



**PROSTAT KANSERİ OLGULARINDA IL-10-592 VE IL-10-1082
POLİMORFİZMLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Fulya TEVRÜZ

**Ekim, 2011
DENİZLİ**

**PROSTAT KANSERİ OLGULARINDA IL-10-592 VE IL-10-1082
POLİMORFİZMLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Pamukkale Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Yüksek Lisans Tezi
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı**

Fulya TEVRÜZ

Danışman: Yard. Doç. Dr. Nedim Karagöç


**Ekim, 2011
DENİZLİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ ONAY FORMU


Fulya TEVRÜZ tarafından, Yrd. Doç. Dr. Nedim KARAGENÇ yönetiminde hazırlanan "**Prostat Kanseri Olgularında IL-10-1082 ve IL-10-592 Polimorfizmlerinin Araştırılması**" başlıklı tez tarafımızdan okunmuş kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.



Prof. Dr. Gülseren BAĞCI
Jüri Başkanı



Doç. Dr. Sadettin ESKİÇORAPCI
Jüri Üyesi



Yrd. Doç. Dr. Nedim KARAGENÇ
Jüri Üyesi (Danışman)

Pamukkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 3/11/11 tarih ve 11/11-5 sayılı kararıyla onaylanmıştır.



Doç. Dr. Z. Melek BOR KÜÇÜKATAY
Müdür

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın gerçekleşmesi için gerekli ortamı hazırlayan tez danışmanım Sayın Yard. Doç. Dr. Nedim KARAGENÇ'e ve araştırmanın planlanmasından yazımına kadar tüm aşamalarda benden yardımlarını esirgemeyen ve umutsuzluğa kapıldığım her anda bana çok büyük destek sağlayan sevgili hocam Doç. Dr. Vildan Caner'e teşekkürü borç bilirim. Ayrıca dokuların temininde bize büyük destek sağlayan ve güleryüzünü esirgemeyen sayın Yrd. Doç Dr. Nilay Şen Türk hocama ve Sayın Doç Dr. Saadettin Eskiçorapçı'ya çok teşekkür ederim. Tezimin deneysel aşamasında ve yazımında yine bana büyük manevi destek veren arkadaşım Özge Can'a ve tüm bölüm arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğini beyan ederim.

İmza :

Öğrenci Adı Soyadı : Fulya TEVRÜZ

ÖZET

PROSTAT KANSERİ OLGULARINDA IL-10-592 ve IL-10-1082 POLİMORFİZMLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Tevrüz, Fulya

Yüksek Lisans Tezi, Tıbbi Biyoloji AD

Tez Danışmanı: Yard. Doç. Dr. Nedim KARAGENÇ

Ekim 2011, 40 sayfa

Kronik intraprostatik inflamasyonun prostat kanseri patojenezinde önemli rol oynadığı düşünülmektedir. Kronik inflamasyon indikatörü olan IL-10 prostat kanser gelişiminde etkin olabilir. Bu çalışmada IL-10 ekspresyonunu etkileyen promotör bölge polimorfizmleri ile prostat kanser gelişimi arasındaki ilişkinin ortaya konması hedeflenmiştir.

Çalışmada benign ve malign prostat tümörlü hastalardan alınan doku örneklerinden DNA izolasyonu yapılarak, elde edilen DNA'larda, IL-10-1082 ve IL-10-592 polimorfizmleri Real Time PCR ile çalışılmıştır.

Sonuç olarak malign prostat kanserli olgularda IL-10-1082 GG (wildtype) genotipi görülme sıklığı mutant AA ve heterozigoz GA genotiplerine göre daha fazla bulunmuştur.

Anahtar kelimeler: Prostat kanseri, IL-10-592, IL-10-1082

ABSTRACT

INVESTIGATION OF IL-10-592 and IL-10-1082 POLYMORPHISMS IN PROSTATE CANCER CASES

Tevrüz, Fulya

M.Sc. Thesis In Medical Biology

Supervisor: Ass. Prof. Dr. Nedim KARAGENÇ

October, 2011,40 pages

It has been known that cronic intraprostatic inflammation may have a role in prostate cancer pathogenesis. The relationship between prostat cancer patogenesis and IL-10, which is cronical inflamation indicator, is not clear. This study may contribute to understand the relationship between promoter polymorphisms which effects the IL-10 expression and prostate cancer diagnosis and prognosis.

During the study, DNA isolated from benign and malign prostate tissue samples. Real Time Polymerase chain reaction performed using specific IL-10 primers to detect possible polymorphisms in isolated DNAs.

In conclusion we have demonstrated that IL-10-1082 GG (wildtype) gene polymorphism is more prevalent in malign PCa patients compared GA and AA genotypes. We also observed that the mutant heterozygot IL-10-592 CA polymorphisms is positively related to increased PSA levels.

Keywords: Prostate carcinoma, IL-10-592, IL-10-1082

İÇİNDEKİLER

Sayfa

| | |
|--|-------------|
| İÇİNDEKİLER | viii |
| ŞEKİLLER DİZİNİ | ix |
| TABLolar DİZİNİ | x |
| SİMGELER VE KISALTMALAR | xi |
| | |
| 1.GİRİŞ | 1 |
| 2.KURAMSAL BİLGİLER VE LİTERATÜR TARAMASI | 2 |
| 2.1 PROSTAT BEZİNİN MORFOLOJİSİ | 2 |
| 2.1.1. Embriyoloji..... | 2 |
| 2.1.2. Anatomi..... | 2 |
| 2.1.3. Etiyoloji..... | 3 |
| 2.1.4. Risk Faktörleri:..... | 4 |
| 2.1.4.1. Yaş: | 4 |
| 2.1.4.2. Irk: | 4 |
| 2.1.4.3. Aile öyküsü:..... | 5 |
| 2.1.4.4. Diyet: | 5 |
| 2.1.4.5. Hormonlar:..... | 5 |
| 2.1.4.6. Diğer: | 5 |
| 2.2. POLİMORFİZM VE KANSER..... | 6 |
| 2.2.1. Polimorfizm | 6 |
| 2.3. SİTOKİNLER | 8 |
| 2.3.1. IL-10 Geni | 9 |
| 2.3.2. IL-10 Geninde Bulunan Polimorfizmler..... | 10 |
| 2.3.3. IL-10'un Prostat Kanseriyle İlişkisi..... | 13 |
| 3. MATERYAL VE METOD | 15 |
| 3.1.ÖRNEK SEÇİMİ | 15 |
| 3.2. PARAFİNE GÖMÜLÜ DOKULARDAN GENOMİK DNA İZOLASYONU | 15 |
| 3.2.1. DNA Saflığının Belirlenmesi ve Konsantrasyon Hesaplanması..... | 15 |
| 3.3. SİTOKİN GEN POLİMORFİZMLERİNİN REAL -TİME PCR İLE BELİRLENMESİ..... | 16 |
| 4.BULGULAR | 22 |
| 4.1. IL-10-592 SNP ANALİZİ | 22 |
| 4.2. IL-10-1082 SNP ANALİZİ | 24 |
| 5.TARTIŞMA | 29 |
| 6. SONUÇ | 32 |
| 7.KAYNAKLAR | 33 |
| 8. ÖZGEÇMİŞ | 40 |

ŞEKİLLER DİZİNİ

| | Sayfa |
|--|--------------|
| Şekil 2.1 Ürogenital sistem anatomisi..... | 3 |
| Şekil 2.2 İnsan IL-10 Geni..... | 10 |
| Şekil 4.1 IL-10-592 SNP'ne özgün amplifikasyon eğrisi..... | 22 |
| Şekil 4.2 IL-10-592 SNP'ne özgün erime eğrisi..... | 23 |
| Şekil 4.3 IL-10-592 SNP'ne özgün erime eğrisi analizi..... | 23 |
| Şekil 4.4 IL-10-1082 SNP'ne özgün amplifikasyon eğrisi..... | 24 |
| Şekil 4.5 IL-10-1082 SNP'ne özgün erime eğrisi..... | 24 |
| Şekil 4.6 IL-10-1082 SNP'ne özgün erime eğrisi analizi..... | 25 |

TABLOLAR DİZİNİ

Sayfa

| | |
|---|----|
| Tablo 3.1 IL-10-1082 ve -592 SNP'leri ve lokalizasyonları..... | 16 |
| Tablo 3.2 IL-10-592 SNP analizinde kullanılan primerler ve hibridizasyon problarının baz dizilimleri (5'→3')..... | 16 |
| Tablo 3.3 IL-10-1082 SNP analizinde kullanılan kullanılan primerler ve hibridizasyon problarının baz dizilimleri (5'→3')..... | 17 |
| Tablo 3.4 IL-10-592 ve -1082 SNP analizlerine özgün reaksiyon karışımı..... | 18 |
| Tablo 3.5 IL-10-592 SNP analizi için gerçek-zamanlı PCR protokolü*..... | 19 |
| Tablo 3.6 IL-10-1082 SNP analizi için gerçek-zamanlı PCR protokolü*..... | 20 |
| Tablo 4.1 Sitokin genlerine özgün SNP'lerin çalışma gruplarına göre dağılım oranları..... | 25 |
| Tablo 4.2 Malign Prostatlı hastaların gleason skorları ve gözlenen polimorfizmler.... | 26 |
| Tablo 4.3 Benign ve Malign prostat kanserli hastaların IL-10-592 ve IL-10-1082 polimorfizmlerine göre PSA miktarlarının aritmetik ortalama ve standard sapma miktarları..... | 27 |
| Tablo 4.4 Benign prostatlı hastaların IL-10-1082 polimorfizmi allel sıklığı..... | 27 |
| Tablo 4.5 Malign prostatlı hastaların IL-10-1082 polimorfizmi allel sıklığı..... | 28 |

SİMGELER VE KISALTMALAR

| | |
|--------------------------|--|
| EC: | Endotel Hücre |
| ECM: | Ekstrasellüler matriks |
| PIGF: | Plasental büyüme faktörü |
| eNOS: | Endotelyal nitrik oksit sentaz |
| PCR: | Polimeraz zincir reaksiyonu |
| EDTA: | Etilendiamin tetraasetikasit |
| CaCl₂: | Kalsiyum Klorür |
| SDS : | Sodyum Dodesil Sülfat |
| SNP: | Tek Nükleotid Polimorfizmi |
| EtBr: | Etidyum bromür |
| TAE: | Tris asetik asit EDTA |
| PSA: | Prostat Spesifik Antijen |
| SLE: | Sistemik Lupus Eritematozis |
| Con A: | Concavalin A |
| PBMC: | Periferic blood mononuclear cell |
| DNA: | Deoksiribonükleikasit |
| RFLP: | Restriction fragment length polymorphism |
| SINE: | Short interspersed repeated sequences |
| LINE: | Long interspersed repeated sequences |
| IL-10: | Interleukin 10 |
| mRNA: | Messenger RNA |
| VEGF: | Vascular endotelial growth factor |

1.GİRİŞ

Prostat kanserinde inflamasyon etkenlerinin rol oynadığına ilişkin kanıtlar her geçen gün hızla artmaktadır. Prostat kanserli hastalarda incelenen IL-10 polimorfizmi (rs1800872) A/A genotipi sonuçları istatistiksel analizler sonucunda yüksek PSA riskiyle ilişkili bulunmuştur (Han-ching Lin vd 2009). Bir diğer çalışmada ise IL-10-1082 G>A (rs1800896)'nun A allelinin polimorfizminin düşük seviyelerdeki anti-inflamatuvar sitokini prostat kanseri riskiyle pozitif ilişki göstermiştir (Wang MH vd 2009). Kronik prostat inflamasyonunun prostat kanseri patojenezinde önemli rol oynadığı düşünülmektedir. Anahtar anti-inflamatuvar sitokin geni IL-10 polimorfizmi immün yanıtı etkileyebilir. Ayrıca anti-metastatik molekül olarak da görevi vardır. Yapılan çalışmanın sonunda heterojen (GA) ve homojen mutant (AA) IL-10-1082'in genotiplerinin prostat kanserli hastalarda sağlıklı bireylere oranla daha sık görüldüğü ileri sürülmüştür (Kesarwani vd 2009).

Sistemik inflamasyon ve rol alan interlökinler genellikle akciğer, gastrointestinal ve over malignansileriyle ilişkili olup sağ kalıma ters etki gösterir (Forrest LM vd 2003, Falconer JS vd 1995). Sistemik inflamasyon ve bu ters etki artan tümör prognozu, angiogenez ve metastatik potansiyel gibi tümöre bağlı mekanizmalarla açıklanabilir. Ayrıca kilo kaybı, hipermetabolizma ve gıda alımındaki azalmayla da ilişkilidir (Wigmore SJ vd 1997, Falconer JS vd 1994). Sistemik inflamasyon ve kanser arasındaki ilişki henüz bilinmemekte olup pro-inflamatuvar sitokinlerin prostat kanserinde önemli rol oynadığı düşünülmektedir (Gelin J vd 1991, Strassman G vd 1992).

Projemizde, prostat kanserlerinde IL-10-1082 ve IL-10-592 polimorfizmi ve IL-10-1082 allel sıklığı incelenerek bu parametrelerin her birinin prostat kanseriyle olan ilişkisinin araştırılması hedeflenmektedir.

