T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

"Tez Danışmanı/Tez İzleme Komitesi Üyesi olanlar isimden sonra parantez içinde belirtilecek"

(DOKTORA TEZİ)

MANGAN SÜPEROKSİT DİSMUTAZ VE GLUTATYON PEROKSİDAZ I GEN POLİMORFİZMLERİNİN PROSTAT KANSERİ İLE İLİŞKİSİ

CANAN BAŞARAN KÜÇÜKGERGİN

DANIŞMAN
PROF.DR.ŞULE SEÇKİN

BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
BİYOKİMYA PROGRAMI

İSTANBUL-2010

TEZ ONAYI

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

13 / 04 /2010

Prof.Dr.Tamer DEMİRALP
V. Müdür

Kurum	: İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Program Adı	: Biyokimya
Programın seviyesi	: Yüksek Lisans ☐ Doktora ☒
Anabilim Dalı	: Biyokimya
Tez Sahibi	: CANAN (BAŞARAN) KÜÇÜKGERGİN
Tez Başlığı	: Mangan süperoksit dismutaz ve glutatyon peroksidaz I gen polimorfizmlerinin prostat kanseri ile ilişkisi
Sınav Yeri	: İstanbul Tıp Fakültesi Biokimya Anabilim Dalı
Sınav Tarihi	: 02 / 04 / 2010

Tez Sınav Jürisi

Ünvanı Adı Soyadı (Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı) İmzası

1.Prof.Dr. Müjdat UYSAL (İ.Ü.İstanbul Tıp Fakültesi Biokimya Anabilim Dalı)

2.Prof.Dr. G. Şule SEÇKİN (Danışman) (Tez İzleme Komitesi Üyesi) (İ.Ü.İstanbul Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı)

3.Prof.Dr. Makbule AYDIN (Tez İzleme Komitesi Üyesi) (Deneysel Tıp Araştırma Uygulama Enstitüsü Sinirbilim Anabilim Dalı)

4.Prof.Dr. Pervin VURAL (Tez İzleme Komitesi Üyesi) (İ.Ü.İstanbul Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı)

5.Doç.Dr. Fehime BENLİ AKSUNGAR (Maltepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı)

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 haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Canan Başaran Küçükgergin

(İmza)

İTHAF

Benim her şeyim olan eşim ve oğluma ithaf ediyorum…..

TEŞEKKÜR

Tezimin her aşamasında bilgisini, tecrübesini ve sabrını benden esirgemeyen, onunla çalışmaktan büyük gurur ve mutluluk duyduğum değerli hocam ve tez danışmanım **Prof. Dr. Şule SEÇKİN**'e, eğitimim süresince her türlü bilgi ve deneyimleriyle bize ışık tutan ve yol gösteren başta Anabilim Dalı Başkanımız değerli hocam sayın **Prof. Dr. Müjdat UYSAL** olmak üzere Biyokimya Anabilim Dalı'ndaki bütün hocalarıma;

Tezimin bazı aşamalarında değerli katkıları olan İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü'nde sayın **Prof. Dr. Makbule AYDIN, Dr. Elif Özkök'e;**

Hastaların toplanmasında ve klinik verilerine ulaşılmasında büyük emeği olan İstanbul Tıp Fakültesi Üroloji A.B.D'nda sayın **Prof. Dr. İsmet NANE, Uzm. Dr. M. Öner Şanlı ve Dr. Tzevat Tefik'e;**

Eğitimim süresince zevkle çalıştığım ve birlikte güzel günler geçirdiğim **Lab. Sevilay Tahmisoğlu** başta olmak üzere asistan arkadaşlarıma ve anabilim dalımızın diğer çalışanlarına;

Son olarak, bugünlere gelmemde en büyük emeğe sahip olan, hayatım boyunca karşılaştığım maddi ve manevi bütün zorluklarda sonsuz desteklerini her zaman hissettiğim sevgili anne ve babama, her aşamada bana sonsuz sabır gösteren ve destek veren sevgili eşim ile oğluma teşekkürlerimi sunmayı bir borç bilirim.

Uzm. Bio. Canan KÜÇÜKGERGİN

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: T-945/06102006

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI .....**HATA! YER İŞARETİ TANIMLANMAMIŞ.**
BEYAN ..... İİ
İTHAF .....İV
TEŞEKKÜR..... V
İÇİNDEKİLER ..... Vİ
TABLOLAR LİSTESİ ..... Vİİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ.....İX
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ X
ÖZET.....Xİİ
ABSTRACT..... Xİİİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER..... 3
2.1. PROSTAT BEZİNİN MORFOLOJİSİ..... 3
2.1.1. Embriyoloji..... 3
2.1.2. Anatomi 3
2.2. PROSTAT KANSERİ 6
2.2.1. Etiyoloji 6
2.2.2. Risk Faktörleri: 7
2.2.3. Histolojik Derecelendirme..... 9
2.2.4. Klinik Evreleme 10
2.2.5. Prostat Kanserinde Tanı 12
2.3. OKSİDATİF STRES 17
2.3.1. Serbest radikaller ve etkileri 17
2.3.2. Oksidatif Stres ve Kanser 24
2.3.3. Antioksidan sistem 26
2.4. POLİMORFİZM VE KANSER 36
2.4.1. Polimorfizm 36
2.4.2. MnSOD (Ala-9Val) Gen Polimorfizmi ve kanserle ilişkisi 37
2.4.3. GPxI (Pro198Leu) gen polimorfizmi ve kanserle ilişkisi 40
3. GEREÇ VE YÖNTEM..... 43

3.1. ÇALIŞMA GRUPLARI 43
3.2. ÇALIŞMA MATERYALİ 43
3.3. KULLANILAN ALETLER 43
3.4. KULLANILAN KİMYASAL MALZEMELER 44
3.5. KULLANILAN YÖNTEMLER 46
3.5.1. MnSOD ve GPxI Gen Polimorfizminin Tayini 46
3.5.2. Periferik Kandan DNA İzolasyonu 47
3.5.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) 48
3.5.4. GPxI gen bölgesinin çoğaltılması (108) 52
3.5.5. MnSOD Ala-9 Val gen bölgesinin çoğaltılmas 54
3.5.6. Plazma Malondialdehit (MDA) Tayin 56
3.5.7. Tam Kanda Glutatyon (GSH) Tayini : 57
3.5.8. Süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesinin ölçülmesi 57
3.5.9. Glutatyon peroksidaz (GPx) aktivitesinin ölçülmes 58
3.6. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER 60
4. BULGULAR 61
4.1. Kontrol ve hasta gruplarının klinik değerleri 61
4.2. Kontrol ve hasta gruplarını GSH ve MDA değerleri ile SOD ve GPx aktiviteleri 62
4.3. MnSOD Ala-9Val polimorfizmi ile ilgili sonuçlar 62
4.4. GPx I Pro198 Leu polimorfizmi ile ilgili sonuçlar 68
5. TARTIŞMA 75
KAYNAKLAR 82
FORMLAR 100
ETİK KURUL KARARI 116
ÖZGEÇMİŞ 117

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1:TNM SINIFLAMASI.....11
Tablo 2-2: Yaşa özgü PSA (ng/ml) referans aralıkları.....14
Tablo 2-3: Reaktif oksijen ve nitrojen türleri 18
Tablo 2-4 : Organizmada antioksidan sistem elemanları 27
Tablo 4-1: Kontrol ve hasta gruplarının klinik değerleri.....61
Tablo 4-2. Kontrol ve hasta grubundaki tam kan GSH, plazma MDA değerleri ile.....62
Tablo 4-3: Kontrol ve prostat kanserli hasta grubunda Ala-9Val genotip dağılımı.....63
Tablo 4-4:MnSOD Ala-9Val polimorfizmi genotiplerinin plazma SOD aktivitesi.....65
Tablo 4-5: MnSOD Ala-9Val genotiplerinin tümörün derecesi ile ilişkisi 65
Tablo 4-6: MnSOD Ala-9Val genotiplerinin klinik T evresi ile ilişkisi 66
Tablo 4-7: MnSOD Ala-9Val genotiplerinin kemik metastazı ile ilişkisi.....67
Tablo 4-8: MnSOD polimorfizminin lojistik regresyon analizi 68
Tablo 4-9: Kontrol ve hasta grubunda GPxI genotip dağılımı ve allel sıklığı.....69
Tablo 4-10:GPxI Pro198Leu polimorfizmi genotiplerinin sigara kullanımı ile 70
Tablo 4-11:GPxI Pro198Leu polimorfizmi genotiplerinin GPx aktivitesi ile ilişkisi.....71
Tablo 4-12: GPxI Pro198Leu genotiplerinin tümörün derecesi ile ilişkisi 71
Tablo 4-13: GPxI Pro198Leu genotiplerinin klinik T evresi ile ilişkisi.....72
Tablo 4-14: GPxI Pro198Leu genotiplerinin kemik metastazı ile ilişkisi.....73
Tablo 4-15 :GPxI polimorfizminin lojistik regresyon analizi 74

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil2-1: Üregenital sistem anatomisi. 4
Şekil 2-2: Prostatın zonal anatomisi 6
Şekil 2-3: Prostat kanserinde etiyoloji 7
Şekil 2-4: Gleason derecelendirme sisteminin şematik diyagramı 10
Şekil 2-5: Reaktif oksijen ve nitrojen türlerinin organizmadaki etkileri 21
Şekil 2-6 : Lipit peroksidasyonunun kimyasal yolu 23
Şekil 2-7: Hücrede serbest radikallerin etkileri 25
Şekil 2-8: ROS ve metal iyonlarının indüklediği sinyal yolları 26
Şekil 2-9: Glutatyon 30
Şekil 2-10: SOD izoenzimlerinin gen yapısı 32
Şekil 2-11: Sinyal peptid proteinin sitozolden mitokondriye taşınması 34
Şekil 2-12 :MnSOD geni üzerindeki polimorfizmler 38
Şekil 2-13: MnSOD enziminin kanser riski ilişkisi 40
Şekil 2-14: GPx I gen polimorfizmi 41
Şekil 3-1: PZR üç basamağı 50
Şekil 3-2: GPxI Pro198Leu PZR ana ürün 53
Şekil 3-3: GPxI Pro198Leu polimorfizmi 54
Şekil 3-4: MnSOD Ala-9Val ana ürün 55
Şekil 3-5: MnSOD Ala-9Val polimorfizmi 56
Şekil 4-1 Türk erkek populasyonunda MnSOD Ala-9Val genotip dağılımı 63
Şekil 4-2: Klinik T evresine göre MnSOD Ala-9 Val genotiplerinin dağılımı 66
Şekil 4-3:MnSOD Ala-9 Val genotiplerinin kemik metastazı üzerine etkisi 67
Şekil 4-4:Türk erkek populasyonunda GPxI Pro198Leu genotip dağılımı 69
Şekil 4-5:Klinik T evresine göre Pro198Leu genotiplerinin dağılımı....72
Şekil 4-6: Pro198Leu genotiplerinin kemik metastazı üzerine etkisi....73

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

SOD	Süperoksit dismutaz
GPx	Glutatyon peroksidaz
Cu-ZnSOD	Bakır-çinko süperoksit dismutaz
MnSOD	Mangan süperoksit dismutaz
ECSOD	Ekstrasellüler süperoksit dismutaz
Ala-9Val	Alanin-9Valin
Ala	Alanin
Val	Valin
Pro	Prolin
Leu	Lösin
Pro198Leu	Prolin198lösin
GSH	Glutatyon
MDA	Malondialdehit
PSA	Prostat spesifik antijenin
CAG	Poliliglutamin kodlayan polimorfik trinükleotid
GSTPI	Glutatyon-S-Transferaz Pi
Rb	Retinoblastom geni
AJCC	Amerika Joint Comitee on Canser
UICC	Union International Contre le Canser
PRM	Parmakla rektal muayene
PSA	Prostat spesifik antijen
TRUS	Transrektal ultrasonugrafidir
PSAD	PSA dansitesi
MEOS	Mikrozomal karma fonksiyonlu oksidaz sistemi
$O_2^{\cdot -}$	Süperoksit radikali
H_2O_2	Hidrojen peroksit
MDA	Malondialdehit
GpxI	Glutatyon peroksidaz I
PLGSH-Px	Fosfolipid hidroperoksid glutatyon peroksidaz
ETS	Elektron transport sistemi
Tom	Dış zardan taşınma proteini

Tim	İç zardan taşınma proteini
RLFP	Restriksiyon fragman uzunluğu polimorfizmi
Ala-9Val	Alanin-9Valin
Pro198Leu	Prolin198Lösin
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit dihidrat
SDS	Sodyumdodesil sülfat
dNTP	Deoksinükleotid trifosfatlar
DTNB	5,5'-Dithio-bis 2-nitrobenzoikasid
TEP	1,1,3,3-tetraetoksipropan standardı
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
NaOH	Sodyum hidroksit
NaCI	Sodyum Klorür
WLF	Lökosit Parçalama Tamponu
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
BMI	Vücut kitle indeksi
TCA-TBA-HCI	Triklorasetik asit-tiyobarbitürik asit-hidroklorik asit ayıracı

ÖZET

KÜÇÜKGERGİN, C.B. (2010). Mangan süperoksit dismutaz ve glutatyon peroksidaz I gen polimorfizmlerinin prostat kanseri ile ilişkisi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya ABD. /Doktora Tezi. İstanbul.

Bu tez çalışmasına 2005 ile 2009 yılları arasında İstanbul Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı'na başvurup klinik ve histopatolojik olarak prostat kanseri tanısı konan hastalar (n= 134, ortalama yaş: 64.1 yıl) ile parmakla rektal muayenesi ve serum prostat spesifik antijen (PSA) düzeyleri normal olan sağlıklı kişiler (n= 159, ortalama yaş: 62.5 yıl) dahil edilmiştir.Kontrol ve hasta grubundaki kişilerden elde edilen DNA'lardan MnSOD ve GPxI polimorfizmleri için polimeraz zincir reaksiyonu (PZR), restriksiyon fragman uzunluk polimorfizmi (RFUP) ve agaroz jel elektroforezi teknikleri kullanılmıştır. Ayrıca oksidatif stresin göstergesi olarak tam kanda GSH, plazmada MDA düzeyleri, GPx ve SOD aktiviteleri spektrofotometrik yöntemle tayin edilmiştir. İstatistiksel analizde pearson ki kare (χ^2) testi , student-t testi, Mann-Whitney U testi , lojistik regresyon testi kullanılmıştır.

Hasta ve kontrol grubu arasında yaş ve BMI açısından anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır. Hasta grubunda kontrol grubuna göre GSH düzeylerinde anlamlı bir azalma ($p<0.05$), yine hasta grubunda PSA, MDA düzeyleri ile GPx ve SOD enzim aktivitelerinde kontrol grubuna göre anlamlı bir artış bulunmaktadır ($p<0.05$). MnSOD Ala-9Val polimorfizminde genotip ve allel sıklığı bakımından hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır. Fakat ileri evre ve metastazda Ala/Ala genotipi anlamlı olarak bir risk oluşturmaktadır. GPxI Pro198Leu polimorfizminde ise hasta grubunda Leu/Leu genotip dağılımında kontrol grubuna göre anlamlı bir artış görülmektedir. Ayrıca, ileri evre ve metastazda Leu/Leu genotipi anlamlı olarak bir risk oluşturmaktadır. Sigara kullanımı Leu alleli taşıyanlarda, taşımayanlara göre (Pro/Pro genotip) prostat kanseri oluşumunda bir risk faktörü olarak rol oynamakta, buna karşın gelişiminde etkili olmamaktadır.

Sonuç olarak, Ala/Ala genotipinin prostat kanseri gelişiminde etkili olduğunu; Leu/Leu genotipinin ise prostat kanseri oluşumunda ve gelişiminde rolü olduğunu ileri sürebiliriz.

Anahtar Kelimeler: Prostat kanseri, Mangan süperoksit dismutaz, Glutatyon peroksidaz I, Polimorfizm

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: T-945/06102006

ABSTRACT

KÜÇÜKGERGİN, C.B. (2010). Relationship of Polymorphisms of Manganese Superoxide Dismutase (SOD) and Glutathione Peroxidase I (GPxI) genes with Prostate Cancer.

Istanbul University, Institute of Health Sciences, Department of Biochemistry, / Doctorate Thesis, İstanbul, 2010

The patients who have admitted to Istanbul Faculty of Medicine, Department of Urology between 2005 and 2009 and were found to have clinically and histopathologically confirmed prostate cancer (n=134, mean age: 64,1 year) have formed the patient group in this thesis study. Normal, healthy people who have admitted to the same clinic in same time period and had normal digital rectal examination findings with normal serum prostate specific antigen (PSA) levels (n=159, mean age: 62,5 years) have formed the control group. DNA samples obtained from patients and healthy controls were analysed for MnSOD and GPxI polymorphisms by using Polymerase chain reaction (PCR), restriction fragment length polymorphism (RFLP) and Agarose Gel Electrophoresis techniques. In addition, GSH levels in whole blood and plasma MDA levels, plasma GPx and SOD activities were measured as an indicator of oxidative stress. Pearson Ki-square (χ^2) test , student-t test, Mann-Whitney U test and logistic regression test were used for statistical analyses of the results.

No statistically significant differences were determined between patient and control groups in terms of age and body mass index (BMI). However, it was observed that, when compared to control group, there was a significant decrease in GSH level ($p<0.05$) and significant increases in PSA, MDA levels and GPx and SOD enzyme activities ($p<0.05$) in patient group. In terms of MnSOD Ala-9Val polymorphism, there was no significant difference between patient and control groups. Nevertheless, Ala/Ala genotype was a significant risk in advanced stage and metastatic carcinoma. When GPxI Pro198Leu polymorphism is evaluated, it was observed that there was a significant increase in Leu/Leu genotype distribution in patient group when compared to control group. In addition, Leu/Leu genotype comprised a significant risk in advanced stage and metastasis. It is proposed that, cigarette smoking is a risk factor for prostate cancer in Leu allel carriers when compared to non- carriers of this allel (Pro/Pro genotype).

In conclusion, we can propose that Ala/Ala genotype and Leu/Leu genotype have an impact in development of prostate cancer, however Leu/Leu genotype also has a role in disease progression.

Key Words: Prostate cancer, Manganase superoxide dismutase, Glutathione peroxidaseI ,Polimorphism

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. T-945/06102006

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Prostat kanseri ileri yaş erkeklerde en sık görülen ve erkeklerde akciğer kanserinden sonra ikinci sırada yer alan bir kanser türü olarak bilinmektedir (1). Serbest radikaller; hücre ve dokulardaki proteinler, lipitler, nükleik asitler gibi makromoleküllerde zararlı etkilere yol açmaktadır (2). Serbest radikallerin zararlı etkilerini engellemek üzere organizmada antioksidan savunma sistemleri olarak adlandırılan savunma mekanizmaları bulunmaktadır. Süperoksit dismutaz (SOD) ve glutatyon peroksidaz (GPx) enzimleri serbest radikallerin birikmesini ve lipit peroksidasyonunun başlamasını önlemektedirler (3,4). Süperoksit dismutaz enziminin Bakır-çinko süperoksit dismutaz (Cu-ZnSOD), mangan süperoksit dismutaz (MnSOD), ekstrasellüler süperoksit dismutaz (ECSOD) olmak üzere üç izoformu bulunmaktadır (5). MnSOD; mitokondride süperoksit radikaline ($O_2^{\cdot-}$) karşı etkili tek enzim olduğundan hücrenin oksidatif hasardan korunmasındaki önemli enzimlerden biri olarak rol oynamaktadır (5,6). MnSOD genindeki Ala-9Val polimorfizmi; sinyal dizisindeki -9. amino asit olan valin yerine gendeki bir nükleotidteki baz değişimi (T→C) sonucu alanin gelebilmekte, bu değişiklik enzimin mitokondri içerisine girişini etkileyebilmektedir. Sinyal dizisinde valin amino asidine sahip olan MnSOD enziminin mitokondri iç membranından kısmen oysa sinyal dizisinde alanin amino asidine sahip olan MnSOD enziminin mitokondri membranını kolayca geçebildiği belirtilmektedir (7-9).Yapılan çalışmaların büyük bir kısmında Ala allelinin, bazı çalışmalarda ise Val allelinin çeşitli hastalıkların oluşumunda önemli bir risk faktörü olduğu ileri sürülmektedir. Over kanserinde (10), meme kanserinde (11), Parkinson hastalığında (12), prostat kanserinde (13), kolon kanserinde (14) tip I diabet hastalığında (15) Ala allelinin bir risk faktörü olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmektedir. Val allelinin ise, akciğer kanserinde (16), herediter hemokromatoziste (17) bir risk faktörü olduğu belirtilmektedir. Sonuçta; MnSOD polimorfizminin etkisinin hastalığın türüne, tümörün yerine hatta konağa bağlı olduğu, özellikle hormonların etkili olduğu dokularda gelişen kanser tüerlerinde (prostat, over, meme) daha çok Ala allelinin etkili olduğu belirtilmektedir (16).

Değişik kanser türlerinde GPx, SOD enzim aktivitelerinin arttığı, bazılarında azaldığı bazılarında ise değişmediğini gösteren çelişkili sonuçlar bulunmaktadır. Çeşitli kanser türlerinde yapılan çalışmalarda GPx enzim aktivitesinin azaldığı (18), arttığı (19), bir çalışmada ise değişmediği (20) belirtilmektedir. Çeşitli kanser türlerinde SOD enzim

aktivitesinin arttığını (19) veya değişmediğini (18) gösteren çeşitli çalışmalar bulunmaktadır.

GPxI, homotetramerik yapıda ve her birinde bir selenosistein kalıntısı içeren selenoprotein yapısında bir enzimdir. GPxI geninin ekzon 2 de tek nükleotid polimorfizmi olan Prolin198lösin (Pro198Leu) polimorfizmi bulunmaktadır. Bu polimorfizmde 198. kodondaki 593. nukleotidte C yerine T gelmesi sonucu prolin yerine lösin oluşmaktadır (21). Son yıllarda yapılan az sayıda çalışmada Pro198Leu polimorfizminin kanser oluşumunda önemli bir risk faktörü olduğu ileri sürülmektedir. Yapılan çalışmalarda Pro/Pro genotipine sahip olanların daha güçlü bir antioksidan savunmaya sahip olduğu oysa Leu/Leu genoripine sahip olanların kanser hastalığına yakalanma riskinin daha fazla olduğu belirtilmektedir (22-24). Ratnasinghe ve ark. (23) Leu/Leu genotipinin Pro/Pro genotipinin % 130 oranında, Pro/Leu genotipinin %80 oranında kanser riskini arttırdığını ileri sürmektedirler. Bir başka çalışmada Leu/Leu genotipinin meme kanserinde (24) bir risk faktörü olduğu gösterilmektedir. Bazı çalışmalarda ise bazal hücre karsinomunda (25), meme kanserinde (26) GpxI Pro198Leu polimorfizminin bir risk taşımadığını belirtmektedirler.

Bütün bu bilgilerin ışığında çalışmamızda,

1-Tam kanda glutatyon (GSH), plazmada malondialdehit (MDA) düzeyleri ile antioksidan sistem enzimlerinden süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPx) aktivitelerini ölçerek oksidatif stresin prostat karsinojenezindeki rolünü incelemeyi,

2-Türk toplumundaki sağlıklı erkekler ile prostat kanserli hastalar arasında Mn süperoksit dismutaz (Ala-9Val) ve glutatyon peroksidaz I (Pro198Leu) gen polimorfizmlerinin genotip dağılımlarını ve allel sıklığını incelemeyi,

3-Prostat kanserinde Ala-9Val ve Pro198Leu gen polimorfizmleri ile tümörün derecesi, evresi ve metastaz oluşumu arasındaki ilişkiyi araştırmayı,

4-Oksidatif streste etkili olduğu öne sürülen sigaranın, MnSOD Ala-9Val ve GPxI Pro198Leu gen polimorfizmleri ile prostat kanseri arasındaki ilişki üzerindeki etkisini incelemeyi amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

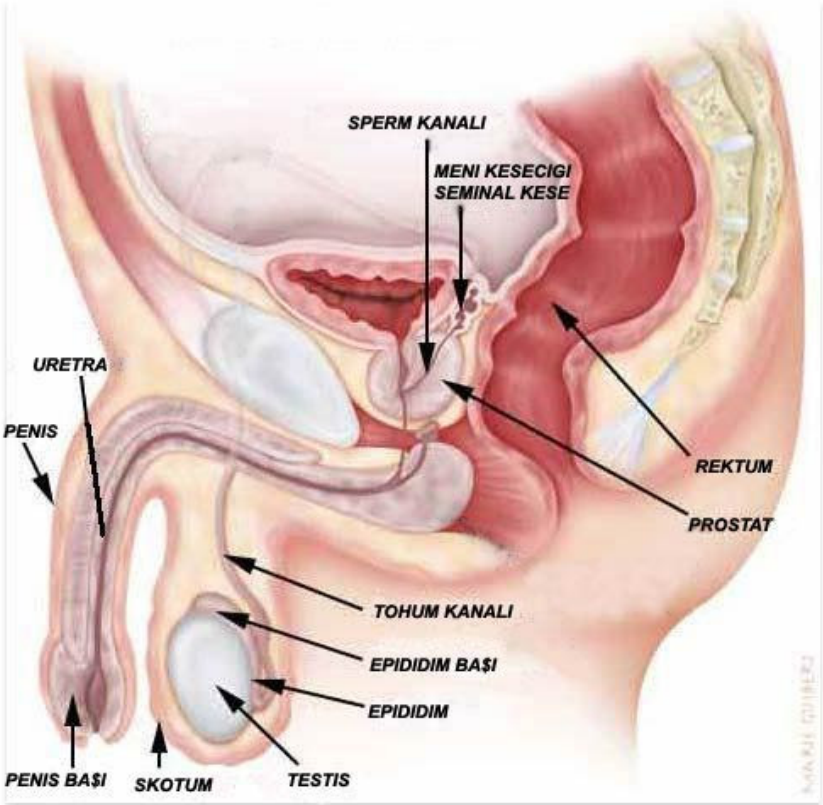
2.1. PROSTAT BEZİNİN MORFOLOJİSİ

2.1.1. Embriyoloji

Prostatik üretra epiteli, ürogenital sinüs endoderminden köken almaktadır. Embriyonel gelişimin üçüncü ayında prolifere olmaya başlayarak çevresindeki mezanşimal doku içine penetre olan bazı tomurcuklanmalar göstermektedir. Prostatın glandüler bez epiteli bu endodermal hücre tomurcuklarından gelişirken, epitel hücreleriyle ilişkili mezenşimden ise, organın stroması ve düz kasları meydana gelmektedir. Üretral orta noktada, verumontanum seviyesinde prostata açılan ejakülatuvar duktuslar ve etrafındaki mezankim dokusu, mezonefrik kanal kökenlidir. Bu nedenle prostat çift embriyonik gelişimlidir. Neonatal dönemde çapı 1 cm' den az olan prostat, puberteye kadar gelişerek 2 cm' den küçük çapa ulaşmakta ve puberteden sonra prostatın matürasyonu hızlanmaktadır ve 20 yaşında erişkin halini almaktadır (27).

2.1.2. Anatomi

Erkek genital sisteminin en büyük aksesuar bezi olan prostat, mesane boynu ile ürogenital diyafram arasında, gerçek pelviste yer almaktadır. Prostat bezi, tabanı proksimalde mesane boynu ve veziküla seminalis giriş noktalarında, apeksi distalde ürogenital diyaframda olan ters çevrilmiş koniye benzeyen, prostatik üretrayı çevreleyen fibromüsküler glandüler bir organdır (şekil 2.1.)(28). Prostatik üretra, bezin merkezinde vertikal olarak ilerlerken, verumontanum seviyesinde öne doğru yaklaşık 35º'lik açılanma oluşturmaktadır. Denonviller fasyası olarak bilinen ince bağ dokusu tabakası, posteriorda prostat ve veziküla seminalisleri rektumdan ayırır. Prostat kanlanmasını başlıca a. vesikalis inferior, rectalis media ve arteria pudenta interna'dan sağlamaktadır. Prostat venleri, prostatın kapsülü ve fibröz kılıf arasında zengin pleksuslar oluşturmaktadır. Bu pleksuslar presakral vertebral pleksuslarla (Batson venleri) anastomoz yaparlar. Bu yapı prostat kanserinin erken vertebral yayılımını açıklamaktadır. Son larak internal iliak venlere drene olurlar. Lenfatikleri ise bezin çevresinde pleksus oluşturarak internal iliak lenf düğümlerine boşalır. Prostatın sinirleri, inferior hipogastrik pleksustan gelmektedir (29).



Şekil2-1Üregenital sistem anatomisi(www.cambridgeurologypartnership.co.uk/images/.).

Prostatın Zonal Anatomisi

McNeal'e göre prostat periferik zon, santral zon, transisyonel zon, anterior fibromusküler stroma ve preprostatik sfinkterik zondan oluşmaktadır. İlk üçü prostatın glandüler kısmını oluştururken, anterior veya ventral fibromusküler stroma ile preprostatik sfinkterik bölge prostat dokusunun non-glandüler kısmını oluşturmaktadır (30,31)(Şekil 2.2).

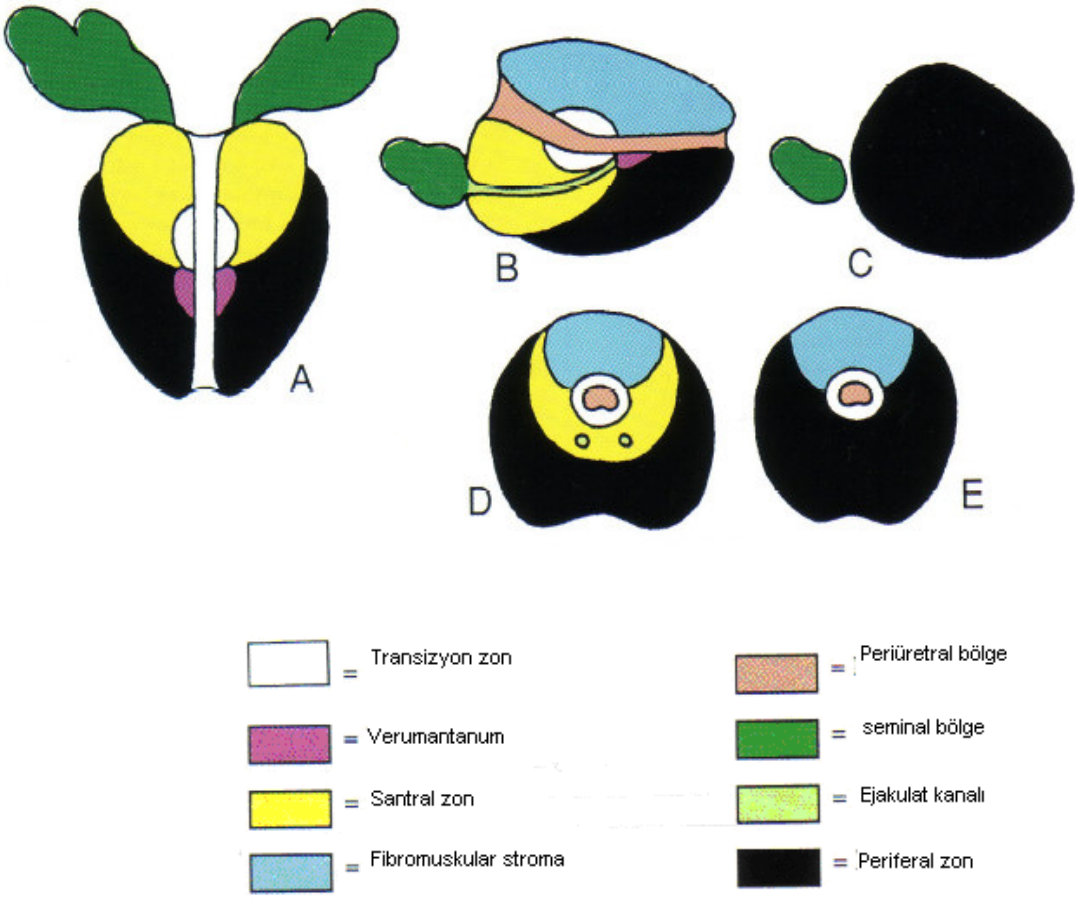
Anterior fibromusküler stroma: Kalın bir konnektif doku olup prostatın ön yüzünü kaplamaktadır. Orijini detrüsör kası olup mesane boynundan başlayarak prostatik üretranın ön yarısını sarmaktadır. Apekste, bu düz kaslar dış sfinktere lifler verir. Bu tabaka prostatik üretranın ön yüzünde bir sfinkter oluşturmaktadır. Anterior fibromuskuler stroma prostat hacminin üçte birini oluşturmakta ve glandüler yapı içermemektedir (30,31).

Periüretral glandüler zon: Verumontanumun üst köşesinden sonraki üretranın ön tarafını sarmaktadır. Hem glandüler hem de nonglandüler elemanlar taşır. Bu bölüm retrograd ejakülasyonu önleyen bir sfinkterdir. Ana komponenti preprostatik üretrayı saran düz kas sfinkteridir. Bununla üretra arasında çok ince periüretral glandlar bulunmaktadır (30,31).

