

T.C
EGE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**HÜCRE DIŞI PLAZMA DNA' NIN
PROSTAT KANSERİNDE
KANTİTATİF TAYİNİ VE
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Zeynep Özlem Doğan

Bornova/İZMİR

2006

T.C
EGE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**HÜCRE DIŞI PLAZMA DNA' NIN
PROSTAT KANSERİNDE
KANTİTATİF TAYİNİ VE
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Zeynep Özlem Doğan

DANIŞMAN: Doç. Dr. Cumhur GÜNDÜZ

Bornova/İZMİR

2006

DEĞERLENDİRME KURULU ÜYELERİ

(Adı Soyadı)

(İmza)

Başkan : Doç. Dr. Cumhur GÜNDÜZ

(Danışman)

Üye : Prof. Dr. Nejat TOPÇUOĞLU

Üye : Prof. Dr. Oktay NAZLI

Yüksek Lisans Tezinin kabul edildiği tarih:

BÖLÜM I

ÖNSÖZ

Akademik hayatımın temelini oluşturduğu bu ilk aşamada; desteği, sabrı, gecesi gündüzüyle bana yardım eden, en sıkıntılı anlarımda moral verip, çalışmalarımda sonsuz bilgisi, deneyimi, fikirleri ve görüşleriyle bana heyecan veren, ufkumu aydınlatan ve her zaman bana inanan sevgili hocam Sayın Doç. Dr. Cumhuri GÜNDÜZ' e

Tezim ile birebir ilgilenip ve özellikle gönülden destek olan Anabilim Dalı başkanımız Sayın Prof. Dr. Nejat TOPÇUOĞLU' na

Tezimin yönteminin standardizasyonunda bilgi ve deneyimini benimle paylaşan; her aşamada yardım ve desteğini benden esirgemeyen Sayın Yrd. Doç. Dr. Buket KOSOVA' ya,

İlgisini; desteğini yüksek lisansım boyunca her zaman hissettiğim Sayın Yrd. Doç. Dr. Zuhale EROĞLU' na,

Tez çalışmam için gerekli hasta grubunu temin edip, çalışmamı yakından ilgiyle takip ederek görüşlerini paylaşan Sayın Prof. Dr. Oktay NAZLI' ya, tez çalışmamın kanser ile ilgili kısmında engin bilgilerini benimle paylaşan, desteğini esirgemeyen Sayın Op. Dr. Burak TURNA' ya; hasta bilgilerini sağlamamda yardımcı olan; sabrı, zamanı, desteği için Sayın Asistan Dr. Serkan DEMİRYOĞURAN' a; yakın ilgisi ve yardımlarından dolayı Üroloji hemşiresi Sayın Güngör CAN 'ya, üroloji Anabilim Dalı çalışanlarına,

Lisans ve yüksek lisansım boyunca beni hiç yalnız bırakmayan, dostluğuyla, bilgisiyle hep yanımda olan; sevgisini, desteğini her zaman hissettiğim ve yine keşfedilecek tüm yolculuklar için Sayın Sunde YILMAZ' a,

Yüksek Lisans'a başladığım ilk günden itibaren samimi dostluğu ile her zaman bana yardımcı ve yol gösterici olan; inancını benimle paylaşan, tezimin her aşama-

sında yardımını esirgemeyen, beni yüreklendiren Sayın Ar. Gör. Çığır BiRAY AVCI' ya,

Yüksek lisans kariyerim boyunca paylaştığım tüm güzellikler, bilgi ve keyif dolu her gün için sevgilerini, desteklerini her zaman hissettiğim değerli arkadaşlarım Sayın Ar. Gör. Nur SELVİ' ye, Sayın Ar. Gör. Burçin TEZCANLI' ya, Sayın Ar. Gör. Vildan BOZOK ÇETİNTAŞ' a,

Anabilim dalımızda görevli diğer tüm arkadaşlarıma ve çalışanlarına,

Tezimin her aşaması ile mesafelere aldırılmadan ilgilenip her zaman yardım ve desteği ile yanımda hissettiğim canım dostum Demet ARIÖZ' e,

En zor anlarımda beni gülümsetebilmeyi bilen, her anlamda sevgisini ve desteğini hissettiğim Hasan Özgür ŞİĞVA' ya,

Hayata bakışım oluşurken; bana yaşamı sevdiren ve yaşamdan keyif almamı sağlayan; hedeflerimi oluşturmamda ve bu hedeflere ulaşacağıma olan inançları ile ne olursa olsun her zaman yanımda olan çok sevdiğim canım aileme çok teşekkür ediyorum.

Zeynep Özlem DOĞAN

İZMİR/2006

İÇİNDEKİLER

1. BÖLÜM I

1.1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
1.2. GENEL BİLGİLER	2
1.2.1. Genital Sistem	3
1.2.1.1. Erkek Dış Genital Sistemi	3
1.2.1.1.1. Skrotum	3
1.2.1.1.2. Penis	4
1.2.1.2. Erkek İç Genital Organları	5
1.2.1.2.1. Orchis (Testis)	5
1.2.1.2.2. Epididymis (Erbezi Üstü-Epididimis)	6
1.2.1.2.3. Ductus Deferens (Spermiyum Kanalı)	6
1.2.1.2.4. Ductus Ejaculatorius	7
1.2.1.2.5. Funiculus Spermaticus	7
1.2.1.2.6. Drandula Seninalis	7
1.2.1.2.7. Cowper Bezleri	8
1.2.1.2.8. Grandula Prostata (Prostat Bezi)	8
1.2.2. Kanser	10
1.2.2.1. Prostat Kanseri	11
1.2.2.1.1. Genetik Temel	14
1.2.2.1.2. Etnik Ve Çevresel Faktörler	14
1.2.2.1.3. Prostat Kanseri Skorlaması	15
1.2.2.1.3.1. Gleason Skoru	16
1.2.2.1.3.2. TNM Sınıflandırması	17
1.2.2.1.4. PSA	20
1.2.3. Serbest DNA	23
1.2.3.1. Tarihçe	26
1.2.3.2. SRY	27
1.2.3.3. Telomer ve Telomeraz Enzimi	28
1.2.4. PCR	29
1.2.4.1. Real-Time PCR	31
1.2.4.2. <i>Taqman</i> Yöntemi	31
1.2.4.3. Serbest RNA	34

2. BÖLÜM II

2.1. GEREÇ VE YÖNTEM	35
2.1.1. Kontrol ve Olgu Grubu	35
2.1.2. Plazmadan Serbest DNA İzolasyonu	35
2.1.2.1. Serbest DNA İzolasyon Protokolü	36
2.1.3. Serbest DNA Kantitasyonu	38
2.1.3.1. Primerler	38
2.1.3.2. hTERT Gen Bölgesinin Kantitasyonu	39
2.1.3.2.1. hTERT Primer ve <i>TaqMan</i> Probu	39
2.1.3.2.2. hTERT <i>TaqMan</i> PCR Protokolü	40
2.1.3.2.3. hTERT Kantitasyonu	42
2.1.3.3. SRY Gen Bölgesinin Kantitasyonu	43
2.1.3.3.1. SRY Primer ve <i>TaqMan</i> Probu	43
2.1.3.3.2. SRY Kantitasyonu	45

2.1.3.3.3. SRY <i>TaqMan</i> PCR Protokolü	46
2.1.4. Serbest DNA Kopya Sayısının ng/ml'ye Çevrilmesi	48
2.1.5. Plazmadan hTERT mRNA Ekspresyonunun Kantitasyonu	50
2.1.5.1. Plazmadan Total RNA İzolasyonu	50
2.1.5.2. hTERT Kantitasyonu	51
2.1.5.2.1. hTERT R-T PCR Protokolü	53
2.1.5.2.2. hTERT mRNA Kantifikasyonu	55
2.1.6. İstatistiksel Analiz Yöntemleri	55
3. BÖLÜM III	
3.1. BULGULAR	56
3.1.1. Çalışma Grubunun Demografik Özellikleri	56
3.1.2. Kontrol Grubu	60
3.1.3. Serbest DNA Kantitasyonu	60
3.1.3.1. Serbest DNA hTERT Kantitasyonu	60
3.1.3.2. Serbest DNA SRY Kantitasyonu	63
3.1.4. hTERT / SRY Korelasyonu	65
3.1.5. hTERT / SRY Oranı	67
3.1.6. PSA Değerleri ve hTERT, SRY Kopya Sayısı Oranı	69
3.2. Gleason Skoru hTERT, SRY Kopya Sayısı Oranı	70
3.3. TNM hTERT, SRY Kopya Sayısı Oranı	72
4. BÖLÜM IV	
4.1. TARTIŞMA	74
5. BÖLÜM V	
5.1. SONUÇ VE ÖNERİLER	80
6. BÖLÜM VI	
6.1. ÖZET	82
6.2. ABSTRACT	84
7. BÖLÜM VII	
7.1. YARARLANILAN KAYNAKLAR	86
7.2. ÖZGEÇMİŞ	94

TABLO VE ŞEKİL LİSTESİ

Tablo No	Sayfa No
Tablo 1: Kullanılan Cihazlar _____	38
Tablo 2: hTERT PCR Karışımı _____	40
Tablo 3: Denatürasyon _____	41
Tablo 4: Amplifikasyon _____	41
Tablo 5: Soğuma _____	42
Tablo 6: SRY PCR Karışımı _____	45
Tablo 7 : Denatürasyon _____	46
Tablo 8: Amplifikasyon _____	47
Tablo 9: Soğuma _____	48
Tablo 10: Kimyasal Maddeler _____	48
Tablo 11 : Plazma RNA RT-PCR Karışımı _____	52
Tablo 12 : Revers Transkripsiyon _____	53
Tablo 13: Denatürasyon _____	53
Tablo 14: Amplifikasyon _____	54
Tablo 15: Soğutma _____	54

Tablo 16: Olguların demografik ve klinik özellikleri _____	59
Tablo 17: PCa' lı olgularda saptanan hTERT kopya sayısı ve miktarı _____	61
Tablo 18: Kontrol grubundaki hTERT kopya sayısı ve miktarı _____	62
Tablo 19: PCa' lı olgularda SRY kantitasyonu ve miktarı _____	63
Tablo 20: Kontrol grubundaki SRY kantitasyonu ve miktarı _____	64
Tablo 21: hTERT ve SRY pozitif olgular _____	65
Tablo 22: PSA gruplarında hTERT kopya sayısının dağılımı _____	69
Tablo 23: PSA gruplarında SRY kopya sayısının dağılımı _____	69
Tablo 24: Gleason skoruna göre hTERT kopya sayısının dağılımı _____	71
Tablo 25: Gleason skoruna göre SRY kopya sayısının dağılımı _____	71
Tablo 26: hTERT kopya sayısının TNM evrelemesine göre dağılımı _____	72
Tablo 27: SRY kopya sayısının TNM evrelemesine göre dağılımı _____	72

Şekil No	Sayfa No
Şekil 1: Erkek genital sistemi _____	3
Şekil 2: Prostat bezinin bölgeleri _____	10
Şekil 3: Prostat kanseri insidansı _____	11
Şekil 4: Prostat kanseri histolojik evreleri _____	17
Şekil 5: PSA yapısı ve işlenmesi _____	23
Şekil 6: <i>TaqMan</i> Prob _____	32
Şekil 7: PCR sırasında prob hedef DNA dizisiyle hibridize olur _____	32
Şekil 8: Prob ekstansiyon sırasında polimeraz enzimi ile uzaklaştırılır _____	33
Şekil 9: Reporter baskılayıcıdan polimeraz enziminin 5' - 3' nükleaz etkisi ile ayrılır _____	33
Şekil 10: Serbest kalan reporter fluoresan ışık yayar. Her siklus da üretilen ampikon miktarına paralel olarak sinyal şiddetide artmaktadır _____	34
Şekil 11: hTERT standartlarına göre amplifikasyon eğrisi _____	43
Şekil 12: SRY standartlarına göre amplifikasyon eğrisi _____	46
Şekil 13: Prostat kanserli olguların yaş gruplarına göre dağılımı _____	57
Şekil 14: PCa' lı olgularda PSA değerleri (— PSA 4 ng/ml) _____	57

Şekil 15: Olguların Gleason Skoruna göre dağılımı _____	58
Şekil 16: Olguların TNM evrelemesine göre dağılımı _____	58
Şekil 17: (a). hTERT kopya sayısının PCa ve kontrol gruplarındaki dağılımı, (b) hTERT miktarının dağılımı _____	61
Şekil 18: (a) PCa' lı olgu ve kontrol grubundaki SRY kopya sayısı, (b) SRY miktarı _____	63
Şekil 19: (a) hTERT ile SRY kopya sayısı arasındaki regresyon eğrisi, (b) miktarları arasındaki regresyon eğrisi _____	66
Şekil 20: (a) Kontrol grubundaki hTERT ile SRY kopya sayısı, (b) miktarı arasındaki regresyon eğrisi _____	66
Şekil 21: PCa' lı olgulardaki hTERT/SRY oranının dağılımı _____	67
Şekil 22: Kontrol grubundaki hTERT/SRY oranının dağılımı _____	68
Şekil 23: TNM evrelemesinde hTERT/SRY oranının olgulardaki dağılımı _____	68
Şekil 24: (a) hTERT, (b) SRY kopya sayısının PSA gruplarındaki dağılımı _____	70
Şekil 25: (a) Gleason skorunda hTERT ve (b) SRY kopya sayıları _____	71
Şekil 26: (a) TNM evrelemesinde hTERT (b) SRY kopya sayıları _____	73

KISALTMALAR

DNA:	Deoksiribonükleik asit
RNA:	Ribonükleik asit
PSA:	Prostat Spesifik Antijen
PSMA:	Prostat spesifik membran antijen
SRY:	Sex-determining Region of the Human Y- Kromozom (insan Y kromozomu cinsiyet belirleyici bölge)
HMG:	High Mobility Group
PIN:	Prostatik İntraepitelyal Neoplazi
hTR:	İnsan telomerazı RNA komponenti
hTERT:	İnsan telomerazı reverse transkriptazı
TP1:	İnsan telomerazı protein komponenti
G:	Guanin
FAM:	6-carboxyfluorecein
TAMRA	6-carboxy-tetramethyl-rhodamine
R:	Reporter
Q:	Quencher
PCR:	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RT-PCR:	Revers Transkripsiyon PCR
FRET:	Fluoresans Rezonans Enerji Transfer

NK:	Naturel Killer
PCa:	Prostat Kanseri
FSH:	Folikül Uyarıcı Hormon
LH:	Luteinize Edici Hormon
RIA:	Radyoimmünoassay
BPH:	Benign Prostat Hiperplazisi

BÖLÜM-I

1.1. GİRİŞ VE AMAÇ

Bilimsel birçok alanda olduğu gibi geçtiğimiz son on yılda moleküler biyoloji ile ilgili araştırmalarda da etkileyici ilerlemeler gerçekleşmiş ve birçok uygulama arasında, bilinmeyen DNA dizileri ya da genetik anomalilerin ortaya çıkarılmasında kullanılabilirliği kanıtlanmıştır. Moleküler biyoloji dahilinde; duyarlı tekniklerin gelişimi ile nükleik asitlerin dakika mertebesinde tayinini sağlayan bir çok güçlü ekipman geliştirilmiştir. Fakat bu gelişmeler uygun test materyaline ve yüksek duyarlıklı metotlara olan ihtiyaç gibi doğal sorunların üstesinden gelmek için yeterli olamamaktadır. İdeal olanı, tanı örneklerinin hastayı rahatsız etmeden küçük bir invaziv işlem ile alınmaları ve hastalık riskinin hızlı ve güvenilir bir şekilde kolayca belirlenebilir olmasıdır.

Kan ve idrar örnekleri, birçok tanı amaçlı uygulamalar için kullanılabilir olmasına rağmen; kanserlerde sıklıkla tümör biyopsileri gibi invaziv metotlar ile hastalıkların moleküler tanısı konmaktadır.

Prostat adenokarsinomu olarak tanımlanan prostat kanseri (PCa), genel olarak sanayileşmiş batı toplumundaki erkeklerin %10' undan fazlasında klinik olarak ortaya çıkan bir durumdur. Genç erkeklerde nadir görülen bir kanser olup yaş ile artan insidans göstermektedir.

PCa' nın rutin taramasında günümüzde kullanılan en geçerli yöntem, biyokimyasal bir markır olan serum prostat spesifik antijen (PSA) düzeylerini

değerlendirmektir. Fakat prostat kanserinin erken tanısında ve moleküler sınıflandırmasında yeni markır araştırmaları devam etmektedir.

Prostat kanseri tanı başarısında iki problem ortaya çıkmaktadır. Günümüzde prostat kanserinin erken evresinde yavaş ilerleyeceği ya da agresifleşeceği konusunda ayırt edici güvenilir bir metot bulunmamaktadır. Ayrıca bazı hastalarda PSA sonuçları ile prostat kanserinin klinik gelişimi tanımlanamamakta ve tedavi yaklaşımı gecikmektedir. Ayrıca mikrometastazın ortaya çıkarılmasındaki yöntemler de yetersiz olmaktadır. Radikal bir tedavi olan prostatektomi de bazı hastalara yarar sağlayamamakta, çünkü hastalar metastazdan ölmektedir.

Kanser riskini belirleyen faktörler arasında yaşam biçimi gibi mekanizmalar da moleküler biyolojide soru işareti olarak karşımıza çıkmaktadır. Prostat kanserinde bilinen dış karsinojenler bulunmamakta, bundan dolayı hastalık sıklıkla endojen etkenler sonucu oluşmaktadır.

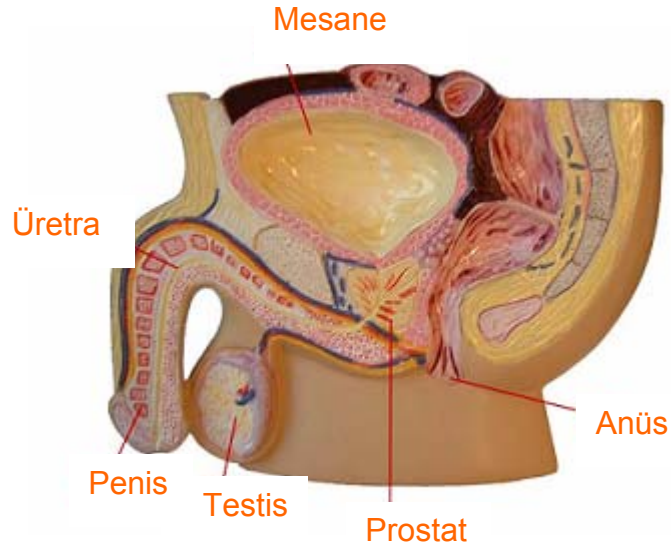
Hasta ya da sağlıklı bireylerin serum ve plazmalarında serbest DNA' nın keşfi son yıllarda bu konuya olan ilgiyi arttırmıştır. Yapılan çalışmalar ile serum ve plazma DNA'sı kanser hastalığı gelişiminde önemli ve geçerli bir metodoloji ve potansiyel tanı kriteri olarak tanımlanmaktadır.

Çalışmamızda; sensitivitesi ve spesifitesi çeşitlilik göstermesine rağmen; prostat kanserli hastaların plazmalarındaki serbest DNA değişimlerinin varlığının ortaya konulması amaçlanmıştır. Tarama testi olarak kullanılabilirliği saptanmaya çalışılmıştır.

1.2. GENEL BİLGİLER

1.2.1. Genital Sistem

Erkek genital sistemi, iç ve dış genital organlar olmak üzere iki grupta incelenmektedir. Erkek dış genital organları; Skrotum ve penis' ten oluşmakta, iç genital organları ise; testis, epididimis, *ductus deferens*, *vesicula seminalis* ve *ductus ejaculatorius*'u içermektedir (60) (şekil 1).



Şekil 1: Erkek genital sistemi

1.2.1.1. Erkek Dış Genital Sistemi

1.2.1.1.2. SKROTUM

Skrotum; testis, epididimis ve *funiculus spermaticus*' un bir bölümünü ve çok sayıda damar yapısı içeren bir yapıdır. Doğumdan önceki dönemde tes-

tisler kasık kanalı içinde buraya taşındıkları için karın ön duvarını oluşturan tüm tabakalar (kaslar, fasyalar), skrotum'un yapısında çok ince lifler şeklinde yer almaktadır. Deriye yapışık durumda bulunan *tunica dartos* tabakası *fascia superficialis*' in yüzeysel ve derin yapraklarının kaynaşması ile oluşur ve içinde *m. dartos* denilen düz kas lifleri bulunur. Bu kas lifleri ısı regülasyonunda en önemli faktördür (9).

Skrotum derisi çok ince olmakla birlikte, melanin pigmenti fazlalığı nedeniyle kahverengidir. Üzerinde az sayıda kıl folikülü ile ter bezleri bulunur. Yağ dokusu içeriği düşüktür. Bu özelliği ısı regülasyonunda önemli bir rol oynamaktadır.

Skrotum ısı normal vücut iç ısısından 3-4°C daha düşüktür (33,9°C). Bu farklılığın nedeni eşey hücrelerinin gelişmesi için uygun ortamın yaratılmasıdır. Dış ortam sıcak ise *m. dartos*'un (düz kas lifleri) etkisiyle deri gevşer ve alanı genişletmek amacıyla düzleşir. Tersine dış ortam soğuk ise *m. dartos* kasılarak deriyi büzer. Skrotum sperm işlevlerini korumak açısından çok önemli bir özelliğe sahip olmaktadır. Sperm hücreleri ısı değişikliklerinden olumsuz etkilenirler ve işlevlerini en iyi şekilde yerine getirebilmeleri için vücut ısısından yaklaşık 2 derece daha düşük bir ortamda bulunmaları gerekir. Torbanın vücut dışında bulunmasının nedeni budur.

1.2.1.1.2. PENİS

Sabit bölümü *perineum*' da; serbest bölümü ise skrotum'un önünde bulunan silindirik yapı bir organdır. Hem çiftleşmeyi, hem de idrar iletimini sağlayacak şekilde çift fonksiyonlu bir oluşumdur. Genital organ olma özelliği

ancak ergenlikten sonra kazanılır. Normal konumda serbest bölümü 6–8 cm iken ereksiyonda 12–14 cm' e çıkar. *Perineum'* da yer alan ve dıştan görülmeyen bölümü *radix penis* (penis kökü) adını alır. Serbest olarak skrotum üzerinde sarkık bulunan bölümü ise *corpus penis* (penis gövdesi) 'tir (32).

Penisin ortasından üretra adı verilen idrar borusu geçmektedir. Mesane ile bağlantılı olan bu boru, penis başının uç kısmında bulunan üretra ağzına açılmakta ve hem meninin hem de idrarın dışarıya boşaltılmasını sağlamaktadır.

1.2.1.2. Erkek iç genital organları

1.2.1.2.1. ORCHİS (TESTİS)

Funiculus spermaticus'u oluşturan yapılarla birlikte skrotum içinde asılı duran, oval şekilli, eşey hücresi (*spermium*) ve erkeklik hormonu (*testesteron*) üreten bir çift bez yapısıdır. Testislerin büyüklükleri kişiden kişiye değişmekle beraber, her biri ortalama 20–30 gram ağırlığında, 4–5 santimetre uzunluğunda ve 2–2,5 santimetre kalınlıktadırlar. Testisler yaklaşık aynı büyüklükte olmalarına karşın yapısal olarak sol testis sağdakine göre biraz daha aşağıda yer almaktadır. Her testis içinde küçük ve oldukça kıvrımlı sperm kanalcıkları bulunmaktadır. Bu kanalcıklar beyindeki hipofiz bezinin salgıladığı FSH hormonunun verdiği emirle sperm hücreleri üretmektedirler. Testisler yine hipofiz bezinden salgılanan ve LH adı verilen hormonun etkisiyle testesteron hormonu üretirler. Erkek çocukta ergenlik dönemine girene kadar nispeten düşük miktarlarda salgılanan testesteron hormonu ergenlikle birlikte daha hızlı salgılanmaya başlar ve erkek çocukta ses kalınlaşması,

sakal-bıyık çıkması, vücut kaslarının gelişmesi, vücutta erkek tipi kıllanmanın ortaya çıkması gibi erkeksi özelliklerin ortaya çıkmasını sağlar. Sperm üretimi de ergenliğin başlamasıyla kısa sürede başlar. Erişkin bir erkekte de testosteron erkek cinsiyete özgü özelliklerin devamını ve sürekli olarak sperm üretimini sağlamaktadır (11).

1.2.1.2.2. EPIDIDYMIS (ERBEZİ ÜSTÜ-Epididimis)

Testislerde üretilen sperm hücrelerinin, sperm kanallarına ulaşmadan önce toplandıkları yerdir. Erkek sperm hücrelerinin olgunlaşmak için kısa süre beklemelerini sağlamaktadır (60).

