

**T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÜROLOJİ ANABİLİM DALI**

**RENAL HÜCRELİ KANSERLİ HASTALARDA PARAOKSONAZ-1 GENİ
Q192R VE L55M POLİMORFİZMLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ
Dr. Ömer Ali UYAR

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Arslan ARDIÇOĞLU

ELAZIĞ-2008

DEKANLIK ONAYI

Prof. Dr.

DEKAN

Bu tez Uzmanlık Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

.....
.....
.....Anabilim Dalı Başkanı

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

.....
.....
Danışman

Uzmanlık Sınavı Jüri Üyeleri

.....
.....
.....
.....
.....

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	I
ŞEKİL LİSTESİ	III
TABLO LİSTESİ	IV
KISALTMALAR	V
1. ÖZET	1
2. ABSTRACT	2
3. GİRİŞ	3
3. 1. Renal Hücreli Kanser (RHK)	4
3. 1. 1. İnsidans.....	4
3. 1. 2. Etyoloji	5
3. 1. 3. Patoloji.....	5
3. 1. 4. Evreleme	9
3. 1. 5. Klinik bulgular	12
3. 1. 5. Laboratuar Bulguları	13
3. 1. 6. Radyografik Bulgular	13
3. 1. 7. Tedavi.....	14
3. 2. Serbest Radikaller	20
3. 2. 1. Oksidatif Stres.....	22
3. 2. 2. Serbest Oksijen Radikallerinin Etki Mekanizmaları.....	23
3. 2. 3. Lipid Peroksidasyonu	24
3. 2. 4 Serbest Oksijen Radikallerinin Kanser Gelişimindeki Rolü	25
3. 2. 5 Antioksidan Savunma Sistemleri.....	26
3.3. Paraoksonaz.....	27
3. 3. 1. Kimyasal yapısı.....	27
3. 3. 2. Paraoksonaz fonksiyonu	28

3. 3. 3. Paraoksonazın Sentez ve Sekresyonu.....	29
3. 3. 4. Paraoksonaz Aktivitesine Beslenme ve Çevresel Faktörlerin Etkisi	29
3. 3. 5. Genetik Polimorfizm	30
3. 3. 6. Çeşitli hastalıklarda paraoksonaz.....	31
3. 3. 7. Kansere ve Paraoksonaz.....	32
4. GEREÇ VE YÖNTEM.....	33
4. 1. Hastaların Seçimi.....	33
4. 2. Örneklerin alınması, saklanması ve analizlere hazırlanması	33
4. 3. Kimyasallar maddeler, sarf malzemeleri ve cihazlar.....	33
4. 4. Kandan DNA izolasyonu	34
4. 5. Oligonükleotidler (primerler)	36
4. 6. PCR ile PON1 192 gen polimorfizmlerinin saptanması	36
4. 7. PCR ile paraoksonaz-1 (PON1) 55 gen polimorfizmlerinin saptanması.....	38
4. 8. İstatistiksel analizler.....	39
5. BULGULAR	40
6. TARTIŞMA	43
7. KAYNAKLAR.....	47
8. ÖZGEÇMİŞ.....	62

ŞEKİL LİSTESİ

	sayfa
Şekil I. Paraoksanaz PON1 192 polimorfizmine ait Alw1 enzimi ile kesilen PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	35
Şekil II. Paraoksanaz PON1 55 polimorfizmine ait Hsp92II enzimi ile kesilen PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	37

TABLO LİSTESİ

	sayfa
Tablo 1. Böbrek hücreli kanserde nükleer grade için Fuhrman klasifikasyonu.....	6
Tablo 2. 2004 dünya sağlık örgütünün Renal hücreli kanserin sınıflaması.....	7
Tablo 3. RHK’de metastaz lokalizasyonları	9
Tablo 4. RHK’da Robson evreleme sistemi.....	10
Tablo 5. RHK TNM evrelendirilmesi.....	11
Tablo 6. RHK’de evre grublandırılması	12
Tablo 7. Organizmada serbest radikal reaksiyonunu artıran faktörler	21
Tablo 8. Serbest oksijen radikallerinin etkileri	22
Tablo 9. PON1 genine ait primer dizileri.....	34
Tablo 10. Hastaların ve kontrol grubunu demografik verileri	38
Tablo 11. Evrelere göre hasta sayıları ve yüzdeleri.....	38
Tablo 12. PON1 geni Q192R polimorfizminin genotip ve allel dağılımı	39
Tablo 13. PON1 geni Q192R polimorfizminin genotip ve allel dağılımı	40

KISALTMALAR

- ARE** : Arilesteraz
- BT** : Bilgisayarlı tomografi
- HDL** : Yüksek dansiteli lipoprotein
- İL** :İnterlökin
- İVÜ** : İntravenöz ürografi
- LA** :Lenfadenektomi
- LDL** : Düşük dansiteli lipoprotein
- LRN** : Laparoskopik radikal nefrektomi
- MR** : Magnetik rezonans
- NK** :Natürel killer
- NKC** : Nefron koruyucu cerrahi
- PCR** : Polimeraz zincir reaksiyonu
- PON** : Paraoksonaz
- RN** :Radikal nefrektomi
- RHK** : Renal hücreli kanser
- SOR** : Serbest oksijen radikali
- USG** : Ultrasonografi
- UV** : Ultraviyole

1. ÖZET

Kanser gelişiminde artmış oksidatif stresin etkisi olduğu bilinmektedir. Renal hücreli kanser (RHK) gelişiminde de artmış oksidatif stresin rolü bulunmaktadır. İnsan vücudunda oksidatif strese karşı etki gösteren antioksidan sistemler mevcuttur. Bu sistemlerden biri de düşük dansiteli lipoproteinleri (LDL) oksidasyona karşı koruyan paraoksonaz (PON) enzimidir. Bu çalışmada RHK'li hastalarda PON1 Q192R ve L55M gen polimorfizmleri araştırıldı.

Bu amaçla 60 adet RHK tanısı almış hastanın ve 60 adet sağlıklı kontrol grubunun periferik kanları alındı ve DNA'ları elde edildi. Genotipler, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile belirlendi ve Q192R polimorfizmi için Alw I ve L55M polimorfizmi için Hsp92II restriksiyon enzimleri kullanıldı. Verilerin değerlendirilmesinde Ki-kare ve Fisher's exact testi kullanıldı.

RHK'li hasta grubu ve kontrol grubunda Q192R polimorfizmi açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($P=0.045$). Hasta ve kontrol grubunda Q ve R allel frekansları açısından da anlamlı fark mevcuttu ($P=0.013$). Hasta grubunda Q alleli kontrol grubundan daha fazla bulundu. Kontrol grubunda ise R alleli hasta grubundan daha fazla tesbit edildi. L55M polimorfizmleri açısından hasta ve kontrol grupları arasında istatistiksel fark bulunamadı ($P=0.276$). Ayrıca L ve M allel frekansları açısından da herhangi istatistiksel bir fark yoktu ($P=0.069$).

Sonuç olarak bu çalışmada RHK ile kontrol grubu arasında PON1 Q192R polimorfizmi için farklılık olduğu ve hasta grubunda Q allelinin kontrole göre daha yüksek, R allelinin ise daha düşük oranda olduğu gösterildi. Bu sonuç bize R allelinin RHK'de koruyucu bir etken olabileceğini düşündürmektedir. Bizim sonuçlarımıza göre RHK ile PON1 L55M polimorfizmi arasında bir ilişki görülmemektedir.

Anahtar Kelimeler: Renal hücreli kanser, paraoksonaz, gen polimorfizm

2. ABSTRACT

Researching of paraoxonase1 (PON1) Q192R and L55M gene polymorphism in patient with renal cell carcinoma

It is already known that increased oxidative stress has an effect on carcinogenesis. Oxidative stress has also an effect on the development of renal cell carcinoma (RCC). There are antioxidant systems operating against oxidative stress in the human body. One of these systems is paraoxonase enzyme which protects low density lipoproteins (LDL) against oxidation. PON1 Q192R and L55M gene polymorphisms were researched in RCC patients in this study.

Sixty patients with RCC and sixty healthy control group were included in this study. Their peripheral blood samples were taken and DNA was isolated. Genotypes were found by polymerase chain reaction (PCR) and Alw I restriction enzymes were used for Q192R polymorphism and Hsp92II restriction enzymes were used for L55M polymorphism. Chi-square and Fisher's exact tests were used for analyzing data.

Statistical significant difference was found in patients with RCC and control group in PON1 Q192R polymorphism ($P=0.045$). There was found significant difference in patients and control group in Q and R allele frequency ($P=0.013$). Q allele was higher in patients group more than in the control group. R allele was higher in control group more than in the patients group. Between control and patients group no statistical difference was found in L55M polymorphism ($P=0.276$). Additionally there was no statistical difference in L and M allele frequency ($P=0.069$).

At the end of this study Q allele is higher and R allele is lower in patients group than in the control group and the difference in PON1 Q192R polymorphism between patient with RCC and the control group was shown. This result shows that R allele can be a protective factor in RCC. According to our results there was no relation diagnosed between RCC and PON1 L55M polymorphism.

Key Words: renal cell carcinoma, paraoxonase, gene polymorphism

3. GİRİŞ

Kanser vücudun herhangi bir yerindeki bir hücre grubunun farklılaşarak kontrolsüz olarak çoğalıp çevre dokulara infiltrasyonu ve bu hücrelerinin dolaşıma geçerek vücudun farklı bölgelerine metastazı ile karakterize bir hastalıktır. Kanser Dünyada önemi giderek artan bir sağlık sorunudur. Günümüzde en sık ölüm nedenleri arasında kanser, kalp hastalıklarının ardından ikinci sırada yer almaktadır. Ortalama yaşam süresinin uzaması ve daha çok kanserojene maruz kalma nedeniyle kanser sıklığı giderek artmaktadır (1, 2).

Serbest radikaller ile antioksidan savunma sistemi arasındaki hassas dengenin, prooksidan ve oksidan maddelerin lehine kayması oksidatif stresin artmasına yol açar. Oksidatif stresin doku hasarına yol açtığı ve kanser gelişmesinde etkin olduğu bilinmektedir. Sağlıklı bir organizmada normal metabolizma sırasında da serbest oksijen radikalleri (SOR) oluşmaktayken; inflamasyon, sigara içimi, bazı ilaçların kullanımı (bleomisin, asetaminofen gibi), nitrojen oksit içeren ekzojen kaynaklara ve radyasyona maruz kalma durumlarında SOR'nin üretimi artmaktadır. Artan oksidatif stres lipid ve proteinlerde oksitlenmelere, kanser riskinde artmaya neden olur (3-5). Endojen ve ekzojen antioksidanlar, kansere neden olan SOR'ni nötralize ederek veya etkilerini engelleyerek kanser gelişimini önleyebilmektedir (6, 7).

Yapılan çalışmalarda çeşitli kanser türlerinde olduğu gibi oksidatif stres ve buna bağlı lipid peroksidasyonunun artmış renal hücreli kanser (RHK) riskiyle birlikte olduğu bildirilmektedir (8, 9). İnsanlarda bu radikallerin zararlı etkilerinden korunmak için serbest radikalleri temizleyen bazı endojen sistemler mevcuttur. Lipid peroksidasyonunda oluşan karsinojenik yağda çözünür radikallerin ve paraoksan gibi organofosforlu bileşiklerin detoksifikasyonunda rol oynayan paraoksanaz1 (PON1) enzimi de bu sistemler içerisinde yer almaktadır (10).

PON1, yüksek dansiteli lipoproteine (HDL) bağlı 43 kDa ağırlığında karaciğerde ve serumda bulunan lipofilik bir antioksidandır (11). PON1'in antioksidan rolü düşük dansiteli lipoproteinleri (LDL) oksidasyondan koruyucu etkisinden dolayıdır (10).

PON1'in yaygın iki fonksiyonel polimorfizmi tespit edilmiştir ve bu polimorfizm serum PON1 aktivitesini etkilemektedir. Bu iki polimorfizm 55. ve 192. pozisyonlardaki aminoasitlerin değişimi ile ortaya çıkar. 192. pozisyondaki glutamin (Q genotipi) ve arginin (R genotipi) yer değiştirmesi ile birinci polimorfizm; pozisyon 55'deki lösin (L genotipi) ve metionin (M genotipi) değişmesiyle ikinci önemli polimorfizm oluşur. Bu polimorfizimler sonucunda enzim aktivitesinin değiştiği de bildirilmektedir (12, 13).

Biz bu çalışmamızda oluşumunda oksidatif stres ve SOR'nin etkili olduğu bilinen RHK ile antioksidan özelliği bulunan PON enziminin Q192R ve L55M gen polimorfizminin ilişkisini araştırmayı planlamaktayız.

3. 1. Renal Hücreli Kanser (RHK)

3. 1. 1. İnsidans

Yetişkin tümörlerin % 3'ünü oluşturan RHK, ürolojik kanserlerin içinde üçüncü sıklıktadır. Genel olarak 100. 000 popülasyonda 8,7 yeni olgu rapor edilmektedir. Erkek/kadın oranı 3/2dir (14). Genellikle ileri yaş hastalığı olup en sık 6. ve 7. dekatta görülür. Siyah ırkta %10-20 daha fazla görülüp nedeni tam olarak bilinmemektedir (15). Son 20 yılda bütün dünyada yaygınlığı giderek artmasına rağmen Danimarka ve İsviçre de yaygınlığının azaldığı bildirilmiştir (16).

RHK oldukça ölümcül bir kanserdir. 1998 yılında Avrupa da renal hücreli kanser tanısı almış 30. 000 hastanın yarısının takibinde bu hastalıktan dolayı öldüğü bildirilmiştir (17). RHK insidansı 1970'li yıllardan beri artış görülmektedir. Bu artış bilgisayarlı tomografi (BT) ve ultrasonografinin (USG) yaygın kullanıma girmesiyle insidental olarak yakalanan vakarla açıklanabilir (18). Ancak erken evre insidental tanı konulan olguların oranındaki artış RHK'e bağlı mortalite oranlarını etkilememiştir. Bu durumun son yıllarda tütün kullanımının ve karsinojenlere daha fazla maruz kalmanın tümör biyolojisini kötü etkilemesine bağlı olabileceği düşünülmektedir (15).

3. 1. 2. Etyoloji

RHK üzerinde 100 yılı aşkın bir süredir çalışılmaktadır. Ancak etyolojisi ve histogenezi hala tam olarak aydınlatılamamıştır. Bilinen en önemli etyolojik faktör sigaradır (19, 20). Sigara içenlerde böbrek kanseri riski iki kat artmaktadır. Her tür tütün risk faktörü olmakla birlikte çok içilmesi ve uzun süreli kümülatif doz riski artırmaktadır (21). Risk sigara içme süresi ile ilişkilidir ve bırakıldıktan sonra riskin kademeli olarak azalması neden sonuç ilişkisini gösteren bir bulgudur (22). RHK uzun süreli obezitesi olan düşük sosyoekonomik düzeyli ve kırsal kesimden insanlarda daha sık görülmektedir. Ancak bunun nedeni tam olarak bilinmemektedir (23, 24).

Yüksek yağ ve protein yanında düşük meyve sebze tüketiminin RHK ile ilişkisi olduğu gösterilmişse de bu risk çok yüksek değildir (25). Benzer şekilde RHK metal işçilerinde, fırında çalışanlarda, asbest ve kadmiyum maruziyetinde daha fazla görüldüğü rapor edilmiştir (26, 27). Bunların dışında thorostrast, radyasyon ve diüretikler dışında ki antihipertansiflerin uzun süreli kullanımının RHK için risk olabileceği bildirilmiştir (28).

Hayvan çalışmalarında çeşitli etyolojik faktörler belirlenmiştir. Bunlar arasında virüsler, kurşun bileşikler ve aromatik karbonlar gibi çeşitli maddeler sayılabilir. Ancak insanlarla ilgili kesin bir ajan saptanamamıştır (29). Son yıllarda RHK'in moleküler genetiği ile ilgili önemli gelişmeler kaydedilmiştir. Bu konuda yeni familyal sendromlar bulunduğu gibi; bu malignitenin sporadik ve familyal formları ile ilgili supresör genler ve onkogenler tanımlanmıştır. Seffaf hücreli karsinomda 3. kromozomun kısa kolunda DNA kaybı olduğu ve Von Hippel- Lindau (VHL) supresör geninin burada lokalize olduğu gösterilmiştir (29, 30). Papiller hücreli karsinom kromozom 7 ve 17 de trizomi, kromozom 1, 16 ve Y'deki anormalliklerle karakterizedir (31, 32).

3. 1. 3. Patoloji

RHK'ler tipik olarak böbreğin normal konturlarını protrude eden renal korteksin herhangi bir yerinden gelişen globüler kitleler şeklindedirler. Kesit yüzü genellikle grimsi ödematöz stroma, hemoraji, nekroz, kistik ve kalsifiye alanlar içeren sarı renkte, yumuşak parankimden oluşur (33, 34). Sarı renk yoğun intrasitoplazmik lipid

nedeniyedir. Yüksek grade'li tümörler daha az lipid ve glikojen içerirler ve daha değişken görünümlere sahiptirler (35).