Periferik zon: Prostatın apikal, lateral ve posterior kısımlarını saran en büyük parçasıdır. Total glandüler dokunun %75'i burada bulunmaktadır. Karsinomların %75-80'i bu zondan çıkmaktadır. Prostat apeksinde prostat kapsülü incedir ve prostat kanserlerinin yayılımı açısından zayıf bir anatomik bölgedir (30,31).

Santral zon: Glandüler fonksiyon yapan diğer %25'lik bölümdür. Prostat kanserlerinin %5-10'u bu zondan kaynaklanmaktadır. Vezikülo seminalisler ve duktus deferensler, prostat tabanında santral zona girerek birleşerek ve ejakülatör kanalları oluşturup santral zon içine ilerleyerek verumontanumdan üretraya açılmaktadır (30,31).

Transisyonel zon: Proksimal ve distal üretranın birleştiği bölgede küçük bir grup glanddan oluşur ve tüm prostatın %5'inden azını oluşturmaktadır. Prostat kanserinin %10-20'si transizyonel zondan çıkmaktadır. Komşuluğundaki santral ve periferik zonlardan cerrahi kapsül adı verilen fibromüsküler doku adı verilen bir doku ile ayrılmaktadır (30,31).



Şekil 2-2: **Prostatın zonal anatomisi (31).**

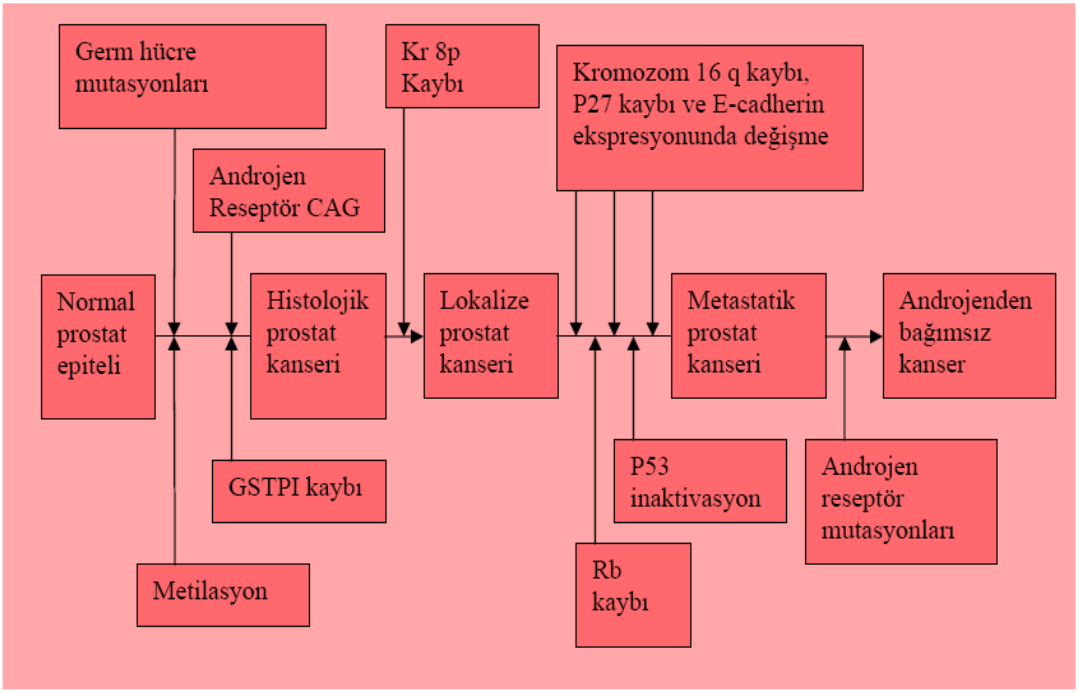
2.2. PROSTAT KANSERİ

2.2.1. Etiyoloji

Prostat kanseri, erkeklerde en sık tanı konulan, akciğer kanserinden sonra en çok kanser ölümlerinden sorumlu olan, aynı zamanda gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerdeki orta yaşını geçmiş erkeklerin en sık tanı alan kanser türüdür. Bir erkekte 0-39 yaş arası prostat kanseri gelişme olasılığı %0.01iken, 40-59 yaş arası %2.58, 60-79 yaş arası %14.7 ve yaşam boyu bir erkekte klinik önemi olan prostat kanseri gelişme olasılığı % 17.8 gibi yüksek oranlardadır. Prostat spesifik antijenin (PSA) prostat kanseri tanısında kullanılmaya başlamasından sonra 1986-1992 yılları arasında prostat kanseri insidansında bir artış olmuş bundan sonrada düşmeye başlamıştır. PSA testinin yaygınlaşması ile lokal-bölgesel hastalık insidansı artarken metastatik hastalık insidansı azalmaktadır (32).

Genetik yatkınlık ve çevresel faktörlerin prostat kanserinin etiyolojisinde etkili olabileceği ileri sürülmektedir. Etiyolojide temel faktörler şunlardır:

Hücre kinetiğinin bozulması, germ hücre mutasyonları, DNA metilasyonları, tümör süpresör genlerinin kaybı, androjen reseptör mutasyonları, büyüme faktörleri, stromal ve epitelyal etkileşimler (Şekil 2-3)(33).



Şekil 2-3: Prostat kanserinde etiyoloji (33)

CAG: Poliliglutamin kodlayan polimorfik trinükleotid GSTPI: Glutatyon-S-Transferaz Pi Rb: Retinoblastom geni

2.2.2. Risk Faktörleri:

Prostat kanseri için bir takım potansiyel risk faktörlerin olduğu belirtilmektedir. Bu faktörler;yaş, ırk, aile hikayesi, diyetle alınan yağ ve hormonlar, vazektomi, A vitamini, ve düşük D vitamin düzeyleri olarak sayılabilmaktedir (33).

a-Yaş:

Prostat kanserinin yaşla çok kuvvetli ilişkisi bulunmaktadır. Bir çok diğer organ kanserinde belirli bir yaşta insidans belirgin olarak artmaktadır. Fakat prostat kanserinde belli yaş aralığında insidansın artmasından ziyade, insidansta yaşın artışına paralel bir yükselme

bulunmaktadır. Özellikle 50 yaştan sonra insidans katlanarak artmaktadır. 40 yaşın altında prostat kanseri gelişmiş olması riski 1/10.000, 40-59 yaş arasında 1/ 103 ve 60-79 yaş arasında 1/8 olarak belirtilmektedir (34).

b-Irk:

Prostat kanseri insidansı dünya çapında büyük değişkenlik göstermektedir.Uzak doğuda yaşayanlar batı ülkelerinde yaşayanlara göre 100'e 10 gibi bir oranda daha az yakalanma riski göstermektedir. Japonlarda görülen düşük insidansın diet ve yaşam tarzı faktörlerinden dolayı olduğu belirtilmektedir. ABD'de yaşayan siyah derili erkeklerde prostat kanseri insidansının ve mortalitesinin beyazlara göre daha yüksek olduğu ve bunlarda metastatik hastalığın daha fazla olduğu bilinmektedir. Prostat kanserinin tüm evreleri göz önüne alındığında 5 yıllık yaşam oranları zencilerde % 87, beyazlarda ise %94 olarak belirtilmektedir (35) .

c- Aile öyküsü:

Prostat kanseri birinci derece akrabalarında bulunan kişilerde risk 2-3 kat artmaktadır. Prostat kanserlerinin %9' unda genetik yatkınlık gösterilmiştir. Akrabalarında prostat kanseri olanların prostat kanserine yakalanma riski yaşları ile ters orantılı olarak artmaktadır. Elli yaşında ve birden fazla akrabasında prostat kanseri olan bir kişinin oğlu veya babası, 70 yaşında ve etkilenmiş bir akrabası bulunmayan kişinin oğlu veya babasına göre prostat kanseri için 5-11 kat daha fazla risk taşımaktadır (36).

d- Diyet :

Prostat kanseri gelişim riskinin yağ tüketimi yüksek oranda olan kişilerde arttığı ileri sürülmektedir. Düşük vitamin D düzeylerinin ve yüksek oranda kalsiyum tüketiminin de prostat kanseri riskini artırdığı gösterilmiştir. Ayrıca, vitamin E, selenyum ve yüksek oranda likopen içeren domatesin prostat kanseri riskini azalttığı ileri sürülmektedir (37).

e- Hormonlar:

Normal prostat gelişimi için testosteron ve onun daha etkin bir metaboliti olan dihidrotestosteron gereklidir. Prostat kanseri testosteronu dihidrotestosterona dönüştüren 5 alfa redüktazın konjenital eksikliği olan insanlarda görülmez.Fakat prostat kanserinde androjen ve östrojenlerin kesin rolleri tam olarak anlaşılamamıştır (38).

f- Diğer :

Prostat kanseri riskinin vazektomili hastalarda arttığı, bazı çalışmalarda prostat kanserine yakalanma yaşının 35'e indiği belirtilmiştir. Düzenli fiziksel aktivitenin de kanser yakalanma riskini azalttığı ileri sürülmektedir (38).

2.2.3. Histolojik Derecelendirme

Prostat adenokarsinomunun değerlendirilmesinde bir çok derecelendirme sistemi bulunmasına rağmen en çok kabul gören Gleason derecelendirmesidir. Gleason sistemi; tümörün, küçük büyütmede tespit edilen, glandüler diferansiyasyon ve büyüme paterninin, stroma ile ilişkisine dayanmaktadır. Sitolojik özellikler tümör derecelendirmesinde rol oynamamaktadır. Primer (en sık) ve sekonder (ikinci en sık) yapısal paternler belirlenip, 1'den 5'e kadar derecelendirilmektedir. 1 en iyi diferansiyasyonu, 5 en kötü diferansiyasyonu göstermektedir. Bulunan iki sayı toplanarak Gleason skor elde edilmektedir. Tümör tek bir histolojik paternden oluşuyorsa primer ve sekonder paternlere aynı derece verilmektedir.

Gleason skoru, 2'den (1+1=2), 10'a kadar (5+5=10) değişmektedir. Gleason dereceleme sisteminde skor gruplandırılması; 2-4 (düşük derece), 5-7 (orta derece) ve 8-10 (yüksek derece) olarak 3'lü grup şeklinde yapılmıştır. Son çalışmalar; Gleason skor 7 kanserin, 5 ve 6' ya göre daha kötü prognozlu olduğunu göstermektedir. Bu nedenle 2-4 (iyi diferansiye), 5-6 (orta diferansiye), 7(orta-az diferansiye), 8-10 (az diferansiye) şeklindeki gruplandırma daha yaygın olarak kullanılmaktadır. (Şekil 2.4) (39).

Derece 1: Tümör çevresi sınırlı, uniform, sıkışık ve ayrık yerleşimli bez yapılardan oluşmaktadır.

Derece 2: Derece 1'deki gibidir fakat burada daha değişken hücre biçimleri ve bezler arasında daha fazla stroma vardır ayrıca periferde sınırların belirginliği azalmaktadır.

Derece 3a: Normal glandlar arasına infiltre olan tek dağılımlı iyi diferansiye bezlerden oluşmaktadır. Tümör bezleri derece 1 ve 2 ' den daha büyük nükleuslu ve bazofilik sitoplazmaya sahip olmak için açılı ve sıkışmış olabilir.

Derece 3b: Fark edilemeyen ya da olmayan lümen arasına dağılan küçük bezlerden oluşmaktadır.

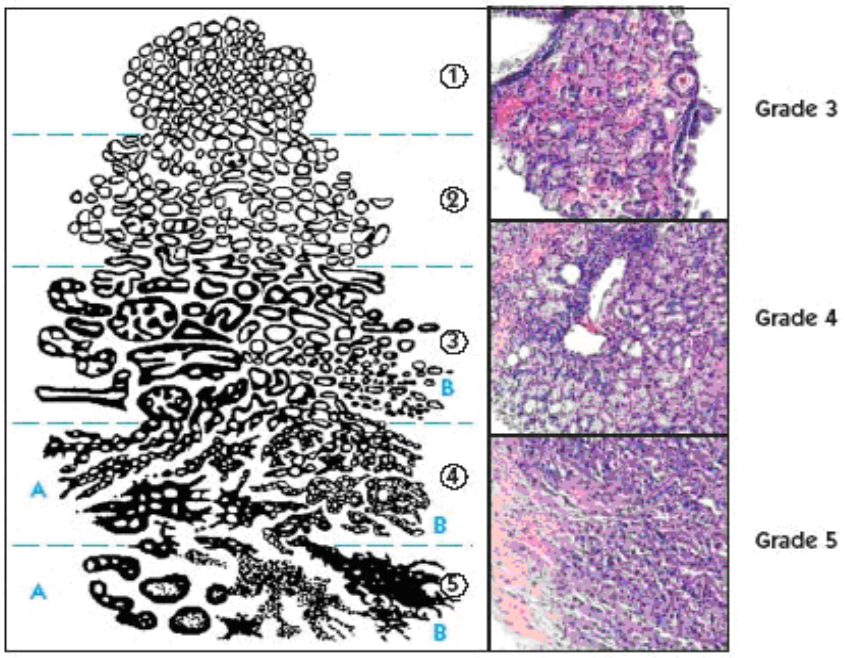
Derece 3c: Stromal infiltrasyon olmaksızın düzgün sınırlı papiller ve kribriform paternden oluşmaktadır.

Derece 4a: Bazı düzgün görünümlü lümenler ile erimiş görünümünde küçük glandüler yapılardan oluşmaktadır.

Derece 4b: Yetersiz stromayla birlikte düzensiz invazyon gösteren kenarlar içeren papiller ve kribriform paternden oluşmaktadır.

Derece 5a: Ortası nekroze olmuş papiller/ kribriform komedokarsinomu şeklinde oluşum göstermektedir.

Derece 5b: Tümör hücrelerinden yoğun olan tabakaya infiltre olan tek hücreler (mühür yüzüğü şeklinde hücreler)' den oluşmaktadır (40).



Şekil 2-4: Gleason derecelendirme sisteminin şematik diyagramı (www.prostate-cancer.org/education/staging/img.)

2.2.4. Klinik Evreleme

Prostat karsinomunun evrelemesinde iki amaç bulunmaktadır. Prognozu tayin etmek ve hastalığın yaygınlığına göre uygun tedaviyi belirlemektir. Klinik evrelemede günümüzde kabul gören sistemler, TNM evreleme sistemi ve Whitmore-Jewett evreleme sistemleridir.

TNM evreleme sistemi 1992'de Amerika Joint Comitee on Canser (AJCC) ve Union International Contre le Canser/ İnternational Union Against Canser (UICC) kurumları tarafından oluşturulmuştur ve 1997'de yine bu kurumlar tarafından revize edilmiştir. AJCC/ UICC verilerine göre 'p' öntakısı TNM sisteminin klinik sınıflandırmasıyla kıyaslanabilecek patolojik sınıflandırmasını simgelemektedir (pTNM) (Tablo 2.1) (41).

Tablo 2-1:TNM SINIFLAMASI

Primer tümör (T)

Tx : Primer tümör değerlendirilemiyor

T0 : Tümöre ait hiçbir bulgunun olmadığı olgular

T1 : Palpasyon ya da görüntüleme yöntemleriyle klinik olarak saptanamayan olgular

T1a : Benign hastalık için yapılan rezeksiyonda %5'den daha az dokuda tümör mevcut.

T1b : Benign hastalık için yapılan rezeksiyonda %5'den daha fazla dokuda tümör mevcut.

T1c : PSA yüksekliği nedeniyle yapılan biyopside tespit edilmiştir.

T2 : Prostata sınırlı tümör

T2a : Tek lobu tutan tümör

T2b : Her iki lobu tutan tümör

T3 : Prostat kapsülünü aşan tümör

T3a : Ekstrakapsüler yayılım (tek veya çift taraflı)

T3b : Veziküla Seminalis tutulumu

Bölgesel Lenf Nodülleri (N)

Nx : Bölgesel lenf nodüllerinin değerlendirilemediği olgular

N0 : Bölgesel lenf nodu metastazı bulunmayan olgular

N1 : Bölgesel lenf noduna veya nodlarına metastaz var.

Uzak Metastaz (M)

Mx : Uzak metastaz değerlendirilemiyor.

M0 : Uzak metastaz yok.

M1 : Uzak metastaz

M1a : Bölgesel olmayan lenf nodlarına metastaz.

M1b : Kemik metastazı

M1c : Diğer uzak organlara metastaz.

2.2.5. Prostat Kanserinde Tanı

Prostat kanserini göstermek için kullanılan üç temel tanı aracı bulunmaktadır. Bunlar parmakla rektal muayene (PRM), prostat spesifik antijen (PSA) miktarı tayini ve transrektal ultrasonugrafidir (TRUS). Bu yöntemlerle şüphe oluşan durumlarda biopsi alınarak prostat kanseri tanısı konulmaktadır. Bu yöntemlerden yalnızca birinin anormal olduğu durumlarda biopsi sonucunun pozitif olma ihtimali % 6-25 arasında değişmektedir. Eğer iki değer anormal ise bu durumda pozitif biopsi ihtimali % 18-60 arasında değişmektedir. Eğer üç değer anormal ise bu durumda pozitif biopsi ihtimali % 56-72 arasında değişmektedir (42).

a)Parmakla rektal muayene (PRM)

Parmakla rektal muayene prostat kanseri tanısında en basit ve en güvenli yöntemlerden biridir. Belirgin prostat riski nedeniyle, PRM'sinde pataloji saptanan erkeklerde PSA düzeyleri ne olursa olsun biyopsi alma gerekliliği bulunmaktadır. Çünkü prostat kanserlerinin %25'inde serum PSA değeri normal kabul edilen 4 ng/ml nin altındadır. Prostat kanserlerinin büyük çoğunluğu perifaral zon yerleşimlidir ve 0.2ml'den daha büyük iseler PRM ile tespit edilebilmektedirler. Belli bir boyutun altında olanlar ve transisyonel zonda yerleşen tümörler PRM ile saptanamamaktadır (42).

b)Prostat spesifik antijen (PSA)

PSA onkolojide kullanılmakta olan en önemli tümör belirtecidir. Prostat kanseri açısından kabul edilebilir duyarlılığa sahip olmasına rağmen özgüllük açısından yetersizdir. PSA'nın

kullanım alanları prostat kanseri tanıma, erken tanı, evreleme ve tedavi sonrası izlemdir. Kronolojik açıdan PSA ilk kez 1971 yılında seminal plazmada tanımlanmış, 1980 yılında serumda ölçülmüş ve son olarak 1994 yılında prostat kanseri tanımlamasında kullanım onayı almıştır (43).

Nötral serin proteaz yapısındaki PSA, 237 aminoasitten oluşan polipeptit yapısına sahiptir ve karbonhidrat oranı PSA molekülünün %7'sini oluşturmaktadır. 19. kromozomda (19q13.4) bulunmaktadır. (43).

PSA, prostat asiner hücre ve duktal epitelden salgılanmaktadır. Fizyolojik görevi seminal koagulum likeifikasyonu olup semende serumdan 106 kat daha fazla bulunur. Prostat kanser hücresinde PSA üretimi normal prostat epiteline göre daha yavaştır. PSA serum yarılanma ömrü 2-3 gündür. PSA sistemik dolaşımda birkaç şekilde bulunmaktadır (44,45).

Serbest PSA %10-30

∝-1 antikimotripsin – PSA %70-90

∝-2 makroglobulin– PSA %1

∝-1 antitripsin– PSA %1

Gerçekte total PSA değeri bu 4 formun toplamından oluşmaktadır

Serum PSA düzeyini etkileyen faktörler

Serum PSA düzeyleri prostat kanserinden başka, hastaya bağlı çeşitli faktörlerden, ürolojik girişimlerden, kanser dışı prostat hastalıklarından ve bazı farmakolojik tedavilerden etkilenebilmektedir. Ejakulasyonun serum PSA seviyesinde artışa neden olduğu belirtilmektedir. Akut prostatit, subakut prostatit ve üriner retansiyonun da serum PSA seviyesini etkilediği bildirilmektedir. Prostat masajı sonrasında serum PSA dezeyinin iki kat artığı , sistoskopinin, üratral kateterizasyonun ve prostat iğne biyopsisinin serum PSA düzeyinde klinik açıdan anlamlı yükselmelere neden olduğu belirtilmektedir (46).Normal serum PSA değerinde üst sınır genel olarak 4.0 ng/ml olarak kabul edilmektedir. Ancak prostat kanserli olguların yaklaşık % 20 kadarında serum PSA düzeyi 4.0 ng/ml' den düşüktür. Serum PSA değeri 4.0-10 ng/ml arasında olan erkeklerden alınana biyopsilerde

kanser tespit etme oranının yaklaşık sadece %25 tir. Bu nedenle, özellikle ''gri bölge '' olarak adlandırılan 4-10 ng/ml aralığında, PSA testinin güvenilirliğinin desteklemek için yaşa özgü PSA, PSA dansitesi, yıllık PSA artış hızı, serbest PSA, serbest/total PSA oranı gibi yeni yöntemler geliştirilmiştir (47).

Yaşa ve ırka özgü PSA :

Yaşla birlikte prostattaki BPH dokusunun çoğalması beraberinde volüm artışını getirdiği için standart PSA referans aralığı (0-4ng/ml) hatalı yorumlara neden olabilmektedir. Bu nedenle PSA değerindeki yaşa bağlı değişimler dikkate alınarak, prostat kanseri tanısında gençlerde duyarlılığı, yaşlılarda ise özgünlüğü artıracak daha etkili bir yöntem olarak "yaşa özgü PSA" ileri sürülmüştür. Irklara göre önerilen yaşa özgü PSA aralıkları aşağıda görülmektedir (Tablo 2.2). Beyaz ırkta PSA aralığı 0- 4 ng/ml olarak alındığında genç erkek popülasyonunun sadece %1'i, yaşlı erkeklerin ise %15'i normal sınırların üzerinde değerlendirilmektedir. Yaşa özgü PSA referans aralığına göre erkekler değerlendirildiğinde ise, genç erkeklerin %3'ü, yaşlıların ise sadece %9'u normal sınırlar üzerinde PSA değerine sahiptir. Bu yöntemle 60 yaşın altındaki kür şansı olan genç hastalara daha düşük evrelerde daha çok tanı konabilmekte, tedavinin gerekmediği yaşlı hastalarda ise daha az tanı konmaktadır(48).

Tablo 2-2: Yaşa özgü PSA (ng/ml) referans aralıkları

Yaş Aralığı	Beyaz ırk	%Özgünlük	Siyah ırk	%Özgünlük	Sarı ırk	%Özgünlük
40-49	0,0-2,5	95	0,0-2,0	93	0,0-2,0	95
50-59	0,0-3,5	95	0,0-4,0	88	0,0-3,0	95
60-69	0,0-4,5	95	0,0-4,5	81	0,0-4,0	95
70-79	0,0-6,5	95	0,0-5,5	78	0,0-5,0	95

Standart PSA aralığı, PSA değerindeki yaşla ve prostat hacmi ile birlikte görülen oynamaları göz önünde bulundurmaz. Yaşa özgü PSA referans aralığı PSA'yı 60 yaş

altındaki erkekler için daha duyarlı, 60 yaş üzerindekiler için ise daha özgün bir tümör belirleyicisi haline getirmeyi amaçlar. Ancak PSA değeri 2.6 ng/ml'nin üzerinde olsa da (sırasıyla) 3.5 ve 4.5 ng/ml'nin altında olan 50-59 ve 60-69 yaş arası tanı konmamış prostat kanserli hastaların, yaşam beklentilerinin uzun olmasına rağmen tedavisiz kalmaları bu yöntemin en önemli açığı olarak belirtilmektedir (48,49).

PSA dansitesi (PSAD) :

PSA değeri 4-10 ng/ml olan hastalarda biyopsi ile kanser yakalanma oranı yaklaşık %25-30'dur. Geri kalan hastalarda PSA yüksekliğinin nedeni BPH'a bağlı prostat hacmindeki artıştan dolayı olduğu belirtilmektedir. Bu nedenle, serum PSA düzeyini prostat ağırlığına göre düzeltmeyi amaçlayan Benson ve arkadaşları tarafından PSA dansitesi (PSAD) yöntemi geliştirilmiştir.

PSAD toplam PSA değerinin TRUS ile belirlenen prostat hacmine bölünmesi ile hesaplanmaktadır. Saptanan değerin 0.15'in üzerinde olmasının prostat kanserini, 0.15' in altında olmasının ise bening hastalığı göstermektedir. PSA dansitesi için 0.15 eşik değer olarak alındığında, toplam PSA değeri 4-10 ng/ml olan olgularda prostat kanseri saptama oranının arttığı belirtilmektedir. Bunun yanında, eşik değerinin 0.15 olmasının yaklaşık %50 olguda prostat kanseri tanısının atlanmasına yol açacağı da öne sürülmektedir.

Kalish ve arkadaşları 'transisyonel zon PSA dansitesi' yöntemini belirtmişlerdir. Bu yöntemde TRUS ile ölçülen transisyonel bölge hacmi esas alınmaktadır. PSA/TZ değeri 0.35' in üzerindeki olgularda prostat kanseri riski daha yüksek olduğu belirtilmektedir (50).

Yıllık PSA artışı (PSA velositesi):

PSA, prostat kanserli olgularda benign hiperplazide olduğundan daha hızlı yükselmektedir. Bu nedenle, PSA'nın belirli bir zaman içindeki yükselme hızını temel alarak prostat kanserli olguların benign hiperplazili olgulardan ayırt edilmesini amaçlayan bir yaklaşımla PSA velositesi tanımlanmıştır. PSA velositesi 18-24 aylık bir takip gerektirmektedir. İlk tanımlandığı çalışmada 0.75 ng/ml veya daha yüksek yıllık PSA artışının %72 duyarlılık ve %95 özgünlükle prostat kanserini öngördüğü bildirilmiştir. Ancak daha sonra yapılan çalışmalarda, özellikle ilk PSA değeri 4 ng/ml'nin üzerinde olan olgularda düşük duyarlılık ve özgünlük değerleri elde edilmiştir. Hesaplanmasının zor

olması, PSA'nın kansere özgü olmaması, uzun bekleme ve takip süresi gerektirmesi nedeniyle hastanın yaşam kalitesini olumsuz etkileyebilecek olması, PSAV'de yaşa bağlı değişimlerin öngörülememesi gibi sebeplerle bu yöntemin kullanımı çok yaygınlaşamamıştır (51).

Serbest/Total PSA oranı:

Serumda PSA'nın yaklaşık %5'i serbest formda bulunmaktadır ve serbest PSA' nın serum toplam PSA' sı içindeki yüzdelik oranının prostat kanserli olgularda düşük olduğu belirtilmektedir. Serbest PSA ölçümü toplam PSA değerinin normal sınırlarda olduğu hastalarda kanser saptama duyarlılığını artırmak, toplam PSA' nın yükseldiği (4-10 ng/ml) hastalarda ise özgünlüğü artırmak ve yapılan prostat biyopsisi sayısını azaltmak amacıyla kullanılmaktadır. Serbest/total PSA oranı % 15 altında olduğu zaman prostat kanseri olma ihtimali çok yükselirken bu oran % 25 'in üzerinde olduğunda ise BPH olma ihtimalinin daha yüksek olduğu belirtilmektedir (52).

c)Transrektal Ultrasonografi (TRUS)

Prostat bezinin görüntülenmesinde kullanılan standart yöntemlerden biri olan TRUS, hacim ölçümleri ve ultrason eşliğinde biyopsi alınımında altın standart olarak kabul edilmektedir. TRUS prostat kanseri tanısında duyarlılığı ve özgüllüğü düşük bulunmaktadır. Prostat kanseri TRUS'da genellikle hipoekoik lezyon görünümü vermektedir ancak bu hipoekojenisite spesifik değildir, inflamasyon, atrofi ve hiperplazi gibi durumlarda da benzer görünüm oluşabilmektedir (53,54). Periferik zondaki kanserlerin yaklaşık %30-50'si izoekoik olduğundan TRUS'da izlenememektedir (55). TRUS'da izlenen hipoekoik lezyonların ancak %20'si malign olarak belirtilmektedir. TRUS' un periferik zondaki hipoekoik odaklarda tanı değeri yüksek olmadığından hipoekoik lezyonların kesin tanısı ancak biyopsi ile mümkün olmaktadır (53,54).

2.3. OKSİDATİF STRES

2.3.1. Serbest radikaller ve etkileri

Yaşamın sürekliliğinin sağlanması, hareket, iş yapabilme ve büyüme gibi bütün fizyolojik olaylar, enerji tarafından sağlanmaktadır. Tüm diğer aerobik canlılar gibi, insanlar da, enerji gereksinimini, oksidatif metabolizma yani aerobik metabolizma sonucu elde etmektedirler. Oksijen, oksidatif metabolizma sırasında enerji eldesi için suya indirgenirken çok az bir kısmı da "serbest radikaller" adı verilen, zararlı maddelere dönüşmektedir. Serbest radikaller, dış orbitallerinde paylaşılmamış bir veya daha fazla elektron taşıyan bileşiklerdir. Serbest radikaller, tek elektron eksiklikleri nedeniyle başka moleküllerle kolayca elektron alışverişi yapabilir veya onlarla birleşebilirler. Böylece diğer molekülerin yapı ve fonksiyonlarını değiştirmekte, hatta pekçok dokuda hücre hasarı meydana getirebilmektedir (56-58). Bu bileşikler organizmada sürekli olarak oluşmakta ve organizmaya zarar vermesi güçlü bir savunma sisteminin varlığı ile engellenmektedir. Oluşan serbest radikaller ile bunların etkisizleştirilmesi arasında bir denge bulunmaktadır. Organizmada prooksidan-antioksidan denge sağlıklı bir yaşam için çok önemlidir. Serbest radikal oluşumundaki artış ve/veya antioksidan sistemdeki yetersizlik organizmada oksidatif strese neden olmaktadır. Bu dengenin serbest radikallerin lehine bozulması zararlı etkilerinin ortaya çıkmasına ve yaşlanma, ateroskleroz, kanser oluşumu, diabetes mellitus, iskemi-reperfüzyon hasarı gibi birçok hastalığa neden olmaktadır (58-62).

Serbest radikaller organizmada hem metabolizma sırasında, hem de radyasyon, ilaçlar ve zararlı kimyasallar gibi çeşitli dış etkenlerin etkisi sonucunda oluşmaktadır. Vücutta oluşan radikallerin önemli bir bölümü oksijen kaynaklıdır bununla birlikte azot, karbon ve kükürt merkezli radikaller de oluşmaktadır (57,58).

Memeliler, hücrelerindeki ATP üretiminin büyük bir kısmını mitokondrial elektron transport sisteminde, oksijenin dört elektron alarak su (H_2O) oluşturmak üzere indirgenmesiyle sağlamaktadırlar. Fakat bu süreçte oksijenin %2-3'ü tam olarak suya dönüşememektedir ve oksijen kaynaklı radikaller oluşmaktadır. Oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi ile süperoksit radikali ($O_2^{\cdot -}$), iki elektron alarak indirgenmesi ile de hidrojen peroksit (H_2O_2) oluşmaktadır. Üçüncü elektron ilavesi ile yüksek derecede reaktif hidroksil radikali ($OH^{\cdot}$) meydana gelmektedir. Dördüncü elektron eklenmesi ile de su oluşmaktadır (57,58).

$O_2 + H^+ + e^- \rightarrow HO^-_2$ Hidroperoksil radikali

$HO_2 \rightarrow H^+ + O_2^{\cdot -}$ Superoksit radikali

$O_2^{\cdot -} + 2\,H^+ + e^- \rightarrow H_2O_2$ Hidrojen peroksit

$H_2O_2 + e^- \rightarrow OH^- + OH^{\cdot}$ Hidroksil radikali

$OH^{\cdot} + e^- + H^+ \rightarrow H_2O$

Serbest radikaller organizmada mitokondrinin yanı sıra hücrenin tüm kısımlarında zara bağlı veya serbest halde bulunan pek çok enzimin katalizlediği reaksiyonlar sırasında oluşmaktadır. Bunlar arasında mikrozomal karma fonksiyonlu oksidaz sistemi (MEOS), sitoplazmada ksantin oksidaz, hücre zarına bağlı NADPH oksidaz ve lipooksijenazlar gibi enzimlerin katalizlediği reaksiyonlar sayılabilmektedir (57-59).

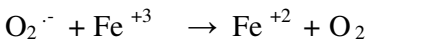
Aerobik organizmalarda serbest radikallerin bir bölümü radikal nitelikli iken bir bölümü ise bazı reaksiyonlara katılarak radikallere dönüşmektedir (63,64) (Tablo 2.3).

