

T.C.
CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

MİKROZOMAL EPOKSİT HİDROLAZ ENZİMİNİN GENETİK POLİMORFİZMİ
İLE PRİMER BEYİN TÜMÖRÜ İNSİDANSI İLİŞKİSİNİN İNCELENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
ALİ AYDIN

DANIŞMAN ÖĞRETİM ÜYESİ
DOÇ. DR. HATİCE PINARBAŞI

SİVAS 2007

Bu tez Cumhuriyet Üniversitesi Senatosunun 5. 1. 1984 tarih ve 84 / 1 nolu kararı ile kabul edilen tez yazma önermesine göre hazırlanmıştır.

TEŐEKKÜR

Bu tezin hazırlanmasında emeği geçen sayın hocam Doç. Dr. Hatice PINARBAŞI'na sonsuz teŐekkür ederim. ÇalıŐmamda değerli bilgileriyle katkılarını esirgemeyen Prof. Dr. Öge ÇETİNKAYA, Prof. Dr. Sevtap BAKIR, Yrd. Doç. Dr. V. Kenan ÇELİK, Yrd. Doç. Dr. Yavuz SİLİĞ'e teŐekkürlerimi sunarım. İstatiksel analizlerimde yardımlarından dolayı Doç. Dr. Hafize SEZER'e teŐekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	SAYFA NO
ÖZET	1
ABSTRACT	2
1. GİRİŞ ve AMAÇ	3
2. GENEL BİLGİLER	5
2. 1. Zenobiyotik Metabolizması	5
2. 2. Epoksit Hidrolazlar	8
2. 3. Mikrozomal Epoksit Hidrolazlar	9
2. 3. 1. Mikrozomal Epoksit Hidrolazların Aktivite Tayini	10
2. 3. 2. Mikrozomal Epoksit Hidrolazların Membran Topolojisi	11
2. 3. 3. Mikrozomal Epoksit Hidrolazların Substratları	11
2. 3. 4. Mikrozomal Epoksit Hidrolazların Üçboyutlu Yapısı	13
2. 3. 5. Mikrozomal Epoksit Hidrolazların Aktivitesinin Düzenlenmesi	13
2. 3. 6. Mikrozomal Epoksit Hidrolazların İnhibitörleri	14
2. 3. 7. Mikrozomal Epoksit Hidrolazların Biyolojik Rolü	15
2. 3. 8. Mikrozomal Epoksit Hidrolazların Polimorfizmi	16
2. 3. 9. Mikrozomal Epoksit Hidrolazların Polimorfizmi ve Kanser	17
2. 4. Primer Beyin Tümörü	18
3. GEREÇ ve YÖNTEM	21
3. 1. Gereçler	21
3. 2. Kimyasallar	22
3. 3. Genel Çözeltiler ve Tamponlar	23
3. 4. Hastalar ve Kontrol Grubu	23
3. 4. 1. Hastalar	23

3. 4. 2. Kontroller	24
3. 5. Kan Örneklerinin Toplanması	24
3. 6. Genomik DNA İzolasyonu	25
3. 7. DNA Kalitesi ve Miktarının Belirlenmesi	25
3. 8. Genotipleme	26
3. 8. 1. Ekzon 3 Polimorfizminin Belirlenmesi	26
3. 8. 2. Ekzon 4 Polimorfizminin Belirlenmesi	26
3. 9. Agaroz Jel Elektroforezi	28
4. İSTATİKSEL DEĞERLENDİRME	28
5. BULGULAR	29
5. 1. mEH Polimorfizmi ve Primer Beyin Tümörü İlişkisi	31
5. 1. 1. Ekzon 3 Polimorfizmi	31
5. 1. 2. Ekzon 4 Polimorfizmi	32
5. 2. Primer Beyin Tümörünün Histopatolojik Tipi ile Genotip Sıklıkları Arasındaki İlişki	33
6. TARTIŞMA ve SONUÇ	36
7. KAYNAKLAR	45
EK 1 Hasta ve kontrollere ait sorgu formu	
EK 2 Yerel Etik Kurul Kararı	

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Zenobiyotiklerin metabolik döngüye giriş yerleri ve atılımları	6
Şekil 2. Zenobiyotiklerin metabolik yolu	6
Şekil 3. Mikrozomal EH enziminin substratları	12
Şekil 4. Benzo (a) pren aktivasyonu ve DNA-adduct oluşumu	16
Şekil 5. Mikrozomal epoksit hidrolaz ekzon-3 ve ekzon-4 genotiplerinin PZR-RFLP paternleri	27

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1. Primer beyin tümörü hastaları ve kontrollerin özellikleri	29
Tablo 2. Primer beyin tümörü hastalarının ve kontrollerin sigara alışkanlığı yönünden karşılaştırılması	30
Tablo 3. Primer beyin tümörü hastaları ve kontrollerin ailede kanser hikayesi yönünden analizi	31
Tablo 4. Primer beyin tümörü hastaları ve kontrollerin mEH ekzon 3 polimorfizmi yönünden analizi	32
Tablo 5. Primer beyin tümörü hastaları ve kontrollerin mEH ekzon 4 polimorfizmi yönünden analizi	33
Tablo 6. Primer beyin tümörü hastalarında kanserin histopatolojik tipi ile gen varyantları arasındaki ilişki.	35

ÖZET

Mikrozomal epoksit hidrolaz (mEH) polimorfizmi ile primer beyin tümörü riski arasındaki ilişki incelendi. mEH geni polimorfizmleri 255 Türk bireyde (150 kontrol ve 105 primer beyin tümörü hastası) PZR-RFLP metoduyla belirlendi. Sonuçlarımız mEH ekzon 4 polimorfizm sıklığının kontrollerde primer beyin tümürlü hastalara oranla daha yüksek olduğunu göstermektedir (OR: 1.8 % 95 CI: 1.0-3.4). Bu çalışmada Türk populasyonunda mEH ekzon 3 polimorfizmi ile primer beyin tümörü arasında bir ilişki gözlenmemiştir. Hastaların primer beyin tümörünün histopatolojik tipi ile gen varyantlarına göre analizi bir ilişki göstermedi. Hasta ve kontroller ailede kanser hikayesi yönünden incelendiğinde istatistiksel olarak anlamlı ilişki gözlenmiştir (χ^2 : 7.0, P: 0.01).

