



T.C
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

İDİYOPATİK HİRŞUTİZMLİ VAKALARDA CYP19 GENİ VE
SRD5A2 GENİ POLİMORFİZMLERİNİN VE BUNLARIN LOKAL
OLARAK ANDROJENE DUYARLI DOKUDAKİ
EKSPRESYONLARININ ARAŞTIRILMASI.

TIPTA UZMANLIK TEZİ

DR. AHMET OKAY ÇAĞLAYAN

KAYSERİ 2007



T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

İDİYOPATİK HİRŞUTİZMLİ VAKALARDA CYP19 GENİ VE
SRD5A2 GENİ POLİMORFİZMLERİNİN VE BUNLARIN LOKAL
OLARAK ANDROJENE DUYARLI DOKUDAKİ
EKSPRESYONLARININ ARAŞTIRILMASI.

TIPTA UZMANLIK TEZİ

DR. AHMET OKAY ÇAĞLAYAN

Danışman
PROF. DR. MUNİS DÜNDAR

KAYSERİ 2007

TEŞEKKÜR

Bu tezin hazırlanmasında bana destek veren, bilgi ve birikimiyle bana yardımcı olan ve çalışmalarımı yönlendiren çok değerli hocam ve danıőmanım sayın Prof. Dr. Munis DÜNDAR'a ve

Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'na geldiğim günden beri her konuda yardım ve desteklerini benden esirgemeyen çok değerli hocalarım sayın Prof. Dr. Yusuf ÖZKUL'a ve Yrd. Doç. Dr. Çetin SAATÇI'ye,

Tezimin en başından beri benden yardımlarını esirgemeyen, bilgi ve tecrübelerini her zaman benimle paylaşan, hasta ve kaynak temininde yardımcı olan kıymetli hocalarım, sayın Prof. Dr. Fahrettin Keleştimur'a, sayın Doç. Dr. Kürőat Ünlühizarcı ve Yrd. Doç. Dr. Fatih Tanrıverdi'ye,

Bugünlere gelmemde çok büyük emekleri olan canım aileme,

Her zaman, her konuda beni yalnız bırakmayan hayat arkadaşım Dr. Leyla Gül Yurdagül'e teşekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
TEŞEKKÜR	i
KISALTMALAR	iv
TABLO LİSTESİ	vi
ŞEKİL LİSTESİ	vii
ÖZET	viii
ABSTRACT	x
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	5
Kıl Gelişiminin Fizyolojisi	6
Hirşutizm? Nekadarı Normal Değildir?	13
İdiyopatik Hirşutizmin Tanımı	14
İdiyopatik Hirşutizmin Yaygınlığı	14
İdiyopatik Hirşutizmin Patogenezi	14
İdiyopatik Hirşutizmin Serum Belirleyicileri	22
İdiyopatik Hirşutizmin Tedavisi	23
3. GEREÇ ve YÖNTEM	27
GEREÇ	
Çalışma grubu	27
Gereçler	28
Kimyasallar	29
Solüsyonlar	30
Primer Dizileri	31
METOD	
CYP19 geni C1558T ve SRD5A2 A49T Polimorfizm Analizleri	32
Kandan DNA İzolasyonu	32
DNA'nın Spektrofotometrede Konsantrasyonunun Ölçülmesi	33
Polimeraz Zincir Reaksiyonu	33
Restriksiyon Enzim Kesimi İle Mutasyon Analizi	35
DNA Dizi Analizi İle Mutasyon Analizi	37
Aromataz ve 5-alfa redüktaz tip II genlerinin ekspresyonlarının araştırılması	
RNA izolasyonu	41
RNA'nın ölçümü	44

Total RNA'dan cDNA sentez edilmesi	44
Real-Time PZR metoduyla SRD5A2 ve CYP19 genlerinin ekspresyonlarının tesbit edilmesi	45
İSTATİSTİKSEL ANALİZ	55
4. BULGULAR	56
5. TARTIŞMA	64
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	68
7. KAYNAKLAR	70
8. TEZ ONAY SAYFASI	90

KISALTMALAR

AR	: Androjen Reseptör
BAC	: Bakteriyel Yapay Kromozom
cDNA	: Komplementer DNA
CPA	: Siproteron Asetat
Ct	: Eşik siklusu
CYP19	: Sitokrom P19
DEAS	: Dehidroepiandrosteron Sülfat
DHT	: Dihidrotestosteron
DNA	: Deoksiribonükleotid trifosfat
dNTP	: deoksiribonükleotid trifosfatlar
EDTA	: Etilendiamin tetra asetat
EE	: Etil estradiol
EGF	: Epidermal Büyüme Faktörü
EtBr	: Etidyum Bromür
FSH	: Folikül Stimüle Edici Hormon
GAPDH	: Gliseraldehit-3-fosfat-dehidrojenaz
GH	: Büyüme Hormonu
GnRH	: Gonadotropin Serbestleştirici Hormon
IGF-I	: İnsüline Benzer Büyüme Faktörü I
IGF-II	: İnsüline Benzer Büyüme Faktörü I
IH	: İdiyopatik Hirşutizm
Kb	: Kilobaz
KM	: Michaelis – Menten sabiti
LH	: Lüteinizan Hormon
L-T3	: L-Tiroksin
mRNA	: Haberci RNA
PCOS	: Polikistik Over Sendromu
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RFLP	: Restriction Fragment Length Polymorphism

RNA	: Ribonükleotid trifosfat
RT-PZR	: Revers Transkripsiyon PZR
SDR5A1	: Steroid 5 alfa redüktaz Tip 1
SRD5A2	: Steroid 5 alfa redüktaz Tip 2
SP	: Spironolakton
T	: Testosteron
TGF-beta	: Transforme Edici Büyüme Faktörü beta
Tm	: Erime Isısı
UTR	: Tranlasyon Yapılmayan Bölge

TABLO LİSTESİ

	Sayfa No
Tablo 1: Hirşutikliğin nedenleri	2
Tablo2: IH ve Kontrol Grupları Arasında CYP19 C1558T Genotip Dağılımı ve Allel Sıklıkları	56
Tablo 3: IH ve Kontrol Grupları Arasında SRD5A2 A49T Genotip Dağılımı ve Allel Sıklıkları	57
Tablo 4: Hasta ve kontrol gruplarının periferik kan ve androjene duyarlı umblikus altı orta hattan elde edilen dokularda SRD5A2 ve CYP19 genlerinin ekspresyonlarının real-time pqr cihazıyla sybergreen kullanılarak araştırılması sonucu bulunan sonuçların tümünün görünümü	58
Tablo 5: Hastaların kan ve dokudaki SRD5A2 geni ekspresyonlarının karşılaştırılması	59
Tablo 6: Kontrol grubunun kan ve dokudaki SRD5A2 geni ekspresyonlarının karşılaştırılması	59
Tablo 7: Hastaların kan ve dokudaki CYP19A geni ekspresyonlarının karşılaştırılması	60
Tablo 8: Kontrol grubunun kan ve dokudaki CYP19A geni ekspresyonlarının karşılaştırılması	60

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa No
Şekil 1: Kıl folikülünün yapısı	6
Şekil 2: Kıl gelişiminin dönemleri	7
Şekil 3: CYP19 geninin şematik görünümü	19
Şekil 4: CYP19 geninin PZR ile çoğaltılan 190 bp'lik bölgesinin <i>BspI286 I</i> restriksiyon enzimi ile kesim reaksiyonu sonucu oluşan ürünün, yatay jel elektroforezinde görüntüsü	37
Şekil 5: CYP19 geninin Real-Time analizi sonuçlarının görünümü	61
Şekil 6: SRD5A2 geninin Real-Time analizi sonuçlarının görünümü	61
Şekil 7: Beta aktin geninin Real-Time analizi sonuçlarının görünümü	62
Şekil 8: SRD5A2 geni A49T polimorfizminin dizi analizi ile tesbit edilmesi	62
Şekil 9: Tezin akış şeması	63

İDİOPATİK HİRŞUTİZMLİ HASTALARDA AROMATAZ VE 5 ALFA REDÜKTAZ mRNA'LARININ REAL-TİME PZR İLE KUANTİFİYE EDİLMESİ VE BU GENLERİN POLİMORFİZMLERİNİN ARAŞTIRILMASI

ÖZET

Giriş: Hirsutizm, kadınlarda terminal tüylerin erkek benzeri yapı kazanması olarak tanımlanır ve tüm kadınların %5-10'unu etkilemektedir. Hirsütizmin varlığı hastalar için stres kaynağı olmakta ve psikososyal gelişimlerine olumsuz etki yapmaktadır. Hirsütizm ile birlikte normal ovulatuvar fonksiyona ve dolaşımdaki androjen konsantrasyonuna sahip olan hastalar İdiyopatik Hirsütizm sınıfına konurlar ve bu hastalığın patogenezinde oldukça az bilgi mevcuttur.

Amaç: Bu çalışmada, androjen biyosentezinde yer alan genlerin (SRD5A2, CYP19) polimorfizmlerinin ve ekspresyonlarının idiyopatik Hirsütizme yakınlıktaki rolleri araştırıldı.

Metod: Tüm hirsütizm hastaları aynı gözlemci tarafından seçildi. Hirsütizm modifiye Ferriman-Gallwey(F-G) metodu ile derecelendirildi. F-G skoru 8'den büyük olanlar hirsütik olarak kabul edildi. Bu çalışmada, 8 hirsütik ve 8 kontrol hastasında, 5 alfa redüktaz Tip2 (SRD5A2) ve aromataz (CYP19) genleri ekspresyonu, göbek altı orta hattan alınan dermal papillada çalışıldı ve karşılaştırıldı. SRD5A2 ve CYP19 ekspresyonları Real-Time PZR ile internal kontrol olarak β -actin geni kullanılarak değerlendirildi. Ayrıca, 15 idiyopatik hirsütik ve 15 sağlıklı kontrol hastasından, SRD5A2 A49T polimorfizmi direkt sekanslama metodu ile ve CYP19 C1558T polimorfizmi RFLP metodu çalışıldı.

Sonuç: SRD5A2 geni ekspresyonu hasta ve kontrol grubunda farklılık göstermedi (0.78 ± 0.05 vs 0.74 ± 0.06). CYP19 gen ekspresyon düzeyi kontrol grubuna göre

doku düzeyinde düşük bulundu ($p<0.05$). SRD5A2 ve CYP19 genleri polimorfizmleri için hasta ve kontrol grupları arasında fark bulunamadı.

Tartışma: İdiyopatik hirsütizimli hastalarda aromataz gen ekspresyonunun daha fazla hasta kullanılarak araştırılması hastalığın etiyopatogenezinin aydınlatılması için gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler: CYP19, Ekspresyon, Hirsütizm, SRD5A2, Polimorfizm

QUANTITATIVE DETERMINATION, BY REAL-TIME REVERSE TRANSCRIPTION POLYMERASE CHAIN REACTION, OF AROMATASE AND 5 ALPHA REDUCTASE mRNA, AND POLYMORPHISMS IN THE AROMATASE AND 5 ALPHA REDUCTASE GENES IN IDIOPATHIC HIRSUTISM.

ABSTRACT

Background: Hirsutism, the presence of terminal (coarse) hairs in females in a male-like pattern, affects between 5% and 10% of women surveyed. The presence of hirsutism is extremely distressing to patients, with a significant negative impact on their psychosocial development. Hirsutism with normal ovulatory function and normal circulating androgen concentrations called idiopathic hirsutism and little information is available regarding the pathogenesis.

Aim: In this study, significance of polymorphisms of the genes involved in androgen biosynthesis (*SRD5A2, CYP19*) and their expressions in modulating the susceptibility to idiopathic hirsutism was studied.

Methods: All hirsutism exams were performed by one examiner. Hirsutism was scored using a modification of the Ferriman-Gallwey (F-G) method. An F-G score of >8 defined hirsutism. In the present study, we assessed the expression of the genes for type 2 5 alpha-reductase isoenzyme (*SRD5A2*) and aromatase (*CYP19*) in subumbilical midline hairs plucked from 8 untreated idiopathic hirsutic patients and compare it with that of 8 normal women. *SRD5A2* and *CYP19* expression was estimated by Real-Time-PCR using the gene of the ubiquitously expressed protein β -actin as an internal control. In addition, associations between aromatase and 5 alpha reductase expression and their polymorphisms were sought for *SRD5A2* gene A49T and *CYP19* gene C1558T polymorphisms direct sequencing and RFLP methods, respectively in 15 undertreated and 15 healthy women.

Results: No differences were found in SRD5A2 expression levels between patients and normal women (0.78 ± 0.05 vs 0.74 ± 0.06 , respectively). CYP19 gene expression levels were lowered the patients according to controls ($p < 0.05$). In addition no differences were found SRD5A2 and CYP19 polymorphisms between patients and controls.

Discussion: Further studies are needed to investigate the expression of the aromatase gene in idiopathic hirsutism for understanding idiopatik hirsutism etyopathogenesis.

Key words: CYP19, Expression, Hirsutism, SRD5A2, Polymorphism

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Hirşutizm, kadınlarda yüz, göğüs, meme, sırt, karın alt kısım ve ön uyluk gibi cilt bölgelerindeki vellöz kılların terminal kıllara dönüşerek artmasıdır (1). Hirşutizm tanısı toplumdan topluma ve hatta aynı toplum içerisinde kültürden kültüre farklılık gösterebilir. Vücutlarında genel olarak daha çok kıllanma izlenen Akdeniz ülkelerindeki kadınlar, Kuzey Avrupalı veya Uzak Doğulu kadınlara göre hirşutik olarak değerlendirilebilir (2). Ülkemizde bu konuda kesin rakamlar yoktur. Ancak bir Akdeniz ülkesi olmamız da gözönüne alındığında klinik izlenimlerde bu semptomun nadir olmadığı görülmektedir. Hirşutizme yol açan bir çok sebep vardır (Tablo 1). Hirşutik kadınların yaklaşık %15'inde mensesler düzenlidir ve overler normal yapıdadır. Adrenal veya over kaynaklı tümörlere ait hiçbir belirti yoktur, plazma testosteron veya androstenedion düzeylerinde belirgin bir yükselme saptanmaz (3). Bu vakalar idiyopatik hirşutizm olarak adlandırılır ve hirşutizmin polikistik over sendromundan sonra en sık rastlanılan ikinci sebebidir (4). İdiyopatik hirşutizmin patogenezinde az sayıda bilgi mevcuttur. Günümüzde idiyopatik hirşutizmin aslında pilosebase birimde, androjen metabolizmasıyla ilgili bir bozukluk olduğu ve genetik nedenlerle ortaya çıktığı düşünülmektedir.

Tablo 1. Hirsutikliğin nedenleri

	Başlangıç bulgusu hirsutizm olabilen hastalıklar	Başlangıç bulgusu genellikle hirsutizm olmayan hastalıklar
Polikistik over sendromu (PCOS)	+	
Over tümörleri	+	
Konjenital adrenal hiperplazi (CAH)	+	
Adrenal duyarsızlık	+	
Cushing hastalığı		+
Prolaktinoma		+
Adrenal tümörler	+	
Gonadal disgenezis		+
Androjen tedavisi	+	
Nedeni belli olmayan hirsutizm		+
Stres	+	

Normal şartlar altında, 5 alfa redüktaz enzimi, testosteronu daha etkili androjen olan dihidrotestosterona çevirir ve kıl foliküllerinde androjenlerin etkisi için anahtar rol oynar (5,6). Klonlama çalışmaları 5 alfa redüktaz enziminin Tip 1 ve Tip 2 olmak üzere iki izoenziminin olduğunu bulmuştur (7,8). Ciltte bulunan baskın 5 alfa redüktaz izoenzimi Tip 1'dir (SDR5A1) ve yapısal olarak 5 alfa redüktaz izoenzimi Tip 2 ile %60 homoloji gösterir ki 5 alfa redüktaz izoenzimi Tip 2 karakteristik olarak prostat bezinde bulunmaktadır (8).

Hirşutik hastaların genital ve pubik cilt fibroblastlarında normal kadınlarınkine göre artmış 5 alfa redüktaz enzim aktivitesi gösterilmiştir (9,10). Böyle çalışmalar idiopatik hirşutizm tanısı almış hastalarda da aynı sonucu vermiştir (11). SRD5A2, hem normal hem de hirşutik hastalarda genital ciltte ana olarak eksprese edilen izoformdur (12). Ama 5 alfa redüktaz izoenzimlerinin fizyolojik rolleri tam olarak anlaşılmamıştır ve onların değişik vücut bölgelerindeki dağılım farklılıklarının önemi bilinmemektedir (13).

SRD5A2 geni, 2p23 kromozom bölgesinde bulunmaktadır. SRD5A2 geni, 5 ekzon ve 4 introndan oluşur, 56384 baz içerir, 254 aa den oluşan 28393 Dalton ağırlığında ürün verir ve 5-dehidrottestosteron bağımlı genital doku, karaciğer dahil diğer organ ve dokularda da bulunmaktadır (14). İkinci en yaygın SRD5A2 germ hücreleri ile aktarılan polimorfizm, 49. kodondaki alaninden threonine değişime neden olan tek yanlış anlamlı mutasyondan kaynaklanmaktadır. Bu polimorfizm, invitro enzim aktivitesi normalden beş kat daha fazla olan varyant proteinin üretimi ile sonuçlanmaktadır (15). Bilinen SRD5A2 polimorfizmlerinin 5 alfa redüktaz enziminin aktivitesinde değişikliğe neden olan etkisi, olası mRNA stabilitesindeki değişikliktir (13).

Aromataz östrojen biyosentezinde anahtar bir enzimdir. Aromataz enzimini kodlayan CYP19 geni 15q21.2 lokalizasyonunda bulunmaktadır ve yaklaşık 123kb'dan oluşmaktadır (16). Translasyonun başlangıç kısmı ekzon iki ve bitiş kısmı da ekzon on'dur ve yaklaşık kodlanan bu bölge 30 kb kadardır. Translasyona uğramayan ilk ekzonunda bulunduğu 5' ucu ise yaklaşık 90 kb kadardır (17). Enzim C19 steroidleri östrojenlere (C18) çevirmektedir (androstenedionu östrona -E1-,testosteronu da östradiole-E2- dönüştürür). Enzim esas olarak over ve plasenta gibi östrojeni üreten hücrelerin endoplazmik retikulumunda yerleşmiştir ama geniş bir şekilde testislerin leydig hücresi, beyin, adipoz doku, karaciğer, kas ve saç folikülü gibi birçok diğer dokuda da bulunmaktadır (18,19).

İnsan aromataz geni dokuya spesifik promotorların kontrolü altında transkripsiyona uğramaktadır. Böyle promotorlar geniş bir şekilde dağılmışlardır (90-kb'lik bir alana dağılmışlardır). Her bir promotor farklı tip hormonlar tarafından aktive edilir ve aromatazın ifadesini düzenler, aromataz mRNA'sını kodlayan bölge aynıdır (aynı ekzonlar transkripsiyona uğrar) ama plasentada, gonadlarda, beyinde, yağ dokuda ve ciltte dokuya spesifik 5'-çevrilmeyen bölgeler mevcuttur (20).

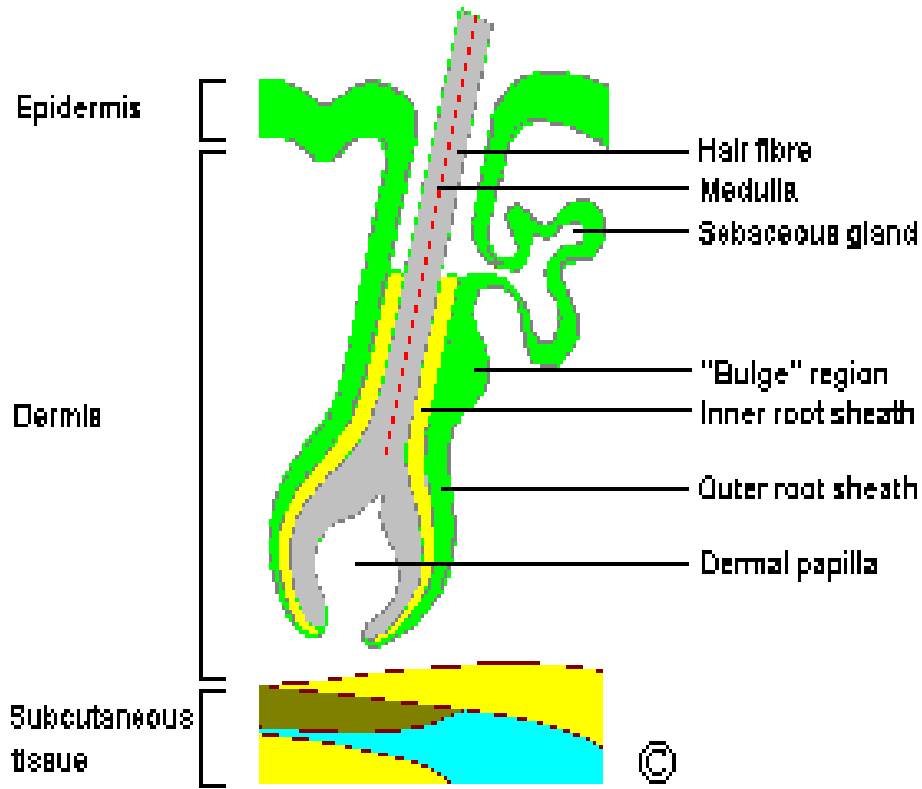
Ovulatuar kadınlarda, östrojen primer olarak FSH tarafından aktive edilen, aromatazin proksimal yerleşimli promotor II'sinin etkisiyle ovarian granülosa hücrelerinden kaynaklanmaktadır. Erkeklerde ve postmenapozal kadınlarda, östrojen primer olarak yağ ve cilt dokuları gibi ekstraglanduler dokulardan üretilmektedir ki burada aromataz, I.3 ve I.4 lokalizasyonundaki distal promotorlarının etkisiyle düşük seviyede ifade edilir (21,22).

Somner ve ark. yaptığı bir çalışmada CYP19 genotipinin serum östradiol konsantrasyonu ile önemli derecede ilişkili olduğu bulunmuştur ($p<0.002$) (23). Literatürde şimdiye kadar idiyopatik hirsütizmi olan vakalarda hastalığın patogenezinde önemli rol oynayan androjen üretim ve etki sisteminde kilit konumdaki SRD5A2 ve CYP19 genlerinin etkilerinin tesbit edildiği bir çalışma mevcut değildir. Bu çalışmadaki amaç, hedef genlerin lokal olarak doku düzeyinde ve kanda kantitatif ekspresyonlarının karşılaştırılması ve seçilen polimorfik varyantlarının hedef genlerin ekspresyonuna etkilerinin tesbit edilmesidir.

2. GENEL BİLGİLER

Kadınlarda yüz, göğüs, meme, sırt, karın alt kısım ve ön uyluk gibi cilt bölgelerindeki vellöz kılların terminal kıllara dönüşerek artmasına hirsütizm adı verilir, kadınların %5-10'unu etkilemektedir (23-25). İdiyopatik hirsütizm tanısı ise hirsütizmi bulunan kadınların %5-15'ine konulmaktadır (26). Hirsütizmin varlığı hastalar için bir stres faktörü olmakta ve onların psikososyal gelişiminde oldukça önemli bir negatif etki yapmaktadır (27,28). Hirsütizm hastalarının büyük bir çoğunluğunda izole rahatsızlığa göre diğer hastalık durumlarının (örneğin, polikistik over sendromu, androjen sekrete eden tümörler, klasik olmayan adrenal hiperplazi, veya ciddi insülin rezistansı sendromları gibi) bir işareti bulunmaktadır. Bu hastalıklar gibi benzer diğer hastalıkların bulunmadığı hastalar idiyopatik hirsütizm veya basit veya periferik hirsütizm olarak adlandırılmaktadır (26).

Erişkin insan vücudunda kıllar vellöz ve terminal olmak üzere başlıca ikiye ayrılırlar. Vellöz kıllar ince, yumuşak ve pigmentsizdir. Puberte öncesi bütün vücutta yaygın olarak bulunurlar. O kadar ince, yumuşak ve renksizdirler ki gözle güçlükle farkedilebilirler. Terminal kıllar kalın, kolay farkedilebilen pigmentli kıllardır. Puberte öncesi sadece kafa ve kaşlarda bulunur. Kadınlarda puberte döneminde androjenlerin etkisi ile aksiller ve pubik bölgelerdeki vellöz kıllar terminal kıllara dönüşürler. Yüz ve vücuttaki terminal kılların normalden fazla olması, genellikle anovulatuvar over ve siklik menstrüel fonksiyonun kaybı ile beraber olan, androjen yapımı fazlalığı tarafından oluşturulur. Daha ileri durum olan virilizm (kliteromegali, sesin derinden gelmesi, saç dökülmesi), daha ciddi durumlarda (adrenal hiperplazi, adrenal veya over kaynaklı androjen üreten tümörler) görülür.



Şekil 1. Kıl folikülünün yapısı

2.1.KIL GELİŞİMİNİN FİZYOLOJİSİ

2.1.1 Tüylerin gelişimi, türleri ve dağılımı

İnsan vücudunu yaklaşık 50 milyon kıl folikülü kaplamaktadır. Bunların 100,000-150,000 tanesi kafa derisinde geriye kalanı da yüz ve diğer vücut alanlarında bulunmaktadır. Kıl folikülünün olmadığı vücut alanları ayak tabanı, el ayası ve dudaklar ile sınırlıdır. Oldukça az sayıda kıl folikülü doğumdan sonra şekillenir ve çoğu kıl foliküllerinin çoğu 40 yaşından sonra azalmaya başlar (29,30).

Tüy yapısının oluşumunu sağlayan ilk epidermisin yapısı, embriyonik yaşamın ilk aşaması, 9-12. haftalar arasında oluşur (31,32). Ektodermal ve mesodermal bileşenler yakın bir temasta bulunmakta ve kıl folikülünün varlığı boyunca da sürekli bir etkileşim içinde olmaktadır. Bu embriyonik tüy folikülleri tüy üretmeye, gelişimin 16.-20. haftalarında başlayabilmektedir.

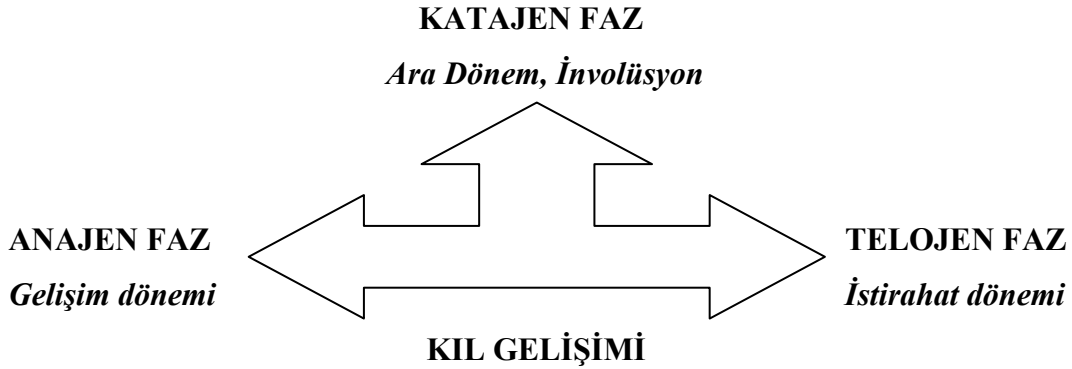
Tüy, kendisinin gövdesini oluşturan keratin proteinlerinden oluşmaktadır. Yapısal olarak, tüyler üçe ayrılmaktadır. Lanugo, doğum sonrası 1.-4. aylar arasında

dökülen, fetusun derisini kaplayan yoğun ve yumuşak bir tüydür. Vellus tüyleri de yumuşaktır ancak, lanugo tüylerinden daha büyüktür. Vellus tüyleri çoğunlukla pigmentli değildir, uzunluğu 2 mm civarındadır ve vücudun tüysüz olan bölgelerini kaplamaktadır. Histolojik olarak, vellus tüylerinin 0.03 mm'yi aşmayan çapı vardır ve bu çap da kök kılıfından daha küçüktür (33). Terminal tüyler ise uzun, pigmentlidir. Bu tüyler, her iki cinsiyette kaşları, kirpikleri, kafa derisi tüylerini ve pubik ve koltukaltı tüylerini ve erkeklerde de yüz ve vücut tüylerinin çoğunu oluşturmaktadır (29,30).

Ciltte, kıl folikülleri foliküler üniteleri oluşturmak üzere grup oluşturular; her foliküler ünite yaklaşık iki-dört adet kıl folikülü ile beraber sebaceöz glandlar ve bağ dokudan oluşur (34-36). Her etnik grup içerisinde foliküler ünite sayısı cinsiyete göre değişiklik göstermez. Bu nedenle erkek ve kadınlar arasındaki vücut tüylerindeki farklılık foliküler ünite sayısı ile ilişkili değilken, tüyün tipi ve vasfı ilişkilidir (29,30).

2.1.2 Tüy uzamasının aşamaları ve düzenlenmesi

Tüy uzamasında üç aşama vardır. Aktif büyüme aşaması (anajen); tüylerin uzamasının durup, tüy gelişimlerinin azaldığı geri dönüş evresi (katajen) ve son olarak tüylerin durduğu ve yerine yeni tüylerin gelmesiyle dökülen telojen aşamasıdır (29,30) (Şekil 2).



Şekil 2. Kıl gelişiminin dönemleri, Saçlı derideki kıllarda kılların anajen fazı kısa (2-4 ay), telojen fazları uzundur. Ekstremitelerde, kirpik ve kaştaki anajen faz uzun (2-6 yıl), telojen faz kısadır (3 ay).

İnsanlarda tüyler, farklı tüy folikülleri arasındaki büyüme aşamalarının asenkronizasyonunun bir sonucu olarak, sürekli uzayan bir görünümündedir. Bazı tüyler büyüme aşamasında iken (anajen), diğerleri duraklama döneminde (telojen),

veya tam tersidir. Bu da sürekli bir büyüme olduğu izlenimi vermektedir. Büyüme aşamasının süresinin uzunluğu, kıl folikülünün nerede olduğu ile ilgilidir. Örneğin, kafa derisinde anajen dönemi 2–6 ay arasında sürerken, vücut tüylerindeki anajen dönem 3–6 ay sürmektedir. Ayrıca, kafa derisinde ve vücut tüylerinde katajen ve telojen aşamalarının süresi benzerdir. Bu süre, ortalama olarak 2–3 haftadan 3–4 aya kadar değişmektedir. Anajen–telojen oranı (anajen dönemdeki tüy oranının, telojen dönemdeki tüylere oranı) çoğunlukla derinin belli alanlarındaki tüy uzama aktivitesini tahmin etmek için kullanılmaktadır. Bu orantıda, yüksek oran, daha aktif tüy uzamasını göstermektedir.

