

T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MESANE KANSERLİ HASTALARIN LENFOSİT
HÜCRELERİNDE KARDEŞ KROMATİD
DEĞİŞİM SIKLIĞININ BELİRLENMESİ

Pınar ASLAN KOŞAR

TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Doç.Dr. Nurten ÖZÇELİK

79988

Bu tez Süleyman Demirel Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından
133 Proje numarası ile desteklenmiştir.

YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
ULUSLARARASI İLİŞKİLER VE İNTERNET MERKEZİ

Tez. No: 79988

1999-İSPARTA

KABUL VE ONAY

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;

Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Yüksek Lisans *Programı*
Çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından
Yüksek Lisans *Tezi* olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi :/...../1999

Tez Danışmanı :
(Ünvanı, Adı Soyadı) (Üniversite)

Üye :
(Ünvanı, Adı Soyadı) (Üniversite)

Üye :
(Ünvanı, Adı Soyadı) (Üniversite)

Üye :
(Ünvanı, Adı Soyadı) (Üniversite)

Üye :
(Ünvanı, Adı Soyadı) (Üniversite)

ONAY:

Bu tez Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu Kararıyla kabul edilmiştir.

Prof.Dr.Sadettin ÇALIŞKAN
Enstitü Müdürü

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	i
İÇİNDEKİLER	ii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. <i>Kardeş Kromatid Değişim (KKD) Mekanizmaları</i>	6
2.2. <i>Lösemi ve Lenfomalarda Kardeş Kromatid Değişimi</i>	16
2.2.1. Malign Lenfoma.....	16
2.2.2. Kronik Myeloid Lösemi (KML).....	16
2.2.3. Akut Lenfoblastik Lösemi (ALL).....	16
2.2.4. Hodgkin's Hastalığı.....	16
2.3. <i>Solid Tümörlerde Kardeş Kromatid Değişimi</i>	17
2.3.1. Over Kanseri.....	17
2.3.2. Meme Kanseri.....	17
2.3.3. Akciğer Kanseri.....	17
2.3.4. Serviks Kanseri.....	18
2.3.5. Malign Melanoma.....	18
2.3.6. Oral Kavite Karsinoma (OKK).....	18
2.3.7. Kolon ve Rektum Kanserleri.....	18
2.3.8. Prostat Kanseri.....	18
2.3.9. Mesane Kanseri.....	18
3. MATERYAL VE METOD	20
3.1. <i>Materyal</i>	20
3.2. <i>Metod</i>	20
3.2.1. Kültürlerin Kurulması	20
3.2.2. Kromozom Eldesi.....	21
3.2.3. Kardeş Kromatid Değişimi Boyama Tekniği	23
3.2.4. Kardeş Kromatid Değişimi'nin Değerlendirilmesi	25

3.2.5. Mesane Kanserli Hastaların Değerlendirilmesi	28
3.2.6. İstatistik Yöntem	28
3.2.7. Fotoğrafik İşlemler	28
4. BULGULAR.....	29
4.1. <i>Mesane Kanserli Hastaların Bulguları</i>	29
4.2. <i>Kontrol Grubu Bireylerin Bulguları</i>	34
4.3. <i>Mesane Kanserli Hastaların ve Kontrollerin Genel Ortalama KKD Oranları ve Kromozom Grupları Arasındaki KKD Değerlerinin Karşılaştırılması</i>	35
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	45
ÖZET.....	50
SUMMARY.....	51
6. KAYNAKLAR	53



1. GİRİŞ

İnsan kromozomlarının daha iyi tanımlanmasını sağlayan bandlama yöntemlerinin gelişmesi sonucunda çeşitli deney sistemlerinde, mutajen ve karsinojen etkili kimyasal ve endüstriyel maddelerin kromozomlar üzerine olan etkileri de büyük ölçüde çalışılmaya başlanmıştır. Bu sayede kromozomlardaki translokasyon, delesyon, ring gibi anomaliler incelenebilmiştir. Fakat düşük dozlardaki mutajen ve karsinojenler kromozomlarda gözlenebilir anomaliler oluşturmadığı için etkileri başarılı bir şekilde incelenememiştir.

Çeşitli mutajen ve karsinojenlerin hem in vivo, hem de in vitro koşullar altında neden olduğu DNA hasarını saptamayı sağlayan sitogenetik yöntemlerden birisi de **Kardeş Kromatid Değişimi (KKD)=Sister Chromatid Exchange (SCE)**'dir. KDD, DNA'daki çok küçük harabiyetlerin bile hassas göstergesi olarak kabul edilir. DNA hasarının ve indüklenmiş DNA tamirinin gösterilmesinde en basit, duyarlı ve kısa zamanda sonuç veren bir yöntem olarak kullanılmaktadır (1, 2).

KKD, yeni duplike olmuş kromatid ve eski kendi kardeş kromatidi arasında, kromozom morfolojisi değişmeksizin simetrik olarak özdeş segmentlerin değişimidir (3).

KKD çoğalmakta olan hücrelerde spontan olarak meydana gelmekte, özellikle kromozom hasarı, instabilitesi ve DNA tamir bozukluğu sendromlarında duyarlı bir parametre olarak kullanılmaktadır (1).

KKD sıklığı, karsinojenik ve/veya mutajenik ajanların genotoksik etkilerini değerlendirmek için kullanılabilecek sensitif markerlerin birisi olarak düşünülmektedir (4). Kromozom kırılma sendromu olarak bilinen birçok herediter rahatsızlığa maruz kalan hastaların, kanser gelişmesi için yatkın (risk içinde)

oldukları bilinir (5). Örneğin kromozom kırıkları ile birlikte seyreden ve kansere yakalanma riski fazla olan Bloom sendromlu hastaların lenfositlerinde BrdU ile yüksek sıklıkta KKD gözlenmesi, araştırmacıları insan kanserlerinde KKD çalışmalarına yönlendirmiştir.

Risk grubundaki kişilerin hücreleri, kimyasal ve fiziksel mutajenler tarafından neden olunan genomik hasara fazla hassasiyet gösterirler. Bu KKD sıklığı ile değerlendirilir.

Birçok faktör KKD sıklığını değiştirir. Bunlar; yaş, seks, bireylerin genetik yapısı, sigara, alkol, radyasyon, bazı kimyasallar ve kültür koşulları gibi faktörlerdir. Bu nedenle değişik faktörlerin KKD üzerine olan etkisini araştırırken, kontrol grupları bütün bu değişkenler göz önüne alınarak oluşturulmalıdır.

Son yıllarda yapılan genetik çalışmalar ile, kanserin genetik bir hastalık olduğu kabul edilmektedir. Bu hastalığın ortaya çıkmasında kimyasal, fiziksel, viral ve kromozomal düzensizlikler gibi birçok faktör rol oynamaktadır. Kanser dünyadaki ölümlerin %20'sinden fazlasını oluşturmaktadır. Sitogenetik olarak yapılan çalışmalarda, bazı kanser tiplerine özgü belirli kromozomlarda sayısal ve yapısal anormallikler ve marker kromozomlar bulunmuştur.

Başta hematolojik sistemle ilgili kan hastalıkları ve kanserleri olmak üzere, akciğer, serviks, kolon, meme, over, mesane, kolon ve rektum kanserlerinde bu yöntemle yapılan çalışmalar sonucunda, kontrollere göre KKD oranlarında artışlar saptanmıştır. Aynı zamanda kanser vakalarında tedavi amaçlı kullanılan radyoterapi ve çeşitli kemoterapötik ilaçların hücrelere verdiği zararın kalıcı etkisi, periferik kan lenfosit hücrelerinde kromozom kırıkları ve KKD 'deki değişimler ile gösterilmiştir.

Mesane tümörleri tüm malign hastalıkların %2'sini oluşturur ve ürolojide en sık rastlanılan tümörlerden biridir. Üroepitelyal tümörlerin ise %90'ını oluşturmalarına rağmen, solid dokularda kültür koşulları zor olduğundan kromozom çalışmaları fazla yapılmamış, ancak hastalıkların moleküler genetiği konusunda son yıllarda

ilerlemeler kaydedilmiştir. Mesane kanserli vakalarla yapılan birçok araştırmada sıklıkla 5. kromozomun kısa (p) kolu için bir izokromozom olduğu i(5p), kromozom 7'nin trizomisi ve 9'un monozomisi bildirilmektedir. Aynı zamanda bu araştırmalarda, 5 nolu kromozomun kısa ve uzun kolu için delesyon ve translokasyonlara sıklıkla rastlandığı belirtilmektedir (6, 7, 8, 9).

Bu çalışmada amacımız,patolojik evrelendirilmesi yapılmış ve mesane kanseri teşhisi konmuş olgularda, operasyon öncesi, periferal kan lenfositlerinde KKD oranını, birebir kontrol bireyleri ile karşılaştırmak, kanser evreleri ile KKD değerleri arasındaki ilişkiyi saptamaktır. Ayrıca her iki grupta kromozom grupları arasında KKD bakımından bir fark olup olmadığı araştırılmıştır.



2. GENEL BİLGİLER

Kardeş kromatid değişim analizi, hassas genotoksik testlerden biridir. Değişik mutajenlere maruz kalan bireylerin periferal kan lenfositlerinde (PBL) in vivo ve in vitro olarak çok fazla KKD alışması yapılmıştır. KKD, bireylerde somatik hucrelerde bilinen ya da potansiyel mutajen ve karsinojenlere maruz kalmanın etkilerini saptamada da kullanılan bir yontemdir.

İn vitro sistemlerde fiziksel ajanlardan, UV ile gorunur ışık KKD sıklığında artışa neden olurken, iyonize edici radyasyon KKD frekansında anlamlı bir artış yaratmamıştır. Perry ve Evans isimli araştışıcılar da çeşitli dozlarda X ışınlarının mitozun farklı evrelerinde KKD frekansını arttırdığını göstermişlerdir (10). Crossen ve arkadaşları düşük düzeyde iyonize edici radyasyona maruz kalmanın KKD insidansına etkisini 18 gönüllü bireyin kan lenfositlerinde çalışmışlar ve KKD'de herhangi bir artış olmadığını saptamışlardır (11).

Değişik araştışıcılar mitomycin -C (MMC), adriamycin (AM), N methyl- N-nitrosoguanidine (MNNG), quinacrine mustard (QM), nitrojen mustard (NH₂), ethyl methane sulphonate (EMS), eyiophosphamide (CP), penicillamine gibi bilinen veya şüpheli pek çok mutajen ve karsinojenleri çeşitli hücre kültürlerinde incelemişler ve KKD'lerinde önemli artışlar olduğunu saptamışlardır. Oysa KKD'de önemli artışlar yapan bu mutajenler, kromozom aberasyonlarında ya kk bir artışa neden olur veya hiç etkilemezler (12, 13).

Bilinen ya da potansiyel mutajen ve karsinojenlere, mesleki açıdan maruz kalmanın etkileri de bireylerin periferal kan lenfositlerinde çalışmış ve özellikle organik çözücülere (etilen oksit, styrene viniylchlorid, belirli pestisit/herbisit gibi) maruz kalan bireylerde kromozom aberasyonu ile beraber KKD sıklığının arttığı

gösterilmiştir. Konuyla ilgili Anderson ve arkadaşları yaptıkları çalışmada Viniyl chloride monomerlerine mesleki açıdan maruz kalmış kişilerde KKD sıklığının kontrollere göre anlamlı bir artış gösterdiğini belirtmektedirler (14).

Quinakrin mustard ve klorombusil gibi, alkilleyici ajanlar da, DNA'da alkilasyonu indükleyerek premutajenik ya da letal sonuç doğurabilmektedir. İnsan periferel kan lenfositlerinde KKD sıklığı, alkilleyici ajanlarla büyük ölçüde artmaktadır. Salamon ve arkadaşları insan kromozomlarında quinakrin mustart ve klorombusil'in KKD'de önemli bir artışa neden olduklarını ve konsantrasyon arttıkça KKD'de de artışın olduğunu göstermişlerdir (15, 16).

İnsanda sitogenetik açıdan hasar oranını etkileyebilecek başka bir faktör ise sigaradır. Bağcı ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada sigara içen ve içmeyen bireyler arasında anlamlı bir fark bulunmuştur. Çalışmada ayrıca sigara içim süresine göre bir sınıflandırma yapıldığında, sigara içme süresi arttıkça KKD'de anlamlı artış gözlenmiştir (17). Sigara kullanımının bu bireylerin çocuklarında genetik hasar oluşturabileceği düşünülerek, Lundgren ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, sigaranın yeni doğan çocuklarda KKD artışına yol açmadığı gösterilmiştir (18).

Zararlı alışkanlıklardan bir diğeri olan alkol kullanımının, in vivo genetik etkileri ile ilgili yapılan araştırmada KKD oranının kontrol grubuna göre artmış olduğu saptanmıştır (19).

Esasi bir element olan Krom (Cr)'un fazlalığında karsinojik etki yaptığına ilişkin çalışmalar yapılmıştır. Özellikle mesleki açıdan Cr'a maruz kalmış bireylerde kanser olma riski düşünülmüştür. Bu konuyla ilgili Acar ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada, ferrokrom fabrikasında çalışan 50 işçiden alınan periferel kan örneklerinde, kontrol grubuna göre önemli derecede farklılık bulunmuştur (2). Ayrıca hekzavalent ve trivalent krom bileşikleri üretiminde çalışan işçilerde, solunum sistemi kanserlerinden özellikle akciğer kanseri riskinin artmış olduğu, ayrıca bu

endüstride çalışanlarda sindirim sistemi kanserlerinin görülme sıklığının daha fazla olduğu bildirilmiştir (20, 21, 22).

Hücre bölünmesi ve büyümesini engelleyen ve aktif olarak büyüyen hücreleri öldüren, antineoplastik ilaçların genotoksik etkileri, KKD analizleri ile araştırılmıştır. Gebhard ve arkadaşları bu ilaçlardan biri olan, sitotoksik etkili ve kromozom hasarı da yapan Bleomycin ile çalışmışlar, İn vitro koşullar altında farklı konsantrasyonlarda kromozomal kırık oranının, doza bağlı artış gösterdiğini bulmuşlardır (23). Husum ve arkadaşları ameliyathane personeline anestezi esnasında nitroz okside maruz kalan bireylerin periferik kan lenfositlerinde KKD sıklığını araştırmışlar ve ameliyathane personeline, kontrol grubuna göre önemli bir fark gözleyememişlerdir (24).

Kanserlerin büyük bir çoğunluğunda gözlenen kromozom anormallikleri, sitogenetik boyama metodları, bantlama teknikleri ile tanımlanabilir. Sitogenetik metotlardan biri olan KKD, mutajenik ve karsinojenik ajanların DNA'ya yaptığı hasarın bir göstergesi olarak bazı kanser vakalarının erken teşhisi ve evre tespitinde destekleyici faktör olarak düşünülmektedir ve sıkça kullanılmaktadır. Kanserli hastalarda tedavi öncesi ve sonrası in vitro koşullarda, KKD çalışmaları yapılmaktadır.