Tablo 2-3:Reaktif oksijen ve nitrojen türleri

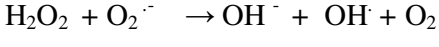
Radikaller		Radikal olmayanlar	
Hidroksil	$HO^{\bullet}$	Hidrojen peroksit	H_2O_2
Alkoksil	$RO^{\bullet}$	Singlet oksijen	$*O_2$
Peroksil	$ROO^{\bullet}$	Ozon	O_3
Süperoksit	$O_2^{\bullet -}$	Hipoklorid asit	HOCl
Nitrik oksit	$NO^{\bullet}$	Lipit hidroperoksit	LOOH
Azot dioksit	$NO_2^{\bullet}$	Peroksinitrit	$ONOO^-$

Süperoksit radikali kuvvetli bir indirgeyicidir. Bu radikal süperoksit dismutaz etkisiyle hidrojen peroksite dönüşmektedir. Hidrojen peroksit ise radikal niteliğinde olmayan zayıf etkili indirgeyici bir bileşiktir. Ortamda geçiş metalleri bulunmadığında çok zararlı olmayan bu bileşik, Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonları olarak tanımlanan reaksiyonlar ile son derece

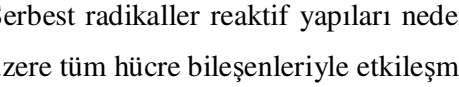
etkili hidroksil radikallerine dönüşmektedir. Dolayısıyla, H_2O_2 'in hemen ortamdan uzaklaştırılması önem kazanmaktadır. Süperoksit radikalinin de bu reaksiyonlar ile hidroksil radikaline dönüştüğü bilinmektedir. Bu oluşumlarda bir geçiş metali olarak demir çok önemli bir rol oynamaktadır (57,58).



$$H_2O_2 + Fe^{+2} \rightarrow Fe^{+3} + OH^{\cdot} + OH^{-}$$



$$O_2^{\cdot -} + Fe^{+3} \rightarrow Fe^{+2} + O_2$$



$$H_2O_2 + O_2^{\cdot -} \rightarrow OH^{-} + OH^{\cdot} + O_2$$

Serbest radikaller reaktif yapıları nedeniyle başta lipitler, proteinler ve nükleik asitler olmak üzere tüm hücre bileşenleriyle etkileşme ve onlara zarar verme özelliğindedir (64-65) .

Serbest radikallerin hücre bileşenlerinde oluşturduğu zararlı etkiler:

- Lipit peroksidasyonu
- Protein ve lipitlerle kovalent bağlar
- Zar proteinlerinde hasar
- Zar yapı ve işlevlerinde değişiklikler
- Proteinlerin parçalanması
- Protein ''turnover''ının artması
- Hücre tiyol/disülfit oranının değişmesi
- Tiyollere bağımlı enzimlerin yapı ve fonksiyonlarının bozulması
- Enzim aktivitelerinde değişiklikler
- Nükleotid yapılı koenzimlerin yıkımı
- DNA' nın tahrip olması
- Mükopolisakkaritlerin yıkımı
- Yaş pigmenti ve seroid birikimi

a)Serbest radikallerin proteinler üzerine olan etkileri:

Serbest radikallerin proteinlere etkisi proteinlerin aminoasit içeriğine göre değişmektedir. Protein molekülleri üzerindeki sülfhidril veya amino gruplarıyla serbest radikallerin etkileşmesi sonucu proteinlerde oluşan yapısal değişiklikler üçe ayrılmaktadır.

1) Amino asitlerin modifikasyonu

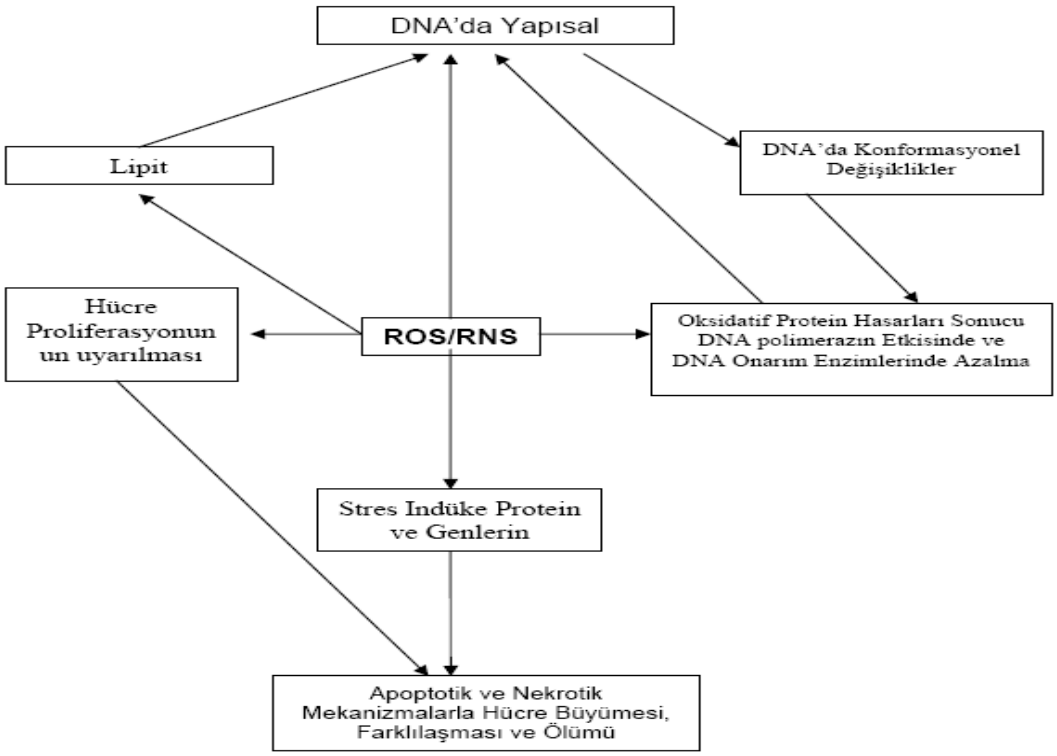
2) Proteinlerin fragmantasyonu

3) Proteinlerin agregasyonu veya çapraz bağlanmalardır.

Yapıları bozulan proteinler normal fonksiyonlarını meydana getiremezler. Enzimler protein yapısında olduklarından enzim aktivitelerinde değişiklikler meydana gelmektedir. Aromatik aminoasitlerde (fenilalanin, tirozin, triptofan) doymamış yapılar olduğundan oksidatif ataklara çok hassastırlar. Sülfürlü amino asitler olan sistein ve sistin de serbest radikal atağına hassas amino asitlerdir. Radikaller, membran proteinleri ile reaksiyona girebilirler ve enzim, nörotransmitter ve reseptör proteinlerinin fonksiyonlarının bozulmasına neden olabilmektedirler (57,58,64).

b) Serbest radikallerin nükleik asitler ve DNA üzerine olan etkileri:

İyonize edici radyasyonla oluşan serbest radikaller DNA'yı etkileyerek hücrede mutasyona ve ölüme yol açmaktadır. Hidroksil radikali (OH•) deoksiriboz ve bazlarla kolayca reaksiyona girer ve değişikliklere yol açar. Aktive olmuş nötrofillerden kaynaklanan hidrojen peroksit membranlardan kolayca geçebilmekte ve hücre çekirdeğine ulaşarak DNA hasarına, hücre disfonksiyonuna ve hatta hücre ölümüne yol açtığı belirtilmektedir. Baz ve şeker radikallerinin reaksiyonları; değişik modifiye baz ve şekerler, kontrolsüz baz dizilimi, zincir kırılmaları ve DNA-protein çapraz bağlarını meydana getirmektedirler. Oksidatif DNA hasarları da denilen bu tip hasarlar mutasyona, kanser ve yaşlanmaya yol açmaktadır (58,59,66) (şekil 2.5).



Şekil 2-5: Reaktif oksijen ve nitrojen türlerinin organizmadaki etkileri(66)

c)Serbest radikallerin karbohidratlar üzerine etkileri:

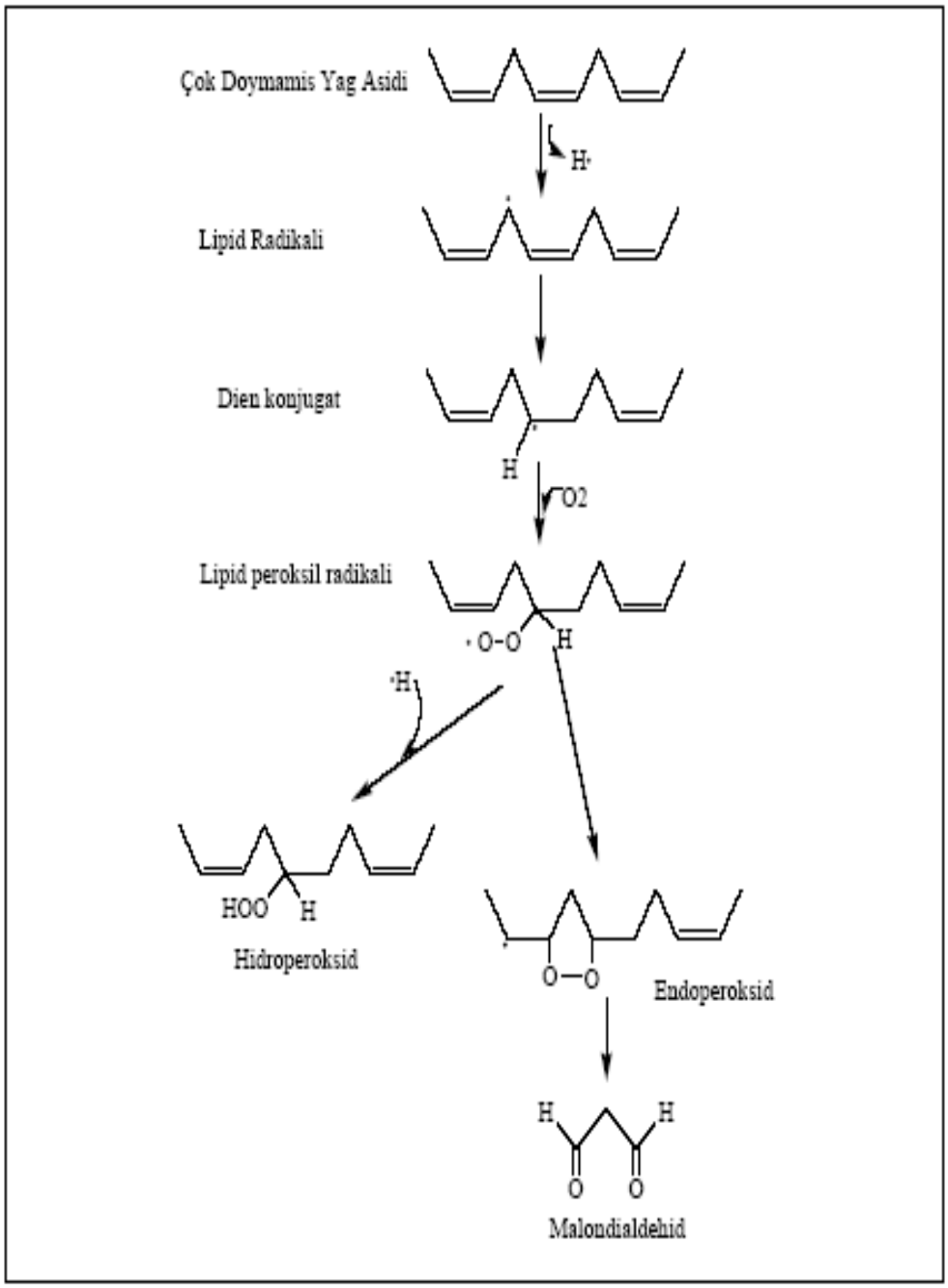
Monosokkaritlerin otooksidasyonu sonucu hidrojen peroksit, peroksit ve okzoaldehitler oluşmaktadır. Açığa çıkan okzoaldehitlerin proteinlere bağlanabilme özelliklerinden dolayı antimitotik etki gösterdiği ve böylece kanser ve yaşlanmaya neden olabileceği belirtilmektedir (58,59,65).

d) Serbest radikallerin lipitler üzerine etkileri:

Serbest radikallerin lipitler üzerindeki en önemli etkileri lipit peroksidasyonunu uyarmasıdır. Lipit peroksidasyonu serbest radikaller tarafından başlatılan ve hücre zarlarında bulunan çok doymamış yağ asitlerinin oksidasyonuna yol açan kimyasal bir olaydır. Süperoksit radikali, hidroksil radikali, peroksil radikali ve alkoksil radikali lipit peroksidasyonunu başlatan başlıca radikallerdir (58,59,60). Lipit peroksidasyonu genellikle çok doymamış yağ asitlerindeki konjuge çift bağlardan bir elektron içeren hidrojen atomlarının uzaklaştırılması ve bunun sonucunda yağ asidi zincirinin bir lipit radikaline dönüşmesiyle başlamaktadır. Lipit radikali (L•) dayanıksız bir bileşiktir ve bir dizi değişikliğe uğramaktadır. Lipit radikalleri (L•) moleküler oksijenle (O2) etkileşerek hızla

peroksil radikaline (LOO•) dönüşmektedir. Lipit peroksit radikalleri (LOO•), membran yapısındaki diğer poliansatüre yağ asitleri ile etkileşerek yeni lipit radikallerinin oluşumuna yol açarken kendileri de açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak lipit peroksitlerine (LOOH) dönüşmekte ve böylece olay kendi kendini katalizleyen zincir reaksiyonu olarak devam etmektedir (Şekil 2.6). Lipit peroksitler (LOOH) yıkıldığında çoğu biyolojik olarak aktif olan aldehitler oluşmaktadır. Bu bileşikler ya hücre düzeyinde metabolize edilmektedir veya başlangıçtaki etki alanlarından diffüze olup hücrenin diğer bölümlerine hasarı yaymaktadırlar.

Üç veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucu malondialdehit (MDA) meydana gelmektedir. MDA yağ asidi oksidasyonunun spesifik göstergesi olmamakla birlikte lipit peroksidasyonunun derecesiyle korelasyon göstermektedir. Bu nedenle biyolojik sıvılarda MDA tayini lipit peroksit seviyelerinin göstergesi olarak kullanılmaktadır (67-68). Nonenzimatik lipit peroksidasyonu çok zararlı bir zincir reaksiyonudur. Hücre zarlarında lipit peroksidasyonu sonucu zar transport sistemi etkilendiği için hücre içi ve dışı iyon dengeleri bozulmaktadır. Hücre içi kalsiyum konsantrasyonu artması sonucu proteazlar aktive olduğundan lipid peroksidasyonu hücre hasarında önemli bir rol oynamaktadır. Lipid peroksidasyonu membran yapısına ve ürettiği reaktif aldehitlerle diğer hücre bileşenlerine zarar vermektedir (57,58,60,63).



Şekil 2-6 : Lipit peroksidasyonunun kimyasal yolu (68)

Serbest oksijen radikallerinin tüm bu etkilerinin sonucunda hücre hasarı meydana gelmektedir. Hücrede reaktif oksijen türlerinin ve serbest radikallerin artışı hücre hasarının önemli bir nedeni olduğu ve birçok hastalığın sebebi olduğu belirtilmektedir (69).

2.3.2. Oksidatif Stres ve Kanser

Serbest radikallerin ve oksidatif stresin karsinojenez ile ilişkisi olduğu ve tümörün gelişimi sürecinde serbest radikallerin etkili olduğu bir çok çalışmada öne sürülmüştür (69-72). Yapılan birçok çalışmada oksidatif stresin hücre proliferasyonunu uyardığı, hücrelerin büyümesini ve diferansiyasyonunu kontrol eden genlerde hasara neden olarak tümörün gelişimiyle ilişkili olduğu gösterilmiştir (71-73).

Reaktif türler birkaç mekanizma ile hücre davranışlarını etkilemektedir.

*Reaktif türlerin tipi ve düzeyi

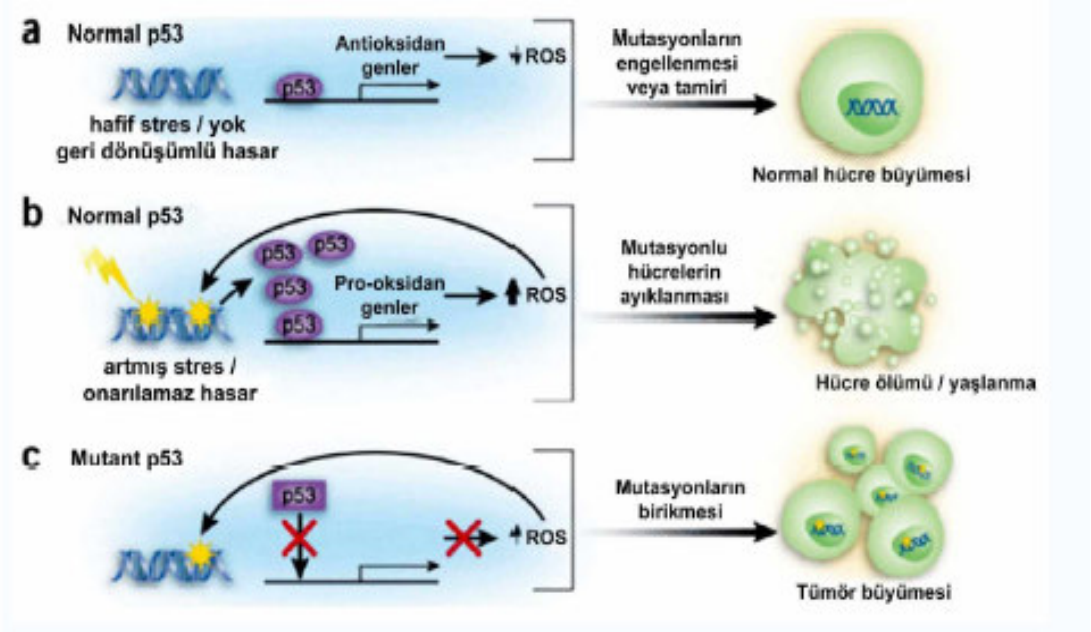
*Ne kadar süreyle maruz kaldıkları

*Hücrenin antioksidan savunma düzeyi

*Oksidatif hasarı düzeltecek olan hücrenin tamir mekanizmasının aktivitesine bağlı olarak hücre bu reaktif türlere göre değiştirilmektedir.

Bunun sonucunda proliferasyonda artış, hücre döngüsünde durma, yaşlılık, apoptozis ve nekroz meydana gelmektedir. Reaktif türler kanserin başlaması, yükselmesi ve ilerlemesi aşamalarına ve böylece bunların etkisiyle hücre döngüsü, gen ekspresyonu, doğrudan veya dolaylı DNA hasarı ve apoptozis ve diğer şekillerde hücre ölümü gerçekleşmektedir. Reaktif türlerin düzeyi hücrenin normal proliferasyonundan hücre döngünün durmasına geçişinde veya hücreye özgü başka olayların başlamasında "şalter" görevi görmektedir. (73-74) (şekil 2.7).

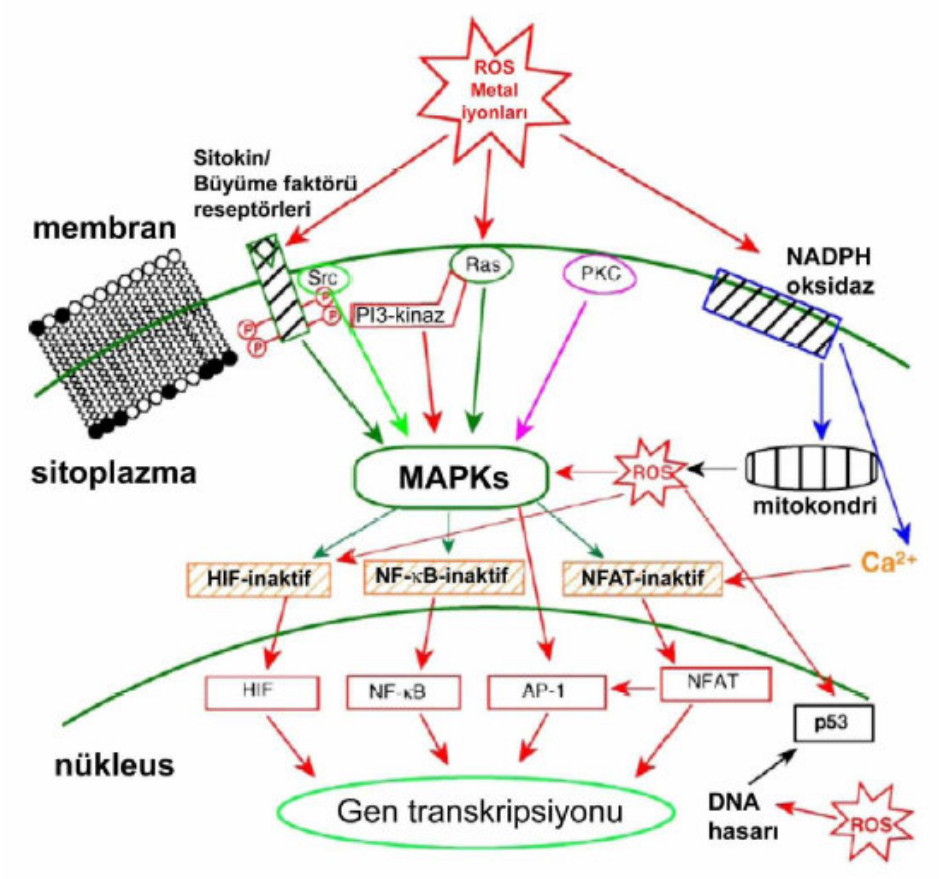
Reaktif türler ilk olarak p53 proteininin aktivitesi ile normal düşük düzeydeki hücresel antioksidan savunmanın sürdürülmesini, MnSOD, GPxI ve proteinlerin genlerinin trankripsiyonla deşifre edilmesini sağlamaktadır. İkinci olarak; reaktif türler p53 aktivitesini arttırabilir. Böylece bazı onkogenlerin ekspresyonu,süperoksit üretimini hızlandırabilmektedir. Üçüncü olarak; p53 aktivitesi bazı mekanizmalarla reaktif türlerin üretimine neden olur ve bu reaktif türler bazen p53'ün sitostatik ve pro-apoptotik etkilerine katkıda bulunmaktadır (74).



Şekil 2-7: Hücrede serbest radikallerin etkileri (74)

Özellikle kanserin ileri evrelerinde oksidatif stresin daha da arttığı ve oksidatif stresle birlikte meydana gelen değişikliklerin tümör gelişimi süresince mutasyonlarında artmasına neden olduğu belirtilmektedir. Oksidatif DNA hasarının mutasyon meydana getirebilmesi için hücrenin DNA onarım kapasitesini aşması gerektiği belirtilmektedir (75).

Antioksidan savunma ve tamir aktiviteleri bazen yükselmesine rağmen bu artış serbest radikaller ile baş etmek için yeterli değildir. Serbest radikaller belli bir seviyenin üzerine çıktığında oksidatif hasar ciddi boyutlara gelmektedir ve hücre fonksiyonları bozulmaktadır. Serbest radikaller hücre hasarına yol açmakla birlikte aslında hücre içindeki sinyal iletiminin ve düzenlenmesinin bazı safhalarında önemli bir fizyolojik rol oynamaktadırlar (76). Yüksek konsantrasyondaki serbest radikaller hücre ölümüne veya nekroza neden olmaktadır. Düşük konsantrasyondaki O^{-}_{2} ve H_2O_2 çoğalmayı uyarabilir ve pek çok hücre tipinde hayatta kalma olasılığını arttırabilir. Bu nedenle serbest radikaller ikincil habercilerin fonksiyonlarında önemli bir fizyolojik rol oynayabilmektedir (76). Ayrıca sitozolik kalsiyum konsantrasyonunun düzenlenmesi, protein fosforilasyonunun düzenlenmesi ve bazı transkripsiyon faktörlerinin (NF- alfaB ve AP-1 faktör ailesi gibi) aktivasyonunda rol oynamaktadır (Şekil 2.8)(76,77).



Şekil 2-8: ROS ve metal iyonlarının indüklediği sinyal yolları (77).

2.3.3. Antioksidan sistem

Organizmada sürekli biçimde serbest radikal niteliğinde bileşikler oluşmaktadır. Ancak bu radikallerin organizmaya zarar vermesi güçlü bir savunma sisteminin varlığı sayesinde engellenmektedir. Bu mekanizmalar "antioksidan savunma sistemleri" veya kısaca "antioksidanlar" olarak adlandırılmaktadır. Serbest radikallerin oluşum hızı ile etkisizleştirme hızının dengede tutulması son derece önemlidir. Bu denge bozulduğu zaman, serbest radikallerin zararlı etkileri ortaya çıkmakta ve çeşitli organ ve sistemler olumsuz

etkilenmektedir. Bu nedenle antioksidan sistemlerin bilinmesi, oksidatif stresin yol açtığı zararların engellenmesi açısından büyük önem taşımaktadır (58-65).

Antioksidanlar dört ayrı şekilde etki etmektedirler:

1)Serbest oksijen radikallerini etkileyerek onları tutma veya daha zayıf yeni moleküle çevirme ***toplayıcı etki***dir. Antioksidan enzimler ve küçük moleküller bu tip etki gösterirler.

2)Serbest oksijen radikalleriyle etkileşip onlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini azaltma veya inaktif şekle dönüştürme ***bastırıcı etki***dir. Vitaminler, flavanoidler bu tarz bir etkiye sahiptirler.

3)Serbest oksijen radikallerini bağlayarak zincirlerini kırıp fonksiyonlarını engelleyici etki ***zincir kırıcı etki***dir. Hemoglobin, seruloplazmin ve mineraller zincir kırıcı etki gösterirler.

4)Serbest radikallerin oluşturdukları hasarın onarılması ***onarıcı etki***dir. Antioksidan sistem; enzimleri, ve metal iyonlarını bağlayan proteinleri ve suda, yağda çözünen radikal tutucularını kapsamaktadır (58,59,61)(Tablo 2.4)

Tablo 2-4 : Organizmada antioksidan sistem elemanları

A.Protein yapısındaki antioksidanlar	
Enzimler	Metal iyonlarını bağlayanlar
Süperoksit dismutaz	Ferritin
Katalaz	Transferrin
Glutatyon peroksidaz	Haptoglobin
Glutatyon redüktaz	Seruloplazmin
Glutatyon transferaz	Albümin
B.Düşük molekül ağrılıklı antioksidanlar	
Suda çözünenler	Yağda çözünenler
Glutatyon	Vitamin E
Vitamin C	b-Karoten
Ürik asit	Bilirubin
Glikoz	Ubikinol
Sistein	Flavonoidler

a) Katalaz

Katalaz tüm hücre tiplerinde bulunan yapısında dört hem grubu içeren bir hemoproteindir. Karaciğer, böbrek ve eritrositlerde yüksek konsantrasyonda, beyin, kalp, akciğer ve bağ dokusunda nispeten daha düşük kosantrasyonlarda bulunmaktadır. Dokuların en fazla mitokondri ve peroksizom fraksiyonlarında bulunan bu enzim metabolik reaksiyonlar sırasında açığa çıkan hidrojen peroksitin (H_2O_2) su ve oksijene dönüştürülmesini katalizlemektedir (3,4,61).

$$H_2O_2 \xrightarrow{\text{Katalaz}} 2H_2O + O_2$$

b) Glutatyon Redüktaz

Glutatyon redüktaz GPx reaksiyonu sırasında açığa çıkan okside glutatyonun (GSSG), tekrar redükte glutatyona (GSH) dönüşmesini NADPH bağımlı bir reaksiyonla katalizlemektedir (3,4,61).

$$GSSG + NADPH + H \xrightarrow{\text{GSSG-R}} 2GSH + NADP^+$$

c) Glutatyon peroksidaz

Glutatyon peroksidaz H_2O_2 ve organik hidroperoksitleri su ve oksijene dönüştürerek organizmayı bu zararlı bileşiklerden koruyan antioksidan etkili bir enzimdir (3,4,61,78).

$$LOOH + 2GSH \xrightarrow{\text{GSH-Px}} LOH + GSSG + H_2O$$

$$GSSG + NADPH + H^+ \xrightarrow{\text{GSH-R}} 2GSH + NADP^+$$

Bu enzim, H_2O_2'yi metabolize ederek lipit peroksidasyonunun başlamasını önlemenin yanı sıra peroksidasyon sonucu oluşan lipit hidroperoksitleri metabolize ederek lipit peroksidasyonunun ilerlemesini de engellemektedir. GPx reaksiyonu sırasında hidrojen vericisi olarak glutatyon (GSH) kullanılır, hidrojen peroksit ve lipit hidroperoksitleri indirgenirken, GSH oksitlenir (GSSH) (3,4,61).

GPx enziminin dört farklı izoenzimi bulunmaktadır.

GPx I: Se bağımlı sitozolik GPx

GPx 2: Sitozolik GPx

GPx 3: Plazma GPx

GPx 4: Fosfolipit hidroperoksidaz GPx

GPxI her alt ünitesi bir selenyum atomu içeren birbirinin aynı dört alt üniteden oluşmuş tetramerik yapıda bir enzimdir. Selenyum özel bir amino asit olan selenosistein olarak glutatyon peroksidazın yapısına katılmaktadır. Bu katılma translasyon sırasında gerçekleşmektedir. Selenosistein, aslında sistein amino asidinde bulunan azot atomlarından birinin yerine selenyum atomu geçmesiyle ortaya çıkmaktadır.

Fosfolipid hidroperoksid glutatyon peroksidaz da (PLGSH-Px) molekül ağırlığı 20.000 dalton olan, monomerik selenyum atomu ihtiva eden sitozolik bir enzimdir. Membran fosfolipid hidroperoksidlerini, alkollere indirgemektedir. Membrana bağlı en önemli antioksidan olan vitamin E yetersiz olduğu zaman PLGSH-Px membranın peroksidasyona karşı korunmasını sağlamaktadır. Hidroperoksidlerin redükte olması ile meydana gelen GSSG, glutatyon redüktazın katalizlediği reaksiyon ile tekrar GSH'a dönüşmektedir. Ökaryotik bir hücrede GPx aktivitesinin %60-75'i sitoplazmada %25-40'ı ise mitokondride bulunmaktadır. Enzim aktivitesinin en yüksek olduğu dokuların ise eritrosit ve karaciğer olduğu gösterilmiştir. GPx hücre içinde lipitleri peroksidasyondan koruyan başlıca antioksidanlardan birisidir ve bu özelliği sayesinde hücrenin yapı ve fonksiyonlarının korunmasında önemlidir (2,3,4,61).

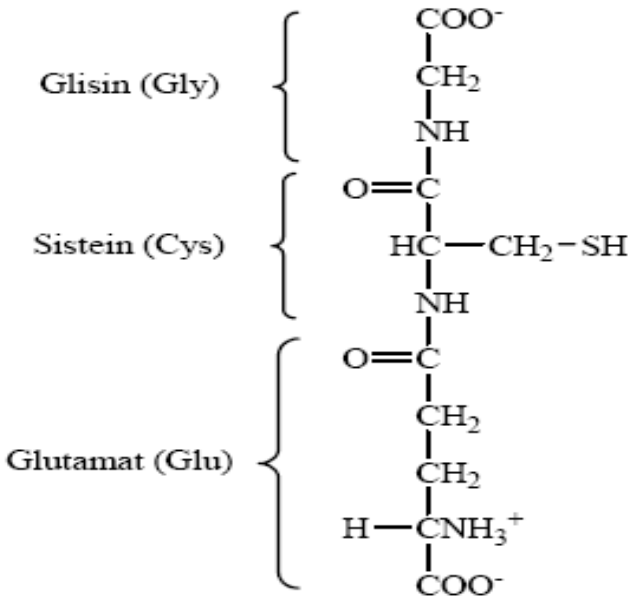
d) Glutatyon-S-Transferaz

Araşidonik asit ve hidroperoksitleri başta olmak üzere lipid peroksitlerine karşı Se bağımsız Gpx gibi aktivite göstererek antioksidan etki sağlayan bir enzimdir. Membran lipitlerinin peroksidasyonunu yalnızca fosfolipaz A_2'nin varlığında inhibe etmektedir. (2,3,4,61).

$$ROOH + 2GSH \xrightarrow{GST} GSSG + ROH + H_2O$$

e) Glutatyon (GSH)

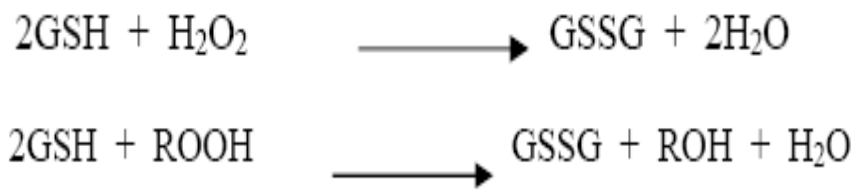
En önemli endojen antioksidanlardan biri olan glutatyon, glutamat, sistein ve glisinden oluşan bir tripeptittir (şekil.2.9). Glutatyonun antioksidan etkisinden sorumlu etkin grubu sülfidril (-SH) grubudur.



