

**PARAOKSONAZ 1 (PON1) GENİ
POLİMORFİZMLERİNİN MESANE KANSERİNİN
GELİŞİMİ ÜZERİNE ETKİLERİ**

HATİCE BİGE KOÇ

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOLOJİ
ANA BİLİM DALI**

DOKTORA TEZİ

**Danışman
Doç. Dr. Yasemin KAÇAR**

**MERSİN
HAZİRAN – 2011**

**PARAOKSONAZ 1 (PON1) GENİ
POLİMORFİZMLERİNİN MESANE KANSERİNİN
GELİŞİMİ ÜZERİNE ETKİLERİ**

HATİCE BİGE KOÇ

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOLOJİ
ANA BİLİM DALI**

DOKTORA TEZİ

**Danışman
Doç. Dr. Yasemin KAÇAR**

**MERSİN
HAZİRAN – 2011**

Hatice Bige KOÇ tarafından Doç. Dr. Yasemin KAÇAR danışmanlığında hazırlanan "Paraoksonaz I (PON1) Geni Polimorfizmlerinin Mesane Kanseri Gelişimi Üzerine Etkileri" başlıklı bu çalışma aşağıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından oy birliği ile Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. M. Emin ERDAL

Prof. Dr. Tülin GURAY

Prof. Dr. Serap ERGENE

Doç. Dr. Yasemin KAÇAR

Yrd. Doç. Dr. Ata ÖZÇİMEN

İmza

Yukarıdaki Jüri kararı Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 08./03./2011 tarih ve 2011.19...../345..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.



Bu tezde kullanılan özgün bilgiler, selah, tizelge ve fotoğraflardan kaynak göstermeden alıntı yapmak 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunu hükümlerine tabidir.

PARAOKSONAZ1 (PON1) GENİ POLİMORFİZMLERİNİN MESANE KANSERİNİN GELİŞİMİ ÜZERİNE ETKİLERİ

Hatice Bige KOÇ

ÖZ

Lipid peroksidasyonunun önlenmesinden sorumlu PON1 serum paraoksonaz1 enziminde görülen polimorfizmlerinin bazı kanserlerde ve sistemik hastalıklarda genetik risk faktörü olduğu bilinmektedir. Çalışmamızda mesane kanserli bireylerde PON1'in üç polimorfizmi SNP genotipleme yöntemi ile belirlenerek kanserle ilişkili genotipler belirlenmeye çalışılmıştır. PON1 L55M polimorfizminin mesane kanserinin gelişimi ile ilişkili olduğu görülmüştür ($p=0,0010$). Heterozigot LM (OR=0,333, %95 CI, 0,151 – 0,734) ve homozigot MM (OR= 3,643, %95 CI, 1,288 – 10,306) genotiplerinin mesane kanseri gelişiminde etkili olduğu belirlenmiştir ($p=0,03$). Yalnızca L alleli taşıyor olmak hasta ve sağlıklı bireyler arasında farklılık göstermemiştir ($p=0,447$), ancak allellerden birisinin ya da her iki allelin M olmasının bireylerde hastalıkla ilişkili olduğu belirlenmiştir. PON1 Q192R polimorfizminin QQ genotipinin hastalığa yatkınlık göstermediği belirlenmiş, mesane kanseri gelişiminde Q alleli ya da R alleli bulundurmanın etkisiz olduğu sonucuna varılmıştır ($p=0,853$). Ancak homozigot R/R genotipinin bireylerde hastalıkla ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Mesane kanserli ve sağlıklı bireylerin tamamı PON1 I102V polimorfizmi açısından homozigot I/I genotipi olarak bulunmuştur. Taranan 107 Türk bireyin tamamının homozigot bulunması, Türk populasyonunun çoğunluğunun yaygın olarak bu polimorfizm için izolösün taşıdığını göstermektedir. PON1'in L55M ve Q192R polimorfizmlerinin bağlantılı genotip sonuçları incelendiğinde tek bir polimorfizm için (LL-RR veya MM-QQ) homozigot varyant allel bulundurması bireyde mesane kanseri riskinin artması için yeterli görülmektedir. Taranan populasyonun tamamında PON1 MM-RR genotipine sahip bireye rastlanmamıştır.

Anahtar Kelimeler: Paraoksonaz1, PON1, Polimorfizm, SNP Genotipleme, Mesane kanseri, PZR-RFLP, Real Time PZR.

Danışman: Doç. Dr. Yasemin KAÇAR, Mersin Üniversitesi, Biyoloji Anabilim Dalı

THE EFFECT OF PARAOXONASE1 (PON1) POLYMORPHISMS ON THE DEVELOPMENT OF BLADDER CANCER

Hatice Bige KOÇ

ABSTRACT

Paraoxonase 1, which is coded by PON1 gene, play an crucial role in the prevention of LDL lipid peroxidation. PON1 gene polymorphisms were shown to be associated with some cancer types and systemic diseases. In this study, effect of three independent polymorphisms of PON 1 on bladder cancer development were searched by using SNP genotyping method in bladder cancer patients. It is determined that PON1 L55M polymorphism is associated with bladder cancer ($p=0,0010$). It is determined that heterozygote LM (OR=0,333, CI 95%, 0,151–0,734) and homozygote MM genotype (OR= 3,643, CI 95%, 1,288–10,306) are influential on bladder cancer expansion ($p=0,03$). Individuals having LL genotype didn't show any diversity in terms of bladder cancer risk in comparison to healthy ones ($p=0,555$). However, it is indicated that carrying one or two M allele is related with bladder cancer progress. QQ genotype of PON1 Q192R polymorphism were shown unrelated to bladder cancer, in contrast, R/R homozygote genotype can be related with bladder cancer. It is also concluded that carrying one of the alleles Q or R had no effect on bladder cancer ($p=0.853$). In terms of PON1 I102V polymorphism, all of the 107 individuals including both healthy ones and cancer patients were shown to be homozygote I/I genotype. We can assume that most of the individuals of Turkish community are isoleucine carriers for PON1 I102 which were shown to have decreased paraoxonase activity. Linking with PON1 L55M ve Q192R genotype analysis, individuals carrying one of the homozygote variant allele (LL-RR or MM-QQ) were shown to have an increased risk for bladder cancer. MM-RR genotype were not found among the searched population.

Key Words: Paraoxonase 1, PON1, Polymorphism, SNP Genotyping, Bladder Cancer, PCR-RFLP, Real-Time PCR.

Advisor: Ass. Prof. Yasemin Kaçar, Department of Biology, University of Mersin

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam sırasında hiçbir özveriden kaçınmayarak bana tüm bilgi ve birikimlerini aktaran Danışman Hocam Doç. Dr. Yasemin KAÇAR'a teşekkürü borç bilirim.

Çalışmamın deneysel aşamalarında Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Laboratuvarı'nın tüm olanaklarını kullanmama izin veren ve engin bilgileriyle çalışmamı ileriye taşıyıp, yönlendiren Sayın Prof. Dr. M. Emin ERDAL'a teşekkür ederim. Tez çalışmamın her aşamasında görüş ve önerileriyle ufkumu genişleten Sayın Prof. Dr. Serap ERGENE'ye teşekkür ederim.

Örneklerin toplanmasında ve tez çalışmamın devamlılığında yardımlarını esirgemeyen Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı hocalarından Sayın Prof. Dr. Mehmet ARSLAN'a, Prof. Dr. Ahmet ÖZTÜRK'e ve Arş. Gör. Emre GÖĞER'e teşekkür ederim. Selçuk Üniversitesi Patoloji Anabilim Dalı hocalarından Sayın Prof. Dr. Lema TAVLI'ya, Prof. Dr. Salim GÜNGÖR'e, Uzm. Dr. Gülay TURAN'a ve Arş. Gör. Deniz KARASOY'a teşekkür ederim.

Verilerimin değerlendirilmesinde bana yardımcı olan Tıp Fakültesi Biyoistatistik Bölümü hocalarından Doç. Dr. Bahar TAŞDELEN'e ve Arş. Gör. Mehmet Ali SUNGUR'a teşekkür ederim.

Deneylerimi benimle birlikte omuzlayan Arş. Gör. Şenay GÖRÜCÜ YILMAZ'a teşekkür ederim. Doktora çalışmam süresince bana her zaman destek olan sevgili Dr. Cemil AYMAK'a, Dr. Filiz KAYA'ya, Dr. Ali KURU'ya teşekkür ederim. Mersin Üniversitesi Biyoloji Bölümü'nde Arş. Gör. Serpil KÖNEN'e, Arş. Gör. Ali Osman ADIGÜZEL'e, Arş. Gör. Şafak KAYA'ya başta olmak üzere tüm araştırma görevlisi arkadaşlara teşekkür ederim. Tez çalışmam için maddi destek sağlayan Mersin Üniversitesi BAP birimine teşekkür ederim.

Bana sonsuz sabırla destek veren, zor anlarda yanımda olan sevgili eşime ve çalışmam boyunca daima çevremde olan minik kızlarıma, tüm hayatımda olduğu gibi akademik çalışmalarım da beni daima cesaretlendiren sevgili anneme ve babama, heyecanımla çalışmamı hız veren sevgili kız kardeşime, farklı bakış açısıyla beni yönlendiren sevgili erkek kardeşime çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZ	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	v
ÇİZELGELER DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
SİMGE VE KISALTMALAR	ix
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	4
2.1. PARAOKSONAZ1 (PON1) ENZİMİ VE POLİMORFİZMLERİ.....	4
2.1.1. Paraoksonaz1 Enzimi (PON1)	4
2.1.2. PON1 Geni Polimorfizmleri.....	7
2.1.2.1. PON1 Polimorfizmleri ile Hastalıklar Arasındaki İlişki	10
2.1.2.2. PON1 Polimorfizmlerinin Kansere İlişkisi	14
2.2. MESANE TÜMÖRLERİ	15
2.3. POLİMORFİZM VE SNP GENOTİPLEME.....	19
2.3.1. Restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi (RFLP)	20
2.3.2. 5' nükleaz (TaqMan) Testi	20
3. MATERYAL VE YÖNTEM	22
3.1. KULLANILAN ALETLER VE CİHAZLAR.....	22
3.2. KİMYASAL MADDELER.....	23
3.3. ÇÖZELTİLER.....	24
3.4. KAN ÖRNEKLERİNDEN DNA İZOLASYONU	25
3.5. AGARUZ JEL ELEKTROFOREZİ.....	27
3.5.1. Agaroz Jel Hazırlama	28
3.5.2. Agaroz Jele Örnek Yüklenmesi.....	28
3.5.3. DNA Bantlarının Gözlenmesi ve Görüntülenmesi.....	28
3.6. PZR-RFLP ve TaqMan SNP GENOTİPLEME YÖNTEMLERİ	29

3.6.1. PON1 Polimorfik Gen Bölgeleri İçin PZR-RFLP Uygulaması	29
3.6.2. TaqMan SNP Genotipleme Yöntemi (TaqMan Testi	31
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	34
4.1. BULGULAR	34
4.1.1. Mesane Kanserli ve Sağlıklı Kontrol Grubu Bireylerin DNA'ları	34
4.1.2. PON1 Polimorfizimlerinin PZR-RFLP ile Genotiplemesi.....	34
4.1.2.1. PON1 Polimorfizimlerinin PZR Sonuçları	34
4.1.2.2. PON1 PZR-DNA'larının Restriksiyon Enzim Kesimi Sonuçları	36
4.1.3. PON1 SNP Polimorfizimlerinin TaqMan PZR ile Genotiplemesi.....	40
4.1.3.1. PON1 L55M Polimorfizimi Genotip Sonuçları	40
4.1.3.2. PON1 Q192R Polimorfizimi Genotip Sonuçları.....	41
4.1.3.3. PON1 I102V Polimorfizimi Genotip Sonuçları	43
4.1.3.4. PON1 (L55M, Q192R, I102V) Polimorfizimlerinin Bağlantılı Genotip Sonuçları	43
4.1.4. Mesane Kanserli Bireylerde PON1 Polimorfizimlerinin Çevresel Faktörlerle İlişkisi.....	44
4.2. TARTIŞMA	46
5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER	56
KAYNAKLAR.....	59
ÖZGEÇMİŞ.....	71

ÇİZELGELER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1. Mesane kanserinin derecelendirilmesi	17
Çizelge 3.1. Mesane kanserli hasta ve Kontrol grubu için sağlıklı bireylerin kanından DNA izolasyonu tarihleri ve örnek sayısı	26
Çizelge 3.2. PON1 192 A/G, PON1 55 T/A ve PON1 102 bölgelerine özgün primerler	29
Çizelge 3.3. 10 örneklilik PZR protokolü	30
Çizelge 3.4. PON 55 ve PON 192 için PZR tepkime programı	30
Çizelge 3.5. PON 102 için PZR tepkime programı	30
Çizelge 3.6. PON1 polimorfizmleri için enzim kesim protokolü ve enzim özellikleri.....	31
Çizelge 3.7. PON1 polimorfizmlerinin rs ve assay numaraları.....	32
Çizelge 3.8. Kullanım klavuzunda yer alan PZR karışımının hazırlanmasında kullanılan miktarlar	33
Çizelge 3.9. PON polimorfizimlerinin Real-Time SNP Genotipleme PZR programı	33
Çizelge 4.1. PON1 L55M polimorfizminin istatistiksel analiz sonuçları	41
Çizelge 4.2. PON1 L55M polimorfizmi L ve M alellerinin istatistiksel analiz sonuçları.....	41
Çizelge 4.3. PON1 Q192R polimorfizminin istatistik analiz sonuçları	42
Çizelge 4.4. PON1 Q192R polimorfizminin Q ve R alellerinin istatistiksel analiz sonuçları	43
Çizelge 4.5. Mesane kanserli hasta ve kontrol gruplarında polimorfizmlerin genotip özelliklerinin % dağılımları	43
Çizelge 4.6. Mesane kanserli Hasta ve kontrol grubunda bireylerin her üç polimorfizm açısından % dağılımları	44

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. Paraoksonazın yapısı	7
Şekil 2.2. PON1 geninin yapısı	8
Şekil 2.3. PON1geninin kromozom 7 üzerinde yerleşimi.....	10
Şekil 2.4. Mesane Kanserinin Evreleri	17
Şekil 2.5. TaqMan problemlerinin kimyasal mekanizması	21
Şekil 4.1. İzole edilen İnsan total DNA'ların agaroz jelde görünüşü.....	34
Şekil 4.2. Mesane kanseri ve sağlıklı kontrol grubu bireylerin PON1 L55M bölgesi için çoğaltılan PZR-DNA bantlarının agaroz jelde görünümü	35
Şekil 4.3. Hasta ve sağlıklı kontrol grubu bireylerin PON1 Q192R bölgesi için çoğaltılan PZR-DNA bantlarının agaroz jelde görünümü.....	35
Şekil 4.4. Mesane kanseri ve sağlıklı kontrol grubu bireylerin PON1 I102V bölgesi için çoğaltılan PZR-DNA bantlarının agaroz jelde görünümü	36
Şekil 4.5. RFLP sonucu PON1 55 bölgesinde kesilmiş bantların görünümü	38
Şekil 4.6. RFLP sonunda PON1 192 bölgesinde kesilmiş bantların görünümü	38
Şekil 4.7. RFLP sonucunda PON1 102 bölgesinde kesilmiş bantların jelde Görünümü.....	39
Şekil 4.8. PON1 polimorfizmleri Real-Time PZR SNP Genotipleme Analizi sonuçlarını gösteren grafikler	40

SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ

PON: Paraoksonaz

PCR: Polymerase Chain Reaction (Polimeraz zincir reaksiyonu)

RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism (Restriksiyon Enzim Parça Uzunluk Polimorfizmi)

SNP: Single Nucleotide Polymorphisms (Tek Nükleotid Polimorfizmi)

mg/L: Miligram/litre

µl: Mikrolitre

ml: Mililitre

UV: Ultraviyole

°C: Santigrat Derece

bç: Baz Çifti

dH₂O: Distile Su

kDa: Kilo Dalton

Leu55Met (L55M): 55. Pozisyonda lösin metiyonin dönüşümü

Gln192Arg (Q192R): 192. Pozisyonda glutamin arjinin dönüşümü

Ile102Val (I102V): 102. Pozisyonda izolösin valin dönüşümü

MPGN: Membranoproliferatif glomerulonefrit

DEHK: Değişici Epitel Hücre Karsinom

TNM: Tümör Nodül Metastaz

NAT2: N-asetil Transferaz 2

GSTM1: Glutasyon S-transferaz M 1

VEGF: Vasküler Endotelial Growth Faktör

GSTT1: Glutasyon S-transferaz teta 1

XPC: Xeroderma pigmentosum grup C

XPG: Xeroderma pigmentosum grup G

NBS1: Nijmegen Breakage Syndrome 1

LCAT: Lesitin-kolesterol asiltransferaz

PAF-AH: Platellet aktive edici faktör

1. GİRİŞ

Son yıllarda insanoğlunun en çok çare bulmaya çalıştığı kanser, hemen her cinsiyet ve yaştan bireyin sağlığını ciddi şekilde tehdit eden bir hastalıktır. Bu nedenle günümüzde kanser ile ilgili yapılan çalışmaların sayısı oldukça fazladır. Mesane kanseri de görülme sıklığına bağlı olarak çok yönlü araştırılan kanser tiplerinden birisidir.

Dünyada ve ülkemizde mesane kanserleri erkeklerde akciğer, prostat, kolorektal tümörlerden sonra sıklık açısından 4. sırada yer almaktadır ve erkeklerdeki bütün tümörlerin %7'sini mesane tümörleri oluşturmaktadır (Baykara, 2007, Dizdar, 2007). Mesane tümörlerinin %75'i erkeklerde %25'i kadınlarda görülmektedir (Tural, 2006, Borkowska, 2007). Kadınlarda görülen tüm tümörler içinde mesane tümörleri %3 sıklıkta ortaya çıkmakta ve 8. sırada yer almaktadır (Garcia-Closas, 2007).

Mesane tümörlerinin oluşumunda, genetik yatkınlık, endüstriyel karsinojenler, tütün, kronik irritasyon ve enfeksiyon, onkojenik virüsler, ağrı kesici kullanımı, idrar durgunluğu, kahve, sitostatikler gibi faktörlerin rol oynadığı düşünülmektedir (Baykara, 2007).

