacaatcctgggagatgtatftgggttagcgtggtcgtatgttctactatagccaagt
gaagttcgagtgggtggcagaaggatttgatttgctaataatgaatcaacattcacccgatggcaagtatggaactctctgaaatgtagt
ggatttactcagattctcaggagatatctggaatatatctttttaagtaatatgatacatttaacatgttacctagtgagataa
aattaggaaaaatgtaaaatgtcttaattttcaggggtgaaatttatcaaatcaaaaatttcattgtgaaggcatactggtttattt

Şekil 3.1- PON1 geni dizisi üzerinde, Q192R polimorfizmi çalışmasında kullanılan primerlerin yerleşim bölgeleri. Altı çizili olarak gösterilen diziler bu çalışmada kullanılan primerleri işaret etmektedir.

tctagtccatcaattaaacaataataactaagtgtaaatttaataaactgttaatgaattaatatttttaatttccatataatc
gcattcatcaattgaataaatgaaagaatgaattattctgaacctattaagaagagtgatgtatagccccagttcaagtgaggtgtg
ataaagaatggatccacatcctgcaataatgaacaacctgtactttctgtctctttctggcagaaactggctctgaagactgg
agatactgcctaattggactggcttcattagctctgtgagtgtttctttcactttctgtgttctagaacgtttctaggactggcagt
ttaagtctttcacttaggctttctgtatacccatgccactttcaataaaatgaacagtcaggtttaaagacaaatgtgtatgcat
ttacactgtgctataattatgatcatgcgtgttctatgcatattgtgttcttcggctcattgaaccatattacgttagcttctatt

Şekil 3.2- PON1 geni dizisi üzerinde, L55M polimorfizmi çalışmasında kullanılan primerlerin yerleşim bölgeleri. Altı çizili olarak gösterilen diziler bu çalışmada kullanılan primerleri işaret etmektedir.

Tablo 3.2- PZR Reaksiyonlarında kullanılan primerler ve dizileri.

Primer Adı	Primer Dizisi	Referans	Hedef Gen	Ürün Boyu
Q192R (F)	5'tattgttgctgtgggacctgag3'	Antognelli ve ark. 2004	PON1	238 bç
Q192R (R)	5'cctgagaatctgagtaaatccact3'	Mevcut çalışma		
L55M (F)	5'gaagagtgatgtatagccccag3'	Antognelli ve ark. 2004	PON1	230 bç
L55M (R)	5'tgaaagacttaaactgccagtc3'	Mevcut çalışma		

PON1 geni Q192R ve L55M polimorfizmlerinin tespiti için kullanılan PZR koşulları aşağıdaki gibidir.

Q192R için PZR koşulları, final hacim 40µl (her bir örnek için)

dH ₂ O (DNase-RNase içermeyen)	30,3 µl
10X PZR Tampon (10mM)	4 µl
1,5 mM MgCl ₂	2,4 µl
2mM dNTPs (adenin, guanin, sitozin, timin)	1,6 µl
10pmol Q192R primeri	1 µl
1U Taq DNA polimeraz	0,2 µl
100 ng genomik DNA	0,5 µl

L55M için PZR koşulları, final hacim 40µl (her bir örnek için)

dH ₂ O (DNase-RNase içermeyen)	30,3 µl
10X PZR Tampon (10mM)	4 µl
1,5 mM MgCl ₂	2,4 µl
2mM dNTPs (adenin, guanin, sitozin, timin)	1,6 µl
10µmol L55M primeri	1 µl
1U Taq DNA polimeraz	0,2 µl
100 ng genomik DNA	0,5 µl

Q192R ve L55M polimorfizmleri için PZR döngüsü (35 siklus)

94°C	3dak. İlk denatürasyon
94°C	1dak.
53°C/57°C	1dak.
72°C	1dak.
72°C	5dak. Son uzatma

3.2.3. Restriksiyon Enzim Kesimi

PCR ürünlerinin restriksiyon enzimi ile kesimi Q192R polimorfizmi için 33,5 µl, L55M polimorfizmi için 30 µl final hacimde yapıldı. Reaksiyonlar enzim kitapçığında önerilen buffer ve koşullarda gerçekleştirildi. Enzim kesimi için önerilen ısılarda 4 saat inkübasyon yapıldı. Kesim sonrası kesilmiş ve kesilmemiş ürünler DNA marker ile beraber yürütülüp, % 4 oranında hazırlanan agaroz jel elektroforezinde görüntülendi (Tablo 3.3, Şekil 3.3 ve Şekil 3.4).

Tablo 3.3- PON1 geninin Q192R ve L55M polimorfizmleri için PCR ürünü ve restriksiyon enzim kesim ürünü boyları.

PON1 geni Q192R genotipleri	PCR ürünü	Restriksiyon enzimi	Kesim sonrası ürün boyları
Q192R QQ	238bç	BspPI (BinI)	238bç
Q192R QR	238bç	BspPI (BinI)	238bç+175bç+63bç
Q192R RR	238bç	BspPI (BinI)	175bç+63bç
PON1 geni L55M genotipleri	PCR ürünü	Restriksiyon enzimi	Kesim sonrası ürün boyları
L55M LL	230bç	Hsp92 II	230bç
L55M LM	230bç	Hsp92 II	230bç+127bç+103bç
L55M MM	230bç	Hsp92 II	127bç+103bç

1) Normal bireylerde (Glutamin amino asidi bulunur.):

tattgttgctgtgggacctgagcacttttatggcacaatgatcactatcttgacccta
 cttacaatcctgggagatgtattgggttagcg
 tggcgtatggttctactatagccaagtgaagtcgagtggtggcagaaggattgatttgctaatggaatcaac
 attcaccgatggcaagatgtgaactctctgaaatgtagtgatttactcagattctcagg

(238 bç)

2) Mutant bireylerde (Arjinin amino asidi bulunur)(a-g dönüşümü):

tattgttgctgtgggacctgagcacttttatggcacaatgatcactatcttgacccta
 cttacaatcctgggagatgtattgggttagcg
 tggcgtatggttctactatagccaagtgaagtcgagtggtggcagaaggattgatttgctaatgggatcaac
 attcaccgatggcaagatgtgaactctctgaaatgtagtgatttactcagattctcagg

(238 bç)

3) BspPI (BinI) enzimi uygulaması (homozigot mutant bireylerde) :

tattgttgctgtgggacctgagcacttttatggcacaatgatcactatcttgacccta
 cttacaatcctgggagatgtattgggttagcg
 tggcgtatggttctactatagccaagtgaagtcgagtggtggcagaaggattgatttgctaatgggatcaac

(175 bç)

attcaccgatggcaagatgtgaactctctgaaatgtagtgatttactcagattctcagg

(63 bç)

Şekil 3.3- Q192R polimorfizminde PZR ürünüde enzim kesiminin gösterilişi. 1) Normal bireylerdeki 238 bç'lik PZR ürünüde 192 pozisyonundaki adenin (a) bazını gösteriyor. 2) Mutant bireylerdeki 238 bç'lik PZR ürünüde 192 pozisyonundaki guanin (g) bazını gösteriyor. 3) BspPI (BinI) enzimiyle homozigot mutant bireylerde oluşan kesim sonucu gösterilmektedir.

1) Normal bireylerde (Lösin amino asidi bulunur.)

gaagagtgatgtatagccccagttcaagtgaggtgtgataaagaaatggatccacatcctgcaataatatgaaacaacctgta
ctttctgttctcttttctggcagaaactggctctgaagacttggagatactgcctaataaggactggcttcattagctctgtgagtgttt
ctttcactttctgtgttctagaacgtttctaggactggcagtttaagtctttca

(230 bç)

2) Mutant bireylerde (Metionin amino asidi bulunur.) (t-a dönüşümü) :

gaagagtgatgtatagccccagttcaagtgaggtgtgataaagaaatggatccacatcctgcaataatatgaaacaacctgta
ctttctgttctcttttctggcagaaactggctctgaagacatggagatactgcctaataaggactggcttcattagctctgtgagtgttt
tctttcactttctgtgttctagaacgtttctaggactggcagtttaagtctttca

(230 bç)

3) Hsp92 II enzimi uygulaması (homozigot mutant bireylerde) :

gaagagtgatgtatagccccagttcaagtgaggtgtgataaagaaatggatccacatcctgcaataatatgaaacaacctgta
ctttctgttctcttttctggcagaaactggctctgaagacatg

(127 bç)

gagatactgcctaataaggactggcttcattagctctgtgagtgtttctttcacttttctgtgttctagaacgtttctaggactggcagtt
ttaagtctttca

(103 bç)

Şekil 3.4- L55M polimorfizminde PZR ürününde enzim kesiminin gösterilişi. 1) Normal bireylerdeki 230 bç'lik PZR ürününde 55 pozisyonundaki timin (t) bazını gösteriyor. 2) Mutant bireylerdeki 230 bç'lik PZR ürününde 55 pozisyonundaki adenin (a) bazını gösteriyor. 3) Hsp92 II enzimiyle homozigot mutant bireylerde oluşan kesim sonucu gösterilmektedir.