Şekil 2-9: **Glutatyon**

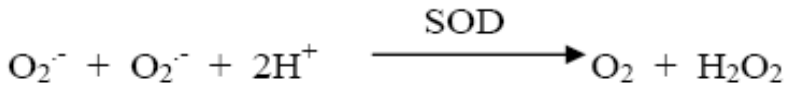
Bu molekül, organizmada başta proteinler olmak üzere biyolojik moleküllerin sülfidril gruplarını serbest radikallerin etkisinden korumaktadır. Ayrıca ksenobiyotiklerin zehirsizleştirilmesinde, GPx ve glutatyon transferaz reaksiyonlarına katılarak çok önemli bir rol oynamaktadır. GSH çeşitli hücre birleşiklerinin metabolizmasında indirgeyici olarak görev

yaptığı gibi, organizmada sistein deposu olarak da ödev görmektedir. GSH, hücre zarlarından aminoasitlerin hücre içerisine taşınmasını ve biyolojik zarlardaki doymamış yağ asitlerinin oksidatif hasara karşı korunmasını da sağlamaktadır (2,3,4,61).



f)Süperoksit Dismutaz (SOD)

1969 yılında McCord Fridovich tarafından keşfedilen süporoksit dismutaz (SOD), vücudumuzun en önemli antioksidan enzimlerinden biridir (5,6).Süperoksit dismutazlar prokaryotik ve ökaryotik hücrelerde yaygın olarak bulunan bir metalloenzim ailesidir. Süperoksit radikallerini direkt olarak hidrojen peroksite ve moleküler oksijene çevirmektedir (4,5,6)



Enzimin hem antioksidan hemde pro-oksidan fonksiyonu bulunmaktadır. Oksijen kulanımı yüksek olan dokularda SOD aktivitesi fazla, buna karşılık hücre dışı sıvılarda SOD aktivetesi çok düşüktür (4,5,6).

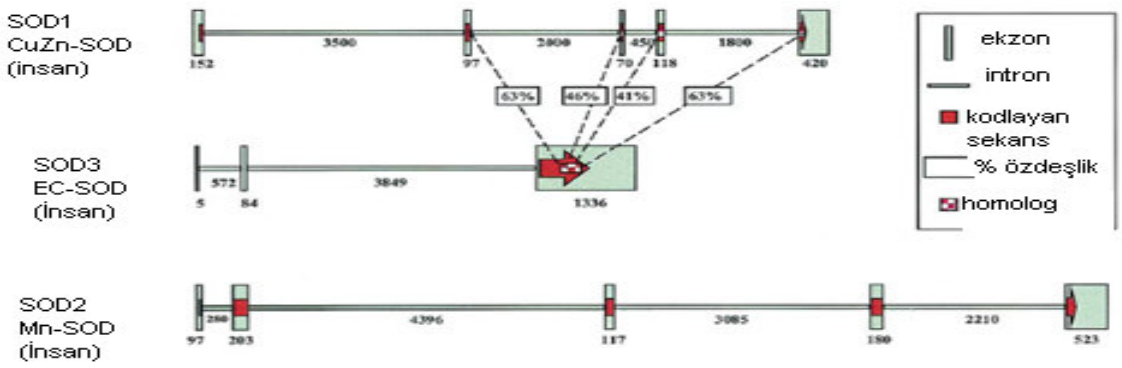
Ökaryotlarda bulundukları yere göre veya yapılarında bulunan metal iyonlarına göre isimlendirilmektedir:

(a) SOD1, Cu, Zn-SOD, sitoplazmada bulunur

(b) SOD2, Mn-SOD, mitokondride bulunur

(c) SOD3, EC-SOD, hücre dışı ortamda bulunur.

Bütün SOD izoenzimleri aynı reaksiyonu katalizlemelerine rağmen homolog bir primer yapıyı paylaşmamaktadır (Şekil 2.10) (5).



Şekil 2-10: SOD izoenzimlerinin gen yapısı (5)

a) Cu,Zn-SOD: SOD1 denilen ilk tanımlanmış enzim çeşididir. Her alt ünitede birer tane bakır ve çinko atomu bulunmaktadır. Hücre içerisindeki intrasellüler sitoplazmik bölgede bulunmaktadır. İnsanlarda kromozom 21q22 bölgesinde bulunmaktadır (4,5,6).

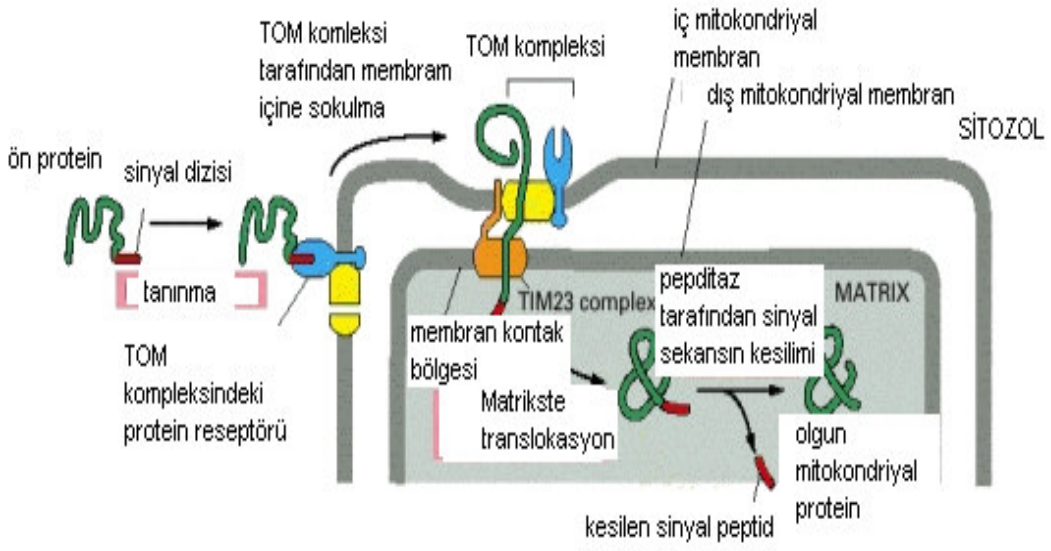
b) Ec-SOD: Ökaryotlarda hücre dışında bulunan homotetramer ekstrasellüler süperoksit dismutazdır. Bu izoenzimde, bakır ve çinko içeren bir homotetramerik yapıya sahiptir. 135.000 Dalton molekül ağırlığındadır ve 4p-q21 kromozom bölgesinde bulunmaktadır (4,5,6).

c) MnSOD: MnSOD, tetramer yapısında ökaryotlarda yalnızca mitokondride bulunan bir metaloenzimdir (5,6). MnSOD enziminin molekül ağırlığı 80kDa'dur. Reaktif türlerin başlıca hücre içi kaynağı iç mitokondri membranında bulunan elektron transport sistemidir (ETS). NADH dehidrogenaz ve koenzimQ basamakları başta olmak üzere ETS aracılığıyla oluşan serbest oksijen türleri nedeniyle mitokondri membran birleşikleri oksidatif hasara çok yatkındır. İster fizyolojik ister patolojik koşullar altında olsun, oluşan ilk reaktif ürün süperoksit anyonudur. Bu anyonun dismutasyonuyla oluşan H_2O_2 de daha sonra oksidatif hasar etkisi en güçlü olan hidroksil radikalinin oluşumuna yol açabilmektedir (3,5,6,79). Mn-SOD enzimi oksidatif fosforilasyon sırasında mitokondride oluşan süperoksit anyonunun dismutasyonunu gerçekleştirerek bu molekülün mitokondri matriksinde birikimini engellediğinden serbest radikal hasarından korunmada ilk savunma enzimi olarak kabul

edilmektedir. Süperoksit radikalinin sitoplazmada Cu,Zn-SOD, mitokondride MnSOD tarafından dismutasyonu, hidrojen peroksitin de GPx'le dissosiasiyonu reaksiyonları hidroksil radikalinin oluşumunun önlenmesi ve hücrenin oksidatif hasardan korunmasından sorumlu temel mekanizmalardır. Buna göre MnSOD bu önemli mekanizmada ilk basamakta aldığı görevi nedeniyle antioksidan savunma sisteminde son derece önemlidir (5,6,73,79).

MnSOD büyük miktarda mitokondri matriksi içerisinde yer almaktadır. Mitokondride bulunan diğer enzimler gibi MnSOD nükleus geni tarafından kodlanmaktadır (5-8,80). Buradaki translasyon sürecinde 222 aminoasit içeren MnSOD alt birimi meydana gelmektedir. MnSOD'ın translasyon sonrası mitokondri içerisine girmesi gerekmektedir (5-8,80). MnSOD'ın mitokondriyal matrikse taşınması, hem mitokondriyal fonksiyonu hem de enzim aktivitesi için son derece önemlidir (8,79).

Mitokondrilere gidecek öncül proteinlerin sitozoldeki şaperon proteinler tarafından bağlanan amino-ucu mitokondriyal sinyal sekansı içermektedir (81). Bu süreçte, MnSOD 24-amino asitlik N-terminal mitokondriyal sinyal dizisi tarafından mitokondriye yönlendirilmektedir (8,9,80). Proteinin prekürsörü şaperona bağlı halde mitokondrinin önce dış reseptorlerine taşınmaktadır. Daha sonra organelin hem dış hem de iç membranın kapsayan bir protein kanala taşınmaktadır. Bağlı proteinin prekürsörü Tom (dış zardan taşınma proteini ''transport across the outer membrane'') kısa adı ile anılan bir protein kompleksine oradan mitokondriyal reseptöre taşınır ve sonrada dış membranda bir kanal oluşturan başka bir Tom kompleksine taşınır. Bir başka protein kompleksi Tim (iç zardan taşınma proteini ''Transport Across iner membrane'') olarak adlandrılan farklı bir protein kompleksi proteini mitokondriyal matrikse götürmektedir (Şekil 2.11)(81).



Şekil 2-11: Sinyal peptid proteinin sitozolden mitokondriye taşınması (81)

Proteinin kanal içerisinden geçerek taşınması ATP veya GTP hidrolizi ile ve bazı durumlarda da transmembran potensiyal farkı ile gerçekleştirilmektedir. Mitokondriye taşındıktan sonra protein translasyon sonrası değişime uğrar. Organelin içinde prekürsör proteinin sinyal sekansı uzaklaştırılır, olgun protein farklı şaperon proteinleri (MSF veya 70) yardımıyla tekrar katlanır ve dört alt birim birleşerek, her alt birim için birer tane mangan kofaktör içeren homotetramer oluşur (81). Katalitik olarak aktif enzimin her alt birimi 198 aminoasit içermektedir (80).

Bazı kanserlerde MnSOD aktivitesinin değişiklik gösterdiği ve bir çok tümörde düşük MnSOD aktivitesi olduğu gösterilmiştir (2). Bazı araştırmacılar meme kanseri, prostat kanseri gibi bazı kanser türlerinde MnSOD'ın yüksek oranda olmasının (overexpression) tümör oluşumuna engel olduğu ve bu yüzdende MnSOD'ın bir çok tümör oluşumunda baskılayıcı olduğu tahmin edilmektedir. Bu nedenle MnSOD aynı zamanda tümör supresör gen olarakta tanımlanmaktadır. (11, 82, 83)

Vitamin E (α-tokoferol): E vitamini yağda eriyen çok güçlü bir antioksidandır. Antioksidan etkisi molekülün aktif kısmını oluşturan fenolik hidroksil grubundan kaynaklanmaktadır. E vitamini özellikle hücrenin mitokondri ve mikrozomlar gibi membrandan zengin fraksiyonlarında bol bulunmakta ve antioksidan etkisini süperoksit, singlet oksijen, hidroksil, lipid peroksi radikali gibi radikalleri indirgeyerek etkisini göstermektedir (3,4).

Vitamin C (Askorbik Asit): C vitamini organizmada birçok hidroksilasyon reaksiyonunda indirgeyici ajan olarak görev yapan ve suda çözünen en güçlü antioksidan moleküldür. Süperoksit ($O2•^{-}$) ve hidroksil (HO•) gibi radikaller ile reaksiyona girerek onları ortamdan uzaklaştırmaktadır. İnsanlarda sentez edilmediği için diyetle alınması gerekmektedir (3,4).

Hücrede oluşan serbest radikaller, antioksidan savunma sistemleri ile ortamdan uzaklaştırılmalarına rağmen bazı durumlarda, bu savunma sistemleri yetersiz kalmakta ve oksidatif stres gelişmektedir. Bunun sonucunda yaşlanma, ateroskleroz, kanser oluşumu, diabetes mellitus, iskemi-reperfüzyon hasarı gibi birçok hastalığa neden olmaktadır (64,65,68).

2.4. POLİMORFİZM VE KANSER

2.4.1. Polimorfizm

İnsan DNA'sının yaklaşık % 99.9'u iki insan arasında aynıdır ve insanlardaki genetik çeşitlilik DNA zincirindeki küçük farklardan kaynaklanmaktadır. Bazı DNA sekanslarındaki farklar insan fenotipini etkilememekte bazıları ise direkt hastalığa neden olmaktadır. Bu iki uç arasında anatomik, fizyolojik, tedaviye cevap, ilaçlara karşı yan etki, infeksiyonlara yatkınlık, kansere yatkınlık ve kişilik özellikleri gibi genetik farklılıklar yer almaktadır (84).

Bir genin özgün bir kromozom bölgesinde (lokus) veya DNA dizisinin birkaç alternatif formundan her biri ‘’allel’’ olarak adlandırılmaktadır. Gen lokusu kromozom üzerinde belirli bir karaktere ait genetik bilginin yer aldığı bölgedir. İnsanlar her otozomal lokusunda biri anneden digeri babadan gelen iki allel bulundurur. Belirli bir populasyonda, belli bir gen lokusunda, bir allelin bulunma sıklığı allel frekansı veya gen frekansı olarak adlandırılır. Bir toplum genlerin dağılımı yani farklı gen lokuslarındaki allel frekansları ile karakterize edilebilir (84). Farklı genom lokuslarındaki allellerde çok çesitli mutasyonlar bulunmaktadır. Bu mutasyonlar toplumda normal varyasyonundan kalıtsal hastalıklara kadar uzanmaktadır. Günümüzdeki rutin moleküler teknikler ile birçok genetik hastalıktaki mutasyonlar kolaylıkla belirlenebilmektedir. Toplumdaki farklı mutasyonların tanımlanması ile ailelerin genetik hastalıklar açısından taranması ve geniş populasyonların risklerinin belirlenmesi mümkün olabilmektedir.

Polimorfizm, DNA üzerinde herhangi bir genetik hastalığa neden olmayan ancak hastalık için bir risk faktörü oluşturabilen değişikliklerdir. Bu değişikliklere suskun nükleotid değişimleri denilmektedir Allellerin genel popülasyondaki kromozomların %1'inden fazlasında bulunması " genetik polimorfizmi" oluşturmaktadır. Allelik sıklıgı %l’den küçük ise buna ‘’nadir varyantlar" denilmektedir. Genlerin regülatuar (düzenleyici) bölgelerinde bulunan polimorfik alleller genlerin transkripsiyonel regülasyonunu etkileyerek fenotipik degisikliklere neden olabilmektedir. Polimorfizmler, tekli baz değişiklikleri, parça kaybı veya eklenmesi ile oluşabilirler ve sıklıkla genlerin protein kodlamayan bölgelerinde görülmektedirler (84,85)..

Yapısal genlerde, amino asitleri kodlamak üzere şifrelenmiş olan nükleotid segmentlerine ekson, şifrelenmemiş olan nükleotid segmentlerine ise intron denilmektedir (84,85).

Protein sentezini kodlayan fonksiyonel ve yapısal genlere tek kopya genleri denilmektedir. Hücre, her genetik dizi için iki kopya içermektedir. Tek kopya genlerin oluşumuna katılan DNA, kromozomların içinde bulunan DNA'nın küçük bir kısmını oluşturmaktadır. Bu bölgedeki DNA değişimleri proteinin fonksiyonunu değiştirmektedir (84-86).

Spesifik bir DNA çift sarmal sekansını tanıyan ve DNA'yı belirli bir bölgeden kesen enzimlere Restriksiyon enzimler denilmektedir. Eğer polimorfizmler, bu restriksiyon enzimlerinin kesim bölgesinin yok olmasına ya da yeniden oluşmasına neden olurlarsa, bu durum kolaylıkla saptanabilmektedir. DNA, bu enzimlerle kesildiğinde farklı uzunlukta parçalar oluşur ve agaroz jel elektroforezinde moleküler boyutlarına göre değişik pozisyonlarda görülürler. Bunlara; restriksiyon enzimi uzunluk polimorfizmleri **"Restriction fragment length polimorphism (RFLP)"** denilmektedir (87).

Kodlamayan DNA segmentleri iki ana grupta incelenebilir;

Dağılmış tekrarlayan DNA dizileri: Uzunlukları 500 baz çiftinden daha küçük olan ve tüm genoma dağılmış olarak bulunan dizilere *SINE* (*short interspersed repeared sequences*) denilmektedir. Bu gruba ait ailelerden en önemlisi *Alu* tekrar dizisidir. Alu ailesinin tüm genomdaki kopya sayısı 500.000 kadar olup, uzunlukları 300 baz çifti civarındadır. 5-6 kb uzunluğunda olan tekrar dizisine ise *LINE (long interspersed repeared sequences)* denilmektedir (84).

Dağılmamış tekrarlayan DNA dizileri: Bunlar genellikle kromozomların heterokromatik bölgelerinde lokalize olmuşlardır. Ayrıca kromozomların sentromerik ve telomerik bölgelerinde de bulunmaktadırlar. Tekrarlanan DNA sayısı aynı ailenin bireylerinde farklı olabilir. Hücrenin yaşamı boyunca oluşan replikasyonlar sırasında tekrar sayıları değişebilmektedir ve bu değişiklikler bir sonraki nesle aktarılmaktadır. (84).

2.4.2. MnSOD (Ala-9Val) Gen Polimorfizmi ve kanserle ilişkisi

MnSOD geni 6q25 lokalizasyonunda nüklear DNA tarafından kodlanan, 5 ekzon 4 intron bölgesine sahip, homotetramerik bir molekül olup 222 amino asitten oluşmaktadır. Önce sitoplazmada sinyal dizisi içeren öncül bir molekül olarak sentezlenmekte, daha sonra mitokondri içine girerek bu sinyal dizisini kaybetmekte ve 198 aminoasitli aktif şekline dönüşmektedir (7-10,80,88).

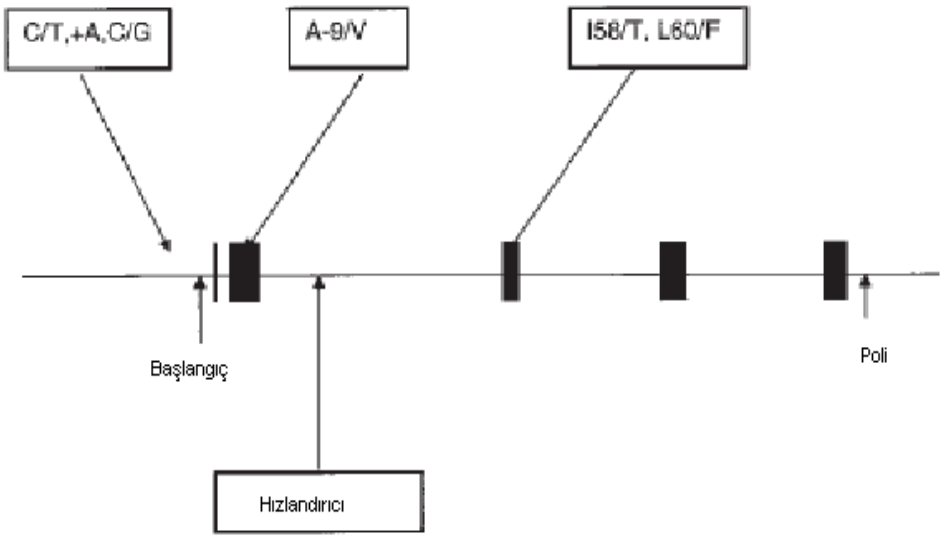
MnSOD geni üzerinde promoter, sinyal dizisi ve kodlanan bölgelerde olmak üzere polimorfizmler bulunmaktadır (Şekil 2.12) (7,89,90).

MnSOD'ın promoter bölgesinde 3 mutasyon gösterilmiştir:

1-Genin -102 pozisyonunda C yerine T

2-Genin -38 pozisyonunda C yerine G

3-Genin -93 pozisyonuna A'nın insersyonudur.



Şekil 2-12 :MnSOD geni üzerindeki polimorfizmler (90).

MnSOD'ın kodlananan bölgesinde bir kaç polimorfik bölge bulunmaktadır :

3. ekzonda ;

*58.pozisyonda izolösin/treonin (ACA-ATA)

*60.pozisyonda Lösin/Fenilalanin (CTT-TTT) polimorfizmidir (89).

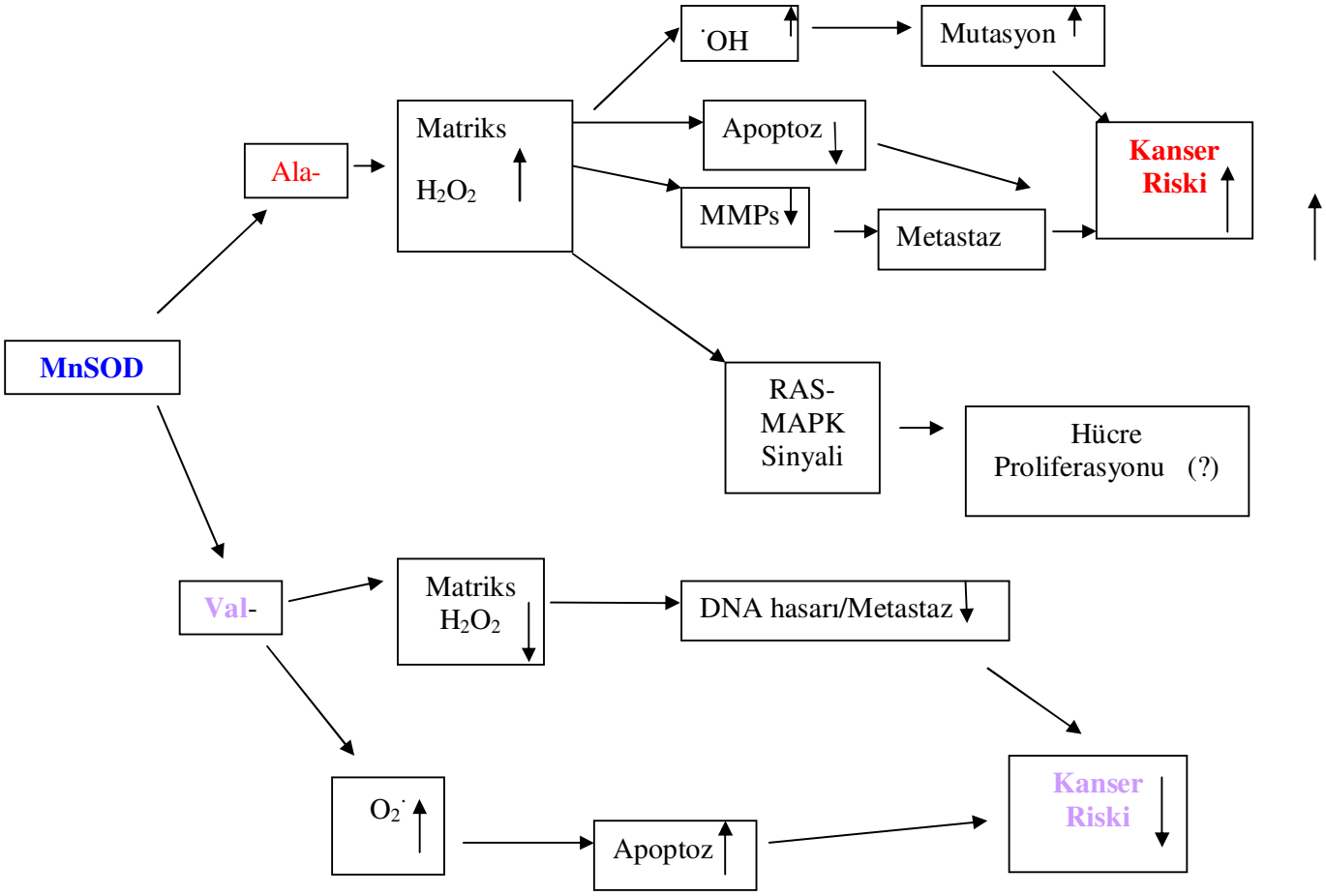
Bu 3. ekzondaki polimorfizmin enzim aktivitesinin azalması ile ilgili olduğu saptanmıştır (89).

MnSOD, mitokondriyal sinyal dizisi gen bölgesinde :

* Ala-9Val içeren bir tek nükleotid polimorfizmi bulunmaktadır.

MnSOD genindeki Ala-9Val polimorfizmi; sinyal dizisindeki -9. amino asit olan valin yerine gendeki bir nükleotidteki baz değişimi (T →C) sonucu alanin gelebilmekte, bu değişiklik enzimin mitokondriye girişini etkileyebilmektedir.Ala-9Val polimorfizminin; AlaAla(AA)/ AlaVal(AV) /ValVal(VV) olmak üzere üç genotipi bulunmaktadır (7-9). Sinyal dizisinde valin amino asidine sahip olan MnSOD enziminin mitokondri iç membranından kısmen oysa sinyal dizisinde alanin amino asidine sahip olan MnSOD enziminin mitokondri membranını kolayca geçebildiği belirtilmektedir. Sinyal dizisinin öneminden dolayı bu polimorfizm çok ilgi çekmektedir. Alanin içeren sinyal dizisi, alfa-heliks ikincil yapısına sahiptir ve mitokondri içerisine engelsiz girebilmektedir. Oysa valin içeren sinyal dizisi beta-kırmalı tabakaya yapısındadır (7-9). Bu yüzden, enzimin valin izoformu mitokondriye taşınırken iç mitokondriyal membran tarafından durdurulmuş ve sonuç olarak aktif enzim miktarında azalma meydana gelmektedir. Bazı çalışmalarda valin-MnSOD sinyal dizisinin mitokondriye taşınmasından sonra alanin MnSOD sinyal dizisine göre enzim düzeyinin % 40 azaldığı saptanmıştır (8).

Yapılan çalışmaların büyük bir kısmında Ala allelinin, bazı çalışmalarda ise Val allelinin hastalık oluşumunda önemli bir risk faktörü olduğu ileri sürülmektedir. Over kanserinde (10), premenapozal kadınlarda meme kanserinde (11,91,92), parkinson hastalığında (7), prostat kanserinde (13), kolon kanserinde (14) tip I diabet hastalığında (15) Ala allelinin bir risk faktörü olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmektedir.Val allelinin ise, akciğer kanserinde (16), herediter hemokromatoziste (17) bir risk faktörü olduğu belirtilmektedir. Sonuçta; MnSOD polimorfizminin etkisinin hastalığın türüne, tümörün yerine hatta konağa bağlı olduğu, hormonların etkili olduğu dokularda gelişen kanser tiplerinde (prostat, over, meme) daha çok Ala allelinin etkili olduğu belirtilmektedir (16).Yapılan bazı çalışmalarda Valin içeren MnSOD enziminin mitokondri matriksine tamamen geçemediği için aktivitesinin azaldığı ve yetersiz enzim aktivitesinin hücresel hasara yol açtığı ileri sürülmektedir (16,17). Diğer yandan bazı çalışmalarda ise Alanin içeren MnSOD enziminin kolayca mitokondri matriksine girmesinden dolayı aktivitesinin arttığı fakat bir yandan da özellikle GPx enzim aktivitesi yeterli olmadığı durumlarda artan hidrojen peroksit oluşumuna bağlı farklı yollar sonucunda hücre hasarına neden olarak kanser riskini arttırdığı belirtilmektedir (7,8,11-15, 93) (Şekil 2.13)



Şekil 2-13: MnSOD enziminin kanser riski ilişkisi (93)

2.4.3. GPxI (Pro198Leu) gen polimorfizmi ve kanserle ilişkisi

Glutatyon peroksidaz I homotetramerik yapıda olup , her birinde selenosistein kalıntısı içeren bir selenoprotein yapısındadır. GPxI geni kromozom üzerinde 3p21.3 lokalizasyonunda bulunmakta ve 2 ekzon bölgesi içermektedir. 201 aminoasit içeren GPxI proteinindeki tek nükleotid polimorfizmi çeşitli hastalıklara sebeb olabilmektedir. (21,22,94-96).

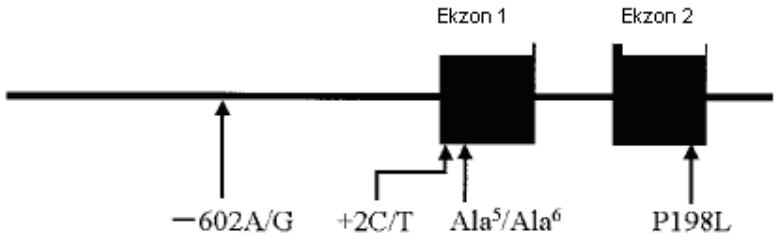
GPxI geninde bulunan polimorfizmler;

*-602 bölgesindeki A/G polimorfizmi

*Ekzon I de bulunan +2 deki C/T polimorfizmi

*Ekzon I de kodon 7-11 de bulunan Polyalanin polimorfizmi 5Ala/6Ala

*Ekzon 2 de bulunan kodon 198 deki CCC(prolin)/CGC(lösin) polimorfizmi (Şekil 2.14) (21,22,95,96).



Şekil 2-14: GPx I gen polimorfizmi

GPxI geni 2. ekzonda bulunan Prolin198Lösin (Pro198Leu) polimorfizminin bir çok hastalıkla ilişkili olduğu belirtilmektedir (95-99). Bu polimorfizmde 198. kodondaki 593. nukleotidte C yerine T gelmesi sonucu prolin yerine lösin oluşmaktadır . Pro198Leu polimorfizminin, Pro-Pro (CC)/ Pro-Leu(CT) / Leu-Leu (TT) üç genotipi bulunmaktadır (21-23).

Değişik hastalıklarda ve farklı ülkelerde yapılan çalışmalarda GPxI Pro198Leu polimorfizminin kanser oluşumunda önemli bir risk faktörü olduğu (21-24,100,101) veya değişmediğini (102,103) gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Prolin bir alfa imino asittir. Prolin yerine lösin gelmesi, selenyumun enzime bağlanmasını etkileyerek aktivitesinin azalmasına neden olduğu belirtilmektedir. GPx enziminin ikinci ve üçüncü konformasyonal yapısının değişmesine bağlı olarak enzimin fonksiyonunun bozulduğu bunun sonucunda kanser oluşum riskinin arttığı ileri sürülmektedir (23,24,97-99).

Yapılan çalışmalarda Pro/Pro genotiplilerin daha güçlü bir antioksidan savunmaya sahip olduğu oysa Leu/Leu genotiplilerin kanser hastalığına yakalanma riskinin daha fazla olduğu belirtilmektedir (21,23,97-99). Ratnasinghe ve ark. GPxI polimorfizminin akciğer kanserindeki etkisini incelemişler ve Pro/Pro genotipine göre Leu/Leu genotipinin 2.3 kat , Pro/Leu genotipinin 1.8 kat daha fazla oranda kanser riskini arttırdığını göstermişlerdir (23). Pro/Leu genotipi mesane kanserinde (97), Leu/Leu genotipinin ise daha çok meme kanserinde (24,98,99), bir risk faktörü olduğu gösterilmiştir. Bazı çalışmalarda ise bazal hücre karsinomunda (25), meme kanserinde (26,102,103), kolerektal kanserinde (104) Pro198Leu polimorfizminin bir risk taşımadığını belirtmişlerdir.

GPxI Pro198Leu polimorfiziminde Leu/Leu genotipine sahip olanların glutatyon peroksidaz aktivitesi ile ilgili farklı sonuçlar bulunmaktadır. Makedonya populasyonunda prostat kanserinde Leu/Leu genotipinin ile GPx aktivitesi arasında bir ilişki gösterilememiştir (105). Hansen ve ark. (104) kolerektal kanserinde, Forsberg ve ark. (94) ise bir başka çalışmada GPx aktivitesi ile Pro198Leu polimorfizmi genotipleri arasında bir ilişki olmadığını belirtmişlerdir. Oysa bazı çalışmalarda; meme kanserinde (99), Leu/Leu genotipinin azalan GPX aktivitesi ile ilişkili olduğu gösterilmişir. Leu/Leu genotipine sahip olanların lösin aminoasidi oluşmasından dolayı selenyumun enzime bağlanamadığını bu yüzdende GPx enzimi aktivitesinin azaldığı ve biriken H_2O_2 artışına neden olduğu belirtilmektedir. Artan H_2O_2'in lipit, protein ve DNA'da mutasyonlara sebep olarak kanserin ve çeşitli hastalıkları meydana getirdiği belirtilmektedir (98,99).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. ÇALIŞMA GRUPLARI

Çalışmamızda prostat kanserinde, oksidatif stresin bir göstergesi olarak plazmada MDA, GSH düzeyleri, antioksidan sistem enzimlerinden total SOD, GPx aktiviteleri incelendi. Ayrıca Gleason skoru, klinik T evresi ve metastaz gibi prostat kanseri gelişiminde rol oynayan prognostik faktörler ile MnSOD ve GPxI gibi oksidatif strese bağlı enzimlerin polimorfizmleri arasındaki ilişki araştırıldı. İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalına alt üriner sistem semptomları ile başvuran ve Transrektal Ultrasonografi (TRUS) eşliğinde biyopsileri alındıktan sonra prostat kanseri tanısı alan 134 kişi (yaş ortalaması 64.1 ± 7.37) çalışma grubumuza dâhil edildi. Ayrıca İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalına çeşitli ürolojik nedenlerle başvuran, parmakla rektal muayenesi normal ve PSA'sı 4'ün altında olan sağlıklı 159 kişi (yaş ortalaması 62.5 ± 8,28) kontrol grubu olarak alındı.