Sonuç olarak, çalışmalarımız mEH enzimini kodlayan gende bulunan ekzon 4 polimorfizminin bu Türk populasyonunda primer beyin tümörüne karşı koruyucu bir faktör olabileceğini göstermektedir.

Anahtar kelimeler: Primer beyin tümörü, polimorfizm, mEH

ABSTRACT

Association between genetic polymorphisms in microsomal epoxide hydrolase and primary brain tumor risk was investigated. Polymorphisms of mEH gene were determined in 255 Turkish individuals (150 hospital-based controls and 105 primary brain tumor patients) by PCR-RFLP methods. Our results indicate that the frequency of the mEH exon 4 polymorphism in controls is significantly higher than that of the primary brain tumor patients (OR: 1.8 % 95 CI: 1.0-3.4). This report failed to demonstrate a significant association between mEH exon 3 polymorphism and primary brain tumor susceptibility in this Turkish population. The analysis of patients by histological type of primary brain tumor and gene variants, showed no association. Analysis of family history of cancer between cases and controls showed statistically significant association (χ^2 : 7.0, P: 0.01).

In conclusion, our results suggest that exon 4 polymorphism in the gene encoding the mEH enzyme may be a protective factor against the primary brain tumor in this Turkish population.

Keywords: Primary brain tumor, polymorphism, mEH

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Kanser günümüzde önemli sağlık problemlerinden biridir. Diğer ülkelerde olduğu gibi Türkiye’de de insidans ve ölümler arasındaki yeri açısından gerçekçi bir rakam vermek olası değilse de kanserden ölümler kalp-damar hastalıklarından sonra ikinci sırayı almaktadır. Çevre kirliliği, sigara içimi, radyasyon ve kimyasallara maruz kalmanın kanser insidansında artışa neden olduğu bildirilmiştir (1). Kimyasal karsinojenlerin çoğu hücre içi makro moleküllerle direkt olarak etkileşmeden önce metabolik aktivasyona gereksinim duyarlar. Bu maddelerin çoğu Faz I enzimleri olarak bilinen Sitokrom P450 (CYP450)’nin izoformlarını içeren enzimler tarafından reaktif elektrofilik metabolitlere dönüştürülürler. Bu metabolitler genomik DNA’ya bağlanabilir veya onkogenleri aktive edebilirler. N-asetiltransferaz, glutatyon S-transferaz, aldehit dehidrogenaz ve epoksit hidrolaz gibi Faz II konjuge edici enzimler ise karsinojen madde veya onun reaktif metabolitini biyolojik olarak inert türevlere dönüştürerek veya reaktif metabolitlerin miktarını azaltarak etkili olurlar (2). Epoksit hidrolazlar memelilerde genotoksik epoksitleri inaktive ederek detoksifikasyonu sağlar. Bunu hidratlamayla basit epoksitleri vicinal diollere, aren oksitleri transdihidrodiollere çevirerek yaparlar. Oluşan ürünler suda çözünür olup renal ya da safra yoluyla atılır (3). Şimdiye kadar memelilerden mikrozomal epoksit hidrolaz (mEH), çözünür epoksit hidrolaz (sEH), mikrozomal kolesterol-5,6-oksit hidrolaz, hepoksilin A₃ hidrolaz ve lökotrien A₄ hidrolaz olmak üzere beş çeşit epoksit hidrolaz saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir (3). Mikrozomal EH sigara ve egzoz dumanında ve çok pişmiş gıdalarda bulunan PAH gibi karsinojenlerin oksidatif ürünlerini de içeren epoksitlerin detoksifikasyonundan sorumlu olan ve insan populasyonlarında polimorfik olarak kalıtıldığı bilinen bir enzimdir (4, 5, 6).

Bu enzim üzerinde bulunan iki polimorfik varyasyon bölgesi (ekzon-3 ve ekzon-4) enzim aktivitesinde değişmeye neden olur (7). EPHX 1 (mEH fonksiyonel geni) polimorfizmlerinin karsinogeneizde rol oynadığını bildiren, farklı populasyonlarda yapılmış moleküler epidemiyoloji çalışmalarının sayısı artmaktadır (8). Primer beyin tümörleri oldukça heterojen bir hastalık grubudur ve nedenleri henüz tam olarak anlaşılammıştır. Bununla birlikte fiziksel, kimyasal ve biyolojik ajanlar tarafından oluşturulan DNA hasarının potansiyel nörokarsinojen olabileceği düşünölmektedir.

Bu çalışmada Türk populasyonunda primer beyin tümörü insidansı ile epoksitlerin detoksifikasyonunda rol alan mEH enziminin genetik polimorfizmi arasında bir ilişki olup olmadığı araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