Birçok RHK gross olarak yuvarlak ya da ovaloid yapıdadır. Çevresinde komprese olmuş parankim ya da fibröz doku vardır. Üst üriner sistemin değişici epitel karsinomlarının aksine birçok RHK gros olarak infiltratif görünebilir (36). Tümör çapı ortalama 5-8 cm olmakla beraber; birkaç milimetreden bütün abdomeni dolduracak kadar büyük de olabilir. Nükleer özellikler oldukça değişkendir; bu nedenle nükleer büyüklük ve yapıya, belirgin nükleolusun olup olmamasına göre çeşitli sınıflamalar ortaya konmuştur. Fuhrman klasifikasyon sistemi bugün sıklıkla kullanılmaktadır. Bu sınıflama tümör evresinden bağımsız olarak prognozu öngörebilmektedir (35, 36).

Tablo 1. Böbrek hücreli kanserde nükleer grade için Fuhrman klasifikasyonu

Grade	Nükleer çap	Nükleer çeper	Nükleolus
1	10mm	Yuvarlak üniform	Yok yada silik
2	15mm	Düzensiz	Belirgin
3	20mm	Düzensiz	Belirgin yoğun
4	>20mm	Multilobule	Kromatin demetleri

Birçok RHK unilateral ve unifokaldır. Bilateral tutulum eş zamanlı ya da farklı zamanlarda olabilir. Çift taraflı olma oranı %2-4 arasında değişmekle beraber familial formlarda daha sıktır. Multisentrisite olguların %10-20 sinde görülür ve papiller histolojide ve familial RHK'de daha sıktır (37, 38).

Bütün renal hücreli kanserler, özellikle adenokanserler, renal tübüler epitelyal hücrelerden köken alırlar. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda berrak hücreli RHK

proksimal tübül epitelinden köken alırken diğer papiller ve kromofobik gibi tipler tübülün daha distalinden köken alır (39).

Geleneksel olarak RHK 4 sınıfa ayrılırdı: berrak hücreli, granüler hücreli, tübülopapiller ve sarkomatoid. RHK'deki moleküler genetik gelişmelerine ve histolojik ve ultrastrüktürel bulguların daha kapsamlı yorumlanmasına bağlı olarak, yeni bir sınıflama şeması ortaya konmuştur. En son 2004 yılında dünya sağlık örgütünc kabul edilen sınıflama tablo. 2'de verilmiştir (40).

Berrak hücreli ya da konvansiyonel RHK tüm tümörlerinin %70-80'ini oluşturur ve oldukça vaskülerdirler. Tümör hücre demet ya da asinileri arasında yayılmış ince vasküler sinüzoidlerle karakterizedir. Kromozom 3 değişiklikleri ve VHL mutasyonları konvansiyonel RHK'de sıktır. Ayrıca bu genin inaktivasyonu ve mutasyonu sporadik olguların %75'inde görülür (39, 41).

Tablo 2. 2004 dünya sağlık örgütünün Renal hücreli kanserin sınıflaması

Histolojik tip	prevelans
-Berrak hücreli RHK	70
-Papiller RHK	10
-Kromofob RHK	5
-Hereditör kanser sendromu	5
-Multiloküler kistik RHK	<1
-Toplayıcı kanal karsinomu	<1
-Medüller karsinom	<1
-Müsinöz tübüler karsinom	<1
-Nöroblastomla birlikte RHK	<1
-Xp11. 2 translokasyonlu TFE3 RHK	<1
-Sınıflandırılmamış lezyon	4

Diğer klasifikasyon şemalarında kromofilik RHK olarak tanımlanan tübülopapiller ya da papiller RHK'ler ikinci sıklıkta görülen histolojik tiptir. Tüm RHK'lerin %10-15'ini oluşturmakla beraber son dönem böbrek yetmezliği ve kazanılmış renal kistik hastalık gibi özel durumlarda daha çok görülür (41). Papiller RHK'in sitogenetik anormallikleri karakteristik olup kromozom 7 ve 17'nin trizomisi ve Y kromozomu kaybıdır. Papiller RHK'in diğer bir tipik özelliği, multisentrisite eğilimidir ki bu bazı serilerde %40'lara kadar çıkar (38, 42, 43).

Kromofob Hücreli Karsinom toplayıcı kanalların kortikal bölümünden köken alan ayrı bir histolojik tiptir. Tüm RHK'ların %4-5'ini oluştururlar. Rapor edilen bir çok olgu genç yaşta olup genellikle 3. 4. ve 5. dekatlarda görülür. Rapor edilen olguların çoğu tanı sırasında ileri evre ve yüksek derecelidir ve genellikle konvansiyonel tedavilere cevap vermezler (39, 41).

Toplayıcı kanal ya da Bellini kanal karsinomu, RHK'lerin oldukça ender bir türüdür ve tüm RHK'lerin %1'inden azını oluşturur (39).

Renal medüller karsinoma göreceli olarak yeni bir histolojik subtiptir ve hemen daima sickle-cell genetiği ile birlikte görülür. Sıklıkla genç yaştaki (en çok üçüncü dekatta) siyahi Amerikalılarda görülür (44).

RHK'de lokal agresif davranış sık görülen bir özelliktir. Toplayıcı sistemin veya renal kapsülün invazyon ve perforasyonu olguların yaklaşık % 20'sinde görülür. RHK olgularının %10'unda venöz sisteme yayılım vardır. Bu oran diğer tümörlerden daha fazladır (45). Lenfatik yolla bölgesel lenf nodüllerine yayılabilir (46). Hematojen yolla başta akciğer olmak üzere, karaciğer, kemikler, sürrenal ve karşı böbreğe yayılabilir (47, 48).

Tablo 3. RHK’de metastaz lokalizasyonları

Lokalizasyon	görülme yüzdesi
Akciğer	50-60
Karaciğer	33
Kemik	30-40
Bölgesel lenf nodları	15-30
V. renalis	15-20
Perirenal yağ dokusu	10-20
Sürrenal bez (aynı taraf)	10-15
V. cava inferior	8-15
Beyin	10-13
Komşu organlar(mide, kolon. . . .)	10
Karşı böbrek	2

3. 1. 4. Evreleme

Evrelemenin asıl amacı uygun tedavi seçimi ve prognostik bilgi edinilmesidir. 1958 yılında Flocks ve Kodesky tümörün makroskopik özelliklerine göre bir evreleme ileri sürmüşlerdir. Daha sonra Robson vasküler tutulumu da göz önüne alan bir modifiye evreleme sistemi önermiştir (49). Robson sisteminin kullanımı kolay olmasına rağmen özellikle evre III hastalık için prognostik değerinin az olduğu görülmüştür.

Tablo 4. RHK’da robson evreleme sistemi

Evre I	:	Tümör böbrek parankimi içine sınırlı
Evre II	:	Tümör perinefritik yağ dokusunu tutmuş gerota fasyası içerisine sınırlı (sürrenal dahil)
Evre III A	:	Tümör renal ana ven veya infeior kavayı tutmuş
Evre III B	:	Tümör bölgesel lenf nodüllerini tutmuş
Evre III C	:	Tümör hem lokal damarları hemde bölgesel lenf nodlarını tuttar
Evre IV A	:	Tümör sürrenal dışındaki komşu organlara yayılır
Evre IV B	:	Uzak metastazlar

Tümör nodül metastaz (TNM) sistemi tümör tutulumunun yaygınlığı ve prognoz açısından daha doğru bilgi vermektedir. RHK’in tümör sınıflama sistemi 1987 sadeleştirilerek daha kolay kullanılabilir hale getirildi. En son 2004 yılında yeniden düzenlenen TNM evrelendirme sistemi ve evre gruplandırılması tablo 5 ve 6 da gösterilmektedir (50).

Tablo 5. RHK TNM evrelendirilmesi

T: primer tümör

- Tx : Primer tümör saptamak için veriler yeterli değil
To : Primer tümöre ait bulgu yok
T1 : Tümör böbreğe sınırlı çapı 7 cm'den düşük
T1a : Tümör çapı 4 cm'den küçük
T1b : Tümör çapı 4 cm'den büyük
T2 : Tümör böbreğe sınırlı 7 cm'den büyük
T3 : Tümör majör venlere yayılmış veya sürrenal bez ya da perinefrik dokuları tutmuş gerota fasyasını aşmamış
T3a : Tümör sürrenal bezi veya perinefrik dokuları tutmuş
T3b : Tümör renal ven veya V. Kava'yı diafragma altına kadar tutmuş
T3c : Tümör v. Kava'yı diafragma üstünde gross olarak tutmuştur

T4 : Tümör gerota fasyasını aşmıştır.

N: Bölgesel lenf nodları

- Nx : Bölgesel lenf nodlarını saptamak için veriler yeterli değil
No : Bölgesel lenf noduna metastaz yok
N1 : Tek bir lenf nodunda metastaz var
N2 : Birden fazla lenf nodunda metastaz var

M : Uzak metastaz

- Mx: Uzak metastaz saptama için veriler yetersiz
M0: Uzak metastaz yok
M1: Uzak metastaz var
-

Tablo 6. RHK'de evre grublandırılması

Evre I	:	T1	N0	M0
Evre II	:	T2	N0	M0
EvreIII	:	T1, T2, T3	N1	M0
		T3	N0	M0
Evre IV	:	T4	N0, N1	M0
		Herhangi bir T	N2	M0
		Herhangi bir T	Herhangi bir N	M1

3. 1. 5. Klinik bulgular

Böbrek tümörleri birçok vakada ileri evreye gelinceye kadar hiçbir bulgu vermeyebilir. Bu yüzden son yıllarda rutin uygulamaya giren USG ve BT ile insidental tanı koyma oranı gittikçe artmaktadır. Klasik olarak tanımlanan makroskopik hematüri, palpabl kitle ve böğür ağrısı hastaların yalnızca %10'unda görülür ve sıklıkla ilerlemiş hastalık belirtisidir. Lomber ağrı genellikle hemoraji ve pıhtı obstrüksiyonuna bağlı olmakla beraber lokal ileri evre hastalığa da bağlı olabilir. İleri evre hastalığın diğer belirtileri; kilo kaybı, ateş, gece terlemeleri ya da fizik muayenedeki palpabl servikal lenfadenopati, varikozel ve bilateral alt ekstremitte ödemidir.

Paraneoplastik sendromlar RHK'li hastaların %20'sinde bulunur. Normal şartlar altında böbrek; 1-25 dihidrokolikalsiferol, renin, eritropoietin ve çeşitli prostoglandinleri salgılar. Bunların hepsi homeostazı sağlamakla yükümlüdür. RHK'lerde bu enzimler fazlasıyla salgılayabildiği gibi, paratroid hormon, HCG, insülin, çeşitli sitokin ve inflamatuvar mediatörler gibi fizyolojik anlamda diğer önemli faktörleri de salgılanabilir. Bu faktörler kilo kaybı, ateş ve anemi gibi semptomların gelişmesinden sorumludurlar. Hiperkalsemi, RHK'li olguların %13'ünde görülüp, paraneoplastik nedeniyle ya da kemiklerin osteolitik metastazı sonucu gelişebilmektedir (51, 52).

Hiperkalseminin semptom ve bulguları, bulantı, kusma, halsizlik ve azalmış tendon refleksleridir. Hiperkalseminin medikal tedavisinde furasemid gibi diüretikler, kortikosteroidler ve kalsitonin verilebilir (51).

Hipertansiyon ve polisitemi RHK'de görülen diğer paraneoplastik sendromlardır. Hipertansiyonun nedeni tümör tarafından fazla renin salgılanmasıdır. Ayrıca tümörün renal arter ya da dallarına baskısı ve arterio-venöz fistüller de diğer sebepler arasında sayılabilir (52).

Paraneoplastik sendromların en önemlerinden bir tanesi de non-metastatik hepatik disfonksiyon (Stauffer sendromu) dur. Bu sendrom olguların %3-20'sinde gösterilmiştir. Bu sendromda protrombin zamanı yükselmesi, hipoalbüminemi, serum bilirubin ya da transaminaz yüksekliği saptanır. Diğer sık görülen bulgular trombositopeni ve nötropenidir. Tipik semptomlar ateş ve kilo kaybıdır (52).

3. 1. 5. Laboratuvar Bulguları

RHK için özel tanı koydurucu herhangi bir test yoktur. Bu hastalarda rutin hemogram yapılmalıdır. Bu yolla anemi, polisitemi, trombositopeni gibi hematolojik bozukluklar test edilir. Paraneoplastik sendromlarını irdelemek açısından serum kalsiyum, karaciğer ve böbrek fonksiyon testlerinin yapılması gerekir. RHK'lerde yapılan rutin idrar tetkikinde hematüri değerlendirilmelidir. Hematürinin varlığı RHK için önemli bir bulgu olmakla beraber olmaması hastalığı ekarte ettirmez. RHK'de uzun yıllar bir çok serum tümör belirleyicisi kullanılmakla beraber özgüllük ve duyarlılığı fazla olan test bugüne kadar bulunamamıştır. Bu amaçla kullanılan eritrosit sedimentasyon hızı, serum ferritin, eritropoetin ve renin seviyelerinin bu anlamda fazla bir değeri yoktur.

3. 1. 6. Radyografik Bulgular

İntravenöz ürografi (İVÜ) hematürisi olan olgularda kullanılır ve yalnız başına kullanıldığında sadece %75 oranında doğruluk sağlar ve tanıyı kanıtlamak için ilave tetkiklere ihtiyaç duyulur. Böbrek korteksindeki küçük kitleler yakalanamaz. İVÜ'nin kitle açısından duyarlılık ve özgüllüğü düşüktür (53).

Ultrasonografi (USG) non-invaziv ve ucuz bir tetkik olması nedeniyle tarama amacıyla kullanılabilir. Bir santimetreye kadar olan kitleler USG ile değerlendirilebilir. Bilgisayarlı tomografi (BT) böbrek kitlesini değerlendirilmesindeki en önemli görüntüleme yöntemidir. RHK tanısını doğrulamada ve kontralateral böbreğin morfoloji ve fonksiyonunu değerlendirme de yardımcıdır. Ayrıca BT ile primer tümörün ekstrarenal uzanımları, venöz tutulumlar, rejyonel lenf nodları ve sürrenal'in durumu değerlendirilebilir (54).

Magnetik rezonans (MR) multiplanar görüntü sağlaması nedeniyle hem renal lezyonları hem de muhtemel vasküler invazyonu değerlendirmede oldukça faydalıdır. MR, kontrast madde allerjisi ya da renal yetmezliği olan hastalarda öncelikli tercih edilmelidir (55). MR günümüzde, inferior vena kava tümör trombusünü değerlendirmede BT'den daha üstündür ve en değerli test olarak kabul edilmektedir (56-58).

3. 1. 7. Tedavi

A. Lokalize hastalık

a. Radikal Nefrektomi(RN);

RHK'un genetik ve biyolojisi ile ilgili bilgilerimizin artmasına rağmen, bugün hastalığın tedavisinde tek küratif seçenektir. RN'nin prensibi, renal arter ve ven'in erken bağlanması, böbreğin gerota fasyası ile birlikte çıkarılması, aynı taraf sürrenalin alınması ve diafragma'dan aort bifurkasyonuna kadar rejyonel lenfadenektomi yapılmasıdır. Bunların hepsinin her hastaya yapılması ile ilgili bazı tartışmalar mevcuttur. Perifasyal nefrektomi yapılması, postoperatif lokal tümör rekürrensini önlemede son derece önemlidir; zira lokalize RHK'un yaklaşık%25'i perinefrik yağ dokusunu tutar. Renal arterin erken bağlanması her ne kadar pratikte gerekli bir yaklaşımsa da, büyük tümörlerde ayrıca vaskülarite de arttığından bu her zaman mümkün olmayabilir. Araştırmalar göstermiştir ki sürrenal gland'ın çıkartılması sürrenalde radyografik bir büyüme olmadığı zaman gerekli değildir. Ancak tümör bütün böbreği doldurmuş, ya da üst polü tutmuşsa sürrenalektomi yapılması zorunludur (59, 60).