1.2.1.2.3. DUCTUS DEFERENS (SPERMİUM KANALI)

Ductus deferens, epididimisten sonra gelen ve yalnızca iletim işlevi olan bölümdür. 40–50 cm uzunluğundadır. Musküler duvar yapısı nedeniyle kordon benzeri bir yapısı vardır. Geçiş yaptığı bölüme göre dört parçaya ayrılır. Birinci parçası, epididimis'in arkasında kalır. İkinci parçası, *funiculus spermaticus* denilen kordon içinde yer alır. Üçüncü parça, kasık kanalı içinden geçen bölümdür. Dördüncü parçası ise kasık kanalının iç tarafında kalan ve vesicula seminalis' e kadar süren son bölümüdür. *Ductus deferens'* in genişlemiş olan son bölümü ampulla ductus deferentis adını alır. Burası prostat bezinin taban kısmı yakınında bulunur ve ejakulasyon öncesinde spermin depolandığı bir bölgedir (60).

1.2.1.2.4. DUCTUS EJACULATORIUS

Ductus deferens ile *ductus excretorius*'un birleşmesi sonucu oluşan iki cm uzunluğunda dar (0,5 mm) ve ince duvarlı bir kanaldır. Prostat bezinin parankim dokusu içinden geçerek *colliculus seminalis*' lerde *pars prostatica* üretra' ya açılır. Üretra' nın bundan sonraki bölümü idrar ve meni nakli için kullanılacak şekilde çift fonksiyonludur.

Parasempatik etki sekresyona neden olur. *Ductus deferens* boyunca yavaş peristaltik dalgalar oluşur. Spermatozoa' lar epididimis' ten depolanmak üzere ampulla' ya ulaştırılır. Sempatik etki ise kanalın düz kaslarında kuvvetli kasılmalara böylece ejakulasyona yol açar.

1.2.1.2.5. FUNICULUS SPERMATICUS

Testisin damarlarını, sinirlerini ve *ductus deferens*' i içeren, *canalis inguinalis* ile testis arasında uzanan kordondur. Sağ ve solda birer tane olmakla birlikte testisleri skrotum içinde asılı tutar.

1.2.1.2.6. GLANDULA SEMINALIS (VESICULA SEMINALIS-MENİ KESECIĞİ)

Glandula seminalis kıvrımlı, tek bir kanal olmakla birlikte idrar kesesinin arka yüzü ile rektumun ön yüzü arasında, sağ ve solda birer tane olan ve 4–5 cm uzunluğundaki küçük bir bezdir. Alt ucu, salgısını akıttığı düz ve dar bir kanal şeklindedir ve *ductus excretorius* adını alır. Bir depo yeri değildir. Meninin dışarı atılması sırasında kasılmalar yapar. Salgısı, fruktoz ve kolin içermesi nedeniyle sperm hücrelerinin hareketliliğini artırır, yaşamsal enerjilerini

sağlar. Meninin yarıdan fazlasını bu bezin salgısı oluşturur. Spermatozoa'ların hareketli olmaları için gerekli enerjiyi üretmek için karbonhidrata ihtiyaçları vardır. Vücutta fruktoz üreten tek yer seminal bezlerdir. Fruktoz yokluğunda spermler ovuma ulaşarak onu dölleyemezler ve fertilizasyon gerçekleşemez (69).

1.2.1.2.7. COWPER BEZLERİ

Perineum'da *pars membranacea* üretranın arka dış yanında ve penis kökünün üst tarafında bulunmaktadır. Yaklaşık bir cm çapındadır. *M. sphincter* üretraya ait kas lifleri ile kuşatılmıştır. Sempatik lifleri L1–2; parasempatikleri S2–4 segmentlerinden gelir. Akıtıcı kanallarına ductus gll. bulbourethrales denilir, 2–3 cm uzunluğundadır. Üretranın *pars spongiosa*'sının ilk bölümüne açılırlar. Koyu (mukoid) ve alkali bir salgısı vardır. Ejakulasyondan önce salgılanır ve üretra mukozasındaki idrar artıklarının nötralizasyonunu sağlar.

1.2.1.2.8. GLANDULA PROSTATATA (PROSTAT)

Prostat erkek üreme sisteminin bir parçası olan 2.5x3x4 cm ebatlarında yaklaşık 20 gr ağırlığında bir salgı bezidir. Rektumun hemen önünde ve içinde idrarın biriktiği mesanenin alt kısmında bulunmaktadır. Prostat aynı zamanda idrarın içinden geçtiği kanal olan üretrayı sarar.

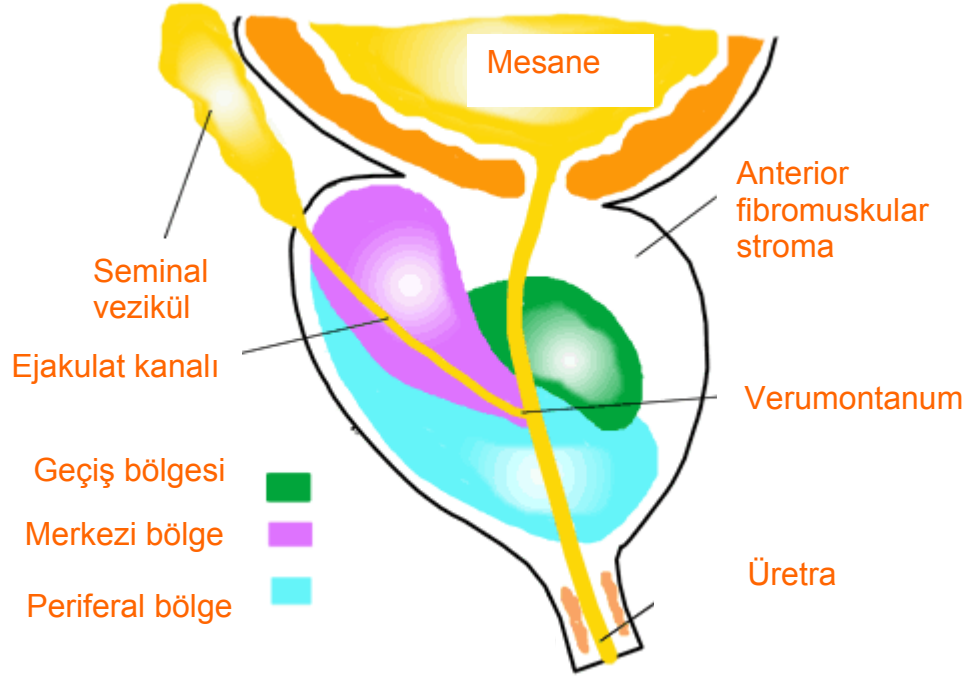
Prostat, üreme olayına yardımcı olan bir iç salgı bezi olup meninin asit baz oranını ayarlamaktadır. Prostatı oluşturan hücrelerin yaptığı salgının, önemli bir kısmını da prostat salgısı oluşturmaktadır. Ejekülatın %1–2' si spermden, %98–99 spermi taşıyan sıvıdan oluşmaktadır. Prostat salgısı gün-

lük 0,50 ml kadardır ve ejakulatın (meni) % 15–25 kadarını oluşturur. Ovumun döllenesini sağlamak üzere alkalen (bazik) yapıdadır.

Fetüsün 12. haftasında prostat oluşumu büyük oranda tamamlanmaktadır. Prostat 35–40 salgı bezini çevreleyen bağ ve kas dokularından oluşur. Prostat salgı bezlerinin kanalları prostat içinden geçen idrar yoluna (üretra) açılır. Ayrıca prostat içindeki bu idrar yoluna meni kanalları da açılmaktadır. Mesaneyi dışarıya bağlayan idrar yolu, prostat bezi içinden sonra hem idrar hem de meni yolu görevini görmektedir.

Prostatın yaklaşık % 30' u müsküler doku, kalanı glandüler epitelyumdan oluşur. Glandüler elementin duktusları ve asinileri kolumnar epitelyum ile döşelidir. Prostatik duktuslar prostatik üretranın posterioruna drene olurlar. Glandüler element primer olarak posterior ve lateral bölümlerdedir. Anterior segment ise fibromüsküler yapıdadır. McNeal glandüler elemanları santral zon, periferik zon ve transisyonel zon olarak üç, non-glandüler yapıları ise fibromüsküler stroma ve preprostatik sfinkter olmak üzere iki bölgeye ayırmıştır. Anterior fibromüsküler stroma fibröz ve musküler dokudan oluşur, glandüler yapılar içermez. Tüm prostat dokusunun % 30' unu oluşturur. Detrüsoz kasından köken alır ve prostatın ön yüzünü tümüyle kaplar. Preprostatik sfinkter, prostatik üretrayı tümüyle saran düz kas sfinkteridir. Glandüler elemanlar içermez ve retrograd ejakulasyonu önlemekle görevlidir. Santral zon, glandüler yapılardan oluşur, veru montanumun arkasında üretrayı saracak biçimde yerleşmiştir. Transisyonel zon, tüm prostatın % 5' inden azını oluşturmasına rağmen fonksiyonel önemi çok fazladır. Distal ve

proksimal üretranın birleşim yerinde, üretranın hemen çevresinde yer alan küçük bir grup glandüler elemandan oluşmuştur (Şekil 2) (7).



Şekil 2: Prostat bezinin bölgeleri

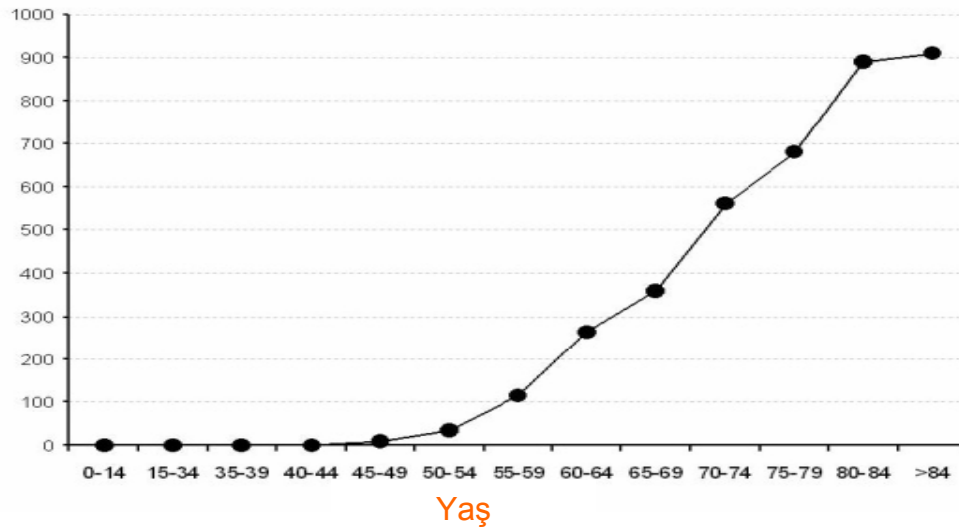
1.2.2. Kanser

Kanser, tümör süpresör genlerinin inaktivasyonu ve onkogenlerin aktivasyonu sonucu oluşan bir genetik hastalıktır.

Kanserin gelişim sürecinde, tümör oluşum mekanizmaları ve mutasyonlar rol almaktadır. Kanseri gelişimi; genetik ve epigenetik değişimlerin üst üste birikmesi sonucu oluşmaktadır (32). Bu değişimler; nokta mutasyonlarını, kromozomal yeniden düzenlenmeleri, mikrosatellit kararsızlığını, tümör süpresör genlerin promotor bölgelerin hipermetilasyonunu ve / veya inaktivasyonunu, onkogenlerin aktivasyonunu ve apoptozisin baskılanmasını vb. içermektedir (25).

1.2.2.1. Prostat Kanseri

Prostat kanseri, erkek üreme sisteminin önemli bir üyesi olan prostatta görülen malign değişikliklerdir ve ileri yaş erkeklerde görülen en sık rastlanan kanserlerden birisidir (Şekil 3). Prostat kanseri, erkeklerde en fazla tanı konulan neoplazm olup A.B.D.'nde kansere bağlı mortalitede ikinci sırada yer almaktadır. Avrupa' da her yıl tahmini 2,6 milyon yeni olguya kanser tanısı konmaktadır. Erkeklerde görülen kanserlerinin %11' ini prostat kanseri oluşturmakta ve erkekler arasındaki tüm kanser ölümlerinin %9' unun sebebi olmaktadır (65).



Şekil 3: Prostat kanseri insidansı [100.000 Erkek, (65)]

Prostat kanseri (PCa) diğer kanser tipleri gibi genetik ve epigenetik etkileşimlerin sonucu gelişen normal grandular epitelyumun preneoplastik lezyonlara dönüşümü olarak da incelenebilen bir invaziv karsinomdur.

Prostat adenokarsinomunun makroskopik olarak tanımlanması, radikal prostatektomi örneklerinde genellikle zordur ve mikroskopik inceleme gereklidir (8).

Bununla birlikte gri-sarımtırak renkte, sınırları çevre dokudan tam olarak ayırt edilemeyen, sert bir alan olarak izlenir (46). Mikroskopik olarak prostat adenokarsinomu geniş bir spektrum sergiler; anaplastik tümörden, non-neoplastik bez ile ayırımı oldukça zor olan iyi diferansiye neoplazma kadar uzanır (46).

Çoğu prostat adenokarsinomu, bir veya daha fazla pattern oluşturan asinustan meydana gelir. Tanı yapısal ve sitolojik bulguların kombinasyonuna bağlıdır. Işık mikroskopunda görülen özellikler tanı için genellikle yeterlidir. Fakat nadir olgularda immunhistokimyasal inceleme yararlı olabilir (8). Prostat kanserleri prostatın asiner hücrelerinden doğan adenokarsinomdur. Prostat bezi normal olarak, 50–70 yaşlar arasında atrofiye uğrar. Malign transformasyonun atrofik veya postatrofik bezlerden geliştiği düşünülüyor iken, Mc Neal' in çalışmalarında ise premalign lezyonların genelde daha genç dokulardan ve daha az olasılıkla postatrofik geliştiği gösterilmiştir. Karsinomanın gelişimi aktif bezlerden oluşmakta olup, androjen stimülasyonun etkisi altındadır. Atopi ve hiperplazik değişiklikler prostatik bezlerde bulunabilir. İntraduktal displazi veya prostatik intraduktal neoplazi premalign lezyonlardır. İntraduktal neoplasia, prostat kansinomalı hastaların üçte birinde, selim prostat hiperplazili hastaların % 4' ünde görülür.

PCa, prostat asiner hücrelerinden kaynaklanan adenokarsinom olmakla birlikte %70' i periferik, %15-20' si merkezi, %10-15' i transizyonel zondan

gelişmektedir. PCa' nin çoğu çok merkezlidir ve heterojen bir yapıya sahiptir. Yapısal özellikleri ise küçük veya orta büyütmeye değerlendirilir, asinusların ölçüleri, şekilleri ve lümenlerindeki değişiklikler incelenir (8). Bez oluşturan karsinomlarda, glandlar prostat dokusuna göre daha kalabalık olarak izlenir. Prostat adenokarsinomunda glandlar tipik olarak gelişigüzel bir şekilde büyür. Bezler birbirlerine dik olarak yerleşir ve infiltratif (nüfuz etme –sızma) sürecin bir göstergesi olarak düz kas hücre demetleri ile düzensiz olarak ayrılır. İnfiltratif yapının diğer bir paterni büyük benign bezlerin arasında küçük atipik bezlerin yerleşmiş olmasıdır (65). Glandular diferansiyasyonun kaybı, kribriform (damarlar-delikli) şekilli formasyonlar, birleşmiş bezler, şekli bozulmuş bez yapıları ile benign bezler arasındaki ayırım, yapısal örneğe dayalı olarak daha belirgin hale gelir. İndiferansiye prostat kanseri ise solid adalar, hücre kordları ve izole tek tek hücrelerle karakterizedir (20). Morfolojik olarak; prostat kanseri histolojik derecede yalnızca heterojeniteyi ortaya çıkarmakla kalmaz, prostatın çok odaklı histogenezini de ortaya koyar. Bazı durumlarda, bu heterojenite birçok tümör odağının zamanla birikmesi ve birbirini tetikle-mesi sonucu olabilmektedir. Bir veya daha fazla spesifik genetik özelliğin ka-lıtımının prostat kanserine neden olduğunu ortaya koymak zor olmaktadır.

Prostat kanserinin %10' undan azı kalıtsal olmakla birlikte; çoğu prostat kanseri sporadik olarak ortaya çıkmaktadır. Bu durum farklı genetik meka-nizmaların etkisi ve genetiksel olarak kontrol edilen multipl faktörlerle sporadik tümörlerin evolusyonunu içerdiğini göstermektedir (21).

1.2.2.1.1. Genetik Temel

Genetik temelin kanıtları, etkilenen 1. derece akrabalar ve prostat kanseri teşhisindeki yaşları ile prostat kanseri gelişme riski arasındaki lineer ilişkidir. İkiz çalışmaları ile genetik pozisyon hakkında daha ileri destek bulunmuştur.

PCa' nın %9 oranında önemli risk faktörü hereditedir. Birinci derecede akrabalarda risk ikiye katlanmaktadır. Birinci derecede yakınlarda iki veya daha fazla PCa var ise risk 5–11 kat artmaktadır. Buna bağlı olarak prostat kanseri riskinin ailevi olarak arttığı gösterilmiştir. Babalarında ya da erkek kardeşlerinde prostat kanseri olan erkelerin bu kansere yakalanma risklerinin oldukça arttığı gösterilmiştir (17). Ayrıca, prostat kanserinin teşhis edilme yaşının gençleşmesi ile birlikte kardeşlerde ya da aile bireylerinde prostat kanserine yakalanma riskinin de arttığı gösterilmiştir. Bu relatif riskin, 70 yaşında prostat kanserine yakalanmış bir aile yakını olan erkekte 4 kat arttığı gösterilmiştir. Aynı risk 60 yaş için 5 kat, 50 yaş için ise 7 kat olarak hesaplanmıştır. Meme ya da kolon kanserine yakalanmış olan kişilerin aile yakınlarında da prostat kanseri riskinin daha fazla olduğu belirlenmiştir(17).

1.2.2.1.2. Etnik Özellikler ve Çevresel Faktörler

PCa insidansı dünya çapında büyük değişkenlik göstermekle birlikte uzak doğuda yaşayanlar batı ülkelerinde yaşayanlara göre daha az yakalanma riskine sahiptirler. Her ne kadar özellikle sağlık sistemindeki fark olmak üzere bazı farklar mevcutsa da aslında Japonlar' daki düşük PCa insidansının, diyet ve yaşam tarzı gibi faktörlerle etkileşimi etkili olmaktadır.

Tüm bu farklılıklar, PCa prekürsörleri olan örneğin; prostatik intraepitelyal neoplazinin (PIN) tüm dünyada benzer sıklıkta görülmesi ile daha ilginç hale gelmiştir (30).

PCa gelişiminde çevresel ve yaşam biçimi faktörlerine olan ilgi, göç çalışmaları ile daha da belirginleştirilmiştir. En fazla PCa insidansının Afrikalı Amerikalılarda olması, bu hastalıktaki etnik temeli vurgulamaktadır. Androjen metabolizmasındaki farklılıkların bu gözlemden sorumlu olduğu düşünülmüştür. ABD' de yaşayan siyah derili erkeklerde prostat kanseri insidansının ve mortalitesinin beyazlara göre daha yüksek olduğu ve bunlarda metastatik hastalığın daha fazla olduğu bilinmektedir. Yaşam süresince PCa teşhis edilmesi ve prostat kanserinden ölme riski beyazlarda % 15,53 ve % 2,95 iken aynı rakamlar ABD' nde yaşayan Afrika kökenlilerde % 18,26 ve % 4,78 olarak tespit edilmiştir (29, 30).

Otopsilerde prostat kanseri insidansı dünyanın çeşitli bölgelerinde önemli bir farklılık göstermezken, klinik olarak saptanan PCa' nın prevalansı bölgelere göre farklılık arzeder. Coğrafi bölgeler bakımından en sık ABD ve Kuzey Avrupa' da, en az Japonya ve güney doğu Asya' da görülmektedir. PCa riskini azaltmak için yeterli kanıt olmamasına karşın hayvansal yağların azaltılması, tahıl, sebze, meyve ve kırmızı şarap gibi yiyecek ve içeceklerin artırılması özellikle ailede PCa olanlara önerilebilmektedir (42).

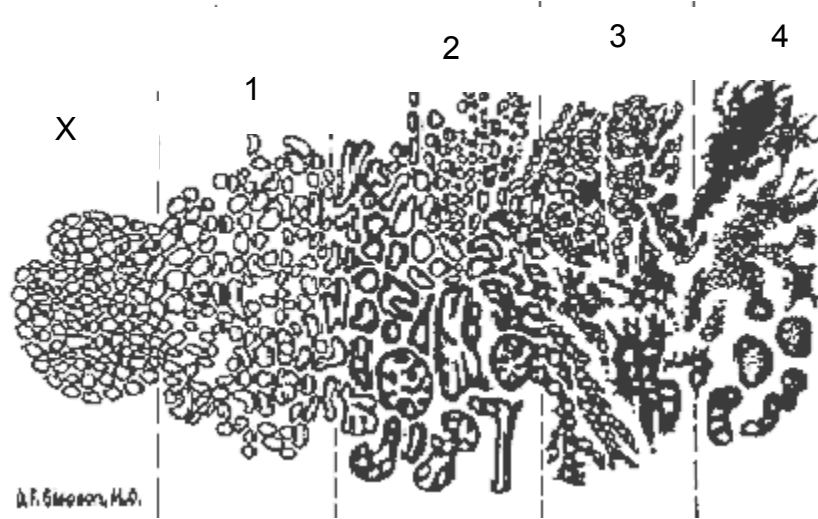
1.2.2.1.3. Prostat Kanseri Skoruması

PCa için Skorumama ve Evreleri şeklinde 2 tip değerleme kullanılmaktadır.

Skorlama; kanser hücrelerinin normal hücrelerle kıyaslandığında ne kadar farklı görüldüğünü ortaya koyar. Tümör hücrelerinin ne kadar agresif olduğunun bir göstergesidir.

1.2.2.1.3.1. Gleason Skoru

Prostat kanserinin derecelendirilmesinde en sık kullanılan sistem *Gleason* sistemidir. Bu sistemde, 1 den 5' e kadar kanserin normal prostat bez dokusunu ne kadar iyi taklit ettiğine göre derecelendirme yapılmaktadır. Prostat kanserlerinde değişik derecelere sahip değişik alanlar bulunduğu için, kanserin çoğunluğunu oluşturan iki ayrı alana iki ayrı derece değeri verilerek bu değerler toplanır ve 2 ile 10 arasında bir Gleason skoru elde edilir. 2–4 arasındaki skorlar düşük, 5–6 arasındaki skorlar orta derece, 7–10 arası skorlar yüksek olarak değerlendirilir (17). Skor yükseldikçe, kanser dokusunun büyümesi ve yayılım hızı artar ve sağkalımın süresi kısalmaktadır. Gleason skoru yüksek olan hastaların kanserleri tanı anında olasılıkla prostat dışına yayılmıştır. Bu nedenle Gleason skorlaması tedavi seçenekleri ve tedavi öncesi yapılacak ek testler konusunda yararlı bilgiler sağlamaktadır (45).



Şekil 4: Prostat kanseri histolojik evreleri (65)

(Gx: Grade değerlendirilemiyor **G1:** İyi diferansiye (Gleason 2–4) **G2:** Orta derecede diferansiye (Gleason 5–6) **G3–4:** Az diferansiye/ indiferansiye (Gleason 7–10)) (21)

1.2.2.1.3.2. TNM Sınıflaması

Evreleri ise kanserin büyüklüğü ve lokasyonu ile ilgilidir. TNM Tümör- Nodül- Metastaz evrelerinde N değeri etkilenmiş lenf nodüllerini (0–3 arası), M değeri ise tümörün uzak bir metastazının mevcudiyetini (0–1 arası) gösterir (46).

Primer Tümör (T)

Klinik

Tx: Primer tümör değerlendirilemiyor

T0: Primer tümör bulgusu yok

T1: Klinik olarak görülebilen veya palpe edilebilen tümör yok

T1a: Tümör incelenen dokunun %5 veya daha azında, insidental olarak tespit edilir

T1b: Tümör incelenen dokunun %5' inden fazlasında insidental olarak tespit edilir

T1c: Tümör iğne biopsisi ile tespit edilir (Yükselmiş PSA nedeniyle)

T2: Tümör prostat içinde sınırlı

T2a: Bir lobun yarısı veya daha azını tutmuş

T2b: Bir lobun yarısından daha fazlasını tutmuş

T2c: Her iki lobu tutmuş

T3: Tümör prostatik kapsül dışına yayılmış

T3a: Ekstrakapsüler yayılım (unilateral veya bilateral)

T3b: Seminal vezikül yayılımı

T4: Tümör seminal vezikülden başka diğer komşu organlara; mesane boynu, eksternal sfinkter, rektum, levator kaslar ve / veya pelvik duvara invaze veya fiske

Patolojik (pT)

pT2: Organa sınırlı

pT2a: Unilateral, bir lobun yarısı veya daha azını tutar

pT2b: Unilateral, bir yarısından fazlasını tutar

pT2c: Bilateral hastalık

pT3: Ekstraprostatik yayılım

pT3a: Ekstraprostatik yayılım

pT3b: Seminal vezikül invazyonu

pT4: Mesane, rektum invazyonu

Patolojik T1 sınıflandırması yoktur. pT3a' da pozitif cerrahi sınır, rezidüel mikroskopik hastalık ile gösterilmelidir.