Cinsiyet steroid'leri ve bir takım lokal ve sistemik etkenler, tüy uzamasını düzenlemesinde dermal papilla üzerinde dolaylı ve doğrudan etki yapabilirler. Ayrıca bu etkenler, kıl foliküllerinin diğer bölümleri üzerinde de etkili olabilirler. Bu bölümlere, tüy uzamasını düzenleyen dermal papilla kadar önemli olabilen, iç ve dış kök kılıfları ve “artış” bölgesinin foliküler kök hücreleri de dâhildir (34-36).

2.1.2.1 Lokal ve sistemik etkenler:

Tüy uzamasını etkileyen çeşitli büyüme faktörleri ve sitokinler saptanmıştır (37–43). Bu etkenlerin, büyümeyi hızlandırmak için dermal papillayı etkileyen matriks metalloproteinazı olan, stromolizin sentezinin artması ile oluştuğu düşünülmektedir (44).

Tiroid ve GH gibi diğer hormonlar da tüy uzamasını değiştirebilir (45-47). Genelde, tiroid hormonu veya büyüme hormonu (GH) gibi hormonlardaki eksiklikler, kafa derisi ve vücut tüylerindeki anajen–telojen oranındaki değişiklikler ile ilişkilidir (45,46,48). Tiroid hormonu alarak tedavi gören hipotiroid hastaları çoğunlukla yaklaşık 8 hafta içinde kafa derilerindeki tüylerde uzamalar yaşamışlardır (45). Araştırmacılar tüy foliküllerinin dış kılıf hücrelerinde tiroid hormonu reseptörlerinin varlığını ve kültürlenmiş tüy foliküllerinde hücresel çoğalmada L-T3'ün olumlu etkilerinin olduğunu kanıtlamışlardır (49). GH tedavisi gören GH eksikliği yaşayan erkeklerde, serbest androjen indeksinde gözle görülür bir artış gözlenmeden, vücut tüylerinde artış yaşadıklarını belirtmişlerdir (47). GH'ın vücut tüylerinin uzamasını, dögüsel androjenlerde bağımsız olarak, doğrudan etkileyebileceği belirtilmiştir. GH tutulması, kıl folikülünün alt 1/3'ünde, folikülün üst 2/3'ünün dış kılıfında ve dermal papilla da görülmektedir (50). Buna rağmen, GH'ın in vitro tüy folikül uzamasında veya morfolojisindeki doğrudan etkileri, incelenmemiştir (51). GH'ın etkisine, insülin benzeri büyüme faktörü I'in (IGF-I)

artan üretiminin de katkıda bulunması olasıdır. İnsanlarda, skrotal deri fibroblast'ları, IGF-II veya insülin değil, IGF-I androjen etkisinin periferal potensiyalizasyonu için gerekli enzim olan 5 α -reduktazın etkilerini arttırmaktadır (52). Ayrıca, kültürlenmiş tüy foliküllerinde, IGF-II veya insülinde fazla olarak IGF-I tüy foliküllerinin gelişimini arttırmaktadır (40).

2.1.2.2 Seks steroidleri:

Cinsiyet steroidleri arasında androjenler, insan vücudundaki tüylerin türlerinin ve dağılımını sağlamakta oldukça önemlidirler. Androjenlerin etkisi dâhilinde, vellus tipi tüy üreten tüyler terminal türlerin üretilmesine başlamak için uyarılabilirler. In vivo deneyler, normal erkeklerde (53), enükleiklerde (54) ve kadından erkeğe dönüşen transseksüellerde (55) vücudun androjen duyarlı bölgelerindeki (örneğin, genital ve yüz sakal alanları) tüy foliküllerinin farklılaşmasında, dış androjenlerin etkisinin olduğunu göstermiştir. Bazı alanlardaki terminal tüylerin üretimini arttırmaktan başka, androjenler vücut tüylerinin anajen dönemini uzatırken, kafa derisindeki anajen dönemi kısaltmaktadır (56,57). Androjenler ayrıca sebüm salgılanmasını arttırmaktadır. Bu nedenle androjenler, sadece mevcut tüyün türünü değiştirmekle kalmaz, ayrıca anajen döneminin süresini uzatarak vücut tüylerinin uzamasını, deri ve tüylerin yağlılığının artmasını da sağlayabilir.

Androjenlerin etkisi ile bazı tüy foliküllerinin terminal tüy üretimi (örneğin, vellus tüylerinin “terminalleşmesi”), androjen duyarlılığındaki farklılığa veya tüy foliküllerindeki diğer (daha tanımlanmamış) öncül farklılıklara bağlı olabilir ve bu konu hala daha tam açıklanmış değildir. Vücut tüyleri arasında (farklı deri alanlarında ve deri alanları arasında) 5 alfa redüktaz içeriği ve androjenleri metabolize etmesi anlamında büyük farklılıklar vardır. Androjenlerin, üretimi uyarması ve terminal tüylerin uzatmasındaki çeşitliliği, belli bir oranda bu farklılıklar sayesinde. Son olarak, terminal tüy uzatmasındaki androjenlerin etkilerinin saptanmasında androjen konsantrasyonu önemlidir. Bu da tam ve kısmi androjen duyarsızlığı olan hastaların seyrek terminal vücut tüylerinin olması ile açıkça görülmektedir (58).

Cinsiyet steroidlerinin, döngüsel düzeylerinden bağımsız olarak tüy folikülleri üzerinde etkileri olabileceği göz önüne alınmaktadır. Bu bölgesel veya intrakrin etkileri oldukça önemlidir ve özellikle IH'de androjen fazlalığı düzensizliklerinin gelişiminde belirgin bir rol oynayabilirler. Tüy foliküllerinin

intrakrinolojisi kadın ve erkeği etkileyen androjenik alopesi'de görülmüştür. Bu düzensizlikte androjenler, özellikle hassas kadın ve erkekte, kafa derisindeki anajen dönemini kısaltmakta ve görülebilen tüylerde büyük miktarda azalmaya neden olmaktadır. Erkeklerde, androjenik alopesi, kafanın frontal ve oksipital tarafındaki saçlarda kayıplar ve daha sonrasında da sagittal bölgedeki saçların kaybı ile ilişkilidir (59). Buna karşılık, kadınlarda bu düzensizlik kafanın frontal ve oksipital bölgesindeki tüylerin yaygın şekilde incelmeye neden olmaktadır (60). Kadın ve erkeğin yaşadığı bu düzensizlikteki klinik farklılıklarda, lokal cinsiyet steroidlerinin neden olabileceği bildirilmiştir (61). Bu hipotezi test etmek için yapılan bir çalışmada, androjenik alopesialı 12 erkek ve 12 kadın incenmiş ve erkeklerinkine kıyasla, kadınların frontal tüy foliküllerindeki 5 alfa redüktaz içerikleri 6 kat fazla ve aromataz içerikleri 3 kat az olarak tesbit edilmiştir (61). Bu nedenle, lokal androjen metabolizmasının, androjenik alopesia'da cinsiyetler arasındaki klinik farklılıklara neden olduğu söylenebilir. Yine de bu farklılıkların androjenlerin lokal eksikliğinden (östrojenlerin dönüşümü ile) veya doğrudan östrojen etkisinden mi kaynaklandığı bilinmemektedir. Aslında, bazı araştırmacılar östrojenlerin, anajen–telojen oranlarını değiştirerek, kafa derisinde saç kaybına doğrudan neden olabileceğini belirtmişlerdir (62).

Kafa derisinin aksine, östrojenlerin vücut tüylerinin uzamasını düzenlemesi üzerindeki doğrudan etkileri kesin değildir (63). Fare modellerinde östrojenlerin, tüy foliküllerinin gelişimlerinin oluşumunu ve tüm uzama döngüsünün uzamasını önlediği görülmüştür (64,65). Yüksek dozlarda progesteron ve estradiol, insan genitalinde ve pubik deride (66), muhtemelen potent androgen dihidrotestosteronun lokal üretimini azaltarak, 5 alfa redüktazın etkilerini engellemektedir. Progesteronların ve östrojenlerin, insanlarda tüy uzamasındaki doğrudan etkileri hakkında çok az bilgi vardır.

2.1.2.3. Deri 5 alfa redüktaz (5 α -RA) aktivitesi.

Çeşitli deneyler, testosteron, androstenedion, ve dehidroepiandrosteron'ların 5 α redüksiyonu ile DHT'ye geçişini deri ve tek tek tüy foliküllerinde in vitro olarak göstermiştir. Tam bir organizmada, DHT aslında, erkeklerde T'nin periferik nonhepatik 5 α redüksiyonu ve kadınlarda da androstenedion'nun 5 α redüksiyonu ile oluşmaktadır (67,68). Aslında, terminal tüylerin gelişiminde androjenlerin etkisi, önemli derecede 5 alfa redüktazın çalışmasını gerektirmektedir. Bu durum, 5 alfa redüktaz eksikliği olan hastalarda seyrek sakal gelişimi ile desteklenmektedir.

(58,69,70). Ancak, 5 alfa redüktaz eksikliği olan hastalarda bile, T metabolizması dermal papilla hücrelerinin in vitro şekilde DHT'ye dönmesi, terminal tüy uzaması ile ilişkilidir (71).

5 alfa redüktaz ve DHT'nin erkek tipi tüy uzamasındaki etkilerinin saptamasındaki önemli rolü Farthing ve arkadaşları (72) tarafından yapılan bir çalışma ile desteklenmiştir. Bu çalışmadaki hastalarda, T ve DHT'nin döngüsel konsantrasyonlarında normalden daha fazla bir sapma görülen, çölyak hastalığı vardır (72). Bu erkeklerde, yüz tüylerinin uzama oranı, plasma DHT düzeyleri ile doğrudan ilişkilidir ki, bu da normalden daha düşüktür. Ayrıca, tüy yoğunluğu DHT değil ancak T düzeyleri ile ilişkilidir; bu hastalarda normalden daha yüksektir. DHT ve T'nin sinerjik olan bu ikili etkisi, çocuklukta 5 alfa redüktaz eksikliği olan hastalarda görülen bölgesel virilizasyon ile tutarlıdır (58,69,70). Sonuçta, yüksek konsantrasyonlardaki döngüsel T, Foliküler ünite üzerinde doğrudan etkiye sahipken, DHT hedef dokularındaki temel androjen hareketidir.

Lokal 5 alfa redüktaz aktivitesi, büyük oranda DHT üretimi ve sonucunda androjenlerin tüy foliküllerine etkilerini belirlemektedir. Yüksek dozda progesteron ve östradiol'ün, insan genitalinde ve pubik derisinde (66) 5 alfa redüktaz aktivitesini önlemektedir, kaldı ki, androjenlerin periferik 5 alfa redüktaz aktivitesini uyardığı ve arttırdığı bilinmektedir (73). Ancak, tüm androjenlerin periferik 5 alfa redüktaz aktiviteleri ve tüy uzamasına etkileri eşit değildir. Örneğin, Adrenal Hiperandrojenizm'li hastalardaki pubik deriler, kontrol grubu ile benzer ve ovarian hiperandrojenizmi hastalarından daha düşük 5 alfa redüktaz düzeyleri göstermektedir (74). Androjenlerle birlikte, 5 alfa redüktazın aktivite dağılımını başka etkenler kontrol edebilir. Örneğin, ilk verilere göre, lokal (TGF-beta ve EGF) ve döngüsel büyüme etkenleri (örneğin, IGF-I, aktivin A, ve inhibin A), bu enzimin aktivitelerini değiştirmektedir (52,75,76). Bununla birlikte, bu düzenleyici etkenlerin hareketlerinin işleyişi ve özel rollerinin tanımlanması gerekmektedir. 5 alfa redüktaz aktivitesi, Tip 1 ve Tip 2 5 alfa redüktaz izoenzimi adlı iki farklı izoenzimin fonksiyonlarının bir sonucudur (77). Her 5 alfa redüktaz izoenzimi 5 ve 2 kromozomlarındaki ayrı genlerde şifrelenmiştir ve farklı biyokimyasal özellikler ve doku dağılımları göstermektedir (61). Tip 1 izoenziminin optimum PH'ı yaklaşık 8,0, Michaelis-Menten sabiti (KM) yaklaşık 24 mM ve daha düşük eşçarpın belirliliğine sahiptir ve mikrozomal subsellüler bölümdedir. Tip 2 izoenzimi daha asitli bir PH aralığında ve KM'si yaklaşık 0,33 mM ve nükleer ve mikrozomal subsellüler

bölümlerin her ikisinde de bulunmaktadır. Bu nedenle Tip 2 5 alfa redüktaz, KM değerleri göz önüne alındığında, DHT'nin sentezinde daha aktiftir.

Her ne kadar son çalışmalara göre, Tip 2 izoenzimi testis, prostat ve sakaldaki tüy folikülleri ve genital tüylerde baskın şekilde bulunmaktaysa da, her iki 5 alfa redüktaz izoenzimi vücutta geniş bölgelere yayılmıştır (77). Hangi izoenzimin kafa derisindeki tüy foliküllerinde bulunduğu tartışmalıdır. Bir araştırmacı, Tip 1 ve Tip 2 insan yağ bezleri arasında bulunsa da, kafa derisindeki tüy foliküllerinde sadece Tip 2 5 alfa redüktaz bulunduğunu belirtmiştir (78). Diğer araştırmacılar (61,79) her iki izoenzimi kafa derisi yağ bezlerinde bulmuşlar ancak, aynı şekilde iki izoenzimin kafa derisi tüy foliküllerinde de bulunduğunu belirtmişlerdir (Şekil 1). İlginç olarak, her iki tür 5 alfa redüktaz, dermal papillada daha az şekilde, kıl folikülünün dış kök kılıfında lokalleşebileceğini belirtmiştir (61). Tip 1 izoenzimi, yağ bezlerinin merkezden uzak bölümlerinde fazlasıyla görülmekteyken, Tip 2 5 alfa redüktaz, yağ bezlerinin temelde birbirlerine bağlandıkları yerde bulunmuştur (61). Tip 2 5 alfa redüktazın bu yeri, klinik olarak önemli olabilir çünkü, yağ bezlerinin bağlanma yeri, akne vulgarise yol açan kilit patolojik sürecin geçtiği bölgedir.

Cinsiyet ve derideki yerinin farklılıklarına ek olarak, Tip 2 5 alfa redüktaz izoenzimi, işlevsel olarak da farklı olabilirler. Örneğin ilk veriler, deride iki enzimin farklı derecede androjenler ile düzenlenebileceğini belirtmiştir. Tip 1 izoenzimi, bu steroidlerce düzenlenmeye daha uygundur (80). Dahası Tip 2 5 alfa redüktaz doğumdan itibaren deride varken, Tip 1 izoenzimi çocukluk çağının sonlarında veya ergenlik çağında belirgin hale gelmektedir (77).

5 alfa redüktaz aktivitelerinin öncelikle, mikrodiseksiyon yapılmış ve koparılmış tüylerdeki foliküler hücrelerde ve deri parçacıkları ve asıl hücre kültürlerinde biyokimyasal olarak ölçüldüğü bilinmelidir. 5 alfa redüktaz aktivitelerini inceleyen çoğu araştırma, mevcut özel izoenzim biçimlerini saptamadan genital veya kafa derisini kullanarak yapılmıştır. Dahası, hirsütizmlı kadınların karın veya yüz derilerindeki izoenzimlerin aktivitelerinin de incelenmesi gerekmektedir. Bireysel izoenzim mRNA'larının tanımlanması için özel Northern blotlama kullanımının, 5 alfa redüktazın varlığını saptanmasında yardımcı olduğu bilinmektedir (61). Bu tekniklerin gelişmesi, cinsiyetler arasındaki tüy uzamasındaki farklılıkların ve androjenik alopesi, akne ve hirsütizm gibi hipoandrejenik düzensizliklerin patofizyolojisinin daha iyi anlaşılmasını sağlayabilir.

2.2 HİRŞUTİZM: NE KADARI NORMAL DEĞİLDİR?

2.2.1 Hırşutizmin Sayısallaştırılması

Hırşutizmin klinik teşhisi, tüy türü ve büyümesinin görsel değerlendirilmesine dayanan, oldukça öznel bir süreçtir. Hırşutizmden şüphelenilen hastaların değerlendirilmesinde, aşırı tüyün terminal veya vellus tipinde olup olmadığı ve erkeklerinkine benzer olup olmadığı incelenmesi gerekmektedir. Vellus tüy büyümesinin aşırı olması, hipoandrojenizmin bir yansıması olmamaktadır ve nedeni ailevi/genetik nedenler, GH veya tiroid hormon üretimi veya kullandığı ilaçlar olabilir. Her ne kadar vellus tüyleri sertlikleri, kalınlıkları ve pigmentleri dolayısıyla terminal tüylerden farklı olsalar da, çoğu androjenli hasta her iki tüyde aşırı büyüme olduğunu belirtmiştir. “Hipertrikosis” kavramı, aşırı tüy uzaması durumu için kullanılmaktadır. Ancak bazı araştırmacılarca hırşutizmi tanımlamada, bazı araştırmacılar ise vellus tüylerinin aşırı uzaması olarak kullanılmaktadır.

Hırşutizm derecesinin saptanmasında görsel yöntemler, Ferriman–Gallwey tarafından tanımlananları takip etmektedir (23). Araştırmacılar çalışmalarında, vücudun 11 farklı bölgesindeki (örneğin üst dudak, çene, göğüs, üst sırt, alt sırt, üst karın, alt karın, kol, önkol, kalça ve alt bacak) terminal tüylerin yoğunluğunu ölçmüşlerdir. Bu ölçümlerde genel bir ayakta tedavi kliniğine giden 18–38 yaşları arasındaki 161 kadın kullanılmıştır. Bu alanların her birini 0–4 arasında (0= terminal hiç tüy yok, 4= aşırı düzeyde terminal tüy) değerlendirmişlerdir. Bu çalışmada, önkol ve alt bacakta tüy uzaması, androjenlere daha az duyarlı veya tepkisiz olarak saptanmış ve Ferriman–Gallwey yöntemindeki son düzenlemelerde, bu alanların kaldırılmasına neden olmuştur. Sakal alanında, alt çene ve üst boyun ve kalçadaki tüy uzamasının ölçümleri, son ölçüm sistemlerine dâhil edilmiştir (81).

2.2.2 Hırşutizmin Tanımlanması

Ferriman ve Gallwey çalışmalarında, sadece dokuz tane deri bölgesinin incelendiği (örneğin, alt bacak ve önkol hariç tutulmuştur), 161 hastanın, %9.9’unda 5’den fazla, %4.3’ünde 7’den fazla ve %1.2’sinde de 10’dan fazla skor elde edilmiştir (23). Bu verilerden 8 veya daha yüksek skorların hırşutizmi tanımladığı belirtilmiştir. Unutulmaması gereken nokta ise, bu çalışmada beyaz kadın nüfusunun baskın olduğudur. Normal bireylerde tüy foliküllerinin androjen duyarlılığı, dağılımı veya sayılarındaki etnik/ırksal farklılık tanımlandıysa da, farklı ırk gruplarında hırşutizmin yaygınlığı, çok azdır.

2.3 İdiyopatik Hirsütizmin Tanımı (İH)

Literatür araştırmaları, İH'nin tanımının dinamik bir süreç olduğunu, çeşitli androjen fazlalığı düzensizliğinin etiyolojisi ve bu konudaki anlayışlar ile geliştiğini göstermektedir. İH'nin tam bir tanımının olmaması, sürekli bir karışıklığın ve ikilemin temel nedenlerinden biridir. Geçmiş bilgiler İH'i "hirsütizmin bilinmeyen nedeni" olarak tanımlamıştır. Ancak günümüzde sadece 1) hirsütizm, 2) normal ovulatuvar fonksiyon ve 3) normal androjen profiline sahip kadınlar idiyopatik hirsütizm şeklinde tanımlanır (82-89).

2.4. İH'in Yaygınlığı

Hirsütizimli kadınların %50–70'i düzenli adet görmektedir (90,82,83,86). Bununla beraber, bu kadınların yaklaşık %40–75'inde DHEAS veya toplam ve/veya serbest T'nin artan sirkulatuvar düzeyleri (83), ve/veya açık ovulatuvar düzensizliği vardır (82,86). Bernasconi ve arkadaşları (91) İH'i ovulatuvar düzensizliğin olmadığı (luteal progesteron düzeyinin ölçülmesi ile belirlenmektedir), hirsütizm durumunda tanımlamış ve 226 hastanın %55'inde İH olduğu tahmin edilmiştir. Ne var ki bu araştırmacılar, İH teşhisinde döngüsel androjen düzeylerini dikkate almamışlardır ve araştırma sonucunda, serbest T ve androstenedion düzeylerinin ortalaması, İH'li hastalarda kontrol grubundakilerden daha yüksekti.

Veriler de göstermektedir ki, İH, düzenli ovulasyon ve normal androjen düzeyi ile bağlantılı hirsütizmin varlığı olarak tanımlandığında, hirsütizimli kadınların sadece %15'inde bu teşhis saptanmaktadır. İH'in yaygınlığı, incelenen etnik veya ırk gruplarına göre oldukça farklılaşmaktadır. Ayrıca, iyi özelliklere sahip sağlıklı kontrol grubunun yeterli sayısına dayanan normatif verilerin kalitesi, hiperandrojenemi'nin saptanma yeteneğini de oldukça etkilemektedir. Son olarak, ovulatuvar fonksiyonun hirsütizimli kadınlarda nesnel şekilde değerlendirilmesi gerekmektedir; kaldı ki, bu kadınların %40'ı oligo/anovulatuvar'dir. Sonuçta, verilere göre, kesin şekilde tanımlandığında İH, hirsütizmin nispeten yaygın olmayan nedenidir.

2.5 İH'in Patogenezi

İH'nin patogenezi hakkında oldukça sınırlı bilgi vardır. Bu eksiklik, önerilen hipotezlerin test edilmesi için yeterli moleküler tekniklerin yetersizliği yüzündendir. Ayrıca, ilk çalışmaların çoğu, İH hastalığının tam teşhis edilmediği hastaları da kapsamaktadır. Bu düzensizliğin etiyolojisi de göz önüne alınarak, en olası nedenler aşağıda sunulmuştur.

2.5.1 IH'da aşırı periferik 5 alfa redüktaz aktivitesi

IH'li kadınların deri 5 alfa redüktaz aktivitelerinde temel bir artış olduğu kabul edilmektedir. Jenkins ve Ash (92) "nedeni belli olmayan hirsütizmli" her üç kadının ikisinde, suprapubik derinin küçük parçalarında T'dan üretilen DHT'nun üst normal sınırı, %50–100'ün üzerinde bulmuşlardır. Ne yazık ki, IH'li adaylarda androjen normal düzeylerdeyken, ovuluar fonksiyonları hakkında bilgi verilmemiştir. Serafini ve Lobo (11) IH'li 10 kadın incelemiştir (hirsütizmin varlığı, normal androjen düzeyi ve düzenli menstrüal döngüler şeklinde tanımlanmıştır) ve kontrol grubu ile kıyaslandıklarında, genital derilerinde biyokimyasal ölçümlerde 5 alfa redüktaz aktivitesini daha yüksek bulmuşlardır. Döngüsel androjenlerin, periferik 5 alfa redüktaz aktivitesini arttırdığı bilinse de (93,94), çalışmaya katılan IH'li kadınlarda döngüsel androjen düzeyleri normaldir. Bu nedenle de araştırmacılar, çalışmaya katılan kadınlarda, deride 5 alfa redüktaz aktivitesinin artmasının temel bir patofizyolojik bir olay olduğunu belirtmişlerdir (11).

Artan deri 5 alfa redüktazının, IH'e özgü bir durum olması mümkündür ve hirsütizmin gelişmelerini yansıtabilir. Örneğin, Jenkins ve Ash (92) ve Serafini ve Lobo (11) tarafından yapılan çalışmalarda PCOS'lu hastaların 5 alfa redüktaz aktivitelerinde bir artış gözlenmiştir. IH'li hastaların aksine, PCOS'lu kadınların periferik 5 alfa redüktazlarındaki artış, yüksek androjen düzeylerinin ikincil etkisi nedeniyle oluşmaktadır. Aslında, bu araştırmacılar PCOS'lu hastalarda bile hirsütizmin gelişmesinde periferik olayların önemli rol oynadığını belirtmişlerdir (10).

Aynı şekilde, IH'in gelişiminde, eğer varsa, hangi 5 alfa redüktaz izoenzimlerinin baskın olduğu belirsizdir. İzoenzim-özü mRNA'lardaki moleküler analiz sonucunda, yağ bezlerindeki Tip 1 5 alfa redüktaz izoenzim konsantrasyonları, akneli hastalarda daha yüksektir (95,96). Bu da Tip 2 izoenziminin konsantrasyonundan farklıdır. Bu bulgu ile tutarlı olarak, prostat hiperplazisi tedavisi gören erkeklerde sebüm üretiminde finasterid'in hiçbir etkisinin olmadığı görülmüştür (97). Bununla birlikte, aknenin aksine, finasterid tedavi sürecinde hiç değilse bölgesel olarak etkili olduğundan, Tip 2 izoenzimin hirsütizmde önemli bir rolünün olması olasıdır (98,99). Hirsütizmin gelişiminde ve özellikle IH'de izoenzimlerin rolünün tanımlanması için daha fazla çalışmaya gereksinim vardır.

2.5.2 Androjen reseptör polimorfizimleri

Her ne kadar periferal androjen reseptörlerinin sayısında fark olması IH'e neden oluyorsa da, IH'li hastalar ile kontrol grubu arasında, androjen bağlayıcı kapasitede (örneğin, androjen reseptör içeriği) sayısal farklılık yoktur (87). Ancak, IH'li kadınlardaki androjen reseptörlerinde nicelden ziyade niteliksel farkların olması, olasıdır. Bu tür bir fonksiyonel farklılık, androjen reseptörlerindeki genetik değişimlerden kaynaklanabilir; bu da döngüsel androjen düzeylerinde değişiklik olmaması nedeniyle hirsütizm gelişmesini açıklayabilir (100). Aslında, androjen reseptörlerindeki genetik değişimler, prostat kanseri gibi diğer androjen duyarlı düzensizliklerin gelişimi ile ilişkilidir (101). Dahası, androjen reseptör genlerinde, diğer steroid reseptör genlerinden daha sık aralıklı değişimler olduğu bilinmektedir (102) ve bu polimorfizmlerin, androjen duyarlılığını ve fenotip şekillerini etkilemesi olasıdır.

Muhtemelen androjen reseptörlerinin fonksiyonlarını etkileyen yaygın bir genetik değişim örneği, androjen reseptör geninin ekzon 1'deki üçlü nükleotid CAG tekrar sayısıdır. Bu üçlü nükleotid tekrarları, çeşitli insanlarda oldukça farklıdır (103). CAG kodon'ları, androjen reseptörlerinin transaktivasyon alanlarının amino uçlarındaki glutaminlerin uzatılması için şifrelenmiştir. Androjen reseptörlerinin bu bölgede genişlemesi, androjenik alopesi ve hirsütizmi de kapsayan, kadın ve erkekte benzer olarak, androjen ilişkili deri düzensizliklerinin gelişimini göstermektedir (100,104). Bir araştırmada, androjen reseptör geninin CAG tekrarlarının sayısı, hiperandrojenin periferal belirtileri olan kadınlarda incelenmiştir (100). Sağlıklı kontroller ve akneli kadınlarda üçlü nükleotid tekrar sayısında (21 \pm 3 ve 20 \pm 3) benzer bir ortalama bulunmuştur (6 sd). Bu da, androjenik alopesi veya hirsütizmlili kadınlarıkinden daha yüksektir (17 \pm 3 ve 16 \pm 3). Benzer olarak, 110 IH'li İspanyol kadında yapılan bir çalışmada, hirsütizm skorları ve androjen reseptör genindeki CAG tekrar sıklığı arasında ters bir ilişki bulunmuştur (104). Sonuçta, androjen reseptörlerinin N-terminal alanlarındaki daha az CAG tekrar uzunluklarının, androjenik alopesi ve hirsütizm ile ilişkili olması da olasıdır.

Bu araştırmalar hirsütizm ve muhtemelen IH'nin androjen reseptörlerinin moleküler özelliklerinden etkilendiğini belirtmektedir. Ancak, androjen reseptör geni X kromozomu üzerindedir ve Lyon hipotezine göre, X kromozom inaktivasyonunun tesadüfî örneklerine göre, hedef dokularda sadece bir tane alel bulunmaktadır. Bu nedenle de hirsütizmlili kadınlarda X bağlı alelin hangisinde olduğu belli

olmamaktadır, kaldı ki, çoğu kadın androjen reseptör geninin CAG tekrar boyutunda heterozigottur. Sonuçta, IH'in gelişiminde androjen reseptör gen polimorfizimlerinin rolünün saptanmasını için daha fazla çalışma gerekmektedir.