RN gereken hastaların tümüne lenfadenektomi (LA) gerekliliği tartışmalıdır. Rejyonal lenf nodu tutulumu prognoz açısından çok önemlidir ve genellikle sağ kalımı olumsuz etkiler. RHK'un bazı karakteristik özellikleri LA gerekliliğini gereksiz kılar. Birincisi, tümör hücreleri kana ve Lenf kanallarına genellikle eşzamanlı girer ve Lenf tutulumu olan hastaların çoğunda hematojen metastaz da vardır. İkincisi, böbreğin Lenfatik drenajı değişkendir ve geniş bir LA bile tüm tutulmuş Lenf nodlarını çıkartamayabilir. Üçüncüsü, lenf metastazı olmayan bir çok hastada uzak metastaz vardır. Başka yayılımın olmadığı yalnızca lenf nodu tutulumu olan hasta yok denecek kadar azdır. Literatürde karşılaştırmalı çalışmalarda lenf nodu diseksiyonu yapılan ve yapılmayan hastalar arasında belirgin bir sağkalım avantajı saptanmamıştır. EORTC'nin bir çalışmasının (30881) erken sonuçları 5 yıllık izlem süresinde hastalığın ilerlemesi ve sağkalımda lenfadenektominin bir avantaj sağlamadığı yönündedir (61). Her halükarda RN sırasında tutulmuş lenf nodlarının özenle çıkartılmasında yarar vardır. Bunlar perihiler ve yerine göre parakaval ve paraaortik lenf nodlarıdır.

b. Laparoskopik Radikal Nefrektomi

Laparoskopik Radikal Nefrektomi (LRN), 8 cm. den küçük, lokalize, böbrek damarları ya da Lenf nodu tutulumu olmayan hastalarda iyi bir alternatif olarak ortaya çıkmaktadır. Postoperatif ağrının az oluşu, iyileşme süresinin kısalığı ve hastanede yatış süresinin az olması önemli avantajlar olarak karsımıza çıkmaktadır. Açık RN ile eşit etkinlik ve minimal morbidite LRN'ye ilgiyi giderek arttırmaktadır. Uzun dönem izlem sonuçları açık cerrahiye eşit onkolojik sonuçlar sağlandığını bildirmektedir. En önemli tartışma konusu işlem sırasında tümör ekilmesi ve port bölgesinde oluşabilecek tümör nüksüdür (62, 63).

c. Nefron Koruyucu Cerrahi (NKC)

Son zamanlarda görüntüleme yöntemlerinin gelişmesi ve rutin uygulamaya girmesiyle erken evre küçük çaplı tümörlerin insidental olarak yakalanma sıklığı artmıştır. Bunun sonucu olarak nefron koruyucu cerrahi daha fazla ilgi görmeye başlamıştır. NKC, tümörün çıkarılması ve olabilecek en geniş böbrek parankiminin bırakılması esasına dayalı bir cerrahidir.

NKC'nin kabul edilen endikasyonu, radikal nefrektominin hastayı anefrik bırakacağı ya da dialize mahkum edeceği durumlardır (64). NKC'nin endikasyonlarını üç gruba ayırarak inceleyebiliriz.

Kesin endikasyonlar:

- 1) Soliter böbrekte tümör
- 2) Bilateral renal kitle
- 3) Ciddi böbrek yetmezliği

Relatif endikasyonlar:

- 1) Önceden böbrek hastalığı geçirmiş kontralateral böbrek(Nefrolitiazis, pyelonefrit, UPJ darlığı, reflü vs.)
- 2) Böbrek yetmezliği oluşturabilecek sistemik hastalık varlığı(Diabet, HT vs.)
- 3) Multifokalite(Genetik sendromlar, VHL vs.)

Elektif endikasyonlar:

- 1) <4 cm tümörler(Daha büyük periferik tümörlerde de uygulanabilir.)
- 2) Periferal kitleler
- 3) Genç ve sağlıklı hastalar

NKC yapılması düşünülen hastalarda yakın ve uzak metastaz ekarte edilmeli tümörün böbrek içi vasküler yapılar ve toplayıcı sistemle ilişkisi belirlenmelidir. NKC'nin teknik başarısı oldukça yüksektir ve bir çok araştırma %78-100'e varan kansere özgü sağkalım belirtmektedirler. Bu sağkalım oranları özellikle düşük evredeki tümörler için radikal nefrektomi serileri ile kıyaslanabilecek niteliktedir. NKC'nin en önemli dezavantajı, lokal tümör rekürrensidir ki bu da olguların ortalama %10'unda gözlemlenmektedir (64).

d. Minimal invaziv alternatif tedaviler

Minimal invaziv tekniklerin potansiyel avantajları arasında morbiditenin az olması, cerrahi tedavinin uygulanamadığı yüksek riskli hastalara uygulanabilmesi ayaktan uygulanabilmesi sayılabilir. Bu amaçla perkütan radyofrekans ablasyon,

kriyoablasyon, mikrodalga ablasyon, laser ablasyon, yüksek yogunluklu odaklanmış ultrason dalgalarıyla (HIFU) denemeler yapılmaktadır. Küçük insidental olarak yakalanmış yaşlı hastalar tek böbrekli hastalar yada iki taraflı tümörün olduğu hastalara önerilebilir (65, 66, 67). Bu işlemlerden sonraki başarı oranları ve komplikasyonlar için henüz yeterli çalışmalar mevcut değildir.

B. Metastatik hastalık:

a. Cerrahi tedavi

Nefrektomi metastatik RHK'li hastaların çoğunda yalnızca palyatiftir. Palyatif nefrektomi, ciddi kanama, ağrı ve neoplastik sendromu olan hastalarda ya da komşu visseral organlara bası olduğu durumlarda endikedir. Ancak primer tümör kitlesi immun sistem üzerinde negatif bir etki yaratmakta ve kitlenin çıkarılması immunoterapötik potansiyeli arttırmaktadır. Metastatik böbrek tümörlü hastalarda nefrektomi + interferon alfa ile yalnızca interferon alfa'nın etkinliği karşılaştırılmış ve kombinasyon uygulanan hastalarda 3-10 aylık bir sağkalım avantajı ortaya konulmuştur (68). Soliter metastazlı hastalarda da nefrektomiyle beraber tek metastatik odağın cerrahi olarak çıkarılması yaşam süresini uzatmaktadır (69, 70).

b. Radyoterapi

Metastatik RHK'de radyoterapi kullanımı sınırlıdır. Rezeke edilemeyen kemik yada beyin metastazların bulunduğu hastalarda uygulanabilir. Semptomlarda anlamlı derecede düzelmeler bildirilmiştir (71, 72).

c. Kemoterapi

RHK kanserler genellikle kemoterapötik ilaçlara genellikle dirençlidirler. Membran glikoproteinini kodlayan MDR-1'in aşırı salgılanmasının kanser hücrelerinden kemoterapötik ajanın dışarı salgılanması için bir mekanizma geliştirdiği görülmektedir. MDR-1 geninin insan RHK spesmenlerinde yüksek yüzdelerde salgılandığı rapor edilmiştir (64). Genellikle cevap oranları %10'nun altında bildirilmektedir. Gemsitabin

ve 5 F-florourasil (5FU) kombinasyonu ile yapılan bir faz 2 çalışmada cevap oranı % 17 olarak bildirilmiştir (73).

d. İmmunoterapi

Genel olarak iyi performansla sahip olan, daha önce nefrektomi yapılan, pulmoner ve yumuşak doku metastazları düşük volümlü olan asemptomatik ya da minimal semptomları olan hastalar immünoterapiye daha iyi yanıt verirler. Diğer taraftan, primer tümörü rezeke edilmemiş, daha önce sistemik tedavi almış ve visseral organlara ya da kemiğe yaygın metastaz yapmış hastalar tedaviye kötü yanıt verirler. İmmunoterapiye yanıt veren tek histolojik tip şeffaf hücreli tiptir.

İlk olarak tedavi edici amaçlarla kullanılan sitokin interferonlardır. İnterferon-alfa, metastatik RHK'in tedavisinde yaygın olarak kullanılan antiviral, immünomodüler ve antiproliferatif aktivite gösteren bir proteindir. Yan etkileri doza bağlıdır. Tek ajan ya da kombinasyon halinde ayaktan tedavi şeklinde uygulanmaktadır. Cevap oranları % 10-25 arasında, ortalama cevap süresi 8-10 ay bildirilmiştir (74-76).

İmmunoterapide kullanılan bir diğer sitokin interlökin-2(İL-2)'dir. İL-2 immün sistemde etkin hücreler üzerinde bir büyüme faktörü gibi rol oynayarak etki göstermektedir. İL-2'nin toksisitesi interferona göre oldukça fazladır. İL-2'nin toksisitesi doza bağlıdır. Başlıca yan etkileri sıvı retansiyonu, interstisyel ödem, hipotansiyon, periferik vasküler direncin azalması, kardiyak indekste artış taşikardi ve oligüridir. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda interferona karşı bir üstünlüğü gösterilememiştir. Tedaviye yanıt oranı %15 civarında bildirilmiştir (64).

e. Anjiogenez inhibitörü ilaçlar

Moleküler biyolojinin son yıllarda daha iyi anlaşılır hale gelmesi sayesinde metastatik RHK tedavisinde bazı yeni ilaçlar geliştirilmesi mümkün olmuştur. Sporadik RHK anjiogenezi sağlayan vasküler epitelyal growth faktör (VEGF) ve platelet derived growth faktör (PDGF) birikimine yol açar. Bu durum RHK gelişmesinde ve ilerlemesinde önemli katkı sağlar. RHK'inde içinde olduğu birçok kanserin

gelişmesinde ve tümör anjiogenezinde rol oynayan en önemli growth faktör VEGF'dir (50).

Klinik uygulamalarda VEGF yolu iki şekilde inhibe edilmektedir. Bunlardan birincisi trozin kinaz inhibitörleri (sunitinib, sorafenib, axitinib vs.) ile intraselüler VEGF resptörlerinin inhibe edilmesidir. İkinci yol ise dolaşımdaki VEGF'lerin monoklonal antikor (bevacizumab) kullanılarak inhibe edilmesidir (77).

Son zamanlarda iki yeni anjiogenez inhibitörü ajan olan sunitinib ve sorafenib metastatik RHK tedavisinde onay almıştır.

Sunitinib; sunitinib bir oksindol trozin kinaz inhibitörüdür. Antitümör ve antianjiogenik aktivitesi olan küçük bir molekül olup VEGF ve PDGF resptörlerini inhibe eder.

Sunitinib'in metastatik RHK'de kullanımı ile ilgili iki adet faz II çalışma yapılmıştır. 63 hasta ile yapılan ilk çalışmada %40 oranında cevap bildirilmiştir (78). 106 hasta ile yapılan ikinci çalışmada benzer sonuçlar elde edilmiştir. Bu çalışmada %34 oranında parsiyel cevap ve ortalama 8,3 ay progresyonsuz yaşam elde edilmiştir (79).

Yapılan randomize faz III çalışmada ise sunitinib ve interferon tedavisi karşılaştırılmıştır. Bu çalışma sunitinibin cevap oranlarında ve progresyonsuz yaşam sürelerinde daha iyi sonuçları olduğu bildirilmiştir. Cevap oranları sunitinibde %31 iken interferonda %6 bulunmuştur. Aynı şekilde progresyonsuz yaşam oranları ise 11 aya karşı 5 ay olarak tespit edilmiştir (80).

Sorafenib; Tümör hücre proliferasyonu ve anjiyogenezde rol oynayan hücre içi sinyal iletim yollarından önemli bir tanesi de *Ras* ve *Raf* gen ailesini içermektedir. *Ras* aktive olduğunda *Raf*-kinaz stimülasyonu ile hücre proliferasyonu uyarılmaktadır. Oral olarak kullanılabilen bir Rafkinaz inhibitörü olan sorafenib tümör hücre proliferasyonunu inhibe eder. Sorafenib aynı zamanda VEGFR-2 ve PDGFR-β'yı da bloke ederek anjiyogenezisi de inhibe etmektedir (81).

Sorafenib'in günde 2 kez 400 mg kullanıldığı, 202 hastanın incelendiği faz II bir çalışmada, tedavi süresince 73 hastada tümör boyutunun %25'ten fazla oranda küçüldüğü ve 65 hastanın stabil hastalık döneminde kaldığı gözlenmiştir (82). Sitokine

dirençli hastaların alındığı randomize bir faz III çalışmada, hastalar sorafenib ve plasebo gruplarına randomize edilmişler, sorafenib alanlarda progresyonsuz sağkalımın 5.5 ay, plasebo grubunda ise 2.8 ay olduğu bulunmuş ve bu farkın istatistiksel anlamlı olduğu rapor edilmiştir (83).

Bevacizumab; bevacizumab VEGF proteinlerinin majör izoformlarının hepsini nötralize eden insan monoklonal antikordur. Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, kolorektal kanser ve meme kanserinde etkinliği gösterilmiştir.

RHK için yapılan bir çalışmada interferon alfa ile bevacizumab tedavisi karşılaştırılmıştır. Bevacizumab tedavisinde cevap oranı %36.4 interferon tedavisinde cevap oranı %12.4 bulunmuştur (84). Başka bir çalışmada bevacizumab ve interferon kombinasyonu ile yalnızca interferon tedavisini karşılaştırılmıştır. Kombinasyon tedavisi verilen hastalarda progresyon zamanı 8.5 ay bulunurken yalnız interferon tedavisinde 5 ay bulunmuştur. Objektif cevap oranı kombinasyon tedavisinde %25 iken tek başına s interferon tedavisinde % 13 bulunmuştur (85).

Axitinib; Yeni ve küçük molekülü VEGF, PDGF KİT reseptör inhibitörü bir ilaçtır. Bu ilaç ile yapılan tek faz II çalışmada % 40 oranında cevap oranı bildirilmiştir (86).

f. Deneysel Tedavi yöntemleri

Metastatik RHK'de Aşı tedavisi, allojenik kök hücre nakli, talidomid, lenfokin aktif öldürücü hücre, otolenfosit tedavisi gibi tedaviler denenmekte olup henüz yaygın olarak kullanımı bulunmamaktadır.

3. 2. Serbest Radikaller

Serbest oksijen radikaller (SOR) yaşam için gereklidir. Elektron transferi enerji üretimi ve pek çok diğer metabolik işlevde temel oluşturur. Serbest oksijen radikalleri hücrelerde endojen ve ekzojen kaynaklı etmenlere bağlı olarak tüm hücreler tarafından normal veya patolojik olarak aerobik metabolizma ile sürekli üretilmektedir. Serbest radikaller bir veya birden çok çiftleşmemiş elektronların varlığından dolayı kararsız, molekül ağırlığı düşük ve çok etkin atom veya moleküller olarak tanımlanır (87, 88).

Oksidatif metabolizma sürecinde oksijenin çoğu hidrojene bağlanarak su oluşturmaktadır. Ancak oksijenin yaklaşık % 4-5'lik kısmı ise su oluşumuna katılmaz ve SOR oluşturur (88). Aerobik metabolizması olan memelilerde SOR genellikle oksijenden üretilmekle birlikte organizmada oksijen türevi SOR dışında karbon ve kükürt merkezli radikallerde oluşmaktadır (89, 90).

Radyasyon, kimyasal maddelere maruz kalma, karbon tetraklorür, ilaç toksisiteyi, hava kirliliği, sigara dumanı gibi çevresel faktörler, antineoplastik ajanlar SOR oluşumuna neden olan ekzojen kaynaklı etmenlerdir (90). Psikolojik stres ve yetersiz beslenme (düşük antioksidan ve fazla yağ alımı) gibi çevresel faktörler de SOR üretimini artırmaktadır (89).

İmmün sistem, tümör büyümesine karşı major savunma mekanizmasıdır. Sitotoksik naturel killer (NK) hücreleri; tümör başlangıcı ve metastazlara karşı immün savunmada ana komponenttir. Aşırı oksidatif stres, DNA hasarına ve protoonkogen mutasyonuna neden olmaktadır. SOR üretiminde artış NK hücre sitotoksitesinde azalmaya neden olarak immünyetede belirgin değişiklikler meydana getirir. Oksidatif stres, mutasyona uğramış hücre kolonilerinin yayılmasını uyarabilir (91).

Serbest oksijen radikalleri kanser, diabetes mellitus ve nörodejeneratif hastalıklar (Parkinson hastalığı, Alzheimer hastalığı) gibi farklı patolojilere neden olmaktadır. Kanser gelişimine mutasyon ve onkojenik transformasyon hızını artırıp DNA hasarlanması yaparak neden olur (92). Bu durumlarda SOR düzensiz bir şekilde üretilir. SOR proliferasyon, hücreyel remodeling, apoptozis gibi hücreyel fonksiyonlarına da etki ederek kanser ve metastaz gelişimine neden olabilir (93).

3. 2. 1. Oksidatif Stres

Oksidatif stres basit bir şekilde, vücudun oksidan-antioksidan dengesinin oksidan lehine değişmesi olarak tanımlanabilir. Serbest oksijen radikalleri normal hücre metabolizması süresince devamlı olarak üretilmekte ve antioksidan savunma sistemi tarafından nötralize edilmektedir. Ancak SOR aşırı miktarda üretildiğinde veya antioksidan savunmada belirgin bir azalma olduğunda antioksidan savunma sistemi baskılanır ve oksidatif stres ortaya çıkar. Oksidatif stres karsinogenezis başlatılmasında kritik rol oynayan DNA hasarına, kromozomal sapmalara, tümör süpresör genlerde mutasyonlara, kontrol edilmeyen hücre bölünmelerine neden olmaktadır (94).

Oksidatif stres aynı zamanda hücre büyümesi ve çoğalması ile ilişkili olan genlerin transkripsiyonunu düzenleyen döngüde rol alan sitoplazmik kalsiyumun artışına neden olmaktadır (95).