2.KURAMSAL BİLGİLER VE LİTERATÜR TARAMASI

2.1 Prostat Bezinin Morfolojisi

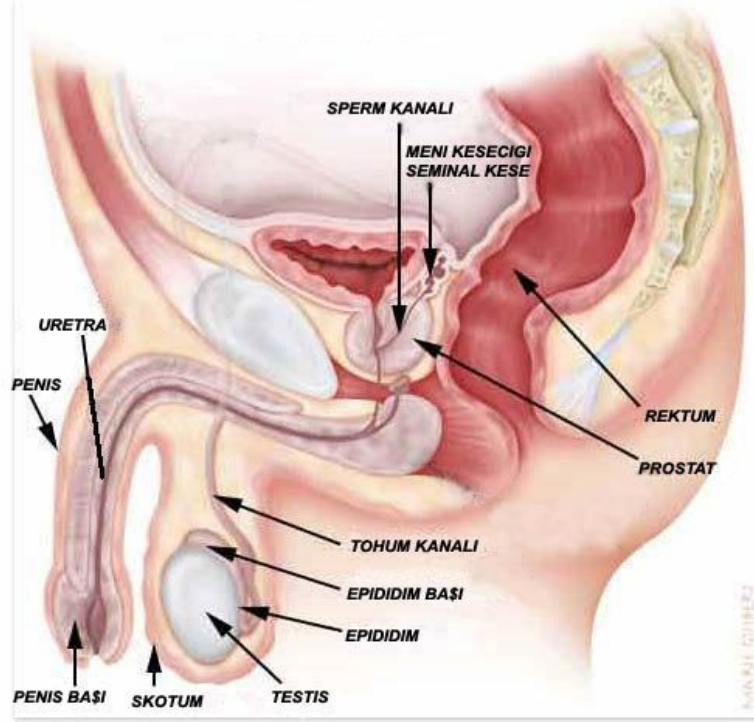
2.1.1. Embriyoloji

Prostatik üretra epitel, ürogenital sinüs endoderminden köken almaktadır. Embriyonel gelişimin üçüncü ayında prolifer olmaya başlayarak çevresindeki mezenşimal doku içine penetre olan bazı tomurcuklanmalar göstermektedir. Prostatın glandüler bez epitel bu endodermal hücre tomurcuklarından gelişirken, epitel hücreleriyle ilişkili mezenşimden ise, organın stroması ve düz kasları meydana gelmektedir. Üretral orta noktada, verumontanum seviyesinde prostata açılan ejakülatuar duktuslar ve etrafındaki mezankim dokusu, mezonefrik kanal kökenlidir. Bu nedenle prostat çift embriyonik gelişimlidir. Neonatal dönemde çapı 1 cm' den az olan prostat, puberteye kadar gelişerek 2 cm' den küçük çapa ulaşmakta ve puberteden sonra prostatın matürasyonu hızlanmaktadır ve 20 yaşında erişkin halini almaktadır (Basaklar C. 1993).

2.1.2. Anatomi

Erkek genital sisteminin en büyük aksesuar bezi olan prostat, mesane boynu ile ürogenital diyafram arasında, gerçek pelviste yer almaktadır. Prostat bezi, tabanı proksimalde mesane boynu ve veziküla seminalis giriş noktalarında, apeksi distalde ürogenital diyaframda olan ters çevrilmiş koniye benzeyen, prostatik üretrayı çevreleyen fibromüsküler glandüler bir organdır (Şekil 1.) (McNeal JE. 1997). Prostatik üretra, bezin merkezinde vertikal olarak ilerlerken, verumontanum seviyesinde öne doğru yaklaşık 35°'lik açılanma oluşturmaktadır. Denonviller fasyası olarak bilinen ince bağ dokusu tabakası, posteriorda prostat ve veziküla seminalisleri rektumdan ayırır. Prostat kanlanması başlıca a. vesikalis inferior, rectalis media ve arteria pudenda interna'dan sağlanmaktadır. Prostat venleri, prostatın kapsülü ve fibröz kılıf arasında zengin

pleksuslar oluşturmaktadır. Bu pleksuslar presakral vertebral pleksuslarla (Batson venleri) anastomoz yaparlar. Bu yapı prostat kanserinin erken vertebral yayılımını açıklamaktadır. Son olarak internal iliak venlere drene olurlar. Lenfatikleri ise bezin çevresinde pleksus oluşturarak internal iliak lenf düğümlerine boşalır. Prostatın sinirleri, inferior hipogastrik pleksustan gelmektedir (Dikson JS., Gosling JA. 1996).



Şekil 2.1 Ürogenital sistem anatomisi(www.cambridgeurologypartnership.com.uk/images/)

2.1.3. Etiyoloji

Prostat kanseri, erkeklerde en sık tanı konulan, akciğer kanserinden sonra en çok kanser ölümlerinden sorumlu olan, aynı zamanda gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerdeki orta yaşını geçmiş erkeklerin en sık tanı alan kanser türüdür. Bir erkekte 0-39 yaş arası prostat kanseri gelişme olasılığı %0.01 iken, 40-59 yaş arası %2.58, 60-79 yaş arası %14,7 ve yaşam boyu bir erkekte klinik önemi olan prostat kanseri gelişme olasılığı % 17,8 gibi yüksek oranlardadır. Prostat spesifik antijenin (PSA) prostat kanseri tanısında kullanılmaya başlamasından sonra 1986-1992 yılları arasında prostat kanseri insidansında bir artış olmuş bundan sonrada düşmeye başlamıştır. PSA testinin

yaygınlaşması ile lokal hastalık insidansı artarken metastatik hastalık insidansı azalmaktadır (Stephenson RA. vd 1995). Genetik yatkınlık ve çevresel faktörlerin prostat kanserinin etiolojisinde etkili olabileceği ileri sürülmektedir.

2.1.4. Risk Faktörleri:

Prostat kanseri için bir takım potansiyel risk faktörlerin olduğu belirtilmektedir. Bu faktörler; yaş, ırk, aile hikâyesi, diyetle alınan yağ ve hormonlar, vazektomi, A vitamini ve düşük D vitamin düzeyleri olarak sayılabilmektedir (Reiter DE. vd 2002).

2.1.4.1. Yaş:

Prostat kanserinin yaşla çok kuvvetli ilişkisi bulunmaktadır. Birçok diğer organ kanserinde belirli bir yaşta insidans belirgin olarak artmaktadır. Fakat prostat kanserinde belli yaş aralığında insidansın artmasından ziyade, insidansın yaşın artışına paralel bir yükselme bulunmaktadır. 50 yaş üstü erkeklerde hem görülme sıklığı hem de kanserden ölüm oranı yaşa bağlı olarak artar. 40 yaşın altında prostat kanseri gelişmiş olması riski 1/10.000, 40-59 yaş arasında 1/103 ve 60-79 yaş arasında 1/8 olarak belirtilmektedir (Stephenson RA vd 1995).

2.1.4.2. Irk:

Prostat kanseri insidansı dünya çapında büyük değişkenlik göstermektedir. Uzak doğuda yaşayanlar batı ülkelerinde yaşayanlara göre 100'e 10 gibi bir oranda daha az yakalanma riski göstermektedir. Japonlarda görülen düşük insidansın diyet ve yaşam tarzı faktörlerinden dolayı olduğu belirtilmektedir. ABD'de yaşayan siyah derili erkeklerde prostat kanseri insidansının ve mortalitesinin beyazlara göre daha yüksek olduğu ve bunlarda metastatik hastalığın daha fazla olduğu bilinmektedir. Prostat kanserinin tüm evreleri göz önüne alındığında 5 yıllık yaşam oranları zencilerde % 87, beyazlarda ise % 94 olarak belirtilmektedir (Ross RK vd 1992).

2.1.4.3. Aile öyküsü:

Prostat kanseri birinci derece akrabalarında bulunan kişilerde risk 2-3 kat artmaktadır. Prostat kanserlerinin % 9'unda genetik yatkınlık gösterilmiştir. Akrabalarında prostat kanseri olanların prostat kanserine yakalanma riski yaşları ile ters orantılı olarak artmaktadır. Elli yaşında ve birden fazla akrabasında prostat kanseri olan bir kişinin oğlu veya babası, 70 yaşında ve etkilenmiş bir akrabası bulunmayan kişinin oğlu veya babasına göre prostat kanseri için 5-11 kat daha fazla risk taşımaktadır (Carter BS vd 1993).

2.1.4.4. Diyet:

Prostat kanseri gelişim riskinin yağ tüketimi yüksek oranda olan kişilerde arttığı ileri sürülmektedir. Bu hipoteze göre diyetle alınan fazla miktarda yağ, seks hormonlarının sentezini arttırmakta bu da prostat bezinde kanser riskini arttırmaktadır. Düşük vitamin D düzeylerinin ve yüksek oranda kalsiyum tüketiminin de prostat kanseri riskini artırdığı gösterilmiştir. Ayrıca vitamin E, selenyum ve yüksek oranda likopen içeren domatesin prostat kanseri riskini azalttığı ileri sürülmektedir (Chan JM vd 1998).

2.1.4.5. Hormonlar:

Normal prostat gelişimi için testosteron ve onun daha etkin bir metaboliti olan dihidrotestosteron gereklidir. Prostat kanseri, testosteronu dihidrotestosterona dönüştüren 5 alfa redüktazın konjenital eksikliği olan insanlarda görülmez. Fakat prostat kanserinde androjen ve östrojenlerin kesin rolleri tam olarak anlaşılamamıştır (Ross RK vd 1998).

2.1.4.6. Diğer:

Prostat kanseri riskinin vazektomili hastalarda arttığı, bazı çalışmalarda prostat kanserine yakalanma yaşının 35'e indiği belirtilmiştir. Düzenli fiziksel aktivitenin de kanser yakalanma riskini azalttığı ileri sürülmektedir (Ross RK vd 1998).

2.2. POLİMORFİZM VE KANSER

2.2.1. Polimorfizm

İnsan DNA'sının yaklaşık % 99,9'u iki insan arasında aynıdır ve insanlardaki genetik çeşitlilik DNA zincirindeki küçük farklardan kaynaklanmaktadır. Bazı DNA sekanslarındaki farklar insan fenotipini etkilememekte bazıları ise direkt hastalığa neden olmaktadır. Bu iki uç arasında anatomik, fizyolojik, tedaviye cevap, ilaçlara karşı yan etki, enfeksiyonlara yatkınlık, kansere yatkınlık ve kişilik özellikleri gibi genetik farklılıklar yer almaktadır (Basaran N. 1999).

Bir genin özgün bir kromozom bölgesinde (lokus) veya DNA dizisinin birkaç alternatif formundan her biri ‘’allel’’ olarak adlandırılmaktadır. Gen lokusu kromozom üzerinde belirli bir karaktere ait genetik bilginin yer aldığı bölgedir. İnsanlar her otozomal lokusunda biri anneden diğeri babadan gelen iki allel bulundurlar. Belirli bir popülasyonda, belli bir gen lokusunda, bir allelin bulunma sıklığı allel frekansı veya gen frekansı olarak adlandırılır. Bir toplum genlerin dağılımı yani farklı gen lokuslarındaki allel frekansları ile karakterize edilebilir (Basaran N. 1999). Farklı genom lokuslarındaki allellerde çok çeşitli mutasyonlar bulunmaktadır. Bu mutasyonlar toplumda normal varyasyonundan kalıtsal hastalıklara kadar uzanmaktadır. Günümüzdeki rutin moleküler teknikler ile birçok genetik hastalıktaki mutasyonlar kolaylıkla belirlenebilmektedir. Toplumdaki farklı mutasyonların tanımlanması ile ailelerin genetik hastalıklar açısından taranması ve geniş popülasyonların risklerinin belirlenmesi mümkün olabilmektedir.

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

sıklıkla genlerin protein kodlamayan bölgelerinde görülmektedirler (Basaran N. 1999, Weaver R. vd 1989).

Yapısal genlerde, amino asitleri kodlamak üzere şifrelenmiş olan nükleotid segmentlerine ekzon, şifrelenmemiş olan nükleotid segmentlerine ise intron denilmektedir (Basaran N. 1999, Weaver R. vd 1989). Protein sentezini kodlayan fonksiyonel ve yapısal genlere tek kopya genleri denilmektedir. Hücre, her genetik dizi için iki kopya içermektedir. Tek kopya genlerin oluşumuna katılan DNA, kromozomların içinde bulunan DNA'nın küçük bir kısmını oluşturmaktadır. Bu bölgedeki DNA değişimleri proteinin fonksiyonunu değiştirmektedir (Basaran N. 1999, Meyer UA. 1997).

Spesifik bir DNA çift sarmal sekansını tanıyan ve DNA'yı belirli bir bölgeden kesen enzimlere '**Restriksiyon Enzimleri**' denilmektedir. Eğer polimorfizmler, bu restriksiyon enzimlerinin kesim bölgesinin yok olmasına ya da yeniden oluşmasına neden olurlarsa, bu durum kolaylıkla saptanabilmektedir. DNA, bu enzimlerle kesildiğinde farklı uzunlukta parçalar oluşur ve agaroz jel elektroforezinde moleküler boyutlarına göre değişik pozisyonlarda görülürler. Bunlara; restriksiyon enzimi uzunluk polimorfizmleri "**Restriction fragment length polymorphism (RFLP)**" denilmektedir (Lewin B 1994).