2.5.3 Aromataz Ve İdiyopatik Hirsütizm

2.5.3.1 Giriş

15q21.2 kromozomunda bulunan CYP19 geni, östrojen biyosentezi için kilit enzim olan aromatazı kodlamaktadır (105,106). Çoğu memelilerde aromatazlar sadece gonadlar ve beyinde bulunurken, maymunlarda bu gen ayrıca gonad haricindeki bölgelerde de bulunmaktadır (105). İnsanlarda evrim ağacı geliştikçe ve azamiye ulaştıkça, aromataz ekspresyonu ve östrojen üretimi sürekli artmaktadır. Bu da ilave sıra dışı dokuya özgü promotorların daha etkin kullanılması ile sağlanmıştır (105). Östrojen kadınlarda üreme organlarının gelişimi ve her iki cinsiyette de kemik mineralleşmesi ve gonad ile ilgili fonksiyonlar için önemlidir (107,108). Dahası, göğüs kanseri ve endometritis gibi östrojen bağımlı patolojik dokularda, aberrant promotorların uygun olmayan aktivasyonu ile aromataz upregüle olmuştur (105,106). Çoklu promotorların alternatif kullanımı, CYP19 geninin dokuya özgü transkripsiyonunu yapan kilit moleküler mekanizmadır. Örneğin proksimal over-spesifik promotor (PII) 5'-UT bölgesinin bitişiğindeki ilk kodlanan eksonun (eksonII) ekspresyonunun artmasına sebep olurken, hamile kadınlarda plasenta içindeki yapısal aktif, distal promotor (I.I), döngüsel östrojenin (100–1000 katı normaldir) belirgin şekilde artan düzeyinin temelini oluşturur (107,108). Tüm mRNA türleri aynı açık okuma çerçevesine sahipken (ekzon II - X), kullanılan promotor ne olursa olsun, kodlanmış protein aynıdır. Bu promotorların bazılarında doğal TATA ve CAAT elemanları bulunmamakta ve her promotor hormon veya sitokinlerin kesin bir bileşimine karşıt düzenlenmektedir (105).

2.5.3.2 CYP19 Geninin (P450arom) genomik yapısı

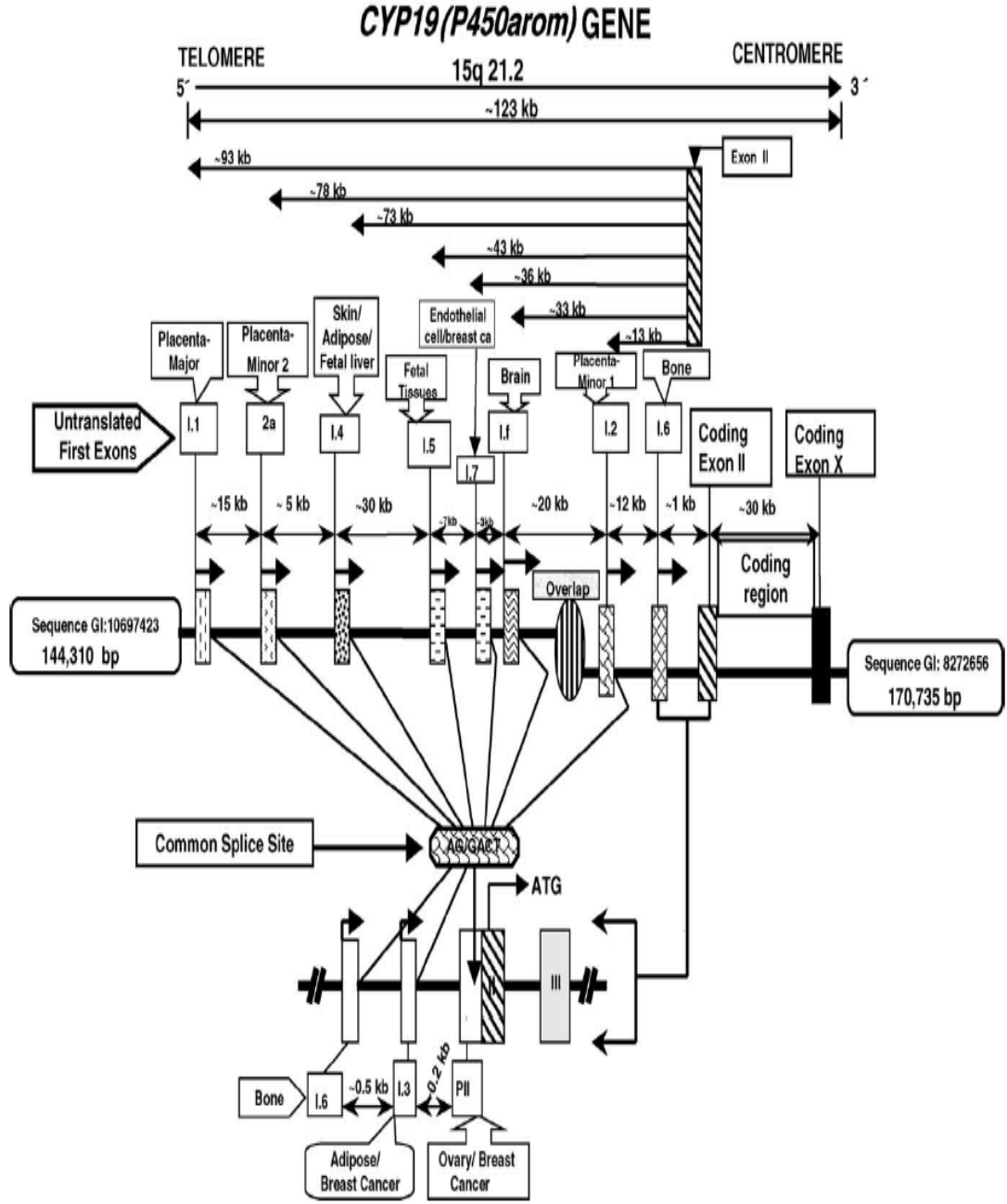
Aromataz östrojen biyosentezinde anahtar bir enzimdir. Aromataz enzimini kodlayan *CYP19* geni 15q21.2 lokalizasyonunda bulunmaktadır ve yaklaşık 123 kb'dan oluşmaktadır (16). [Şekil 3]. Translasyonun başlangıç kısmı ekzon iki ve bitiş kısmı da ekzon on'dur ve yaklaşık kodlanan bu bölge 30 kb kadardır. Translasyona uğramayan ilk ekzonunda bulunduğu 5' ucu ise yaklaşık 90kb kadardır (17). Enzim C19 steroidleri östrojenlere (C18) çevirmektedir (androstenedionu östrona -E1-, testosteronu da östradiole-E2- dönüştürür). Enzim esas olarak over ve plasenta gibi östrojeni üreten hücrelerin endoplazmik retikulumunda yerleşmiştir ama geniş bir

şekilde testislerin Leydig hücresi, beyin, adipöz doku, karaciğer, kas ve saç folikülü gibi birçok diğer dokuda da eksprese edilmektedir (18,19).

İnsan aromataz geni dokuya spesifik promotorların kontrolü altında transkripsiyona uğramaktadır. Böyle promotorlar geniş bir şekilde dağılmışlardır (93-kb'lik bir alana dağılmışlardır). En proksimal gonadal spesifik promotor II ve diğer proksimal promotorlar olan I.3 (adipöz doku ve meme kanseri) ve I.6 (kemikte bulunur), ekzon II'de ATG translasyon başlangıç bölgesinin upstream 1 kb bölge içinde bulunmaktadır. Minor plasentaya özgü promotor olan, promotor I.2, ekzon II'deki ATG bölgesinin yaklaşık 13 kb upstreamindedir. Beyin (I.f), endotelial hücreler (I.6), fetal dokular (I.5), adipöz doku (I.4) ve plasentaya (2a ve I.1) özgü promotorlar, sırasıyla ilk kodlanan ekzon olan ekzon II'nin yaklaşık 33, 36, 43, 73, 78 ve 93 kb upstreaminde bulunmaktadırlar. Her bir promotor farklı tip hormonlar tarafından aktive edilir ve aromatazın ekspresyonunu düzenler, aromataz mRNA'sını kodlayan bölge aynıdır (aynı ekzonlar transkripsiyona uğrar) ama plasentada, gonadlarda, beyinde, yağ dokusunda ve ciltte dokuya spesifik 5'-çevrilmeyen bölgeler mevcuttur (19).

Ovulatuvar kadınlarda, östrojen primer olarak FSH tarafından aktive edilen, aromatazın proksimal yerleşimli promotor II'sinin etkisiyle ovarian granülosa hücrelerinden kaynaklanmaktadır. Erkeklerde ve postmenapozal kadınlarda, östrojen primer olarak yağ ve cilt dokuları gibi ekstraplandüler dokulardan üretilmektedir ki burada aromataz, I.3 ve I.4 lokalizasyonundaki distal promotorlarının etkisiyle düşük seviyede eksprese edilir (20,21).

Somner ve ark. yaptığı bir çalışmada CYP 19 genotipinin serum östradiol konsantrasyonu ile önemli derecede ilişkili olduğu bulunmuştur ($p < 0.002$). Bu çalışmada CYP 19 geninin ekzon 3 (G3A) polimorfizmi değerlendirilmiş ve AA genotipli bireylerin GG genotiplilere göre serum östradiol konsantrasyonlarının daha yüksek olduğu saptanmıştır. Bu sonuca göre yaşlı kadınlarda CYP 19 GA ve GG genotipe sahip olanların osteoporoz ve fraktür risklerinin arttığı bildirilmiştir (22).



Şekil 3. CYP19 geninin uygun promotorları

2.5.4 5 alfa redüktaz ve İdiyopatik Hirşutizm

Günümüzde idiyopatik hirşutizmin patogeneziindeki en yaygın önerilen patofizyoloji cilt 5 alfa redüktaz aktivitesindeki primer artış ve androjen reseptör fonksiyonundaki muhtemel değişikliktir (82).

Normal şartlar altında, 5 α -redüktaz, testosteronu daha etkili androjen olan dihidrotestosterona çevirir ve kıl foliküllerinde androjenlerin etkisi için anahtar rol oynar (5,6). Konlama çalışmaları 5 alfa redüktazın Tip 1 ve Tip 2 olmak üzere iki

izoenziminin olduğunu bulmuştur (7,8). Ciltte bulunan baskın 5 α -redüktaz izoenzimi Tip 1'dir (SDR5A1) ve 5 α -redüktaz izoenzimi Tip 2 ile %60 homoloji gösterir ki 5 α -redüktaz izoenzimi Tip 2 karakteristik olarak prostat bezinde bulunmaktadır (8).

Hirşutik hastaların genital ve pubik cilt fibroblastlarında normal kadınlarınkine göre artmış 5 alfa redüktaz aktivitesi gösterilmiştir (9,10). Böyle çalışmalar idiyopatik hirşutizm tanısı almış hastalarda da aynı sonucu vermiştir (51). SRD5A2, hem normal hem de hirşut hastalarda genital ciltte ana olarak eksprese edilen izoformdur (12). Ama 5 alfa redüktaz izoenzimlerinin fizyolojik rolleri tam olarak anlaşılmamıştır ve onların değişik vücut kompartmanlarındaki dağılım farklılıklarının önemi bilinmemektedir (13).

SRD5A2 geni, 2p23.1 kromozom lokalizasyonunda bulunmaktadır. SRD5A2 geni, 5 ekzon ve 4 introndan oluşur, 56384 baz içerir, 254 aa den oluşan 28393 Dalton ağırlığında ürün verir ve 5-dehidrotestosteron bağımlı genital doku, karaciğer dahil diğer organ ve dokularda da eksprese edilmektedir (109). İkinci en yaygın SRD5A2 germ hücreleri ile aktarılan polimorfizm, 49. kodondaki alaninden valine değişime neden olan tek missens mutasyondan kaynaklanmaktadır. Bu polimorfizm invitro enzim aktivitesi normalden beş kat daha fazla olan varyant proteinin üretimi ile sonuçlanmaktadır (110). Bilinen SRD5A2 polimorfizmlerinin 5 alfa redüktaz enziminin aktivitesinde değişikliğe neden olan etkisi muhtemelen mRNA stabilitesindeki değişikliktir (13).

Androjenlerin kendisi periferik 5 alfa redüktaz aktivitesini uyardıklarından (66,70), artan bir 5 alfa redüktaz aktivitesi, bu enzimin fonksiyonlarının temel artışı için yeterli bir kanıt değildir. Aslında, kıl foliküllerinin dolaşımdaki androjenlere aşırı düzeyde açık olmasının IH'nin gelişiminde bir rol oynayıp oynamadığı konusu net değildir. Bu bağlamda, bazı araştırmacılar IH'li hastalarda çeşitli androjenlerin üretim oranının arttığını belirtmiştir (111,112). Ancak, bu çalışmalarda IH, "tanımlanmamış hirşutizm" in varlığı olarak ifade edilmiş ve hastaların önemli bir bölümü düzensiz menstrüal döngülere ve artan androjen düzeylerine sahip olduklarını belirtmişlerdir.

Glickman ve Rosenfield (113) IH'li dört hastada, pubik tüy foliküllerindeki androjen metabolizmasını incelemişlerdir. Sonuçta, sadece bir hastanın tüy folikül metabolizmasında bir anormallik olduğu saptanmıştır. Bu hastada, 17 β -hidroksisteroidlerin (örneğin, T ve DHT) inaktivasyonunun, kıl folikülündeki androjenlerin etkilerini arttırmada etkili olmayacak olan 17-ketosteroidlere oranı

oldukça yüksektir. Faredin ve Toth (114), düzenli menstrual döngü ve normal androjen seviyesine sahip IH'li üç hastanın alt karın derisini incelemiştir. Bu incelemede, androstenedion'un yüksek değişimi baskın görünmektedir. Bu da 17b-hidroksisteroidlerin aktivitelerinde bir yükseklik anlamına gelmektedir. Sonuçta, IH'de androjen metabolizmasındaki lokal veya sistemik anormalliklerin rolü, daha fazla incelenmelidir.

İnsülin direnci ve hipoinsülinizm, günümüzde PCOS'ların önemli bir özelliği, uyarıcı ovarian androjen salgısının uyarıcısı ve cinsiyet hormonu bağlayıcı globulin (SHBG) üretiminin engelleyicisi olarak kabul edilmektedir (115). İnsülin, tüy foliküllerinin uzamasını in vitro uyarmaktadır (40). Bununla beraber, IH hastalarının, insülin hareketlerinde anormalliklerinin olup olmadığı bilinmemektedir. Paoletti ve arkadaşları (116), kontrol grubu ile kıyaslandıklarında IH ve PCOS'lu hastaların, oral glukoz stimülasyon testindeki insülin, C-peptid ve glukoz, düzeylerinin yüksek olduğunu belirtmiştir. Dahası, antiandrojen flutamid'in uygulanımı, PCOS'lu değil ancak, IH hastalarında insülinin uyarım ve bağlama düzeylerini azaltmaktadır. Ayrıca, araştırmacılar IH olasılığı olan hastalarında, düzenli adet dönemleri, 1'den düşük LH/FSH değeri ve yumurtalıkların normal bir ultrasonu olmasına rağmen, normal ovulatuvar işlevinin varlığını onaylamamışlardır. Bu nedenle, IH'li kadınlarda patolojide insülin hareketinin, öneminin ve rolünün incelenmesi gerekmektedir.

Sonuçta, 5 alfa redüktaz ve AR'nin kontrolü ve fizyolojisinin anlaşılması, IH'nin patofizyolojisinin açıklanmasında yardımcı olacaktır. Günümüzde, IH'nin patogenezi konusundaki sınırlı bilgi ile düzenli ovulasyona, normal sirkülatuar androjenlere ve hirsütizme sahip hastalar için kullanılan "nedeni belli olmayan" terimi, uygundur. Bu düzensizlik aktif inceleme içinde olmasına rağmen, düzensizlik, dinamik bir tanımdır ve düzensizliğin gelişimindeki patojenlerin anlaşılmasında yenileme gerekmektedir.

2.6 İH'İN SERUM BELİRLEYİCİLERİ

2.6.1 DHT

İH'e sahip kadınlardaki periferal 5 alfa redüktaz aktivitelerinde artış olursa, DHT'nin döngüsel düzeylerinde artış beklenmektedir. Ancak, 5 alfa redüktaz serum düzeyleri hirsütizimli kadınlarda çoğunlukla normaldir (10). Çünkü deride üretilen çoğu DHT, döngüde tutulmamakta ancak, hızlı metabolizmasından önce lokal olarak etki etmektedir.

2.6.2 5 α -Androstan-3 α ,17 β -diol glukuronid

DHT metabolitleri, 3 α - ve 3 β -androstanediol, İH'in potansiyel serum belirleyicileri olarak incelenmiştir. DHT'ye benzer olarak, döngüde ayrı androstanediol çok az bulunmuş veya hiç bulunmamıştır (117). Ancak, bu steroidlerin birleşik metabolitleri daha uzun bir yarıömre sahiptir ve rutin ölçümleri sağlayarak, serumda belirgin miktarlarda bulunmaktadır. Ne var ki, 3,17 β -androstanediol sulfat veya androsteron glukuronid olan androjen metabolitlerinin döngüsel veya üriner düzeyleri İH hastalarında yüksek olsa da, çoğunlukla normaldirler. Sonuçta, 3,17 β -androstanediol sulfat veya androsteron glukuronid, düzensizlik için kullanışlı belirleyiciler değildir (118). Bir takım araştırmacılar, 3 α -adiol-G düzeyinin, periferal 5 alfa redüktaz aktivitelerinde bir belirleyici olabileceğini belirtmiştir (117-121). Ancak, bu bileşimin serum düzeyi sadece deri 5 alfa redüktaz aktivitesine değil ayrıca, androjen belirtilerinin döngüsel düzeyine de bağlıdır (122,25). Bu nedenle, döngüsel 3 α -diol-G'nin yüksek düzeyleri PCOS ile hirsütizimli kadınlarda belirtilmiş ve bunlarda adrenal veya ovarian androjen fazlalığı saptanmıştır (10, 123-127). DHEAS ve androstenedion'lar 3 α -adiol-G'nin temel kaynakları olduğundan; bu bileşim düzeyi, adrenal androjen biyosentezini yansıtmaktadır (118). Bu nedenle, bu bileşimin yükselmiş serum düzeyleri, ya nedeni ne olursa olsun, hirsütizmin varlığını göstermekte ya da, herhangi bir kaynaktaki adrenal veya androstenedione'un aşırı DHEAS üretimini göstermektedir. Aslında, 3 α -adiol-G'nin yüksek döngüsel düzeyleri, diğer döngüsel androjenler normalken, İH'in varlığını göstermektedir. Ancak, İH'li kadınların %20'si, 3 α -adiol-G'nin normal serum düzeylerini göstermiştir (121). 3 α -adiol-G ölçümü, hirsütizimli kadınların teşhis değerlendirmelerinde aşırı tüy uzamasının fiziksel incelenmesi kadar önemli bir değer değildir. Ayrıca, bu hormon düzeyleri tedaviye yanıtı göstermemektedir (122,128), ve İH ve ya diğer hirsütizimli hastaların değerlendirilmesinde 3 α -adiol-G'nin rutin ölçümleri önerilmemektedir.

2.7. İH'İN TEDAVİSİ

2.7.1 Androjen supresyonu

Oral doğum kontrol haplarının dolaşımdaki androjen düzeylerini, döngüsel LH ve SHBG düzeylerinin uyarılmasını önleyerek, düşürmekte ve hiperandrojenik hastalarda da hirsütizmi azalttığı belirtilmektedir (129). Oral doğum kontrol haplarına ek olarak, androjen önlenmesi, uzun süreli GnRH analoglarının kullanılması ile de sağlanabilir. Düzenli menstrual döngüleri ile birlikte hirsütizm olarak tanımlanan İH'de, GnRH analoglar ile tedavi, çalışmaya katılan hastaların küçük bir bölümünde tüy uzamasını azaltmıştır (130,131). Döngüsel androjenlerdeki azalmanın, androjenlerce uyarılan 5 alfa redüktazın tüm aktivitelerindeki azaltacağı gibi, periferik 5 alfa redüktaz için bir alt tabaka oluşumunda azalmaya neden olabileceği olasıdır (132).

2.7.2 Androjen Reseptör Blokörleri

2.7.2.1 Spironolakton (SPA). Amerika Birleşik Devletleri'nde hirsütizm tedavisinde yaygın olarak kullanılan androjen önleyicileri, SPA'dır. SPA, progestinlerle yapısal olarak ilişkili olan aldosteron karşıtıdır. Ayrıca, SPA'nın 5 alfa redüktaz üzerindeki önleyici etkisi vardır ve SHBG'nin tutumu için androjenlerle rekabet etmektedir. SPA veya 17 hidroksile metabolitleri, androjen biyosentezine katılan çeşitli enzimlerin hareketlerini de önlemektedir. Ancak bu etki çoğunlukla 200mg/gün'den yüksek dozdaki kullanımlar için geçerlidir (133–136). SPA ayrıca değişken progestasyonel aktivite de bulunmaktadır. Bu aktiviteler, döngüsel LH/FSH oranını azaltabilmek için, LH'in GnRH'a tepkilerini azaltmaktadır.

Daha önce de belirtildiği gibi, DHT'nin periferik üretimi, 5 alfa redüktazın aktivitelerinin ve öncelikle T ve androstenedion olmak üzere belirtilerinin döngüsel düzeylerinin sonucudur. Oral doğum kontrol haplarının SPA ile birlikte kullanımı yeterli gebelik korunması sağlarken, fonksiyonel olmayan rahim kanaması veya SPA kullanan kadınlarda görülen oligomenore'nin kötüleşmesini azaltmaya yardımcı olmaktadır. SPA, göğüs kanserine genetik eğilimli kadınlara önerilmemektedir (137).

2.7.2.2 Flutamid. Nonsteroidal bir antiandrojen olan flutamid, Amerika Birleşik Devletleri'nde prostat kanserinin tedavisi için ek bir tedavi olarak kullanılmaktadır. Her ne kadar, yüksek dozlarda androjen sentezini azaltıp veya metabolizmayı arttırabilirse de, bu saf bir androjen reseptör blokörüdür (138). Androjen reseptörüne DHT tutumunu önleyen 2-Hidroksiflutamid, bu ilacın temel metabolitidir. Flutamid, hirsütizm tedavisinden SPA'a kadar veya daha fazla etkili olmaktadır (99, 139-142).

Couzinet ve arkadaşları (139), IH hastaları üzerinde yaptıkları bir araştırmada, günlük 500 mg/gün flutamid ile 12 ay boyunca tedavi ettikleri hastalarda hirsütizm skorlarında azalma saptamışlardır. 10 hastanın hiçbirinde belirgin yan etkiler görülmemiştir. Bununla beraber, başta hepatotoksisite olmak üzere ciddi ters etkileri de olmuştur (141,142).

Genelde günde 2 defa 250 mg kullanılırken, bazı hastalar için tek dozda 250 mg etkili olabilmektedir (143). Son olarak, hayvan modellerinde flutamid erkek fetuslarda dişileştirici etkiye sahiptir (144,145) ve üreme çağındaki sterilize edilmemiş hastalarda, etkin bir doğum kontrolü kullanması önerilmektedir.

2.7.2.3 Siproteron asetat. Siproteron asetat (CPA), megesterol asetat ile benzer güce sahip, güçlü progestojenik özellikli bir türevidir (146,147). CPA'nın önleyici özellikleri, gonadotropin tutumu nedeniyle oluşmaktadır. CPA ayrıca bir antiandrojen olarak sınıflandırılmıştır, kaldı ki androjen alıcıların önlemede DHT ile rekabet halindedir. Döngüsel LH'da azalma yaratarak, androstenedione ve döngüsel T düzeylerini düşürmekte ve hirsütizmde etkin bir tedavi için kullanılmaktadır (148). Barth ve arkadaşları (149) sıralama çalışmalarında, hirsütizmi azaltılmasında 35 mg EE ve 2 mg CPA eklenmiş oral doğum kontrol hapının etkili olduğunu belirtmiştir.. Hirsütizm tedavisinde 30– 35 mg EE ile birleştirilmiş 50–100 mg/gün dozundaki CPA, 100 mg/gün dozunda SPA ve Oral doğum kontrol hapi bileşimi kadar etkilidir (99,150). Başka bir çalışmada, CPA içeren trifazik Oral doğum kontrol hapının döngünün ilk on gününde 12.5 mg/gün dozu da (artı EE'nin değişen dozları) , flutamid kadar etkilidir (151). Buna karşılık, 2mg/gün CPA ve 35 mg/gün EE bileşiminin, 100 mg/gün SPA'dan daha az etkili olacağı düşünülmektedir (152).

2.7.3 5a-RA önleyicileri

Elde edilen ilk bilgiler IH'in 5 alfa redüktazın artan periferik aktivitesi ile saptanacağını belirttiğinden, ideal tedavi bu enzimin aktivitelerini önleyen ajanlar içermelidir. Finasterid gibi bir ajan, androjenik alopesi (Propecia, 1 mg finasteride, Merck & Co., Inc., West Point, PA) ve ılımlı prostat hipoplazi'si (Proscar, 5 mg finasteride, Merck & Co., Inc.) olan erkeklerin tedavileri için ABD'de kullanılmaktadır. Elde edilen sonuçlarda, IH tedavilerinde etkili olduğu görülmektedir (97,98). Finastrade öncelikle Tip 2 5 alfa redüktazın aktivitelerini engellemektedir (153).

Venturoli ve arkadaşları (182), 66 hirsütizimli kadında, finasterid'in (5 mg/gün) etkilerini, flutamid (250 mg/gün), CPA (döngünün ilk on gününde 12.5

mg/gün ve 0.01 mg/gün ile 0.02 mg/gün arasında değişen EE ile birlikte) ve ketokonazol (300 mg/gün) ile kıyaslamışlardır. Flutamid ve doğum kontrol hapı–östrojen bileşimi ketokonazol’dekine (%255, %260, ve %253) benzer etki yaratmıştır. Bu, finasterid’in etkisine kıyasla daha yavaş ancak daha etkilidir (% 244). Ketokonazol kullanımı ile görülen yan etkiler belirgin miktarda ise de, özellikle finasteride’de olmak üzere üç tedavide de çok az sorun yaşanmıştır. Sonuçta, hirsütizmli kadınların tedavisi için (5 mg/gün) uygun bir alternatif olabilir. Aslında, çeşitli antiandrojenler/5 alfa redüktaz arasında yapılacak seçim, ilacın etkilerinden ziyade, hastanın toleransına ve yan etkilerine dayanmaktadır.

2.7.4 Tüy Folikül Büyümesinde Biyolojik Tamamlayıcılar

Eflornithine hydrochloride, kadınlarda yüzdeki tüy uzamalarını durduran veya azaltan bir güncel bir krem olarak klinik aşama III’ü geçmiş, yeni bir ajandır (Vaniqa, DFMO/eflornithine 15% cream, Bristol Myers-Squibb Co., Buffalo, NY.). Bu ajanın tüy foliküllerinin uzamasını, keratin protein sentezini önleyerek (154–156) etkilemesi düşünülse de, etki derecesi ve işleyişinin tam mekanizması bilinmemektedir.

2.7.5 Hirsütizmin Mekanik Kontrolü: Genelde, istenmeyen tüylerin kontrol edilmesi, kaldırılması veya yok edilmesi anlamındaki mekanik terimler, hirsütizmin tedavisinde tıbbi yönetimin tamamlayıcıları olarak ele alınmalıdır.

2.7.5.1 Tıraş olma ve tüy alma: Tüyleri yolmak, ağda veya tıraş olma, bir çok kadın için tüylerin ortadan kaldırılmalarında kullanılan yaygın yöntemlerdir. Ancak tüylerin alınmasına yönelik bu kozmetik yöntemler deriyi tahriş edebilir. Bu da follükülit, pseudofollükülit, ve kıl dönmesi ile sonuçlanabilir. Tüylerin uzama oranlarında tüylerin alınma yöntemlerinin etkilerini inceleyen bir çok araştırmada (157), erkekler kullanıldıysa da, Peereboom–Wynia (157), IH’li ve kalçalarında tüy uzaması olan 15 kadında çeşitli tıraş ve tüy alma yöntemlerinin etkilerini incelemiştir. Sonuçta, bir veya 12 defaya kadar tıraş olma veya tüy almaların, tüy uzamasında bir etkisinin olmadığı görülmüştür. Ne yazık ki bu çalışmada IH, belirgin bir nedeni olmayan hirsütizm olarak tanımlanmıştır. Çalışmadaki kadınların %20’sinde düzensiz döngüler ve değerlendirilmeye alınmayan döngüsel androjenler bulunmaktadır. Yüz ve vücut tüylerinin uzamalarında, tüylerin ortadan mekanik şekilde kaldırılmasına yönelik incelemeler için IH’lı ve diğer hirsütizmli kadınlar gerekmektedir.

2.7.5.2 Elektroloji. Hirşutizimli hastaların yönetilmesinde elektrolojistlerin rolü, gözden kaçırılmamalıdır. Elektrolisis (örneğin, elektroepilasyon) aşamalı da olsa, uzun dönemde tüyleri yok etmektedir (158,159). Sürekli uygulama sonrasında sürekli tüylerde %15–50 arasında etki görülmektedir (160).

2.7.5.3 Lazer epilasyon. Seçmeli fototermolisin teorisine dayalı tüy foliküllerine doğrudan hasar vermek, son zamanlarda belirtilmektedir (161,162). Lazerle müdahale edilmiş olan tüy folikülleri, tedavi sonrasında 2 yıl (163,164) kadar sürecek olan telogen dönemine geçmektedir (165). Klinik anlamda belirgin kalıcı tüy folikül yıkımının lazer tedavisi ile oluşup oluşmayacağı belli değildir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM BÖLÜMÜ

3.1.GEREÇ

3.1.1 Çalışma grubu

Bu çalışma Eylül 2005- Eylül 2006 tarihleri arasında Erciyes Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik ve Dermatoloji Anabilim Dalları ile Endokrinoloji Bilim Dalı'nda gerçekleştirildi.

Üniversitemiz İç hastalıkları Ana Bilim Dalı Endokrinoloji kliniğince aşağıdaki kriterlere göre ilk kez idiyopatik hirsütizm tanısı konulan ve daha önce herhangi bir tedavi almamış 6 hasta ve daha önce tedavi almış veya şu anda tedavisi devam eden 9 hasta çalışmaya dahil edildi:

-Hastalaradaki hirsütizmin mevcudiyeti modifiye Ferriman-Gallwey skorunda 8'in üzerinde puan almalarıyla tespit edilecek (1).