Organizmadaki bu oksidan-antioksidan denge birçok faktörlere bağlıdır. Bunlar endojen ve ekzojen faktörler olmak üzere iki bölümde incelenebilir. Ancak bu faktörler genellikle birlikte etkilidir. Bu dengeyi oksidan lehine değiştiren faktörler Tablo 7’de verilmiştir (96).

Tablo 7. Organizmada serbest radikal reaksiyonunu artıran faktörler

I - Normal biyolojik işlemler
1 - Oksijenli solunum
2 - Katabolik ve anabolik işlemler
II - Oksidatif stres yapıcı durumlar
1 - İskemi - hemoraji - travma - radyoaktivite - intoksikasyon
2 - Ksenobiotik maddelerin etkisi
a-) İnhale edilenler
b-) Alışkanlık yapan maddeler
c-) ilaçlar
3 - Oksidan enzimler
a-) Ksantin oksidaz
b-) İndolamin dioksigenaz
c-) Triptofan dioksigenaz
d-) Galaktoz oksidaz
e-) Siklooksigenaz
f-) Lipooksigenaz
g-) Monoamino oksidaz
4 - Stres ile artan katekolaminlerin oksidasyonu
5 - Fagositik inflamasyon hücrelerinden salgılanma (nötrofil, monosit, makrofaj, eosinofil, endotelyal hücreler)
6 - Uzun süreli metabolik hastalıklar
7 - Diğer nedenler: Sıcak şoku, güneş ışını, sigara
III - Yaşlanma süreci

3. 2. 2. Serbest Oksijen Radikallerinin Etki Mekanizmaları

Serbest oksijen radikallerinin (SOR) mitokondrial oksidasyon, hemoglobin tarafından oksijen transportu ve sitokrom P450 aktivitesi gibi birçok fizyolojik reaksiyonlarda rolleri olduğu gibi organizmaya zararlı etkileri de olmaktadır (97). SOR, lipid peroksidasyonu yolu ile karbonhidratları, proteinleri, sülfür içeren enzimleri ve

DNA'yı etkileyerek hücre membranının hasarına ve mutajenik etki ile kanser gelişimine neden olmaktadır (98, 99).

Tablo 8. Serbest oksijen radikallerinin etkileri (11).

-
1. Membran yapısı ve fonksiyonunun değişmesi,
 2. Protein oksidasyonu
 3. DNA'nın oksidasyona bağlı hasar görmesi
 4. Enzimlerin inaktivasyonu
 5. Nükleotit yapılı koenzimlerin yıkımı,
 6. Hücre yüzeyindeki reseptörlerde değişiklik
 7. Membran proteinlerinin tahribi, taşıma sistemlerinin bozulması,
 8. Karbonhidrat oksidasyonu
 9. Mitokondrilerdeki aerobik solunumu bozarlar
 10. Trombosit agregasyonunu arttırmaları,
 11. Ekstrasellüler etkiler: Kollagen süperoksit radikali etkisiyle harap olmakta, hiyalüronik asitte depolarize olarak bağ dokusu harabiyeti meydana getirmektedirler.
-

3. 2. 3. Lipid Peroksidasyonu

Lipid peroksidasyonu, serbest radikaller tarafından başlatılan ve membran yapısındaki çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyonuna neden olup, membran lipid yapısını değiştirerek hücre yapı ve fonksiyonunun bozulmasına yol açan kimyasal bir olaydır. Süperoksit gruplarının hızlı bir şekilde doymamış yağ asitleriyle reaksiyona girerek peroksitler, alkoller, aldehitler, hidroksi yağ asitleri, etan ve pentan gibi çeşitli lipid peroksidasyon ürünlerini oluşturur (91).

Lipid peroksidasyon reaksiyonları biyolojik membranların yapı ve fonksiyonlarında belirgin hasara neden olmaktadır. Lipid peroksidasyonu hücre membranlarının bütünlüğünü tehlikeye sokar, hücre membranının akışkanlığını artırır,

membrana bağlı reseptör ve enzimleri inaktive eder. SOR lipid peroksidasyonunu indükleyerek fonksiyonel ve yapısal hücre hasarına neden olur (91, 100).

Lipid peroksidasyonun en önemli ürünü malondialdehid (MDA) dir. Oluşan MDA, hücre membranlarından iyon alış-verişine etki ederek membrandaki bileşiklerin çapraz bağlanmasına yol açar ve iyon geçirgenliğinin ve enzim aktivitesinin değişimi gibi olumsuz sonuçlara neden olur. MDA bu özelliği nedeniyle, DNA'nın nitrojen bazları ile reaksiyona girebilir ve bundan dolayı mutajenik, hücre kültürleri için genotoksik ve karsinojeniktir (101-103).

Lipid peroksidasyonu ve oksidatif stres birçok hastalığın etyopatogenezinden sorumlu tutulmaktadır. Bunlar arasında ateroskleroz, kanser, radyasyon hasarı, iskemi-reperfüzyon hasarı, romatoid artrit ve diğer otoimmün hastalıklar, diabetes mellitus, akciğer hastalıkları (amfizem, oksijen toksisitesi, bronkopulmoner displazi), SSS hastalıkları (Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı), böbrek bozuklukları (otoimmün nefroz, aminoglikozit nefrotoksisitesi), kardiyak miyopati, kas hastalıkları (kas distrofisi, multipl skleroz), göz hastalıkları (katarakt, maküler dejenerasyon), kan hastalıkları (favizm, orak hücre anemisi, malarya, protoporfirin fotooksidasyonu), gastrointestinal bozukluklar (ülseratif kolit) sayılabilir (96).

3. 2. 4 Serbest Oksijen Radikallerinin Kanser Gelişimindeki Rolü

Karsinogeneizde DNA hasarı etken bir olaydır. Serbest radikaller DNA'nın nükleik asitleri ile reaksiyona girerek DNA'da hasar oluşturmakta ve bu hücrelerin kanser hücrelerine dönüşmesine yol açmaktadır (104). Lipid peroksidasyonu sonucu oluşan ara ürünlerde DNA ile reaksiyona girebilmektedir. Meydana gelen endojen DNA lezyonları genotoksiktir (105).

Oksidasyon-antioksidasyon potansiyeli organizmanın tümör gelişmesine yatkınlığını belirler. Oksidanların hücre proliferasyonunu uyardığı, aktif oksijen radikallerini ve oluşan reaktif aldehid ve peroksidlerin spesifik hücrelerin büyümesini ve diferansiyasyonunu kontrol eden genlerde hasara neden olarak tümörün gelişimi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (106, 107).

Sürekli oksidatif strese maruz kalan memeli hücrelerinde p53 tümör süpresör geninde mutasyon tespit edilmiştir. p53 gen mutasyonları insan kanserinde çok sık meydana gelen değişiklikler arasındadır. p53 geni, hücre siklusunun düzenlenmesinde, apoptozisde, DNA onarımının kolaylaştırılmasında, anjiogenezisin antagonize edilmesinde önemli rol oynamaktadır (108).

Çok basamaklı karsinogenezisin basit olarak başlama (*initiation*), gelişme (*promotion*) ve ilerleme (*progression*) olmak üzere üç evresi bulunur. SOR'nin kanser gelişiminin her üç basamağında da önemli rol oynadığı gösterilmiştir (109).

3. 2. 5 Antioksidan Savunma Sistemleri

Antioksidanlar, hem direkt, hem de dolaylı olarak ksenobiyotiklerin, ilaçların, karsinojenlerin ve toksik radikal reaksiyonların istenmeyen etkilerine karşı hücreleri koruyan maddelerdir. Vücut biyolojik fonksiyonlarını sürdürebilmek için oksidan ve antioksidan iki sistemi dengelemeye çalışır. Antioksidanlar okside olabilen substratın oksidasyonunu önleyen moleküller oldukları için antikarsinojen olarak etki göstererek hücreleri oksidatif hasardan korurlar. Karsinogenezisin her üç safhasına da baskılayıcı etki yaparak fonksiyonlarını gösterirler (110, 111).

Antioksidan savunma; hücrenel, membranöz ve ekstrasellüler mekanizmalar şeklinde fonksiyon yapar. Hücrenel antioksidan savunma sistemi, glutatyon peroksidaz, süperoksit dismutaz ve katalaz gibi antioksidan enzimlerin endojen üretimine dayanmaktadır. Bu enzimler hücre içi süperoksit radikallerinin temizlenmesini sağlayarak hücreyi bu radikallerin zararlı etkilerinden korumaktadırlar (96).

Membranöz antioksidan savunma sisteminde vitamin E, betakaroten ve koenzim Q gibi antioksidanlar yer alır. Lipofilik olan vitamin E (alfa tokoferol) ara peroksil radikallerini temizlemekte ve lipid peroksidasyonunun zincir reaksiyonunu bloke etmektedir (88).

Ekstrasellüler savunma sistemi ise metal bağlayıcı proteinlerin karışımını kapsamaktadır. Metal bağlayıcı proteinler transferrin, laktoferrin, albumin, haptoglobülinler, ürik asit, vitamin C ve bilirübindir. Demir, bakır gibi metal

iyonlarının varlığı lipid peroksidasyonu ve SOR oluşumunu hızlandırabileceğinden metal bağlayıcı proteinler bu metallerin nonreaktif durumda kalmalarını sağlar (110, 112).

3.3. Paraoksonaz

Paraoksonaz1 (PON1), karaciğerde sentezlenen, organik fosforlu bir insektisit olan parationun aktif metaboliti paraoksonu hidroliz etme yeteneğine sahip bir serum esterazdır. Enzim, paration dışında birçok aromatik karboksilik asit esterlerinin hidrolizini de katalize etmektedir. Bununla birlikte, PON1'in doğal substratı kesin olarak belli değildir (113, 114).

İnsanlarda birbirine komşu üç ayrı PON geni (PON-1, PON-2, PON-3) bulunmaktadır. PON genlerinin, insanlarda yedinci kromozomun uzun kolunda, q 21. 3 bölgesinde yerleştikleri bildirilmektedir (1). Üç PON proteininin aminoasit dizileri arasında yaklaşık %53 oranında homoloji bulunmaktadır ve dokulardaki ekspresyonları ile dağılımları birbirinden farklılık gösterir. PON-1 ve PON-3'ün karaciğer ve plazmada bulunmasına karşılık, PON-2'nin karaciğer, böbrek, kalp, beyin, testis dokularında özellikle endotel tabakasında bulunduğu ve aortik düz kas hücrelerinde de yer aldığı gösterilmiştir (115).

Organofosfatlar, asetilkolinesterazları inhibe etme etkisinden dolayı sinir gazları ve insektisit amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır. Paraoksonaz önceleri organofosfat bileşiklerini hidrolize etme yeteneği nedeniyle daha çok toksikoloji alanında çalışılmıştır. Ancak son yıllarda antioksidan etkileri nedeniyle güncellik kazanmıştır.

3.3.1. Kimyasal yapısı

İnsan serum PON1'i, 43 kDa molekül ağırlığında, 354 aminoasitten oluşan bir glikoproteindir (116). Total ağırlığının %15. 8'ini oluşturan üç karbonhidrat zinciri içerir. İzoelektrik noktası 5. 1'dir. Aminoasit içeriği, yüksek miktarda bulunan lösin dışında bir özellik göstermez. Yapısında bulunan üç sistein aminoasidinden 284.

pozisyonundaki serbest iken, diğ er ikisi (Cys 42-352) arasında disü lfit bağı bulunur. Serbest sistein, substrat tanınması ve bağlanması için gereklidir (117).

Maksimum PON1 aktivitesi için kalsiyum gereklidir. Üç boyutlu yapıda enzimin merkezinde iki adet kalsiyum iyonu bulunmaktadır (118). PON1'in organofosfat substratlarına karşı hidrolitik aktivitesi kalsiyuma bağımlı iken, lipid peroksitlerin birikimini önlemede kalsiyumun gerekli olmadığı bildirilmektedir (119).

3. 3. 2. Paraoksonaz fonksiyonu

PON1'nin en iyi bilinen koruyucu fonksiyonu, organofosfat nörotoksinleri, aromatik karboksilik asit esterlerini ve insektisidleri hidroliz etme yeteneğidir. Toksik organik molekülleri hidroliz etmesi, PON1'in tanımlanan ilk fizyolojik fonksiyonudur (120).

PON1'in belirlenen ikinci biyolojik fonksiyonu antioksidan aktiviteye sahip olmasıdır. Serum PON1 plazmada HDL ile birlikte bulunur ve plazma lipoproteinlerinin oksidasyonunu önlemede rolü bulunmaktadır. Peroksidasyona uğramış olan lipidler bu enzim tarafından metabolize edildiğinden, lipid peroksitlerinin hem HDL'de hem de LDL'de birikimi önlenir. Bu özelliğ i nedeniyle, HDL'nin LDL'yi oksidasyona karşı koruyucu etkisinden PON1 sorumludur ve bu açıdan A ve E vitaminlerinden daha etkilidir (121, 122).

PON1, lipid peroksitlerin yanı sıra hidrojen peroksit üzerine de etkilidir. PON-1'in okside LDL'deki kolesteril linoleat hidroperoksitlerini ve hidroksitleri indirgemesi nedeni ile peroksidaz benzeri aktivitesi olduğu düşünülmektedir. Ayrıca, lipopolisakkarid inaktivasyonu yolu ile bakteriyel endotoksinlere karşı koruma sağlamaktadır (123).

Oksidatif stres altında sadece lipoproteinler değil hücrenin yapısındaki lipidler de peroksidasyona uğramaktadır. Paraoksonaz lipid peroksitlerinin aterosjenik etkilerini nötralize eder, hücre membranlarını koruyucu etki gösterir. LDL oksidasyonu esnasında oluşan okside fosfolipidlerden okside kolesterol esterleri, lizofosfatidilkolinler PON enzimidaki serbest sü lfidril grubu ile etkileşime girer ve enzimin inaktive olmasına yol açarlar (124, 125).

3. 3. 3. Paraoksonazın Sentez ve Sekresyonu

Karaciğerde sentezlenen ve dolaşıma verilen PON1'in HDL yapısında yer aldığı bilinmektedir. PON1, hidrofobik N-terminal bölgesi aracılığıyla HDL lipidlerine kolayca bağlanabilmektedir. PON1'i bağlayan HDL alt birimleri, apolipoprotein AI (Apo AI) ve Apo J (klusterin) proteinlerini de içerdiğinden, Apo AI ve Apo J'nin bağlanmada rol oynayabileceği düşünülmektedir (126).

Serum PON1 aktivitesi, yenidoğan ve prematüre infantlarda erişkin düzeyin yarısı kadardır. Erişkin düzeylerine doğumdan bir yıl sonra ulaşılır, ancak yapılan çalışmaların çoğunda ileri yaşta PON1 aktivitesinin azaldığı belirlenmiştir. Serumdaki PON düzeyi ve aktivitesi bireyler arasında çok değişkendir. Bunun bir nedeni PON geninin kodlama ve promotor bölgelerinde çok sayıda polimorfizm göstermesidir. Bir diğer faktör ise beslenme şekli ve çevresel faktörlerdir.

Serum PON1 düzeyleri ayrıca akut faz reaktanları, gebelik ve Apo AI metabolizmasını etkileyen bozukluklardan etkilenir (126, 127).

3. 3. 4. Paraoksonaz Aktivitesine Beslenme ve Çevresel Faktörlerin Etkisi

PON1 aktivitesi çevresel ve nütrisyonel faktörlerden etkilenmektedir. Örneğin yüksek serum kolesterol düzeyi ve insülin rezistansı PON1 aktivitesini azaltmaktadır (128). Ayrıca aterosklerotik diyetinde PON1 aktivitesini azalttığı gösterilmiştir (129).

Organofosfatlara veya diğer toksinlere kronik olarak mesleki veya çevresel düşük dozlardaki maruziyetin PON1 aktivitesini etkileyip etkilemediği henüz kesinlik kazanmamıştır. Ancak organofosfatlara akut maruziyet durumlarında da PON1 aktivitesi azalmaktadır (130).

Yapılan bir çalışmada fazla miktarda diyetle alınan sebzeler içerdikleri C ve E vitamin miktarına bağlı olarak PON1 aktivitesini azalttığı bildirilmiş olmakla birlikte, yüksek dozlarda vitamin E verilen bireylerde bile PON1 aktivitesinde değişiklik gözlenmemiştir. Muhtemelen PON1 aktivitesi E vitaminine ihtiyaç göstermemektedir (131).

Sigaranın doz ve zamana bağımlı olarak PON1 aktivitesini inhibe ettiği gösterilmiştir. Kullanılmış yağdan zengin diyetin tokluk serum PON1/ARE aktivitesini azalttığı, kullanılmamış yağ içeren diyetin ise ters etki yaptığı bildirilmiştir. Lipid düşürücü ilaçlarında PON1 aktivitesini düşürdüğü tespit edilmiştir (132).

