

T.C.
ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SİTOKROM P450 ENZİMLERİNİ KODLAYAN GENLERİN (CYP) VE
VİTAMİN K EPOKSİT REDÜKTAZ KOMPLEKS SUBÜNİT1
ENZİMİNİ KODLAYAN GENİN (VKORC1) VARYASYONLARININ
PROSTAT KANSERİ ETİYOLOJİSİNDEKİ ROLLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bio. Ali Osman ARSLAN

BOLU
2012

T.C.
ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SİTOKROM P450 ENZİMLERİNİ KODLAYAN GENLERİN (CYP) VE
VİTAMİN K EPOKSİT REDÜKTAZ KOMPLEKS SUBÜNİTİ
ENZİMİNİ KODLAYAN GENİN (VKORC1) VARYASYONLARININ
PROSTAT KANSERİ ETİYOLOJİSİNDEKİ ROLLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bio. Ali Osman ARSLAN

TEZ DANIŞMANI
Yrd. Doç. Dr. Selma DÜZENLİ GEPDİREMEN

Bu çalışma Abant İzzet Baysal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir [Proje numarası: 2011.08.03.432].

BOLU
2012

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ONAY SAYFASI

Abant İzzet Baysal Üniversitesi,
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne,

Ali Osman ARSLAN tarafından hazırlanan ve 27/01/2012 tarihinde savunulan
“**Sitokrom p450 enzimlerini kodlayan genlerin (CYP) ve vitamin K epoksit
redüktaz kompleks subünit 1 enzimini kodlayan genin (VKORC1)
varyasyonlarının prostat kanseri etiyolojisindeki rollerinin araştırılması**”
başlıklı bu çalışma jürimiz tarafından Tıbbi Biyoloji ve Genetik Programında
Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı Yrd. Doç. Dr. Selma DÜZENLİ GEPEĞİREMEN
(AİBÜ) (imza)

Üye Prof. Dr. Akçahan GEPEĐİREMEN
(AİBÜ) (imza)

Üye Prof. Dr. Ahmet METİN
(AİBÜ) (imza)

ONAY:

Bu tez, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu’nca belirlenen yukarıdaki
jüri üyeleri tarafından uygun görölmüş ve Yönetim Kurulu’nun kararıyla
kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Esra KOÇOĞLU
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

En başta değerli hocam ve tez danışmanım, bana akademik hayatımda hocalık haricinde, kimi zaman bir abla, kimi zaman bir anne gibi destek olan ve gerek akademik gerekse hayata dair tecrübeler edinmemi sağlayan, akademik deneyim ve bilgilerini benimle paylaşarak iyi bir akademisyen olma yolunda hep yardımcı olan, Sn. Yrd. Doç. Dr. Selma DÜZENLİ GEPDİREMEN'e

Çalışma hastalarımın tamamlanmasında, bana her türlü yardımı ve zamanlarını ayıran Sn. Prof. Dr. Ahmet METİN ve Doç. Dr. Muzaffer EROĞLU'na

Samimi ve içtenliği ile bizi şenlendiren ve moral katan değerli abim Yrd. Doç. Dr. M. Yalçın GÜNAL'a

Yüksek lisans eğitimim boyunca yanımda olan ve beni hiç yalnız bırakmayan, zor anlarımda desteğini esirgemeyen, değerli abim Uzm. Dr. Murat DIRAMALI'ya

Yüksek lisans eğitimim boyunca hep yanımda olan, samimi dostluğu ile zor zamanlarımda yanımda yer alan, dertlerimi dinleyen ve bana moral veren değerli arkadaşım-can dostum Bio. Şeyda ÖZSOY'a,

Bolu'da eğitim stresinin ardından muhabbetleri ile beni rahatlatan ve yanımda olan değerli arkadaşlarım Bio. Dilek DOĞRUER'e, Lab. Tekn. Ebru KURUKAN'a, Bio. Ali UÇBEK'e ve Bio. Ayşenur AYDOĞAR'a,

Hastanedeki zamanım dışında evde vakit geçirdiğim, sıcak muhabbet ve dostluklarını benden esirgemeyen ev arkadaşlarıma,

Tezimin tamamlanmasında büyük desteği olan CDK Firmasından çok değerli Sn.Ömer Şen ve çalışanlarına

Ve,

Bu güne kadar beni hiç yalnız bırakmayan, eğitim hayatım boyunca bana sürekli moral ve pozitif bir güç katan, maddi ve manevi desteklerini hiç esirgemeyen, arkadaş gibi her mutlu anımda ve zor zamanımda yanımda olan, kendileriyle her zaman gurur duyduğum

Canım annem Aysel ARSLAN'a,

Canım babam Mehmet ARSLAN'a ve

Canım kardeşim Aslı ARSLAN'a ve eşine

Sonsuz teşekkür, sevgi ve saygılarımı sunarım...

Bio. Ali Osman ARSLAN

ÖZET

Prostat kanseri multifaktöriyel bir hastalık olup, ortaya çıkışında etnik farklılıklar, ileri yaş, sigara kullanımı, beslenme ve genetik faktörler bulunmaktadır. Çeşitli ülkelere bakıldığında prostat kanseri akciğer kanserinden sonra en sık görülen ve ölümcül olan ikinci kanser türüdür. Değişik çalışmalarda, örneğin hücre sistemleri ya da hayvan modelleri üzerinde prostat kanseri ile ilgili çalışmalar yapılmıştır.

CYP450 enzim seviyeleri genetik kontrol altındadır. Sitokrom p450 sistemi ve bu sistemin alt ünitelerinden CYP2C9 genindeki polimorfizmlerin bazılarının atriyal fibrilasyon, pulmoner emboli, stroke, venöz tromboz, koagülasyon bozuklukları, kardiyovasküler hastalık, depresyon, diabetes mellitus, ilaç toksisitesi, epilepsi, hipertansiyon, şizofreni gibi hastalıklara yatkınlık sağladıkları bildirilmiştir.

Vitamin K epoksit redüktaz kompleks subünit 1 (VKORC1) indirgenmiş vitamin K'nın yeniden üretilmesini kontrol eden vitamin K'nın siklus enzimidir. Vitamin K epoksit redüktaz kompleks subunit 1 (VKORC1), K vitamini bağımlı hemostazda önemli bir rol oynamaktadır. VKORC1 geninin dolaylı yollardan kanserli hücrelerde anjiyogeneizde rol oynadığı ileri sürülmektedir.

Bu sebeple bu çalışmada CYP2C9 ve VKORC1 genlerindeki polimorfizmlerin prostat kanseri etyolojisindeki rolleri araştırıldı. 48 kontrol ve 48 hasta üzerinde yapılan çalışmada CYP2C9 ve VKORC1 genlerinin alt varyantlarındaki değişimlerin prostat kanseri üzerinde etkilerinin olup olmadığı araştırıldı. Sonuç olarak, CYP2C9 geninin 6, VKORC1 geninin 8 adet polimorfizmi istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte, sayısal ve yüzde olarak hasta ve kontrol grubunda önemli fark göstermiştir. Bu sonuçların yorumunda, hasta ve kontrol grubunun sayısal küçüklüğü göz önünde bulundurulmalıdır.

Anahtar kelimeler: Prostat kanseri, VKORC1, CYP2C9, sitokrom P450,

ABSTRACT

Prostate cancer is a multifactorial disorder, where ethnicity, age, smoking, diet and genetic factors play a role in the generation of this disorder. Compared with other countries, after lung cancer, prostate cancer is the second most seen lethal cancer. Different studies were undertaken in prostate cancer, for example on cell systems or animal model studies.

CYP450 enzyme levels are under genetic control. Some of the polymorphisms of the cytochrome p450 enzyme system are said to be susceptible for atrial fibrillation, pulmonary embolism, stroke, venous thrombosis, coagulation disorders, cardiovascular disorders, depression, diabetes, drug toxicity, epilepsy, hypertension and schizophrenia susceptibility.

VKORC1 is an enzyme that controls the reproduction of reduced vitamin K. VKORC1 is important in vitamin K dependent hemostasis. It is postulated that VKORC1 gene plays an important role in angiogenesis of cancer cells.

Due to this facts, in this study, we analyzed the role of CYP2C9 and VKORC1 gene polymorphisms in prostate cancer ethiology. The study was undertaken on 48 patients and 48 controls, by analyzing CYP2C9 and VKORC1 gene subunit variations in prostate cancer patients. As a result, six polymorphisms of CYP and eight of VKORC1 were found unimportant, statistically. When interpreting this results, the small group of patient and control should be considered.

Keywords: Prostate cancer, VKORC1, CYP2C9, Vitamin K, Cytochrome P450

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR	ix
TERMİNOLOJİ	xi
ŞEKİLLER	xii
TABLolar	xiii
GRAFİKLER	xiv
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Prostat	3
2.1.1. Prostat Embriyolojisi	3
2.1.2. Prostat Anatomisi	4
2.2. Kanser	5
2.2.1. Kanser Biyolojisi	5
2.2.2. Hücre Döngüsü ve Kontrolü	9
2.2.3. DNA Tamir Mekanizması	10
2.3. Prostat Kanseri	13
2.3.1. Prostat Kanseri Etiyolojisi ve moleküler Temeli	16
2.3.2. Prostat Kanseri Epidemiyolojisi	21
2.3.3. Prostat kanseri Patolojisi	23
2.3.4. Yeni Gelişmeler: Genomik ve Postgenomik Dönemler	25
2.4. Farmakogenetik	25
2.4.1. Faz I ve Faz II Reaksiyonları	26
2.5. Sitokrom p450 Enzim Ailesi	26

2.5.1. CYP2C Ailesi	28
2.5.2. CYP2C9	28
2.5.3. CYP2C9 Gen Yapısı ve Polimorfizmi	29
2.5.4. Sitokrom p450'ler ve Kanser	30
2.6. K Vitamini	30
2.6.1. K vitaminin Farmakokinetiği ve Etki Mekanizması	31
2.6.2. K Vitamininin Fizyolojik Önemi	31
2.7. Pıhtılaşma Mekanizması ve K Vitamini	32
2.7.1. Pıhtılaşmanın intrinsek (plazma içinde) yolu	32
2.7.2. Pıhtılaşmanın ekstrinsek (plazma dışında) yolu	33
2.7.3. K Vitamini gama-karboksilasyonu	34
2.8. K Vitamini Epoksid Redüktaz (VKOR)	34
2.9. VKORC1	35
2.10. VKORC1 ve Kanser	36
3. GEREÇ VE YÖNTEM	
3.1. Gereç	38
3.2. Yöntem	38
3.2.1. Tam kandan DNA izolasyonu	39
3.2.2. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)	41
3.2.3. PCR'da gerekli olan Bileşenler	42
3.2.4. İzole edilmiş DNA örneklerinin PCR ile amplifikasyonu	42
3.2.5. Infiniti sistemi	44
3.2.6. Mikroarray	46
3.3. İstatistiksel Aanaliz	59
4. BULGULAR	60
5. TARTIŞMA	73
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	79
7. KAYNAKLAR	80
8. EKLER	93
EK1: Etik Kurul Onayı	93

SİMGELER ve KISALTMALAR

ATP	: Adenozin Trifosfat
ASAP	: Atipik Small Asiner Proliferasyon,
APC	: Adenomatous Polyposis Coli (tümör süpressör gene)
ASPE	: Allel Specific Primer Extention
BRCA1	: Breast cancer 1 geni
BRCA2	: Breast cancer 2 geni
Bcl-2	: B-cell lymphoma 2 geni
Bcl-XL	: B-cell lymphoma-extra large
CYP450	: Cytochrome P450
CYP2C9	: Cytochrome P450 2C9
CYP3A4	: Cytochrome P4503A4
dATP	: Deoxyadenosine Triphosphate
dCTP	: Deoxycytidine Triphosphate
dGTP	: Deoxyguanosine Triphosphate
dNTP	: Deoxyribonucleotide Triphosphate
dTTP	: Deoxythymidine Ttriphosphate
DCC	: Deleted in Colorectal Cancer
DHEA	: Dehidroepiandrosteron
DHT	: Dihidrotestesteron
DMSO	: Dimetilsulfoksid
EDTA	: Etilendiamin Tetraasetik Asit
FAPC	: Familyal Adenomatosis Poliposis Coli
GDP	: Guanozin-5-difosfat
GFR	: Grow Faktör Reseptör
Gla	: γ -karboksi glutamat
Glu	: Glutamat
GTP	: Guanozin Trifosfat
HPCX	: Hereditary Prostate Cancer, X-Linked.

HPC1	: Hereditary Prostate Cancer 1
Mdm2	: Murine Double Minute 2
MEN1	: Multip Endokrin Neoplazi
mRNA	: Messenger RNA
myc	: Myelocytomatosis
µl	: Mikrolitre
PIN	: Prostatik intraepitelyal neoplazi
PCAP	: Putative Cancer of Prostate
PCR	: Polymerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
PKC	: Protein Kinaz C
Rb	: Retinoblastoma
p53	: Tümör Süpressör Gen
p27	: Tümör süpressör geni
SHBG	: Sex Hormone Binding Globulin
Sbk	: Cycline dependent kinase
SNP	: Single Nucleotide Polymorphism
VKORC1	: Vitamin K epoksit redüktaz kompleks subünit 1 enzimi
VEGF	: Vasküler endotelyal büyüme faktörüdür
WT1	: Wilms' tümörü 1
TF	: Tissue Factor

TERMİNOLOJİ

Allel: Özdeş kromozomların özel bir loküsünde bulunan herhangi bir genin seçenekli biçimlerinden biridir.(Homolog kromozomlar üzerinde aynı lokuslarda yer alan ve aynı polipeptidin kodlanmasından sorumlu alternatif genlerdir.)

Fenotip: Bir genotipin morfolojik, klinik, biyokimyasal veya moleküler özellik olarak gözlenebilen ifadesidir

Gen: DNA üzerinde her biri, bir proteinin yapısını kodlayan bölgelere verilen ad.

Genotip: Bir kişinin tüm genetik yapısını oluşturan gen ya da genlerdir.

Heterozigot: Diploid organizmalarda (homolog kromozom), aynı gen loküsünde birbirinden farklı iki alelin taşındığı durum

Homozigot: Diploid organizmalarda, herhangi bir gen loküsünde bulunan iki alelin biribiri ile özdeş olması durumu

Kromatin: Selenoid yapının kendi içinde yoğunlaşması ile oluşan yapı (DNA+ histon proteinleri)

Kromozom: Yoğunlaşmış kromatin yapısıdır.

Nükleozom: 146 baz çiftlik DNA'nın histon proteinleri ile sarılarak (8 histonlu yapı) oluşan yapı.

Polimorfizm: Toplumda %1'den daha yüksek sıklıkta bulunan genetik çeşitlilik tipi ya da gen seçenekleri.

ŞEKİLLER

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1.2.1. Prostat bezinin bölgeleri	4
2.2.3.1. Türkiye’de kanser insidansları, erkek	12
2.3.1. Normal ve büyümüş prostat bezi	14
2.3.1.1. Prostat kanserinde ikinci kuşakta üç akrabanın etkilendiği kalıtım	19
2.3.1.2. Kalıtsal prostat kanseri yatkınlık genleri	20
2.5.1. İnsan genomundaki aktif p450 genleri	27
2.5.2.1. CYP2C9 geninin lokalizasyonu	29
2.7.1. Fibrin pıhtısının oluşmasında intrensek ve ekstrensek yollar	33
2.8.1. K vitamini döngüsü	35
3.2.1.1. Tam kandan DNA izolasyonu	40
3.2.6.1. INFINITI™ Teknolojisi mikroyarray cihazı	47
3.2.6.2. Genotip mikroyarray çip örneği	49
3.2.6.3. Spotlu mikroyarray çip örneği	50
3.2.6.4. Affymetrix Gene Chip® firmasına ait insan ve fare genomu çipleri	53
3.2.6.5. Floresan işaretli nükleotitlerin uzama reaksiyonunda gösterimi	54
3.2.6.6. BiyoFilmÇip™ örneği resmi	55
3.2.6.7. Mikroçip üzerinde parlayan floresan ışıklarının görüntüsü	56
3.2.6.8. AutoGenomics mikroyarray cihazının sonuç ekranı görüntüsü	57

TABLÖLAR

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
2.3.2.1. Çeşitli ülkelerde prostat kanseri insidansı ve moratlite oranları	22
2.3.2.2. Türkiye’de erkekerde görülen ilk on kanser türü	22
3.2.4.1. Çalışmamızın PCR şartları	43
4.2.1. CYP2C9’un kontrol grubundaki wild, heterozigot ve mutant genotip tiplerinin sayısal dağılımı	61
4.2.2. VKORC1’in kontrol grubundaki wild, heterozigot ve mutant genotip tiplerinin sayısal dağılımı	61
4.2.3. CYP2C9 alt varyantlarının hasta grubundaki wild, heterozigot ve mutant genotip tiplerinin sayısal dağılımı	62
4.2.4. VKORC1 alt varyantlarının hasta grubunda ki wild, heterozigot ve mutant genotip tiplerinin sayısal dağılımı	62
4.2.5. Kontrol ve hasta grubunda CYP2C9 geninin alt varyantlarına ait polimorfizmlerin wild, heterozigot ve mutant genotiplerin yüzde dağılımları	63
4.2.6. Kontrol ve hasta grubunda VKORC1 geninin alt varyantlarına ait polimorfizmlerin wild, heterozigot ve mutant genotiplerin yüzde dağılımları	64
4.2.7. CYP2C9 alt varyantlarının hasta ve kontrol gruplarında sayısal olarak yorumlanması	68
4.2.8. VKORC1 varyantlarının hasta ve kontrol gruplarında sayısal olarak yorumlanması	69
4.2.9. Hasta ve Kontrol gruplarının yaş ve PSA ortalamaları	70

GRAFİKLER

<u>Grafik</u>	<u>Sayfa</u>
4.2.1. CYP2C9'un alt gruplarının hasta grubunda elde edilen wild, heterozigot ve mutant verilerin grafiksel olarak gösterimi	70
4.2.2. CYP2C9 alt gruplarının kontrol grubunda elde edilen wild, heterozigot ve mutant verilerin grafiksel olarak gösterimi	71
4.2.3. VKORC1'in alt gruplarının hasta grubunda elde edilen wild, heterozigot ve mutant verilerin grafiksel olarak gösterimi	71
4.2.4. VKORC1'in alt gruplarının kontrol grubunda elde edilen wild, heterozigot ve mutant verilerin grafiksel olarak gösterimi	72

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Prostat kanseri tüm dünya ülkelerinde yaşayan erkeklerde en sık görülen kanser türü olup, kanserin yol açtığı ölüm nedenleri arasında akciğer ve kolon kanserlerinden sonra ikinci sırada yer almaktadır. Prostat kanseri yaşla birlikte artış gösterdiğinden gelişmiş olan ülkelerde önemli bir sağlık problemini oluşturmaktadır (1)

Prostat kanserleri pek çok tip göstermektedir. Bunlar adenokarsinoma, musinöz adenokarsinoma, prostatik duktal adenokarsinoma, saf küçük hücreli adenokarsinoma, skuamoz ve adenoskuamoz kanserler, sarkomatid karsinoma, (karsinosarkom), transizyonel hücreli kanserler, malign mezenşimal tümörler, prostatik epitelyal neoplazi (PIN), atipik küçük asiner proliferasyon (ASAP)'dır. Bunlardan en sık görüleni %98 görülme sıklığı ile adenokarsinomlardır (2). Prostat kanseri ülkeler arasında farklılık gösterir. Bunun nedeninin genetik, çevresel faktörler ve etnik yapı çeşitliliğinden kaynaklandığı bilinmektedir (3). Prostat kanserinde genetik etkinin %5-10 oranında olduğu iddia edilmektedir (4).

Sitokrom P450 (CYP450) monooksijenaz enzimleri olgun eritrosit ve iskelet kası hücreleri dışında, tüm memeli hücre tipleri ve prokaryotlarda bulunan bir hem-protein ailesini teşkil ederler. CYP ailesi geniş alt gruplara, alt gruplar da çeşitli varyantlara sahiptir. Bu alt grupların sayısı günümüzde 50'den fazladır (5). Biz çalışmamızda CYP2C9 alt grubunun ve bu alt grubun bazı varyantlarının polimorfizmlerini analiz ettik. Seçtiğimiz varyantların kanser oluşum mekanizmasına etkilerini araştırdık. Seçtiğimiz varyantlar *2, *3, *4, *5, *6,*11'dir. CYP2C9'un tüm varyantlarından tüm ırklarda ortalama olarak en yaygın olanlar *2 ve *3' dür. (6)

Varyant *1 ve *11 ise Kafkas ve Afrika toplumunda sık görülmüştür (7). Diğer bir varyant olan *4 de Japon populasyonunda daha yaygındır (6). *5 ve *6 varyantları ise Afrika ve yerli Amerikan populasyonunda belirlenmiştir (8).

Prostat kanserinde etkili olduğunu düşündüğümüz başka bir mekanizma ise vitamin K metabolizmasıdır. Buna dayanarak analiz için seçtiğimiz diğer gen ise VKORC1 (K Vitami Epoksid Redüktaz Kompleks Alt Ünit 1)' dir.

Vitamin K birçok biyokimyasal yolakta kofaktör olarak görev alır. Bunların en önemlisi vitamin K bağımlı karboksilasyon reaksiyonlarıdır (9). Vitamin K'nın

kofaktör görevini sürdürebilmesi için kinon formunun kinol şekline indirgenmesi gerekir. Bu dönüşüm VKORC1 enzimi (vitamin K epoksit redüktaz kompleks subünit 1 enzimi) ile olur (10). VKORC1 enzimi ise VKORC1 geni tarafından kontrol edilir (10). Netice olarak VKORC1 geni vitamin K'nın kofaktör görevini sürdürmede kilit rol oynamaktadır.

K vitamininin ayrıca kanser hücrelerinin büyümesini *in vivo* ve *in vitro* olarak inhibe ettiği tespit edilmiştir (11,12). Vitamin K aktivitesinin kanserli hücrelerinde anjiogenezi inhibe ettiği bulunmuştur (13). Bu durumda VKORC1 geninin vitamin K metabolizması üzerinden kanser mekanizmasında önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir. Şimdiye dek VKORC1 geninin alt gruplarında 28 polimorfizm tespit edilmiştir (14). Biz çalışmamızda bu 28 polimorfizmden 8 tanesini (3673G>A, 6009C>T, 6484C>T, 6853G>C, 7566C>T, 8773C>T, 9041 G>A, 5808 T>G) çalıştık.

Çalışmamızda, Sitokrom p450 enzimlerini kodlayan genlerin (CYP2C9) ve vitamin K epoksit redüktaz kompleks subünit1 enzimini kodlayan genin (VKORC1) varyasyonlarının muhtemel bireysel ve ortak etkilerinin prostat kanseri olan hastalarda araştırılmasını ve ayrıca her ne kadar CYP ve VKORC1 genleri ile ilgili çalışmalar olsa da, dünya çapında herhangi bir kanser hastalığı grubunda günümüze kadar hiç araştırılmamış olan CYP ve VKORC1 gen polimorfizmlerinin ilişkilerinin beraber araştırılmasını amaçladık.

Çalışmamız ile ilk defa prostat kanseri hastalarında, sitokrom P450 2C9 (CYP2C9) ve VKORC1 gen polimorfizmlerinin muhtemel ortak etkilerinin araştırılması ve prostat kanserinde CYP2C9 ve VKORC1 alt gruplarına ilişkin gen bölgelerindeki SNP'lerinin (tek nükleotit polimorfizmlerin) popülasyonumuza özgü genotip dağılımını belirlemeye çalıştık.

Araştırmamızın sonucunda prostat kanserinde CYP2C9 ve VKORC1 genlerinin alt gruplarına ilişkin gen bölgelerindeki tek nükleotit polimorfizmlerin popülasyonumuza özgü genotipik dağılımlarını belirleyerek bu sonuçların hasta ve kontrol grubu arasındaki ilişkileri istatistiksel olarak hesapladık. İstatistik sonucuna göre prostat kanserinde ilgili SNP'lerin muhtemel etkilerini tespit etmeyi hedefledik.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Prostat

2.1.1. Prostat Embriyolojisi

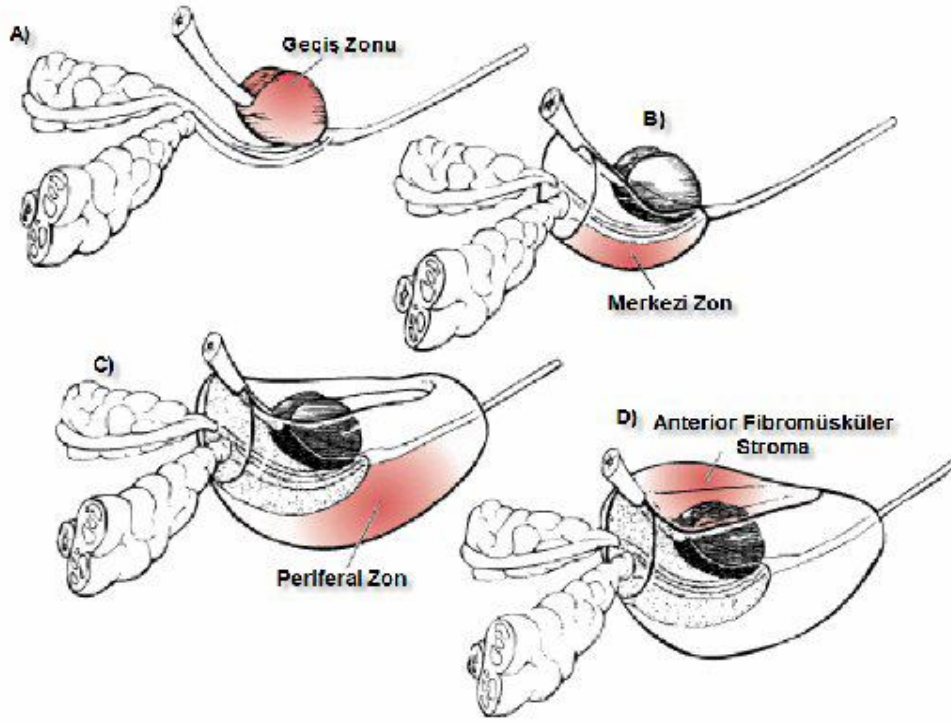
Prostat embriyolojik hayatın on ikinci haftasında fetal testisten salgılanan androjenik hormonların etkisi ile gelişmeye başlar (15). Bu gelişme döneminde üretradan birçok farklı epitelyal çıkıntılar gelişmeye başlar. Bunlar müllerian tüberkülü ve komşu ejakülatör duktusların bulunduğu seviyenin altında ve üstünde gelişirler (16). Bu solid tubuler çıkıntılar devamlı dallanarak karmaşık bir duktus sistemi oluştururlar. Bu yapı ürogenital sinüs çevresindeki farklılaşmakta olan mezenkimal hücreler ile karşılaşır, bunun sonucunda mezenkimal hücreler onaltıncı haftadan itibaren tübüler çevresinde çoğalmaya başlar ve periferde yoğunlaşarak daha sonrasında kapsül yapısını oluştururlar. 22. haftada müsküler stroma oldukça gelişmiş bir hal alır ve doğuma kadar gelişmeye devam eder (17).

30. haftada daha önceden solid yapıda olan tübüller lümenli hale gelirler ve asiner yapılar oluşmaya başlar. Tübüler yapılar mezenkim dokusunun içine doğru ilerlemeye devam ederler ve böylece lobüler kümeler halinde asinotübüler yapılar oluşur. Prostatın glandüler epiteli envajina olan endodermal hücrelerden farklılaşır, stroma ve düz kas lifleri ise mezenkimal kaynaklı olarak oluşur. Ejakülatör kanalları ise Wolf kanalı kaynaklı gelişir (18-20). Doğumu takip eden 5-6. haftalardan itibaren proliferen olan duktal yapılarda sekresyon belirtileri görülmeye başlar ve sonrasında alveolar yapılar oluşur. Prostat bu dönemde puberteye kadar herhangi bir değişikliğe uğramadan kalır. Puberte ile birlikte 6 veya 7 yıl içinde glandüler elamanlar hızla gelişir ve prostat erişkin boyuta ulaşır (19).

2.1.2. Prostat Anatomisi

Prostat mesanenin hemen alt bölümünde bulunan fibromusküler ve glandüler yapıda olup 18-20 gr ağırlığında sekretuar bir organdır. Erkek üretrasını saran ve mesane boynu ile devam eden prostat bezi 2.5 cm uzunluğunda, sıkıştırılmış ve ters yüz edilmiş konik bir yapı şeklindedir (21). Erişkinde prostat fibromusküler bir stroma içinde 30-50 adet tubuloalveolar gland içeren sekretuar bir organdır. Bu glandlar, 16-32 adet kanal ile verumontanumun iki yanından prostatik uretraya acılır. Prostat, posterior, anterior ve iki inferolateral olmak üzere dört yuzeye sahiptir (Şekil. 2.1.2.1) (22).

Prostatın arterial kan akımı inferior vezikal arter tarafından sağlanır (23). Prostatın sinirleri inferior hipogastrik pleksustan gelmektedir (22).



Şekil 2.1.2.1: Prostat bezinin bölgeleri (24)

A) Prostat bezi geçiş zonu, B) Merkezi zon, C) Periferik zon ve D) Anterior fibromusküler stroma olmak üzere 4 bölümden oluşmaktadır.