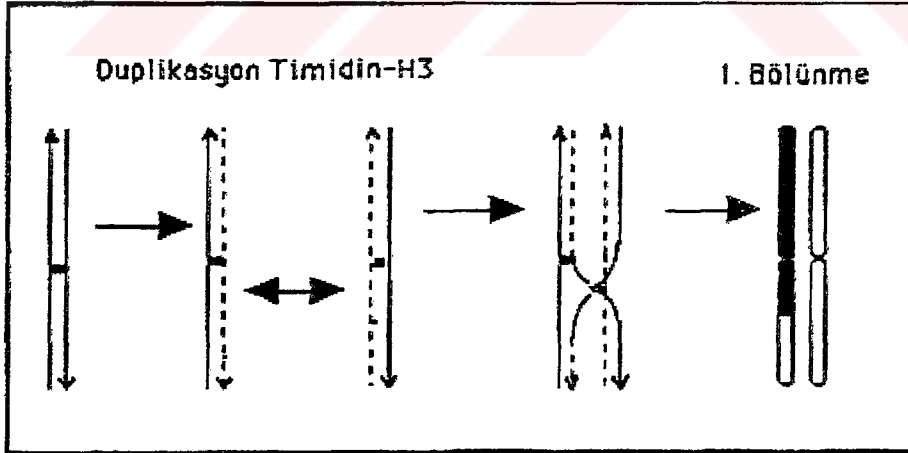
2.1. Kardeş Kromatid Değişim (KKD) Mekanizmaları

Kardeş kromatid değişimi çoğalmakta olan hücrelerde spontan olarak meydana gelir. Çeşitli fiziksel ve kimyasal etkenlerle kromozom DNA'sında meydana gelen, replikasyon esnasında onarılmayan hatalar KKD'lerin ortaya çıkmasını ya da artmasını sağlar. Yani DNA hasarına neden olan pek çok ajanın KKD sıklığını arttırdığı bilinmektedir. Bu nedenle pek çok mutajenik ya da karsinojenik etkileri

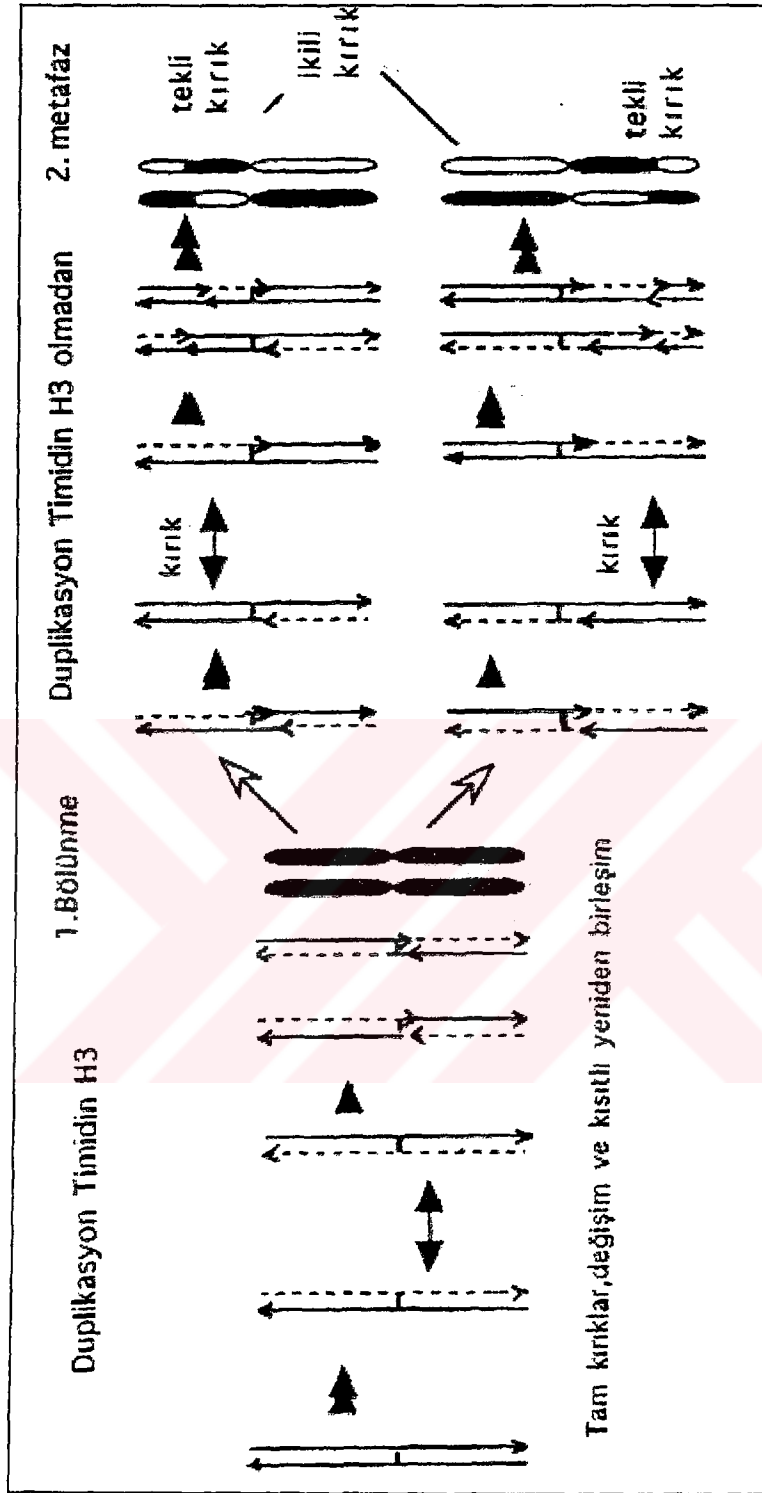
göstermede duyarlı bir parametre olarak kabul edilir (5). KKD, mutasyon oranı, doku tipi, ajanların doz oranı ya da diğer faktörlerle farklılık gösteren hızlı, duyarlı ve kantitatif bir ölçüm metodudur (25). KKD'nin sitogenetik açıdan değerlendirilmesi kromozom boyları ve sentromer pozisyonları dikkate alınarak her bir kromozom grubunda kırık noktaları 1'li, 2'li, 3'lü, 4'lü değişimler şeklinde yapılmaktadır (3).

Kardeş kromatid değişimini ilk olarak 1957 yılında Taylor ve arkadaşları, bitki mitotik kromozomlarında (*Vicia faba* ve *Bellenalia romana*) DNA replikasyonu ve segregasyonu konusunda yaptığı otoradyografik çalışmalarla gözlemeyi başarmıştır (26, 27).

Her kromatidde bir çift iplik bulunduğundan, sadece birer ipliği içeren değişim olasılığı düşünülmüş ve 3HdTh (3H- deoksi-Timidin) ile işaretlenmiş iplik ile diğer kromatidin işaretli olmayan ipliği arasında karşılıklı kırık noktalarından değişimin olduğu ileri sürülmüştür. Ama, 3HdTh ile işaretlenen kromozomların tek tip boyanma özelliği göstermesinden dolayı, bu safhada bu tarz bir değişimin gerçekleşmeyeceği sonucuna varmışlardır (Şekil 1a).



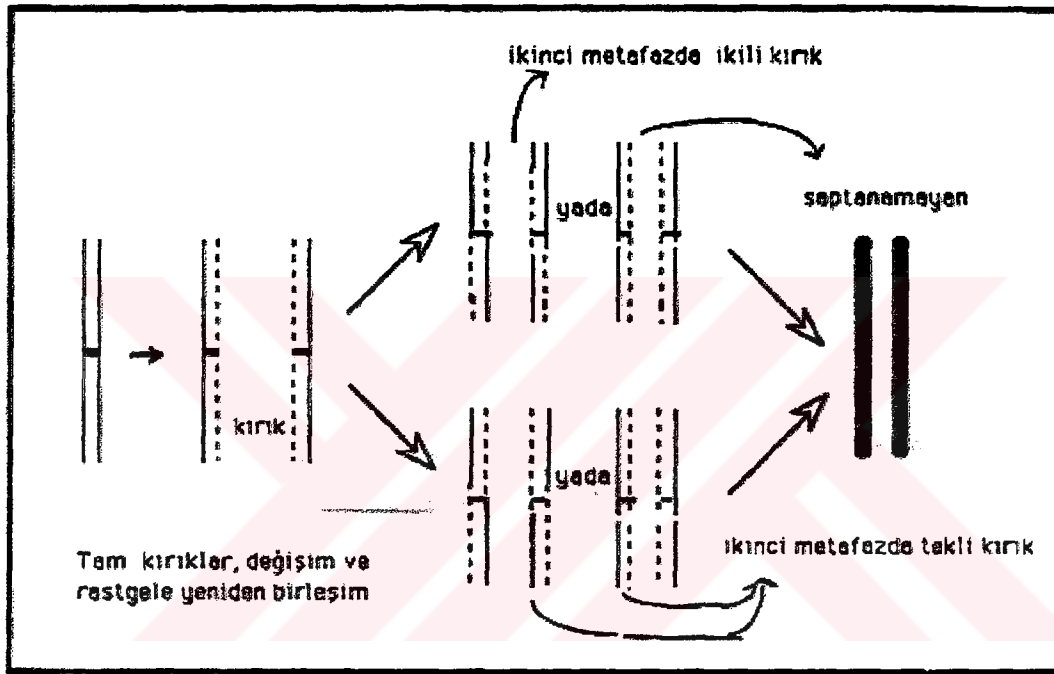
Şekil 1.a KKD oluşum mekanizması. Taylor, J. H. Genetics 43: 515-529, 1958



Şekil 1.b KKD oluşum mekanizması. Taylor, J. H., Genetics 43:515-529, 1958

Düşünülen diğer mekanizma ise hücre bölünmesinin 1. replikasyonu sonunda tetraploid durumda iken durdurulması ve her kromatid segmentinin karşılıklı değişimini izleyen 2. replikasyonda işaretli timin yokluğunda, kardeş kromatidler arasında karşılıklı değişimin meydana geldiğini açıklamaktır.

1. replikasyonda 2 kardeş kromatid arasında değişim olursa “ikili değişim”, ikinci replikasyonda kardeş kromatidler arasında değişim olursa “tekli değişim” gözlenebileceğini bildirmişlerdir (Şekil 1b, 1c).

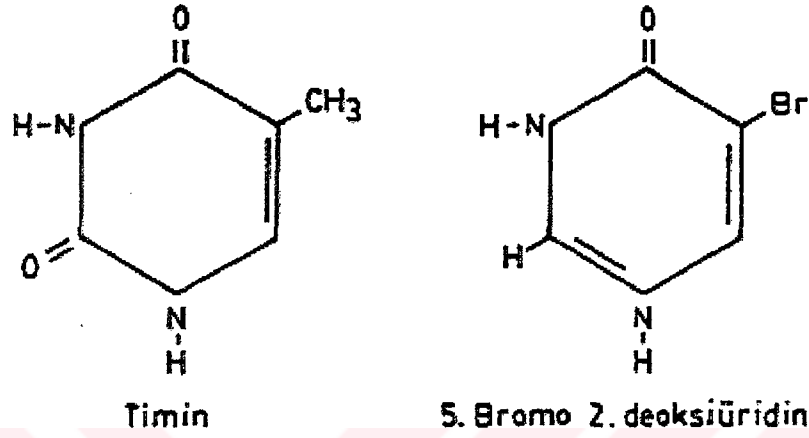


Şekil 1.c KKD oluşum mekanizması. Taylor, J. H., Genetics 43:515-529, 1958

Sonraki çalışmalar otoradyografi tekniğine göre, kromatidlerin daha iyi rezolüsyon ile farklı boyanmasını sağlayan yeni metodlar üzerinde olmuştur.

1972 yılında Zakharov ve Egolina isimli araştırmacılar, Chinese Hamster hücrelerinde uzun süreli kültür kurmuş ve timin analogu olan 5- Broma -2 deoxyuridine (BrdU) ile replike olan kromozomların morfolojisini incelemişlerdir (28).

Timidin analogu olan BrdU, replikasyon sırasında DNA'ya girer ve timidindeki metil grubunun yerini Brom atomunun almasıyla DNA molekülünde oluşan bir seri fiziko - kimyasal değişiklikler sonucu, ikincil yapıların şekillenmesinde güçlükler neden olur (Şekil 2).

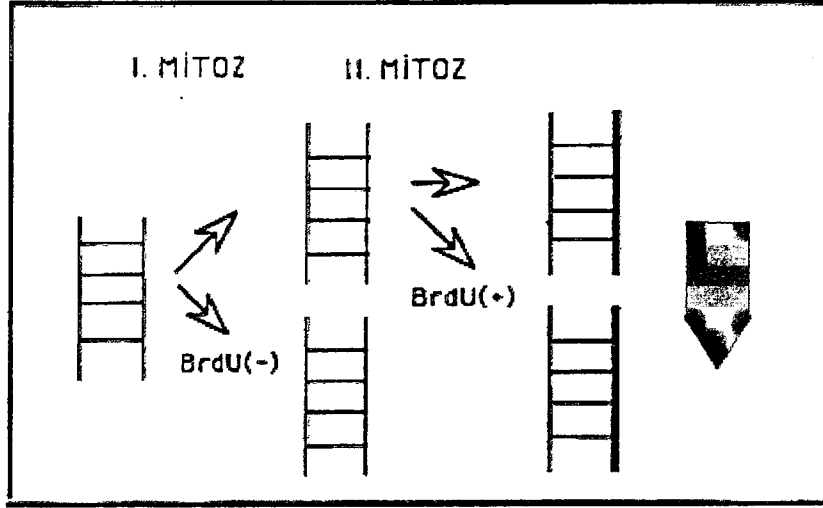


Şekil 2. Timidin ve BrdU'in halkasal yapısı.

Zakharov ve Egolina bu olaya “Spiralizasyon gecikmesi” adını vermişlerdir. Spiralizasyondaki bu gecikmenin, BrdU varlığına ve yoğunluğuna, bu ajanın hangi fazda kromozom yapısına girdiğine ve mitozlar arasındaki zaman sürecine bağlı olduğunu bildirmektedirler.

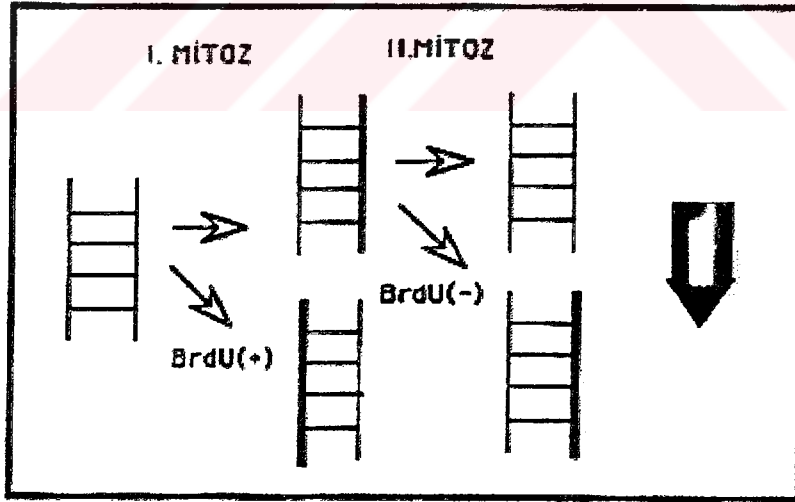
Buna göre, eğer kromozom spiralizasyonundaki gecikme, gerçekten BrdU'in DNA'ya girmesine bağlı ise, ikinci hücre siklusundaki tüm metafazlar giemsa ile boyandıklarında, üç farklı morfolojik yapı görülecektir (Şekil 3a, 3b , 3c , 3d) (25).

Yalnız 2. Replikasyon ortamında BrdU bulunması durumunda kromozomun her iki kromatidinde eş zamanlı spiralizasyon gecikmesi oluşacak, fakat kromozomlar normal boyanacaktır (Şekil 3a).



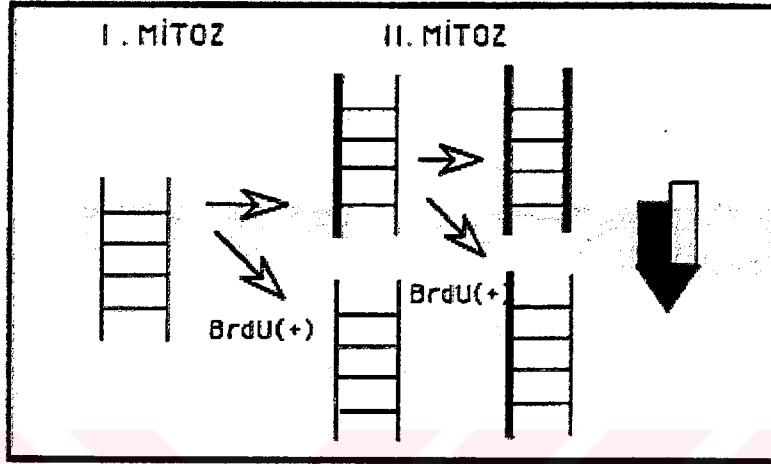
Şekil 3a. BrdU varlığına bağlı spiralizasyon geçikmesi. Zakharov ve Egolina, Chromosoma(Berl), 38:341-365, 1972

1. replikasyonda ortamda BrdU bulunması, 2. Replikasyonda bulunmaması durumunda spiralizasyon geçikmesi görülmez ve morfolojik değişim oluşmaz (Şekil 3b).



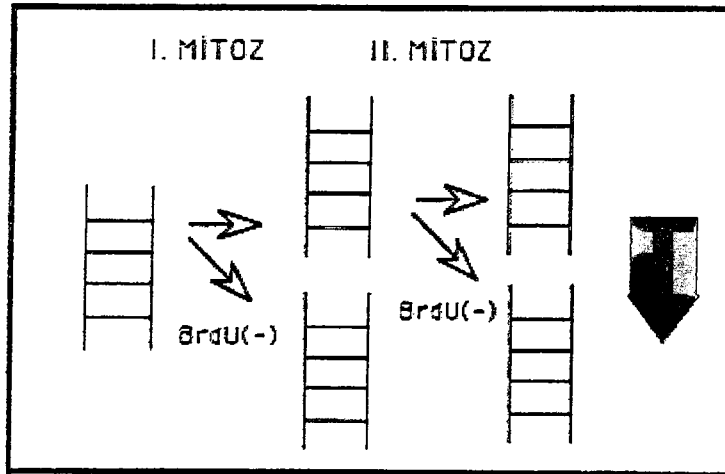
Şekil 3b. BrdU varlığında spiralizasyon geçikmesi. Zakharov ve Egolina, Chromosoma (Berl) 38:341-365, 1972

Her iki replikasyonda veya mitozda ortamda BrdU bulunması halinde, kromatidlerden birinin, her iki DNA zincirinde BrdU bulunur, diğer kromatidin ise yalnızca bir zincirinde BrdU, diğerinde timin yer alır ve her iki ipliğinde de spiralizasyon geçikmesi olduğundan BrdU'in yer aldığı kromatid bölgeleri soluk boyanır (Şekil 3c).