3.2. ÇALIŞMA MATERYALİ

Hasta ve kontrol grubundaki kişilerden bir gece açlıktan sonra venöz kan örnekleri alındı. GSH ve DNA izolasyonu için 10 ml'lik EDTA'lı tüplere alınan kan örnekleri 24 saat içinde çalışıldı. MDA düzeylerinin tayini, total SOD, GPx aktiviteleri için alınan kan örnekleri ise 600xg'de 10 dk santrifüj edilerek plazmaları elde edildi ve -20 °C'de saklandı. Hastaların Gleason skorları, klinik T evreleri ve kemik metastazının olup olmadığı belirlendi. Gleason skoru 2-6 olanlar düşük dereceli tümör ve Gleason skoru 7-10 olanlar yüksek dereceli tümör olarak, klinik T evresi T1 ve T2 olanlar düşük evre, T3 ve T4 olanlar ise ileri evre olarak kaydedildi. Kemik metastazının olup olmadığı kemik sintigrafisi ile saptandı. Hasta ve kontrol grubuna seçilen kişilerin antioksidan ve herhangi bir selenyum içeren vitamin desteği almadıkları, ayrıca alkol içme alışkanlıklarının olmadığı ve sigara kullanıp kullanmadıkları belirlendi.

3.3. KULLANILAN ALETLER

1. Spektrofotometre (Ultraspec 3000, Pharmacia Biotech).

2. pH metre (HANNA Instruments, Portugal).

3. Vorteks (MS 2 Minishaker, İKA).

4.Santrifüj (Megafuge 1.0 R, Heraeus; Mikro 24-48 R, Hettich).

5.Su banyosu (BM 101, Nüve).

6. Manyetik karıştırıcı (İKAMAG RH, İKA basic labortechnic).

7. Elektroforez için güç kaynağı (Biometra).

8. Elektroforez sistemi (Agagel Midi-VVide, Biometra).

9. PZR aleti (Techne TC412 Termal Cycler, Barloworlal Scientific, UK).

10.Hassas terazi (HR-120, AND).

11.Mikrodalga fırın

12.Pipet takımı (Biohit, Proline).

13. Otoklav (Hirayama, HV – 50L).

14. UV transilluminatör ve görüntüleme sistemi (VilberLourmant, France).

3.4. KULLANILAN KİMYASAL MALZEMELER

Kimyasal Maddeler

1.Agaroz

2.Amonyum asetat

3.Amonyum klorür

4.Asetik asit

5.Bromfenol mavisi

6.dNTP seti

7.Etilendiamin tetraasetik asit dihidrat (EDTA-dihidrat)

8.Etanol(%95)

9.Etidyum bromuür

10.Potasyum bikarbonat

11.Sodyumdodesil sülfat (SDS)

12.Sodyum hidroksit

13.Sodyum klorür

14. Tris (hidroksimetil) aminometan (Tris baz)

15.5,5'-Dithio-bis 2-nitrobenzoikasid (DTNB)

16.Triklorasetik asit

17.Tiyobarbitürik asit

18.Hidroklorik asit

19.1,1,3,3-tetraetoksipropan (TEP) standardı

20.Potasyum fosfat

21.Riboflavin

22.o-dianisidin

23.SOD standardı (100 IU/ml)

24.Sodyum azid

25.NADPH

26.Glutatyon

27.Glutatyon redüktaz

28.Kumen hidroperoksit

Kullanılan enzimler

1.Proteinaz K

2.NgoMIV

3.Apa I

4.Taq polimeraz

Kullanılan primerler

MnSOD gen bölgesi için kullanılan primer dizisi:

(‘forward’ primer): 5’ ACC AGC AGG CAG CTG GCG CCG G 3’

(‘reverse’ primer): 5’ GCG TTG ATG TGA GGT TCC AG 3’

GPx I gen bölgesi için kullanılan primer dizisi

(‘forward’ primer) : 5’ TGT GCC CCT ACG CAG GTA CA 3’

(‘reverse’ primer) :5’ CCC CCG AGA CAG CAG CA 3’

3.5. KULLANILAN YÖNTEMLER

3.5.1. MnSOD ve GPxI Gen Polimorfizminin Tayini

MnSOD ve GPxI gen polimorfizmlerinin tayini için aşağıdaki işlemler uygulandı.

a-Periferik kandan DNA izole edildi

b-İzole edilen DNA, PZR ile çoğaltıldı

c-Oluşan PZR ürünleri agaroz jel elektroforezinde yürütüldü

d-Jelde yürütülen PZR ürünleri UV altında incelendi ve polimorfizmin tipi belirlendi.

3.5.2. Periferik Kandan DNA İzolasyonu (106):

Ayıraçlar:

1)Eritrosit Parçalama Tamponu (pH 7.4)

Bir beher içine 8.74 g amonyum klorür, 1 g potasyum bikarbonat, 200 µl 0,5 M etilen diamin tetra asetik asit (EDTA) alınarak üzerine 900 ml bidistile su eklendi ve çözeltinin pH'sı 1 N NaOH ile 7.4'e ayarlandı. Daha sonra çözelti ölçü balonu aktarıldı ve hacmi 1 litreye tamamlandı. Ve son olarak çözelti 120°C'de 15 dk otoklavlandı ve +4°C'de saklandı.

2)0.5 M EDTA (pH 8.0)

Bir beher içine 186.1 g EDTA alınarak üzerine 800 ml bidistile su eklendi. Daha sonra manyetik karıştırıcıda çözülmesi sağlandı. Yaklaşık 20 g NaOH pelletleri ile pH 8'e ayarlandı ve bidistile su ile 1 litreye tamamlandı. 120°C'de 15 dk otoklavlanarak sterilize edildi.

3)4 M Sodyum Klorür (NaCI)

Bir behere 233.6 g NaCI alındı. Üzerine 800 ml bidistile su ilave edildi ve manyetik karıştırıcı yardımıyla çözüldü. Daha sonra ölçü balonuna aktarılarak hacmi 1 litreye tamamlandı. 120°C'de 15 dk otoklavlanarak sterilize edildi.

4)Lökosit Parçalama Tamponu (WLF)

Bir ölçü balonuna 25 ml 4 M NaCI ve 50 ml 0.5 M EDTA alınarak 1 litreye tamamlandı. 120°C'de 15 dk otoklavlandı ve +4°C' de saklandı.

5)1 M Tris Tamponu (stok)

Bir behere 121.1 g Tris baz alınarak üzerine 42 µl HCI ve 800 ml bidistile su eklendi daha sonra manyetik karıştırıcı yardımıyla çözülerek hacmi 1 litreye tamamlandı. 120°C'de 15 dk otoklavlanarak sterilize edildi.

6)9.5 M Amonyum asetat

73.22 g amonyum asetat beher içine alındı ve üzerine 80 ml bidistile su eklenerek +40°C 'de manyetik karıştırıcı yardımıyla çözündürüldü. Daha sonra hacmi bidistile su ile 100 ml'ye tamamlandı. 0.22 mikrometrelik filtreden geçirilerek sterilize edildi. +4°C'de saklandı.

7)%10 Sodyum dodesil sülfat (SDS, pH 7.2)

10 g SDS beher içine alındı ve üzerine 80 ml bidistile su eklenerek manyetik karıştırıcı yardımıyla iyice çözüldü. pH'sı 7.2'ye ayarlanarak ölçü balonuna aktarıldı .Hacmi 100 ml'ye tamamlandıktan sonra sterilizasyon için 0.22 mikrometrelik filtreden geçirildi ve oda sıcaklığında saklandı.

8)Proteinaz K (20 mg/ml)

Steril bir ependorf tüp içinde 20 mg proteinaz K steril bidistile su ile 1 ml'ye tamamlandı. 20°C'de saklandı.

9)Tris-EDTA (pH 8.0)

2.5 ml 1M Tris ve 0.5 ml 0.5 M EDTA ölçü balonuna alındı ve bidistile su ile 250 mL'ye tamamlandı. 120 °C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildi ve oda ısısında saklandı.

İşlem: EDTA'lı tüplere alınan 10 ml periferik kan örnekleri steril falkon tüplerine aktarıldı. Üzerlerine 30 ml (1:3 oranında) eritrosit parçalama tamponu eklenerek karıştırıldı ve +4°C'de 15 dk bekletildi. 1500 rpm'de 15 dk santrifüj edildikten sonra süpernatantları atıldı. Falkon tüplerin dibinde oluşan pelletler homojenize edildikten sonra üzerlerine 15-20 ml eritrosit parçalama tamponu eklenerek karıştırıldı ve +4°C'de 15 dk bekletildi. Daha sonra 1500 rpm'de 15 dk santrifüj edilerek süpernatantları atıldı. Tekrar homojenize edilen pelletler üzerine 9.4 ml lökosit parçalama tamponu, 50 µl proteinaz K (20 mg/ml) ve 500 µl %10'luk SDS eklenerek karıştırıldı ve 56°C su banyosunda bir gece inkübe edildi. İnkübasyondan sonra her bir örneğe 3.7 ml 9.5 M'lık amonyum asetat çözeltisi eklendi. Örnekler yavaşça karıştırıldıktan sonra 3000 rpm'de 30 dk santrifüj edilerek proteinler çöktürüldü. Santrifüjden sonra süpernatantlar steril falkon tüplerine aktarıldı ve üzerine 1:2 oranında % 99'luk absolü alkol eklendi. Alkolün etkisiyle DNA yoğunlaşıp yüzeye çıktıktan sonra steril bir mikropipet ucuyla alındı ve % 70'lik alkolde yıkanarak 56°C'de alkol uçurulduktan sonra 300 µl Tris-EDTA çözeltisi içinde çözüldü. Daha sonra DNA örnekleri +4°C'de saklandı.

3.5.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) (107):

Prensip:DNA zincirinin önceden belirlenen bir bölgesini çoğaltmak için kullanılan Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR), Kary Mullis tarafından 1984 yılında bulunan moleküler genetik alanındaki en önemli yöntemlerden biridir. PZR izole edilen veya patolojik materyallerde

bulunan hedef genetik materyallerin (DNA veya RNA), spesifik kısa zincirli oligonükleotit primerler yardımıyla enzimatik olarak sayısal çoğaltılması (amplifikasyon) olarak tanımlanabilir.

PZR yöntemi ile DNA'nın çoğaltılabilmesi için reaksiyon ortamında çeşitli maddeler yer almalıdır. Bu maddeler şunlardır;

a. Kalıp DNA,

b. Primerler (çoğaltılması istenen bölgenin iki ucundaki DNA dizisini özgül olarak tanıyıp bağlayacak olan DNA primerleri)

c. DNA Polimeraz (Primerlere bağlanıp bunlara 3' ucundan nükleotidleri ekleyerek DNA sentezi yapar, Thermus aquaticus'tan elde edilen ısıya dayanıklı bir enzimdir),

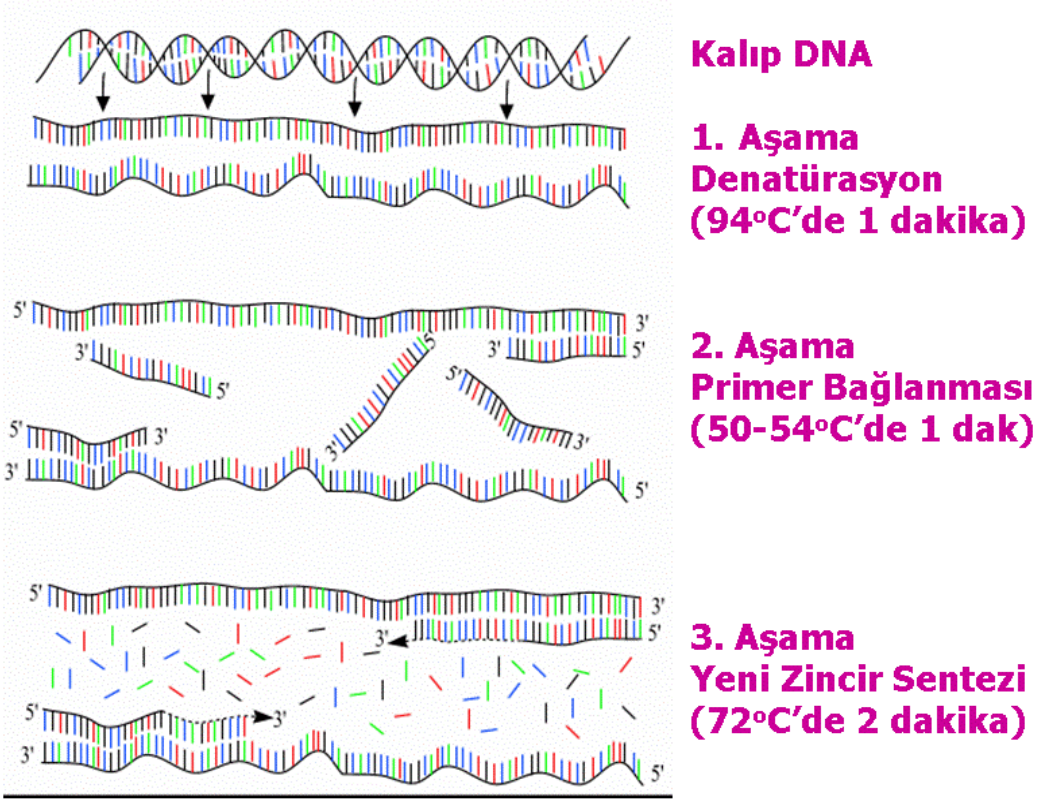
d. Deoksinükleotid trifosfatlar (dNTP),

e. Polimerazın çalışması için gerekli tampon görevi yapan KCl, tris gibi maddeler,

f. Enzimin çalışması için gerekli bir kofaktör olan magnezyum iyonları.

PZR'ın prensibi tekrarlanan üç basamağa dayanmaktadır ve bu 3 basamak bir siklusu oluşturmaktadır (Şekil 3.1)

1. Denatürasyon (parçalanma)
2. Hibridizasyon (pirimerlerin yerleşmesi)
3. Polimerizasyon (sentez)



Şekil 3-1: PZR üç basamağı (genotyping.files.wordpress.com/2007/03/pcr.gif)

Denatürasyon

PCR işleminin ilk aşamasında amplifiye edilecek DNA başlangıçta 95-100 ^{0}C'ye kadar ısıtılır. Denatürasyon için genellikle 90-95 ^{0}C 30 sn ısı uygulanır. PZR basamakları için kullanılan bu dereceler ve süreler çeşitli faktörlere bağlı olarak değişebilir. Hedef DNA'nın guanin ve sitozin bakımından zengin olduğu durumlarda denatürasyon için 95^{0}C'den daha yüksek bir ısı uygulanabilir.

Hibridizasyon

DNA'nın ısıyla denatüre edilmesi yani çift sarmallı DNA sarmalının birbirinden ayrılması ve sıcaklığın 50 ^{0}C'ye düşürülmesi ile primerler DNA matrisi üzerinde yoğunlaşırlar. Primerlerden biri kendine ait 5'-terminusu ile hedef DNA'lardan birinin 3'-ucu ile ve diğer primerler de, ikinci tek iplikçik DNA'nın, anti paralel olarak diğer ucunda bulunan 3'-ucuna bağlanarak, DNA polimeraz'ın çalışması yönüne uygun olarak (5'-3') bağlanırlar. Hibridasyon ısısı genellikle primerlerin erime ısısının 5 ^{0}C altında olup 55-65 ^{0}C'lerde en iyi sonuç vermektedir.

Polimerizasyon (sentez)

Sentez basamağında ise primerlerin DNA polimeraz enzimi vasıtasıyla hedef DNA sarmalını tamamlamaları işlemi gerçekleşir.Yeni şekillenmiş olan sarmal orijinal hedef DNA'dan denatürasyon yolu ile ayrılır ve primer hibridizasyonunu, DNA sentezi ve denatürasyon siklusu tekrar edilir. Bütün DNA molekülleri reaksiyonun sonunda çift sarmallı olarak bulunur. TaqDNA polimeraz enzimi, 5'-3' yönünden olmak üzere, ortamdaki nükleotidleri kullanırlar, primerlerin 3' terminusuna nükleotidleri yerleştirir ve böylece hedef DNA sekansının bir kopyası elde edilir.

Normalde PZR 25-35 siklus arasında yapılmaktadır

Restriksiyon fragman uzunluğu polimorfizmi (RLFP)

Restriksiyon enzimleri spesifik bir DNA çift sarmal sekansını tanır ve DNA'yı belirli bir bölgeden keser. Genomik DNA'da oluşan sekans değişiklikleri restriksiyon enzimlerinin kesim yerlerini değiştirir ve kesim sonucu oluşan parçaların boyutları değişir. Enzim kesim yöntemi ile kesim sonucu oluşan parçalar agaroz jel üzerinde elektroforez edilir ve moleküler boyutlarına göre bandlara ayrılır (87).

PZR' NİN KULLANIM ALANLARI (84)

1. Hastalık etkeninin teşhisi

a. Bakteriyel patojenlerin saptanması: PZR özellikle çoğaltılması zor ve uzun zaman alan patojenlerin çabuk teşhisi için kullanılır.

b. Viral patojenlerin saptanması: Viral hastalıklar, viral RNA'nın varlığı aktif enfeksiyonun bir göstergesidir ve bu enfeksiyon enfekte hücrelerden elde edilmiş RNA'nın revers transkripsiyon sayesinde elde edilen cDNA kalıplarının PZR'da kullanılmasıyla teşhis edilir.

c. Paraziter hastalıkların etkenlerinin saptanması: PZR, konakçı vücudunda çok az parazit veya bir tek parazit bulunması halinde bile parazit protein yapılarından bir tanesinin genetik parçasının sağaltılarak tanınabilir hale gelmesi ile laboratuarlarda kullanılmaya başlanmıştır.

d. Patoloji ve klinik araştırmaları: Dondurulmuş cerrahi kesitler veya biopsi örnekleri materyal olarak kullanılabilir. PZR'nin etkin bir şekilde kullanılabilmesi; patoloji ve diğer klinik sahalarda yapılan araştırmaların kombine bir şekilde çalışması ile olur.

2. Genetik hastalıkların teşhisi

a)Kalıtsal ve sonradan kazanılan hastalıkların tespiti için

b)Hücrelerin izolasyonu ve identifikasyonu için

c)Gen terapisinde

d)Doku tiplemesi

e)Prenatal tanı

f)Babalık/akrabalık tayini

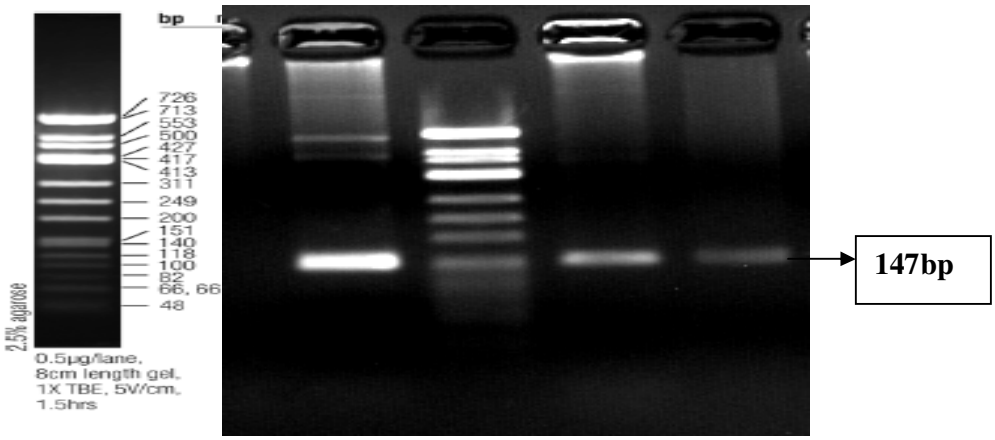
3.5.4. GPxI gen bölgesinin çoğaltılması (108)

GPxI gen bölgesi için 5' TGT GCC CCT ACG CAG GTA CA 3' ve 5' CCC CCG AGA CAG CAG CA 3' primer dizileri kullanıldı. DNA örneklerinden GPxI gen bölgesinin çoğaltılması için 25µl hacminde PZR karışım çözeltisi hazırlandı. Karışım çözeltisi 15µl bidistile su,1.25U/L Taq polimeraz enzimi, bu enzimin çalışması için gerekli 1.5µl 10Xreaksiyon çözeltisi, GPx I gen bölgesine özgü 10pmol primer çifti, 2mM MgSO4 ,0.2mM deoksinükleotid trifosfat (dNTP) karışımı içerir. Bu karışımların içine 1µl DNA örneklerinden eklenerek Progene Techne Thermal Cycler'da PZR işlemi yapıldı. PZR programı;95°C'de 3 dk, 95°C'de 30sn denatürasyon, 58°C'de 60 sn bağlanma, 72°C'de 90sn uzama olmak üzere 35 döngü, 72°C'de 10dk final uzama olarak gerçekleştirildi.

%3 Agaroz jel hazırlanması:

3g Agaroz tartılarak 100mL 1XTBE tamponuna eklendi ve manyetik karıştırıcıda karıştırılarak homojenize edildi. Jel üzerine 2-3µl etidyum bromür eklenerek karıştırıldı. Hazırlanan jel tank içine dökülerek 30 dk kadar donması beklendi. Donma işleminden sonra daha önce hazırlanan 10µl PZR ürünü ve 1-2µl Bromfenol mavisi karışımı jele uygulandı. 100Mv elektrik akımında 30dk. yürütüldü. Bantlar UV ışık altında incelenerek PZR

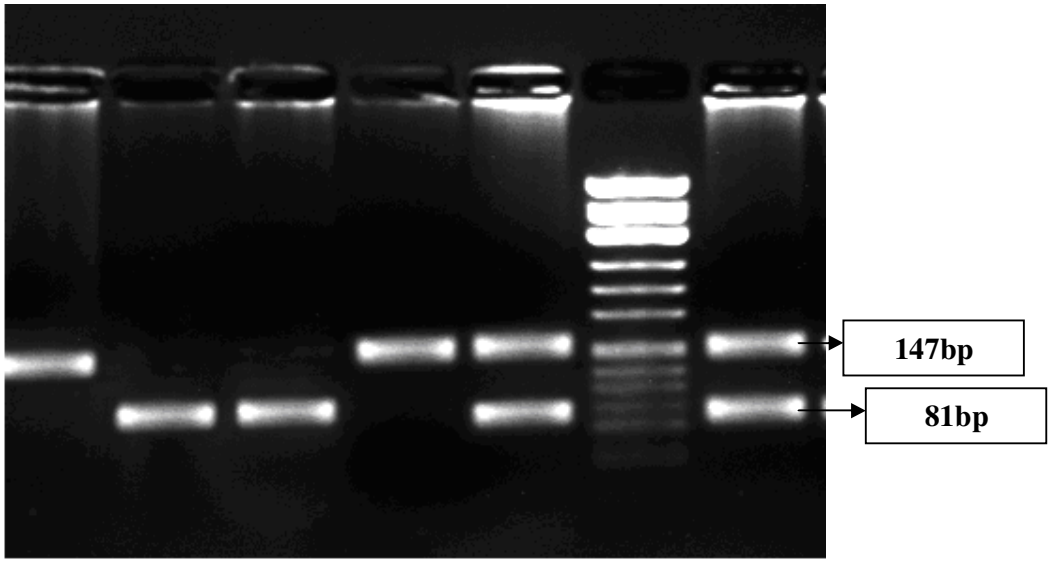
ürünlerinin oluşup oluşmadığı kontrol edildi Markır olarak PhiX174 DNA/HinfI Marker kullanıldı. (Şekil 3-2).



PhiX174HinfI **Şekil 3-2: GPxI Pro198Leu PZR ana ürün**

PZR ürünlerinin Kesim İşlemi

PZR sonucunda elde edilen ürünler 198 .kodonda prolini kodlayan CCC nükleotidleri ise Apa I enzimi ile kesilebilir, lösini kodlayan CTC nükleotidleri ise kesilemez. Kesim işlemi için 1µl bidistile su, 1µl 1X tampon ve 0.5µl ApaI enzimi içeren bir karışım çözeltisi hazırlandı. Bu karışım çözeltisine 7.5µl PZR ürünlerinden eklendi ve 37°C etüvde 1 gece bekletilerek kesim gerçekleştirildi.Kesim işlemi tamamlandıktan sonra 10µl kesim ürünü ve 1-2 romfenol mavisi karışımı %3 agaroz jele uygulandı ve 100mV elektrik akımı altında 30dk. yürütüldü. Genotipler UV ışık altında uygun markır ile karşılaştırılarak genotipler saptandı. Buna göre, TT (Leu/Leu) genotipi içerenlerde 147 baz çiftlik bant gözlendi. CC(Pro/Pro) genotipi içerenlerde 81 baz çiftlik bant, CT(Pro/Leu) genotipi içerenlerde ise 147 ve 81 baz çiftlik bantlar görüldü (Şekil 3.3).



TT CC CC TT CT Markır CT

Şekil 3-3: GPxI Pro198Leu polimorfizmi

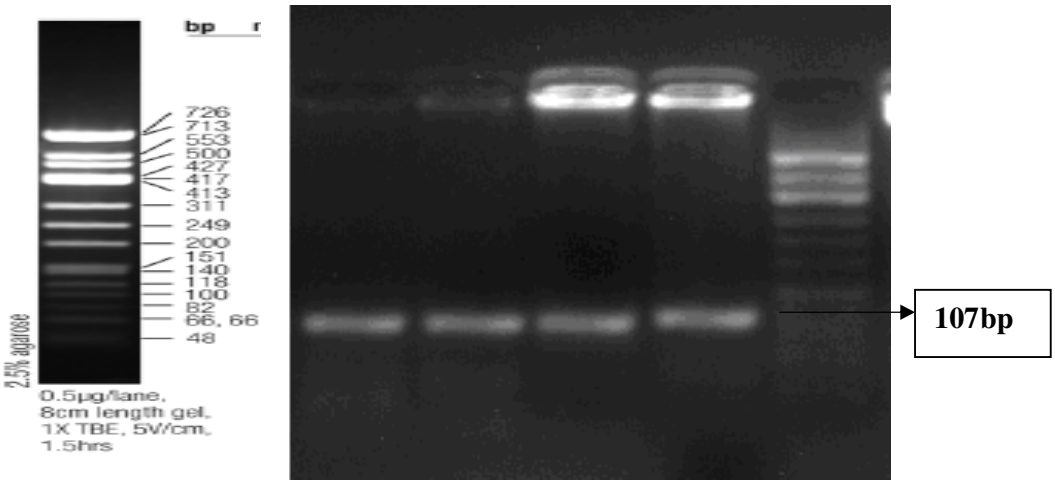
3.5.5. MnSOD Ala-9 Val gen bölgesinin çoğaltılması (109)

MnSOD gen bölgesi için 5' ACC AGC AGG CAG CTG GCG CCG G 3' ve 5' GCG TTG ATG TGA GGT TCC AG 3' primer dizileri kullanıldı. DNA örneklerinden MnSOD gen bölgesinin çoğaltılması için 25µl hacminde PZR karışım çözeltisi hazırlandı. Karışım çözeltisi 1.5µl bidistile su, 1.25U/L Taq polimeraz enzimi, bu enzimin çalışması için gerekli 1.5µl 10Xreaksiyon çözeltisi, MnSOD gen bölgesine özgü 10pmol primer çifti, 2mM MgSO4 , 0.2mM deoksiribonükleotid trifosfat (dNTP) karışımı içerir. Bu PZR karışımları içine 1µl DNA örneklerinden eklenerek Progene Techne Thermal Cycler'da PZR işlemi yapıldı.PZR programı; 95°C'de 15dk,94°C'de 30sn denatürasyon, 60°C'de 30sn bağlanma, 72°C'de 30sn uzama olmak üzere 35 döngü,72°C'de 7 dk final uzama olarak gerçekleştirildi.

%3 Agaroz jel hazırlanması:

3g Agaroz tartılarak 100mL 1XTBE tamponuna eklendi ve manyetik karıştırıcıda karıştırılarak homojenize edildi. Jel üzerine 2-3µl etidyum bromür eklenerek karıştırıldı. Hazırlanan jel tank içine dökülerek 30 dk kadar donması beklendi. Donma işleminden sonra daha önce hazırlanan 10µl PZR ürünü ve 1-2µl Bromfenol mavisi karışımı jele uygulandı. 100mV elektrik akımında 30dk. yürütüldü. Bantlar UV ışık altında incelenerek PZR

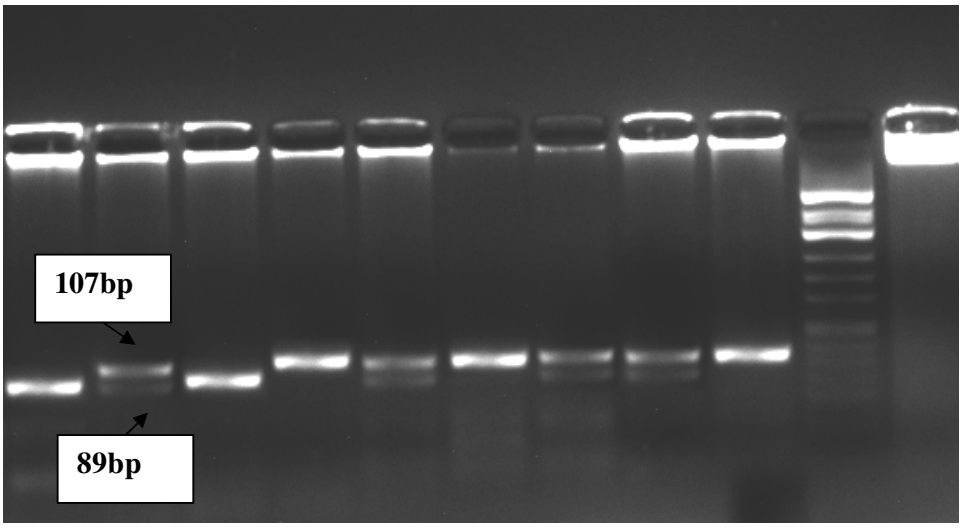
ürünlerinin oluşup oluşmadığı kontrol edildi . Markır olarak PhiX174 DNA/HinfI Marker kullanıldı. (Şekil 3-4).



PhiX174HinfI **Şekil 3-4: MnSOD Ala-9Val ana ürün**

PZR ürünlerinin Kesim İşlemi

PZR sonucu elde edilen ürünler 9. kodonda alanini kodlayan GGC nükleotidleri ise NgoMIV enzimi ile kesilebilir, valini kodlayan GGT nükleotidleri ise kesilemez. Kesim işlemi için 1µl bidistile su, 1µl 1Xtampon ve 0.5µl NgoMIV enzimi içeren bir karışım çözeltisi hazırlandı. Bu karışım çözeltisine 7.5 µl PZR ürünlerinden eklendi ve 37 °C etüvde 1 gece bekletilerek kesim işlemi gerçekleştirildi. Kesim işlemi tamamlandıktan sonra 10µl kesim ürünü ve 1-2µl bromfenol mavisi karışımı %3 agaroz jele uygulandı ve 100mV elektrik akımı altında 30dk. yürütüldü. Genotipler UV ışık altında uygun markır ile karşılaştırılarak genotipler saptandı. Buna göre, TT (Val/Val) genotipi içerenlerde 107 baz çiftlik bant gözlendi. CC (Ala/Ala) genotipi içerenlerde 89 baz çiftlik bant, CT (Ala/Val) genotipi içerenlerde ise 107 ve 89 baz çiftlik bantlar görüldü (Şekil 3-5)



CC CT CC TT CT TT CT CT TT Marker

Şekil 3-5: MnSOD Ala-9Val polimorfizmi

3.5.6. Plazma Malondialdehit (MDA) Tayini (110)

Prensip:Oksidatif stresi belirlemede, lipit peroksidasyonunun göstergesi olarak MDA düzeyleri ölçülür. Oluşan MDA, 100°C'de tiyobarbitürik asit (TBA) ile reaksiyona girer ve 535 nm'de spektrofotometrik olarak absorbans veren renkli bir ürün oluşur.

Ayıraçlar:

1.Triklorasetik asit-tiyobarbitürik asit-hidroklorik asit ayıracı (TCA-TBA-HCI): 375 mg TBA, 15ml %100'lük TCA ve 2.1ml derişik HCI karıştırılarak 100ml'ye distile su ile tamamlandı.

2. 1,1,3,3-tetraetoksipropan (TEP) standardı:10mM stok standard:22mg TEP 10ml distile suda çözüldü. 10nmol/ml çalışma standardı: 10mM stok standarttan 100µl alındı ve 100ml'ye distile su ile tamamlandı.