Kodlamayan DNA segmentleri iki ana grupta incelenebilir;

Dağılmış tekrarlayan DNA dizileri: Uzunlukları 500 baz çiftinden daha küçük olan ve tüm genomda dağılmış olarak bulunan dizilere *SINE (short interspersed repeated sequences)* denilmektedir. Bu gruba ait ailelerden en önemlisi *Alu* tekrar dizisidir. *Alu* ailesinin tüm genomdaki kopya sayısı 500.000 kadar olup, uzunlukları 300 baz çifti civarındadır. 5-6 kb uzunluğunda olan tekrar dizisine ise *LINE (long interspersed repeated sequences)* denilmektedir (Basaran N. 1999).

Dağılmamış tekrarlayan DNA dizileri: Bunlar genellikle kromozomların heterokromatik bölgelerinde lokalize olmuşlardır. Ayrıca kromozomların sentromerik ve telomerik bölgelerinde de bulunmaktadır. Tekrarlanan DNA sayısı aynı ailenin bireylerinde farklı olabilir. Hücrenin yaşamı boyunca oluşan replikasyonlar sırasında

tekrar sayıları değişebilmektedir ve bu değişiklikler bir sonraki nesle aktarılmaktadır (Basaran N.1999).

2.3. SİTOKİNLER

Sitokinler çözünür (salgılanan) proteinler veya glikoproteinler olup özel reseptör ligandlarına bağlanarak sinyal iletimi ve ikincil haberci yolları başlatır ve hedef hücrelerin aktivitesini kontrol eder veya ayarlarlar. Sitokinler pleiotropik bir gruptur ve vücutta birçok organ sistemini etkilemektedir. Çeşitli sitokinlerin büyük derecede etkileşiminden bir ağ oluşur. Bu etkileşim gen aktivasyonu veya baskılaması ile sonuçlanır. Sitokinler; interlökinler, interferonlar ve tümör nekrozis faktör gen ailesini içermektedirler (Ken LJ 2002). Ayrıca son zamanlarda yeni sitokinler (başlıca interlökin-10 homologları) tanımlanmıştır (Zdnaov A. 2004). Sitokinler birkaç kritere göre sınıflandırılabilir. Bu sınıflandırma bazen onları üreten hücre tipine göre yapılır. Bununla birlikte en yaygın olan sınıflandırma sisteminde, sitokinler, **Th1** (pro-inflamatuvar sitokinler, TNF- α ve interlökin-1 gibi) ve **Th2** (anti-inflamatuvar sitokinler, interlökin-10 ve interlökin-4 gibi) olmak üzere iki gruba ayrılır. Bu sınıflandırma sadece bir genellemedir ve bazı sitokinler (IL-6 gibi), etkileşime karışan hücre tipine göre hem pro-inflamatuvar hem de anti inflamatuvar etki gösterebilir. İmmün sistemde sitokin uyarımına verilen farklı yanıt, Th1/Th2 dengesini kontrol edebilir. Bu dengenin her iki yönde de bozulması birçok immün ve enfeksiyonel hastalığın kliniğini önemli derecede etkilemektedir (Keen LJ. 2002).

Sitokin üretiminde görülen bireysel farklılıkların, ilgili genlerin allelik polimorfizmine bağlı olduğu sanılmaktadır. Tek veya çift yumurtalı ikizleri ve akraba olmayan bireylerde bulunan farklılıkların araştırılması sitokin salınımında kalıtsal farklılıkları ortaya çıkarmıştır (Reuss E. vd 2002, Westendorp RG vd 1997). İn vitro hücre kültüründe, sitokinler açısından görülen bireysel farklılıklar kısmen bu genlerin mikrosatellit veya tek nükleotid polimorfizmine bağlanmıştır (Warlae MC vd 2003). Bu gibi değişiklikler bazı hastalıklara yatkınlıkla bağlantılı olup hastalığın şiddeti ve ilerlemesine katkıda bulunabilir (Yılmaz V vd 2005). Son zamanlarda sitokin, sitokin reseptör gen polimorfizmleri ve bu polimorfizmlerin immün dengeyi nasıl etkilediği bilimsel ilgi odağı olmuştur (Keen LJ. 2002). Sitokinler ve ilgili reseptörlerin yüksek derecede polimorfik olduğu gösterilmiştir (Bidwell J vd 1999). Bu polimorfizmler; tek

nükleotid polimorfizmler (SNPs), değişken sayıda ardışık tekrar (VNTRs) polimorfizmleri ve mikrosatellit polimorfizmleri olmak üzere üç biçimde görülür (Keen LJ. 2002, Gibson AW vd 2002). Sitokinler ve reseptörlerinin genlerinde bulunan polimorfizmlerin büyük çoğunluğu promotör, intron ve 3' translyasyona uğramayan bölgelerde yer almaktadır. Genin translyasyona uğramayan bölgelerindeki bu dizi değişiklikleri yine de gen ifadenmesi ve işlevini etkileyebilir. Promotör bölge polimorfizmi transkripsiyon düzenleyici elementleri bozar veya durdurabilir (Keen LJ. 2002).

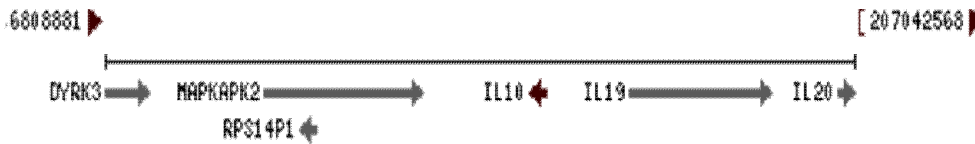
Sitokin polimorfizmi genellikle hastalığa yatkınlıktan ziyade hastalığın etiyolojisini etkilemektedir. Belirli bir polimorfizm büyük ihtimalle; özgül belirtiler, sonuçlar veya tedavi sürecine özel reaksiyonlar ile karakterize olan bir hasta alt grubunu tanımlar. Sitokinlerin pleiotropizmi ve etkili oldukları geniş ağ sistemi göz önüne alınırsa bu hiç şaşırtıcı değildir (Keen LJ. 2002).

2.3.1. IL-10 Geni

IL-10 geni 1. kromozomun uzun kolu üzerinde (1q31-32) haritalanmıştır (Moore KW vd 2001, Huang YC vd 2005). Bu gen, beş ekzondan oluşan 5,1 kb'lık bir DNA dizisini kapsamaktadır (Tone M vd 2000). IL-10 geninin -30'dan -24'e kadar olan bölgesinde tipik bir TATA kutusu (TATAAAA kutusu) vardır. Bu, IL-10 ekspresyonunun (diğer birçok sitokin geni gibi) TATA tipi promotör aracılığı ile düzenlendiğini göstermektedir (Tone M vd 2000).

IL-10 geninin ifadenmesi sonucu, ~2 kb'lık mRNA (hIL-10) ortaya çıkar (Moore KW vd 2001, Vieira P vd 1991). IL-10, genellikle bir aktivasyon uyarısına yanıt olarak çeşitli hücrelerde ifade edilir ve ekspresyonu farklı hücrelerde (örneğin T hücreleri ve monositler/makrofajlar) farklı mekanizmalarla düzenlenir. IL-10 geninin bir dereceye kadar yapısal olarak transkripsiyona uğradığı ve daha sonra post-transkripsiyonel RNA degradasyon mekanizmalarının değişimi ile kontrole maruz kaldığı öne sürülmüştür. Yapısal ekspresyon ve postranskripsiyonel düzeyde kontrolün kombinasyonu, iltihaba karşı homeostatik cevabın hızlı bir şekilde ortaya çıkmasına izin verir (Moore KW. vd 2001).

IL-10 gen ekspresyonu SP1 ve SP2 transkripsiyon faktörleri aracılığı ile düzenlenir. Bu transkripsiyon faktörleri yapısal olarak ifade edilir ve G + C'ce zengin dizilere (GC kutusu) bağlanır. Ancak bu faktörlerin, IL-10 promotörü üzerindeki bağlanma dizisi GC kutusu yerine çekirdek olarak CCTCCT dizisi içeren sis etkili bir elementtir (Tone M. vd 2000). İkizler ve aile çalışmalarından elde edilen sonuçlar, IL-10 üretimindeki değişikliğin yaklaşık % 50-75'inin genetik olarak belirlendiğini göstermiştir (Reuss E. vd 2002, Westendorp RG. vd 1997). IL-10 mRNA sentez hızı ve en sonunda sitokin üretimi genin nihai yapılına bağlıdır (Crawley E. vd 1999, Eskdale J. vd 1998).



Şekil 2.2 İnsan IL-10 Geni (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3586>)

2.3.2. IL-10 Geninde Bulunan Polimorfizmler

IL-10 geni polimorfiktir ve bu polimorfizm farklı bireylerde üretilen sitokin düzeylerinde nicel varyasyonlara neden olur (Kalish RB vd 2004). IL-10, hastalıklara genetik yatkınlık ile bağlantılıdır. *In vitro* ortamda, IL-10 üretim düzeyindeki farklılıklar, temel olarak kalıtsal bir bileşenden etkilenmektedir. IL-10 promotör polimorfizmi hastalıklardaki genetik yatkınlığın moleküler temelini oluşturabilir (Westendorp RG vd 1997). İnsan IL-10 geninin 5' ucundaki dizilimde birkaç polimorfizm dikkate alınmıştır. Bu polimorfizmler, transkripsiyon başlama noktasından ~1,2 kb ve ~4 kb 5' uca doğru (upstream) iki bölgede birçok (CA)_n tekrarından oluşan mikrosatellit polimorfizmler (IL-10.R ve IL-10.G) ve - 1082 (G/A) (rs1800896 G/A), - 819 (T/C) (rs1800871T/C) ve - 592 (A/C) (rs1800872A/C) pozisyonlarında bağlantılı (linked) üç SNP'den ibarettir (Moore KW vd 2001, Eskdale J vd 1997). IL-10 promotörünün tam olarak belirtilmemesine rağmen bu polimorfizmlerin promotör bölgesinde yer aldığı varsayılmaktadır (Moore KW vd 2001). Ayrıca IL-10 distal promotör bölgesinde diğer SNP'lerin (- 2763, - 2849, - 3575 pozisyonlarında) de

bulunduğu bilinmektedir (Vieira P. vd 1991). En çok araştırılan SNP'ler, transkripsiyon başlama noktasının 5' yönünde – 1082(G/A), – 819(T/C) ve – 592(A/C) pozisyonlarında bulunan polimorfizmler olmuştur. Bu üç dimorfizm, özellikle - 819(T/C) ve –592(A/C) polimorfizmleri, güçlü bağlantı dengesizliği (linkage disequilibrium) gösterir (Huang YC vd 2005, Opdal SH 2004).

Bu üç SNP'nin, IL-10 ekspresyon düzeyi ile bağlantılı olduğu gösterilmiştir ancak farklı sonuçlar elde edilmiştir (Reuss E vd 2002, Crawley E vd 1999, Eskdale J vd 1999). 1082 G/A, ETS faktörü bağlanma yeri sanılan bir bölgede ve – 819 T/C, pozitif düzenleyici bölgede yerleşmiştir. –592 A/C ise, bir STAT3 bağlanma yeri ve negatif düzenleyici bölge olabilir (Gibson AW v 2001, Crawley E vd 1999). Bununla birlikte, bu polimorfizmlerin fonksiyonel ilintisi, onların bazı immün-inflamatuvar hastalıkların üzerinde (şiddet ve yatkınlık açısından) etkili olduğundan yola çıkarak saptanmıştır (Kingo K vd 2005).

IL-10 geninin –1082 G alleli ve G içeren haplotipleri yüksek IL-10 ekspresyon düzeyi ile ilgili bulunmuştur (Kingo K vd 2005). Başka bir çalışmada –1082 A alleli düşük IL-10 üretimi ile bağlantılı olduğu gösterilmiştir (Yılmaz V vd 2005). Ancak diğer bir çalışmada, – 1082 polimorfizmi IL-10 düzeyini etkilememiş ve – 819 T alleli yüksek IL-10 düzeyi ile bağlantılı bulunmuş (Ma SL vd 2005). Diğer taraftan periferik kan mononükleer hücrelerin (PBMC) Concanavalin (ConA) ile uyarılması sonrasında, promotör –1082 GG genotipi ile düşük IL-10 üretimi arasında bağlantı bulunmuştur (Warlae MC vd 2003). Akraba olmayan ve sağlam gönüllülerde, –819 T allelini taşıyanlarda, homozigot –819 C allelini taşıyanlara göre daha yüksek IL-10 düzeyi gösterilmiştir. Buna karşın, düşük IL-10 ekspresyonu, –819 C ve –592 C alleli ile bağlantılı bulunmuştur ve – 1082A/– 819C/– 592C haplotipini taşıyanlarda IL-10 üretiminin düşük olabileceği bildirilmiştir (Ma SL vd 2005). Diğer bir çalışmada ise – 592 C allelinin *in vitro* ortamda yüksek IL-10 üretimi ile bağlantılı olduğu rapor edilmiştir (Edwards-Smith CJ vd 1999).

Üstelik IL-10 distal promotör bölgesinde bulunan diğer SNP'lerin (– 2763, – 2849, – 3575) de IL-10 üretimini etkilediği öne sürülmüştür ancak proksimal promotör pozisyonlar ile oluşan geniş haplotiplerin sitokin düzeyleri ile bağlantısı tam olarak açıklanmamıştır (Gibson AW vd 2001).