Şekil 3c. BrdU varlığında spiralizasyon geçikmesi. Zakharov ve Egolina, Chromosoma (Berl), 38:341-365, 1972

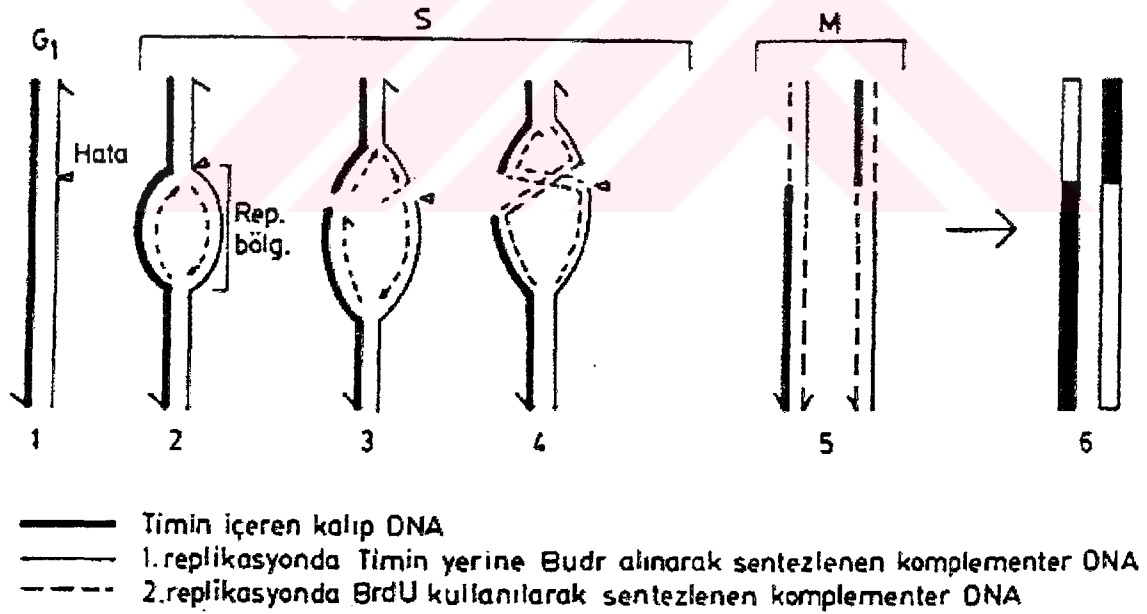
Her iki replikasyon siklusunda ortamda BrdU bulunmazsa, normal kromozom morfolojisi ve normal boyanma özelliği görülecektir (Şekil 3d).



Şekil 3.d BrdU yokluğunda spiralizasyon. Zakharov ve Egolina, Chromosoma (Berl), 38:341-365, 1972

Zakharov ve Egolina'dan sonra 1973 yılında Latt, insan kromozomlarında floresan boya Hoechst 33258 ile kromatidlerin farklı boyandığını göstermiştir (29). Sonraları Akridin oranj ve DAPI gibi floresan boyalar ile Giemsa boyanın beraber uygulandığı yöntemlerde, yüksek pH ve sıcak tuzlu solüsyonlar ile işlemiden sonra, giemsa ile kardeş kromatidlerin farklı boyanması sonucu kromozomlar incelenmiştir (30, 31).

Evans isimli bir araştırmacı ise, yalnızca replikasyon süresince mevcut etkenlerin KKD'leri ortaya çıkarabildiğini, bundan dolayı da değiş tokuşun replikasyon çentiğinden başlaması gerektiğini belirtmiştir. Evans, kromatidlerin herhangi bir zincirinde kontrollü kırıkların meydana gelmesi ile kromatid üzerinde yeni sentezlenen oğul zincir ile kardeşinin atasal zinciri arasındaki karşılıklı parça değişiminin gerçekleşmesine dayanan bir mekanizma olduğunu ileri sürmüştür (Şekil 4), (32, 33, 34, 35).



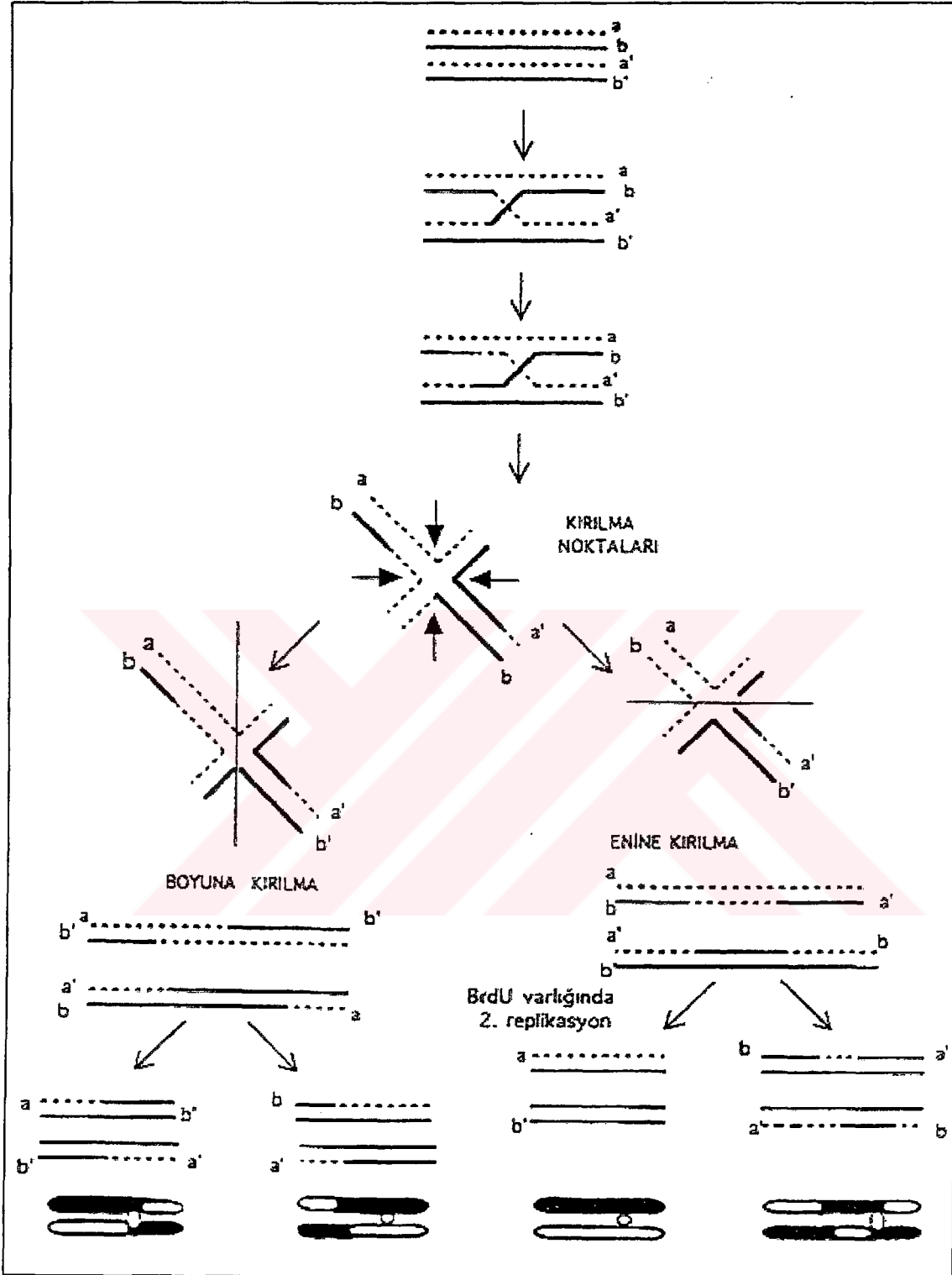
Şekil 4. Evans tarafından öne sürülen KKD oluşum mekanizması, Evans, H.J. Chromosoma Today, 6:315-326, 1977

1981 yılında Loveday ve Latt isimli araştırıcılar Potter ve Dressler'in önerdiği modelden yola çıkararak yeni bir model ne sürmüşlerdir. Bu modele göre kalıp DNA'dan komplementer olarak timin yerine BrdU'in girdiği tamamlayıcı DNA zinciri sentezlenir. Her bir çift sarmalda tek zincir kırığı oluşur ve bir dublekteki bir zincir ile diğer dublekteki DNA'nın tamamlayıcı, kardeş zinciri arasında crossing-over gerçekleşir. Rekombinasyon sonucu hem timin, hem de BrdU'in yer aldığı heterodubleks zincirler oluşur.

DNA'nın crossing-over noktası etrafındaki rotasyonu ile "X formu" meydana gelirken, kırıklar oluşur ve kırılan zincirler birbiri ile değil, kardeş zincirlerin parçaları ile DNA ligazla birleştirilerek her iki zincirinde BrdU ve her iki zincirinde timidin içeren 2 rekombinant yapı oluşur.

Her iki zincirinde BrdU içeren bölgeler soluk, her iki zincirinde timin veya bir zincirinde BrdU, diğerinde timin içeren bölgelerin koyu boyanması ile KKD değerlendirilir (şekil 5), (36).

Kanser tıpta en yaygın problemlerden biridir. Yapılan istatistiklere göre gelişen ülkelerde tüm ölümlerin %20'sinden fazlasını kanser oluşurmaktadır. Kanser başlangıçta değişimi uyaran bir faktör ile oluşan, bu uyaran ortadan kalktıktan sonra da normal dokular ile işbirliği yapmadan kontrol edilemeyen, aşırı gelişme gösteren, normal olmayan malign tümörlere verilen isimdir. Anormal hücre çoğalması ile oluşan kitle lokalize ise **benign tümör**, invaziv ise **malign tümör** adını alır. Neoplazmlar buldukları konakta parazit gibi davranırlar ve metabolik gereksinimleri için normal doku ve hücrelerden yararlanırlar. Böylece tümörler hastalarda zayıflatıcı, yıkıma uğraticı bir şekilde gelişirler. Beslenme ve kanlanmaları konağa bağımlıdır. Tümöral hücreler normal hücre gelişmesini kontrol eden mekanizmalardan etkilenmeksizin çoğalırlar (37).



Şekil 5. KKD oluşum mekanizması. Loveday ve Latt, Human Genetics 49:63-69, 1979.

2.2. Lösemi ve Lenfomalarda Kardeş Kromatid Değişimi

2.2.1. Malign Lenfoma : Kurvik ve arkadaşları, 47 malign lenfomalı olgu ve 40 kontrol bireyin periferal kan lenfositlerinde, spontan KKD düzeyini araştırmışlar, malign lenfomalı olgularda kontrollere göre KKD sıklığının oldukça yüksek olduğunu gözlemişlerdir. Terapi gören 13 hastada ise özellikle 15. haftadan sonra KKD'in oldukça azaldığını saptamışlardır (38). Benzer bir çalışma Crossen ve arkadaşları tarafından yapılmış ve malign lenfomalı olguların periferal kan lenfositlerinde KKD sıklığı açısından kontrol grubuna göre bir fark gözlenmemiştir (39).

2.2.2. Kronik Myeloid Lösemi (KML): Yapılan bir çalışmada 40 KML'li olguda ve 38 sağlıklı kontrol bireyde, kemik iliğinde spontan KKD düzeyine bakılmış ve lösemili bireylerin hücrelerinde KKD sıklığının azaldığı gözlenmiştir (40). Benzer bir çalışma Cheng ve arkadaşları tarafından da yapılmış ve KML'li olguların periferal kan lenfositlerinde KKD oranları kontrol grubuna yakın bulunmuştur(41).

2.2.3. Akut Lenfoblastik Lösemi (ALL): Otter ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada ALL'li hasta gruplarının periferal kan lenfositlerinde spontan KKD düzeylerine bakılmış ve kontrollere göre oldukça yüksek oran gözlenmiştir (42).

2.2.4. Hodgkin's Hastalığı: Thelma ve arkadaşları 16 Hodgkin's hastalıklı olgu 8 kontrol birey ve 28 tedavi görmüş olgu ile bir çalışma yapmışlardır. Tedavi gören gruba MVPP (Mustin / Vinblastin / Prednisolon / Prokarbazin) karışımı kombine kemoterapi uygulanmıştır. Grupların periferal kan lenfositlerinde, spontan KKD bakımından bir fark bulunmamıştır. MVPP terapisinin 2. kez uygulanmasından sonra ise maksimum düzeyde KKD gözlemişlerdir (43).

2.3. Solid Tümörlerde Kardeş Kromatid Değişimi

2.3.1. Over Kanseri : Adhvaryu ve arkadaşları, 20 sağlıklı birey ve 19 over kanserli hastanın periferik kan lenfositlerinde spontan ve mitomycin-C (MMC) ile indüklenmiş KKD sıklığını incelediklerinde, over kanserli olguların spontan KKD düzeyini anlamlı derecede yüksek bulurlarken, MMC ile indüklenmiş kültürlerdeki KKD oranını kontrol grubu ile yakın bulmuşlardır (44).

2.3.2. Meme Kanseri : Meme ve over kanserlerinin insidansının %5-10'luk bir kısmında, yüksek risk taşıyıcı bir genin aktarıldığı ve sonra meme ya da overin hedef epitel hücrelerine özgü genetik değişimlerin ortaya çıktığı ileri sürülmektedir. Meme kanserlerinin %50'sinden fazlasında tümör 50 yaşından önce oluşmakta ve meme kanserlerinin %90'ından fazlasında ise hastalık sporadik gelişim göstermektedir (45).

Bir çalışmada 22 meme kanserli olgu ile 10 sağlıklı kontrol bireyinin periferik kan lenfositlerinde KKD araştırılmış, meme kanserli bireylerin kontrollere göre artmış KKD 'ne sahip olduğu saptanmıştır. Ayrıca bu çalışmada KKD ile kanserin evreleri ile olan ilişkisi de araştırılmış ve evre ilerledikçe KKD oranının arttığı bulunmuştur. Çalışma bir başka açıdan da değerlendirilmiş ve tümörün hacmi ile KKD arasında da korelasyon olduğu bulunmuştur (46). Öztürk'ün yaptığı bir başka çalışmada ise, 24 meme kanserli olgu, 24 birebir kontrol grubu birey ile spontan KKD açısından değerlendirilmiş ve istatistiksel açıdan meme kanserli olgularda kontrol grubu bireylere göre önemli fark olduğu gösterilmiştir (1).

2.3.3. Akciğer Kanseri : Yapılan bir çalışmada kanser riski düşük 14 ve kanser riski yüksek 11 birey ile 15 akciğer kanserli birey çalışılmıştır. Sonuçta risk taşıyan grup ile 15 akciğer kanserli olgunun periferik kan lenfositlerinde, spontan ve Benzo (a) pyren ile indüklenmiş KKD sıklığı, 25 kontrol bireye göre yüksek bulunmuştur (47).

2.3.4. Serviks Kanseri : Adhvaryu ve arkadaşları, 13 kontrol bireyi ile 13 tedavi görmeyen serviks kanserli olgu arasında spontan ve MMC ile indüklenmiş KKD'de kontrollere göre anlamlı bir artış bulamamışlardır (48). Oysa uterin-serviks kanserli olgular ile yapılmış başka bir çalışmada ise, yüksek KKD sıklığının bir prelinik marker olabileceği belirtilmektedir (49). Yokota ve arkadaşlarının yaptığı bir başka çalışmada, 18 sağlıklı kadın, 17 uterin miyoma olgulu kadın ve klinik evrelendirmesi yapılmış ancak tedavi görmemiş 35 serviks kanserli olgu spontan ve MMC ile indüklenmiş KKD açısından değerlendirilmiş, spontan KKD'de kanserli grupta anlamlı artış bulunurken MMC ile indüklenmiş KKD'de diğer iki gruba göre istatistiksel açıdan bir fark gözlememişlerdir (50).

2.3.5. Malign Melanoma: İleni ve arkadaşları, 22 kalıtsal malign melanoma görülen birey ile 39 sporadik melanomalı olgu ve bunların yakın akrabalarının periferik kan lenfositlerinde KKD sıklığını incelemişler ve 39 kontrol bireye göre anlamlı bir artış bulmuşlardır (51).

2.3.6. Oral Kavite Karsinoma (OKK) : Ankathil ve grubu yaptıkları çalışmada OKK'lı hastaların spontan KKD 'de kontrollere göre anlamlı bir fark gözlerken, Bazopoulou ve arkadaşları spontan KKD 'de anlamlı bir farklılık gözlememişlerdir (52, 53).

2.3.7. Kolon ve Rektum Kanseri : Yapılan birçok çalışmada kolon ve rektum kanserli olguların kontrol grubu bireyler ile karşılaştırıldığında KKD oranlarında farklılık bulunamamıştır (54, 55).

2.3.8. Prostat Kanseri : Prostat kanserli 24 hastanın periferik kan lenfositlerinde yapılan KKD analizinde, kanserli olguların ortalama KKD değerlerinin 40 kontrol grubu bireye göre daha anlamlı olduğu bulunmuştur (56).

2.3.9. Mesane Kanseri : Ferrari ve arkadaşları, 32 pestisite maruz kalan ve mesane kanseri gelişen birey ve 32 pestisite maruz kalmış sağlıklı bireyde KKD sıklığını araştırmışlar, her iki grubun da periferik kan lenfositlerinde KKD oranının

31 kontrole göre anlamlı bir artış gösterdiğini bulmuşlardır. Bu artışın pestisite maruz kalmış, mesane kanserli olgularda daha yüksek olduğunu saptamışlardır (57).