2.2. Kanser

Kanser, belirli genlerde bir takım etkilerle oluşan mutasyonlar sonucu veya gen ifadesinin miktarında ve zamanlamasında meydana gelen değişikliklerle ortaya çıkan, hücresel seviyedeki genetik bir bozukluktur. Bu bozukluk neticesinde, hücre döngüsünün bozularak sürekli olarak yeni kanser hücrelerinin meydana gelmesi ve yok edilememesi ile karakterize bir hastalıktır (25).

2.2.1. Kanser Biyolojisi

Normal dokularda hücre sayısındaki artış organizmanın ihtiyacına göre olmaktadır. Hücre çoğalmasındaki artış ya da azalış dengeli bir şekilde olup gerekli hücre ölümleri ile vücuttaki aşırı hücre oluşumu engellenmektedir (26).

Kanserin Evreleri

- 1.İndüksiyon Fazı: Bu faz 30 yıl veya daha fazla olabilir. Bu fazda radyasyon ve toksinler gibi çeşitli çevresel karsinojenlerin birine veya bir kaçına maruz kalınabilir.
2. İnsitu Fazı (Lokal Faz)
3. İnvazyon Fazı
4. Metastaz (Disseminasyon) Fazı

Kanser Hücresinde Görülen Değişiklikler

- * Ribonükleotid redüktaz aktivitesinin artması
- * Kansereşen hücre üreme kontrolünü kaybetmiştir
- * Kansereşen hücre antijenik özelliğini kaybetmiştir.
- * DNA ve RNA sentezi artmıştır.
- * Kanserleşen hücrenin morfolojisi değişmiştir.
- * Prididin katabolizması artmıştır.
- * Glukoneogenez artmıştır
- * Kanserleşen hücre dokuya özgüllüğünü kaybetmiştir
- * Kanserleşen hücrede özel fonksiyonlu bazı proteinler sentezlenir.
- *Tümör hücreleri porfirinleri normal dokulardan daha fazla tutarlar (Bundan faydalanılarak kanserli dokuya fototerapi uygulanır.) (27).

Kanser, anormal hücrelerin sürekli olarak birikmesi ile karakterize bir düzen bozukluğudur. Bu durum, sürekli çoğalarak aşırı miktarda artan hücre sayısının normal olarak gerçekleşen uygun miktarda hücre kaybıyla dengelenmemesi sonucu gerçekleşir. Kanser hücreleri kaynaklandıkları normal hücrelere göre daha kısa zamanda ölmelerine rağmen yeni hücre oluşumu o kadar hızlıdır ki, sonuç da hücreler devamlı birikir. Aşırı hücre birikimi sonucunda oluşan bu dengesizlik hem kanser hücrelerindeki genetik anormalliklerden hem de organizmanın bu hücreleri tanımada ve yok etmedeki başarısızlığından kaynaklanır (26).

Proto-onkogen ve Onkogenler

Proto-onkogenler, önemli hücre regülatör genleri olup, birçok durumda normal hücre bölünmesini kontrol eden sinyal iletim yollarında görev yapan proteinleri şifreleyen genlerdir.

Onkogen proteinlerinin büyük bir çoğunluğu ise, hücre bölünmesini ve ölümünü düzenleyen sinyal yollarında görev yapar. Bu onkogen proteinleri, polipeptid büyüme faktörleri, büyüme faktör reseptörleri, intrasellüler sinyal yollarının elemanları ve transkripsiyon faktörleri gibi değişik roller üstlenmiştir.

Onkogenler ve proto-onkogenler arasındaki en temel farklılık, onkogenlerin proto-onkogenlerin mutant formları olmasıdır.

Tümör virüsleri ile yapılan çalışmalar, onkogen olarak isimlendirilen spesifik genlerin varlığını ortaya koymuş olup, hücre bölünmesi, farklılaşması ve devamlılığını kontrol eden kritik konumdaki regülatör genlerin yapısında meydana gelen mutasyonların veya viral gen ilaveleri ile oluşan değişimlerin sonucunda da kanserin oluşabildiği deneysel olarak gösterilmiştir (28).

Onkogen Biyolojisi

Hem proto-onkogen hem de farklı kaynaklı büyüme faktörleri, hedef hücrelerdeki spesifik büyüme faktörü reseptörlerine (GFR) bağlanırlar. Böylece, bu reseptörler üzerindeki tirozin kinaz aktifleşir. Büyüme faktörü-GFR kompleksi hücreler tarafından alınır ve inaktifleştirilir.

Proteinin hücre yüzeyindeki parçasında spesifik ekstrasellüler büyüme faktörleri için bölgeler bulunur. GFR'ler kendilerine özgü büyüme faktörleri ile

aktive edildiklerinde, bu reseptörlerin sitoplazmik bölgeleri aktif tirozin kinaz haline gelir.

Aktifleşen tirozin kinazlar ekstrasellüler sinyali bazı mekanizmalarla sitoplazmik proteinlere ve nükleusa aktarırlar. Artan protein kinaz C'nin (PKC) ise DNA sentezini uyaran bir grup proteini aktive eder. Aktif tirozin kinazların başka bir fonksiyonu, guanozin-5-difosfatı (GDP), guanozin trifosfat (GTP)'a çevirmek üzere fosforile etmeleridir. GTP, bir c-ras proteini olan p21'i aktive eder, aktifleşmiş GTP-p21 kompleksi ise nükleusda DNA transkripsiyonunu uyarır (29).

Tümör Süpressör Genler

Tümör baskılayıcı genler, tümör gelişimini baskılama özelliğinden dolayı tümör süpressör protein olarak tanımlanan ürünleri kodlayan genlerdir. İlk tanımlanan tümör süpressör gen bir çocukluk çağı göz tümörü olan retinoblastomada (Rb) ortaya çıkarılmıştır. İkinci tanımlanan tümör süpressör gen ise 53 kDalton ağırlığında olmasından dolayı p53 olarak tanımlanan bir genidir

p53 gibi INK tümör süpressör genide de akciğer kanserini içeren birçok yaygın görülen kanserde rol oynar. Diğer iki tümör süpressör gen olan APC ve DCC kolon kanserinde sıklıkla mutasyona uğramıştır.

BRCA 1 ve BRCA 2 tümör süpressör genleri meme, over, prostat ve kolon kanserlerinde önemlidir.

Pten tümör süpressör geni Glioblastom, prostat, meme ve endometrium tümörlerinde rol alırlar (28).

p53 Geni

p53 geni kanserde en önemli tümör süpresör genlerden biridir. p53 genindeki fonksiyon kaybı, kontrolsüz hücre proliferasyonu ve apoptozda azalmaya yol açmaktadır. p53 geni mutasyonunun, prostat kanserinin erken dönemindeki rolü tartışmalıdır. Ancak, p53 geni mutasyonu ve fonksiyon kaybı, lokal ileri ve metastatik tümörlerde açıkça gösterilmiştir ve tümör progresyonunda da rol aldığı düşünülmektedir. Tespit edilen p53 protein ekspresyonu ile tanımlanan p53 geni mutasyonu, radikal prostatektomi ve radyoterapi gören hastalarda da kötü prognoz ile ilişkili bulunmuştur (30).

Tümör baskılayıcı p53 geni, DNA hasarı ve onkogenik transformasyon sonucu aktive olur. Strese girmeyen, hasara uğramamış hücrelerde p53 proteinin konsantrasyonu belirlenemeyecek kadar azdır ve stoplazmada tutularak çekirdeğe girişi önlenir.

p53 proteininin hücre içi düzeyi murine double minute 2 (Mdm2) proteininin varlığına bağlıdır ve p53 sıkı biçimde Mdm2 tarafından kontrol altında tutulur. Bu gen, transkripsiyon faktörü olan Mdm2 ekspresyonunu da indükleyerek kendi kendisinin inhibisyonunu sağlar. Mdm2 p53 proteininin transaktivasyon domainine bağlanır ve transkripsiyonu aktive etmesini önler (31).

Bilinen en önemli tümör baskılayıcı genlerden biri olan p53'ün mutasyonu ve/veya delesyonu ile tümör dokusundaki anjiyogenez ve buna bağlı neovaskülarizasyon artmaktadır. Yapılan çalışmalarda düşük klinik evre prostat kanserinde, tümör dokusundaki p53 gen mutasyonunun az görülmesine karşın hastalığın progresyonunda önemli bir aşama olduğu belirtilmektedir (32).

Birçok insan kanserlerinin mutant p53 süpresör genine sahip olduğu bulunmuştur (26).

p27 Geni

p27 geni, kromozom üzerinde 12p12'de lokalize olan bir tümör süpresör genidir. Bazı prostat kanserlerin de bu bölgede genetik materyal kaybı olduğu gösterilmiştir. Radikal prostetaktomi yapılan hastalardaki çalışmalar, p27 gen ekspresyonu kaybı ve biyokimyasal rekürens riski artışı arasında bir ilişki bulmuşlardır.

p27 geni, sikline bağımlı kinaz (sbk) inhibitörlerinden Cip/Kip ailesine aittir. Siklin E/cdk2 kompleksine bağlanıp inhibe ederek hücre siklusun G₁ fazından S fazına progresyonunu düzenler. Böylelikle p27 genindeki fonksiyon kaybı, hücrelerin hücre siklusunda ilerlemelerini sağlayarak tümör oluşumunu hızlandırabilir. p27 gen ekspresyonu kaybı, heterozigote datalarında öne sürüldüğü gibi, genetik kayıp sonucu oluşabilir. Ancak, p27 ekspresyonu kaybı, kromozom 12p12'de heterozigote kaybindan çok daha sıktır ve immunohistokimyasal çalışmalarda gösterildiği gibi, invaziv kanserlerin çok erken evresinde oluşur.

Prostat kanserinde en sık rastlanılan kromozomal değişiklik, kromozom 8q'nun duplikasyonudur. Prostat karsinogenezisinin erken safhasında ortaya çıkan

kromozom 8p'deki değişikliklerin aksine, 8q'nun duplikasyonu, sıklıkla lokal ileri ve metastatik tümörlerde bulunur. Kromozom 8q'daki genlerin duplikasyonu ya da amplifikasyonu, metastaz riskinde artış ve daha kısa süre ile ilişkilidir (30)

2.2.2. Hücre döngüsü ve kontrolü

Hücre bölünme döngüsü bir biri ile eş zamanlı olarak gerçekleşen 4 aşamadan oluşur. Bunlar; hücre büyümesi, DNA replikasyonu, kopyalanan genetik materyalin yavru hücrelere kromozom şeklinde eşit olarak dağıtılması ve hücrenin ikiye bölünmesidir.

Hücre döngüsünün en önemli aşamalarından olan DNA sentezi ise Hücre döngüsünün sadece S (sentez) olarak tanımlanan interfaz evrsinde gerçekleşmektedir. Herhangi bir ökaryotik hücre incelendiğine hücre döngüsü esas olarak 2 temel süreçten oluşur. Mitoz bölünme evresi hücre döngüsünün en canlı ve hareketli evresi olup bu evrede yavru kromozomlar bir birinden ayrılır ve genellikle hücrenin ikiye bölünmesi (sitokinez) ile sona erer. Mitoz ve sitokinez sadece bir saat sürerken, hücre döngüsünün %95'i ise interfazda yani iki mitoz arasındaki evrede gerçekleşir. İnterfazda sürekli bir büyüme olmaktadır DNA sentezi ise S olarak tanımlanan interfazın özel bir evresinde gerçekleşir. Bu nedenle DNA sentezini, referans noktası olarak seçecek olursak ökaryotik hücre döngüsünün dört ayrı evreye ayrıldığını görüyoruz. Bunlar:

M evresi: mitozu gösterir. Sitokinez ile sona erer. (1 saat)

G1 evresi: mitozu izleyen evredir. Mitozla DNA replikasyonu arasındaki evreyi oluşturur. Hücre metabolik olarak aktiftir. Sürekli bir büyüme vardır ama DNA sentezi yoktur. (11 saat)

S evresi: G1 evresini izleyen dönemdir. Bu evrede DNA sentezi yapılır. (8 saat)

G2 Evresi: DNA sentezi tamamlandıktan sonraki evredir. Bu evrede hücre büyümesi devam eder ve mitozla hazırlık olarak gerekli organel ve proteinlerin sentezi yapılır. (4 saat)

İleri ökaryotik hücrelerin hücre döngüleri G1 evresinde düzenlenir. Özellikle geç G1 de bulunan ve hayvan hücrelerinde “kısıtlama noktası” (Restriction point) adını alan bir kavşak noktası vardır.

G1/S kontrol noktası: S evresine girmeden önce oluşmuş veya bir önceki kontrol noktası olan mitoz evresinde meydana gelmiş DNA hasarının varlığı, hücrelerin S evresinde ilerlemesini yavaşlatır ve döngü G1 deki kontrol noktasında duraklatır. Burda amaç S fazına girmeden tamir için zaman kazanmaktır. Buradaki mekanizmada p53 geni görev almaktadır.

G2/ M kontrol noktası:

Bu kontrol noktası, G2 de bulunur. DNA replikasyonu tamamlanmadıkça mitozun başlamasını önler. G2 noktası replikasyonu tamamlanmamış DNA 'yı tanır ve hücre döngüsünü durduran bir sinyal oluşturur. Tüm genomun replikasyonu tamamlanmadıkça G2 geçilemez. Replikasyon tamamlandıktan sonra eğer bir hata olursa G2 de duraklatma söz konusudur ve tamir mekanizmaları çalışmaktadır.

M kontrol noktası:

Genomun bütünlüğün korunması sağlanmaktadır. Bu nokta kromozomların mitoz mekiği üzerinde dizilmesini kontrol eder ve yavru hücrelere kromozom setlerinin doğru şekilde aktarılmasını sağlar. Bu kontrol noktası kromozomlar mekik üzerinde her iki yavru hücreye tam bir kromozom seti gidecek şekilde dizilmedikçe kromatidlerin ayrılmasını önler (28).

2.2.3. DNA tamir mekanizması

DNA'da oluşan hasarlar replikasyon veya transkripsiyonu inhibe edebilir ve yüksek sıklıkta mutasyonlarla sonuçlanabilir. Canlılar genomun bütünlüğünü muhafaza etmek için, metabolizmada bulunan biyokimyasal reaksiyonlar ile diğer çevresel etmenler sonucu ortaya çıkan serbest radikaller gibi mutajenik etkisi yüksek maddelerin mutajenitesini ortadan kaldırmak amacıyla hasar önleme ve buna rağmen oluşan DNA hasarlarını ortadan kaldırmak içinde tamir mekanizmaları geliştirmek zorundadır.

DNA tamir mekanizmaları; replikasyon öncesi ve replikasyon sonrası olmak üzere iki genel sınıf altında toplanabilir.

*** Replikasyon Öncesi DNA Tamiri**

Replikasyon öncesi DNA tamirinde ilk olarak DNA hasarının direkt onarımı söz konusudur. DNA yapısında oluşabilecek hasarların büyük çoğunlu, hasarlı

bazların çıkarılması ve çıkarılan bölgenin yeniden sentezlenip yerine konulması ile tamir edilir.

Her ne kadar direk tamir özel DNA hasarları ile başa çıkmada etkili bir yol ise de, ikinci bir replikasyon öncesi tamir mekanizması olan kesip çıkarma tamiri, DNA'nın çok çeşitli kimyasal değişimlerinin tamirinde rol aldığı için daha yaygındır. Kesip-çıkarma tamirinin ilk aşamasında, hasarlı DNA bölgesi tanınır ve hasarının tipine göre serbest baz ya da nükleotid olarak yeri değiştirilir. Boşluk, hasarsız komplementer iplik templat olarak kullanarak yeni bir DNA ipliği sentezlenerek doldurulur.

*Replikasyon Sonrası DNA Tamiri

Bu tamir sistemi replikasyon öncesi tamir mekanizmalarında başarısızlık sonucu oluşabilecek durumlar için alternatif tamir mekanizmasıdır.

Rekombinasyon tamiri, homolog rekombinasyonel tamir ve non-homolog rekombinasyonel tamir olarak alternatif tamir mekanizmaları replikasyon sonucu oluşan hataların giderilmesinde kullanılır (28).

Apoptoz (Apoptosis)

Apoptoz terimi programlı hücre ölümü demektir. DNA'da meydana gelen ve DNA tamir mekanizmaları tarafından da düzeltilememiş hasarlı hücrelerin fizyolojik olarak kendi kendini yok edilmesi olayıdır.

Programlanmış hücre ölümü, embriyolojik gelişimde ve yetişkinlerin dokularında önemli rol oynayan hücre ölümünün normal fizyolojik bir biçimidir.

DNA hasarının oluşması durumunda, hasarın meydana geldiği hücre, apoptoza yönlendirilerek ortadan kaldırılır. Bu şekilde DNA yapısında zararlı mutasyonları bulunduran hücrelerin, kanserleşme potansiyeli ortadan kaldırılmış olur.

Nekrozun tersine, apoptoz inflamatuvar reaksiyona yol açmaz. Apoptoz genetik olarak düzenlenir, ancak malign hücrelerde bozulmuştur. Örneğin, p53 tümör supressör geni apoptozu uyarır. Bcl-2 onkogeni ise apoptozu inhibe eder (28).

Bcl-2 Geni

Kanser, hem hücresel proliferasyonda artma, hem de hücre ölümünde azalma (apoptoz) ile karakterizedir. Bcl2, apoptozu önleyen bir onkogendir (30).

Bcl-2 özellikle mitokondri dışı membranında bulunmakta ve iyon transportunu düzenlemektedir. Bcl-2 gen ailesinin Bax, Bad, gibi proapoptik üyeleri apoptozu tetiklerken, Bcl-2 ve Bcl-XL gibi üyeleri ise apoptozu inhibe ederler.

Herhangi bir nedenle DNA hasarı olduğu zaman, oluşan bu hasara yanıt olarak p53 geni aktiflenir ve bunun sonucunda apoptoz başlatılır. Apoptoz ayrıca reaktif oksijen radikallerinin hem mitokondri hem plazma membranı hem de genom üzerinde oluşturabileceği hasara bağlı olarak da başlatılabilir (28).

Bcl2 normal prostat da bazal hücreler (kök/progenitor hücreler) tarafından eksprese edilir. Aynı zamanda, özellikle androjen bağımsız tümörlerde olmak üzere, prostat tümörlerinin ciddi bir kısmında da eksprese edilir. Bcl2'nin inhibisyonu, prostat kanserinin potansiyel bir tedavisi olarak araştırılmaktadır (30).

Yerleşim yeri	Olgu sayısı	Kaba hız (yüzbinde)	YSH* (Dünya)
Trakea, bronş, akciğer	12862	37,3	47,7
Mide	3320	9,6	12,2
Mesane	2952	8,6	11
Kolon ve rektum	2545	7,4	9,1
Larinks	2206	6,4	8
Prostat	2099	6,1	8
Lösemi	1747	5,1	5,8
Beyin, sinir sistemi	1354	3,9	4,5
Non-Hodgkin lenfoma	1154	3,3	3,8
Oral kavite	887	2,6	3,2
Karaciğer	713	2,1	2,6
Pankreas	702	2	2,6
Özofagus	578	1,7	2,1
Böbrek	570	1,7	2
Testis	484	1,4	1,3
Hodgkin lenfoma	419	1,2	1,2
Nazofarinks	281	0,8	0,9
Melanom	271	0,8	0,9
Multipl miyelom	224	0,6	0,8
Tiroid	211	0,6	0,7
Diğer farinks	126	0,4	0,5
Tüm yerleşim yerleri (MM** dışı deri hariç)	38041	110,3	137,3

* YSH: yüzbinde, yaşa standardize hız, dünya standart nüfusu

**MM Maliyan Melanom

Şekil 2.2.3.1: Türkiye’de Kanser İnsidansı, erkek (33)

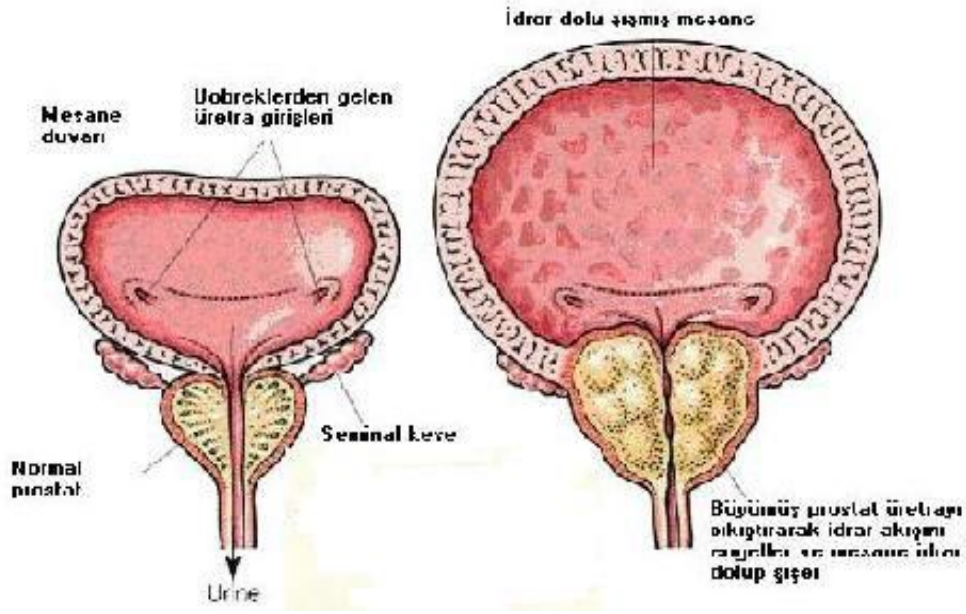
2.3. Prostat Kanseri

Prostat kanseri prostat bezinde meydana gelen hücre proliferasyonu ve hücre ölümü arasındaki dengenin bozularak, organda meydana gelen malign hacim büyümesi olarak tanımlanabilir. Prostat kanserleri prostat asiner hücrelerinden kaynaklanan adenokarsinomlardır (34).

Prostat kanserleri pek çok tip göstermektedir. Bunlar; adenokarsinoma, musinöz adenokarsinoma, prostatik duktal adenokarsinoma, saf küçük hücreli adenokarsinoma, skuamoz ve adenoskuamoz kanserler, sarkomatid karsinoma, (karsinosarkom), transizyonel hücreli kanserler, malign mezenşimal tümörler, prostatik epitelyal neoplazi (PIN), atipik küçük asiner proliferasyon (ASAP)'dır. Bunlardan en sık görüleni %98 görülme sıklığı ile adenokarsinomlardır (2).

Prostat adenokarsinomunun prostat dışına lokal yayılımı, seminal vezikule invazyonu ve uzak metastazları, tumor volumu ve kötü diferansiasyon arttıkça artar. Küçük ve iyi diferansiye tümörler genelde prostata sınırlı iken, büyük veya kötü diferansiye tümörler daha sıklıkla lokal olarak yayılır veya lenf nodları ya da kemiklere metastaz yaparlar (35).

Prostat kanserinin %5-10'unun genetik faktörler tarafından belirlendiği iddia edilmiştir (4). Prostat kanserinde estrogen reseptörleri hem fetal prostatın farklılaşmasında aktivasyon gösterirken aynı zaman da prostatın etiolojisinde ve patogenezinde rol oynuyor (36). Amerika'da erkeklerde en sık görülen kanser, prostat kanseridir. Japonya'da erkek ölümleri içerisinde 7. sırada iken Avrupa'da erkek ölümlerinin %9'unu oluşturmaktadır. Türkiye'de sağlıklı bir istatistik yoktur. Ancak Sağlık Bakanlığı'ndan bildirilen vakalar çerçevesinde yaptığı değerlendirmelerde prostat kanseri ülkemizde 6-7. sıralarda yer almaktadır (Şekil 2.2.3.1) (2).



Şekil 2.3.1: Normal ve büyümüş prostat bezi (37)

Prostat kanserleri prostat açiner hücrelerinden kaynaklanan adenokarsinomlardır. Prostat kanserlerinin %70'i prostatın periferik, %15-20'si santral, %10-15'i transizyonel zondan çıkar. İyi farklılaşmış prostat adenokarsinomları sırt sırta vermiş aralarında çok az stroma bulunan glandüler hücreler çevresinde normal miyoepitelyal hücre tabakasının kaybolduğu küçük bez gruplarıdır (Şekil 2.3.1) (34).

Epidemiyolojik gözlemlere dayanarak prostat kanserinde en azından 3 etiyolojik faktörden söz edilmektedir. Bunlar:

- Hormonal etkiler,
- Diyet ve çevresel faktörler,
- Genetik faktörler

Hormonal Etkiler

Androjen: Prostat kanserinin gelişimi ve ilerlemesi androjenler tarafından etkilenmektedir. Androjenler; testosteron, androstenedion, dihidrotestesteron (DHT), dehidroepiandrosteron (DHEA) gibi erkek cinsiyet hormon topluluğudur (38).

Testesteron, testislerden sentezlendikten sonra pasif difüzyon yolu ile hedef doku hücresine girer. Hücre içindeki testesteron, steroid 5 α -redüktaz enzimi ile ya DHT'ye dönüşür ya da ekstradiol arommatize olur (39).

Yüksek androjen seviyesinin, prostat kanseri riskini artırıp artırmadığını belirlemek için çok sayıda çalışma yapılmıştır. Guess ve arkadaşları ve Barrett-Connor ve arkadaşları prostat kanser riski ile androjen seviyeleri üzerine prospektif çalışmalar düzenlemişler ve testesteron, seks hormon bağlayıcı globulin (SHBG) ya da 5 α -redüktaz ile prostat kanseri arasında bir ilişki bulamamışlardır (40,41).

Bunun aksine, Gann ve arkadaşları testesteron seviyesindeki artış ile prostat kanserinde anlamlı bir artış gözlemlemişlerdir. Ayrıca bu araştırmacılar, prostat kanser riski ile SHBG arasında ciddi bir ters ilişki bulmuşlardır. Yine aynı çalışmacılar testesteron/DHT oranı ve androstenodiol glukuronide düzeyleri ile artmış 5 α -redüktaz aktivitesine sahip erkeklerde, prostat kanseri riskinde ciddi bir artış eğilimi olduğunu bildirmişlerdir (42).

Prostat kanserinin hormonal habercileri hakkında önceden yayınlanmış çalışmaların meta-analizi, total testesteron seviyesinin yüksek olduğu erkeklerde prostat kanseri gelişme olasılığının 2.34 misli yüksek olduğu sonucuna varmıştır (30).

Açıkcası, androjen ve androjen metabolitlerinin prostat kanser riskine katkısının derecesi halen tartışmalıdır (43).

PSA: PSA prostat hücreleri tarafından salgılanan 33.000 Dalton molekül ağırlığında bir Glikoproteindir. Bir serin proteazdır ve semenin sıvılaşmasına yardımcı olur. Genç yetişkinlerde PSA'nın normal değerleri 0-4 ng/ml arasındadır. Yapılan çalışmalarda benign prostat hiperplazisi (BPH)'da PSA yükselmesinin transizyonel zonun boyutu ile orantılı olduğu hesaplanmıştır. İyi farklılaşmış kanser dokusu daha fazla ve farklılaşmamış kanser dokusu ise daha az miktarlarda PSA üretir (34). PSA, Prostatik duktal epitel ve prostatik asini hücrelerinde oluşturulur. Malin özellikte olan hücrelerde sentezlendiği gibi normal yapılı hücrelerde de oluşturulmaktadır (44). Prostat spesifik antijen (PSA) prostat kanserinin erken tanısı, evreleme ve izleminde en önemli belirleyicidir (45).

Diyet ve Çevresel Faktörler: Diyet ile yüksek oranda yağ alımının prostat kanseri insidansını artırdığı düşünülmektedir. Likopen, selenyum ve E vitamininin antioksidan etkileriyle kanserde potansiyel bir negatif faktör olduklarına dair çeşitli çalışmalar yapılmıştır (46). Prostat kanserinin mortalite oranları, tüm dünyada,

ortalama yağ tüketimi ile sıkı korelasyon göstermektedir. Yüksek yağ tüketimi hem in vitro hem de in vivo olarak prostat kanseri hücrelerinin proliferasyonunu uyaramaktadır. Clinton ve arkadaşları, prostat kanserinde, yağsız diyetin androjene bağımlı tümör hücrelerinin büyümesini azaltabileceğini göstermiştir (47).

2.3.1. Prostat Kanserinin Etiyolojisi ve Moleküler Temeli

Genel Etiyoloji

BPH:

- Hiperplazi
- Androjen ve androjen reseptör etkisi
- Östrojenler
- Programlı hücre ölümünün ayarlanması
- Stromal ve epitelyal etkileşimler
- Büyüme faktörleri
- Genetik ve ailesel faktörler

PROSTAT KANSERİ:

- Hücre kinetiğinin bozulması
- Germ hücre mutasyonları
- DNA metilasyonları
- Tümör süpresör genlerinin kaybı
- Büyüme faktörleri
- Stromal ve epitelyal etkileşimler

Moleküler Yapı

Prostat kanserinin moleküler etiyolojisi ise karmaşıktır. Öyle görünüyor ki çok sayıda farklı mekanizma prostat kanseri gelişmesine neden olmaktadır (30).

İsveç ve Amerika'da kalıtsal prostat kanseri üzerinde yapılan çalışmalarda prostat kanseri açısından yüksek risk taşıyan 91 ailede 1.kromozomun uzun kolunda (1q24-25) majör olarak hassas bir alan tanımlanmıştır. Bu hassas alana sahip bireylerde prostat kanseri oluşma eğilimi daha fazla bulunmuştur. Ciddi prostat kanseri hikayesine sahip İsveçli ailelerde yapılan, 65 yaş yaşından önce prostat

kanseri olan tüm bireylerde Kalıtsal Prostat Kanseri 1 (*HPC1*) geninin prostat kanseri ile bağlantılı olduğu kanıtlanmıştır (48,49).