3.3.5. Genetik Polimorfizm

Epidemiyolojik ve moleküler çalışmalar, PON1 geninde 55. ve 192. pozisyonlarda olmak üzere iki önemli genetik polimorfizm olduğunu göstermiştir. Bu iki polimorfizm 55. ve 192. pozisyonlardaki aminoasitlerin değişimi ile ortaya çıkar. PON geninin 192. pozisyonundaki glutamin aminoasiti (Q genotipi) yerine arginin aminoasitinin (R genotipi) geçmesiyle birinci polimorfizm (Q192R); aynı şekilde 55. pozisyonundaki lösin aminoasiti(L genotipi) yerine metionin (M genotipi) geçmesiyle ikinci polimorfizm (L55M) oluşur.

Bu polimorfizmler sonucunda oluşan paraoksonaz enziminin aktivitesinde farklılıklar olduğu bildirilmiştir. Mackness ve ark yaptığı çalışmada bu iki polimorfizme bağlı olarak paraoksonaz aktivitesinde önemli farklılıklar gösterilmiştir. Bu çalışma sonucunda QQ genotipi en düşük, QR genotip orta derecede, RR tipi ise en yüksek derecede enzim aktivitesi göstermiştir. Aynı şekilde MM homozigot genotipi ML ve LL gentipleryle karşılaştırıldığında da daha düşük enzim aktivitesi göstermiştir. En düşük enzim aktivitesi QQ ve MM genotipinde görülmüştür (133).

En yaygın olanı homozigot (QQ), ikincisi heterozigot (QR) ve en az olanı homozigot (RR)'dir. R allelin kodladığı proteinin paraokson hidroliz aktivitesi Q allele göre sekiz kat daha yüksektir. Bu genetik polimorfizm serum protein konsantrasyonunu da etkilemektedir. Homozigot RR bireyler homozigot QQ bireylere göre daha yüksek enzim konsantrasyonuna sahiptir. Polimorfizm aril esteraz (ARE) aktivitesini etkilemez. Bu nedenle ARE aktivitesi PON1 aktivitesindeki değişikliklerden bağımsız olarak asıl protein konsantrasyonunun göstergesi olarak kabul edilebilir (132).

Bu iki pozisyonundaki polimorfizmlere ek olarak PON1 promotor alanında beş polimorfizm daha rapor edilmiştir. Bu genetik polimorfizmlerden dolayı PON1 aktivitesi bireyler ve toplumlar arasında 10-40 kat kadar farklılıklar göstermektedir (134, 135).

3. 3. 6. Çeşitli hastalıklarda paraoksonaz

Paraoksonaz enziminin LDL oksidasyonunu önleyerek antioksidan etki gösterdiğinin gösterilmesi ile patogenezinde oksidatif stres olan bir çok hastalıkla ilişkili olabileceği düşünülmüştür. Yüksek dansiteli lipoprotein yapısında fosfolipidlere bağlı olarak bulunan PON1 enziminin LDL'i oksidasyondan koruyarak ateroskleroza önlediği kesin olarak ortaya konmuştur.

Patogenezinde ateroskleroz olan koroner arter hastalığında paraoksonaz enzim aktivitesinin düştüğü gösterilmiştir (136). Benzer şekilde iskemik stroke geçiren hastalarda enzim aktivitesinin düştüğü gösterilmiştir (137). Son yıllardaki çalışmalara göre farklı PON1 genotiplerinin ateroskleroza önlemedeki rolleri hala tartışmalı olmakla birlikte QQ düşük aktivite genotipine sahip bireylerin ateroskleroz riskinin daha yüksek olduğu giderek daha çok kabul görmektedir (132).

Familiyal hiperkolesterolemili ve insülin bağımlı diabetes mellituslu hasta gruplarında serum PON1 aktivitesi, genetik değişiklikten bağımsız olarak sağlıklı kontrol grubuna göre düşük bulunmuştur (138).

İnsülin bağımsız diabetes mellituslu hastalarda serum PON1 aktivitesi sağlıklı bireylerle karşılaştırıldığında belirgin şekilde düşük olduğu tespit edilmiştir. Azalmış PON1 aktivitesi diabetik vasküler komplikasyonların gelişimine zemin hazırlamaktadır (139).

Üremik ve böbrek transplantasyonu yapılmış hastalarda artmış lipoprotein oksidasyonuna bağlı olarak ateroskleroz riski artmaktadır. Üremik ve böbrek transplantasyonu yapılmış hastalarda PON1 enzim aktivitesi sağlıklı bireylere göre daha düşük bulunmuştur (140).

Eretil disfonksiyonu olan hastalarda paraoksonaz enzim aktivitesinin azaldığı gösterilmiştir. Antiaterojenik etki gösteren paraoksonazın azalması damar yapısının bozulmasına ve buna bağlı olarak erektil disfonksiyon gelişimine neden olabileceği düşünülmüştür (141).

Serum PON1 enzimini taşıyan HDL kolesterolün yokluğuna bağlı olarak lipid metabolizma bozukluğu olan Fish-eye ve Tangier hastalığı olanlarda serum PON1

aktivitesi çok düşük veya dolaşımında hiç saptanamayacak düzeyde tespit edilmiştir (132, 143).

Serum PON1 aktivitesinin azaldığı diabet, hiperkolesterolemi ve kardiovasküler hastalığı olan hastalar artmış bir oksidatif stres altındadır (138, 144).

3. 3. 7. Kanser ve Paraoksonaz

PON1, LDL oksidasyonu üzerinden HDL ile antioksidan özelliğe sahip olduğu bilinmektedir. Ayrıca lipid peroksidasyonu sonucu oluşan karsinojenik soluble lipid radikallerinin detoksifikasyonuna katkısı olmaktadır (145).

Birçok hastalıkta serum PON1 seviyesi değişmektedir. Bununla birlikte serum PON1 seviyesi ile kanser arasındaki ilişki hala tam olarak bilinmemektedir. Ancak Akçay ve arkadaşları yaptıkları iki farklı çalışmada pankreas ve mide kanserli hastalarda PON1 ile plazma lipoproteinleri arasındaki ilişkiyi incelemişler. İlk çalışmada 20 pankreas kanseri tanısını alan hastalar ile aynı yaş ve cinsiyette 20 sağlıklı kontrol grubu karşılaştırılmış ve pankreas kanserli hastalarda HDL ve PON-1 seviyelerinin kontrol grubundan düşük olduğu gösterilmiştir. Diğer çalışmada mide kanseri tanısını alan hastalar ile kontrol grubu karşılaştırıldığında aynı sonuçlar elde edilmiştir. İki çalışmanın sonucuna göre pankreas ve mide kanserli hastalar ile sağlıklı kontrol grubu karşılaştırıldığında kanserli hastalarda HDL ve PON1 seviyelerinin daha düşük olduğu görülmüştür (146, 147).

Akciğer kanserli hastalarda PON enzim aktivitesi araştırılmış ve akciğer kanserli hastalarda enzim aktivitesinin önemli derecede düşük olduğu gösterilmiştir (148).

Yüksek gradeli meningioma ve glioma da yapılan çalışma da enzim aktivitesinde azalma tespit edilmiş fakat genetik polimorfizm açısından anlamlı bir farklılık bulunamamıştır (149).

Prostat kanserinde yapılan polimorfizm çalışmasında PON192/QR ve PON55LM/MM genotiplerinin artmış prostat kanseri riskiyle birlikte olduğu gösterilmiştir (150).

Ancak kolorektal kanserde yapılan bir çalışma da PON-1 Q192R ve L55M polimorfizmleri değerlendirilmiş ve herhangi bir farklılık gösterilememiştir (151).

Literatürde RHK ve PON arasındaki ilişkiyi gösteren herhangi bir çalışma yoktur.

4. GEREÇ VE YÖNTEM

4. 1. Hastaların Seçimi

Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi etik kurulunca onay alındıktan sonra berrak hücreli (Klasik tip) RHK tanısı konulmuş 60 tane hasta ve 60 adet sağlam kontrol grubu çalışmaya alınmıştır. Hastalar ve kontrol grubu bilgilendirilerek onay formları imzalatılmıştır.

Çalışmaya alınan hastaların adı-soyadı, yaşı, cinsiyeti, hastalığın evresi, tedavi bilgileri kaydedildi. Kontrol grubu seçiminde bireylerin benzer yaş ve cinsiyette olmasına özellikle dikkat edildi.

4. 2. Örneklerin alınması, saklanması ve analizlere hazırlanması

Kanlar sabah aç karnına, dinlenmiş hastaların antekübital veninden daha önceden hazırlanmış EDTA'lı tüplere 2 cc olarak alındı.

Kanlar, kan alınma işlemleri bittikten sonra DNA saflaştırması yapıncaya kadar ortalama olarak 1 hafta -20 C°'de bekletildi. Kanlar birkaç defa alt-üst edilerek homojen hale getirilip 8'erli gruplar oluşturularak çalışıldı.

4. 3. Kimyasallar maddeler, sarf malzemeleri ve cihazlar

Mikrosantrifüj (Ole Dich Instrumentmakers APS, type 157. MP, Germany ve Eppendorf microcentrifuge type 5415C, Germany), Elektronik hassas terazi (Shimadzu Corporation Libror AEG-320, Japan), pH metre (Hanna Instruments HI8521 pHmeter, Italy), UV/visible spektrofotometre (LKB Biochrom Ultraspec Plus 4054 UV/visible spectrophotometer, Cambridge, England), hız ayarlı vorteks (Labinco L46, The Netherlands), su banyosu (Kötterman labortechnic type 3643, Germany), Elektroforez aparatı 1200V-500mA E815 (Belgium), Electrophoresis box (Consort N. V. Parklaan 36 B-2300 Turnhout, Belgium), Eppendorf Mastercycler gradient (Netheler Mlnz GmbH, 22331 Hamburg, Germany), UV lambası ve ilgili okuma, kaydetme, fotoğraflama ünitesi (TCP-20-M, Vilber Lourmat, Cedex, France), amonyum asetat,

amonyum klorür, potasyum hidrojen karbonat, sodyum dodesil sülfat (SDS), isopropanol, %70'lik etanol, borik asit, EDTA, bromphenol blue, xylene cyanole, ficoll, agaroz, yüksek rezolüsyonlu agaroz, ethidium bromide, TRIS baz, potasyum asetat, magnesium asetat, TRIS-asetat, DTT (dithiotreitol), deoksinükleotid trifosfat (dNTP) seti (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) (MBI Fermentas, Vilnius, Lithuania), Taq DNA polimeraz (MBI Fermentas, Vilnius, Lithuania), Magnezyum Klorür, 100 bp DNA ve 50 bp DNA step marker'leri (Promega, Madison, WI).

4. 4. Kandan DNA izolasyonu

DNA saflaştırılması Promega firmasından alınan ticari “Wizard Genomic DNA Purification Kit”i ile gerçekleştirildi (Kat. No. : A1125, Madison, WI, USA). Bu kit 300 µL kandan DNA izolasyonu için dizayn edilmiştir. Çalışma esnasında kitin genel kurallarına uymak koşuluyla bazı modifikasyonlar yapıldı. Gerçekleştirilen deney aşamaları aşağıda sıralandığı gibidir:

- 1. 5 ml lik tüplere 900 µL “cell lysis” (hücre parçalama) solusyonu konuldu.
- Alt-üst edilmiş kandan 300 µL alınarak hücre parçalama solusyonunun üzerine ilave edildi, 5-6 defa alt-üst edildi, 10 dak. oda ısısında bekletildi.
- 15. 000 x g de 20 saniye oda ısısında santrifüjlendi.
- Alttaki beyaz kısma zarar vermeden mümkün olduğu ölçüde fazla süpernatant uzaklaştırıldı ve atıldı. Altta hücrelerin üzerinde yaklaşık olarak 10-20 µL sıvı bırakıldı.
- Hücre parçalama solusyonundan 300 µL alınarak çok hafifçe vortekslenmiş hücre çöküntüsünün üzerine eklendi ve 5-6 kez alt-üst edildi. 2-4. basamaklar tekrar edildi. Beyaz hücrelerin arasında hala bazı kırmızı hücreler görülüyorsa bu durumda tekrar hücre parçalama solusyonu eklenerek yukarıdaki deneyler tekrarlandı.
- Beyaz hücreler şiddetle vortekslenerek iyice karışması sağlandı (10-15 saniye).
- Vortekslenmiş hücrelerin üzerine 350 µL “Nuclei lysis” (çekirdek parçalama) solusyonu eklendi. Beyaz hücrelerin parçalanması için solusyon 5-6 kez

pastör pipeti ile pipetlendi ve bırakıldı. Solusyon visköz bir yapı kazandı. Karıştırıldıktan sonra hala hücre kümeleri görünüyorsa 37°C’de inkübe edildi ve kümelerin bozulması beklendi. Kümeler 1 saat sonra hala varsa 100 µL çekirdek parçalama solusyonu eklenerek inkübasyon tekrarlandı.

- Oda ısısına getirilmiş Nükleer lizatın üzerine 120 µL “protein precipitation” (protein çöktürme) solusyonu eklendi. 10-20 saniye şiddetle vortekslenildikten sonra küçük, değişik kahverengi tonlarında protein kümeleri görüldü. Numuneler tam oda ısısına gelmeden protein çöktürme solusyonu eklendiğinde yeterli bir protein çöküntüsü elde edilemeyeceğinden hareketle iyi bir çöktürme için bu ayrıntıya dikkat edildi.

- Oda sıcaklığında 15. 000 x g’de 3 dakika santifüjlendi. Eppendorf tüpün dibinde koyu kahverengi bir protein çöküntüsü görüldü.

- Süpernatant 300 µL izopropanol içeren 1. 5 ml’lik santifüj tüpüne transfer edildi.

- Sürekli alt-üst edilerek ve ters çevrilerek karıştırıldı. Beyaz iplik görünümündeki DNA, görülebilen bir kitle oluncaya kadar bu çevirme işlemine devam edildi. Bazı numunelerde görülebilen kümeler oluşurken diğer bazılarında çok küçük miktarda iplikçik görüldü.

- 1 dakika oda sıcaklığında 15. 000 x g’de santrifüjlendi. DNA, örnekteki lökosit miktarının az veya fazla olmasına göre miktarı değişebilen beyaz bir çöküntü olarak görüldü.

- Süpernatant dökülerek dipte kalan DNA’nın üzerine 300 µL oda sıcaklığındaki %70’lik etanol eklendi. Alt-üst yapılarak DNA pelleti ve tüpün kenarları yıkandı. Yukarıdaki santrifüjleme işlemi tekrarlandı.

- Etanol dikkatlice aspire edildi. Bu aşamada DNA çok gevşektir. Yanlışlıkla pipetlenebileceğinden dikkatli olmak gerekir. Tüpler temiz kurutma kağıtlarının üzerine ağızları alta gelecek şekilde yerleştirildi, böylece fazla etanol alınmış oldu. Sonra 5-10 dakika normal havada kurumaya bırakıldı.

- Kurumuş tüpe 100 µL DNA rehidratasyon solusyonu eklendi. DNA’yı rehidre etmek için 65°C’de 1 saat inkübe edildi. Tüp ara ara çalkalandı.

- DNA 0.5 mL'lik eppendorf tüplere aktararak 2-8°C'de saklandı.

Bu işlemler bittikten sonra eppendorf tüplerde bulunan DNA'nın tahmini miktarını hesaplamak için şu işlem gerçekleştirildi: UV/visible spektrometre 260 ve 280nm'de çift dalga boyu aralığında okuma yapacak şekilde ayarlandı. DNA örneğinden 4 µL alınarak mikro küvette bulunan 746 µL saf suyun üzerine konuldu ve alt-üst yapıldı. Okuma gerçekleştirildi. Daha sonra $\text{ng}/\mu\text{L DNA} = A_{260} \times \text{dilüsyon faktörü} \times 50$ formülünden hareketle örneklerdeki DNA'nın yaklaşık miktarı hesaplandı.

4. 5. Oligonükleotidler (primerler)

Çalışmada kullanılacak olan Primer (Oligonükleotid) Biobasic firmasına (BioBasic, Ontario, Canada) sentezletirildi. PCR deneylerinde kullanılacak olan oligonükleotidler, insan DNA'sı üzerindeki ilgili gen bölgesinin amplifikasyonunu gerçekleştirmek için kullanıldı. Satın alınan primerin nükleotid sekansı tablo 9'da belirtilmiştir.

Tablo 9. PON1 genine ait primer dizileri

PON 192 gen bölgesi için kullanılan primer dizileri
5'-TAT TGT TGC TGT GGG ACC TGA G-3';
5'-CAC GCT AAA CCC AAA TAC ATC TC-3'.
PON 55 gen bölgesi için kullanılan primer dizileri
5'-GAA GAG TGA TGT ATA GCC CCA G-3'
5'-TTT AAT CCA GAG CTA ATG AAA GCC -3'

4. 6. PCR ile PON1 192 gen polimorfizmlerinin saptanması

Genomik DNA örneklerinde PON1 192 lokusuna ait aleller polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile çoğaltıldı. DNA örneklerinin her birinin amplifikasyonu için toplam 25 µl'lik PCR karışımı hazırlandı. Bu PCR karışımı 100-200 ng DNA, her bir primerden 0.5µl, 0.2mM dNTP, 1.5mM MgCl₂ ve 1.0 U Taq DNA Polimeraz

olacak şekilde hazırlandı Amplifikasyon reaksiyonları Mini Thermal Cycler'da aşağıda belirtilen şekilde gerçekleştirildi.