Genotip ve haplotiplerin dağılımında çarpıcı etnik farklılıklar vardır (Ma SL vd 2005). Bazı polimorfizmler sadece belirli popülasyonlarda bulunur (Lei SF vd 2003). Bazıları ise farklı allel sıklıkları gösterir. Bu, genetik polimorfizm ve hastalık arasındaki bağlantı üzerinde açıkça bir gizleyici etkiye neden olabilir (Ma SL vd 2005).

Birçok araştırmadan elde edilen sonuçlar, IL-10 promotör haplotiplerinin bazı hastalıklara yatkınlık veya hastalıkların şiddeti ile bağlantılı olduğunu göstermiştir. Belki de, en güçlü bağlantı Sistemik Lupus Eritematozis (SLE) hastalığında görülmüştür (Moore KW vd 2001). Bu hastalıkta, IL-10'un yüksek ekspresyonu ve ilgili alellerinin nedensel veya ağırlaştırıcı rolü olduğu önerilmiştir (Moore KW vd 2001, Gonzales-Amaro R vd 1998, Rood MJ vd 1999).

IL-10 anti-inflamatuvar ve anti-angiogenik özellikleri olan bir sitokindir. IL-10'un anti-inflamatuvar özelliklerinin tümör hücrelerinin immün denetimden kaçmalarına izin verebilen pro-tümörogenik potansiyele sahip oldukları varsayılmaktadır. IL-10 ayrıca hem hayvan hem de in-vitro modellerde tümör gelişimini ve angiogenezi arttırdığı gözlemlenmiştir (Huang S vd 1996, Stearns ME vd 1999).

Yapılan birçok çalışma IL-10'un genetik varyasyonlarıyla ve kanserle ilişkisine dayalıdır (Howell WM, Rose-Zerilli MJ 2006). Bu çalışmaların çoğu IL-10'un promotör bölgesinde meydana gelen -1082 G>A, -819 C>T ve -592 C>A allellerini de içeren ve 'yüksek' (GCC/GCC) ya da 'düşük' (ATA/ATA) ekspresyon genotipleriyle sonuçlan bir ya da birden fazla tek nükleotid polimorfizmine (SNPs) odaklanmaktadır ki bu çalışmalar stimüle edilen periferik kan lenfositlerinden IL-10 ürünü ölçümleri baz alınarak yapılmıştır (Edwards-Smith CJ vd 2006, Turner DM vd 1997). 22 çalışmanın 17'sinde tümör tipine göre ilişkinin yönü değişmesine rağmen IL-10 genotipiyle duyarlılık, sağkalım, safha ve tümör karakteristiği arasında anlamlı ilişkiler bulunmuştur. Yüksek IL-10 genotip üretimi bazı solid kanserlerde (servikal, kardşa gastrik gibi) yüksek IL-10 genotip üretimiyle ilişkiliyken, düşük IL-10 üretimi artan duyarlılıkla ve ileri düzeydeki çeşitli kanser safhalarıyla ilişkilidir (deri, malignant melanom ve renal hücre karsinomu gibi) (Howell WM, Rose-Zerilli MJ 2006). Yapılan çalışmaların üçünde IL-10-592 SNP (Eder T vd 2007) , -1082 G>A ve -592 SNPs (Xu J. vd 2005) , -819 C>T ve 210 T>C IL-10 SNPs'lerle (Michaud DS vd 2006) IL-10

arasında herhangi bir ilişki bulunmazken, birinde düşük IL-10 -1082 AA genotipiyle prostat kanseri arasında (McCarron SL vd 2002) anlamlı pozitif bir ilişki bulunmuştur.

IL-10'un genetik varyasyonu ve prostat kanseriyle ilgili bu raporlar çelişkili olsa da düşük IL-10 seviyesinin prostat kanserindeki tümörogenezi arttırabileceği hipotezini destekleyen hayvanlarla ve in vitro ortamda yapılan çalışmalar sonucunda elde edilmiş veriler de vardır. Stearn ve arkadaşları, IL-10'un eksprese edildiği insan prostat kanserli hücrelerin immunocompromise farelere orthotopikal olarak implant edilmesiyle IL-10'un eksprese edildiği hücrelerde daha küçük tümörlerinin, daha az metastazın ve artan sağ kalımın olduğunu belirlemişlerdir (Stearns ME, Wang M 1998).

Bu nedenle düşük IL-10 üreten genotiplerin (-1082AA,-819TT, -592AA gibi) artan prostat kanser riskiyle ilişkileri araştırılmıştır. Ayrıca ikinci bir hipotez olarak düşük IL-10 üreten genotiplerin tümör karakteristiğiyle ilişkisi olduğunu gösteren başka bir deneysel çalışma da yapılmıştır. IL-10 ve prostat kanseriyle genetik varyasyon ilişkisi araştırılmış ve sonuçta IL-10'daki genetik varyasyonun prostat kanserine duyarlılıkta ve yüksek seviyedeki hastalıklarda etken olduğu sonucuna varılmıştır.

2.3.3. IL-10'un Prostat Kanseriyle İlişkisi

Prostat ve diğer kanserli hastalarda IL-10 düzeyleri sıklıkla yüksektir ve bu durum invazif hastalıklarla, düşük klinik belirtilerle progresyonla ve metastazla ilişkilidir (Stearns ME. vd 1999, Kong FM. vd 1996, Howell WM. vd 2001). Bu nedenle sitokin aracılı angiogenezi inhibe eden terapötik ajanlar, tümör gelişimini de inhibe edebilir ve klinik belirtilerin gelişimini sağlayabilir (Tan WW 2006).

Prostat kanserinin bir tür immünolojik rahatsızlık olduğu düşünülmekteydi ancak yapılan araştırmalar gösteriyor ki prostat, lenfatik bir sisteme sahiptir ve inflamatuvar bağışıklık yanıtı oluşturabilir ve bu yanıtlar prostat kanserinin prognozuyla ilişkili olabilir (Sarah McCarron vd 2002). Ayrıca çevresel ve genetik faktörler de prostat kanseri patojenezinde rol oynayabilir (Kesarwani vd 2009).

IL-10 kanser gelişiminde çift yönlü kılıç gibi davranan önemli bir sitokindir, ancak altta yatan esas mekanizma tam olarak bilinmemektedir. IL-10 tümör immünesini baskılar ve kanser hücre toleransına destek sağlar (Richter G. vd 1993, Nabioullin R. vd

1994). Bunun aksine IL-10 makrofajdan üretilen angiogenik faktörleri (vasküler endotelial büyüme faktörü gibi.) inhibe ederek tümör gelişimini ve metastazı baskılayabilir (Stearns ME, Wang M 1998, Balkwill F., Mantovani A 2001).

IL-10'a benzer olarak, TGF- β 1 kanser gelişiminde farklı roller üstlenebilir (Derynck R. vd 2001). Normal epitel, endotel ve hematopoietik hücrelerde TGF- β 1 farklılaşmayı destekleyerek ve proliferasyonu inhibe ederek tümör gelişimini baskılar. Tümörögenез esnasında TGF- β 1 sinyal yolağındaki hasarlar kanser hücrelerinin TGF- β 1 aracılı büyüme inhibisyonuna karşı dirençli hale gelirler ve tümör invazyonu ve metastatik potansiyeli geliştirerek angiogenezi ve immünosupresyonu arttırırlar.

IL-10'un anjiyogenezdaki rolleri göz önüne alındığında IL-10'un düşük ekspresyonlu allelleri diğer allellerle karşılaştırıldığında PCa riskini ve tümör seviyesini daha fazla arttırdıkları belirlenmiştir (Robinson CJ, Stringer SE 2001).

3. MATERYAL ve METOD

Tez çalışmamızda prostat kanseri olgularında IL-10 -592, -1082, polimorfizmlerinin araştırılması ve bu polimorfizmlerin allel sıklıklarının belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla ilk olarak Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı'nda prostat kanseri tanısı konmuş hastalardan alınan ve arşivlenen malign ve benign parafine gömülü dokular seçilmiş, bu dokulardan sırasıyla DNA izolasyonu ve Real Time PCR yöntemiyle polimorfizm tayini yapılmıştır.

3.1. Örnek Seçimi

Çalışma grubu Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı'na başvuran hastalardan benign ve malign prostat tümör tanısı almış olgulardan oluşturulmuştur. Bu hastalara ait Pamukkale Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı arşivinde bulunan dokular kullanılmıştır.

Bu çalışmada 20 adet benign ve 20 adet malign olmak üzere toplam 40 prostat tümürlü hastadan elde edilen parafinli doku arşivlerinde IL-10-592, 1082 polimorfizmleri saptanarak polimorfimlerin allel sıklıkları belirlenmiştir.

3.2. Parafine Gömülü Dokulardan Genomik DNA İzolasyonu

40 olguya ait formalinle tespit edilmiş parafine gömülü doku örneklerinin genomik DNA izolasyonu spin kolon teknolojisi kullanılarak (QIAamp DNA mini kit, Qiagen) kit yardımı ile gerçekleştirilmiştir.

3.2.1. DNA Saflığının Belirlenmesi ve Konsantrasyon Hesaplanması

1:50 oranında sulandırılan DNA'nın saflığı ve miktarı 260nm / 280nm dalga boyunda ölçüldü ve spektrofotometrik olarak değerlendirildi (Eppendorf Bio Photometer). Optik dansite₂₆₀ / Optik Dansite₂₈₀ oranının 1,8 olması DNA'nın saflığını göstermektedir. Çalışmamızda elde ettiğimiz DNA'ların saflıklarının ortalaması 1,84 olarak belirlenmiştir.

DNA miktarı ($\mu\text{g/ml}$), $50 \cdot \text{OD}_{260} \cdot \text{Sulandırma Faktörü (50)}$ formülü kullanılarak hesaplandı. 1 ünitenin 260 nm'deki optik dansitesi 50 $\mu\text{g DNA/ml}$ 'ye karşılık gelmektedir. Malign ve benign olmak üzere toplamda 40 adet dokunun DNA izolasyonu yapılmış olup DNA miktarları ortalama 43,53 $\mu\text{g/ml}$ olarak hesaplanmıştır.

3.3. Sitokin gen polimorfizmlerinin Real -Time PCR ile Belirlenmesi

IL-10-1082 ve IL-10 592 sitokinlerine ait genlerde gözlenen tek nükleotid polimorfizmleri (SNP'ler) için National Center for Biotechnology Information (Ulusal Biyoteknoloji bilgi Merkezi, NCBI) veri tabanında tanımlanan bölgeler kullanıldı. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>) (Tablo 3.1).

Tablo 3.1 IL-10-1082 ve -592 SNP'leri ve lokalizasyonları

| Gen | SNP Lokalizasyonu | SNP 'accession number' |
|-------|-------------------|------------------------|
| IL-10 | -592 | rs1800872 |
| IL-10 | -1082 | rs1800896 |

IL-10-1082 ve -592 sitokin genlerine özgü SNP analizleri için kullanılan primerler ve hibridizasyon problemlerinin dizaynı yapıldı ve sentezletildi. (TIB Molbiol, Berlin, Almanya). Çalışmada kullanılan primer setleri ve hibridizasyon prob dizilimleri Tablo 3.2. ve 3.3.'de verilmiştir.

Tablo 3.2 IL-10-592 SNP analizinde kullanılan primerler ve hibridizasyon problemlerinin baz dizilimleri (5'→3')

| IL-10-592 | |
|------------------|---|
| Primer sense | 5'- GGTGAGCACTACCTGACTAGC - 3' |
| Primer antisense | 5'- CCTAGGTCACAGTGACGTGG - 3' |
| Prob1 | 5'- AGCCTGGAACACATCCTGTGACCCC - 3'FL* |
| Prob2 | **640-5'- CCTGTCCTGTAGGAAGCCAGTCTC - 3' |

Tablo 3.3 IL-10-1082 SNP analizinde kullanılan kullanılan primerler ve hibridizasyon problemlerinin baz dizilimleri (5'→3')

| IL-10-1082 | |
|-------------------------|--|
| Primer sense | 5'- CTCGCTGCAACCCAACTGGC - 3' |
| Primer antisense | 5'- ATGGGGTGGGAAGAAGTTGAA- 3' |
| Prob1 | 5'- GGATAGGAGGTCCCTTACTTTCCTCTTACC- 3'FL* |
| Prob2 | **640-5'-CCCTACTTCCCCCTCCCAA - 3' |

SNP analizi için LightCycler 480 II gerçek-zamanlı PCR sistemi (Roche, Almanya) kullanıldı. Dizayn edilen primer-prob setleri kullanılarak gerçek-zamanlı PCR protokolünün optimizasyon çalışmaları yapıldı. Optimizasyon çalışmaları ile hem amplifikasyon hem de erime eğrisi analizleri için protokoller belirlendi. Öncelikle hedef bölge çoğaltıldı ve sonrasında amplikonun identifikasyonu, erime eğrisi analizi (melting curve analysis) ile yapıldı. Tablo 3.4.'de optimize edilen gerçek-zamanlı PCR reaksiyon karışımları yer almaktadır.