Bölgesel Lenf Nodları (N)

Klinik

Nx: Bölgesel lenf nodu tutulumu değerlendirilemiyor

N0: Lenf nodu metastazı yok

N1: Lenf nodu metastazı

Patolojik

pNx: Bölgesel lenf nodları örneklenmemiş

pN0: Pozitif bölgesel lenf nodu yok

pN1: Lenf nodlarına metastaz

Uzak Metastaz (M)

Mx: Uzak metastaz değerlendirilemiyor

M0: Uzak metastaz yok

M1: Uzak metastaz

M1a: Bölgesel olmayan lenf nodlarına metastaz

M1b: Kemik metastazı

M1c: Diğer alan (lar), beraberinde kemik hastalığı olur veya olmaz.

Histopatolojik Grade (Şekil 4) (21)

Gx: Grade değerlendirilemiyor

G1: İyi diferansiye (Gleason 2–4)

G2: Orta derecede diferansiye (Gleason 5–6)

G3–4: Az diferansiye/ indiferansiye (Gleason 7–10)

1.2.2.1.4. PSA

Prostata özgü antijen (PSA) seviyesi tanı konmasında oldukça önemli spesifik bir markırdır. Kanda bakılan ve prostat bezine özgü bir protein olan PSA prostat kanserinin tanısında yardımcı tetkiklerden biri olmaktadır. Prostat kanseri açısından kabul edilebilir duyarlılığa sahip olmasına rağmen özgüllük açısından yetersizdir (36). PSA' nın kullanım alanları prostat kanseri tanıma, erken tanı, evreleme ve tedavi sonrası izlemdir.

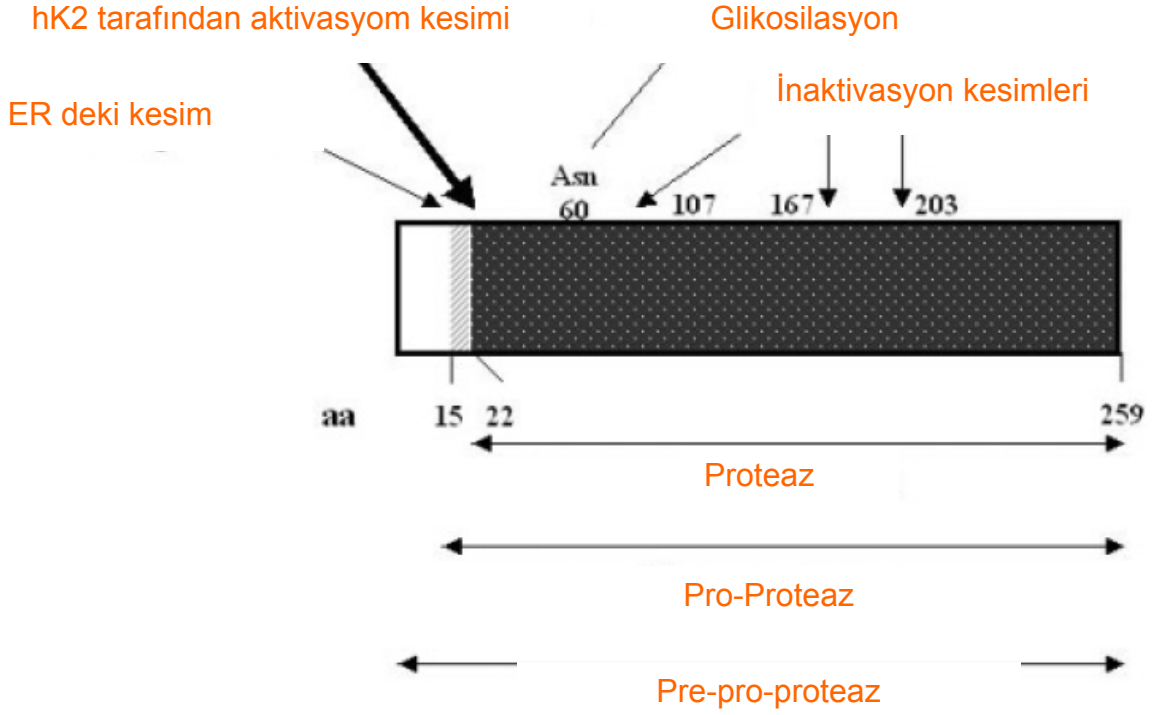
PSA ilk kez 1971 yılında seminal plazmada tanımlanmış, 1980 yılında serumda ölçülmüş ve son olarak 1994 yılında prostat kanseri tanımlamasında kullanım onayı almıştır (36).

PSA, 33 kDa ağırlığında, bir glikoprotein olup, kallikrein gen ailesinden olan 240 amino asitlik bir serin proteazdır (şekil 5). Prostatik epiteliyal hücreler, bir kallikrein-benzeri serin proteaz olan ve seminal plazmanın normal komponenti olan PSA salgılamaktadır. 19. kromozomda (19q13.4) lokalize olup androjen ile düzenlenen gen ekspresyonu mevcuttur. Erişkin bir erkekte normal sınırı 0–4 ng/ml olup biyopsi ile kanser yakalanma oranı yaklaşık %25-30'dur (36). Diğerlerinde PSA yüksekliğinin en olası nedeni BPH (iyi huylu prostat büyümesi)' ye bağlı prostat hacmindeki artıştır (11). PSA dansitesi Benson ve ark. tarafından BPH' yi prostat kanserinden ayırmak için geliştirilmiştir (5). PSA' nın bu sınırın üzerine çıkması prostat kanserini düşündüren bir bulgudur. PSA' nın tek başına yüksek olması kesin tanıya götürmemektedir (36). Bazen prostatın aşırı büyüdüğü durumlarda (BPH) ya da şiddetli prostat enfeksiyonlarında da PSA değeri yükselebilmektedir. Ayrıca PSA değerleri eşik değerde kalan olgularda veya PSA' nın yükselmediği olgularda diğer invaziv tanı yöntemleri uygulanmaktadır (42).

PSA' nın keşfinin ardından, formalinde fikse edilip parafine gömülmüş dokularda, poliklonal veya monoklonal antikorlar şeklinde prostatik diferansiyasyonun immunhistokimyasal belirleyicisi olmuştur. PSA, bütün prostatik zonlardaki nonneoplastik prostatik glandüler hücrelerin sitoplazmasında lokalize olur. Fakat ne bazal hücreler, seminal vezikül / ejakulatuar duktus glandüler hücrelerde ne de ürotelyal hücrelerde ekspresyonu izlenmez (20, 69).

Prostatik glandular hücrelere nispeten yüksek spesifitesinden dolayı çoğu prostatik adenokarsinom için yararlı bir belirleyicidir. İntratümöral ve intertümöral heterojenitesi sıklıkla izlenir. Çoğu çalışmada, artan tümör dereceleri ile ters orantılı olarak PSA' nın ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir (69).

PSA, prostatı sekonder tutan, diğer neoplazmlardan ayırt edilmesinde yararlı olan bir parametredir (69). PSA aynı zamanda prostat karsinomunun benign benzerlerinden, seminal vezikül, ejakülatuar duktus, nefrojenik adenom, mezonefrik duktus kalıntıları, Cowper glandları, granülomatöz prostatit ve malakoplaki'den ayırımını sağlar (69). Yüksek dereceli adenokarsinomların küçük bir kısmında PSA negatif olarak izlenir. Bazı prostatik adenokarsinomlarda, androjen yoksunluk ve radyasyon tedavisi sonrasında PSA immunreaktivitesi kaybolur. Prostat spesifik membran anti-jen (PSMA) ve androjen reseptörleri, bazı yüksek dereceli, PSA immunnegatif prostatik adenokarsinomlarda immunreaktivite gösterebilir (69).



Şekil 5: PSA yapısı ve işlenmesi (65)

1.2.3. Serbest (cell-free) DNA

Potansiyel bir markır olarak önerilen dolaşımdaki hücre dışı nükleik asitler, hızla yeni araştırmaların gelişimini sağlamaktadır. Klinik durumların non-invaziv tanısı için serbest nükleik asitlerin tespiti önem taşımaktadır (44, 61). Dolaşımda bulunan DNA'nın analizi çeşitli kanser formlarının tanımlanmasında önemli olmaktadır. Çeşitli kanser tiplerinde, metastaz ve rekürrenste tümör orijinli serbest DNA yüksek oranlarda saptanmaktadır (32). Günümüzde yapılan çalışmalar serbest DNA seviyesinin, kanserde yeni bir tanı markırı olacağını göstermektedir (32, 37,51). Prostat kanserinin gelişim sürecinin belirlenmesinde serbest DNA'nın önemli bir rolü olduğu keşfedilmiştir. Serbest DNA'nın alternatif bir tümör spesifik markır olarak araştırılmasına yönelik sınırlı sayıda çalışma mevcuttur.

Kan dolaşımında iki çeşit DNA bulunmaktadır. Birincisi lökositlerden elde edilen DNA'dır. Diğeri ise genellikle kanser hastalarının serum ve plazmalarında yüksek oranda bulunan serbest DNA'dır. Tümör DNA'sının tüm karakteristikleri serbest DNA'da da bulunmaktadır. Bunun apoptoz ya da nekroz sonucu dolaşıma geçtiği düşünülmektedir (73). Sağlıklı bireylerden sadece düşük oranda serum veya plazma DNA gözlemlenirken, enfeksiyon, travma, sepsis, inme ve otoimmün hastalıklar gibi benign olgularda yüksek konsantrasyonlarda tanımlanmıştır (3, 37, 70, 72,). Bu tür olgularda apoptoz ya da nekroza bağlı yüksek hücre ölüm oranı ve bunun sonucu serbest DNA fragmantlarının oluşumu gözlemlenmektedir. Dolayısıyla; serbest DNA oligonükleozomların bir formu olup hücre ölüm proseslerinin genel bir markırı olarak görülmektedir (28, 73).

Ziegler ve ark.ları yaptıkları çalışmada doku yıkımı ile sonuçlanan hastalıklarda serbest DNA varlığı ortaya saptamış ve serum DNA'nın dokusal bozulmalardan orijinlenebileceği öne sürmüşlerdir (73). Leon ve ark. ları kanser hastalarının serumlarındaki DNA varlığını rapor etmişlerdir. İlk olarak; lupus eritromatozlu hastalardan anti-DNA antikor sistemine dayanan radyoimmünoassay (RIA) ile DNA kantifiye edilmiştir (35). Sağlıklı kontroller ile karşılaştırıldığında kanser hastalarının % 50 sinde DNA seviyelerinin yüksek olduğu gözlemlenmiştir (56).

Kanser hastalarında tümör orijinli plazma DNA'nın ilk ortaya çıkışı 80'lerin sonuna denk gelmektedir.

Kanser hastalarının plazmalarında artmış serbest DNA, azalmış kromatin stabilitesi ve spesifik onkogenlerin, tümör süpresör genlerin ve

mikrosatellit değişimlerin varlığı gibi tümör DNA' sının tüm karakteristik özelliklerini sergilemektedir (1).

Yapılan çalışmalarda, plazmadan elde edilen DNA'nın 0,5–21 kb büyüklüğünde ve çift zincirli formda olduğu gösterilmektedir. Plazmadaki DNA uzunluğunun ise 0,2–13 µm olduğu saptanmıştır (73). Sağlıklı bireylerin serum serbest DNA oranı 10 ile 30 ng/ml arasında saptanmıştır. Diğer yandan kanser hastalarının plazmalarında yüksek oranda serbest DNA fragmantleri bulunduğu tespit edilmiştir. Örneğin; Shapiro ve arkadaşlarının bir çalışmasında pankreas kanseri hastalarının % 90'ında serumda serbest DNA miktarının 100 ng/ml den yüksek olduğu görülmüştür (41). Serbest DNA, genellikle protein molekülleri ile çevrili bulunmaktadır. Bu durum çoğu serbest DNA' nın degrade olmuş hücrelerden veya genomik DNA' nın enzimatik yıkımından oluşan nukleozomal elementlerin saliverilmesi sonucu oluştuğunu göstermektedir (37, 62, 63).

Serbest DNA'nın orijini için bir diğer alternatif mekanizma da DNA'nın aktive lenfositlerden salınımıdır. Bu olasılık ayrıntılı bir şekilde açıklanmamış olmasına rağmen dolaşımdaki DNA' nın bu hücrelerden gelmiş olabileceği ileri sürülmektedir (6,55). Serbest DNA, çok düşük bir oranda da sağlıklı bireylerde gözlemlenmektedir. Sağlıklı bireylerdeki serbest DNA' nın hematopoetik orijinli olduğu gösterilmiştir. Kemik iliği transplantasyonunda, erkekte kemik iliği transplante edilmiş olguların serum ve plazmasında Y kromozom dizisi gösterilmiş ve dolaşımdaki serbest DNA' nın baskın bir şekilde donör orijinli olduğu bulunmuştur. Y kromozomundaki SRY geni kantitasyonu serum ve plazmada benzer konsantrasyonlarda çıkması meka-

nizması hala anlaşılammış olan aktif salınım bir kanıtı olarak ileri sürülmüş-tür (22).

Non-steroidal ilaç kullanımında ve bazı antibiyotiklerin etkisiyle serbest DNA seviyesinde bir artış olabilmekte fakat bu artış sınırlı olmaktadır.

Serbest DNA, PCR analizlerinde kullanılabilir. Saflaştırılmış serbest DNA örneklerinin çoğaltılmış konsantrasyonlarını birçok çalışma için farklı avantajı sunmaktadır.

Aynı olgulardan alınan serum örneklerinde serbest DNA seviyelerinin plazmaya oranla daha yüksek bulunduğu ortaya konmuştur (2). Bunun pıhtılaşma işlemlerinin bazı hücrelere zarar vermesi sonucu serumda, daha yüksek oranda serbest DNA bulunmasına neden olduğu düşünülmektedir.

1.2.3.1. Tarihçe

Dolaşımdaki serbest DNA ilk olarak 1948 de Mandel ve Metais tarafından insan plazmasında keşfedilmiştir (39).

Uzun bir zaman boyunca serbest DNA çalışmaları romatoid artrit ve sistemik lupus eritromatoz gibi otoimmün hastalıklara odaklanmış ve hastaların serumlarında yüksek oranda varlığı ortaya çıkarılmıştır. Leon ve arkadaşları tarafından 1977' de ise ilk defa radyoterapi gören kanserli hasta serumunda çalışılmış ve artmış DNA konsantrasyonunun tümör markırı olarak kullanılabilirliğini tanımlamışlardır (35). 1989' da kanserli hasta plazmasında neoplastik karakteristik olarak serbest DNA ortaya konmuştur (54). Birkaç yıl sonra da tümör kökenli (türevi) onkogen mutasyonları değişik tip kanserli

hastaların (pankreatik kanser, myelodisplastik sendrom, akut myeloid lösemi) serum ve plazmalarında ortaya konmuştur. Bu bulgular kanser hastalarının serum ve plazmalarından tumor türevi DNA izolasyonunu yapılabilir kılmıştır.

1.2.3.2. SRY (Sex-determining Region Y gene)

İnsan Y kromozomu 60 milyonun üzerinde nükleotid içermesine karşın diğer kromozomlara oranla gen sayısı en az kromozomdur. Y kromozomu erkek karakteristik özelliklerinin genetik belirleyicisi olarak rol oynamaktadır. İnsan Y kromozomu birçok ilginç biyolojik özellikler göstermekle birlikte sınırlı sayıda işlevsel gen taşımaya karşılık sık tekrarlayan elemanlar içermektedir (18). Erkek cinsini belirleyen Y kromozomu 114 gen içermektedir. Bu kromozom üzerinde bulunan SRY geni erkek iç ve dış genital organlarının şekillenmesinde rol oynamaktadır. Embriyonun ilk 8 haftasında cinsiyetsiz olan üreme hücreleri, bu gen sayesinde testis dokusuna dönüşerek testosteron salgılamaya başlamaktadırlar. Bu da erkeğin cinsinin gelişimini sağlamaktadır (19).

SRY, testislerde ifade edilen bir proteini kodlamaktadır. Y kromozomu üzerinde bulunan, cinsiyet belirleyici bölge olarak erkek cinsiyetini belirmesini sağlar. 204 amino asitlik nuklear proteini kodlayan insan SRY geni merkez diziyeye özgü yüksek hareket yeteneğine sahip (high mobility group (HMG)) DNA bağlayıcı bir domain içermektedir.

1.2.3.3. Telomer ve Telomeraz Enzimi

Normal ve malignant hücrelerin proliferatif kapasitelerinin kontrolü, telomer uzunluğu ve telomeraz aktivitesi ile ilişkili olmaktadır.

Telomerler, ökaryotik kromozomların uçlarında yer alan ve çok sayıda "TTAGGG" dizi tekrarı içeren heterokromatik yapılar olup kromozom stabilitesinde, gen ekspresyonunda, kromozomal replikasyonda, tümör oluşumunda, yaşlanmada ve hücre bölünmesinde rol aldıkları bilinmektedir. Ökaryotik hücrelerdeki DNA replikasyonunda, kalıp DNA'nın 3' ucunun normal replikasyon mekanizmasıyla kopyalanamamasına "replikasyon sonu problemi" denmektedir ve bunu kompanse edecek moleküler mekanizmaların yokluğunda, her hücre bölünmesinde kromozomal DNA'nın 3' ucunda, yaklaşık 50–200 nükleotidlik kayıp olmakta ve sonuçta "hücre yaşlanma" gelişmektedir. Telomeraz (telomer terminal transferaz), kromozomal uçlardaki "TTAGGG" tekrarlarının sentezinden sorumlu olan ribonükleoprotein yapıda özel bir DNA polimerazdır (47). Embriyonik hücreler ve erişkin kök hücrelerinde aktif olan bu enzim, normal somatik hücrelerde saptanmamakta, immortal (ölümsüz) kanser hücrelerinde ise yeniden aktive olmaktadır. İnsan telomeraz enziminin bilinen 3 komponenti mevcuttur:

- 1) İnsan telomerazı RNA komponenti (hTR)
- 2) İnsan telomerazı reverse transkriptazı (hTERT)
- 3) İnsan telomerazı protein komponenti (TP1)

"hTR" nin, telomer DNA' sına komplementer olan ve 5'-CCCUAAA-3' tekrarlarını içeren 8–30 bazlık bir bölümü sentezde kalıp olarak kullanılmak-

tadır. Telomerazın katalitik altbirimi olan "hTERT" ise bu diziye komplementer olan "GGTTAG" dizi tekrarlarını sentezlemekte ve "G" den zengin olan 3' ucuna eklemektedir. RNA kalıbının, yeni sentezlenen telomerik dizinin 3' ucuna doğru kaymasıyla, DNA polimeraz bu diziyi kalıp olarak kullanarak karşı komplementer zinciri tamamlar. Telomerazın RNA alt birimine bağlanan "TP1" in, enzimatik aktivitenin regülasyonunda rolü olabileceğini ileri sürmektedir (65).

1.2.4. PCR

DNA zincirinin önceden belirlenen bir bölgesini çoğaltmak için kullanılan Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR), moleküler genetik alanında devrim niteliği taşıyan bir yöntemdir. PCR, DNA molekülünde özgün hedef dizilerin (3000 baz çiftinden kısa) in vitro çoğaltılması esasına dayanmaktadır. PCR' da bir bölgeyi çoğaltabilmek için hedef DNA' nın nükleotid dizisi hakkında bazı bilgiler gerekir (68). Bu bilgi, DNA' ya bağlanacak olan iki oligonükleotid primerin sentezi için kullanılmaktadır. Bu primerler, çoğaltılacak tek zincirli DNA molekülündeki tamamlayıcı dizilerle hibridize olur. Isıya dayanıklı bir DNA polimeraz olan Taq polimeraz, DNA' daki hedef bölgenin sentezini sağlamaktadır (13). Kalıp DNA temiz olmak zorunda değildir. Kurumuş kan ve semen gibi adli tıp örnekleri, tek bir saç teli, uzun süre saklanmış tıbbi örnekler, mumya kalıntıları ve fosil gibi değişik kaynaklardan genomik DNA elde edilebilir.

PCR reaksiyonunda üç temel aşama vardır. Çoğaltılmış DNA dizisinin miktarı teorik olarak bu üç aşamanın tekrarlanma sayısına bağlıdır.

1. Denatürasyon

Çoğaltılacak DNA denatüre edilerek tek zincirli hale getirilir. Çift zincirli DNA, tek zincirli hale gelene kadar ısıtılır (90-95 °C'de yaklaşık 5 dakika). Bu süreçte enzimler çalışmaz.

2. Annealing (Primerlerin Bağlanması)

Cihazın sıcaklığı 50–70 °C'ye düşürülür ve primerlerin tek zincirli DNA'ya bağlanması sağlanır. Bu primerler 15–30 nükleotit uzunluğunda yapay oligonükleotitlerdir. Çoğaltılacak olan DNA dizisinin uçlarındaki tamamlayıcı baz dizisine özgün olarak bağlanır. Bu primerler kalıp DNA'nın sentezi için başlangıç noktası olarak görev yaparlar.

3. Extension (Zincirin Uzaması)

Sıcaklığa dayanıklı bir DNA polimeraz olan Taq polimeraz, DNA sentezi 70–75 °C' de gerçekleştirilir. Polimeraz enzimi, nükleotitleri 5' den 3' ne doğru ekleyerek primerlerin uzamasını sağlar ve hedef DNA'nın iki zincirli bir kopyasını oluşturur. Doğru pozisyon almamış primerler ve kalıp DNA arasındaki bağlar bu sıcaklıkta ayrılırlar.

Bu üç basamaktan oluşan reaksiyon dizisi, bir döngü olarak ifade edilir. PCR bir zincir reaksiyonudur; çünkü yeni DNA zincirlerinin sayısı her döngüde iki katına çıkar ve yeni zincirler bir sonraki döngüde kalıp görevi görürler. Bir döngü 4–5 dakika sürer ve istenildiği kadar tekrar edilir. 25–30 döngü sonunda DNA miktarında yaklaşık 1 milyon kez artış olur.

1.2.4.1. Real-Time PCR

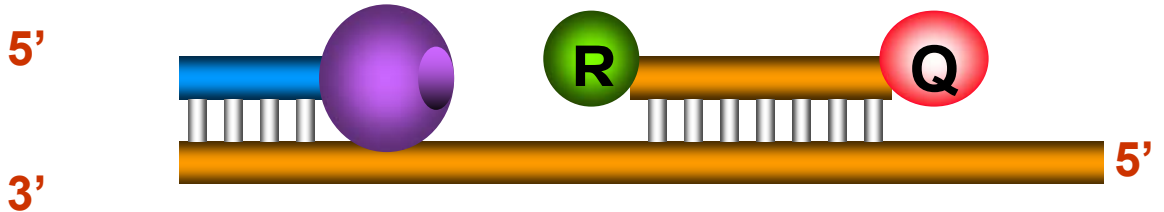
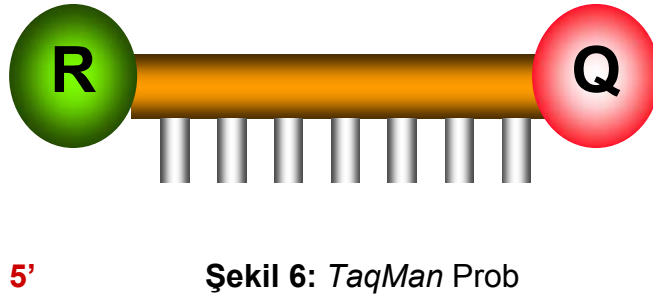
Son yıllarda PCR reaksiyonlarında sıcaklık döngüleri sağlamak için kullanılan cihazların (thermocycler) hassas ölçüm aletleriyle birleştirilmesi, real-time PCR olarak adlandırılan yeni bir yöntemin gelişmesine neden olmuştur. Real-time PCR, geleneksel PCR' ın uygulama alanlarını artırırken PCR' la ilişkili pek çok laboratuvar sorununa da çözüm getirmiştir. Bu yöntem sayesinde DNA ve RNA örnekleri kalitatif ve kantitatif olarak kısa sürede analiz edilebilmekte, çok sayıda örnek son derece az kontaminasyon riskiyle güvenle çalışılabilmektedir (25).

Real-time PCR' da ürünlerin analizi reaksiyon sırasında yapılmaktadır. Bu nedenle, agaroz jel elektroforezi, DNA bantlarının mor ötesi ışık altında görüntülenmesi gibi işlemlerin uygulanmasına gerek kalmamaktadır (67). Real-time PCR ürünlerinin kalitatif ve kantitatif analizlerinde, diziyeye özgün olmayan floresan boyalardan ya da diziyeye özgül problemlerden yararlanılmaktadır. Böylece sonuçlar anında alınmakta, kontaminasyon riski azalarak tüm işlemler sıcaklık döngüleri başlayınca otomatik olarak devam etmektedir.