-Hirsütizm olan hastalardan, düzenli menstrüasyona sahip, testosteron, androstenedion ve dehidroepiandrosteron sülfat (DHEAS) dahil normal serum androjen profiline sahip olanlar,

-Tiroid disfonksiyonu, hiperprolaktinemisi, 21 hidroksilaz ve 11 hidroksilaz enzimleri eksikliğine bağlı Konjenital adrenal hiperplazisi olmayanlar, Polikistik over sendromu olmayanlar ve adrenal/ovaryan tümörü olmadığı uygun testler ve over ve adrenallerin ultrasonografisi ile ekarte edilenler. Bu kriterlere uymayan hastalar çalışmaya alınmamışlardır. Yukarıda bahsedilen kriterlere uyan 15 hastanın aydınlatılmış onamları alınarak; Tıp Fakültesi Hastahanesi merkez laboratuvarında

periferik venöz kandan EDTA'lı tüplere 12 cc kan ve daha önce herhangi bir tedavi almamış 6 hastadan androjene hassas bölgelerden birisi olduğu bilinen göbek altı orta hattın, Dermatoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Yrd. Doç. Dr. M. Borlu tarafından dermatoloji kliniğinde lokal anestezi altında herhangi bir estetik bozukluk yaratmayacak şekilde usulüne uygun olarak 2 adet 0.2 mm'lik punch biyopsisi alınmıştır. Aynı şekilde gönüllü olan ve aydınlatılmış onamları alınan 15 Hirşutizmi olmayan tamamen sağlıklı bireyden merkez laboratuvarında periferik venöz kandan EDTA'lı tüplere 12 cc kan ve bu 15 hastanın 6 tanesinden de androjene hassas bölgelerden birisi olduğu bilinen göbek altı orta hattın, dermatoloji kliniğinde lokal anestezi altında herhangi bir estetik bozukluk yaratmayacak şekilde usulüne uygun olarak 1 adet 0.2 mm'lik punch biyopsisi alınmıştır.

3.1.2. Kullanılan Gereçler

Aletler

Yatay Elektroforez düzeneği (midi)
UV. Transillüminatör
Buzdolabı
Derin Dondurucu (-20°C)
Derin Dondurucu (-80°C)
Distile Su cihazı
Dizi Analizi Cihazı
Doğru akım güç kaynağı
Etüv
Hassas Terazı
Isı Döngü Cihazı
Laminar air flow
Manyetik karıştırıcı
Mikrodalga fırın
Mikrosantrifüj
Otoklav
Otomatik Mikropipetler
(10,20,100,200,1000 µl'lik)
pH Metre

Markası

Biozym TC
Vilber Lourmat
Arçelik
Beko
Sanyo
Millipore
BeckmanCoulter 8000 CE
Biometra PP4000
Nüve FN500
Libror AEG-220
Techne Genius
Heraus
Janke-Kunkel
Arçelik
Heraus
Aesculap
Eppendorf Gilson
WTW

Real Time PCR cihazı	I-cycler,BIORAD
Soğutmalı Santrifüj	Sigma
Thermocycler	Perkin Elmer 9600
Vorteks	MS1 Minishaker IKA®

3.1.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler, kitler ve sarf malzemelerinin aşağıda listesi verildi ve tümü farklı firmalardan temin edildi.

<u>Kimyasal Maddeler ve Sarf Malzemeleri</u>	<u>Markası</u>
Agaroz	Sigma
Amonyum Klorür	Sigma
Amonyum Asetat	Merck
Borik Asit	Riedel-de Haen
Bromophenol Blue	Sigma
Bsp 1286 restriksiyon enzimi	New England BioLabs
cDNA sentez kiti	Fermentas
DNA izolasyon kiti (kandan)	Promega
DNA marker	Jena Bioscience
Distile su	Millipore
dNTP seti(100mM'lık)	Sigma
Dokudan RNA izolasyon kiti	Mobio
Kandan RNA izolasyon kiti	Nucleospin RNA II kit
EDTA	Sigma
Eppendorf Tüpler (0.2,0.5,1.5,2'lik)	Sigma
EtBr	Sigma
Etanol	Merck
Ficoll 400	Sigma
Hidroklorik Asit	Merck
İzopropanol	Merck
Mavi/Turuncu yükleme boyası	El yapımı
2-Merkapto etanol	Sigma
MgCl ₂ (25mm)	Fermentas
NaCl	Merck

10 x PCR Tamponu	Fermentas
Potasyum dihidrojen karbonat	Sigma
RNAse free H ₂ O	Mn
Sodyum Dodesil Sülfat (SDS)	Merck
Steril Falkon tüpler	Sigma
Sybergreen Pzr Kiti (100x50µg)	Finnzymes
Taq DNA polimeraz	Sigma
TEMED	Sigma
Tris	Sigma
Tris / HCl pH : 8,0	Sigma
Xylene Cyanole FF	Sigma

3.1.4 Kullanılan Kimyasal Solüsyonlar

3.1.4.1 DNA izolasyonunda kullanılanlar

1. 0.1 M Na₂EDTA (pH 8.0)

37.22 g Na₂EDTA 700 ml deiyonize su içinde çözüldü. 10 M'lık NaOH ile pH 8.0'a ayarlandı. Deiyonize su ile 1000 ml'ye tamamlandı. 121°C'de 1 atm. Basınçta 25 dk. Otoklavlandı. 4 °C'de saklandı.

2. 1M Tris-HCl

157.6 g Tris-HCL 800 ml deiyonize suda çözüldü. PH 7.4'e ayarlandı. Deiyonize su ile 1000 ml'ye tamamlandı. 121°C'de 1 atm. Basınçta 25 dk. Otoklavlandı. 4°C'de saklandı.

3. Amonyum Asetat (9M)

74 g amonyum asetat 20 ml steril deiyonize suya eklendi ve hacim 100 ml'ye tamamlandı Manyetik karıştırıcı yardımıyla yaklaşık 40°C'de çözüldükten sonra filtre ile sterilizasyon yapıldı. 4°C'de saklandı.

4. %10'luk (w/v) sodyum dodesil sülfat (SDS) solüsyonu

10 gr SDS deiyonize su ile 100 ml'ye tamamlanarak 68°C'de ısıtılarak çözüldü. Solüsyon oda ısısında saklandı.

5. Red Cell Lysis solüsyonu:

155 mM Amonyum Klorür
10 mM Potasyum Hidrojen Karbonat
1mM EDTA

6. Cell Lysis solüsyonu:

25 mM EDTA

%2 SDS

7. Protein presipitasyon solüsyonu :

9 M Amonyum Asetat

74 g amonyum asetat 20 ml steril deiyonize su içinde çözüldükten sonra 100 ml'ye tamamlandı. Çözelti 4°C'de saklandı.

8. TE Tamponu :

10 mM Tris / HCl pH: 8.0

1 mM Na₂EDTA, Hazırlanışı: 1M Tris HCl (ph 7.4) ve 0.1 M Na₂EDTA (ph 8.0) ayrı ayrı hazırlanır. Her ikisinden 5'er ml alınır. Üzerine 490 ml steril deiyonize su ilave edilerek 500 ml'ye tamamlanır. 121°C'de 1 atm. Basınçta 25 dk. Otoklavlandı. 4°C'de saklandı.

3.1.4.2 Agaroz jel elektroforezinde kullanılanlar

9. TBE Tamponu (Tris-borat-EDTA): Konsantre stok solüsyon (10xTBE)

108 gr Tris

55 gr Borik asit

7,31 gr EDTA tartılarak 1lt'ye tamamlandı. Kullanılacağı zaman stok 1 / 10 distile su ile sulandırıldı.

10. Mavi-turuncu 6x yükleme boyası:

3 gr Ficoll 400

50 mg Xylene Cyanole FF

2 gr Bromophenol Blue

20 ml distile su

11. Etidyum Bromid Hazırlanması:

0,2 gr Etidyum Bromid hassas terazide dikkatlice tartılarak 20ml'ye tamamlanır.

3.1.5 Kullanılan Primerler

3.1.5.1 SRD5A2 geni ekspresyonu ve A49T mutasyonu tesbitinde kullanılanlar

SRD5A2 geninin A49T mutasyonunu içeren ekzon 1 içeirsindeki 308 bp'lik bölgeyi polimeraz zincir reaksiyonunda çoğaltmak için kullanılan primerler (196);

SRD5A2 ileri primerler 5'-GCAGCGGCCACCGGCG-3'

SRD5A2 geri primerler 5'-GTGGAAGTAATGTACGCAGAA-3'

(308bp) 2275-1967

3.1.5.2 CYP19 geni ekspresyonu ve C1558T mutasyonu tesbitinde kullanılanlar

CYP19 geninin C1558T mutasyonunu içeren ekzon on içerisindeki 190 bp'lik bölgeyi polimeraz zincir reaksiyonunda çoğaltmak için kullanılan primerler (172,197)

CYP19 ileri primerler 5'-TAG AGA AGG CTG GTC AGT GCC-3'

CYP19 geri primerler 5'-CTC TGG TGT GAA CAG GAG CA-3'

CFE ileri primerler 5'-TCT GGA TCT CTG GAG AGG AAA-3' (384-404);

CRE geri primerler 5'-GCC TTT CTC ATG CAT ACC GA-3' (517-498)

3.2.1 CYP19 geni C1558T ve SRD5A2 A49T Polimorfizm Analizleri

3.2.1.1 Kandan DNA İzolasyonu:

Periferik kan eritrositleri lizis edilerek ortamdan uzaklaştırılıp çekirdekli hücrelerden DNA elde edildi. Metod:

- 1- 1 hacim kan üzerine 3 volüm soğuk Red Cell Lysis solüsyonu eklenir, altüst edilir ve 20 dakika oda ısısında bekletilir.
- 2- 2000 rpm' de 10 dakika santrifüj yapılır. Süpernatant kısmı atılır.
- 3- Dipte kalan lökosit pelleti iyice vortexlenir ve üzerine 1 hacim Cell Lysis solüsyonu eklenir. Yeniden vortexlendikten sonra 37°C' de homojenize olana kadar bekletilir. (Örnekler homojenize olduktan sonra oda sıcaklığında 18 ay kalabilir).
- 4- Homojenize olduktan sonra üzerine 1/3 hacim protein presipitasyon solüsyonu eklenir. İyice vortexlenir. 3000 rpm' de 20 dakika santrifüj edilir.
- 5- Süpernatant kısmı temiz bir tüpdeki 1 hacim izopropanol üzerine alınır. Altüst edilir, DNA görülür. Kısa santrifüj yapılır, süpernatant kısmı atılır. Alttaki DNA pelleti %70'lik etanol ile yıkanır. Etanol atılır ve oda sıcaklığında DNA kurutulur.
- 6- DNA örneği kuruduktan sonra üzerine 200 µl TE Tamponu veya distile su eklenir.

3.2.1.2 DNA'nın Spektrofotometrede Konsantrasyonunun ölçümü

İzole edilen DNA'ların 1/50 dilüsyonları hazırlandı ve 260 nm dalga boyundaki absorban değerleri okundu. 1 OD'nin 50 ng/µl DNA miktarına eşitliğinden gidilerek 260 nm dalga boyunda okunan absorban değerlerinden, örneklerdeki DNA konsantrasyonu hesaplandı. Polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılmak üzere DNA'lar steril deiyonize su ile 50 ng/µl olacak şekilde sulandırıldı (166).

3.2.1.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu:

CYP19 geni C1558T ve SRD5A2 A49T polimorfizm analizleri için kullanılacak yöntemler sırasıyla Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) ve DNA dizi analizi yöntemleridir ve iki metotta polimeraz zincir reaksiyonu bazlıdır.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu -PZR- (Polymerase Chain Reaction, PCR); bir organizmaya ait deosiribonükleik asit veya Ribonükleik asit dizilerinin invitro çoğaltılmasına imkan veren bir yöntemdir. İlk kez 1985 yılında Kary Mullis ve arkadaşları tarafından kullanılmış ve daha sonra Saiki ve arkadaşları tarafından geliştirilmiştir (167-170).

PZR yöntemi kısaca bir gen yada DNA bölgesinin, bu hedef bölgenin uç kısımlarına bağlanan ve hedef diziye komplementer oligonükleotid primerler kullanılarak ardışık bir dizi replikasyonla (siklus, döngü) çoğaltılması işlemidir. PZR'ın gerçekleşebilmesi için ortamda amplifiye olacak çift iplikli DNA yada komplementer DNA (cDNA) fragmenti, iki adet tek sarmallı oligonükleotid ve bunlara ek olarak bir protein bileşeni olan DNA polimeraz enzimi, uygun deoksiribonükleotid trifosfatlar (dNTP), bir tampon ve tuz solüsyonlarının bulunması gerekmektedir. Reaksiyondaki her döngü 3 evreden oluşmaktadır (169,170).

- i. Denatürasyon Evresi: Bu evrede çift iplikli DNA 90°C üzerinde tek iplikli hale getirilmektedir. Eğer çoğaltılmak istenen materyal RNA ise önce revers transkriptaz enzimi kullanılarak cDNA oluşturulmalıdır.
- ii. Primerlerin Bağlanma (annealing) Evresi: Bu evrede primer olarak adlandırılan ve çoğaltılmak istenen DNA dizisinin uç kısımlarına komplementer olan oligonükleotidler, denatürasyon evresinde tek iplikli hale DNA üzerinde kendilerine komplementer olan nükleotid dizilerine hibridize olmaktadır. Primerlerin bağlanması 50-75°C'ta gerçekleştirilmektedir.
- iii. Uzatma (extension) Evresi: Bağlanma evresi tamamlandıktan sonra primerlerin uzatılmasıyla tek sarmallı DNA'nın kopyası sentezlenmektedir. Bu sentez işlemi termofilik bir bakteri olan *Thermus aquaticus*'dan elde edilen Taq DNA polimeraz enzimi tarafından gerçekleştirilmektedir. Bu enzim PZR için ilk defa 1988 yılında kullanılmaya başlanmıştır. Enzim 72-78°C'ta optimum düzeyde işlev görmektedir ve saniyede 150 nükleotid ilave edebilmektedir. Ancak

çeşitli ortam koşullarına bağlı olarak bu oran saniyede 35-100 nükleotid civarındadır (167-170).

PZR reaksiyonunda bu 3 evre bir döngü olarak kabul edilmektedir. Bir döngü yaklaşık olarak 3-5 dakika sürer ve tipik bir PZR reaksiyonu için 20-40 defa tekrarlanır. PZR’da bir döngü sonunda oluşan ürün miktarı bir önceki döngüde oluşan ürün miktarının iki katıdır. Döngü sayısı ‘n’ olarak kabul edilirse ‘2ⁿ’ çoğaltılmış DNA miktarını verir. PZR uygulamalarında standart ısı uygulamasını sağlamak amacıyla 1980’lerin sonlarında her döngü için gerekli ısıyı düzenli olarak ayarlayan otomatik aletler (thermocycler) geliştirilmiştir.

3.2.1.3.1. CYP19 geni C1558T polimorfizmi için PZR

CYP19 geni C1558T polimorfizmini tesbit etmek amacıyla genin mutasyonu içine alan kısmı PZR yöntemiyle çoğaltıldı. Her bir örnek DNA’sına PZR reaksiyonunu gerçekleştirebilmek amacıyla, 50 µl’lik PZR karışımı hazırlandı. 50 µl’lik PZR karışımı içerisinde bir hasta için; 10 x PCR Tamponu’ndan 5 µl, Primer 1 (sense) 10 pM’lükden 1 µl, Primer 2 (antisense) 10 pM’lükden 1 µl, MgCl₂ (25 mM’lık) 3 µl, dNTP (2,5 mM’lık) 3 µl, DNA örneği 5 µl, Taq DNA polimeraz (5 U/µl) 0,5 µl konuldu ve toplam volüm distile su ile 50 µl’ye tamamladı. PZR programı ise ön denatürasyon 94 °C’de 5 dakika, denatürasyon, 94 °C’de 30 saniye, hibridizasyon 58 °C’de 30 saniye ve sentez, 72 °C’de 45 saniye, son üç siklusun 34 kere tekrarı ve 72 °C’de 5 dakika son uzama şeklinde optimize edildi, ürünler ısı döngü (thermal cycler) cihazına yüklendi.

3.2.1.3.2. PZR Sonrası Agaroz Jel Elektroforezi

CYP19 geni C1558T mutasyonunun analizi için, PZR işleminin ardından hedef DNA bölgesinin amplifikasyonunun doğru gerçekleşip gerçekleşmediği %2’lik Agaroz Jelde, 75V/20 mA’de PZR ürünleri yatay elektroforezde koşturularak görüntülenmek suretiyle kontrol edildi.

Jeli hazırlamak için, 2 gr Agaroz, TBE tamponu ile 100 ml’ ye tamamlandı, kaynatılarak erimesi sağlandı, jel kalıbına dökmeden önce yaklaşık 65 °C’ye kadar soğutuldu. İçerisine 4,5 µl Etidyum Bromid eklendi, karıştırıldı ve jel kalıbına döküldü, kuyucukların oluşmasını sağlayan tarak takıldı ve donmaya bırakıldı. Jel polimerize olduktan sonra taraklar çıkarıldı ve jel yatay elektroforez tankına yerleştirildi. Jelin üzerine 1-2 mm geçecek şekilde 1x TAE tampon çözeltisi ilave edildi. PZR ürününün agaroz jele yüklenmesi sırasında jelin ilk ve son kuyucuğuna

ürünün bant boyutunu karşılaştırmak amacıyla DNA boyut belirleyicisi yüklendi. PZR ürününden 0,5'lik Ependof tüpe 13 µl alındı ve üzerine 2 µl loading buffer eklendi . Mikropipetle karıştırıldıktan sonra sırasıyla herbir PZR ürünü kuyucuğa yüklendi. Ürünler 30 dakika yürütüldü. Daha sonra jel, transilüminatörde değerlendirildi.

3.2.1.4 Restriksiyon Enzim Kesimi İle Mutasyon Analizi

Restriksiyon enzimleri, çift sarmal DNA'yı özgün parçalara kesen ve bu şekilde özellikle tek nükleotid polimorfizmlerinin çalışılmasını sağlayan enzimlerdir. Bakterilerin büyük bir bölümü bir veya birkaç türde restriksiyon enzimleri sentezler. Asıl görevleri, bakteriye dışarıdan giren yabancı genetik materyalleri ayrıştırarak mutasyonları önlemek ve böylece bakteri DNA'sını korumaktır. Bakteriye özgü olan bu enzimler, çift iplikli DNA üzerinde özgün bir bölgeyi tanırlar ve çift iplikli DNA'nın her iki zincirindeki fosfo-diester bağını keserek DNA'yı tanıdıkları kesim noktalarından parçalara ayırırlar. Günümüzde 500'e yakın restriksiyon enzimi değişik mikroorganizmalardan elde edilmektedir. İsimleri izole edildikleri bakterilerin ilk üç harfi; aynı bakteriden birkaç enzim elde edildi ise Roma rakamı ile belirtilir (171).

PZR sonrası, agaroz jelde uygun bant uzunluğu elde edilebildiği tesbit edildikten sonra CYP19 C1558T mutasyon analizi restriksiyon enzim kesimi sonucuna göre yapıldı.

3.2.1.4.1. CYP19 geni C1558T polimorfizmi için restriksiyon enzim kesimi

CYP19 geni C1558T polimorfizmi analizi için *Bsp*1286 I restriksiyon enzimi, kullanılmıştır. *Bsp*1286 I restriksiyon enziminin tanıma bölgesi aşağıda gösterilmektedir.

5' G D G C H/C 3'

3' C/H C G D G 5'

CYP19 geninin PZR ile çoğaltılan hedef bölgesi (190bp), *Bsp*1286 I restriksiyon enzimi için normalde kesim bölgesi içermemektedir. Eğer onuncu ekzon'daki hedef gen bölgesinin 1558. pozisyonundaki C bazı T ile transisyon türü mutasyona uğradıysa *Bsp*1286 I restriksiyon enzimi için kesim noktasına sahip olmaktadır.

CYP19 geninin hedef bölgesinin çoğaltılmasıyla elde edilen PZR ürününün, *Bsp*1286 I restriksiyon enzimi ile kesimi sonucunda bireylerin genotipine göre elde edilecek bantlar aşağıda verilmiştir (172).

-Mutasyon içermeyen yabancı allele sahip bireylerden, 190 bp uzunluğunda tek DNA parçası,

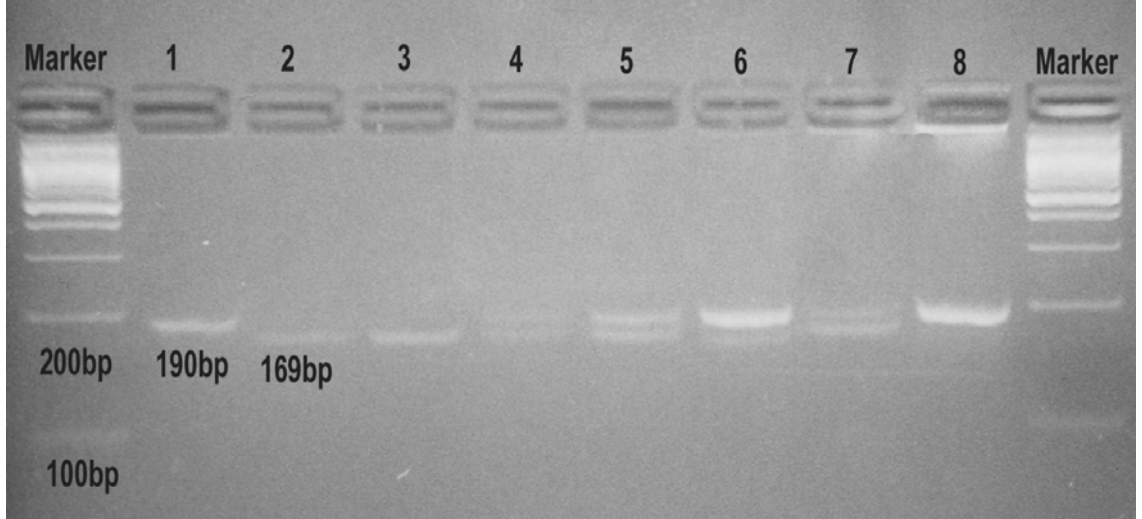
-Heterozigot mutant bireylerden, 190 bp, 169 bp, 21 bp uzunluğunda üç DNA parçası,

-Homozigot mutant bireylerden, 169 bp, 21 bp uzunluğunda iki DNA parçası elde edilmektedir. Ancak 21 bp'lik DNA parçasının görülmesi oldukça zor olduğu için 169 bp'lik DNA parçasının görülmesi enzimin kestiğinin göstergesi olarak kabul edildi.

PZR ürününün *Bsp1286* I restriksiyon enzimi ile kesilebilmesi için 25 µl'lik reaksiyon karışımı hazırlandı. 10 µl PZR ürünü, 2.5 µl 10x tampon, 0.5 ünite *Bsp1286* I restriksiyon enzimi, steril 0.5 ml'lik ependorf tüplerine konulduktan sonra, toplam hacim steril distile su ile 25 µl'ye tamamlandı. Tüpler 37°C'lik etüvde bir gece bekletildi ve bekleme zamanı tamamlandıktan sonra, restriksiyon enzim kesimini sonlandırmak amacıyla -20°C'lik derin dondurucuya aktarıldı.

3.2.1.4.2 Restriksiyon enzim kesimi ürünlerinin görüntülenmesi

CYP19 geninin PZR ile çoğaltılan 190 bp'lik bölgesinin *Bsp1286* I restriksiyon enzimi ile kesim reaksiyonu sonucu oluşan ürün, yatay jel elektroforezinde (Resim) 52'lik nusiv agaroz jelde yürütülerek görüntülendi. Jeli hazırlamak için, 2 gr agaroz, TBE tamponu ile 100 ml' ye tamamlandı, kaynatılarak erimesi sağlandı, jel kalıbına dökmeden önce yaklaşık 65°C'ye kadar soğutuldu. İçerisine 4,5 µl Etidyum Bromid eklendi, karıştırıldı ve jel kalıbına döküldü, kuyucukların oluşmasını sağlayan tarak takıldı ve donmaya bırakıldı. Jel polimerize olduktan sonra taraklar çıkarıldı ve jel yatay elektroforez tankına yerleştirildi. Jelin üzerine 1-2 mm geçecek şekilde 1x TAE tampon çözeltisi ilave edildi. PZR ürününün agaroz jele yüklenmesi sırasında jelin ilk ve son kuyucuğuna ürünün bant boyutunu karşılaştırmak amacıyla DNA boyut markırı yüklendi. PZR ürününden 0,5'lik Ependof tüpe 13 µl alındı ve üzerine 2µl loading buffer eklendi. Mikropipetle karıştırıldıktan sonra sırasıyla herbir PZR ürünü kuyucuğa yüklendi. Ürünler 30 dakika yürütüldü. Daha sonra jel, transilüminatörde değerlendirildi.



Şekil 4 CYP19 geninin PZR ile çoğaltılan 190 bp'lik bölgesinin *Bsp1286 I* restriksiyon enzimi ile kesim reaksiyonu sonucu oluşan ürünün, yatay jel elektroforezinde görüntüsü. 1, 190 bp'lik TT varyant genotip; 2,3, 169 bp'lik CC yabancı genotip görünümü; 4-7, CT heterozigot genotip; 8, 190 bp'lik TT varyant genotip.

3.2.1.5 DNA Dizi Analizi İle Mutasyon Analizi

DNA dizi analizi ya da "Sequencing" DNA'nın nükleotid dizilerinin saptanması anlamına gelmektedir.

Mutasyonların belirlenmesi amacıyla uygulanan DNA dizi analizleri Maxam-Gilbert tarafından geliştirilen kimyasal ve Sanger ve arkadaşları tarafından geliştirilen enzimatik metotlar olarak ikiye ayrılır. Her iki yöntemde dizi analizi yapılacak DNA'nın hazırlanması, reaksiyonlar ve yüksek voltaj jel elektroforezi olmak üzere üç ana aşaması bulunmaktadır. Kullanım kolaylığı ve hassasiyeti açısından günümüzde tercih edilen metod Sanger'in enzimatik yöntemi olup Sanger veya dideoksinükleotid metodu olarak da adlandırılmaktadır (111,112).

3.2.1.5.1 Sanger (Dideoksinükleotid) Yöntemi

Dideoksinükleotidler, şeker alt biriminin 2 ve 3 numaralı karbonlarında hidroksil (-OH) grubu taşımayan, suni nükleotid molekülleridir. Buna karşılık, doğal bir ribonükleotid şeker alt birimi 3 nolu karbonunda hidroksil grubu taşımaktadır. DNA replikasyonu sırasında, replikasyona katılacak olan nükleotid kalıp DNA tarafından belirlenir. Kalıp DNA zinciri ile baz eşleşmesi yapabilen nükleosid trifosfat, 5' α -fosfat grubu ile büyüyen zincirin son nükleotidinin 3'-OH grubuna fosfodiester bağı ile bağlanır. Büyüyen zincirin sonuna dideoksinükleotid eklenecek olursa, daha sonra gelecek olan nükleotid, büyüyen zincir ile fosfodiester bağı kuramayacak ve DNA

sentezi duracaktır. Sonuç olarak, Sanger yöntemi; dideoksinükleotidin DNA sentezini durdurması prensibi üzerine kurulmuştur. Sekans reaksiyonları yeni teknolojiler sayesinde otomatize edilmiştir ve floresan boyalar ile görüntülenmektedirler.

Bu işlem sırası içerisinde yapılacak dizi analizi için kullanılan basamaklar şu şekildedir:

1- Periferik kandan DNA eldesi, 2- I. PZR basamağı, 3- Agaroz jel elektroforez, 4- DNA fragmentlerinin saflaştırılması, 5- II. PZR basamağı (DNA sekans reaksiyonunun hazırlanması), 6- Etanol presipitasyonu, 7- DNA dizi analizi

3.3.6.4.2. Dizi analizi için DNA örneklerinin PZR ile çoğaltılması

SRD5A2 geni A49T polimorfizmini tesbit etmek amacıyla genin 1. ekzonunda 308 bp'lik kısım PZR yöntemiyle çoğaltıldı. Her bir örnek DNA'sına PZR reaksiyonunu gerçekleştirebilmek amacıyla, 50 µl'lik PZR karışımı hazırlandı.

50 µl'lik PZR karışımı içerisinde bir hasta için; 10 x PCR Tamponu'ndan 5 µl, Primer 1 (sense) 10 pM'lükden 3 µl, Primer 2 (antisense) 10 pM'lükden 3 µl, MgCl₂ (25 mM'lık) 3 µl, dNTP (2,5 mM'lık) 3 µl, DNA örneği 3 µl, Taq DNA polimeraz (5 U/µl) 0,5 µl, DMSO 5 µl konuldu ve toplam volüm distile su ile 50 µl' ye tamamladı. PZR programı ise ön denatürasyon 94°C'de 5 dakika, denatürasyon, 94°C'de 30 saniye, hibridizasyon 53°C'de 50 saniye ve sentez, 72°C'de 1 dakika, son üç siklusun 34 kere tekrarı ve 72°C'de 5 dakika son uzama şeklinde optimize edildi, ürünler ısı döngü (thermal cyclers) cihazına yüklendi.

3.2.1.5.3 PZR sonrası agaroz jel elektroforezi

SRD5A2 geni A49T mutasyonunun analizi için, PZR işleminin ardından hedef DNA bölgesinin amplifikasyonunun doğru gerçekleşip gerçekleşmediği ürünlerin jelde koşturulması suretiyle kontrol edildi.

Jeli hazırlamak için, 2 gr Agaroz, TBE tamponu ile 100 ml' ye tamamlandı, kaynatılarak erimesi sağlandı, jel kalıbına dökmeden önce yaklaşık 65 °C'ye kadar soğutuldu. İçerisine 4,5 µl Etidyum Bromid eklendi, karıştırıldı ve jel kalıbına döküldü, kuyucukların oluşmasını sağlayan tarak takıldı ve donmaya bırakıldı. Jel polimerize olduktan sonra taraklar çıkarıldı ve jel yatay elektroforez tankına yerleştirildi. Jelin üzerine 1-2 mm geçecek şekilde 1x TAE tampon çözeltisi ilave edildi. PZR ürününün agaroz jele yüklenmesi sırasında jelin ilk ve son kuyucuğuna ürünün bant boyutunu karşılaştırmak amacıyla DNA boyut markırı yüklendi. PZR

ürününden 0,5'lik Ependof tüpe 13 µl alındı ve üzerine 2 µl loading buffer eklendi . Mikropipetle karıştırıldıktan sonra sırasıyla herbir PZR ürünü kuyucuğa yüklendi. Ürünler 30 dakika yürütüldü. Daha sonra jel, transilüminatörde değerlendirildi. Çoğaltmayı istediğimiz SRD5A2 geninin ekzon 1 bölgesi içindeki 308 bp lik PZR ürünü görüldü.