İşlem:0.5ml plazma üzerine 0.5ml distile su ve 2ml TCA-TBA-HCl ayıracı eklendi. 15dk 100°C'deki su banyosunda kaynatıldıktan sonra soğutuldu ve 10dk 3000rpm santrifüj edilerek elde edilen süpernatantın absorbansı köre karşı okundu. Sonuçların hesaplanmasında ekstinksiyon katsayısı (ε =1.56x10-5 M-1 cm-1) kullanıldı ve sonuçlar nmol MDA/ml plazma olarak verildi.

3.5.7. Tam Kanda Glutatyon (GSH) Tayini (111):

Prensip: 5,5' ditiobis-2 nitro benzoik asit (DTNB)'nin sülfidril grupları tarafından indirgenmesi sonucu 1mol SH grubu başına 1mol -nitro-5 tiyobenzoik asit (TNB) oluşur. Oluşan sarı renkli ürünün verdiği absorbans 412 nm'de spektrofotometrik olarak okunur.

Ayıraçlar:

1. Presipitasyon solüsyon:1.67g glasiyal metafosforikasit, 0.2g EDTA, 30g NaCL tartıldı, 100ml'ye distile su ile tamamlandı.

2. 0.3M Fosfat solüsyonu:42.59 g Na_2 HPO_4 tartıldı, 1 litreye distile su ile tamamlandı.

3. 5,5'-Dithio-bis 2-nitrobenzoikasid (DTNB):40mg DTNB tartılarak sodyum sitrat 100ml'ye tamamlandı.

EDTA'lı tam kan örneğinden 0.2ml alınarak 1.8ml soğuk su içine alınarak hemoliz olması sağlandı. Daha sonra 3ml presipitasyon solüsyonu eklenerek santrifüj edildi. Süpernatantlardan 0.5ml alınarak deneye devam edildi. Üzerine 2ml fosfat solüsyonu ve 0.25ml DTNB ayıracı konulup karıştırıldı. Ekstinksiyon katsayısına göre (ε =13600$M^{-1}cm^{-1}$) glutatyon değerleri hesaplandı ve mg GSH/ml plazma olarak verildi.

3.5.8. Süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesinin ölçülmesi (112)

SOD aktivitesi, riboflavin duyarlandırılmış o-dianisidinin fotooksidasyon hızını arttırılma yeteneği olarak ölçülür. Riboflavinin floresans ışığı etkisiyle oluşturduğu süperoksit radikali, ortamdaki SOD'un etkisiyle hidrojen perokside dönüşür. Hidrojen peroksit ise o-dianisidin ile reaksiyona girerek renkli ürün oluşturur. Oluşan renkli ürünün absorbansı 460 nm'de spektrofotometrik olarak saptanır.

Ayıraçlar:

1-0.1mM EDTA içeren 50 mM Potasyum fosfat tamponu (Ph 7.8)

2-0.2mM riboflavin:7.3 mg riboflavin 100 ml 10 mM Potasyum fosfat tamponunda (pH 7.5)' de çözüldü.

3-6 mM o-dianisidin:19 mg o dianisidin 10 ml distile suda çözündü.

4-SOD standardı (100 IU/ml)

İşlem: Kör, standart ve deney tüplerine sırası ile 2.6 ml 50 mMpotasyum fosfat tamponu (pH 7.8), 0.1 ml o-dianisidin ilave edilir. Kör tüpüne 0.1 ml distile su, standart tüpüne 0.1 ml standart, deney tüpüne 0.2 ml plazma eklendi ve her tüpe 30 saniye ara ile 0.2 ml riboflavin kondu, karıştırıldı ve 460 nm'deki absorbans değerleri okundu. Tüpler 20W floresans lamba içeren 37 °C'ye ayarlanmış özel bir kutuya yerleştirildi ve tam 8 dakika süre ile floresans ışığa maruz bırakıldı. Sürenin bitiminde tüplerin absorbansı tekrar 460 nm'de okundu ve iki absorbans arsındaki fark alındı. Ayrıca deney körü ve standart içinde aynı işlemler yapıldı.

3.5.9. Glutatyon peroksidaz (GPx) aktivitesinin ölçülmesi (113)

GPx aktivitesi tayini iki reaksiyon ile gerçekleşir. Birinci reaksiyonda H_2O_2 veya organik hidroperoksitler (ROOH) GPx etkisi ile indirgenirken, ortamdaki GSH oksitlenmiş GSH'a (GSSG) dönüşür. İkinci reaksiyonda GSSG, GSH- redüktaz (GSH-R) etkisi ile tekrar GSH'a, NADPH ise $NADP^{+'}$ye oksitlenir. Bu dönüşüm 340 nm absorbansta azalma olarak izlenir. NADPH 340 nm de bir absorbans verdiği halde, $NADP^+$ bu dalga boyunda absorbans vermemektedir.

$$ROOH + 2GSH \xrightarrow{GSH\text{-}Px} 2ROH + GSSG$$

$$GSSG + NADPH \xrightarrow{GSH\text{-}Rd} 2GSH + NADP^+$$

Ayıraçlar:

1-50mM potasyum fosfat tamponu (pH 7.2)

2-4.3mM EDTA

3-37.5mM sodyum azid

4-0.2mM NADPH

5-4mM GSH

6-Glutatyon Redüktaz (0.5 IU/ml)

7-0.18mM kumen hidroperoksit

İşlem:50mM potasyum fosfat tamponu (pH 7.0), 4.3mM EDTA, 37.5Mm sodyum azid, 0.2mM NADPH, 4mM GSH, 0.5IU/ml glutatyon redüktaz içeren çalışma ayıracından 1 ml

alındı ve 20µl plazma konularak 37^0C lik su banyosu içeren spektrofotometrede 2-3 dk. bekletildi. Daha sonra 10 sn. aralıklı olarak 40µl kümen hidroperoksit eklendi. Bu karışım, 1'er dakika arayla spektrofotometrede 340 nm'de absorbans değişimi izlendi.

Hesap: Sonuçlar NADPH'in ekstinksiyon katsayısı olan $6.22x10^3$ $M^{-1}cm^{-1'}$den yararlanılarak hesaplandı sonuçlar U/L olarak belirtildi.

3.6. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER

Çalışmamızın istatistiksel analizler için SPSS 15 paket programı kullanıldı. İstatistiksel olarak anlamlılık sınırı $p < 0.05$ olaral kabul edildi.

Klinik ve biyokimyasal parametrelerin karşılaştırılmasında student- t testi ve Mann-Whitney U testi kullanıldı.

MnSOD ve GPxI gen polimorfizmlerinin gruplar arası anlamlılığını karşılaştırmak için pearson's ki kare (χ^2) testi kullanıldı. Gruplar arası risk etkeninin belirlenmesi için Odds oranı (OR) ve % 95 güven sınırları (%95 CI) verildi. Allel frekansı hesaplamalarında ise χ^2 allel hesaplaması kullanıldı. Tümörün derecesi, evresi, metastaz üzerindeki risk faktörleri için lojistik regresyon analizi yapıldı.

Çalışmamızdaki MnSOD ve GpxI polimorfizmleri Hardy-Weinberg denklemine uygunluk göstermektedir. Ayrıca Power analizi sonucu ise %88 olarak bulunmuştur..

4. BULGULAR

4.1. Kontrol ve hasta gruplarının klinik değerleri

Kontrol grubu ile prostat kanserli hastalar arasında yaş ve vücut kitle indeksi (BMI) açısından anlamlı bir farklılık saptanmadı. Hasta grubunda serum total PSA düzeylerinde kontrol grubuna göre anlamlı bir yükselme bulundu. Kontrol grubu ile prostat kanserli hastalar arasında yaş, BMI ve plazma PSA düzeyleri student-t testi ve Mann-Whitney U testi kullanılarak karşılaştırıldı. Hasta ve kontrol grubu arasında sigara kullanımı açısından anlamlı bir farklılık saptanmadı. Yılda 40 paket ve altında (≤40 pkt/yıl) ile 40 paket üstünde (>40 pkt/yıl) sigara kullanan prostat kanserli hasta ve kontrol grupları kıyaslandığında anlamlı bir farklılık bulunmadı. Sigara kullanan ve kullanmayan kontrol grubu ile hasta grubu arasındaki korelasyon Pearson χ^2 testi kullanılarak değerlendirildi.(Tablo 4.1)

Tablo 4-1: Kontrol ve hasta gruplarının klinik değerleri

	Kontrol (n=159)	**Hasta (n=134)**	**p**
Yaş (yıl)	62.5±7.53	64.1±7.48	0.064
BMI (kg/m^2)	26.4±3.01	26.6±3.05	0.154
Total PSA(ng/ml)	1.21±0.99	13.77±20.7	0.000
Sigara (n,%)			
Kullanmayan	90(56.6)	61(45.5)	
Kullanan	69(43.4)	73(54.5)	0.059
≤40 pkt/yıl kullanan	55(79.7)	52(71.2)	
>40 pkt/yıl kullanan	14(20.3)	21(28.8)	0.241

4.2. Kontrol ve hasta gruplarının GSH ve MDA değerleri ile SOD ve GPx aktiviteleri

Prostat kanserli hasta grubunda, tam kan GSH düzeylerinde kontrol grubuna göre anlamlı bir azalma saptandı. Prostat kanserli hasta grubunda plazma MDA düzeylerinde ve plazma SOD ile GPx aktivitelerinde kontrol grubuna göre anlamlı bir yükselme bulundu. Kontrol grubu ile prostat kanserli hastaların GSH ve MDA düzeyleri ile GPx ve SOD aktiviteleri student-t testi ve Mann-Whitney U testi kullanılarak istatistiksel olarak değerlendirildi. (Şekil 4.2).

Tablo 4-2. Kontrol ve hasta grubundaki tam kan GSH, plazma MDA değerleri ile plazma GPx ve SOD aktiviteleri (ortalama±SD)

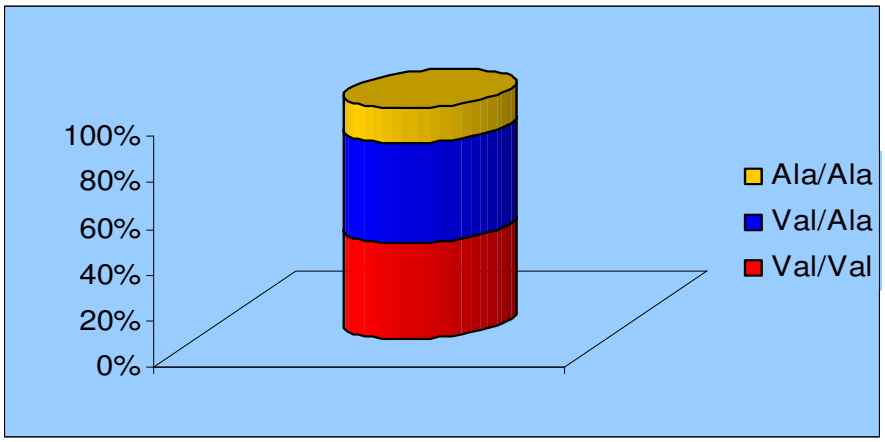
	Kontrol (n=159)	**Hasta (n= 134)**	**p**
MDA(nmol/ml)	4.05±1.71	7.83±2.08	0.000
GSH (mg/dL)	30.±6.99	19.8±6.22	0.000
GPx (U/L)	150.3±34.52	185.14±38.83	0.000
SOD (U/ml)	10.5±4.11	12.2±4.01	0.000

4.3. MnSOD Ala-9Val polimorfizmi ile ilgili sonuçlar

a) MnSOD Ala-9Val polimorfizminde genotip dağılımı ve allel sıklığı bakımından prostat kanserli hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı bir farklılık bulunmadı (Tablo 4.3). (χ^2=3.94; p=0.22). Kontrol ve hasta gruplarında MnSOD Ala-9Val genotip dağılımı ve allel sıklığı Pearson ki kare (χ^2) testi ile istatistiksel olarak değerlendirildi. Ayrıca, Türk erkek populasyonunda MnSOD Ala-9Val polimorfizminde Val/Ala genotip dağılımı ve Val allel sıklığı anlamlı olarak daha yüksek bulundu (Şekil 4.1). MnSOD geninin Ala-9Val polimorfizmi Hardy-Weinberg denklemine uygunluk gösterdi.

Tablo 4-3:Kontrol ve prostat kanserli hasta grubunda Ala-9Val genotip dağılımı ve allel sıklığı

	Kontrol (n %)	Hasta (n %)	OR(95%CI)	p
Genotip				
Val/Val	66(41.5)	43(32.1)	1.00*	
Val/Ala	69(43.4)	65(48.5)	1.44 (0.86-2.41)	0.158
Ala/Ala	24(15.1)	26(19.4)	1.66 (0.84-3.26)	0.138
Val/Val+Val/Ala	135 (84.9)	108(80.6)	1.00*	
Ala/Ala	24(15.1)	26(19.4)	1.35 (0.73-2.49)	0.329
Val/Val	66(41.5)	43(32.1)	1.00*	
Val/Ala + Ala/Ala	93(58.5)	91(67.9)	1.50 (0.92-2.42)	0.097
Allel				
Val	201(64.4)	151(56.3)		
Ala	111(35.5)	117(43.6)		0.090



Şekil 4-1 Türk erkek populasyonunda MnSOD Ala-9Val genotip dağılımı

b) Sigara kullanan ve kullanmayan hasta ve kontrol grupları arasında genotip dağılımları incelendiğinde, MnSOD Ala-9Val genotip dağılımı açısından hem sigara kullanan hem de kullanmayan hasta ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak bir anlamlılık bulunmadı.

MnSOD Ala-9Val polimorfizmi genotiplerinin sigara kullanımı ile ilişkisi

		Kontrol n (%)	**Hasta n (%)**	**OR**	**P**
Sigara kullanmayan	Val/Val	32(43.8)	18(34.6)	1.00*	
	Val/Ala+Ala/Ala	41(56.2)	34(65.4)	1.40(0.69-2.86)	0.300
Sigara kullanan	Val/Val	28(40.6)	22(30.1)	1.00*	
	Val/Ala+Ala/Ala	41(59.4)	51(69.9)	1.58(0.79-3.16)	0.193

c) Kontrol grubunu kendi içinde incelediğimizde; SOD aktivitesi ile MnSOD polimorfizmi arasında bir ilişki bulunamadı. Prostat kanserli hasta grubunu ise kendi içinde incelediğimizde, hem Val/Ala hem de Ala/Ala genotiplerine sahip olan kişilerin plazma SOD aktivitesi Val/Val genotipine sahip olan kişilere göre anlamlı olarak daha yüksek bulundu. Ayrıca, Ala/Ala genotipine sahip olan prostat kanserli hastaların SOD aktivitesinin Val alleline sahip olan prostat kanserli hastalara göre anlamlı olarak arttığı gözlendi.Buna ilave olarak, Ala allelini taşıyanların SOD aktivitesi Val/Val genotipi taşıyanlara göre istatistiksel olarak artış gösterdi (Tablo 4.4).

Tablo 4-4:MnSOD Ala-9Val polimorfizmi genotiplerinin plazma SOD aktivitesi ile ilişkisi

	SOD aktivitesi (U/ml)			
	Kontrol	**n (%)**	**Hasta**	**n (%)**
Val/Val	10.78±4.53	66(41.5)	10.50±3.90	43(32.1)
Val/Ala	10.43±3.88	69(43.4)	12.55±4.14[a]	65(48.5)
Ala/Ala	10.27±3.60	24(15.1)	14.16± 2.64[b]	26(19.4)
Val/Val+Val/Ala	10.60±4.27	135(84.9)	11.73±4.15	108 (80.6)
Ala/Ala	10.27±3.60	24(15.1)	14.16±2.64[c]	26 (19.4)
Val/Val	10.78±4.53	66(41.5)	10.50±3.90	43(32.1)
Val/Ala + Ala/Ala	10.39±3.79	93(58.5)	13.01±3.83[d]	91 (67.9)

[a]p=0.012 Val/Ala genotipi Val/Val genotipine göre kıyaslandı

[b]p=0.000 Ala/Ala genotipi Val/Val genotipine göre kıyaslandı

[c]p=0.005 Ala/Ala genotipi Val alleline göre kıyaslandı

[d]p=0.001 Ala alleli Val/Val genotipine göre kıyaslandı

d) Düşük ve yüksek dereceli tümör açısından incelendiğinde, MnSOD Ala-9Val genotip dağılımları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı (χ^2=4.29; p=0.117) (Tablo 4.5).

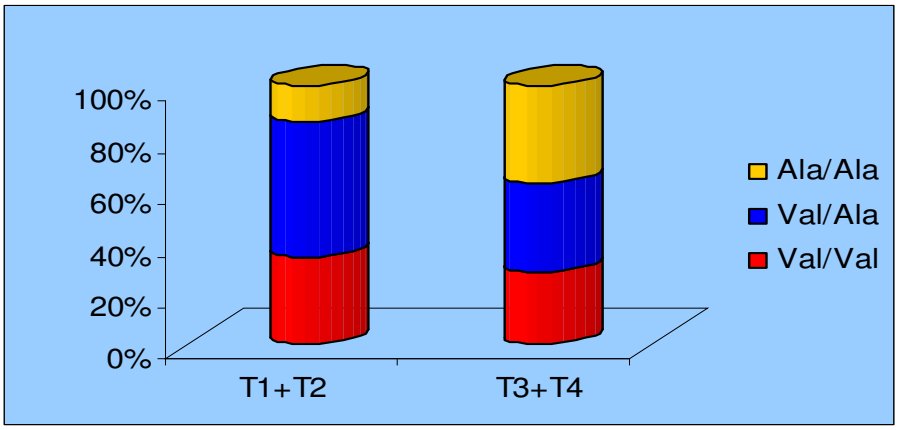
Tablo 4-5: MnSOD Ala-9Val genotiplerinin tümörün derecesi ile ilişkisi

	Val /Val	**Val/Ala**	**Ala/Ala**	**p**
	n (%)	**n (%)**	**n (%)**	
Düşük dereceli tümör (Gleason skoru:2-6)	30(69.8)	43(66.2)	12(46.2)	
Yüksek dereceli tümör (Gleason skoru:7-10)	13(30.2)	22(33.8)	14(53.8)	0.117

e) MnSOD Ala-9Val genotiplerinin dağılımı düşük ve yüksek klinik T evresi açısından incelendiğinde, Ala/Ala genotipine sahip prostat kanserli hastaların Val/Val genotipine sahip prostat kanserli hastalara göre anlamlı olarak daha ileri evreye sahip oldukları saptandı (χ^2=9.03; p= 0.011) (Tablo: 4.6; Şekil 4.2).

Tablo 4-6: MnSOD Ala-9Val genotiplerinin klinik T evresi ile ilişkisi

	Val /Val	**Val/Ala**	**Ala/Ala**	**p**
	n (%)	**n (%)**	**n (%)**	
Düşük evre (T1+T2)	34(79.1)	54(83.1)	14(53.8)	
İleri evre (T3+T4)	9(20.9)	11(16.9)	12(46.2)	0.011

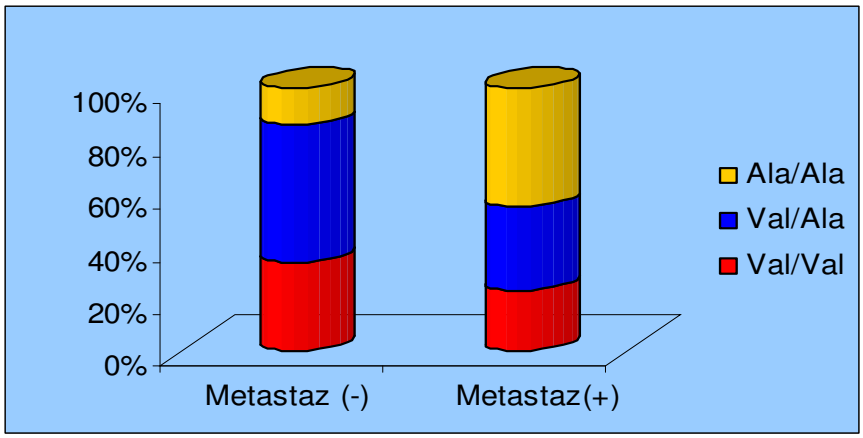


Şekil 4-2: Klinik T evresine göre MnSOD Ala-9 Val genotiplerinin dağılımı

f) İleri klinik T evresine sahip prostat kanserli hastalar içinde MnSOD Ala-9Val genotip dağılımı ile kemik metastazı arasındaki ilişki incelendiğinde Ala/Ala genotipine sahip kişilerin Val/Val veya Val/Ala genotipine sahip olan kişilere göre daha çok kemik metastazına yakalanma riskine sahip olduğu görüldü (χ^2=11.4; p= 0.003) (Tablo:4-7;Şekil:4-3.).

Tablo 4-7: MnSOD Ala-9Val genotiplerinin kemik metastazı ile ilişkisi

	Val/Val	Val/Ala	Ala/Ala	p
	n (%)	n (%)	n (%)	
Kemik metastazı (-)	38(88.4)	58(89.2)	16(61.5)	
Kemik metastazı (+)	5(11.6)	7(10.8)	10(38.5)	0.003



Şekil 4-3:MnSOD Ala-9 Val genotiplerinin kemik metastazı üzerine etkisi

g) MnSOD Ala9Val polimorfizmi, PSA düzeyleri, yaş, BMI ve sigara kullanımı gibi prostat kanserinde rol oynadığı ileri sürülen risk faktörlerinin, kemik metastazı, klinik T evresi ve tümörün derecesi üzerine etkisi lojistik regresyon analizi ile incelendi. Lojistik regresyon analizine göre, MnSOD Ala9Val polimorfizminin ve PSA düzeylerinin kemik metastazı ve klinik T evresi üzerinde anlamlı olarak risk taşıdığı halde tümörün derecesi üzerinde etkili olmadığı bulundu (Tablo 4-8).

Tablo 4-8:MnSOD polimorfizminin lojistik regresyon analizi

	OR	95%CI	p
Kemik metastazı			
MnSOD polimorfizmi	6.12	1.33-28.2	0.020
PSA (ng/mL)	5.71	1.63-19.9	0.006
Klinik T evresi			
MnSOD polimorfizmi	5.20	1.26-21.0	0.022
PSA (ng/mL)	7.63	2.42-24.0	0.001
Tümör derecesi			
MnSOD polimorfizmi	0.92	0.37-2.33	0.874
PSA (ng/mL)	0.50	0.55-2.82	0.181

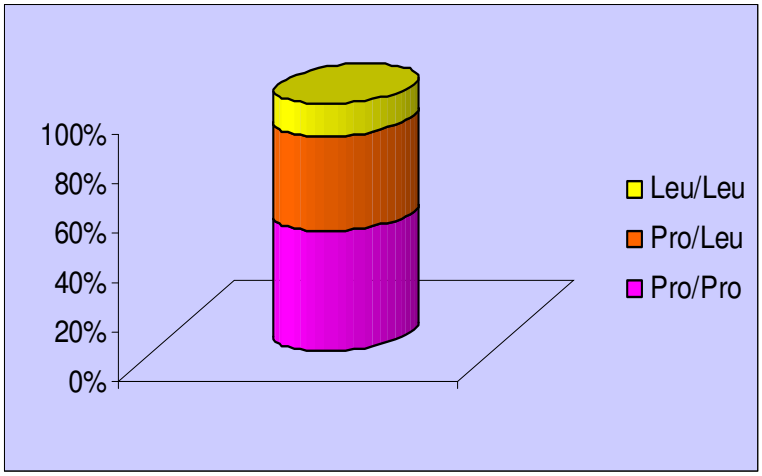
MnSOD polimorfizmi (Val/Val+Val/Ala ; Ala/Ala), Sigara (kullanan / kullanmayan), PSA (≤10.0 ; >10.0), yaş (≤63.6 ; >63.6) , BMI: (≤26.5 ;>26.5) alınarak lojistik regresyon analizi yapıldı.

4.4. GPx I Pro198 Leu polimorfizmi ile ilgili sonuçlar

a) Çalışmamızda, kontrol grubu ile prostat kanserli hasta grubu kıyaslandığında, prostat kanserli hastalarda Leu/Leu genotip dağılımının Pro/Pro genotip dağılımı ve/veya Pro allel sıklığına göre anlamlı olarak arttığı bulundu. Buna ilaveten, Leu allelinin Pro/Pro genotipine göre prostat kanserine yakalanma oranında 2.98 kat daha fazla risk taşıdığı saptandı. Ayrıca, prostat kanserli hasta grubu kontrol grubu ile kıyaslandığında Leu allel sıklığının Pro allel sıklığına göre istatistiksel olarak arttığı bulundu. Ayrıca, Türk erkek populasyonunda Pro198Leu Pro/Pro genotip dağılımı ve Pro allel sıklığı anlamlı olarak daha yüksek bulundu (Şekil 4.4). Kontrol ve hasta gruplarında GPx I Pro198 Leu genotip dağılımı ve allel sıklığı Pearson's ki kare (χ^2) testi kullanılarak karşılaştırıldı. GPxI geninin Pro198Leu polimorfizmi Hardy-Weinberg denklemine uygunluk gösterdi (Tablo 4-9) (genotip χ^2= 21.8; p=0.000) (allel χ^2= 24.5; p= 0.000).

Tablo 4-9: Kontrol ve hasta grubunda GPxI genotip dağılımı ve allel sıklığı

	Kontrol (n %)	Hasta (n %)	OR(95%CI)	p
Genotip				
Pro/Pro	75(48.4)	32(23.9)	1.00* referans	
Pro/Leu	60(38.7)	62(46.3)	2.42(1.40-4.17)	0.001
Leu/Leu	20(12.9)	40(29.9)	4.68(2.38-9.23)	0.000
Pro/Pro+Pro/Leu	135(87.1)	94(70.1)	1.00*	
Leu/Leu	20(12.9)	40(29.9)	2.87(1.58-5.22)	0.000
Pro/Pro	75(48.4)	32(23.9)	1.00*	
Pro/Leu+Leu/Leu	80(51.6)	102(76.1)	2.98(1.80-4.96)	0.000
Allel				
Pro	210(67.7)	126(47.0)	1.00*	
Leu	100(32.2)	142(52.9)		0.000



Şekil 4-4:Türk erkek populasyonunda GPxI Pro198Leu genotip dağılımı

b) Sigara kullanmayan kontrol ve hasta grupları arasında genotip dağılımları açısından istatistiksek olarak bir anlamlılık bulunmadı. Oysa, sigara kullanan hasta grubunda sigara kullanan kontrol grubuna göre Pro/Leu veya Leu/Leu genotip dağılımlarının Pro/Pro genotip dağılımına göre göre anlamlı olarak daha yüksek olduğu saptandı (Tablo 4.10).

Tablo 4-10:GPxI Pro198Leu polimorfizmi genotiplerinin sigara kullanımı ile ilişkisi

		Kontrol n (%)	**Hasta n (%)**	**OR**	**P**
Sigara kullanmayan	Pro/Pro	34(48.6)	17(33.3)	1.00*	
	Pro/Leu+Leu/Leu	36(51.4)	35(67.3)	1.94(0.92-4.09)	0.079
Sigara kullanan	Pro/Pro	19(65.5)	10(34.5)	1.00*	
	Pro/Leu+Leu/Leu	33(38.4)	53(61.6)	3.05(1.26-7.36)	0.011

c) Kontrol grubu kendi içinde incelendiğinde, Leu/Leu genotipi ve/veya Leu alleline sahip olanların GPx aktivitesinin Pro/Pro genotipine sahip olanlara göre anlamlı olarak azaldığı bulundu. Prostat kanserli hasta grubu kendi içinde incelendiğinde ise Leu/Leu genotipi ve/veya Leu alleline sahip olanların GPx aktivitesinin, Pro/Pro genotipine sahip olanlara göre anlamlı olarak azaldığı saptandı. Ayrıca, Leu/Leu genotipine sahip olan prostat kanserli hastaların GPx aktivitesi Pro alleline sahip olanlara göre azalma gösterdi (Tablo 4.11).

Tablo 4-11:GPxI Pro198Leu polimorfizmi genotiplerinin GPx aktivitesi ile ilişkisi

	GPx aktivitesi (U/L)			
	Kontrol	**n (%)**	**Hasta**	**n (%)**
Pro/Pro	157.9±34.15	75(48.4)	194.9±35.28	32(23.9)
Pro/Leu	145,5±30.16	60(38.7)	184.8±36.64	62(46.3)
Leu/Leu	137.3±42.55[a]	20(12.9)	168.5±37.48[c]	40(29.9)
Pro/Pro+Pro/Leu	152.43±32.91	135(87.1)	188.19±36.31	94(70.2)
Leu/Leu	137.3±42.55	20(12.9)	168.5±37.48[d]	40(29.9)
Pro/Pro	157.9±34.15	75(48.4)	194.9±35.28	32(23.9)
Pro/Leu+Leu/Leu	143.47±33.58[b]	80(51.6)	178.56±37.63[e]	102(76.2)

[a]p= 0.007 Leu/Leu genotipi Pro/Pro genotipine göre kıyaslandı
[b]p=0.009 Leu alleli Pro/Pro genotipine göre kıyaslandı
[c]p= 0.005 Leu/Leu genotipi Pro/Pro genotipine göre kıyaslandı
[d]p= 0.025 Leu/Leu genotipi Pro alleline göre kıyaslandı
[e]p = 0.039 Leu alleli Pro/Pro genotipine göre kıyaslandı

d) Düşük ve yüksek dereceli tümör açısından incelendiğinde, GPx I Pro198 Leu genotip dağılımında anlamlı bir farklılık bulunmadı (χ^2=1.02; p=0.598) (Tablo 4-12).

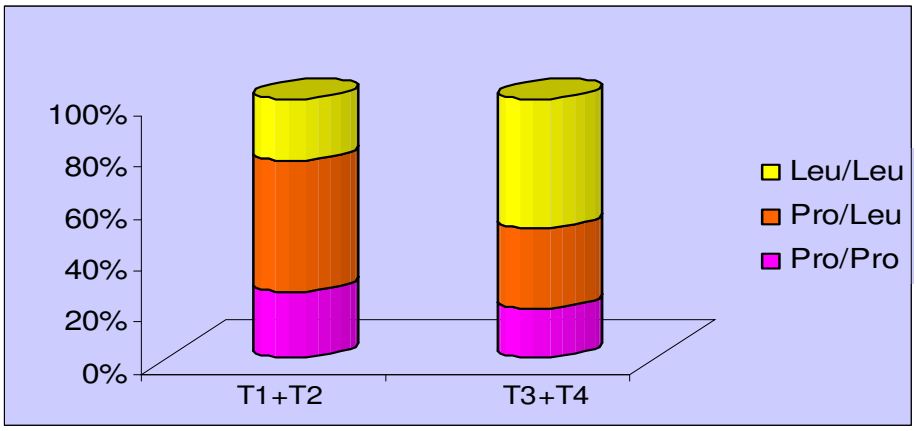
Tablo 4-12: GPxI Pro198Leu genotiplerinin tümörün derecesi ile ilişkisi

	Pro/Pro	**Pro/Leu**	**Leu/Leu**	**p**
	n (%)	**n (%)**	**n (%)**	
Düşük dereceli tümör (Gleason skoru:2-6)	22(68.8)	40(64.5)	23(57.5)	
Yüksek dereceli tümör (Gleason skoru:7-10)	10(31.3)	22(35.5)	17(42.5)	0.598

e) GPxI Pro198 Leu genotiplerinin dağılımı düşük ve yüksek klinik T evresi açısından incelendiğinde, Leu/Leu genotipine sahip prostat kanserli hastaların Pro/Pro genotipine sahip prostat kanserli hastalara göre anlamlı olarak daha ileri evreye sahip oldukları saptandı (χ^2=8.23; p=0.016) (Tablo:4-13; Şekil4-5).

Tablo 4-13: GPxI Pro198Leu genotiplerinin klinik T evresi ile ilişkisi

	Pro/Pro	**Pro/Leu**	**Leu/Leu**	**p**
	n (%)	**n (%)**	**n (%)**	
Düşük evre (T1+T2)	26(81.2)	52(83.9)	24(60.0)	
İleri evre (T3+T4)	6(18.8)	10(16.1)	16(40.0)	0.016



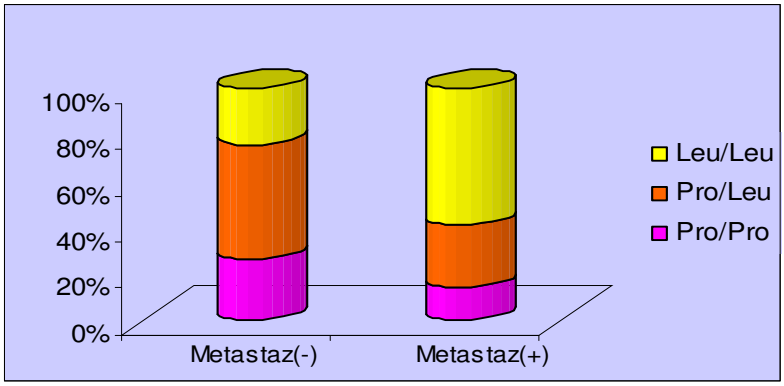
Şekil 4-5:Klinik T evresine göre Pro198Leu genotiplerinin dağılımı

f) İleri klinik T evresine sahip prostat kanserli hastalar içinde GPxI Pro198Leu genotip dağılımı ile kemik metastazı arasındaki ilişki incelendiğinde, Leu/Leu genotipine sahip olan

kişilerin Pro/Pro veya Pro/Leu genotipine sahip olan kişilere göre daha çok kemik metastazına yakalanma riskine sahip olduğu saptandı (χ^2=10.7; p=0.005) (Tablo: 4-14; şekil: 4-6) .