Serbest radikallerin kanser başta olmak üzere çeşitli hastalıkların ortaya çıkmasında etkin olduğu bir çok araştırma ile gösterilmiştir. İnsan vücudu serbest radikalleri uzaklaştırmada çeşitli enzimatik mekanizmalara sahiptir ve oksidatif stres ve serbest radikallerin çeşitli hastalıklara ve kansere neden olduğu bilinmektedir (Ames, 1983, Goldstein, 1990; La Du 1992). Paraoksonaz olarak anılan aril dialkil fosfataz (EC.3.1.8.1) enzimi de bunlardan birisidir. Serumda azo boyaları hidroliz yeteneğiyle 50-60'lı yıllarda esteraz olarak tanımlanan enzim, paraoksonun enzimatik olarak hidrolizini katalizlediği gösterildikten sonra esteraz A olarak sınıflandırılmıştır (Aldridge, 1953, Tashian ve Show, 1962, Krish, 1968). B esterazlardan farklı olarak A esterazların birçok organofosfatlı insektisiti, sinir gazını hidrolize ederek, bu tür toksik bileşiklerin detoksifikasyonunu sağladıkları anlaşılmıştır (Mackness ve ark., 1987).

Paraoksonaz aktivitesinin tespiti ile birlikte bu enzim için genetik polimorfik farklılıkların varlığı da araştırılmaya başlanmıştır. Geldmacher von Mallinckrodt (1973) insan serum paraoksonazı için ilk genetik polimorfizmi tanımlamıştır. Daha sonra Playfer ve arkadaşları (1976) paraoksonaz aktivitesi bakımından, aynı otozomal lokustaki iki allel

tarafından kontrol edilen iki farklı fenotip belirlemiştir. 1983'de üç farklı seviyede aktiviteye sahip paraoksonaz (Esteraz A) tespit edilerek, Avrupalı bireylerde %72 oranında düşük aktiviteli allel sıklığı bulunmuştur (Mueller, 1983). Hasset ve arkadaşlarının (1991), paraoksonaz genlerini klonlamaları sonucunda polimorfizmler DNA seviyesinde PCR ile araştırılmaya başlanmıştır. Paraoksonaz enzimini kodlayan gen bölgesi 7. kromozomun uzun kolu üzerinde yerleşmiştir. PON1 geninin fonksiyonel olduğu düşünülen üç polimorfizmi sırasıyla 3. ve 4. ekzon bölgelerinde 55., 102. ve 192. pozisyonlarda yer almaktadır. (Hasset, 1991, Humbert, 1993, Pasdar, 2006).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda serum paraoksonaz enziminin, plazmada yüksek dansiteli lipoproteinlerin (HDL) yapısında yer aldığı, düşük dansiteli lipoproteinlerdeki (LDL) kolesterol-linoleat-hidroperoksitleri hidroliz ettiği, LDL kolesterolü oksidasyon reaksiyonundan koruduğu ve bu yolla ateroskleroz gelişimini önlemede rol oynadığı gösterilmiştir (Mackness ve ark.,1998, Aviram 1999)

Paraoksonaz polimorfizmlerinin farklı substratlar varlığında (oksonlar, sarin fenilasetat, endotoksinler gibi) değişkenlik gösterdiğinin belirlenmesiyle allozim çalışmalarının tek başına yeterli olamayacağı ve PON1 polimorfizmlerinin popülasyonda SNP genotipleme ile araştırılmasına neden olmuştur. PON1'in hem lipid metabolizmasındaki hemde organofosfatlar, sinir gazı gibi yabancı maddelerin detoksifikasyonundaki rolü enzimin ve genetik polimorfizimlerinin önemini arttırmıştır. Organofosfatların kullanımının ve yayılımının 40 yıl önce başladığını göz önüne alırsak bu bileşiklerin metabolizması gittikçe önem kazanmaktadır.

Koroner Arter Hastalığı (KAH) ve diyabet hastalıklarında PON polimorfizmlerinin (Bauters, 2000, Ombres, 1998) etkisi olduğu bulunduktan sonra kanserde de PON polimorfizmlerinin bir risk faktörü oluşturabileceği düşünülerek çeşitli araştırmalar yapılmıştır.

PON1'in L55M polimorfizminin postmenopozal dönemde görülen göğüs kanseriyle ilişkili olabileceği düşünülmektedir (Stevens, 2006). Benzer şekilde PON1'de yeni bir polimorfizm I102V'nin I/V genotipinin prostat kanseri riskini arttıran bir faktör olabileceği söylenmiştir (Marchenasi, 2003). İtalyan prostat kanserli bireyler ile yapılan çalışmada, PON1

Q192R ve PON1 L55M polimorfizmlerinin Q/R ve M/M genotiplerine sahip olmanın prostat kanseri riskini önemli ölçüde arttırdığı bulunmuştur.

Son yıllarda mesane kanseri oluşumunda etkili olabilecek genetik faktörler ve belirteç genler belirlemek üzere tek nükleotit polimorfizmi (SNP) taramaları yapılmaktadır. Kanser ve tümör oluşumu ile ilişkili pek çok belirleyici gen bulunmaktadır. Farklı kanser tipleri için farklı belirleyici genler olabildiği gibi ortak belirleyici genler de bulunmaktadır. Olası kanser belirteç genleri saptamak için yapılan geniş çaplı tek nükleotit polimorfizmi taraması sonucunda NAT2 ve GSTM1'in mesane kanseri ile ilişkili olabileceği bulunmuştur ve genetik varyasyonların mesane kanserleri üzerindeki risk artırıcı etkisi gösterilmiştir (Garcia-Closas 2007).

Bu çalışmada mesane kanserli hastaların PON1 enzimini kodlayan PON1 geninin 55., 102. ve 192. pozisyonlardaki polimorfizmlerinin PCR-RFLP ve SNP genotipleme yöntemleri ile belirlenerek mesane kanseri gelişimine etkilerini araştırılması amaçlanmıştır. Çalışma PON1'in genetik varyasyonlarının mesane kanseri ve tümör oluşumunda etkisini anlama bakımından önemlidir.

2. KAYNAK ARAŐTIRMALARI

2.1. PARAOKSONAZI (PON1) ENZİMİ VE POLİMORFİZMLERİ

2.1.1. Paraoksonaz1 Enzimi (PON1)

Oksidatif stres ve serbest radikallerin çeœitli hastalıklar ve kansere neden olduğu bilinmektedir (Ames, 1983, Goldstein, 1990). İnsan vücudu serbest radikalleri uzaklaœtırmada çeœitli enzimatik mekanizmalara sahiptir. Sistemik adı aril dialkil fosfataz olan paraoksonaz (EC.3.1.8.1) da bunlardan birisidir. Serumda azo boyaların hidroliz yeteneğiyle 50-60'lı yıllarda esteraz olarak tanımlanan enzim, dietil-4-nitrofenilfosfatın (paraokson) enzimatik olarak hidrolizini katalizlediği gösterildikten sonra esteraz A olarak sınıflandırılmıştır (Aldridge, 1953, Tashian ve Show, 1962, Krish, 1968). A esterazların, B esterazların tersine birçok organofosfatlı insektisiti, sinir gazını hidrolize ederek, bu tür toksik bileœiklerin detoksifikasyonunu sağladıkları anlaşılmıştır (Mackness, 1987).

Parathion gibi organofosfatlı insektisitlerin karaciğer ve diğer dokulardaki mikrosomal sitokrom p450 sistemi tarafından oksidatif desülfirizasyonla aktif komponentleri olan paraoksone dönüœerek (La Du, 1992) estraz B olan asetilkolin esteraz inhibisyonuna neden olması, parakson toksisitesini ortadan kaldıracak enzim varlığının önemini ortaya koymaktadır. Paraoksonaz (PON1) paraoksonun hidrolizini sağlayan, kalsiyum bağımlı çalışan ve birçok organofosfatlı bileœiđi de hidroliz edebilmektedir (Poore, 1972, Zech, 1974, Furlong, 1988). Bir baœka organofosfatlı insektisit grubunun metaboliti olan klorpirifos oksonun da paraoksonaz tarafından hidroliz edildiği ve bu grup insektisitlerin detoksifikasyonunda önemli ölçüde rol oynadığı belirlenmiştir (Mackness, 1987, Furlong, 1988, Primo-Parmo, 1996). Organofosfatların kullanımının ve yayılımının 40 yıl önce baœladıđını göz önüne alırsak bu bileœiklerin metabolizması gittikçe önem kazanmaktadır.

Memelilerde hepatik detoksifikasyon mekanizmasından herhangi bir nedenle kaçan oksonun serum paraoksonaz tarafından çok hızlı metabolize edilerek beyine ulaœmasının engellendiği gösterilmiştir. Paraoksonaz memelilerde bulunmasına karœın böceklerde ve kuœlarda bulunmayıœı bu grup canlıların organofosfat zehirlenmelerine daha hassas olmalarını da açıklamaktadır (Brealey, 1980).

İnsan serumundan saflaştırılan paraoksonaz (PON1) enziminin minimum 43-45 kDa moleküler kütleyle sahip ve 354 aminoasitlik bir glikoprotein olduğu, katalitik aktivitesi için kalsiyum iyonuna ihtiyaç duyduğu, sülfidrilli ajanlarla inhibe edilebildiği, yapısında sisteinlerin yer aldığı gösterilmiştir. Yenidoğan insanda erişkinin yarısı seviyede PON1 aktivitesi olduğu ve bir yılda yetişkin enzim seviyesine eriştiği ve ömür boyu aktivitenin sabit kaldığı gösterilmiştir. Ayrıca enzim aktivitesinin cinsiyete bağlı bir değişim göstermediği bulunmuştur (Mackness, 1998).

İnsan PON1'in karaciğerden sentezlenmesi ve salgılanmasıyla ilgili çalışmalar bulunmakla beraber akciğer, beyin, pankreas ve plasenta gibi dokularda da %70 oranında paraoksonazla benzerlik gösteren mRNA'lar tespit edilmiştir. Ancak Northern Blot analizleri insan ve tavşan dokularına ait mRNA'larının sadece karaciğerde olduğunu göstermektedir (Hasset, 1991).

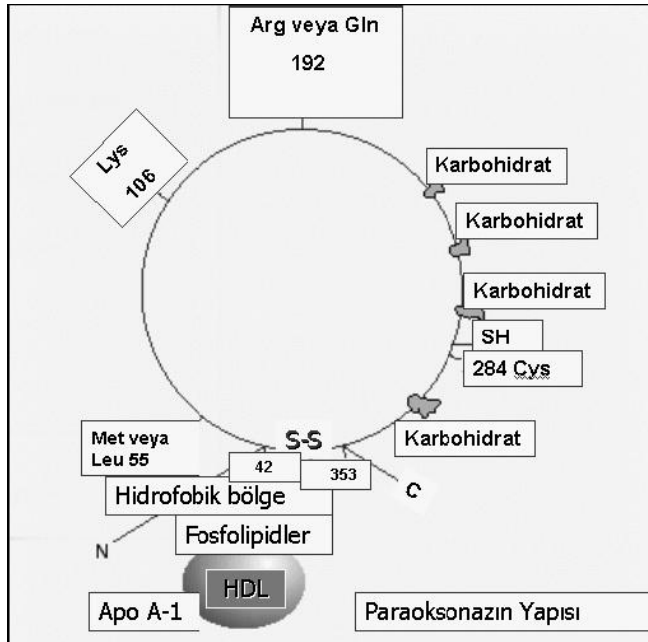
PON1'in HDL ile ilişkisi Uriel tarafından 1961'de yapılan immünopresipitasyon çalışmalarıyla tespit edilmiş, ancak HDL ile ilişkili olarak lipid peroksidasyonunu önlemedeki rolü 1990'lardan sonra anlaşılmıştır (La Du, 1992, Mackness, 1998). 90'lı yıllarda yapılan çeşitli araştırmalarla PON1'in Apolipoprotein A1 (ApoA1) ile birlikte HDL partiküllerine bağlı olduğu gösterilmiştir. PON1'in N-terminalinde bulunan hidrofobik sinyal dizisi ile HDL içerisine entegre olduğu düşünülmektedir (Şekil 2.1) (Aviram, 1999, Memiş oğulları ve ark., 2010). İmmünoafinite kromatografisi yöntemiyle insan PON1'in ApoA1 ve clusterin içeren HDL alt grubu içerisinde bulunması sonucu enzimin membran ve lipoprotein tamir ve yapılandırma mekanizmasında rol oynadığını düşündürmektedir (Mackness, 1998). PON1'in diğer fizyolojik işlevleri konusunda yapılan çeşitli hayvan deneyleri sonucunda damar içerisine bakteriyel endotoksin enjeksiyonundan sonra HDL-PON1 aktivitesinde artış olduğu belirlenerek PON1'in bakteriyel lipopolisakkariti hidroliz edebileceği düşünülmektedir. Bir başka çalışmada izole edilen tripanolitik faktör (TLF)-HDL partikülünün ApoA1 ve PON1 içerdiği bulunmuş ve PON1'in immün cevap sonucu oluşan aşırı peroksidaz aktivitesini engelleyerek sitotoksik metabolit miktarını kontrol altına alabileceği bildirilmiştir (Smith, 1995).

PON1'in diğer bir fizyolojik rolünün de LDL'de okside lipid birikimini önlemek olduğu düşünülmektedir. Bunu destekleyen araştırmalarda LDL oksidasyonu ile sonuçlanan fosfolipid hidroperoksitlerin hidrolizinin PON1, LCAT, PAF-AF gibi enzimler tarafından

katalizlendikleri gösterilmiştir. Bu sonuçlar okside LDL’de bulunan 2-araşidonil fosfatidilkolin fosfolipidlerinin PON1’e substrat olmasıyla da desteklenmektedir (Watson, 1995, Mackness, 1998).

Paraoksonazın, okside LDL’deki kolesteril-linoleat-hidroperoksitleri ve özgün okside fosfolipidleri hidroliz ederek HDL’de lipid peroksit ve aldehit birikimini %95’e kadar azalttığı gösterilmiştir (Aviram, 1999). Paraoksonaz enzimi tepkimesiyle lipid peroksitlerinin aterosjenik etkilerini nötralize ettiği ve hücre membranlarını koruduğu düşünülmektedir. Ayrıca paraoksonazın lökotrien metabolizmasında da önemli rol oynadığı Watson ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmayla gösterilmiştir (Navab, 1995, Watson, 1995).

HDL’nin ateroskleroza önlemedeki rolünün iki farklı yolla olduğu, bunlardan birisinin kolesterolün geri taşınması, diğerinin LDL oksidasyonunu önlemesiyle gerçekleştirdiği düşünülmektedir. LDL oksidasyonunun geri döndürülmesinden sorumlu enzimlerden bir tanesinin de PON1 olduğu anlaşılmaktadır.



Şekil 2.1. Paraoksonazın yapısı (Aviram, 1999’den alınmıştır).

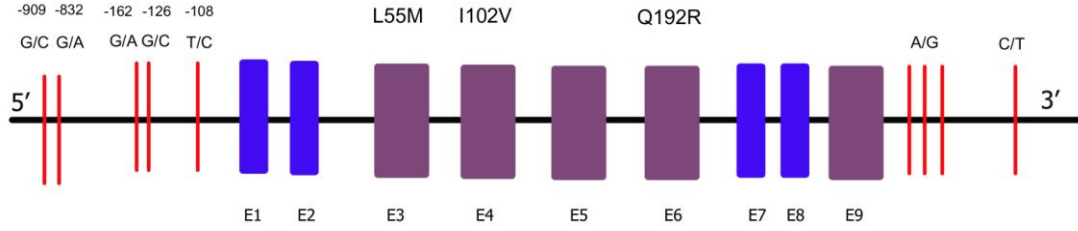
2.1.2. PON1 Geni Polimorfizmleri

Paraoksonaz aktivitesinin tespiti ile birlikte bu enzim için genetik polimorfik farklılıkların varlığı da araştırılmaya başlanmış ve insan serum paraoksonazı için ilk genetik polimorfizm 70'li yıllarda tanımlanmıştır (Geldmacher von Mallinckrodt, 1973). Yapılan çalışmalarla paraoksonaz aktivitesinin iki farklı fenotipini kontrol eden aynı otozomal lokusta yer alan iki allel olduğu belirlenmiştir (Playfer 1976). 1983 yılında paraoksonazın üç farklı aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiş, Avrupalı bireylerde %72 oranında düşük aktiviteli enzim sentezlenmesine neden olan alleller daha sık görülmüştür (Mueller, 1983).

DNA'da nükleotit seviyesinde çalışmaların başlaması sonucu kistik fibröz (CF) geni ile beraber rastlantısal olarak aynı lokusta yer alan paraoksonazı kodlayan PON geninin dizisi ortaya çıkartılmıştır (Eiberg, 1985, Nielsen, 1986, Schmiegelow, 1986). Bu çalışmalardan sonra Hassett ve arkadaşları (1991) insan serum ve tavşan paraoksonaz cDNA klonlarını tanımlamışlardır. Daha sonra Humbert ve arkadaşları (1993) insan serum paraoksonaz polimorfizmlerinin moleküler dayanağını enzim aktivitesiyle birlikte tespit etmişlerdir. İzole edilen üç bağımsız cDNA klonlarında 55. ve 192. aminoasit kodonlarında farklılıklar bulmuşlardır. PON1 geninin sık görülen bu iki polimorfizminden birisi 3. ekzonda 55. pozisyonda amino asit dizisini lösenden metiyonine (L55M) farklılaştıran C/G nükleotit değişimi ve diğeri 6. ekzonda 192. pozisyonda amino asit dizisini glutaminden arjinine (Q192R) farklılaştıran A/T nükleotit değişimi olduğu belirlenmiştir (Pasdar, 2006).

Gen bölgesi içerisinde yer alan PON1'e özgü üçüncü bir polimorfizm ise 4. ekzonun 102. pozisyonundaki A/G transisyonunun, amino asit dizisini izolösinden valine farklılaştırdığı gösterilmiştir (Marchenasi, 2003).

Enzim seviyesine etki eden diğeri önemli polimorfik pozisyonlar da PON1 geni promotor bölgesinde PON -162, PON -108 bölgesinde yer almaktadır (Huen, 2010).



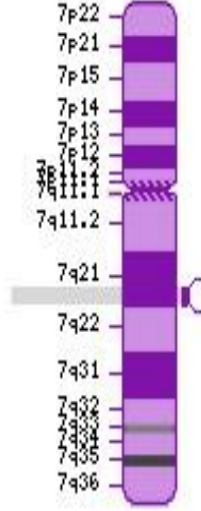
Şekil 2.2. PON1 geninin yapısı. Mavi ve mor renkli kutucuklar dokuz ekzonu (E1-9) simgelemektedir. 5' promotor bölgede 5, kodlanan bölgede 3, 3' translasyona uğramayan bölgede 4 polimorfizm gösterilmiştir (Furlong, 2002).