3.2.4. Jel Elektroforezi ve Genotipleme

3.2.4.1 Jel Elektroforezi

PON1 geni Q192R ve L55M polimorfizmlerinin PCR amplifikasyon ürünlerinin analizi %3'lük agaroz jelde yapıldı. Agaroz jeller 1X TAE ile hazırlandı ve 1.7µl etidyum bromid solusyonu (20mg/ml) eklendi. 10 µl PCR ürünü 2µl yükleme solusyonu ile jele yüklendi. 75 V akımda 40 dakikada jeller yürütüldü. Ardından UV ışık altında görüntülendi.

PON1 geni Q192R ve L55M polimorfizmlerinin amplifikasyon ürünlerinin analizi, restriksiyon enzim kesimini takiben % 4'lük agaroz jelde yürütüldü. Agaroz jeller 1XTAE ile hazırlandı. 1.7µl etidyum bromid solusyonu (20mg/ml) eklendi. Q192R polimorfizm çalışması için 30µl, L55M polimorfizm çalışması için 25µl PCR ürünü 4µl yükleme solusyonu ile jele yüklendi. 65 V akımda 50 dakika jeller yürütüldü. Ardından UV ışık altında görüntülendi.

3.2.4.2. Q192R Genotiplemesi

PON1 geni Q192R polimorfizmi genotiplemesi için yapılan PZR reaksiyonunda Q192R polimorfizmine uygun olan primerler kullanıldı.

PZR ürünleri %3'lük agaroz jel elektroforezinde yürütülüp etidyum bromür ile görünür hale getirildi ve amplifikasyon kontrolü yapıldı.

PZR' si başarılı bir şekilde çıkan örnekler BspPI (BlnI) enzimiyle restriksiyon enzim kesimi çalışması yapıldı. 55°C'de dört saat inkübasyon yapıldı.

Q192R için restriksiyon enzim kesimi koşulları (her bir örnek için)

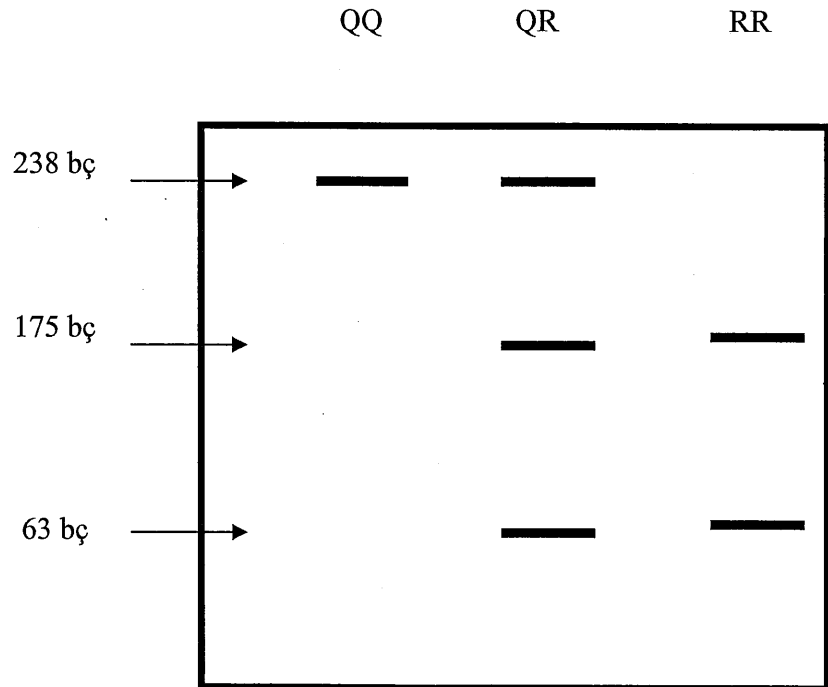
10X Tampon Tango	3	μ l
BspPI (BinI)	0,5	μ l
PZR ürünü	30	μ l

Enzim kesimi yapılan örnekler % 4'lük agaroz jel elektroforezinde yürütülüp etidyum bromür ile görünür hale getirildi.

Homozigot normal form (QQ genotip - tek band taşıyan bireyler) 238 bç

Heterozigot mutant form (QR genotip - iki band taşıyan bireyler) 238 bç, 175 bç, 63bç

Homozigot mutant form (RR genotip - tek band taşıyan bireyler) 175 bç, 63 bç'lik band boyları şeklinde belirlendi (Şekil 3.5).



Şekil 3.5- Q192R genotiplemesinin şematik görüntüsü.

3.2.4.3. L55M Genotiplenmesi

PON1 geni L55M polimorfizmi genotiplenmesi için yapılan PZR reaksiyonunda L55M polimorfizmine uygun olan primerler kullanıldı.

PZR ürünleri % 3'lük agaroz jel elektroforezinde yürütülüp etidyum bromür ile görünür hale getirildi ve amplifikasyon kontrolü yapıldı.

PZR'si başarılı bir şekilde çıkan örneklere Hsp92 II enzimiyle restriksiyon enzim kesimi çalışması yapıldı. 37°C'de dört saat inkübasyon yapıldı.

L55M için restriksiyon enzim kesimi koşulları (her bir örnek için)

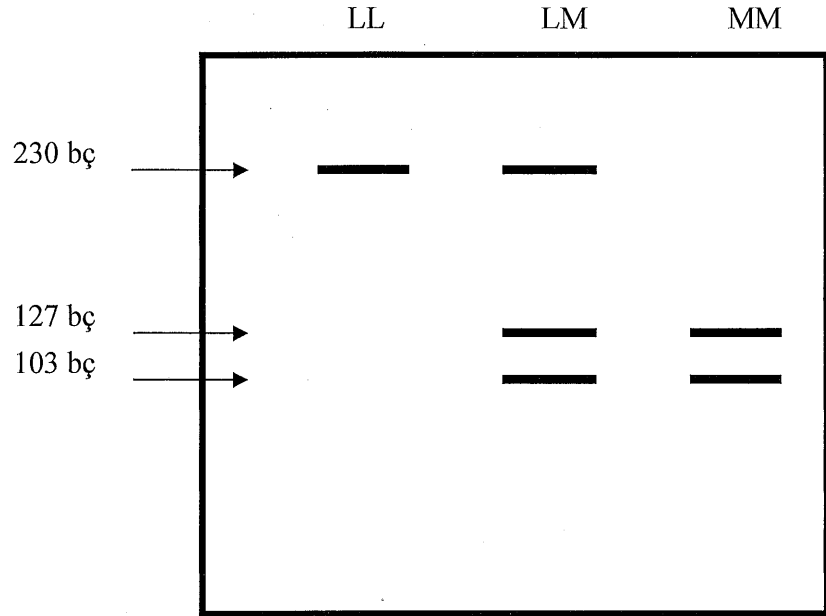
dH ₂ O	1,8	µl
10X Tampon K	3	µl
Hsp92 II	0,2	µl
PZR ürünü	25	µl

Enzim kesimi yapılan örnekler % 4'lük agaroz jel elektroforezinde yürütülüp etidyum bromür ile görünür hale getirildi.