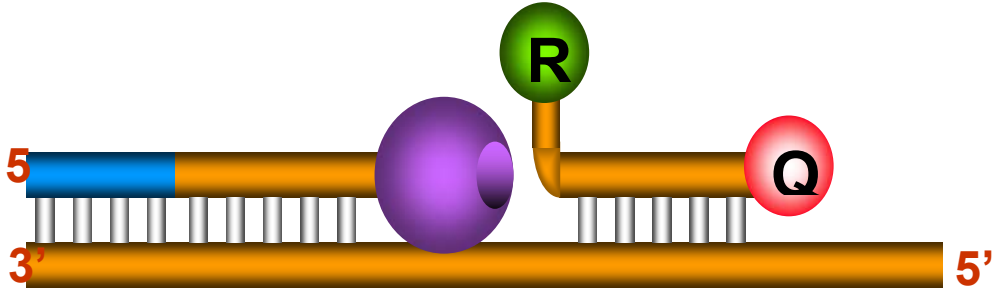
1.2.4.2. TaqMan Yöntemi

Taqman sisteminde, 5' ve 3' uçlarından florokrom maddelerle işaretli prob kullanılmaktadır. Probin 5' ucunda raportör florokrom (6-karboksiflorescein=6-FAM), 3' ucunda ise baskılayıcı florokrom (6-karboksitetrametil-rodamin=TAMRA) bulunmaktadır (Şekil 6). Prob tek sarmal hale getirilen hedef molekül üzerinde, primerlerin bağlanma bölgesinin arasında

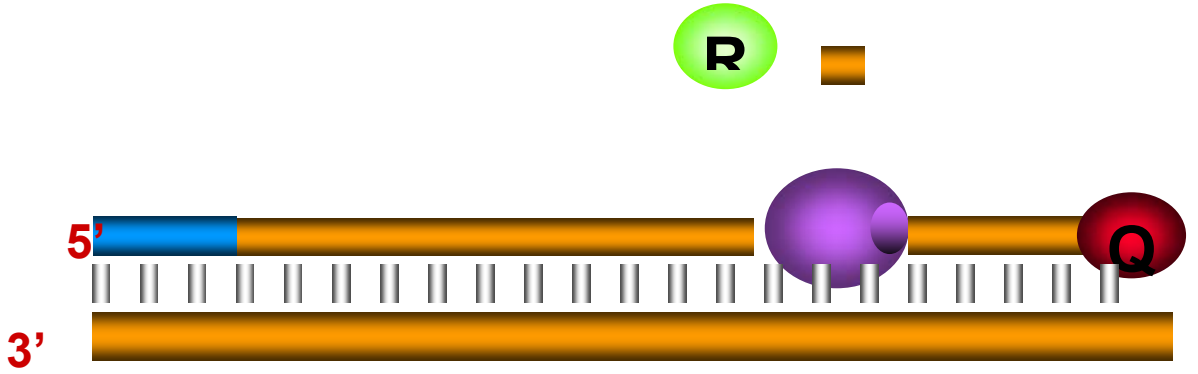
kalan yere bağlanmaktadır (Şekil 7). Prob-hedef molekül arasındaki hibridizasyon devam ettiği sürece raportör florokrom maddenin sinyal oluşturması, 3' uçtaki baskılayıcı florokrom tarafından engellenmektedir. Primerlerin hedef nükleik aside bağlanmasını takiben başlatılan primer uzaması probun bağlandığı noktaya kadar geldiğinde, sentezin devam edebilmesi için *Taq* DNA Polimeraz enzimi 5'→3' ekzonükleaz aktivitesini kullanarak probu 5' uçtan yıkmaya başlar (Şekil 8). Böylece rapörtör florokrom serbest hale geçer ve sinyal oluşturur (Şekil 9). Her siklusta üretilen amplicon miktarına paralel olarak sinyal şiddeti de artmaktadır (Şekil 10).



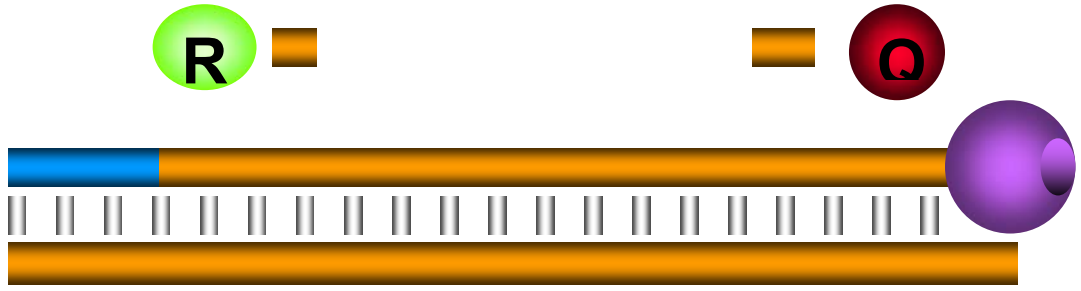
Şekil 7: PCR sırasında prob hedef DNA dizisiyle hibridize olur



Şekil 8: Prob ekstansiyon sırasında polimeraz enzimi ile uzaklaştırılır.



Şekil 9: Reporter baskılayıcıdan polimeraz enziminin 5' 3' nükleaz etkisi ile ayrılır.



Şekil 10: Serbest kalan reporter fluoresan ışık yayar. Her siklus da üretilen amplikon miktarına paralel olarak sinyal şiddetide artmaktadır.

1.2.4.3. Serbest RNA

Serbest DNA gibi serbest RNA da hem plazmada hem de serumda bulunmaktadır ve bazı kanser hastalarının serumlarında özellikle yüksek oranda olmaktadır (34). Serum ve plazmada yüksek oranda ribonükleazlar bulunduğundan dolayı serbest RNA hızlı bir şekilde degrade olmakta ve amplifikasyonu pek başarılı olmamaktadır.

Hücreden ekstraselüler RNA' nın serbest bırakılması ile ilgili kapsamlı bir delil bulunmakta ve hücreden kan dolaşımında bırakılan RNA' nın protein ya da fosfolipidlere bağlı olduğu ve bundan dolayı kısmi olarak ribonükleazlardan korunduğu ileri sürülmektedir (33).

Çeşitli araştırmalar, kanser için serbest RNA' nın kullanımının mümkün olabileceğini göstermektedir. Fakat serbest RNA ile ilgili araştırmaların yüksek sayıda olguda yapılması ve analiz yönteminin sensivite ve spesifite çok dikkatli değerlendirilmesi gerektiği ileri sürülmektedir.

BÖLÜM-II

2.1. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1.1. Kontrol ve Olgu Grubu

Olgu grubu, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı'nda, Kasım 2005 – Temmuz 2006 yılları arasında, prostat kanseri ön tanısı / tanısı alınmış olgulardan oluşturuldu. Çalışma grubunu oluşturan 40 olgunun yaş ortalaması $61,95 \pm 8,14$ idi.

Kontrol grubu aralarında akrabalık ilişkisi bulunmayan 6 sağlıklı olgudan oluşturuldu. Kontrol grubunun yaş ortalaması $48,25 \pm 9,71$ idi.

Prostat tanılı olguların patolojik tanıları, Gleason skorları, hastalıklarının evreleri, metastaz varlığı ve PSA değerleri, kayıt edildi.

Çalışma protokolümüz Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Etik Kurulu tarafından 05.12.2005 tarihli 05–7–31 sayılı kararlar ile onaylandı. Tüm olgulara çalışma hakkında bilgi verilmiş ve gönüllü olur formu imzalatılmıştır.

2.1.2. Plazmadan Serbest DNA İzolasyonu

Çalışma grubumuzu oluşturan olgulardan 8 ml periferik kan EDTA'lı tüplere alınmıştır. Plazmayı izole etmek için 3000 rpm de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Üstteki plazmanın 4 ml' si çalışmada kullanılmak üzere kriyo tüplere alınarak -86°C ' ye kaldırılmıştır.

Kontrol ve olgu grubunun plazmalarından DNA izolasyonu için; High Pure PCR Template Preparation Kit' i (Roche Applied Science, Germany) kullanılmıştır.

High Pure PCR Template Preparation Kit İçeriği:

1. Bağlama Tamponu: 4M üre, 200 mM NaCl, 200 mM EDTA, pH 7,4, 25°C
2. Proteinaz K
3. İnhibitör Tampon: 5 M guanidin-HCl, 20 mM Tris-HCl, pH 6,6, 25°C (20 ml etanol ilave edildikten sonra kullanıldı)
4. Yıkama Tamponu: 20 mM NaCl, 2 mM Tris-HCl, pH 7,5, 25°C (80 ml etanol ilave edildikten sonra kullanıldı)
5. Elüsyon Tamponu: 10 mM Tris, pH 8,5, 25°C
6. Plazmadan serbest DNA izolasyonu için tarafımızdan geliştirilen yöntem kullanılmıştır. Bu yöntem, fenol-kloroform DNA izolasyonu ve kit ile DNA izolasyonunun bir birleşimidir.

2.1.2.1. Serbest DNA İzolasyon Protokolü

1. Dört ml plazma 15 ml' lik falkon tüpe alındı ve üzerine 2,5 ml doymuş Amonyum Asetat ilave edildi.
2. Karıştırıldıktan sonra 4500 rpm de 10 dk santrifüj edildi.
3. Süpernatant 15 ml' lik yeni falkon tüpe alındı.
4. Falkon tüpteki süpernatant miktarı kadar üzerine kloroform ilave edildi.
5. Dörtbin beşyüz rpm' de 10 dk santrifüj edildi.

6. Santrifüj sonrası süpernatant yeni bir 15 ml' lik falkon tüpe alındı.
7. Üzerine 4ml bağlama tamponu ile 4µl Proteinaz K (1mg/ml) ilave edilip pipetle resüspanse edilerek homojenizasyon sağlandı.
8. Bu karışım 72 °C de termocycler da 10 dk inkübe edildi.
9. İnkübasyon sonrası örneklerin üzerine 2 ml izopropanol eklendi ve pipetaj ile iyice karıştırıldı.
10. Örnek toplama kabı içindeki filtrelili tüpe aktarıldı ve 8.000 rpm' de 1dk santrifüj edildi.
11. Santrifüj sonrasında, örneklerin alt kısmı atılarak filtrelili kısım yeni bir toplama kabına aktarıldı.
12. Filtre üzerine 500 µl inhibitor tampon eklendi ve tekrar 8.000 rpm' de 1 dk santrifüj edildi.
13. Santrifüj sonrasında, örneklerin alt kısmı atıldı ve filtrelili kısım yeni bir toplama kabına aktarıldı.
14. Santrifüj sonrası 500 µl yıkama tamponu ilave edildi ve 8.000 rpm' de 1 dk santrifüj edildi.
15. Filtrelili tüpler yeni toplama kabına aktarıldı ve ikinci kez 500 µl yıkama tamponu eklenerek yine 8.000 rpm' de 1 dk santrifüj edildi.
16. Santrifüj sonrası, tüplerin alt kısmında biriken süpernatant uzaklaştırıldı.
17. On saniye 8.000 rpm' de santrifüj yapıldı.
18. Filtrelili tüpler, yeni Eppendorf tüplere yerleştirildi ve 72°C' de sabitlenmiş kuru ısı bloğunda bekleyen elüsyon tamponundan 50 µl ilave edilerek 8.000 rpm' de 1 dakika santrifüj yapıldı.

19. Eppendorf tüp içindeki izole edilen serbest DNA kriyo tüpe alındı ve -86°C' ye kaldırıldı.

Tablo 1: Kullanılan Cihazlar

CİHAZ	MARKASI
Derin Dondurucu (-20 ⁰ C)	Uğur
Derin Dondurucu (-86 ⁰ C)	Revco
Kuru Isı Bloğu	Eppendorf
Otomatik Mikropipetler	Finnpipet (10, 20, 100, 200, 1000 µl)
Santrifüj	Eppendorf
Santrifüj	Thermo Electrocorporatuar
Thermocycler	Thermo
LightCycler	Roche
Buzdolabı (+4 ⁰ C)	Vestel

2.1.3. Serbest DNA Kantitasyonu

2.1.3.1. Primerler

SRY ve hTERT genlerinin *TaqMan* PCR metodu ile amplifikasyonları için, genlere özgül primer dizileri ve çoğaltılan gen bölgesi içinde yer alan prob dizileri sentez ettirildi. Amplifikasyonun kantitasyonu için çoğaltılan SRY ve hTERT gen bölgelerinin plazmidleri sentez ettirildi.

2.1.3.2. hTERT Gen Bölgesinin Kantitasyonu

2.1.3.2.1. hTERT Primer ve *TaqMan* Probu

Primer ile hTERT gen bölgesinde 98 bç.' lik bir ampikon (pozisyon 13059 – 13156, AF128893) çoğaltılmaktadır.

hTERT geni için;

İleri primer 5'-GGC ACA CGT GGC TTT TCG-3',

Geri primer 5'-GGT GAA CCT CGT AAG TTT ATG CAA-3' ve

Prob ise VIC5'-TCA GGA CGT CGA GTG GAC ACG GTG-3' TAMRA kullanıldı.

Liyofilize halde ve 0.02 µmol sentez skalasında ticari olarak sentezlettilen hTERT ileri primeri, 100 pmol/µl hacimde olacak şekilde 56 µl; hTERT geri primeri ise 38 µl, PCR için uygun saflıktaki steril distile su eklenerek çözüldü ve 1:20 oranında çalışma solüsyonu hazırlanarak -20°C' de saklandı. Liyofilize halde ve 0,20 µmol sentez skalasında ticari olarak sentezlettirilen hTERT *TaqMan* probu ise 20 pmol/µl hacimde olacak şekilde 17 µl steril distile su eklenerek çözüldü ve 1:10 oranında çalışma solüsyonu hazırlanarak -20°C' de muhafaza edildi. Standart olarak ve kopya sayısı 10^{10} olacak şekilde sentez ettirilen hTERT gen bölgesini içeren plazmidler 100µl bidistile su ile sulandırılarak 10^8 stok solüsyonu hazırlandı. Bu stok standarttan kopya sayısı 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 ve 10^2 olan standartlar sulandırılarak hazırlandı ve -20 °C ye kaldırıldı.

Tablo 2: hTERT PCR Karışımı

Final Reaksiyon Miktarı	10 µl	10 µl
Bileşenler	Final Konsantrasyonu	Miktar (µl)
H ₂ O	--	3.8
İleri Primer	0.3 µM	0.6
Geri Primer	0.3 µM	0.6
<i>TaqMan</i> Prob	0.1 µM	0.5
<i>TaqMan</i> Reaksiyon karışımı	1X	2.0
Serbest DNA		2.5

hTERT gen bölgesinin amplifikasyonu aşağıdaki evrelere göre gerçekleştirilmiştir:

1. PCR karışımından 10 µl kapiller tüplere eklenmiştir.
2. Üzerine 2,5 µl izole edilen serbest DNA eklenmiştir.
3. Ayrıca kantitasyon için 4 ayrı kapiller tüpte standartlar (sırasıyla 10⁷, 10⁶, 10⁴ ve 10³ kopya sayısı olan plazmid DNA' sı) eklenmiştir.
4. Kapiller tüpler karosele yerleştirilerek LightCycler cihazında hTERT *TaqMan* PCR protokolü çalıştırılmıştır.

2.1.3.2.2. hTERT *TaqMan* PCR Protokolü

PCR, Denatürasyon (tablo 3), Amplifikasyon (tablo 4) ve Soğutma (tablo 5) aşamalarını içermektedir.

Tablo 3: Denatürasyon

Döngü Programı Verileri	Değer
Döngü	1
Analiz Modu	-
Hedef Dereceleri	Segment 1
Hedef Derece (°C)	95
İnkübasyon zamanı (s:dk:sn)	600
Sıcaklık Transisyon Oranı (°C/sn)	20.0
İkinci hedef derece (°C)	0
Basamak derecesi (°C)	0.0
Döngüler	0
Kazanç modu	-

Tablo 4: Amplifikasyon

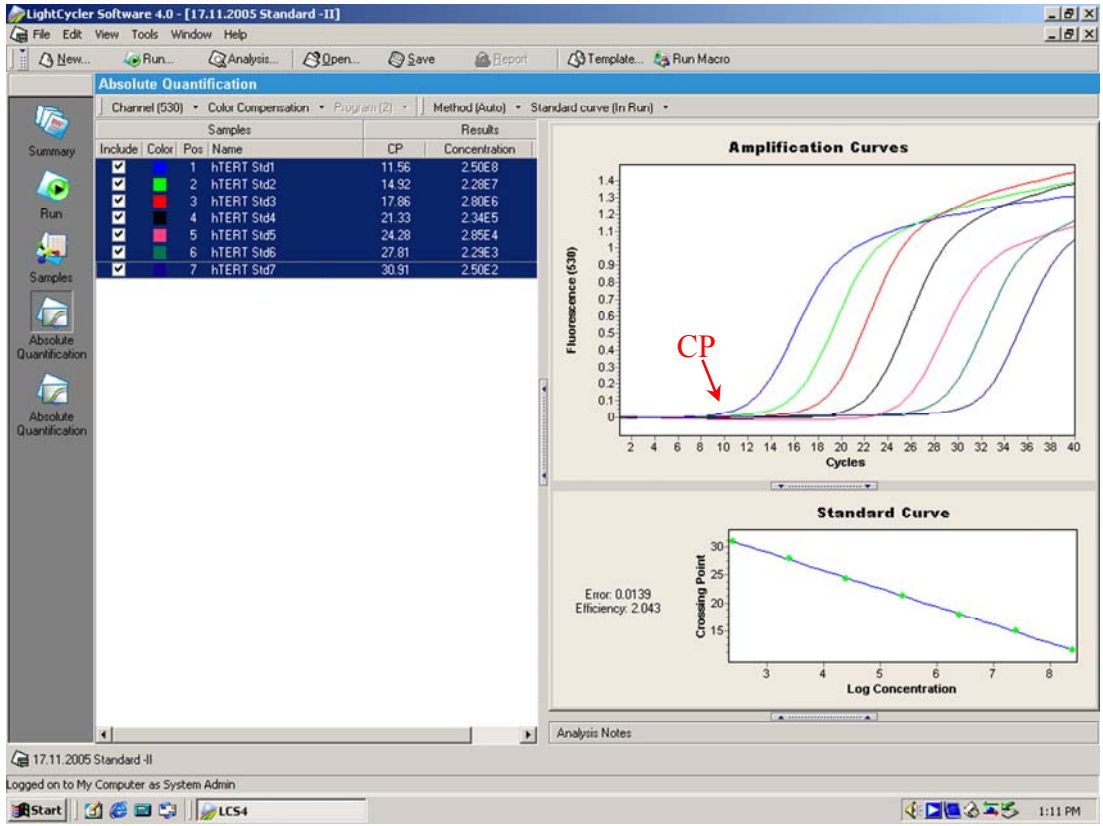
Döngü Programı Verileri	Değer	
Döngü	40	
Analiz Modu	Kantitasyon	
Hedef Dereceleri	Segment 1	Segment 2
Hedef Derece (°C)	94	60
İnkübasyon zamanı (s:dk:sn)	15	60
Sıcaklık Transisyon Oranı (°C/san)	20.0	20.0
İkinci Hedef Derecesi (°C)	0	0
Basamak derecesi (°C)	0.0	0.0
Döngüler	0	0
Kazanç modu	-	Tek

Tablo 5: Soğuma

Program Verileri	Değer
Döngü sayısı	1
Analiz Modu	-
Hedef Dereceleri	Segment 1
Hedef Derece (°C)	40
İnkübasyon Zamanı	30
Sıcaklık Transisyon Oranı (°C/san)	20.0
İkinci Hedef Derece (°C)	0
Basamak derecesi (°C)	0.0
Döngüler	0
Kazanç modu	-

2.1.3.2.3. hTERT Kantitasyonu

Amplifiye edilen DNA' nın kantitasyon analizi, kantitasyon software (Relative Quantification software Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) ile hesaplanmaktadır. PCR sırasında elde edilen amplikonlar, doğrudan LightCycler cihazında, logaritmik artışa geçtikleri döngü sayısına göre değerlendirilmektedir. Bunun için önce konsantrasyonları bilinen 7 farklı standard ile ($10^8, 10^7, 10^6, 10^5, 10^4, 10^3$ ve 10^2) bir standart amplifikasyon eğrisi oluşturuldu. Çalışılan örnekteki geçiş noktasına (CP) göre DNA' nın rölatif miktarı kantitasyon software tarafından belirlenmektedir. hTERT standart amplifikasyon eğrisi şekil 11' de verilmiştir. Amplifikasyon eğrisinin hatası ("error") 0,0139 ve verimliliği ("efficiency") 2.043' tür.



Şekil 11: hTERT standartlarına göre amplifikasyon eğrisi

2.1.3.3. SRY Gen Bölgesinin Kantitasyonu

2.1.3.3.1. SRY Primer ve TaqMan Probu

Primer ile SRY gen bölgesinde 137 bç.' lik bir ampikon (pozisyon109–245, X53772.) çoğaltılmaktadır.

SRY geni için;

İleri primer 5'-TGG CGA TTA AGT CAA ATT CGC-3,

Geri primer 5'-CCC CCT AGT ACC CTG ACA ATG TAT T-3'

Prob ise FAM 5'-AGC AGT AGA GCA GTC AGG GAG GCA GA(TAMRA)-3' kullanılmıştır.

Liyofilize halde ve 0.02 µmol sentez skalasında ticari olarak sentezlettilen SRY ileri primeri, 100 pmol/µl hacimde olacak şekilde hazırlanan 44 µl; SRY geri primeri ise 40 µl, PCR için uygun saflıktaki steril distile su eklenerek çözüldü ve 1:20 oranında çalışma solüsyonu hazırlanarak -20°C' de muhafaza edildi. Liyofilize halde ve 0,20 µmol sentez skalasında ticari olarak sentezlettilen SRY *TaqMan* probu ise 20 pmol/µl hacimde olacak şekilde 16 µl steril distile su eklenerek çözüldü ve 1:10 oranında çalışma solüsyonu hazırlanarak -20°C' de muhafaza edildi.

Standart olarak ve kopya sayısı 10^{10} olacak şekilde sentez ettirilen SRY gen bölgesini içeren plazmidler 100µl bidistile su ile sulandırılarak 10^8 stok solüsyonu hazırlandı. Bu stok standarttan kopya sayısı 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 ve 10^2 olan standartlar sulandırılarak hazırlandı ve -20 °C' ye kaldırıldı.

SRY gen bölgesinin amplifikasyonu aşağıdaki evrelerde gerçekleştirilmiştir:

1. PCR karışımından 10 µl kapiller tüplere eklenmiştir.
2. Üzerine 2,5 µl izole edilen serbest DNA eklenmiştir.
3. Ayrıca kantitasyon için 4 ayrı kapiller tüpte standartlar (sırasıyla 10^7 , 10^6 , 10^4 ve 10^3 kopya sayısı olan plazmid DNA' sı) eklenmiştir.

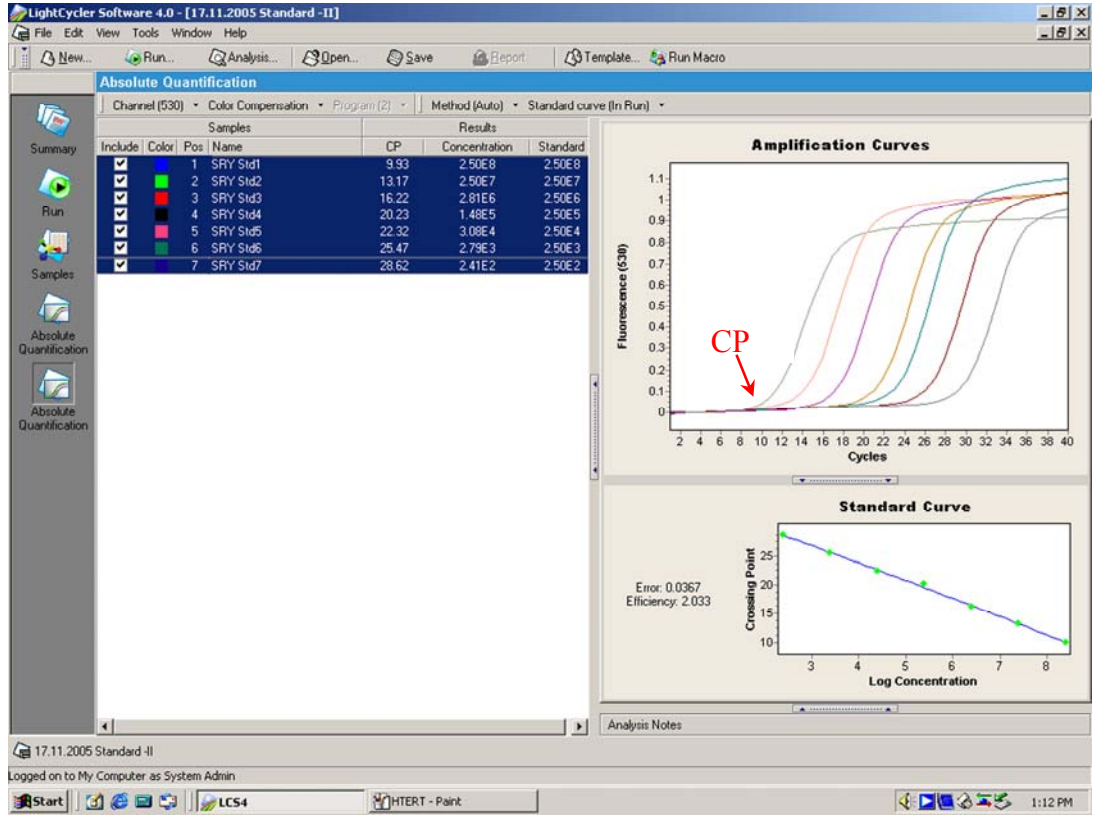
4. Kapiller tüpler karosele yerleştirilerek LightCycler cihazında SRY *TaqMan* PCR protokolü çalıştırılmıştır.