PON1'in Q192R polimorfizminin enzim aktivitesi üzerinde etkili olduğu görülmüştür. 192. pozisyonda Gln (Q) içeren bireylerin serum paraoksonaz enzim aktiviteeleri Arg (R) içeren bireylerinkine göre daha düşük bulunmuştur. Arg içerenler yüksek aktiviteli paraoksonaza sahipken Gln polimorfizmi taşıyanlar düşük aktiviteli paraoksonaz bulundurmaktadır. Bu polimorfizm, substrat olarak paraokson kullanıldığında 192. pozisyon için A (Q alleli düşük aktiviteli) ve B (R alleli yüksek aktiviteli) alloenzimleri olarak tanımlanmışlardır (Humbert, 1993). Ancak genotiplemenin sadece enzim aktivitesi tayiniyle doğru sonuç vermeyeceği, allozim belirleme çalışmalarında kullanılan substrat değiştirildiğinde enzim aktivitesinde farklılıklar görülmesi, polimorfizmlerin tespitinde SNP genotipleme yöntemlerinin kullanılmasını zorunlu kılmıştır. Sinir gazı, sarin, diaoksozon gibi substratlar kullanıldığında A alloziminin B allozimine göre bunları daha hızlı hidrolize ettiği gösterilmiştir. Fenilasetat substrat olarak kullanıldığında ise iki allozim arasında aktivite farklılığı gözlenmemiştir (Davies ve ark, 1996).

PON1'in 55. pozisyonda Leu-Met değişiminin paraoksonaz aktivitesi açısından bir farklılık göstermediği ve bu pozisyon için alloenzim tipi olmadığını düşündüren çalışmaların yanı sıra (Humbert ve ark., 1993), insüline bağlı olmayan diyabetli hastalarda bu polimorfizmin PON aktivitesini yönlendirdiği gösterilmiştir (Blatter-Garin ve ark., 1997, Odawara ve ark., 2007).

Diğer memelilerde de insana benzer PON genlerinin (PON1, PON2, PON3) aynı kromozom üzerinde birbirine yakın yer aldığı gösterilmiştir. PON proteinlerinin aminoasit dizileri arasında %60 benzerlik olduğu bilinmekle beraber dokulardaki ifadeleri ve dağılımları farklılık göstermektedir (Hasset, 1991, Humbert, 1993, Xie ve ark., 2010).

İnsanda paraoksonazı kodlayan PON1 geninden başka PON2 ve PON3 genleri de 7. kromozomun q21.3-22 üzerinde, birbirine 120kb'lık uzaklıkta yer aldığı ve diğerlerinin PON1 ile %65 aminoasit homolojisi ve arilesteraz aktivitesi gösterdiği bulunmuştur (Mochizuki, 1998, Aviram ve Rosenblot, 2004, Horke ve ark, 2007, Huen, 2010).



Şekil 2.3. PON1 geninin kromozom 7 üzerinde yerleşimi.

2.1.2.1. PON1 Polimorfizmleri ile Hastalıklar Arasındaki İlişki

Lipid ve lipoprotein metabolizması ile ilişkisi ve antioksidan özellikleri yoğun bir şekilde araştırılan PON1 geni polimorfizmlerinin kardiyovasküler hastalıklar (KAH), felç, serebral enfarktüs, iskemik felç, tip II diabetes mellitus, Alzhemier gibi hastalıklarla ilişkisi araştırılmıştır.

Amerikan popülasyonunda yapılan bir çalışma sonucunda PON1 Q192R polimorfizmi için düşük enzim aktiviteli Q alleli bulundurmanın KAH için risk faktörü olabileceği gösterilmiştir (Sanghera, 1997). Benzer sonuç Fransız popülasyonu ile yapılan bir çalışmada da gözlenmiştir (Ruiz, 1995).

Japon popülasyonunda PON1 Q192R polimorfizminin popülasyonda R/R genotipinin hakim olması beyaz ırkdaki Hardy-Weinberg'e uygun olan allel dağılımının bulunmayışı nedeniyle KAH ile Q192R polimorfizmi arasında istatistiksel bir ilişki kurulamamıştır (Zama, 1997).

Singapur kökenli Çinliler ve Hint Asyalılarda KAH ile PON polimorfizmlerinin ilişkileri araştırılmış, Çin popülasyonunda R allelinin sıklığı hasta bireylerde sağlıklı bireylere oranla daha yüksek çıkmıştır. Hintlilerde R alleli ile KAH arasında ırka özgü bir ilişki olduğu belirlenirken Çinlilerde böyle bir ilişki gözlenmemiştir. Hintli KAH hastalarında R alleli sıklığı sağlıklı bireylere göre oldukça yüksek bulunmuş ve Q192R polimorfizminin popülasyonda KAH için bağımsız bir risk faktörü olabileceği belirlenmiştir (Sanghera, 1997).

Pati ve arkadaşları (1998) Hint popülasyonunda yaptığı çalışmada QR genotipi ve arjinin allel sıklığının KAH hastalarda sağlıklı bireylere oranla daha yüksek olduğu görülmüştür. Hintli bireylerde KAH için bilindik risk faktörlerinin ve aile geçişinin genotip sıklığını etkilediği, paraoksonaz polimorfizminin ise lipid oksidasyonunun dışında KAH yatkınlığı üzerine etkili olabileceği bulunmuştur.

Bir başka çalışmada, Çin popülasyonunda PON1 Q192R polimorfizminde düşük enzim aktiviteli allelin (Q alleli) kardiyovasküler hastalıklar için risk faktörü olabileceği söylenmiştir (Wang, 2004).

KAH'lı Türk hastalarda PON1 Q192R polimorfizminin hastalık ile ilişkisi araştırılmış ve PCR/RFLP yöntemi kullanılarak genotipleme yapılmıştır. PON1 Q192R polimorfizmi için R allel sıklığının hasta bireylerde daha yüksek olduğu, ancak genotip ve allel dağılımları açısından sağlıklı ve hasta bireyler arasında istatistiksel olarak önemli bir farklılık olmadığı görülmüştür (Aynacıoğlu, 2000).

Ülkemizde yapılan bir başka çalışmada KAH ile PON1 Q192R ve L55M polimorfizmleri arasındaki ilişki incelenmiş, KAH'lı bireylerde M allel frekansı yüksek iken R alleli için farklılık görülmemiştir. Türk popülasyonu için PON1 L55M polimorfizminin KAH gelişiminde risk faktörü olarak değerlendirilebileceği belirtilmiştir (Taşkiran, 2009).

Oksidatif stresin migren patogeneziindeki önemi göz önünde bulundurularak PON1'in L55M ve Q192R polimorfizmleri TaqMan SNP analizi kullanılarak PON1'in genotipleri ve allelik varyantları belirlenmiştir. Erken migren tablosu gösteren hastalarda PON1 QQ genotipi ve 192Q allelik varyantının sıklığı önemli ölçüde yüksek bulunmuştur (Garcia-Martin, 2010).

Hiperlipidemia ve nefrotik sendromlarda artan lipid oksidasyonu glomerular hastalıkların gelişiminde ve glomerulosklerozişte PON1 polimorfizmlerinin etkili olabileceği düşünülerek fokal segmental glomerulosklerozi (FSGS) hastası çocuklarda PON1 Q192R ve L55M polimorfizmlerinin genotip dağılımlarına bakılmıştır. Hasta ve sağlıklı bireylerin PON1 L55M genotiplerinin dağılımı istatistiksel olarak farklı bulunmuş ve sonuç olarak Q alleli ve/veya L alleli varlığının çocuklarda FSGS gelişimi için risk faktörü olabileceği belirlenmiştir (Bıyıklı, 2006).

PON1 Q192R polimorfizminin serum PON1 aktivitesi ve membranoproliferatif glomerulonefritli (MPGN) çocuklarda hastalık prognozu ve risk faktörü olarak etkileri araştırılmış, PON1 192 için QQ genotip sıklığı sağlıklı bireylerle karşılaştırıldığında hasta bireylerde oldukça yüksek bulunmuştur. QQ genotipi ve düşük enzim aktivitesi ile MPGN gelişimi arasında önemli bir ilişki olduğu belirlenmiştir (Bilge, 2007).

Avrupa ve Asya populasyonlarında PON1 Q192R ve L55M polimorfizmlerini Parkinson hastalığı ile ilişkilendiren meta-analizi yapılmıştır. Parkinson hastalığı gelişimi ve PON1 55M alleli arasında bir ilişki söz konusu iken, PON1 192 Q/R allelleri ile Parkinson gelişimi arasında önemli bir ilişki bulunmamıştır (Zintzaras, 2004).

Bugüne kadar yapılan polimorfizm çalışmalarının sonucunda PON1 geni için 250 SNP tespit edilmiştir. Ancak bunlardan sayısal olarak küçük bir kısmı PON1 enzim seviyesine etki etmektedir. En çok bilinen PON1 55, PON1 192 dışında promotor bölgesinde yer alan PON -162, PON -108 polimorfizmleri bulunmaktadır. Meksika-Amerika'lı 700 çocuk ve anneyle yapılan PON1 SNP analizi sonucu promotor bölgesi -108, -162, kodlanan bölgedeki Q192R, L55M polimorfizmlerinin yanı sıra 6 SNP, 1 insersiyon, iki delesyon olmak üzere çeşitli yeni varyantlar içeren küçük allel sıklıklarıyla 94 polimorfizm saptanmıştır. Aynı populasyonda PON2 ile PON3'ün 3 ayrı SNP'sinin genotiplemesi yapılmış, 12 ayrı PON1 ve 2 ayrı PON2 polimorfizminin enzim aktivitesini etkilemede önemli ilişki olduğu bulunmuştur. Ancak enzimin miktarı ve aktivitesi üzerine etkisi olduğu bilinen 9 polimorfizmin ne PON1-108 ne de PON1 192 ile bağlantı eşitsizliği olmadığı gözlenmiştir. Meksikalılar ve beyaz ırk arasında benzerlikler belirlenmiştir (Huen, 2010).

PON1 geninin -107 T/C, Q192R ve L55M polimorfizmlerinin ve 3 farklı PON1 enzim aktivitesinin (diazoksonaz, paraoksonaz, arilesteraz) iskemik felç ile ilişkisi araştırılmış,

iskemik felç için risk faktörü olarak diazoksonaz aktivitesi ilk kez çalışılmış ve sağlıklı ve hasta bireylerde her üç enzim aktivitesi hemen hemen aynı bulunmuştur. -107 T/T genotipinin yetişkinlerde (>59) 1,97 kat felç riskini arttırdığı görülmüş, -107 T/C genotipli bireylerde ise PON1 enzim aktivitesinin düşük olduğu belirlenmiştir. Yapılan çalışma sonucunda QR-LM-TC haplotipinin tüm bireylerde iskemik felce karşı 6,94-10,4 kat koruyucu olduğu, 55 L/L genotipi taşımanın ise iskemik felç riskini 1,78 kat arttırdığı görülmüş ve PON1 genotiplerinin felç riski ile ilişkili olduğu ancak aktivitenin felç ile ilişkisi olmadığı belirlenmiştir (Demirdöğen, 2009).

Diyabetik komplikasyonlarda PON1 Q192R, L55M polimorfizmleri ve enzim aktivitesini belirlemek üzere yapılan çalışma sonucunda Tip2 diyabette MM ve QQ genotipleri çok sık görülmüş ve enzim aktivitesinin ise hasta bireylerde daha düşük olduğu belirlenmiştir (Araki ve ark., 2000, Ağaçhan ve ark.,2005, Ergun ve ark., 2011).

Diyabetli hastalarla yapılan diğer bir çalışmada ise her iki polimorfizmle hastalık arasında bir ilişki bulunmasına rağmen 192 QR genotipinin komplikasyon ortaya çıkmasında 3 kat daha etkili olduğu belirlenmiş ve Q192R polimorfizminin diyabetik komplikasyon riski ile ilişkisinin daha güçlü olduğu bulunmuştur (Altuner, 2010).

Oksidatif LDL'nin retinada bulunan kılcal damar epitelyum hücreleri ve perisitler için toksik etki yarattığı bilinmektedir. Bu nedenle PON1 Q192R ve L55M polimorfizmlerinin IDDM diyabetik retinopati patogenezinde önemli olduğu düşünülmüş ve genotip dağılımları ile allel sıklıkları araştırılmıştır. Q192R polimorfizminin hastalık gelişiminde etkili olmadığı ancak LL genotipinin hastalıkla ilişkili olduğu ve L allel sıklığının hasta bireylerde yüksek bulunduğu bildirilmiştir (Kao-Yan-Lin, 1998).

PON1 geni L55M, Q192R polimorfizmlerinin diyabetik anjiyopati ve enzim aktivitesi ile ilişkileri araştırılmış, Makroanjiyopatili hastalarda daha düşük PON1 enzim aktivitesi ve daha zayıf diyabet kontrolü belirlenmiş, MM ve QQ genotip sıklığının fazla olduğu bulunmuştur (Flekac, 2008).

2.1.2.2. PON1 Polimorfizmlerinin Kanser ile İlişkisi

PON1'in L55M polimorfizminin göğüs kanseriyle ilişkisi postmenopozal kadınlarda araştırılmış, L55M polimorfizminin göğüs kanseri oluşumunda önemli bir risk faktörü olabileceği gösterilmiştir. Heterozigot LM ve homozigot MM genotiplerinin her ikisinin de göğüs kanseri gelişiminde etkili olabileceği, kanser derecesinin (grade) ileri olduğu bireylerde ise MM genotipinin daha sık görüldüğü yani homozigot M allelinin kanser gelişiminde daha etkili olduğu bulunmuştur. Ancak Q192R polimorfizminin göğüs kanseri gelişimi ile ilişkisi olmadığı bulunmuştur (Stevens, 2006).

PON1'in 4. ekzonun 102. kodonunda izolösin-valin değişimine sebep olan polimorfizmin Fin'li prostat kanserli bireylerde araştırılmış, prostat kanseri riskini arttıran bir faktör olabileceği gösterilmiştir. Serum paraoksonaz enzim aktivitesinin heterozigot bireylerde homozigot bireylere göre yaklaşık %40 daha az olduğu belirlenmiştir. İstatistiksel analiz ile 102V alleli taşımanın prostat kanseri için risk faktörü olabileceği sonucuna varılmıştır (Marchenasi, 2003).

İtalyan popülasyonunda prostat kanseri hastalarıyla yapılan çalışmada, PON1 Q192R polimorfizminin Q/R genotipine sahip bireylerde prostat kanseri riskinin önemli ölçüde arttığı bulunmuştur (Antognelli, 2005). PON1 L55M polimorfizminin heterozigot L/M genotipli bireylerde prostat kanseri için önemli bir risk faktörü olduğu, belirlenmiştir (Antognelli, 2005).

Türk popülasyonunda osteosarkomlu hastalar ile yapılan çalışmada, PON1 Q192R polimorfizminin homozigot Q/Q ve PON1 L55M polimorfizminin homozigot L/L genotipinin osteosarkom gelişiminde risk faktörü olabileceği bulunmuştur (Ergen, 2010).

2.2.MESANE TÜMÖRLERİ

Son 20 yıl içerisinde toplumlarda mesane kanseri görülme sıklığı artmıştır. Amerika'da her yıl 54.500, İngiltere'de ise 10.000 yeni mesane kanseri vakası belirlenmektedir. Amerika Birleşik Devletleri'nde mesane kanseri erkeklerde görülen kanserler arasında dördüncü sırada ve ölüm nedeni olarak ise sekizinci sırada yer almaktadır. İngiltere'de ise yılda 5000 kişi mesane kanserinden hayatını kaybetmektedir (Parker, 1997).

Mesane kanserinin görülme sıklığı cinsiyete, yaşa ve ırklara göre farklılıklar göstermektedir. Bununla birlikte hormonal, genetik ve anatomik faktörlerin de etkili olduğu düşünülmektedir. Erkeklerde kadınlara oranla 3 kat daha fazla gözlenen mesane tümörleri 30 yaşın altındaki kişilerde iyi-ayırımı (iyi diferansiye) tümörler olarak karşımıza çıkmaktadır (Parker, 1997). Yıllar içinde kadınlarda mesane kanseri vakalarında artış gözlenmiştir. Bunun 1960'lardan bu yana çalışan kadın oranındaki artış ile bağlantılı olduğu düşünülmüştür. Yaşam ortamları değişen kadınlar, daha önce etkilenmedikleri endüstriyel ve çevresel karsinojenlere maruz kalmaya başlamıştır. Ayrıca kadınlarda sigara tüketimi aynı dönemde belirgin biçimde artış göstermiştir. Kadınlarda mesane kanserindeki artış bu nedenlere bağlanabilir (Greenlee, 2000).

Mesane kanserinin beyaz ırkta görülme sıklığı siyah ırka göre daha fazladır Amerikalı beyaz erkeklerde mesane kanseri görülme sıklığının siyah erkeklere oranla yaklaşık 2, beyaz kadınlarda ise siyah kadınlara oranla yaklaşık 1,5 kat fazla olduğu bildirilmiştir (Stattics, Epidemiology and End Results Program [SEER], 1973-1997). Hispanik Amerikalılarda mesane kanseri sıklığının ise hem kadınlar hem de erkekler için beyaz ırkın yaklaşık yarısı kadar olduğu belirlenmiştir (Canto, 2000).