Varlığında kanser gelişimine yatkınlık oluşturan yüksek riskli bazı genler tanımlanmıştır. İlk kalıtsal prostat kanseri lokusu, *HPC1* (50) 1q24-25'te haritalanmıştır. . Diğer bir kaçanesi de: *PCAP* (predisposing for prostate cancer) (51) 1q42.2-43, *HPCX* (52) Xq27-28, *CAPB* (predisposing for prostate cancer and brain) ve *HPC20* (5) 20q-13 lokusları takip etmektedir.

Sitogenetik çalışmalara bakıldığında, prostat kanserlerinin %25'inde Kromozomal anomaliler olduğu görülmüştür (53).

Prostat Kanseri İnisiyasyonu

Sporadik Prostat Kanseri: Prostat kanserlerinin %90' dan fazlasının sporadik olarak olarak oluştuğuna inanılır. 1. Kromozom 8p'deki heterozigositenin kaybı: Sporadik prostat kanserlerinin analizi sonucunda, sıklıkla kromozom 8p'nin üzerinde lokalize olmuş birkaç tane potansiyel tümör süpressör alan saptanmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda primer prostat kanseri olan erkeklerde kromozom 8p bölgesinde delesyonlar saptanmıştır (23).

Apoptoz ve Prostat Kanseri Arasındaki İlişki

Serbest oksijen radikalleri; inflamatuvar hastalıklar, nörodejeneratif hastalıklar, ateroskleroz, kanser vb. birçok hastalığın temelini oluşturmaktadır. İnflamatuvar hücreler tarafından üretilen oksidatif stres ürünlerinin karaciğer, gastrik ve diğer epitelyum kanserlerinde olduğu gibi prostat kanseri oluşumunda da öncülük eden mekanizmalardan biri olduğu savunulmuştur. Diğer taraftan prostat kanserlerini diğer kanserlerden farklı yapan özellik, prostat kanserlerinin multifokal yapıda olmasıdır. Buradaki önemli özellik DNA hasarındaki defekt ve yolaktaki kontrol merkezlerinin belirtileridir.

Oksidatif stres, prostat kanserinin gelişimini etkilemekte ve ayrıca hipoksi, inflamasyon ve sıklıkla DNA baz değişikliklerine bağlı olmaktadır (54).

Genetik faktörler

Prostat kanserinin, iki formunun (latent- klinik evre) bulunması nedeniyle solid tümörler arasındaki yeri farklıdır. Amerikan toplumunda histolojik ya da latent formu, 50 yaş üstü erkeklerin %30'unda, 80 yaş üstü erkeklerin %60-67'inde bulunur, klinik formu ise yaklaşık her 6 erkekten birini etkiler.

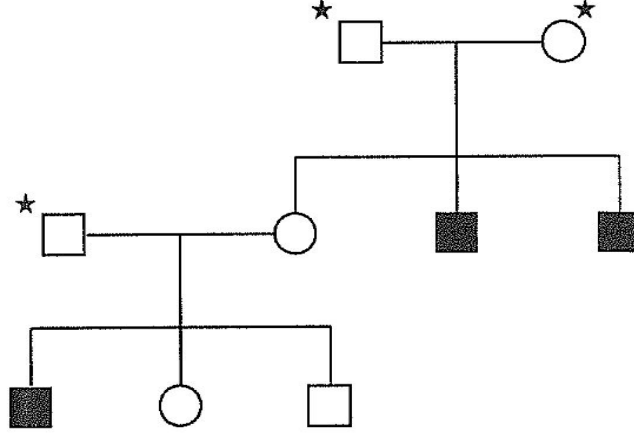
Latent prostat kanserinin tüm dünyada ve etnik gruplarda benzer prevalansa sahip olduğuna inanılmaktadır. Bununla beraber, klinik prostat kanserinin insidansı, farklı ülkeler arasında ve içinde dramatik olarak farklılık gösterir. Bu nedenle prostat kanserinin etiyolojisinin anlaşılması için hem histolojik kanserin başlamasına, hem de klinik invaziv prostat kanseri progresyonuna yol açan basamakların bilinmesi gerekmektedir.

Prostat kanserinin ailevi olarak arttığı gösterilmiştir. Babalarında ya da erkek kardeşlerinde prostat kanseri olan erkeklerin bu kansere yakalanma risklerinin oldukça fazla olduğu, meme ya da kolon kanserine yakalanmış olan kişilerin aile yakınlarında da prostat kanseri riskinin yine daha fazla olduğu belirlenmiştir (55).

Kalıtsal Prostat Kanseri

Kalıtsal prostat kanseri, bir çekirdek aile içinde 3 etkilenmiş akrabanın, 3 kuşakta ve 55 yaşından genç 2 akraba kişide görülmeleri ile tanımlanmıştır. Kalıtsal prostat kanseri taşıyan ailelerin ayırıcı analizleri ile otozomal dominant geçişli, yüksek riskli alellerde taşıyıcı olarak bulunup, erken yaşta prostat kanserine yatkınlık gösterdiği saptanmıştır.

Tüm prostat kanserlerinin sadece %9'u kalıtsal geçişli olmakla birlikte 55 yaşın altında görülenlerin %43'ünden sorumludur (56). Prostat kanserinin kalıtsal formunda bulunan genlerin sporadik prostat kanseri gelişiminde rol oynayabileceği düşünülmektedir (Şekil 2.3.1.1) (57,58).



Şekil 2.3.1.1: Prostat kanserinde ikincil kuşak üç akrabanın etkilendiği kalıtım örneği (59)

■ Prostat kanserli, □ Etkilenmeyen erkek, ○ Kadın, ☆ Prostat kanseri öyküsü olmayan

Prostat Kanseri ilişkili Genler

Kalıtsal prostat kanseri 1 geni (HPC1)

Kalıtsal prostat kanseri üzerine İsveç ve Amerika da yapılan bir çalışmada prostat kanseri açısından yüksek risk taşıyan 91 ailede 1. kromozomun uzun kolunda (1q24-25) majör hassas bir alan tanımlanmıştır. Bu alana sahip kişilerde prostat kanseri daha erken çıkma eğilimindedir. Ciddi prostat kanseri hikayesi olan İsveçli aileler arasında yapılan çalışmada, 65 yaşından önce prostat kanseri olan tüm bireylerde Kalıtsal Prostat Kanseri 1 (HPC1) geninin prostat kanseri ile bağlantılı olduğu kanıtlanmıştır (48,49).

CAPB (Capping Protein Beta) geni

Yüksek riskli ailelerin incelenmesi, multipl hassas alanların tanımlanmasına yol açmıştır. Bu da birden fazla kalıtsal prostat kanseri geninin olabileceğini düşündürmektedir (genetik alan heterojenitesi). Araştırmacılar, HPC1 geninde olduğu gibi, bu alan ile bağlantının da hastalığın erken ortaya çıkması ile ilişkili olduğunu belirtmişlerdir. Bir grup araştırmacı da 1p36'da (CAPB) nadir bir hassas

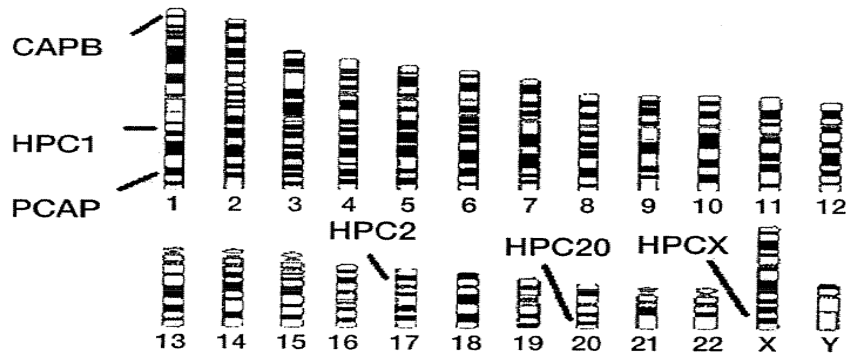
alanı olduğunu bildirmişlerdir. İlginç olan, CAPB geni hem prostat kanseri hem de beyin kanseri ile ilişkilidir (30).

HPCX geni

HPCX geninin ailesel kanserlerin %16'sından sorumlu olduğuna inanılmaktadır. Xu ve Arkadaşları Kuzey Amerika, İsveç ve Finlandiya'dan prostat kanserli 360 aileyi inceledikleri çalışmalarında, kromozom Xq27-28 alanında hassas bir alanı tanımlamışlardır (60).

Özet olarak Herediter Prostat Kanseri (HPC) kompleks bir problemdir. Genetik alanda herediter prostat kanserine neden olan birden fazla genin varlığı prostat kanseri ile ilişkili hassas genlerin tanımlanmasını güçleştirmektedir (30).

Prostat kanserinde yatkınlık oluşturan genler Şekil 2.3.1.2'de gösterilmiştir.



Şekil 2.3.1.2. Kalıtsal prostat kanseri yatkınlık genleri (61).

Prostat Kanserinde Risk Faktörü

Prostat kanseri multifaktöriyel bir hastalık olup, ortaya çıkışında etnik farklılıklar, ileri yaş, sigara kullanımı, beslenme ve genetik faktörler bulunmaktadır (62). Prostat kanserinin %5-10'unun genetik faktörler tarafından belirlendiği iddia edilmiştir (4).

Prostat kanseri riskinin genetiğine bakıldığında, birinci dereceden akrabaları arasında prostat kanserli bir yakını olan bireylerdeki risk faktörü kontrol gruplarındaki bireylere göre iki kat, iki yakını prostat kanseri olan bir bireyde ise 5 kat artmaktadır (56). Ayrıca segresyon analizlerine bakıldığında, erken yaş prostat

kanserlerinde nedenin otozomal dominant kalıtmımlı bir genin rol oynadığı görölmüştür (56,63).

Kalıtsal prostat kanseri riski bulunan kişiler “Hopkins Kriterleri” olarak adlandırılan özelliklere sahiptir. Bu özellikler: prostat kanserinin birinci kuşak akrabalar arasında en az 3 kişide görölmesi, maternal veya paternal geçişli üç kuşakta prostat kanseri görölmesi ve 55 yaşın altında en az iki yakınının etkilenmesidir (63).

2.3.2. Prostat Kanseri Epidemiyolojisi

Dünyada prostat kanseri erkeklerde en sık görölen kanserler arasında dördüncü sıradadır (23).

İnsidansı

Prostat Kanseri insidansı ülkeden ülkeye farklılık göstermektedir (Tablo 2.3.2.1). Gelişmiş batılı ülkelere insidans, gelişmekte olan ülkelere oranla daha yüksektir. Bunun birçok nedeni olmakla beraber en önemli nedenleri genetik ve çevresel faktörlerdir (3).

Dünya genelinde bütün kanserlerin %32’sini oluşturmaktadır. ABD’de cilt kanserinden sonra ikinci sırayı almaktadır (64,65). İskandinav ülkelerinde prostat kanseri insidansı güney Avrupa ülkelerine göre daha yüksektir. Asya ülkeleri, özellikle Japonya ve Çin dünyada en düşük prostat kanseri insidansına sahiptir (23)

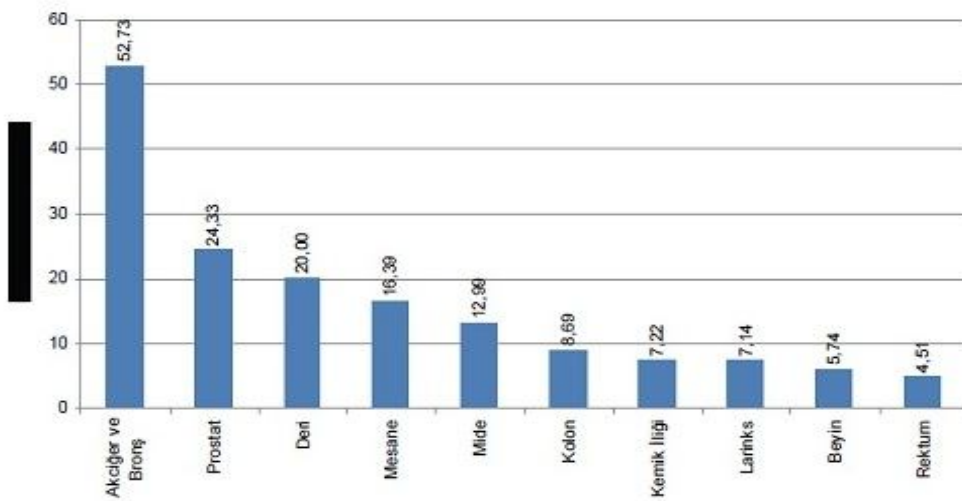
Türkiye’de, Sağlık Bakanlığının, bildirilen vakalar çerçevesinde yaptığı değerlendirmelerde ise prostat kanseri 6-7. sıralarda yer almaktadır (2).

Türkiye’de erkeklerde görölen ilk on kanser türü içinde ise 2. sırayı almaktadır (Tablo 2.3.2.2). (2)

Tablo 2.3.2.1: Çeşitli ülkelerde prostat kanseri insidansı ve mortalite oranları (3)

	İnsidans (/100 bin)	Mortalite (/100 bin)
Kuzey Amerika	119.9	15.8
Avustralya	79.9	18.1
Batı Avrupa	61.6	17.5
Kuzey Avrupa	57.4	19.7
Güney Amerika	47.0	18.0
Güney Afrika	40.5	22.4
Güney Avrupa	35.5	13.2
Batı Afrika	19.3	16.0
Japonya	12.6	5.7
Batı Asya (Türkiye dahil)	10.9	6.0
Orta Asya	4.4	2.8
Çin	1.6	1.0

Tablo 2.3.2.2: Türkiye’de erkeklerde görülen ilk on kanser türü (33).



Yaş

Prostat kanseri sıklıkla ileri yaş hastalığıdır. A.B.D.' de yeni prostat kanseri tanısı konulan erkeklerin %75'i 65 yaşından daha yaşlıdır. Ancak, 50-59 yaş arasında olan erkeklerin prostat kanseri tanısı alması 1970'li yıllardan sonra belirgin bir şekilde artmıştır. Yeni tarama testlerinin ortaya çıkmasıyla klinik olarak erken teşhis edilen vakaların sayısında artış olmuştur. Dolayısı ile hastalık daha erken yaşlarda teşhis edilmektedir. Bu yüzden hastalık orta yaş hastalığı haline gelmiştir (23,66).

Mortalite

A.B.D.' de 1990' lı yıllarda her yıl 40 bin kişi prostat kanserinden dolayı ölmekte iken bu oranın 1999' da 37400' e, 2000 yılında ise 31400' e düşeceği bekleniyordu ki bu yaklaşık %25' lik bir azalmaya tekabül eder. A.B.D.' de kanser mortalitesindeki bu azalmaya rağmen Avrupa'nın bazı bölgelerinde azalmamıştır. Güneydoğu Hollanda'daki mortalite 1994'den bu yana artmaya devam etmiş ve 33/100.000 seviyesine ulaşmıştır. (23).

Prostat Kanserinin Tarihçesi

Prostat kanseri ilk kez 1817 yılında Londra'lı doktor George Langstaff tarafından tıp literatüründe tanımlanmıştır. 1904 yılında Johns Hopkins Hastanesi' nde çalışan Young adındaki bir cerrah da ilk kez prostatı radikal perineal prostatektomi ile çıkartmıştır. Bu teknik sonraları, 40 yaş ve üzerindeki erkekler için prostat kanserinin yarattığı yan etkileri azaltmada kullanılmıştır (67).

2.3.3 Prostat Kanserin Patolojisi

Prostat kanserleri pek çok tip göstermektedir. Bunlar; adenokarsinoma, musinöz adenokarsinoma, prostatik duktal adenokarsinoma, saf küçük hücreli adenokarsinoma, skuamoz ve adenoskuamoz kanserler, sarkomatid karsinoma, (karsinosarkom), transizyonel hücreli kanserler, malign mezenşimal tümörler, prostatik epitelyal neoplazi (PIN), atipik küçük asiner proliferasyon (ASAP)'dır. Bunlardan en sık görüleni %98 görülme sıklığı ile adenokarsinomlardır (2).

Genelde tümör prostatın dış kısmından homojen, düzensiz ve sert alanlar olarak belirlenir. Tümör kıvam olarak memenin skiro karsinomuna benzer. Rengi gri, gri-beyaz ya da beyaz-sarı olabilir (68).

Prostatik İntraepitelyal Neoplazi (PİN)

PİN, invazif prostat kanserinin prekürsörüdür. İnvazif prostat kanserinin ayırıcı kritik özelliği glanduler yapıdaki bazal hücre tabakasının olmamasıdır. Oysa PİN’deki sitolojik özellikler prostat kanserindekiyle aynı olmasına rağmen bazal hücre tabakası mevcuttur (69). PIN mikropapiller, kribriform, düz ve demetler halinde olmak üzere 4 yapısal forma sahiptir. PIN’de bazal tabaka sağlamdır; fakat hücre proliferasyonu, nukleus ve nukleolus hacminde artış gözlenir (1,70).

PİN, yaşla artmakla beraber 20-30 yaşlarında dahi %10-20 oranında rastlanır. Gençlerde görülen, daha düşük grade’li PİN’lerdir. 50 yaşın üzerinde prostat kanseri olanların %82’de, olmayanların %43’de yüksek grade’li PİN görülür. Kanser hacmi ne kadar fazla ise, PİN hacmi de o kadar fazladır (22).

Gleason Derecelendirmesi

Prostat kanserinin histopatolojik olarak derecelendirilmesi Donald Gleason tarafından geliştirilen ve dünya çapında kabul gören Gleason derecelendirme sistemine göre gerçekleştirilmektedir (71).

Gleason sisteminde 2-4 iyi, 5-7 orta ve 8-10 kötü derecede farklılaşmış kanserleri göstermektedir. Gleason derecelendirmesinde, kanserli bezlerin özellikleri 5 histolojik model içinde farklılaşmaktadır ve en fazla farklılaşan model I iken, en az farklılaşan model V’dir (72,73).

Adenokarsinom

Adenokarsinom, prostat kanseri tipleri içinde yaklaşık %98 lik bir oranla karşımıza çıkmaktadır (2).

Prostat adenokarsinomunun prostat dışına lokal yayılımı, seminal veziküle invazyonu ve uzak metastazları, tümör volümü ve kötü diferansiasyon arttıkça artar. Küçük ve iyi diferansiye tümörler genelde prostata sınırlı iken, büyük veya kötü diferansiye tümörler daha sıklıkla lokal olarak yayılır veya lenf nodları ya da kemiklere metastaz yaparlar (35).

Tümör yayılımı: Periferik yerleşimli adenokarsinomlar perinöral aralık invazyonu vasıtası ile lokal olarak prostat dışına yayılıma eğilimlidirler. Prostat adenokarsinomunun, prostat dışına yayılımı çoğu tumorlerin lokalizasyonuna paralel olarak genellikle posterior ve posterolateral bölgeden olur. Tümör prostatın

tabanından prostatik kapsülü penetre ederek peri-seminal veziküler yumuşak dokuya ulaşabilir ve buradan da seminal vezikülü tutabilir (23).

Sitogenetik çalışmalara bakıldığında, prostat kanserlerinin %25'inde Kromozomal anomaliler olduğu görülmüştür (53).

Prostat Kanserinin İlerlemesi

Prostat kanseri hem latent, hem de klinik formunun bulunması ile kendine özgü bir kanserdir. Her ne kadar prostat kanserinin başlamasına yol açan çalışmalar oldukça önem taşısa da, daha önemlisi histolojik olarak benign olan tümörün klinik malign tümöre dönüşümüne yol açan biyolojik olayların daha iyi anlaşılmasıdır ve bu hastalık için yeni önleyici ve tedavi edici stratejilerin geliştirilmesine olanak sağlayacaktır. Prostat kanserini ilerlemesinde ve metastazında rol oynadığı düşünülen birçok gen, kromozomal anomaliler ve sinyal yolları vardır (30).

2.3.4. Yeni Gelişmeler: Genomik ve Postgenomik Dönemler

İnsan genomunun tamamının dizilimi açıklanmıştır. Bu dizilimin daha detaylı incelenmesi prostat kanseri ile ilgili anormal kromozom bölgelerinde yer alan onkogen ve tümör süpresör genlerin keşfini hızlandıracaktır. Araştırmanın bundan sonraki dönemi (post-genomik dönem) DNA'da kodlanmış olan genlerin fonksiyonlarını ve birbirleriyle olan etkileşimlerini açığa çıkartacaktır (30).

2.4. Farmakogenetik

Farmakogenetik, bireyler arasındaki ilaca cevabı belirleyen genetik faktörleri inceleyen bilim dalıdır (74,75). Diğer bir deyişle genetik polimorfizmler bireyin farmakolojik ajanlara cevabını etkiler. Bu etkileşimlerin çalışılması farmakogenetik olarak adlandırılır (76).

İlaçların çoğu karaciğerde metabolize edilmektedir ve genellikle ilaçların çoğu intestinal Emilimi kolaylaştıracak şekilde lipofilik yapıda olduklarından, biyokimyasal olaylar ile önce hidrofilik yapılara dönüştürülürler ve sonrasında idrarla atılırlar. Bu işleme biyotransformasyon denilir. Biyotransformasyon, ilacın atılabilir hale getirilmesinin yanında, bazı ilaçların aktif hale getirilmesi için de gerekli bir işlemdir. Biyotransformasyon sonrasında oluşan metabolitler bazen toksisiteden sorumlu olabilirler. Bu olayda enzimlerin katalitik hızları da önemli bir

oyunar. Çünkü hızlı veya yavaş çalışmalarına göre toksik olabilen ara metabolitler de birikebilir. Enzim aktivitesi, o enzimi kodlayan gendeki polimorfizmler nedeniyle insanlar arasında değişkenlik gösterebilir. Bu nedenle her ilaç her kişide aynı etkiyi yaratmayabilir ve standart tedavi rejimi yerine kişiye özgül tedavi rejimi uygulanması gerekebilir (77).

2.4.1. Faz I ve Faz II Reaksiyonları

Faz I reaksiyonlarında yükseltgenme, indirgenme ve hidroliz gibi reaksiyonlar ile substratlara aktif gruplar eklenerek, faz II konjugasyon reaksiyonları için substrat hazırlanır (78).

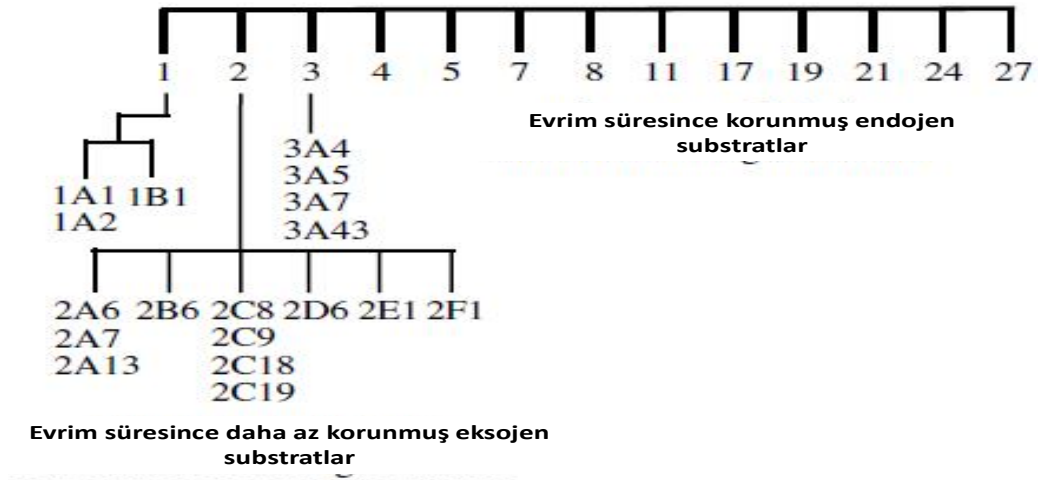
Faz II' de ise sülfat, asetat, glukuronik asit, glutatyon ve glisin gibi endojen maddeler ile konjugasyon reaksiyonları gerçekleştirilir ve ara metabolitlerin polariteleri arttırılarak, böbrek ya da gastrointestinal sistemden atılımları sağlanır. Tüm bu basamaklarda görev alan enzimler genetik polimorfizmlerden etkilenebilecekleri gibi; çevresel faktörler, hastalıklar ve ilaçlardan da etkilenebilmektedirler (79,80).

2.5. Sitokrom P450 Enzim Ailesi

Sitokrom P450 (CYP450) monooksijenaz enzimleri olgun eritrosit ve iskelet kası hücreleri dışında, tüm memeli hücre tipleri ve prokaryotlarda bulunan bir hem-protein ailesini teşkil ederler. Bu enzimler 450 nm' de absorbans gösterdiklerinden sitokrom P450' ler olarak isimlendirilmişlerdir. İnsan genomunda 57 tane CYP450 kodlayan gen bulunmaktadır (5).

İnsan CYP2C subfamilyası enzimleri 10. kromozomun 10q24.2 bölgesinde kodlanmış olup, 300 kilo baz genomik DNA içerir. Baz dizilimi benzerliklerine göre P450 sistemi 40 farklı aile içinde sınıflandırılır (81).

Memelilerdeki tüm CYP450' ler membrana bağlı şekilde bulunurlar. Çoğu endoplazmik retikulumda bulunmalarına karşılık, mitokondride lokalize olanları da vardır (82). Sitokrom p450 ailesi CYP1, CYP2, CYP3, CYP4 ve CYP>4 enzimlerinden (Şekil 2.5.1) oluşur (83).



Şekil 2.5.1: İnsan genomundaki aktif p450 genleri (84)

Sitokrom P450 Enzimleri, en çok karaciğer hepatositlerinde olmak üzere gastrointestinal kanal mukazası ve lümeni, akciğerler, böbrekler, cilt santral sinir sistemi, plazma eritrositler, ağız mukozası, diş etleri ve plasenta gibi birçok yapıda bulunur (85).

Bugüne kadar gerçekleştirilen çalışmalarda *CYP450* enzim ailesinin karsinogenez üzerindeki bazı etkileri ortaya konulabilmektedir. Örneğin, akciğer kanseri ile ilgili yapılan bir çalışmada, sigara içenlerde akciğer kanseri riskinin periferik kan lenfositlerindeki *CYP1A1* ve *CYP1B1*'in indüklenmesi sonucu gerçekleştiği ortaya konmuştur (86). Ayrıca benzer bir çalışmada *CYPD6*'nın rolünden de bahsedilmiş ve zayıf metabolizör fenotipe sahip olan ve sigara içen olgularda akciğer kanseri riskini azalttığı görülmüştür (87).

Testosteron metabolizmasında yer alan *CYP3A4*'deki bir polimorfizmin prostat kanserine yatkınlık oluşturduğu gösterilmiştir (88).

Örneğin karaciğer *CYP2C9* enzimi aktivitesi doğumdan hemen sonra aktif hale geçerken enzimin aktivitesi zamanla yaş ile ters orantılı olarak aktivitesinde azalma oluşur (89). *CYP* gen ve enzimlerinin sayısının bu kadar fazla olmasına rağmen içlerinden sadece *CYP1*, *CYP2* ve *CYP3* ailelerine ait enzimlerin ilaç metabolizmasında majör rol oynadıkları belirlenmiştir. Diğer *CYP* ailelerin ara metabolizmalarda esansiyel rolleri vardır (90).

Endojen olarak sentezlenen birçok bileşik *CYP450*'lerin substratlarını teşkil ederler. Bu bileşikler, prostaglandin lökotrienler dahil yağ asitleri, steroidler, yiyecek katkı maddeleri ve ilaçlar yanında besinlerle, enjeksiyonla, havadan inhalasyonla ya da deriden absorpsiyonla vücuda giren endüstriyel maddelerdir. *CYP450* enzimleri, ilaç biyotransformasyonu ve metabolizmasındaki en önemli basamakları katalizlerler. Burada görev alan enzimler indüksiyon veya inhibisyon gibi sayısız mekanizmalarla değişime uğrayabilirler veya bireyler arasında oldukça farklı formlarda ortaya çıkabilir (5,91).

CYP450'ler fonksiyonlarını yerine getirmek için bir elektron transfer zincirine ihtiyaç duyarlar. Endoplazmik retikulum içindeki bu kaynak NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzimidir. Mitokondrial P450'ler demir-sülfür protein adrenodoksin ve flavoprotein adrenodoksin redüktazlı elektron transport zincirinden faydalanırlar. Mitokondride ayrıca elektronlar redoksin redüktaz ile NADPH tarafından redoksine transfer edilir ve ardından *CYP*'lere transfer edilirler (92,93).

2.5.1. CYP2C Ailesi

CYP2C ailesi, karaciğer mikrozomlarında bulunan CYP'lerin yaklaşık %18'ini oluşturmaktadır. Ayrıca günümüzdeki ilaçların yaklaşık olarak %20'sinin CYP aracılığıyla gerçekleşen metabolizma reaksiyonlarında katalizör olarak işlev görmektedir. CYP2C alt ailesinin insanda esas olarak karaciğerde bulunan *CYP2C8*, *2C9*, *2C18* ve *2C19* olmak üzere bilinen dört üyesi vardır (94).