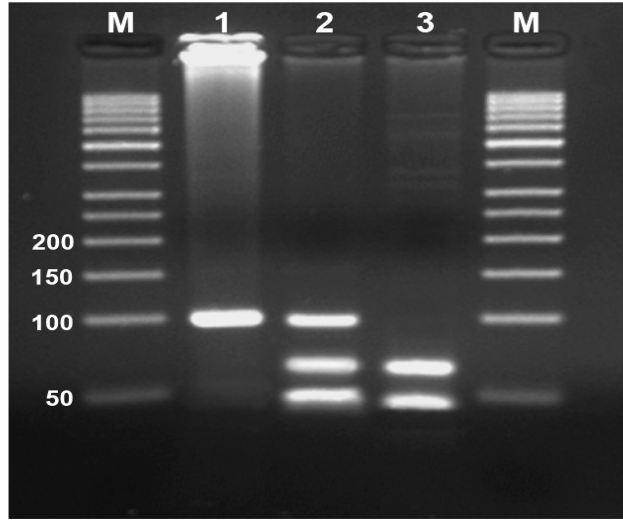
PON1 192 polimorfimine ait amplifikasyon koşulu:

94 0C de 5 dakika başlangıç denatürasyonu,

95 0C de 1 dakika denatürasyon,

60 0C de 1 dakika bağlanma

72 0C de 1 dakika uzama olmak üzere 35 döngüden oluşan bir PCR programı kullanıldı. PCR ürünleri Alw1 restriksiyon endonükleaz ile kesilmiş ve % 2 lik agaroz jel elektroforezine tabi tutulmuştur. DNA fragmanları etidyum bromid ile boyandıktan sonra UV altında görüntülenip genotipleme yapılmıştır. Şekil 1'de görüldüğü gibi A alleli 99 bp, B alleli 69 ve 30 bp de bant vermektedir.



Şekil 1. Paraoksana PON1 192 polimorfizmine ait Alw1 enzimi ile kesilen PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü. 1. birey QQ genotipi, 2. birey QR ve 3. birey RR genotipi. Q alleli 99 bç, R alleli 69 ve 30 bç. M: 50 bç DNA boyut markırı.

4. 7. PCR ile paraoksonaz-1 (PON1) 55 gen polimorfizmlerinin saptanması

Bireylere ait genomik DNA örneklerinde PON1 55 lokusuna ait aleller polimeraz zincirleme reaksiyonu (PCR) ile çoğaltıldı. PCR karışımı 100-200 ng DNA, herbir primerden 0. 5µl, 0. 1mM dNTP, 1. 5mM MgCl₂ ve 1. 0 U Taq DNA Polimeraz olacak şekilde hazırlandı. Amplifikasyon reaksiyonları Mini Thermal Cyclers'da aşağıda belirtilen şekilde gerçekleştirildi.

PON1 55 polimorfimine ait amplifikasyon koşulu:

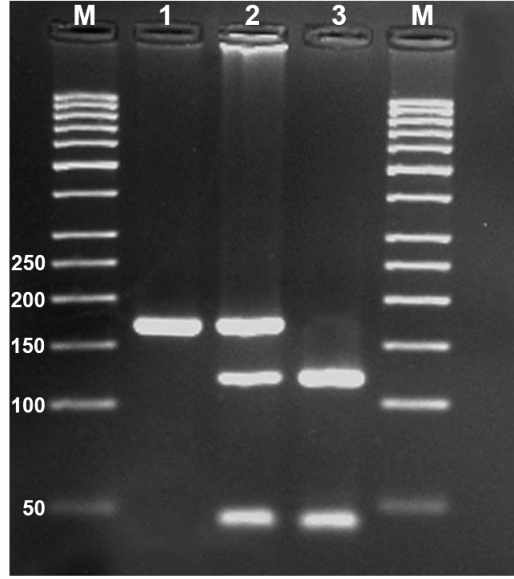
94 0C de 2 dakika başlangıç denatürasyonu,

94 0C de 1 dakika denatürasyon,

60 0C de 1 dakika bağlanma

72 0C de 1 dakika uzama olmak üzere 35 döngüden oluşan bir PCR programı kullanıldı.

PCR ile çoğaltılan PON1 55 lokusuna ait fragman Hsp192II restriksiyon endonükleaz ile kesilmiş ve daha sonra % 2 lik agaroz jel elektroforezine tabi tutulmuştur. DNA fragmanları etidyum bromid ile boyandıktan sonra UV altında görüntülenip ve genotipleme yapılmıştır. Şekil 5'de görüldüğü gibi L aleli 170 bp, M alleli 126 ve 44 bp da bant vermektedir.



Şekil 2. Paraoksanaz PON1 55 polimorfizmine ait Hsp92II enzimi ile kesilen PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü. 1. birey LL genotipi, 2. birey LM ve 3. birey MM genotipi. L alleli 170 bç, M alleli 126 ve 44 bç. M: 50 bç DNA boyut markırı.

4. 8. İstatistiksel analizler

Genetik dağılımın Hardy-Weinberg dengesine uyumu X^2 goodness-of-fit testi ile analiz edildi. Hastalar ve kontroller arasındaki genotipik dağılımların farklılıkları Ki-kare testi ile değerlendirildi. Kontrol ve hastalar arasındaki allelik dağılım farklılıkları Fisher's exact test ile değerlendirildi. P değerinin <0.05 olması istatistiksel açıdan anlamlı olarak kabul edildi. Bütün istatistiksel testler "SPSS[®] for Windows computing program, Version 12. 0" ile gerçekleştirildi.

5. BULGULAR

Çalışmaya 60 adet berrak hücreli RHK'li hasta 60 adet kontrol alındı. Hastaların yaşı 32 ile 82 arasında değişmekteydi. Ortalama hasta yaşı 58. 42 olarak hesaplandı. Yalnızca bir hastada bilateral berrak hücreli RHK mevcuttu. Hasta ve kontrol grubunun demografik özellikleri tablo 10'da verilmiştir.

Tablo 10. Hastaların ve kontrol grubunu oluşturan sağlıklı bireylerin demografik verileri (Sonuçlar ortalama \pm standart sapma olarak verilmiştir).

	Klasik tip renal hücreli kanser	Kontrol
N	60	60
Yaş	60. 42 \pm 12. 8	58. 96 \pm 11. 71
Cinsiyet	38E / 22K	36E /24 K

Değerlendirmeye alınan hastaların hepsi TNM sistemine göre evrelendirilmiştir. hastalardan evre I-II olanlar erken evre; III ve IV olanlar ileri evre olarak grublandırılmışlardır (tablo 11).

Tablo 11. Evrelere göre hasta sayıları ve yüzdeleri

	Erken evre		İleri evre	
Evre	Evre I	Evre II	Evre III	Evre IV
Hasta sayısı ve yüzdeleri	24(%40. 0)	14 (%23. 3)	12(16. 6)	10(%20)

Çalışmamıza dahil edilen klasik tip RHK'li hastaların ve kontrol grubunun genotip dağılımları ayrıca Q ve R allel dağılımları sayı ve yüzde olarak tablo 12'de özetlenmiştir.

Tablo 12. PON1 geni Q192R polimorfizminin genotip ve allel varyant dağılımı

	n	QQ	QR	RR	n	Q allel dağılımı	R allel dağılımı
RHK Hasta	60	38(%63.3)	21(%35.5)	1(%1.7)	120	97(%80.8)	23(%19.2)
kontrol	60	27(%45.0)	27(%45.0)	6(%10.0)	120	81(%67.5)	39(%32.5)
P değr.			P=0.045				P=0.013

Çalışmamızda hasta ve kontrol Hardy Weinberg'e uygundur. Çalışmamız sonucunda PON-1 geni Q192R polimorfizminin genotip dağılımı elde edilmiştir. Bizim sonuçlarımıza göre hasta grubunda QQ genotipi 38(%63.3) en yoğun olup onu QR genotipi 21(%35.5) takip etmekteydi. En az olan RR genotipi yalnızca 1(%1.7) hastada görülmüştür. Kontrol grubunda ise QQ ve QR genotipleri eşit sayıda 27(%45) görülmüştür. RR genotipi 6(%10) hastada görülmüştür. Yapılan istatistiksel analizde genotip dağılımları arasında anlamlı farklılık (P=0.045) bulunmuştur.

Hasta grubu allel varyantı açısından incelendiğinde Q alleli 97(%80.8) ve R alleli 23(%19.2) olarak bulunmuştur. Kontrol grubunun Q alleli 81(%67.5) R alleli 39(%32.5) bulunmuştur. Allel dağılımları açısından incelendiğinde hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı farklılık (P=0.013) görülmüştür.

Çalışmamızda PON1 geni L55M polimorfizmi için elde edilen LL, LM ve MM genotiplerinin sayı ve yüzdeleri ve L alleli ile M alleli dağılımları Tablo 13'de özetlenmiştir.

Tablo 13. PON1 geni L55M polimorfizminin genotip ve allel varyant dağılımı

	LL	LM	MM		L allel	M allel	
	n			n	dağılımı	dağılımı	
RHK Hasta	60	29(%48.3)	25(%41.7)	6(%10.0)	120	83(%69.2)	37(%30.8)
kontrol	60	21(%35.0)	29(48.3)	10(%16.7)	120	71(%59.2)	49(%40.8)
P değeri		P=0.276				P=0.069	

PON-1 geni L55M polimorfizmi için yaptığımız çalışmada LL genotipi 29(%48.3), LM genotipi 25(%41.7) ve MM genotipi 6(%10.0) hasta da görüldü. Kontrol grubunda LL genotipi 21(%35.0) LM genotipi 29(48.3) ve MM genotipi 10(%16.7) kişide görülmüştür. PON-1 geni L55M polimorfizmi için hasta ve kontrol grubu arasında istatistiki olarak anlamlı fark bulunmamıştır(p=276).

Hasta grubunda L allel sayısının 83(%69.2) ve M allel sayısının 37(%30.8) olduğu görüldü. Kontrol grubunda ise L alleli 71(%59.2) ve M alleli 49(%40.8) olarak belirlendi. Allel dağılımı açısından rakamsal olarak fark bulunsa da bu fark istatistiki olarak anlamlı bulunmadı(P=0.069)

Hasta grubunda ileri evre ve düşük evre arasında PON-1 geni Q192R polimorfizmi açısından anlamlı fark gösterilemedi (P=0.286). Aynı şekilde bu farklılık L55M içinde herhangi bir fark söz konusu değildi(P=0.374).

6. TARTIŞMA

Süperoksit radikallerinin üretimi ile antioksidan savunma sistemi arasındaki dengenin SOR üretimi lehine artması ile meydana gelen oksidatif stres DNA üzerinde toksik etkiler ve lipid peroksidasyonuna bağlı doku zedelenmesi oluşturmaktadır. Artmış oksidatif stres başta kanser olmak üzere katarakt, ateroskleroz, neoplastik hastalıklar, diyabet, diyabetik retinopati, gastrointestinal sistemin kronik inflamatuvar hastalıkları, cilt yaşlanması, Alzheimer hastalığı ve diğer nörolojik bozuklukları kapsayan bir takım rahatsızlıkların patofizyolojisinde rol almaktadır (88, 152).

Serbest radikaller biyolojik sistemlerde sürekli olarak üretilmektedir. Bunların etkileri Vitamin C, glutatyon, Vitamin E, glutatyon peroksidaz, katalaz, süperoksit dismutaz gibi enzimatik ve nonenzimatik antioksidan savunma sistemleri ile ortadan kaldırılmaktadır. Antioksidan savunma sisteminde ve onarım kapasitesinde azalma sonucu SOR üretimi artmakta ve buna bağlı olarak doku hasarı meydana gelmektedir (153).

Renal hücreli kanserin etyolojisi tam olarak aydınlatılamamasına rağmen oluşumunda diğer kanserlerde olduğu gibi oksidatif stres etkili olmaktadır. RHK'de antioksidan enzimlerle ilgili yapılan bir çalışmada katalaz, selenyum bağımlı ve bağımsız glutatyon peroksidaz enzimlerinin düşük olduğu gösterilmiştir (154). Yapılan başka bir çalışmada RHK'li dokularda normal dokulara göre sitoplazmik süperoksit dismutaz ve glutatyon peroksidaz aktivitesinin düşük olduğu gösterilmiştir (155). Ayrıca lipid peroksidasyonun RHK ile ilişkili olduğunu bildiren yayınlar da mevcuttur (9, 156).

İnsanlarda karaciğerde sentez edilen PON1, parationun aktif metaboliti paraoksonu hidroliz etme yeteneğine sahip bir serum esterazdır. İnsan serum PON1'i fiziksel olarak HDL ile bağlantılıdır (113, 120). PON1'in fizyolojik rolü tam olarak bilinmemekle birlikte lipid peroksitlerini hidrolize ederek LDL'yi oksidasyondan korumaktadır. Ayrıca organofosfatlar gibi toksik ajanların oluşturabileceği hücrel hasara karşı önemli koruyuculuk görevi yapar (120).

Paraoksonaz enziminin LDL oksidasyonunu önleyerek antioksidan etki olduğunun gösterilmesi ile patogenezinde oksidatif stres olan bir çok hastalıkla ilişkili olabileceği düşünülmüştür. Bununla birlikte serum PON1 seviyesi ile kanser arasındaki ilişki hala tam olarak bilinmemektedir. Ancak Akcay ve arkadaşları yaptıkları iki farklı çalışmada pankreas ve mide kanserli hastalarda PON1 ile plazma lipoproteinleri arasındaki ilişkiyi incelenmiştir. İlk çalışmada 20 pankreas kanseri tanısını alan hastalar ile aynı yaş-cinsiyette 20 sağlıklı kontrol grubu karşılaştırılmış ve pankreas kanserli hastalarda HDL ve PON-1 seviyelerinin kontrol grubundan düşük olduğu gösterilmiştir. Diğer çalışmada mide kanseri tanısını alan hastalar ile kontrol grubu karşılaştırıldığında aynı sonuçlar elde edilmiştir. İki çalışmanın sonucuna göre pankreas ve mide kanserli hastalar ile sağlıklı kontrol grubu karşılaştırıldığında kanserli hastalarda HDL ve PON1 seviyelerinin daha düşük olduğu gösterilmiştir (146, 147).

Akciğer kanserli hastalarda PON enzim aktivitesi araştırılmış ve akciğer kanserli hastalarda enzim aktivitesinin önemli derecede düşük olduğu gösterilmiştir (148).

Bütün bu çalışmalar PON1 enziminin antioksidan etkisiyle kanserden koruyucu olabileceğini düşündürmektedir. Ancak henüz literatürde paraoksonaz enzimi ile RHK arasında ki ilişkiyi inceleyen bir çalışma mevcut değildir.

PON1 aktivitesi bireyler ve toplumlar arasında farklılıklar göstermektedir. Bu farklılığın nedeni genetik polimorfizmleridir. PON1 Q192R ve L55M polimorfizmlere ek olarak PON1 promotör alanında beş adet polimorfizm daha rapor edilmiştir.

Bu polimorfizmler sonucunda oluşan paraoksonaz enziminin aktivitesinde farklılıklar olduğu bildirilmiştir. Mackness ve ark yaptığı çalışmada bu iki polimorfizme bağlı olarak paraoksonaz aktivitesinde önemli farklılıklar gösterilmiştir. Bu çalışma sonucunda QQ genotipi en düşük, QR genotip orta derecede, RR tipi ise en yüksek derecede enzim aktivitesi göstermiştir. Aynı şekilde MM homozigot genotipi ML ve LL genotipleriyle karşılaştırıldığında da daha düşük enzim aktivitesi göstermiştir. En düşük enzim aktivitesi QQ ve MM genotipinde görülmüştür (133). Bu polimorfizmlerin enzim aktivitesinde değişiklik yaptığı keşfedildikten sonra bu polimorfizmlerle kanserler arasında ilişki olabileceği ve bazı genotiplerin kansere yatkınlık oluşturabileceği düşünülmüştür.

Prostat kanserinde yapılan polimorfizm çalışmasında PON1 192/QR ve PON1 55LM/MM genotiplerinin artmış prostat kanseri riskiyle birlikte olduğu gösterilmiştir (150). Ancak kolorektal kanserde yapılan bir çalışmada PON-1 Q192R ve L55M polimorfizmleri değerlendirilmiş ve herhangi bir farklılık gösterilememiştir (151).