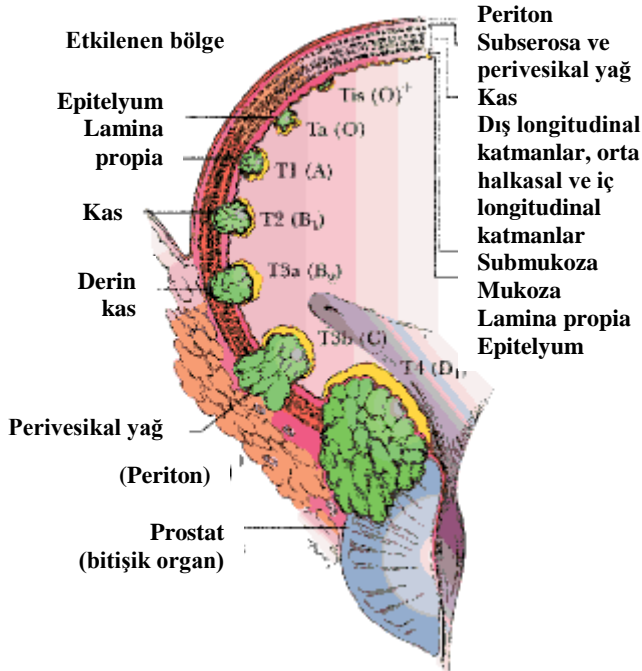
Mesane kanseri çocukluk dönemi de dahil olmak üzere her yaşta görülmektedir. Ancak genellikle orta ve ileri yaş dönemi hastalığı olarak ortaya çıkmaktadır. Transisyonel hücreli kanserin ortalama teşhis yaşı erkekler için 69, kadınlar için ise 71 olarak belirlenmiştir (Lynch,1995). Ayrıca yüz binde görülme sıklığının da yaşla birlikte arttığı gözlenmiştir. Yaşlılarda yüz binde ölüm oranının orta yaşa göre daha fazla olduğu bildirilmiştir. Amerika'da hastalığa bağlı ölüm oranının 65-69 yaşları arasındaki erkeklerde %14, kadınlarda %18 olduğu görülmüştür. Ancak 80-85 yaşları arasındaki erkeklerde %30, kadınlarda %37 olarak belirlenmiştir. Genç bireylerde mesane kanserinin seyrinin daha iyi olduğu, daha çok yüzeysel ve düşük dereceli tümörler olarak ortaya çıktığı gözlenmiştir ([SEER], 1973-1997).

Mesane kanserleri gösterdikleri histolojik özelliklere göre farklı şekilde isimlendirilmektedir.

Değişici Epitel Hücreli Karsinom (DEHK) : Mesanenin değişici epitelinden köken alan bu tip karsinomlar tüm mesane kanserlerinin yaklaşık %90'ını oluşturur. Bu nedenle mesane

kanseri ile yapılan çalışmaların çoğu bu tip karsinom üzerindedir. DEHK'ların %70'ini papiller, %20'sini katı (solid) ve %10 gibi bir kısmını ise çok sayıda mitotik yapı gösteren intraepitelyel anaplastik karsinomlar oluşturmaktadır. Bu tipteki mesane tümörlerinin %75'i yüzeysel, %25'i ise invaziv özelliktedir (Sandberg, 1994). Yassı Hücreli Karsinomlar ise tüm mesane kanserlerinin yaklaşık %5-10'unu oluşturur (Sandberg, 1994). Nadir görülen mesane tümörleri arasında bulunan Adenokarsinomlar %2 sıklıkta olmakla birlikte tanı geç konulabildiğinden tedavi beklentisi düşüktür (Bailey, 2001). Kötü-ayırımı (indiferansiye) karsinomlar da nadir görülen ancak tanı ve tedavisi zor olan mesane tümörlerindedir (Bailey, 2001).

Mesane kanserlerinin evrelendirilmesinde en sık Tümör-Nodül-Metastaz (TNM) evrelendirme sistemi kullanılmaktadır. Mesane duvarı boyunca veya mesane içinde oluşan invazyon düzeyine, lenf düğümlerinin tutulumuna ve uzak bölgede hastalık bulunmasına göre yapılan bir evrelendirmedir (Şekil 2.4) (Bailey, 2001).



Şekil 2.4. Mesane Kanserinin Evreleri (Yale Medical Group org.).
TNM sistemine göre; Tis(0), Ta(0), T1(A), T2(B1), T3a(B2), T3b(C), T4(D1) evreleri.

Patologlar mesane kanserini üç dereceli (grade) bir puanlama sistemi kullanarak anaplaziyi derecelendirirler (Bailey, 2001).

Çizelge 2.1.Mesane kanserinin derecelendirilmesi.

Mesane Kanserinde Anaplazi Derecelendirilmesi
Grade 1: Az indifferansiye tümör
Grade 2: Orta indifferansiye tümör
Grade 3: Şiddetli indifferansiye tümör

Endüstri toplumlarında bir kısım faktörlerin mesane tümörü oluşumu üzerinde etkili olduğu düşünülmüştür. Hastalığın gelişiminden sorumlu olduğu düşünülen bu çevresel karsinojenler aşağıdaki gibi sıralanmaktadır.

Sigara kullanımı kanser riskini %25 oranında arttırmaktadır. Bu oran küçümsenemeyecek bir orandır. Mesane kanserlerinde ise beşte iki gibi bir oranda sigara kullanımının riski arttırdığı görülmüştür. Yine sigara kullanımının hastalığın tekrar etmesinde oldukça etkili olduğu gösterilmiştir. Mesane kanseri ile sigara arasındaki ilişkinin akciğer kanserindeki ilişkiden daha fazla olduğu bildirilmiştir (Thompson, 1987).

Mesleki Maruz Kalma; Boya ve ilaç endüstrisinde çalışan işçilerin maruz kaldıkları kimyasala ve miktara bağlı olarak mesane kanserine yakalanma oranlarının yüksek olduğu gözlenmiştir (Vineis, 1992).

Diyete Bağlı Faktörler; Kafein ve yapay tatlandırıcılar ile kanser arasındaki ilişkiyi ortaya koymak üzere birçok çalışma yapılmış ancak herhangi bir sonuca varılamamıştır (Vineis, 1992).

İlaçlar; Fenaset ve siklofosfamidin hem insan hem de hayvan deneyleriyle mesane kanseri oluşumunda etkili olduğu ortaya konmuştur (Vineis, 1992).

Birçok kanserde olduğu gibi mesane kanseri oluşumunda genetik etkenlerin varlığında araştırılmaktadır. Kanser oluşumu ve gelişiminden doğrudan sorumlu genlerin ve bunlardaki polimorfizimlerin yanı sıra doğrudan olmayan ancak yukarıda belirttiğimiz çevresel faktörlere bireysel yanıtın farkına bağlı risklerin belirlenmesinde enzim polimorfizimleri ve kanser ilişkisi araştırma konusu olmaktadır.

Anilin boyalarla çalışan işçilerin diğerlerine göre mesane kanseri olma sıklıklarının 50 kat arttığı gözlenmiştir (Vineis, 1992). İndirek etkili karsinojenler büyük ölçüde karaciğer,

böbrekler, gastrointestinal sistem, akciğer ve ciltteki çeşitli enzimler tarafından metabolize edilmektedir ve bunların içinde en önemlisi sitokrom P450 enzim sistemidir. Bu enzimleri kodlayan gen bölgelerinde polimorfizimler sonucu bireyler arasında enzim aktivitesinde farklılıklar olduğu gösterilmiştir (La Du, 1992). Kimyasal ajanlara duyarlılığının bireyler arasında farklılık göstermesinde enzim polimorfizmlerinin etkisinin olması, polimorfizimler ve kanser gelişimi arasında etkileşimlerin araştırılmasına neden olmuştur (Yüksel, 2001).

Yabancı kimyasal maddelere maruziyette, kimyasalın hedefi, enzimler tarafından kimyasalın özgün yapısının değişikliğe uğratılması (biyolojik transformasyon) ve konağın zararlı etkilere karşı gösterdiği “tamir” cevabı kimyasalın sağlığı olumsuz etkilemesinden sorumlu bazı etkenlerdir. Bütün bu etkenlerin ortak noktası genetik olarak, bireysel tanımlanmış olmasıdır. Biyotransformasyon ve detoksifikasyon derecesi ise genetik polimorfizme bağlı etkili olmaktadır.

2.3. POLİMORFİZM VE SNP GENOTİPLEME

DNA yapısında, organizmayı olumsuz olarak etkileyen ya da fenotipe yansıyan kalıtsal değişimlerin yanı sıra zararsız kalıtsal varyasyonlar da belirlenmiştir. Bu varyasyonlar tüm genomda her 200-300 nükleotitte 1-2 baz değişimini içermektedir (Tautz ve Rentz, 1984). Özgün genetik varyasyonlar olarak nitelendirilen ve populasyonda en az %1 kadar görülen varyasyonlar polimorfizm olarak değerlendirilmektedir. Bir polimorfizm fenotipe herhangi bir şekilde yansımadığı gibi işlevsel de olabilmektedir.

DNA polimorfizmi olarak adlandırılan insan genomundaki bu değişiklikler çoğu kez intronda ancak bazen de ekzon bölgelerinde bulunmakta ve proteindeki işlevsel değişiklik, stabilite, aktivite ve ifade seviyesinde farklılık şeklinde ortaya çıkabilmektedir. Tek nükleotit değişimi ile sonuçlanan polimorfizmlerin saptanmasında geliştirilen ve genotipin belirlenmesine yardımcı olan yöntemler SNP genotipleme olarak ifade edilmektedir.

DNA polimorfizimlerini ve SNP’leri tanımlamada çok çeşitli yöntemler bulunmaktadır. Tez çalışması kapsamında SNP genotipleme için enzim temelli iki yöntem kullanılmıştır.

2.3.1. Restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi (RFLP)

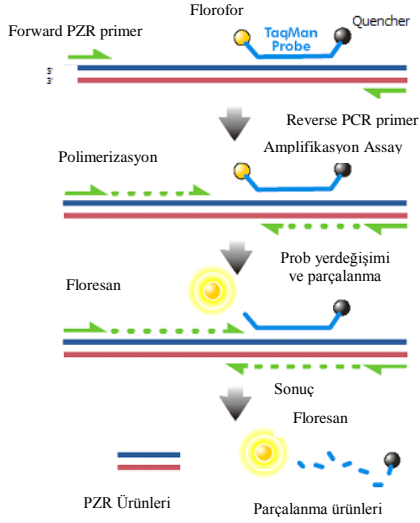
Bu yöntemle DNA'daki polimorfik bölgede bir restriksiyon enzim motifinin varlığı veya yokluğuna bağlı olarak nükleotit değişiminin saptanmasıdır (Jeffreyes ve ark., 1985). PCR yönteminin gelişmesinden sonra RFLP'nin PCR ile birlikte kullanımı (PCR-RFLP) tek nükleotit polimorfizimlerinin kolay ve çabuk tespit edilmesine olanak sağlamıştır (Mullis ve ark., 1990, Syvanen ve ark., 2001). Günümüzde PCR ile çoğaltılan DNA bölgelerinin restriksiyon enzimi ile parça uzunluğuna bakılarak SNP analizlerinde başarıyla uygulanmaktadır (Sanyal ve ark., 2004, Garcia-Closas ve ark., 2007).

PON1 polimorfizmlerini belirlemek üzere araştırmacılar çeşitli restriksiyon enzimleri kullanmışlardır (Hin1II, BspI, Bsp143I) (Hasset, 1991, Humbert, 1993, Marchenasi, 2003).

2.3.2. 5' nükleaz (TaqMan) Testi

TaqMan testi olarak da markalaşan yöntemin biyokimyasal temeli Taq DNA Polimerazın 5' nükleaz aktivitesine dayanmaktadır. TaqMan testi aynı anda hem PZ Reaksiyonlarını gerçekleştirip hem de PCR sonuçlarını değerlendirebilecek şekilde düzenlenmektedir. Yöntemde, tek nükleotid polimorfizmini, polimorfik bölgenin revers ve forward PCR primerleri ile çoğaltıldıktan sonra allel ayırımı, SNP'nin olduğu DNA polimorfik bölgesine özgü problemlerin hibridizasyonunun saptanmasıyla belirlenmektedir. TaqMan problemleri, 5' ucunda fluorofor (FAM) ve 3' ucunda ise baskılayıcı molekül (TAMRA) içermekte ve primer tarafından uzatılan DNA bölgesine yapışacak şekilde hazırlanmaktadır. DNA'da özgün bölgeye yapışan probun, Taq polimerazın karşı DNA ipliğindeki primeri uzatması ile enzimin 5' nükleaz aktivitesine maruz kalarak yıkılmaya başlaması sonucu kendine bağlı fluoroforun serbest kalmasıyla floresans yaymasına neden olur. Cihaz tarafından algılanan floresans şiddeti ile DNA miktarı doğru orantılı olmaktadır (Şekil 2.5). Allele özgü probun tam eşleşmemesi durumunda (erime sıcaklığı daha düşük) DNA'ya yapışma tam olmadığından 5' nükleaz aktivitesi de etki edememektedir. Bunun sonucu floresans yayılmamaktadır. TaqMan testi, bir reaksiyonda yedinin üzerinde SNP belirlenecek şekilde düzenlenebilmektedir. Ancak şimdilik TaqMan uygulamaları

polimorfizmi bilinen SNP'lere özgü problemlerle sınırlıdır ve yeni bir SNP için hem reaksiyon şartlarının düzenlenmesi ve hem de problemlerin sentezlenmesi gerekmektedir (McGuigan ve ark., 2002, Morita ve ark, 2007).



Şekil 2.5. TaqMan problemlerinin kimyasal mekanizması.

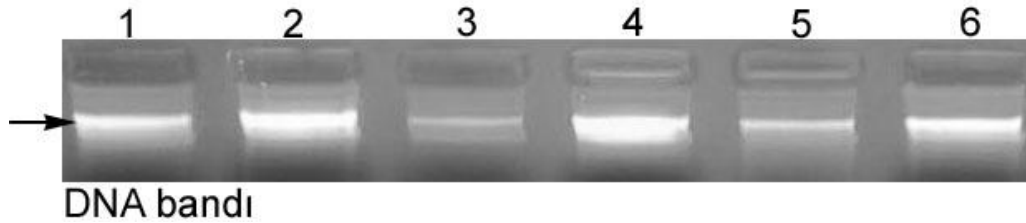
4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. BULGULAR

4.1.1. Mesane Kanserli ve Sağlıklı Kontrol Grubu Bireylerin DNA'ları

Mesane Tümörlü 50 hasta kanından ve kontrol grubu olarak 57 sağlıklı bireyin kanından total DNA izolasyonu yapılmıştır.

Agaroz jel elektroforezi sonucu DNA örneklerinin yüksek moleküler ağırlıklı olduğu ve kırık bulundurmadığı gözlenmiştir. Elde edilen DNA miktarı yaklaşık 50-100ng/μl olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.1: İzole edilen İnsan total DNA'ların agaroz jelde görünüşü.

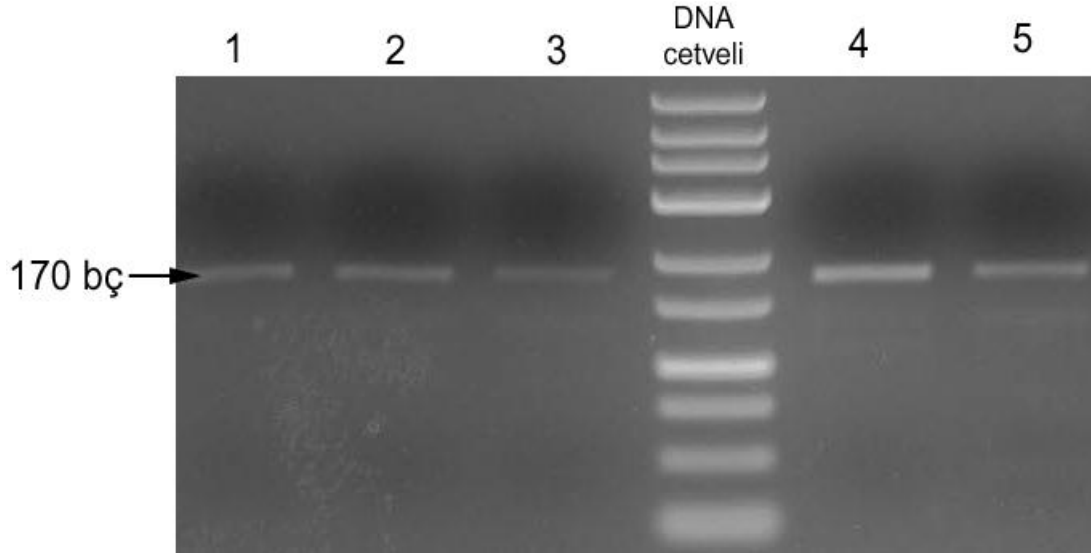
4.1.2. PON1 SNP Polimorfizimlerinin PCR-RFLP ile Genotiplemesi

4.1.2.1. PON1 Polimorfizimlerinin PCR Sonuçları

Mesane kanserli 50 bireyin ve 57 kontrol grubu bireyin çoğaltılan PON1 Q192R, PON1 L55M ve PON1 I102V polimorfik bölgelerine ait DNA bantlarından bazıları aşağıda ayrı ayrı gösterilmektedir (Şekil 4.2., 4.3., 4.4.)

PON1 L55M Polimorfizmi PCR Sonucu

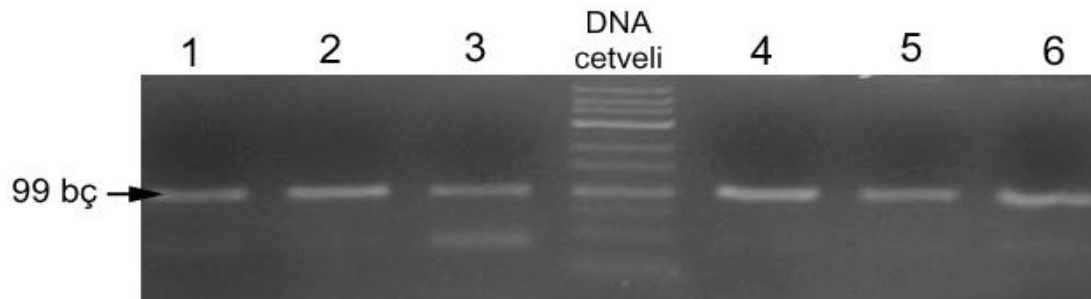
PCR sonucu tüm bireylerde yaklaşık 170 bç'lik DNA bantı gözlenmiştir.



Şekil 4.2: Mesane kanseri ve sağlıklı kontrol grubu bireylerin PON1 L55M bölgesi için çoğaltılan PCR-DNA bantlarının agaroz jelde görünümü.