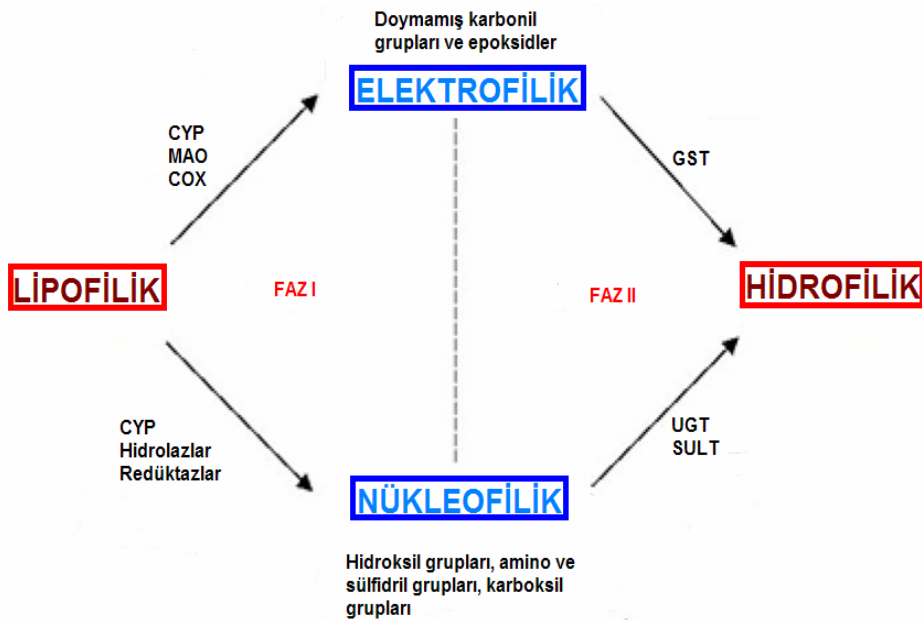
2.1. Zenobiyotik Metabolizması

Zenobiyotik olarak adlandırılan ve vücuda dışarıdan alınan ilaçlar, böcek öldürücüler, anestetikler, petrol ürünleri ve karsinojenler gibi bileşikler diyet, sigara dumanı ve solunan havada bulunmaktadır. Zenobiyotik metabolizması, bu nonpolar bileşiklerin suda çözünebilmesini ve böylelikle safra ve böbrek gibi yollarla atılabilecek hale dönüştürülmesini sağlayan biyodönüşüm işlemlerini içerir (Şekil 1). Genellikle bu işlemler sonucu bileşiğin farmakolojik ve toksikolojik olarak aktivitesini kısmen veya tamamen kaybettiği tahmin edilir. Fakat bazı durumlarda oluşan ürün molekülün kendisinden daha aktif olabilir veya daha toksik etki gösterebilir ki bunlara "reaktif ara ürünler" denir. Zenobiyotik metabolizmasında biyodönüşüm enzimlerince katalizlenen reaksiyonlar iki fazlı işlemlerdir. Bunlar faz I ve faz II reaksiyonlarıdır. Faz I reaksiyonları karaciğerde, özellikle karaciğer hücrelerinin endoplazmik retikulumu içinde bulunan enzim sistemleri tarafından yürütülür. Bununla birlikte belli bir miktar enzimatik aktivite barsak, böbrek, akciğer, adrenaller, beyin ve deride de bulunabilir (9). Faz I reaksiyonlarının çoğu sitokrom-P 450 (CYP) süper ailesi enzimlerinin oluşturduğu mikrozomal membrana bağlı karışık fonksiyonlu oksidazlar tarafından katalizlenir (9). CYP hem içeren bir enzimdir. Genelde hidroksilasyon ve oksidasyon ile karbon atomları üzerine bir oksijen atomu transfer eder (10). Zenobiyotikte oluşturulan bu hidroksil grubu faz II reaksiyonları için önemlidir (11).



Şekil 1. Zenobiyotiklerin metabolik döngüye giriş yerleri ve atımları (12).

Faz I'in oksidatif reaksiyonlarını CYP bağımlı monooksijenazlar (flavin monooksijenaz), ksantin oksidaz, miyelo peroksidaz, amin oksidaz, monoamin oksidaz, dioksijenaz enzimleri başarır (Şekil 2).



Şekil 2. Zenobiyotiklerin metabolik yolu (13).

Oksidatif reaksiyonlar; aromatik halkanın oksidasyonu, alkil zincirlerinin oksidasyonu, oksidatif dealkilasyon, N-oksidasyon, sülfoksidasyon, epoksidasyon ve S ile O yer değişimi reaksiyonlarını içermektedir (9, 12). Aromatik halkanın oksidasyonuna hidroksilasyon denir ve sonuçta fenoller oluşur. Alkil zincirlerinin oksidasyonu sonucunda alkoller, bazen de karboksilik asitler oluşur (9). Faz I'in redüksiyon reaksiyonlarını CYP bağımlı redüktazlar, ketoredüktaz, glutatyon peroksidaz enzimleri başarır. Burada nitro ve azo bileşikler aminlere, ketonlar ise ikincil aminlere dönüştürölür. Faz I'in ester hidroliz reaksiyonlarını karboksil esterazlar, amidazlar, alkol dehidrogenazlar, aldehit dehidrogenazlar ve süper oksit dismutaz enzimleri başarır. Ester ve amin hidrolizi sonucu fenoller, alkoller ve karboksilik asitler oluşur. Faz I'in hidrolaz reaksiyonlarını epoksit hidrolaz, serum paroksonaz enzimleri başarır. Bunlar reaktif elektrofilik epoksit ara ürünleri diollere çevirirler (9, 12, 14). Faz II reaksiyonları konjugasyon reaksiyonları olarak bilinir ve detoksifikasyon işlemleri bu fazda olur. Bu reaksiyonlarda konjugat oluşturmak için zenobiyotiğe endojen bir molekül kovalent olarak bağlanır. Memelilerde en yaygın faz II transformasyonu glukronidasyondur. Sülfat konjugasyonu, glutatyon konjugasyonu ve metilasyon diğer önemli faz II transformasyonlarıdır (9, 10). Konjugasyon bir ilaç veya onun -OH, -COOH, -NH₂, -SH gruplarını içeren metabolitin vücutta glukronik asit, glutatyon, asetil grupları, metil grupları, sülfat grupları, tiyol grupları, glisin, taurin ve glukozamin gibi ara metabolizma ürünleri ile birleşerek polar ve suda çözünebilen ürünler oluşması olayıdır. Oluşan konjugatlar böbrek ve safra yoluyla atılır. Bu reaksiyonları sırasıyla glukronil-transferaz, glutatyon-S-transferaz (GST), N-asetil-transferaz (NAT), metil-transferaz, sülfotransferaz, tiyol-transferaz, glikozil-transferaz gibi enzimler başarır (9, 10, 11, 12,14). GST'ler karsinojen ve

mutajenleri içeren çeşitli hidrofobik ve elektrofilik substratların glutatyonla konjugasyonunu sağlayan dimerik enzim sınıfı olup şimdilerde P, T, M, A, Z, K, S olmak üzere yedi alt sınıfı bilinmektedir (14, 15). İnsan popülasyonlarında hızlı (NAT2) ve yavaş (NAT1) olmak üzere, iki tip asetilatör vardır. Heterosiklik aromatik aminleri asetilleyerek detoksifikasyon rollerini gerçekleştirirler. NAT'lar özellikle ilaç metabolizmasında önemlidir (8, 10, 11).