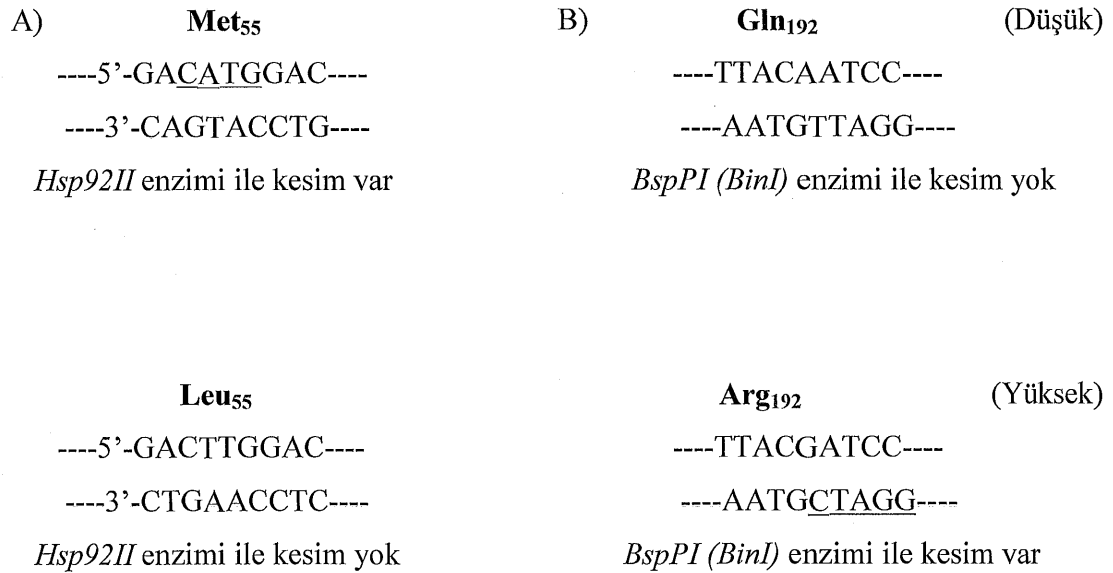
Homozigot normal form (LL genotip) 230 bç

Heterozigot mutant form (LM genotip) 230 bç, 127 bç, 103bç

Homozigot mutant form (MM genotip) 127 bç, 103 bç'lik band boyları şeklinde belirlendi (Şekil 3.6).



Şekil 3.6- L55M genotiplemesinin şematik görüntüsü.



Şekil 3.7- **PON₁₅₅** ve **PON₁₉₂** polimorfizmlerinin restriksiyon enzim analizleri. Restriksiyon enzim kesim yerleri altı çizili olarak gösterildi. Şekilde PCR ile amplifiye edilen DNA segmentleri gözükmekte. A) Eğer segment pozisyon 55 deki metionin amino asidini şifrelerse, amplifiye edilen DNA fragmanı *Hsp92 II* restriksiyon enzimi ile kesilmiş olacak, eğer bu pozisyonda lösin amino asidini şifrelerse enzim tarafından kesilmeyecek. B) Eğer segment pozisyon 192 deki arginin amino asidini şifrelerse, amplifiye edilen DNA fragmanı *BspPI (BinI)* restriksiyon enzimi ile kesilmiş olacak, eğer bu pozisyonda glutamin amino asidini şifrelerse enzim tarafından kesilmeyecektir (30).

3.2.5. İstatistik Hesaplamalar

PON1 geni Q192R ve L55M genotipleri ile prostat kanseri gelişimi arasındaki ilişki χ^2 (kikare) analizleri ile belirlendi. “Odds ratio” (OR) ve %95 güven aralıkları hesaplandı. OR değerinin “1” den büyük olması mevcut risk faktörünü taşıyan bireyler arasında hastalığa sahip olma riskinin arttığını gösterir.

χ^2 (kikare) testi; sayımla elde edilen nitel değişkenlerin, çeşitli sınıflandırma biçimlerine göre (tek değişkenli, iki değişkenli vb.) analizini yapmak, nicel değişkenlerin özgün sınıflama biçimlerini ve frekans dağılımını ele alarak dağılım biçimine yönelik analiz etmekte kullanılan testlerdir. 2*2 tablosunda eğer teorik değerlerin herhangi biri 5'e eşit ya da daha küçük ise bağımsızlık analizi Fisher kikare yöntemi ile yapılır. Fisher testinde doğrudan olasılık elde edilir. χ^2 (kikare) testi sonucunda $p < 0,05$ değeri anlamlı kabul edildi.

Tüm analizler Windows tabanlı SPSS (Statistical Packages of Social Sciences) 10.0 paket programı kullanılarak yapıldı.

4. BULGULAR

4.1. Paraoksonaz 1 Geni Q192R ve L55M Polimorfizmlerinin Genotip Dağılımları

Çalışmamıza dahil edilen prostat kanseri hastaları ve sağlıklı kontrol grubu bireylerindeki Q192R ve L55M gen polimorfizmlerinin dağılımları Tablo 4.1'de ve Tablo 4.2'de özetlenmiştir.

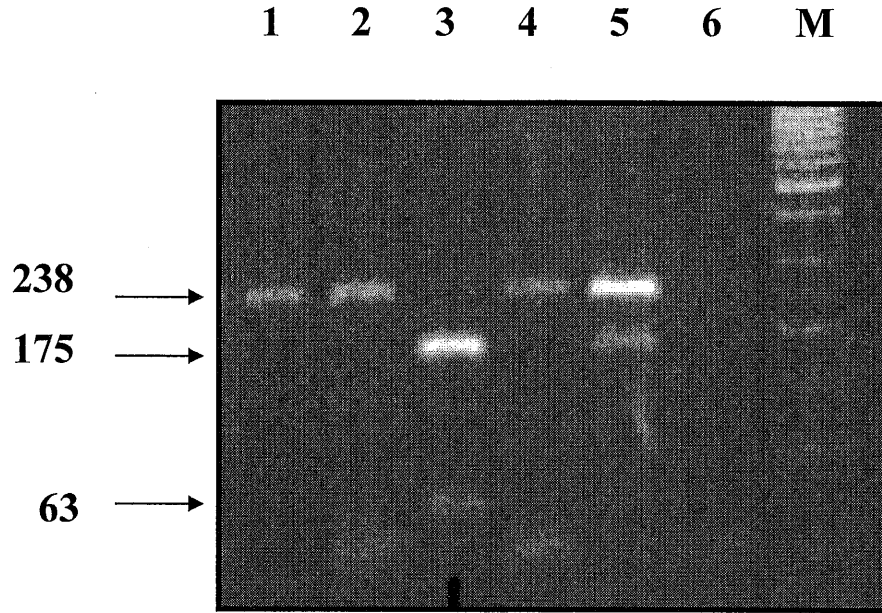
Prostat Kanseri Hasta ve Sağlıklı Kontrol Grubunda Q192R polimorfizmi için,

Yapılan istatistik değerlendirme sonucuna göre prostat kanseri hasta grubu ve sağlıklı kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlılık tespit edilmedi ($p=0,547$, $\chi^2=1.206$).

Tablo 4.1- Prostat kanseri hasta ve sağlıklı kontrol grubunda Q192R polimorfizmine ait genotiplerin dağılımı. n : incelenen örnek sayısı

Q192R	GENOTİP	GRUPLAR		TOPLAM
		KONTROL n %	HASTA n %	
	0 (QQ)	86 (%86)	97 (%85,84)	183
	1 (RR)	4 (%4)	2 (%1,76)	6
	2 (QR)	10 (%10)	14 (%12,38)	24
TOPLAM		100	113	213

Q192R polimorfizmi için prostat kanseri hasta ve kontrol grupları arasında yapılan tarama sonucu; prostat kanseri hastalarında QQ genotipli bireyler %85,84, RR genotipli bireyler %1,76 ve QR genotipli bireyler %12,38 olarak; sağlıklı kontrol grubunda ise QQ genotipli bireyler %86, RR genotipli bireyler %4 ve QR genotipli bireyler %10 olarak saptandı. Çalışmamızda kullanılan prostat kanseri hasta ve kontrol grubu Hardy-Weinberg'e uygundur.



Şekil 4.1- PON1 geni Q192R polimorfizmi genotiplerine ait agaroz jel görüntüleri. PCR ürünü 238bç uzunluğundadır ve BspPI (BinI) restriksiyon enzimi ile kesim sonucu 175bç ve 63bç boylarında ürünler oluşmaktadır. % 4'lük agaroz jel sonucu 5 no'lu örnek heterozigot bireyleri, 1, 2, 4 örnekler normal bireyleri, 3 no'lu örnek homozigot mutant bireyi göstermektedir. (M : 50bç'lik DNA *marker*)