PON1 Q192R Polimorfizmi PCR Sonucu

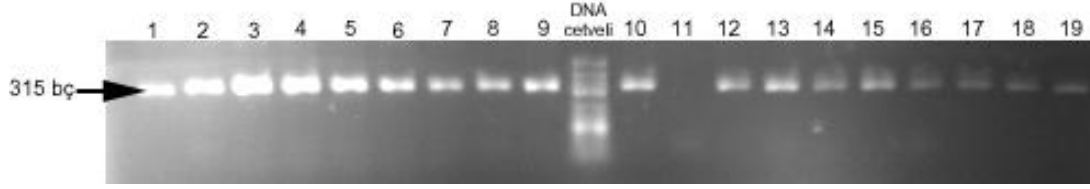
PCR sonucu tüm bireylerde yaklaşık 99 bç'lik DNA bantı gözlenmiştir.



Şekil 4.3. Hasta ve sağlıklı kontrol grubu bireylerin PON1 Q192R bölgesi için çoğaltılan PCR-DNA bantlarının agaroz jelde görünümü.

PON1 I102V Polimorfizmi İçin PCR Sonucu

PCR sonucu tüm bireylerde yaklaşık 315bp'lik DNA bantı gözlenmiştir.



Şekil 4.4: Mesane kanseri ve sağlıklı kontrol grubu bireylerin PON1 I102V bölgesi için çoğaltılan PCR-DNA bantlarının agaroz jelde görünümü.

4.1.2.2.PON1 PCR-DNA'larının Restriksiyon Enzim Kesimi Sonuçları

PON1 L55M, PON1 Q192R ve PON1 I102V için restriksiyon enzimi kesimi bölüm 3.5.1.2'de belirtildiği gibi yapılmıştır. Kesim sonrası DNA bantları %3'lük agaroz jellerde DNA merdiveni ile birlikte yürütüldükten sonra değerlendirilmiştir. Her üç PON1 gen bölgesi için yapılan restriksiyon enzim kesimi Şekil 4.5, 4.6 ve 4.7'de gösterilmektedir. Şekillerde bazı Mesane kanserli ve sağlıklı kontrol bireylerin PCR-DNA-RFLP sonuçları verilmiştir.

PON1 L55M polimorfizimi genin 55. pozisyonda görülen C/T nükleotid değişimi (PON1 L55M) bu pozisyondaki amino asitin lösinden metiyonine farklılaşmasına neden olmaktadır. C/T nükleotid değişiminde T içeren bireylerde (Homozigot M/M) Hin1 II enzimi ile kesim sonucunda gözlenmesi beklenen iki DNA bantı 126bp, 44bp uzunluğundadır. Aynı pozisyonda C bulunduran bireylerin (Homozigot L/L tipi) enzim kesimi sonucunda ise 170bp'lik tek DNA bantı beklenmesi gerekir. Her iki pozisyonu bulunduran heterozigot bireylerde ise 170bp, 126bp, 44bp'lik üç DNA bantı beklenebilir. Bu çalışmada mesane kanseri hastası ve sağlıklı bireylerin genotipleri sırasıyla 15 hasta, 13 kontrol birey L/L, 20 hasta, 38 kontrol L/M, 15 hasta, 6 kontrol M/M olarak belirlenmiştir.

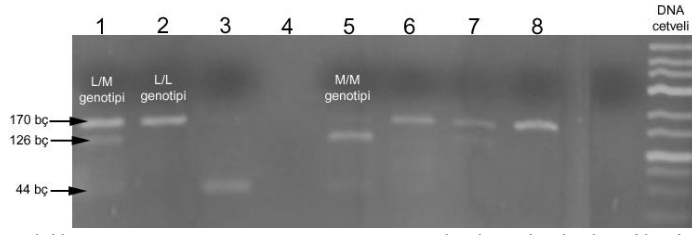
PON1 Q192R polimorfizimi genin 192. pozisyonda görülen A/G nükleotid değişimi (PON1 Q192R) bu pozisyondaki amino asitin glutaminden arjinine değişimine neden olmaktadır. A/G nükleotid değişiminde G içeren bireylerde (Homozigot R/R) BspPI enzimi ile kesim sonucunda gözlenmesi beklenen iki DNA bantı 63bp, 36bp, uzunluğundadır. Aynı pozisyonda A bulunduran bireylerin (Homozigot Q/Q tipi) enzim kesimi sonucunda ise 99bp'lik tek DNA bantı beklenmesi gerekir. Her iki pozisyonu bulunduran heterozigot

bireylerde ise 99bç, 63bç, 36bç'lik üç DNA bantı beklenebilir. Bu çalışmada mesane kanseri hastası ve sağlıklı bireylerin genotipleri sırasıyla 28 hasta, 25 kontrol birey Q/Q, 18 hasta, 32 kontrol Q/R, 4 hasta R/R olarak belirlenmiştir.

PON1 I102V polimorfizimi genin 102. pozisyonda görülen C/T nükleotid değişimi (PON1 I102V) bu pozisyondaki amino asitin izolösinden valine değişimine neden olmaktadır. C/T nükleotit değişiminde T içeren bireylerde (Homozigot V/V) BspP143I enzimi ile kesim sonucunda gözlenmesi beklenen üç DNA bantı 196bç, 100bç, 19bç. uzunluğundadır. Aynı pozisyonda C bulunduran bireylerin (Homozigot I/I tipi) enzim kesimi sonucunda ise 216bç, 100bç'lik iki DNA bantı beklenmesi gerekir. Her iki pozisyonu bulunduran heterozigot bireylerde ise 216bç, 196bç, 100bç, 19bç'lik dört DNA bantı beklenebilir. Bu çalışmada mesane kanserli ve sağlıklı kontrol bireylerin PCR-DNA'larında enzim kesimi yapıldıktan sonra kesim sonucu elde edilen iki bantın uzun olanı DNA merdiveninde 216 veya 196bç'ne; kısa olanı 100bç'ne karşılık gelebilmektedir. Ancak gözlenmesi beklenen üçüncü 19bç'lik bant gözlenememiştir. Kısa DNA bantların agaroz jelde gözlenmesinde bazen sorun yaşanabilmektedir. Bu nedenle araştırılan tüm bireylerin homozigot I/I veya homozigot V/V genotiplerinden hangisi olduğu saptanamamıştır. Genotipin doğru tayini için Real-Time PCR-SNP analizi yapılması gerektiği sonucuna varılarak tüm bireyler bu yöntemle PON1 I102V polimorfizimi için analiz edilmiştir (Bkz 4.1.3).

50 hasta ile 57 sağlıklı bireyin PON1 L55M, PON1 Q192R ve PON1 I102V polimorfizimleri için bu bölümde yer alan PCR-RFLP yöntemi ile yapılan ve bölüm 4.1.2.3.'de verilen Real Time PCR yöntemi (SNP) ile yapılan genotipleme analizlerinin sonuçları birlikte değerlendirilerek tek bir tabloda verilmiştir. (Çizelge 4.1.).

PON1 L55M Restriksiyon Enzim Kesimi Sonuçları



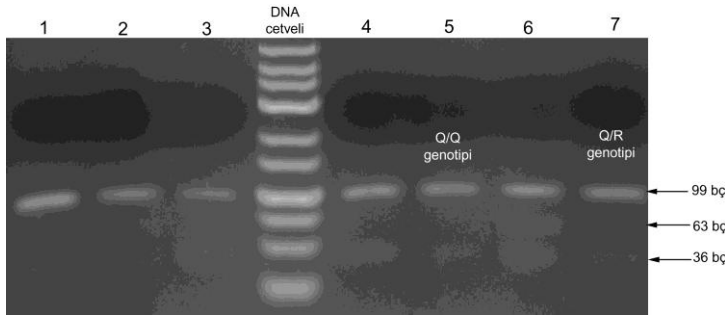
Genotip	DNA uzunluğu bç
L/L (homozigot)	170 bç
M/M(homozigot)	126bç
	44bç
L/M (heterozigot)	170bç
	126bç
	44bç

Şekil 4.5: RFLP sonucu PON1 55 bölgesinde kesilmiş bantların görünümü.

PON1 Q192R Restriksiyon Enzim Kesimi Analizi

Sonuçları

PON1Q192R için RFLP (Bsp PI) genotipleme



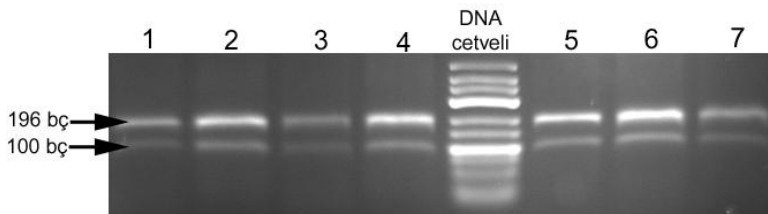
Genotip	DNA uzunluğu bç
Q/Q(homozigot)	99bç
R/R (homozigot)	63bç
	36bç
Q/R(heterozigot)	99bç
	63bç
	36bç

Şekil 4.6: RFLP sonunda PON1 192 bölgesinde kesilmiş bantların görünümü.

PON1 I102V Restriksiyon Enzim Kesimi Analizi

Sonuçları

PON1I102V için RFLP (Bsp143 I) genotipleme



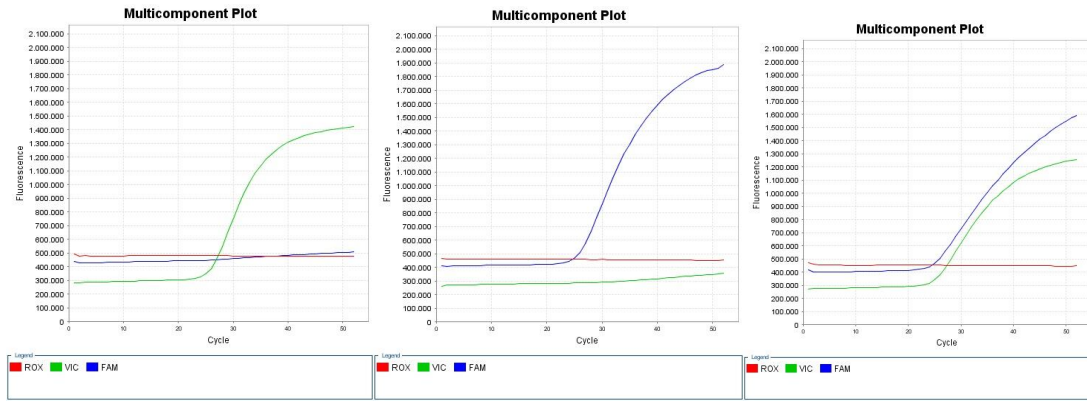
Genotip	DNA uzunluğu bç
I/I(homozigot)	196bç
	100bç
V/V(homozigot)	216bç
	100bç
I/V(heterozigot)	216bç
	196bç
	100bç
	19bç

Şekil 4.7: RFLP sonucunda PON1 102 bölgesinde kesilmiş bantların jelde görünümü.

4.1.3. PON1 SNP Polimorfizimlerinin TaqMan PCR ile Genotiplemesi

4.1.3.1. PON1 L55M Polimorfizimi Genotip sonuçları

PON1 L55M polimorfizmi için; her iki allel C nükleotiti bulduruyorsa grafikte yeşil çizgi belirgin şekilde yüksek görülmüştür ve bireyin genotipi L/L homozigot olarak değerlendirilmiştir. Her bir allel farklı nükleotitler içeriyorsa yani bir allel C diğer allel T nükleotiti içeriyorsa grafikte ise hem yeşil hem de mavi çizgi gözlenmiş ve genotip L/M olarak belirlenmiştir. Alleller T nükleotidi bulduruyorsa grafik çizgisi mavi gözlenmiştir ve genotip M/M olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.8. PON1 polimorfizimleri Real-Time PCR SNP Genotipleme Analizi sonuçlarını gösteren grafikler.

Yapılan istatistik analiz sonucunda mesane kanserinin gelişiminin L55M polimorfizminin farklı genotipleri ile ilişkili olduğu görülmüştür ($p=0,0010$). Toplam 50 hasta bireyden 15'inin LL, 20 bireyin LM ve 15 bireyin MM genotipinde olduğu belirlenmiştir. Kontrol grubunda ise 57 birey arasında 13 bireyin LL, 38 bireyin LM ve 6 bireyin MM genotipinde olduğu görülmüştür. Yapılan analiz sonucunda heterozigot LM (OR=0,333, %95 CI, 0,151 – 0,734) ve homozigot MM (OR= 3,643, %95 CI, 1,288 – 10,306) genotiplerinin mesane kanseri gelişimi üzerine etkili olduğu belirlenmiştir ($p=0,03$) (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. PON1 L55M polimorfizminin istatistiksel analiz sonuçları.

PON1		GRUP			Total
			hasta	kontrol	
L55M	L/L	Birey Sayısı	15	13	28
		GRUP içi %	%30,0	%22,8	%26,2
	L/M	Birey Sayısı	20	38	58
		GRUP içi %	%40,0	%66,7	%54,2
	M/M	Birey Sayısı	15	6	21
		GRUP içi %	%30,0	%10,5	%19,6
Total		Birey Sayısı	50	57	107
		GRUP içi %	%100,0	%100,0	%100,0

Tek allel frekansını belirlemek üzere yapılan istatistiksel analiz sonunda yalnızca L alleli taşıyor olmak hasta ve sağlıklı bireyler arasında farklılık göstermemiştir ($p=0,447$). Başka bir ifadeyle yalnızca L alleli bulundurmanın mesane kanseri gelişiminde etkisiz olduğu sonucunu ortaya koymaktadır. Ancak allellerden birisinin ya da her iki allelin M olmasının bireylerde hastalıkla ilişkili olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. PON1 L55M polimorfizmi L ve M allellerinin istatistiksel analiz sonuçları.

		GRUP			Total
			hasta	Kontrol	
ALLEL	L	Birey Sayısı	50	64	114
		GRUP içi %	%50,0	%56,1	%53,3
	M	Birey Sayısı	50	50	100
		GRUP içi %	%50,0	%43,9	%46,7
Total		Birey Sayısı	100	114	214
		GRUP içi %	%100,0	%100,0	%100,0

4.1.3.2. PON1 Q192R Polimorfizmi Genotip Sonuçları

PON1 Q192R polimorfizmi için; her iki allelin T nükleotidi bulundurması ile grafikte mavi çizgi gözlenmiş ve genotipin Q/Q homozigot olduğu sonucuna varılmıştır. Allellerin biri T diğeri C nükleotidi içeriyorsa grafikte hem mavi hem de yeşil çizgi görülmüştür. Bireyin genotipi Q/R olarak değerlendirilmiştir. Her iki allelin C nükleotidi bulundurması yeşil grafik çizgisi göstermiştir ve genotip R/R olarak belirlenmiştir.

İstatistik analiz sonucunda mesane kanserinin gelişiminin Q192R polimorfizminin farklı genotipleri arasında bir ilişki olduğu görülmüştür ($p=0,010$). 50 hasta bireyden 28'inin QQ,

18 bireyin QR ve 4 bireyin RR genotipinde olduğu belirlenmiştir. Kontrol grubunda ise 57 birey arasında 25 bireyin QQ, 32 bireyin QR genotipinde olduğu görülmüştür. Ancak RR genotipinde sağlıklı birey belirlenmemiştir. RR genotipinin yalnızca hasta bireylerde görülmesi, sağlıklı bireylerde RR genotipinin %0 oranla bulunması nedeniyle bu genotip için matematiksel karşılaştırma yapılamamaktadır (Çizelge3.4).

Çizelge 4.3. PON1 Q192R polimorfizminin istatistik analiz sonuçları.

		GRUP		Total	
		hasta	Kontrol		
Q192R	Q/Q	Birey Sayısı	28	25	53
		GRUP içi %	%56,0	%43,9	%49,5
	Q/R	Birey Sayısı	18	32	50
		GRUP içi %	%36,0	%56,1	%46,7
	R/R	Birey Sayısı	4	0	4
		GRUP içi %	%8,0	%,0	%3,7
Total		Birey Sayısı	50	57	107
		GRUP içi %	%100,0	%100,0	%100,0

Hasta ve sağlıklı bireylerde tek allel frekansının ayrı ayrı Q ve R alleli için yapılan istatistiksel analiz sonunda anlamlı bir farklılık görülmemiştir ($p=0,853$). Bir başka deyişle mesane kanseri gelişiminde Q alleli ya da R alleli bulundurmanın etkisiz olduğu sonucuna varılmaktadır. Ancak her iki allelin R olması durumunda homozigot R/R genotipinin bireylerde hastalıkla ilişkili olabileceğini düşündürmektedir.

Çizelge 4.4. PON1 Q192R polimorfizminin Q ve R allellerinin istatistiksel analiz sonuçları.

		GRUP		Total	
		hasta	kontrol		
ALLEL	Q	Birey Sayısı	74	82	156
		GRUP içi %	%74,0	%71,9	%72,9
	R	Birey Sayısı	26	32	58
		GRUP içi %	%26,0	%28,1	%27,1
Total		Birey Sayısı	100	114	214
		GRUP içi %	%100,0	%100,0	%100,0

4.1.3.3. PON1 I102V Polimorfizmi Genotip Sonuçları

Hasta ve kontrol grubuna ait tüm örneklerde her iki allelin yalnızca FAM boya (mavi) ile işaretlendiği görülmüştür. Buna bağlı olarak tüm bireylerin PON1 I102V polimorfizmi

açısından homozigot I/I genotipinde olduğu belirlenmiştir. I102V polimorfizmi için yapılan genotipleme analizleri sonucunda hem hasta hem de sağlıklı bireylerin tamamının I/I genotipinde olduğu görülmüştür. Bu nedenle herhangi bir istatistiksel analiz yapmak mümkün olmamıştır.

4.1.3.4. PON1 (L55M, Q192R, I102V) Polimorfizimlerinin Bağlantılı Genotip Sonuçları

Çalışmada mesane kanserli hasta ve sağlıklı kontrol bireylerin araştırılan PON1 polimorfizimleri için ayrı ayrı belirlenmiş olan genotiplerinin birlikte (linked) yüzde dağılımları istatistiksel olarak değerlendirilerek ve hasta ve kontrol bireyler arasında genotip ilişkileri analiz edilmiştir.

Çizelge 4.5. Mesane kanserli hasta ve kontrol gruplarında polimorfizmlerin genotip özelliklerinin % dağılımları.

	PON1 L55M			PON1 Q192R			PON1 I102V		
	L/L	L/M	M/M	Q/Q	Q/R	R/R	I/I	I/V	V/V
Hasta	%30	%40	%30	%56	%36	%8	%100	-	-
Kontrol	%26	%62	%12	%50	%61	-	%100	-	-

PON1'in L55M ve Q192R polimorfizmlerinin bağlantılı genotip sonuçları incelendiğinde tek bir polimorfizm için (LL-RR veya MM-QQ) homozigot varyant allel bulundurması bireyde mesane kanseri riskinin artması için yeterli görülmektedir. Taranan popülasyonun tamamında PON1 MM-RR genotipine sahip bireye rastlanmamıştır.