Tablo 4-14: GPxI Pro198Leu genotiplerinin kemik metastazı ile ilişkisi

	Pro/Pro	Pro/Leu	Leu/Leu	p
	n (%)	n (%)	n (%)	
Kemik Metastazı (-)	29(90.6)	56(90.3)	27(67.5)	
Kemik metastazı (+)	3(9.4)	6(9.7)	13(32.5)	0.005



Şekil 4-6: Pro198Leu genotiplerinin kemik metastazı üzerine etkisi

g) GPxI Pro198Leu polimorfizmi, PSA düzeyleri, yaş, BMI ve sigara kullanımı gibi prostat kanserinde rol oynadığı ileri sürülen risk faktörlerinin kemik metastazı, klinik T evresi ve tümörün derecesi üzerine etkisi lojistik regresyon analizi ile incelendi. Lojistik regresyon analizine gore, GPxI Pro198Leu polimorfizminin ve PSA düzeylerinin kemik metastazı ve klinik T evresi üzerinde anlamlı olarak risk taşıdığı halde tümörün derecesi üzerinde etkili olmadığı bulundu (Tablo 4.15).

Tablo 4-15 :GPxI polimorfizminin lojistik regresyon analizi

	OR[a]	95% CI [b]	p
Kemik metastazı			
GPxI polimorfizmi	0.06	0.00-0.77	0.030
PSA (ng/mL)	11.89	2.87-49.1	0.001
Klinik T evresi			
GPxI polimorfizmi	0.06	0.00-0.50	0.009
PSA (ng/mL)	15.91	3.98-63.2	0.000
Tümör derecesi			
GPx I polimorfizmi	0.45	0.12-1.59	0.218
PSA (ng/mL)	2.38	0.96-5.87	0.060

GPxI polimorfizmi (Pro/Pro+Pro/Leu ; Leu/Leu), Sigara (kullanan / kullanmayan), PSA (≤10.0 ; >10.0), yaş (≤63.6 ; >63.6) , BMI: (≤26.5 ;>26.5) alınarak lojistik regresyon analizi yapıldı.

5. TARTIŞMA

Prostat kanseri erkeklerde en sık tanı konan ve kansere bağlı ölümler arasında ikinci sırada yer alan bir kanser türü olarak bilinmektedir (1,36). Yaşın, androjen hormonunun, infeksiyöz ajanların, çevresel ve genetik faktörlerin prostat kanserinin oluşumunda rol oynadığı ileri sürülmektedir (114). Endojen ve eksojen faktörlere maruz kalarak oluşan reaktif oksijen türevlerinin (ROT) indüklediği oksidatif hasarın prostat karsinojenezinde etkili olduğu belirtilmektedir (115). ROT'nin normal düzeylerde iken sinyal iletim yollarının regülasyonu, hücre differansiasyonu, gen transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu gibi bazı önemli fizyolojik proseslerde rol oynadığı öne sürülmektedir (116).Yüksek düzeyde ROT'nin ise DNA'da mutasyona, toksisiteye ve gen ekspresyonunda değişikliklere sebep olduğu belirtilmektedir. ROT'nin indüklediği lipit peroksidasyonla oluşan ürünler (MDA, LOOH) DNA ile etkileşerek proto-onkojen ve tümör süpressör genlerde mutasyonlara yol açabilmektedir (117). Bunun da karsinojenezin başlaması ve gelişiminde rol oynadığı ileri sürülmektedir. Bilindiği gibi ROT oluşumunun en önemli kaynağı hücrede mitokondri fraksiyonu olmaktadır (115). ROT mitokondride mutasyona ve elektron transport zincirinin bozulmasına ve böylece, ROT oluşumunun daha da artmasına yol açabilmektedir. Bu da tümörün başlaması ve gelişmesinde rol oynayan sinyal yollarının aktivasyonuna ve bazı transkripsiyon faktörlerinnin ekspresyonunun artmasına neden olmaktadır. Transkripsiyon faktörlerinin aktiflenmesinin ise metastaz ve anjiojenezde rol oynayan genlerin aktivasyonuna neden olduğu ileri sürülmektedir (118,119).

Diğer yandan, serbest radikallerin oluşturduğu hasar sadece bu radikallerin düzeyine bağlı olmayıp aynı zamanda antioksidan savunma mekanizmalarına da bağlı olmaktadır. Bu oksidan/antioksidan dengenin bozulmasının karsinojenezde etkili olduğu belirtilmektedir.

Yapılan çalışmalarda kanserde oksidatif stresin bir göstergesi olan malondialdehit (MDA) düzeyleri ve enzim aktiviteleri ile ilgili çelişkili sonuçlar bulunmaktadır. Bazı çalışmalarda, prostat kanserinde MDA düzeylerinin değişmediği belirtilmektedir (120,121). Diğer yandan bir çok çalışmada, meme kanserinde (122,123), prostat kanserinde (19,124-126), özafagus kanserinde (127), kolorektal kanserde (128,129), MDA düzeylerinin kontrole göre arttığı ileri sürülmektedir. Bizim de çalışmamızda, plazma MDA düzeylerinin kontrol grubu ile kıyaslandığında anlamlı bir artış gösterdiği bulunmuştur.

Diğer yandan, bazı çalışmalarda GSH düzeylerinde belirgin bir artış olduğu saptanırken (117,123) bazı çalışmalarda, larenks kanserinde (130), servikal kanserde (131), meme kanserinde (122,133,134), prostat kanserinde (124,132,135), GSH düzeylerinde anlamlı bir azalma olduğu gösterilmiştir. Bizim çalışmamızda, prostat kanserli hastalarda total kanda GSH düzeylerinde kontrol grubuna göre anlamlı bir azalma bulunmuştur.

Diğer yandan, Aceto ve ark. prostat kanserli hastaların dokularında GPx enzim aktivitesinin azaldığını belirtmektedirler (136). Bununla birlikte değişik kanser türlerindeki diğer bazı çalışmalarda GPx enzim aktivitelerinde bir değişiklik olmadığı (120,131), bazılarında artış (123,137-140) bazılarında ise azalma (141,142) olduğu belirtilmektedir. Çeşitli kanser türlerinde, SOD aktivitesinin düzeyleri hakkında da çelişkli sonuçlar bulunmaktadır. Bazı çalışmalarda, tümörde SOD aktivitesinin arttığı (120,129,132), bazı çalışmalarda değişmediği, (121) bazılarında ise azaldığı gösterilmektedir (124,143). Satomi ve ark. (144) yaptıkları çalışmada tümördeki SOD aktivitesi artışının evre ve metastaz ile ilişkili olabileceğini belirtmektedirler. Janssen ve ark. (145) MnSOD aktivitesinin özellikle kolorektal kanserin metastazlarında; adenom, karsinom ve normal dokuya göre daha yüksek olduğunu ileri sürmektedirler. Bizim de çalışmamızda, prostat kanserli hastalarda plazma GPx ve SOD aktivitelerinin kontrole göre anlamlı olarak arttığı bulunmuştur.

Sonuçlarımız, prostat kanserinde oksidatif stresin rolü olabileceğini göstermektedir. Ayrıca SOD ve GPx enzim aktivitelerinin oksidatif stresin etkisini azaltmak için indüklenmesinin, GPx ve SOD mRNA ekspresyonlarının artmasına bağlı olduğunu ileri sürebiliriz. Artan GPx aktivitesinin lipooksijenaz ve siklooksijenaz yollarını düzenleyerek karsinojenezde etkili olduğu ileri sürülmektedir (146). Ayrıca bir çok tümörde immun sistemde rol oynayan MHC sınıf I antijen ekspresyonunun azaldığı belirtilmektedir (147). H_2O_2'in ise MHC gen ekspresyonunu aktiflediği ileri sürülmektedir. Buna göre H_2O_2'i detoksifikasyona uğratan GPx aktivitesinin artışı, kanser hücrelerinin sitotoksik T lenfositler tarafından tanınmasını önleyerek tümörijenezde rol oynadığı belirtilmektedir (137). Ayrıca, oksidatif stresin antioksidan enzimlerin ekspresyonunun artışına yol açarak hücreyi oksidatif hasara karşı daha dirençli hale getirdiği ileri sürülmektedir (148).

ROT'ne bağlı oksidatif hasar prostat karsinojenezinde önemli bir faktör olduğuna göre ROT metabolizmasında aktif olan genlerdeki değişiklikleri incelemekte anlamlı olmaktadır. Bu amaçla hem MnSOD Ala-9Val hem de GPxI Pro198Leu gen polimorfizmlerinin prostat kanserinin oluşumu ve gelişimi üzerindeki etkilerini inceledik.

Bilindiği gibi 3 tane SOD izoenzimi (SOD1, SOD2, SOD3) bulunmaktadır. Bu enzimlerin polimorfizmleri içinde MnSOD (SOD2) polimorfizmlerinin kanser riski ile ilişkili olabilecekleri gösterilmiş olmasına rağmen SOD1 ve SOD3 polimorfizmlerinin kanserle ilişkisi bulunamamıştır. En çok çalışılan MnSOD polimorfizmi ise MnSOD Ala9Val tek nükleotid polimorfizmi olmaktadır.

MnSOD, mitokondride $O_2^{\cdot -}$ radikallerinin detoksifikasyonunda rol oynayan en önemli enzim olduğundan, ROT'nin yol açtığı oksidatif hasardan korumada önemli bir rolü bulunmaktadır. Ayrıca, prostat mitokondri bakımından zengin olduğundan MnSOD enzimi prostatta oldukça önemlidir (115). MnSOD proteininin sinyal dizisinin 9. pozisyondaki Ala/Val değişimine neden olan DNA üzerindeki tek baz değişikliğinin (C/T) proteinin yapısında konformasyonel bir değişiklik meydana getirdiği ve proteinin α-heliks yapısının β-kırmalı tabaka yapısına dönüştüğü ileri sürülmektedir. MnSOD proteininin mitokondriyal sinyal dizisindeki bu değişiminin, MnSOD'un mitokondriye taşınmasında rol oynadığı ileri sürülmektedir. MnSOD' un Ala formu mitokondriye kolaylıkla girerken Val formu iç mitokondri zarında kısmen durdurulmaktadır (7-9). Bu bulgulara göre, Val formunun yüksek ROT düzeyleri ile ilişkili olduğu ve kanser riskini arttırdığı ileri sürülebilecekken yapılan çalışmaların büyük bir kısmı bu hipotezin tam tersini ortaya koymaktadır. Birkaç çalışma, Val formunun kanser için bir risk olduğunu gösterse de, yapılan bir çok çalışmada, Ala formunun kanser için risk taşıdığı belirtilmektedir. Bazı çalışmalar ise Ala genotipinin kanser için bir risk faktörü olmadığını ancak bir takım çevresel faktörlerin (sigara, antioksidan alımı, alkol) veya fizyolojik şartların (menapoz, BMI) Ala genotipi ile kanser arasında bir ilişki oluşturduğunu ileri sürmektedirler.

Yapılan çalışmalarda, MnSOD Ala-9Val polimorfizminde genotip dağılımlarının ırklara göre değişiklik gösterdiği belirtilmektedir. Buna göre Val/Val genotipinin bazı ülkelerde (ABD,Türkiye) daha yüksek dağılım gösterdiği belirtilirken (115,149), Ala/Val genotip dağılımının Rus toplumunda daha yüksek olduğu belirtilmektedir (15). Diğer yandan, bir başka çalışmada Ala/Ala genotip dağılımının Japon toplumunda daha yüksek olduğu gösterilmektedir (13). Çalışmamızda ise Türk erkek populasyonunda, MnSOD genotip dağılımında Val/Ala genotip dağılımının daha yüksek olduğu saptanmıştır.

Olson ve ark.(10) Ala allelinin over kanseri oluşumunda bir risk faktörü olduğunu ileri sürmektedirler. Bir başka çalışmada, meme kanserli hastalardan oluşan grupta Ala alleline sahip homozigot ve heterozigot kadınlarda meme kanseri riskinin Val/Val homozigot olanlara

göre 1.5 kat daha fazla olduğu belirtilmektedir (150). Buna karşın, Bergman ve ark. (151) Val/Val ve Ala/Val genotiplerinin meme kanseri için bir risk faktörü olduğunu ileri sürmektedirler. Sigaranın polisiklik aromatik hidrokarbonlar gibi karsinojenler içerdiği ve bunun da direkt olarak DNA'ya etki ederek hasar oluşturduğu belirtilmektedir (93). Sigara kullanımının, MnSOD genotip dağılımı ile kanser olma riski üzerindeki etkisini inceleyen çalışmalarda çelişkili sonuçlar bulunmaktadır. Hung ve ark. (152), yoğun sigara içenler arasında Val/Val genotipinin mesane kanseri riskini arttırdığını öne sürmektedirler. Bazı çalışmalarda ise, sigara kullanımının, MnSOD polimorfizmi ile kanser arasında bir risk oluşturmadığını belirtmektedirler (92,150,153).

Prostat kanseri ile MnSOD polimorfizmi arasındaki ilişkiyi inceleyen az sayıda çalışma bulunmaktadır. Woodson ve ark. (115) homozigot Ala alleline sahip kişilerde prostat kanseri riskinin homozigot Val alleline sahip olanlara göre 70% daha yüksek olduğunu ileri sürmektedirler. Ayrıca Ala/Ala genotipi taşıyan prostat kanserli hastalarda tümörün derecesinin Ala/Val ve Val/Val genotiplerine sahip olanlara göre 3 kat arttığını belirtmektedirler. Bir başka çalışmanın sonuçlarına göre; agressif ve agressif olmayan prostat kanserli hastalar 2 grup halinde incelendiğinde, Ala/Ala genotip dağılımının agressif prostat kanserli hastalarda daha yüksek olduğu ancak istatistiksel açıdan anlamlı olmadığı belirtilmektedir (154). Iguchi ve ark. (155). tarafından 2008 yılında yapılan çalışmada Ala/Ala genotipinin prostat kanseri için bir risk faktörü olduğunu, 2009 yılında yaptıkları diğer çalışmada da (156), sigara kullanımının Ala/Ala genotipine sahip kişilerde prostat kanseri için bir risk oluşturduğunu ileri sürmektedirler. Mikhak ve ark. (157) ise MnSOD polimorfizminin prostat kanseri oluşumunda etkili olmadığını ancak Ala/Ala genotipinin agressif prostat kanseri ile ilişkili olduğunu belirtmektedirler.

Bizim çalışmamızda ise, MnSOD Ala-9Val polimorfizminin prostat kanseri için bir risk faktörü olmadığı ileri sürülmektedir. Ancak, Ala/Ala genotipinin ileri evre ve metastaz oluşumu açısından bir risk taşıdığı belirtilmektedir. Sigara kullanımının, Ala allelini (Val/ala veya Ala/Ala) taşıyanlarda taşımayanlara (Val/Val) göre prostat kanseri için bir risk oluşturmadığı bulunmuştur. Ayrıca lojistik regresyon analizine göre, sigaranın MnSOD genotip dağılımı ile tümörün prognostik faktörleri (evre, derece, metastaz) arasındaki ilişkiyi etkilemediği saptanmıştır.

Bilindiği gibi, GPx enziminin 4 izoenzimi (GPxI, GPx2, GPx3, GPx4) bulunmaktadır. GPxI sitozolik bir enzim olmasına rağmen hem nukleus hem mitokondride aktivite

göstermektedir (15). GPxI enziminin hangi mekanizma ile mitokondriye ve nukleusa taşındığı ise henüz bilinmemektedir.

Yapılan çalışmalarda, MnSOD'un tümör süpressör gen olduğunu ve bu genin fonksiyonunu hücre proliferasyonunu düzenleyerek yaptığını belirtmektedirler (83).

GPxI ekspresyonunun artışı, MnSOD ekspresyonunun artışı ile birlikte olduğu zaman, H_2O_2 veya hidroperoksitlerin önemli ölçüde detoksifikasyonuna bağlı olarak MnSOD'un hücre proliferasyonu üzerindeki baskılayıcı etkisinin azaldığı ileri sürülmektedir (83).

Diğer yandan, son yıllarda yapılan az sayıda çalışmada, GPxI genindeki tek nükleotit polimorfizmi olan Pro198Leu polimorfizminin çeşitli kanser türlerinde önemli bir risk faktörü olduğu belirtilmektedir.

Çeşitli toplumlarda GPxI Pro198Leu genotip dağılımı ve allel sıklığını inceleyen çalışmalarda Pro/Pro genotip dağılımının Japonya, Makedonya, Danimarka gibi ülkelerde daha yüksek olduğu belirtilmektedir (96,97,99,105). Bizim çalışmamızda, Türk erkek popülasyonunda Pro/Pro genotip dağılımının Pro/Leu ve Leu/Leu genotip dağılımlarına göre daha yüksek olduğu saptanmıştır.

Bir iminoasit olan prolin yerine lösin gelmesi GPx enziminin ikincil ve üçüncül konformasyonel yapısının değişmesine, buna bağlı olarak selenyum'un enzime daha yavaş bağlanmasına yol açtığı belirtilmektedir. Bu durumun da, GPx enzim aktivitesinin azalmasına yol açtığı ileri sürülmektedir (23,24)

Bazı çalışmalar Leu/Leu genotipinin kanser için bir risk faktörü olduğunu (21,23,24,99), bazı çalışmalarda ise Leu/Leu genotipinin kanser oluşumunda etkili olmadığını ileri sürmektedirler (94,100-103).

Ravn-Haren ve ark. (99) postmenapoz meme kanserli hasta ve sağlıklı kadın kontrolden oluşan çalışma gruplarında GPxI Pro198Leu polimorfizmini incelemişlerdir.Bu çalışmada homozigot Leu alleline sahip postmenapoz kadınlarda meme kanseri riskinin Leu alleli taşımayanlara göre 1.43 kat daha fazla olduğu, ayrıca, Leu/Leu genotipine sahip olan ve sigara kullananların GPx aktivitesinin Leu/Leu genotipine sahip olan ve sigara kullanmayanlara göre azaldığı öne sürülmektedir. Ratnasinghe ve ark'nın (23) yaptığı çalışmada, sigara kullanımının GPxI polimorfizmi ile akciğer kanseri arasındaki ilişkiyi etkilemediği belirtilmektedir.

Bazı çalışmalarda , Leu/Leu genotipi taşıyanların GPx aktivitesi Pro alleli taşıyanlara göre azalırken (96,98,99); bazı çalışmalarda GPxI genotip dağılımı ile GPx aktivitesi arasında herhangi bir farklılık bulunamamıştır (78,94,104,105).

Ichimura ve ark. (97) Pro/Leu genotipinin , Pro/Pro genotipine kıyasla mesane kanseri riskini 2.5 kat arttırdığını ayrıca, Pro/Leu genotipinin tümörün evresi ile ilişkili olduğunu fakat derecesi ile ilişkili olmadığını ileri sürmektedirler.

Çalışmamızda ise, Leu/Leu genotipinin prostat kanserinin hem oluşumunda hem de gelişiminde bir risk faktörü olarak rol oynadığı belirtilmektedir. Ayrıca, sigara kullanımının Leu alleline sahip kişilerde Pro/Pro genotipine sahip olan kişilere göre prostat kanseri için bir risk oluşturduğu ileri sürülmektedir. Buna karşın lojistik regresyon analizine göre sigara kullanımının GPxI genotip dağılımı ile tümörün prognostik faktörleri arasındaki ilişkiyi değiştirmediği saptanmıştır. Kişiler arasındaki kanser riski farklılığında bazı genetik faktörlerin rolü olduğunu, ayrıca, karsinojenlerin detoksifikasyonunda daha az etkili olan genetik varyantları taşıyanların prostat kanseri olma riskine daha fazla sahip olduklarını ileri sürebiliriz.

Bu çalışmadan elde edilen sonuçlara göre;

1) Prostat kanserli hastalarda plazmada MDA düzeyleri ve antioksidan enzim aktivitelerinin artmasına buna karşın GSH düzeylerinin ise azalmasına bağlı olarak, prostat karsinojenezinde oksidatif stresin önemli rolü olduğunu ileri sürülebiliriz.

2)Türk erkek toplumunda MnSOD Ala-9Val polimorfizminde Val/Ala genotipinin ve GPxI Pro198Leu polimorfizminde Pro/Pro genotip dağılımının daha fazla olduğunu ileri sürülebiliriz.

3)Prostat kanserli hastalarda MnSOD Ala-9Val polimorfizminde;

Prostat kanserli hastalarda Ala/Ala, Ala/Val, Val/Val genotip dağılımlarının kontrol grubundaki kişilere göre farklı olmadığı ve buna göre MnSOD Ala-9 Val polimorfizminin prostat kanserinin oluşumunda bir risk taşımadığı oysa Ala/Ala genotip dağılımının prostat kanserinin gelişiminde ve metastaz oluşumunda bir risk faktörü olduğunu ileri sürülebiliriz.

Sigara kullanımının, Ala allelini taşıyanlarda, taşımayanlara göre prostat kanseri oluşumunda bir risk faktörü olarak rol oynamadığını ileri sürülebiliriz.

4)GPxI Pro198Leu polimorfizminde;

Prostat kanserli hastalarda Leu/Leu genotip dağılımının anlamlı olarak daha yüksek bulunması, GPxI polimorfizminin prostat kanserinin oluşumunda etkili olduğunu aynı zamanda gelişiminde de rol oynadığını ileri sürülebiliriz.

Sigara kullananlar arasında, Leu alleli taşıyanların, taşımayanlara göre (Pro/Pro genotip) prostat kanseri oluşumunda bir risk faktörü olarak rol oynadığını ileri sürülebiliriz.

Sonuç olarak, oksidatif strese bağlı olan MnSOD ve GPxI gibi antioksidan enzimlerin polimorfizmlerinin incelenmesinin gelecekte hastalığın teşhis ve kişiye özgü tedavisi bakımından önemli olduğunu ileri sürebiliriz.

KAYNAKLAR

1- Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics. CA Cancer J Clin. 2007; 57:43-66.

2-Oberley TD. Oxidative damage and cancer. Amer J Pathol. 2002; 160: 403-408.

3-Mates JM, Sanchez-Jimenez F. Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiologic processes. Front Biosci. 1999; 4: 339-345.

4-Helmut S. Oxidative streess: Oxidants and antioxidants. Exp Physiol. 1997; 82: 291- 295.

5-Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. Free Radic Biol Med. 2002; 33:337-349.

6-Kınnula VL, Crapo JD. Superoxide dismutases in malignant cells and human tumors. Free Rad Med. 2007; 36: 718-744.

7-Shimoda-Matsubayashi S, Matsumine H, Kobayashi T, Nakagawa-Hattori Y, Shimizu Y, Mizuno Y. Structural dimorphism in the mitochondrial targeting sequence in the human manganese superoxide dismutase gene. A predictive evidence for conformational change to influence mitochondrial transport and a study of allelic association in Parkinson's disease. Biochem Biophys Res Commun. 1996; 13: 561–565.

8-Sutton A, Khoury H, Prip-Buus C, Cepanec C, Pessayre D, Degoul F. The Ala16Val genetic dimorphism modulates the import of human manganese superoxide dismutase into rat liver mitochondria. Pharmacogenetics. 2003;13: 145-157.

9- Rosenblum JS, Gilula NB, Lerner RA. On signal sequence polymorphisms and diseases of distribution. Proc Natl Acad. Sci USA. 1996; 93: 4471-4473.

10-Olson SH, Carlson M D, Ostrer H, Harlap S, Stone A, Winters M, Ambrosone CB. Genetic variants in SOD2 MPO, and risk of ovarian cancer. Gynecol Oncol. 2004; 93: 615-620;

11-Ambrosone CB, Freudenheim JL, Thompson P, Bowman E, Vena JE, Marshall JR., Graham S, Laughlin R, Nemoto T, Shields PG. Manganese superoxide dismutase (MnSOD) genetic polymorphisms, dietary antioxidants, and risk of breast cancer. Cancer Res. 1999; 59: 602-606.

12- Fong CS, Wu RM, Shieh JC, Fu YP, Kuao CL, Cheng CW. Pesticide exposure on southwestern Taiwanese with MnSOD and NQO1 polymorphisms is associated with increased risk of Parkinson's disease. Clin Chim Acta. 2007; 378: 136–141.

13-Li H, Kantoff PW, Giovannucci E, Leitzmann MF, Gaziano JM, Stampfer MJ. Manganese superoxide dismutase polymorphism, prediagnostic antioxidant status, and risk of clinical significant prostate cancer. Cancer Res. 2005; 6:2498-504.

14-Stoehlmacher J, Ingles SA, Park DJ, Zhang W, Lenz HJ. The -9Ala/-9Val polymorphism in sequence of the manganese superoxide dismutase gene (MnSOD) is associated with age among hispanics with colorectal carcinoma. Oncol Res. 2002; 9: 235-238.

15-Chityakov DA, Savostanov KV, Zotova EV, Nosikov VV. Polymorphisms in the Mn-SOD and EC-SOD genes and their relationship to diabetic neuropathy in type 1 diabetes mellitus. BMC Med Genet. 2003; 2:122-125.

16-Wang LI, Miller DP, Sai Y, Liu G, Su L, Wain JC, Lynch TJ, Christiani DC. Manganese superoxide dismutase alanine-to-valine polymorphism at codon 16 and lung cancer risk. J Natl Cancer Inst. 2001; 93:1818-1821.

17-Valenti L, Conte D, Piperno A, Dongiovanni P, Fracanzani AL, Fraquelli M, Vergani A, Gianni C, Carmagnola L, Fargion S. The mitochondrial superoxide dismurase A16V polymorphism in the cardiomyopathy associated with hereditary haemochromatosis. J Med Genet. 2004; 41: 946-950.

18-Durak I, Bayram F, Kavutcu M, Canpolat O, Ozturk HS. Impaired enzymatic antioxidant dafense mechanism in cancerous human thyroid tissues. J Endocrinol. Invest. 1996; 19:312-315.

19-Yılmaz MI, Sağlam K, Sonmez A, Gök DE, Basal S, Kılıç S, Akay C, Koçar IH.. Antioxidant system activation in prostate cancer. Biol Trace Element Res. 2004; 98:13-20.

20-Seven A, Civelek S, Inci F, Korkut N, Burcak G. Evaluation of oxidative stress parameters in blood of patients with laryngeal carcinoma. Clin Biochem. 1999; 32: 369-373.

21- Moscow JA, Schmidt L, Ingram DT, Gnarra J, Johnson B and Cowan KW. Loss of heterozygosity of the human cytosolic glutathione peroxidase I gene in lung cancer. Carcinogenesis. 1994; 15: 2769-2773.

22- Xin GL, Cheng WH, McClung JP. Metabolic Regulation and Function of Glutathione Peroxidase-1. Annu Rev Nutr. 2007; 27:41–61.

23-Ratnasinghe, D, Tangrea J.A, Andersen MR, Barrett Mj, Virtamo J, Taylor PR, Albanes D. Glutathione peroxidase codon 198 polymorhism variant increases lung cancer risk. Cancer Res. 2000; 60:6381-6383.

24-Hu Y, Benya RV, Carroll RE, Diamond AL. Allelic loss of the gene for the GPX1 selenium-containing protein is a common event in cancer. International conference on diet, nutrition, and cancer. J Nutr. 2005; 135:3021-3024.

25-Vogel U, Olsen A, Wallin H, Overvad K, Tiqnneland A, Nexo BA. No associations between GPx pro198Leu and risk of basal cell carcinoma. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2004; 13. 1412-1413.

26- Cox DG, Tamimi RM, Hunter DJ. Gene x Gene interaction between MnSOD and GPX-1 and breast cancer risk: a nested case-control study. BMC Cancer. 2006 31; 6: 217-129.

27-Başaklar C. Ürogenital sistem. Langman's Medikal Embriyoloji. Ankara, Palme Yayıncılık;1993; 246-282.

28-McNeal JE. Prostate. In: Stenberg SS (ed.). Histology for Pathologists. 2nd Ed. Philadelphia, Lippincott-Raven Publishers. 1997; 997-1018.

29- Dikson JS, Gosling JA. Macro-anatomy of the prostate. In: Kirby R, McConnell J, Fitzpatrick J, Roehrborn C, Boyle P (eds). Textbook of Benign Prostatic Hyperplasia. Oxford. Synthelabo.1996; 4: 1-10.

30-McNeal JE. The zonal anatomy of the prostate. Prostate 1981; 2: 35-49.

31-Brooks JD. Anatomy of the lower urinary tract and male genitalia. In PC Walsh et al. (eds). Campbell's Urology, 8th Ed 2002; 1:41-80

32-Stephenson RA, Smart CR, Mineau GP. The fall in incidence of prostate carcinoma Cancer 1995; 77: 1342-1348.

33-Reiter RE, De Kernion JB. Epidemiology, etiology, and prevention of prostate cancer. In PC Walsh et al. (Eds). Campbell's Urology, 8th Ed 2002; 4:3003-3024.

34-Stephenson RA, Smart CR, Mineau GP. The fall in incidence of prostate carcinoma Cancer 1995; 77: 1342-1348.

35-Ross RK, Bernstain L, Lobo RA et aL. 5 alpha-reductase activity and risk of prostate cancer among Japanese and US white and black males. Lancet 1992; 339: 887-889.

36- Carter BS, Bova S, Beaty TH. Steinberg GD, Childs B, Isaacs WB, Walsh PC. Hereditary prostate cancer: epidemiology and clinical features. J Urol 1993; 150:797 -802.

37-Chan JM, Giovannucci E, Andersson SO, Yuen J, Adami HO, Wolk A. Dairy products, calcium, phosphorous, vitamin D, and risk of prostate cancer . Cancer Causes Control. 1998; 9: 559.

38-Ross RK, Pike MC, Coetzee GA, Reichardt JK, Yu MC, Feigelson H, Stanczyk FZ, Kolonel LN, Henderson BE. Androgen metabolism and prostate cancer. Establishing a model of genetic susceptibi1ity. Cancer Res. 1998; 58: 4497.

39-Gleason DF. Histologic grading of prostate cancer: A perspective. Hum Pathol 1992; 23: 273-279.

40-Amwar A. Significance of Gleason system for grading and scoring of prostatic carcinoma. Pakistan J Med Res 2004; 43:181-183.

41-Zagars GK. The T Classification of Clinically Localized Prostate Cancer. Cancer 1994; 73: 1904-1912.

42-Cooner WH, Mosley BR, Rutherford CL. Prostate cancer deteetion in a clinical urologic practice by u1trasonography, digital rectal examination and prostate spesific antigen J Urol. 1990; 143: 1146-1154.

43-Lilja H. Structure, function, and regulation of the enzyme activity of prostate specific antigen. World J Urol. 1993; 11: 188-191.

44-Bjork T, Abrahamsson PA, Lilja A. Rates of clearance of free and complexed forms of PSA in serum after radical prostatectomy and transurethral microwave therapy. J Urol. 1995; 153: 295-299.

45-Partin AW, Oesterling JE. The clinical usefulness of prostate specific antigen update. J Urol. 1994; 152: 1358-1368.

46-Herschman JD, Smith DS, Catalona WJ.. Effect of ejaculation on serum total and free prostate specific antigen concentrations. Urology.1997; 50: 239-243.

47-Catalona WJ, Smith DS, Ornstein DK. Prostate cancer detection in men with serum PSA concentrations of 2,6 to 4,0 ng/ml and benign prostate examination. Enhancement of spesificity with free PSA measurements.1997; JAMA 277: 1452-1455.

48-Morgan TO, Jacobsen SJ, McCarthy WF, Jacobson DJ, McLeod DG, Moul JW. Age-specific reference ranges for prostate-specific antigen in black men. New Engl J Med.1996; 5: 304-310.

49-Moul JW, Sesterhenn IA, Connelly RR, Douglas T, Srivastava S, Mostofi FK, McLeod DG. Prostatespecific antigen values at the time of prostate cancer diagnosis in African-American men. JAMA.1995; 274: 1277.

50-Catalona WJ, Richie JP, Kernion JB, Ahmann FR, Ratliff TL, Dalkin BL, Kavoussi LR, MacFarlane MT, Southwick PC. Comparison of prostate specific antigen concentration versus prostate specific antigen density in the early detection of prostate cancer: receiver operating characteristic curves. J Urol. 1994; 152: 2031.

51-Carter HB, Pearson JD.: Prostate-specific antigen velocity and repeated measures of prostate-specific antigen. Urol Clin North Am. 1997; 24: 333.

52-Catalona WJ, Partin AW, Slawin KM, Brawer MK, Flanigan RC, Patel A, Richie JP, deKernion JB, Walsh PC, Scardino PT, Lange PH, Subong EN, Parson RE, Gasior GH, Loveland KG, Southwick PC. A multicenter clinical trial evaluation of free PSA in the differentiation of prostate cancer from benign disease. J Urol 1997; 157:434- 464.

53-Choyke PL. Imaging of prostate cancer. Abdom Imaging 1995; 20:505-515.