Metabolizmada rol oynayan mikrozomal enzimler içersinde spesifik önem taşıyan bir gruptur. İnsan Karaciğerindeki total sitokrom P450 enzimlerinin yaklaşık %18'ini oluşturmaktadır (95). *CYP2C* alt ailesinde *CYP2C9* ve *CYP2C19* enzimleri polimorfiktir ve metabolizmada önemli rolleri vardır (96,97).

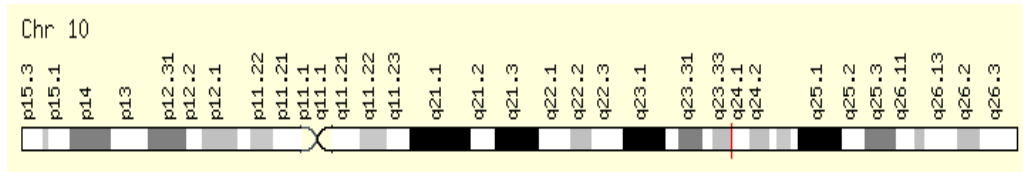
2.5.2. CYP2C9

Sitokrom P-450 *2C9* enzimi, polimorfik olduğu saptanan enzimlerden biridir. Bu enzimin aktivitesi bireyler arası ve topluluklar arası önemli farklılıklar göstermektedir. *CYP2C9* aktivitesinde etken rol oynayan iki önemli mutasyon *CYP2C9*2* ve *CYP2C9*3* varyantlarıdır (98).

CYP2C9 cDNA'sı 490 aminoasitlik ve moleküler ağırlığı 55.6 KD olan proteinler kodlamaktadır. *CYP2C9* proteini üzerinde 6 adet substrat bağlanma bölgesi bulunmaktadır (99).

*CYP2C9*2* ve *CYP2C9*3*'ün allelik sıklıkları toplumlar arasında belirgin farklılıklar gösterir. Beyazlarda *CYP2C9*2* ve *CYP2C9*3*'ün allelik sıklıkları %8-20 ve %6-10' dur. Asyalı ve Afrika kökenli Amerikalı popülasyonlarda bu farklılık daha az sıklıktadır. *CYP2C9*2* Asyalı toplumlarda yoktur ve Afrika kökenli Amerikalılarda %1-2 sıklıktadır. *CYP2C9*3* Asyalılarda %1-4 sıklıkta ve Afrika kökenli Amerikalılarda %1-2 sıklıktadır (76).

Yaş da *CYP2C9* un aktivitesinde farklılık oluşturan önemli bir faktördür. Çünkü yaşlılarda yaşla orantılı olarak karaciğer enzim aktivitesinde azalma görülmektedir (100). Örneğin karaciğer *CYP2C9* enzimi aktivitesi doğumdan hemen sonra aktif hale geçerken enzimin aktivitesi zamanla yaş ile ters orantılı olarak aktivitesinde azalma oluşur (89).



Şekil 2.5.2.1: *CYP2C9* genin lokalizasyonu (101)

2.5.3. *CYP2C9* gen yapısı ve polimorfizmi

İnsan *CYP2C9* subfamilyası enzimleri 10. kromozomun 10q24,2 bölgesinde kodlanmış olup, 300 kilo baz (kb) genomik DNA içerir (102). *CYP2C9* geninin regülatör ve kodlayan bölgelerinde 50'den fazla polimorfizm tanımlanmıştır. Avrupa popülasyonlarında en yüksek frekansa sahip olan alleller %12,2 ile *CYP2C9*2* ve %7.9 ile *CYP2C9*3* varyantlarıdır (103). *CYP2C9* geni 9 ekzon içermektedir (104). (Şekil 2.5.2.1).

2.5.4. Sitokrom P450'ler ve kanser

Bugüne kadar gerçekleştirilen çalışmalarda *CYP450* enzim ailesinin karsinogenez üzerindeki bazı etkileri ortaya konulabilmiştir. Örneğin, akciğer kanseri ile ilgili yapılan bir çalışmada, sigara içenlerde akciğer kanseri riskinin periferik kan lenfositlerindeki *CYP1A1* ve *CYP1B1*' in indüklenmesi sonucu gerçekleştiği ortaya konmuştur (86). Diğer bir çalışmada *CYP2D6*' nın rolünden de bahsedilmiş ve zayıf metabolizör fenotipine sahip sigara içen olgularda akciğer kanser riskini azalttığı belirtilmiştir (87).

Testosteron metabolizmasında yer alan *CYP3A4*' deki bir polimorfizmin prostat kanserine yatkınlık oluşturduğu gösterilmiştir. Bu polimorfizm, *CYP3A4* geninin promoter bölgesindeki -392. pozisyonundaki A nükleotidinin G nükleotidine transisyonu sonucu gelişmektedir (88). *CYP3A4* polimorfizmi özellikle beyaz ırkın prostat kanserine daha yatkın olmalarına neden olmaktadır. Polimorfik G aleline sahip bireylerdeki prostat kanseri geliştirme riski 6-kat fazladır. Fakat aynı polimorfizmi taşıyan Afro-Amerikalılar'da çelişkili sonuçlar elde edilmiştir. Bunun nedeni, iki ırk arasındaki farklılıklara dayanmaktadır (105,106).

2.6. K Vitamini

K vitamin 1930 yılından önce Danimarka'lı biyokimyacı Henrik Dam tarafından keşfedilmiştir (107).

2 Metil-1,4-naftakinon- grubu içeren ve poliizoproneid bir zincirle substitüe edilmiş olan çeşitli naftakinon türevleri K vitamini etkinliği gösterirler.

K1 Vitamini (Fitonadion veya filakinon), ana gruba bağlanmış olarak Fitil grubu içerirler. Bu vitamer yeşil bitkilerin yapraklarında sentezlenir. İlaç olarak tercih edilen K vitamini türüdür. Karaciğerde metabolize olur.

K2 Vitamini (Menakinon), mikrobik kaynaklıdır, Fermantasyon yapan mikroorganizmalar tarafından ve insanda terminal ileum ve kolonda yerleşmiş olan barsak florası bakterileri ve diğer bazı bakteriler tarafından sentezlenir.

K Vitamini serisinin ana ürünlerinden olan vitamin K3 (Menadion) sentetik bir maddedir doğal olarak bulunmamaktadır. Organizmaya verildiğinde in vitro ortamda menakinonlardan birine alkile olmaktadır (108).

2.6.1. K vitaminin Farmakokinetiği ve Etki Mekanizması

Yağda çözünen bir vitamin olarak safra tuzu ve pankreatik lipaz varlığında gastrointestinal sistemden absorbe edilir. Absorbe edildikten sonra karaciğer, dalak ve akciğerlerde toplanır, fakat vücutta uzun süre depolanamaz. Vitamin K'nın farmakokinetik mekanizmaları tam olarak bilinmemekle birlikte, klinik kullanımda yararları açıktır. K vitamini proteinleri karboksile ederek etkisini ortaya koyar ve nükleer transkripsiyon faktörü için ligand (Vit K2) olarak görev yapar. Biyolojik etkileri; koagülasyon dışında, kemik oluşumu, nöronal fonksiyon ve kan damarlarındaki kalsifikasyon üzerinedir (109).

Vitamin K birçok biyokimyasal yolda kofaktör olarak görev alır. Bunların en önemlisi vitamin K bağımlı karboksilasyon reaksiyonlarıdır. Bu reaksiyonlarda vitamin K'nın indirgen formu (kinol), γ - glutamil karboksilaz enzimi ile glutamatın (Glu), γ -karboksi glutamata (Gla) dönüşümünü sağlarken kendisi epoksit (kinon) formuna dönüşür, bu enerji gerektiren bir reaksiyondur (9).

2.6.2. K Vitamininin Fizyolojik Önemi

K Vitaminlerinin temel fonksiyonunun, kemiklerdeki osteoblastlar ve karaciğer hücrelerinde fonksiyonel önemi olan proteinlere bağlı glutamat rezidülerinin, gama-karboksiglutamata (Gla) dönüştürülmesi olduğuna inanılmaktadır. Bu olay gama-karboksilaz enzimi tarafından katalize edilir. Reaksiyona gerekli enerji, hidrokinin formunun K vitamini hidrokinon formunun K Vitaminini epoksid formuna dönüşmesi ile sağlanır. İlk blunan Gla'lanmış protein, Protrombin'dir (108).

Vitamin K'nın kofaktör görevini sürdürebilmesi için kinon formunun kinol şekline indirgenmesi gerekir. Bu dönüşüm vitamin K epoksit redüktaz kompleks subünit 1 (VKORC1) enzimi ile olur (10).

K vitamini kemik yapımı üzerine güçlü etkisinden dolayı özellikle osteoporozda tedavi amaçlı olarak kullanılmaktadır. Osteoporoz kırıklarında kemik gelişimini kolaylaştırdığı ifade edilmektedir (110).

K vitamini kanın pıhtılaşmasında önemli bir faktördür. Buna ek olarak yapılan son çalışmalarda ise kemik metabolizmasında da kofaktör rolü olduğu gösterilmiştir. K vitamini kan pıhtılaşmasında, plazma proteinlerinden faktör II, VII,

IX, X ve bunların yanı sıra protein C, protein S ve protein Z'nin post-translasyonel modifikasyonunda kofaktör olarak işlev görmektedir (111).

Ayrıca K vitamininin kanser hücrelerinin büyümesini *in vivo* ve *in vitro* olarak inhibe ettiği de tespit edilmiştir. Bundan başka ateroskleroz ve kalsifiye arteriyel plak önlenmesi ve tedavisinde de önemli bir kofaktör olabileceği düşünülmektedir (11,12).

2.7. Pıhtılaşma Mekanizması ve K vitamini

Pıhtılaşma kanamanın durması sırasında, damar dışında ve tromboz sırasında, damar içinde meydana gelir. Trombositlerin aktive edilmesi ve onlarla, pıhtılaşma faktörleri olarak adlandırılan özel proteinlerin etkileşmesi ile karakterize olaylar zinciridir (108).

Pıhtılaşma yolları birincisi intrinsek, ikincisi ekstrinsek olmak üzere iki ana başlıkta toplanabilir (112).

2.7.1. Pıhtılaşmanın intrinsek (plazma içinde) yolu

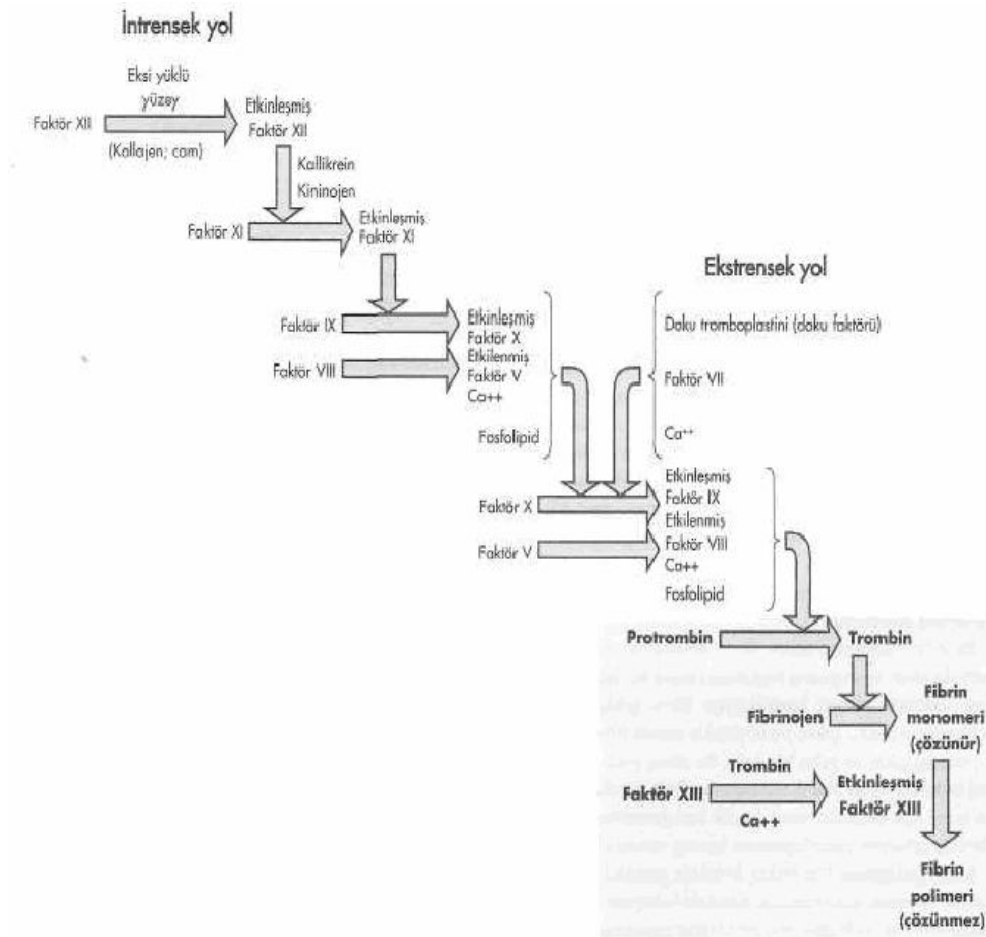
Negatif yüklü bir yüzeyde; yüksek molekül ağırlıklı kininojen, prekallikrein, faktör XII ve faktör XI'in yan yana gelmesi ile intrinsek yol başlatılır. Sonuçta Faktör XII'nin bir kısmı, kimyasal yapısının değişmesi sonucu faktör XIIa (aktive edilmiş faktör XII) haline geçer. Faktör XIIa, faktör XI'i uyarır (faktör XIa). Bu da faktör IX'u aktive eder (faktör IXa). Faktör IXa, kofaktörü olan faktör VIIIa, kalsiyum ve fosfolipid bir yüzeyle beraber faktör X'u aktive eder (faktör Xa). Böylece faktör Xa, kofaktörü olan faktör Va, kalsiyum ve fosfolipid bir yüzeyle beraber protrombin (faktör II) kompleksini oluştururlar (112).

2.7.2. Pıhtılaşmanın ekstrinsek (plazma dışında) yolu

Kanda varolan faktör VII, doku faktörü (TF) ile karşılaştığında ekstrinsek yol çalışmaya başlar. TF, kalsiyum ve faktör VII ile bir kompleks oluşturur. Sonuçta faktör VII aktive edilir (faktör VIIa). TF- faktör VIIa ilişkisi, faktör X'u uyarak ortak yola katılırlar. İntrinsik yol ile ekstrinsek yol, faktör X'un uyarılması ile (faktör Xa) beraber ortak yolda buluşurlar (112).

İntrinsik yol üzerinde oluşan pıhtılaşma dakikalarca sürdüğü halde, ekstrinsek yol üzerinden oluşan saniyelerle ölçülecek kadar kısa bir zamanda tamamlanır (108).

İntrinsik ve ekstrinsek yollarının mekanizması Şekil 2.7.1'de gösterilmiştir



Şekil 2.7.1: Fibrin pıhtısının oluşmasında intrinsik ve ekstrinsek yollar (113).

2.7.3. K Vitamini gama-karboksilasyonu

Karboksilasyon oluşumu, K vitamininin düşük formu olan K vitamini 2–3 epoksite (vitamin KH₂) kofaktör olarak ihtiyaç duyar (114).

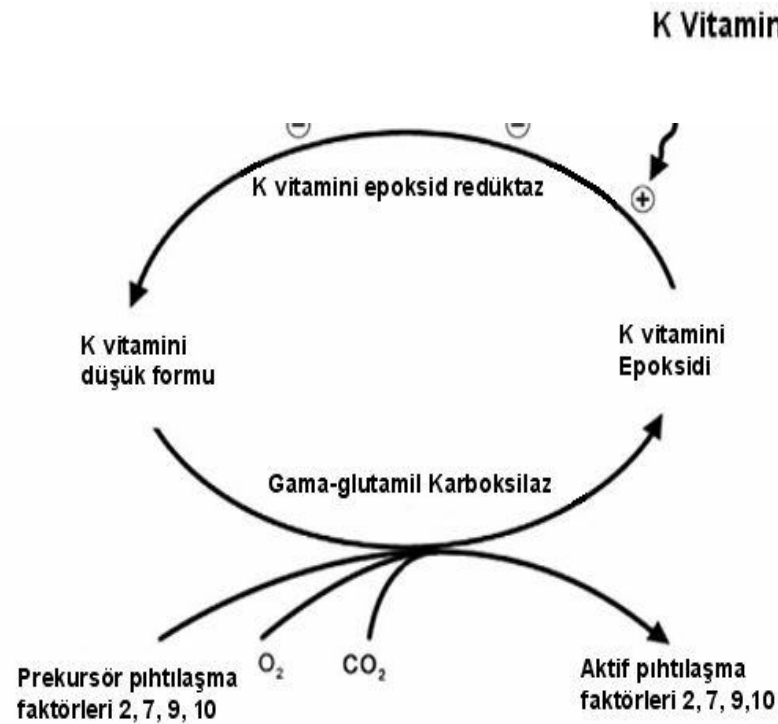
Karboksilasyon, K vitamini bağımlı proteinlerin fosfolipit yüzeylere tutunmasını sağlar ve böylece kanın pıhtılaşması hızlandırılmış olur. K vitaminin düşük formunun oluşumunu K vitamini epoksit redüktaz enzimi engelleyerek durdurur ve böylelikle K vitamini bağımlı pıhtılaşma faktörlerinin gama karboksilasyonunu kısıtlar (115).

K vitamini antagonizmi veya bu vitaminin yokluğu bu faktörlerin ve proteinlerin üretim oranını düşürür ve buna bağlı olarak antikoagülasyon durumu meydana gelir. Karboksilasyonda ki azalmayla birlikte pıhtılaşma faktör ürünlerinin salgılanışı da azalır ve pıhtılaşma faktörlerinin biyolojik olarak aktivasyonu düşer. Sonuç olarak, pıhtılaşma mekanizması fonksiyonel olarak kaybolur (114).

2.8. K Vitamini Epoksid Redüktaz (VKOR)

Yapılan son çalışmalar ışığında K vitamininin, karaciğer hücrelerinde fizyolojik önemi bulunan “K vitamini epoksidi” adlı metabolitine dönüştüğü görülmüştür. Bu metabolit aynı hücrelerde epoksid redüktaz enzimi tarafından tekrar K vitaminine (hidrokinon formuna) dönüştürülür (108).

K vitaminin işlevselliğini gösterbilmesi için k vitamini 2-3 epoksid redüktaz, endoplazmik retikulum membranında K vitamini epoksid redüktaz (VKOR) enzimi tarafından indirgenmeye ihtiyaç duyar. K vitamini epoksid redüktaz (VKOR) enzimi, gama-karboksilasyon için kofaktör olan K vitaminine indirgenmeyi sağlar (116). Bu olaya, yani K vitamini ile K vitamini 2-3 epoksidi geri dönüşümüne, K vitamini döngüsü denmektedir. (Şekil 2.8.1)



Şekil 2.8.1: K vitamini döngüsü (117)

K vitamini döngüsündeki bu olayların moleküler düzeyi daha henüz tam olarak bilinmemektedir (118). Oral antikoagülanlar esas olarak, K vitamini epoksidinden K vitamini hidrokinonun rejenarasyonu inhibe etmek suretiyle pıhtılaşma faktörlerinin sentezini bozarlar ve K vitamininin, K vitamini 2–3 epoksidinden tekrar dönüşümü gerçekleşmeyen hastalarda kanama olayı görülür (108).

2.9. K Vitamini Epoksid Redüktaz Kompleks Alt Ünit 1 Geni (VKORC1) Polimorfizmleri

2004 yılında Rost ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada yeni bir gen olarak VKORC1 genini bulmuşlar ve genin fonksiyonunu hücre dizilerine transfer ederek tespit etmişlerdir. Northern Blot yöntemi ile genin karaciğer ve kalp hücrelerinde yüksek ekspresyonu gözlemlenmiştir (119).

VKORC1 geni insanda 16p11.2 bölgesinde lokalize olmuştur. Bu gen 3 ekzon içermektedir ve yaklaşık olarak 3 kb uzunluğundadır ve VKORC1 geni

163 aminoasitlik ve 18.6 kDalton moleköl ağırlığında bir protein kodlamaktadır (120). VKORC1'in konjenital eksikliği K vitamini ilişkili pıhtılaşma faktörleri kombine eksikliği tip 2 olarak adlandırılan kanama fenotipine yol açar (76). Ve VKORC1 endoplazmik retikulumun küçük bir transmembran proteindir. (121).

VKORC1 geninde yapılan çalışmalarda şimdiye dek 28 polimorfizm bulunmuştur ve ayrıca VKORC1'in hemen hemen tüm genetik varyasyonları ile ilgili 3 ana haplotip tespit edilmiştir (14).

2.10. VKORC1 ve Kanser

Prostat kanserini de içine alan çeşitli kanser tiplerinde vitamin K'nın antikanser etkisinin olduğu gözlemlenmiştir (111). Son zamanlardaki yapılan çalışmalarda, vitamin K'nın kanser hücrelerinin büyümesini inhibe ettiği bulunmuştur. (11,12). Bu etkisinin angiogenezde rol oynayarak olduğu düşünülmektedir Vitamin K damar içinde koagülasyonda önemli bir rol oynadığı gibi, kan akımıyla ve damar yapısının bütünlüğünün sağlanması ile de yakından ilişkilidir (11).

Birçok değişik etmenin yanı sıra, phyloquinone alımı ile yani dolaylı yünden vitamin K ile prostat kanseri arasında ilişki bulunmuştur (122)

Phylloquinone ve menaquinone'lerin proto-onkojen modülasyonu üzerinden kanser hücrelerinin büyümesini inhibe ettiği ve özellikle prostat kanseri ile Phylloquinone ve menaquinone alınımının ters yönde etki gösterdiği bilinmektedir (123,124).

Kanser oluşumunda söz edildiği gibi, kanserin gelişebilmesi için kendine ait yeni kan damarları, kan yolları bulması gereklidir. Bu aşamada vitamin K'nın önemli bir rol oynadığı göz önüne alınırsa vitamin K'nın kanser gelişimi ile ilişkili olduğu söylenebilir.

K-3 vitaminin özellikle pek çok kemirgen ve insan kanser hücreleri üzerinde çoğalmayı baskılayıcı etkisinin olduğu in vitro ve in vivo çalışmalarla gösterilmiştir (125).

Tromboz, kanserli hastalarda en sık görülen komplikasyonlardan bir tanesidir. Tromboza eğilimi fazla olan kanserler arasında abdominal organların adenokarsinomaları (pankreas, mide, safra yolları), ufak hücreli akciğer kanseri,

prostat kanseri ve myeloproliferatif hastalıklar vardır. Prostat kanserlerinde kanama komplikasyonları trombotik komplikasyonlardan daha fazla görülür. Kanserli hastalarda tromboza olan eğilimin farklılıklar göstermesi, hemostatik mekanizmanın ne denli aktive olduğu ile yakından ilgilidir.

Kanser prokoagülünün en önemli etki mekanizması faktör X'u aktive etmesi (Xa) ve koagülasyonu ana (ortak) yoldan başlatmasıdır. Bazı kanser hücreleri tarafından salgılanan mükün de kuvvetli bir prokoagülan etki gösterebilmekte ve ana (ortak) yoldaki protrombini aktive edebilmektedir (126).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

Bu çalışmaya dahil edilen bireyler için yerel etik kurul onayı alındı. Her hasta için hasta rızasına yönelik onam formu alındı. Bu bireyler, Abant İzzet Baysal Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı tarafından takip edilen ve prostat kanseri tanısı almış ve tedavileri bu yönde olan hastalar arasından seçilmiştir. Hastaların yaşları 49-86 arasındadır. Çalışmanın kontrol grubu, prostat kanseri olmadığı biyokimyasal ve muayene yöntemleriyle belirlenmiş, yaşları 51-86 arasında olan gönüllü kişiler arasından seçilmiştir. Çalışmamıza 48 prostat kanseri tanılı hasta ve 48 sağlıklı erkek birey dahil edilmiştir.

Hastaların dahil edilme kriterleri

- Hasta patolojik olarak, kesin prostat kanseri tanısı almış olmalı
- Hastanın başka sistemik hastalığının olmaması
- Eşlik eden başka bir kanserinin olmaması.
- Gönüllü olmak/Bilgilendirilmiş onam formu

Hastaların gruba dahil edilmeme kriterleri/dışlanma kriterleri;

- Kesin Prostat kanseri tanısı almamış hastalar (BPH tanılı olması gibi)
- Hastanın başka sistemik hastalığının olması
- Daha önce prostat dışında kanser tanısı almış olan hastalar
- Bilgilendirilmiş onam formunu imzalamayan hastalar

3.2. Yöntem

Araştırmaya dahil edilen kişilerin periferik venöz kanları alındı ve EDTA (etilendiamintetraasetik asit)'lı tüpler içinde +4 derecede muhafaza edildi. Araştırmaya dahil edilecek bireylerden EDTA'lı tüplere alınan 10 ml kandan ayrıştırılan lökositlerden, uygun izolasyon kiti (QIAamp DNA Mini Kit (50)) kullanılarak, genomik DNA'ları Abant İzzet Baysal Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Moleküler Genetik laboratuvarında izole edildi.

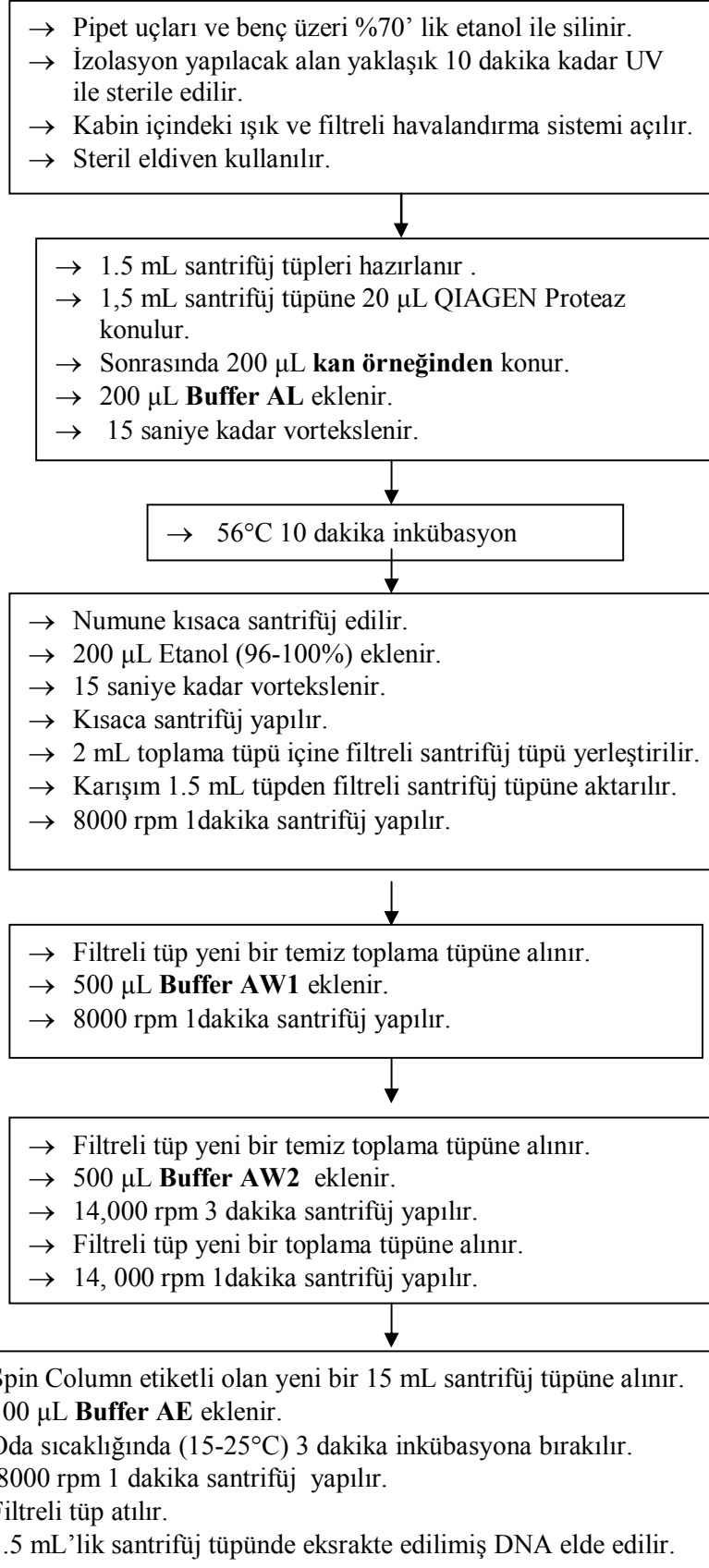
İzole edilen genomik DNA'lar uygun şartlarda ve uygun primerler ile hazırlanan PCR miksi (karışımı) içine eklenerek, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile ilgili gen bölgelerinin amplifikasyonu (çoğaltılması) yapıldı. Amplifikasyon işleminde elde edilen PCR ürünleri INFINITI™ sistemleri yardımıyla

AutoGenomics mikroarray cihazında, ilgili DNA bölgelerine özel prob lar yardımıyla çalışıldı. CYP2C9 ve VKORC1 gen bölgelerine ait alt grup ların polimorfizmleri tespit edildi.

3.2.1. Tam Kandan DNA İzolasyonu

Çalışmanın DNA izolasyon bölümü, AİBÜ Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik AD, Moleküler Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

DNA izolasyonu aşamaları şekil 3.2.1.1'de verilmiştir.