3.2.2.5.4 PZR ürünlerinin Saflaştırılması

Bu protokol; tek veya çift iplik DNA fragmentini PZR'dan ve diğer enzimatik reaksiyonlardan saflaştırmak amacıyla uygulanacaktır.

PZR ürünlerinin saflaştırılması(temizlenmesi) pürifikasyon kiti kullanılarak yapıldı.

Bu işemde yapılan basamaklar aşağıda sıralanmıştır;

- ✓ PZR ürünü (20-50 µl) 1.5 ml'lik ependorf tüpe konuldu ve üzerine 500µl Binding tamponu eklendi. El ile karıştırıldı.
- ✓ Oda ısısında 1 dakika bu tampon içerisinde beklenildi.
- ✓ Bu bekleme süresi içerisinde 2 ml'lik toplama tüpüne spin kolonu yerleştirildi.
- ✓ Örnek toplama tüpüne alınan spin kolona konuldu ve 13.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Toplama tüpünde biriken sıvı atıldı ve spin kolon tekrar toplama tüpüne yerleştirildi.
- ✓ Spin kolona 700 µl yıkama tamponu eklendi ve 13.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Toplama tüpünde biriken sıvı atıldı ve spin kolon tekrar aynı toplama tüpüne yerleştirildi.
- ✓ Toplama tüpü ile beraber içindeki spin kolon 13.000 rpm'de 1 dakika üzerine herhangi bir solüsyon eklenmeden santrifüj edildi.
- ✓ Spin kolon steril ve temiz yeni bir santrifüj tüpüne konuldu. 50 µl Elution tamponu (10 mM Tris Cl, pH 8.5) veya distile su spin kolon üzerine konuldu ve 1 dakika beklenildi. Ardından 13.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
- ✓ Santrifüj tüpüne geçen PZR ürünleri %2'lik agaroz jelde 80 V 'da 20 dakika yürütülerek kontrol edildi.

3.2.2.5.5 DNA dizi analizi için PZR

3.2.2.5.5.1 DNA dizi reaksiyonunun hazırlanması;

Bu basamakta amaç, çoğaltılan DNA bölgelerindeki her bir bazı etiketlemektir.

20 µl dizi reaksiyonu 0.2 ml ince duvarlı tüplerde veya mikrolate kuyucuklarda hazırlandı. Dizi reaksiyonu için gerekli aşağıda listesi verilmiş reaktanlar eklenirken buz üzerinde çalışıldı.

Premiksin Hazırlanması:

Bir ependorf tüp içerisine, 10x Dizi Reaksiyon Tamponundan 200 µl, 100 µl dNTP Mix, 200 µl ddUTP Dye Terminator, 200 µl ddGTP Dye Terminator, 200 µl ddCTP Dye Terminator, 200 µl ddATP Dye Terminator ve 100 µl Polimeraz enzimi eklenir.

Daha sonra hasta başına bu premiksdan 12 µl, DNA template 0.5-4.0 µl, pUC18 kontrol template 0.5 µl, primer (1.6 pmol/µl ya da 1.6 µM) 2.0 µl alınır ve total volüm 20 µl olacak şekilde distile su eklenir.

Not:Tüm reaksiyon içerikleri kullanılmadan önce vorteksle karıştırıldı ve gerekli olduğunda kısa santrifüj yapıldı.

Daha sonra 30 döngü, 96°C'de 20 saniye, 56°C'de 20 saniye ve 60°C'de 4 dakika sekans PZR'ı yapılmak üzere ürünler ısı döngü cihazına yüklenir.

3.2.2.5.5.2 Etanol Presipitasyonu

1-Her örnek için steril 0.5 ml'lik santrifüj tüpü hazırlandı.

2-Taze stop solüsyonu/Glikojen karışımı şu şekilde hazırlandı: 2 µl 3 M Sodyum Asetat (pH 5.2), 2 µl 100 mM Na₂EDTA (pH 8.0), 1 µl 20 mg/ml glikojen.

3-Her tüpe 5 µl Stop solüsyonu/Glikojen karışımından konuldu.

4-Sekans reaksiyon karışımı da eklenerek elle alt-üst edilmek suretiyle karıştırıldı.

5-60 µl -20°C'de bekletmiş soğuk %95'lik (v/v) etanol eklendi ve karıştırıldı.Ardında hemen 14000 rpm'de 4°C'ye ayarlanan soğutmalı santrifüjde 15 dakika santrifüj edildi. Dikkatli bir şekilde supernatant alındı ve atıldı.

6- Pellet iki kez 200 µl -20°C'de bekletmiş soğuk %70'lik etanolle yıkandı ve her yıkama sonrası 14000 rpm'de 4°C'ye ayarlanan soğutmalı santrifüjde en az 2 dakika santrifüj edildi. Dikkatli bir şekilde supernatant mikropipetle alındı ve atıldı.

7-Pellet kuruyuncaya kadar beklenildi.

8-Kuruyan pellet 40 µl örnek yükleme solüsyonu içerisinde resüspanse edildi.

3.2.2.5.5.3 Sekansa yüklemek için örnek hazırlanması

1-Sekans için önerilmiş olan polipropilen örnek plate'inin uygun kuyucuklarına resüspanse edilmiş örnekler transfer edildi.

2-Mineral yağın bir damlası ile resüspanse edilmiş örneklerin herbirinin üzeri kapatıldı

3-Sekans içerisindeki plate örnekleri yüklendi ve istenilen metotla sekansa başlandı.

3.2.2.5.5.4 Sonuçların Analiz edilmesi

Sonuçlar SRD5A2 geni 1. ekzonunda bulunan ve hedef bölgeyi içeren 308 bp'lik kısmın SRD5A2 geninin 1. ekzonunun hedeflediğimiz bölgesinin 5'→3' ve 3'→5' referans dizileriyle karşılaştırılarak CEQTM 8000 Genetik Analiz Sistem (Beckman Coulter) yardımıyla analiz edildi.

3.2.2 Aromataz ve 5-alfa redüktaz tip II genlerinin ekspresyonlarının araştırılması

3.2.2.1 Kandan RNA izolasyonu

3.2.2.1.1 Kandan RNA izolasyonu için Lökosit eldesi

İdiyopatik hirsütizm tanısıyla gelen hastlardan ve sağlıklı kontrollerden EDTA'lı tüplere alınan 6 ml periferik venöz kandan aşağıdaki basamaklarda belirtildiği şekilde RNA izolasyonu için lökosit eldesi yapılmıştır.

- 1- 2 ml EDTA' lı kan falkon tüpüne aktarıldı, üzerine kullandığımız kanın 3 katı olacak şekilde (6 ml) Red cell lysis solüsyonundan konuldu. Oda ısısında arasıra alt üst edilerek 20 dakika bekletildi.
- 2- 2000 rpm' de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası tüpün dip kısmında beyaz renkli pellet kaldı. Süpernatant atıldı. Tüpteki pellet resüspanse edildi.
- 3- Pelleti eritrosit ve red cell lysis solüsyonundan arındırmak için 5 ml PBS' le yıkama işlemi yapılır alt üst edildi. 1400 rpm' de 8 dakika santrifüj edildi, süpernatant atıldı.
- 4- Lökositler (pellet) resüspanse edilerek kullanıma hazır hale getirildi.

3.2.2.1.2 Lökositlerden Total RNA'nın izolasyonu

Periferik kandan elde edilen lökositlerden RNA izolasyonu kandan RNA izolasyonu kiti ile aşağıdaki basamaklarda belirtilen şekilde yapılmıştır.

1- 350 µl RA1 tamponu, 3,5 µl 2 – Merkuptoetanol ve maksimum 100 µl lökosit lizati veya sadece lökositten 30 µl alındı. Bunların hepsi ependorf tüpüne konularak vortexlendi ve enjektörle pipetaj yapıldı.

2- Pembe kapaklı kolon tüpüne yukarıdaki karışım konuldu. Kolon tüpü toplama tüpüne yerleştirildi. 11000 g'de 1 dakika santrifüj edildi. Pembe kolon atıldı. Toplama tüpündeki süspansiyon üzerine 350 µl %70' lik etanol ilave edildi ve karıştırıldı.

3- Süspansiyon mavi kapaklı kolonlu tüpe aktarıldı. 8000 g'de 30 sn santrifüj edildi. Alttaki toplanan sıvı atıldı.

4- Mavi kapaklı filtre üzerine 350 µl MDB solüsyonu konuldu. 1 dakika 11 000 g' de santrifüj edildi. Altta toplanan sıvı atıldı.

5- Filtre üzerine 95 µl DNAase mix (DNAase mix: 90 µl DNA ase inkübasyon tamponu + 10 µl DNAase) solüsyonundan eklendi 15 dakika oda ısısında bekletildi. Üzerine 200 µl RA2 solüsyonu eklendi ve 8000 g'de 30 sn. santrifüj edildi. Alttaki sıvı atıldı. Mavi kapaklı kolon başka toplama tüpüne alındı .

6- Kolon üzerine 600 µl RA3 tamponu ilave edildi. 8000 g'de 30 sn. santrifüj edildi. Altta toplanan sıvı atıldı.

7- Kolon üzerine 250 µl RA3 tamponu ilave edildi. 11000 g'de 2 dakika santrifüj edildi. Kolon yeni bir toplama tüpüne alındı.

8- 60 µl RNAase free water eklendi. 11000 g'de 1 dakika santrifüj edildi.

9- Toplama tüpünde toplanan sıvı (RNA süspansiyonu) başka bir ependorfa aktarıldı.

3.2.2.1.2 Dokudan RNA izolasyonu için Lökosit eldesi

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Dermatoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Yrd. Doç Dr. M. Borlu tarafından poliklinik şartları altında daha önce tedavi almamış veya ilk kez tanısı konulan idiyopatik hirsütizm’li hastalardan ve aydınlatılmış onamları alınan sağlıklı gönüllülerin androjene duyarlı olduğu bilinen göbek altı orta hattan, lokal anestezi altında steril şartlarda 0.2 mm’lik punch biyopsisi alındı ve steril kültür tüpü içerisine konulan steril SF içerisinde Tıbbi Genetik Anabilim Dalı’na ulaştırıldı. Alınan doku steril petri kabı içerisinde steril bistüri ve makas eşliğinde invert mikroskop altında dermal papillasından epidermis ayrılarak küçük parçalara bölündü ve dokudan RNA izolasyon kitiyle RNA elde edilmek üzere steril ependorf tüpe konuldu. Dokudan RNA izolasyon kiti kullanılarak dokudan Total RNA izolasyonu için aşağıdaki işlemler uygulandı;

- 1- Homojenize yaklaşık 30 mg doku yeni bir toplama tüpü içerisindeki 600 µl TMR1’in içerisine konuldu ve üzerine 500 µl TMR2 eklendi. Ardından üzerlerine 250 µl TMR3’de konulduktan sonra altı kez altüst edilip 5 dakika buz üzerinde bekletildi.
- 2- Tüp daha sonra 10 dakika 10.000xg’de santrifüj edildi.
- 3- Pelletten kaçınılarak supernatant yeni bir toplayıcı tüpe alındı ve üzerine 800 µl TMR4 solüsyonu konuldu. Pipetle karıştırıldı.
- 4- Yaklaşık 650 µl’lik kısmı spin filtreli yeni toplama tüpüne konuldu ve 10.000xg’de 30 sn santrifüj edildi, her seferinde altta toplanan sıvı boşaltılır bu yaklaşık 3 kez tekrarlanır.
- 5- Spin kolonu üzerine 500 µl TMR5 eklendi ve 10.000xg’de 30 sn santrifüj edildi.
- 6- Altta toplanan sıvı atıldı. ve rezidüel TMR5’i uzaklaştırmak için bir kez daha santrifüj edildi.
- 7- Spin kolonu yeni bir toplama tüpüne alındı ve üzerine 50 µl TMR6 (RNase free su) spin kolonun tam ortasına konuldu. 30 sn santrifüj edildi.

Spin kolonu atıldı ve toplama tüpünde toplanan RNA -20°C’ye kaldırıldı.

3.2.2.2 RNA'nın ölçümü

Elde edilen RNA'nın miktarı ve kalitesi aşağıda verilen formüller ile spektrofotometre kullanılarak ölçülmüştür. Ölçüm; 10 µl RNA'ya 490 µl distile su eklenir (dilüsyon oranı 1/50). Elde edilen değer 40 sabiti ve dilüsyon oranı ile çarpılır. Sonuç µg/ml cinsinden elde edilir. Kalite için spektrofotometrenin iki dalga boyunda yaptığı ölçümler birbirine oranlanır. $260 / 280 = 1.5 \mu\text{g/ml} - 1.9 \mu\text{g/ml}$ olmalıdır.

3.2.2.3 Total RNA'dan cDNA sentez edilmesi (Revers Transkripsiyon Aşaması)

Amaç Total RNA'yı revers transkriptaz enzimini (RNA'ya yüksek afiniteli DNA polimeraz) kullanarak cDNA (Komplementer DNA)'ya çevirmektir. Yaygın olarak kullanılan iki tane revers transkriptaz enzimi vardır (171). Myeloblastosis virüs revers transkriptaz (AMV-RT) ve moloney murin lösemi virüs revers transkriptaz (MMLV-RT). AMV-RT, MMLV-RT'dan daha uygundur. Çünkü bu enzim 55°C'nin üzerinde çok güçlü polimerizasyon aktivitesini korumaktadır ve RNA'nın sekonder yapısından kaynaklanan problemleri elimine etmeye yardımcı olabilmektedir. MMLV-RT, AMV-RT'ye göre Rnase H aktivitesi daha azdır. Azalan Rnase H aktivitesi uzun ampikonların sentezini etkileyebileceğinden tam uzunluktaki cDNA moleküllerinin amplifikasyonunda MMLV-RT'nin tercih edilmesi tavsiye edilmektedir. RT reaksiyonları genellikle 40°C veya 50°C'ta spesifik primerler, random heksamerler veya oligo-dT primerler kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Metodun tekrarlanabilirliğini etkileyen en önemli faktörlerden biri RT için seçilen yöntemdir. Örneğin; random heksamerler gibi cDNA sentez metotları seçildiğinde yeterlilik azalmakta ve hatta cDNA'ların eksik sentezlenmesi gerçekleşebilmektedir. Bu nedenle, primer seçiminde dikkatli olunması gerekmektedir. Çünkü mRNA spesifik primerlerin kullanımı arka plan oluşmasını engellemektedir (172-176). Bu amaç için cDNA sentez kiti kullanılmıştır.

cDNA sentezi için her bir hasta başına aşağıdaki gibi reaksiyon karışımı buz üzerinde hazırlanmıştır. Bir hasta için; RNase - free water 8 µl, 5 x RT PZR tamponu 4 µl, dNTP (10 mM) 2 µl, Random Hexamer 1 µl, RNase inhibitör 1 µl,

AML Revers Transcriptase 1 µl, RNA 3 µl alınarak reaksiyon karışımı hazırlandı. Hazırlanan bu karışım konvansiyonel PZR cihazına yerleştirildi ve 25°C’de 10 dakika ve 42°C’de 60 dakika inkübasyona bırakıldı. Böylelikle RNA’dan tek iplikcikli RNA’ya komplementer DNA sentez edildi.

3.2.2.4 Real-Time (Eş Zamanlı) PZR metoduyla SRD5A2 ve CYP19 genlerinin ekspresyonlarının tesbit edilmesi

3.2.2.4.1 Real Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Moleküler tekniklerdeki son gelişmeler sayesinde elde edilen örneklerdeki genomik değişiklikleri hızlı ve doğru bir biçimde ölçebilme olanağı doğmuştur. DNA ve RNA’dan sayısal veya niteliğe yönelik olarak elde edilen yeni belirteçler morfolojik kullanıma girmiş; medikal tanıda son kararın konulmasına doğru uzanan bir yapıya bürünmüştür. Gerek DNA gerekse de RNA’ya yönelik sayımsal çalışmalar biyolojide ve biyomedikal araştırmalarda geniş bir biçimde kullanılmaktadır. ‘Gerçek zamanlı sayımsal polimer zincir reaksiyonu’ son yıllarda ortaya çıkan ve biyolojik enstrümanların rutin kullanımıyla duyarlılık, tekrarlanabilirlik ve kolay kullanımın sağlandığı bir teknolojidir. Bu teknoloji nükleik asitlerin sayımıyla; mutasyon saptaması, genotipleme, kimerizm analizleri yapabilen yaratıcı bir yöntemdir.

Sayımsal RT-PZR, bilinen PZR teknolojisinin geliştirilmiş bir biçimidir. Bu teknoloji sayesinde artık gen kopya ürünlerinin düzeylerini sayısal değerlere dönüştürerek ölçmek mümkün olmaktadır. Üstelik süregelen PZR reaksiyonunu ekranda izleyerek gerçek zamanlı “Real Time (RT)” olarak reaksiyonun gidişine müdahale etmek ve PZR döngülerinin sayısı ile oynayabilmek de mümkündür. Birçok adlandırmayla anılan bu teknolojiye floresan okuma yapması nedeniyle yabancı yayınlarda Floresan Sayımsal RT-PZR, Sayımsal-kinetik PZR gibi çeşitli adlar altında rastlamak mümkündür.

3.2.2.4.1.1 Sayımsal RT-PZR Yöntemi Nasıl Uygulanır?

3.2.2.4.1.2. Örneklerin hazırlanması

Kantitasyondaki ana hedef, gen anlatımının ölçülmesi olduğunda sayımsal PZR yöntemi, mRNA üzerinden gerçekleştirilir. RNA, her türlü dokudan elde edilebilir Total RNA elde edilirken kullanılan yöntemlerde genellikle DNA bulaşığı saptanır. İki farklı örnek arasında gözlenen farklı değerler, örneklerin DNA bulaşıklık seviyeleri arasındaki farklılıktan kaynaklanabilir. Bu nedenle elde edilen total RNA

örnekleri DNase enzimi ile muamele edilerek DNA bulaşımı giderilmelidir. DNase enziminin cDNA sentezi öncesi ortamdan uzaklaştırılması da reaksiyon özgüllüğü açısından önemlidir. Elde edilen RNA'nın kalitesi agaroz jel elektroforezi ile konsantrasyonu ise UV spektrofotometresiyle tespit edilebilir. Kantitasyonun başarılı olması kullanılan en çok RNA'nın kalitesine bağlıdır.

Kantitasyon işlemi genellikle DNase enzimi ile işlemiş 1 µg total RNA üzerinden sentezlenen cDNA ile gerçekleştirilir. cDNA sentezi için Ters Transkriptaz PZR yöntemi kullanılır. Bu yöntemde özgün primerler ve 'Ters Transkriptaz' enzimi kullanılarak total RNA'dan cDNA elde edilir.

3.2.2.4.1.3 PZR aşaması

Kantitasyonda anlatım miktarı belirlenmek istenen örnekler, içerdiği cDNA miktarı bilinen standartlarla PZR sonunda karşılaştırılır. Bu standartlar genellikle 10'lu dilüsyonlar halinde hazırlanır ve amplifikasyonları, her dokuda aynı düzeyde anlatıma girdiği bilinen genlerle ('housekeeping gen'ler) gerçekleştirilir. Dış kontrol olarak da adlandırılan bu standart örneklerin eşik değerine girdikleri döngü PZR aleti tarafından saptanır. Bu döngü, ortam kirliliğinden kaynaklanan floresan sinyalinin üstünde bir floresan sinyalin alındığı döngüdür. Reaksiyon sonunda, standartların eşik değerleri belirlenerek bir eğri oluşturulur. Miktarları bilinmeyen örneklerin bu eğriyi kestiği döngüler belirlenerek miktar sayımı yapılabilir. Eğer yapılacak olan göreceli gen sayımı ise, çalışılacak her örnek için iki farklı karışım hazırlanır. Karışımlardan ilki "house keeping gen" adı verilen anlatımı sabit gen primerlerini içerirken, ikincisi anlatımı ölçülecek gene ait primerleri içerir. Yani tüm örnekler hem incelenecek genle hem de 'housekeeping gen'le amplifiye edilir. Bu ikinci örnek iç kontrol olarak da adlandırılmaktadır. PZR sonunda araştırılan genin değeri, iç kontrol genin değerine oranlanarak ölçülür ve normalize edilir.

Kişisel deneylerimizde yararlandığımız SYBR Green I boyası floresan ışımaya saptamak için en sık kullanılan boyadır (177,178). SYBR Green I dışında işaretli problardan da yararlanılabilir. Bu daha masraflı bir yaklaşımdır. SYBR Green I, çift iplikli DNA'ya bağlanır. Ortamdaki çift iplikli DNA sayısı arttıkça, yani amplifiye olan cDNA miktarı arttıkça elde edilen floresan miktarı da artacaktır. PZR sonucu elde edilen ürünlerin gerçek PZR ürünü olup olmadığı "erime eğrisi"

yöntemi ile kontrol edilmelidir. Erime ısı (T_m), bir amplifikasyon ürünü genin %50'sinin denatüre olduğu sıcaklık değeridir ve bu değer genin dizisine ve %GC oranına bağlı olarak farklılık gösterir. Erime eğrisi yöntemi de bu özellikten yararlanarak, PZR sonunda elde edilen amplifikasyon eğrilerinin gen ürünü mü yoksa primer dimer ya da ortam kirliliğine bağlı bir eğri olup olmadığını belirler.

3.2.2.4.1.4. Sayımsal RT-PZR Uygulamasında Dikkat Edilmesi Gereken Noktalar Nelerdir?

Sayımsal RT-PZR uygulamaları tekniğin aşırı duyarlılığından dolayı aynı zamanda çok risklidir. Elde edilen sonuçları güvenilir kılabilmek için şu düzenlemelerin yapılması önemlidir (177,178):

a) Hedef bölge uzunluklarının düzenlenmesi: ABI Prism 7700 ile 400 bp'e kadar varan kopyalar elde edilebildiği bildirilmesine karşın RT-PZR'de optimal hedef uzunluğunun 100 bp'den daha kısa olması hedeflenir ve 80 bp civarına düşmesi arzu edilir (179). Bunun nedeni, 92-95°C arasına düşen denatürasyon aralığını gerek primer gerek problemlerle yakalayabilme arzusudur.

b) Primer düzenlenmesi: İyi düzenlenmiş primerler doğru bölgelere bağlanarak amplifikasyon ya da genomik DNA kontaminasyonundan kaynaklanan yanlış pozitif sonuçları önleyebilir. İdeal bir amplifikasyon için, primer seçimi T_m sonucuna bakılarak yapılmalıdır ve primer boyları birbirine yakın olmalıdır. Genomda hedeflenenden başka bölgelere uyumlu olup olmadığının türler arasında da kontrol edilmesi önemlidir. Bu nedenle primer düzenlenmesi için hazırlanmış çeşitli bilgisayar programları kullanılmaktadır ki bunların bir bölümünü sistem üretici firmalar da sağlamaktadır. Genel olarak tek zincirli primerler 15-20 baz uzunluğunda ve G/C içerikleri arasındaki fark %20-%70 arasında olmalıdır. T_m dereceleri 1-2°C'den fazla olmamalı ve maksimum T_m 58-60°C olmalıdır. Primerler konsantrasyon olarak genelde 50-200 nM arasında ortamda bulunur ve daha fazla ya da daha düşük konsantrasyonlar nonspesifik ürünler veya hedef kopya sayısında göreceli düşüklükle analizlerde zorluğa yol açabilir. Ayrıca 3' ucundaki son 5 bazda G-C bazlarının sayısını bir ya da ikiden fazla olmayacak şekilde biçimlendirmek de faydalıdır. Böylece DNA polimerazın non-spesifik uzantılandırılmalarının önüne geçilebilir.

c) Sayımsal RT-PZR'de eşik değerlerin ve dış standart eğrilerinin düzenlenmesi: Floresan bazlı RT-PZR'de eşikler, doğru ve yenilenebilir kantifikasyon yapmada en önemli noktalar (180). RT-PZR'de floresan değerler her döngü sonunda ölçülerek kopyalanıp ürün miktarı hakkında bilgi edinilmektedir. Fakat başlangıçtaki ortam kirliliğinin yarattığı sinyal karmaşasını devredışı bırakarak ölçmek için eşik noktasının tayini çok önemlidir.

Bir diğer önemli nokta da standart eğrilerinin doğru düzenlenmesidir. Bu amaçla 'göreceli' ya da 'saf' kantifikasyon yaklaşımlarından birini seçmek mümkündür. Başlangıç ve dolayısıyla sonuç miktarını bildiğimiz standartlar çeşitli seyreltiler halinde reaksiyona konulur. Amplifikasyon sonucu ortaya çıkan matematik eğri sayesinde diğer ürünlerimizin de matematik kantifikasyonu mümkün olacaktır. 'Göreceli kantifikasyon'da bilinen bir amplikonun varlığında bir nükleik asidin kalibratör olarak kullanılışı söz konusudur. Elde edilen sonuç bu bilinen amplikonla kıyaslanarak hesaplanır. Başka bir deyişle hedef genin eşik değerini aşan kopyaları kalibratör genin eşik değerini aşan kopyalarıyla deney sonunda kıyaslanır. 'Saf kantifikasyon'daysa hücre tam sayısı ölçülmektedir ve bu nedenle saf standart eğri konsantrasyonlarının ölçümü her bir amplikonun içerdiği hücre sayısını anlamak için önemlidir.

d) Sayımsal RT-PZR sonuçlarının normalizasyonu: RT-PZR'de mRNA kantifikasyonuna ait yanlışlıklar başlangıç materyaline ait küçük farklılıkların amplifikasyon üründe katlanarak yansımından da kaynaklanabilir. Bu durum özellikle farklı bireylerden alınan örneklerle başlanan reaksiyonlarda izlenir. Bir iç kontrol kullanılarak bu başlangıç farklılıklarını standardize etmek ve elde edilen sonucun normalizasyonu bu yüzden çok faydalıdır. İdeal bir iç kontrol (ya da genel tanımıyla internal standart) farklı doku ve organizmalarda belli bir biçimde anlatıma girmeli ve terapilerden etkilenmemelidir. Bu amaçla kullanılan 'housekeeping gen'ler ökaryotlarda çok çeşitli olmakla birlikte en ünlüleri GAPDH, β aktin ve rRNA'dırlar. Oysa özellikle hematolojide bu genlerin kararlı davranışları hakkında önemli kuşkular oluşmuştur. GAPDH yıllardır önerilmekle birlikte buna ciddi itirazlar da gelmiştir (181,182). β aktin ise daha eski ve çok kullanılmış bir internal standarttır (183). Ama β aktin'in mRNA'sının kolaylıkla bulaşık DNA'yı da amplifiye ettiği bildirilmiştir (184). Ribozomal RNA'lar ise

özellikle insan çalışmalarında daha güvenilir olmakla birlikte biyolojik faktörlerden etkilenebildiği de rapor edilmiştir (185,186).

Son zamanlarda özellikle hematolojide $\beta 2$ mikroglobulin ve ABL genleri üzerinde bir uzlaşmaya varılmış ve internal housekeeping kullanımında yalnızca bu genlerin kullanılması biçiminde bir ortak düşünceye ulaşılabilmektedir (187).

3.2.2.4.1.5 Gerçek Zamanlı PZR’da kantitatif miktar ölçmede kullanılan yöntem ve Kavramlar

Eşik Siklus Kavramı: Eşik siklus kavramı floresans temelli RT-PZR kullanarak doğru ve tekrarlanabilir miktar ölçmenin temelini oluşturmaktadır. Floresans değerler her döngüde kaydedilmektedir ve ölçülen floresans amplifikasyonun o noktasında ortamda var olan ürünlerin miktarını göstermektedir. PZR’ın erken fazları boyunca floresans düzey arka plan üzerinde ayırt edilemez. Floresans ilerleyen sikluslar boyunca bir üst katlar fazı, bir lineer faz ve sonunda bir plato fazı oluşturacak şekilde bir döngü floresans grafiği oluşturmaktadır. Bu amplifikasyon grafiği siklus sayısına karşın oluşan floresans sinyalin grafiğidir. PZR ilk siklulardan başlayarak her döngüde üst katlar şeklinde bir mekanizmayla devam etmektedir. Ancak reaksiyon bileşenleri sınırlayıcı olduğundan eninde sonunda herhangi bir ürün artışının gerçekleşmediği bir plato fazına ulaşılmaktadır. Bu faza ulaşıncaya kadar hedefin amplifikasyon oranı azalacaktır. Ve sonunda duracaktır. Ancak floresans tesbiti st katlar şeklinde işleyen ve ürünlerin herhangi bir sınırlayıcı etkisinin olmadığı üst katlar fazında ölçülmektedir. İlk PZR sikluslarında floresans miktarında çok küçük bir değişim vardır. Bu grafikte anlamlı bir değer ifade etmediğinden temel değer (baseline) olarak adlandırılmaktadır. Y Temel değer üzerinde floresansda oluşan artış biriken PZR ürünlerinin göstergesidir. Sabit bir floresans eşik değer, temel değer üzerinde tesbit edilmektedir. Eşik siklus (treshold cycle, Ct) floresansın sabitlenmiş eşiği geçtiği kesri döngü sayısı olarak veya floresans sinyalin arka plan üzerinde istatistik olarak anlamlı bir değere ulştığı nokta olarak tanımlanmaktadır. İlk 3-15 döngüler boyunca arka plan üzerinde 10 standart sapmayla hesaplanmaktadır. Ct değerine her zaman amplifikasyonun üst katlar (eksponansiyel) fazında ulaşılmaktadır. Bu nedenle Ct değeri reaksiyonun plato fazının reaksiyonu sınırlayıcı bileşenlerinden etkilenmemektedir. Bu Ct değeri daha sonra standart bir eğri oluşturularak kantitatif bir sonucun hesaplanmasında kullanılmaktadır (175,188).

3.2.2.4.1.5.1. Miktar Ölçmede Kullanılan Yöntemler

Kantitatif gerçek zamanlı PZR analizleriyle mRNA'nın miktarının ölçülmesinde, nispi (relatif) ve standart eğri metodları kullanılabilir. Standart eğri metodu tam (absolute) miktar ölçme olarak da bilinmektedir. Ama bu metod için en doğru adlandırma standart eğri metodudur (189).