Çizelge 4.6. Mesane kanserli Hasta ve kontrol grubunda bireylerin her üç polimorfizm açısından % dağılımları

	LL/QQ	LL/QR	LL/RR	LM/QQ	LM/QR	LM/RR	MM/QQ	MM/QR	MM/RR	Toplam
Hasta	%6	%18	%8	%20	%18	-	%30	-	-	%100
Kontrol	-	%23	-	%35	%32	-	%9	%1	-	%100

4.1.4.

Mesane Kanserli Bireylerde PON1 Polimorfizimlerinin Çevresel Faktörlerle İlişkisi

Mesane kanseri hasta bireylerde cinsiyet, yaş, sigara ve alkol kullanımı, meslek özellikleri gibi değişken faktörleri belirlemek üzere anket formu düzenlenmiştir (bkz. ekler). Özellikle polimorfizimleri etkileyebilecek çevresel bir takım bilgiler sorgulanmıştır. Anket

sonuçları istatistiksel olarak değerlendirilmiş ve PON1 polimorfizmlerinin mesane kanserli hasta bireylerde çevresel faktörlerle ilişkileri araştırılmıştır.

Hasta grubunda yaş aralığının 26 ile 88 arasında olduğu belirlenmiştir. Genotiplere göre yaş dağılımı birbirine yakın bulunmuştur. Yaş ortalamaları genotiplere göre sırasıyla; Q/Q genotipi için 63, L/L genotipi için 58, Q/R genotipi için 59, L/M için 61 ve R/R için 57, M/M için 65 olarak belirlenmiştir. Yapılan istatistik analiz sonucunda yaş ile genotip dağılımları arasında önemli bir farklılık görülmemiştir (PON1 Q192R için $p=0,607$, PON1 L55M için $p=0,468$).

Mesane kanseri hasta grubu 38 erkek ve 12 kadın bireyden oluşmuştur. Mesane kanserinin görülme sıklığı cinsiyete, yaşa ve ırklara göre farklılıklar göstermektedir. Erkeklerde kadınlara oranla 2,5 katdan daha fazla gözlenen mesane tümörleri 30 yaşın altındaki kişilerde iyi-ayırımımlı tümörler olarak karşımıza çıkmaktadır ([SEER], 1973-1997, Bailey, 2001).

Buna karşın PON1 polimorfizmlerinin genotipleri ile bireylerin cinsiyetleri arasında yapılan analiz sonucunda istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmemiştir (Bkz. Ekler).

Hasta grubu bireylerden yalnızca 42 tanesi sigara kullanımı ile ilgili anket sorusunu yanıtlamıştır ve bunlardan 22 birey sigara kullandığını 20 birey ise kullanmadığını belirtmiştir. Yine sigara kullanan ve kullanmayan bireyler ile PON1 genotipleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmemiştir. Sigara kullanımı pek çok kanser tipinde kanser ile ilişkilendirilmiştir (Carbone, 1992). Mesane kanserine yakalanma riskini %20 arttırdığı belirtilmiştir (Thompson, 1987). Benzer şekilde alkol, kahve ve tatlandırıcı kullanımı ile PON1 genotipleri arasındaki ilişki istatistiksel olarak analiz edilmiş ve hiçbiri ile anlamlı bir farklılık bulunmamıştır (Bkz. Ekler).

Hipertansiyon, kolesterol, kalp hastalığı, ateroskleroz, böbrek, prostat ve karaciğer hastalıkları, felç, obezite, beyin kanaması , Alzheimer ve ailedeki kanser geçmişi ile PON1 polimorfizmleri genotipleri arasındaki ilişki istatistiksel olarak analiz edilmiş ve anlamlı bir farklılık bulunmamıştır (Bkz. Ekler).

4.2. TARTIŞMA

Bazı HDL alt guruplarına bağlı bulunan serum paraoksonaz enzimi organofosfatlı, azo boyalı, sarin gibi yabancı maddelerin detoksifikasyonunu hidrolizleyen bir A esterazdır (Aldrige WN. 1953, Pool 1972, Zech 1974, Furlong 1988, Davies ve ark., 1996 Primo-Parmo 1996, Mackness 1987). Organizmadaki endojen rölünün LDL'nin oksidasyonunu önleme ve lipid peroksidasyonuna karşı antioksidan etki göstermek olduğu düşünölmektedir (Navab 1995, Watson 1995 Mackness 1998, Aviram 1999).

Bu nedenle PON1 enzimi polimorfizimlerinin çeşitli organları, sistemleri etkileyen hastalık oluşumlarında risk faktörü olduğu araştırmalar ile gösterilmiş ve son yıllarda kanser oluşumunda da bu polimorfizimlerin ilişkisi araştırılmıştır.

Yapılan çalışmalarla son yıllarda dünyada ve ölkemizde mesane kanseri sıklığının arttığı görölmüş ve erkeklerde akciğer, prostat, kolorektal tümörlerden sonra sıklık açısından 4. sırada yer aldığı belirlenmiştir (Baykara, 2007, Dizdar, 2007). Kadınlarda ise erkeklere göre 1/3 sıklıkta görölen mesane kanseri, göğüs kanseri, sindirim sistemi kanserleri, uterus kanseri, endometriyum kanseri, over kanseri ve akciğer kanserinden sonra 8. sırada yer almaktadır (Garcia-Closas, 2007, Tural, 2006, Borkowska, 2007).

Mesane tümörlerinin oluşumunda; genetik yatkınlık başta olmak üzere sırasıyla (predisposisyonlar), endüstriyel karsinojenler, tütün, kronik irritasyon ve enfeksiyon, onkojenik virüsler, analjezik kullanımı, idrar stazı, kahve, sitostatikler gibi faktörlerin rol oynadığı düşünölmektedir (Baykara ve ark., 2007).

Mesane tümörlerinin hücre tipine göre yapılan sınıflandırılmasında (staging) epitelyal tümörler mesane tümörlerinin %98'ini oluşturmaktadır. Bunların %90'ı ise değişici epitelyal ve %7 si yassı epitelyal tümörleri kapsamaktadır. Nadiren ve daha çok genç hastalarda görölen papillom, iyi huylu (benign) bir tümördür. Nonepitelyal tümörler ise %2 oranında görölmektedir. (Macvicar ve ark., 2000).

Genetik faktörlerin mesane kanseri üzerinde risk arttırıcı etkisi ile ilgili yapılan araştırmalarda, belirteç genler belirlemek üzere geniş çaplı tek nükleotit polimorfizmi taramaları yapılmış ve NAT2 ve GSTM1'in genetik rolü mesane kanseri ile

ilişkilendirilmiştir. VEGF (vasküler endotelial growth faktör) geninin de düzenleyici bölgesindeki genel genetik varyasyonların mesane kanseri üzerinde etkili olabileceği gösterilmiştir (Garcia Closas ve ark., 2007).

Isveç popülasyonunda mesane kanseri hasta bireyler ile xeroderma pigmentosum bileşenleri grup C, grup D ve grup G, X-Ray tamir bileşenleri grup 1 ve grup 3, Nijmegen kırılma sendromu1, cyclin D1, metilen tetrafolat redüktaz, NADPH dehidrogenaz quinon1, H-ras ve glutatyon S-transferaz teta1 genlerinin polimorfizmleri arasındaki ilişkiler araştırılmıştır. XPC geninin ekzon 15'deki A/C polimorfizminde C alleli bulundurmanın mesane kanseri riskini arttırdığı, H-ras geninin ekzon1'deki T/C polimorfizminin homozigot C/C genotipinin ise mesane kanseri riskini azalttığı belirlenmiştir. DNA tamir genleri olan XPG ve NBS1 genlerindeki tek nükleotid polimorfizmleri için homozigot varyant genotiplerin ve GSTT1'in homozigot yabancı genotipinin mesane kanseri için risk faktörü olduğu bulunmuştur (Sanyal ve ark., 2004).

PON1 polimorfizmlerinin göğüs kanseri insidansına etkisi araştırılan çalışmada postmenopozal kadınlarda Q192R tek nükleotid polimorfizminin göğüs kanseri ile ilişkisi olmadığı L55M polimorfizminin ise göğüs kanseri oluşumunda önemli ölçüde risk oluşturabileceği bulunmuştur. Heterozigot L/M genotipi için OR değeri 1,23 (%95 CI, 0,92-1,65), homozigot M/M genotipi için ise OR değeri 1,58 (%95 CI, 1,05-2,37) olarak belirlenmiştir (p=0,03). Sadece ileri derecede meme kanserli bireylere bakıldığında ise M/M genotipi taşıyanlar için OR değeri 1,85 p değeri de 0,01 bulunarak homozigot M allelinin daha etkili olduğu bulunmuştur. PON Q192R ve L55M polimorfizmlerinin genotip kombinasyonları ile yapılan istatistiksel analizlerde anlamlı bir sonuca ulaşılmamıştır (Stevens ve ark., 2006).

Bu çalışmada da benzer şekilde PON1 L55M polimorfizminin heterozigot L/M (OR= 0,333; 0,151 – 0,734) ve homozigot M/M (OR= 3,643; 1,288 – 10,306) genotiplerinin hastalık ile ilişkili olduğu bulunmuştur (p=0,03). Çalışmamızda mesane kanseri ile PON1 Q192R polimorfizminin genotipleri arasında bir ilişki olduğu ortaya çıkmıştır (p=0,01). QR genotipi için OR değeri 0,440 (0,202 – 0,958), RR genotipi için OR değeri 11,129 (0,584 – 212,048) olarak bulunmuştur (p=0,09).

Fin'li erkeklerde PON1'in yeni bulunmuş bir polimorfizmi olan 102. kodonda gözlenen izolösin-valin değişiminin prostat kanseri riskini arttıran bir faktör olabileceği gösterilmiştir. İstatistiksel olarak OR değeri 7,2 (%95 CI, 2,3-22,3) p değeri 0,005 bulunmuştur. PON1'in 4. ekzonun 102. kodonunda izolösin-valin değişimine sebep olan polimorfizmin serum paraoksonaz enzim aktivitesini düşürdüğü ve heterozigot bireylerde enzim aktivitesinin homozigot bireylere göre yaklaşık %40 daha az olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmada 14 yıl süreyle prostat kanseri ön taraması yapılan yaklaşık 1600 erkek bireyin %96,4'ünün homozigot I/I ve %3,6'sının heterozigot I/V genotipine sahip olduğu görülmüştür. İstatistiksel analiz ile 102V alleli taşımanın prostat kanseri için risk faktörü olabileceği sonucuna varılmıştır (Marchenasi ve ark., 2003).

Bu çalışmada hem mesane kanseri hem de kontrol bireylerin tamamı PON1 I102V polimorfizmi açısından homozigot I/I genotipi göstermiştir. Taranan 107 Türk bireyin tamamının homozigot bulunması, Türk popülasyonu ile Fin popülasyonunun genotip dağılımı bakımından benzer olduğunu düşündürmektedir. Taranan birey sayısının artırılması ile popülasyondaki heterozigot bireylerin de tespit edilmesi mümkün olabilecektir. Ancak o zaman mesane kanseri için polimorfizmin etkisi konusunda istatistik analiz yapılabilecektir. Çalışmamızda serum paraoksonaz aktivitesine bakılmadığından Fin popülasyonu ile enzim aktivitesi bakımından karşılaştırma yapmamız mümkün olmamıştır. Bu nedenle PON1 102V genotipinin mesane kanserine etkisi olup olmadığı belirlenememiştir. PON I102V polimorfizmlerinin etkisini araştırabilmek için birey sayısını arttırmak gerekmektedir.

Aynı çalışmada diğer PON1 polimorfizmleri olan L55M ve Q192R polimorfizmlerinin prostat kanseri riskine etkileri de araştırılmıştır. Cox modeline göre yapılan istatistiksel analizde PON1 55L-192Q haplotipi (RR=11,6, %95 CI, 2,4-57,5; p=0,003) ve 55M-192Q haplotiplerini (RR=6,3, %95 CI, 1,2-32,6; p=0,027) 102V alleli ile birlikte bulunduran bireylerin prostat kanseri ile önemli ölçüde ilişkili olduğu bulunmuştur. Ancak tek başına Q192R ve L55M genotipleri için anlamlı bir sonuç bulunmamıştır (p=0,72).

Yapılan çalışmada PON1 L55M polimorfizminin genotiplerinin hastalık ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Heterozigot LM genotipi, homozigot MM genotipi ve M alleli sıklığının hastalık ile ilişkili olduğu belirlenmiştir. Yaptığımız analizler sonucunda mesane kanseri ile PON1 Q192R polimorfizminin QR, RR genotipleri ve R alleli arasında bir ilişki olduğu ortaya çıkmıştır.

Serbest radikal stresinin de prostat kanseri oluşumuna etkisi olduğu Fleshner ve arkadaşları (1998) tarafından yapılan bir çalışma ile gösterilmiştir. Ayrıca Marchesani ve arkadaşlarının (2003) yaptığı çalışma da bunu desteklemektedir. Kansere yatkınlık araştırmalarında oksidatif stres taraması yapılırken PON1 102 I/V genotipli bireylerde serum paraoksonaz aktivitesi düşük olduğundan yapılacak çalışmalarda ek tarama parametresi olarak kullanılması gerektiği ileri sürülmüştür (Marchesani ve ark., 2003).

Prostat kanserli 384 İtalyan birey ile yapılan çalışmada, PON1 Q192R polimorfizminin Q/R genotipine sahip bireylerde prostat kanseri riskinin önemli ölçüde arttığı bulunmuştur (OR=2,13 %95 CI, 1,52-2,98; $p<0,0001$) (Antognelli, 2005). Bizim bulgularımızın aksine Antognelli ve arkadaşları (2005) PON1 Q192R polimorfizminin homozigot R/R genotipinin hasta bireylerde oldukça az görüldüğünü bildirmiştir (OR=0,34, %95 CI, 0,19-0,59). Mesane kanseri üzerine yaptığımız çalışmada homozigot R/R genotipinin hastalık riskini önemli biçimde arttırdığı gözlenmiştir (OR=11,129, 0,584 – 212,048) ($p=0,09$).

Prostat kanserli hastaların %51,3'ünde PON1 L55M polimorfizminin heterozigot L/M genotipi görülmüştür ve L/M genotipinin bireyler için önemli bir risk faktörü olduğu belirlenmiştir (OR=1,44, %95 CI, 1,03-2,00) ($p=0,02$) (Antognelli, 2005). Aynı polimorfizmin homozigot M/M genotipinin de prostat kanseri riskini arttırdığı görülmüştür (OR=1,92 %95 CI, 1,19-3,10) ($p=0,004$) (Antognelli ve ark., 2005).

Yapılan çalışmada mesane kanseri için PON1 L55M polimorfizminin benzer biçimde risk oluşturduğu gözlenmiştir. Heterozigot L/M genotipi için OR değeri 0,333, %95 CI, 0,151 – 0,734, homozigot M/M genotipi için OR değeri 3,643, %95 CI, 1,288 – 10,306 olarak belirlenmiştir ($p=0,03$).

Ergen ve arkadaşları (2010) tarafından yurdumuzda osteosarkomlu 50 birey ile yapılan çalışmada, PON1 Q192R polimorfizminin homozigot Q/Q genotipinin (OR=0,365, %95 CI, 0,161-0,83; $p=0,015$) ve PON1 L55M polimorfizminin homozigot L/L genotipinin (OR=0,136, %95 CI, 0,037-0,50; $p=0,001$) osteosarkom gelişiminde risk faktörü olabileceği bulunmuştur Aynı çalışmada PON1 polimorfizmlerinin haplotip karşılaştırılması yapılmış ve PON1 192Q-55L haplotipinin osteosarkom ile ilişkili olduğu görülmüştür ($p=0,02$).

Bu çalışmada ise PON1 L55M polimorfizminin heterozigot L/M genotipi (OR=0,333, %95 CI, 0,151 – 0,734) ile homozigot M/M genotipinin (OR= 3,643, %95 CI, 1,288 – 10,306) mesane kanseri riski üzerine etkili olduğu belirlenmiştir (p=0,03). Mesane kanseri ve PON1 Q192R polimorfizminin genotipleri arasında yaptığımız istatistik analizlere göre dikkate değer bir ilişki olduğu ortaya çıkmıştır (p=0,01). PON1 192 polimorfizminin Q/R genotipi (OR= 0,440, 0,202 – 0,958) ve RR genotipi (OR=11,129, 0,584 – 212,048) hastalık gelişiminde risk faktörü olarak bulunmuştur (p=0,09).

PON enzimi polimorfizimlerinin çeşitli organları, sistemleri etkileyen hastalık oluşumlarında risk faktörü olduğu araştırmalar ile gösterilmiştir. Son yıllarda bazı genetik polimorfizimlerin koroner arter hastalıkları (KAH) için risk faktörü oluşturabileceği bulunmuştur. Lipit peroksidasyonunu önlemede önemli bir enzim olan serum paraoksonaz enzim aktivitesi ile ilişkili PON1 polimorfizimlerinin KAH ile ilişkisi çeşitli dünya populasyonlarında araştırılmıştır.

Japon populasyonu ile yapılan çalışmada, PON1 Q192R polimorfizmi ve KAH arasındaki ilişkiye bakılmış ve R alleli taşıyanlarda KAH riskinin yüksek olduğu belirlenmiştir (Zama ve ark., 1997). Bu çalışmada beyaz ırk ile allel frekansları karşılaştırılmış ve Japon bireylerin R allel frekansının daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Benzer şekilde Amerikalı (Serrato ve ark., 1995) ve Fransız (Ruiz ve ark., 1995) populasyonları ile yapılan çalışmayla da R allelinin (Arjinin) KAH insidansı ile ilişkili olduğu gösterilmiştir.

Hintli ve Asyalı bireylerde yapılan araştırma sonucunda ise Çinlilerde polimorfizm ile hastalık arasında bir ilişki gözlenmemiş ancak Hint populasyonunda PON1 Q192R polimorfizminin KAH için bağımsız bir risk faktörü olduğu belirlenmiştir (Sanghera ve ark., 1997, Pati ve ark., 1998). Fin populasyonu ile yapılan çalışmada da Çinlilerle aynı sonuç elde edilmiştir (Antikainen ve ark., 1996).