Tablo 6: SRY PCR Karışımı

Final Reaksiyon Miktarı	10 µl	10 µl
Bileşenler	Final Konsant- rasyonu	Miktar (µl)
H ₂ O	--	3.8
İleri Primer	0.3 µM	0.6
Geri Primer	0.3 µM	0.6
<i>TaqMan</i> Prob	0.1 µM	0.5
<i>TaqMan</i> Reaksiyon karışımı	1X	2.0
Serbest DNA (ng / µl)		2.5

2.1.3.3.2. SRY Kantitasyonu

Kantitasyon analizi, kantitasyon software (Relative Quantification software Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) ile hesaplanmaktadır. PCR sırasında elde edilen ampliconlar, doğrudan LightCycler cihazında, logaritmik artışa geçtikleri döngü sayısına göre değerlendirilmektedir. Bunun için önce konsantrasyonları bilinen 4 farklı standart ile (10^7 , 10^6 , 10^4 ve 10^3) bir standart amplifikasyon eğrisi oluşturulmakta ve çalışılan örnekdeki geçiş noktasına göre DNA' nın rölatif miktarı belirlenmektedir. SRY standart amplifikasyon eğrisi şekil 12' de verilmiştir. Amplifikasyon eğrisinin hatası ("error") 0,0367 ve verimliliği ("efficiency") 2.033' dür



Şekil 12: SRY standartlarına göre amplifikasyon eğrisi

2.1.3.3.3. SRY TaqMan PCR Protokolü

PCR, Denatürasyon (tablo 7), Amplifikasyon (tablo 8) ve Soğutma (tablo 9) aşamalarını içermektedir.

Tablo 7: Denatürasyon

Döngü Programı	Değer
Verileri	
Döngü	1
Analiz Modu	-
Hedef Dereceleri	Segment 1
Hedef Derece (°C)	95

İnkübasyon zamanı (s:dk:sn)	600
Sıcaklık Transisyon Oranı (°C/sn)	20.0
İkinci hedef derece(°C)	0
Basamak Derecesi(°C)	0.0
Döngüler	0
Kazanç modu	-

Tablo 8: Amplifikasyon

Döngü Programı	Değer	
Verileri		
Döngü	40	
Analiz Modu	Kantitasyon	
Hedef Dereceleri	Segment 1	Segment 2
Hedef Derece (°C)	94	62
İnkübasyon zamanı (s:dk:sn)	15	60
Sıcaklık Transisyon Oranı (°C/san)	20.0	20.0
İkinci Hedef Derecesi (°C)	0	0
Basamak Derecesi (°C)	0.0	0.0
Döngüler	0	0
Kazanç modu	-	Tek

Tablo 9: Soğuta

Program Verileri	Değer
Döngü sayısı	1
Analiz Modu	-
Hedef Dereceleri	Segment 1
Hedef Derece (°C)	40
İnkübasyon Zamanı	30
Sıcaklık Transisyon Oranı (°C/san)	20.0
İkinci Hedef Derece (°C)	0
Basamak Derecesi (°C)	0.0
Döngüler	0
Kazanç modu	-

Tablo 10: Kimyasal Maddeler

KİMYASAL MADDE	MARKASI
Amonyum Asetat	Sigma
Kloroform	Sigma

2.1.4. Serbest DNA Kopya Sayısının ng/ml'ye Çevrilmesi

Kantitasyon analizi ile saptadığımız kopya sayıları Lo ve ark.larının geliştirdiği aşağıdaki çevirim formülü kullanılarak ml' deki kopya sayısına ve burdan da pg/ml' ye çevrilmiştir.

$$C = Q \times \frac{V_{\text{DNA}}}{V_{\text{PCR}}} \times \frac{1}{V_{\text{ext}}}$$

- C plazmadaki hedef konsantrasyon (ml deki kopya sayısı)
- Q tespit sistemi ile hesaplanan hedef kopyalar
- V_{DNA} ekstraksiyonun (50 μ l) total volümü
- V_{PCR} her bir PCR reaksiyonu için kullanılan DNA hacmi (2,5 μ l)
- V_{ekst} ekstrakte edilmiş plazma hacmi (4 ml)
- Serbest DNA düzeyini ng/ml düzeyinde eksprese eden 6,6 pg' lik konversiyon faktörü bulunmaktadır.

Serbest DNA düzeyini ng/ml düzeyinde eksprese eden 6,6 pg' lik konversiyon faktörüdür

Bu değer insan genomunun 3×10^9 bç' den oluşması temeline dayanır. Bundan dolayı iki kromozom setinden oluşan bir hücre 6×10^9 bç' dir. Tek bir baz çiftinin ortalama moleküler ağırlığı 680g/mol dür. Tek bir hücrede DNA' nın moleküler ağırlığı 4.1×10^{12} g/mol ($6 \times 10^9 \times 680$) olmaktadır.

Son olarak bir hücredeki DNA' nın kütlesi 4.1×10^{12} , nin avogadro sayısına (6.23×10^{-23} g) bölünmesi ile elde edilir. Bu da 6.6×10^{-11} g olan konversiyon değerini ortaya çıkarır (37).

2.1.5. Plazmadan hTERT mRNA ekspresyonunun kantitasyonu

Amplifiye edilen hTERT gen bölgesi ekzonu içerdigi için hTERT mRNA'nın amplifiye edilip edilmediğini saptamak amacıyla plazmadaki hTERT mRNA ekspresyonunun kantitasyonu da yapılmıştır.

2.1.5.1. Plazmadan Total RNA İzolasyonu

1. Dört ml plazma 15 ml' lik falkon tüpe alındı ve üzerine 2,5 ml doymuş Amonyum Asetat ilave edildi.
2. Karıştırıldıktan sonra 4500 rpm de 10 dk santrifüj edildi.
3. Süpernatant 15 ml' lik yeni falkon tüpe alındı.
4. Falkon tüpteki süpernatant miktarı kadar üzerine kloroform ilave edildi.
5. Dörtbin beşyüz rpm de 10 dk santrifüjlendi.
6. Santrifüj sonrası süpernatant yeni bir 15 ml' lik falkon tüpe alındı.
7. Onbeş ml' lik falkon tüplerdeki 4 ml plazma üzerine 8 ml bağlayıcı tampon ilave edildi.
8. On bin rpm' de 15 saniye santrifüj edildi.
9. Filtreli tüpün alt kısmı uzaklaştırıldı.
10. Doksan µl DNAaz inkübasyon tamponu ve 10µl DNAaz enzimi içeren karışım filtre üzerine ilave edilerek oda ısısında 15 dk inkübasyona bırakıldı.
11. İnkübasyon sonrası 500µl yıkama tamponu I ilave edildi ve 10000 devirde 15 saniye santrifüj edildi.
12. Filtreli tüpün alt kısmı uzaklaştırıldı.
13. Örnek üzerine 500 µl yıkama tamponu II ilave edildi ve aynı işlem tekrarlandı.

- 14.Örnek, 200µl yıkama tamponu II ile 13000 rpm de 2 dakika santrifüj edildi.
- 15.Filtreli tüplerin alt kısımları tekrar uzaklaştırıldı.
- 16.Toplama kabının filtreli kısmı 1.5ml lik ependorf tüplere aktarıldı ve üzerine 50µl elusyon tamponu eklenerek ve 10000 rpm' de 1 dakika santrifüj edildi.
- 17.Santrifüj sonrası, filtreli kısım atıldı.
- 18.Ependorf tüplerdeki total RNA örneği kriyovial tüplere alınarak çalışılacağı zamana kadar -86 °C' de saklandı.

2.1.5.2. hTERT Kantitasyonu

Telomerler, telomeraz enzimi tarafından uzatılan yüz binlerce TTAGGG tekrar dizileri içermektedirler. Spesifik primerler kullanılarak, 198 bç' lik fragman cDNA' ya çevrilerek amplifikasyon gerçek-zamanlı revers transkriptaz PCR (RT-PCR) reaksiyonları ile gerçekleştirilmektedir. Floresanlı hibridizasyon problemleri kullanılarak ampikon ortaya çıkarılmaktadır. Hibridizasyon problemleri iki farklı kısa oligonükleotit dizileri içermektedir. Bir probun 5' ucu LightCycler Red 640 ile işaretliken, diğer probun 3' ucu da floresein ile işaretlidir. Problemler hedef ampikonlar üzerinde birbirine yakın (1–5 nükleotid uzaklıkta) yere bağlanmakta ve işaretli uçlar yan yana gelmektedir. İki boyanın yan yana gelmesiyle açığa çıkan enerji ikinci prob üzerindeki alıcı boyayı etkileyerek floresans oluşumuna yol açmaktadır. "Floresans Rezonans Enerji Transfer" (FRET) olarak adlandırılan bu enerji transferi sonucunda oluşan floresan miktarı, ortamdaki hibridizasyonun derecesine diğer bir

ifade ile PCR siklusu süresince oluşan amplikonların miktarına bağlı olarak artmaktadır.

Plazmadan serbest RNA' nın kantitasyonunda LightCycler Telo TAGGG hTERT kantitasyon (Roche Diagnostic) kiti kullanılmıştır. Kitin avantajı RNA'nın cDNA' ya çevrimi ve kantitasyonu aynı reaksiyon içinde gerçekleşmesidir. RT-PCR karışımı tablo 11' de verilmiştir.

Tablo 11 : Plazma RNA RT-PCR Karışımı

İçerik	Miktar	Final Konsantrasyonu
hTERT Reaksiyon Karışımı	2 µl	1X
Revers Transkriptaz	0.1 µl	-
hTERT saptama karışımı ya da PBGD saptama karışımı	2 µl	1X
H ₂ O	13.9	-
Total Miktar	18 µl	

1. PCR karışımından kapiller tüplere 18 µl eklenmiştir.
 - a. Her bir örnek için hTERT ve PBGD ayrı ayrı kapilleri hazırlanmıştır.
2. Üzerine 2 µl izole edilen serbest RNA eklenmiştir.
3. Ayrıca kantitasyon için 4 ayrı kapiller tüpte standartlar (sırasıyla 10⁶, 10⁵, 10³ ve 10² kopya sayılı kit standartları) eklenmiştir.
4. Kapiller tüpler karosele yerleştirilerek LightCycler cihazında RT-PCR protokolü çalıştırılmıştır.

2.1.5.2.1. hTERT RT-PCR Protokolü

RT-PCR, Revers transkripsiyon (Tablo 12), Denatürasyon (Tablo 12), Amplifikasyon (Tablo 13) ve Soğutma (Tablo 14) aşamalarını içermektedir.

Tablo 12 : Revers Transkripsiyon

<i>Parametre</i>	<i>Değer</i>
Döngü	1
Analiz modu	Yok
Sıcaklık Hedefleri	Segment 1
Hedef Sıcaklığı (C°)	60
İnkubasyon Süresi (s:dk:sn)	00:10:00
Sıcaklık Değişimi Oranı (C°/sn)	20
İkincil Hedef Sıcaklık (C°)	0
Basamak derecesi (C°)	0
Döngüler	0
Kazanç modu	Yok

Tablo 13: Denatürasyon

<i>Parametre</i>	<i>Değer</i>
Döngü	1
Analiz modu	Yok
Sıcaklık Hedefleri	Segment 1
Hedef Sıcaklığı (C°)	95
İnkubasyon Süresi (s:dk:sn)	00:00:30
Sıcaklık Değişimi Oranı (C°/sn)	20
İkincil Hedef Sıcaklık (C°)	0
Basamak derecesi (C°)	0
Döngüler	0

Kazanç modu Yok

Tablo 14: Amplifikasyon

<i>Döngü Program Verisi</i>	<i>Değer</i>		
Döngü	40		
Analiz modu	Kantifikasyon		
Sıcaklık Hedefleri	Segment 1	Segment 2	Segment 3
Hedef Sıcaklığı (C°)	95	60	72
İnkübasyon Süresi (s:dk:sn)	0:00:00	0:00:10	0:00:05
Sıcaklık Değişimi Oranı (C°/sn)	20.0	20.0	20.0
İkincil Hedef Sıcaklık (C°)	0	0	0
Basamak derecesi (C°)	0.0	0.0	0.0
Döngüler	0	0	0
Kazanç modu	Yok	Tek	Yok

Tablo 15: Soğutma

<i>Döngü Program Verisi</i>	<i>Değer</i>
Döngü	1
Analiz modu	Yok
Sıcaklık Hedefleri	Segment 1
Hedef Sıcaklığı (C°)	40
İnkübasyon Süresi (s:dk: sn)	0:00:60
Sıcaklık Değişimi Oranı (C°/sn)	20.0
İkincil Hedef Sıcaklık (C°)	0
Basamak derecesi (C°)	0.0
Döngüler	0
Kazanç modu	Yok

2.1.5.2.2. hTERT mRNA Kantifikasyonu

Thermal profil hem Reverse transkripsiyon, hem de Kantitasyon analizi için ayrı olarak LightCycler cihazın parametrelerine göre belirlenmiştir. PCR sırasında elde edilen amplikonlar, doğrudan LightCycler cihazında, logaritmik artışa geçtikleri döngü sayısına göre değerlendirilmektedir. Bunun için önce konsantrasyonları bilinen 4 farklı Standart ile (10^6 , 10^5 , 10^3 , ve 10^2) bir konsantrasyon / döngü sayısı eğrisi oluşturulmakta ve sonuçlar bunun üzerinden okunmaktadır. N_{hTERT} oranı ise hTERT mRNA örnekteki kopya sayısı / (PBGD mRNA örnekteki kopya sayısı/ 1000) formülü ile hesaplanmaktadır.

2.1.6. İSTATİSTİKSEL ANALİZ YÖNTEMLERİ

Çalışma ve kontrol grubumuzun ortalama, standart sapma, minimum, maksimum, median değerleri ve grupların birbiri ile karşılaştırıldığı Student' s t testi, varyans analizi ve regresyon analizi SPSS 13.0 for windows istatistik paket programında yapılmıştır. Anlamlılık değeri, $p < 0.05$ ' dir.

BÖLÜM-III

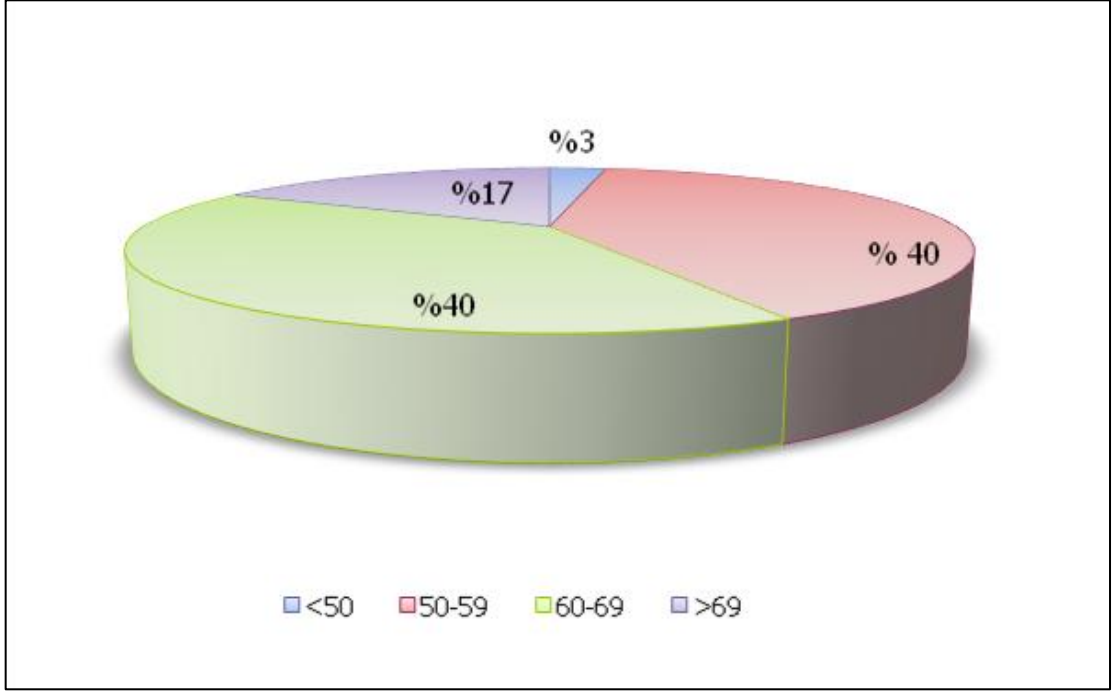
3.1. BULGULAR

Çalışmamızda, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı'nda prostat kanseri tanısı veya ön tanısı almış 40 olguda ve kontrol grubu olarak, aralarında akrabalık ilişkisi bulunmayan ve sağlıklı olduğu bilinen 6 olguda plazma DNA düzeyleri araştırılmıştır. Tüm bireylerden, 8 ml'lik EDTA'lı tüplere alınmış olan periferik kan örneklerinden, 4 ml plazmaları ayrıldıktan sonra serbest DNA izolasyonu yapılmıştır. Serbest DNA'nın kantitasyonu Real Time kantitatif PCR LightCycler cihazında *TaqMan* sistemi kullanılarak 5' ekzonükleaz metoduna göre hTERT geni ve SRY geni primer ve problemleri ile gerçekleştirilmiştir.

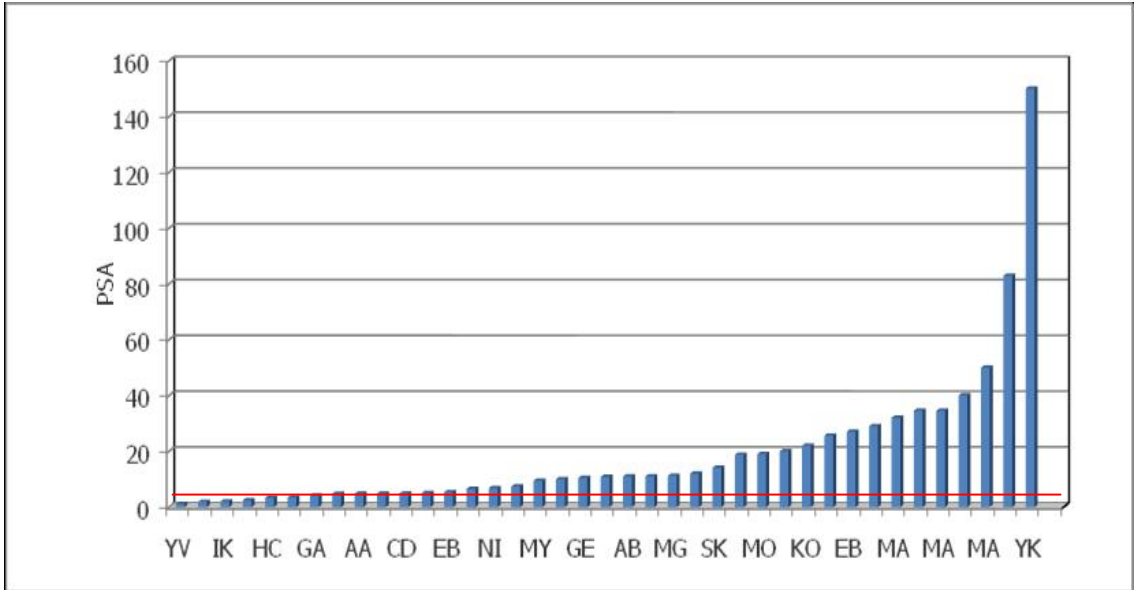
3.1.1. Çalışma Grubunun Demografik ve Klinik Özellikleri

Prostat kanseri tanısı veya ön tanısı almış 40 olgunun yaş ortalaması $61,95 \pm 8,14$ (42 – 74, median 62) dir. Olguların yaş grupları Şekil 13'te verilmiştir.

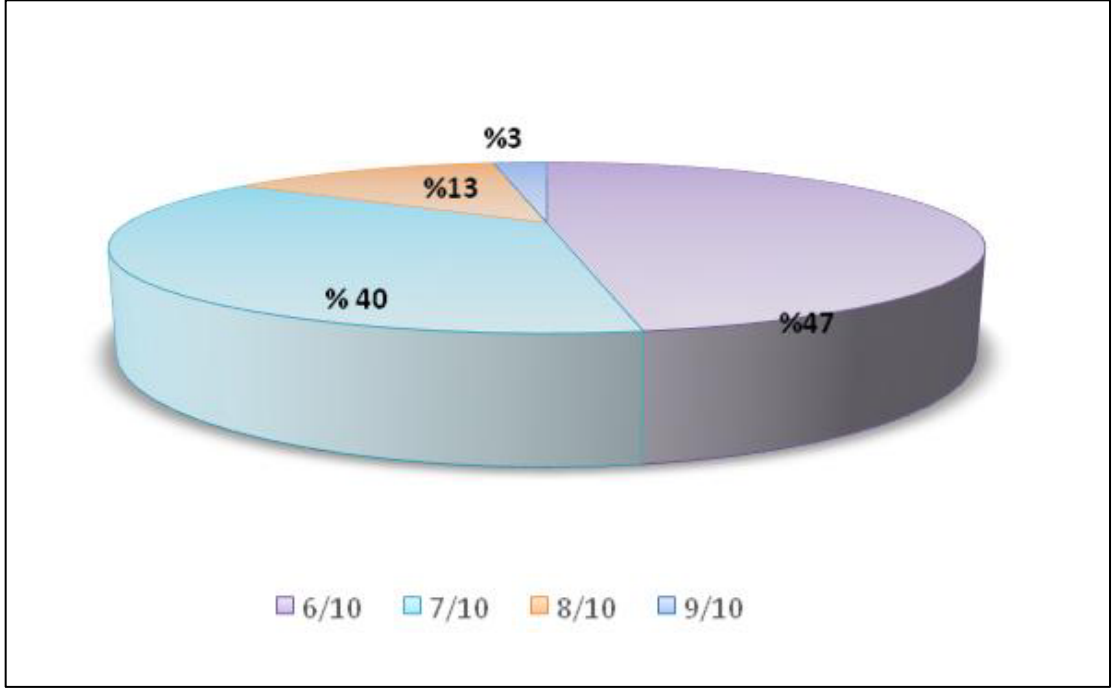
Olguların PSA ortalaması $19,33 \pm 26,95$ (1,1 – 150,00, median 10,92) tir (Şekil 14). Gleason Skorlamasına göre dağılımları 18 olgu 6/10, 14 olgu 7/10, 5 olgu 8/10 ve 1 olgu 9/10 olarak belirlenmiştir (Şekil 15). TNM sınıflandırmasına göre; 12 olgu T2a, 14 olgu T2b, 7 olgu T7a, 4 olgu T3b ve 1 olgu T4MB dir (Şekil 16).