3.2.2.4.1.5.1.1 Nispi Miktar Ölçme:

Nispi miktar ölçme bir genin mevcut durumdaki transkripsiyonundaki değişimleri tanımlamaktadır ve genellikle yeterlidir. Nispi miktar ölçmenin tam olarak anlaşılması için aşağıdaki terimlerin tam olarak anlaşılması gerekmektedir.

STANDART: Bilinen konsantrasyonlarda bir örnek standart bir eğri oluşturmak için kullanılmaktadır.

REFERANS: Deneysel sonuçları normalize etmek için kullanılan pasif veya aktif sinyaldir. Endojen ve eksojen kontroller aktif referansın örnekleridir. Aktif referans terimi ile sinyalin PZR amplifikasyonunun sonucu olarak meydana gelmesi kastedilmektedir. Aktif referans primer ve prob setleridir.

ENDOJEN KONTROL: İzole edilmiş olan ve her örnekte bulunan DNA veya RNA'dır. Aktif referans olarak endojen kontroller kullanılarak, her reaksiyona giren total RNA'nın miktarındaki farklılıkları normalize etmek mümkündür. mRNA transkriptlerinin miktarının ölçülmesinde RT-PZR spesifik hatalar daha çok örneklerin başlangıç miktarlarının farklı olmasından kaynaklanmaktadır. Bu özellikle örneklerin farklı bireylerden elde edildiği durumlarda ekspresyon profillerinin yanlış ifade edilmesine neden olmaktadır. Sonuç olarak uygun bir standartın kullanılması gerekliliği ortaya çıkmaktadır. Standart deneyin en önemli bileşenlerinden biridir. Örnekler arasındaki varyasyonu gidermek ve hataları en aza indirmek için en fazla kabul gören metod hedefle eş zamanlı bir iç referans olarak hizmet veren hücrel bir RNA'nın hedefle eş zamanlı çoğaltılmasıdır. Böylece tüm RNA değerleri normalize edilebilmektedir. İdeal bir iç standart bir organizmanın tüm gelişim safhalarında ve farklı dokularında değişmez bir düzeyde eksprese olması ve deneysel uygulamalardan etkilenmemesi gerekmektedir. İlave olarak, iç standart olarak kullanılan RNA'nın çalışılan RNA ile kabaca aynı düzeyde eksprese olması gerekmektedir. Böylece bir iç standart RNA bulunmadığında, 3 farklı RNA gen ekspresyonunu normalize etmek için

kullanılabilmektedir. Bunlar gliseraldehit-3-fosfat-dehidrojenaz (GAPDH), Beta aktin ve ribozomal RNA'dır. İlaveten H3 ve siklofilinde bazen kullanılabilmektedir (175).

EKZOJEN KONTROL: Bu bilinen miktarlarda her bir örnek içine konan karakteristik bir DNA yada RNA'dır. Ekzojen bir aktif referans genellikle invitro olarak oluşturulmaktadır ve aynı zamanda internal pozitif kontrol olarak kullanılmaktadır. Ekzojen bir referans aynı zamanda revers transkriptaz tarafından sentezlenen DNA veya örnek ekstraksiyon yeterliliğindeki farklılıkları normalize etmek için de kullanılabilmektedir. Aktif bir referans kullanılıp kullanılmaması floresans sinyaldeki PZR ile ilgili olmayan dalgalanmaları normalize etmek pasif bir referans kullanmakta önemlidir.

NİSPİ STANDART EĞRİ: Nispi miktar ölçmek için standart eğriler hazırlamak oldukça kolaydır. Çünkü miktar kalibratör gibi bazı temel örneklerle bağı olarak ifade edilmektedir. Nispi bir standart kalibratör olarak adlandırılan bir örnek içermektedir. Kalibratör keyfi üniteleri içeren dilüsyon serisi oluşturmakta kullanılmaktadır ve herhangi bir nükleik asit bu amaç için uygundur. Ancak konsantrasyonun ve amplikonun uzunluğunun bilinmesi gerekmektedir.

Tüm deneysel örnekler için, hedefin miktarı standartla tanımlanmaktadır ve kalibratörün miktarına bölünmektedir. Örneğin ekspresyon üzerine ilaçların etkileri çalışılırken ilacın uygulanmadığı bir örnek kalibratör olarak kullanılabilmektedir. RNA'nın nispi miktarının belirlenmesi için bir DNA kullanmak mümkündür. Bunu yapmak için hedefin RT yeterliliğinin tüm örneklerde aynı olduğunun kabul edilmesi gerekmektedir.

Miktar ölçmek için bir endojen kontrolle normalizasyon yapılmalıdır. Standart eğriler hem hedef hemde endojen referans için hazırlanmalıdır. Her bir deneysel örnek için, hedef ve endojen referansın miktarı uygun standart eğriden tanımlanmalıdır. Sonra, hedef miktar normalize edilmiş bir hedef değer elde etmek için endojen referans miktarına bölünmelidir.

Nispi miktar ölçme metodu kullanıldığında tüm genlerin PZR yeterliliğinin birbirine yakın veya %90'ın üzerinde olması gerekmektedir. Bu pozitif bir kontrol kalıbının tipik olarak 5 veya 10 katlık seri dilüsyonları standart eğri oluşturmak için kullanılmaktadır ve kalıbın log10 konsantrasyonuna karşın Ct'nin grafiklenmesiyle

miktar ölçülmektedir. Oluşan meyil çizgisinin meyili PZR yeterliliğini göstermektedir. -3.32'lik meyil PZR yeterliliğinin %100 olduğunu göstermektedir. PZR yeterliliğini etkileyen etkenler arasında $MgCl_2$, primer ve prob konsantrasyonu sayılabilir. Eğer ölçülen PZR yeterliliği -3.32'den daha büyükse bilinen örneklerin pipetlemesinde hatalar mevcuttur yada standartta bir PZR inhibitörü vardır. Eğer bu fark edilmezse bilinmeyen örneklerdeki kalıbın miktarı olandan daha fazla ölçülecektir. Reaksiyona giren kalıp miktarına bağlı olarak oluşan Ct değerleri giren kalıp miktarının $\log(10)$ konsantrasyonlarının fonksiyonu olarak grafiklenmiştir (189).

3.2.2.4.1.5.1.2 Karşılaştırmalı Ct Metodu:

Standart eğri metoduna benzemektedir. Karşılaştırmalı Ct metodunda, relatif miktar ölçme ile aynı sonuçlara ulaşmak için aritmetik formüller kullanılmaktadır. Bu metotta geçerlilik deneyi yapıldığı sürece relatif miktar ölçmedeki standart eğrilerin kullanımını elimine etmek mümkündür. Hedefin miktarı bir kalibratör bağlı olarak ve bir endojen referansla normalize edilmektedir. Metodun temelinde 2 farklı örnek için elde edilen Ct değerlerindeki farklılıkları kullanmak yatmaktadır. Ct değerleri PZR'ın üst katlar fazında elde edilmektedir ve başlangıçtaki hedefin kopya sayısı ile arantılıdır (188).

3.2.2.4.1.5.1.3 Standart Eğri metodu (Tam miktar ölçme):

Transkripsiyonun tam miktarının ölçülmesinde her hücredeki kopya sayısının tam olarak tanımlanması gerçekleştirilmektedir. Bir iç veya dış kalibrasyon eğrisinden faydalanılmaktadır. Ama standartın kopya sayısının tam olarak bilinmesi gerekmektedir. Standart olarak bir plazmid veya bir gen fragmenti kullanılabilir. RNA standartın miktarı UV spektrofotometresi veya yarışmalı RT-PZR veya RPA gibi diğer alternatif metodlarla ölçülmektedir. RNA ile çalışılıyorsa RT aşamasından kaynaklanabilecek potansiyel farklılıkları gidermek için standart bir RNA olmalıdır. Alternatif bir metod olarak dış sentetik RNA hazırlanabilir ve yarışmalı RT-PZR için standartın hazırlanmasında kullanılarak benzer bir şekilde miktarı ölçülebilmektedir. Stabil ve güvenilir bir standart materyalin oluşturulması tam miktar ölçmek için gerekmektedir. Endojen bir standartla hedef genin normalizasyonu tavsiye edilmektedir. Standart eğri

metodunda bilinmeyen örnek miktarının ölçülmesi için bilinen bir pozitif kontrol örneğinin 5 veya 10 katlık seri dilüsyonları kullanılmaktadır (188-190).

Tekrarlanabilirliği: Gerçek zamanlı PZR reaksiyonu bir çok dezavantaja sahiptir ve farklı laboratuvarlarda tekrarlandığında aynı örnekten farklı sonuçlar ortaya çıkması ve tekrarlanabilirliğin oldukça az olmasıyla karakteristiktir (191). RT-PZR'ın tekrarlanabilirliği 2 ardışık enzimatik aşamanın gerekliliği ve RT aşamasının yeterliliğinin değişken olmasında etkilenmektedir (192). PZR'ın erken safhalarında meydana gelen yanlış eşleşme olayları, reaksiyon bileşenlerindeki ufak varyasyonlar, hedef moleküllerin çok küçük miktarlarda olması ve PZR'ın üst katlar şeklinde işleyen mekanizması reaksiyon sonunda amplifiye olmuş ürünlerin son miktarını oldukça fazla etkilemektedir. Bu özellikle klinikte rutin deneylerde kullanıldığında RT-PZR'ın güvenilirliği ve yararı hakkında belirsizliklere neden olmaktadır. Bu özellikle kanser hastalarında mikrometastatik hastalığın varlığının taranmasında önemli bir problemdir. Aynı zamanda prognoz ve hasta yaşamının belirlenmesi üzerindeki yararı oldukça ciddi şekilde sınırlamaktadır (175).

Optimizasyon ve tutarlılık gerçek zamanlı RT-PZR deneylerinde tekrarlanabilir sonuçların elde edilmesinde kritik öneme sahiptir. Bununla beraber, gerçek zamanlı RT-PZR deneylerinin diğer konvansiyonel RT-PZR prosedürlerine göre daha az değişken olduğu şphe götürmez bir gerçektir. Ölçümlerde Ct verileri için değişkenlik katsayısının çok küçük olduğu gösterilmiştir. Bu değer Taq-Man için %2'den daha azdır (193,194). Konvansiyonel RT PZR için bu değer %14 olarak rapor edilmiştir (195).

3.2.2.4.2 SRD5A2 Geninin Kandaki Ve Dokudaki Ekspresyonunun Tesbit Edilmesi

Hasta ve sağlıklı kontrol grubunun kan ve hedef dokularından izole edilen RNA'lardan sentez edilen cDNA hedef genin ekspresyonunu tesbit etmek amacıyla Real-Time PZR cihazına yerleştirilir. Bunun için her bir hasta başına Sybergreen Mix'den 25 µl, Primer forward (10 pmol)'den 3 µl, Primer reverse (10 pmol)'den 3 µl alınır 5 µl cDNA eklenerek reaksiyon karışımı hazırlandı. Bu karışıma toplam volüm 50 µl'ye tamamlanacak şekilde dH₂O eklendi. Tüm karışım hazırlama işlemleri buz üzerinde gerçekleştirildi. Herbir hasta için hazırlanan bu PZR karışımları amplifikasyon için cihazın platinine yüklenerek amplifikasyon programı başlatıldı. Amplifikasyon programı 95°C'de 5 dakika, 94°C'de 1 dakika, 61°C'de

40 saniye, 72°C’de 1 dakika ve son üç sikusun 40 kere tekrarlanması ve son uzama 72°C’de 2 dakika olarak optimize edildi.

3.2.2.4.3 CYP19 Geninin Kandaki Ve Dokudaki Ekspresyonunun Tesbit Edilmesi

Hasta ve sağlıklı kontrol grubunun kan ve hedef dokularından izole edilen RNA’lardan sentez edilen cDNA hedef genin ekspresyonunu tesbit etmek amacıyla Real-Time PCR cihazına yerleştirildi. Bunun için her bir hasta başına Sybergreen Mix’den 25 µl, Primer forward (10 pmol)’den 3 µl, Primer reverse (10 pmol)’den 3 µl alınır 5 µl cDNA eklenerek reaksiyon karışımı hazırlandı. Bu karışıma toplam volüm 50 µl’ye tamamlanacak şekilde dH₂O eklendi. Tüm karışım hazırlama işlemleri buz üzerinde gerçekleştirildi. Herbir hasta için hazırlanan bu PZR karışımları amplifikasyon için cihazın platine yüklenerek amplifikasyon programı başlatıldı. Amplifikasyon programı 95°C’de 3 dakika, 94°C’de 1 dakika, 63°C’de 50 saniye, 72°C’de 0.5 dakika ve son üç siklusun 35 kere tekrarlanması ve son uzama 72°C’de 5 dakika olarak optimize edildi.

3.2.2.4.3 Beta Aktin Geninin Kandaki Ve Dokudaki Ekspresyonunun Tesbit Edilmesi

Hasta ve sağlıklı kontrol grubunun kan ve hedef dokularından izole edilen RNA’lardan sentez edilen cDNA hedef genin ekspresyonunu tesbit etmek amacıyla Real-Time PCR cihazına yerleştirildi.

Bunun için her bir hasta başına Sybergreen Mix’den 25 µl, Primer forward (10 pmol)’den 3 µl, Primer reverse (10 pmol)’den 3 µl alınır. 5 µl cDNA eklenerek reaksiyon karışımı hazırlandı. Bu karışıma toplam volüm 50 µl’ye tamamlanacak şekilde dH₂O eklendi. Tüm karışım hazırlama işlemleri buz üzerinde gerçekleştirildi. Herbir hasta için hazırlanan bu PZR karışımları amplifikasyon için cihazın platine yüklenerek amplifikasyon programı başlatıldı. Amplifikasyon programı 95°C’de 5 dakika, 94°C’de 1 dakika, 61°C’de 40 saniye, 72°C’de 1 dakika ve son üç sikusun 35 kere tekrarlanması ve son uzama 72°C’de 2 dakika olarak optimize edildi.

3.2.3 İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Çalışmanın, idiyopatik hirsütizimli hastalarda CYP19 geni C1558T polimorfizmi ve SRD5A2 geni A49T polimorfizmi için PZR’a dayalı agaroz jel elektroforzi

yapıldıktan sonra elde edilen bulguların değerlendirilmesinde kullanılan istatistiksel analiz testleri aşağıda açıklanmaktadır.

Hasta ve kontrol grubunun kan ve doku daki CYP19 ve SRD5A2 genlerinin ekspresyonlarının karşılaştırılmasında Student t Testi kullanılmıştır. Bağımsız iki grup ortalamasının karşılaştırıldığı Student t Test'inde ortak ve temel amaç, grup ortalamaları arasındaki farkın hesaplanmasıdır.

Hasta ve kontrol grubunun, CYP19 geni C1558T ve SRD5A2 geni A49T mutasyonlarının karşılaştırılmasında Ki-kare testi ve Fisher'in Keskin Testi uygulanmıştır. Her iki test için de anlamlılık değeri $p < 0.05$ 'dir.

Ki-kare Testi, sağlık araştırmalarında en güvenilir bulunan ve sıklıkla kullanılan, analiz yöntemidir. Ki-kare analizi, grupları çapraz tablo gözlerindeki gözlenen değerler ile beklenen değerler arasındaki farkı dikkate alarak karşılaştıran bir testtir.

Fisher'in Keskin testi, bir ki-kare testi olmamasına karşın, genellikle onun uzantısı olarak ya da onunla birlikte sunulur. $N < 20$ ise ya da $20 < n < 40$ ve beklene değerden en az bir tanesi beşin altında ise, elde edilecek sonucun hatalı olma olasılığı artacaktır. Böyle durumlarda ki-kare testi yerine Fisher'in Keskin Testi kullanılır.

4. BULGULAR

CYP19 geni C1558T genotipi için hasta ve kontrol grubunun periferik venöz kanlarından elde edilen DNA'larının mutasyon spesifik PZR sonrası elde edilen ürünlerin Bsp 1286I restriksiyon enzimiyle muamelesi (RFLP metodu) sonucu elde edilen veriler;

Tablo 2. IH ve kontrol grupları arasında CYP19 C1558T genotip dağılımı ve allel sıklıkları

	n	Genotip (%)			Total alleller	
		CC	CT	TT	C	T
IH	16	1(6)	7(44)	8(50)	9	23
Controls	32	2(7)	11(34)	19(59)	15	49
χ^2		0.417			0.063	
<i>p</i>		0.884			0.803	
<i>OR</i>						
T alleli için		OR:0.78		RR:0.94		
C alleli için		OR:1.29		RR:1.2		

Hasta ve kontrol grubu arasında CYP19 C1558T polimorfizminin görülme oranının karşılaştırılmasında X^2 analizine göre fark bulunamadı.

SRD5A2 geni A49T genotipi için, hasta ve kontrol grubunun periferik venöz kanlarından elde edilen DNA'larının SRD5A2 geni ekzon 1 bölgesinin hedef mutasyonu içerecek şekilde yapılan dizi analizi sonuçları;

Tablo 3. IH ve kontrol grupları arasında SRD5A2 A49T genotip dağılımı ve aminoasit sonuçları

	n	Kodon	
		TGT (Threonin)	AGT (Alanin)
IH	16	16	-
Controls	14	14	-

p

I

Hasta ve kontrol grubu arasında SRD5A2 A49T polimorfizminin görülme oranının karşılaştırılmasında X² analizine göre fark bulunamadı.

Hasta ve kontrol gruplarından elde edilen periferik kan ve androjene duyarlı umblikus altı orta hattan elde edilen dokularda SRD5A2 ve CYP19 genlerinin ekspresyonlarının real-time pcr cihazıyla sybergreen kullanılarak araştırılması sonucu elde edilen bulgular;

Tablo 4. Sonuçların tümünün görünümü

	SRD5A2	CYP19	β -AKTİN	SRD5A2 / β -AKTİN	CYP19/ β -AKTİN
1D	0.119	0.156	0.16	0.744	0.975
2D	0.445	0.242	0.506	0.88	0.48
3D	0.122	0.0348	0.162	0.753	0.215
4D	0.0294	0.0198	0.0676	0.435	0.293
5D	0.191	0.163	0.125	1.528	1.304
6D	0.598	0.51	2.18	0.274	0.234
7D	0.103	0.0719	0.149	0.691	0.482
8D	0.138	0.0632	0.303	0.455	0.208
1K	0.424	0.476	19.9	0.021	0.024
2K	0.0954	0.106	18.2	0.0052	0.0058
3K	0.056	0.0467	0.0147	3.81	3.18
4K	0.12	0.276	1.34	0.09	0.205
5K	0.927	0.515	3.2	0.29	0.161
6K	0.13	0.207	1.29	0.1	0.16
7K	6.00	5.54	4.96	1.21	1.117
8K	2.08	1.91	1.58	1.32	1.21
1KD	0.37	1.14	0.145	2.55	7.86
2KD	0.292	3.9	0.201	1.45	19.4
3KD	1.18	1.78	0.540	2.185	3.3
4KD	0.311	1.21	0.537	0.58	2.253
5KD	0.0209	0.975	0.116	0.180	8.405
6KD	0.613	0.625	0.757	0.809	0.825
7KD	0.304	0.303	0.229	1.327	1.323
8KD	0.580	0.517	1.02	0.568	0.506
1KK	0.102	0.369	0.198	0.515	1.863
2KK	0.0256	2.01	0.115	0.222	17.47
3KK	0.826	0.745	0.965	0.856	0.772
4KK	1.23	0.927	1.03	1.194	0.9
5KK	6.16	4.71	2.94	2.095	1.602
6KK	4.67	2.53	0.0186	251	136
7KK	1.38	1.22	1.19	1.156	1.025
8KK	0.562	2.1	2.1	0.267	1

Tablo 5. Hastaların kan ve dokudaki SRD5A2 geni ekspresyonlarının karşılaştırılması;

Hasta Grubu: SRD5A2 / β -AKTİN		
	KAN	DOKU
1	0.021	0.744
2	0.0052	0.88
3	3.81	0.753
4	0.09	0.435
5	0.29	1.528
6	0.1	0.274
7	1.21	0.691
8	1.32	0.455
Median (Min-Max)	0.195 (0-1.32)	0.717 (0.27-1.53)
P=0.279		

Tablo 6. Kontrol grubunun kan ve dokudaki SRD5A2 geni ekspresyonlarının karşılaştırılması;

Kontrol Grubu: SRD5A2 / β -AKTİN		
	KAN	DOKU
1	0.515	2.55
2	0.222	1.45
3	0.856	2.185
4	1.194	0.58
5	2.095	0.180
6	251	0.809
7	1.156	1.327
8	0.267	0.568
Median (Min-Max)	1 (0.22-251)	1.068 (0.18-2.55)
P=0.959		

Hasta ve kontrol dokularında ve kanlarında SRD5A2 geni ekspresyonları arasındaki ortancaların karşılaştırılmasında Mann-Whitney U Testi kullanıldı ve anlamlı bir fark bulunamadı.

Hasta Grubu: SRD5A2 / β -AKTİN- KAN		
	Hasta	Kontrol
Median (Min-Max)	0.19 (0-1.32)	1.06 (0.22-251)
P=0.08		

Hasta Grubu: SRD5A2 / β -AKTİN- DOKU		
	Hasta	Kontrol
Median (Min-Max)	0.71 (0.27-1.53)	1.06 (0.18-2.55)
P=0.328		

Tablo 7. Hastaların kan ve dokudaki CYP19A geni ekspresyonlarının karşılaştırılması;

Hasta Grubu: CYP19/ β -AKTİN		
	KAN	DOKU
1	0.024	0.975
2	0.0058	0.48
3	3.18	0.215
4	0.205	0.293
5	0.161	1.304
6	0.16	0.234
7	1.117	0.482
8	1.21	0.208
Median (Min-Max)	0.183 (0.01-3.18)	0.3865 (0.21-1.3)
P=0.328		

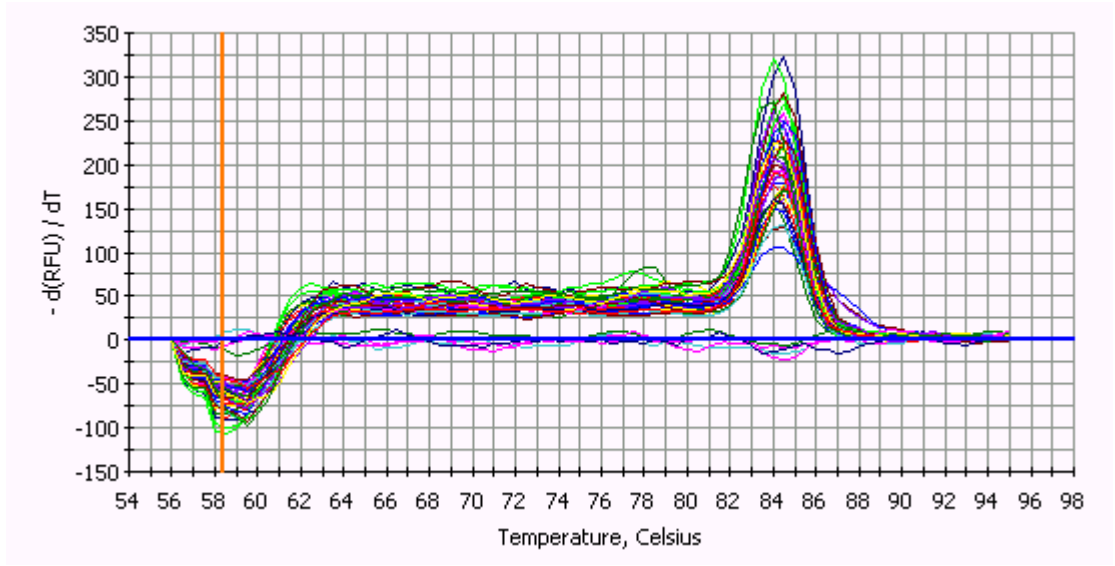
Tablo 8. Kontrol grubunun kan ve dokudaki CYP19A geni ekspresyonlarının karşılaştırılması;

Kontrol Grubu: CYP19A/ β -AKTİN		
	KAN	DOKU
1	1.863	7.86
2	17.47	19.4
3	0.772	3.3
4	0.9	2.253
5	1.602	8.405
6	136	0.825
7	1.025	1.323
8	1	0.506
Median (Min-Max)	1.3 (0.77-136)	2.77 (0.51-19.4)
P=0.721		

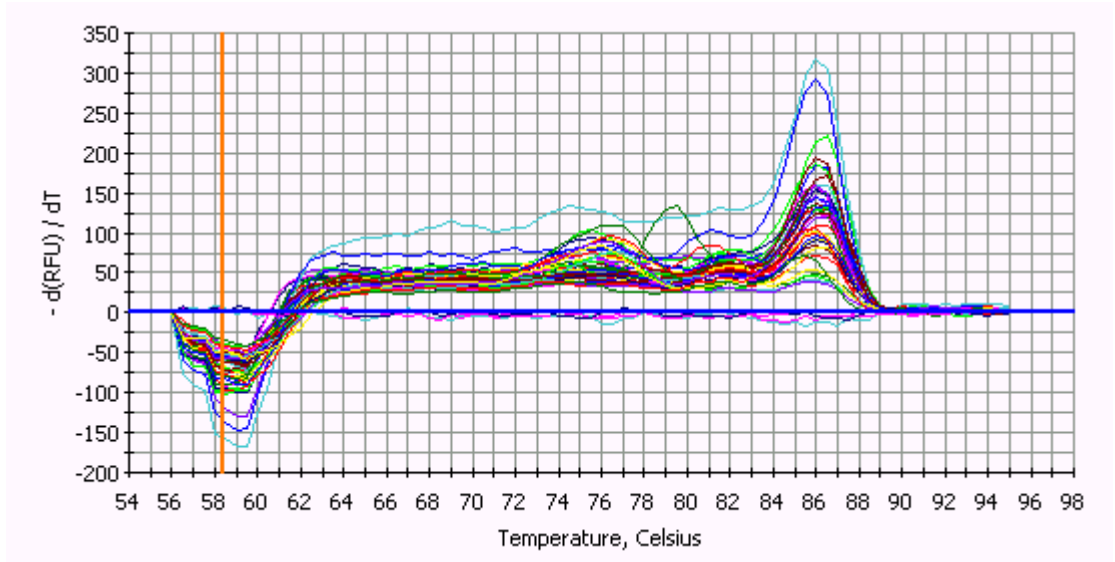
Hasta Grubu: CYP19A / β -AKTİN-KAN			Hasta Grubu: CYP19A / β -AKTİN-DOKU		
	Hasta	Kontrol		Hasta	Kontrol
Median (Min-Max)	0.183 (0.01-3.18)	1.3 (0.77-136)	Median (Min-Max)	0.38 (0.21-1.3)	40 (0.51-19.4)
P=0.06			P=0.02		

Hasta ve kontrol dokularında ve kanlarında CYP19A geni ekspresyonları arasındaki ortancaların karşılaştırılmasında Mann-Whitney U Testi kullanıldı ve kanlar arasında anlamlı bir fark bulunamazken dokular arasında anlamlı bir fark tesbit edildi.