2.2. Epoksit Hidrolazlar

Epoksit hidrolazlar memeli, bitki, böcek, fungus, bakteri gibi pek çok organizmada geniş bir dağılım gösteren enzim grubudur. Organizmadan organizmaya biyolojik rolleri değişir. Epoksit hidrolazların detoksifikasyon, karbon kaynaklarının yıkımı ve sinyal molekül düzenlenmesi şeklinde üç ana fonksiyonu vardır. Detoksifikasyon görevini memeli hücrelerinde genotoksik epoksitleri inaktive ederek gerçekleştirir. Katabolizma görevini bakterilerde bulunan limonen epoksit hidrolaz başarır. Sinyal molekül düzenlenmesi memeli hücrelerinde daha çok sEH ve mEH enzimleri ile gerçekleştirilir (16). Epoksit hidrolazlar ilk kez 1973'de Oesch tarafından detoksifikasyon enzimleri olarak tanımlanmıştır (17). Epoksit hidrolazlar oksiren türevlerinin hidrolitik parçalanmasını sağlarlar. Yani hidratlamayla basit epoksitleri vicinal diollere, aren oksitleri transdihiodiollere çevirir. Memelilerde her biri immünolojik ve kimyasal olarak farklı olan beş çeşit epoksit hidrolaz (EH) vardır. Bunlar mEH, sEH, mikrozomal kolesterol-5,6-oksit hidrolaz, hepoksilin A₃ hidrolaz, lökotrien A₄ hidrolazdır (18). Mikrozomal kolesterol-5,6-oksit hidrolaz memeli karaciğer dokusunda kolesterol 5,6 α ve 5,6 β oksiti, koleston 3 β , 5 α , 6 β triole hidratlar. Birçok doku mikrozomlarında da bu enzimin aktivitesi görülür. Hepoksilin A₃ hidrolaz araşidonik asit metabolitlerinin metabolizmasına katılan sitozolik bir

enzimdir. Lökotrien A₄ hidrolaz Zn⁺² içerir ve hem hidrolaz hem de aminopeptidaz aktivitesi sergiler. Substratları lökotrienler ise inflamatuvar ve alerjik cevaba aracılık eden araşidonik asit türevli metabolitlerdir. Bu enzimi kodlayan gen 12q22 nolu kromozom üzerinde lokalize olmuştur. sEH endojen olarak türevlenen yağ asidi epoksitlerinin metabolizmasına katılan ve ekzojen olarak trans-stilben oksit gibi zenobiyotikleri metabolize eden bir enzimdir. Bu enzim sinyal molekülü gibi davranan lipit epoksitlerinin işlenmesinde anahtar bir rol oynar. Ayrıca sEH vazoaaktif araşidonik asit epoksitlerinin yıkımından da sorumludur. Bu enzimi kodlayan gen 8p21-p12 nolu kromozom üzerinde lokalize olmuştur (16, 18).

2.3. Mikrozomal Epoksit Hidrolazlar

Mikrozomal epoksit hidrolaz enzimi benzo (a) pren gibi epoksitleri hidrolizleyerek reaktif ara ürünler oluşturan faz I enzimi olarak görev aldığı gibi (19), aren, alken ve alifatik epoksitlerin hidrolizi sonucu oluşan reaktif ara ürünlerin detoksifikasyonundan sorumlu faz II enzimi olarak da fonksiyon görmektedir (11, 20). Dolayısıyla mEH biyoaktivasyonda ikili rol oynayan bir enzimdir. mEH α/β fold hidrolaz ailesinin bir üyesidir. α/β fold hidrolaz ilk defa 1992’de tanımlanmış olup esteraz, peptidaz, lipaz, dehalojenaz ve epoksit hidrolaz gibi farklı hidrolitik enzimlerin ortak yapısıdır (21). α/β fold yapısı α heliksler aracılığı ile enzimin her iki tarafı üzerinde katlanan bir domein ve kor üzerinde sanki bir kapak yapısı oluşturan helikal bir domein içerir. α/β fold hidrolaz enzimleri bir nükleofil (serin, aspartat), bir yük değiştirici (aspartat, glutamat) ve bir bazdan (histidin) oluşan katalitik bölge içerir (21). mEH’in cDNA’sı insan ve ratların dahil olduğu birkaç türden izole edilmiş ve yapılan cDNA dizi karşılaştırmaları, bu türler arasında % 80’den fazla homoloji olduğunu göstermiştir. İnsan mEH enzimi (E.C.3.3.2.3.) 1 nolu kromozomun uzun kolu

üzerinde lokalize olan tek bir fonksiyonel gen (EPHX 1) tarafından kodlanır (22). Bu gen 16 kb uzunluğunda olup 8 intronla ayrılmış 9 ekzona sahiptir. Mikrozomal EH yaklaşık 50 kDa proteini karşılayan 455 aminoasit kalıntısı içerir (23, 24). EPHX 1 prenatal 1. trimesterden itibaren hepatositlerde ifade edilmeye başlar (25). Mikrozomal EH neredeyse bütün memeli dokularında bulunur. Ratlar üzerinde yapılan ilk çalışmalarda en çok karaciğer olmak üzere akciğer, testis, beyin, lökosit gibi 26 farklı organ ve dokuda mEH aktivitesi belirlenmiştir. Beynin birçok kısmında da mEH ifadesi tespit edilmiştir (26, 27). Bir organda bulunan mEH ifadesi daha çok o organın belli hücrelerinde lokalize olmuştur. mEH diğer ilaç metabolize eden enzimlerle birlikte beyin kılcal damarlarında yüksek oranda bulunduğu için kan-serebrospinal-beyin bariyeri gibi fonksiyonu olan dokularda koruyucu gücü önemli ölçüde artırır. mEH aktivitesi koroid pleksusda neredeyse karaciğerdeki kadar fazladır. Lenfosit ve monosit gibi kan hücrelerinde de mEH aktivitesi ve gen ifadesi belirlenmiştir (27).

2.3.1. Mikrozomal Epoksit Hidrolazların Aktivite Tayini

In vitro mEH aktivite tayininde stiren-7,8-oksit, benzo (a) pren-4,5-oksit ve trans etil stiren oksit substratları kullanılır. İnsan kanında yada hücre fraksiyonu gibi kompleks karışımlarda mEH aktivitesi ölçümünde bu substratlar radyoaktif işaretlenerek kullanılır ve böylece hassas bir ölçüm elde edilir. *In vivo* olarak karbamazepin-10,11-epoksit substratı kullanılır. İşlemde valpromid ile inhibe veya fenobarbital ile indüklemeye yapılarak transdihidrodiol/epoksit oranı tespit edilir ve böylece aktivite tayini yapılır (22).