KKD inceleme teknikleri ve mekanizması ile ilgili çok yönlü çalışılmasının nedeni, BrdU varlığında üretilen hücrelerde, belirli KKD ortalaması bulunmasına rağmen, aynı hücrelerin çeşitli kimyasal ve fiziksel mutajenlere maruz bırakıldığında cevap olarak yüksek oranda KKD göstermesidir.

KKD sıklığı karsinojenik ya da mutajenik ajanların genotoksik etkilerini değerlendirmek için sensitif markerlerin birisi olarak düşünülmektedir. Son yıllarda pek çok araştırmacı, malign hastalıklara maruz kalan bireylerin hücrelerinde KKD sıklığını araştırmıştır. Ancak malign hastalıkların hiçbirisi ile KKD arasında kesin bir ilişki bulunamamıştır. Oral kavite, KML, rektum ve kolon kanseri hastalarda lenfositik KKD'nin değişmediği bildirilmektedir. Diğer yandan malign lenfomalı, malign melanomalı ve akut lenfoblastik lösemili (ALL), akciğer kanserli, over kanserli, meme kanserli, mesane kanserli hastalarda lenfositik KKD sıklığının arttığı bulunmuştur. Hatta bir araştırma, artmış KKD sıklığının uterin-serviks kanseri için bir prelinik marker olabileceğini belirtmektedir.

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi ve Isparta Devlet Hastanesi Üroloji Bölümüne başvuran ve sistoskopi yapılarak mesanede tümörün varlığı, sayısı, infiltrasyon durumu ve birlikte bulunan diğer patolojiler görülüp değerlendirilerek, tümör kaidesinden ve yakın çevresinden biopsiler alınarak patolojik tanısı konmuş, tedavi görmemiş 17 mesane kanserli erkek olgudan, ameliyat öncesi venöz periferik kan heparinize enjektör ile alındı. Ayrıca olgularla aynı yaş ve sekste, aynı özellikte, yakın zamanda hastalık geçirmemiş sağlıklı, gönüllü 17 kontrol bireyden de örnekler alınarak toplam 34 bireyde KKD analizi yapıldı.

3.2. Metod

3.2.1. Kùltürlerin Kurulması

Kullanılan Solüsyonlar

Besi ortamının hazırlanması :

Mc Coy's 5A (Irvine Scientific)	100 ml.
Fetal Bowine Serum (Irvine Scientific)	20 ml.
Fitoheınağlutinin (Irvine Scientific)	2,5 ml.
Penisilin / Streptomisin (Irvine Scientific)	1.0 ml.
L- Glutamin (Irvine Scientific)	1.0ml
Water For Cell Culture (Irvine Scientific)	5 ml.

100 ml. Mc Coy's 5A içerisine, yukarda miktarları verilen maddeler ilave edilerek hazırlanan besiyeri, ağız parafilmle sarılarak buzdolabında +4 °C'de saklandı.

5-Broma-2 deoxyuridine (BrdU) solüsyonunun hazırlanması :

6,5 mgr. BrdU (Sigma) 12,5 ml. Mc Coy's 5A besi ortamı içinde çözüldü. Stok olarak hazırlanan bu solüsyon steril, ağız kapaklı bir tüpe konup üzeri alüminyum folyo ile kaplanarak + 4 °C'de buzdolabının buzluk kısmında saklandı.

İşlemler :

Besi ortamı hazırlandıktan sonra ağız kapaklı steril doku kültürü tüplerine (Falcon, 15 cc) 5'er ml. olacak şekilde dağıtıldı. Heparin (Liquemine-Roche) ile sıvanmış enjektör ile olgulardan alınan 5 cc. kan steril şartlarda her bir tüpe 0.4-0.6 ml. olacak şekilde yaklaşık 10-13 damla kadar ilave edildi. Her tüp içine stok BrdU solüsyonundan 0.1 ml. koyularak iyice karıştırıldıktan sonra, tüplerin kapakları parafilm ile sarıldı ve tüpler alüminyum folyo ile ışık görmeyecek şekilde kaplandı. Tüpler inkübasyon için, kapalı sistem etüv içinde 37 °C'de 72 saat bırakıldı. Kontrol grubunu oluşturan bireylerin kanlarına da sıralanan işlemler yapıldı. Kanların kullanılmayan miktarları herhangi bir olumsuz durumda kullanılmak üzere enjektör içinde buzdolabında + 4 °C'de saklandı (58).

3.2.2. Kromozom Eldesi

Kullanılan solüsyonlar:

Kolçisin solüsyonu:

1 mg kolçisin (Serva) 10 ml. bidistile suda (0.1mg/ml) özüldü. Bu stok solüsyonun üst kısmından 1 ml. alındı ve 9 ml. bidistile su (10 ~~mg~~ / ml) ilave edildi.

Hipotonik solüsyonu :

0.075 M KCl (Merck) olacak şekilde 0.5592 gr. KCl tartılarak 100 ml. bidistile suda çözüldü, kullanılmak üzere 37 °C'lik etüve konuldu.

Fiksatif solüsyonu :

1 birim glacial asetik asit (Merck) üzerine 3 birim methanol (Merck) ilave edilerek iyice karıştırıldı.

Her deney aşamasında taze olarak hazırlandı. Bu solüsyonun taze olması içindeki alkolün uçuculuğu açısından önemlidir.

İşlemler :

Kromozom preparasyonu için modifiye Moorhead ve arkadaşlarının tekniği uygulandı (58). Üreme için 37 ° C'deki etüve bırakılan kültür tüplerine, kromozom eldesinden 2 saat önce yani 70. saatte 0.1 µgr /ml olacak şekilde 0.05 ml. kolçisin ilave edildi ve hafifçe karıştırıldı, tekrar 2 saat süreyle etüvde bekletildi. Yetmiş ikinci saatte etüvden çıkarılan tüpler içindeki besi ortamı pastör pipeti ile karıştırıldıktan sonra aynı pipet ile dereceli konik (10 ml'lik) santrifüj tüplerine aktarıldı. Hücrelerin birbirinden ayrılması için köpürtmeden nazikçe pipetaj yapıldı (10 kez). 1000 rpm'de 7 dakika santrifüj (Jouan ISO 9001) edildi.

Dökelti (Süpernatam) pastör pipeti ile atılarak, çökelti ile üstünde kalan 0.5 ml'lik sıvı, pastör pipeti ile karıştırıldı. Üzerine hipotonik solüsyondan (0.075 M KCl) bir pastör pipeti (3 ml.) koyularak hafifçe karıştırıldı. Hipotonik solüsyon ikinci kez ilave edildi ve pipetaj yapıldı. Toplam hacim 8-9 ml. olana kadar aynı işlem tekrarlandı. 37 ° C etüvde 10 dakika bekletildi. Süre bitiminde 1000 rpm'de 7 dakika santrifüj edildi, pastör pipeti ile dökelti atıldı. Çökelti üzerinde bırakılan 0.5 ml. hipotonik ile yavaşça çalkalandı. Cam yüzeye yapışık pıhtı kalmamasına dikkat

edilerek çok hafif pipetaj yapıldı. Pastör pipeti kanlandığı için 1-2 ml hipotonik ile pipetaj yapılarak yıkandı ve 1 pastör pipeti (2-3 ml) fiksatif çekilerek tüpün dip kısmına birden bire bırakıldı ve iyice pipetaj yapılarak hücre topluluklarının oluşması engeldi. Pastör pipeti ile 4-5 ml fiksatif ilave edilerek pipetaj yapıldı. 1000 rpm'de 7 dakika santrifüj edildi. Fiksatif solüsyonu ile yıkama işlemi 3 kez tekrarlandı. Tüpler bir gece buzdolabında bekletildikten sonra bir kez daha taze fiksatif ile yıkandı. Çökeltinin miktarına göre üzerinde belli bir miktar fiksatif (genellikle 0.5 ml.) bırakılarak dökelti atıldı. Kalan miktar yavaş yavaş pipetaj yapılarak karıştırıldı. Bir gün önceden hazırlanmış ve bidistile su içerisinde bir gece buzdolabında bekletilmiş soğuk ıslak lamlar gazlı bezle iyice kurulandı ve hohlama ile nemlendirilerek 45 derecelik açı ile 10 cm. yukarıdan 1 damla lam üzerine bırakıldı. Lamlar havada kurutuldu. Yayma işlemi yapılan preparatlar, kapalı sistem etüvde 37 °C'de 1-2 hafta süre ile yaşlandırıldı.

3.2.3. Kardeş Kromatid Değişimi Boyama Tekniği

Kullanılan solüsyonlar:

Hoechst stok solüsyonu:

1 mg Hoechst (Sigma) 10 ml. bidistile suda çözüldü. Bir tüpe koyularak ağzı parafilm ile sarılıp, alüminyum folya ile sarılı olarak buzdolabında + 4 °C'de saklandı.

McBouline fosfat tampon solüsyonu:

A solüsyonu : 1.922 gr. Sitrik asit (0.1 M Merck) 100 ml.bidistile suda çözüldü.

B solüsyonu : 3.5598 gr. Na₂HP₄2H₂O (Merck) 100 ml.bidistile suda çözüldü. Na₂HP₄2.H₂O solüsyonuna pH 7.1 oluncaya kadar sitrik asit solüsyonu damlatıldı.

2xSSC solüsyonu :

A solüsyonu : 1.7530 gr. NaCl (0,3 M Merck) 100 ml. bidistile suda çözüldü.

B solüsyonu : 0.8823 gr. Na-sitrat (0.03 M Merck) 100 ml. bidistile suda çözüldü. Her iki solüsyon bire bir olacak şekilde karıştırıldı. Sitrik asit ile PH 7.2'ye ayarlandı.

Söransan tamponu :

A solüsyonu : 9.08 gr. KH_2PO_4 (Merck) 1 lt bidistile suda çözüldü.

B solüsyonu : 11.88 gr. Na_2HPO_4 (Merck) 1 lt bidistile suda çözüldü. Balon jöjeye A solüsyonundan alınarak pH 6.8'e gelinceye kadar B solüsyonu eklenerek 2 solüsyon karıştırıldı.

Giemsa boya solüsyonu :

5 ml. Giemsa lösing (Merck), 95 ml pH 6.8'lik söransan tamponu içine ilave edilerek 100 ml'ye tamamlandı.

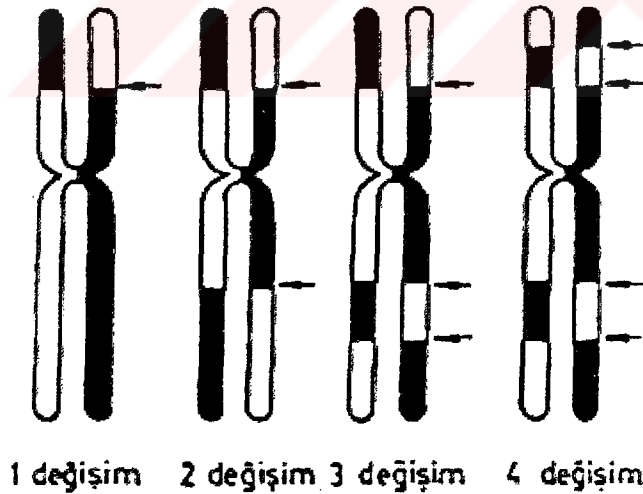
İşlemler :

Korenberg ve arkadaşlarının önerdikleri modifiye boyama yöntemi kullanıldı (58). Boyama işlemi yapılmadan önce yaşanan preparatlar bir süre oda ısısında bekletildi. Hoechst stok boya çözeltisinden 1 ml. alınıp 100 ml'ye bidistile su ile tamamlanmış solüsyonda, preparatlar karanlık ortamda 20 dakika bekletildi. Bu süre sonunda çıkarılan preparatlar, hazırlanmış McBouline fosfat tampon içinde 4-5 kez çalkalanarak petri kaplarına aktarıldı ve üzerine preparatların üstünü örtecek şekilde aynı tampondan ilave edildi. Petriler 25 cm. yükseklikteki UV. lambası altına yerleştirildi. Bir saat UV'ye tabi tutulan preparatlar oda sıcaklığındaki 2xSSC'tamponunda 4-5 kez çalkalandı ve 60 °C'deki benmaride (Termal) 1 saat 2 x SSC'de bekletildi. Preparatlar çıkarılıp oda ısındaki 2x SSC'de 4-5 kez çalkalandıktan sonra havada kurutuldu. % 5'lik Giemsa'da 6.5 dakika boyandı.

Musluk suyundan geçirilip kurutma kağıdı ile kurutuldu. Ksilen (Merck) içinde 1 saat kadar bekletilip entellan (Merck) yardımı ile kapatılıp, mikroskopta immersiyon yağı ile 100'lük objektifle incelendi.

3.2.4. Kardeş Kromatid Değişiminin Değerlendirilmesi

Her olgu ve birebir kontrol bireyi için, iyi dağılmış 25 metafazdaki KKD oranları, 100x'lık mikroskop (Nikon) altında incelendi. Ortalama değerler, kromozom boyları ve sentromer pozisyonları dikkate alınarak A₁, A₂, A₃, B, C-X, D, E, F, G-Y olmak üzere 9 grup içindeki her kromozomun birli, ikili, üçlü ve dördü değişimlerdeki kırık noktaları sayılarak saptandı (Şekil 6) ve özel olarak hazırlanan formlara kaydedildi (Ek 1-2). Her bir metafazda gözlenen toplam değişim değeri belirlendi ve her olgu için 25 metafaz değerlendirilerek değişimlerin ortalaması alındı.



Şekil 6. KKD'de 1'li, 2'li, 3'lü ve 4'lü değişimlerin şematik görünümü.

Oligu Adi;	Preperat No;	Koordinat No;	Metafaz No;	1 Deg#	2 Deg#	3 Deg#	4 Deg#	5 Deg#	6 Deg#	7 Deg#	8 Deg#	9 Deg#	10 Deg#	11 Deg#	12 Deg#	13 Deg#	14 Deg#	15 Deg#
A1																		
A2																		
A3																		
B																		
C-X																		
D																		
E																		
F																		
G-Y																		

EK - 1

OLGU ADI:

M.S.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	Toplam
GRUP:																										
A1																										
A2																										
A3																										
B																										
C-X																										
D																										
E																										
F																										
G-Y																										
Toplam																										

EK - 2

3.2.5. Mesane Kanserli Hastaların Değerlendirilmesi

Çalışmaya alınan mesane kanserli olgular pelvik tomografi, transrektal Ultrasonografi ve alınan tümör dokusu örneklerinin patolojik incelemelerine göre, yüzeysel, (Evre A) ve invaziv (Evre B, C, D) olarak sınıflandırıldı. Ayrıca patolojik bulgulara göre vakalar grade I, II, III ve IV olarak sınıflandırıldı. Kanserli hastalar sigara içenler ve içmeyenler olarak gruplandırıldı. Tüm gruplar KKD değerleri açısından birbiri ile karşılaştırıldı.

3.2.6. İstatistik Yöntem

Her olgu ve kontrol bireyi için ortalama değişim değeri elde edildi. Bu değerlere göre olguların ve bire bir kontrol grubu bireylerin KKD değerleri ve her iki çalışma grubunun kromozom grupları arasındaki değerler “iki ortalamanın arasındaki farkın anlamlılık testi (Student-t testi)”, “Mann-Whitney U testi” ve “Varyans Analizi (Anova test)” kullanılarak, istatistiksel açıdan önemlilik derecelerine göre değerlendirildi. İstatistiksel analizler **Graphpad InStat tm** istatistik programı ile bilgisayarda yapıldı. İstatistiksel analizlerde $p < 0.05$ anlamlı kabul edildi. Değerler ortalama \pm standart sapma olarak verildi.

3.2.7. Fotoğrafik İşlemler

Tezde örnek olarak verebilmek için kaliteli olan birkaç metafazın 100x objektifle immersiyon yağı altında Olympus B0 071 marka fotomikroskop ile 100 ASA'lık Ilforda Kodak filmi kullanılarak fotoğrafları çekildi. Basım için Ilford Ilfobrom 4. I P kontrast kağıdı kullanıldı (Resim).

Bu çalışmada, Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi ve Isparta Devlet Hastanesi Üroloji Bölümünde, mesaneden sistoskopi yapılarak alınan biyopsi materyalinde patolojik olarak tanısı konmuş, 17 mesane kanserli olgudan alınan kan örneklerinde ve birebir kontrollerde KKD analizi yapıldı.

4.1. Mesane Kanserli Hastaların Bulguları

Mesane kanserli hastaların yaş / seks, patolojik tanı (grade) ve kanser evresi (stage), sigara alışkanlığı ve sigara kullanım süresi, alkol alışkanlığı durumları ve ortalama KKD değerleri Tablo 1 de verilmiştir.