Bizim yaptığımız çalışmaya göre RHK grubu ile kontrol grubu arasında PON1 Q192R polimorfizmi açısından anlamlı fark bulunmuştur ($P=0.045$). Hasta grubunda özellikle düşük enzim aktivitesi ile birlikte olduğu bildirilen QQ genotipi daha fazla görülmektedir. Hasta grubunda yalnızca bir adet RR genotipi bulunurken, kontrol grubunda 6 adet RR genotipi mevcuttu. Ayrıca RHK grubu ile kontrol grubu Q ve R allelleri açısından karşılaştırıldığında da anlamlı farklılık mevcuttu ($P=0.013$). Q alleli hasta grubunda kontrol grubundan daha fazla iken R alleli kontrol grubunda hasta

grubundan daha fazla bulundu. Bütün bu bulgular Q allelinin RHK için risk oluşturabileceğini ve R allelinin koruyucu etkisinin olabileceğini düşündürmektedir. Daha önceki çalışmalarda QQ genotipinin düşük aktiviteye RR genotipinin yüksek aktiviteye sahip olduğunun gösterilmesi (133) RHK ile PON1 aktivitesinin ilişkili olabileceğini düşündürmüştür.

Çalışmamızda L55M polimorfizmi için hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı fark gösterilememiştir ($P=0.276$). Aynı şekilde hasta ve kontrol grubu L ve M alleleri bakımından karşılaştırıldığında anlamlı farklılık bulunamamıştır ($P=0.069$). Bizim çalışmamıza göre L55M polimorfizmleri ile RHK arasında ilişki bulunmamaktadır. Ancak literatürde L55M polimorfizminde Q192R polimorfizmindeki gibi enzim aktivitesinin değiştiği bildirilmektedir (133). Bu açıdan bakıldığında bu polimorfizm içinde gruplar arasında farklılık beklenebilir. Bunun nedeni bizim çalışmamızda ki hasta grubunun az olması olabilir. Bu sebeple bu çalışmanın daha geniş hasta grubunda tekrarlanması uygun olacaktır.

Bu çalışmada RHK ile kontrol grubu arasında PON1 Q192R polimorfizmi için farklılık olduğunu ve hasta grubunda Q allelinin kontrole göre daha yüksek R allelinin ise daha düşük oranda olduğu gösterildi. Kontrol grubunda ise R alleli yoğunluğu daha yüksek bulundu. Bütün bu bulgular R allelinin RHK için koruyucu olduğunu düşündürmektedir. Ancak bu bulgunun daha geniş bir hasta grubunda enzim aktiviteleri de eklenerek desteklenmesiyle PON1 ile RHK arasındaki ilişkiyi daha iyi anlamamıza katkı sağlayacaktır.

7. KAYNAKLAR

1. Connolly JL, Schnitt SJ, Wang HH, Longtine JA, Dvorak A, Dvorak HF. Principles of Cancer Pathology. In Kufe DW, Pollock RE, Weichselbaum RR et al. (eds): Cancer Medicine, London: Hamilton-BC Decker 2003; 487-502.
2. Jemal A, Tiwari RC, Murray T, Ghafoor A, Samuels A, Ward E et al. Cancer statistics, 2004. CA Cancer J Clin 2004; 54: 8-29.
3. Rosenberg B, VanCamp L, Trosko JE, Mansour VH. Platinum compounds: a new class of potent antitumour agents. Nature 1969; 222: 385-386.
4. Gutteridge JM. Free radicals in disease processes: a compilation of cause and consequence. Free Radic Res Commun 1993;19:141-158.
5. Borek C. Free-radical processes in multistage carcinogenesis. Free Radic Res Commun 1991; 12- 13 Pt 2: 745-750.
6. Khanzode SS, Muddeshwar MG, Khanzode SD, Dakhale GN. Antioxidant enzymes and lipid peroxidation in different stages of breast cancer. Free Radic Res 2004; 38: 81-85.
7. Borek C, Ong A, Mason H, Donahue L, Biaglow JE. Selenium and vitamin E inhibit radiogenic and chemically induced transformation in vitro via different mechanisms. Proc Natl Acad Sci U S A 1986; 83: 1490-1494.
8. Toyokuni S, Okamoto K, Yodoi J, Hiai H. Persistent oxidative stress in cancer. FEBS Lett. 1999; 358: 1-3.
9. Gago-Dominguez M, Castelao JE Lipid peroxidation and renal cell carcinoma: further supportive evidence and new mechanistic insights. Free Radic Biol Med. 2006; 40: 721-733
10. Mackness MI, Arrol S, Durrington PN. Paraoxonase prevents accumulation of lipoperoxides in low-density lipoprotein. FEBS Lett 1991; 286: 152-154.
11. Blatter MC, James RW, Messmer S, Barja F, Pometta D. Identification of a distinct human highdensity lipoprotein subspecies defined by a lipoprotein-

- associated protein, K-45. Identity of K-45 with paraoxonase. *Eur J Biochem* 1993; 211: 871-879.
12. Humbert R, Adler DA, Disteché CM, Hassett C, Omiecinski CJ, Furlong CE. The molecular basis of the human serum paraoxonase activity polymorphism. *Nat Genet* 1993; 3: 73-76.
 13. Mackness B, Durrington PN, Mackness MI. Human serum paraoxonase. *Gen Pharmacol* 1998; 31: 329-336.
 14. Landis SH, Murray T, Bolden S, Wingo PA. Cancer statistics, 1999. *CA Cancer J Clin.* 1999; 49: 8-31.
 15. Chow WH, Devesa SS, Warren JL, Fraumeni JF Jr. Rising incidence of renal cell cancer in the United States. *JAMA.* 1999; 281: 1628-1631.
 16. Lindblad P. Epidemiology of renal cell carcinoma. *Scand J Sur*2004; 93: 88-96.
 17. Ljungberg B, Hanbury DC, Kuczyk MA, Merseburger AS, Mulders PF, Patard JJ, Sinescu IC; European Association of Urology Guideline Group for renal cell carcinoma. Renal cell carcinoma guideline. *Eur Urol.* 2007; 51: 1502-1510.
 18. Konnak JW, Grossman HB. Renal cell carcinoma as an incidental finding. *J Urol.* 1985;134: 1094-1096.
 19. Murphy WM, Beckwith JC, Farrow GM. Normal Anatomy. In: Rosai J, Sobin LH, editor. *Tumors of the kidney, bladder and related urinary structures.* AFIP; 1994: 1-11.
 20. Ordonez NG, Rosai J. Renal Cell Carcinoma. In: Rosai J, editor. *Surgical Pathology* 9th ed. Mosby; 2004: 1251-1263.
 21. La Vecchia C, Negri E, D'Avanzo B, Franceschi S. Smoking and renal cell carcinoma. *Cancer Res.* 1990; 50: 5231-5233.
 22. McLaughlin JK, Lindblad P, Mellemegaard A, McCredie M, Mandel JS, Schlehöfer B, Pommer W, Adami HO. International renal-cell cancer study. I. Tobacco use. *Int J Cancer.* 1995 ; 60: 194-198.

23. Muscat JE, Hoffmann D, Wynder EL The epidemiology of renal cell carcinoma. A second look. *Cancer*. 1995; 75: 2552-2557.
24. Yuan JM, Castelao JE, Gago-Dominguez M, Ross RK, Yu MC. Hypertension, obesity and their medications in relation to renal cell carcinoma *Br J Cancer*. 1998; 77: 1508-1513.
25. Yu MC, Mack TM, Hanisch R, Cicioni C, Henderson BE. Cigarette smoking, obesity, diuretic use, and coffee consumption as risk factors for renal cell carcinoma. *J Natl Cancer Inst*. 1986; 77: 351-356.
26. Kolonel LN. Association of cadmium with renal cancer. *Cancer*. 1976; 37: 1782-1787.
27. Laber DA. Risk factors, classification, and staging of renal cell cancer. *Med Oncol*. 2006; 23: 443-54.
28. Kantor AF. Current concepts in the epidemiology and etiology of primary renal cell carcinoma. *J Urol*. 1977 ; 117: 415-417.
29. Linehan WM, Lerman MI, Zbar B: Identification of the Von Hippel Lindau(VHL) gene: Its role in renal cancer. *JAMA* 1995; 273: 564-570.
30. Zbar B: Von Hippel Lindau disease and sporadic renal cell carcinoma. *Cancer Surv*. 1995; 25: 219-232.
31. Skolarus TA, Serrano MF, Berger DA, Bullock TL, Yan Y, Humphrey PA, Kibel AS. The distribution of histological subtypes of renal tumors by decade of life using the 2004 WHO classification. *J Urol*. 2008; 179(2): 439-44.
32. Oyasu RM: Renal cancer: Histologic classification update. *Int. J. Clin. Oncol*. 1998; 3: 125-133.
33. Eble JN, Togashi K, Pisani P. Renal Cell Carcinoma. In: Eble JN, Sauter G, Epstein JI, Sesterhenn IA, editor. *World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and genetics of Tumours of the urinary system and male genital organs* IARC Press; 2004. 9-87.
34. Eble JN. Renal Neoplasia. In: Weidner N, Cote RJ, Suster S, Weiss LM, editor. *Modern Surgical Pathology* 1st ed. Saunders; 2003: 1065-1101.

35. Reuter VE, Tickos SK. Adult Renal Tumors. In: Carter D, Greenson JK, Oberman HA, Reuter VE, Staler MH, editor. Sternberg Surgical Pathology 4th ed. LWW; 2004: 1955- 2000.
36. Farrow GM: diseases of kidney. In murphy WM ed. urological pathology, 2nd ed. Philadelphia WB sunders 1997: 440-470
37. Whang M, O'Toole K, Bixon R, Brunetti J, Ikeguchi E, Olsson CA, Sawczuk TS, Benson MC. The incidence of multifocal renal cell carcinoma in patients who are candidates for partial nephrectomy. J Urol. 1995; 154: 968-971
38. Campbell SC. Advances in angiogenesis research: relevance to urological oncology. J Urol. 1997; 158: 1663-1674.
39. Storkel S, Ebie JN, Adlakha K, et al: Classification of renal cell carcinoma: Workgroup no. 1 Union Internationale Contre le Cancer (UICC) and the American Joint Committee on Cancer (AJCc). Cancer 1997; 80: 987-989.
40. Eble JN, Sauter G, Epstein JI, Sesterhenn IA, eds. Pathology and genetics of tumours of the urinary system and male genital organs. Lyon, France: IARC Press, 2004:276-288
41. Clifford SC, Prowse AH, Affara NA, Buys CH, Maher ER. Inactivation of the von Hippel-Lindau (VHL) tumour suppressor gene and allelic losses at chromosome arm 3p in primary renal cell carcinoma: evidence for a VHL-independent pathway in clear cell renal tumourigenesis. Genes Chromosomes Cancer. 1998; 22: 200-209.
42. Oyasu RM: Renal cancer: Histologic classification update. Int. J. Clin. Oncol. 1998; 3: 125-133.
43. Amin MB, Corless CL, Renshaw AA, Tickoo SK, Kubus J, Schultz DS. Papillary (chromophil) renal cell carcinoma: histomorphologic characteristics and evaluation of conventional pathologic prognostic parameters in 62 cases. Am J Surg Pathol. 1997; 21: 621-35.
44. Davis CJ Jr, Mostofi FK, Sesterhenn IA. Renal medullary carcinoma. The seventh sickle cell nephropathy. Am J Surg Pathol. 1995; 19: 1-11.

45. Schefft P, Novick AC, Straffon RA, Stewart BH: Surgery for renal cell carcinoma extending into the inferior vena cava. *J Urol* 1978; 120: 28-31.
46. Estig D, Ahlering TE, Lieskovsky G, et al: Experience with fossa recurrence of renal cell carcinoma. *J Urol*, 1992; 147: 1491-1496
47. Gelister JSK, Falzon M, Crawford R, Chapple CR, et al: Urinary tract metastasis from renal carcinoma. *Br J Urol* 1992; 69: 250-254
48. Williams R. D: Renal, perirenal and ureteral neoplasms. In *Adult and Pediatric J. Urology*. Edited by J. Y. Gillenwater, J. T. Grayhack, S. S. Howards, J. W. Ducked. Chicago-London-Boca Raton. Yearbook Medical Publishers inc: Vol. 1, chapt 16, 1998: 513-554.
49. Robson CJ, Churchill BM, Anderson W: The results of radical nephrectomy for renal cell carcinoma. *J Urol* 1969; 101: 297.
50. Ljungberg B, Hanbury DC, Kuczyk MA, Merseburger AS, Mulders PF, Patard JJ, Sinescu IC; European Association of Urology Guideline Group for renal cell carcinoma. Renal cell carcinoma guideline. *Eur Urol*. 2007; 51: 1502-1510.
51. Gold PJ, Fefer A, Thompson JA Paraneoplastic manifestations of renal cell carcinoma. *Semin Urol Oncol*. 1996; 14: 216-22.
52. Sufrin G, Chasan S, Golio A, Murphy GP. Paraneoplastic and serologic syndromes of renal adenocarcinoma. *Semin Urol*. 1989; 7: 158-171.
53. Weiss LM, GeIb AB, Medeiros LJ: Adult renal epithelial neoplasms. *Am J Clin Pathol* 1995; 103: 624-635.
54. Bechtod RE, Zagoria RI: Imaging approach to staging of renal cell carcinoma. *Urol Clin North Am* 1997; 24: 507-522.
55. Hricak H. Demas BE, Williams RD, McNamara ML Hedgcock MW, Amparo EG. Tanagho EA: Magnetic resonance imaging in the diagnosis and staging of renal and perirenal neoplasms. *Radiology* 1985; 154: 709-715.

56. Goldfarb DA, Navick AC, Long R et al: Magnetic resonance imaging for assessment of vena caval tumor thrombi: A comparative study with venacavography and computerized tomography scanning. *J Urol* 1990; 144: 1100-1104.
57. Kallman DA, King BF, Hattery RR, et al: Renal vein and inferior vena cava tumor thrombus in renal cell carcinoma: CT, US, MRI, and venacavography. *J Comput Assist Tomogr* 1992; 16: 240-247.
58. Choyke PL: Detection and staging of renal cancer. *Magn. Reson. Imaging Clin N Am* 1997; 5: 29-47.
59. Sagalowsky AI, Kadesky KT, Ewalt DM, Kennedy TJ. Factors influencing adrenal metastasis in renal cell carcinoma. *J Urol.* 1994 ; 151: 1181-1184.
60. Sandock DS, Seftel AD, Resnick MI. Adrenal metastases from renal cell carcinoma: role of ipsilateral adrenalectomy and definition of stage. *Urology.* 1997; 49: 28-31.
61. Blom JHM, Van Poppel H, Marechal JM et al: Radical nephrectomy with and without lymph node dissection: preliminary results of the EORTC randomised phase 3 protocol 30881. *Eur. Urol.* 1999; 36: 570-575.
62. Ono Y, Kinukawa T, Hattori R, Yamada S, Nishiyama N, Mizutani K, Ohshima S: Laparoscopic radical nephrectomy for renal cell carcinoma: a five-year experience. *Urology.* 1999; 53: 280-286.
63. Chan DY, Cadeddu JA, Jarrett TW, Marshall FF, Kavoussi LR: Laparoscopic radical nephrectomy: cancer control for renal cell carcinoma. *J Urol.* 2001; 166(6): 2095-2099.
64. Novick A, Campbell S, Walsh P, Retik A, Vaughn E. D. Vine A. *et al.*, in: (Eds.), *Campbell's Urology*, Ed. 8, WB Saunders, Philadelphia, USA, 2002: 2672-2731
65. Lewin JS, Nour SG, Connell CF, Sulman A, Duerk JL. Resnick Mi. Haaga JR: Phase 2 clinical trial of interactive MR imaging-guided interstitial

radiofrequency thermal ablation of primary kidney tumors: initial experience. *Radiology* 2004; 232: 835-845.

66. Gill IS, Remer EM, Hasan WA, Strzempkowski B, Spaliviero M, Steinberg AP, Kaouk JH, Desai MM, Novick AC: Renal cryoablation: outcome at 3 years. *J Urol* 2005; 173: 1903-1907.
67. Lin CH, Moinzadeh A, Ramani Ap, Gill IS: Histopathologic confirmation of complete cancer-cell kill in excised specimens after renal cryotherapy. *Urology* 2004; 64: 590-596.
68. Mickisch GH, Garin A, Van Poppel H, de Prijck L, Sylvester R: European Organisation for Research and Treatment of Cancer (EORTC) Genitourinary Group. Radical nephrectomy plus interferon-alfa-based immunotherapy compared with interferon alfa alone in metastatic renal cell carcinoma: a randomised trial. *Lancet*. 2001; 358: 966-970.
69. Tongaonkar HB, Kulkarni JN, Kamat MR: Solitary metastases from renal cell carcinoma: a review. *J Surg Oncol* 1992; 49: 45-48.
70. Van der Poel HG, Roukema JA, Horenblas S, Van Geel AN, Debruyne FM: Metastasectomy in renal cell carcinoma: a multicenter retrospective analysis. *Eur Urol* 1999; 35: 197-203.
71. Fossa SO, Kjolseth I, Lund G: Radiotherapy of metastases from renal cancer. *Eur Urol* 1982; 8: 340-342.
72. Gez E, Libes M, Bar-Deroma R, Rubinov R, Stein M, Kuten A: Postoperative irradiation in localized renal cell carcinoma: the Rambam Medical Center experience. *Tumori* 2002; 88: 500-502.
73. Stadler WM, Huo D, George C, Yang X, Ryan CW, Karrison T, Zimmerman TM, Vogelzang NJ: Prognostic factors for survival with gemcitabine plus 5-fluorouracil based regimens for metastatic renal cancer. *J Urol* 2003; 170: 141-145.
74. Sarna G, Figlin R de Kernion: Interferon in renal cell carcinoma. The UCLA experience. *J. Cancer*. 1987; 59: 610-612.