Tablo 3.4 IL-10-592 ve -1082 SNP analizlerine özgün reaksiyon karışımı

| İçerik | Hacim | Final Konsantrasyon |
|---------------------|-----------------------------|--------------------------|
| PCR-grade su | 6,4 μ l | - |
| MgCl ₂ | 1,6 μ l | 3 μ M |
| Primer sense | 2 μ l | 0,5 μ M |
| Primer antisense | 2 μ l | 0,5 μ M |
| Prob 1(FL) | 2 μ l | 0,2 μ M |
| Prob 2(LC640) | 2 μ l | 0,2 μ M |
| Master Karışım* | 2 μ l | 1X |
| DNA Örneği | 2 μ l | - |
| Toplam Hacim | 20 μl | μM |

*Reaksiyon karışımı için 'LightCycler HybProbe Master' kiti kullanıldı. Master karışımı: FastStart Taq DNA polimeraz, reaksiyon tamponu, MgCl₂ ve dNTP karışımından oluşmaktadır.

PCR-grade su, Mgcl₂, primerler, probalar ve Master karışımı (FastStart Taq polimeraz, reaksiyon tamponu, nükleotid karışımı ve 10mM MgCl₂) belirtilen sıra ile ve belirtilen miktarlarda karıştırıldıktan sonra, 18 μ l hacimde olacak şekillere kapillere aktarıldı. Kapillere aktarılan her reaksiyon karışımı üzerine 2 μ l DNA örneği eklendi. Negatif kontrol örneğinde DNA yerine 2 μ l 'PCR-grade' su kullanıldı. Toplam 20 μ l reaksiyon karışımı içeren kapillerler, karusel yardımı ile gerçek-zamanlı PCR sistemine yerleştirildi. Tablo 3.5.-3.6'da gerçek-zamanlı PCR protokolleri yer almaktadır.

Tablo 3.5 IL-10-592 SNP analizi için gerçek-zamanlı PCR protokolü*

| Analiz modu | Döngü | Segment | Hedef Isı | Süre | Kazanım Modu |
|-----------------------|-------|--------------|-----------------------------|-------|--------------|
| Pre-inkübasyon | | | | | |
| | 1 | | 95 ⁰ C | 10 dk | |
| Amplifikasyon | | | | | |
| | | Denatürasyon | 95 ⁰ C | 10 sn | - |
| | 40 | Annealing | 55 ⁰ C | 10 sn | Tek |
| | | Ekstensiyon | 72 ⁰ C | 17 sn | - |
| Erime Eğrisi | | | 95 ⁰ C | 0 sn | - |
| | | | 55 ⁰ C | 30 sn | - |
| | | | 85 ⁰ C | 0 sn | Sürekli |
| | | | Slope:0,2 ⁰ C/sn | | |
| Soğutma | | | | | |
| | 1 | | 40 ⁰ C | 30 sn | - |

Tablo 3.6 IL-10-1082 SNP analizi için gerçek-zamanlı PCR protokolü*

| Analiz Modu | Döngü | Segment | Hedef Isı | Süre | Kazanım Modu |
|-----------------------|-------|--------------|---|--------------|--------------|
| Pre-inkübasyon | | | | | |
| | 1 | | 95 ⁰ C | 10 dk | |
| Amplifikasyon | | | | | |
| | | Denatürasyon | 95 ⁰ C | 10 sn | - |
| | 40 | Annealing | 60 ⁰ C 55 ⁰ C Slope:0,2 ⁰ C/sn | 10 sn 1sn | Tek |
| | | Ekstensiyon | 72 ⁰ C | 10 sn | - |
| Erime Eğrisi | | | | | |
| | | | 95 ⁰ C | 0 sn | - |
| | | | 45 ⁰ C | 30 sn | - |
| | | | 75 ⁰ C Slope:0,2 ⁰ C/sn | 0 sn | Sürekli |
| Soğutma | | | | | |
| | 1 | | 40 ⁰ C | 30 sn | - |

* Gerçek-zamanlı PCR protokolü; Pre-inkübasyon: Enzim aktivasyonu ve kalıp DNA'nın denatürasyonu, Amplifikasyon: Hedef bölgenin primerler yardımıyla çoğaltılması, Erime eğrisi: Amplikona ait genotipin belirlenmesi (SNP analizi), Soğutma: Sistemde yer alan rotorun ve termal haznenin soğutulması basamaklarını içermektedir.

Optimize edilen protokollerde belirtilen reaksiyon koşullarına göre, primerler kullanılarak hedef SNP'yi içeren DNA parçaları çoğaltıldı. Amplikonların varlığı, özgün hibridizasyon prob setleri kullanılarak floresan artışı ile belirlendi. Özetle sistemdeki floresan değeri şu şekilde ölçülmektedir: Özgün hibridizasyon prob seti, çoğalan hedef bölgede yer alan dizilerle hibridize olabilen iki farklı olügonükleotitten oluşmaktadır. Bir prob, 5' ucunda 'LightCycler Red 640-N-hydroxy-succinimide ester

(Red 640-NHS ester)' (alıcı boya) ile işaretlidir ve 3' ucu fosforilasyonla modifiyedir. Diğer probun ise 3' ucu fluoresin (donör boya) ile işaretlidir. İki prob, hedef DNA'da birbirlerine oldukça yakın hibridize olduklarında (1-5 nt), gerçek-zamanlı PCR sisteminin mavi ışık kaynağı donör boyayı (floresin) harekete geçirir ve uzun bir dalga boyunca yeşil floresan ışığı saçılır. Donör ve alıcı boyalar birbirlerine çok yakın olduklarında, saçılan bu enerji ikinci bir hibridizasyon probundaki alıcı boyayı harekete geçirir ve farklı bir dalga boyunda ışık saçılır. 'Floresan Rezonan Enerji Transferi' (FRET) olarak adlandırılan bu enerji transferi, iki prob arasındaki mesafeye bağlıdır.

Amplikonların varlığının belirlenmesinin ardından, amplikonların identifikasyonu için, yani SNP analizi için erime eğrisi analizleri yapıldı. Bu aşamada, öncelikle sistemin ısısının arttırılmasına (örneğin 95 °C'ye çıkmasına) olanak sağlandı. Daha sonra ısı düşürüldü ve tekrar artması sağlandı ve ısı artışı sırasında her 0,1°C'de sistemde var olan floresan için okuma yapıldı. Gerçek-zamanlı PCR sistemi yazılım programı ile her bir örneğe ait 640 nm dalga boyunda ölçülen floresanın negatif türevini ısıya göre değerlendiren ve amplikona ait erime derecesini (T_m) gösteren grafikler elde edildi. SNP genotiplenmesinde, erime eğrisi analizi ile işaretli prob ve amplikon arasındaki tek bir yanlış eşleşmenin (mismatch) erime derecesini önemli oranda azaltacağı gerçeğinden yararlanılmıştır. Dolayısıyla destabilize mismatch içeren prob/amplikon hibridleri ile mükemmel eşleşen prob/amplikon hibridlerinin erime dereceleri kolaylıkla gözlemlenebilir ve karşılaştırılabilir. Çalışmada analiz edilen SNP'ler için prob dizaynları bazı SNP'ler için normal genotipe, bazı SNP'ler için polimorfik genotipe özgün yapıldığından, erime derecelerine göre normal homozigot genotip, heterozigot genotip ve polimorfizme özgün homozigot genotip ayrımı yapılmıştır.

İstatistiksel Analiz

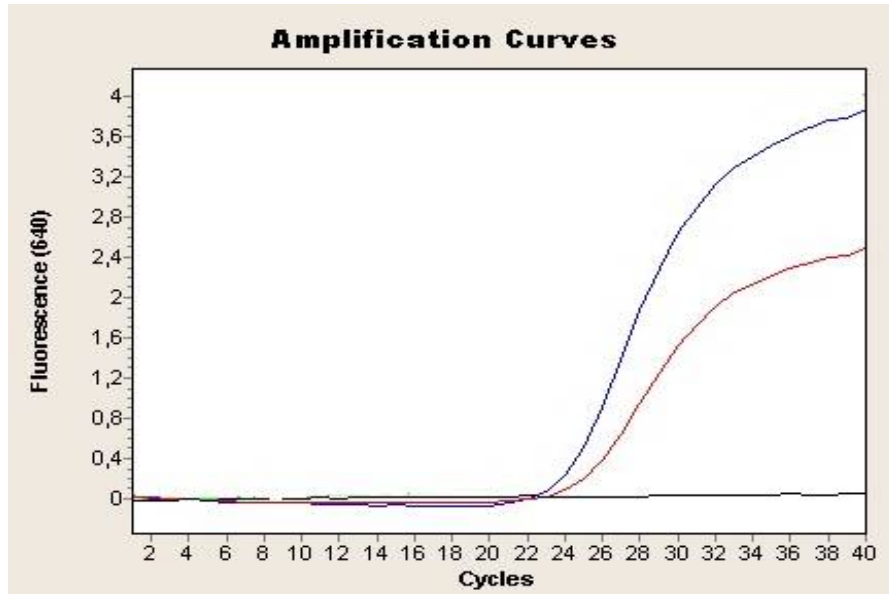
IL-10-592 ve IL-10-1082 sitokin gen polimorfizmlerinin gruplar arasındaki dağılım yüzdeleri hesaplandı. İstatistiksel analizler için SPSS 17,0 paket programı kullanıldı. Sitokinlere ait gen polimorfizmleri ile olgu grupları arasındaki ilişki Mann Whitney-U testi ile değerlendirildi. Testler sonucu elde edilen 'p' değerleri 0,05'den küçük ise anlamlı olarak kabul edildi. Ayrıca IL-10-1082 allel sıklığı Hardy Weinberg eşitliği ile hesaplandı. (<http://www.oege.org/software/hwe-mr-calc.shtml>)

4.BULGULAR

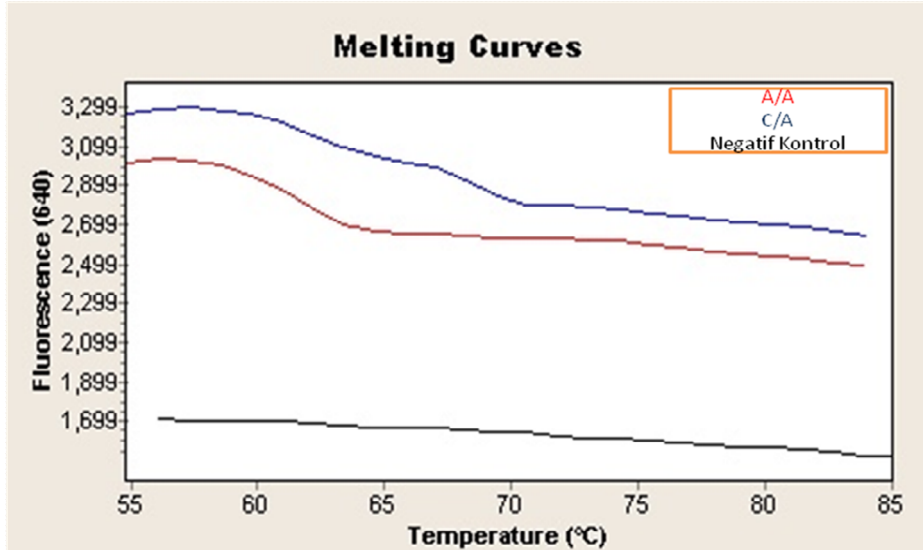
Çalışmadaki IL-10-592, -1082 sitokin genlerine ait SNP analizleri aşağıdaki Şekil 4.1'de sunulmuş olup SNP dağılımlarının malign ve benign prostat hiperplazisi taşıyan bireylerden oluşan gruplardaki karşılaştırmalı sonuçları tablo 4.1'de verilmiştir.

4.1. IL-10-592 SNP Analizi

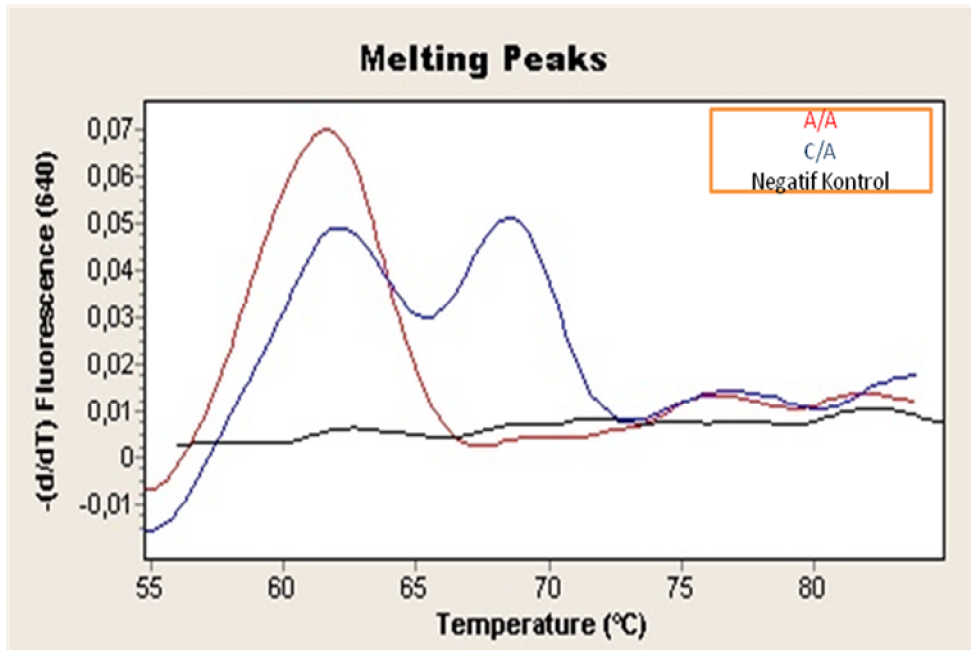
IL-10-592 SNP'ne özgün amplifikasyon eğrisi ve erime eğrisi analizleri sırasıyla aşağıdaki şekillerde gösterilmiştir.