Ülkemizde Koroner Arter Hastalığı (KAH) ile yapılan çalışmanın sonucunda PON1 L55M polimorfizmi hastalık için risk faktörü oluştururken PON1 Q192R polimorfizminin KAH üzerine herhangi bir etkisi olmadığı bildirilmiştir. Enzim aktivitesi düşük olan M allelinin hasta bireylerde daha fazla bulunduğu görülmüştür (p=0,003) (Taşkıran ve ark., 2009).

Aynacıoğlu ve arkadaşlarının (2000) KAH'lı Türk hastalar ile yapmış olduğu çalışma sonucunda, Taşkıran (2009) ve arkadaşlarının yaptığı çalışma ile benzer şekilde PON1 Q192R polimorfizmi ile hastalık arasında ilişki olmadığı görülmüştür. Türk populusyonu, Fin ve Çin populusyonları ile PON1 Q192R polimorfizmi açısından karşılaştırıldığında, her üç populusyonda polimorfizm dağılımı benzerlik göstermekte olup, hepsinde KAH için bir risk faktörü olmadığı anlaşılmaktadır.

KAH ile PON1 L55M polimorfizmi arasındaki ilişkiye bakıldığında ise Japon populusyonu için bir ilişki bulunmadığı ancak Türk populusyonunda M allelinin KAH için risk faktörü olduğu grlmektedir (Zama ve ark., 1997, Taşkıran ve ark., 2009).

Türk ve dünya populusyonlarında PON1 polimorfizmlerinin diyabet ile arasındaki ilişkiler araştırılmış ve hastalık için risk faktörü olabileceği bulunmuştur.

Türk populusyonunda Tip2 diyabet hastalarında yapılan çalışmada PON1 Q192R ve L55M polimorfizmlerinin hastalık üzerine etkileri araştırılmış, Q/Q ve M/M genotiplerinin hastalık gelişiminde risk faktörü olduğu belirlenmiştir (Ergun ve ark., 2011).

Altuner ve arkadaşlarının (2010) yaptığı çalışmada ise PON1 Q192R ve L55M polimorfizmlerinin Tip2 diyabet komplikasyonlarıyla ilişkileri araştırılmış, her iki polimorfizmin hastalıkla ilişkisi olduğu grlmş ancak Q192R polimorfizminin heterozigot Q/R genotipine sahip bireylerde diyabetik komplikasyon ortaya çıkmasında üç kat daha fazla etkili olduğu gözlenmiştir.

Avustralyalı diyabetik retinopati hastaları ile yapılan araştırma sonucunda PON1 L55M polimorfizmine ait L/L genotipinin diyabetik retinopati gelişimi için risk faktörü olduğu ancak PON1 Q192R polimorfizminin hastalık üzerine etkisi olmadığı görülmüştür (Kao-Yan-Lin ve ark., 1998).

ek populusyonunda makroanjyopatili diyabet hastası bireylerle yapılan çalışmada PON1 geninin Q192R ve L55M polimorfizmleri araştırılmış ve PON1 192 Q/Q, PON1 55 M/M genotiplerinin hastalık için risk faktörü olabileceği belirlenmiştir. Bunun yanında homozigot R/R ve L/L genotipli bireylerde serum paraoksonaz enzim aktivitesi yüksek olup

daha iyi diyabet kontrolü sağlanırken, makroanjiyopatili diyabet hastalarında serum paraoksonaz enzim aktivitesi düşük ve diyabet kontrolünün zayıf olduğu bulunmuştur (Flekac ve ark., 2008).

PON1 Q192R polimorfizminin Q/Q genotipinin İspanyol migren hastalarında erken dönem migren ile ilişkili olabileceği bulunmuş, beyaz ırk ve Asya populasyonları ile yapılan meta analizi sonucunda PON1 L55M polimorfizminin L/M genotipinin Parkinson hastalığında risk faktörü olduğu belirlenmiştir. (Garcia-Martinez ve ark., 2010, Zintzaras ve ark., 2004).

Membranoproliferatif glomerulonefritli (MPGN) Türk hastalarda yapılan çalışma sonucunda PON1 Q192R polimorfizminin Q/Q genotipine sahip bireylerde serum aktivasyonunun düşük olduğu aynı zamanda homozigot Q/Q genotipinin MPGN gelişiminde risk faktörü olabileceği bulunmuştur (Bilge ve ark., 2007).

Bu çalışmada PON1 Q192R genotipi allel dağılımlarına bakıldığında yaygın genotip %49,5 ile QQ, %46,7 ile QR ve %3,7 ile RR olarak gözlenmiştir. Varyant allel olan R'nin sıklığı Hardy-Weinberg kuralına göre hesaplanarak 0,27 olarak bulunmuştur. Yine Türk populasyonunda PON1 polimorfizmleri ile yapılan farklı çalışmalarda allel dağılımı ve varyant allel frekansı bizim çalışmamızla karşılaştırıldığında PON1 Q192R genotipi için Aynacıoğlu'nun (1999) yaptığı çalışmada benzer sonuç elde edilmiştir (0,31). Karakaya (1991) ise 105 bireyle yaptığı çalışmada R allel frekansını 0,37 olarak bulmuştur. Q alleli, R alleli ile enzim aktivitesi bakımından karşılaştırıldığında düşük aktiviteli alleli temsil etmektedir.

Dünya populasyonlarına bakıldığında PON1 Q192R için varyant allel frekansının Japon ve Çin'lilerde 0,58 (Zama ve ark., 1997, Sanghera ve ark., 1998), Avrupa populasyonlarında ise 0,24-0,30 arasında; Amerikan ve Hint populasyonu için 0,31 bulunmuştur. Türk populasyonunun allel frekansı bakımından Avrupa (Herrmann ve ark., 1996, Blatter ve Garin, 1997, Mackness ve ark., 1997, Cascorbi ve ark., 1995), Amerika (Serrato ve Marian,1995) ve Hint (Sanghera ve ark., 1998) populasyonu ile benzerlik gösterdiği görülmektedir.

Bizim çalışmamızda PON1 L55M genotipi allel dağılımı; yaygın genotip %54,2 ile LM, %26,2 ile LL ve %19,6 ile MM olarak belirlenmiştir. Varyant allel olan M allelinin frekansı

0,47 olarak hesaplanmıştır. Aynacıoğlu'nun (1999) yaptığı çalışmada ise Türk populasyonu için M allel frekansı 0,28 olarak belirlenmiştir ve bu çalışmada allel dağılımına baktığımızda LL (%52,5) ve LM (%38,6) genotiplerinin dağılımı bizim çalışmamızdakinden farklı bulunmuştur. Bizim çalışmamızda yaygın genotip LM olarak belirlenmiştir. Aynacıoğlu kendi çalışmasında bulduğu M allel frekansının düşük olduğunu belirtmektedir. Avrupa populasyonlarında M allel frekansına bakıldığında 0,33-0,38 olduğu bulunmuştur (Blatter ve Garin 1997, Mackness 1997, Cascorbi, 1999). Hint populasyonunda ise M alleli frekansı 0;21'dir (Sanghera, 1998). Enzim aktivitesi bakımından alleller karşılaştırıldığında MM homozigot bireylerin LL ve LM genotiplerine göre %50 daha düşük PON1 aktivitesi gösterdiği bulunmuştur (Mackness ve ark., 1997).

Yapılan çalışmada PON1 enzim gen bölgesinin sık çalışılmış L55M ve Q192R bölgeleri ile nadir çalışılmış olan I102V bölgesinde görülen polimorfik farklılıkların mesane kanseri gelişimi üzerine etkileri araştırılmıştır. Mesane kanserli hasta grubunda MM genotipinin sağlıklı bireylere göre daha fazla olduğu belirlenmiş, LL genotipinde ise hasta ve kontrol bireyler arasında önemli bir farklılık gözlenmemiştir. LM ve MM genotipleri bulunduran bireylerde hastalığa yakalanma olasılığının yüksek olduğu ancak MM genotipinin mesane kanseri gelişiminde risk faktörü olabileceği belirlenmiştir. Yalnızca L alleli bulundurmamak hastalık gelişimini etkilememekle beraber allellerden birisinin ya da her iki allelin M olması mesane kanseri için önemli bulunmuştur. PON1 Q192R polimorfizminin QQ ve QR genotipleri mesane kanseri ile istatistiksel olarak ilişkili bulunmuştur. Ancak RR genotipinin hastalarda bulunup kontrol grubunda olmaması, RR genotipinin hastalık gelişiminde önemli rol oynayabileceğini düşündürmüştür. PON1 Q192R genotipi için Hardy-Weinberg kuralına göre hesaplanarak varyant allel frekansı 0,27 olarak bulunmuştur. Aynacıoğlu'nun (1999) Türk populasyonu ile yaptığı çalışmada benzer sonuç elde edilmiştir (0,31). PON1 L55M genotipi için M allel frekansı 0,47 olarak hesaplanmıştır. Aynacıoğlu'nun (1999) yaptığı çalışmada allel frekansı 0,28 olarak belirlenmiştir.

PON1 I102V bölgesindeki polimorfizmler araştırıldığında tüm hasta ve kontrol bireylerin homozigot I/I genotipinde olduğu görülmüştür. Bu bölge polimorfizminin mesane kanseri gelişimi üzerine etkisi olmadığı düşünülmüştür. Ancak yaptığımız çalışmanın Türk populasyonu için PON1 I102V bölgesi polimorfizmi açısından bir ön çalışma niteliğinde olabileceği belirlenmiştir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında, Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Üroloji Anabilim Dalı'nda mesane kanseri teşhisi konmuş hastalarda PON1 enzim geninin üç ayrı bölgesindeki polimorfizmleri belirlenerek mesane kanseri gelişimine etkileri araştırılmıştır.

1. Yapılan istatistik analiz sonucunda mesane kanserinin gelişiminin L55M polimorfizminin farklı genotipleri ile ilişkili olduğu görülmüştür ($p=0,0010$). PON1 L55M bölgesinin MM genotipinin mesane kanseri için risk faktörü olabileceği, LM genotipli bireylerin ise mesane kanseri yatkınlığı gösterebileceği belirlenmiştir ($p=0,013$). LL genotipinde bireylerin mesane kanseri yatkınlığı görülmemiştir ($p=0,555$). Yapılan analiz sonucunda heterozigot LM ve homozigot MM genotiplerinin mesane kanseri gelişimi üzerine etkili olduğu belirlenmiştir ($p=0,03$). Alellerden birisinin ya da her iki alelin M olmasının bireylerde hastalıkla ilişkili olduğu belirlenmiştir

2. PON1 Q192R bölgesi polimorfizmleri incelendiğinde mesane kanserinin gelişiminin Q192R polimorfizminin farklı genotipleri ile ilgili olarak QQ genotipli bireylerin hastalığa yatkınlık göstermediği belirlenmiş, mesane kanseri gelişiminde Q aleli ya da R aleli bulundurmanın etkisiz olduğu sonucuna varılmıştır ($p=0,853$). Ancak her iki alelin R olması durumunda homozigot R/R genotipinin bireylerde hastalıkla ilişkili olabileceğini düşündürmektedir.

3. Mesane kanserli ve sağlıklı bireylerin tamamı PON1 I102V polimorfizmi açısından homozigot I/I genotipi olarak bulunmuştur. Taranan 107 Türk bireyin tamamının homozigot bulunması, Türk popülasyonunun çoğunluğunun yaygın olarak bu polimorfizm için izolösün taşıdığını göstermektedir. Taranan birey sayısının artırılması ile popülasyondaki heterozigot bireylerin de tespit edilmesi mümkün olabilecektir. Ancak o zaman mesane kanseri için polimorfizmin etkisi konusunda istatistik analiz yapılabilir.

4. PON1 Q192R genotipi alel dağılımlarına bakıldığında yaygın genotip %49,5 ile QQ, %46,7 ile QR ve %3,7 ile RR olarak gözlenmiştir. Varyant alel olan R'nin sıklığı Hardy-Weinberg kuralına göre hesaplanarak 0,27 olarak bulunmuştur. PON1 L55M genotipi alel dağılımı; yaygın genotip %54,2 ile LM, %26,2 ile LL ve %19,6 ile MM olarak belirlenmiştir. Varyant alel olan M alelinin frekansı 0,47 olarak hesaplanmıştır.

5. PON1'in L55M ve Q192R polimorfizmlerinin bağlantılı genotip sonuçları incelendiğinde tek bir polimorfizm için (LL-RR veya MM-QQ) homozigot varyant alel bulundurması bireyde mesane kanseri riskinin artması için yeterli görülmektedir. Taranan populasyonun tamamında PON1 MM-RR ve LM-RR genotiplerine sahip bireye rastlanmamıştır.

6. Mesane kanseri hasta bireylerin yaşı istatistiksel olarak değerlendirildiğinde hasta grubunda yaş aralığının 26 ile 88 arasında olduğu belirlenmiştir. Genotiplere göre yaş dağılımı birbirine yakın bulunmuştur. Yaş ortalamaları genotiplere göre sırasıyla; Q/Q genotipi için 63, L/L genotipi için 58, Q/R için 59, L/M için 61 ve R/R için 57, M/M için 65 olarak belirlenmiştir. Yapılan istatistik analiz sonucunda yaş ile genotip dağılımları arasında önemli bir farklılık görülmemiştir (PON1 Q192R için $p=0,607$, PON1 L55M için $p=0,468$).

7. Mesane kanseri hasta bireylerin cinsiyet dağılımı 38 erkek ve 18 kadın olarak bulunmuş ve mesane kanserinin cinsiyete bağlı görülme sıklığı, 2,1 olarak çıkmıştır. Buna karşın PON1 polimorfizmlerinin genotipleri ile bireylerin cinsiyetleri arasında yapılan analiz sonucunda istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmemiştir.

8. Mesane kanseri hasta bireylerde sigara, alkol, kahve ve tatlandırıcı kullanımı gibi değişken çevresel faktörler istatistiksel olarak incelendiğinde kullanan ve kullanmayan bireylerde PON1 genotipleri arasında anlamlı bir ilişki görülmemiştir.

9. Hipertansiyon, kolesterol, kalp hastalığı, ateroskleroz, böbrek, prostat ve karaciğer hastalıkları, felç, obezite, beyin kanaması, Alzheimer ve ailedeki kanser geçmişi ile PON1 polimorfizmleri genotipleri arasındaki ilişki istatistiksel olarak analiz edilmiş ve anlamlı bir farklılık bulunmamıştır.

10. Mesane kanseri hasta bireylerde meslek özellikleri ile PON1 polimorfizmleri arasındaki ilişki değerlendirildiğinde bir ilişki olmadığı görülmüştür.

KAYNAKLAR

Ağaçhan, B., Yılmaz, H., Ergen, H.A., Karaali, Z.E. ve Isbır, T. “Paraoxonase (PON1) 55 and 192 Polymorphism and Its Effects to Oxidant-Antioxidant System in Turkish Patients with Type 2 Diabetes Mellitus”, *Physiological Research*, 54:287-293, (2005).

Aldridge, W.N., “Serum Esterases. 1. Two types of esterase (A and B) hydrolysing p-nitrophenyl acetate, propionate and butyrate and a method for their determination”, *Biochem. J.* 53, 110-117, (1953).

Altuner, D., Süzen, S.H., Ateş, İ., Koç, G.V., Aral, Y., Karakaya, A., “Are PON1 Q/R 192 and M/L 55 Polymorphisms Risk Factor for Diabetes complications in turkish population?”, *J Clin Biochem*, DOI: 10.1016, (2010).

Ames, BN. “Dietary carcinogens and anticarcinogens. Oxygen radicals and degenerative diseases.”, *Science*, 221:1256–1264, (1983).

Antikainen, M., Murtomaki, S., Syvanne, M., Pahlman, R., Tahvanainen, E., Jauhiainen, M., Frick, M. H., Ehnholm, C., “The Gln-Arg 191 polymorphism of human paraoxonase gene (HUMPONA) is not associated with the risk of coronary artery disease in Finns.”, *J. Clin. Invest.* 98, 883–885(1996).

Antognelli, C., Mearini, L., Talesa, V.N., Giannantoni, A., Mearini, E., “ Association of CYP17,GSTP1 and PON1 Polymorphisms With the Riskof Prostate Cancer.”, *The Prostate*, 63:240-251, (2005).

Araki, S., Makita, Y., Canani, L., Ng, D., Warram, J.H., Krolewski, A.S., “Polymorphisms of Human Paraoxonase 1 Gene (PON1) and Susceptibility to Diabetic Nephropathy in Type I Diabetes Mellitus”, *Diabetologia*, 43: 1540-1543, (2000).

Aviram, M., “Does paraoxonase play a role in susceptibility to cardiovascular disease.”, *Mol. Med. Tod.*, 5: 381-6, (1999).

Aviram, M., Rosenblat, M., "Paraoxonases 1, 2 and 3, oxidative stres and macrophage foam cell formation during atherosclerosis development.", Free Radical Biology and Medicine, Vol.37, 9:1304-1316, (2004).

Aynacıoğlu, A. Ş., Kepekçi, Y., "The human paraoxonase Gln-Arg192 (Q/R) polymorphism in Turkish patients with coronary artery disease", International Journal of Cardiology, 74, 33-37, (2000).

Bailey, M., Sarosdy, M., "Fast Facts – Bladder Cancer" © 1. Baskı, (2001).

Bauters, C., Amant, C., Boulier, A., Cabrol, P., McFadden, E., Duriez, P., Bertrand, M.E. and Amouyel, P., "Paraoxonase Polymorphism (Gln192Arg) as a Determinant of the Response of Human Coronary Arteries to Serotonin", Circulation Journal of the American Heart Association, 101:740-743, (2000).

Baykara, M. (2007) Üroloji/Mesane Tümörleri.

Erişim:http://www.akdeniz.edu.tr/tip/web/eng/ders_form/UROLOJI/baykara_mesane.htm
[15 Ocak 2008].

Bıyıklı, N.K., Alpay, H., Yıldız, N., Ağaçhan, B., Ergen, A., Zeybek, Ü., Bozkurt, N., İşbir, T., "Paraoxonase 1 192 and 55 polymorphisms in nephrotic children", Pediatr Nephrol, 21:649-654, (2006).

Bilge, I., Şirin, A., Ağaçhan, B., Emre, S., Sadıkoğlu, B., Yılmaz, H., Sucu, A., İşbir, T., "Is paraoxonase 192 gene polymorphism a risk factor for membranoproliferative glomerulonephritis in children?", Cell Biochem Funct, 25:159-165, (2007).