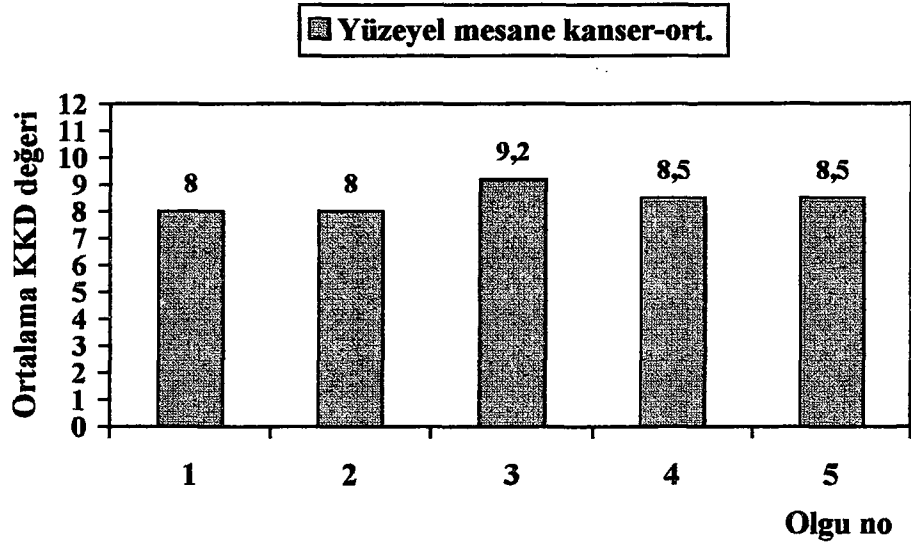
Olguların yaşları 52 ile 72 arasında değişmektedir, yaş ortalaması 64.17 ± 5.96 olarak saptanmıştır. Olgularımız arasında mesane tümörlü hiç bayan hasta yoktur. Pelvik tomografi, transrektal USG ve alınan tümör dokusu örneklerinin patolojik incelemeleri ile 12 olgunun invaziv mesane tümörü (Evre B, C, D), 5 olgunun ise yüzeysel mesane tümörü (Evre A) taşıdıkları saptanmıştır. 12 invaziv mesane tümörlü olgunun 7 tanesi Evre B, 4 tanesi Evre C, 1 tanesi de Evre D olarak tanımlanırken, 5 yüzeysel mesane tümörlü olguda Evre A olarak tanımlanmıştır. Patolojik incelemeler sonunda 17 mesane kanserli olgudan 7 tanesi Grade I, 4 tanesi Grade II, 3 tanesi Grade III ve 3 tanesi de Grade IV olarak bulunmuştur.

Olguların 11 tanesinde uzun süreli sigara kullanımı mevcuttur. 5 olgu hiç sigara içmezken, 2 olgunun ise sigara içmiş ama uzun yıllar önce sigarayı bıraktığı öğrenilmiştir. Olguların sadece 1 tanesinde alkol kullanımı mevcuttur.

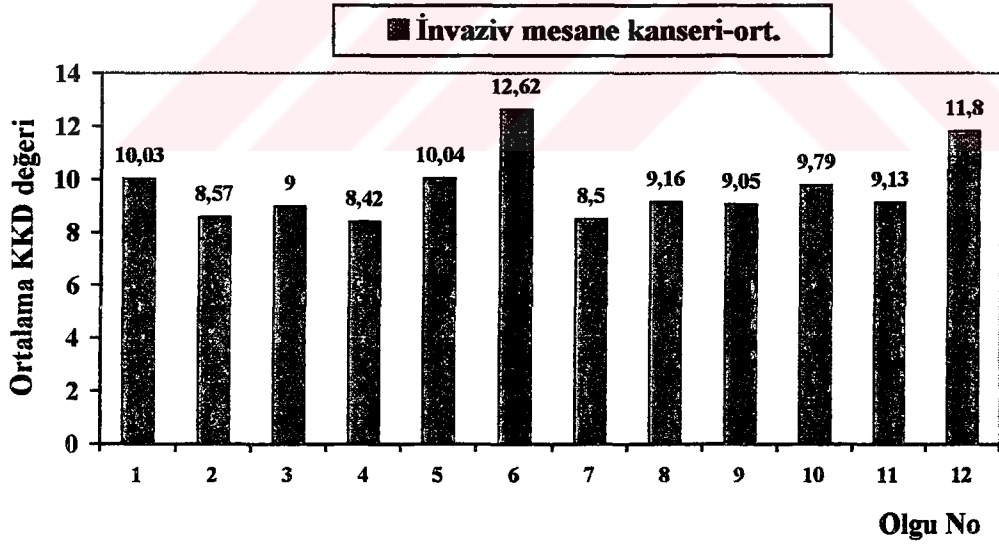
Tablo 1- Mesane kanserli olguların yaş / seks, alkol kullanımı, sigara kullanımı ve sigara kullanım süresi, kanser evresi (stage), patolojik tanı (grade) ve ortalama KKD değerleri

Olgu No	Yaş ve Seks	Alkol Kullanımı (+/-)	Sigara Kullanımı (+/-)	Sigara Kullanım Süresi	Evre (Stage)	Grade	Ortalama KKD
1	66/E	-	+	40 yıl	A	I	8,0
2	65/E	+	+	40 yıl	A	I	8,0
3	55 /E	-	+	40 yıl	A	II	9,2
4	66/E	-	-	-	A	I	8,5
5	52/E	-	-	-	A	I	8,5
6	70/E	-	+	50 yıl	C	IV	10,03
7	70/E	-	+	50 yıl	B	II	8,57
8	68/E	-	+	52 yıl	B	II	9,0
9	56/E	-	+	45 yıl	B	III	8,42
10	57/E	-	-	-	B	II	10,04
11	68/E	-	+	28 yıl 20 yıldır içmiyor	D	IV	12,62
12	64/E	-	+	40 yıl	C	IV	8,5
13	60/E	-	-	-	C	I	9,16
14	67/E	-	+	40 yıl	C	I	9,05
15	69/E	-	+	45 yıl	B	III	9,79
16	72/E	-	+	30 yıl 20 yıldır içmiyor	B	I	9,13
17	66/E	-	-	-	B	III	11,8

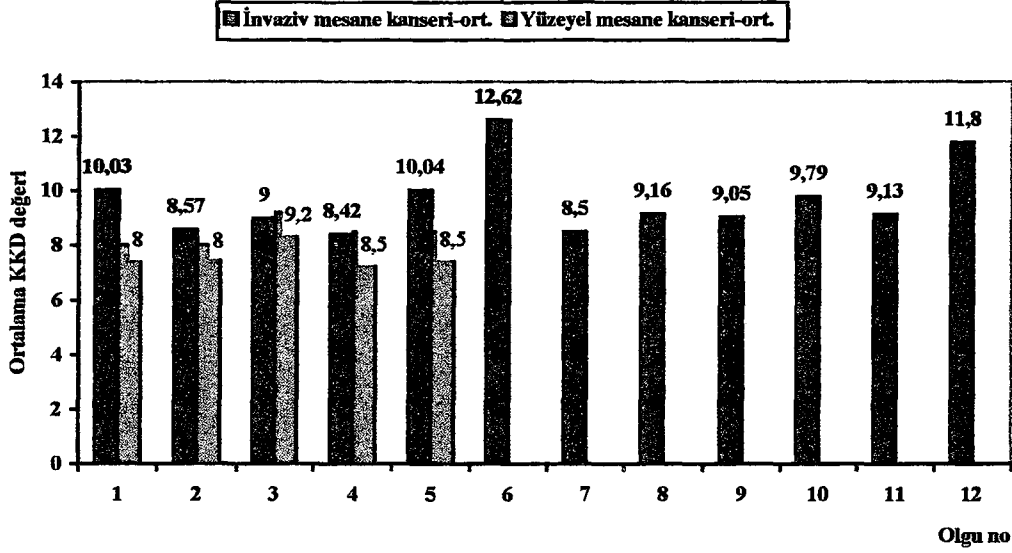
Yüzeyel ve invaziv mesane kanserli olguların KKD değerleri grafik 1 ve 2'de verilmiştir. Her iki grubun KKD değerleri açısından karşılaştırılması, grafik 3'de görülmektedir (Grafik 1, 2, 3).



Grafik 1- Yüzeyel mesane kanserli olguların ortalama KKD değerleri



Grafik 2- İnvaziv mesane kanserli olguların ortalama KKD değerleri.



Grafik 3- İnvaziv ve yüzeysel mesane kanserli bireylerin ortalama KKD değeri

Olgularla aynı yaş, seks ve özellikteki 17 kontrol birey ve 17 olgudan elde edilen KKD dağılımları Mann-Whitney U Testi, Student-t Testi ve Varyans Analizi (Anova Test) ile karşılaştırılmıştır.

Olgulara ait preparatlarda, 25 metafazda sayım yapılmıştır. Her bir olgu için metafazlarda gözlenen 1'li, 2'li, 3'lü ve 4'lü değişimler Ek 1'deki formlara kaydedilmiştir. Her bir metafazdaki toplam kırıklar ise Ek 2'de ki formlara işlenmiştir. Onyediy mesane kanserli bireyin hücre başına düşen ortalama KKD değeri 9.31 olarak saptanmıştır (Tablo 2). Mesane kanserli olgular arasında hücre başına en düşük ortalama 8.00 olarak saptanırken, maksimum değer de 12.62'dir (Tablo 2).

Tablo 2. Mesane kanserli olguların hücre başına düşen ortalama KKD değeri, minimum ve maksimum KKD değerleri

Mesane Kanserli Olgular	
KKD /Hücre	9.31
Standart sapma (SD)	1.26
Minimum değer	8.00
Maksimum değer	12.62

Mesane tümörlü olgular kendi aralarında invaziv ve yüzeysel mesane tümörlü olgular olarak sınıflandırıldığında ise, yüzeysel mesane tümörlü olguların hücre başına düşen ortalama KKD değeri 8.44, invaziv mesane tümörlü olguların hücre başına düşen ortalama KKD değeri ise 9.68 olarak bulunmuştur (Tablo 3). Mesane kanserli bireylerden oluşan her iki grup arasındaki fark **Mann-Whitney U** testine göre anlamlı bulunmuştur ($p = 0.03$).

Tablo 3. İnvaziv ve yüzeysel mesane kanserli olguların genel ortalama KKD değerleri, minimum ve maximum değerleri

Olgular	İnvaziv Mesane Kanserli	Yüzeysel Mesane Kanserli
KKD / Hücre	9.68	8.44
Standart sapma (SD)	1.32	0.49
Minimum değer	8.42	8.00
Maximum değer	12.62	9.20

Mesane kanserli bireyler kendi aralarında sigara içen mesane kanserli olgular ve sigara içmeyen mesane kanserli olgular olarak değerlendirilmiştir. Buna göre sigara içen mesane kanserli olguların hücre başına düşen ortalama KKD değeri 9.2 ± 1.08 , sigara içmeyen mesane kanserli olguların hücre başına düşen ortalama KKD değeri 9.58 ± 1.73 olarak saptanmıştır. Her iki grup arasındaki fark **Student -t** testine göre anlamlı bulunmamıştır ($p = 0.6$).

Mesane tümörlü 17 hasta gradelerine göre gruplandırılmış ve her grubun hücre başına düşen ortalama KKD değerleri arasında istatistiki olarak bir fark bulunmamıştır ($p>0.05$) (Tablo 4). Yalnız grade arttıkça KKD'de de bir artışın olduğu da açıkça görülmektedir.

Tablo 4. Mesane kanserli olguların grade'lerine göre hücre başına düşen ortalama KKD değerleri.

Mesane Kanserli Bireyler				
Grade	Grade I	Grade II	Grade III	Grade IV
KKD / Hücre	8.62	9.20	10.00	10.38
Standart sapma(SD)	0.50	0.61	1.70	2.08

4.2. Kontrol Grubu Bireylerin Bulguları

Hastaların her biri ile aynı yaş ve cinsiyetteki 17 kontrol bireyin, incelenen 25 metafazda hücre başına düşen ortalama KKD değeri 7.83 olarak saptanmıştır. Kontrol bireyler arasında hücre başına en düşük ortalama 7.00, en yüksek ortalama 8.41 olarak bulunmuştur (Tablo 5).

Tablo 5. Kontrol grubu bireylerin hücre başına düşen ortalama KKD değeri, minimum ve maksimum KKD değeri

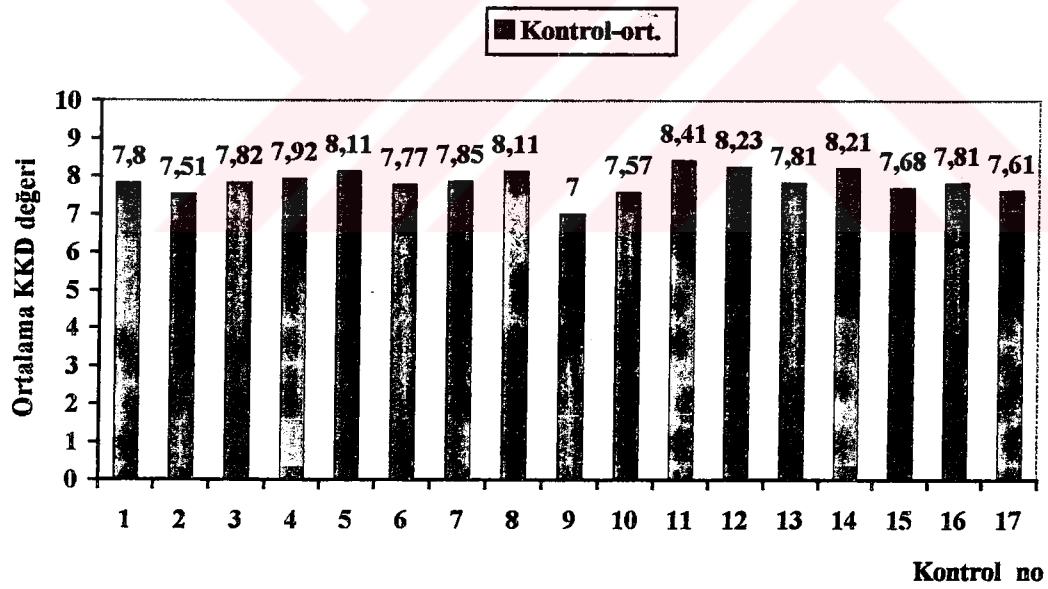
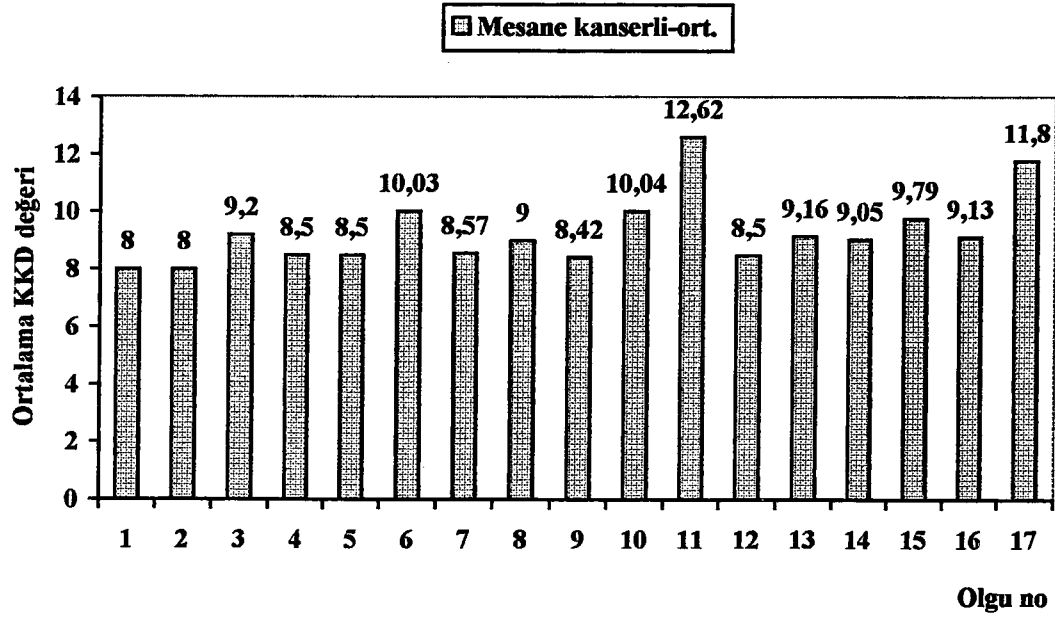
Kontrol Grubu Bireyler	
KKD /Hücre	7.83
Standart sapma (SD)	0.33
Minimum değer	7.00
Maxium değer	8.41

4.3. Mesane Kanserli Hastaların ve Kontrollerin Genel Ortalama KKD Oranları ve Kromozom Grupları Arasındaki KKD Değerlerinin Karşılaştırılması

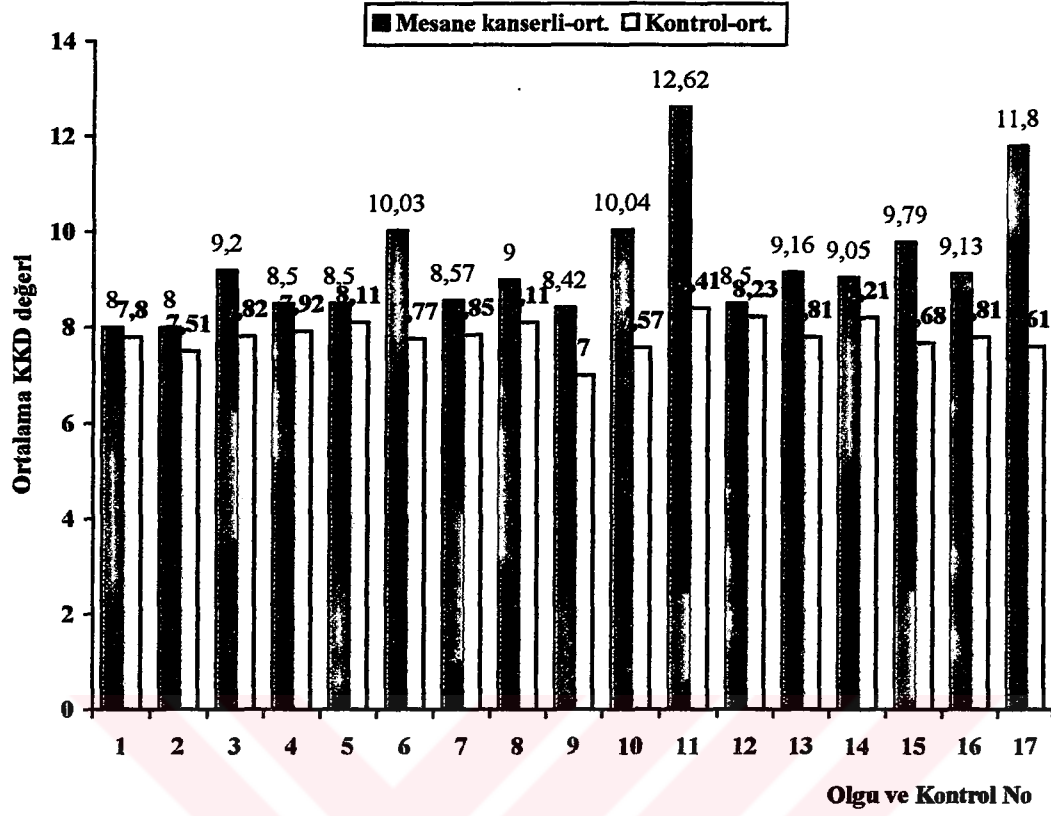
Hücre başına düşen ortalama KKD değerlerinin kontrol grubu bireyler ve mesane kanserli olgular arasında önem kontrolü yapıldığında, kontrol grubunda hücre başına düşen ortalama KKD değeri 7.83 ± 0.33 , mesane kanserli olgularda ise 9.31 ± 1.26 olarak saptanmıştır (Tablo 6). Her iki grup arasındaki fark **Mann-Whitney U** testine göre oldukça anlamlı bulunmuştur ($p < 0.0001$). Ayrıca KKD değerleri açısından iki grubun karşılaştırılması grafik 4 ve 5’de görülmektedir (Grafik 4 ve 5).