Şekil:3.2.1.1: Tam kandan DNA izolasyonu

3.2.2. PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

Belli bir DNA parçasını çoğaltmak için kullanılan bir yöntem olan polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) Karly Mullis tarafından 1980'lerin ortalarında keşfedilmiştir (127).

Polimeraz zincir reaksiyonu, herhangi bir DNA örneğinde istenen bölgenin çoğaltılmasını sağlayan hızlı bir in vitro yöntemdir. Polimeraz zincir reaksiyonu, elde bulunan DNA örneklerinde seçici olarak ilgili bölgenin çoğaltılmasını sağladığı için, önceden bu bölgenin DNA sekansı ile ilgili bilgi sahibi olunmasını gerektirmektedir. Sekans dizilimi bilgisi doğrultusunda belirlenen primer çift, çalışılacak gen bölgesini içerecek şekilde seçilir. Primerler 15-25 nükleotid arasında değişen uzunluklarda olmalıdırlar. Ayrıca CG-AT oranları erime ısısında göz önünde bulundurulmalıdır. Primerlerin erime sıcaklıkları (Melting temperatures) birbirine oldukça yakın olmalıdır.

Primerler polimeraz zincir reaksiyonu içerisinde denatüre olmuş olan kalıp DNA'nın tamamlayıcı dizilerine bağlanırlar. Uygun bir DNA polimeraz enzimini (Titanium Taq) ve dört çeşit dNTP (deoksiniükleozid trifosfat) (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) ve Mg^{+2} iyonunun yeterli miktarda bulunması halinde, primerler hedef DNA'nın komplementlerinin sentezlenmesini sağlarlar (128).

Polimeraz Zincir reaksiyonu, tek iplikli DNA'yı kalıp alan ve dNTP'leri substrat olarak kullanan DNA polimeraz enzimi ile gerçekleştirilir. DNA polimeraz diğer bütün polimerazlar gibi 5'→3' yönünde sentez yapar. Uygun koşullar sağlandığında primerler kalıp DNA üzerinde kendilerine komplement olan bölgelerle eşleşerek enzimin senteze başlaması için başlatıcı görev yapar. Daha sonra DNA polimeraz enzimi primerlerin ucuna serbest dNTP'leri ekleyerek komplement DNA ipliğini sentezler (127).

Yeni sentezlenen DNA dalları, ardışık döngülerde sentezlenecek diğer DNA'lar için kalıp görevi yapmaktadırlar. Her döngü sonucunda DNA miktarı geometrik olarak (2,4,8,16,32...) artar.

Polimeraz zincir reaksiyonu ısı değişimlerine dayanan üç temel basamaktan oluşmaktadır (128).

i. Denatürasyon (çift zincirin açılması): Yaklaşık 93-95°C'de gerçekleşir. DNA tek dal haline gelmektedir.

ii. Annealing (Bağlanma): 50-70⁰C arasında gerçekleşen ve primerlerin hedef DNA'ya bağlanmasının gerçekleştiği basamaktır/ısıdır.

iii. Elongasyon (Uzama): 70-75⁰C arasında gerçekleşir ve yeni DNA dallarının elde edildiği aşamadır (128).

3.2.3. PCR'da Gerekli Olan Bileşenler

1. Amplifiye edilecek olan hedef DNA dizisini içeren kalıp DNA
2. Amplifiye edilecek hedef DNA dizisinin komplementeri olacak şekilde seçilmiş kısa primerler
3. Zincirin uzaman reaksiyonunu gerçekleştiren termostabil karakterde Taq DNA polimeraz enzimi
4. Enzimin çalışması için gerekli kofaktör olarak görev yapan Mg iyonu sağlayan MgCl²
5. Yapılan amplifikasyona göre değişik miktarlarda hazırlanan dNTP karışımı (dATP, dCTP, dGTP, dTTP).
6. Deiyonize ve steril su

3.2.4. İzole edilen DNA örneklerinin PCR ile amplifikasyonu

PCR master miks'in hazırlanışı (1 örnek için)

Amplifikasyon miksi	17.5 µl (PCR için gerekli bileşenler*)
Titanium Taq polimeraz	0.5 µl

Total Hacim	18µl
-------------	------

(*: dNTP, Mg, H₂Odd, primerler)

Hazırlamış olduğumuz 18 µl x 24 = 432 µl 'lik master miksi 24 kuyucuklu plate'e eşit hacimlerde (18 µl) dağıttıktan sonra plate yavaş bir şekilde vortekslendi.

Plate vortekslendikten sonra plate'deki karışıma, nonspesifik reaksiyonları önlemek amacı ile DNA en son olarak eklendi. Her bir kuyucuğa her bir hastaya ait 2 µl DNA örneği eklendi.

PCR master Mix	18µl
DNA örneği	2 µl
Amplifikasyon reaksiyon hacmi	20 µl

Çalışmamızın PCR şartları tablo 3.2.4.1’de gösterilmiştir.

Tablo 3.2.4.1: Çalışmamızın PCR şartları

Step Sayısı	Sıcaklık (C)	Zaman	Siklus Sayısı
1	94	2 dakika	1
2a	94	20 saniye	12 x
2b	60-54(0.5/siklus)	30 saniye	
2c	72	30 saniye	
3	94	20	30X
	54	30	
	72	30	
4	72	2 dakika	1

Polimeraz zincir reaksiyonu sonucunda elde edilen ürünler mikroarray yöntemi ile çalışıldı. İlgili gen bölgelerinin polimorfizmlerine bakıldı.

3.2.5. INFINITI™ Sistemi

Infiniti Sistemine Genel Bakış

INFINITI™ sistemi hastalığa özgü BioFilmChip™ kullanarak niteliksel ve niceliksel birçok proteomik ve genomik uygulamanın yapılabildiği tamamen otomatize, multipleks bir moleküler tanı platformudur.

INFINITI™ sistemi aşağıdaki anahtar parçalardan oluşmaktadır:

- INFINITI Analizör
- BioFilmChip™ Mikroçip
- Intellipac™ Reaktif Modülü
- Uygulama arayüzlü Qmatic işletim yazılımı

INFINITI™ Analizör

INFINITI analizör tak çalıştır, otomatize, multipleks bir mikroçip platformu olup DNA analizindeki örnek işleme, reaktif yönetimi, hibridizasyon, stringency ve optik okuma gibi ayrık basamakları kendine yeten bir sistemde entegre etmektedir. Herhangi bir tüp ya da boru sistemine ihtiyaç duymayan analizör minimum miktarda sıvı atık üretmektedir. Ağ uyumu olan cihaz laboratuvar bilgi işlem sistemlerine kolaylıkla bağlanabilir

BioFilmChip™ Mikroçip

BioFilmChip™ mikroçip özgün, film tabanlı bir mikroçip olup, çok katmanlı 8-10 um kalınlığında hidrojel tabakalardan oluşmaktadır. Bu tabakalar biyolojik materyallerin bağlanması için oldukça uygun üç boyutlu bir yatak sağlamaktadır. Örneğin, tabakalardan biri test hassasiyetini sağlamak amacıyla içsel floresan sinyali ortadan kaldıran bir içeriğe sahipken diğeri oligonükleotid, antikor ya da antijen gibi biyolojik molekülleri sabitlemek için streptavidin-biotin etkileşimini kullanarak tasarlanmıştır. Spotlanmış BioFilmChip™ mikroçipi kolay kullanım için teste özgü haznelere paketlenmiştir.

Intellipac™ Reaktif Modülü

Testleri gerçekleştirmek için gerekli tüm reaktifler 4 rezervuarlı özgün bir reaktif işlem modülünde paketlenmiştir. Bu Intellipac™ reaktif modülüne işlem sürecini kullanıcı için basitleştiren, aynı zamanda reaktif son kullanma tarihi, kalan reaktif miktarı ve yapılabilecek test sayısı gibi verileri elektronik olarak kaydeden 64kb'lık bir hafıza kartı entegre edilmiştir.

Qmatic™ İşletim Yazılımı

The Qmatic İşlem Yazılımı çoklu işlem yaparak INFINITI™ analizör tarafından yerine getirilen karmaşık görevleri yönetebilmektedir. Yazılım, örnek ve reaktiflerin alınıp-boşaltılması, allele özgü primer uzatma (ASPE) reaksiyonu, hibridizasyon, floresan sinyal algılanması, veri analizi, veri işlenmesi ve sonuçların raporlanması gibi tüm elektromekanik ve robotik işlemleri kontrol eder

Yükle ve Çık Otomasyonu

Bir test yapabilmek için aşağıdaki basit işlemleri yerine getirilir.

1. Analizörün kapağını açmak için ekrandaki kapak düğmesine basar
2. Intellipac™ modüllerini, pipet uçlarını, BioFilmÇip™ haznelerini ve amplifiye edilmiş örnekleri yükler.
3. Her spesifik örnek için test gereksinimlerini girdiği bir iş listesi hazırlar ve “yürüt”e basar (Analizörün kapağı kapanır ve sonuçları daha fazla manüel müdahale gerekmeksizin sunulur) (129)

3.2.6. Mikroarray

Tarihçesi

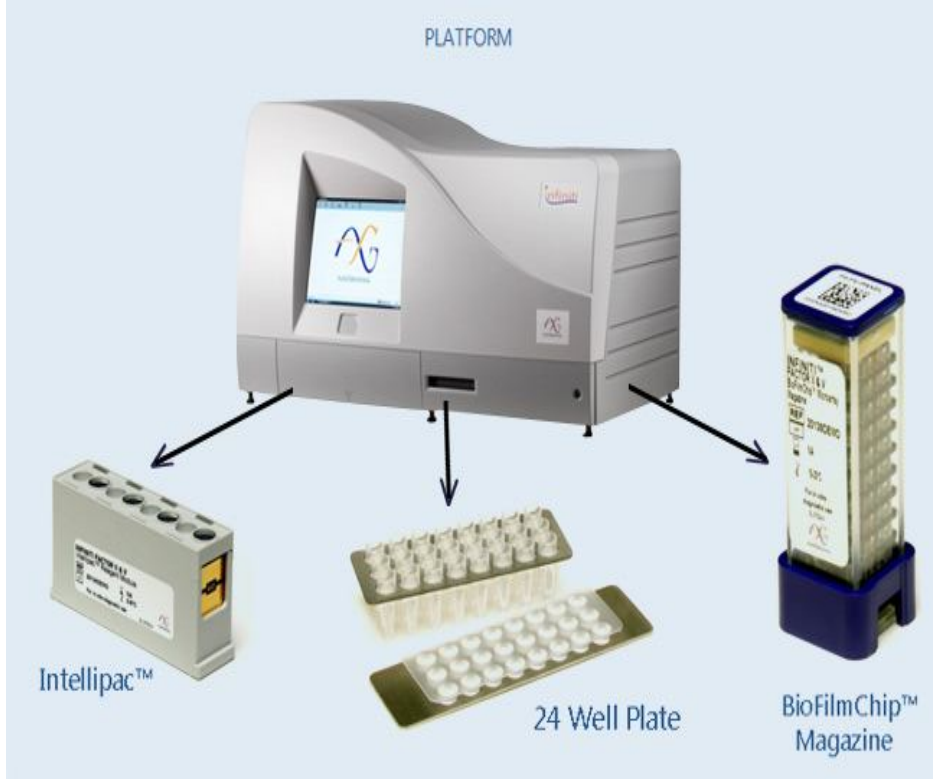
Bir zemin üzerinde sabitlenmiş sentetik gen dizileriyle serbest nükleik asitleri melezleştirme düşüncesi moleküler biyolojinin önemli adımlarından biri olmuştur. DNA ‘chip’ analizlerindeki ileri amaç ise bunu eş zamanlı olarak birçok gen bölgesinde yüksek duyarlılıkla ölçmektir. Tekniğin başlangıç girişimleri Schena ve Shalon tarafından gerçekleştirilmiştir. ‘Chip’ lerin yer aldığı zeminleri hazırlamaya ait ilk ekip Brown ve arkadaşlarınca oluşturulmuştur (130).

Mikroarray’in Tanımı

Mikroarray genellikle cam, naylon membran veya silikon yapıdaki katı yüzeyler üzerinde minyatürize alanlara yerleştirilmiş milyonlarca birbirine denk tek iplikli DNA parçacıkları (prob), antikor veya epitopik belirteçler aracılığıyla bir genomda depolanmış olan bilgilerin hibridizasyon gibi özgün kimyasal bağlanma temeline dayanan bir prensiple incelenmesi tekniğidir (131).

Yüzeye tutturulan bu DNA segmentlerinin (20 ile 100 ya da daha fazla nükleotid uzunluğunda olabilir) binlercesi tek bir DNA mikroarray’inde birlikte kullanılabilir (132).

Uygulanan yöntem ve amaç farklılıkları olmakla birlikte, “microchip”, “DNA chip” ve “DNA array” gibi tanımlamalar da benzer uygulamaları ifade etmek için kullanılırlar. Bununla birlikte, *in situ* oligonükleotid sentezi tekniği ile üretilmiş olan yüksek yoğunluklu mikroarray platformları çip olarak ifade edilirken, “DNA array” terimi özellikle cam lamalar üzerinde hazırlanan daha küçük kapasiteli platformlar için tercih edilir. Genel olarak mikroarray teknolojisinin en önemli özelliği, küçük bir alanda çok sayıda genomik incelemenin yapılmasına olanak sağlamasıdır (131). (Şekil 3.2.6.1)



Şekil 3.2.6.1: INFINITI™ Teknolojisi Mikroarray Cihazı (133)

Arraylerin Yapımı

Birçok farklı mikroarray teknikleri, aletleri ve enstrüman sistemleri hızla gelişmektedir ve yaygın olarak kullanım alanı bulmaktadır. Mikroarrayde, DNA'ların çipler, küçük cam slayd veya naylon membran üzerindeki hibridizasyonunu analiz ederek genlerin ekspresyon düzeyleri hakkında bilgi sağlamaktadır. En basit array mikroskop lamının yüzeyine binlerce DNA molekülünün noktalar halinde değişik yöntemlerle sabitlenmesiyle oluşturulur. Bir mikroskop lamına 50.000 DNA noktacığı yerleştirilebilir. Mikroskop lamına bırakılan DNA'nın kaynağı hücreden alınan herhangi bir gen parçacığı olabileceğı gibi cDNA, mRNA, tRNA veya yapay olarak sentezlenen oligonükleotitlerde olabilir (134).

Yapısal olarak genelde üç farklı mikroarray tipi bulunmaktadır: naylon membran üzerinde sentezlenen cDNA mikrodizilimleri, cam üzerinde sentezlenen cDNA mikrodizilimleri veya oligonükleotide dizilimler (DNA çipleri) olabilir. 1995'de Stanford Üniversitesi tarafından geliştirilen cDNA mikroarraylerinde cam üzerine UV-maskelemesi veya ışıktaki aktif olan kimyasallar kullanılarak direk olarak

cDNA dizileri sabitlenmiştir. Oligonükleotid arraylar ise Affimetrix firması tarafından geliştirilmiş bu yüzden Affimetrix veya DNA çipleri olarak anılmaktadır.

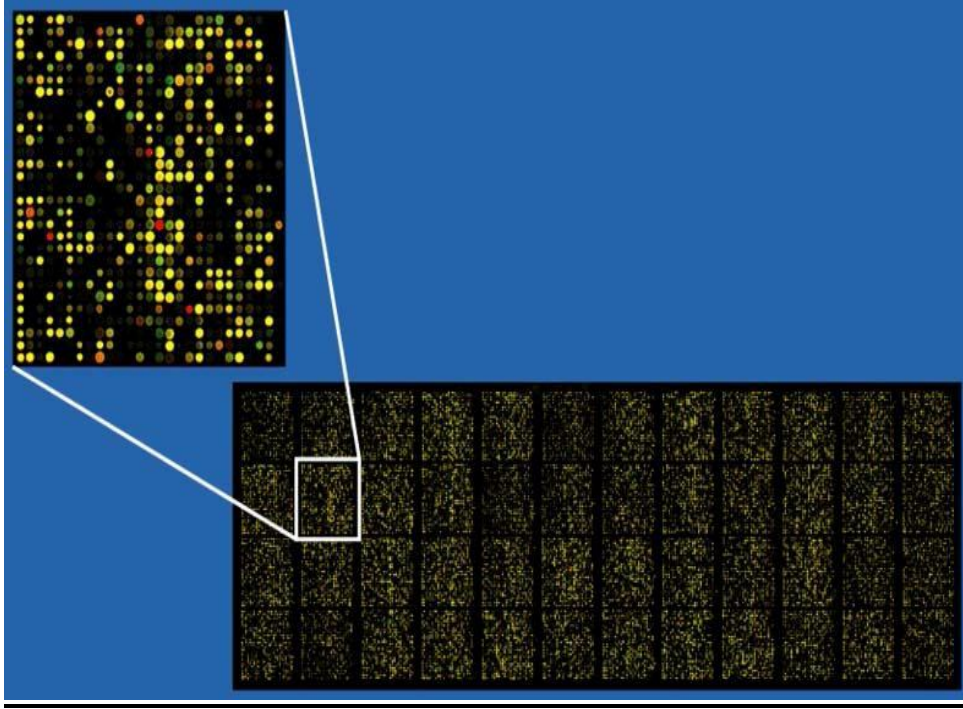
İn situ olarak cam slayd veya silikon yüzeyler üzerine sentezlenmiş oligolardan (mRNA ve/veya cDNA) oluşurlar. DNA çipleri de cDNA mikroarrayleri gibi Photolithografi prosesi kullanılarak hazırlanmaktadır. PCR kullanılarak elde edilen cDNA'lar cam slayd veya naylon membran üzerine yerleştirilerek cDNA arrayleri oluşturulmaktadır (135).

Mikroarray Çeşitleri

Genotip mikroarrayleri

DNA mikroarray'leri aynı zamanda belli bir pozisyondaki bir genom sekansını okumada da kullanılabilir. SNP(single nucleotid polymorphisms) mikroarray'ler bireylerde ve populasyonlarda genetik varyasyonu belirlemek için kullanılan özel bir çeşit DNA microarray tipidir. Genetik varyasyondan ve genetik hastalıklara duyarlılıktan sorumlu olduğu düşünülen tek nükleotid polimorfizmini (single nucleotid polymorphisms –SNPs-) belirlemede kısa nükleotid array'leri kullanılabilir. Genel olarak genotip belirleme olarak adlandırılan bu tip DNA mikroarray uygulamaları adli tıp çalışmalarında, hastalıklara genetik yatkınlığın hızlı bir şekilde bulunması ya da ölçülmesi çalışmalarında ya da DNA temelli ilaç adaylarının tanımlanmasında kullanılabilir. Bu tip SNP mikroarray'leri ayrıca kansere neden olan somatik mutasyonların, özellikle de heterozigote kaybı ve DNA bölgelerinin amplifikasyon ve delesyonlarının profilinin belirlenmesinde de kullanılmaktadır. Amplifikasyon ve delesyonlar mikroarray'lerle birlikte karşılaştırmalı genomik hibridizasyonun kullanılmasıyla da saptanabilir.

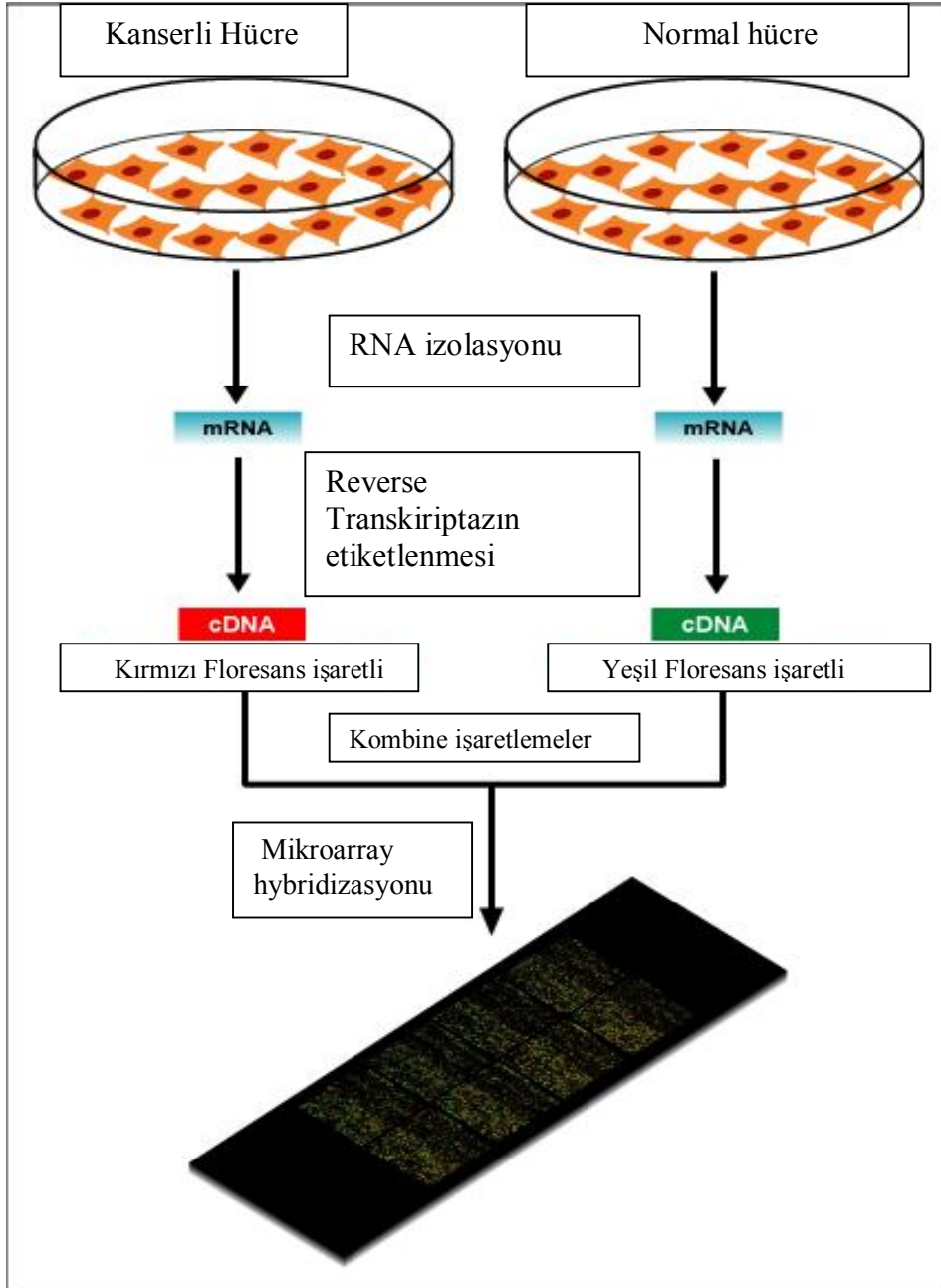
Yeniden sekanslama array'i bireylerdeki genom kısımlarının sekansını çıkarmak için geliştirilmiş bir başka array yöntemidir. Bu array tekniği bireylerdeki germline mutasyonlarını veya kanserdeki somatik mutasyonları belirlemede kullanılabilir (132). Şekil 3.2.6.1'de genotip mikroarray çip örneği resmi verilmiştir.



Şekil 3.2.6.2: Genotip mikroarray örneği resmi (136)

Spotlu mikroarray'ler

Spotlu (ya da iki kanallı) mikroarray'lerde probolar oligonükleotid, cDNA veya m-RNA'lara tekabül eden PCR ürünlerinin küçük fragmentleri olabilir. Bu tarz array'ler tipik olarak iki farklı florfor ile işaretlenmiş, karşılaştırılacak iki örnekten (örneğin hasta ve kontrol) gelen cDNA ile hibridize edilmiştir. Örnekler karıştırılıp tek bir mikroarray'e hibridize edilebilir; bu daha sonra scan edilir ve de böylece up-regulated genlerle down-regulated genler bir seferde görülebilir (132). Şekil 3.2.6.2 de spotlu mikroarray örneği verilmiştir.



Şekil 3.2.6.3: Spotlu Mikroarray örneği (137)

Oligonükleotid mikroarray'leri

Oligonükleotid (ya da tek kanallı) mikroarray'lerinde prob lar sekansı bilinen ya da tahmin edilen mRNA'lara uygun olacak şekilde dizayn edilir. Bu mikroarray'ler gen ekspresyonunun kesin değeri ile ilgili tahminler verir; o nedenle, iki duru-mun karşılaştırılmasında iki ayrı mikroarray kullanmak gerekir. Oligonükleotid microarray'leri piezoelektrik depozisyon aracılığı ile üretilebileceği gibi in-situ sentez aracılığı ile de üretilebilir.

Array'deki herbir geni temsil etmek üzere genellikle 25-70 nt uzunluğundaki oligo nükleotidler kullanılır. Daha küçük boyutlar da prob bağlanma etkinliği daha düşük olmaktadır. Bununla birlikte, küçük oligonükleotidlerin özgülüğü daha yüksektir. 70 nt'-den daha büyük olanlarda ise sinyalde çok küçük bir artış olmaktadır. Oligonükleotidler her seferinde yeniden sentezlendiği için c-DNA'larda olduğu gibi başka sekanslardan kontaminasyon söz konusu değildir.

Uzun Oligonükleotid Array'leri 60 parçadan oluşur ve silika substrat üzerine ink-jet baskı ile üretilir. Kısa Oligonükleotid Array'leri ise 25 veya 30 parçadan oluşur ve silika substrat üzerine fotolitografik sentez ile (Affymetrix'in yaptığı gibi) ya da akrilamid matris üzerine piezoelektrik depozis-on (GE Healthcare'in yaptığı gibi) ile üretilir. Son zamanlarda NimbleGen Systems tarafından geliştirilen Maskesiz array sentezi, esnekliği ve çok sayıda prob kullanımını bir araya getirmiştir (132).

Genel Mikroarray Yöntemi

DNA mikroarray; genomdaki tüm genlerin ekspresyon analizlerini hızlı bir şekilde yapmak üzere geliştirilmiş bir metottur. Küçük örnek hacimleri kullanılarak tek deneyde mikroarrayler, SNP'lerin (tek nükleotid polimorfizminin), hastalıklı ve normal gen ekspresyonunun (mRNA'daki artış ve azalışlar) hızlı bir şekilde çalışılmasını sağlamaktadır.

Temeli Northern ve Southern blottinge dayanan mikroarray teknolojisi farklı düzeylerde 10-15 yıldan beri kullanılan bir teknik olmasına rağmen son zamanlarda kullanılan cDNA mikroarray teknolojisiyle bilim dünyasında hızlı bir gelişme kaydedilmiştir (138).

Sıklıkla kullanılan geleneksel laboratuvar yöntemleri, genellikle tek bir gen veya proteinin araştırılmasına yöneliktir. Hastalıkların çoğunda birçok gen etkilenmekte (multigenik) ve birçok faktöre bağlı olarak hastalıklar oluşmaktadır (139).

Bu da, birçok farklı genin ve proteinin bir arada, kolay ve verimli olarak incelenebilmesini gündeme getirmiştir. Günümüzde gelişen bilgisayar teknolojisinin biyolojiye uyarlanması ile ortaya çıkan DNA çipleri hücre döngüsünü etkileyen yüzlerce genin ekspresyonunun takip edilebilmesini sağlamıştır (138).

Mikroarray analizi:

Intellipac® reaktif modülü (Üzerinde 4 kuyucuk bulunur ve 1.– 4. kuyucuklar kullanılır. 1. kuyucukta hybridizasyon solüsyonu, 4. kuyucukta keşif primerlerini içeren solüsyon bulunur.) içinde mevcut primerler 24-kuyucuklu platformdaki PCR ürünlerine eklenir. Primerler, PCR ürünleri üzerindeki polimorfik bölgelerde komplementer sekanslarına bağlandıktan sonra, uzatılırlar (ekstansiyon). Bu uzama reaksiyonu sırasında floresan işaretli nükleotidler eklenmiş olur. Uzamış primerler antizipkod (insan kaynaklı olmayan DNA sekansı) ismi verilen kısa DNA sekanslarına sahiptirler.

BioFilmChip™ mikroçip polieyster film tabanına kaplanmış çok tabakalı üç boyutlu hidrojel matrikslerden meydana gelir. BioFilmChip™ 240 oligonükleotid ile dizilmiştir. Çip üzerine spotlanan bu kısa DNA sekanslarına zipkod denir. Her bir zipkod uzama reaksiyonundan gelen primerler tarafından sağlanan bir anti-zipkoda hibridize olabilir. Eğer bir spottaki zipkod sekansı anti-zipkod sekansı ile %100 örtüşme içindeyse, primer o spotta kalır. Eğer primer floresan işaretli ise bu spottaki sinyal optik modül tarafından algılanır. INFINITI™ optik modülünün içerisindeki bir konfokal mikroskop her bir BioFilmChip™ 'i tarar. Her bir spottaki floresan sinyal yoğunluğu biyoinformatik yazılım tarafından, test edilen genin genotipini örnekten gelen DNA parçasının varlığını belirlemek için kullanılır (133).