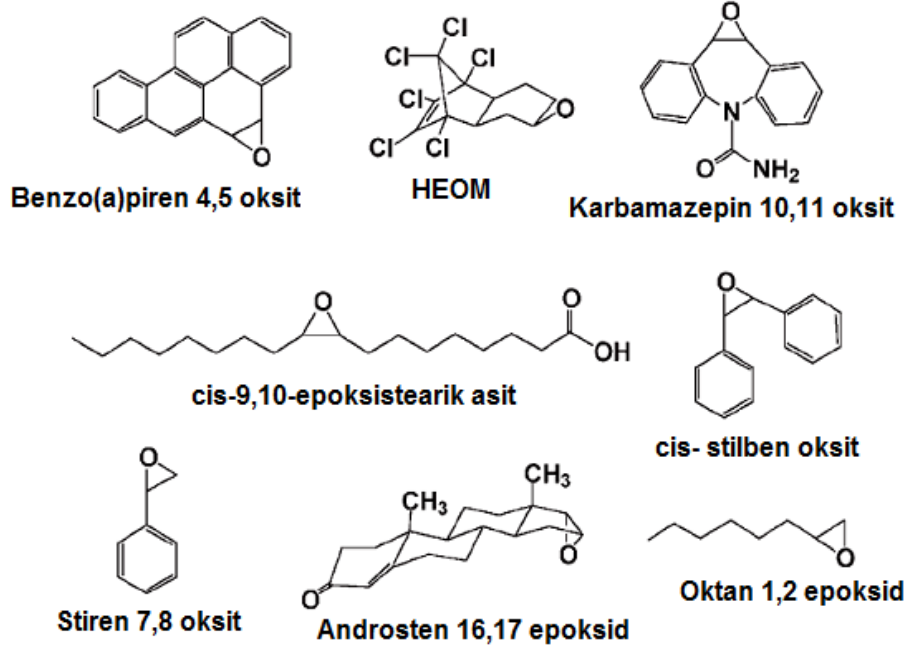
2.3.2. Mikrozomal Epoksit Hidrolazların Membran Topolojisi

Mikrozomal EH N-terminalinde yaklaşık 20 a.a. kalıntısı içeren hidrofobik transmembran bölge ile güçlü bir şekilde zara bağlanır (27). mEH endoplazmik retikulum zarında tip II membran topolojisi gösterir. mEH ER'ye ko-translasyonel bir şekilde yerleşir. Bu işlem sırasında proteinin N-terminali kesilmeden kalır (28). Karaciğerde mEH düz ER ve plazma membranında bulunur. Ancak ER'de ve plazma membranında farklı topoloji sergiler. ER'de katalitik C-terminal domeini sitozole bakarken, plazma membranında hücre dışı ortama bakar (29). N-terminal bölge varlığında mEH membrana tutunur, ancak deneysel olarak N-terminal kısmı kesildiğinde mEH'in yinede çözünür olmadığı görülmüştür. Bunun nedeni mEH ile membran arasında hidrofobik etkileşim olması ve mEH'in fosfolipidlerle güçlü bir şekilde etkileşmesi olabilir (27).

2.3.3. Mikrozomal Epoksit Hidrolazların Substratları

Polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH) organik maddelerin eksik yanmasıyla ya da doğada karbonizasyonla oluşurlar ve bunların birçoğunu mEH metabolize eder. PAH yiyeceklerin pişirilmesi sırasında da oluşur. Ayrıca yağmur suyundan meyve ve sebzelere atmosferik PAH'ın geçmesiyle de insanlar PAH'a maruz kalır. Yağmur suyunda PAH dahil 640 çeşit zenobiyotik tespit edilmiştir (22, 30, 31). Aren ve alkenlerden türetilen zenobiyotikler CYP süper ailesinin izoenzimleri olan çok farklı oksijenaz enzimleri ile epoksitlere dönüştürülür (16, 21). Epoksitler uygun olmayan bağ açısı içeren, oldukça gergin üç üyeli heterosiklik bileşiklerdir. Bu siklik eterlerin bağ açısı yaklaşık 60° olup bu onu gergin yapar. Polarize C-O bağları epoksitin reaktivitesini artırır (halkanın C atomları elektrofilik merkez sunar) (Şekil 3). Reaktif elektrofiller potansiyel olarak genotoksiktir. Güçlü bir elektrofil olan epoksitler DNA ve protein gibi önemli

elektro zengin biyolojik moleküllerle reaksiyona girer. Nükleik asit halkalarının ekzosiklik amino grupları ya da pürinlerin N⁷ kısmı bu reaktif elektrofiller için kolay hedefdir. Mikrozomal EH için mono, cis-1,2-disubstitue epoksitler iyi substratlardır.



Şekil 3. Mikrozomal EH enziminin substratları (16).

Alifatik epoksitler (bütadien oksit, 1,2-epoksi oktan), poliaromatik oksitler (fenantren oksit, karbamazepin oksit, benzo (a) pren-4,5-oksit), stiren oksit, cis-stilben oksit, epikloridin, androsten mikrozomal EH'ların önemli substratlarıdır (Şekil 3). Epoksit içeren gliserol fosfolipidler de mEH'in zayıf substratlarıdır (27, 32, 33, 34). Epoksitler mEH enzimi tarafından hidratlanmayla diollere dönüşür. Oluşan dioller çoğunlukla reaktif olmayıp suda kolay çözünür (21). 1,2-epoksit ve 3,4-epoksit krisenler, naftalen- 1,2-epoksit, dimetilbenz (a) antrasen, benzen, nitropiren, antrosen, fentoin, sorbinil, mianserin de mEH substratıdır (18, 36, 37). Vinil bromit ve vinil klorit de mikrozomal EH substratıdır (35).