Tablo 6. Mesane kanseri ve kontrol bireylerinin genel ortalama KKD’leri

Olgu	Mesane Kanseri	Kontrol
KKD/Hücre	9.31	7.83
Standart Sapma (SD)	1.26	0.32



Grafik 4- Mesane kanserli olgu ve kontrollerin ortalama KKD değerleri



Grafik 5- Olgu ve Kontrollerin Ortalama KKD Değerlerinin Karşılaştırılması

Kontrol bireyleri ve meme kanserli olguların A₁, A₂, A₃, B, C -X, D, E, F ve G-Y şeklinde morfolojik olarak sınıflandırılmış kromozom grupları arasında KKD dağılımı incelenerek her gruptaki KKD değişimleri değerlendirilmiştir (Tablo 7 ve 8).

Tablo 7. Kontrol grubu bireylerin kromozom gruplarının Ortalama KKD Değeri

Kontrol No	A₁	A₂	A₃	B	C-X	D	E	F	G-Y
1	30	18	14	30	58	20	10	10	5
2	29	17	14	29	56	19	8	10	5
3	31	19	13	28	60	22	8	10	5
4	28	21	15	27	61	23	9	9	5
5	28	22	18	26	64	21	8	10	6
6	35	20	20	29	65	14	4	5	2
7	30	20	15	27	61	21	8	10	3
8	32	19	19	30	63	20	9	7	4
9	25	15	16	28	55	18	7	7	4
10	30	18	14	29	57	17	10	8	6
11	34	22	23	35	65	20	5	4	2
12	40	18	18	36	62	18	7	4	3
13	35	20	19	31	55	21	8	6	0
14	41	17	18	30	68	24	4	2	1
15	38	23	20	30	51	15	7	8	0
16	26	28	18	27	61	16	7	4	8
17	36	20	12	28	60	18	8	6	2
Toplam :	548	337	286	500	1022	327	127	120	61
Ortalama :	32.24	19.82	16.82	29.41	60.12	19.23	7.47	7.05	3.58
Standart									
Sapma :	4.72	2.94	2.98	2.67	4.37	2.75	1.77	2.60	2.23

Tablo 8- Yüzeysel ve İnvaziv Mesane Kanserli Bireylerin Kromozom Gruplarının Ortalama KKD Değerleri

Yüzeysel Mesane Kanser No	A₁	A₂	A₃	B	C-X	D	E	F	G-Y
1	30	17	17	28	58	21	11	14	4
2	30	18	16	28	59	20	9	9	11
3	28	25	30	43	67	20	5	5	7
4	27	27	23	16	82	14	9	6	9
5	26	28	23	16	80	16	9	7	8
Toplam :	141	115	109	131	346	91	43	41	39
Ortalama :	28.2	23.0	21.8	26.20	69.20	18.20	8.60	8.20	7.8
Standart Sapma :	1.79	5.15	5.60	11.14	11.34	3.03	2.19	3.56	2.58
İnvaziv Mesane Kanser No	A₁	A₂	A₃	B	C-X	D	E	F	G-Y
6	38	22	42	54	70	11	11	6	6
7	27	30	10	37	82	12	8	3	4
8	29	27	25	38	81	9	7	6	3
9	29	27	20	20	75	15	4	8	3
10	35	37	45	45	58	13	10	3	6
11	63	20	43	70	110	10	8	3	6
12	28	10	17	35	86	19	8	5	5
13	22	25	21	53	74	15	8	5	6
14	30	23	20	39	71	23	13	7	7
15	31	24	32	38	73	21	13	8	5
16	19	27	25	38	81	19	6	7	7
17	31	37	25	57	95	28	8	8	6
Toplam :	382	309	325	524	956	195	104	69	63
Ortalama :	31.83	25.75	27.08	43.67	74.67	16.75	8.66	5.75	5.33
Standart Sapma :	11.04	7.27	11.14	13.02	13.28	6.64	2.67	1.96	1.37
Genel Toplam :	523	424	434	655	1302	286	147	110	102
Genel Ortalama :	30.76	24.94	25.53	38.53	76.59	17.18	8.65	6.4	6.06
Genel Standart Sapma :	9.35	6.68	9.96	14.66	13.33	5.76	2.47	2.67	2.08

Kontrol grubu bireylerin kromozom grupları **Varyans Analizi (Anova Test)** ile karşılaştırılmış, istatistiksel olarak gruplar arasındaki fark anlamlı bulunmuştur ($p < 0.0001$, F: 523.14).

Farklılığı yaratan grupları belirleyebilmek için kromozom grupları ikişer-ikişer **Mann-Whitney U testi** ile kıyaslandığında A₁-B, A₂-D, E-F grupları arasındaki fark anlamsız ($p > 0,05$), diğer gruplar arasındaki fark anlamlı bulunmuştur ($p < 0.01$) (Tablo 9).

Tablo 9-Kontrol bireylerinde kromozom grupları arasında ortalama KKD'nin karşılaştırılması.

	Kontrol grubu	SD(\pm)	Önem Kontrolü
A ₁	32,24	4,72	p>0,05
B	29,41	2,67	
A ₂	19,82	2,94	p>0,05
D	19,23	2,75	
E	7,47	1,77	p>0,05
F	7,05	2,60	

Aynı şekilde mesane kanserli olguların kromozom grupları arasında da "**Varyans Analizi**" (Anova Test) ile karşılaştırma yapılarak gruplar arası fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.0001$, F: 110). Farklılığa neden olan grupları belirleyebilmek için kromozom grupları ikişer-ikişer **Varyans Analizi testi** ile kıyaslandığında A₂, A₃, F-G-Y grupları arasındaki fark anlamsız ($p > 0.005$), diğer gruplar arasındaki fark anlamlı bulunmuştur ($p < 0.01$) (Tablo 10).

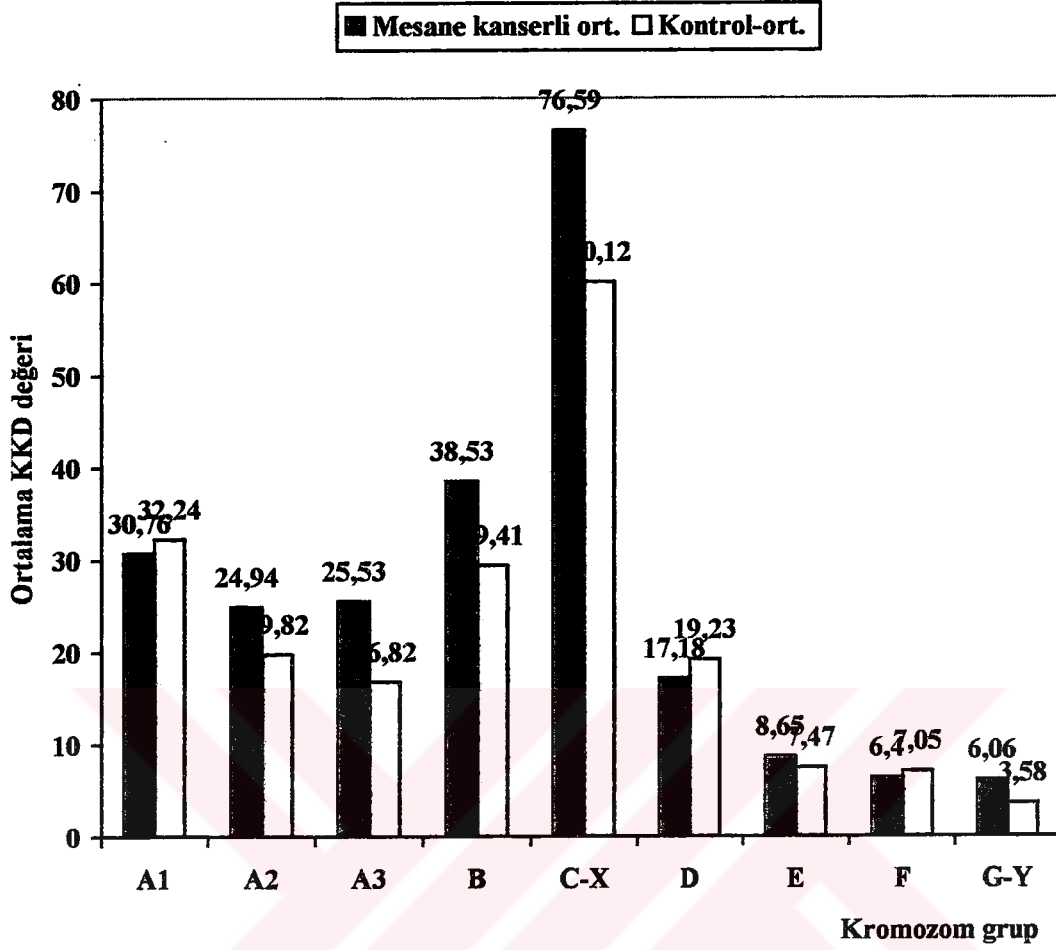
Tablo 10. Mesane kanserli olgularda kromozom grupları arasında ortalama KKD'nin karşılaştırılması

	Ortalama KKD Değeri	Standart (\pm) Sapma	Önem Kontrolü
A ₂	24.94	6.68	p>0,05
A ₃	25.53	9.96	
F	6.40	2.67	p>0,05
G-Y	6.06	2.08	

Kontrol bireyleri ve mesane kanserli olgular arasındaki her bir kromozom grubunun değerleri **Mann-Whitney U** testi ile kıyaslandığında A₁, D, E ve F'de istatistiki olarak anlamlı fark bulunmazken (p>0,05), diğer gruplar arasındaki fark anlamlı olarak gözlenmiştir (Tablo 11). Kromozom grupları arasındaki farklar Grafik 6'da görülmektedir (Grafik 6).

Tablo 11. Kontrol grubu ile mesane kanserli grubun kromozom gruplarında gözlenen ortalama KKD'lerinin karşılaştırılması

Kromozom Grubu	Kontrol Grubu Ort.KKD \pm SD	Mesane Kanserli Olgu Ort. KKD \pm SD	Önem Kontrolü (P)
A ₁	32.24 \pm 4.72	30.76 \pm 9.35	p>0.1
A ₂	19.82 \pm 2.94	24.94 \pm 6.68	p<0.005
A ₃	16.82 \pm 2.98	25.53 \pm 9.96	p<0.001
B	29.41 \pm 2.67	38.53 \pm 14.66	p<0.01
C-X	60.12 \pm 4.37	76.59 \pm 13.33	p<0.0001
D	19.23 \pm 2.75	17.18 \pm 5.76	p>0.1
E	7.47 \pm 1.77	8.65 \pm 2.47	p>0.1
F	7.05 \pm 2.60	6.4 \pm 2.67	p>0.5
G-Y	3.58 \pm 2.23	6.06 \pm 2.08	p<0.002

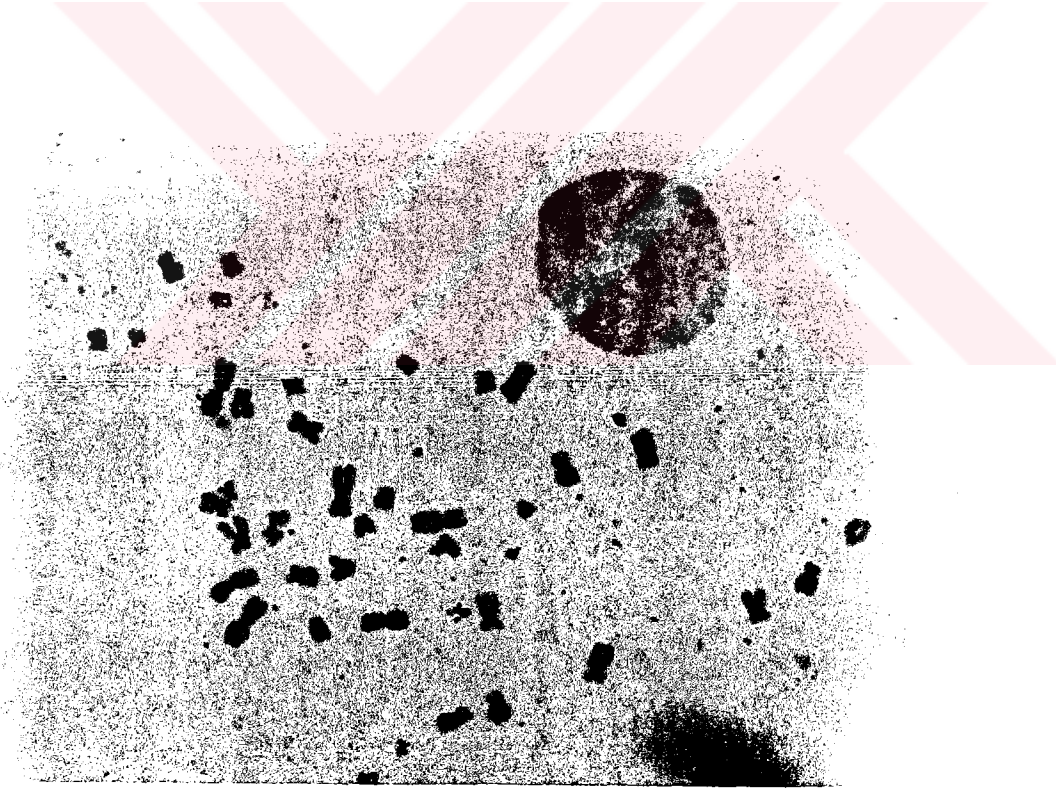
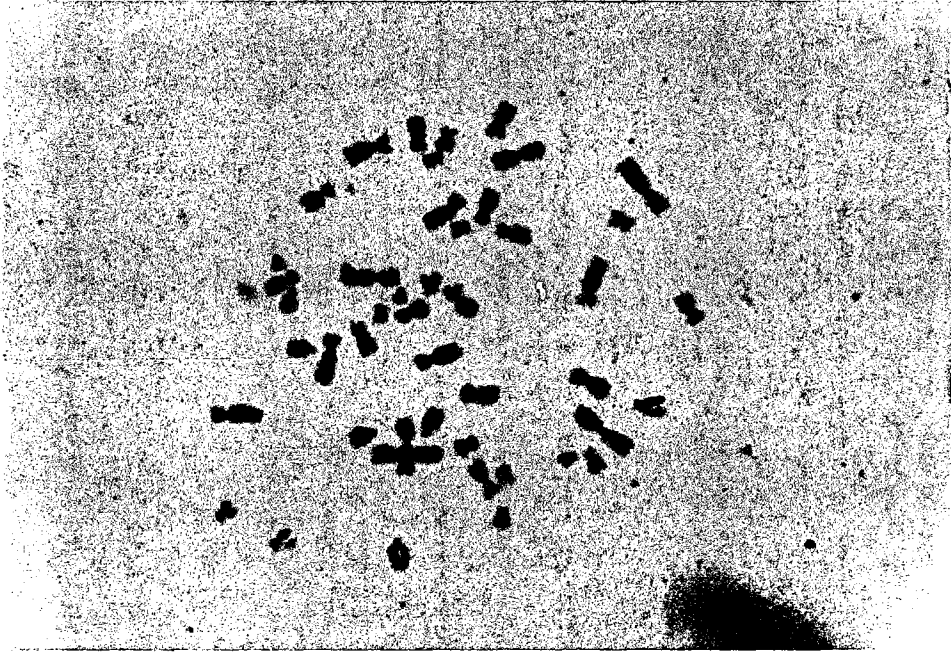


Grafik 6- Olgu ve kontrollerin kromozom gruplarındaki ortalama KKD değeri

Mesane kanserli olgular, patolojik olarak yüzeysel ve invaziv mesane kanserli olgular olmak üzere kendi aralarında iki ayrı grupta değerlendirildiğinde A₃, B ve G-Y grupları arasındaki fark **Mann-Whitney U** testine göre istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur (Tablo 12).