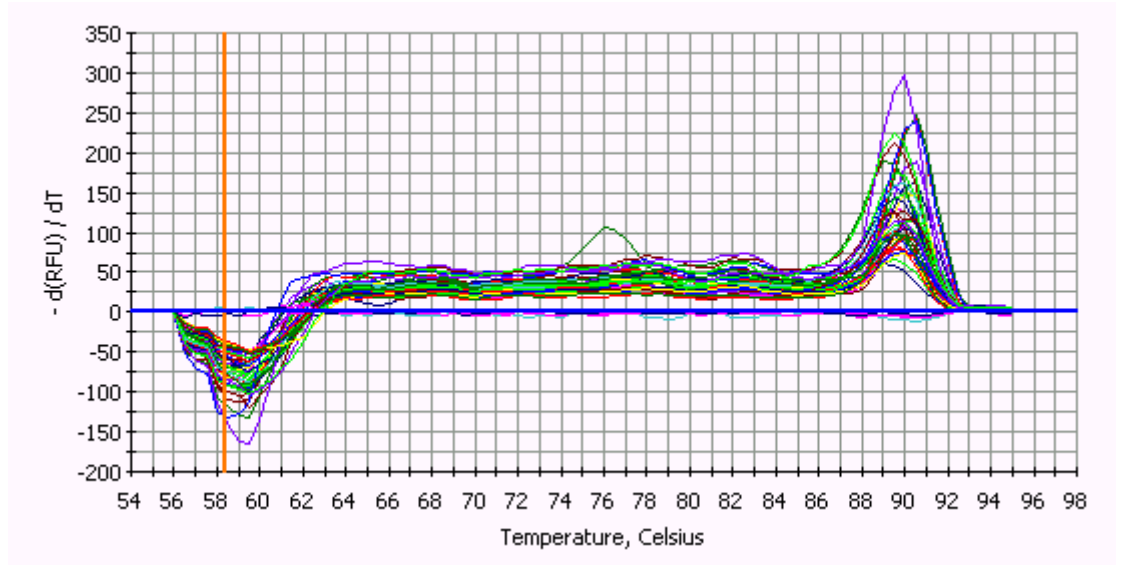
Şekil 5. CYP19 geninin Real-Time Melting-Curve analizi sonuçlarının görünümü



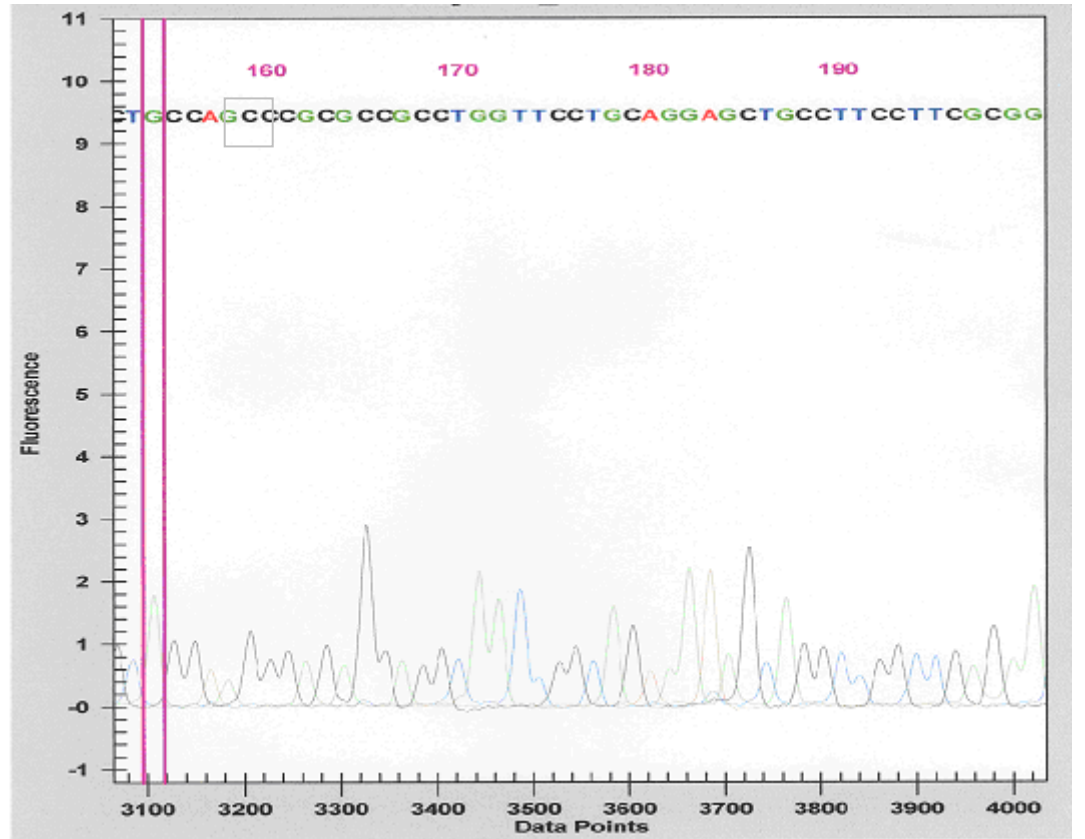
Şekil 6. SRD5A2 geninin Real-Time analizi sonuçlarının görünümü



Şekil 7. Beta aktin geninin Real-Time Melting-Curve analizi sonuçlarının görünümü

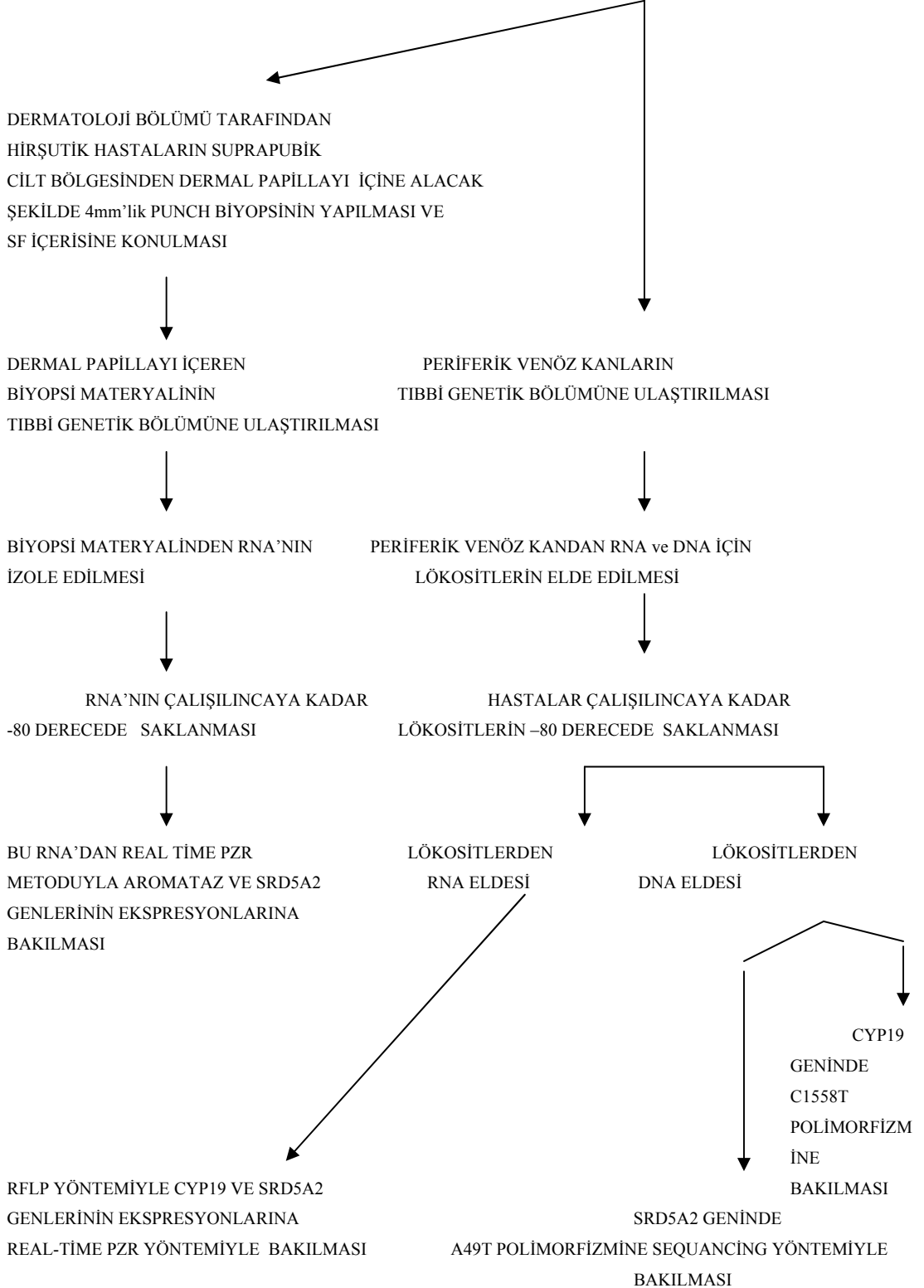


Şekil 8: SRD5A2 geni A49T polimorfizminin Dizi analizi ile tesbit edilmesi



KLİNİK OLARAK İDİYOPATİK HİRŞUTİZM TANISI KONULAN HASTA

ENDOKRİN BÖLÜMÜNDE HASTALARIN HERBİRİNDEN 4 TANE CBC TÜPÜNE (3 cc'lik, EDTA'lı) TOPLAM 12cc PERİFERİK VENÖZ KANIN ALDIRILMASI



5.TARTIŞMA

Hirşutizm tüm kadınların %5-10'unu etkilemektedir (23-25). İdiyopatik hirşutizm tanısı ise hirşutizmi bulunan kadınların %5-15'ine konulmaktadır (26). Hirşutizmin varlığı hastalar için bir stres faktörü olmakta ve onların psikososyal gelişiminde oldukça önemli bir negatif etki yapmaktadır (27,28).

İdiyopatik hirşutizmin patogenezinde az sayıda bilgi mevcuttur. En iyi bilinen hipotez 5α -RA enziminin ciltteki artmış aktivitesidir. Bu hipotez Serafini ve Lobo'nun (11) idiyopatik hirşutizimli 10 kadında yaptığı bir çalışmada genital ciltte biyokimyasal olarak ölçülen alfa redüktaz aktivitesinin kontrollere göre fazla olduğunun tesbit etmesiyle öne sürülmüştür. Hipoteze göre ciltteki bu artmış 5α -RA enzim aktivitesinin mekanizması androjenlerden bağımsız ve belki genetik belirleyiciler ile ilgili idi. Diğer taraftan cilt 5α -RA enzim aktivitesi yalnızca androjenler tarafından değil ayrıca büyük oranda ciltte mevcut olan ve görev yapan insülin benzeri büyüme faktörü I (IGF-I), insülin ve transforming growth factor- β (TGF- β) gibi bazı hormonlar ve mediatörler tarafından da düzenlenmektedir. Bu nedenle lokal olarak 5α -RA enzim aktivitesini düzenleyen mekanizmalardaki değişikliklerin idiyopatik hirşutizme neden olabileceği düşünülmüştür. Ama polikistik over sendromlu vakalarda yapılan çalışmalar sonucu 5α -RA aktivitesinin hirşutizmle beraber arttığı bulunmuş ve bu yüzden idiyopatik hirşutizmdeki artmış periferik 5α -RA aktivitesinin idiyopatik hirşutizmin nedeni olmaksızın basit olarak hirşutizmin gelişmesini yansıttığının muhtemel olabileceği de düşünülmüştür (11).

Deri 5 α -RA aktivitelerinde artış, muhtemelen her iki izoenzim türlerinde ve muhtemelen androjen alıcı fonksiyonlarında değişiklik yaratması beklenmektedir. Bununla birlikte, bu hipotezlerin kabul edilmesi, çoklu vücut bölgelerinden ve moleküler incelemelerinden elde edilen deri biyopsi örnekleri kullanılarak doğru teşhis edilmiş hastalar ile mümkün olacaktır. İkinci en yaygın SRD5A2 germ-line polimorfizm, 49. kodondaki alaninden valine değişime neden olan tek missens mutasyondan kaynaklanmaktadır. Bu polimorfizm invitro enzim aktivitesi normalden 5 kat daha fazla olan varyant proteinin üretimi ile sonuçlanmaktadır (15). Bilinen SRD5A2 polimorfizmlerinin 5 α -RA enziminin aktivitesinde değişikliğe neden olan etkisi muhtemelen mRNA stabilitesindeki değişikliktir (196). Bu çalışmada A49T polimorfizmi idiyopatik hirsütizimli hastalarda çalışıldı ve gerçekten aktivitesininin artmasının artmış ekspresyonla ilişkili olup olmadığı tesbit edildi. A49T polimorfizmi şimdiye kadar çalışılmış popülasyonlarda nadir olarak bulunmuş ve varyant olan T allelinin beyaz ırkta (%5-6;196) Afriko Amerikanlar (%1;15) veya Latin Amerikalılara (%2;198) göre prevalansının daha fazla olduğu tesbit edilmiştir. Asya popülasyonunda ise henüz böyle bir bağlantı bildirilmemiştir (199).

Asada ve ark. (2001;198) yaptığı çalışmada AR ve SDR5A1 mRNA'sının kıl folikülünün tüm bölgelerinde ama SRD5A2 mRNA'sının sadece dermal papilla ve bağ dokuyu içeren mezankimal kısım ve epitelyal kısımda eksprese olduğunu ve bu ekspresyon intensitelerinin saçlı ve saçsız kafa derisinde farklılık göstermediğini bulmuşlardır. Bununla beraber Sawaya ve ark (1997;61) yaptığı başka bir çalışmada AR, SDR5A1 ve SRD5A2 genlerinin ekspresyonları saçsız kafa derisinde saçlı bölgelere nazaran daha fazla bulunmuştur.

Daha önceki bazı çalışmalar SRD5A2 geninin ürününün sakal kıllarının büyümesi için gerekli olduğunu ama pubik ve aksiller kılların büyümesi için gerekli olmadığını bildirmişlerdir (61, 200-203).

Bu çalışmada literatürde bildirilenden farklı olarak SRD5A2 geninin idiyopatik hirsütizimli hastalarda androjene duyarlı dokudaki lokal ekspresyonun değişmediği tesbit edilmiştir.

Bir diğer hipotez olan değişmiş androjen reseptör aktivitesinin hirsütizm gelişmesine yardımcı olabileceğidir (100). Bazı çalışmalar göstermiştir ki androjen reseptör geninin 1. ekzonundaki CAG trinükleotidlerinin sayısı ile hirsütizm gelişmesi arasında ters bir korelasyon vardır (104). Düşük sayıda CAG trinükleotid sayısına sahip androjen reseptör geni androjenlere daha yüksek afinite ile bağlanan

reseptöre yol açmakta ve bazı kişilerde dolaşımdaki normal androjen seviyesine rağmen hirsütizm gelişmesine yardımcı olabilmektedir (104).

Bazı hirsütik hastalarda değişmiş periferik androjen metabolizması tesbit edilmiştir. İdiyopatik hirsütizmi bazı hastalarda artmış cilt 17- β -hidroksisteroid dehidrojenaz aktivitesi ve dolayısıyla testosteronun, androstenediondan artmış formasyonu tesbit edilmiştir (116). Diğer çalışmalar sadece düşük miktarda androjen üretim artışı tesbit etmişlerdir (204,205). Ancak bu artışların hirsütizme neden olamayacağı düşünülmüştür.

Bazı çalışmacılar kıl büyümesinin, androjenlerden bağımsız olduğu ama lokal hormon ve mediatörlerle bağlantılı olduğunu savunmuşlardır (206).

Östrojen biyosentezi ve metabolizmasında rol alan genlerin polimorfizmlerinin, etyopatogenezinde direkt veya indirekt, fayda veya zarar olarak östrojenin rol aldığı hastalık durumlarında (fayda-postmenapozal fraktür riskinde kemik mineral dansitesini etkilediği için veya zarar-östrojen reseptörü pozitif meme kanseri) önemli olduğu daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir. Aromataz knockout (ArKO) fareler artmış kemik rezorpsiyonu nedeniyle kemik kaybı yaşamışlar (207) ve insanda inaktive edici mutasyonların her iki cinsten de kemik mineral dansitesinde kayba neden olduğu bulunmuştur (208,209). Polimorfizmler CYP19 da gen ekspresyon değişikliği ve dolayısıyla sex steroidlerinin etkisini etkileyebilirler. Bu gende de bir çok tek nükleotid polimorfizmi (SNP) bulunmaktadır (210-212). Özellikle meme kanseri çalışmalarında, bizim çalışmamıza dahil ettiğimiz silent (sessiz) tek nükleotid polimorfizmi olan onuncu ekzondaki C1558T mutasyonunun mRNA'nın 3' transkripsiyon edilmeyen bölgesinde olduğu için fonksiyonel olarak etkili olduğu yani yüksek östrojen profili ile ilişkili olduğu önerilmiştir çünkü bu tek nükleotid polimorfizmi T alleli için tümör hücreleri içindeki aromataz mRNA düzeyi ile ilişkili bulunmuştur (213).

Bu çalışmada CYP19 geninin idiyopatik hirsütizmi hastalarda androjene duyarlı dokudaki lokal ekspresyonun düştüğü tesbit edilmiştir. Bu sonuç ile ilgili literatürde benzer bir bilgi bulunmamaktadır. Ayrıca bakılan C1558T polimorfizminin azalan aromataz ekspresyonunu ile ilişkili bir genotipinin varlığı tesbit edilmemiştir. Lokal olarak azalan aromataz aktivitesi ve dolayısıyla lokal olarak androjen lehine değişmiş androjen metabolizması hirsütizmin etyopatogenezinde oldukça önemli olabilir. Ancak aromataz mRNA düzeyi ile

ilişkili olduğu bilinen C1558T polimorfizminin aromataz ekspresyonu ile ilişkili çıkmamasının düşük denek sayısı ile ilişkili olabileceği düşünölmüştür.

İdiyopatik hırşutizm de insölin rezistansı ve hiperinsölinizm yeni tanımlanmış önemli bir özelliktir. İnvitro olarak insölininin kıl foliköl büyümesini stimüle ettiği bulunmuştur. Tsilchorozidou ve ark. yaptığı bir çalışmada PCOS'lu vakalarda insölinin dolaşımdaki androjen konsantrasyonunu arttırmadan 5 alfa redüksiyonu arttırdığı bulunmuştur (51). Ancak hala idiyopatik hırşutizimli hastalara insölinin etkisi açık değildir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Hirşutizmin varlığı hastalar için bir stres faktörü olmakta ve onların psikososyal gelişiminde oldukça önemli bir negatif etki yapmaktadır. Bu nedenle mutlaka tedavi edilmesi gereken bir hastalıktır.

İdiyopatik hirşutizmin patogeneğinde az sayıda bilgi mevcuttur. Bu nedenle yapılan tedaviler sadece semptomatik olabilmektedir.

İdiyopatik hirşutizmin etiopatogenezi için günümüzde en çok kabul gören hipotezler 5 alfa redüktaz enziminin ciltteki artmış aktivitesi ve lokal androjen meabolizmasındaki muhtemel değişikliktir.

Bu çalışmada hem 5 alfa redüktaz enziminin hirşutizmde rol aldığı gösterilmiş Tip 2 izoenzimini kodlayan SRD5A2 genin hemde aromataz enzimini kodlayan CYP19 geninin idiyopatik hirşutizimli hastalarda ve kontrol grubunda lokal olarak ekspresyonu Real-Time PZR metodu ile tesbit edilmiştir. Sonuçta SRD5A2 geninin ekspresyonu kontrol grubu ile farklılık göstermez iken CYP19 geninin ekspresyonunun kontrollere göre düşük olduğu tesbit edilmiştir.

Ayrıca aynı grup hastada hedef genlerdeki mutasyon nedeniyle ürünün aktivitesini değiştirdiği tesbit edilen polimorfimlere bakılmıştır. Bu polimorfizmler SRD5A2 geni için A49T ve CYP19 için C1558T'dir. Bu polimorfizmlerin özellikle kontrol grubuna göre düşük ekspresyonu tesbit edilen CYP19 geni için C1558T polimorfizminin genotip dağılımının kontrollere göre istatistiksel olarak farklı olmadığı tesbit edilmiştir.

Literatüre ilk kez kazandırılan idiyopatik hırşutizmlı hastalarda aromataz ekspresyonunun kontrollere göre düşük olması bilgisinin daha fazla hasta üzerinde tekrarlanarak yapılması gerekmektedir. Ayrıca bu çalışmada bakılan polimorfizmde dahil olmak üzere aromataz genindeki enzim aktivitesini etkileyen diğer polimorfizmlerin de daha fazla sayıda hasta grubunda araştırılması idiyopatik hırşutizm'e yatkınlık veya koruyuculuğun tesbitinde önemli bir yer alacaktır.

KAYNAKLAR

1. İliçin G, Ünal S, Biberoğlu K, Akalın S, Süleymanlar G. Temel İç Hastalıkları 1996, Cilt 2 sayfa 1743-49.
2. Clarke S. Hirsutism in women. Clinician Reviews 2000;10 (2):61-72.
3. Surrey ES, DeZiegler D, Gambone JC, Judd HL. Preoperative localization of androgen-secreting tumors: clinical, endocrinologic, and radiologic evaluation of ten patients. Am J Obstet Gynecol.1988;158:1313.
4. Pabuçcu R. Polikistik Ovaryan Sendrom, Hiperandrojenizm ve Hirsütizm 2001. sayfa 109-148.
5. Hay JB, Hodgins MB. Metabolism of androgens in vitro by human facial and axillary skin. Journal of Endocrinology 1973;59:475-486.
6. Takayasu S, Wakimoto H, Itami S, Sano S. Activity of testosterone 5 α -reductase in various tissues of human skin. Journal of Investigative Dermatology 1980;74:187-191.
7. Andersson S, Bishop RW, Russell DW. Expression, cloning and regulation of steroid 5 α -reductase, an enzyme essential for male sexual differentiation. Journal of Biological Chemistry 1989;264:16249-16255.
8. Andersson S, Berman DM, Jenkins EP, Russell DW. Deletion of steroid 5 α -reductase 2 gene in male pseudohermaphroditism.Nature 1991;354:159-161.
9. Mowszowicz I, Melanitou E, Doukani A, Wright F, Kuttann F, Mauvais-Jarvis P. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 1983;56:1209-1213.
10. Lobo RA, Goebelsmann U, Horton R. Evidence for the importance of peripheral tissue events in the development of hirsutism in polycystic ovary syndrome. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 1983;57:393-397.
11. Serafini P, Lobo RA. Increased 5 α -reductase activity in idiopathic hirsutism. Fertil Steril 1985;43:74-78.
12. Mestayer CH, Berthaut I, Portois MC, Wright F, Kuttann F, Mowszowicz I, et al. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 1996;81:1989-93.

13. Oliveira IO, Lhullier C, Brum IS, Spritzer PM. The 5 α -reductase type 1, but not type 2, gene is expressed in anagen hairs plucked from the vertex area of the scalp of hirsute women and normal individuals. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 2003;36:1447-1454.
14. Thigpen AE, Davis DL, Milatovich A, Mendonca BB, Imperato-McGinley J, Griffin JE, et al. Molecular Genetics of Steroid 5 α -Reductase 2 Deficiency. *J. Clin. Invest.* 1992;90:799-809.
15. Makridakis NM, Ross RK, Pike MC, Crocitto LE, Kolonel LN, Pearce CL, et al. Association of missense substitution in SRD5A2 gene with prostate cancer in African-American and Hispanic men in Los Angeles, USA. *Lancet* 1999;354:975–978.
16. Sebastian S, Bulun SE. Genetics of Endocrin Disease. A Highly Complex Organization of the Regulatory Region of the Human CYP19 (Aromatase) Gene Revealed by the Human Genome Project. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 86(10):4600–4602.
17. Bulun SE, Sebastian S, Takayama K, Suzuki T, Sasano H, Shozu M. The human CYP19 (aromatase P450) gene: update on physiologic roles and genomic organization of promoters. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 2003;86:219–224.
18. Means GD, Mahendroos MS, Carole C, Mendelson R, Simpson ER. Structural Analysis of the Gene Encoding Human Aromatase Cytochrome P-450, the Enzyme Responsible for Estrogen Biosynthesis. *The Journal of Biological Chemistry* 1989;264(32):19385-19391.
19. Shozu M, Zhao Y, Bulun SE, Simpson ER. Multiple Splicing Events Involved in Regulation of Human Aromatase Expression by a Novel Promoter, I.6 *Endocrinology* 1998;139:1610–1617.
20. Melvin M, Grumbach JA, Richard JA. Estrogen: Consequences and Implications of Human Mutations in Synthesis and Action. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:4677–4694.
21. Evan R, Simpson RD, Susan RD. Minireview: Aromatase and the Regulation of Estrogen Biosynthesis—Some New Perspectives. *Endocrinology* 2001;142:4589–4594.
22. Somner J, McLellan S, Cheung J, Mak YT, Frost ML, Knapp KM, et al. Polymorphisms in the P450 c17 (17-Hydroxylase /17,20-Lyase) and P450

- c19 (Aromatase) Genes: Association with Serum Sex Steroid Concentrations and Bone Mineral Density in Postmenopausal Women *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:344–351.
23. Ferriman D, Gallwey JD. Clinical assessment of body hair growth in women. *J Clin Endocrinol Metab* 1961;21:1440–1447.
 24. McKnight E. The prevalence of “hirsutism” in young women. *Lancet* 1964;1:410–413.
 25. Hartz AJ, Barboriak PN, Wong A, Katayama KP, Rimm AA. The association of obesity with infertility and related menstrual abnormalities in women. *Int J Obesity* 1979;3:57–73.
 26. Azziz R, Carmina E, Sawaya ME. Idiopathic Hirsutism. *Endocrine Reviews* 2000;21:347–362.
 27. Barth JH, Catalan J, Cherry CA, Day A. Psychological morbidity in women referred for treatment of hirsutism. *J Psychosom Res* 1993;37:615–619.
 28. Sonino N, Fava GA, Mani E, Belluardo P, Boscaro M. Quality of life of hirsute women. *Postgrad Med* 1993;69:186–189.
 29. Ebling FJ. *Hair* *J Invest Dermatol* 1976; 67:98-105.
 30. Uno H. Biology of hair growth. *Semin Reprod Endocrinol* 1986;4:131–141.
 31. Dawber RP. The embryology and development of human scalp hair. *Clin Dermatol* 1988;6:1–6.
 32. Muller M, Jasmin JR, Monteil RA, Loubiere R. Embryology of the hair follicle. *Early Hum Dev* 1991;26:159–166.
 33. Whiting DA, Howsden EL. *Color Atlas of Differential Diagnosis of Hair Loss*. Canfield Publishing, Cedar Grove (NJ) 1996.
 34. Bernstein RM, RassmanWR. The aesthetics of follicular transplantation. *Dermatol Surg* 1997;23:785–799.
 35. Bernstein RM, Rassman WR. Follicular transplantation: patient evaluation and surgical planning. *Dermatol Surg* 1997;23:771–784.
 36. Headington JT. Transverse microscopic anatomy of the human scalp. A basis for a morphometric approach to disorders of the hair follicle. *Arch Dermatol* 1984;120:449–456.

37. Moore GP, Du Cros DL, Isaacs K, Pisansarakit P, Wynn PC. Hair growth induction: roles of growth factors. *Ann NY Acad Sci* 1991;642:308–325.
38. Peus D, Pittelkow MR. Growth factors in hair organ development and the hair growth cycle. *Dermatol Clin* 1996;14:559–572.
39. Harmon CS, Nevins TD. IL-1 a inhibits human hair follicle growth and hair fiber production in whole-organ cultures. *Lymphokine Cytokine Res* 1993;12:197–203.
40. Philpott MP, Sanders DA, Kealey T. Effects of insulin and insulin-like growth factors on cultured human hair follicles: IGF-I at physiologic concentrations is an important regulator of hair follicle growth in vitro. *J Invest Dermatol* 1994;102:857–861.
41. Danilenko DM, Ring BD, Pierce GF. Growth factors and cytokines in hair follicle development and cycling: recent insights from animal models and the potentials for clinical therapy. *Mol Med Today* 1996;2:460–467.
42. Akiyama M, Smith LT, Holbrook KA. Growth factor and growth factor receptor localization in the hair follicle bulge and associated tissue in human fetus. *J Invest Dermatol* 1996.106:391–396.
43. Jankovic SM, Jankovic SV. The control of hair growth. *Dermatol Online J* 1998;4:2.
44. Goodman LV, Ledbetter SR. Secretion of stromelysin by cultured dermal papilla cells: differential regulation by growth factors and functional role in mitogen-induced cell proliferation. *J Cell Physiol* 1992;151:41–49.
45. Freinkel RK, Freinkel N. Hair growth and alopecia in hypothyroidism. *Arch Dermatol* 1972;106:349–352.
46. Comaish JS. The thyroid and hair growth. *Semin Dermatol* 1985;4:4–8.
47. Blok GJ, de Boer H, Gooren LJ, van der Veen EA. Growth hormone substitution in adult growth hormone-deficient men augments androgen effects on the skin. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1997;47:29–36.
48. Ebling FJ, Johnson E. The action of hormones on spontaneous hair growth cycles in the rat. *J Endocrinol* 1964.29:193–20128.
49. Ahsan MK, Urano Y, Kato S, Oura H, Arase S. Immunohistochemical localization of thyroid hormone nuclear receptors in human hair follicles and in vitro effect of L-triiodothyronine on cultured cells of hair follicles and skin. *J Med Invest* 1998;44:179–184.

50. Lobie PE, Breipohl W, Lincoln DT, Garcia-Aragon J, Waters MJ. Localization of the growth hormone receptor/binding protein in skin. *J Endocrinol* 1990;126:467–471.
51. Tsilchorozidou T, Honour JW, Conway GS. Altered Cortisol Metabolism in Polycystic Ovary Syndrome: Insulin Enhances 5 α -Reduction But Not the Elevated Adrenal Steroid Production Rates. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 88(12):5907–5913.
52. Horton R, Pasupuletti V, Antonipillai I. Androgen induction of steroid 5 α -reductase may be mediated via insulin-like growth factor-I. *Endocrinology* 1993;133:447–451.
53. Reynolds EL. The appearance of adult patterns of body hair in man. *Ann NY Acad Sci* 1951;53:576–584.
54. Chieffi M. Effect of testosterone administration on the beard growth of elderly males. *J Gerontol* 1949;4:200–204.
55. Futterweit W, Weiss RA, Fagerstrom RM. Endocrine evaluation of forty female-to-male transsexuals: increased frequency of polycystic ovarian disease in female transsexualism. *Arch Sex Behav* 1986;15:69–78.
56. Ebling FJG. Hair follicles and associated glands as androgen targets. *Clin Endocrinol Metab* 1986;15:319–339.
57. Randall VA. Androgens and human hair growth. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1994;40:439–457.
58. Griffin JE, Wilson JD. The syndromes of androgen resistance. *N Engl J Med* 1980;302:198–209.
59. Hamilton JB. Patterned loss of hair in man: types and incidence. *Ann NY Acad Sci* 1951;53:708–728.
60. Ludwig E. Classification of the types of androgenetic alopecia (common baldness) occurring in the female sex. *Br J Dermatol* 1977;97:247–254.
61. Sawaya ME, Price VH. Different levels of 5 α -reductase type I and II, aromatase, and androgen receptor in hair follicles of women and men with androgenetic alopecia. *J Invest Dermatol* 1997;109:296–300.
62. OhHS, Smart RC. An estrogen receptor pathway regulates the telogen anagen hair follicle transition and influences epidermal cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:12525–12530.
63. Stenn K, Paus R, Filippi M. *J Invest Dermatol* 1998;110:95.

64. Hooker CW, Pfeiffer CA. Effects of sex hormones upon body growth, skin, hair and sebaceous glands in rat. *Endocrinology* 1943;32:69–76.
65. Emmens CW. The endocrine system and hair growth in the rat. *J Endocrinol (Oxf)* 1942;3:64–78.
66. Cassidenti DL, Paulson RJ, Serafini P, Stanczyk FZ, Lobo RA. Effects of sex steroids on skin 5 α -reductase activity in vitro. *Obstet Gynecol* 1991;78:103–107.
67. Mahoudeau JA, Bardin CW, Lipsett MB. The metabolic clearance rate and origin of plasma dihydrotestosterone in man and its conversion to the 5 α -androstenediols. *J Clin Invest* 1971;50:1338–1344.
68. Ito T, Horton R. The source of plasma dihydrotestosterone in man. *J Clin Invest* 1971;50:1621–1627.
69. Imperato-McGinley J, Guerrero L, Gautier T, Peterson RE. Steroid 5 α -reductase deficiency in man: an inherited form of male pseudohermaphroditism. *Science* 1974;186:1213–1215.
70. Kuttann F, Mowszowicz I, Wright F et al. Male pseudohermaphroditism: a comparative study of one patient with 5 α -reductase deficiency and three patients with the complete form of testicular feminization. *J Clin Endocrinol Metab* 1979;49:861–865.
71. Hamada K, Thornton MJ, Laing I, Messenger AG, Randall VA. The metabolism of testosterone by dermal papilla cells cultured from human pubic and axillary hair follicles concurs with hair growth in 5 α -reductase deficiency. *J Invest Dermatol* 1996;106:1017–1022.
72. Farthing MJG, Mattei AM, Edwards CRW, Dawson AM. Relationship between plasma testosterone and dihydrotestosterone concentrations and male facial hair growth. *Br J Dermatol* 1982;107:559–564.
73. Kuttann F, Mauvais-Jarvis P. Testosterone 5 α -reduction in the skin of normal subjects and of patients with abnormal sex development. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1975;79:164–176.
74. Kuttann F, Mowszowicz I, Schaison G, Mauvais-Jarvis P. Androgen production and skin metabolism in hirsutism. *J Endocrinol* 1977;75:83–91.
75. Wahe M, Antonipillai I, Horton R. Effects of transforming growth factor band epidermal growth factor on steroid 5 α -reductase activity in genital skin fibroblasts. *Mol Cell Endocrinol* 1993;98:55–59.