2.3.4. Mikrozomal Epoksit Hidrolazların Üçboyutlu Yapısı

Memeli mikrozomal epoksit hidrolazın primer yapısını 20 yıl önce Heinemann tanımlamıştır (38). Ancak o zaman enzimatik mekanizma ve katlanma üzerindeki yetersiz bilgilerden dolayı tersiyer yapısı bulunamamıştır. Bundan beş yıl sonra Jansen ve arkadaşları mEH ile bakteriyel haloalkandehalojenaz (HAD) enziminin hem N hem de C terminalinin a.a. dizileri bakımından benzer olduğunu belirlemişlerdir (39). Böylece zaten bilinen HAD'in üç boyutlu yapısı ve onun katalitik mekanizması sayesinde epoksit hidrolazların da üçboyutlu yapısı hakkında fikirler elde edilmiştir (16). Mikrozomal EH'in katalitik bölgesini içeren C-terminal domeini HAD ile homologdur. *Aspergillus niger*'den elde edilen sEH, N-terminal membrana bağlanma bölgesi hariç, memeli mEH ile homologdur (27). Epoksitlerin katalitik hidrolizi iki basamaklıdır. İlki alkilasyon basamağı olup, nükleofil aspartat alkil enzim ara ürünü oluşumunda epoksit karbonlarının birine atak yapar. İki tirozin kalıntısı alkilasyon basamağı için esansiyeldir. Enzimin kapak domeininde bulunan tirozinler, nükleofile karşı, epoksit oksijeniyle etkileşerek hidrojen bağı yaparlar. İkinci basamakta alkil ara ürünü, diol ürünü üretmek için su tarafından hidrolizlenir. Su, yük değiştirici asit yardımıyla bir baz (histidin) tarafından aktive edilir (16).

2.3.5. Mikrozomal Epoksit Hidrolazların Aktivitesinin Düzenlenmesi

Mikrozomal EH'in düzenlenmesi transkripsiyonel, translasyonel, post-translasyonel düzeyde olur. Mikrozomal EH'in indüksiyonu hayvan modellerinde çalışılmıştır. Kemirgenlerde mEH geni fenobarbital, poliklorinlenmiş bifeniller (PCB), trans-stilben oksit, peroksizom proliferatörler (PPAR), radyasyon, ağır metaller, bazı steroidler (östroksit) kullanılarak indüklenmiştir (27). Her bir uyarıcının etkisi türe, ırka, cinsiyete, yaşa göre değişebilir (27). Diabeti indükleyen

alloksan ya da streptozokin kullanma ratlarda hepatik mEH aktivitesinde % 71'lik bir azalmaya yol açmıştır. Ayrıca deksametazon, gadolinyum klorid, akriflavin, liposakkarid kullanma da mEH geni ifadesini baskılar. Ratlarda adrenal bezin çıkarılması mEH seviyesini yükseltir. Bu durum mEH düzenlenmesinde hipotalamus-hipofiz-adrenal ekseninin önemini destekler niteliktedir. Hipofizin çıkarılması hem dişilerde hem de erkeklerde mEH aktivitesini uyarır. mEH geninde bulunan ekzon-3, ekzon-4 bölgesi polimorfizmleri de mEH geni transkripsiyonunu düzenlemede etkili olabilir (27). Rat embriyo fibroblast çalışmalarında bildirilenlerin aksine, insan glioma hücrelerinde mEH mRNA ifadesini p53 düzenlemez (40). Bir hücrede GST ve mEH ifadesinin artması, CYP ifadesinin azalması şeklinde detoksifikasyon sisteminin adaptasyonu ile reaktif bileşiklerin daha etkili nötralizasyonu ve daha az proilaç aktivasyonu sağlanabilir (40). Bunun sonucunda mEH ifadesinin düzenlenmesinde görev alan polimorfizmler, post-transkripsiyonel düzenlemeler, çevresel ajanlarla gen indüksiyonu ve mEH ifadesi için gereken transkripsiyonel proteinlerin düzeyindeki değişimler gibi faktörler ortak bir şekilde mEH aktivitesini belirler (40). Nitrözmetiletilamin ve nitrözmetilpropilamin rat karaciğerinde mEH'in potansiyel indükleyicileridir (41).

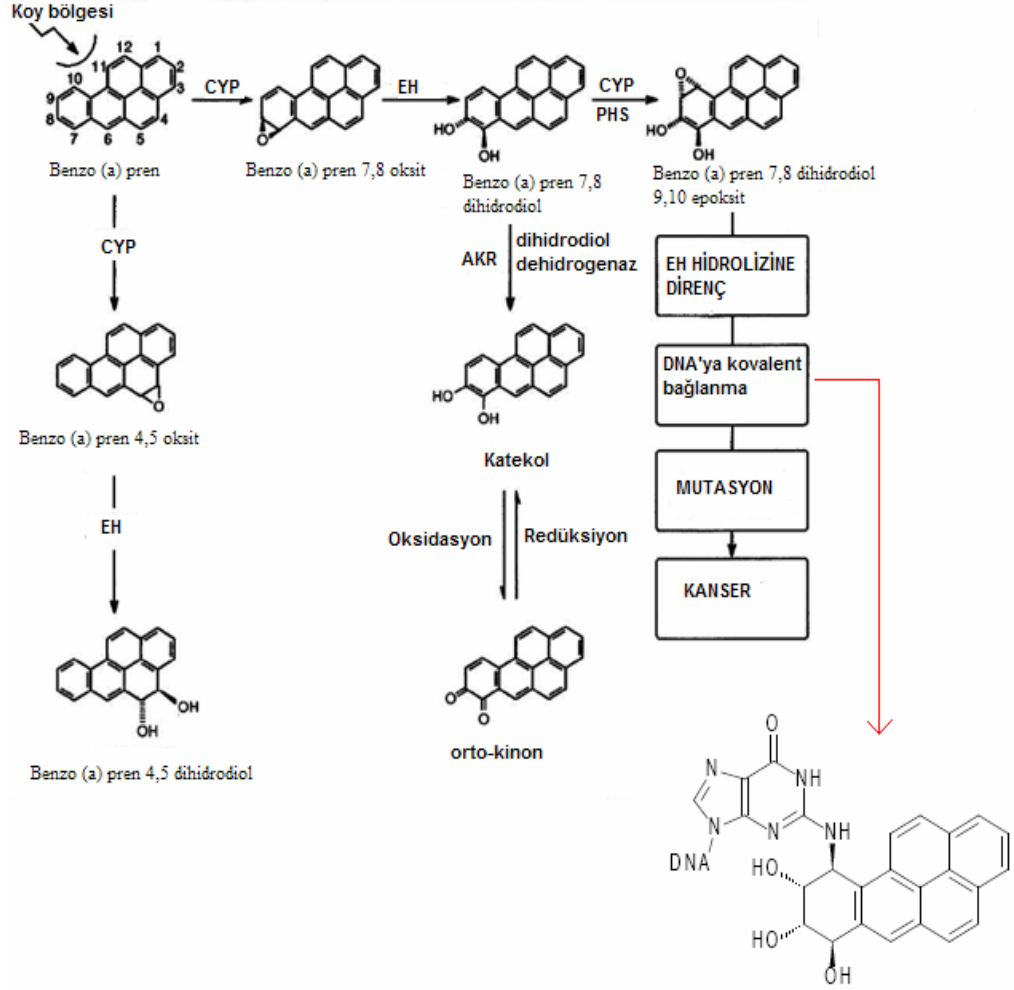
2.3.6. Mikrozomal Epoksit Hidrolazların İnhibitörleri