Tablo 12. Yüzeyel ve invaziv mesane kanserli olguların kromozom gruplarında gözlenen ortalama KKD'lerin karşılaştırılması

Kromozom Grubu	Kanser evresi	Ortalama KKD Değeri	SD	Önem Kontrolü
A ₁	İnvaziv	31.83	11.04	p>0.05
	Yüzeyel	28.20	1.79	
A ₂	İnvaziv	25.75	7.27	p>0.05
	Yüzeyel	23.00	5.15	
A ₃	İnvaziv	27.08	11.14	p<0.05
	Yüzeyel	21.8	5.60	
B	İnvaziv	43.67	13.02	p<0.05
	Yüzeyel	26.20	11.14	
C-X	İnvaziv	74.67	13.28	p>0.05
	Yüzeyel	69.20	11.34	
D	İnvaziv	16.75	6.64	p>0.05
	Yüzeyel	18.20	3.03	
E	İnvaziv	8.66	2.67	p>0.05
	Yüzeyel	8.60	2.19	
F	İnvaziv	5.75	1.96	p>0.05
	Yüzeyel	8.20	3.56	
G-Y	İnvaziv	5.33	1.37	p<0.05
	Yüzeyel	7.8	2.58	



Resim : KKD görülen iki ayrı metafaz örneği

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Kardeş kromatid değişimi, genetikçiler tarafından in-vitro hücre çoğalmasında gözlenen birkaç tipte kromatid değişiminden biri olarak bilinmektedir (59, 60). KKD'inin krossing-over'e benzeyen resiprokal değişimle, kardeş kromatidler arasında oluştuğu, ancak yeni alelik kombinasyonların oluşmadığı deneysel çalışmalarla gösterilmiştir. KKD, çeşitli mutajen ve karsinojenlerin neden olduğu DNA hasarını saptamada, in vivo ve in vitro koşullar altında oluşma kolaylığı ve duyarlılığı nedeni ile sıklıkla kullanılan bir tetkiktir (59, 60, 61).

Otozomal resesif kırık sendromlu kişilerde yapılan moleküler genetik çalışmalar, bu grup hastaların DNA tamir mekanizmalarında bozukluklar olduğunu, bunun sonucunda kromozomlarda kırıklar, yeniden düzenlenmeler ve bazılarında KKD düzeylerinde artış meydana geldiğini göstermektedir. Bu bireylerde kromozomların genetik instabilitesi, belirtilen sendromların bir özelliği olarak karşımıza çıkmaktadır. Genetik instabilite kanser gelişimi için önceden yatkınlığı sağlayan bir özellik olarak bilinmektedir. Kırık sendromlarında kansere karşı aşırı hassasiyet bu nedendir. Hastalıkların tanısında, kromozom analizleri ve KKD incelemeleri yönlendirici olmaktadır (62).

Kanser gelişimine yatkın olan bireylerin ve mutajene maruz kalan bireylerin hücrelerinde, normal spontan KKD sıklığından daha yüksek oranda artmış KKD değerini bildiren birçok çalışma vardır (63, 64).

Araştırmalar ilerledikçe, kanserlerle ilgili olarak KKD tekniği çok değişik amaçlarla uygulanmış ve bu yöntemin uygulanan tedaviyi yönlendirmede gelecek vadettiği ileri sürülmüştür (65). Ayrıca, spontan KKD oranlarının, kanserin erken teşhisinde klinik açıdan bir prelinik marker olarak kullanılabilieceği görüşü

yaygındır. Çeşitli kanser vakalarında spontan ve farklı mutajenlerle indüklenmiş KKD analizi yapılmıştır (66, 49).

Yükselmiş KKD sıklığının, malign hastalığın gelişiminde, olası riski yansıttığı ileri sürülmektedir. Yokota, serviks karsinomlu olgularda yaptığı çalışmada, KKD sıklığı için 2 görüş belirtmektedir (67). Birinci görüşe göre, kanserli hücreleri veya normal hücrelerin kanserli hücrelere değişmiş formunu tanıyan sirküle lenfositlerde, DNA hasarının gelişmesi ve bunun sonucunda kanserli hastaların KKD sıklığında artış gözlenmesidir. İkinci görüş ise, bilinmeyen bazı nedenlerle, normal birey lenfositlerine göre lenfositlerinde aşırı DNA hasarı olan bireylerin, kanser olma eğiliminin yüksek olmasıdır. Bu görüşe göre DNA hasarı olan bireylerde, DNA tamir mekanizması yada direkt veya indirekt ajanların etkisine bağlı genetik instabilitenin de olabileceği düşünülebilir. Yapılan bazı çalışmalarda, KKD sıklığının kanser evresi ile korelasyon gösterdiği bildirildiğinden, ilk görüşün daha uygun olduğu görülmektedir.

Son yıllarda pek çok araştırmacı tarafından malign hastalığa maruz kalan kişilerin lenfositlerinde KKD sıklığı araştırılmıştır. KKD'nin oral kavite (53), meme (68), Malign lenfoma (39) ve kronik miyeloid lösemili hastalarda (41) değişmediği bildirilirken, birçok çalışmada lenfositik KKD sıklığının malign lenfomalı (38), akut lenfoblastik lösemili (42), Akciğer kanserli (47), meme kanserli (53, 1) hastalarda arttığı bildirilmektedir. Bir başka çalışmada ise uterin - serviks kanserli hastalarda artmış KKD sıklığının bir prelinik marker olabileceği belirtilmektedir (49).

Otuzbir Akciğer kanserli hasta ve benzer bölgeden aynı sosyo - ekonomik durumdaki 35 sağlıklı kontrolde yapılan bir çalışmada KKD'inin kanserli hastalarda anlamlı olarak daha yüksek olduğu bildirilmektedir (69). Bu çalışmada sitogenetik hasarın kanserle ilgili bir biomarker olduğu belirtilmektedir.

Yapılan bir çalışmada over kanserli hastalarda KKD sıklığının kontrollere göre daha yüksek olduğu bulunmuştur ($6.34 \pm 0,09$ 'a karşı 4.47 ± 0.12). Aynı çalışmada, KKD sıklığının kanserin evresi ile anlamlı olarak arttığı bildirilmektedir (70).

Adhvaryu ve arkadaşları, yaş aralığı 25-60 olan toplam 40 meme kanserli olgunun, mastektomi öncesi alınan periferik kan lenfositlerinde ortalama KKD'yi 7.72 ± 1.41 bulmuş, 40 kontrol grubu bireyde bu değerin 6.28 ± 0.87 olduğunu saptamışlardır. Kontrol grubuna göre bu artışın istatistiki olarak önemli olduğu vurgulamış, ameliyattan 3-6 ay sonra 8 hastada yaptıkları KKD analiz sonuçlarının, ameliyat öncesine göre önemli derecede düştüğünü bulmuşlardır (45).

Öztürk'ün yaptığı çalışmada ise, 24 meme kanserli olgunun hücre başına düşen ortalama KKD değeri 9.49 ± 1.315 bulunmuş ve bu değerin istatistiki olarak 24 birebir kontrol bireyden (7.70 ± 0.847) farklı olduğu görülmüştür ($p < 0.001$) (1).

Erkek ürogenital sistemi organlarından prostatın adenokanseri ile KKD sıklığı arasındaki ilişkinin araştırıldığı bir çalışmada, 24 prostat kanserli hasta ve 40 kontrol hastası kullanılmıştır. Ortalama KKD sıklığı hastalarda 9.14 ± 0.62 , kontrollerde 5.94 ± 0.25 bulunmuştur ($p < 0.05$) (56).

Araştırmalarımız sırasında mesane kanserli hastalarda KKD'nin araştırıldığı yalnız bir çalışma bulabildik (57). Bu çalışmada 32 tane pestisitlere maruz kalan mesane kanserli hasta değerlendirilmiştir. Mesane kanserli hastalarda KKD sıklığı 5.45 ± 0.35 , kontrol grubunda ise bu değer 3.77 ± 0.15 olarak bulunmuştur ($p < 0.05$). Çalışmada mesane kanserli hastaların tamamı pestisite maruz kaldığı için, KKD sıklığındaki bu anlamlı yükselişin pestisite bağlı olduğu bildirilmiştir.

Olgularımızın yaş aralığı 52-72 (ort. 64.17 ± 5.96) arasında değişim göstermektedir. Olguların hepsi erkektir ve kendileri ile aynı yaş ve cinsiyetteki birebir kontroller ile karşılaştırılmıştır.

İnvaziv mesane kanseri taşıyan bir olgumuzda (Mesane kanseri-17), mesane kanseri teşhisi konduktan 4 ay sonra, erkek ürogenital organlarından olan prostatta ikinci bir kanser gelişimi olmuştur. Evre B ve Grade III'deki 17 numaralı mesane kanserli bu olgunun KKD sıklığı, aynı evre ve gradeki hastalardan (Mesane kanseri

9 ve 15) daha yüksek bulunmuştur (11.8'e karşı 9.79 ve 8.42). KKD'inde ki bu artışın ikinci bir kanser gelişimi için bir predispozan faktör olabileceği düşünülebilir.

Kanser evreleri, mesane kanserli olgularda pelvik tomografi, transrektal USG ve alınan tümör dokusu örneklerinin patolojik incelemeleri ile klinik teşhise göre genel olarak yüzeysel (Evre A) ve invaziv (Evre B, C, D) olarak sınıflandırılır.

Bu sınıflandırmaya göre yüzeysel mesane kanserli 5 olgu ve invaziv mesane kanserli 12 olgu mevcuttur. İnvaziv mesane kanserli bireylerin (6-17 nolu olgular) 7 tanesi (7, 8, 9, 10, 15, 16, 17 nolu olgular) Evre B, 4 tanesi (6, 12, 13, 14 nolu olgular) Evre C, 1 tanesi de (11 nolu olgu) Evre D mesane tümörüne sahiptir. Yüzeysel mesane kanserli (1-5 nolu olgular, Evre A) olguların hücre başına düşen ortalama KKD değeri 8.44 ± 0.49 , invaziv mesane kanserli olguların (6-17 nolu olgular Evre B, C, D) ortalama KKD değeri 9.68 ± 1.32 olarak bulunmuştur. Her iki grup arasındaki fark "Mann-Whitney U" testine göre anlamlı bulunmuştur ($p=0.03$). Tüm mesane kanserli bireylerin KKD ortalaması 9.31 ± 1.26 bulunmuş ve bu değer kontrol grubu bireylerin ortalama KKD değeri olan 7.83 ± 0.33 'den "Mann-Whitney U" istatistik testine göre oldukça anlamlı bulunmuştur ($p < 0.0001$). Mesane kanserli olgular Grade'lerine göre 4 grupta incelenmiş ve Grade I'de 7 olgu (1, 2, 4, 5, 13, 14, 16 nolu olgular), Grade II'de 4 olgu (3, 7, 8, 10 nolu olgular), Grade III'de 3 olgu (9, 15, 17 nolu olgular) ve Grade IV'de 3 olgu (6, 11, 12 nolu olgular) olduğu görülmüştür. Grade I'deki 7 olgunun ortalama KKD değeri 8.62 ± 0.50 Grade II'deki 4 olgunun ortalama KKD değeri 9.20 ± 0.61 , Grade III'deki 3 olgunun ortalama KKD değeri 10.00 ± 1.70 , Grade IV'deki 3 olgunun ortalama KKD değeri 10.38 ± 2.08 olarak bulunmuştur. Gradelerine göre 4 grup arasında istatistik olarak bir fark bulunmamıştır ($p > 0.05$). Yalnız grade arttıkça KKD'de de bir artış olduğu açıktır.

Mesane kanserli olgularda malign kitle çıkarıldıktan sonra, kemoterapi ve radyoterapi görmeden önceki KKD değerlerine bakılarak bulgulardaki KKD'nin azalıp-azalmadığına bakılabilir. Çalışmanın ikinci aşaması olarak bu düşünülmektedir.

Mesane kanserinin en önemli etiyolojik faktörlerinden bir tanesi sigara kullanımınıdır (71). Mesane kanserli hastalarda epidemiyolojik araştırma yapıldığı zaman büyük çoğunluğunun uzun yıllardır sigara kullanmakta olduğu görülür. Bizim çalışma grubumuzda da hastalarımızın 10 tanesi uzun yıllardır sigara kullanmakta (1, 2, 3, 6, 7, 8, 9, 12, 14, 15 nolu olgular), olguların 2 tanesi (11, 16 nolu olgular) ise uzun yıllar sigara içmiş ama son 20 yıldır içmemektedir. Hastaların 5 tanesi (4, 5, 10, 13, 17 nolu olgular) hiç sigara içmemiştir. Sigara içen hastaların ortalama içme süresi 44.25 senedir. Bazı çalışmalar sigara içiminin kanserli hastaların ortalama KKD'inde artışa katkıda bulunabileceğini ileri sürmektedir. Husain ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, sigara içiminin meme kanserlerinde ortalama KKD'inde artışa neden olabileceğini göstermiştir (46). Fakat mesane tümörünün KKD ile ilişkisini araştıran makale sayısı çok sınırlı olduğu için, mesane kanserli hastalar için böyle bir değerlendirmeye literatürde rastlayamadık. Çalışma grubumuzda sigara içen hastalarla, içmeyenlerin ortalama KKD sıklık değerlerini karşılaştırdık ve sigara içen mesane kanserli olguların hücre başına düşen ortalama KKD değerini 9.2 ± 1.08 bulurken, içmeyenlerin ortalama KKD değerini 9.58 ± 1.73 olarak saptadık. Her iki grup arasındaki fark "Student-t" testine göre anlamsız olarak bulundu ($p= 0.6$).

Mesane kanserinin etiyolojik faktörleri ile KKD sıklığı, malign kitle alınmadan öncesi ve sonrası KKD oranları ile ilgili daha fazla sayıda çalışmalar yapılması gerektiğine inanıyoruz. Bu çalışmalarda kontrol gruplarında, KKD'yi önemli ölçüde etkileyen yaş, cinsiyet, sigara, alkol ve çevresel koşullar göz önünde bulundurulmalıdır.

ÖZET

Klinik teşhis, pelvik tomografi, transrektal USG ve alınan tümör dokusu örneklerinin patolojik incelemesi ile mesane kanseri teşhisi konmuş 17 kanserli olguda malign kitlenin operasyonu öncesi alınan periferik kan lenfositlerinde KKD analizi yapılmıştır. Kontrol grubunu her olgu için aynı özellik, yaş ve cinsiyetteki sağlıklı bireyler oluşturmuştur.

Mesane kanserli olgulardaki ortalama KKD değeri 9.31 ± 1.26 kontrol grubunda ise 7.83 ± 0.33 olarak belirlenmiş ve her 2 grup arasındaki fark, istatistiki olarak önemli bulunmuştur ($p < 0.0001$).

Kanser evrelerine göre olgular, yüzeysel (Evre A) ve invaziv (Evre B, C, D) mesane kanserli olgular olarak sınıflandırılmış ve bu sınıflandırmaya göre yüzeysel mesane kanserli 5, invaziv mesane kanserli 12 olgu olduğu görülmüştür. Yüzeysel mesane kanserli olguların ortalama KKD değeri 8.44 ± 0.49 , invaziv mesane kanserli olguların ortalama KKD değeri 9.68 ± 1.32 olarak hesaplanmıştır. Evreler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmiştir ($p = 0.03$). Mesane kanserli hastalar kendi aralarında sigara tüketimi ve mesane kanserine yakalanma riski açısından da değerlendirilmiş, fakat istatistiki olarak fark bulunamamıştır ($p = 0.6$). Mesane kanserli 17 olgu Gradelerine göre Grade I, Grade II, Grade III ve Grade IV olarak gruplandırılmış ve gruplar arasında ortalama KKD açısından istatistiki olarak fark bulunmamıştır ($p > 0.05$). Olguların ve kontrol bireylerinin kromozom grupları arasındaki fark istatistiksel olarak incelendiğinde, A₁, D, E, F grupları arasında ilişki bulunmazken, diğer gruplar arasındaki farkların anlamlı olduğu görülmüştür.

Bulgularımız mesane kanserli hastaların, maligniteye yatkınlıkla ilişkili olması beklenen kromozomal instabiliteye sahip olduğunu gösterir.