Affymetrix GeneChip® Mikroarray Teknolojisi (Genotip microarray)

Affymetrix firması tarafından uygulamaya sokulmuş bir yöntemdir. Bu teknolojinin uygulama alanına girdiği 1994 yılında her bir hibridizasyon noktası 100 x 100 mikron boyutlarında iken, 2005 yılında 5 x 5 mikron boyuta inilmiş, böylece yaklaşık olarak 1.28 cm x 1.28 cm boyutlarındaki bir yüzey alanı içerisinde yaklaşık 400 kat daha fazla sayıda deney (yaklaşık 6.5 milyon farklı noktada hibridizasyon aracılığıyla 500 bine ulaşan deney) gerçekleştirilebilmiştir. (Şekil 3.2.6.3)



Şekil 3.2.6. 4: Affymetrix GeneChip® firmasına ait insan ve fare genomu çipleri (140)

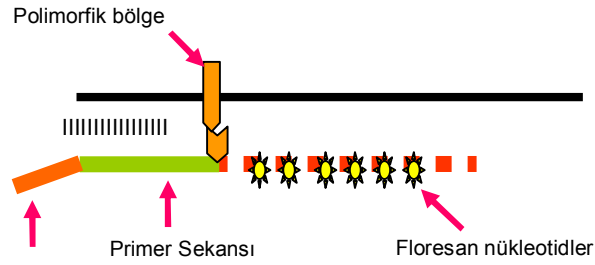
Her bir noktada birbiri ile denk milyonlarca prob bir arada bulunmaktadır. Problar genellikle 25 nükleotid uzunluktadırlar ve özgün DNA veya RNA dizisini yakalamak için tasarlanmıştır. 25 nükleotidlik prob uzunluğu yeterli düzeyde özgünlük sağlarken, duyarlılığı ve tekrarlanabilirliği arttırmak amacıyla ekspresyon çalışmalarında 22, genotiplendirme çalışmalarında ise 40 prob aynı anda farklı noktalarda test edilir. Spesifik olmayan bağlanmalardan oluşabilecek yanlış pozitif değerlendirmeleri engellemek amacıyla bazı problemlerin orta kısmında bilerek uygunsuz bölgeler tasarlanır. RNA mikroarray çalışmalarında, RNA molekülü dış ortam şartlarına dayanıksız olduğundan önce reverse transkripsiyonla cDNA'ya çevirilir. Daha sonra *in vitro* transkripsiyonla yeniden RNA (cRNA) oluşturulur. Ancak bu sırada ortama konulan urasil nükleotidler biyotinlenmiştir. Elde edilen biyotinlenmiş cRNA hibridizasyon öncesi daha küçük parçalara ayrıldıktan sonra hibridizasyon fırınında özgün prob ile hibridize edilir. Yıkama sonrasında ortama konan floresan boyalar biyotin molekülüne bağlanırlar. Lazer okuyucular ile taranan çip hibridizasyon oluşumunun varlığı açısından değerlendirilir (140).

INFINITI™ Teknolojisi ve Mikroarray

Basamak 1:

Intellipac içinde mevcut primerler 24-kuyulu platformdaki PCR ürünlerine eklenir. Primerler PCR ürünleri üzerindeki polimorfik bölgelerde komplementer sekanslarına bağlandıktan sonra, uzatılırlar (ekstansiyon). Bu uzama reaksiyonu sırasında floresan işaretli nükleotidler eklenmiş olur. Uzatmış primerler anti-zipkod ismi verilen kısa DNA sekanslarına sahiptirler.

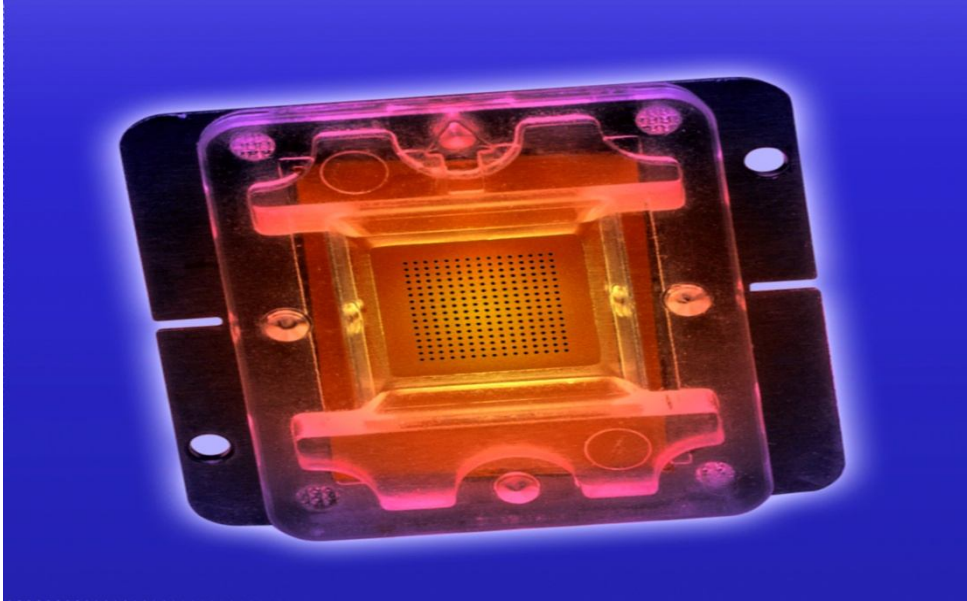
(Şekil 3.2.6.5)



Şekil 3.2.6.5: Floresan işaretli nükleotitlerin uzama reaksiyonunda gösterimi

Basamak 2:

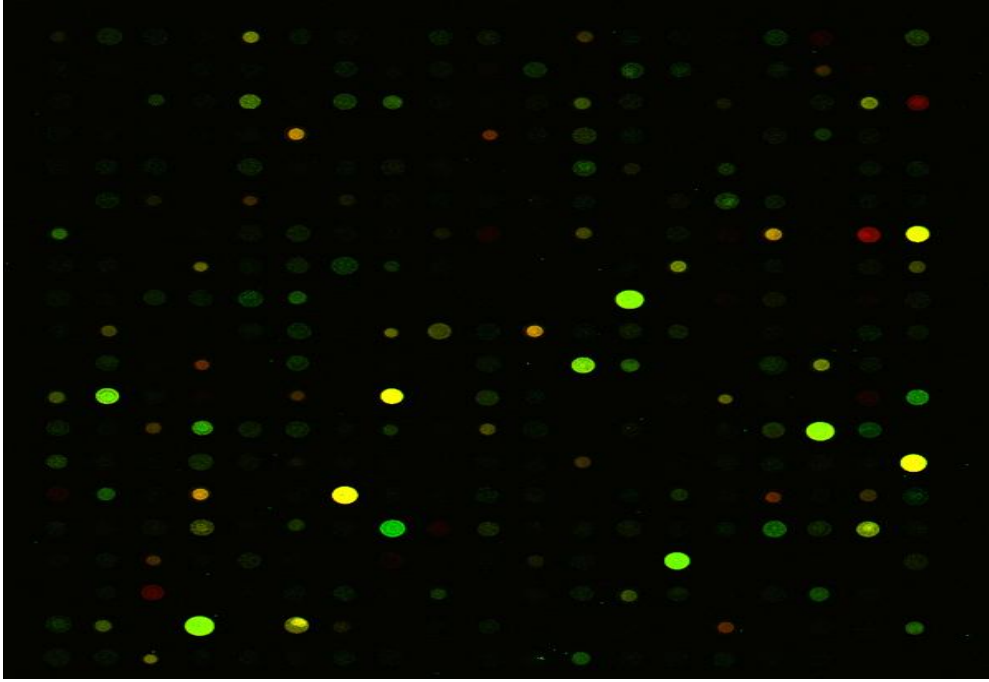
BiyoFilmÇip™ mikroçip poliestere film tabanına kaplanmış çok tabakalı üç boyutlu hidrojel matrislerden meydana gelir. BiyoFilmÇip 240 oligonükleotid ile dizilmiştir. Çip üzerine spotlanan bu kısa DNA sekanslarına zipkod denir. Her bir zipkod uzama reaksiyonundan gelen primerler tarafından sağlanan bir anti-zipkoda hibridize olabilir. Eğer bir spottaki zipkod sekansı anti-zipkod sekansı ile %100 örtüşme içindeyse, primer o spotta kalır. Eğer primer floresan işaretli ise bu spottaki sinyal optik modül tarafından algılanır. (Şekil 3.2.6.6)



Şekil: 3.2.6.6: BiyoFilmÇip™ örneği resmi

Basamak 3:

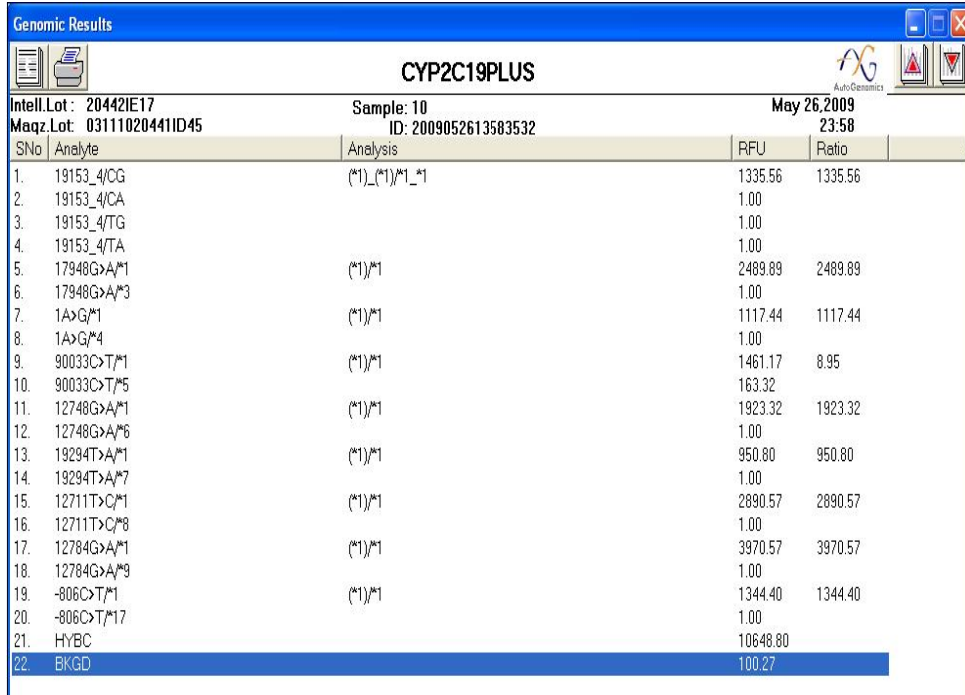
INFINITI optik modülünün içerisindeki bir konfokal mikroskop her bir ByoFilmÇipi tarar. Her bir spottaki floresan sinyal yoğunluğu biyoinformatik yazılım tarafından, test edilen genin genotipini ya da viral ya da bakteriyel bir örnekten gelen DNA parçasının varlığını belirlemek için kullanılır. (Şekil 3.2.6.7)



Şekil 3.2.6.7: Mikroçip üzerinde parlayan floresan ışıklarının görüntüsü

Basamak 4:

BiyoFilmÇip tarandıktan sonra, bilgi biyoinformatik yazılım tarafından işlenir. Sonuçlar kolay yorumlanabilir bir tablo olarak listelenir. İlk sonuçlara infinity çalışmaya başladıktan 4 saat sonra erişilebilir. Takip eden sonuçlar her 30 dakikada bir analizör çalışmaya devam ettiği halde elde edilebilir. (Şekil 3.2.6.8)



SNo	Analyte	Analysis	RFU	Ratio
1.	19153_4/CG	(*)/(*1)_*1_*1	1335.56	1335.56
2.	19153_4/CA		1.00	
3.	19153_4/TG		1.00	
4.	19153_4/TA		1.00	
5.	17948G>A/*1	(*)/*1	2489.89	2489.89
6.	17948G>A/*3		1.00	
7.	1A>G/*1	(*)/*1	1117.44	1117.44
8.	1A>G/*4		1.00	
9.	90033C>T/*1	(*)/*1	1461.17	8.95
10.	90033C>T/*5		163.32	
11.	12748G>A/*1	(*)/*1	1923.32	1923.32
12.	12748G>A/*6		1.00	
13.	19294T>A/*1	(*)/*1	950.80	950.80
14.	19294T>A/*7		1.00	
15.	12711T>C/*1	(*)/*1	2890.57	2890.57
16.	12711T>C/*8		1.00	
17.	12784G>A/*1	(*)/*1	3970.57	3970.57
18.	12784G>A/*9		1.00	
19.	-806C>T/*1	(*)/*1	1344.40	1344.40
20.	-806C>T/*17		1.00	
21.	HYBC		10648.80	
22.	BKGD		100.27	

Şekil 3.2.6.8: AutoGenomics mikroarray cihazının sonuç ekranı

Mikroarrayin Kullanım Alanları

İlk arrayler, 1980'lerin ortalarında keşfedilmiş ve mikroarray olarak adlandırılmıştır. Bu cihaz üretimine 300 mikronluk DNA problemleri ile başlanmış ve spot büyüklüğü 300 micron olarak ayarlanmıştır. Çoğunlukla DNA klonlamada, PCR ürünlerinde ya da oligonukleotidlerde ve özellikle radyoaktif olarak etiketlenmiş hedefler için kullanılmıştır. Bu teknoloji ilk olarak tıp alanında kullanılmaya başlanmıştır. Daha sonraki mikroarray cihazları iğne uçlu yüzeyler (pin spotter) kullanılarak tasarlanmıştır. Bu iğne temelli robotik sistemde bir cam yüzeye yaklaşık 150 mikronluk DNA solusyonları homojen olarak dağıtılmıştır. 1990'lara gelindiğinde ise, araştırmacılar mikroarrayi farklı profiller gösteren doku türleri ve farklı süreçlerde bulunan bakteriyel hücreleri saptamak ve değerlendirmek için kullanmışlardır (141,142).

Mikroarray teknolojisinin kullanım alanları her geçen gün artmaktadır. Çok sayıda DNA molekülünün lamalar ya da naylon membranlar üzerine noktalanması ile mikroarrayler oluşturulur. Kullanım alanları, gen ifade profillerinin araştırılması, mutasyon taraması ve analizi, genotipleme (örneğin; ökaryot, mikroorganizma, virüs), genlerin ve klonların haritalanması, mikrodelsiyon ve kromozomal aberasyonların tespiti olarak sıralanabilir (134).

3.3. İstatistiksel Analiz

Çalışmanın analizi sonucunda elde edilen veriler EpiInfo 3.5.3 istatistik programı yardımıyla hesaplandı. P değeri küçük eşittir 0,05 olan sonuçlar anlamlı olarak kabul edildi.

Mikroarray çalışması sonucunda hasta ve kontrol grubu için her bireyin tek tek homozigot, heterozigot ve wild type (yabanıl tip) olarak sayıları hesaplandı. Ayrıca toplam wild-heterozigot-homozigot sayıları da hesaplandı ve EpiInfo 3.5.1 istatistik programı yardımı ile bu sayıların anlamlılık derecelerine bakıldı.

4.BULGULAR

4.1. Kontrol ve hasta gruplarının genel özelliklerinin değerlendirilmesi ve istatistiksel analizlerinin yapılması

Kontrol ve çalışma grubuna ait bireylerden EDTA'lı tüplere alınan periferik kan örneklerinden genomik DNA ekstraksiyonu yapıldıktan sonra ilgili gen bölgeleri PCR ile çoğaltıldı, elde edilen ampikon (ürün) mikroarray yöntemi ile çalışıldı.

Kontrol ve çalışma grupları ile ilgili genel bilgiler, elde edilen bulgular ve istatistiksel analiz sonuçları aşağıda belirtilmiştir.

Kontrol grubu: Bu grup, herhangi bir kanser tanısı almamış ve prostat kanseri olmadığı biyokimyasal ve muayene yöntemleriyle belirlenmiş, ayrıca sistemik bir hastalığı olmayan gönüllü erkek bireylerden oluşmaktadır. Kontrol grubunun yaş aralığı 51-86 arasında olup, yaş ortalaması 68 yıl, PSA ortalaması ise 2,04 ng/mg'dir

Hasta grubu: Abant İzzet Baysal Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı tarafından takip edilen ve prostat kanseri tanısı almış erkek bireyler hasta grubumuzu oluşturmaktadır. Hastaların yaşları 49-86 arasında olup, yaş ortalaması 71 yıl ve PSA ortalaması ise 37,63 ng/mg'dir

(Tablo 4.2.9)

4.2. Genotip analiz sonuçları:

Hasta ve kontrol grubumuzda CYP2C9 geninin alt grupları (*2,*3,*4,*5*6,*11) ile VKORC1 geninin alt gruplarına ait polimorfizmler (*3673,*6009,*6484, *6853, *7566, *8773, *9041, *5808) tespit edildi. (Tablo 4.2.1 ve tablo 4.2.2)

Tablo 4.2.1: CYP2C9 alt varyantlarının kontrol grubundaki wild, heterozigot ve mutant tiplerinin sayısal dağılımı

Genotip	wild	heterozigot	mutant
2C9*2	45	3	0
2C9*3	38	8	2
2C9*4	48	0	0
2C9*5	48	0	0
2C9*6	48	0	0
2C9*11	47	1	0

Tablo 4.2.2: VKORC1 alt varyantlarının kontrol grubundaki wild, heterozigot ve mutant tiplerinin sayısal dağılımı

Genotip	wild	heterozigot	mutant
VKR3673	26	9	13
VKR5808	16	14	18
VKR6009	35	13	0
VKR6484	11	24	13
VKR6853	12	24	12
VKR7566	12	23	13
VKR8773	48	0	0
VKR9041	21	20	7

Tablo 4.2.3: CYP2C9 alt varyantlarının hasta grubundaki wild, heterozigot ve mutant genotip tiplerinin sayısal dağılımı

Genotip	wild	heterozigot	mutant
2C9*2	39	9	0
2C9*3	42	6	0
2C9*4	48	0	0
2C9*5	47	1	0
2C9*6	48	0	0
2C9*11	48	0	0

Tablo 2.4.4: VKORC1 alt varyantlarının hasta grubundaki wild, heterozigot ve mutant genotip tiplerinin sayısal dağılımı

Genotip	Wild	heterozigot	mutant
VKR3673	28	7	13
VKR5808	21	11	15
VKR6009	32	11	5
VKR6484	15	16	17
VKR6853	15	16	17
VKR7566	16	16	16
VKR8773	47	1	0
VKR9041	27	15	6

Tablo 4.2.5: Kontrol ve hasta grubunda CYP2C9 geninin alt gruplarına ait polimorfizmlerin wild, heterozigot ve mutant genotiplerin yüzde dağılımları

Varyant	Wild tip	Heterozigot	Mutant
CYP2C9*2 C>T	C/C K: (%93.75) H: (%81.25)	C/T K: (% 0) H: (%18.75)	T/T K: (%6.25) H: (% 0)
CYP2C9*3 A>C	A/A K: (%79.16) H: (% 87.5)	A/C K: (%16.6) H (%12.5)	C/C K: (% 4.16) H: (%0)
CYP2C9*4 T>C	T/T K: (%100) H: (%100)	T/C K: (%0) H: (%0)	C/C K: (%0) H: (%0)
CYP2C9*5 C>G	C/C K: (%100) H: (%97.91)	C/G K: (%0) H: (%2.08)	G/G K: (%0) H: (%0)
CYP2C9*6 del A	K: (100) wild H: (100) wild		
CYP2C9*11 C>T	C/C K: (% 97.91) H: (%100)	C/T K: (% 2.08) H: (% 0)	T/T K: (%0) H: (%0)

K: kontrol

H: Hasta

Tablo 4.2.6: Kontrol ve hasta grubunda VKORC1 geninin alt varyantlarına ait polimorfizmlerin wild, heterozigot ve mutant genotiplerin yüzde dağılımları

Varyant	Wild tip	Heterozigot	Mutant
VKORC1 3673 G>A	G/G K: (%16.66) H: (%58.33)	G/A K: (%18.75) H: (% 14.59)	A/A (%) K: (%27.08) H: (%27.08)
VKORC15808T>G	T/T K: (%33.33) H: (%43.75)	T/G K: (% 29.16) H: (%22.91)	G/G K: (%37.5) H: (%33.33)
VKORC16484C>T	C/C K: (% 22.91) H: (%31.25)	C/T K: (%29.16) H: (% 33.33)	T/T K: (% 47.91) H: (%35.41)
VKORC16853 G>C	G/G K: (%25) H: (%31.25)	G/C K: (% 50) H: (% 33.3)	C/C K: (%25) H: (%34.41)
VKORC17566C >T	C/C K: (%25) H: (%33.33)	C/T K: (%47.91) H: (%33.33)	T/T K: (%27.08) H: (% 33.33)
VKORC18773 C>T	C/C K: (%100) H: (%97.91)	C/T K: (% 0) H: (%2.08)	T/T K: (% 0) H: (%0)
VKORC1 9041 G>A	G/G K: (%43.75) H: (%56.25)	G/A K: (% 41.66) H: (%31.25)	A/A K: (%14.58 H: (12.5)
VKORC1 6009 C>T	C/C K: (%72.91) H: (%66.66)	C/T K: (%27.08) H: (% 22.91)	T/T K: (%0) H: (% 10.41)

K: kontrol

H: Hasta

CYP2C9 genotip sonuçlarının yorumlanması

Sonuçlarımıza göre kontrol grubunda, 45 birey (%93,75) CYP2C9*2 wild C/C (yabanıl) genotipte, 3 birey (%6,25) heterozigot C/T genotipte tespit edilirken, bu grupta homozigot genotipe sahip herhangi bir birey tespit edilmemiştir. CYP2C9*3 wild A/A genotipe sahip 38 birey (79,16), heterozigot A/C genotipe sahip 8 birey (%16,6) ve homozigot C/C mutant tipe sahip 2 birey (% 4,16) tespit edilmiştir. Kırksekiz birey (%100) CYP2C9*4 T/T wild tip, bu varyant için heterozigot ve homozigot mutant bireyler tespit edilememiştir. 48 birey (%100) CYP2C9*5 C/C wild genotipte tespit edilmiş olup, heterozigot ve homozigot mutant bireyler tespit edilmemiştir. 48 birey (%100 delA/A) CYP2C9*6 wild genotipte tespit edilmiş olup bu grup için heterozigot ve homozigot mutant bireyler tespit edilmemiştir. Son olarak, CYP2C9 varyantı *11'de ise 47 birey (%97,16) CYP2C9*11 C/C wild genotipte, 1 birey (2,08) C/T heterozigot genotipte tespit edilmiş olup homozigot mutant genotipte birey tespit edilememiştir.

Hasta grubunda, 39 birey (%81,25) CYP2C9*2 için C/C wild genotipte, 9 birey (%18,75) C/T heterozigot genotipte bulunmuş olup homozigot mutant genotipte birey tespit edilmemiştir. 42 birey (%87,5) CYP2C9*3 A/A wild genotipe sahip olarak tespit edildi ve 6 birey (%12,05) de heterozigot A/C genotipe sahip olarak bulundu. Ancak CYP2C9*3 homozigot mutant genotipe sahip bireyler tespit edilmemiştir. 48 birey (%100) CYP2C9*4 T/T wild genotipte tespit edilmiş olup heterozigot ve homozigot mutant bireyler tespit edilmemiştir. 47 birey (%97,91) CYP2C9*5 C/C wild genotipte, 1 birey (%2,08) C/G heterozigot genotipte tespit edilirken homozigot mutant genotipe sahip bireyler tespit edilmemiştir. 48 (%100 delA/A) birey CYP2C9*6 wild genotipte tespit edilirken heterozigot ve homozigot mutant bireyler tespit edilmemiştir ve CYP2C9*11'de ise 48 birey (%100) CYP2C9*11 C/C wild genotipte tespit edilmiş olup heterozigot ve homozigot mutant bireyler tespit edilmemiştir.

(Tablo 4.2.1, Tablo 4.2.3, Tablo 4.2.5, Tablo 4.2.7. ve Grafik 4.2.1, Grafik 4.2.2)

VKORC1 genotip sonuçlarının yorumlanması

Diğer bir parametremiz olan VKORC1 varyantlarının sonuçlarına baktığımızda kontrol grubunda, 26 birey (54,16) VKORC1 3673 GG wild genotipte, 9 birey (%18,75) G/A heterozigot ve 13 birey (%27,08) de A/A homozigot mutant genotipte tespit edilmiştir. 14 birey (%33,33) VKORC1 5808 T/T wild genotipte, 14 birey (29,16) T/G heterozigot genotipte ve 18 birey (% 37,5) GG homozigot mutant genotipte tespit edilmiştir. 35 birey (%72,91) VKORC1 6009 C/C wild genotipte, 13 birey (%27,08) C/T heterozigot genotipte tespit edilirken homozigot mutant birey tespit edilememiştir. 11 birey (%22,91) VKORC1 6484 C/C wild genotipte, 14 birey (%29,16) C/T heterozigot genotipte ve 23 birey (%47,91) de T/T homozigot mutant genotipte tespit edilmiştir. 12 birey (%25) VKORC1 6853 G/G wild genotipte, 24 birey (%50) G/C heterozigot genotipte ve 12 birey (%25) de C/C homozigot mutant genotipte tespit edilmiştir. 12 birey (%25) VKORC1 7566 C/C wild genotipte, 23 birey (47,91) C/T heterozigot genotipte ve 13 birey (27,08) de T/T homozigot mutant genotipte tespit edilmiştir. 48 birey (%100) VKORC1 8773 C/C wild genotipte tespit edilirken heterozigot ve homozigot genotipe sahip herhangi bir birey tespit edilmemiştir. 21 birey (%43,75) VKORC1 9041 G/G wild genotipte, 20 birey (%41,66) C/A heterozigot ve 7 birey (%14,8) de A/A homozigot mutant genotipte tespit edilmiştir.

VKORC1 varyantları için hasta grubumuzun sonuçlarına baktığımızda, 28 birey (%58,33) VKORC1 3673 G/G wild genotipte, 7 birey (14,59) G/A heterozigot ve 13 birey (%27,08) de A /A homozigot mutant genotipte tespit edilmiştir. 21 birey (43,75) VKORC1 5808 T/T wild genotipte, 11 birey (%22,91) T/G heterozigot ve 16 birey (%33,33) de GG homozigot mutant genotipte tespit edilmiştir. 32 birey (% 66,66) VKORC1 6009 C/C wild genotipte, 11 birey (%22,91) C/T heterozigot genotipte ve 5 birey (%10,41) de T/T homozigot mutant genotipte tespit edilmiştir. 15 birey (%31,25) CC VKORC1 6484 wild genotipte, 16 birey (%33,33) C/T heterozigot genotipte ve 17 birey (%35,41) de T/T homozigot mutant genotipte tespit edilmiştir. 15 birey (31,25) VKORC1 6853 G/G wild genotipte, 16 birey (33,33) G/C heterozigot genotipte ve 17 birey (%34,41) CC homozigot mutant genotipte tespit edilmiştir. 16 birey (%33,33) VKORC1 7566 C/C wild genotipte, 16 birey (33,33) C/T heterozigot genotipte ve 16 birey (%33,33) de TT homozigot mutant genotipte

tespit edilmiştir. 47 birey (%97,91) VKORC1 8773 C/C wild genotipine sahip ve 1 birey (%2,08) C/T heterozigot genotipine sahip olarak tespit edilmiş olup homozigot mutant genotipte birey tespit edilmemiştir. 27 birey (%56,25) VKORC1 9041 G/G wild genotipte, 15 birey (31,25) G/A heterozigot genotipte ve 6 birey (%12,5) de AA homozigot mutant genotipte tespit edilmiştir.

(Tablo 4.2.2. Tablo 4.2.4, Tablo 4.2.8. ve Grafik 4.2.3 ve Grafik 4.2.4.)