Şekil 4.1. IL-20-592 SNP'ne özgün amplifikasyon eğrisi



Şekil 4.2 IL-10-592 SNP'ne özgün erime eğrisi

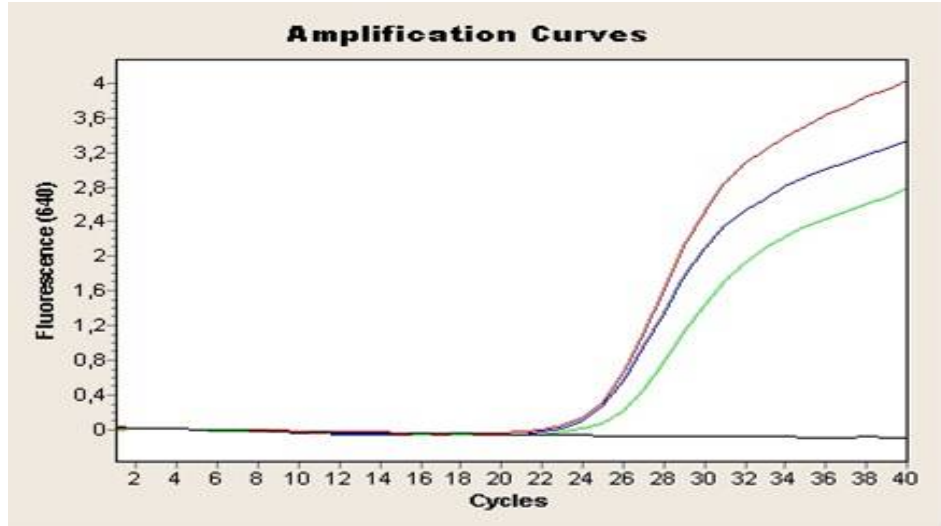


Şekil 4.3 IL-10-592 SNP'ne özgün erime analizi

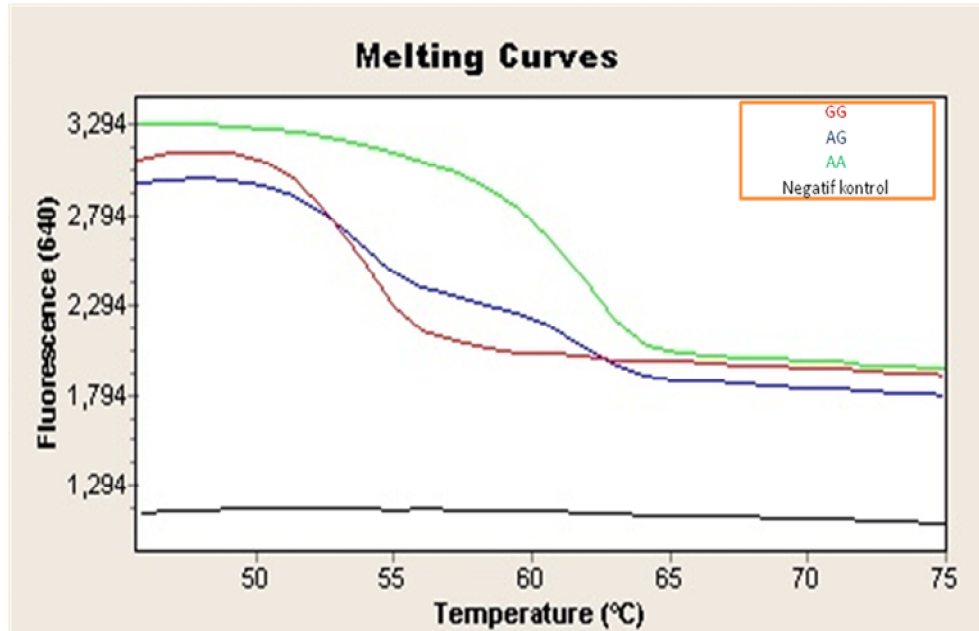
IL-10-592 sitokinine ait polimorfizmlerin genotip dağılımı malign ve benign olgu grupları arasında karşılaştırıldığında benign prostat tümörü taşıyan grupta 9 adet 'CA' genotipi, malign prostat tümörü taşıyan grupta ise 7 'CA', 4 'AA' genotipine rastlanmıştır.

4.2. IL-10-1082 SNP Analizi

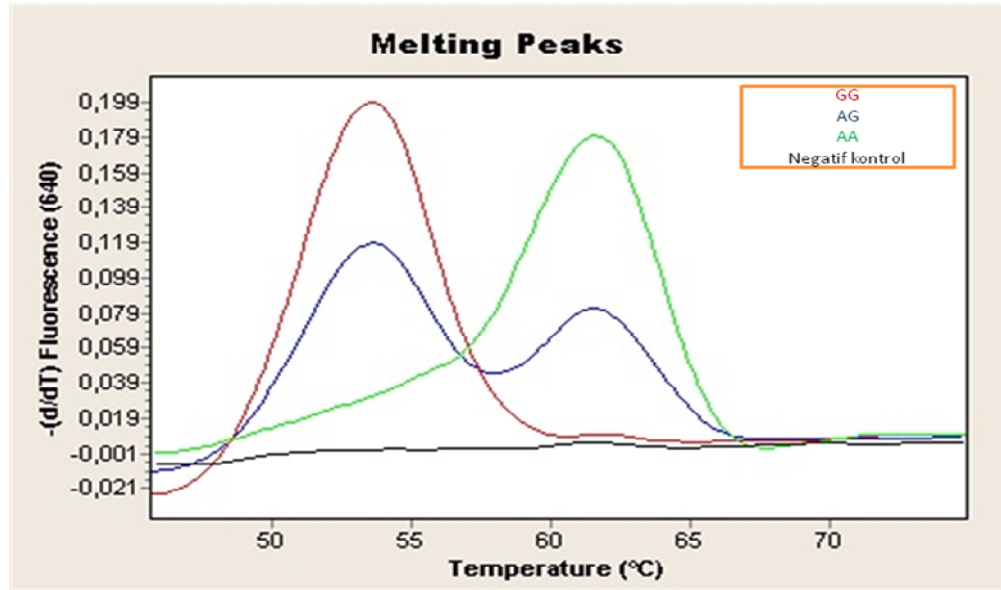
IL-10-1082 SNP'ne özgün amplifikasyon eğrisi ve erime eğrisi analizleri sırasıyla aşağıdaki şekillerde gösterilmiştir.



Şekil 4.4 IL-10-1082 SNP'ne özgün amplifikasyon eğrisi



Şekil 4.5 IL-10-1082 SNP' ne özgün erime eğrisi



Şekil 4.6 IL-10-1082 SNP' ne özgün erime analizi

IL-10-1082 SNP' ne özgün genotip dağılımı malign ve benign prostat tümörü taşıyan olgu grupları arasında değerlendirildiğinde malign prostat tümörü taşıyan grupta 4 adet homozigot mutant 'AA' 6 adet heterozigot 'GA' ve 6 adet homozigot 'GG'(wildtype) genotipine rastlanmıştır. Benign tümörlü grupta ise 1 adet 'AA', 6 adet 'GA' genotipi gözlenirken 12 hastada 'GG' genotipine rastlanmıştır.

Tablo 4.1 Sitokin genlerine özgün SNP'lerin çalışma gruplarına göre dağılım oranları

| SNP genotipleri | Benign Prostat | Malign Prostat |
|-------------------------|----------------|----------------|
| IL-10-592 | | |
| C/C genotipi(wild type) | 0 (20) | 0 (20) |
| C/A genotipi | 9(20) | 7 (20) |
| AA genotipi | 0(40) | 4 (20) |
| IL-10-1082 | | |
| AA genotipi | 4 (20) | 1 (20) |
| A/G genotipi | 6 (20) | 6 (20) |
| G/G genotipi(wild type) | 6 (20) | 12 (20) |

Çalışma grubu 20 malign 20 benign tümörlü hastalardan oluşmasına karşın Real Time PCR sonucunda IL-10-592 polimorfizmi için analizi yapılabilen 9 benign, 11 malign örnek bulunmaktadır ve 20 örnek çalışma dışı bırakılmıştır. IL-10-1082 polimorfizmi için ise 16 benign, 19 malign örnek bulunmaktadır. 5 örnek çalışma dışı bırakılmıştır

Tablo 4.2 Malign Prostatlı hastaların gleason skorları ve gözlenen polimorfizmler

| İzole Edilen Malign Dokular | Gleason Skorları | IL-10-592 | IL-10-1082 |
|-----------------------------|------------------|-----------|------------|
| 74H09 – RP5A | (4+3) 7 | AA | GG |
| 196H08 – RP4 | (5+4) ≥ 8 | AA | GA |
| 583H07 – LP5 | (3+4) 7 | AA | GG |
| 913H10 – LP9 | (3+4) 7 | CA | GG |
| 925H07 – RP4 | (4+3) 7 | CA | GG |
| 925H07 – RP7 | (4+3) 7 | CA | GG |
| 998H07 – LP5 | (4+3) 7 | CA | GA |
| 1181H08 – RA4 | (3+4) 7 | - | GA |
| 1486H10 – 1B | (3+3) ≤ 6 | - | GA |
| 1719H10 – LA3 | (3+3) ≤ 6 | AA | GG |
| 1854H09 – LP9 | (5+4) ≥ 8 | - | GG |
| 2061H10 – LP4 | (3+3) ≤ 6 | - | GG |
| 2248H09 – RP4 | (3+3) ≤ 6 | CA | GA |
| 2493H10 – LP8 | (4+3) 7 | CA | GA |
| 2613H10 – LP9A | (3+4) 7 | - | - |
| 2767H10 – LP4A | (3+4) 7 | - | GG |
| 3399H09-RP4 | (3+4) 7 | - | GG |
| 3876H10 – LA1 | (3+3) ≤ 6 | - | AA |
| 3553H09-LP6 | (3+3) ≤ 6 | - | GG |
| 3854H09-LP5 | (3+4) 7 | CA | GG |

Tablo 4.3 Benign ve Malign prostat kanserli hastaların IL-10-592 ve IL-10-1082 polimorfizmlerine göre PSA miktarlarının aritmetik ortalama ve Standard sapma miktarları

| Polimorfizm | PSA miktarının Arit. Ort.+/- Std. Sap. | | % Oranları | | Total % | 'p' değeri |
|-------------------|---|----------------------|------------|--------|---------|---------------|
| | Benign | Malign | Benign | Malign | | |
| IL-10-1082 | | | | | | |
| AA | 5,50 +/- 2,50 | 11,18 +/- | 26 | 5 | 12,5 | 0,400 |
| GA | 2,70 +/- 1,07 | 11,60 +/-1,86 | 37 | 32 | 30 | 0,548 |
| GG(wildtype) | 6,0 +/- 4,66 | 8,54 +/- 9,81 | 37 | 63 | 45 | 0,181 |
| IL-10-592 | | | | | | |
| CC(wildtype) | - | - | - | - | - | |
| CA | 4,92 +/- 3,70 | 14,61 +/- 9,50 | 45 | 35 | 40 | 0,027 |
| AA | - | 8,22 +/- 6,40 | - | 20 | 10 | |

Heterozigot CA polimorfizmi olan prostat kanserli hastalarda PSA değerleri malign prostat kanseri olan olgularda anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Ancak bu sonuç tam olarak CA genotipiyle ilişkilendirilemez.

Ayrıca IL-10-1082 'GA' genotipinin PSA miktarları malign tümörlü hastalarda benign tümörlü hastalara oranla oldukça artmıştır. Bu durum istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç ifade etmiyor olsa da örnek sayısının arttırılmasıyla ciddi önem kazanabileceği düşünülmektedir.

Tablo 4.4 Benign prostatlı hastaların IL-10-1082 polimorfizmi allel sıklığı<http://www.oege.org/software/hwe-mr-calc.shtml>

| Genotype | Beklenen | Gözlenen |
|---------------|----------|----------|
| AA | 19.8 | 26 |
| GA | 49.4 | 37 |
| GG(wild type) | 30.8 | 37 |

$X^2=6,3$

Tablo 4.5 Malign prostatlı hastaların IL-10-1082 polimorfizmi allel sıklığı<http://www.oege.org/software/hwe-mr-calc.shtml>

| Genotype | Beklenen | Gözlenen |
|---------------|----------|----------|
| AA | 4.41 | 5 |
| GA | 33.18 | 32 |
| GG(wild type) | 62.41 | 63 |

$X^2=0,13$

IL-10-1082 polimorfizmi gözlenen benign prostat kanserli olgular her üç genotipte görülürken, 'GG' ve 'GA' genotiplerini taşıyan olgularda malign prostat kanseri daha sık görülmektedir. Bir başka deyişle 'AA' genotipinde malign prostat görülme sıklığı daha azdır.