Valproik asit ve valpromid karaciğerde mEH'i inhibe edip, karbamazepin epoksitin ve stiren oksitin hidrolizini önler (42). Valproilamid analogları da mEH'i inhibe eder (43). Trikloropropen oksit (TCPO) gibi pek çok mEH inhibitörü vardır. Hg⁺², Zn⁺² gibi ağır metaller de mEH inhibitörüdür (29). Son çalışmalar üre, amid, amin bileşikleri ile sikloheksen, sikloalkan oksitlerin ve elaidamidinin de mEH inhibitörü olduğunu göstermiştir (44). mEH fentoin ve sorbinilin aren oksitlerini

metabolize ederek onların teratojenik etkilerini önler (36). Siklopropil oksirenler mEH'in geri dönüşümlü inhibitörleridir (45).

2.3.7. Mikrozomal Epoksit Hidrolazların Biyolojik Rolü

Mikrozomal EH'in detoksifikasyon rolünün daha çok karaciğerde olmak üzere ekstrahepatik dokularda ve beynin koroid pleksusunda da olduğu bildirilmiştir. Mikrozomal EH'in steroid metabolizmasında önemli rol oynadığı bilinmektedir. Epoksi-steroidler endojen bileşikler olarak bilinir. mEH steroidojenik dokularda bulunur. mEH antiöstrojen bağlayan bölgenin bir altbirimi olarak tanımlanmıştır ve epoksi steroidleri vicinal diollerine hidroliz eder. Epoksit steroidler toksik olabilir. Örneğin östrojen epoksit kritik bir meme kanseri başlatıcı faktör olabilir (27). Mikrozomal EH hepatositlerde düz ER'ye Na⁺ bağımlı konjuge safra asidi geçişine aracılık eder. İyi bilinen bir PAH olan ve sigara dumanı, egzoz dumanı ve çok pişmiş gıdalarda bulunan benzo (a) pren CYP'ler ile benzo (a) pren 7,8 oksite çevrilir. Yeni oluşan molekülü mEH enzimi metabolize ederek onu çok karsinojenik olan benzo (a) pren 7,8 dihidrodiole çevirir (Şekil 4). Burada mEH'in kimyasal madde detoksifikasyon görevinin yanı sıra bazen de kimyasal maddeleri aktive edebileceği görülür (46).



Şekil 4. Benzo (a) pren aktivasyonu ve DNA-adduct oluşumu (10, 12).

2.3.8. Mikrozomal Epoksit Hidrolazların Polimorfizmi

Genetik polimorfizm; bir populasyonda farklı allellere bağlı genetik olarak belirlenmiş iki veya daha çok alternatif fenotipin görülmesidir. Populasyon genetikçilerine göre nadir alleller en az % 1 frekansa sahip oldukları ve sonuçta bu alleller için en az % 2 oranında görüldükleri takdirde polimorfik olarak tanımlanırlar. Biyokimyacılar nadir allelli bir bireyde dahi bulsa, onu polimorfik olarak kabul ederler (47, 48). Zenobiyotik metabolizmasında rol oynayan enzimleri kodlayan genlerde, bireyler arasında değişik polimorfik formlar bulunmakta ve bunların sıklıkları populasyonlar arasında farklılık göstermektedir. Genotipe meydana gelen değişimler fenotipe yansiyabilmekte ve bu enzim aktivitesinde değişikliğe

neden olabilmektedir. mEH enziminin yedi polimorfik varyasyon bölgesi vardır. Bu polimorfik varyasyon bölgeleri 113 (ekzon-3), 139, 148 (ekzon-4), 348 (ekzon-8), 396, 406, 420 (ekzon-9) aminoasit kalıntılarındadır. PZR-genotip analizlerinden insan mEH'in iki polimorfik varyasyonunun protein üzerinde etkili olduğu gösterilmiştir (49). Bunlardan birincisi ekzon-3 polimorfizmi olup burada proteinin 113. pozisyonundaki tirozin aminoasidi histidin aminoasidi ile yer değiştirmiştir (Tyr113→His113). Burada esas olarak T bazının C bazına dönüştüğü single nücleotide polymorphism bulunmaktadır. Bu olay enzim aktivitesinde % 50 oranında bir azalmaya neden olduğundan ekzon-3 polimorfizmi yavaş allel olarak bilinir. İkincisi ekzon-4 polimorfizmi olup burada proteinin 139. pozisyonundaki histidin aminoasidi arjinin aminoasidi ile yer değiştirmektedir (His139→Arg139). Yine burada A bazının G bazına dönüşmesiyle enzim aktivitesinde % 25 oranında bir artış meydana geldiğinden ekzon-4 polimorfizmi hızlı allel olarak bilinir (50). Japonya'da 96 epileptik hastanın yer aldığı bir çalışmada, EPHX 1 genine ait beş yeni SNP bulunmuştur. Bu polimorfizmler; başlama kodonunda, ekzon 2, ekzon 8, intron 8 ve ekzon 9'da bulunmuştur. Bu polimorfizmlerin mEH enzim aktivitesini etkilemediği bildirilmiştir (51).