54-Hodge KK, McNeal JE, Terris MK Stamey TA. Random systematic versus directed ultrasound guided transrectal core biopsies of the prostate. J Urol 1989; 142: 71-74.

55-Terris MK, Freiha FS, McNeal JE Stamey TA. Efficacy of transrectal ultrasound for identification of clinically undetected prostate cancer. J Urol 1991; 146: 78-83.

56-Aruoma O, Kaur H, Halliwell B. Oxygen free radicals and human diseases. J R Soc Health. 1991; 11: 172-177.

57-Kehrer JP, Smith CV. Free radicals in biology: Sources, reactivities, and roles in the etiology of human diseases. In: frei (ed). Natural Antioxidants in Human Health and Disease. Academic press, San Diego. 1994: 25-62.

58-Halliwell B, Gutteridge JMC. Free Radical in Biology and medicine. Oxford Sci Publ, Oxford. 1999.

59-Nakazawa H, Genka C, Fujishima M. Pathological aspects of active oxygens/ free radicals. Jpn J Physiol. 1996; 46: 15-32.

60-Uysal M. Serbest radikaller, lipit peroksitleri ve organizmada prooksidan-antioksidan dengeyi etkileyen koşullar. Klinik gelişim. 1998; 11: 336-341

61-Yalçın AS. Antioksidanlar. Klinik gelişim. 1998; 11: 342-346.

62-Yu BP. Cellular defences againts damage from reactive oxygen species. Physiol Rev 1994; 74: 139-162.

63-Southorn PA. Free radicals in medicine. II. Involvement in human disease. Mayo Clin Proc 1988; 63: 390-408.

64-Uysal M. Serbest radikaller ve oksidatif stres. Biyokimya, Editörler F. Gürdöl ve E. Ademoğlu. Biyokimya, Nobel Tıp Kitabenleri, İstanbul. 2006, s. 829-835.

65- Akkuş İ: Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. 1995; 5:1-3.

66- Halliwell B. Oxidative stress and cancer: have we moved forward? Biochem J 2007; 401: 1-11.

67-Ohkawa H., Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Anal Biochem. 1979; 95, 351-358.

68-Marnett LJ. Lipid peroxidation – DNA damage by malondialdehyde. Mut Res Fund Mol Mech Mutagen 1999; 424: 83-95

69-Burdon RH, Gill V, Rice Evans C. Oxidative stress and tumor cell proliferation. Free Radic Res Commun 1990;11:65-76.

70-Burdon RH, Gill V,Rice-Evans C. Cell proliferation and oxidative stress. Free Radic Res Commun 1989;6:345-358.

71-Goldstein BD,Czerniecki B,Witz G. The role of free radicals in tumor promotion. Environ Health Perspect 1986; 81: 55-57.

72-Dizdaroglu M. Chemical determination of free radical-induced damage to DNA.Free Radic Biol Med.1991; 10: 225-242.

73- Huang RP, Peng A, Hossain MZ, Fan Y, Jagdale A, Boynton AL Tumor promotion by hydrogen peroxide in rat liver epithelial cells. Carcinogenesis. 1999; 20: 485-492.

74-Bensaad K, Vousden KH. Savior and slayer: the two faces of p53. Nat Med 2005; 11: 1278-1279.

75-Olinski R, Gackowski D, Rozalski R, Foksinski M, Bialkowski K. Oxidative DNA damage in cancer patients: a cause or a consequence of the disease development? Mutat Res. 2003; 531:177-190.

76-Hensley K, Robinson KA, Gabbita SP, Salsman S, Floyd RA. Reactive oxygen species, cell signaling and cell injury. Free Rad Biol Med. 2000; 28: 1456-1462.

77-Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. Chem Biol Inter 2006; 160: 1-40.

78-Jablonska E, Gromadzinska J, Reszka E, Wasowicz W, Sobala W, Szeszenia DN, Boffetta P. Association between GPxI pro198Leu polymorphism, GPxI activity and plasma selenium concentration in humans. Eur J Nutr. 2099; 48; 383-386.

79-Weisiger RA, Fridovich I. Mitochondrial superoxide dismutase. Site of synthesis and intramitochondrial localization. J Biol Chem.. 1973; 248: 4793-4796.

80-Wispe JR, Clark JC, Burhans MS, Kropp KE, Korfhagen TR, Whitsett JA. Synthesis and processing of the precursor for human mangano-superoxide dismutase. Biochim Biophys Acta. 1989; 994: 30-36.

81-Nelson DL, Cox MM. Protein metabolism In: Lehninger principles of biochemistry. 4th ed. New York, W.H. Freeman and company. Madison, Winconsin University .

82- Li JJ, Oberley LW, St Clair DK, Ridnour LA, Oberley TD. Phenotypic changes induced in human breast cancer cells by overexpression of manganese-containing superoxide dismutase. Oncogene. 1995; 10: 1989-2000.

83 Oberley LW. Mechanism of the tumor suppressive effect of MnSOD overexpression. Biomed Pharmacother. 2005; 59; 143-148.

84-Başaran N. Tıbbi Genetik Ders Kitabı, 7. Baskı. Güneş ve Nobel Tıp Kitabevleri, Bursa 1999; 10-12.

85-Weaver R, Hedrick P. Mendelian Genetics. In: Genetics, W.C. Brown Publishers 1989; 14-18.

86-Meyer UA. Molecular mechanisms of genetic polymorphisms of drug metabolism. Annu Rev Pharmocol Toxicol. 1997; 37: 269-296.

87-Lewin B. Restriction sites can be used as genetic markers. In: Genes IV, Oxford University Press USA 1994; 134-142.

88-Church SL, Grant JW, Meese EU, Trent JM. Sublocalization of the gene encoding manganese superoxide dismutase (MnSOD/SOD2) to 6q25 by fluorescence in situ hybridization and somatic cell hybrid mapping. Genomics. 1992; 14: 823-825.

89-Borgstahl GE, Parge HE, Hickey MJ, Johnson MJ, Boissinot M, Hallewell RA, Lepock JR, Cabelli DE, Tainer JA. Human mitochondrial manganese superoxide dismutase polymorphic variant Ile58Thr reduces activity by destabilizing the tetrameric interface. Biochemistry. 1996;35:4287-4297.

90-St Clair D. Manganase superoxide dismutase:genetic variation and regulation. J Nutr.2004; 134: 3190-3191.

91-Ambrosone CB, Ahn J, Singh KK, Rezaishiraz H, Furberg H, Sweeney C, Coles B, Trovato A. Polymorphisms in genes related to oxidative stress (MPO, MnSOD, CAT) and survival after treatment for breast cancer. Cancer Res. 2005; 65: 1105-1111.

92-Millikan RC, Player J, Cotret AR, Moorman P, Pittman G, Vannappagari V, Tse CK, Keku T. Manganese superoxide dismutase Ala-9Val polymorphism and risk of breast cancer in a population-based case-control study of African Americans and whites. Breast Cancer Res. 2004; 6:264-274.

93- Bag A, Bag N. Target sequence polymorphism of human manganese superoxide dismutase gene and its association with cancer risk: a review. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2008; 17: 3298-3305.

94-Forsberg L, De Faire U, Marklund SL, Andersson PM, Stegmayr B, Morgenstern R. Phenotype determination of a common Pro-Leu polymorphism in human glutathione peroxidase 1.Blood Cells Mol Dis. 2000 ;26:423-426.

95-Lei XG, Cheng WH, McClung JP. Metabolic Regulation and Function of Glutathione Peroxidase-1. Annu. Rev. Nutr. 2007; 27: 41–61.

96-Hamanishi T, Furuta H, Kato H, Doi H, Tamai M, Shimomura H, Sakagashira S, Nishi M, Sasaki H, Sanke T, Nanjo K. Functional Variants in the Glutathione Peroxidase-1 (GPx-1) Gene Are Associated With Increased Intima-Media Thickness of Carotid Arteries and Risk of Macrovascular Diseases in Japanese Type 2 Diabetic Patients. Diabetes. 2004; 43: 2455-2460.

97-Ichimura Y, Habuchi T, Tsuchiya N, Wang L, Oyama C Sato K, Nishiyama H, Ogawa O, Kato T. Increased risk of bladder cancer associated with a glutathione peroxidase 1 codon 198 variant. J Urol. 2004; 172: 728–732.

98-Hu YJ, Diamond AM. Role of glutathione peroxidase 1 in breast cancer: loss of heterozygosity and allelic differences in the response to selenium. Cancer Res. 2003; 63: 3347–3351

99-Ravn-Haren G, Olsen A, Tjonneland A, Dragsted LO, Nexo BA, Wallin H, Overvad K, Raaschou-Nielsen O, Vogel U. Associations between GPX1 Pro198Leu polymorphism, erythrocyte GPX activity, alcohol consumption and breast cancer risk in a prospective cohort study. Carcinogenesis. 2006; 27: 820–825.

100-Cebrian A, Pharoah PD, Ahmed S, Smith PL, Luccarini C, Luben R, Redman K, Munday H, Easton DF, Dunning AM, Ponder BA. Tagging singlenucleotide polymorphisms in antioxidant defense enzymes and susceptibility to breast cancer. Cancer Res. 2006; 66: 1225–1233.

101-Nemoto M, Nishimura R, Sasaki T, Hiki Y, Miyashita Y, Nishioka M, Fujimoto K, Sakuma T, Ohashi T, Fukuda K, Eto Y, Tajima N. Genetic association of glutathione peroxidase-1 with coronary artery calcification in type 2 diabetes: a case control study with multi-slice computed tomography.Cardiovasc Diabetol. 2007; 6: 23.

102-Knight JA, Onay UV, Wells S, Li H, Shi EOJ, Andrulis IA, Ozçelik H. Genetic Variants of *GPX1* and *SOD2* and Breast Cancer Risk at the Ontario Site of the Breast Cancer Family Registry. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2004; 13: 146–149.

103-Ahn J, Gammon MD, Santella RM, Gaudet MM, Britton JA, Teitelbaum SL, Terry MB, Neugut AI, Ambrosone CB.. No association between glutathione peroxidase Pro198Leu polymorphism and breast cancer risk. Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 2005; 14: 2459–2461.

104-Hansen R, Saebo M, Skjelbred CF, Nexo BA, Hagen PC, Bock G. Lothe B, Johnson E, Aase S, Hansteen I GPX Pro198Leu and OGG1 Ser326-Cys polymorphisms and risk of development of colorectal adenomas and colorectal cancer. Cancer Lett .2005; 229:85–91.

105-Arsova-Sarafinovska Z, Matevska N, Eken A, Petrovski D, Banev S, Dzikova S, Georgiev V, Sikole A, Erdem O, Sayal A, Aydin A, Dimovski AJ. Glutathione peroxidase 1 (GPX1) genetic polymorphism, erythrocyte GPX activity, and prostate cancer risk. Int Urol Nephrol. 2009; 41:63-70.

106-Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Res 1988; 1216:1215.

107-Erlich, H.A. PCR technology, molecular biology and biotechnology. Robert A. Meyers. (Eds) VCH publishers USA, 641-648.

108-Sutton AS, Nahon P, Pessayre D, Ryfat P, Poire A, Ziol M. Et al. Genetic polymorphisms in antioxidant enzymes modulate hepatic ıron accumulation and hepatocellular carcinoma development in patients with alcohol-ınduced cirrhosis. Cancer Res. 2006; 66: 2844-2852.

109-Akyol Ö, Canatan H, Yılmaz HR, Yüce H, Özyurt H, Soğut S, Gulec M, Elyas H. PCR/RFLP-based cost-effective identification of SOD2 signal sequence polymorphism (Ala-9Val) using NgoM IV: a detailed methodological approach. Clin Chim Acta. 2004; 345: 151-159.

110-Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. Methods Enzymol 1978; 52:302-310.

111-Sedlak J, Lindsay R. Estimation of total, protein–bound and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. Anal Biochem 1968; 25:192-205.

112-Mylorie AA, Collins H, Umbles C, Kyle J. Erythrocyte superoxide dismutase activity and other parameters of copper status in rats ingesting lead acetate. Toxicol Appl Pharmacol. 1986; 82: 512-520.

113-Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterisation of erythrocyte glutathione peroxidase. J Lab .Clin Med. 1967; 70: 158-169.

114- Ripple MO, Henry WF, Schwarze SR, Wilding G, Weindruch R. Effect of Antioxidants on Androgen-Induced AP-1 and NF-kB DNA-Binding Activity in Prostate Carcinoma Cells. Natl Cancer Inst. 1999; 91, 1227-1232.

115- Woodson K, Tangrea JA, Lehman TA, Modali R, Taylor KM, Snyder K, Taylor PR, Virtamo J, Albanes D. Manganese superoxide dismutase (MnSOD) polymorphism, alpha-tocopherol supplementation and prostate cancer risk in the alpha-tocopherol, beta-carotene cancer prevention study (Finland). Cancer Causes Control. 2003; 14: 513–518.

116-Apel K, Hirt H. Reactive oxygen species, metabolism, oxidative stress, and signal transduction. Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol. 2004; 55: 373-399.

117- Kumaraguruparan R. Kabalimoorthy S, Nagini S. Correlation of tissue lipid peroxidation and antioxidants with clinical stage and menopausal status in patients with adenocarcinoma of the breast. Clin Biochem. 2005; 38:154-158.

118-Dakubo GD, Parr RL, Costello LC, Franklin RB, Thayer RE. Altered metabolism and mitochondrial genome in prostate cancer. J Clin Pathol. 2010;22;10-16.

119-Koul S, Maroni P, Koul HK. Oxidative stres in prostate cancer. Cancer Lett. 2009. 282; 125-136.

120-Rao AV, Fleshner N, Agarwal S. Serum and tissue lycopene and biomarkers of oxidation in prostate cancer patients: a case-control study. Nutr Cancer. 1999; 33: 159-164.

121-Doğru-Abbasoğlu S, Aykaç-Toker G, Koçak T, Unlüer E, Uysal M. Antioxidant enzyme activities and lipid peroxides in the plasma of patients with benign prostatic hyperplasia or prostate cancer are not predictive. J Cancer Res Clin Oncol. 1999; 125: 40.

122-Yeh CC, Hou MF, Tsai SM, Lin SK, Hsiao JK, Huang JC, Wang LH, Wu SH, Hou LA, Ma H, Tsai LY. Superoxide anion radical, lipid peroxides and antioxidant status in the blood of patients with breast cancer. Clin Chim Acta. 2005; 361: 104-111.

123-Kumaraguruparan R, Subapriya R, Viswanathan P, Nagini S. Tissue lipid peroxidation and antioxidant status in patients with adenocarcinoma of the breast. Clin Chim Acta. 2002; 325: 165- 170.

124-Iynem AH, Alademir AZ, Obek C, Kural AR, Konukoğlu D, Akçay T. The effect of prostate cancer and antiandrogenic therapy on lipid peroxidation and antioxidant systems Int Urol Nephrol. 2004; 36: 57-62.

125-Aydin A, Arsova-Sarafinovska Z, Sayal A, Eken A, Erdem O, Erten K, Ozgök Y, Dimovski A. Oxidative stress and antioxidant status in non-metastatic prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. Clin Biochem. 2006;39: 176-179.

126-Biri H, Oztürk HS, Kaçmaz M, Karaca K, Tokuçoğlu H, Durak I. Activities of DNA turnover and free radical metabolizing enzymes in cancerous human prostate tissue. Cancer Invest. 1999; 17: 314-319.

127-Dursun H, Bilici M, Uyanik A, Okcu N, Akyüz M. Antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation levels in erythrocytes of patients with oesophageal and gastric cancer. J Int Med Res. 2006; 34: 193-199.

128-Ozdemirler G, Pabuccuoğlu H, Bulut T, Buğra D, uysal M, Toker G. Increased lipid peroxide levels and antioxidant system in coloractal cancer. J Cancer Res. Clin Oncol. 1998; 124: 555-559.

129-Skrzydiewska E, Stankiewicz A, Sulkowaska M, Sulkowski S, Kasacka I. Antioxidant status and lipid peroxidation in colorectal cancer. J Toxicol Environ Health A. 2001: 64; 213-222.

130-İnci E, Civelek S, Seven A et al. Larygneal cancer: In relation to oxidative stres. Tohoku J Exp. Med. 2003; 200; 17-23.

131-Ahmed MI, Fayed ST, Hossein H, Tash FM. Lipid peroxidation and antioxidant status in human cervical carcinoma. Dis markers . 1999; 15: 283-291.

132-Surapaneni KM, Venkata GR. Lipid peroxidation and antioxidant status in patiants with carcinoma of prostate. Indian J Physiol Pharmacol . 2006; 50: 350-354.

133-Kumaraguruparan R, Subapriya R, Viswanathan Nagini S. Antioxidant profile in the circulation of patients with fibroadenoma and adenocarcinoma of the breast. Clin Biochem. 2002; 35: 275-279.

134-Akinloye O, Adaramoye O, Karem O. Changes in antioxidant status and lipid peroxidation in nigerian patients with prostate carcinoma. Pol Arch Med Wewn. 2009. 2009;119: 526-531.

135-Beutler E, Gelbart T. Plasma glutathione in health and in patients with malignant disease. J Lab Clin Med. 1985; 105; 581-584.

136-Aceto A, Di Ilio C, Angelucci S, Tenaglia R, Zezza A,Caccuri AM, Federici G. Glutathione-related enzyme activities in testis of patients with malignant diseases. ClinChim Acta 1989; 183: 83-86.

137-Lu YP, Lou YR, Yen P, Newmark HL, Mirochnitchenko OI, Inouye M, Huang MT Enhanced skin carcinogenesis in transgenic mice with high expression of glutathione peroxidase or both glutathione peroxidase and superoxide dismutase. Cancer Res. 1997; 57: 1468-1474.

138-Zachara B, Maclağ A, Marchaluk E, Nowicki A. Selenium, glutathione and glutathione peroxidase in blood and tissues of breast cancer patients. In:Anke M, Meissner D, Mills CF, (Eds). Trace Elements in Man and Animals. New York: TEMA Verlag. 1993; 789-793.

139-Singh SV, Brunnert SR, Roberts B, Krishan A. Differential expression of glutathione S-transferase, glutathione peroxidase and glutathione reductase in normal and malignant human breast tissues. Cancer Lett.1990; 51: 43-48.

140-Howie AF, Forrester LM, Glancey MJ, Schlager JJ, Powis G,Beckett GJ, Hayes JD, Wolf CR. Glutathione S-transferase and glutathione peroxidase expression in normal andtumour human tissues. Carcinogenesis. 1990; 11: 451-458

141-Arsova-Sarafinovska Z, Eken A, Matevska N, Erdem O, Sayal A, Savaser A, Banev S, Petrovski D, Dzikova S, Georgiev V, Sikole A, Ozgök Y, Suturkova L, Dimovski AJ, Aydin A. Increased oxidative/nitrosative stress and decreased antioxidant enzyme activities in prostate cancer. Clin Biochem. 2009.42:1228-12235.

142-Zachara BA, Szewczyk-Golec K, Tyloch J, Wolski Z, Szylberg T, Stepien S, Kwiatkowski S, Bloch-Boguslawska E, Wasowicz W.Blood and tissue selenium concentrations and glutathione peroxidase activities in patients with prostate cancer and benign prostate hyperplasia. Neoplasma. 2005; 52:248-254.

143-Oberley TD, Zhong W, Szweda LI, Oberley LW. Localization of antioxidant enzymes and oxidative damage products in normal and malignant prostate epithelium Prostate. 2000; 44:144-155.

144-Satomi A, Murakami S, Hashimoto T, Ishida K, Matsuki M, Sonoda M. Significance of superoxide dismutase (SOD) in human colorectal cancer tissue:correlation with malignant intensity. J Gastroenterol. 1995 ; 30:177-182.

145-Janssen AM, Bosman CM, Kruidenier L . Superoxide dismutases in the human colorectal cancer sequence.J Cancer Res Clin Oncol. 1999;125:327-335.

146-Bryant RW, Simon TC, Bailey JM. Role of glutathione peroxidase and monophosphate shunt in platelet lipoxygenase pathway. J Biol Chem. 1982; 257: 14937-14943.

147-Moller P, Hammerling G. The role of surface HLA-A,B,C molecules in tumuor immunity. Cancer Surv.1993; 13;101-127.

148-Raynesssh CP, Manimaran A, Sasikala KR, Adaikappan P. Lipid peroxidation and antioxidant status in patients with breast cancer. Singapore Med J. 2008; 49: 640-643.

149- Dalan AB, Ergen A, Yılmaz H, Karateke A2 Işbır T. Manganese superoxide dismutase gene polymorphism, MnSOD plasma levels and risk of epithelial ovarian cancer.J. Obstet Gynaecol Res.2008; 34: 878–884.

150- Mitrunen K, Sillanpaa P, Kataja V , Eskelinen M, Komsa VM', Benhamou S, Uusitupa S and Hirvonen A. Association between manganese superoxide dismutase (MnSOD) gene polymorphism and breast cancer risk. Carcinogenesis. 2001; 22: 827-829.

151- Bergman M, Ahnström M, Palmebäck Wegman P, Wingren S. Polymorphism in the manganese superoxide dismutase (MnSOD) gene and risk of breast cancer in young women. J Cancer Res Clin Oncol. 2005;13: 439-444.

152-Hung RJ, Boffetta P, Brennan P, Malaveille C, Gelatti U, Placidi D, Carta A, Hautefeuille A, Porru S Genetic polymorphisms of MPO, COMT, MnSOD, NQO1, interactions with environmental exposures and bladder cancer risk. Carcinogenesis. 2004; 25: 973–978.

153-Tamimi RM, Hankinson SE, Spiegelman D, Colditz GA, Hunter DJ. Manganese superoxide dismutase polymorphism, plasma antioxidants, cigarette smoking, and risk of breast cancer. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2004; 13: 989-996.

154- Ergen HA, Narter F, Timirci O, Isbir T. Effects of manganase superoxide dismutase Ala-9Val polymorphism on prostate cancer: a case-control study. Anticancer Res. 2007; 27:1227-1230.

155- Iguchi T, Wang CY, Delongchamps NB, Sunheimer R, Nakatani T, de la Roza G, Haas GP Association of prostate cancer and manganese superoxide dismutase AA genotype influenced by presence of occult cancer in control group.Urology. 2008; 72: 238-241.

156- Iguchi T, Sugita S, Wang CY, Newman NB, Nakatani T, Haas GP. MnSOD genotype and prostate cancer risk as a function of NAT genotype and smoking status.In Vivo. 2009; 23: 7-12.

157- Mikhak B, Hunter DJ, Spiegelman D, Platz EA, Wu K, Erdman JW, Giovannucci JE. Manganese superoxide dismutase (MnSOD) gene polymorphism, interactions with carotenoid levels and prostate cancer risk. Carcinogenesis. 2008; 29: 2335-2340.

FORMLAR

GÖNÜLLÜ BİLGİLENDİRME FORMU

Çalışmamızda toplum sağlığını yakından ilgilendiren bir hastalık olan prostat kanserinde genetik olarak hangi kişilerin prostat kanserine daha sıklıkla yakalanma riski olduğunu araştırmak amacıyla bu hastalığın erken teşhisine katkıda bulunabileceğini düşündüğümüz kan testleri yapacağız. Bu klinik araştırma kanser oluşumunu tetikleyen faktörleri ve kanser oluşumunda rol oynayan genetik risk faktörlerini saptamak amacıyla yapılacaktır. Bu amaçla gönüllü hastalardan iki farklı tüpe kan alınarak çeşitli biyokimyasal tetkikler yapılacaktır.Hastalara dışarıdan herhangi bir ilaç veya madde verilmeyeceği için hastalar için hiçbir istenmeyen etki veya risk içermemektedir.

Çalışmamız Türk toplumunda prostat kanseri oluşum oranını etkileyen genetik faktörleri belirleyerek bu hastalığın erken safhada nasıl önlenebileceği sorusuna cevap bulunabilirse bilime katkı sağlayabilecektir.

Çalışma, numunelerin toplanması,belli bir sayıya ulaştıktan sonra tetkiklerin yapılması ve sonuçların değerlendirilmesi gibi aşamalardan oluştuğu için yaklaşık bir(1) yıl sürecektir.Çalışmaya yaklaşık olarak ikiyüz(200) hasta ve 6 tane araştırmacı katılacaktır.

Gönüllü araştırmayı kabul etmeme hakkına sahiptir ve kabul etmemesi durumunda hastalığı ile ilgili tedavisinde hiçbir şekilde aksama olmayacaktır.Gönüllü istediği anda araştırmacıya önceden haber vererek çalışmadan çekilebilir veya araştırmacı tarafından gerek görüldüğünde araştırma dışı bırakılabilir.Gönüllüler araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına girmeyecektir ve ayrıca kendisine de çalışma için bir ödeme yapılmayacaktır.Ayrıca alınacak kanlar sadece bu çalışma için kullanılacak olup hastaların kişisel bilgileri kesinlikle gizli tutulacaktır.

HASTA TAKİP FORMU

Hasta Ad Soyad:

Yaş: **Boy:** **Kilo:**

Siagara: **Alkol:**

Geçirdiği hastalıklar

Kullandığı ilaç:

ETİK KURUL KARARI

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Canan	**Soyadı**	Başaran Küçükgergin
Doğ.Yeri	Çerkezköy	**Doğ.Tar.**	26.09.1973
Uyruğu	T.C	**TC Kim No**	
Email	ckucukgergin@yahoo.com	**Tel**	5325715361

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	**Mez. Yılı**
Doktora	İ.Ü.T.F. Biyokimya A.B.D.	
Yük.Lis.	İ.Ü.T.F. Biyokimya A.B.D.	1998
Lisans	İ.Ü.Fen Fakültesi . Biyoloji Bölümü	1994
Lise	Yeşilköy 50.Yıl lisesi	1990

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	**Kurum**	**Süre (Yıl - Yıl)**
1.	Biyolog	İ.Ü.Tıp Fakültesi	1995-Devam ediyor
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	**Okuduğunu Anlama***	**Konuşma***	**Yazma***	**KPDS/ÜDS Puanı**	**(Diğer) Puanı**
İngilizce	İyi	Orta	İyi	50	

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	**Eşit Ağırlık**	**Sözel**
LES Puanı			
(Diğer) Puanı	60.45	61.18	61.90

Bilgisayar Bilgisi

Program	**Kullanma becerisi**
MS Office	İyi

Yayınları/Tebligleri Sertifikaları/Ödülleri

Uluslararası makale:

1- Seçkin S, Başaran-Küçükgergin C, Uysal. Effect of acute and chronic administration of sodium valproate on lipid peroxidation and antioxidant system in rat liver. M.Pharmacol Toxicol. 1999 ;85(6):294-298.

2- Seçkin S, Doğru-Abbasoğlu S, Başaran-Küçükgergin C, Yavuz E, Cevikbaş U, Aykaç-Toker G, Uysal M. Increased lipid peroxidation in the liver and kidney and their mitochondrial fractions following buthionine sulfoximine induced glutathione depletion in guinea pigs. Res Commun Mol Pathol Pharmacol. 2001;109(5-6):299-308.

3- Doğru-Abbasoğlu S, Başaran-Küçükgergin C, Seçkin S, Oztezcan S, Solakoğlu S, Aykaç-Toker G, Uysal M. Cholesterol plus methionine feeding do not induce lipid peroxidation and atherosclerotic changes in the rat aorta..Int J Vitam Nutr Res. 2002 ;72(2):109-113.

4- Seçkin S, Alsancak S, Başaran-Küçükgergin C, Uysal M. The effect of chronic diazepam administration on lipid peroxidation and Ca2+ -ATPase activity in rat liver. Acta Biol Hung. 2007 ;58(4):441-3

5- Küçükgergin C, Aydın AF, Ozdemirler-Erata G, Mehmetçik G, Koçak-Toker N, Uysal M. Effect of Artichoke Leaf Extract on Hepatic and Cardiac Oxidative Stress in Rats Fed on High Cholesterol Diet..Biol Trace Elem Res. 2009 .

6- Sanli O, Kucukgergin C, Gokpinar M, Tefik T, Nane I, Seckin S. Despite the lack of association between different genotypes and the presence of prostate cancer, endothelial nitric oxide Synthase a/b (eNOS4a/b) polymorphism may be associated with advanced clinical stage and bone metastasis. Urol Oncol. 2009 .

7- Aydin AF, Küçükgergin C, Ozdemirler-Erata G, Koçak-Toker N, Uysal M. The effect of carnosine treatment on prooxidant-antioxidant balance in liver, heart and brain tissues of male aged rats.. Biogerontology. 2010 11(1):103-9.

Seminer:

1-Diabet hastalığında HLA .Biyokimya A.B.D.

1-Prostat Kanserinde MnSOD ve GPx ilişkisi. Biyokimya A.B.D.

2-Bilirubin metabolizması.Biyokimya A.B.D.

3-Spermde DNA hasarı .Biyokimya A.B.D.

Ulusal bildiri:

1- Amasyalı A.S. , Kucukgergin C, Sanli O, Ozcan F, Ozkok E, Aydin M, Gokpinar M[1], Seckin S. Glutathione Peroxidase I Codon 198 (GPX1 Pro198Leu) polimorfizminin mesane kanserli hastalardaki rolü. 20.Ulusal Üroloji Kongresi. 1-6 Kasım 2008.

1- Seçkin Ş , Küçükgergin C, Gökpınar M, Sanlı O , Tevfik C, Özcan F , Özkök E, Aydın M . Prostat kanserinin plazma nitrik oksit düzeyi ve oksidatif stres ile ilişkisi VIII. Ulusal Klinik Biyokimya Kongresi 8-11 Mayıs 2008.

3- Küçükgergin , Sanlı Ö, Amasyalı A.S , Nane İ , Seçkin S. Effects of endothelial nitric oxide synthase intron 4(eNOS4a/b) polymorphism on bladder cancer . III. Internatıonal Congress of Molecular 5-8 Mayıs 2009.

4- Aydın A.F , Küçükgergin C, Özdemirler Erata G , Koçak-Toker N, Uysal M. The effect of carnosine on oxidative stres parameters in different tissues of aged rats. III. Internatıonal Congress of Molecular 5-8 Mayıs 2009..

5- Küçükgergin C , Seçkin Ş, Sanlı Ö, Amasyalı A.S, Özcan F. Mesane kanseri gelişiminde oksidatif stresin etkisi. 21. Ulusal Biyokimya Kongresi. 28-31 Ekim 2009

Sözlü Bildiriler

1-Kucukgergin C. Gokpinar M, Sanli O, Tefik T, Ozcan F, , Ozkok E, Aydin M, Seckin S. Mangan süperoksit dismutaz (MnSOD) (Ala-9Val) ve glutatyon peroksidaz I (GPXI) (Pro198Leu) gen polimorfizmlerinin prostat kanseri ile ilişkisi. 20.Ulusal Üroloji Kongresi. 1-6 Kasım 2008.

2-Küçükgergin C , Gökpınar M , Sanlı Ö , Tevfik C, Özkök E, Aydın M , Özcan F, Seçkin S. Endotelyal Nitrik Oksit Sentaz Gen Polimorfizminin Prostat Kanseri ile İlişkisi. 20.Ulusal Üroloji Kongresi. 1-6 Kasım 2008.

3- Kucukgergin C, Sanli O, Tefik T, Ozcan F, Seckin S, Ozkok E, Aydin M, Gokpinar M. Role of Glutathione Peroxidase 1 codon 198 (GPX1 Pro198Leu) polymorphism in patients with prostate cancer. AUA Congress.17-22 May 2008.

4-Küçükgergin Canan.Sperm DNA Hasarı. 8.Ulusal Androloji Kongresi.02.02.2009.

5-Küçükgergin, Sanlı Ö, Amasyalı A.S. Tefik C, Özcan F, Seçkin S. Mesane kanserinde oksidatif stresin rolü. 9. Ankara üroonkoloji kursu.4-8 Kasım 2009.

Sertifikalar:

1-Uygulamalı deney hayvanları kursu. İ.Ü. Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü.12 Mayıs 2006.

2-Elektroforez kursu. Türk klinik biyokimya derneği .01 Şubat 2008.

3-Klinik biyokimyada ileri teknolojiler kursu. Türk klinik biyokimya derneği. 26 Aralık 2008.

4- Reproductive Medicine course. III. International congress of molecular medicine. 5-8 may 2009.

5-School of molecular medicine. . III. International congress of molecular medicine. 5-8 may 2009.

6- Genetics and statistics.quality. . III. International congress of molecular medicine. 5-8 may 2009.

7-Stem cells:From analysis to clinical applications. . III. International congress of molecular medicine. 5-8 may 2009.

8-İnfertilite değerlendirilmesinde laboratuar uygulamaları kursu. 8.Ulusal androloji kongresi. 20 mayıs 2009.
9- Proteomik araştırmaları kursu. 10-11 Aralık 2009

Katıldığı Kongre :

1-31st FEBS Congress Molecules in Health&Disease 24-29 June 2006.

2-20. Ulusal Üroloji Kongresi. 1- 6 Kasım 2008.

3-III. Internatıonal Congress of Molecular 5-8 Mayıs 2009

4- 8. Androloji Kongresi. 20 Mayıs 2009

5- 21. Ulusal Biyokimya Kongresi. 28-31 Ekim 2009.