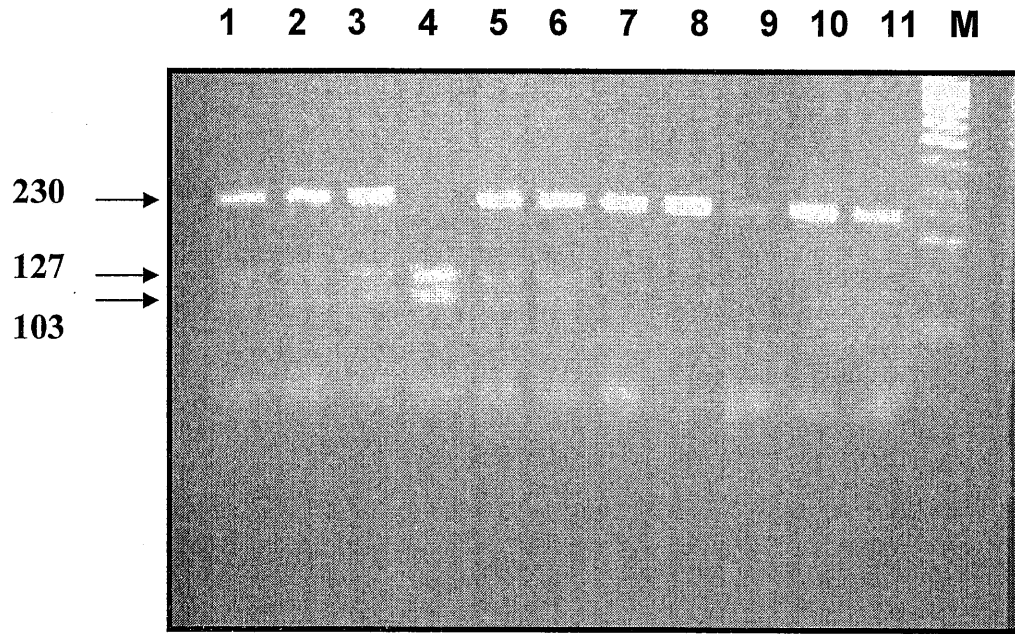
Prostat Kanseri Hasta ve Sağlıklı Kontrol Grubunda L55M polimorfizmi için,

Yapılan istatistik değerlendirme sonucuna göre prostat kanseri hasta grubu ve sağlıklı kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edildi ($p=0.000023$, $\chi^2=21.334$).

Tablo 4.2- Prostat kanseri hasta ve sağlıklı kontrol grubunda L55M polimorfizmine ait genotiplerin dağılımı.
n : incelenen örnek sayısı

L55M	GENOTİP	GRUPLAR		TOPLAM
		KONTROL n %	HASTA n %	
	0 (LL)	91 (%91)	74 (%64,34)	165
	1 (MM)	1 (%1)	6 (%5,21)	7
	2 (LM)	8 (%8)	35 (%30,43)	43
TOPLAM		100	115	215

L55M polimorfizmi için prostat kanseri hasta ve kontrol grupları arasında yapılan tarama sonucu; prostat kanseri hastalarında LL genotipli bireyler % 64,34, MM genotipli bireyler % 5,21 ve LM genotipli bireyler % 30,43 olarak; sağlıklı kontrol grubunda ise LL genotipli bireyler % 91, MM genotipli bireyler % 1 ve LM genotipli bireyler % 8 olarak saptandı. Çalışmamızda kullanılan prostat kanseri hasta ve kontrol grubu Hardy-Weinberg'e uygundur.



Şekil 4.2- PON1 geni L55M polimorfizmi genotiplerine ait agaroz jel görüntüleri. PCR ürünü 230bp uzunluğundadır ve Hsp92 II restriksiyon enzimi ile kesim sonucu 127bp ve 103bp boylarında ürünler oluşmaktadır. % 4'lük agaroz jel sonucu 1, 2, 3, 5, 6 no'lu örnekler heterozigot bireyleri, 7, 8, 9, 10, 11 örnekler normal bireyleri, 4 no'lu örnek homozigot mutant bireyi göstermektedir. (M : 50bp'lik DNA marker)

4.2. Hastalara Ait Klinik Parametrelere Göre Paraoksonaz 1 Geni Q192R ve L55M Polimorfizmlerinin Varyant Allel Dağılımları

Prostat Kanseri Hasta ve Sağlıklı Kontrol Grubunda Q192R polimorfizmi için,

Prostat kanseri hasta ve sağlıklı kontrol grubuna ait Q192R polimorfizmi için varyant allellerin dağılımı Tablo 4.3'de belirtilmiştir.

Tablo 4.3- PON1 geni Q192R polimorfizminin genotip ve allel varyant dağılımı. n : incelenen örnek sayısı.

GEN./ALLEL	Q192R GENOTİP						Q192R ALLEL			
	QQ		QR		RR		Q		R	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
KONTROL	86	(%86)	10	(%10)	4	(%4)	182	(%91)	18	(%9)
HASTA	97	(%85,84)	14	(%12,38)	2	(%1,76)	208	(%92,03)	18	(%7,96)
p DEĞERİ	p= 0,547						p= 0,701			

Prostat Kanseri Hasta ve Sağlıklı Kontrol Grubunda L55M polimorfizmi için,

Prostat kanseri hasta ve sağlıklı kontrol grubuna ait L55M polimorfizmi için varyant allellerin dağılımı Tablo 4.4'de belirtilmiştir.

M / L allel frekans dağılımı açısından, prostat kanseri hasta ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki olduğu gösterilmiştir. M alleleline sahip olmanın prostat kanseri hastalığına yakalanma riskini 3,5 kat arttırdığı sonucuna varılmıştır ($p < 0,0001$, OR 3,5, %95GA).

Tablo 4.4- PON1 geni L55M polimorfizminin genotip ve allel varyant dağılımı. n : incelenen örnek sayısı.

GEN/ ALLEL	L55M GENOTİP						L55M ALLEL			
	LL		LM		MM		M		L	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
KONTROL	91	(%91)	8	(%8)	1	(%1)	10	(%5)	190	(%95)
HASTA	74	(%64,34)	35	(%30,43)	6	(%5,21)	47	(%20,43)	183	(%79,56)
p DEĞERİ	p= 0,000023						p= 0,000002			

4.3. Hastalara Ait Klinik Parametrelere Göre Paraoksonaz 1 Geni Q192R ve L55M Polimorfizmlerinin Sigara Kullanımı, Aile Öyküsü, Metastaz Durumu Açısından İstatistik Değerlendirilmesi

Sigara kullanan ve kullanmayan prostat kanserli hastalar PON1 geni Q192R ve L55M polimorfizmlerine ait genotip ve allel frekansları itibarı ile karşılaştırıldı. Sigara içen ve içmeyenlerde Q192R ve L55M polimorfizmleri için anlamlı bir farklılık bulunamadı (Q192R için $p= 0,316$; L55M için $p= 0,240$).

Hasta çalışma grubumuzun aile öyküsü itibarıyla genotip dağılımları karşılaştırıldı. Yapılan analizler sonucunda aile öyküsü ile Q192R genotip/allel dağılımları yönünden istatistiksel bir anlamlılığa rastlanmadı ($p= 0,595$). L55M polimorfizmi ile aile öyküsü arasındaki olası ilişki incelendiğinde bu bölgeye ait genotip ve allel frekansları ile aile öyküsü arasında anlamlı bir ilişkinin olduğu belirlendi ($p= 0,025$, $\chi^2= 7.3$). Metastaz varlığı ve yokluğu ile genotipler bakımından karşılaştırma yapıldı. Q192R ve L55M polimorfizmleri için anlamlı bir farklılık bulunamadı (Q192R için $p= 0,496$; L55M için $p= 0,126$).

5. TARTIŞMA

Yapılan çalışmalar çeşitli kanser türlerinde olduğu gibi oksidatif stres ve serbest radikallerin, artmış prostat kanseri riskiyle bağlantısı bulunduğunu bildirmektedir (2, 3, 15, 92). Dünyadaki bütün yüksek türdeki canlılar çevresel genotoksinlere karşı korunma için kompleks ksenobiyotik enzim sistemleri geliştirmişlerdir (7, 66). İnsan organizması da serbest radikalleri temizleyen bazı endojen sistemler geliştirmiştir. Lipid peroksidasyonundan karsinojenik yağda çözünür radikalleri ve paraokson gibi organofosforlu bileşiklerin detoksifikasyonunda rol oynayan paraoksonaz enzimi de bu sistemler içinde yer almaktadır (7, 19). Toksik ve çevresel kimyasallara hassasiyette önemi olan PON1 geni polimorfizmlerinin prostat kanserinin belirlenmesinde kilit faktörler olduğuna inanılmaktadır (7, 21, 60). Bu nedenle, prostat kanserine yatkınlık, risk ve prostat kanseri patogeneğinde potansiyel çevresel etkenler ve genetik faktörler arasındaki interaksiyonun iyice anlaşılması gerekmektedir.