SUMMARY

Of 17 patients suffering from bladder carcinoma; pelvic computerised tomography, transrectal ultrasonography and histopathologically confirmed diagnosis were performed sister chromatid exchange (SCE) analysis was done in peripheral blood lymphocytes that are obtained prior to the operation. Control group was consisted of healthy individuals with the same characteristics, age and sex.

The average SCE rate of 17 bladder carcinoma cases was found to be 9.31 ± 1.26 , it was significantly higher than the mean value of controls that was 7.83 ± 0.33 ($p < 0.0001$).

The patients were grouped as superficial (Stage A) and invasive (Stage B,C,D) according to cancer staging of patients, and 5 of the patients had superficial bladder carcinoma and 12 of them had invasive bladder carcinoma. The mean SCE rates of patients with superficial and invasive bladder cancer were 8.44 ± 0.49 and 9.68 ± 1.32 , respectively. There was a significant difference in SCE values of superficial and invasive bladder cancer ($p = 0.03$). No statistical significant difference was found between the bladder carcinoma patients were evaluated according to consumption of cigarette and to catch of risk to bladder carcinoma ($p = 0.6$). The histopathologic examination of the tumour showed no significant differences of SCE among the grades I, II, III, IV ($p > 0.05$).

When the mean SCE rates of patients and controls were compared with regard to the chromosomal groups, the difference was statistically significant between each group except the A₁, D,E,F groups.

Our results indicate that the patients with bladder carcinoma show a degree of chromosomal instability that might be related to a predisposition to neoplasia.

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım sırasında değerli yardımları ve eleştirileri ile büyük katkıda bulunan tez danışmanım sayın Doç. Dr. Nurten ÖZÇELİK'e,

Hasta seçimi ve takibinde yardımcı olan ve bilimsel desteğini esirgemeyen Üroloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden eşim Yrd.Doç.Dr. Alim KOŞAR'a, ayrıca aynı Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Yrd.Doç.Dr. Ahmet ÖZTÜRK'e ve Araştırma Görevlilerine, Devlet Hastanesi Üroloji Bölümü'nden Dr. Hüseyin Taner ŞİMŞEK'e, çalışma arkadaşım Biyolog Demet SOYSAL'a;

S.D.Ü. Tıp Fakültesi IVF Merkezi imkanlarından yararlanmam için yardımlarını esirgemeyen Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı'ndan Yrd.Doç.Dr. Hakan KAYA'ya ve Biyokimya Anabilim Dalı'ndan Doç.Dr. Namık DELİBAŞ'a;

Araştırmalarımnda kullandığım yöntemleri öğrenmem için laboratuvar imkânlarından yararlanmamı sağlayan Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı sayın Prof.Dr. Güven LÜLECİ'ye ve Anabilim Dalı Elemanlarına,

Her türlü yardımları için anne ve babama teşekkürü bir borç bilirim.

6. KAYNAKLAR

1. ÖZTÜRK, A.: Meme Kanserli Olguların Lenfosit Hücrelerinde Kardeş Kromatid Değişimi Sıklığı. Yüksek Lisans Tezi, 1995.
2. ACAR, A. : Ferrokrom Fabrikasında Çalışan İşçilerde Sitogenetik Çalışmalar. Doktora Tezi, 1985.
3. ÖZKINAY, C. : Kromozomlarda Kardeş Kromatid Değişimi. E.Ü., Tıp Fak.Dergisi, Cilt 21, Sayı 1 : 1-4, 1982.
4. KATO, H. : Spontaneous and induced sister chromatid exchanges as revealed by the BudR labelling method. *Int. Rev. Cytol.*, 49: 55, 1977.
5. RAY, J. H., GERMAN, J. III : Sister chromatid exchange in the chromosome breakage syndrome. In : *SCE, Progress and Topics in Cytogenetics*, Vol. 2. Ed. : Sandberg, A.A. New York, Alan R. Liss, Inc. 553, 1982.
6. DAGG K., ROY JB., BOTTOMLEY RH. : Cytogenetic studies in patients with primary carcinoma of bladder. In : *Proc 71 st Ann Meet Am Assoc Cancer Res.*, p.: 56, 1980.
7. AVERY A. SANDBERG : Chromosome Changes in Bladder Cancer : Clinical and Orther Correlations. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 19 : 163-175, 1986.
8. SANDBERG A.A. : Chromosome studies in bladder cancer In : *Carcinoma of the bladder*, JG Connally, ed. Raven Press, New York, 1981.
9. SANDBERG A.A. : Karyotypic findings in bladder carcinoma In : *Urology 1, Bladder Cancer*, PH Simith, Gr Prout, Jr. eds. Butter worth, Woburn, MA p.: 46-65, 1984.
10. PERRY, P and EVANS H. J. : Cytological detection of mutagen carcinogen expusure by sister chromatid exchange. *Nature*, 258, 1975
11. CROSSEN, P.E. and MORGAN W.F. : The effects of radiation on sister chromatid exchanges in cultured human lymphocytes. *Mutation Research*, 62 : 125-129, 1979.
12. KRAM, D., SCHNEİDER, E.L., SENULA, G.G., NAKANİSHİ, Y. : Spontaneous and mitomycin-C induced Sister chromatid exchanges. Comparison of in vivo and in vitro systems. *Mutat. Res.*, 60 : 339-347, 1979.

13. RAFFETTO, G., PARODÌ, S. et al. : Relationship between cytotoxicity and induction of Sister chromatid exchanges in mouse foetal cells exposed to several doses of carcinogenic and non-carcinogenic chemicals. *Mutat., Res.* 63 : 335-343, 1979.
14. EVANS, B.J. : Cytogenetic studies on industrial populations exposed to mutagens. Medical Research Council Clinical and Population Cytogenetics Western General Hospital Edinburg, EH 42 XU Scotland, 325-339.
15. GEBHART E. : Sister chromatid exchange and structural chromosome aberration in mutagenicity testing. *Human Genetics*, 58 : 235-354, 1981.
16. SOLOMON, P.E., DRETS, M.E., ARRIGHÌ, F. E. : Analysis of the frequency and distribution of quinacrin mustard induced SCE in cultered human lymphocyte. *Human Genetics*, 35: 345-352, 1981.
17. BAĞCI, G., ACAR, A., LÜLECI, G. : Sister chromatid exchange in Turkish cigarette smoker. *Journal Health of Science*, 57-67, 1989.
18. LUNDGREN, K., LAMBERT, JM., SCHREINEMACHERS, D. and EVERSON, R.B. : Effect of 5-Broma 2-deoxyuridine concentration and alfa-nonhthoflavovone on the association between smoking and the frequency of sister chromatid exchanges in lymphocytes from maternal an cord blood. *Mutation Research*, 188: 223-231, 1987.
19. HEDNER, K., WADSTEIN, J. and NITELMAN, F. : Incresed sister chromatid exchange frequency in chronic alcoholic users. *Hereditas*, 101 : 265-266, 1984.
20. LANGARD, S. :The carcinogenicity of chromium compounds in man and animals. *Chromium : Metabolism and Toxicity*. CRC Press. p.: 13-30, Boca Raton, Florida, USA, 1983.
21. LANGARD, S., VIGANDER, T. : Occurence of lung cancer in workers producing chromium pigments. *Brit. j, Ind. Med.* , 40 : 71-74, 1983.
22. LANGARD, S., NORSETH, T. : Cancer in the gastrointestinal tract in chromate pigment workers *Arc. Hig. Rada Toksikol.*, 30 : 301-304, 1979.
23. GEBHARD, E. and KAPPAUF, H. : Bleomycin and sister chromatid exchange in human lymphocyte chromosomes. *Mutation Research*, 58 : 121-124, 1978.
24. HUSUM, B., NIEBUHR, E., WULF, H.C. and NORGAARD, I. : Sister chromatid exchanges and structural chromosome aberrations in lymphocytes in operating room personel. *Annual Anaesthesiology of Scandland*, 27 : 262-265, 1983.
25. SASAKI, M.S. : Sister chromatid exchange and chromatid interchange as posible manifostation of different DNA repair processes. *Nature*, Vol. 269 : 623-625, 1977.

26. TAYLOR, J.H. : Sister chromatid exchanges in tritium labeled chromosomes. *Genetics*, 43 : 515-529, 1958.
27. SINTYH, DR. And EVANS H.J. : Mapping of sister chromatid exchanges in human chromosomes using G banding and autoradiography. *Mutation Research*, 35 : 139-154, 1976.
28. ZAKHAROV and EGOLINA N.A. : Differential spiralization along mammalian mitotic chromosomes. *Chromosoma (Berl)*, 38 : 341-365, 1972.
29. SHELDON W. : Sister chromatid exchange. *Annual Review of Genetics*, II : 183-201, 1977.
30. BEEK, B. And OBE, G. : The human leukocyte test system. *Human Genetics*, 29: 127-134, 1975
31. LAMBERT, B. O., HANSSON, K. , LINDSTEN, J., STEN, M. and WERELIUS, B.: Bromodeoxyuridine inducal sister chromatid exchanges in human lymphocytes. *Heredites*, 83 : 163-174, 1976.
32. EVANS, B.J. : What are sister chromatid exchanges? *Chromosome Today*, Volume, 6 : 315-326, 1977.
33. HEEDLE (ed) J.A. : Mutagenicity New Horizons in genetic toxicology. N.Y.Academic Press, 1984.
34. VOLFF, S. : Sister Chromatid Exchange. *Ann. Rev. Genet.*, II : 183-201, 1977.
35. BURKHOLDER, G.D. : The mechanisms responsible for reciprocal BrdU - Giemsa staining. *Experimental Cell. Res.*, 141 : 127-137, 1982.
36. LOVEDAY, K.S., LATT, S.A. : A high buoyant density fraction in mammalian DNA. *Experimental Cell. Res.*, 141: 127-137, 1982.
37. ROBBINS and KUMAR : *Basic Pathology*, Güneş Kitabevi, s.: 236-237, 1987.
38. KURVINK, K., BLOMMFIELD, C.D., KEEMAN, K.M., LEVITT, S. and CERVENKA, J. : SCE in lymphocytes from patients with malignant lymphoma. *Human Genetics*, 44 : 137-144, 1978.
39. CROSSEN, P.E., FITZGERALD, P.N., COLLS, B.N. : Normal Sister chromatid exchanges and cell cycle progression in cultured lymphocytes from patients with malignant lymphoma. *j. Natl. cancer Inst.*, 67 : 821, 1981.
40. BERNARD, B., ZIMMER, G., PRESCHER, G. and SCHMIDT C.G. : Spontaneous SCE in normal bare marrow and Ph-positive chronic mylocytic leukemia, *Cancer Research*, 48 : 745-750, 1988.

cancer cases. *Cancer Genetics of Cytogenetics*, 61 : 142-146, 1992.

47. DOSAKA, H., ABE, S., SASAKI, N., MIYAMATO, H. and KAWAKAMI, Y. : SCE induction by benzo (a) pyrene in cultured peripheral blood lymphocytes of lung cancer patients and healthy individuals with or without or familial history of neoplasms. *International journal of Cancer*, 39 : 329-332, 1987.
48. ADHVARYU, S.G., UYAS, R.C., DOWE, B.J., TRIVERDI, A.H. and PARIKH, B.H. : Spontaneous and induced Sister chromatid exchanges and cell cycle progression in lymphocytes of patients with carcinoma of the uterine-cervix. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 14 : 67-72, 1985.
49. MITRA, A.B., MURTY, V.V.V.S., LUTHRA, H.K. : Sister chromatid exchanges in leukocytes of patients with cancer of cervix uteri. *Hum. Genet.*, 60 : 214, 1982.
50. YOKOTA, K., VEDA, K., O., K. and FUJIWARA, A. : Increased spontaneous and Mitomycin -C induced Sister chromatid exchanges in patients with cancer of the cervix-uteri with special reference to stage of cancer. *Cancer Genetics of Cytogenetics*, 43 : 79-87, 1989.
51. Illei, N.T., ROVINI, D., GRASSI, C., LOMBARDO, C., PLACCUCCU, N., SQUACCIARINI, P., COSCINELLI, N. and GHIDENI, A. : SCE analysis in familial groups of Malignant Melanoma patients. *Cancer Genet. of Cytogenet.*, 53 : 237-246, 1991
52. ANKATHRI, R., YAHAKUMAR, T., BAHATTATHIRI, V.N. and NAIR, K. : SCE frequencies in carcinoma of the human oral cavity : Effect of treatment. *Head and Neck*, November / December : 473-476, 1992.

53. BAZOPOULOU, E., GARAS, J., ANGELOPOULOS, A. P. : SCE in lymphocytes of patients with oral carcinoma. *Cancer Genet. of Cytogenet.*, 20 : 35, 1986.
54. GARDNER, E. J., WOODWARD, S.R. and HUGHES, J.P. : Evaluation of chromosomal diagnosis for hereditary adenomatosis of the colorectum. *Cancer Genet. of Cytogenet.*, 15 : 321-324, 1985.
55. KASUKAWA, T., WATANABE, T. and ENDO, K. : Cytogenetic and cytokinetic analysis of lymphocytes from patients with hereditary adenomatosis of the colon and rectum. *Cancer Genet. of Cytogenet.*, 16 : 73-79, 1985.
56. DHILLON, V.S., DHILLON, I.K. : Chromosome aberrations and SCE studies in patients with prostate cancer: possible evidence of chromosome instability. *Cancer Genet of Cytogenet.*, 19 (2) : 143-147, 1998.
57. DE FERRARÌ, M., ARTUSO, M., BONASSÌ, S., BONATTÌ, S., CAVALIERÌ, Z., PESCATORE, D., MARCHINÌ, E., PISANA, V. and ABBONDANDOLO, A. : Cytogenetic biomonitoring of an Italian population exposed to pesticides : chromosome aberration and SCE analysis in preripheral blood lymphocytes. *Mutation Research*, 260 : 105-113, 1991.
58. LÜLECI, G., BAŞARAN, S., BAĞCI, G., KESER, İ. : Sitogenetik uygulama yöntemleri. *Meteksan*, s.: 22-31, 1990.
59. TUCHER., D.J., WYROBEK, A.J. ASHWORTH, L.K., CHRISTENSEN, M.L., BURTON, G.V., CARRANO, A.V. and EVERSOY, R. B. : Induction, accumulation and persistence of SCE in women with breast cancer receiving cyclophosphamide, adreameycin and 5 fluorouracil chemotherapy. *Cancer Research*, 50 : 4951-4956, 1990.
60. ANSELL, M.S., CONSTANCE, E., RENSBURG, J.V., REPOPOR, B.L., GRESSE, P., CLOETE, E.V., VANSTADEN, A.M., KENNETH, S., FELLESON, C.İ., FALKSON, G. : Sister chromatid exchanges in lymphocyte cultures of patients previously treated with dibromadulcital. *Oncology*, 48 : 253-257, 1991.
61. Gen Amplification, RT Schinke, ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor. N.Y. p. : 307-312, 1982.
62. VILLIAMS, S., KLUG, MICHAEL, R., Concepts of Genetics, Third Edition, 173-175, Macmillan Publishing Company N.Y., 1991.
63. SHIRAISHI, Y., SANDBERG, A.A. : Effects of mitomycin-C on SCE in normal and Bloom Syndrome cells. *Mutation Research*, 49: 233-238, 1978.
64. YAMANAKA, L., WOLFF, S. : The utility of SCE. *Mutation Research*, 64: 53-56, 1979.

65. BECHER, R. and PRESCHER, G. : Induction of Sister chromatid exchanges and chromosomal aberrations by busulfan Philadelphia chromosome positive chronic myeloid and normal bone marrow. *Cancer Genetics of cytogenetics*, 48 : 3435-3439, 1988.
66. WIENCKE, J.K., VOSÍKA, J., JOHNSON, P., WANG, N., GARRY, V.F. : Differential induction of SCE by chemical carcinogens in lymphocytes cultured from patients with solid tumors. *Pharmacology*, 24 : 67-73, 1982.
67. MURTY, V.V.V. S., MÍTRA, A.B., SHARMA, A., DAS, B.C., LUTHRA, U.K.: Mytomycin-C induced chromosomal aberrations and Sister chromatid exchanges in lymphocytes of patients with precancerous and cancerous lesions of uterine cervix. *Neoplasma*, 34 : 1, 1987.
68. HUSUM, B., WULF, H.C., NIEBUHR, E. : Sister chromatid exchanges in women with cancer of the breast. *Mutat. Res.*, 85; 357, 1981.
69. ANDERSON, D., HUGHES, J.A., NI ZANKOWSKA, B., CEBULSKA-WASÍLEWSKA, A., WIERZEWSKA, A., KASPER, E. : Factors affecting various biomarkers in untreated lung cancer patients and healthy donors. *Environ Mol Mutagen*, 19 (2) 205-216, 1997.
70. DHAR, P.K., DEVI, S., RAO, T.R., KUMARI, U., JOSEPH, A., KUMAR, M.R., NAYAK, S., SHREEMATI, Y., BHAT, S.M., BHAT, K.R. : Significance of lymphocytic SCE frequencies in ovarian cancer patients. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 19 (2) : 105-108, 1996.
71. YAMAN, S.L., GÖĞÜŞ, O., MÜFTÜOĞLU, Z.Y., KÜPELİ, S., ANAFARTA, K., ŞAFAK, M., BEDÜK, Y., ARIKAN, N. : *Üroloji, Güneş Kitabevi*, s.: 360-368, 1989.