75. Muss HB, Costanzi JJ, Leavitt R, Williams RD, Kempf RA, Pollard R, Ozer H, Zekan PJ, Grunberg SM, Mitchell MS, et al: Recombinant alfa interferon in renal cell carcinoma: a randomized trial of two routes of administration. *J Clin Oncol.* 1987; 5: 286-291.
76. Medical Research Council Renal Cancer Collaborators. Interferonalpha and survival in metastatic renal carcinoma: Early results of a randomised controlled trial. *Medical Research Council Renal Cancer Collaborators. Lancet* 1999; 353: 14-17.
77. Ravaud A, Wallerand H, Culine S, Bernhard JC, Fergelot P, Bensalah K, Patard JJ. Update on the medical treatment of metastatic renal cell carcinoma. *Eur Urol.* 2008 54:315-325.
78. Motzer RJ, Rini BI, Bukowski RM, et al. Sunitinib in patients with metastatic renal cell carcinoma. *JAMA* 2006;295:2516–2524.
79. Motzer RJ, Michaelson MD, Redman BG, et al. Activity of SU11248, a multitargeted inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor and platelet-derived growth factor receptor, in patients with metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2006;24:16–24.
80. Motzer RJ, Hutson TE, Tomczak P, et al. Sunitinib versus interferon alfa in metastatic renal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 2007;356:115–124.
81. de Mulder PHM, Patard JJ, Szczylik C, et al: Currentstatus of targeted therapy in metastatic renal cell carcinoma. *Eur Urol (Suppl).* 6: 665-671, 2007.
82. Ratain MJ, Eisen T, Stadler WM, et al: Phase II placebo controlled randomized discontinuation trial of sorafenib in patients with metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol.* 24: 2505-12, 2006.
83. Escudier B, Eisen T, Stadler WM, et al: Sorafenib in advanced clear cell renal cell carcinoma. *N Engl J Med.* 356: 125-134, 2007.
84. Escudier B, Pluzanska A, Koralewski P, et al. Bevacizumab plus interferon alfa-2a for treatment of metastatic renal cell carcinoma: a randomized, double-blind phase III trial. *Lancet* 2007;370:2103–11.

85. Rini BI, Halabi S, Rosenberg JE, et al. CALGB 90206: A phase III trial of bevacizumab plus interferon-alpha versus interferon-alpha monotherapy in metastatic renal cell carcinoma. ASCO GU 2008.
86. Rini B, Rixe O, Bukowski R, et al. AG-013736, a multi-target tyrosine kinase receptor inhibitor, demonstrates anti-tumor activity in a Phase 2 study of cytokine-refractory, metastatic renal cell cancer (RCC). *J Clin Oncol* 2005;23:4509.
87. McCord JM. Human disease, free radicals, and the oxidant/antioxidant balance. *Clin Biochem* 1993; 26: 351-357.
88. Clarkson PM, Thompson HS. Antioxidants: what role do they play in physical activity and health? *Am J Clin Nutr* 2000; 72: 637-646.
89. Halliwell B. Oxidative stress, nutrition and health. Experimental strategies for optimization of nutritional antioxidant intake in humans. *Free Radic Res* 1996; 25: 57-74.
90. Nakazawa H, Genka C, Fujishima M. Pathological aspects of active oxygens/free radicals. *Jpn J Physiol* 1996; 46: 15-32.
91. Kang DH. Oxidative stress, DNA damage, and breast cancer. *AACN Clin Issues* 2002; 13: 540-549.
92. Jackson AL, Loeb LA. The contribution of endogenous sources of DNA damage to the multiple mutations in cancer. *Mutat Res* 2001; 477: 7-21.
93. Behrend L, Henderson G, Zwacka RM. Reactive oxygen species in oncogenic transformation. *Biochem Soc Trans* 2003; 31: 1441-1444.
94. Schuyer M, Berns EM. Is TP53 dysfunction required for BRCA1-associated carcinogenesis? *Mol Cell Endocrinol* 1999; 155: 143-152.
95. Maki A, Berezsky IK, Fargnoli J, Holbrook NJ, Trump BF. Role of $[Ca^{2+}]_i$ in induction of c-fos, c-jun, and c-myc mRNA in rat PTE after oxidative stress. *Faseb J* 1992; 6: 919-924.
96. Uysal M. Serbest radikaller, lipid peroksitleri ve organizmada prooksidan-antioksidan dengeyi etkileyen kosullar. *Klinik Gelisim* 1998; II: 336-341.

97. Kavas G. Serbest radikaller ve organizma üzerine etkileri. Türkiye Klinikleri Fizyoloji 1989; 9: 1-8.
98. Sander CS, Chang H, Hamm F, Elsner P, Thiele JJ. Role of oxidative stress and the antioxidant network in cutaneous carcinogenesis. Int J Dermatol 2004; 43: 326-335.
99. Hussain SP, Hofseth LJ, Harris CC. Radical causes of cancer. Nat Rev Cancer 2003; 3: 276-285.
100. Slater TF. Free-radical mechanisms in tissue injury. Biochem J 1984; 222: 1-15.
101. Freeman BA, Crapo JD. Biology of disease: free radicals and tissue injury. Lab Invest 1982; 47: 412-426.
102. Frank L, Massaro D. Oxygen toxicity. Am J Med 1980; 69: 117-126.
103. Niki E, Yoshida Y, Saito Y, Noguchi N. Lipid peroxidation: Mechanisms, inhibition, and biological effects. Biochem Biophys Res Commun 2005; 338: 668-676.
104. Halliwell B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? Lancet 1994; 344: 721-724.
105. Dreher D, Junod AF. Role of oxygen free radicals in cancer development. Eur J Cancer 1996; 32: 30-38.
106. Burdon RH, Gill V, Rice Evans, C. Oxidative stress and tumor cell proliferation. Free Radic Res Commun 1990; 11: 65-76.
107. Goldstein BD, Czerniecki B, Witz G. The role of free radicals in tumor promotion. Environ Health Perspect 1986; 81: 55-7
108. Hussain SP, Aguilar F, Amstad P, Cerutti P. Oxy-radical induced mutagenesis of hotspot codons 248 and 249 of the human p53 gene. Oncogene 1994; 9: 2277-2281.
109. Marnett LJ. Oxyradicals and DNA damage. Carcinogenesis 2000; 21: 361-370.
110. Betteridge DJ. What is oxidative stress? Metabolism 2000; 49: 3-8.

111. Allen RG, Tresini M. Oxidative stress and gene regulation. *Free Radic Biol Med* 2000; 28: 463- 499.
112. Abuja PM, Albertini R. Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins. *Clin Chim Acta* 2001; 306: 1-17.
113. Primo-Parmo SL, Sorenson RC, Teiber J, La Du, B. N. The human serum paraoxonase/arylesterase gene (*PON1*) is one member of a multigene family. *Genomics* 1996, 33; 498–507.
114. Hong-Liang L, De-Pei L, Chihj-Chuan L. Paraoxonase gene polymorphisms, oxidative stress and diseases. *J Mol Med* 2003; 81: 766-779.
115. Hassett C, Richter RJ, Humbert R, Chapline C, Crabb JW, Omiecinski CJ. Ve ark. Characterization of cDNA clones encoding rabbit and human serum paraoxonase: the mature protein retains its signal sequence. *Biochemistry* 1991, 30, 10141–10149.
116. Gan KN, Smolen A, Eckerson HW, La Du BN. Purification of human serum paraoxonase/arylesterase. *Drug Metab Dispos* 1991; 19: 100-106.
117. Lourdes R, Bharti M, Durlington PN, Hernandez A, Mackness MI. Hydrolysis of platelet-activating factor by human serum paraoxonase. *Biochem J* 2001; 354: 1-7.
118. Harel M, Aharoni A, Gaidukov L, et al. Structure and evolution of the serum paraoxonase family of detoxifying and antiatherosclerotic enzymes. *Nat Struct Mol Biol* 2004; 11: 412-414
119. Khersonsky O, Tawfik DS. Structure-reactivity studies of serum paraoxonase PON-1 suggest that its native activity is lactonase. *Biochemistry* 2005; 44: 6371-6382.
120. Mackness MI, Mackness B, Durlington PN, Connely PW, Hegele RA. Paraoxonase: biochemistry, genetics and relationship to plasma lipoproteins. *Curr Opin Lipidol* 1996; 7: 69-76.

121. Mackness MI, Arrol S, Durrington PN. Paraoxonase prevents accumulation of lipoperoxides in low density lipoprotein. *FEBS Lett* 1991; 286: 152-154.
122. Rousselot DB, Therond P, Beaudoux JL, Peynet J, Legrand A, Delatre J. High density lipoproteins and the oxidative hypothesis of atherosclerosis. *Clin Chem Lab Med* 1999; 37: 939-949.
123. Aviram M, Rosenblat M, Bisgaier CL, Newton RS, Primo-Parmo SL, La Du BN. Paraoxonase inhibits high density lipoprotein oxidation and preserves its functions. *J Clin Invest* 1998; 101: 1581-90.
124. Aviram M, Hardak E, Vaya J, Mahmood S, Milo S, Hoffman A, Billicke S, Draganov D, Rosenblat M. Human serum paraoxonases (PON1) Q and R selectively decrease lipid peroxides in human coronary and carotid atherosclerotic lesions. *Circulation* 2000; 101: 2510-17.
125. Rye KA, Clay MA, Barter PJ. Remodelling of high-density lipoproteins by plasma factors. *Atherosclerosis* 1999; 145: 227-238.
126. Deakin SP, James RW. Genetic and environmental factors modulating serum concentrations and activities of the antioxidant enzyme paraoxonase-1. *Clin Sci* 2004; 107: 435-447.
127. Costa LG, Vitalone A, Cole TB, Furlong CE. Modulation of paraoxonase (PON-1) activity. *Biochem Pharmacol* 2005; 69: 541-550.
128. Mackness MI, Harty D, Bhatnagar D, Winocour PH, Arrol S, Ishola M, Durrington PN. Serum paraoxonase activity in familial hypercholesterolaemia and insulin-dependent diabetes mellitus. *Atherosclerosis* 1991; 86: 193-199.
129. Shih DM, Gu L, Hama S, Xia YR, Navab M, Fogelman AM, Lusis AJ. Genetic-dietary regulation of serum paraoxonase expression and its role in atherogenesis in a mouse model. *J Clin Invest* 1996; 97: 1630-1639.
130. Sozmen EY, Mackness B, Sozmen B, Durrington P, Girgin FK, Aslan L, Mackness M. Effect of organophosphate intoxication on human serum paraoxonase. *Hum Exp Toxicol* 2002; 21: 247-252.

131. Mackness MI, Mackness B, Durrington PN. Paraoxonase and coronary heart disease. *Atheroscler*. 2002; 3: 49-55.
132. Azarsız E, Sönmez EY. Paraoksonaz ve klinik önemi. *Türk Biyokimya Dergisi* 2000; 25: 109-119.
133. Mackness B, Mackness MI, Arrol S, Turkie W, Durrington PN. Effect of the molecular polymorphisms of human paraoxonase (PON1) on the rate of hydrolysis of paraoxon Br *J Pharmacol*. 1997; 122: 265-268.
134. Durrington PN, Mackness B, Mackness MI. Paraoxonase and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21: 473-480.
135. Playfer JR, Eze LC, Bullen MF, Evans DA. Genetic polymorphism and interethnic variability of plasma paraoxonase activity. *J Med Genet* 1976; 13: 337-342.
136. Gur M, Aslan M, Yildiz A, Demirbag R, Yilmaz R, Selek S, Erel O, Ozdogru I. Paraoxonase and arylesterase activities in coronary artery disease. *Eur J Clin Invest*. 2006; 36: 779-787.
137. Kim NS, Kang K, Cha MH, Kang BJ, Moon J, Kang BK, Yu BC, Kim YS, Choi SM, Bang OS. Decreased paraoxonase-1 activity is a risk factor for ischemic stroke in Koreans. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007 ; 364: 157-62.
138. Mackness MI, Harty D, Bhatnagar D, Winocour PH, Arrol S, Ishola M, Durrington PN. Serum paraoxonase activity in familial hypercholesterolaemia and insulin-dependent diabetes mellitus. *Atherosclerosis* 1991; 86: 193-199.
139. Ikeda Y, Suehiro T, Inoue M, Nakauchi Y, Morita T, Ariei K et al. Serum paraoxonase activity and its relationship to diabetic complications in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism* 1998; 47: 598-602.
140. Paragh G, Asztalos L, Seres I, Balogh Z, Locsey L, Karpati I et al. Serum paraoxonase activity changes in uremic and kidney-transplanted patients. *Nephron* 1999; 83: 126-131.

141. Ciftci H, Yeni E, Savas M, Verit A, Celik H. Paraoxonase activity in patients with erectile dysfunction *Int J Impot Res.* 2007; 19: 517-520.
142. Mackness MI, Walker CH, Carlson LA. Low A-esterase activity in serum of patients with fish-eye disease. *Clin Chem* 1987; 33: 587-588.
143. Mackness MI, Peuchant E, Dumon MF, Walker CH, Clerc M. Absence of "A"-esterase activity in the serum of a patient with Tangier disease. *Clin Biochem* 1989; 22: 475-478.
144. Ayub A, Mackness MI, Arrol S, Mackness B, Patel J, Durrington PN. Serum paraoxonase after myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 330-335.
145. Mackness B, Durrington PN, Mackness MI. Human serum paraoxonase. *Gen Pharmacol* 1998; 31: 329-336.
146. Akcay MN, Yilmaz I, Polat MF, Akcay G. Serum paraoxonase levels in gastric cancer. *Hepatogastroenterology* 2003; 273-275.
147. Akcay MN, Polat MF, Yilmaz I, Akcay G. Serum paraoxonase levels in pancreatic cancer. *Hepatogastroenterology* 2003; 225-227.
148. Elkiran ET, Mar N, Aygen B, Gursu F, Karaoglu A, Koca S. Serum paraoxonase and arylesterase activities in patients with lung cancer in a Turkish population. *BMC Cancer.* 2007; 7: 48.
149. Kafadar AM, Ergen A, Zeybek U, Agachan B, Kuday C, Isbir T. Paraoxonase 192 gene polymorphism and serum paraoxonase activity in high grade gliomas and meningiomas. *ell Biochem Funct.* 2006; 24: 455-460.
150. Antognelli C, Mearini L, Talesa VN, Giannantoni A, Mearini E. Association of CYP17, GSTP1, and PON1 polymorphisms with the risk of prostate cancer. *Prostate.* 2005; 63: 240-451.
151. Van Der Logt EM, Janssen CH, Van Hooijdonk Z, Roelofs HM, Wobbes T, Nagengast FM, Peters WH. No association between genetic polymorphisms in NAD(P)H oxidase p22phox and paraoxonase 1 and colorectal cancer risk. *Anticancer Res.* 2005; 25: 1465-1470.

- 152.** Stohs SJ. The role of free radicals in toxicity and disease. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* 1995; 6: 205-228.
- 153.** de Groot H. Reactive oxygen species in tissue injury. *Hepatogastroenterology* 1994; 41: 328-332.
- 154.** Pljesa-Ercegovac M, Mimic-Oka J, Dragicevic D, Savic-Radojevic A, Opacic M, Pljesa S, Radosavljevic R, Simic T. Altered antioxidant capacity in human renal cell carcinoma: role of glutathione associated enzymes. *Urol Oncol.* 2008 ; 26: 175-81.
- 155.** Lusini L, Tripodi SA, Rossi R, Giannerini F, Giustarini D, del Vecchio MT, Barbanti G, Cintonino M, Tosi P, Di Simplicio P. Altered glutathione antioxidant metabolism during tumor progression in human renal-cell carcinoma. *Int J Cancer.* 2001; 91: 55-59.
- 156.** Gago-Dominguez M, Castelao JE, Yuan JM, Ross RK, Yu MC. Lipid peroxidation: a novel and unifying concept of the etiology of renal cell carcinoma (United States). *Cancer Causes Control.* 2002; 13: 287-293.

8. ÖZGEÇMİŞ

1975 yılında Mersin'in Erdemli ilçesinde doğdum. İlk, orta ve lise eğitimimi Erdemli'de tamamladım. 1995 yılında Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakülte'sini kazandım. 2001 yılında tıp fakültesinden mezun oldum ve Hakkari Durankaya Sağlık Ocağı'n'da ilk görevime başladım.

2003 yılında Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı'nda araştırma görevlisi olarak uzmanlık eğitimime başladım. Halen aynı anabilim dalında araştırma görevlisi olarak çalışmaktayım.