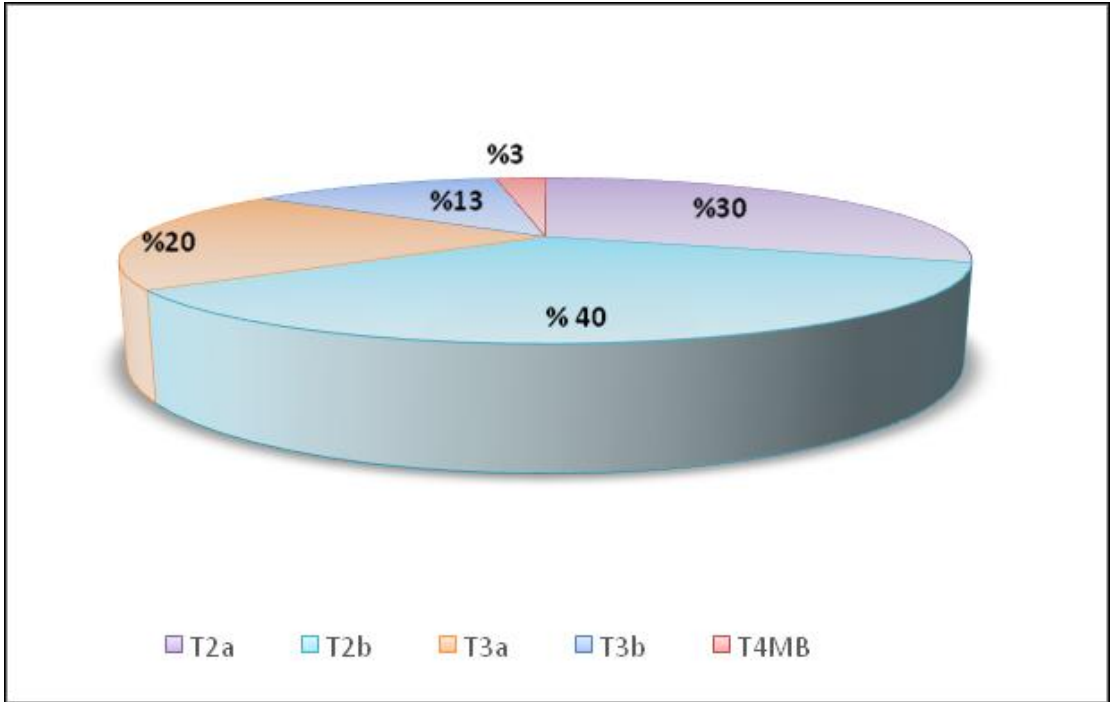
Şekil 13: Prostat kanserli olguların yaş gruplarına göre dağılımı



Şekil 14: PCa'lı olgularda PSA değerleri (— PSA 4 ng/ml)



Şekil 15: Olguların Gleason Skoruna göre dağılımı



Şekil 16: Olguların TNM evrelemesine göre dağılımı

Tablo 16: Olguların demografik ve klinik özellikleri

OLGU NO	Yaş	PSA	Gleason Skoru	TNM
SK				
YK	51	150,00		
CA	58	1,84	6/10	T2a
HK	72	2,42	7/10	T2a
AA	67	4,80	6/10	T2a
NK	51	5,02	6/10	T2a
KY	66	6,50	7/10	T2a
GE	59	10,44	7/10	T2a
AB	72	11,00	7/10	T2a
MO	60	19,00	6/10	T2a
EB	65	27,00	6/10	T2a
HK	74	29,00	6/10	T2a
VK	54	82,92	8/10	T2a
IK	64	1,96	8/10	T2b
KY	63	4,76	6/10	T2b
AY	56	4,80	6/10	T2b
CD	53	4,80	7/10	T2b
EB	68	5,32	6/10	T2b
NI	59	6,80	6/10	T2b
HT	50	7,38	7/10	T2b
SK	63	14,1	7/10	T2b
MSB	73	18,75	9/10	T2b
EI	57	20,00	6/10	T2b
KO	69	22,00	7/10	T2b
AKK	68	25,06	7/10	T2b
MA	55	34,53	9/10	T2b
HD	69	40,00	6/10	T2b
HC	70	3,30	7/10	T3a
HB	59	10,00	6/10	T3a
ND	68	10,84	7/10	T3a
MCG	73	11,00	8/10	T3a
MA	42	32,00	7/10	T3a
MA	55	34,53	9/10	T3a
MA	72	50,00	6/10	T3a
YV	54	1,10	6/10	T3b
GA	55	4,10	7/10	T3b
MY	61	9,4	6/10	T3b
MG	70	11,20	7/10	T3b
MS	79	12,00	8/10	T4Mb
Ortalama	61,95	19,33		
SD	8,14	26,95		
Median	62,00	10,84		

3.1.2. Kontrol Grubu

Sağlıklı bireylerden seçilerek kontrol grubuna dahil edilen 6 erkek olgunun yaş ortalaması $48,25 \pm 9,71$ (36 – 57, median 50) olarak saptanmıştır.

3.1.3. Serbest DNA Kantitasyonu

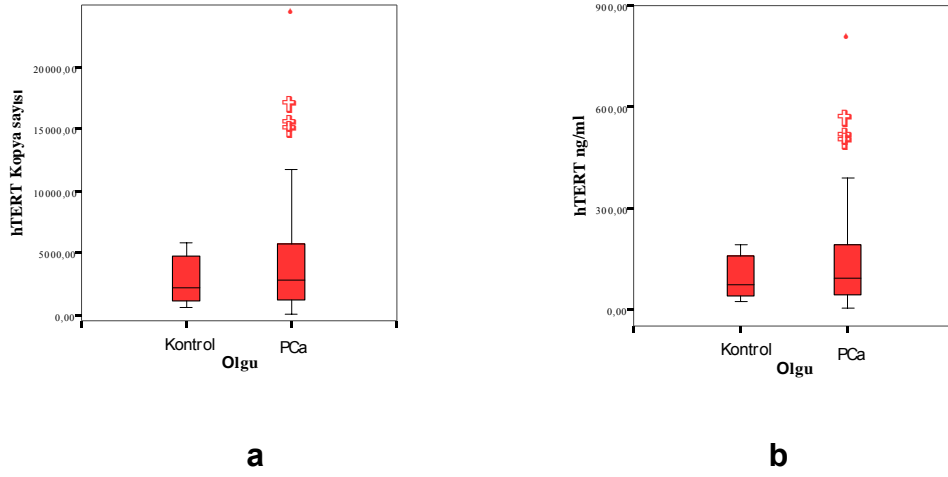
Serbest DNA' nın kantitasyonu hTERT ve SRY gen bölgesinin kopya sayısına göre ayrı ayrı hem birbirleri ile hem de gruplar arası karşılaştırılmıştır.

hTERT gen bölgesi için seçtiğimiz primerler ekzon bölgesini içermekte olduğundan hTERT mRNA' yı da amplifiye edip etmediğini anlamak için plazmada total RNA izolasyonu yapılmıştır. Bu total RNA' dan RT-PCR ile hTERT mRNA ekspresyonu yapılmış ve hTERT mRNA ekspresyonu saptanmamıştır.

3.1.3.1. Serbest DNA hTERT Kantitasyonu

Çalışma grubunu oluşturan olguların serbest plazma DNA' sından TaqMan yöntemine göre kantifiye edilen hTERT kopya sayısı ortalaması $10,140 \pm 36,043$ (63 – 230.000 median 2.710)' tir. Çevrim formülü kullanarak kopya sayısını ng/ml çevrildiğine çalışma grubunun ortalaması $334,63 \pm 1.189,41$ (2,08 – 7.590,00 median 89,43)' dir (Tablo 17). Kontrol grubunun ortalaması ise 2.813 ± 2.064 (643 – 4.800, median 2.656) dir. Kontrol grubunun ng/ml değerinin ortalaması ise $113,68 \pm 76,72$ (21,23 – 192,19, median 120,65) ve ortalamanın % 95 güven aralığı 52,29 – 175,07' dir (Tablo 18). hTERT Kopya sayısını ve DNA miktarlarını kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p < 0,05$). Kontrol grubunun DNA miktarının ortalama $\pm 2SD$ ' sı hTERT kantitasyonu eşik değeri olarak belirlenmiş-

tir. Belirlediğimiz eşik değeri 267,12 ng/ml olup çalışma grubumuzda bu eşik değerin üzerinde 9 olgu pozitif olarak belirlenmiştir.



Şekil 17: (a). hTERT kopya sayısının PCa ve kontrol gruplarındaki dağılımı, **(b)** hTERT miktarının dağılımı

Tablo 17: PCa' lı olgularda saptanan hTERT kopya sayısı ve miktarı

İSİM	hTERT kopya sayısı	hTERT ng/ml
MCG	23000	7590,00
MA	24300	801,90
HB	16400	541,20
İK	14743	486,51
AKK	14300	471,90
MS	11800	389,40
GA	9100	300,30
YV	8560	282,48
MA	8230	271,59
MY	6180	203,94
EB	5320	175,56
SK	4560	150,48
Eİ	4530	149,49
MG	4400	145,20
KO	3700	122,10
NI	3580	118,14
HK	3330	109,89

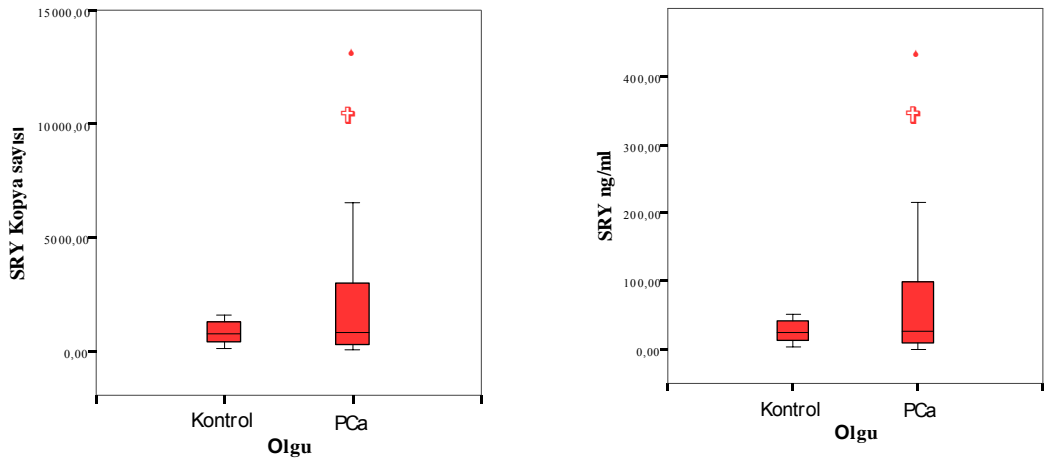
İSİM	hTERT kopya sayısı	hTERT ng/ml
CA	3120	102,96
NK	2864	94,51
AY	2860	94,38
AA	2710	89,43
HT	2640	87,12
ND	2280	75,24
YK	2270	74,91
CD	1720	56,76
HC	1550	51,15
MA	1500	49,50
MO	1451	47,90
SK	1312	43,30
KY	1291	42,62
KY	1230	40,59
VK	1104	36,43
HK	795	26,24
AA	636	20,99
MA	526	17,35
AB	234	7,72
EB	200	6,60
HD	112	3,70
GE	106	3,50
MSB	63	2,08
Ortalama	10140	334,63
Standart sapma	36043	1189,41
Median	2710	89,43

Tablo 18: Kontrol grubundaki hTERT kopya sayısı ve miktarı

İSİM	hTERT kopya sayısı	hTERT ng/ml
FB	5824	192,19
MB	4800	158,40
OK	2512	82,90
CG	1940	64,02
IN	1160	38,28
CG	643	21,23
Ortalama	2813	113,68
Standart sapma	2064	76,72
Median	3656	120,65

3.1.3.2. Serbest DNA SRY Kantitasyonu

Çalışma grubunu oluşturan olguların serbest plazma DNA' sından *TaqMan* yöntemine göre kantifiye edilen SRY kopya sayısı ortalaması 4.412 ± 15.600 (7 – 99.000, median 799)' tür. Çevrim formülü kullanarak kopya sayısını ng/ml çevrildiğinde çalışma grubunun ortalaması $145,59 \pm 514,80$ (0.22 – 3.267,00 median 26,37)' dir (Tablo 19). Kontrol grubunun ortalaması ise 793 ± 572 (105 – 1.555, median 1147) dir. Kontrol grubunun ng/ml değerinin ortalaması ise $32,63 \pm 20,64$ (3,46 – 51,32, median 37,86) ve ortalamanın % 95 güven aralığı 16,11 – 49,14 dir (Tablo 20). Kopya sayısı ve DNA miktarları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p < 0,05$). Kontrol grubunun DNA miktarının ortalama $\pm 2SD$ ' sı SRY kantitasyonu eşik değeri olarak belirlenmiştir. Belirlediğimiz eşik değeri 73,91 ng/ml olup çalışma grubumuzda bu eşik değerinin üzerinde 12 olgu pozitif olarak belirlenmiştir.



Şekil 18: (a) PCa' lı olgu ve kontrol grubundaki SRY kopya sayısı, **(b)** SRY miktarı

Tablo 19: PCa' lı olgularda SRY kantitasyonu ve miktarı

İSİM	SRY Kopya Sayısı	SRY ng/ml
KY	99000	3267,00
MO	13000	429,00
CD	10000	330,00
YK	6530	215,49
MA	6370	210,21
AA	6260	206,58
HK	3870	127,71
AB	3290	108,57
HK	3160	104,28
HT	3100	102,30
HD	2890	95,37
ND	2540	83,82
EB	1850	61,05
MSB	1773	58,52
EI	1371	45,26
NK	1280	42,24
MA	1150	37,95
GE	933	30,79
VK	876	28,91
HB	815	26,90
SK	799	26,37
MA	775	25,58
KO	726	23,96
MCG	556	18,35
SK	497	16,41
CA	474	15,64
EB	436	14,39
MA	401	13,24
AKK	355	11,72
NI	317	10,47
MS	245	8,09
HC	222	7,33
AY	156	5,15
MY	146	4,82
MG	130	4,28
GA	104	3,43
KY	54	1,79
IK	11	0,36
AA	8	0,26
YV	7	0,22
Ortalama	4412	145,59
Standart sapma	15600	514,799
Median	799	26,367

Tablo 20: Kontrol grubundaki SRY kantitasyonu ve miktarı

İSİM	SRY kopya sayısı	SRY ng/ml
OK	1555	51,32
CG	1250	41,25
MB	1045	34,48
CG	423	13,96
IN	380	12,54
FB	105	3,46
Ortalama	793	32,63
Standart sapma	572	20,64
Median	1147	37,86

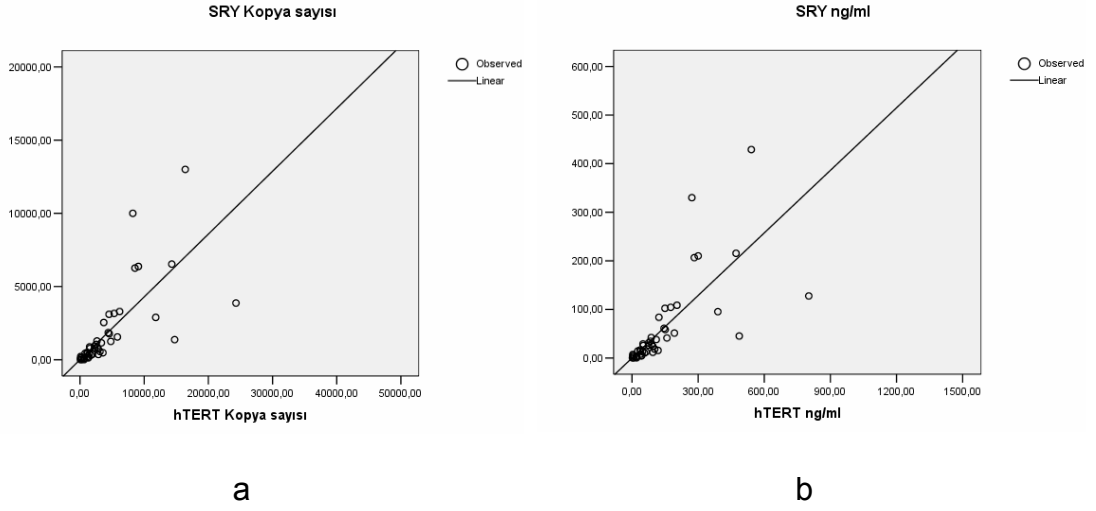
hTERT ve SRY için pozitif olan olgulardan 8 tanesi hem hTERT hem de SRY için pozitif olarak bulunmuştur (Tablo21).

Tablo 21: hTERT ve SRY pozitif olgular

İsim	Yaş	PSA	GS	TNM	hTERT	SRY	hTERT/ SRY
İK	62,00	1,96	8/10	T2b	486,51	45,26	10,75
KO	69,00	22,00	7/10	T2b	122,10	83,82	1,46
MS	79,00	12,00	8/10	T4Mb	389,40	95,37	4,08
Eİ	57,00	20,00	6/10	T2b	149,49	102,30	1,46
EB	68,00	5,32	8/10	T2b	175,56	104,28	1,68
MY	61,00	9,40	8/10	T3b	203,94	108,57	1,88
MA	72,00	50,00	8/10	T3a	801,90	127,71	6,28
YV	54,00	1,10	8/10	T3b	282,48	206,58	1,37
GA	55,00	4,10	7/10	T3b	300,30	210,21	1,43
AKK	68,00	25,60	7/10	T2b	471,90	215,49	2,19
MA	55,00	34,53	8/10	T2b	271,59	330,00	0,82
HB	59,00	10,00	8/10	T3a	541,20	429,00	1,26
MCG	73,00	11,00	8/10	T3a	7590,00	3267,00	2,32

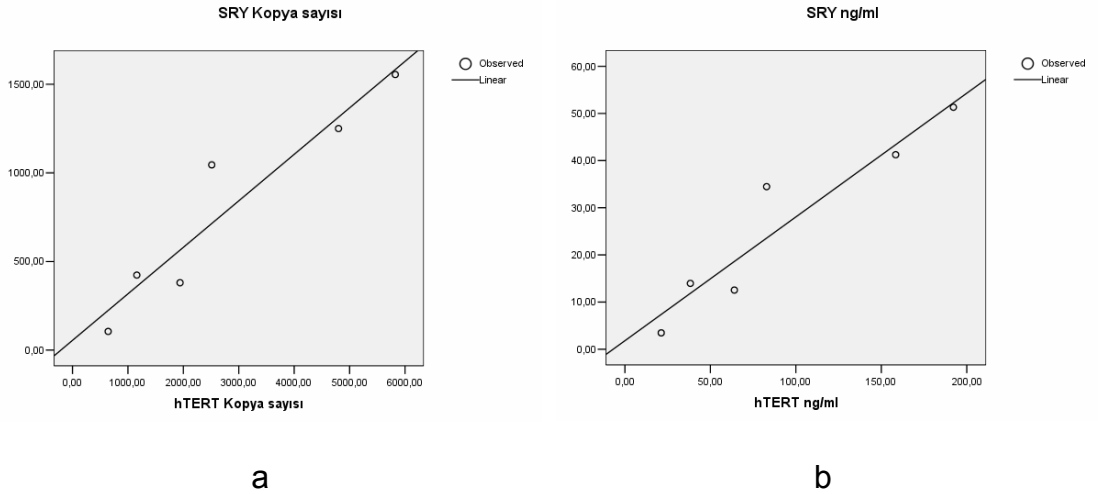
3.1.4. hTERT / SRY Korelasyonu

Çalışma grubunda hTERT kopya sayısı artışı ile SRY kopya sayısı artışı arasındaki ilişki incelenmiştir. hTERT ve SRY kopya sayısı / miktarları arasındaki korelasyon % 98 ilişkili olup anlamlı olarak saptanmıştır [(R=0,991, p=0,000, Şekil 19)].



Şekil 19: (a) hTERT ile SRY kopya sayısı arasındaki regresyon eğrisi, **(b)** miktarları arasındaki regresyon eğrisi

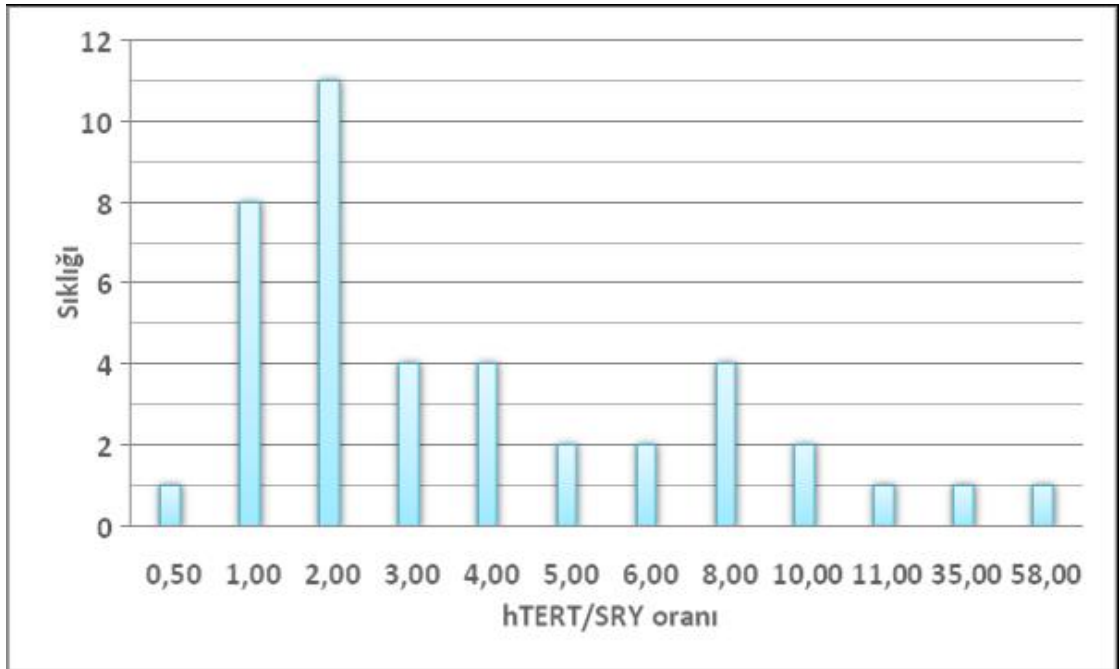
Kontrol grubunda ise hTERT ve SRY kopya sayısı ve miktarları arasındaki korelasyon % 89 ilişkili olup istatistiksel olarak anlamlıdır [(R=0,948, p=0,004, Şekil 20)].



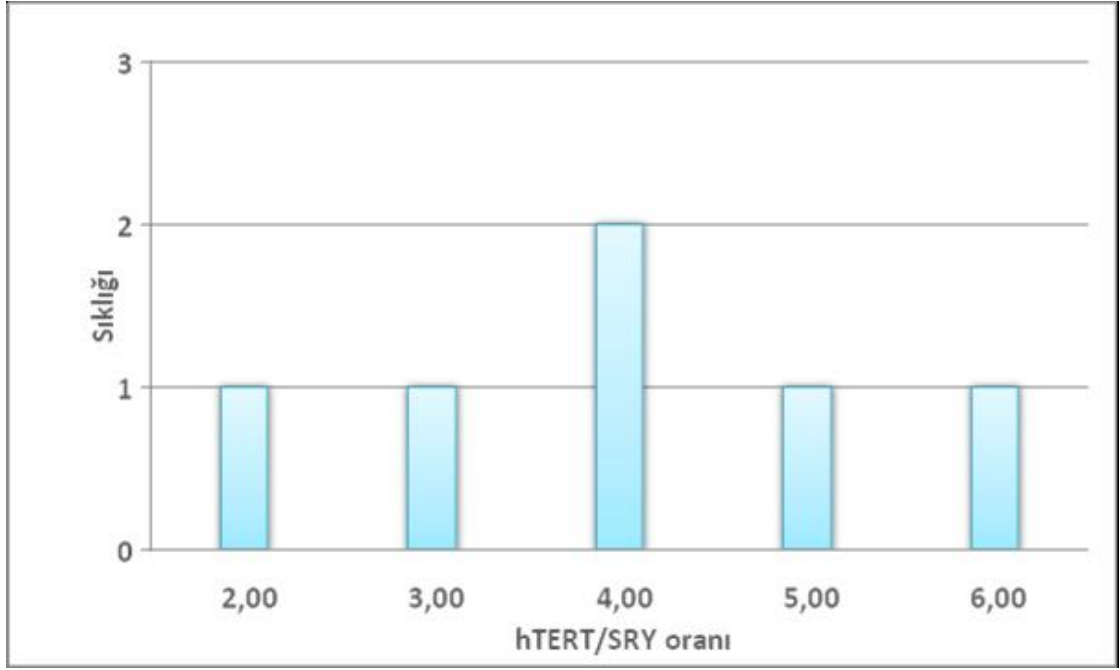
Şekil 20: (a) Kontrol grubundaki hTERT ile SRY kopya sayısı, **(b)** miktarları arasındaki regresyon eğrisi

3.1.5. hTERT / SRY Oranı

İnsan genomunda hTERT geni diploid yani iki kopya SRY geni ise haploid yani tek kopya halinde bulunmaktadır. Bundan dolayı hTERT / SRY oranının beklenen değeri ise 2/1' dir. Çalışma grubunda hTERT/SRY oranının ortalaması $5,86 \pm 10,17$ (0,50 – 57,82, median 2,43)' dir (Şekil 21). Kontrol grubunda ise hTERT/SRY oranının ortalaması $4,03 \pm 1,55$ (1,68 – 6,13, median 3,79)' dir (Şekil 22).

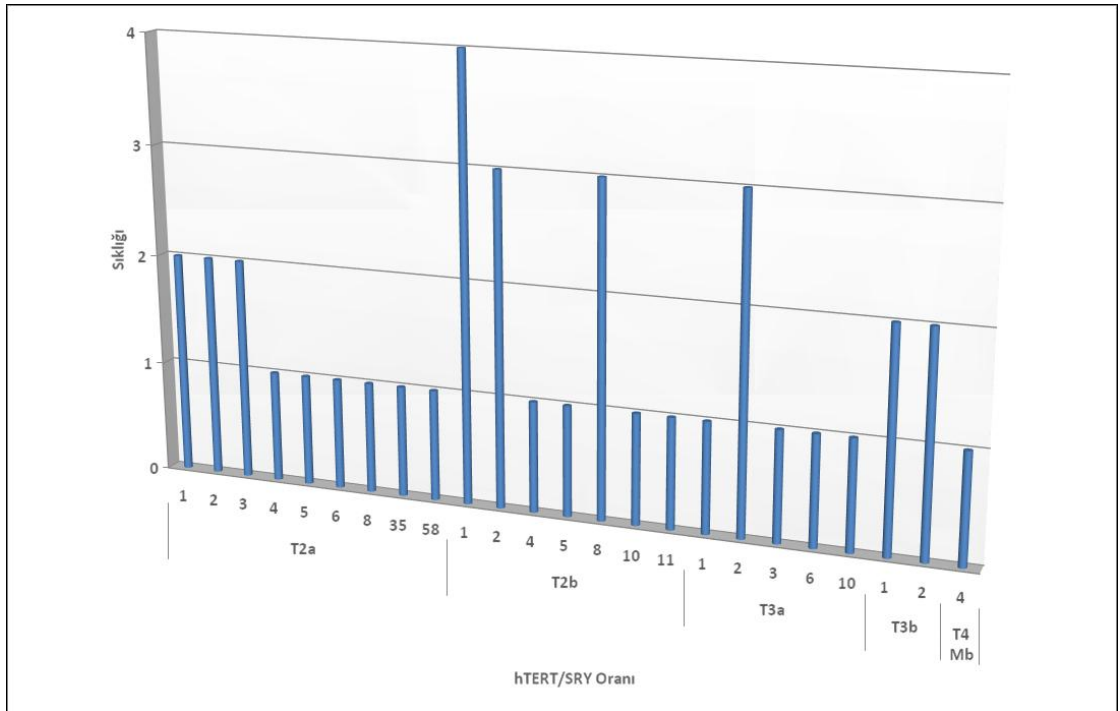


Şekil 21: PCa'lı olgulardaki hTERT/SRY oranının dağılımı



Şekil 22: Kontrol grubundaki hTERT/SRY oranının dağılımı

Çalışma grubundaki hTERT/SRY oranı tümör derecelerine göre incelendiğinde istatistiksel bir fark saptanmadı ($p > 0,005$, Şekil 23).