Blatter Garin, M.C., James, R.W., Dussoix, P., Blanché, H., Passa, P., Froguel, P. and Ruiz, J., "Paraoxonase Polymorphism Met-Leu54 Is Associated with Modified Serum Concentrations of the Enzyme. A Possible Link between the Paraoxonase Gene and Increased Risk of Cardiovascular Disease in Diabetes", J. Clin. Invest. 99(1):62-66, (1997).

Borkowska, E., Binka-Kowalska, A., Constantinou, M., Nawrocka, A., Matych, J., Kaluzewski, B., "P53 Mutations in Urinary Bladder Cancer Patients from Central Poland", *J Appl Genet*, 48(2): 177-183, (2007).

Brealey, C.J., Walker, C.H., Baldwin, B.C., "A-esterase activities in relations to the differential toxicity of primiphos-methyl to birds and mammals.", *Pestic. Sci.*, 11, 546-554,(1980).

Canto, M.T., Chu, K.C., "Annual cancer incidence rates for Hispanics in the United States. *Surveillance, Epidemiology and End Results*, 1992-1996, *Cancer*, 88; 2642, (2000).

Carbone, D., "Smoking and cancer.", *The American Journal of Medicine*, Vol. 93, 1(1): 13-17, (1992).

Cascorbi, I., Drakoulis, N., Brockmüller, J., Maurer, A., Sperling, K. and Roots, I., "Arylamine N-acetyltransferase (NAT2) mutations and their allelic linkage in unrelated Caucasian individuals: Correlation with phenotypic activity.", *Am. J. Hum. Genet.*, 57:581-592, (1995).

Davies, H.G., Richter, R.J., Keifer, M., Broomfield, C.A., Sowalla, J., Furlong, C.E., "The effect of the human serum paraoxonase polymorphism is reversed with diazoxon, soman and sarin.", *Nat. Genet.*, 14, 334-336, (1996).

Demirdöğen, B.C., Demirkaya, Ş., Türkanoglu, A., bek, S., Arınç, E., adalı, O., "Analysis of paraoxonase 1 (PON1) genetic polymorphisms and activities as risk factors for ischemic stroke in Turkish population", *Cell Biochemistry and Function*, 27:558-567, (2009).

Dizdar, Y. (17 Nisan 2007). Mesane Kanseri. Pfizer Onkoloji, Erişim : http://www.pfizeronkoloji.com/Toplum_KanserNedir_Mesane.aspx [14 ocak 2008].

Eiberg, H., Mohr, J., Schmiegelow, K., Nielsen, L. S., Williamson, R., “Linkage relationships of paraoxonase (PON) with other markers: indication of PON- cystic fibrosis syntený.”, *Clin. Genet.*, 28: 265-271, (1985).

Ergen, A., Kılıçoğlu, Ö., Özger, H., Ağaçhan, B., İşbir, T., “Paraoxonase 1 192 and 55 polymorphisms in osteosarcoma”, *Mol Biol Rep*, DOI 10.1007:11033-010- 0538-8, (2010).

Ergun, M.A., Yurtcu, E., demirci, H., İlhan, M.N., Barkar, V., Yetkin, İ., Menevşe, A., “PON1 55 and 192 Gene Polymorphisms in Type 2 Diabetes Mellitus Patients in a Turkish Population”, *Biochem Genet*, 49:1-8, (2011).

Flekac, M., Skrha, J., Zidkova, K., Lacinova, Z., Hilgertova, J., “Paraoxonase 1 gene Polymorphisms and Enzyme Activities in Diabetes Mellitus”, *Physiol Res*, 57:717-726, (2008).

Fleshner, N.E., Klotz, L.H., “Diet, androgens, oxidative stress and prostate cancer susceptibility.”, *Cancer Metastasis Rev.*, 17: 325-330 (1998-99).

Furlong, C. E., Richter, R. J., Seidel, S. L., Motulsky, A. G., “Role of genetic polymorphism of human plasma paraoxonase/arylesterase in hydrolysis of the insecticide metabolites chlorpyrifos oxon and paraoxon.”, *Am. J. Hum. Genet.*, 43: 230-238, (1988).

Garcia-Closas, M., Malats, N., Real, F.X., Yeager, M., Welch, R., Silverman, D., Kogevinas, M., Döşemeci, M., Figueroa, J., Chatterjee, N., Tardón, A., Sera, C., Carrato, A., Garcia-Closas, R., Murta-Nascimento, C., Rothman, N., Chanock, S.J., “Large-Scale Evaluation Of Candidate Genes Identifies Associations between VEGF Polymorphisms and Bladder Cancer Risk”, *Plos Genetics*, 3(2): 287-293, (2007).

Garcia-Martin, E., Martinez, C., Serrador, M., Alonso-Navarro, H., Navacerrada, F., Agundez, J.A.G., Jimenez-Jimenez, F.J., “Paraoxonase 1 (PON1) polymorphisms and risk for migraine”, *J Neurol*, 257:1482-1485, (2010).

Geldmacher-von Mallinckrodt, M., Lindorft, H. H., Petenyi, M., Flugel, M., Fischer, T., Hiller, T., "Genetisch determinierter Polymorphismus de menschlichen Serum-Paroxonase (E.C.3.1.1.2).", *Humangenetik*, 17: 331-335, (1973).

Goldstein, BD., Witz, G. "Free radicals and carcinogenesis.", *Free Radic Res Commun*, 11:3-10. (1990).

Greenlee, R. T., Murray, T., Bolden, S., Wings, P. A., "Cancer statistics", *Cancer J Clin*, 50; 7, (2000).

Hassett, C., Richter, R. J., Humbert, R., Chapline, C., Crabb, J. W., Omiecinski, C. J., Furlong, C. E., "Characterization of cDNA clones encoding rabbit and human serum paraoxonase: the mature protein retains its signal sequence.", *Biochemistry*, 30: 10141-10149, (1991).

Herrmann, S.M., Blanc, H., Poirier, O., Arveiler, D., Luc, G., Evans, A., Marques-Vidal, P., Bard, J.M., Cambien, F., "The Gln/Arg polymorphism of human paraoxonase (PON 192) is not related to myocardial infarction in the ECTIM Study.", *Atherosclerosis*, 126: 299-303, (1996).

Horke, S., Witte, I., Wilgenbus, P., Krüger, M., Strand, D., Förstermann, U., "Paraoxonase-2 reduces oxidative stres in vascular cells and decreases endoplasmic reticulum stres-induced caspase activation.", *Circulation*, 115: 2055-2064, (2007).

Huen, K., Barcellos, L., Beckman, K., rose, S., Eskenazi, B., Holland, L., "Effects of PON Polymorphisms and Haplotypes on Molecular Phenotype in Mexican- American Mothers and Children", *Environmental and Molecular Mutagenesis*, DOI 10.1002/em.20567, (2010).

Humbert, R., Adler, D.A., Disteche, C.M., Haset, C., Omiecinski, C.J., Furlong, C.E., "The Molecular Basis of the Human Serum Paraoxonase Activity Polymorphism", *Nature Genetics*, Vol.3:73-76, (1993).

Jeffreys, A.J., Wilson, V., Thein, S.L., "Hypervariable minisatellite region in human DNA.", *Nature*, 314: 67-73, (1985).

Karakaya, A., Suzen, S., Sardas, S., Karakaya, A.E., Vural, N., "Analysis of the serum paraoxonase/arylesterase polymorphism in a Turkish population.", *Pharmacogenetics*, 1: 58-61, (1991).

Kao, Y.L., Donaghue, K., Chan, A., Knight, J., Slink, M., "A Variant of Paraoxonase (PON1) Gene is Associated With Diabetic Retinopathy in IDDM", *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, Vol 83, No7:2589-2592, (2008).

Krisch, K., "Enzymatische hydrolyse von Diäthyl-p-nitrophenylphosphat (E600) durch menschliches serum.", *Z. Klin.Chem. u. Klin. Biochem*, 6: 41-45, (1968).

La Du, B. N., "Human serum PON1/arylesterase", *Pharmasogenetics of Drug Metabolism* (Edited by Kalow W.), New York, 51-59, (1992).

Lynch, C.F., Cohen, M.B., "Urinary System", *Cancer*, 75; 316, (1995).

Mackness, B., Mackness, M.I., Arrol, S., Turkei, W. And Durrington, P.N., "Effects of the molecular polymorphisms of human paraoxonase (PON1) on the rate of hydrolysis of paraoxon.", *Br. J. Pharmacol.*, 122: 265-268, (1997).

Mackness, B., Durrington, P.N., Mackness, M., "Human Serum Paraoxonase", *Gen. Pharmac.* Vol. 31, No.3, 329-336, (1998).

Mackness, M. I., Thompson, H. M., Hardy, A. R., Walker, C. H., "Distinction between A-esteraz and arylesterases. Implications for esterase classification.", *Biochem. J.*, 245; 293-296, (1987).

Macvicar, A.D., "Bladder cancer staging.", *BJU International*, Vol. 86, 111-122, (2000).

Marchesani, M., Hakkarainen, A., Tuomainen, T.P., Kaikkonen, J., Pukkala, E., Uimari, P., Seppälä, E., Matikainen, M., Kallioniemi, O-P., Schleutker, J., Lehtimäki, T., Salonen,

J.T., "New Paraoxonase 1 Polymorphism I102V and the Risk of Prostate Cancer in Finnish Men", *Journal of the National Cancer Institute*, 95(11):812-818, (2003).

McGuigan, F.E., Ralston, S.H., "Single nucleotide polymorphism detection: allelic discrimination using TaqMan.", *Psychiatr Genet.*, 12(3):133-6, (2002).

Memişoğulları, R., Orhan, N., "Paraoksonaz ve kanser", *Konuralp Tıp Dergisi*, 2(2):22-26, (2010).

Mochizuki, H., Scherer, S. W., Xi, T., Nickle, D. C., Majer, M., Huizenga, J. J., Tsui, L.-C., Prochazka, M., "Human PON2 gene at 7q21.3: cloning, multiple mRNA forms, and missense polymorphisms in the coding sequence.", *Gene*, 213: 149-157, (1998).

Morita, A., Nakayama, T., Doba, N., Hinohara, S., Mizutani, T., Soma, M., "Genotyping of triallelic SNPs using TaqMan® PCR", *Molecular and Cellular Probes*, 21 (3): 171–6, (2007).

Mueller, R. F., Hornung, S., Furlong, C. E., Anderson, J., Giblett, E. R., Motulsky, A. G., "Plasma paraoxonase polymorphism: a new enzyme assay, population, family, biochemical, and linkage studies.", *Am. J. Hum. Genet.*, 35: 393-408, (1983).

Mullis, K., "The unusual origin of the polymerase chain reaction.", *Scientific American*, 262 (4):56-61, 64-5, (1990).

Navab, M., Hama, S., Nguyen, T., Aldons, J.L. and Fogelman, A. M., "High density lipoprotein from fatty streak prone mice on atherogenic diet contains reduced levels of paraoxonase.", *FASEB J.*, 9: A584 (1995).

Nielsen, A., Eiberg, H., Mohr, J., "Number of loci responsible for the inheritance of high and low activity of paraoxonase.", *Clin. Genet.*, 29: 216-221, (1986).

Odawara, M., Tachi, Y. and Yamashita, K. "Paraoxonase Polymorphism (Gln192Arg) is Associated with Coronary Heart Disease in Japanese Noninsulin-Dependent Diabetes Mellitus", *Journal of Clinic Endocrinology and Metabolism*, 82(7):2257-2260, (2007).

Ombres, D., Pannitteri, G., Montali, A., Candeloro, A., Seccareccia, F., Campagna, F., Cantini, R., Campa, P.P., Ricci, G. and Arca, M., "The Gln-Arg192 Polymorphism of Human Paraoxonase Gene is not Associated with Coronary Artery Disease in Italian Patients", *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.*, 18: 1611- 1616, (1998).

Parker, S.L., Tong, T., Bolden, S., Wingo, P. A., "Cancer Statistics", *CA Cancer J Clin*, 47: 5-27, (1997).

Pasdar, A., Adams, H.R., Cumming, A., Cheung, J., Whalley, L., St Clair, D. and MacLeod, M-J., "Paraoxonase Gene Polymorphisms and Haplotype Analysis in a Stroke Population", *BMC Medical Genetics*, 7(28): 1-6, (2006).

Pati, N., Pati, U., "Paraoxonase gene polymorphism and coronary artery disease in Indian subjects", *International Journal of Cardiology*, 66, 165-168, (1998).

Playfer, J. R., Eze, L. C., Bullen, M. F., Evans, D. A. P., "Genetic polymorphism and interethnic variability of plasma paraoxonase activity.", *J. Med. Genet.*, 13: 337-342, (1976).

Poore, R.E., Neal, R.A., "Evidence for extrahepatic metabolism of parathion", *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 23: 759-768 (1972).

Primo-Parmo SL, Sorenson RC, Teiber J, Du BNL., "The Human Serum Paraoxonase/Arylesterase Gene (PON1) Is One Member of a Multigene Family.", *Genomics*, 33:498-507 (1996).

Ruiz, J., Blanché, H., James, R.W., Blatter-Garin, M.C., Vaisse, C., Charpentier, G., Cohen, N., Morabia, A., Passa, P., Froguel, P., "Gln-Arg 192 polymorphism of paraoxonase and coronary heart disease in type 2 diabetes.", *Lancet*, 346:869-872, (1995).

Sandberg, A.A., Berger, C.S., "Review of chromosome studies urological tumors. II. Cytogenetics and molecular genetics of bladder cancer.", *J. Urol.*, 151: 545- 60, (1994).

Sanghera, D.K., Saha, N., Aston, C.E., Kamboh, M.I., "Genetic Polymorphism of Paraoxonase and the Risk of Coronary Heart Disease", *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 17:1067-1073, (1997).

Sanyal, S., Feasta, F., Sakano, S., Zhang, Z., Steineck, G., Norming, U., Wijkström, H., Larsson, P., Kumar, R., Hemminki, K., "Polymorphisms in DNA repair and metabolic genes in bladder cancer", *Carcinogenesis* Vol. 25, No. 5, 729-734, (2004).

Schmiegelow, K., Eiberg, H., Tsui, L.-C., Buchwald, M., Phelan, P. D., Williamson, R., Warwick, W., Niebuhr, E., Mohr, J., Schwartz, M., Koch, C., "Linkage between the loci for cystic fibrosis and paraoxonase.", *Clin. Genet.*, 29: 374- 377, (1986).

Serrato, M., Marian, A. J., "A Variant of Human Paraoxonase/Arylesterase (HUMPONA) Gene Is a Risk Factor for Coronary Artery Disease", *J. Clin. Invest.*, Vol. 96, 3005-3008, (1995).

Smith, A.B., Esko, J., Hajduk, S.L., "Killing of trypanosomes by the human haptoglobi-related protein.", *Science*, 268:284-286, (1995).

Stevens, V.L., Rodriguez, C., Pavluk A.L., Thun, M.C. and Calle, E.E. "Association of Polymorphisms in the Paraoxonase 1 Gene with Breast Cancer Incidence in the CPS-II Nutrition Cohort", *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 15(6):1226-12228, (2006).

Syvanen A.C., "Assessing genetic variation: genotyping single nucleotide polymorphisms." *Nat Rev Genet.*, 2(12):930-42(2001).

Tashian, R. E., Shaw, M. W. "Inheritance of an erythrocyte acetylcysteine variant of man.", *Am. J. Hum. Genet.*, 14: 295-300, (1962).

Taşkıran, P., Çam, F.S., Şekuri, C., Tüzün, N., Alioğlu, E., Altıntaş, N., Berdeli, A. “Paraoksonaz geninde Leu-Met (55) ve Gln-Arg (192) polimorfizmleri iel koroner arter hastalığı arasındaki ilişki”, Türk Kardiyol Dern Arş, 37(7):473-478, (2009).

Tautz, D. And Rentz, M., “Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eucaryotic genomes.”, Nükleik Acids Res., 12:4127-4138, (1984).

Thompson, I. M., Peek, M., Rodriguez, F.R., “The impact of cigarette smoking on stage, grade and number of recurrences in transitional cell carcinoma of the bladder.”, J. Urol, 137: 401-3, (1987).

Tural, Ş., Güneş, S., Büyükalpelli, R., Bağcı, H. “Mesane Kanseri Olgularında H-Ras Proto-onkojen Polimorfizmi”, Türk Üroloji Dergisi, 32(1):14-18, (2006).

Vineis, P., Magnani, C., “Occupation and bladder cancer in males: A case-control study”, İnternational Journal Cancer, 15:35 (5): 599-606, (1985).

Wang, X., Huang, J., Fan, Z., Su, S., Zhao, J., Shen, Y., Qiang, B. and Gu, D., “Genetic and Environmental Factors Associated with Plasma Paraoxonase Activity in Healty Chineses”, İnternational Journal of Molecular Medicine, 13: 445-450, (2004).

Watson AD, Berliner JA, Hama SY, La Du, B.N., Faul, K.F., Fogelman, A.M. and Navab, M., “Protective effect of HDL associated paraoxonase inhibition of the biological activity of minimally oxidized LDL.”, J Clin Invest., 96: 2882-2891, (1995).

Xie, S, Li, J., Chen, Y., "Sequence Identification, chromosomal mapping and tissue specific expression of the porcine paraoxonase 1 (PON1) gene”, Mol Biol Rep, 37:1347-1353, (2010).

Yale Medical Group org

Erişim: <http://www.yalemedicalgroup.org/stw/Page.asp?PageID=STW014444>

Yüksel, N., “sitokrom P450 Enzim sistemi ve İlaç Etkileşmeleri”, Klinik Psikiyatri 1: 5-16, (2001).

Zama, T., Murata, M., Matsubara, Y., Kawano, K., Aoki, N., Yoshino, H., Watanabe, G., Ishikawa, K., Ikeda, Y., "A 192arg Variant of Human Paraoxonase (HUMPONA) Gene Polymorphism Is Associated With an Increased Risk for Coronary Artery Disease in the Japanese", *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 17:3565-9, (1997).

Zech, R. and Zurcher, K., "Organophosphate splitting enzyme in different mammals.", *Comp. Biochem. Physiol.*, 48B: 427-433, (1974).

Zintzaras, E., Hadjigeorgiou, G.M., "Association of paraoxonase 1 gene polymorphisms with risk of Parkinson's disease: a meta-analysis", *J Hum Genet*, 49:474-481, (2004).