PON1 geni Q192R ve L55M polimorfizmleri ile diğer kanser türleri arasındaki ilişkiyi araştıran çalışmalar sonucunda, Q192R polimorfizmi QQ genotipi artmış akciğer kanseri riski ile ilişkilendirilirken, RR genotipinin artmış multipl miyelom hastalığı riski ile bağlantısı kurulmuştur. Fakat Q192R polimorfizmi ile meme kanseri, kolorektal kanser ve beyin tümörleri arasındaki bağlantı gösterilememiştir. PON1 geni L55M polimorfizmi ile artmış meme kanseri riski arasında bağlantı gösterilmiştir (19, 42, 89).

Mevcut çalışmamızda, prostat kanserli hastalardaki Paraoksonaz 1 (PON1) geni Q192R ve L55M polimorfizmleriyle ilgili genotipik değişiklikler araştırılmıştır. Biz bu araştırmamızda prostat kanserli hasta ve sağlıklı kontrol grubunda Paraoksonaz 1 (PON1) geni Q192R ve L55M polimorfizmlerine ait genotip, allel frekanslarını saptayıp; prostat kanseri hasta ve sağlıklı kontrol grubumuza ait olan verileri kullanarak, sigara kullanımı, ailede öyküsü ve metastaz durumları itibariyle genotip dağılımlarını karşılaştırdık.

Yapılan istatistiksel incelemeler doğrultusunda Q192R polimorfizmiyle ilgili olarak PON192/QQ, PON192/QR, PON192/RR genotiplerinin risk oluşturmadığı görüldü ($p=0,547$, $\chi^2=1,206$) (Tablo 4.3). Antognelli ve ark. (2004) ise bulgularımızın aksine çalışmalarında Q192R polimorfizmi PON192/QR ve PON192/RR genotiplerinin

prostat kanseri riski açısından istatistiksel olarak anlamlılığını gösterdiler (7). Bu konuda bizim bulgularımızı ise Marchesani ve ark. (2003) Q192R polimorfizmiyle ilgili yaptıkları çalışmada istatistiksel anlamlılık bulamayarak desteklemektedir (60).

L55M polimorfizmiyle ilgili olarak istatistiksel açıdan anlamlılık saptandı ($p=0,000023$, $\chi^2=21,334$). PON55/MM genotipi ve özellikle PON55/LM genotipinin risk oluşturabileceği bulundu (Tablo 4.4). Yapılan istatistiksel hesaplamalarda L55M polimorfizmi, M alleli mevcudiyetinin prostat kanserine yakalanma riskini arttırdığını düşündürmektedir. M alleleline sahip olmanın prostat kanseri hastalığına yakalanma riskini 3,5 kat arttırabildiği gösterilmiştir ($p<0,0001$, OR 3,5, %95GA). Antognelli ve ark. (2004) çalışmalarında prostat kanseri riski açısından L55M polimorfizmi değerlendirildiğinde PON55/LM genotipinin orta derecede ve PON55/MM genotipinin yüksek derecede risk oluşturabileceği sonucuna varılırken (7); Marchesani ve ark. (2003) çalışmasında L55M polimorfizmiyle prostat kanseri arasında istatistiksel anlamlılık bulunamamıştır (60). Marchesani ve ark.'larının çalışmasının sonucu araştırmalarda kullanılan, hasta ve kontrol grubunu oluşturan bireylerin etnik, klinik ve diğer özelliklerinin yapılan çalışmaların sonucunu etkileyebileceğini düşündürmektedir. Bizim çalışmamızdaki çıkan sonuca göre L' nin M' ye süstitüsyonunun çevresel ve lipidik peroksidasyon kaynaklı genotoksinlere karşı düşük enzim aktivitesine neden olup, bunun da neoplastik transformasyona yatkınlığa neden olabileceği sonucunu düşündürmektedir.

PON1 geni polimorfizmlerinin paraoksonaz ekspresyonunu etkilemesi, bunun sonucunda serbest radikalleri elimine edemeyip, oksidatif stresin oluşması ile prostat kanseri arasında büyük bir ilişki olduğunu bize düşündürmektedir. Literatürde çelişkili sonuçların olmasına karşın, PON1 geni polimorfizmi ile prostat kanseri arasında ki etiyolojik ilişkinin belirlenebilmesi için örnek sayısı ve izlem süresinin arttırıldığı araştırmaların sürdürülmesi gereklidir.

KAYNAKLAR

1. Abdulkadir SA, Magee JA, Peters TJ ve ark. Conditional loss of NKX3.1 in adult mice induces prostatic intraepithelial neoplasia. *Mol Cell Biol* 2002;22(5):1495-503.
2. Adkins S, Gan KN, Mody M, LaDu BN. Molecular basis for the polymorphic forms of human serum paraoxonase/arylesterase: Glutamine or arginine at position 192, for the respective A or B allozymes. *Am J Hum Genet* 1993;52:598-608.
3. Aharoni A, Gaidukov L, Khersonsky O, Gould SMQ, Roodveldt C, Tawfik DS. The 'evolvability' of promiscuous protein functions. *Nature Genetics* 2004;37:73-6. <http://www.nature.com/ng/journal/v37/n1/thumbs/ng1482-F4.jpg>
4. Ahlbom A, Lichtenstein P, Malmstrom H, Feychting M, Hemminki K, Pedersen NL. Cancer in twins: genetic and nongenetic familial risk factors. *J Natl Cancer Inst* 1997;89:287-93.
5. Alberts B, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular Biology Of The Cell*. 4th ed. New York: Garland Science; 2002.
6. Ames BN, Gold LS. Endogenous mutagens and the causes of aging and cancer. *Mut Res* 1991;250:3-16.
7. Antognelli C, Mearini L, Talesa VN, Giannantoni A, Mearini E. Association of CYP17, GSTP1, and PON1 polymorphisms with the risk of prostate cancer. *The Prostate* 2004;63(3):240-51.
8. Athanassiadou P, Bantis A, Gonidi M, Lioffi A, Aggelonidou E, Petrakakou E ve ark. Telomerase expression as a marker in prostate cancer: correlation to clinicopathologic predictors. *J Exp Clin Cancer Res* 2003;22(4):613-8.
9. Aviram M, Billecke S, Sorenson R ve ark. Paraoxonase active site required for protection against LDL oxidation involves its free sulfhydryl group and is different from that required for its arylesterase/paraoxonase activities: selective active of human paraoxonase alloenzymes Q and R. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;10:1617-24.

10. Aynacıoğlu AS, Cascorbi I, Mrozikiewicz PM, Nacak M, Tapanyığıt EE, Roots I. Paraoxonase 1 mutations in a Turkish population. *Toxicol Appl Pharmacol* 1999;157:174-77.
11. Bartsch G, Horninger W, Klocker H ve ark. Prostate cancer mortality after introduction of prostate-specific antigen mass screening in the Federal State of Tyrol, Austria. *Urology* 2001;58:417-24.
12. Bayrak T, Bayrak A, Demirpençe E, Kılınç K. Yeni bir kardiyovasküler belirteç adayı: paraoksonaz. *Hacettepe Tıp Dergisi* 2005;36:147-151.
13. Bennett CL, Price DK, Kim S ve ark. Racial variation in CAG repeat lengths within the androgen receptor gene among prostate cancer patients of lower socioeconomic status. *J Clin Oncol* 2002;20(17):3599-604.
14. Blatter-Garin MC, James RW, Dussoix P, Blanche H, Passa P, Froguel P ve ark. Paraoxonase polymorphism Met-Leu55 is associated with modified serum concentrations of the enzyme. A possible link between the paraoxonase gene and increased risk of cardiovascular disease in diabetes. *J Clin Invest* 1997;99:62-6.
15. Brennan P. Gene-environment interaction and Aetiology of cancer: what does it mean and how can we measure it? *Carcinogenesis* 2002;23: 381-7.
16. Carter BS, Beaty TH, Steinberg GD, Childs B, Walsh PC. Mendelian inheritance of familial prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:3367-71.
17. Chang B, Zheng SL, Isaacs SD ve ark. Linkage and association of CYP17 gene in hereditary and sporadic prostate cancer. *Int J Cancer* 2001;95:354-9.
18. Chen C. Risk of prostate cancer in relation to polymorphisms of metabolic genes. *Epidemiol Rev* 2001;23:30-5.
19. Chen J, Chan W, Wallenstein S, Berkowitz, Wetmur JG. Haplotype-phenotype relationships of paraoxonase-1. *Cancer Epi Biomark Pre* 2005;14(3):731-34.
20. Clarimon J, Eerola J, Hellström O, Tienari PJ, Singleton A. Paraoxonase 1 (PON1) gene polymorphisms and Parkinson's disease in a Finnish population. *Neuro Let* 2004;367:168-70.