Tablo 4.2.7: CYP2C9 alt varyantların hasta ve kontrol gruplarının genotiplerin ve allellerinin sayısal olarak yorumlanması

Varyantlar		Hasta (n)	%	kontrol(n)	%	P
CYP2C9*2 C>T	CC	39	% 81.25	45	%93.75	0,073638 p>0.05
	TT	0		3	% 6.25	
	CT	9	%18.75	0	% 0	
	C	87	% 90.62	93	% 96.88	
	T	9	%9.37	3	% 3.12	
CYP2C9*3 A>C	AA	42	% 87.5	38	% 79.16	0,1373948 p>0.05
	CC	0		2	% 4. 16	
	AC	6	% 12.5	8	% 16.66	
	A	84	% 87.5	84	% 87.5	
	C	12	% 12.5	12	% 12.5	
CYP2C9*4 T>C	TT	48	100%	48	100%	1 p>0.05
	CC	0		0	% 0	
	TC	0		0	% 0	
	T	96	100%	96	100%	
	C	0		0		
CYP2C9*5 C>G	CC	47	% 97.91	48	100%	1 p>0.05
	GG	0	% 0	0	% 0	
	CG	1	% 2.08	0	% 0	
	C	95	% 98.96	96	100%	
	G	1	% 1.04	0		
CYP2C9*6 del A	AA	48	100%	48	100%	1 p>0.05
	...	0	% 0	0	% 0	
	A	96	100%	96	100%	
	...	0		0	% 0	
CYP2C9*11 C>T	CC	48	100%	47	% 97.91	1 p>0.05
	TT	0	% 0	0	% 0	
	CT	0	% 0	1	% 2. 08	
	C	96	100%	95	%98.95	
	T	0		1	% 1.04	

Tablo 4.2.8: VKORC1 alt varyantlarının hasta ve kontrol gruplarının genotiplerinin ve allellerinin sayısal olarak yorumlanması

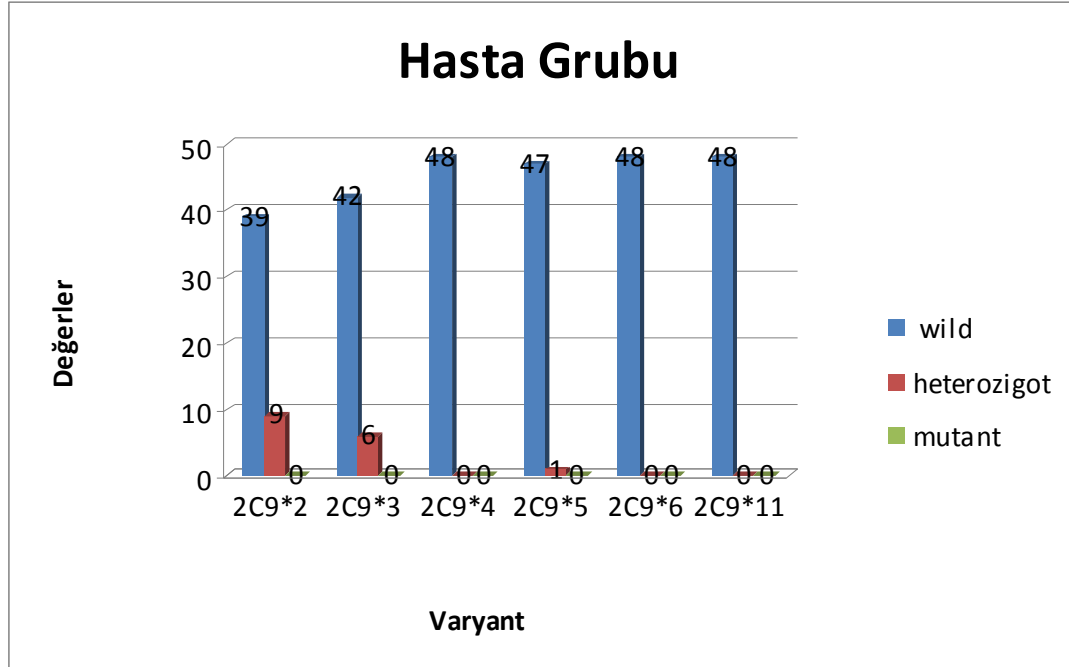
Varyantlar		Hasta (n)	%	kontrol(n)	%	P
3673G>A	GG	28	% 58.33	26	% 54.16	0.763 p >0.05
	AA	7	% 14.59	13	%27.08	
	GA	13	% 27.08	9	%18.75	
	G	63	%65.62	61	%63.54	
	A	33	% 34.37	35	%36.45	
5808 T>G	TT	21	%43.75	16	% 33.33	0.31208 p >0.05
	GG	16	%33.33	18	%37.5	
	TG	11	%22.91	14	% 29.16	
	T	53	%55.20	46	%47.91	
	G	43	%44.79	50	%52.08	
6853 G>C	GG	15	%31.25	11	%22.91	0.88513 p >0.05
	CC	17	%34.41	12	%25.0	
	GC	16	%33.33	24	%50.0	
	G	46	% 47.91	46	% 47.91	
	C	50	%52.08	50	%52.08	
6009 C>T	CC	32	%66.66	35	%72.91	0,1304269 p >0.05
	TT	5	%10.41	0	% 0	
	CT	11	%22.91	13	%27.08	
	C	75	%78.12	83	%86.45	
	T	21	%21.87	13	%13.54	
6484 C>T	CC	11	%22.91	11	%22.91	0.88513 p >0.05
	TT	23	%47.91	23	%47.91	
	CT	14	% 29.16	14	%29.16	
	C	46	%47.91	46	%47.91	
	T	50	%52.08	50	%52.08	
7566 C>T	CC	16	%33.33	12	%25.0	0,885227 p >0.05
	TT	16	%33.33	13	%27.08	
	CT	16	%33.33	23	%47.91	
	C	48	% 50.0	47	%48.95	
	T	48	% 50.0	49	551.04	
8773 C>T	CC	47	%97.91	48	% 100.0	0,48177 p >0.05
	TT	0		0	% 0	
	CT	1	%2.08	0	% 0	
	C	95	%98.95	96	%100 .0	
	T	1	%1.04	0	% 0	
9041 G>A	GG	27	%56.25	21	% 43.75	0,2779013 p >0.05
	AA	6	%12.5	7	%14.58	
	GA	15	%31.25	20	%41.66	
	G	69	%71.87	62	%64.58	
	A	27	28.12%	34	%35.41	

Tablo 4.2.9: Hasta ve Kontrol gruplarının yaş ve PSA ortalamaları

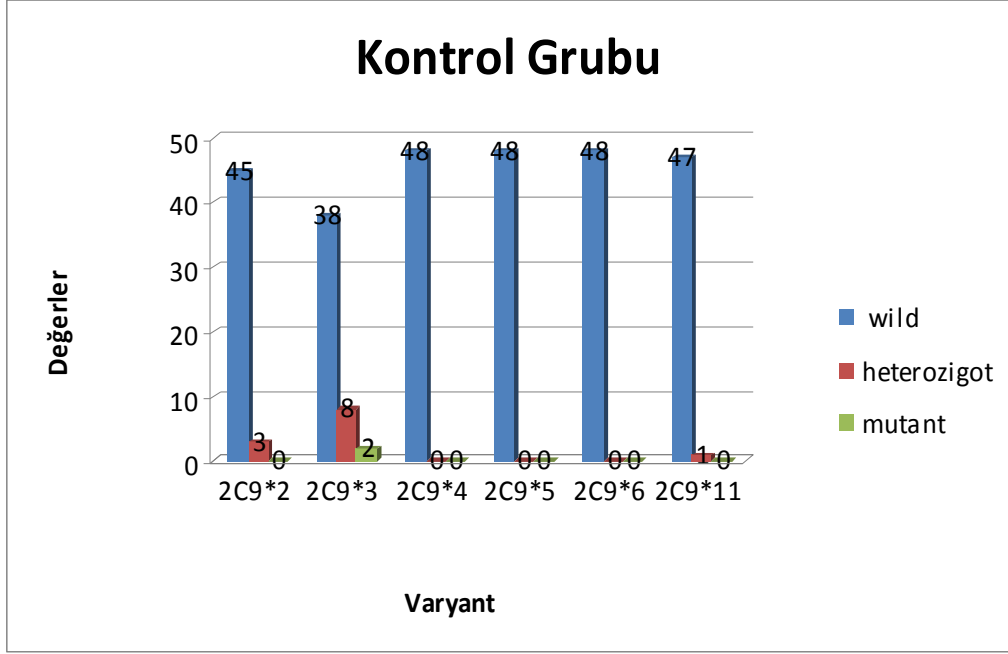
	Hasta (n:48)	kontrol (n:48)
Yaş	71	68
PSA	37,63	2,1

PSA= Prostat spesifik antijen, n= hasta ve kontrol sayısı

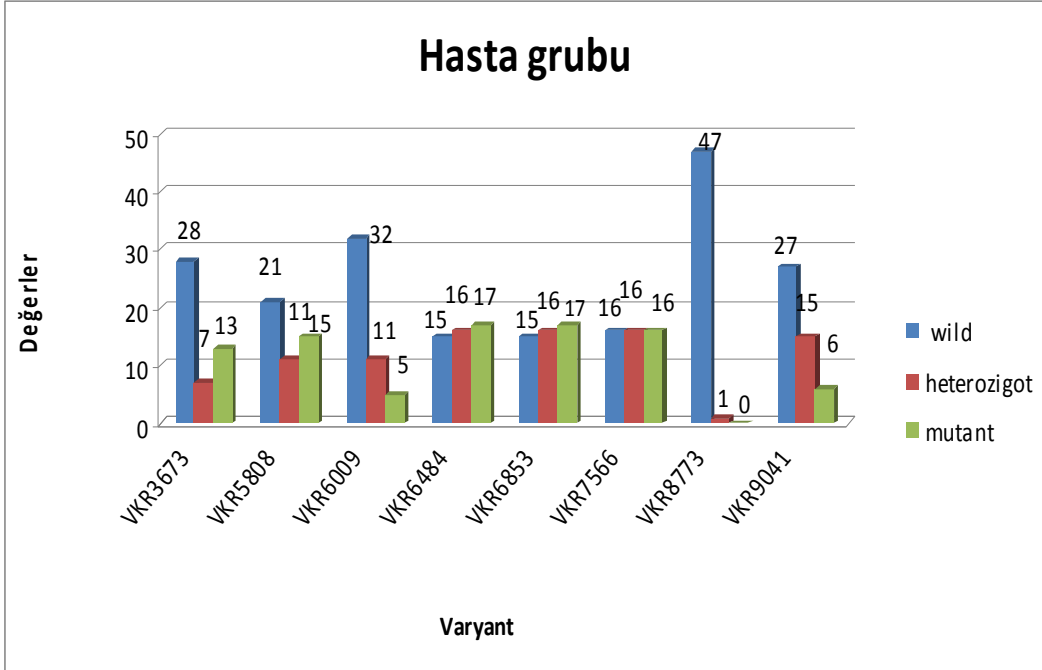
Grafik 4.2.1: CYP2C9'un alt gruplarının hasta grubunda elde edilen wild, heterozigot ve mutant verilerin grafiksel olarak gösterimi



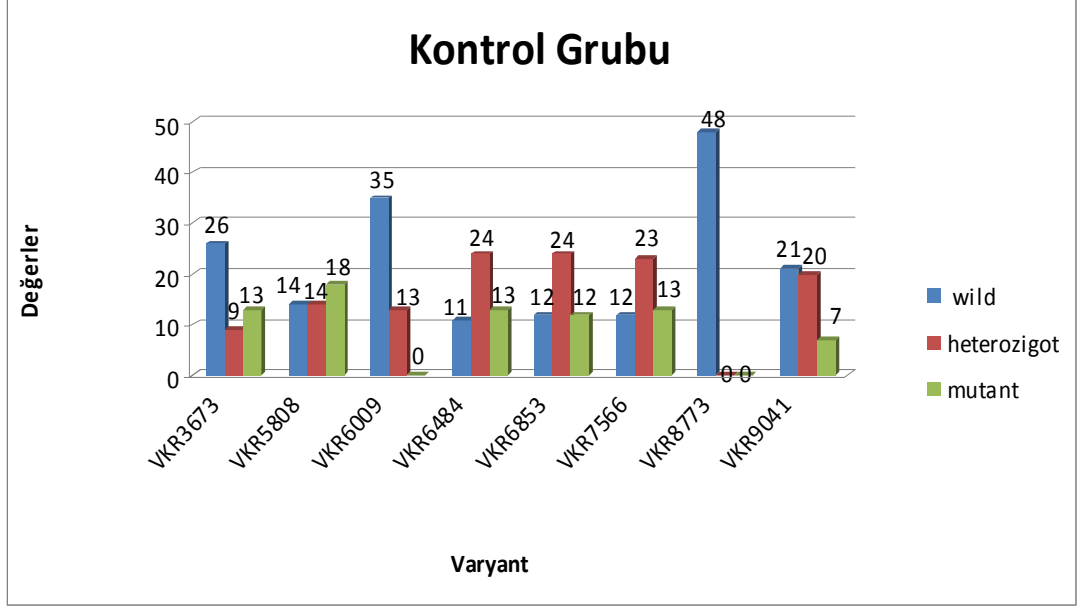
Grafik 4.2.2: CYP2C9 alt gruplarının kontrol grubunda elde edilen wild, heterozigot ve mutant verilerin grafiksel olarak gösterimi



Grafik 4.2.3: VKORC1'in alt gruplarının hasta grubunda elde edilen wild, heterozigot ve mutant verilerin grafiksel olarak gösterimi



Grafik 4.2.4: VKORC1'in at gruplarının kontrol grubunda elde edilen wil, heterozigot ve mutant verilerin grafiksel olarak gösterimi



5. TARTIŞMA

Dünyada Prostat kanseri erkeklerde en sık görülen kanserler arasında dördüncü sıradadır. (23) Prostat kanseri prostat bezinde meydana gelen hücre proliferasyonu ve hücre ölümü arasındaki dengenin bozularak, organda meydana gelen malign hacim büyümesi olarak tanımlanabilir. Prostat kanserleri prostat asiner hücrelerinden kaynaklanan adenokarsinomlardır. (34)

Gelişmiş ülkelerin verilerine göre, prostat kanseri tüm erkek kanserlerinin %11'ini oluşturmaktadır (143).

Prostat kanseri ülkeler arasında farklılık gösterir ve bunun nedeninin genetik, çevresel faktörler ve etnik yapı çeşitliliğinden kaynaklandığı bilinmektedir (3). Örneğin, ABD'de prostat kanseri %33 oranındadır (144). Güney Avrupa Ülkeleri ile karşılaştırıldığında, İskandinav ülkelerinde prostat kanseri bakımından tanı ve ölüm oranları daha yüksektir. Prostat kanseri oranı Norveç'te İspanya'dan iki kat daha fazladır. Epidemiyolojik çalışmalar, Afrika kalıtlı erkeklerin Amerika'da yüksek prostat kanseri insidansına sahip olduğunu göstermiştir (23). Kuzey Amerika ve Avrupa'da prostat kanseri riski Asya'dan daha fazladır (145).

Kanserin multifaktöriyel bir hastalık olduğu bilinmekle birlikte, bu faktörler ile ilişkisinin aydınlatılabilmesi için, moleküler çalışmaların yapılmasına ihtiyaç duyulmaktadır. Bu açıdan moleküler biyoloji ve genetik alanında yapılan çalışmalar günümüzde daha çok anlam kazanmaya başlamıştır. Özellikle, farmakogenetik alanında yapılan çalışmalar ile kişiye özel ilaçlar geliştirilerek ilacın yan etkileri en aza indirgenmeye çalışılmaktadır. İlaçların biyotransformasyonunda Sitokrom P450 (CYP450) ailesi enzimleri önemli bir rol oynamaktadır. Bu ilaçların arasında, kanser tedavisinde kullanılan ilaçlar da bulunmaktadır ve onların aktivasyon ve de inaktivasyonlarından CYP450 ailesi enzimleri sorumludurlar. CYP450 ailesi enzimleri ayrıca erkeklerin önemli bir androjeni olan testosteronu da karaciğer ve prostatta inaktive etmektedirler (146).

Bu etkilerin yanında CYP450 enzim sisteminin kanser oluşum mekanizmasında rol aldığı bazı çalışmalar ile gösterilmeye çalışılmıştır

Ayrıca kanser oluşum mekanizmalarında rolü olan ve vitamin K aktivasyonu üzerinden etkili olan VKORC1 geni de çalışmamıza dahil edilmiştir.

Bu iki parametreden birincisi olan CYP 2C9 geninin 30 adet allellinin sıklıkları etnik gruplar arasında değişmektedir. CYP 2C9*2 alleli beyazlarda yaklaşık olarak %10-12 iken Afrika kökenli Amerikalılarda daha azdır. CYP2C9*1 dışındaki alleller Asya kökenli olgularda nadirdir. CYP2C9*3 alleli daha az yaygın olup, beyazlarda %8 iken, Afrika kökenli Amerikalılarda göz ardı edilebilecek kadar azdır (76).

CYP450 enzim sistemi ile ilgili genlerde gözlenen polimorfizmler (SNP) sonucu alt gruplar meydana gelmiştir (83). SNP'ler sık olarak gende farklı allellerin oluşmasına yol açarlar. CYP 2C9*2 ve CYP 2C9*3 kanserler açısından en güçlü risk faktörleri olarak kabul edilen iki alleldir (76).

Bugüne kadar gerçekleştirilen çalışmalarda CYP450 enzim ailesinin karsinogenez üzerindeki bazı etkileri ortaya konulabilmiştir. Örneğin, akciğer kanseri ile ilgili yapılan bir çalışmada, sigara içenlerde akciğer kanseri riskinin periferik kan lenfositlerindeki CYP1A1 ve CYP1B1'in indüklenmesi sonucu gerçekleştiği ortaya konmuştur (147). Ayrıca diğer bir çalışmada CYP2A13, CYP41A1 gen polimorfizmleri ile akciğer kanseri arasında anlamlı bir ilişki bulunmuştur. ($p=0.025$) (148)

CYP2C9 gen polimorfizmi ve kolorektal kanseri ilişkisini araştırmak üzere yapılan bir çalışmada da anlamlı bir ilişki bulunmuştur ($p=0.0004$) (149). Yine diğer bir çalışmada kolorektal kanserli hastalarda CYP1B1 gen polimorfizmine bakılmış ve önemli bir ilişki olduğu tespit edilmiş (150).

CYP2D6 gen polimorfizmi ile birçok kanser ilişkilendirilmiştir. Bunlardan bir tanesi meme kanseri olan ve yüksek risk taşıyan hasta grubunda yapılan çalışmaya göre meme kanseri ile CYP2D6 arasında anlamlı bir ilişki bulunmuştur. ($p<0.05$) (151).

Bir başka çalışmada meme kanserinde CYP2C19*3 polimorfizmine bakılmış ve meme kanseri arasında önemli bir bağlantı olduğu ileri sürülmüştür. ($p = 0.003$) (152).

Birçok çalışmada CYP ve alt grupları ile kanser vakaları arasındaki polimorfizm çalışmaları genelde anlamlı sonuç verse de, istatistiksel olarak anlamlı olmayan çalışmalar da bulunmaktadır. Örneğin CYP2E1 ile ağız kanseri arasında bir ilişki olabileceği düşünülmüş ve bununla ilgili bir çalışma yapılmış olup, bu çalışmada CYP2E1 ile ağız kanseri arasında önemli bir ilişki bulunamamıştır (153).

Prostat kanseri etiyojisi ile CYP450 enzim sisteminin ilişkisinin araştırıldığı bir çalışmada CYP3A4 polimorfizmine bakılmıştır (154). Bilgimiz dahilinde, CYP2C9'un prostat kanseri oluşumundaki rolü ile ilgili şimdiye kadar herhangi bir çalışma sonucu yayınlanmamıştır.

Aynı şekilde şimdiye kadar VKORC1 gen polimorfizmleri ile prostat kanseri arasındaki ilişkiyi araştıran herhangi bir çalışma da yapılmamıştır.

VKORC1 geni vitamin K'nın metabolizmadaki rolüne bağlı olarak damarda koagülasyon kaskatında çok önemli bir rol oynamaktadır ve kan akımındaki rolü vasıtasıyla anjiogeneze (damarlaşmada) yakından ilgili olduğu bildirilmiştir (155). Bu şekilde yeni kanser oluşumu sürecinde kanser hücrelerinin anjiogenezinde rol oynadığını düşünülmüştür. Vitamin K'nın başka mekanizmalar üzerinden antikanser özelliği olduğu ile ilgili çalışmalar da bulunmaktadır (111). Ayrıca literatürler de serum vitamin K'sının K1 formunun prostat kanseri riskini azalttığı bildirilmiştir (122).

K vitamini açısından zengin gıdalar ile beslenen bireylerde prostat ve akciğer kanserine yakalanma riski K vitamini açısından düşük seviyeli besinlerle beslenenlerden daha düşüktür (131). Bir başka çalışmada K vitamini alımı ile genel kanser ve ölümler arasında ki ilişki araştırılmış, vitamin K'nın genel kanser riskini de azalttığı ileri sürülmüş (122).

Yapılan bir diğer çalışmada VKORC1 geni ve alt varyantlarının polimorfizmlerinin hepatoselüler karsinomda önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir (156).

VKORC1 alt grubundaki gen polimorfizmi çalışmaları sonucunda akciğer kanserli bireylerde VKORC1 alt grup polimorfizmlerinin önemli olduğu bildirilmiştir (157).

Tüm bu bilgiler ışığında CYP2C9'un alt varyantlarının (*2,*3,*4,*5,*6 ve*11 ve VKORC1'in alt varyantlarının (VKORC1 3673, 5808, 6484, 6853, 7566, 8773,

9041 ve 6009) prostat kanseri ile ilişkili olabileceği varsayımı üzerine, çalışmamızda CYP2C9 ve VKORC1 polimorfizmlerini araştırdık.

Yaptığımız çalışmada CYP2C9 alt grupları için kontrol ve hasta grupları arasında birbirine göre farklılık gösteren sonuçlarımızdan;

CYP2C9*2'nin genotipleri bakımından kontrol grubunda % 93.75 C/C wildtip, % 6.25 T/T mutant ve % 0 oranında C/T heterozigot genotipte bireyler bulunurken hasta grubumuzda % 81.25 C/C wild tip, %18.75 C/T heterozigot genotip ve % 0 oranında da T/T mutant genotipte bireyler bulunmuştur. İstatistiksel olarak anlamlı bulunmamasına rağmen, sonuçlarımızın yüzdeleri karşılaştırıldığında önemli fark görülmüştür.

CYP2C9*3'ün genotiplerine baktığımızda kontrol grubunda % 79.16 A/A wild tip, % 16.6 A/C heterozigot ve % 4.16 C/C mutant genotipte bireyler elde edilirken hasta grubunda % 87.5 A/A wild tip, % 12.5 A/C ve % 0 oranında da C/C mutant genotip tespit edildi. Yine bu sonuçlarda da yüzde olarak önemli fark görülmektedir.

CYP2C9*4, CYP2C9*5, CYP2C9*6 ve CYP2C9*11 genotiplerinin oranları ise hasta ve kontrol grubunda birbirine yakın olarak tespit edildi.

Burada hasta ve kontrol grubunun kısıtlılığı göz önünde bulundurulmalıdır.

Türk toplumunda veya başka bir popülasyonda buna benzer herhangi bir çalışma bulunmadığından, henüz verilerimizi karşılaştırma imkanımız olmamıştır.

Diğer bir parametremiz olan VKORC1 alt gruplarının genotipleri analiz edildiğinde kontrol ve hasta grupları arasında birbirine göre farklılık gösteren sonuçlarımızdan;

VKORC1 alt grubu 3673'ün genotiplerine baktığımızda % 16.6 G/G wild tip, % 18.75 G/A heterozigot ve % 27.08 A/A mutant genotip'de bireyler tespit ettik.

Hasta grubumuzda ise %58.33 G/G wild tip, %14.59 G/A heterozigot, ve % 27.08 A/A mutant genotipte bireyler tespit ettik. İstatistik sonucumuzda $p>0.05$ olarak tespit edildi. İstatistiksel olarak anlamlı bir sonuç bulamamış olmamıza rağmen, hasta ve kontrol grupları arasındaki genotip yüzdeleri arasında önemli bir farklılık olduğu tespit edildi.

VKORC1 5808'in genotipleri için kontrol grubunda % 33.33 oranında T/T wild tip, % 29.16 oranında T/G heterozigot ve 37.5 oranında G/G mutant tip

genotipte bireyler tespit edildi. Buna karşın hasta grubunda % 43.75 oranında T/T wild tip, % 22.91 oranında T/G heterozigot ve % 33.33 oranında da G/G mutant tipte bireyler elde tespit edildi. Yine aynı şekilde bu alt grup polimorfizminde de istatistik sonucumuz anlamlı sonuç bulunmadı, fakat hasta ve kontrol yüzdeleri karşılaştırıldığında önemli fark olduğu görüldü.

VKORC1 6484' in sonuçlarımızı analiz ettiğimizde kontrol grubunda % 22.91 oranında C/C wild tip, 29.16 oranında C/T heterozigot ve % 47.91 oranında T/T mutant tip genotipte bireyler tespit edilirken hasta grubunda % 31.25 oranında C/C wild tip, % 33.33 oranında C/T heterozigot ve % 35.41 oranında T/T mutant tipte genotipler tespit edilmiştir. Buradaki sonuçlara göre de $p>0.05$ olarak bulunmuş istatistiksel olarak sonucumuz anlamlı bulunmamıştır. Örnek sayımızın az olmasına rağmen genotip yüzdelerinde farklılık olduğu tespit edilmiştir.

VKORC1 6853'ün genotip sonuçlarına baktığımızda kontrol grubunda % 25 oranında G/G oranında wild tip, % 50 oranında G/C heterozigot ve % 25 oranında C/C oranında da mutant tip genotipe sahip bireyler tespit edildi ve hasta grubunda ise % 31.25 oranında G/G oranında wild tip, % 33.33 oranında G/C heterozigot ve % 34.41 C/C oranında da C/C mutant tipte genotipe sahip bireyler elde edilmiştir. İstatistiksel olarak anlamlı bir sonuç bulamamış olmamıza rağmen, hasta ve kontrol grupları arasındaki genotip yüzdeleri arasında önemli bir farklılık olduğu tespit edilmiştir.

VKORC1 7566'nın analiz sonuçlarına göre kontrol grubunda % 25 oranında C/C wild tip, % 47.91 oranında C/T heterozigot ve % 27.08 oranında da T/T mutant tipte genotipler elde edilmiştir. Hasta grubunun analizinde ise % 33.33 oranında C/C wild tipte, % 33.33 oranında C/T heterozigot tip ve % 33.33 oranında da T/T mutant tipte bireyler tespit edilmiştir. İstatistik sonucumuzda $p>0.05$ olarak tespit edildi. Buradaki sonuçlara göre de $p>0.05$ olarak bulunmuş istatistiksel olarak sonucumuz anlamlı bulunmamıştır. Yine örnek sayımızın azlığına rağmen genotip yüzdelerinde farklılık olduğu tespit edilmiştir.

VKORC1 9041'in genotiplerini incelediğimizde kontrol grubunda % 43.75 oranında G/G wild tip, % 41.66 oranında G/A heterozigot tip ve % 14.58 oranında A/A mutant tip genotipe sahip bireyler elde edilmiştir. Hasta grubunda ise % 56.25 oranında G/G wild tip, % 31.25 oranında G/A heterozigot tip ve % 12.5 oranında da

A/A mutant tip genotipte bireyler tespit edilmiştir. İstatistik sonucumuzda $p>0.05$ olarak tespit edildi. Yine aynı şekilde bu alt grup polimorfizminde de istatistiksel sonucumuz anlamlı çıkmadı ama hasta ve kontrol yüzdeleri karşılaştırıldığında fark olduğu görüldü.

VKORC16009'un genotip incelenmesinde kontrol grubunda %72.91 oranında C/C wild tip, % 27.08 oranında C/T heterozigot tip ve % 0 oranında da T/T mutant tipe sahip bireyler tespit edilirken, hasta grubundaysa % 66.66 oranında C/C wild tipte, % 22.91 oranında C/T heterozigot tip ve % 10.41 oranında da T/T mutant tipte genotipe sahip bireyler tespit edilmiştir. İstatistik sonucumuzda $p>0.05$ olarak tespit edildi. İstatistiksel olarak anlamlı bir sonuç bulamamış olmamıza rağmen, hasta ve kontrol grupları arasındaki genotip yüzdeleri arasında önemli bir farklılık olduğu tespit edildi.

İleride daha kapsamlı ve geniş bir çalışma grubu ile yapılacak moleküler çalışmalar ışığında CYP2C9 ve VKORC1 genlerinin alt grupları ile prostat kanseri etyolojisi arasındaki ilişkinin daha da anlaşılması mümkün olacaktır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Hasta ve kontrol grubunun sayısal azlığı çalışmamızın zayıf tarafını oluşturmakla birlikte ve halen literatürde çalışma için seçilen hasta grubu üzerinde CYP ve VKORC1 polimorfizmleri açısından, benzer bir çalışma olmaması sonuçlarımızı yorumlamakta zorluk oluştursa da, böyle bir çalışmanın ilk olarak yapılmış olması bir avantaj olarak görülebilir.

Sonuç olarak diyebiliriz ki, bu konu ile ilgili çalışmaların devamı kanser etiyolojisinin aydınlatılması açısından faydalı olacaktır.

7.KAYNAKLAR

1. **Parkin DM, Bray FI, Devesa SS.** Cancer burden in the year 2000. The global picture. *EurJCancer*. **2001**; 37: 4–66.
2. **Baltacı S.** Prostat Kanseri. Anafarta K. Bedük Y. Arıkan N (ed). Temel Üroloji, Ankara, 3. baskı, Güneş Tıp Kitabevleri. **2007**; 740-766.
3. **Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P.** Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* **2002**; 55: 74-108.
4. **Coffey DS.** Similarities Of Prostate And Breast Cancer: Evolution, Diet, And Estrogens. *Urology*. **2001**; 57: 31-38.
5. **Nelson DR, Koymans L, Kamataki T, Stegeman JJ, Feyereisen R, Waxman DJ, et al.** P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics* **1996**; 6: 1-42.
6. **Yin I, Miyata T.** 'Warfarin dose and the of CYP2C9 and VKORC I Jarionnle and perspectives. *Thfombosls Research*. **2007**.
7. **Geisen C, Watzka M, Sittinger K, Steffens M, Daugela L, Seifried E egt al.** VKORC1 Haplotypes ande their impact on the inter individual and inter etchnical variability of oral anticoagulation. *Thrombosis & haemostasis*. **2005**; 94: 773-779.
8. <http://www.healthanddoa.com/professional/2C>, erişim tarihi: 20.10.2011.
9. **Vermeer C, Knapen MHJ, Schurgers LJ.** Vitamin K and metabolic bone disease. *Clin Pathol*. **1998**; 51: 424-426.
10. **Holzer G, Grasse AV, Zehetmayer S, Bencur P, Bieglmayer C, Mannhalter C.** Vitamin K epoxide reductase (VKORC1) gene mutations in osteoporosis: A pilot study. *Transl Res*. **2010**; 156(1): 37-44.
11. **New AS.** Bone health: the role of micronutrients. *Br Med Bull*. **1999**; 55(3): 619-633.
12. Monographs. Vitamin K2. *Altern Med Rev*. **2009**; 14(3): 284-293.
13. **Wang Y, Zhen Y, Shi Y, Chen J, Zhang C, Wang X et al.** Vitamin K epoxide reductase: a protein involved in angiogenesis. *Mol Cancer Res*. **2005**; 3: 317–323.