76. Antonipillai I, Wahe M, Yamamoto J, Horton R. Activin and inhibin have opposite effects on steroid 5 α -reductase activity in genital skin fibroblasts. *Mol Cell Endocrinol* 1995;107:99–104.
77. Thigpen AE, Silver RI, Guilleyard JM, Casey ML, McConnell JD, Russell DW. Tissue distribution and ontogeny of steroid 5-reductase isoenzyme expression. *J Clin Invest* 1993;92:903–910.
78. Bayne EK, Flanagan J, Einstein M, Ayala J, Chang B, Azzolina B, et al. Immunohistochemical localization of types 1 and 2 5 α -reductase in human scalp. *Br J Dermatol* 1999;141:481–491.
79. Russell DW, Wiley EL, Whiting DA. Expression of steroid 5 α -reductase I and II in scalp skin in normal controls and androgenetic alopecia. In: Van Neste DJ, Randall VA (eds) *Hair Research for the Next Millenium*. Elsevier Publishers, The Netherlands 1996; pp 339–340.
80. Carmina E. Role of 5-reductase isoenzymes in the pathogenesis of acne and hirsutism. In: Dastidar KG, Dastidar SG, Chowdurry NNR (eds) *Proceedings of the International Conference on Advances in Reproductive Medicine—ICARM '97, Calcutta, India, 1997*; pp 154–162.
81. Redmond GP. Clinical evaluation of the woman with an androgenic disorder. In: Redmond GP (ed) *Androgenic Disorders*. Raven Press, New York, 1995; pp 1–20.
82. Azziz R, Waggoner WT, Ochoa T, Knochenhauer ES, Boots LR. Idiopathic hirsutism: an uncommon cause of hirsutism in Alabama. *Fertil Steril* 1998;70:274–278.
83. Mehta A, Matwijiw I, Taylor PJ, Salamon EA, Kredentser JV, Faiman C. Should androgen levels be measured in hirsute women with normal menstrual cycles? *Int J Fertil* 1992;37:354–357.
84. Azziz R, Dewailly D, Owerbach D. Non-classic adrenal hyperplasia: current concepts. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;78:810–815.
85. Dodin S, Faure N, Cedrin I, Mechain C, Turcot-Lemay L, Guy J, et al. Clinical efficacy and safety of low-dose flutamide alone and combined with an oral contraceptive for the treatment of idiopathic hirsutism. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1995;43:575–582.
86. Carmina E. Prevalence of idiopathic hirsutism. *Eur J Endocrinol* 1998;139:421–423.

87. Mowszowicz I, Melanitou E, Doukani A, Wright F, Kuttenn F, Mauvais-Jarvis P. Androgen binding capacity and 5 α -reductase activity in pubic skin fibroblasts from hirsute patients. *J Clin Endocrinol Metab* 1983;56:1209–1213.
88. Couzinet B, Pholsena M, Young J, Schaison G. The impact of a pure anti-androgen (flutamide) on LH, FSH, androgens and clinical status in idiopathic hirsutism. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1993;39:157–162.
89. Tolino A, Petrone A, Sarnacchiaro F, Cirillo D, Ronsini S, Lombardi G, Nappi C. Finasteride in the treatment of hirsutism: new therapeutic perspectives. *Fertil Steril* 1996;66:61–65.
90. Jahanfar S, Eden JA. Idiopathic hirsutism or polycystic ovary syndrome? *Aust NZ J Obstet Gynaecol* 1993;33:414–416.
91. Bernasconi D, Del Monte P, Meozzi M, Randazzo M, Marugo A, Badaracco B, et al. The impact of obesity on hormonal parameters in hirsute and nonhirsute women. *Metab Clin Exp* 1996;45:72–75.
92. Jenkins JS, Ash S. The metabolism of testosterone by human skin in disorders of hair growth. *J Endocrinol (Oxf)* 1973;59:345–351.
93. Mauvais-Jarvis P. Regulation of androgen receptor and 5-reductase in the skin of normal and hirsute women. *Clin Endocrinol Metab* 1986;15:307–317.
94. Peus D, Pittelkow MR. Growth factors in hair organ development and the hair growth cycle. *Dermatol Clin* 1996;14:559–572.
95. Thiboutot D, Harris G, Iles V, Cimis G, Gilliland K, Hagari S. Activity of the type I 5-reductase exhibits regional differences in isolated sebaceous glands and whole skin. *J Invest Dermatol* 1995;105:209–214.
96. Zoboulis CC, Xia L, Akamatsui H. Cultured human sebocytes: an in vitro model for functional and control studies on human sebaceous cells. In: *Sebaceous Glands, Acne and Related Disorders*, Berlin, Germany, 1997 (Abstract 2).
97. Imperato-McGinley J, Gautier T, Cai LQ, Yee B, Epstein J, Pochi P. The androgen control of sebum production. Studies of subjects with dihydrotestosterone deficiency and complete androgen insensitivity. *J Clin Endocrinol Metab* 1993;76:524–528.

98. Castello R, Tosi F, Perrone F, Negri C, Muggeo M, Moghetti P. Outcome of long-term treatment with the 5 α -reductase inhibitor finasteride in idiopathic hirsutism: clinical and hormonal effects during a 1-year course of therapy and 1-year follow-up. *Fertil Steril* 1996;66:734–740.
99. Erenus M, Yucelten D, Durmusoglu F, Gurbuz O. Comparison of finasteride vs. spironolactone in the treatment of idiopathic hirsutism. *Fertil Steril* 1997;68:1000–1003.
100. Sawaya ME, Shalita AR. Androgen receptor polymorphisms (CAG repeat lengths) in androgenetic alopecia, hirsutism and acne. *J Cutan Med Surg* 1998;3:9–15.
101. Hardy DO, Scher HI, Rogenreider T, Sabbatini P, Zhang ZF, Nanus DM, et al. Androgen receptor CAG, repeat lengths in prostate cancer: correlation with age of onset. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81:4400–4405.
102. Tilley WD, Marcelli M, McPhaul MJ. Recent studies on the androgen receptor: new insights into old questions. *Mol Cell Endocrinol* 1990;68:C7–C10.
103. Edwards A, Hammond HA, Jin L, Caskey CT, Chakraborty R. Genetic variations at five trimeric and tetrameric tandem repeat loci in four human population groups. *Genomics* 1992;12:241–253.
104. Legro RS, Shahbahrani B, Lobo RA, Kovacs BW. Size polymorphisms of the androgen receptor among female Hispanics and correlations with androgenic characteristics. *Obstet Gynecol* 1994;83:701–706.
105. Simpson ER, Mahendroo MS, Means GD, Kilgore MW, Hinshelwood MM, Graham-Lorence S, et al. Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. *Endocr Rev* 1994;15:342–355.
106. Chen SA, Besman MJ, Sparkes RS, Zollman S, Klisak I, Mohandas T, et al. Human aromatase: cDNA cloning, Southern blot analysis, and assignment of the gene to chromosome 15. *DNA* 1988;7:27–38.
107. Smith EP, Boyd J, Frank GR, Takahashi H, Cohen RM, Specker B, et al. Estrogen resistance caused by a mutation in the estrogen-receptor gene in a man. *N Engl J Med* 1994;331:1056–1061.

108. Morishima A, Grumbach MM, Simpson ER, Fisher C, Qin K. Aromatase deficiency in male and female siblings caused by a novel mutation and the physiological role of estrogens, *J Clin Endocrinol Metab* 1995;80:3689–3698.
109. Thigpen AE, Davis DL, Milatovich A, Mendonca BB, Imperato-McGinley J, Griffin JE, et al. Molecular Genetics of Steroid 5 α -Reductase 2 Deficiency. *J Clin Invest* 1992;90:799-809.
110. Makridakis NM, Ross RK, Pike MC, Crocitto LE, Kolonel LN, Pearce CL, et al. Association of missense substitution in SRD5A2 gene with prostate cancer in African-American and Hispanic men in Los Angeles, USA. *Lancet* 1999;354: 975–978.
111. Bardin WC, Lipsett MB. Testosterone and androstenedione blood production rates in normal women and women with idiopathic hirsutism or polycystic ovaries. *J Clin Invest* 1967;46:891–897.
112. Kirschner M, Zucker R, Jespersen D. Idiopathic hirsutism —an ovarian abnormality. *N Engl J Med* 1976;294:637–641.
113. Glickman SP, Rosenfield RL. Androgen metabolism by isolated hairs from women with idiopathic hirsutism is usually normal. *J Invest Dermatol* 1984;82:62–66.
114. Faredin I, Toth I. Metabolism and concentration of androgenic steroids in the abdominal skin of women with idiopathic hirsutism. *Acta Med Hung* 1984;41:19–34.
115. Dunaif A. Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome: mechanism and implications for pathogenesis. *Endocr Rev* 1997;18:774–800.
116. Paoletti AM, Cagnacci A, Orru M, Ajossa S, Guerriero S, Melis GB. Treatment with flutamide improves hyperinsulinemia in women with idiopathic hirsutism. *Fertil Steril* 1999;72:448–453.
117. Horton R, Hawks D, Lobo R. 3 α ,17 β -Androstenediol glucuronide in plasma. *J Clin Invest* 1982;69:1203–1206.
118. Rittmaster RS. Androgen conjugates: physiology and clinical significance. *Endocr Rev* 1993;14:121–132.
119. Zawadzki JK, Dunaif A. Diagnostic criteria for polycystic ovary syndrome: towards a rational approach. In: Dunaif A, Givens JR, Haseltine

- F, Merriam GR (eds) Polycystic Ovary Syndrome. Blackwell Scientific Publications, Boston, MA, 1990; pp 377–384.
120. Gompel A, Wright F, Kuttann F, Mauvais-Jarvis P. Contribution of plasma androstenedione to 5 α -androstanediol glucuronide in women with idiopathic hirsutism. *J Clin Endocrinol Metab* 1986;62:441–444.
 121. Rittmaster RS, Thompson DL. Effect of leuprolide and dexamethasone on hair growth and hormone levels in hirsute women: the relative importance of the ovary and the adrenal in the pathogenesis of hirsutism. *J Clin Endocrinol Metab* 1990;70:1096–1102.
 122. Paulson RJ, Serafini PC, Catalino JA, Lobo RA. Measurements of 3 α ,17 β -androstanediol glucuronide in serum and urine and the correlation with skin 5 α -reductase activity. *Fertil Steril* 1996; 46:222–226.
 123. Meikle AW, Odell WD. Effect of short- and long-term dexamethasone on 3 α -androstanediol glucuronide in hirsute women. *Fertil Steril* 1986;46:227–231.
 124. Carmina E, Geentzschein E, Stanczyk FZ, Lobo RA. Substrate dependency of C19 conjugates in hirsute hyperandrogenic women and the influence of adrenal androgen. *Hum Reprod* 1995;10:299–303.
 125. Pang S, Wang M, Jeffries S, Riddick L, Clark A, Estrada E. Normal and elevated 3 α -androstanediol glucuronide concentrations in women with various causes of hirsutism and its correlation with degree of hirsutism and androgen levels. *J Clin Endocrinol Metab* 1992;75:243–48.
 126. Gilad S, Chayen R, Tordaman K, Kisch E, Stern N. Assessment of 5 α -reductase activity in hirsute women: comparison of serum androstanediol glucuronide with urinary androsterone and aetiocholanolone excretion. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1994;40:459–464.
 127. Houry MY, Baracat EC, Pardini DP, Viera JG, Delima GR. Serum levels of androstanediol glucuronide, total testosterone, and free testosterone in hirsute women. *Fertil Steril* 1994;62:76–80.
 128. Carmina E, Lobo RA. Peripheral androgen blockade vs. glandular androgen suppression in the treatment of hirsutism. *Obstet Gynecol* 1991;18:845–849.
 129. Azziz R, Gay F. The treatment of hyperandrogenism with oral contraceptives. *Semin Reprod Endocrinol* 1989;7:246–254.

130. Rittmaster RS. Differential suppression of testosterone and estradiol in hirsute women with the superactive gonadotropinreleasing hormone agonist leuprolide. *J Clin Endocrinol Metab* 1988;67:651–655.
131. Azziz R, Ochoa TM, Bradley Jr EL, Potter HD, Boots LR. Leuprolide and estrogen vs. oral contraceptive pills for the treatment of hirsutism: a prospective randomized study. *J Clin Endocrinol Metab* 1995;80:3406–3411.
132. Kuttann F, Mauvais-Jarvis P Testosterone 5 α -reduction in the skin of normal subjects and of patients with abnormal sex development. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1975;79:164–176.
133. Serafini PC, Catalino J, Lobo RA. The effect of spironolactone on genital skin 5-reductase activity. *J Steroid Biochem* 1985;23:1911–1914.
134. Loriaux DL, Menard R, Taylor A, Pita JC, Santen R. Spironolactone and endocrine dysfunction. *Ann Intern Med* 1976;85:630–636.
135. Young RL, Goldzieher JW, Elkind-Hirsch K. The endocrine effects of spironolactone used as an antiandrogen. *Fertil Steril* 1987;48:223–228.
136. Serafini P, Lobo RA. The effects of spironolactone on adrenal steroidogenesis in hirsute women. *Fertil Steril* 1985;44:595–599.
137. Wilson J Androgens. In: Gilman AG, Rall TW, Nies AS, Taylor P (eds) *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, ed 9. McGraw Hill Publishers, New York, 1996; pp 1441–1457.
138. Marugo M, Bernasconi D, Meozzi M, Del Monte P, Zino V, Primarolo P, Badaracco B. The use of flutamide in the management of hirsutism. *J Endocrinol Invest* 1994;17:195–199.
139. Couzinet B, Pholsena M, Young J, Schaison G. The impact of a pure anti-androgen (flutamide) on LH, FSH, androgens and clinical status in idiopathic hirsutism. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1993;39:157–162.
140. Cusan L, Dupont A, Gomez JL, Tremblay RR, Labrie F. Comparison of flutamide and spiroolactone in the treatment of hirsutism:a randomized controlled trial. *Fertil Steril* 1994;61:281–287.
141. Dankoff JS. Near fatal liver dysfunction secondary to administration of flutamide for prostate cancer. *J Urol* 1991;148:1914.
142. Wysowski DK, Fourcroy JL. Flutamide hepatotoxicity. *J Urol* 1996;155:209–212.

143. Muderris II, Bayram F, Sahin Y, Kelestimur F, Tutus A, Ayata D. The efficacy of 250 mg/day flutamide in the treatment of patients with hirsutism. *Fertil Steril* 1996;66:220–222.
144. Kassim NM, McDonald SW, Reid O, Bennett NK, Gilmore DP, Payne AP. The effects of pre- and postnatal exposure to the nonsteroidal antiandrogen flutamide on testis descent and morphology in the Albino Swiss rat. *J Anat* 1997;190:577–588.
145. Spencer JR, Torrado T, Sanchez RS, Vaughan Jr ED, Imperato-McGinley J. Effects of flutamide and finasteride on rat testicular descent. *Endocrinology* 1991;129:741–748.
146. Neri RO. Antiandrogens. *Adv Sex Horm Res* 1976;2:233–262.
147. Lachnit-Fixson U. The development and evaluation of an ovulation inhibitor (DIAne) containing an antiandrogen. *Acta Obstet Gynecol Scand Suppl* 1979;88:33–42.
148. Belisle S, Love EJ. Clinical efficacy and safety of cyproterone acetate in severe hirsutism: results of a multicentered Canadian study. *Fertil Steril* 1986;46:1015–1020.
149. Barth JH, Cherry CA, Wojnarowska F, Dawber RP. Cyproterone acetate for severe hirsutism: results of a double-blind doseranging study. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1991;35:5–10.
150. O'Brien RC, Cooper ME, Murray RML, Seeman E, Thomas AK, Jerums G. Comparison of sequential cyproterone acetate/estrogen vs. spironolactone/oral contraceptive in the treatment of hirsutism. *J Clin Endocrinol Metab* 1991;72:1008–1013.
151. Venturoli S, Marescalchi O, Colombo FM, Macrelli S, Ravaioli B, Bagnoli A, et al. A prospective randomized trial comparing low dose flutamide, finasteride, ketoconazole, and cyproterone acetate-estrogen regimens in the treatment of hirsutism. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:1304–1310.
152. Lunde O, Djose land O. A comparative study of Aldactone® and Diane® in the treatment of hirsutism. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1987;28:161–165.
153. Rittmaster RS. Finasteride. *N Engl J Med* 1994;330:120–125.

154. Probst E, Krebs A. Ornithine decarboxylase activity in relation to DNA synthesis in mouse interfollicular epidermis and hair follicles. *Biochim Biophys Acta* 1975;407:147–157.
155. Hynd PI, Nancarrow MJ. Inhibition of polyamine synthesis alters hair follicle function and fiber composition. *J Invest Dermatol* 1996; 106:249–253.
156. Soler AP, Gilliard G, Megosh LC, O'Brien TG. Modulation of murine hair follicle function by alterations in ornithine decarboxylase activity. *J Invest Dermatol* 1996;106:1108–1113.
157. Peereboom-Wynia JDR. Effect of various methods of depilation on density of hair growth in women with idiopathic hirsutism. *Arch Dermatol Res* 1972;272:164–176.
158. Peereboom-Wynia JDR, Stolz E, van Joost T, Kleiman A. Comparative study of the effects of electrical epilation of beard hairs in women with hirsutism by diathermy and by the blend method. *Arch Dermatol Res* 1985;278:84–86.
159. Richards RN, Meharg GE. Electrolysis: observations from 13 years and 140,000 hours of experience. *J Am Acad Dermatol* 1995;33:662–666.
160. Wagner RF. Physical methods for the management of hirsutism. *Cutis* 1990;45:19–26.
161. Dierickx CC, Grossman MC, Farinelli WA, Andersen RR. Permanent hair removal by normal mode ruby laser. *Arch Dermatol* 1998;134:837–842.
162. Lin TYD, Manuskiatti W, Dierickx CC et al. Hair growth cycle affects hair follicle destruction by ruby laser pulses. *J Invest Dermatol* 1998;111:107–113.
163. Pittaway DE, Maxson WS, Wentz AC. Spironolactone in combination drug therapy for unresponsive hirsutism. *Fertil Steril* 1985;43:878–882.
164. Board JA, Rosenberg SM, Smeltzer JS. Spironolactone and estrogen-progestin therapy for hirsutism. *South Med J* 1987;80:483–486.
165. Kolinko VG, Littler CM, Cole A. Influence of the anagen:telogen ratio on Q-switched Nd:YAG laser hair removal efficacy. *Lasers Surg Med* 2000;26:33–40.

166. Heptinstall J., Rapley R. Spectrophotometric Analysis of Nucleic acids. In *The Nucleic Acid Protocols Handbook*. Rapley R. (Ed.), Totowa, New Jersey. Human Press Inc.,2000,pp.57-60.
167. Mullis K., Faloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G., Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA invitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbo Symposia on Quantitative Biology* 1986;51:263-273.
168. Mullis K., Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 1987;155:335-350.
169. Saiki RK, Bugavan TL, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Analysis of enzymatically amplified beta globin and HLA-DQ alpha DNA with allele-specific oligonucleotide probs. *Nature* 1986;13:163-166.
170. Saiki RK, Gelfand DL, Stoffel S et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermastable SNA polymerase.*Science* 1998; 29:487-491.
171. Akar N. Klinik moleküler patolojiye giriş, Antıp A.S., Ankara,1995;143-162.
172. Tofteng CL, Kindmark A, Brändström H, Abrahamsen B, Petersen S, Stiger F, et al. Polymorphisms in the CYP19 and AR Genes—Relation to Bone Mass and Longitudinal Bone Changes in Postmenopausal Women With or Without Hormone Replacement Therapy:The Danish Osteoporosis Prevention Study. *Calcif Tissue Int* 2004;74:25–34.
173. DeStefano JJ, Buiser RG, Mallaber LM, Myers TW, Bambara RA, Fay PJ. Polymerization and Rnase H activities of the reverse transcriptases from avian myeloblastosis, human immunodeficiency, and Moloney murine leukemia viruses are functionally uncoupled. *The Journal Biological Chemistry* 1991;12:7423-7431.
174. DeSteffano JJ, Mallaber LM, Fay PJ, Bambara RA. Determinants of the Rnase H cleavage specificity of human immunodeficiency virus revers transcriptase. *Nucleic Acids Research* 1993; 18:4330-4338.
175. Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reactionassays. *Journal of Molecular Endocrinology* 2000; 25:169-193.

176. Zhang J, Byrne CD. Differential priming of RNA templates during cDNA synthesis markedly affects both accuracy and reproducibility of quantitative reverse transcriptase PCR. *Biochemical Journal* 1999;337:231-241.
177. Savli H, Aalto Y, Nagy B, Knuutila S, Pakkala S. Gene expression analysis of 1,25(OH)2D3 dependent differentiation of HL-60 cells-a cDNA array study. *Br J Haematol* 2002;118:1065-72.
178. Esen N, Savli H. Stimulated microglia supernatants induced over-expression of neuronal nitric oxide gene in astrocytes. *Intern J Neurosci* 2003;113:1069-79.
179. Bustin SA, Gyselman VG, Williams NS, Dorudi S. Detection of cytokeratins 19/20 and guanylyl cyclase C in peripheral blood of colorectal cancer patients. *Br J Cancer* 1999;79(11-12):1813-20.
180. Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. Kinetic PCR analysis: Real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology* 1993;11(9):1026-30.
181. Edwards DR, Denhardt DT. A study of mitochondrial and nuclear transcription with cloned cDNA probes. Changes in the relative abundance of mitochondrial transcripts after stimulation of quiescent mouse fibroblasts. *Exp Cell Res* 1985;157(1):127-43.
182. Oliveira JG, Prados RZ, Guedes AC, Ferreira PC, Kroon EG. The housekeeping gene glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is inappropriate as internal control in comparative studies between skin tissue and cultured skin fibroblasts using Northern blot analysis. *Arch Dermatol Res* 1999;291(12):659-61.
183. Kreuzer KA, Lass U, Landt O, Nitsche A, Laser J, Ellerbrok H, et al. Highly sensitive and specific fluorescence reverse transcription-PCR assay for the pseudogene-free detection of beta-actin transcripts as quantitative reference. *Clin Chem* 1999;45(2):297-300.
184. Desprez PY, Poujol D, Saez S. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH, E.C. 1.2.1.12.) gene expression in two malignant human mammary epithelial cell lines: BT-20 and MCF-7. Regulation of gene expression by 1,25-dihydroxyvitamin D3 (1,25-(OH)2D3). *Cancer Lett* 1992;64(3):219-24.

185. Zhong H, Simons JW. Direct comparison of GAPDH, beta-actin, cyclophilin, and 28S rRNA as internal standards for quantifying RNA levels under hypoxia. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;259(3):523-6.
186. Spanakis E. Problems related to the interpretation of autoradiographic data on gene expression using common constitutive transcripts as controls. *Nucleic Acids Res* 1993;21(16):3809-19.
187. Lion T. Current recommendations for positive controls in RT-PCR assays. *Leukemia* 2001;15:1033-7.
188. Walker NJ. Real time and quantitative PCR: Applications to mechanism-based toxicology. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* 2001;15:121-127.
189. Ginzinger DG. Gene quantification using real time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainstream. *Experimental Hematology* 2002; 30:503-512.
190. Plaffl M.W. A new mathematical model for relative quantification in real time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 2001;29:2005-2007.
191. Keilholz U, Willhauck M, Rimoldi D, Brasseur F, Dummer W, Rass K, et al. Reliability of reverse transcription polymerase chain reaction based assays for the detection of circulating tumour cells: a quality-assurance initiative of the EORTC Melanoma Cooperative Group. *European Journal of Cancer* 1998;34:750-753.
192. Bishop GA, Bokahr KL, Lowes M, McGuinness PH, Napoli J, DeCruz DJ, et al. Quantitative reverse transcriptase PCR amplification of cytokine mRNA in liver biopsy specimens using a non-competitive method. *Immunology and Cell Biology* 1997;75:142-147.
193. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Research* 1996;6:986-994.
194. Gerard CJ, Olsson K, Ramanathan R, Reading C, Hanania EG. Improved quantitation of minimal residual disease in multiple myeloma using real-time polymerase chain reaction and plasmid -DNA complementarity region II standards. *Cancer Research* 1998;58: 3957-3964.

195. Zhang J, Desai M, Ozanne SE, Doherty C, Hales CN, Byrn CD. Two variants of quantitative reverse transcriptase PCR used to shown differential expression of alpha-, beta-, and gamma-fibrinogen genes in rat liver lobes. *Biochemical Journal* 1997;321: 769-775.
196. Allen N, Juergen KVR, Nguyen H, Key TJ. Association between Two Polymorphisms in the *SRD5A2* Gene and Serum Androgen Concentrations in British Men. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 2003;12:578–581.
197. Zhang Z, Yamashita H, Toyama T, Omoto Y, Sugiura H, Hara Y, Wu X, Kobayashi S, Iwase H. Quantitative determination, by real-time reverse transcription polymerase chain reaction, of aromatase mRNA in invasive ductal carcinoma of the breast. *Breast Cancer Research* 2003;5:250-256.
198. Asada Y, Sonoda T, Ojiro M, Kurata S, Sato T, Ezaki T, et al. 5a-Reductase Type 2 is constitutively expressed in the Dermal Papilla and connective tissue sheath of the hair follicle in vivo but not during culture in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:2875–2880.
199. Yamada Y, Watanabe M, Murata M, Yamanaka M, Kubota Y, Ito H, et al. Impact of genetic polymorphisms of 17-hydroxylase cytochrome P-450 (CYP17) and steroid 5 alpha-reductase type II (SRD5A2) genes on prostate-cancer risk among the Japanese population. *Int J Cancer* 2001;92: 683–686.
200. Itami S, Kurata S, Sonoda T, Takayasu S. Characterization of 5a-reductase in cultured human dermal papilla cells from beard and occipital scalp hair. *J Invest Dermatol* 1991;96:57-60.
201. Itami S, Kurata S, Sonoda T, Takayasu S. Mechanism of action of androgen in dermal papilla cells. *Ann NY Acad Sci* 1991;642:385-95.
202. Hamada K, Thornton MJ, Laing I, Messenger AG, Randall VA. The metabolism of testosterone by dermal papilla cells cultured from human pubic and axillary hair follicles concurs with hair growth in 5a-reductase deficiency. *J Invest Dermatol* 1996;106:1017-22.
203. Ando Y, Yamaguchi Y, Hamada K, Yoshikawa K, Itami S. Expression Of mRNA for Androgen Receptor, 5a-Reductase and 17b-Hydroxysteroid Dehydrogenase in Human Dermal Papilla Cells. *British Journal of Dermatology* 1999; 141: 840-845.

204. Escobar-Morreale HF, Serrano-Gotarredona J, Garcia-Robles R, Sancho J, Varela C. Mild adrenal and ovarian steroidogenetic abnormalities in hirsute women without hyperandrogenemia: does idiopathic hirsutism exist? *Metabolism* 1997;46:902-907.
205. Rossi R, Tauchmanova L, Luciano A, Valentino R, Savastano S, Battista C, et al. Functional hyperandrogenism detected by corticotropin and GnRH-analogue stimulation tests in women affected by apparently idiopathic hirsutism. *Journal of Endocrinological Investigation* 2001;24:491-498.
206. Azziz R, Carmina E, Sawaya ME. Idiopathic hirsutism. *Endocrine Reviews* 2000;21:347-362.
207. Miyaura C, Toda K, Inada M, Ohshiba T, Matsumoto C, Okada T, et al. Sex- and age related response to aromatase deficiency in bone. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;280:1062–1068.
208. Morishima A, Grumbach MM, Simpson ER, Fisher C, Qin K. Aromatase deficiency in male and female siblings caused by a novel mutation and the physiological role of estrogens. *J Clin Endocrinol Metab* 1995;80:3689–3698.
209. Mullis PE, Yoshimura N, Kuhlmann B, Lippuner K, Jaeger P, Harada H. Aromatase deficiency in a female who is compound heterozygote for two new point mutations in the P450arom gene: impact of estrogens on hypergonadotropic hypogonadism, multicystic ovaries, and bone densitometry in childhood. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:1739–1745.
210. Sourdaine P, Parker MG, Telford J, Miller WR. Analysis of the aromatase cytochrome P450 gene in human breast cancers. *J Mol Endocrinol* 1994;13:331–337.
211. Siegelmann-Danieli N, Buetow KH. Constitutional genetic variation at the human aromatase gene (Cyp19) and breast cancer risk. *Br J Cancer* 1999;79:456–463.
212. Miyoshi Y, Noguchi S. Polymorphisms of estrogen synthesizing and metabolizing genes and breast cancer risk in Japanese women. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2003;57:471–481.

213. Kristensen VN, Harada N, Yoshimura N, Haraldsen E, Lonning PE, Erikstein B, et al. Genetic variants of CYP19 (aromatase) and breast cancer risk. *Oncogene* 2000;19:1329–1333.

TC.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI'NA

Dr. Ahmet Okay Çağlayan'a ait İdiopatik Hirşütizimli Vakalarda CYP19 Geni ve SRD5A2 Geni Polimorfizmlerinin ve Bunların Lokal Olarak Androjene Duyarlı Dokudaki Ekspresyonlarının Araştırılması. adlı çalışma, jürimiz tarafından Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'nda Tıpta Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tarih : 19/10/2007

İmza

Başkan..... İmza

Prof. Dr. Selim Kurtoğlu

Üye..... İmza

Prof. Dr. Fahrettin Keleştimur

Üye..... İmza

Prof. Dr. Munis Dündar

Üye..... İmza

Prof. Dr. Yusuf Özkul

Üye..... İmza

Yrd. Doç. Dr. Çetin Saatçi