21. Costa LG, Li WF, Richter RJ, Shih DM, Lusi A, Furlong CE. The role of paraoxonase (PON1) in the detoxication of organophosphates and its human polymorphism. *Chem Bio Inter* 1999;119-120:429-38.
22. Costa LG, Vitalone A, Cole TB, Furlong CE. Modulation of paraoxonase (PON-1) activity. *Biochem Pharmacol* 2005;69:541-50.
23. Cui J, Staples MP, Hopper JL, English DR, McCredie MR, Giles GG. Segregation analyses of 1,476 population-based Australian families affected by prostate cancer. *Am J Hum Genet* 2001;68:1207-18.
24. Deakin SP ve James RW. Genetic and environmental factors modulating serum concentrations and activities of the antioxidant enzyme paraoxonase-1. *Clinical Science* 2004; 107:435-47. <http://www.clinsci.org/cs/107/0435/cs1070435.htm>
25. Deakin SP, James RW. Genetic and environmental factors modulating serum concentrations and activities of the antioxidant enzyme paraoxonase-1. *Clin Sci* 2004;107:435-47.
26. Di Cristofano A, De Acetis M, Koff A, Cordon-Cardo C, Pandolfi PP. Pten and p27KIP1 cooperate in prostate cancer tumor suppression in the Mouse. *Nat Genet* 2001;27(2):222-4.
27. Elo JP, Visakorpi T. Molecular genetics of prostate cancer. *Ann Med* 2001;33:130-41.
28. Ferré N, Camps J, Ballart JF, Arija V, Murphy MM, Ceruelo S ve ark. Regulation of serum paraoxonase activity by genetic, nutritional, and lifestyle factors in the general population. *Clin Chem* 2003;49(9):1491-97.
29. Finnish Cancer Registry. Cancer incidence in Finland 1998. Cancer statistics of The National Research and Development Centre for Welfare and Health. Cancer Society of Finland publication available at www.cancerregistry.fi/v2000/v2000002oi.html (year2000).
30. Furlong CE. PON1 Status as a Susceptibility Factor in Pesticide Toxicity. http://www.epa.gov/scipoly/sap/2002/june/presentations/epa_6_12.ppt
31. Gan KN, Smolen A, Eckerson HW, La Du BN. Purification of human serum paraoxonase/arylesterase. *Drug Metab Dispos* 1991;19:100-6.
32. Gelmann EP. Searching for the gatekeeper oncogene of prostate cancer. *Crit Rev In Oncol Hem* 2003;46:11-20.

33. Genatlas: Gene Database. Erişim10.05.2006,
<http://www.dsi.univ-paris5.fr/genatlas/fiche.php?symbol=PON1>
34. Ghadirian P, Howe GR, Hislop TG, Maisonneuve P. Family history of prostate cancer: a multi-center case-control study in Canada. *Int J Cancer* 1997;70:679-81.
35. Glover FE Jr, Coffey DS, Douglas LL ve ark. Familial study of prostate cancer in Jamaica. *Urology* 1998;52:441-3.
36. Greenlee RT, Murray T, Bolden S, Wingo PA. Cancer statistics, 2000. *CA Cancer J Clin* 2000;50:7-33.
37. Gronberg H, Damber L, Damber JE, Iselius L. Segregation analysis of prostate cancer in Sweden: support for dominant inheritance. *Am J Epidemiol* 1997;146:552-7.
38. Gronberg H, Damber L, Damber JE. Studies of genetic factors in prostate cancer in a twin population. *J Urol* 1994;152:1484-9.
39. Haenszel W, Kurihara M. Studies of Japanese migrants. I. Mortality from cancer and other diseases among Japanese in the United States. *J Natl Cancer Inst* 1968;40:43-68.
40. Hankey BF, Feuer EJ, Clegg LX ve ark. Cancer surveillance series: interpreting trends in prostate cancer. I. Evidence of the effects of screening in recent prostate cancer incidence, mortality, and survival rates. *J Natl Cancer Inst* 1999;91:1017-24.
41. Harel M, Aharoni A, Gaidukov L ve ark. Structure and evolution of the serum paraoxonase family of detoxifying and antiatherosclerotic enzymes. *Nat Struct Mol Biol* 2004;11:412-9.
42. Hong-Liang L, De-Pei L, Chihj-Chuan L. Paraoxonase gene polymorphisms, oxidative stress and diseases. *J Mol Med* 2003;81:766-79.
43. Hsing AW, Tsao L, Devesa SS. International trends and patterns of prostate cancer incidence and mortality. *Int J Cancer* 2000;85:60-7.
44. Humbert R, Adler DA, Disteché CM, Hassett C, Omiecinski CJ, Furlong CE. The molecular basis of the human serum paraoxonase activity polymorphism. *Nat Genet* 1993;3:73-6.
45. Hussain SP, and Harris CC. Molecular Epidemiology of human cancer. *Recent Results Cancer Res* 1998;154: 22-36.

46. Jaggi M, Johansson SL, Baker JJ, Smith LM, Galich A, Balaji KC. Aberrant expression of E-cadherin and beta-catenin in human prostate cancer. *Urol Oncol* 2005;23(6):402-6.
47. Jemal A, et al. Cancer statistics, 2004. *CA Cancer J Clin.* 2005;55(1):10-30.
48. Jemal A, Thomas A, Murray T, Thun M. Cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2002;52:23-47.
49. Khersonsky O, Tawfik DS. Structure-reactivity studies of serum paraoxonase PON-1 suggest that its native activity is lactonase. *Biochemistry* 2005;44:6371-82.
50. Kibel AS, Faith DA, Bova GS, Isaacs WB. Loss of heterozygosity at 12p12-13 in primary and metastatic prostate adenocarcinoma. *J Urol* 2000;164(1):192-6.
51. Kinzler KW, Vogelstein B. Cancer-susceptibility genes: gatekeepers and caretakers. *Nature* 1997;386:761-63.
52. Lesko SM, Rosenberg L, Shapiro S. Family history and prostate cancer risk. *Am J Epidemiol* 1996;144:1041-7.
53. Lichtenstein P, Holm NV, Verkasalo PK, Iliadou A, Kaprio J, Koskenvuo M ve ark. Environmental and heritable factors in the causation of cancer: analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark and Finland. *N Engl J Med* 2000;343:78-85.
54. Lin X, Tascilar M, Lee WH ve ark. GSTP1 CpG island hypermethylation is responsible for the absence of GSTP1 expression in human prostate cancer cells. *Am J Pathol* 2001;159:1815-26.
55. Lourdes R, Bharti M, Durrington PN, Hernandez A, Mackness MI. Hydrolysis of platelet-activating factor by human serum paraoxonase. *Biochem J* 2001;354:1-7.
56. Mackness B, Mackness MI, Arrol S, Turkie W, Durrington PN. Effect of the molecular polymorphisms of human paraoxonase (PON1) on the rate of hydrolysis of paraoxon. *Br J Pharmacol* 1997;122:265-68.
57. Mackness MI, Mackness B, Durrington PN, Connely PW, Hegele RA. Paraoxonase: biochemistry, genetics and relationship to plasma lipoproteins. *Curr Opin Lipidol* 1996;7:69-76.

58. Mackness MI, Peuchant E, Dumon MF, Walker CH, Clerc M. Absence of "A"-esterase activity in the serum of a patient with Tangier disease. *Clin Biochem* 1989;22:475-78.
59. Maier C, Rosch K, Herkommer K ve ark. A candidate gene approach within the susceptibility region PCAP on 1q42.2-43 excludes deleterious mutations of the PCTA-1 gene to be responsible for hereditary prostate cancer. *Eur Urol* 2002;42:301-7.
60. Marchesani M, Hakkarainen A, Tuomainen TP, Kaikkonen J, Pukkala E, Uimari P ve ark. New paraoxonase 1 polymorphism I102V and the risk of prostate cancer in Finnish men. *J Natl Cancer Inst* 2003;95(11):812-18.
61. McMenamin ME, Soung P, Perera S, Kaplan I, Loda M, Sellers WR. Loss of PTEN expression in paraffin-embedded primary prostate cancer correlates with high Gleason score and advanced stage. *Cancer Res* 1999;59:4291-6.
62. Millar DS, Ow KK, Paul CL, Russel PJ, Molloy PL, Clark SJ. Detailed methylation analysis of the glutathione S-transferase pi (GSTP1) gene in prostate cancer. *Oncogene* 1999;18:1313-24.
63. Monroe KR, Yu MC, Kolonel LN ve ark. Evidence of an X-linked or recessive genetic component to prostate cancer risk. *Nat Med* 1995;1:827-9.
64. Morganti G, Gianferrari L, Cresseri A, Arrigoni G, Lovati G. Recherches clinicostatistiques et génétiques sur les néoplasies de la prostate. *Acta Genet Stat Med* 1956;6:304-5.
65. Myers MP, Pass I, Batty IH ve ark. The lipid phosphatase activity of PTEN is critical for its tumor suppressor function. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:13513-8.
66. Nebert DW, McKinnon RA, Puga A. Human drug-metabolizing enzyme polymorphisms: effects on risk of toxicity and cancer. *DNA Cell Biol* 1996;15(4):273-80.
67. Nelson CP, Kidd LC, Sauvageot J ve ark. Protection against 2-hydroxyamino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine cytotoxicity and DNA adduct formation in human prostate by glutathione S-transferase P1. *Cancer Res* 2001;61:103-9.