- 14. Montes R, Gaona ER, Martinez-Gonzalez MA, Alberca I, Hermid J.** The 1639G > A polymorphism of the VKORC1 gene is a major determinant of the response to acenocoumarol in anticoagulated patients. *British Journal of Haematology*. **2006**; 133: 183–187.
- 15. Siiteri PK, Wilson JD.** Testosterone formation and metabolism during male sexual differentiation in the human embryo. *J Clin Endocrin Metab* **1974**; 136: 1148-1152.
- 16. Tanagho EA.** Anatomy of the lower urinary tract. In Walsh PC, Retik AB, Stamey TA, Vaughan ED Jr (eds). *Campbell's Urology*. ed 6, Philadelphia, W.B. Saunders Co. **1992**; 1: 40-69.
- 17. Tanagho EA.** Embryology of the genitourinary system. In Tanagho TA, McAninch JE (eds). *Smith's General Urology*, ed 14, Norwalk, Appleton & Lange. **1995**; 17-30.
- 18. Kirby RS, Christmas TJ:** Benign Prostatic Hyperplasia, ed 2, London, Mosby International. **1997**.
- 19. Hinman F Jr.** Atlas of Urosurgical Anatomy, Philadelphia, W.B. Saunders Co. **1993**.
- 20. Mc Neal JE:** Regional morphology and pathology of the prostate. *Am J Clin Pat*. **1968**; 49: 347- 357.
- 21. Anafarta K, Beduk Y, Arikan N.** Ürogenital Organların Anatomik ve Histolojik Yapısı, Temel Uroloji, 3. Baskı, Ankara, Güneş Tıp Kitap Evleri, **2007**.
- 22. Goğuş O.** Prostat tümörleri. Anafarta K, Goğuş O, Beduk Y, Arikan N (Ed). Temel üroloji içinde. Güneş Kitabevi, Ankara **1998**; 726-751.
- 23. Walsh PC, Retik BA, Vaughan ED, Wein AJ.** *Campbell's urology*. 9th ed. Philadelphia, *Saunders Co*. **2007**; 3001-3221.
- 24.** <http://cancer.idv.tw/09-uro/prostate.htm>, erişim tarihi: 22.12.2011.
- 25. Cummings M R, Klug W.S.** Genetik, Ankara 6. baskı, Palme Yayıncılık, **2002**; 816.
- 26. Lowitz BB, Casciato DA,** Klinik Onkoloji El Kitabı, Palme Yayıncılık, Ankara, **2007**; 762.
- 27. Yöntem M.** Pratik Biyokimya Kitabı. DPÜ Fen Fakültesi Biyoloji. 2. baskı **2006**; 281-291.

- 28. Lüleyap HÜ.** Moleküler Genetiğin Esasları. Nobel kitapevi. **2008**; 307-311.
- 29. Lowitz BB, Casciato D.** Principles of oncology. In: Casciato DA, ed. Manual of Clinical Oncology. 5th ed. Philadelphia, PA, Lippincott. **2007**; 48: 214–220.
- 30. Reiter RE, Dekernion JB.** Epidemiology of prostate cancer, etiology and prevention, Patrick C, Walsh M.D (eds). Campbell's Urology, 8. baskı, Ankara Güneş Tıp Kitabevi, **2005**; 3003-3019.
- 31. Yıldırım A, Bardakçı F, Karataş M, Tanyolaç B.** Moleküler Biyoloji, 2.baskı, Ankara, **2010**; 456-457.
- 32. Shurbaji MS KJ, Thurmond TS.** Immunohistochemical detection of p53 protein as a prognostic indicator in prostate cancer. *Hum Pathol.* **1995**; 26: 106-109.
- 33. Tuncer M, Özgül N, Olcayto E Ö, Gültekin M, Erdin B.** T.C. Sağlık Bakanlığı Kanserle Savaş Dairesi Başkanlığı. Ulusal Kanser Programı **2009**; 3.
- 34. Emil A, Tanogho J, Mcaninch, JW.** Prostat Kanseri ve Benign Prostat Hiperplazisi, Azancı G (ed). Smith Genel Uroloji, 16. Baskı, Nobel Kitabevleri, İstanbul. **2004**, 410-418.
- 35. Tanagho EA, Mcaninch JW.** (Eds.). Jr. Neoplasm Of The Prostate Gland. Smith's General Urology. 15th Ed. San Francisco: The McGraw-Hill Companies. **2000**; 399-421.
- 36. Satariano WA, Ragland KE, Van Den Eeden SK.** Cause Of Death In Men Diagnosed With Prostate Carcinoma, Cancer. **1998**; 1180-1188.
- 37.** <http://www.prostathapi.com/prostat-belirtileri.html>, erişim tarihi: 12.09.2011.
- 38. Menteş G.** Gonadlar ve Steroid Hormonlar. Onat T, Emerk K, Sözmen EY (ed). İnsan Biyokimyası, Ankara, 1. baskı, Palme Yayıncılık, **2002**; 491-501.
- 39. Wilson JD, Griffin JE, Russell DW.** Steroid 5 α -reductase 2 deficiency. *Endocrine Reviews.* **1993**; 14: 577-592.
- 40. Guess HA, Friedman GD, Sadler MC, Stanczyk FZ, Vogelmann JH, Imperato-Mcginley J, et al.** 5 alpha-reductase activity and prostate cancer: a case-control study using stored sera. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention.* **1997**; 6: 21-24.
- 41. Barrett-Connor E, Garland C, McPhillip JB, Khaw KT, Wingard DH.** A prospective, population-based study of androstenedione, estrogens, and prostatic cancer. *Cancer Research.* **1990**; 50: 169-173.

- 42. Gann PH.** Risk factors for prostate cancer. *Reviews in Urology*. **2002**; 4: 3-10.
- 43. Prehn RT.** On the prevention and therapy of prostate cancer by androgen administration. *Cancer Research*. **1999**; 59: 4161-4164.
- 44. Brawer MK, Lange PH.** Prostate specific antigen: Its role in early detection, staging and monitoring of prostatic carcinoma. *J. Endourol*. **1989**; 3: 227.
- 45. Partin AW, Oesterling JE.** The clinical usefulness of prostate specific antigen. J Urol. Department of Urology, Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, Maryland. **1994**; 152: 1358.
- 46. Schald DJ.** The complex genetic epidemiology of prostate cancer. *Human Molecular Genetics*. **2004**; 13: 103-121.
- 47. Clinton SK, Palmer SS, Spriggs CE, Vissek WJ.** Growth of Dunning transplantable prostate adenocarcinomas in rats fed diets with various fat contents. *Nutr J*. **1988**; 118: 908-914.
- 48. Gronberg H, Xu J, Smith JR, Carpten JD, Isaacs SD, Freije D et al.** Early Age At Diagnosis In Families Providing Eviencie Of Linkage To The Hereditary Prostate Cancer Locus (Hpc1) On Chromosome 1. *Cancer Research*. **1997**; 57: 4707-4709.
- 49. Ribeiro ML, Santos A, Carvalho-Salles AB, Hackel C.** Allelic Frequencies Of Six Polymorphic Markers For Risk Of Prostate Cancer. *Braz. J. Med. Biol. Res*. **2002**; 35: 205-213.
- 50. Smith JR, Freije D, Carpten JD, Grönberg H, Xu J, Isaacs SD et al.** Major Susceptibility Locus For Prostate Cancer On Chromosome Suggested By A. *Genome-Wide Search. Science*. **1996**; 274: 1371-1374.
- 51. Berthon P, Valeri A, Cohen Akenine A, Drelon E, Paiss T, Wohr G et al.** Predisposing Gene For Early Onset Prostate Cancer, Localized On Chromosome 1q42.2-43. *Am J Hum Genet*. **1998**; 62: 1416-1424.
- 52. Gibbs M, Stanford JL, McIndole RA, Jarvik GP, Kolb S, Goode EL. et al.** Evidence for a rare prostate cancer-susceptibility locus at chromosome 1p36. *Am J Hum Genet*. **1999**; 64: 776-787.
- 53. Lundgren R, Kristoffersson U, Heim S.** Genes Chrom Cancer. **1992**; 10: 16-24.
- 54. Coussens LM, Werb Z.** Inflammation and cancer. *Nature*. **2002**; 420: 860-867.

- 55. Gsur A, Feik E, Madersbacher S.** Genetic polymorphisms and prostate cancer risk. *World Journal of Urology*. **2003**; 10: 345-378.
- 56. Carter BS, Beaty TH, Steinberg GD, Childs B, Walsh PC.** Mendelian inheritance of familial prostate cancer. *Genetics*. **1992**; 89: 3367-3371.
- 57. Kibel AS, Nelson JB.** Moleküler Genetik ve Kanser Biyolojisi. Patrick C, Walsh M.D (eds). Campbell's Urology. Ankara: 8. baskı Güneş Tıp Kitabevi, **2005**; 2625-2671.
- 58. Nwosu V, Carptein J, Trent JM, Sheridan R.** Heterogeneity of genetic alterations in prostate cancer: evidence of the complex nature of the disease. *Human Molecular Genetics*. **2001**; 10: 2313-2318.
- 59. Güneş S, Bağcı H, Sarıkaya Ş.** Prostat kanseri genetiği. Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Üroloji AD, Samsun, **2003**.
- 60. Xu J, Zheng SL, Carptein JD, Nupponen NN, Robbins CM, Mestre J, et al.** Evaluation of linkage and association of HPC2/ELAC2 in patients with familial or sporadic cancer. *American Journal Human Genetic*. **2001**; 68: 901-911.
- 61. Coonay K.** Prostate Cancer genes2001.<http://www.cancer.med.umich.edu/prostcan/genes01htm>.
- 62. Claus G. Roehrborn, John D. McConnell.** Bening Prostatic Hiperplasia: Etiology, Pathophysiology, Epidemiology And Natural History, Campbell-Walsh Urology, 9th Ed. **2007**, 86. Chapter.
- 63. Carter BS, Bova GS, Beaty TH, Steinberg GD, Childs B, Isaacs WB.** Hereditary Prostate Cancer: Epidemiologic and Clinical Features. *J Urol*. **1993**; 150: 797-802.
- 64. Babaian RJ, Grunow WA.** Reliability of Gleason grading system in comparing prostate biopsies with total prostatectomy specimens. *Urology*. **1985**; 25: 564-567.
- 65. Obek C, Louis P, Civantos F, Soloway MS.** Comparison of digital rectal examination and biopsy results with the radical prostatectomy specimen. *J Urol*. **1999**; 161: 494-499.
- 66. Lowe FC, Gilbert SM, Kahane H.** Evidence of increased prostate cancer detection in men aged 50 to 59: A review of 324,684 biopsies performed between 1995 and 2002. *Urology*. **2003**; 62: 1045-1049.

- 67. Kanski A**, Evaluating the Addition of Total Androgen Suppression to Radiation versus Radiation Alone for Locally Advanced Prostate Cancer. *Radiation Oncology*. **2004**; 71–72.
- 68. İnci O**. Ürogenital tümörler. İstanbul, Nobel Tıp Kitapevleri. **1985**; 105-134.
- 69. Presti JR**. Neoplasm of the prostate gland. In. Tanagho EA, McAninch JW (Eds). Smith's general urology. 15th ed. San Francisco: The McGraw-Hill Companies. **2000**; 399-421.
- 70. Gürkan K**. Smith Genel Üroloji. Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Şti. İstanbul, **1999**.
- 71. Giovannucci E**. Tomatoes, tomato-based products, lycopene, and cancer: review of the epidemiologic literature. *J Natl Cancer Inst. Feb.* **1999**; 17; 91: 317-331.
- 72. Gardiner-Garden M, Frommer M**. CpG islands in vertebrate genomes. *J. Mol. Biol.* **1987**; 196: 261-282.
- 73. Angelo MD, William GN, William BI, Jonathan IE**. Pathological and molecular aspects of prostate cancer. *The Lancet*. **2003**; 361: 955-964.
- 74. Hopkins MM, Ibarreta D, Gaisser S, Enzing CM, Ryan J, Matin PA, et al**. Putting pharmacogenetics into practice. *Nat Biotechnol*. **2006**; 24: 403-410.
- 75. Goldstein DB, Tate SK, Sisodiya SM**. Pharmacogenetics goes genomic. *Nat Rev Genet*. **2003**; 4: 937-947.
- 76. Beyan C**, XXXIV. Ulusal Hematoloji Kongresi, VKOR Gen Mutasyonları: İzmir. **2008**; 121-127.
- 77. Hunt CM, Westerkam WR, Stave GM**. Effect of age and gender on the activity of human hepatic CYP3A. *Biochem Pharmacol*. **1992**; 44: 275-283.
- 78. Lee WM**. Drug-induced hepatotoxicity. *N Engl J Med*. **2003**; 349: 474-485.
- 79. Guengerich FP**. Common and uncommon cytochrome P450 reactions related to metabolism and chemical toxicity. *Chem Res Toxicol*. **2001**; 14: 611-650.
- 80. Ikemoto S, Imaoka S, Hayahara N, Maekawa M, Funae Y**. Expression of hepatic microsomal cytochrome P450s as altered by uremia. *Biochem Pharmacol*. **1992**; 43: 2407-2412.
- 81. Stubbins Mj, Harries Lw, Smith G, Tarbit Mh, Wolf Cr**. Genetic Analysis Of The Human Cytochrome P450 2c9 Locus. *Pharmacogenetics*. **1996**; 6: 429-439.

- 82. Anandatheerthavarada HK, Vijayasathya C, Bhagwat, SV, Miswas G, Mullick J, Avadhani NG.** Physiological Role Of The N-Terminal Processed P450 1a1 Targeted To Mitochondria In Erythromycin Metabolism And Reversal Of Erythromycin-Mediated Inhibition Of Mitochondrial Protein Synthesis. *J. Biol. Chem.* **1999**; 274: 6617-6625.
- 83.** <http://www.cypalleles.ki.se>. erişim tarihi: 15.11.2011.
- 84. Sundberg MI, Antona CS.** Pharmacogenetics of drug-metabolizing enzymes: implications for a safer and more effective drug therapy, *Phil. Trans. R. Soc. B* **2005**; 360: 1563–1570.
- 85. Kayaalp SO.** İlaçların biyotransformasyonu, Tıbbi Farmakoloji, 7. Baskı 1.cilt, ANKARA: Feryal Matbaacılık San. Ve Tic. Ltd.Şti, **1994**; 92-129.
- 86. Kellerman G, Shaw CR, Luyten-Kellerman M.** Aryl Hydrocarbon Hydroxylase Inducibility And Bronchogenic Carcinoma. *N. Engl. J. Med.* **1973**; 298: 934-937.
- 87. Ayesh R, Idle JR, Ritchie JC, Crothers MJ, Hetzel MR.** Metabolic Oxidation Phenotypes As Markers For Susceptibility To Lung Cancer. *Nature*, **1984**; 312: 169-170.
- 88. Rebbeck TR, Jaffe JM, Walker AH, Wein AJ, Malkowicz SB.** Modification Of Clinical Presentation Of Prostate Tumors By A Novel Genetic Variant In Cyp3a4. *J Natl Cancer Inst.* **1998**; 90: 1225-1229.
- 89. Oesterheld JR:** Review Of Developmental Aspect Of Cytochrome P450. *J Child Adoles Psychopharmacol* **1998**; 8: 161-74.
- 90. Frye RF.** Probing The World Of Cytochrome P450 Enzymes, Volume 4, Issue 3, *Molecular Interventions*. **2004**; 4: 157-62.
- 91. Nelson DR.** Cytochrome P450 and the individuality of species. *Arch Biochem Biophys.* **1999**; 369: 1-10.
- 92. Gonzalez FJ.** Molecular of the P-450 superfamily. *Pharmacol Sci* **1990**; 13: 346-352.
- 93. Graham SE, Peterson JA.** How similar are P450s and what can their differences teach us? *Arch Biochem Biophys.* **1999**; 369: 24-29.
- 94. Lee CR, Goldstein JA, Pieper JA.** Cytochrome P450 2c9 Polymorphisms: A Comprehensive Review Of The In-Vitro And Human Data, *Pharmacogenetics*. **2002**; 12: 251-263.

- 95. Tanaka E**, Clinical importance of non-genetic and genetic cytochrome P450 Function Tests in liver disease. *J Clin pharmacol Ther.* **1998**; 23: 61-170.
- 96. Spatzeneger M, Jaeger W**, Clinical importance of hepatic cytochrome P450 in drug metabolism. *Drug metabolism Reviews* **1995**; 27: 397-417.
- 97. Belpaire FM, Bogaert MG**. Cytochrome P450: Genetic Polymorphism And drug Interactions. *Acta Clinica Belgica.* **1996**; 51: 254-260.
- 98. Aynacioğlu AS**. İlaç Metabolizmasındaki Genetik Farklılıkların İlaç Tedavisi ve Çeşitli Hastalıklara Yakalanma Riski Bakımından Önemi. *Anadolu Tıp Dergisi* **1999**; 1: 32-38.
- 99. Miners JO, Birkett DJ**. Cytochrome P4502C9: an enzyme of major importance in human drug metabolism, *Br. J. Clin. Pharmacol.* **1998**; 45: 525–538.
- 100. Yükselen N**. Sitokrom P450 Enzim Sistemi ve İlaç Etkileşimleri 35.Ulusal Psikiyatri Kongresi, Trabzon, **1998**.
- 101.** <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CYP2C9&search>, erişim tarihi: 15.11.2011.
- 102. Goldstein JA, de Morais SM**. Biochemistry and molecular biology of the human CYP2C9 subfamily. *Pharmacogenetics.* **1994**; 4: 285-299.
- 103. Moridani M, Fu L, Selby R, Yun F, Cole D**. Frequency Of Cyp2c9 Polymorphisms Affecting Warfarin Metabolism In A Large Anticoagulant Clinic Cohort. *Clin Biochem.* **2000**; 39: 606-612.
- 104.** <http://genatlas.medecine.univ-paris5.fr/fiche.php?n=7393>. erişim tarihi:20.10.2011.
- 105. Hiatt RA, Armstrong MA, Klatsky AL, Sidney S**. Alcohol consumption, smoking, and other risk factors and prostate cancer in a large health plan cohort in California (United States). *Cancer Causes Control Jan.* **1994**; 5: 66-72.
- 106. Mohammed TT, Caroline C, Linda S, Neva EH, Patrick HR, Graeme IM, Simon NLP, Howard LM**. CYP3A4 promoter variant is associated with prostate cancer risk in men with benign prostate hyperplasia. *Oncology.* **2002**; 653-655.
- 107. Cranenburg EC, Schurgers LJ, Vermeer C**. Vitamin K: The coagulation vitamin that became omnipotent. *Thromb. Haemost.* **2007**; 98: 120–125.
- 108. Kayaalp SO**. Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. Ankara, 9. baskı, Hacettepe-Taş Kitapçılık, **2002**.

- 109. Drevon CA, Henriksen HB, Sanderud M, Gundersen TE, Blomhoff R.** Biological effects of vitamin K and concentration of vitamin K in Norwegian food. *Tidsskr Nor Laegeforen.* **2004**; 124: 3261-3262.
- 110. Plaza SM, Lamson DW.** Vitamin K2 in bone metabolism and osteoporosis. *Altern Med Rev.* **2005**; 10: 24-35.
- 111. Lamson DW, Plaza SM.** The anticancer effects of vitamin K. *Altern Med Rev.* **2003**; 8: 303-318.
- 112. Canan İ, Derviş, O.** Kardiyoloji, Genetik ve Kardiyovasküler hastalıklar. Ankara, Antıp A.Ş. Yayınları, **2002**; 6: 40-42.
- 113. Berne RM, Levy MN, Koeppen BM, Stanton BA.** Fizyoloji, Ankara Güneş Tıp Kitapevleri, Öncü Basımevi, **2008**.
- 114. Horton JD, Bushwick BM.** Warfarin Therapy. Evolving Strategies in Anticoagulation, *American Family Physician.* **1999**; 59: 635-646.
- 115. Hirsh J, Fuster V, Ansell J, Halperin JL.** American College of Cardiology Foundation Guide to Warfarin Therapy, *American Heart Association.* **2003**; 107: 1692.
- 116. Goodstadt L, Ponting CP.** Vitamin K epoxide reductase: homology, active site and catalytic mechanism. *Trends Biochem Sci.* **2004**; 29: 289-292.
- 117. Schwarz UI, Stein CM.** Genetic determinants of dose and clinical outcomes in patients receiving oral anticoagulants. *Clin. Pharmacol. Ther.* **2006**; 80: 9.
- 118. Wallin R, Sane DC, Hutson SM.** Vitamin K 2,3-epoxide reductase and the vitamin K-dependent γ -carboxylation system. *Thrombosis Research.* **2003**; 108: 221- 226.
- 119. Rost S, Fregin A, Ivaskevicius V.** Mutations in VKORC1 cause warfarin resistance and multiple coagulation factor deficiency type 2. *Nature.* **2004**; 427: 537- 541.
- 120. Li T, Lange LA, Li XL, Susswein B, Bryant R, Malone EM, Lange TY, Huang DW, Stafford JP.** Polymorphisms in the VKORC1 gene are strongly associated with warfarin dosage requirements in patients receiving anticoagulation. *J. Med. Genet.* **2006**; 43: 740-744.
- 121.** <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/608547>, erişim tarihi: 05.09.2011.

- 122. Nimptsch K, Rohrmann S, Nieters A, Linseisen J.** Serum Undercarboxylated Osteocalcin as Biomarker of Vitamin K Intake and Risk of Prostate Cancer: A Nested Case- Control Study in the Heidelberg Cohort of the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* **2009**; 18: 49-56.
- 123. Wang Z, Wang M, Finn F, Carr BI.** The growth inhibitory effects of vitamins K and their actions on gene expression. *Hepatology.* **1995**; 22: 876-882.
- 124. Bouzahzah B, Nishikawa Y, Simon D, Carr BI.** Growth control and gene expression in a new hepatocellular carcinoma cell line, Hep40: inhibitory actions of vitamin K. *J Cell Physiol.* **1995**; 165: 459-467.
- 125. Prasad KN, Prasad JE, Sakamoto A.** Vitamin K (menadione) inhibits the growth of mammalian tumor cells in culture. *Life Sci.* **1981**; 13: 1387-1392.
- 126. Gezer S.** Kanser ve Tromboz. Rush University Medical Center. *Chicago Illinois, USA.* **2004**; 21:3.
- 127. Bardakçı F, Yenidünya A F.** Moleküler Biyoloji Teknikleri I. Nükleik asit analiz teknikleri. Moleküler Biyoloji, 2. Baskı Nobel Kitabevi, **2010**; 545-547.
- 128. Strachan T, Read AP.** Human Molecular Genetics, 2nd Edition, *BIOS Scientific Publishers, Ltd. Oxford, UK,* **1999**.
- 129.** http://www.autogenomics.com/infiniti_main.php, 22.12.2011.
- 130. Savlı H.** DNA ‘chip’ Teknolojisi, Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji AB Dalı, Kocaeli, KLiMiK XI. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Kongresi, **2003**; 121-122.
- 131.** <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/About/primer/microarrays.html>, erişim tarihi: 12.10.2011.
- 132. İpekdağ K.** Mikroarray Teknolojisi Evrimsel ve Ekolojik Çalışmalarda Kullanımı, Proteomik ve Genomik. **2006**.
- 133.** <http://www.cdkmed.com/html/urun.php?catid=20>, erişim tarihi: 22.12.2011.
- 134. Karaca M, Onus AN.** Array gen ekspresyon teknolojisi ve bitkisel üretimde kullanımı. *Alatarım.* **2004**; 3: 5–10.
- 135. Ayalew TM, Mark E, Bolander M, Stephen M, Ansell M, Eric D et al.** Primer on medical genomics. Microarray experiments and data analysis. *Mayo Clin Proc.* **2002**; 77: 927-940.

136. <http://en.wikipedia.org/wiki/File:Microarray2.gif>, erişim tarihi:22.12.2011.
137. <http://www.dnamicroarray.net/>, erişim tarihi:10.10.2011.
138. **Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P.** Molecular Biology of Cell 4th ed. *Garland Science, New York.* **2002.**
139. **Connor M, Ferguson SM.** Essential Medical Genetics. 5th ed, *Blackwell Science, New York.* **1997.**
140. http://www.affymetrix.com/corporate/outreach/lesson_plan/downloads/chip_function_teacher_notes.pdf. erişim tarihi: 05.08.2011.
141. **Stephen H, Stoughton, RB.** The Magic of microarrays. *Scientific American.* **2002**; 34-41.
142. **Weiner DM.** Microarray Technologies in Target Validation and Drug Discovery. Microarray Methods and Applications. Eagleville PA, USA **2003.**
143. **Black R, Bray F, Ferlay J, Parkin D.** Cancer incidence and mortality in the European Union: Cancer registry data and estimates of national incidence for 1990. *Eur J Cancer.* **1997**; 33: 1075-1107.
144. **Jemal A, Tiwari RC, Murray T.** Cancer Statistics 2004. *CA Cancer J Clin.* **2004**; 54: 8-29.
145. **Liu Z, Xiang Y, Zhang W.** Incidence trends of prostate cancer in urban Shanghai (1993–1999). *Chin J Health Stat (Chin).* **2003**; 20: 335-337.
146. **Kumagai J, Fujimura T, Takahashi S, Urano T, Ogushi T, Horie-Inoue K et al.** Cytochrome P450 2B6 is a growth-inhibitory and prognostic factor for prostate cancer. *Prostate.* **2007**; 1;67: 1029–1037.
147. **Feng J, Li L, Zhao YS, Tang SQ, Yang HB, Liu SX.** Interaction between CYP2C19*3 polymorphism and smoking in relation to laryngeal carcinoma in the Chinese Han populations, *Genet Mol Res.* **2011**;10.
148. **Tamaki Y, Arai T, Sugimura H, Sasaki T, Honda M, Muroi Y, et al.** Association between cancer risk and drug-metabolizing enzyme gene (CYP2A6, CYP2A13, CYP4B1, SULT1A1, GSTM1, and GSTT1) polymorphisms in cases of lung cancer in Japan. *Drug Metab Pharmacokinet.* **2011**; 26: 516-522.
149. **Liao LH, Zhang H, Lai MP, Lau KW, Lai AK, Zhang JH et al.** The association of CYP2C9 gene polymorphisms with colorectal carcinoma in Han Chinese. *Clin Chim Acta.* **2007**; 380: 191-196.

- 150. Habano W, Gamo T, Sugai T, Otsuka K, Wakabayashi G, Ozawa S.** CYP1B1, but not CYP1A1, is downregulated by promoter methylation in colorectal cancers. *Int J Oncol.* **2009**; 34: 1085-1091.
- 151. Levkovich NN, Gorovenko NG, Myasoedov DV.** Association of polymorphic G1934A variant (allele *4) of CYP2D6 gene with increased risk of breast cancer development in Ukrainian women. *Exp Oncol.* **2011**; 33: 136–139.
- 152. Gan CQ, Wang XY, Cao YD, Ye WX, Liu H, Sun YY.** Association of CYP2C19*3 gene polymorphism with breast cancer in Chinese women. *Genet Mol Res.* **2011**; 10.
- 153. Balaji L, Singh KB, Bhaskar LV.** Genetic Polymorphisms of the CYP2E1 Gene do not Contribute to Oral Cancer Susceptibility in South Indians. *Asian Pac J Cancer Prev.* **2011**; 12: 1523-1527.
- 154. Fujimura T, Takahashi S, Urano T, Tanaka T, Zhang W, Azuma K,** Clinical significance of steroid and xenobiotic receptor and its targeted gene CYP3A4 in human prostate cancer. *Cancer Sc.* **2011**; 1349-7006.
- 155. Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH.** Mechanisms of disease, the pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (part one). *N Engl J Med.* **1992**; 326: 242–250.
- 156. Wang Y, Luo F, Zheng Y, Fan X, Chen J, Zhang Y, Hui R.** VKORC1 haplotypes influence the performance characteristics of PIVKAI for screening of hepatocellular carcinoma. *Clin Chem Lab Med.* **2010**; 48: 1475-9.
- 157. Wijen PA, Bekers O, Drent M.** Development of cocaine-induced interstitial lung damage in two CYP2C and VKORC1 variant allele carriers. *Mol Diagn Ther.* **2011**; 15: 177-80.

8. EKLER

EK 1: Etik Kurul Onayı

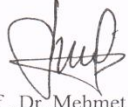
**T.C.**
ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ
AİBÜ Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

Sayı :B.30.2.ABÜ.0.20.05.04-050.01.04- 40
Konu: Kararlar. 22.12.2011

Sayın Yrd.Doç.Dr. Selma DÜZENLİ GEPDİREMEN
A.İ.B.Ü. Tıp Fakültesi
Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi

Abant İzzet Baysal Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 09 Şubat 2011 Çarşamba günü yaptığı toplantısında değerlendirilen, 2011/21 nolu "*Sitokrom P450 Enzimlerini Kodlayan Genlerin (CYP) ve Vitamin K Epoksid Redüktaz Kompleks Subünit1 Enzimini Kodlayan Genin (Vkorc1) Varyasyonlarının Prostat Kanseri Etiyolojisindeki Rollerinin Araştırılması*" çalışmanızın, etik olarak uygun olduğuna oybirliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi rica ederim.


Prof . Dr. Mehmet YAZICI
Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar
Etik Kurulu Başkanı

Abant İzzet Baysal Üniversitesi AİBÜ Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu -414280 Gölköy / BOLU
Telefon : 0374 253 45 68 Fax : 0374 253 45 59