Şekil 23: TNM evrelemesinde hTERT/SRY oranının olgulardaki dağılımı

3.1.6. PSA Değeri ve hTERT, SRY Kopya Sayısı Oranı

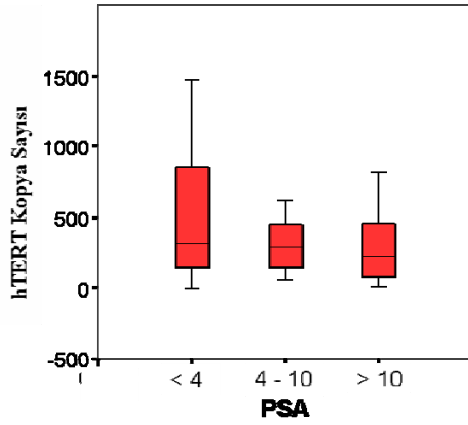
PSA değerleri <4, 4–10 ve >10 olmak üzere 3 gruba ayrılmıştır. hTERT kopya sayısı ile PSA grupları arasında anlamlı bir ilişki saptanamamıştır ($p>0,005$, tablo 22). SRY kopya sayısı ile PSA grupları arasında da istatistiksel bir fark saptanamamıştır [($p>0,005$, tablo 23, Şekil 24)].

Tablo 22: PSA gruplarında hTERT kopya sayısının dağılımı

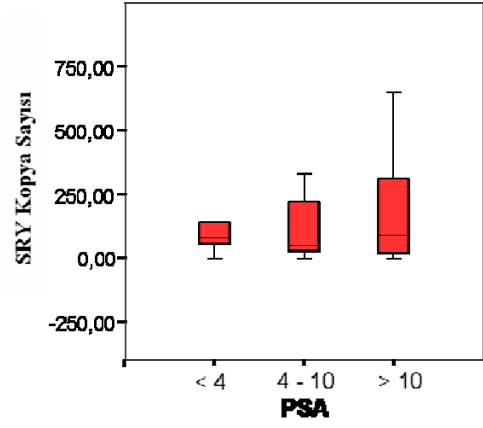
PSA	N	Ortalama	SD	%95 Güven aralığı		Minimum	Maksimum
				Alt sınır	Üst sınır		
<4	6	5668,8333	5067,25805	351,0721	10986,5945	1550,00	14743,00
4-10	12	4485,0833	4467,90273	1646,3134	7323,8533	636,00	16400,00
>10	21	14914,9048	49650,10564	-7685,5524	37515,3619	63,00	230000,0
Total	39	10283,2564	36502,45401	-1549,4703	22115,9832	63,00	230000,0

Tablo 23: PSA gruplarında SRY kopya sayısının dağılımı

PSA	N	Ortalama	SD	%95 Güven aralığı		Minimum	Maksimum
				Alt sınır	Üst sınır		
<4	6	1821,1667	2193,80213	-481,0875	4123,4208	556,00	6260,00
4-10	12	2446,5000	3828,79004	13,8029	4879,1971	11,00	13000,00
>10	21	6400,9048	21364,72997	-3324,2037	16126,0132	7,00	99000,00
Total	39	4479,5897	15797,96685	-641,5187	9600,6982	7,00	99000,00



a



b

Şekil 24: (a) hTERT, (b) SRY kopya sayısının PSA gruplarındaki dağılımı

3.2. Gleason skoru, hTERT, SRY Kopya Sayısı Oranı

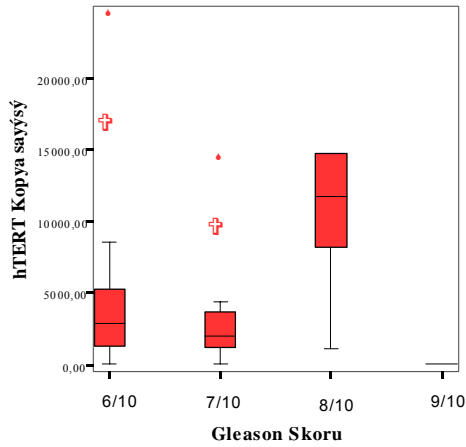
Gleason skorlamasına göre 16 olgu 6/10, 14 olgu 7/10, 5 olgu 8/10 ve 1 olgu da 9/10 olup bu gruplar kendi içinde karşılaştırıldığında hTERT kopya sayısı açısından anlamlı fark saptanmıştır ($F=2,978$, $p=0,045$, Tablo 24). Gleason skoru 8/10 olan grupta hTERT kopya sayısı belirgin olarak yüksektir. SRY kopya sayısı ile Gleason skoru arasında istatistiksel fark saptanamamıştır [$p>0,05$, Tablo 25, Şekil 25].

Tablo 24: Gleason skoruna göre hTERT kopya sayısının dağılımı

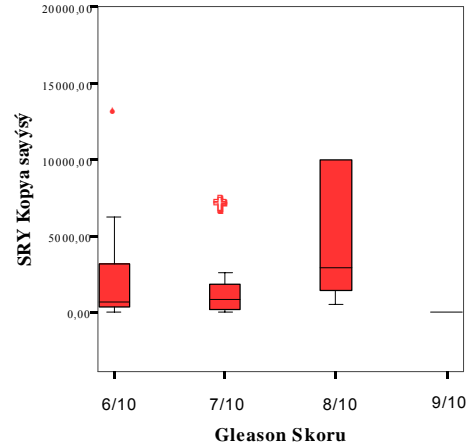
GS	N	Ortalama	SD	%95 Güven aralığı		Minimum	Maksimum
				Alt sınır	Üst sınır		
6/10	18	4800,5000	6222,92270	1705,9133	7895,0867	112,00	24300,00
7/10	14	3316,2857	3908,33625	1059,6795	5572,8919	106,00	14300,00
8/10	5	53175,4000	98979,07852	-69723,3584	176074,1584	1104,00	230000,0
9/10	1	63,0000	.	.	.	63,00	63,00
Total	38	10494,1316	36968,35958	-1657,0658	22645,3290	63,00	230000,0

Tablo 25: Gleason skoruna göre SRY kopya sayısının dağılımı

GS	N	Ortalama	SD	%95 Güven aralığı		Minimum	Maksimum
				Alt sınır	Üst sınır		
6/10	18	2101,5556	3228,03517	496,2914	3706,8197	11,00	13000,00
7/10	14	1584,0714	2190,19678	319,4895	2848,6534	7,00	6530,00
8/10	5	22751,6000	42788,14742	-	75880,1022	497,00	99000,00
9/10	1	8,0000	.	.	.	8,00	8,00
Total	38	4572,9211	15999,12957	-685,8620	9831,7041	7,00	99000,00



a



b

Şekil 25: (a) Gleason skorunda hTERT ve (b) SRY kopya sayıları

3.3. TNM, hTERT, SRY Kopya Sayısı Oranı

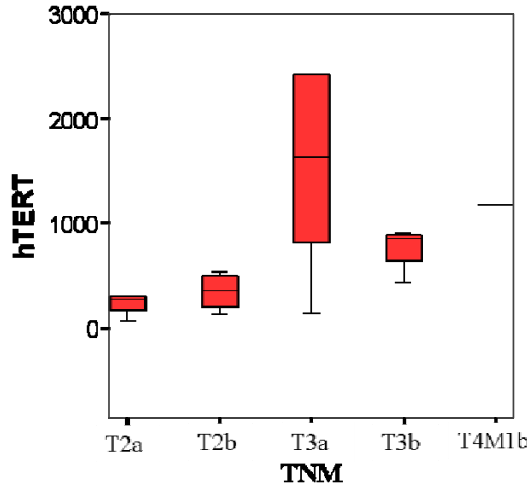
Çalışma grubumuzda, hTERT ve SRY kopya sayıları ile tümör evreleri arasında anlamlı bir fark saptanamamıştır [(p>0,05, Tablo 26, Tablo 27, Şekil 26)].

Tablo 26: hTERT kopya sayısının TNM evrelemesine göre dağılımı

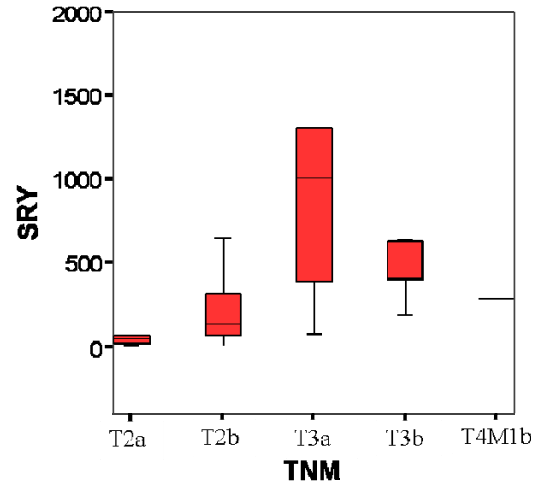
TNM	N	Ortalama	SD	%95 Güven aralığı		Minimum	Maksimum
				Alt sınır	Üst sınır		
T2a	12	1481,6667	1206,25237	715,2505	2248,0829	106,00	3330,00
T2b	14	4600,0714	4724,49905	1872,2269	7327,9160	63,00	14743,00
T3a	7	39508,0000	84501,87683	-	117659,2015	526,00	230000,0
				38643,2015			
T3b	4	7060,0000	2180,33637	3590,5983	10529,4017	4400,00	9100,00
T4Mb	1	11800,0000	.	.	.	11800,00	11800,00
Total	38	10494,1316	36968,35958	-1657,0658	22645,3290	63,00	230000,0

Tablo 27: SRY kopya sayısının TNM evrelemesine göre dağılımı

TNM	N	Ortalama	SD	%95 Güven aralığı		Minimum	Maksimum
				Alt sınır	Üst sınır		
T2a	12	393,5833	337,53450	179,1241	608,0425	7,00	1150,00
T2b	14	2143,8571	2893,00533	473,4856	3814,2287	8,00	10000,00
T3a	7	16910,5714	36481,07783	-16828,7983	50649,9411	54,00	99000,00
T3b	4	4442,5000	2241,12137	876,3758	8008,6242	1850,00	6370,00
T4Mb	1	2890,0000	.	.	.	2890,00	2890,00
Total	38	4572,9211	15999,12957	-685,8620	9831,7041	7,00	99000,00



a



b

Şekil 26: (a) TNM evrelemede hTERT (b) SRY kopya sayıları

BÖLÜM-IV

4.1. TARTIŞMA

Prostat kanseri (PCa) erkeklerde en sık ortaya çıkan sağlık sorunlarından birisi olmaktadır. Erkeklerde en sık görülen kanserlerden biri olan PCa, tüm kanserlerin %32' sini oluşturmaktadır. 40 yaşın altında nadiren görülen PCa' nın yaş ilerledikçe insidansı artmakta ve 80'li yaşlarda ise en yüksek oranda görülmektedir.

Günümüzde kullanılan tümör markırları, sınırda kalan olgular için gerekli spesifite ve sensitivite gösteremediklerinden dolayı kanser hastalarının tedavilerinin düzenlenmesinde tatmin edici olamamaktadır. Dolaşımdaki serbest DNA' nın yeni bir tümör markerı olması olasıdır.

Serbest DNA' nın kanser hastalarının serum ve plazmalarında yüksek oranda bulunduğu gösterilmiştir. Azalmış kromatin stabilitesi ve spesifik onkogenlerin, tümör süpresör genlerin ve mikrosatellit değişimler gibi tümör DNA' sının tüm karakteristikleri, serum ve plazmadaki serbest DNA' da da bulunmaktadır.

Pıhtılaşma işlemleri sırasında hematopoietik hücrelerden DNA'nın non-spesifik salınımı, serumda plazmadan daha yüksek DNA konsantrasyonları ile sonuçlanmaktadır (32). Plazma örnekleriyle karşılaştırıldığında, serum örneklerindeki ortalama 14 kat yüksek DNA konsantrasyonu bir çalışmada bildirilmiş olup, diğer araştırmacılar 2–5 kez daha yüksek konsantrasyon sap-

tamışlardır (32, 57). Plazmadaki serbest DNA' nın *in vivo* konsantrasyonlarını serum DNA' sına göre daha iyi yansıttığı bildirilmiştir. Çalışmamızda serbest DNA' nın izolasyonu plazmadan gerçekleştirilmiştir. Serbest DNA' sı daha yüksek konsantrasyonlarda olması ve pıhtılaşma esnasında kontrol edilemeyen faktörleri içermesinden dolayı serum tercih edilmemiştir.

Serbest DNA' nın konsantrasyonu, kan örneğinin alınması ve işleme protokolleri tarafından etkilenmektedir (32, 57). Kullanılan enjektörün çeşidi, kan örnekleme ile örnek preparasyonu arasındaki geçen zaman ve kan örneklerinde farklı santrifüj işlemlerinin kullanılması, DNA' nın konsantrasyonunu *in vitro* etkileyen faktörler arasında yer almaktadır (32, 57, 59).

Buna ek olarak DNA konsantrasyonlarında dikkate değer farklılıkların oluşma nedenleri arasında farklı ekstraksiyon protokolleri de yer almaktadır (25, 32, 37). Fakat bu faktörlerin tümünden daha önemlisi, serbest DNA' nın kantifikasyonunu etkileyen serum veya plazmadan örnek hazırlama metodudur (22, 25, 37). Serbest DNA' nın izolasyonu için 4 ml plazma kullanılmıştır. Bu hacimdeki plazmanın izolasyonu için geliştirdiğimiz ekstraksiyon protokolü uygulanmıştır. İzolasyonu kit ile gerçekleştirildiğinde 4 ml plazmadaki serum proteinleri izolasyon kitinin filtresini tıkamakta ve izolasyon gerçekleştirilememektedir (12). Bu amaçla serum proteinlerini uzaklaştırmak için amonyum asetat ve kloroform çöktürme yöntemleri izolasyon protokolüne eklenmiştir.

Serbest DNA konsantrasyonları, kütle konsantrasyonları (ng/ml; µg/l) veya genom-dengi konsantrasyonlar (genom-denkle/ml; kilo genom-denkle/l; kopya/ml), 6.6pg içeren tek bir diploid insan hücresindeki belirli hedef sekansın miktarı olarak bir genom-denklik tanımı yapılmaktadır (5, 37).

Tüm bu etmenler çeşitli gruptaki araştırmacıların buldukları değerleri karşılaştırmayı zorlaştırmaktadır. Serbest DNA' nın referans değerlerini araştıran birkaç çalışma bulunmaktadır (5, 23, 37). Çalışmamızda elde ettiğimiz serbest DNA kopya sayıları Lo ve ark. larının geliştirmiş olduğu çevrim formülü ile ng/ml' ye çevrilmiştir. Bu çevrim formülüne göre çalışmamızda saptanan 0,2 kopya sayısı 6.6 pg/ml' ye karşılık gelmektedir (37).

Çalışmamızda kontrol grubuna ($76,72x2+113,68$) göre hTERT miktarının "cut-off" değeri 267,12 ng/ml ve SRY için ($20,64x2+32,63$) 73,91 olarak saptanmıştır. Bir yöntemin cut-off değeri belirlenirken ortalama + 2SD kullanılırken literatürde serbest DNA için genellikle % 95 düven aralığı üst sınırı tercih edilmiştir. Çalışmamızın hTERT miktarının üst limiti 175,07 ve SRY' nin 49,14 tür. Leon ve ark. larının yaptıkları çalışmada serbest DNA, radyoimmunoassay ile araştırılıp, serumda 50 ng/ml üst "cut-off" değeri olarak seçilmiştir.

Junk ve ark. larının yaptıkları çalışmada ise; erkek ve bayan kontrollerde plazma DNA konsantrasyonlarının benzer olduğu gösterilmiştir. Erkek olgularda üst referans limiti 41 ng/ml olarak bulunmuştur (22, 29, 32).

Thijssen ve ark. ları, 28 sağlıklı donör ile yaptıkları çalışmada plazmada DNA'nın "cut-off" limitini 12 ng/ml olarak tespit etmişlerdir (57).

Wu ve ark. ları yaşları 20–70 olan erişkinlerde serumdaki en üst referans limitini 84 ng/ml olarak tanımlamışlardır (66).

hTERT üst limiti literatürdeki ve bizim çalışmamızdaki SRY üst limitinin 3,5 katı olarak saptanmış ve SRY üst limiti ise literatürle uyumludur (32, 50).

Çalışmamızın “cut-off” değerlerine göre hTERT pozitif olan olgu sayısı ile SRY pozitif olgu sayısı arasında da fark bulunmaktadır. Her ikisinin pozitif olduğu 8 olgu bulunmaktadır. Bir olgu sadece hTERT pozitifken 3 olgu da sadece SRY pozitifdir. Ayrıca hTERT / SRY oranı 11 olguda (%27,5) $2/1$, 9 olguda (%22,5) $< 2/1$ ve 20 (%50) $> 2/1$ olarak saptanmıştır.

Olgularımızdaki hTERT / SRY oranlarındaki bu farklı dağılımının prostat kanseri ile ilişkisinin daha ayrıntılı incelenmesi gerekmektedir. Fakat bu güne kadar literatürde bununla ilgili bir kaynak bulunmamaktadır. Bu orandaki kayma bize göre iki anlam taşımaktadır. hTERT gen kopya sayısının amplifikasyonu söz konusu olabilir veya Y kromozomunun delesyonu bulunmaktadır. Bu her iki olasılık kanserlerde sıklıkla rastlanan patolojilerdendir.

Perinchery ve ark. nın yaptıkları çalışmada, prostat kanserinde Y-spesifik genlerin delesyonları araştırılmıştır. Yalnızca epitelial hücrelerin mikrodiseksiyonu için 50 prostat kanserli doku işleme alınmıştır. Bu hücrelerden DNA izole edilip, PCR ile amplifiye edilip, Y-kromozomuna spesifik 6 farklı genin (SRY, ZFY, BPY1, SMCY, RBM1 ve BPY2) analizleri yapılmıştır. Prostat kanserinde Y-kromozomuna spesifik genlerin anlamlı kaybı tespit edilmiştir. Prostat kanserinin yüksek grade lerinde ve evrelerinde SRY ve BPY2 genlerinin kaybı daha sık olarak gözlenmiştir (41).

Wu ve ark. larının yaptıkları çalışmada 1ml serum / plazma örneklerinden QIAamp 96 spin blood mini kit (Qiagen) kullanılarak serbest DNA izole edilmiş ve kantitasyon PicoGreen DNA tayin kiti kullanılarak yapılmıştır. Serbest DNA düzeyinin ortalama değeri kontrol grubunda (yıllık sağlık kontrolü yapılan bireyler) $57,1 \pm 30,6$ ng/ml (ortalama \pm SD) olarak bulunmuştur. Pros-

tat kanseri tanılı, PSA değerleri 4 ile 20 ng/ml olan 51 olgunun, ortalama serbest DNA düzeyleri 458 ± 790 ng/ml ve PSA değerleri 20 ng/ml den fazla olan 34 olgunun ortalama serbest DNA düzeyleri 490 ± 471 ng/ml olarak bulunmuştur (66).

Çalışmamızda PSA değerleri <4, 4-10, >10 olmak üzere 3 grupta incelenmiş PSA değerleri artışı ile serbest DNA' nın artışı gözlenmiş olmakla birlikte aralarında anlamlı bir korelasyon saptanmamıştır. Çalışmamızda 4-10 PSA değerinde, serbest DNA hTERT ortalaması 148,01 ng/ml, SRY ise 80,74 ng/ml ve PSA değerleri >10 olan grupta hTERT 476,66 ng/ml, SRY 204,29 ng/ml olarak belirlenmiştir. PSA değeri >10 gruptaki DNA miktarı Wu ve ark. larının çalışmasındaki DNA miktarına oldukça yakındır.

TNM evreleri ile prostat kanserli olgularda serbest DNA miktarı arasında anlamlı bir fark saptanmamış olup çalışmamızda pozitif olarak değerlendirilen olgulardan 6 tanesi T3 evresinde ve DNA ortalaması 1903,18 ng/ml 1 tanesinde T4 evresinde ve 389,40 ng/ml serbest DNA saptanmıştır. T3 evresindeki yüksek orandaki serbest DNA miktarı dikkat çekicidir.

Gleason skorları ile serbest DNA miktarları arasında anlamlı bir korelasyon saptanmıştır. Gleason skorlarıyla serbest DNA arasındaki korelasyonu gösteren ilk çalışma olması yönünden de dikkat çekicidir.

Çalışmamızda yöntemimizin spesifisite ve sensitivitesi kontrol grubumuzun az olmasından dolayı hesaplanmamıştır.

Boddy ve ark.ları serbest DNA' nın prostat kanserinin klinik tanısında rolü olup olmadığını araştırmışlardır. Prostat karsinomlu 61 olgu ve benign

anamnezli 62 olgu çalışmaya dahil edilmiştir. Analizler sonucunda; serbest DNA ($p=0,82$), boyut dağılımı ($p=0,91$) ve kanser varlığı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon saptamamışlar ve prostat kanserinin klinik takibinde, serbest DNA' nın prognostik bir değer taşımadığı fikrini ileri sürmüşlerdir (7).

Çalışmamız Boddy ve ark. larının yaptığı çalışmada olduğu gibi serbest DNA ile prostat kanseri arasında bir korelasyon saptayamamıştır (7). Bununla birlikte Boddy ve ark. larının ileri sürmüş oldukları bu yöntemin bir prognostik değer taşımadığı fikrini katılmamaktayız. Farklı kromozomlardaki fazla sayıda markırlar ile değerlendirilmesi ile serbest DNA' nın prognostik değer taşıyan bir tümör markırı olacağını inanmaktayız.

Sonuç olarak; Prostat kanserinde, serbest DNA yönteminin geniş seriler ile "cut-off" değerlerinin belirlenmesi yoluyla tanı değerini artacağına inanmaktayız. Yöntemin geçerliliğinin gösterilmesiyle prostat kanserinde tanıya yardımcı bir non-invaziv yöntemin uygulamaya geçirilebileceğini düşünmekteyiz.

BÖLÜM-V

5.1. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda, prostat karsinomu ön tanılı ve tanılı olgularda dolaşımdaki serbest DNA' nın kantitatif tayinini yapmak ve prostat kanserinde noninvaziv bir yöntemle tanıya yardımcı olmak amaçlanmıştır.

Prostat kanseri tanısı alan 40 olgulardan serbest DNA kantitasyonu çalışılmıştır. Olguların yaş ortalamaları $61,7 \pm 8,9$, PSA değerleri ortalaması $41,3 \pm 23,8$ olarak hesaplanmıştır.

hTERT, SRY kopya sayıları ve DNA miktarları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p < 0,05$).

hTERT ve SRY kopya sayısı / miktarları arasındaki korelasyon % 98 ilişkili olup, anlamlı olarak saptanmıştır ($R=0,991$, $p=0,000$).

Kontrol grubunda hTERT ve SRY kopya sayısı ve miktarları arasındaki korelasyon % 89 ilişkili olup istatistiksel olarak anlamlıdır ($R=0,948$, $p=0,004$).

Çalışma grubundaki hTERT / SRY oranı tümör derecelerine göre incelendiğinde istatistiksel bir fark saptanmadı ($p > 0,005$).

SRY kopya sayısı ile PSA grupları arasında da istatistiksel bir fark saptanamamıştır ($p > 0,005$).

Gleason skoru 8 / 10 olan grupta hTERT kopya sayısı belirgin olarak yüksektir. SRY kopya sayısı ile Gleason skoru arasında istatistiksel fark saptanamamıştır.

Çalışma grubumuzda, hTERT ve SRY kopya sayıları ile tümör evreleri arasında anlamlı bir fark saptanamamıştır

Sonuç olarak bulgularımız ışığında, olgularımızdaki serbest DNA' nın kantitatif değişimlerine ek olarak, plazma DNA' nın tümör ilişkili karakteristiklerinin de çalışılması önerilmektedir.