68. Nelson WG, De Marzo AM, Dewese TL. The molecular pathogenesis of prostate cancer: implications for prostate cancer prevention. *Urology* 2001;57:39-45.
69. Ostrander EA, Stanford JL. Genetics of prostate cancer: too many loci, too few genes. *Am J Hum Genet* 2000;67:1367-75.
70. Page WF, Braun MM, Partin AW, Caporaso N, Walsh P. Heredity and prostate cancer: a study of World War II veteran twins. *Prostate* 1997;33:240-5.
71. Perera FP. Molecular Epidemiology: insights into cancer susceptibility, risk assessment, and prevention. *J Natl Cancer Inst* 1996;88(8): 496-509.
72. Reddy ST, Wadleigh DJ, Grijalva V ve ark. Human paraoxonase-3 is an HDL-associated enzyme with biological activity similar to paraoxonase-1 protein but is not regulated by oxidized lipids. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:542-7.
73. Rodriguez C, Calle EE, Miracle McMahill HL ve ark. Family history and risk of fatal prostate cancer. *Epidemiology* 1997;8:653-7.
74. Rokman A, Ikonen T, Seppala EH ve ark. Germline alterations of the RNASEL gene, a candidate HPC1 gene at 1q25, in patients and families with prostate cancer. *Am J Hum Genet* 2002;70:1299-304.
75. Sakr WA, Grignon DJ, Crissman JD, Heil Brun LK, Cassin BJ, Pontes JJ ve ark. High grade prostatic intraepithelial neoplasia (HGPIN) and prostatic adenocarcinoma between the ages of 20-69: An autopsy study of 249 cases. *In Vivo* 1994;8:439-43.
76. Sanghera DK, Saha N, Aston CE, Kamboh MI. Genetic polymorphism of paraoxonase and risk of coronary heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:1067-73.
77. Schaid DJ, McDonnell SK, Blute ML, Thibodeau SN. Evidence for autosomal dominant inheritance of prostate cancer. *Am J Hum Genet* 1998;62:1425-38.
78. Seçkin D, Onur R, İlhan N, Ardıçoğlu A, İlhan N. Prostat kanserli ve benign prostat hiperplazili hastalarda plazma vasküler endotelial büyüme faktörü, oksidatif stres ve nitrik oksit ilişkisi. *Fir Üni Sağ Bil Der* 2005;19(4):277-81.
79. Shimizu H, Ross RK, Bernstein L, Yatani R, Henderson BE, Mack TM. Cancers of the prostate and breast among Japanese and white immigrants in Los Angeles County. *Br J Cancer* 1991;63:963-6.

80. Smith JR, Freije D, Carpten JD ve ark. Major susceptibility locus for prostate cancer on chromosome 1 suggested by a genomewide search. *Science* 1996;274:1371-4.
81. Spitz MR, Currier RD, Fueger JJ, Babaian RJ, Newell GR. Familial patterns of prostate cancer: a case-control analysis. *J Urol* 1991;146:1305-7.
82. Stanford JL, Just JJ, Gibbs M ve ark. Polymorphic repeats in the androgen receptor gene: molecular markers of prostate cancer risk. *Cancer Res* 1997;57(6):1194-8.
83. Stapleton AM, Timme TL, Gousse AE va ark. Primary human prostate cancer cells harboring p53 mutations are clonally expanded in metastases. *Clin Cancer Res* 1997;3:1389-97.
84. Steinberg GD, Carter BS, Beaty TH, Childs B, Walsh PC. Family history and the risk of prostate cancer. *Prostate* 1990;17:337-47.
85. Stephan DA, Howell GR, Teslovich TM ve ark. Physical and transcript map of the hereditary prostate cancer region at Xq27. *Genomics* 2002;79(1):41-50.
86. Taioli E. Structure of Epidemiological studies on genetic Susceptibility to environmental toxicants. *Toxicol Lett* 2002;127:315-19.
87. Udayakumar TS, Nagle RB, Bowden GT. Fibroblast growth factor-1 transcriptionally induces membrane type-1 matrix metalloproteinase expression in prostate carcinoma cell line. *The Prostate* 2004;58(1):66-75.
88. Verhage BA, Baffoe-Bonnie AB, Baglietto L ve ark. Autosomal dominant inheritance of prostate cancer: a confirmatory study. *Urology* 2001;57:97-101.
89. Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3- Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer* 2002;2:489-501.
90. Wang G, Reed E, LI QQ. Apoptosis in prostate cancer: Progressive and therapeutic implications (Review). *Int J Mol Med* 2004;14:23-34.
91. Wang L, McDonnell SK, Elkins DA ve ark. Analysis of the RNASEL gene in familial and sporadic prostate cancer. *Am J Hum Genet* 2002;71:116-23.
92. Whittemore AS, Kolonel LN, Wu AH ve ark. Prostate cancer in relation to diet, physical activity, and body size in blacks, whites, and Asians in the United States and Canada. *J Natl Cancer Inst* 1995;87:652-61.

93. Whittemore AS, Wu AH, Kolonel LN ve ark. Family history and prostate cancer risk in black, white, and Asian men in the United States and Canada. *Am J Epidemiol* 1995;141:732-40.
94. William GN, Angelo MDM, William BI. Mechanisms of disease: Prostate cancer. *N Engl J Med* 2003;349(4):366-81.
95. Williams K, Fernandez S, Stien X, Ishii K, Love HD, Lau YF ve ark. Unopposed c-MYC expression in benign prostatic epithelium causes a cancer phenotype. *The Prostate* 2005;63(4):369-84.
96. Xu J, Zheng SL, Carpten JD ve ark. Evaluation of linkage and association of HPC2/ELAC2 in patients with familial or sporadic prostate cancer. *Am J Hum Genet* 2001;68:901-11.
97. Xu J, Zheng SL, Komiya A ve ark. Germline mutations and sequence variants of the macrophage scavenger receptor 1 gene are associated with prostate cancer risk. *Nat Genet* 2002;32(2):321-5.
98. Yang RM, Naitoh J, Murphy M ve ark. Low p27 expression predicts poor disease free survival in patients with prostate cancer. *J Urol* 1998;159(3):941-5.
99. Zegarra-Moro OL, Schmidt LJ, Huang H, Tindall DJ. Disruption of androgen receptor function inhibits proliferation of androgen-refractory prostate cancer cells. *Cancer Res* 2002;62(4):1008-13.