5.TARTIŞMA

Prostat kanseri (PCa) akciğer kanserinden sonra, Batılı erkeklerde en sık görülen kötü huylu tümörler arasında yer almakta ve ölümlerle sonuçlanan kanserler arasında ikinci sırasında yer almaktadır (Jemal A vd.2008). Bazı Asyalı erkeklerde PCa sıklığı son yıllarda önemli ölçüde düşmüştür ancak, bazılarında da bu oran belirgin olarak artmıştır (McCracken M vd 2007). Yaş, etnik köken, diyet ve coğrafi faktörler bu bozukluğun etiolojisinde katkıda bulunmaktayken (Hamasaki T vd 2001,Habuchi T 2000), genetik varyasyonlar PCa'ya duyarlılıkta rol oynayabilir (Dennis LK 2002). Son yıllarda yapılan çalışmalar anti inflamatuvar sitokin İnterlökin-10 (-10 IL)'u içeren immünite ve kronik inflamasyona sahip genlerdeki genetik polimorfizmin PCa yatkınlığı etkileyebileceğini göstermektedir (Dennis LK vd 2002).

Genetik polimorfizmler ve kalıtsal faktörler IL-10 ekspresyonu ayarlarlar (modüle ederler). IL-10 kodlayan gen kromozom 1 (1q31-1q32) üzerinde bulunur ve birçok IL-10 gen promotörü polimorfizmi tanımlanmıştır. Polimorfizm örnekleri in vitro ortamdaki IL-10 mRNA transkripsiyonunu ve IL-10 ekspresyonunu etkileyen proksimal bölgede meydana gelen -1082 G/A (rs 1800896), -819 T/C (rs1800871) ve -592 A/C (rs1800872)'yi içerir (Kingo K vd 2005, Gibson AW vd 2001). Günümüzde dünyanın değişik bölgelerinde farklı etnik gruplar üzerinde yapılan çalışmalar göz önüne alındığında PCa progresyonunda önemli rol oynayan sitokinlerle ilişkili genetik varyasyonlar oldukça ilgi çekicidir.

İmmün sistem prostat kanseri patogeneğinde tümör gelişimini düzenleyerek hastalığın ilerlemesinde kritik rol oynar. Sitokinler hem hücre-araçlı immün yanıtta görev alırlar Pro-inflamatuvar ve anti-inflamatuvar sitokin genlerinin promotör bölgeleri direk olarak sitokin üretimini etkileyen polimorfizmler içerirler (Bidwell J vd 2001). Bu promotör polimorfizmleri sonucu yüksek ya da düşük sitokin üretimi gerçekleştirilerek anti-tümör immün yanıtı etkiler ve bireyler arasında immün yanıtta farklılıklara yol açabilir. Bu bilgilere ek olarak bazı sitokinler tümör angiogenezindeki yollarda üstlendikleri görevlerle tümör gelişimini de etkileyebilirler (örn: IL-10 ve VEGF).

Bu çalışmamızda malign prostat kanserli bireylerde IL-10-1082 GG (wildtype) genotipi görülme sıklığı AA genotipi görülme sıklığına göre 1,7 kat fazla olduğu bulunmuştur. Bu durum GG genotipinde görülen yüksek IL-10 ekspresyonu nedeniyle bu olgularda IL-10'un anti inflamatuvar etkisinden dolayı tümorojenik etki göstermesiyle açıklanabilir. Bir başka deyişle IL-10'un anti inflamatuvar etkisiyle immün denetimden kaçan hücreler tümör oluşturabilirler. Öte yandan İngiltere ve Kuzey Hindistan'da yapılan iki çalışmada IL-10-1082 AA ve GA genotipinin hastalarda kontrol grubuyla karşılaştırıldığında belirgin şekilde artmış olduğu gözlenmiştir (Sarah McCarron vd 2002, Kesarwani vd 2009). Bu bulgulara göre bu iki genotip ile PCa arasında bir ilişki bulunmaktadır. Ayrıca IL-10-1082 GA heterozigot mutant genotipinin PSA değerlerine bakıldığında malign ve benign olgular arasında yaklaşık 4 katlık bir fark göze çarpmaktadır. İstatistiksel olarak anlamlılık ifade etmeyen bu bulgu göz ardı edilemez ve örnek sayısının artırılması durumunda ciddi önem kazanabileceği düşünülmektedir. Jie Liu ve ark.'larının yapmış olduğu başka bir çalışmada ise IL-10 promotor polimorfizmlerinin PCa gelişiminde bir risk faktörü oluşturmayacağı ancak PCa progresyonunu etkileyebileceği sonucuna varılmıştır (Jie Liu vd 2010). Prostat kanserli hastalarda incelenen IL-10 polimorfizmi (rs1800872) A/A genotipi sonuçları istatistiksel analizler sonucunda yüksek PSA riskiyle ilişkili bulunmuştur (Han-ching Lin vd 2009). Bir diğer çalışmada ise IL-10-1082 G>A (rs1800896)'nın A allelinin polimorfizminin düşük seviyelerdeki anti inflamatuvar sitokini prostat kanseri riskiyle pozitif ilişki göstermiştir (Wang MH vd 2009). Bu sonuçlar gösteriyor ki polimorfizmlerin yanı sıra çevresel etkenlerde prostat kanseri gelişiminde rol oynayabilir.

IL-10-592 polimorfizmi ile ilgili bulgularımız ise CA heterozigot mutant genotip sıklığının diğer genotiplere oranla daha fazla olduğudur. Ayrıca malign prostat tümörlü hastalarda PSA değerlerini karşılaştırdığımızda IL-10-592 CA polimorfizmi gösteren bireylerde anlamlı bir farklılık elde ettik. Ancak bu durum sadece polimorfizmle açıklanamayabilir, çünkü malign prostat tümörü taşıyan bireylerin PSA miktarlarının yüksek olduğu bilinmektedir. Avusturya ve İsveç'te yapılan iki çalışmada da IL-10-592 C□A polimorfizminin prostat kanserinde tümör ve gelişimi tanı esnasındaki PSA değeri ile bir ilişkisinin olmadığı sonucuna varmışlardır (Tanja Eder vd. 2007, Xu J vd. 2005). Ancak Finlandiya'da yapılan bir başka çalışmada ise IL-10-592 genotipinin düşük ekspresyonu ile prostat kanser riski ve tümör oluşumu arasında bir ilişki olduğu

bulunmuştur (Jessica M vd 2008). Bu çalışmalar sonucundaki uyumsuzluk genetik farklılıktan kaynaklanıyor olabilir.

6. SONUÇ

Sonuç olarak bu çalışmada malign prostat kanserli bireylerde IL-10-1082 GG (wildtype) genotipi görülme sıklığının AA genotipi görülme sıklığına göre 1,7 kat fazla olduğu bulunmuştur. IL-10-592 polimorfizmi ile ilgili ise CA heterozigot mutant genotip sıklığının diğer genotiplere oranla daha fazla olduğunu gözlemledik. Ayrıca malign prostat tümörlü hastalarda PSA değerlerini karşılaştırdığımızda IL-10-592 CA polimorfizmi gösteren bireylerde anlamlı bir farklılık elde ettik. Ancak bu sonuçlar literatürdeki tüm yayınlarla uyumlu değildir. Değişik çalışmalarda farklı sonuçlar elde edilmesi PCa gelişiminde genetik faktörlerin yanı sıra çevresel faktörlerinde rol oynayabileceğini bu da prostat kanserli olguların kanser oluşum mekanizmalarının her olgu için ayrı değerlendirilmesi gerektiğini düşündürmektedir.

7.KAYNAKLAR

- Balkwill F, Mantovani A. (2001) Inflammation and cancer: Back to irchow? *Lancet* ;357:539–545.
- Basaklar C. (1993) Ürogenital sistem. Langman’s Medikal Embriyoloji. Ankara, *Palme Yayın.*; 246-282.
- Basaran N. Tıbbi Genetik Ders Kitabı, (1999) 7. Baskı. *Günes ve Nobel Tıp Kitabevleri*; Bursa 10-12.
- Bidwell J, Keen L, Gallagher G, Kimberly R, Huizinga T, McDermott MF, et al. (1999) Cytokine gene polymorphism in human disease: on-line databases. *Genes Immun.*;1:3-19
- Carter BS, Bova S, Beaty TH. Steinberg GD, Childs B, Isaacs WB, Walsh PC. (1993) Hereditary prostate cancer: epidemiology and clinical features. *J Urol.*; 150:797-802.
- Chan JM, Giovannucci E, Andersson SO, Yuen J, Adami HO, Wolk A. (1998) Dairy products, calcium, phosphorous, vitamin D, and risk of prostate cancer . *Cancer Causes Control.* ;9: 559.
- Chau GY, Wu CW, Lui WY, Chang TJ, Kao HL, Wu LH et al (2000) Serum interleukin-10 but not interleukin-6 is related to clinical outcome in patients with resectable hepatocellular carcinoma. *Ann Surg.*; 231:552–558
- Claffey KP, Robinson GS. (1996) Regulation of VEGF/VPF expression in tumor cells: Consequences for tumor growth and metastasis. *Can. Metas. Rev.*; 15:165–176.
- Crawley E, Kay R, Sillibourne J, Patel P, Hutchinson I, Woo P. (1999) Polymorphic haplotypes of the interleukin-10 5' flanking region determine variable interleukin-10 transcription and are associated with particular phenotypes of juvenile rheumatoid arthritis. *Arth. Rhe.*;42: 1101-8.
- Dennis LK, Lynch CF, Torner JC (2002): Epidemiologic association between prostatitis and prostate cancer. *Uro.*; 60:78-83
- Derynck R, Akhurst RJ, Balmain A. (2001)TGF-beta signaling in tumor uppression and cancer progression. *Nat. Genet.* ;29:117–129.
- Dikson JS, Gosling JA. (1996) Macro-anatomy of the prostate. In: Kirby R, McConnell J, Fitzpatrick J, Roehrborn C, Boyle P (eds). *Textbook of Benign Prostatic Hyperplasia.* Oxford. Synthelabo. 4: 1-10.
- Eder T, Mayer R, Langsenlehner U, Renner W, Krippel P, Wascher TC et al (2007) Interleukin-10 [ATA] promoter haplotype and prostate cancer risk: a population-based study. *Eur. J. Cancer*; 43:472–475

- Edwards-Smith CJ, Jonsson JR, Purdie DM, Bansal A, Shorthouse C, Powell EE. (1999) Interleukin-10 promoter polymorphism predicts initial response of chronic hepatitis C to interferon alfa. *Hepatology*; 30: 526-30.
- Edwards-Smith CJ, Jonsson JR, Purdie DM, Bansal A, Shorthouse C, Powell EE (1999) Interleukin-10 promoter polymorphism predicts initial response of chronic hepatitis C to interferon alfa. *Hepatology* ;30:526–530
- Eskdale J, Gallagher G, Verweij CL, Keijsers V, Westendorp RG, Huizinga TW. (1998) Interleukin 10 secretion in relation to human IL-10 locus haplotypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* ;4; 95: 9465-70.
- Eskdale J, Keijsers V, Huizinga T, Gallagher G. (1999) Microsatellite alleles and single nucleotide polymorphisms (SNP) combine to form four major haplotype families at the human interleukin-10 (IL-10) locus. *Genes Immun.*; 1: 151-5.
- Eskdale J, Kube D, Tesch H, Gallagher G. (1997) Mapping of the human IL10 gene and further characterization of the 5' flanking sequence. *Immunogenetics*; 46: 120-8.
- Falconer JS, Fearon KCH, Plester CE, Ross JA, Carter DC. (1994) Cytokines, the acute phase response, and resting energy expenditure in cachectic patients with pancreatic cancer. *Ann. Surg.* ; 219:325–31.
- Falconer JS, Fearon KCH, Ross JA, et al. (1995) Acute phase protein response and survival duration of patients with pancreatic cancer. *Cancer* ;75:2077–82.
- Forrest LM, McMillan DC, McArdle CS, Angerson WJ, Dunlop DJ. (2003) Evaluation of cumulative prognostic scores based on the systemic inflammatory response in atients with non-operable non-small-cell lung cancer. *Br. J. Cancer*; 89:1028–30.
- Gelin J, Moldawer LL, Lonnroth C, et al. (1991) Role of endogenous TNF α and IL-1 for experimental tumour growth and the development of cancer cachexia. *Cancer Res.*; 51:415–21.
- Gibson AW, Edberg JC, Wu J, Westendorp RG, Huizinga TW, Kimberly RP. (2001) Novel single nucleotide polymorphisms in the distal IL-10 promoter affect IL-10 production and enhance the risk of systemic lupus erythematosus. *J. Immunol.*;166: 3915-22.
- Gonzalez-Amaro R, Portales-Perez D, Baranda L, Abud-Mendoza C, Llorente L, Richaud-Patin Y, et al. (1998) Role of IL-10 in the abnormalities of early cell activation events of lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus. *J Autoimmun* ;11: 395-402.