Kanserin biyolojisindeki yeni keşfedilen yollar ve ağlar kanser oluşum nedenleri arasında son yıllarda yerini almıştır. Tümörögenезin kompleksliğinin çözümlenmesinde gelişen teknolojiler önemli rol oynamakta ve kanser teşhisindeki gelişmelerle ilgili var olan bilgiler kanser tanısı, önlenmesi ve tedavisi açısından yeni pencereler açılmaktadır. Moleküler determinantlar aracılığıyla kanser riskinin moleküler tespiti gerçeğe hiç bu kadar yakın olmamıştır. Tipik olmayan DNA ve RNA' nın tespiti, serum veya plazmadaki oto-antikorların varlığı ve protein profillenmesi, ilaca olan yanıtın önceden tahmin edilmesi halen sınırlı olarak kullanılabilir.

Bir sonraki çalışmamızda, prostat kanserinde önemli rol oynadığı bilinen Akt/Pten ve mTOR yolağında, SRY ve hTERT gen kopya sayısının yaptığı etkilerin araştırılması planlanmaktadır.

BÖLÜM-VI

6.1. ÖZET

Prostat adenokarsinomu olarak tanımlanan prostat kanseri, sanayileşmiş batı toplumundaki genel olarak erkeklerin %10' undan fazlasında klinik olarak ortaya çıkan bir durumdur. Yaş ile artan bir insidans göstermektedir. Günümüzde prostat kanserinin erken evresinde yavaş ilerleyeceği ya da agresifleşeceği konusunda ayırt edici güvenilir bir metot bulunmamaktadır.

Kanser hastalarının serum ve plazmalarında yüksek oranda serbest DNA (cell-free DNA) bulunduğu gösterilmiştir. Bunun apoptoz ya da nekroz sonucu olduğu düşünülmektedir. Kanser hastalarının plazmalarındaki artmış serbest DNA, azalmış kromatin stabilitesi ve spesifik onkogenlerin, tümör süpresör genlerin ve mikrosatellit değişimlerin varlığı gibi tümör DNA' sının tüm karakteristik özelliklerini sergilemektedir.

Çalışmamızda, prostat karsinomu ön tanılı ve tanılı olgularda dolaşımdaki serbest DNA' nın kantitatif tayinini yapmak ve prostat kanserinde noninvaziv bir yöntemle tanıya yardımcı olmak amaçlanmıştır.

Çalışmamızda, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı' nda prostat kanseri tanısı alan 40 olgulardan serbest DNA kantitasyonu çalışılmıştır. Olguların yaş ortalamaları $61,95 \pm 8,14$, PSA değerleri ortalaması $19,33 \pm 26,95$ olarak hesaplanmıştır. Olgulardan 8 ml periferik kandan plazma ayrılmıştır. Serbest DNA' nın izolasyonu 4 ml plazmadan DNA izolasyon kiti ile (High Pure PCR Template Preparation Kit, Roche Diagnostics, Germany) kit prosedürüne göre gerçekleştirilmiştir. Serbest DNA' nın kantitasyonu için hTERT (human Telomerase Reverse Transcriptase) ve SRY (sex determining region Y) gen bölgeleri seçilmiştir. Kantitasyon, *Taqman* 5' ekzonükleaz metoduna göre Real time kantitatif PCR LightCycler cihazında hTERT ve SRY geni primer ve proları ile gerçekleştirilmiştir. (Roche Diagnostics, Germany). Her iki gen bölgesi için konsantrasyonları bilinen standartlar kullanılarak konsantrasyon / döngü sayısı eğrisi oluşturulmuştur. Saptanan kopya sayıları çevrim formülü kullanılarak ng/ml' ye çevrilmiştir.

hTERT kopya sayısını ng/ml çevrildiğinde çalışma grubunun ortalaması 334,63±1189,41 (2,08 – 7590,00 median 89,43) bulunurken, kontrol grubunun ng/ml değerinin ortalaması ise 113,68±76,72 (21,23 – 192,19, median 120,65) bulunmuştur.

SRY kopya sayısı ng/ml çevrildiğinde çalışma grubunun ortalaması 145,59±514,80 (0,22 – 3.267,00 median 26,37) iken, kontrol grubunun ng/ml değerinin ortalaması ise 32,63±20,64 (3,46 – 51,32, median 37,86) dir

hTERT, SRY kopya sayıları ve DNA miktarları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p < 0,05$).

hTERT ve SRY kopya sayısı / miktarları arasındaki korelasyon % 98 ilişkili olup, anlamlı olarak saptanmıştır. ($R=0,991$, $p=0,000$)

Kontrol grubunda hTERT ve SRY kopya sayısı ve miktarları arasındaki korelasyon % 89 ilişkili olup istatistiksel olarak anlamlıdır ($R=0,948$, $p=0,004$).

Çalışma grubundaki hTERT / SRY oranı tümör derecelerine göre incelendiğinde istatistiksel bir fark saptanmamıştır ($p > 0,005$).

hTERT / SRY kopya sayısı ile PSA grupları arasında da istatistiksel bir fark saptanmamıştır ($p > 0,005$).

Gleason skoru 8 / 10 olan grupta hTERT kopya sayısı belirgin olarak yüksektir. SRY kopya sayısı ile Gleason skoru arasında istatistiksel fark saptanmamıştır.

Çalışma grubumuzda, hTERT ve SRY kopya sayıları ile tümör evreleri arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır

Günümüzde kullanılan tümör markırları, gerekli spesifite ve sensitivitenin eksikliğinden dolayı kanser hastalarının tedavilerinin düzenlenmesinde tatmin edici olmamaktadır. Plazma serbest DNA' nın yeni bir tümör markırı olabileceğini düşünmekteyiz. Dolaşımdaki serbest DNA' nın kantitatif analizi yönteminin uygulanabilir hale gelmesiyle birçok kanser türünde tanının konmasında yardımcı olabilecektir. Ayrıca birçok kanser türü için de tarama testi olarak kullanılabilir.

6.2. ABSTRACT

Prostate cancer, called more precisely 'prostate adenocarcinoma', becomes clinically significant in up to 10% of all males in Western industrialized countries. It is rare in younger males, but its incidence increases continuously with age.

Currently, there isn't enough distinguishing and reliable methods in early stage of prostate cancer about its aggressiveness or development.

Increased concentrations of cell-free DNA in plasma or serum have been found in patients suffering from different types of cancer. It has been conceived that is derived from apoptosis or necrosis. It has been reported that the increased cell free DNA in the plasma of cancer patients has all of the characteristics of tumor DNA, such as decreased strand stability and the presence of specific oncogenes, tumor suppressor genes and microsatellite alterations.

In our study, we aimed to contribute the diagnosis with a non-invasive method in prostate cancer and make the quantitative detection of cell-free DNA in pre-diagnosed and diagnosed patients.

In our study, quantification of cell-free DNA from 40 patients who were diagnosed with prostate cancer in Urology Department of Ege University Medical Faculty. The average age of patients was $61,95 \pm 8,14$ and the average level of PSA was calculated $19,33 \pm 26,95$. Plasma is isolated from 8 ml peripheric blood sampling. The isolation of cell-free DNA from 4 ml plasma by using DNA Isolation Kit (High Pure PCR Template Preparation Kit, Roche Diagnostics, Germany) according to the kit manual. The gene regions SRY (sex determining region Y) and hTERT (human telomerase reverse transcriptase) was chosen for the quantitative analysis of cell-free DNA. Quantitative analysis was actualized by using *TaqMan* 5' exonuclease method with SRY and hTERT primers and probes on Real-time quantitative PCR in LightCycler device (Roche Diagnostics, Germany). For both of the gene regions by using standards which had known concentrations, the curve of concentration / cycle number was constituted. By using formula of conversion, the determined copy numbers was converted to ng/ml.

While the copy number of hTERT were converted to ng/ml, the average of the study group was found $334,63 \pm 1189,41$ (2,08 – 7590,00 median 89,43), the average of the ng/ml value of the control group was found $113,68 \pm 76,72$ (21,23 – 192,19, median 120,65).

When the copy of number SRY converted to ng/ml, the average of the study group was $145,59 \pm 514,80$ (0.22 – 3.267,00 median 26,37) and the average of the ng/ml value of the control group was $32,63 \pm 20,64$ (3,46 – 51,32, median 37,86).

When the hTERT and SRY copy numbers and the amount of DNA were compared with the control group there was no significant difference was found ($p < 0,05$).

The correlation between the hTERT and SRY copy number amount was 98% related and it had a significant difference ($R = 0,991$, $p = 0,000$).

In the control group, the correlation between the hTERT and SRY copy number and amounts was 89% related and is statistically significant ($R = 0,948$, $p = 0,004$).

Any statistically significant correlation between hTERT/SRY ratio and tumor grades was found ($p > 0,005$).

Any statistically significant correlation between hTERT/SRY copy numbers and PSA groups was found ($p > 0,005$).

In the group which have 8/10 Gleason score, the hTERT copy number is significantly high. Any statistically significant correlation between SRY copy number and Gleason score was appointed ($p > 0,005$).

Current tumor markers are not entirely satisfactory in managing cancer patients because of the lack of sufficient specificity and sensitivity. It is possible that serum cell-free DNA might be new tumor markers which have the enhanced specificity that is sought.

BÖLÜM-VII

7.1. YARARLANILAN KAYNAKLAR

1. Allen D, Butt A, Cahill D, Wheeler M, Popert R, Swaminathan R Role of cell-free plasma DNA as a diagnostic marker for prostate cancer. *Ann N Y Acad Sci.* 2004;1022: 76–80
2. Anker P, Mulcahy H, Stroun M Circulating nucleic acids in plasma and serum as a noninvasive investigation for cancer: time for large-scale clinical studies? *Int J Cancer.* 2003 10;103: 149–52.
3. B. Schmidta, T. Carstensena, E. Engelb, B. Jandrigc, C. Witta, M. Fleischhackerb, Detection of cell-free nucleic acids in bronchial lavage .fluid supernatants from patients with lung cancer *European Journal of Cancer* 40 (2004) 452–460
4. Baydınç, C., Ürogenital Organların Anatomik ve Histolojik Yapısı, in *Temel Üroloji*, G.O.Anafarta K, Bedük Y, Arıkan N., Editör. 1998. p. 3–27
5. Benson, M. C., Olsson, C. A.: Prostate specific antigen and prostate specific antigen density. Roles in patient evaluation and management. *Cancer*, 74: 1667, 1994
6. Biroccio A, Leonetti C. Related Articles, Links Telomerase as a new target for the treatment of hormone-refractory prostate cancer. *Endocr Relat Cancer.* 2004;11: 407–21. Review
7. Boddy JL, Gal S, Malone PR, Shaida N, Wainscoat JS, Harris AL. The role of cell-free DNA size distribution in the management of prostate cancer *Oncol Res.* 2006;16: 35–41
8. Bostwick D.G., *Surgical pathology of the prostate*, Chapter32, in *Modern Surgical*

9. Cansino Alcaide JR, Martinez-Pineiro L., Molecular biology in prostate cancer. *Clin Transl Oncol.* 2006; 8: 148–52
10. Carpentier NA, Izui S, Rose LM, et al. The presence of circulating DNA in patients with acute or chronic leukemia: Relation to serum anti-DNA antibodies and Clq binding activity. *Hum Lymphocyte Diff* 1981; 1: 93–104.
11. Catalona, W. J., Richie, J. P., deKernion, J. B. et al.: Comparison of prostate
12. Chan KC, Yeung SW, Lui WB, Rainer TH, Lo YM. Effects of preanalytical factors on the molecular size of cell-free DNA in blood. *Clin Chem.* 2005;51: 781–4. Epub 2005 11
13. Chang JT, Chen YL, Yang HT, Chen CY, Cheng AJ. Differential regulation of telomerase activity by six telomerase subunits. *Eur J Biochem.* 2002; 269:3442–50
14. Chen XQ, Bonnefoi H, Diebold-Berger, et al. Detecting tumour-related alterations in plasma or serum DNA of patients diagnosed with breast cancer. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 2297–2303.
15. Chiu RW, Chan CW, Zhong XY, Lapaire O, Holzgreve W, Hahn S, Lo YM Fetal rhesus D mRNA is not detectable in maternal plasma. *Clin Chem.* 2005;51(11):2210 1
16. Chiu RWK, Poon LLM, Lau TK, et al. Effects of bloodprocessing protocols on fetal and total DNA quantification in maternal plasma. *Clin Chem* 2001; 47: 1607–1613.G
17. De Marzo A.M., Nelson W.G., Isaacs W.B., Epstein J.I.: Pathological and molecular aspects of prostate cancer. *Lanset* 2003; 361: 955–964
18. Doç. Dr. Cem Güler, Yard. Doç. Dr. Murat Şamlı Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Üroloji AD Gene. 2003 Dec 4;321:25-37. *Review*).
19. Doç. Dr. Ferda Şenel - Dr Sami Ulus Çocuk Hastanesi)EKİM 2005 bilim ve Teknik “yeni ufuklara eki”

20. Epstein J.I., Tumors of the prostate, Chapter 3 in Pathology and genetics of tumor of the urinary system and male genital organs, Ed: Eble J.N., Souter G., Epstein J. I., Sesterhenn I.A., IARC Pres Lyon, 2004: 159-215 World Health Organization Classification of Tumors.)
21. Epstein J.I.: The prostate and seminal vesicles, Chapter 45, in Sternberg's Diagnostic Pathology, 4th ed, Vol:III, Lippincot Williams &Wilkins, Philadelphia, 2004:
22. Farina A, Sekizawa A, Rizzo N, Concu M, Banzola I, Carinci P, Simonazzi G, Okai T. Cell-free fetal DNA (SRY locus) concentration in maternal plasma is directly correlated to the time elapsed from the onset of preeclampsia to the collection of blood. *Prenat Diagn.* 2004; 24: 293–7.
23. Fournie GJ, Bret L, Belenguer P, et al. Physicochemical characterization of plasma DNA. *Lupus* 1992; 1: 186
24. Garcia-Olmo D, Garcia-Olmo DC. Functionality of circulating DNA: the hypothesis of genomestasis. *Ann N Y Acad Sci.* 2001;945:265–75.
25. Garcia-Olmo DC, Gutierrez-Gonzalez L, Samos J, Picazo MG, Atienzar M, Garcia-Olmo D. Surgery and Hematogenous Dissemination: Comparison Between the Detection of Circulating Tumor Cells and of Tumor DNA in Plasma Before and After Tumor Resection in Rats. *Ann Surg Oncol.* 2006 24
26. Garcia-Olmo DC, Ruiz-Piqueras R, Garcia-Olmo D. Circulating nucleic acids in plasma and serum (CNAPS) and its relation to stem cells and cancer metastasis: state of the issue. *Histol Histopathol.* 2004;19: 575–83.
27. Gautschi O, Bigosch C, Huegli B, Jermann M, Marx A, Chasse E, Ratschiller D, Weder W, Joerger M, Betticher DC, Stahel RA, Ziegler A Circulating deoxyribonucleic Acid as prognostic marker in non-small-cell lung cancer patients undergoing chemotherapy

28. Herrera LJ, Raja S, Gooding WE, El-Hefnawy T, Kelly L, Luketich JD, Godfrey TE. Related Articles, Links Quantitative analysis of circulating plasma DNA as a tumor marker in thoracic malignancies. *Clin Chem.* 2005;51:113–8. Epub 2004 11
29. Holdenrieder S, Stieber P, Chan LY, Geiger S, Kremer A, Nagel D, Lo YM. Cell-free DNA in serum and plasma: comparison of ELISA and quantitative PCR. *Clin Chem.* 2005; 51: 1544–6. makale 15
30. Horninger W, Berger AP, Rogatsch H, Gschwendtner A, Steiner H, Niescher M, Klocker H, Bartsch G. Characteristics of prostate cancers detected at low PSA levels. *Prostate.* 2004 15;58: 232–7.
31. Jahr S, Hentze H, English S, et al. DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: Quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Res* 2001; 61: 1659–1665.
32. Jung K, Stephan C, Lewandowski M, Klotzek S, Jung M, Kristiansen G, Lein M, Loening SA, Schnorr D Increased cell-free DNA in plasma of patients with metastatic spread in prostate cancer. *Cancer Lett.* 2004 18; 205.1 73–80 makale 5
33. Kopreski MS, Gocke CD. Cellular- versus extracellular-based assays. Comparing utility in DNA and RNA molecular marker assessment. *Ann N Y Acad Sci.* 2000;906:124–8.
34. Lee T-H, Montalvo L, Chrebtow V, et al. Quantitation of genomic DNA in plasma and serum samples: higher concentrations of genomic DNA found in serum than in plasma. *Transfusion* 2001; 41: 276–282.
35. Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, et al. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res* 1977; 37: 646–650.

36. Lilja, H., Christensson, A., Dahlen, U. et al.: Prostate-specific antigen in serum occurs predominantly in complex with alpha 1-antichymotrypsin. *Clin Chem*, 37: 1618, 1991
37. Lo YMD, Tein MSC, Lau TK, et al. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: Implications for noninvasive prenatal diagnosis. *Am J Hum Genet* 1998; 62: 768–775.
38. Lui YYN, Chik KW, Chiu RWK, et al. Predominant haematopoietic origin of cell-free DNA in plasma and serum after sex-mismatched bone marrow transplantation. *Clin Chem* 2002; 48: 421–427.
39. Mandel P, Metais P. Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l'homme. *CR Acad Sci Paris* 1948; 142: 241–243
40. Milo Frattini, Debora Balestra, Paolo Verderio, Gianfrancesco Gallino, Ermanno Leo, Gabriella Sozzi, Marco A. Pierotti, and Maria Grazia Daidone
Reproducibility of a Semiquantitative Measurement of Circulating DNA in Plasma From Neoplastic Patients *American Society of Clinical Oncology*.9, 2006
41. Moriyama H, Matsubara N, Kanbara T, Mori M, Matsuoka J, Yoshino T, Takakura N, Shimizu K, Takaka N. Allelic imbalance and microsatellite instability in plasma DNA released from polyclonal pancreatic adenocarcinoma. *Int J Oncol*. 2002; 21: 949–56.
42. Partin AW, Carter HB, Chan DW, et al. Prostate specific antigen in the staging of localized prostate cancer: influence of tumor differentiation, tumor volume and benign hyperplasia. *J Urol* 1990;143:747– 52.
43. Pathology, Ed: Widner N., Cote R.J., Suster S., Weiss L.M., Elsevier Science, Philadelphia, 1st ed, 2003: 1149-1196
44. Paul A. Bunn Jr Early Detection of Lung Cancer Using Serum RNA or DNA Markers: Ready for “Prime Time” or for Validation? *The Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* Vol 21, No 21 1, 2003

45. Rogers JC, Boldt D, Kornfeld S, et al. Excretion of deoxyribonucleic acid by lymphocytes stimulated with phytohaemagglutinin or antigen. Proc Natl Acad Sci USA 1972; 69: 1685–1689.
46. Rosai J., Rosai and Ackerman's Surgical Pathology, Chapter 18, Male reproductive system, 9th ed, Elsevier Inc, 2004: 1361–1411)
47. S, Kyo S, Banerjee PP. Genistein represses telomerase activity via both transcriptional and posttranslational mechanisms in human prostate cancer cells. Cancer Res. 2006 15;66,2107–15
48. SAĞLIK BAKANLIĞI TAKSİM EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ PATOLOJİ KLİNİĞİ Klinik Şefi: Doç.Dr.Nusret ERDOĞAN Doktora tezi
49. Savill J, Fadock V, Hensons P, et al. Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis. Immunol Today 1993; 14: 131–136.
50. Schmidt B, Weickmann S, Witt C, Fleischhacker M. Improved method for isolating cell-free DNA. Clin Chem. 2005; 51,1 561–3. makale 12
51. Shapiro B, Chakrabarty M, Cohn EM, et al. Determination of circulating DNA levels in patients with benign or malignant gastrointestinal disease. Cancer 1983; 51: 2116 2120. 268
52. Sorenson GD, Pribish DM, Valone FH, et al. Soluble normal and mutated DNA sequences from single-copy genes in human blood. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 1994; 3: 67–71.
53. Sozzi G, Conte D, Leon M, Ciricione R, Roz L, Ratcliffe C, Roz E, Cirenei N, Bellomi M, Pelosi G, Pierotti MA, Pastorino U. Related Articles, Links Quantification of free circulating DNA as a diagnostic marker in lung cancer. J Clin Oncol. 2003 1;213902–8. Epub 2003 24

54. Stroun M, Anker P, Lyautey J, et al. Isolation and characterization of DNA from the plasma of cancer patients. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1987; 23: 707–712.
55. Stroun M, Anker P, Maurice P, et al. Neoplastic characteristics of the DNA found in the plasma of cancer patients. *Oncology* 1989; 46: 318–322.
system, 9th ed, Elsevier Inc, 2004: 1361–1411
56. Tan EM, Schur PH, Carr RI, et al. Deoxyribonucleic acid (DNA) and antibodies to DNA in the serum of patients with systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest* 1966; 45: 1732–1740.
57. Thijssen MA, Swinkels DW, Ruers TJ, de Kok JB. Difference between free circulating plasma and serum DNA in patients with colorectal liver metastases. *Anticancer Res* 2002; 22:421–5.
58. Tjoa ML, Jani J, Lewi L, Peter I, Wataganara T, Johnson KL, Bianchi DW, Deprest JA. Circulating cell-free fetal messenger RNA levels after fetoscopic interventions of complicated pregnancies. *Am J Obstet Gynecol.* 2006; 195: 230–5. Epub 2006 Apr 19
59. Tong YK, Lo YM. Related Articles, Links Diagnostic developments involving cell-free (circulating) nucleic acids. *Clin Chim Acta.* 2006; 363(1–2): 187–96. Epub 2005 26. Review makale 8
60. ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ Üroloji Anabilim Dalı ,Ders Notları
61. Vasioukhin V, Anker P, Maurice P, et al. Point mutations of the N-ras gene in the blood plasma of patients with myelodysplastic syndrome or acute myelogenous leukemia. *Br J Haematol* 1994; 86: 774–779.
62. Vernon SD, Shukla SK, Conradt J, Unger ER, Reeves WC Analysis of 16S rRNA gene sequences and circulating cell-free DNA from plasma of chronic fatigue syndrome and non-fatigued subjects. *BMC Microbiol.* 2002 23;2: 39. Epub 2002 23.

63. Wataganara T, Bianchi DW. Fetal cell-free nucleic acids in the maternal circulation: new clinical applications. *Ann N Y Acad Sci.* 2004;1022: 90–9.
64. Wataganara T, Chen AY, LeShane ES, Sullivan LM, Borgatta L, Bianchi DW, Johnson KL. Changes of cell-free fetal DNA in maternal plasma after elective termination of pregnancy. *Clin Chem.* 2005;51: 217–9. Epub 2004 4
65. Wolfgang Arthur Schulz *Molecular Biology of Human Cancer, An advanced Student's Textbook*
66. Wu TL, Zhang D, Chia JH, Tsao KH, Sun CF, Wu JT Cell-free DNA: measurement in various carcinomas and establishment of normal reference range. *Clin Chim Acta.* 2002;32177–87 makale 4
67. Xiao Yan Zhong, Wolfgang Holzgreve, Sinuhe Hahn Risk free simultaneous prenatal identification of fetal Rhesus D status and sex by multiplex real-time PCR using cell free fetal DNA in maternal plasma *SWISS MED WKLY* 2001;131: 70–74
68. Xu qi Chen, Herve´ Bonnefoi, Marie-Franc,oise Pelte, Jacqueline Lyautey, Christine Lederrey, Sina Movarekhi, Pierre Schaeffer, Hugh E. Mulcahy, Pierre Meyer, Maurice Stroun, and Philippe Anker
69. Young R.H., Srigley J.R., Amin M.B., Ulbright T.M., Cubilla A.L. Tumors of the prostate gland, seminal vesicles, male urethra and penis. *Armed Forces Institute of Pathology.* Washington, D.C, 2000; 1–344
70. Zhong XY, Gebhardt S, Hillermann R, Tofa KC, Holzgreve W, Hahn S Circulatory nucleosome levels are significantly increased in early and late-onset preeclampsia.
71. Zhong XY, Holzgreve W, Tercanli S, Wenzel F, Hahn S. Cell-free foetal DNA in maternal plasma does not appear to be derived from the rich pool of cell-free foetal DNA in amniotic fluid. *Arch Gynecol Obstet.* 2006;273(4): 221–6. Epub 2005 28.

72. Zhong XY, Wang Y, Chen S, Pan X, Zhu N, Hahn C, Huppertz B, Holzgreve W, Hahn S; Labu; Pubuzhuoma; Gesangzhuogab; Ouzhuwangmu. Circulating fetal DNA in maternal plasma is increased in pregnancies at high altitude and is further enhanced by preeclampsia. Clin Chem. 2004;50: 2403–5
73. Ziegler A, Zangemeister-Wittke U, Stahel RA. Circulating DNA: a new diagnostic gold mine? Cancer Treat Rev. 2002; 28:255–71

7.2. ÖZGEÇMİŞ

1980 yılında İzmir’ de doğdum. Orta öğrenimimi Aydın Süper Lisesinde tamamladım. 1999 – 2000 öğretim yılında Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümüne başladım ve 2004 yılında mezun oldum. 2004 yılında, Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü’ nün açtığı Tıbbi Biyoloji lisansüstü eğitim programında yüksek lisansa başladım. İngilizce bilmekteyim.