HAM VERİLER

	YAŞ	AILEDE CA	GLEASON	metastaz	PSA1 ted oncesi	PSA2 ted sonrası	SİGARA	PON 192	PON55
Sp1	78		0 4+3	(-)	12,03	0	(-)	0	0
Sp2	70		0 2+3	(+)	5,84	0,44	(-)	0	2
Sp3	74		0 4+4	(+)	61,9 yok		(-)	0	0
Sp4	59	ABI-CA	4+5	(+)	20,74 yok		(-)	0	0
Sp5	68	ANNE-MİDE CA	4+3	(-)	9,98	0,47	25 YIL 1 PK	0	0
Sp6	73		0 3+3	(-)	5,87 yok		(-)	0	0
Sp7	67	ANNE-UTERUS CA	3+3	(-)	7,81	0,02	(-)	2	0
Sp8	61		0 3+3	(-)	11,5	0,1	(-)	0	2
Sp9	70		0 yok	(-)	4,72 yok		(-)	0	0
Sp10	61		0 3+3	(+)	44,55 yok		(-)	0	2
Sp11	77		0 3+4	(-)	7,3	0	(-)	0	1
Sp12	71		0 3+3	(+)	3 yok		(-)	0	2
Sp13	70		0 3+4	(-)	27 yok		20 YIL 1 PK	0	2
Sp14	72	DAYI-MESANE TM	4+3	(-)	11,7	0,01	(-)	0	0
Sp15	77		0 2+3	(-)	6,05	0,273	(-)	2	0
Sp16	71		0 3+4	(-)	14,4	0,01	50 YIL 2 PK	2	0
Sp17	72	KARDEŞ AKC. BABA KC 5+4	5+4	(+)	46,41	0,38	20 YIL 1 PK		0
Sp18	73		0 3+4	(-)	7,12	0,03	40 YIL 1 PK	0	0
Sp19	70		0 4+4	(+)	100	548	(-)	0	0
Sp20	75		0 4+3	(+)	168	0,037	15 YIL 1/2 PK	0	2
Sp21	72	ANNE AKC CA	3+3	(-)	7,5	0,07	(-)	2	0
Sp22	70		0 2+3	(-)	6,5	0,001	(-)	2	0
Sp23	80		0 3+3	(-)	160,61	0,023	55 YIL 1 PK	0	2
Sp24	70		0 yok	(-)	yok		(-)		0
Sp26	64		0 3+3	(-)	5,14	0,014	35 YIL 2 PK		0
Sp27	82		0 4+3	(-)	yok	174,3	30 YIL 1 PK	0	2
Sp28	81		0 4+5	(-)	yok	1297	20 YIL 1 PK	0	0
Sp29	81	ABI-KOLON CA	5+4	(-)	yok	0,001	60 YIL 1 PK	0	2
Sp30	64		0 3+3	(-)	6,96 yok		(-)	0	2
Sp32	52		0 3+4	(-)	9,9	0,01	(-)	2	0
Sp33	68		0 3+3	(+)	yok	0,12	50 YIL	0	0
Sp34	77		0 4+5	(-)	3,3	0,02	(-)	0	2
Sp35	65		0 4+3	(+)	2,55 yok		38 YIL 1 PK	2	0
Sp36	65		0 3+3	sal 6-7.kat.T7L3 s	8,41 yok		30 YIL 1/2 pk	0	2
Sp37	63	ABI-PCA	3+3	(-)	0,19	0,331	(-)	0	1
Sp38	62		0 4+5	(-)	68,08	0,013	40 YIL 1 PK	0	2
Sp39	78	ABI-RENALCA EX	3+4	(-)	8	0,29	30 YIL 1/2 PK	0	2

Krp21	MG	48	0	5+4	(+) KEMIK	73	1,58 (-)	0	2
Krp22	IZ	58	ERKEK KARDEŞ KOLON	3+5	(-)	18	0,018 (-)	0	0
Krp23	KK	75	BABA AKC CA	5+4	(+) KEMIK	100 yok	(-)	2	0
Krp24	ÖY	56	BABA MESANE+PCA	K 3+3	(-)	20	0,99 (-)	0	1
Krp25	MC	75	0 yok	0 yok	(+) KEMIK	100 yok	(-)	0	0
Krp26	HŞG	51	BABA AKC CA EX	4+5	(+) KEMIK	4,18 yok	(+)	0	0
Krp27	IÇ	76	BABA-AMGA PCA	3+4	(+) KEMIK		(-)	0	2

FORMLAR

Hasta Bilgilendirme Formu

Tarih: .../.../...

Sayı:

Sayın Bay.....

- 1.Çalışmakta olduğumuz “Prostat Kanseri hastalarda paraoxonase gen polimorfizminin risk faktörü olarak belirlenmesi” isimli proje Prostat Kanseri ile ilgili bir projedir. Sizin bu proje için seçilmenizin sebebi hasta popülasyonu temsil etmenizdir.
- 2.Yapılması planlanan çalışma için Prostat Kanseri belirlenen olguların periferik kanlarından elde edilen DNA ile ilgili deneyler gerçekleştirilecektir.
3. Periferik kanınızdan izole edilen DNA'nız saklanacaktır.Toplam 100 Prostat Kanseri hastasından oluşturulan DNA bankasında PON1 geni polimorfizm analizi yapılacaktır.
- 4.Çalışma süresi 1 yıldır.Bu süre içinde dilerseniz çalışmadan çıkma hakkınız bulunmaktadır.Bu durumda sayıyı tamamlamak amacıyla yerinize yeni Prostat Kanseri hastaları bulunacaktır.
- 5.Bu çalışma direkt olarak size tıbbi bir yarar sağlamayacaktır.
- 6.Bu çalışmanın size maddi bir getirisi olmayacağı gibi sizden ya da kurumunuzdan herhangi bir ücret talep edilmeyecektir.
- 7.Bu çalışmada yukarıda belirtilen analizlerden başka bir analiz yapılmak istenmesi halinde size ulaşılarak ayrı bir onay alınacaktır.
- 8.Elde edilen bilgi şifre korumalı bir bilgisayar programında korunacak olup çalışma kapsamındaki araştırmacılar dışında kimse ile paylaşılmayacaktır.
- 9.Oluşturulan bu DNA bankasında kişi isimleri kullanılmayacak,örnekler numaralı olarak saklanacaktır.
- 10.Sonuçlar doktorunuza gönderilecektir.
- 11.Çalışma süresince ve sonrasında dilediğiniz zaman bu çalışma ile ilgili bilgi alma hakkına sahip bulunmaktasınız.

ETİK KURUL KARARI

ETİK KURUL KARARI



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
DEKANLIĞI
Yerel Etik Kurulu



Sayı : 727

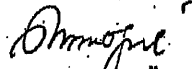
Tarih 04.11.2004.

Konu :

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA,

İliği:24.08.2004 tarih ve 033531 sayılı yazınıza cevaben.

Sorumlu araştırmacılığını Fakültemiz Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Genetik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof.Dr.Uğur Özbek'in, üstlendiği Biyolog.Tuba Deniz'in yürüteceği "Prostat Kanseri Hastalarda Paraoxonase Gen Polimorfizminin Risk Faktörü Olarak Belirlenmesi" başlıklı tek merkezli (tanı testi geliştirmeye yönelik) çalışması kurulumuzda incelendi ve araştırma fonundan desteklendiği takdirde, etik yönden bir sakınca taşımadığına karar verilmiş olup, etik kurul kararımızın Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Genetik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof.Dr.Uğur Özbek'e iletilebilmesi için gereğini saygılarımla arz ederim.


Prof.Dr.Ahmet GÜL
İstanbul Tıp Fakültesi
Etik Kurul Başkanı

Ekl:Tutanak

**İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
YEREL ETİK KURUL TUTANAĞI**

Toplantı Tarihi: 06.10.2004
Toplantı Yeri : Behçet Kütüphanesi Pembe Salon
Toplantı Sayısı: 09
Prot.No.Sayısı :

Sorumlu araştırmacılığını Fakültemiz Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Genetik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof.Dr.Uğur Özbek'in, üstlendiği Biyolog Tuba Deniz'in yürüteceği "Prostat Kanserli Hastalarda, Paraoxonase Gen Polimorfizminin Risk Faktörü Olarak Belirlenmesi" başlıklı tek merkezli (tanı, testi geliştirmeye yönelik) çalışması kurulumuzda incelendi ve araştırma fonundan desteklendiği takdirde, etik yönden bir sakınca taşımadığı görüldü, uygulamaya konulabileceğine karar verildi.

Prof.Dr.Ahmet GÜL 

Prof.Dr.Mübeccel DEMİRKOL 

Prof.Dr.Berrin UMMAN 

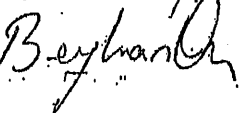
Prof.Dr.Cahide GÖKKUŞU


Prof.Dr.Koray ACARLI

Prof.Dr.Selim BADUR

Prof.Dr.Aykan CANBERK 

Prof.Dr.Pınar SAİP

Prof.Dr.Beyhan ÖMER 

Prof.Dr.Oğuzhan ÇOBAN 

Prof.Dr.Veli UYSAL

Prof.Dr.Kamil PEMBEÇİ 

Prof.Dr.Nuran YILDIRIM

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Tuba	Soyadı	Deniz
Doğ.Yeri	İstanbul	Doğ.Tar.	15.05.1975
Uyruğu	TC	TC Kim No	26690021736
Email	tdenizl@ttnet.net.tr	Tel	0 212 2660086

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora		
Yük.Lis.		
Lisans	İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü	2000
Lise	Nişantaşı Kız Lisesi	1992

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.			-
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜD S Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	İyi	İyi	İyi		

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı	52,663	53,021	53,378
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Ofis Programları	İyi

Yayımları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

Özel İlgi Alanları (Hobileri): Kitap okumak, müzik dinlemek