- Habuchi T, Suzuki T, Sasaki R, Wang L, Sato K, Satoh S, Akao T, Tsuchiya N, Shimoda N, Wada Y, Koizumi A, Chihara J, et al (2000): Association of vitaminD receptor gene polymorphism with prostate cancer and benign prostatic hyperplasia in a Japanese population. *Cancer Res.*;60:305-8.
- Hamasaki T, Inatomi H, Katoh T, Ikuyama T, Matsumoto T (2001): Clinical and pathological significance of vitaminD receptor gene polymorphism for prostate cancer which is associated with a higher mortality in Japanese. *Endocr J.* ;48:543-9.
- Han-ching Lin, Chia-Chu Liu, Wan-Yi Kang, Chia-Cheng Yu, Tony T. Wu, Jyh-Seng Wang, Wen-Jeng Wu, Chun-Hsiung Huang, Ming-Tsang Wu, Shu-Pin Huang. (2009) Influence of Cytokine Gene Polymorphisms on Prostate-Specific Antigen Recurrence in Prostate Cancer after Radical Prostatectomy *Urol Int.*; 83:463-70
- Hayes VM, Severi G, Padilla EJ, Eggleton SA, Southey MC, Sutherland RL, Hopper JL, Giles GG (2005): Genetic variants in the vitamin D receptor gene and prostate cancer risk. *Can. Epi. Bio.*; Prev 14:997-9.
- Houck KA, Ferrara N, Winer J, Cachianes G, Li B, Leung DW. (1991) The vascular endothelial growth factor family: Identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Mol. Endocrinol.*;5:1806–1814.
- Howell WM, Rose-Zerilli MJ (2006) Interleukin-10 polymorphisms, cancer susceptibility and prognosis. *Fam. Cancer*; 5:143–149
- Howell WM, Turner SJ, Bateman AC, Theaker JM. (2001) IL-10 promoter polymorphisms influence tumour development in cutaneous malignant melanoma. *Genes Immun.*; 2:25–31.
- Huang S, Xie K, Bucana CD, Ullrich SE, Bar-Eli M (1996) Interleukin 10 suppresses tumor growth and metastasis of human melanoma cells: potential inhibition of angiogenesis. *Clin. Cancer Res.*; 2:1969–1979.
- Huang YC, Tsukamoto K, Sharma V. (2005) Interleukin-10 promoter gene polymorphisms have no clear influence on interleukin-10 protein secretion in AIDS-associated B-cell lines. *Biochemical and Biophysical Res. Commun.*; 335: 529-535.
- Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, Thun MJ (2008): Cancer statistics, *CA Cancer J Clin.* ;58:71-96.
- Jessica M. Faupel Badger, La Creis Renee Kidd, Demetrius Albanes, Jarmo Virtamo, Karen Woodson, Joseph A. Tangrea (2008) Association of IL-10 polymorphisms with prostate cancer risk and grade of disease. *Can. Causes Contr.*; 19:119-124

- Jie Liu, Bao Song, Xueli Bai, Wenjian Liu, Zengjun Li, Jialin Wang, Yan Zheng, Zhehai Wang (2010): Association of genetic polymorphisms in the interleukin-10 promoter with risk of prostate cancer in Chinese. *BMC Cancer*; 10:456-62
- Kesarwani P, Ahirwar DK, Mandhani A, Singh AN, Dalela D, Srivastana AN, Mittal RD. (2009) *IL-10* -1082 G>A: a risk for prostate cancer but may be protective against progression of prostate cancer in North Indian cohort. *World J of Uro.*;27:389-96
- Kalish RB, Vardhana S, Gupta M, Perni SC, Witkin SS. (2004) Interleukin-4 and -10 gene polymorphisms and spontaneous preterm birth in multifetal gestations. *Am J Obstet Gynecol* ;190: 702-6.
- Keen LJ. (2002) The extent and analysis of cytokine and cytokine receptor gene polymorphism. *Transpl. Immunol.* ;10: 143-6.
- Kingo K, Ratsep R, Koks S, Karelson M, Silm H, Vasar E. (2005) Influence of enetic polymorphisms on interleukin-10 mRNA expression and psoriasis susceptibility. *J Dermatol Sci.*; 37: 111-3.
- Kong FM, Washington MK, Jirtle RL, Anscher MS. (1996) Plasma transforming growth factor-beta 1 reflects disease status in patients with lung cancer after radiotherapy: A possible tumor marker. *Lung Cancer*; 16:47-59.
- Lei SF, Deng FY, Liu XH, Huang QR, Qin Y, Zhou Q, et al. (2003) Polymorphisms of four bone mineral density candidate genes in Chinese populations and comparison with other populations of different ethnicity. *J Bone Miner Metab.*; 21: 34-42.
- Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N. (1989) Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science*; 246:1306-1309.
- Lewin B. (1994) Restriction sites can be used as genetic markers. In: Genes IV, *Oxford University Press USA*; 134-142.
- Ma SL, Tang NL, Lam LC, Chiu HF. (2005) The association between promoter polymorphism of the interleukin-10 gene and Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging.*; 26: 1005-10.
- McCarron SL, Edwards S, Evans PR, Gibbs R, Dearnaley DP, Dowe A et al (2002) Influence of cytokine gene polymorphisms on the development of prostate cancer. *Cancer Res.*; 62:3369-3372
- McCracken M, Olsen M, Chen MS Jr, Jemal A, Thun M, Cokkinides V, Deapen D, Ward E (2007): Cancer incidence, mortality, and associated risk factors among Asian Americans of Chinese, Filipino, Vietnamese, Korean, and Japanese ethnicities. *CA Cancer J Clin.*; 57:190-205.

- McNeal JE. Prostate. In: Stenberg SS (ed.). (1997) *Histology for Pathologists*. 2nd Ed. Philadelphia, **Lippincott-Raven Publishers.**; 997-1018.
- Mengs U, Schwarz T, Bullitta M, Weber K. (2000) Antitumoral effects of an intravesically applied aqueous Mistletoe extract on urinary bladder carcinoma MB-49 in mice. *Anticancer Res.*; 20:3565- 3568
- Meyer UA. (1997) Molecular mechanisms of genetic polymorphisms of drug metabolism. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.*; 37: 269-296.
- Michaud DS, Daugherty SE, Berndt SI, Platz EA, Yeager M, Crawford ED et al (2006) Genetic polymorphisms of interleukin- 1B (IL-1B), IL-6, IL-8, and IL-10 and risk of prostate cancer. *Cancer Res.*; 66:4525–4530
- Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. (2001) Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu. Rev. Immunol.*; 19: 683-765.
- Nabioullin R, Sone S, Mizuno K, Yano S, Nishioka Y, Haku T, Ogura T. (1994) Interleukin-10 is a potent inhibitor of tumor cytotoxicity by human monocytes and alveolar macrophages. *J. Leukoc. Biol.*;55:437–442.
- Opdal SH. (2004) IL-10 gene polymorphisms in infectious disease and SIDS. *FEMS Immunol Med Microbiol*; 42: 48-52.
- Reiter RE, De Kernion JB. (2002) Epidemiology, etiology, and prevention of prostate cancer. In PC Walsh et al. (Eds). *Campbell's Urology.*; 8th Ed 4:3003-3024.
- Reuss E, Fimmers R, Kruger A, Becker C, Rittner C, Hohler T (2002) Differential regulation of interleukin-10 production by genetic and environmental factors-a twin study. *Genes Immunity*; 3: 407-13.
- Richter G, Kruger-Krasagakes S, Hein G, Huls C, Schmitt E, Diamantstein T, Blankenstein T. (1993) Interleukin 10 transfected into Chinese hamster ovary cells prevents tumor growth and macrophage infiltration. *Cancer Res.*; 53:4134–4137.
- Robinson CJ, Stringer SE. (2001) The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors. *J. Cell Sci.*; 114:853–865.
- Rood MJ, Keijsers V, van der Linden MW, Tong TQ, Borggreve SE, Verweij CL, et al. (1999) Neuropsychiatric systemic lupus erythematosus is associated with imbalance in interleukin 10 promoter haplotypes. *Ann Rheum. Dis.*; 58: 85-9.
- Ross RK, Bernstein L, Lobo RA et al. (1992) 5 alpha-reductase activity and risk of prostate cancer among Japanese and US white and black males. *Lancet* ;339: 887-889.

- Ross RK, Pike MC, Coetzee GA, Reichardt JK, Yu MC, Feigelson H, Stanczyk FZ, Kolonel LN, Henderson BE. (1998) Androgen metabolism and prostate cancer. Establishing a model of genetic susceptibility. *Cancer Res.*; 58: 4497.
- Sarah L McCarron, Stephan Edwards, Philip R ,Evans, Roz Gibbs, David P. Dearnaley Anna Dowe, Christine Southgate (2002): Influence of Cytokine Gene Polymorphisms on the Development of Prostate Cancer. *Cancer Res.*; 62:3369-72.
- Shalaby F, Ho J, Stanford WL et al. (1997) A Requirement for Flk1 in Primitive and Definitive Hematopoiesis and Vasculogenesis. *Cell*; 89: 981-990.
- Shanchun Guo, Laronna S. Colbert, Miles Fuller, Yuanyuan Zhang, Ruben R.Gonzales-Perez. (2010) Vascular endothelial growth factor receptor-2 in breast cancer. *BBA Reviews on Cancer*; 1806: 109-16
- Shibuya M. (2001) Structure and Dual Function of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1 (Flt-1). *Int. J. Biochem. Cell Biol.*; 33: 409-420.
- Shibuya M. (2006) Differential Roles of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1 and Receptor-2 in Angiogenesis. *J Biochem. Mol. Biol.*; 39: 469-478.
- Stearns ME, Rhim J, Wang M (1999) Interleukin 10 (IL-10) inhibition of primary human prostate cell-induced angiogenesis: IL-10 stimulation of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and inhibition of matrix metalloproteinase (MMP)-2/MMP-9 secretion. *Clin. Cancer Res.*; 5:189–196
- Stearns ME, Wang M (1998) Antimetastatic and antitumor activities of interleukin 10 in transfected human prostate PC-3 ML clones: orthotopic growth in severe combined immunodeficient mice. *Clin. Cancer Res.*; 4:2257–2263
- Stephenson RA, Smart CR, Mineau GP. (1995) The fall in incidence of prostate carcinoma. *Cancer* ;77: 1342-1348.
- Strassmann G, Fong M, Kenney JS, Jacob CO. (1992) Evidence for the involvement of interleukin 6 in experimental cancer cachexia. *J. Clin. Invest.*; 89:1681–4.
- Tan WW. (2006) Novel agents and targets in managing patients with metastatic prostate cancer. *Cancer Control*; 13:194–198.
- Tanja Eder, Ramana Mayer, Uwe Langsenlehner, Wilfried Renner, Peter Krippel, Thomas C. Wascher, Karl Pummer, Karin S. Kapp (2007) IL-10 (ATA) haplotype and prostate cancer risk: A population-based study. *Eur. Jour. Of Cancer*; 43:472-75
- Tischer E, Mitchell R, Hartman T, Silva M, Gospodarowicz D, Fiddes JC, Abraham JA. (1991) The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J. Biol. Chem.*; 266:11947–11954.

- Tone M, Powell MJ, Tone Y, Thompson SA, Waldmann H. (2000) IL-10 Gene Expression Is Controlled by the Transcription Factors Sp1 and Sp3. *The Journal of Immun.*; 165: 286-291
- Turner DM, Williams DM, Sankaran D, Lazarus M, Sinnott PJ, Hutchinson IV (1997) An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter. *Eur. J. Immunogenet* 24:1-8
- Valtola R, Salven P, Heikkila P et al. (1999) VEGFR-3 and Its Ligand VEGF-C are Associated with Angiogenesis in Breast Cancer. *Am. J. Pathol.* 154: 1381-1390.
- Vieira P, Malefyt RW, Dang M-N, Johnson KE, Kastelein R, Fiorentino DF, et al. (1991) Isolation and expression of human cytokine synthesis inhibitory factor cDNA clones: Homology to Epstein-Barr virus open reading frame BCRFI. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 1172-6.
- Warle MC, Farhan A, Metselaar HJ, Hop WC, Perrey C, Zondervan PE, et al. (2003) Are cytokine gene polymorphisms related to *in vitro* cytokine production profiles? *Liver Transpl.* 9: 170-81.
- Weaver R, Hedrick P. (1989) Mendelian Genetics. In: Genetics, *W.C. Brown Publishers*
- Westendorp RG, Langermans JA, Huizinga TW, Elouali AH, Verweij CL, Boomsma DI, et al. (1997) Genetic influence on cytokine production and fatal meningococcal disease. *Lancet* 349: 170-3. *Erratum in: Lancet* 349: 656.
- Wigmore SJ, Fearon KCH, Lai PBS, et al. (1997) Recombinant and tumour-cell derived IL-8 stimulates acute phase protein production by isolated human hepatocytes. *Am. J. Physiol.* 273:E720-6.
- Wise GJ, Marella VK, Talluri G, Shirazian D (2000) Cytokine variations in patients with hormone treated prostate cancer. *J. Urol.* 164:722-725
- Xu J, Lowey J, Wiklund F, Sun J, Lindmark F, Hsu FC et al (2005) The interaction of four genes in the inflammation pathway significantly predicts prostate cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14:2563-2568
- Yanping Guo, Shihua Wang, Dahlys R. Hoot, Steven K. Clinton. (2006) Suppression of VEGF-mediated autocrine and paracrine interactions between prostate cancer cells and vascular endothelial cells by soy isoflavones. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 18:408-17
- Yilmaz V, Yentur SP, Saruhan-Direskeneli G. (2005) IL-12 and IL-10 polymorphisms and their effects on cytokine production. *Cytokine* 30: 188-94.
- Zdnaov A. (2004) Structural features of the interleukin-10 family of cytokines. *Current Pharmaceutical Design*, 10: 3873-3884

8. ÖZGEÇMİŞ

Fulya TEVRÜZ 25 Mart 1985 yılında Kadıköy'de doğdu. İlkokulu İstanbul'da okuduktan sonra, ortaokul ve liseyi Milas Anadolu Lisesinde tamamladı. 2004-2009 yılları arasında Pamukkale Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nü bitirdi. 2009 yılında Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji bölümünde yüksek lisans eğitimine başladı.