2.3.9. Mikrozomal Epoksit Hidrolazların Polimorfizmi ve Kanser

Kanser hücrelerin kontrolsüz çoğalma durumudur. Hücre çevreden gelen mesajlara göre çoğalır, farklılaşır ya da apoptozise uğrar. Hücre çoğalmasında görevli üç grup protein vardır. Bunlar protoonkogenler, tümör baskılayıcı genler ve apoptik genlerin ürünleridir. Kanser olgusu bu üç tip proteini kodlayan genlerden birinin bozulmasına dayanır. Her on kanserden biri kalıtımla, ikisi virüsler aracılığıyla ve geri kalan büyük kısım ise kimyasal, fiziksel karsinojenler nedeniyle oluşmaktadır (52). Kimyasal karsinojenlerin metabolizmasında önemli

rol oynayan mEH enzimi ve onun polimorfizmi ile kanser arasındaki ilişki çok yoğun bir şekilde incelenmiştir. Örneğin akciğer kanseri ile mEH polimorfizmi arasındaki ilişki pek çok popülasyonda çalışılmış ve yavaş allelin (ekzon 3) akciğer kanserine karşı koruyucu, hızlı allelin (ekzon 4) ise risk oluşturduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmalar sonucunda sigara dumanı, kimyasallar gibi çevresel faktörlerin yanı sıra kimyasal karsinogen metabolizmasına dahil olan enzimleri kodlayan genlerdeki polimorfizmlerin akciğer kanserine kişisel eğilimi değiştirdiği bulunmuştur (53, 54, 55, 56, 57). Mikrozomal EH polimorfizmi ile özefaranjial ve larinks kanserleri arasında da bir ilişki bulunmuştur (58, 59, 60). Kolorektal polipe çok pişmiş et ve sigara tüketimi varlığında yavaş fenotipi (ekzon 3) bir risk artışıyla ilişkilendiren çalışmalar vardır (61, 62). Harrison ve arkadaşları mEH polimorfizmi ile amfizem arasında önemli ilişkiler bulurken (63), Kore popülasyonunda yapılan çalışmada böyle bir ilişki bulunamamıştır (64). Aflatoksin B1'e bağlı hepatosellüler karsinoma (HCC) ile mEH polimorfizmi arasında anlamlı ilişkiler bulunmuştur (65, 66). İngiltere popülasyonunda yapılan bir çalışmada mEH polimorfizmi ile ovaryum kanseri arasında bir ilişki bulunamazken (67), Kafkas popülasyonunda yapılan çalışmada ekzon-4 polimorfizmi ile ovaryum kanseri arasında bir ilişki bulunmuştur (68). Kafkasyalı bir hasta kontrol çalışmasında mesane kanseri ile mEH polimorfizmi arasında bir ilişki gösterilememiştir (61).

2.4. Primer Beyin Tümörü

Beyin yumuşak, süngerimsi bir doku olup kafatası kemiği ve meninges denilen üç ince membranla korunur. Meningesler ile ventriküller arasında akan serebrospinal sıvı beyni bir yastık gibi korur. Beyinden köken alan tümörlere primer beyin tümörü denir. Beyin tümörleri yüksek dereceden (IV) düşük dereceye

(I) gruplandırılır. Bu dereceler mikroskop altında hücrelere bakmak yoluyla belirlenir (69). Primer beyin tümörleri başladığı hücre tipine ya da beyin kısımlarının yerine göre isimlendirilir. En yaygını glial hücrelerden köken alan gliomalardır. Astrositoma, beyin sapı gliomu, epindimoma, oligodendroglioma en yaygın glioma tipleridir. Medulloblastoma, meningioma, şivanoma, kraniofaranjioma ise diğer yaygın primer beyin tümörü tipleridir (69). Türkiye’de primer beyin tümörleri Sağlık Bakanlığının 1999’daki verilerine göre en sık görülen on kanser arasında yer almaktadır (76). Primer beyin tümörü USA’da kanser ölümlerinde ilk on içinde yer alır (70).

Kohort tipi ya da hasta-kontrol tipi epidemiyolojik çalışmalarda diyet, sigara içimi, kimyasallar, enfeksiyonlar, virüsler, iyonize radyasyon, aile öyküsü, karsinojen metabolizmayla ilgili genlerdeki kalıtsal polimorfizmler ve oksidatif metabolizmanın beyin tümöründe risk gruplarını oluşturup oluşturmadığı araştırılmıştır. Pek çok endüstri alanında çalışan işçiler nörotoksik ve karsinojenik olan organik çözücüler, formaldehit, akrilonitril, fenol, fenolik bileşikler, kömür katranı, N-nitroso bileşikleri, vinil klorit ve PAH’lara maruz kalırlar. Deney hayvanlarında bu moleküller veya metabolitlerinin beyin tümörü oluşumunu indüklediği bilinmektedir (71, 72). Örneğin Cocco ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada metilen klorit, tarım kimyasalları, klorlanmış alifatik hidrokarbonlar, solvent işlerinde çalışan kadınlarda merkezi sinir sistemi hastalıklarında % 20–30 oranında artış olduğu bildirilmiştir. Aynı çalışmada PAH, benzen ve nitrözaminin de risk olabileceği belirtilmiştir (73). Kelsey ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ise filtresiz sigara içimi ile beyin tümörü riski arasında bir ilişki olduğu bildirilmiştir (74). Sigara karsinojenler, ko-karsinojenler (kendileri karsinojen olmadığı halde diğer maddelere karsinojenik özellik kazandıran) ve tümör

promotorları olmak üzere binlerce molekül içerir. Sigara dumanındaki oksidanlar hem serbest radikallerden hem de radikal olmayan oksidanlardan oluşur. Bunlar sigara dumanının DNA, protein ve lipitler üzerinde oluşturduğu biyolojik harabiyetten sorumludur. Sigara dumanı partikül faz (katran) ve gaz faz olmak üzere iki faza ayrılır. Bu iki faz sigaranın hem ana dumanında hem de yan dumanında bulunmaktadır. Gaz fazı yüksek konsantrasyonda oksiradikaller içermektedir (NO, CO, benzen, etilen, metanol, asetaldehit, formaldehit). Gaz fazdaki radikaller kısa ömürlüdür. Oysa katran fazda oldukça stabil radikaller yüksek konsantrasyonda bulunur ve oldukça uzun ömürlüdürler. Bu yüzden katran fazı daha karsinojeniktir. Katran fazda nikotin, polifenoller, aldehitler, nitrozaminler ve PAH'lar bulunur (9, 75). Sigara dumanının karsinojenik etkisi karsinojenlerin DNA'ya ulaşması, bozuk tekrarların ve mutasyonların oluşmasına neden olmasındandır. Bu mekanizmada sigara dumanı karsinojenlerinin metabolizmada biyoaktivasyonu sonucu oluşan aktif metabolit DNA'ya bağlanarak DNA-adduct meydana getirir. Oluşan DNA-adduct tamir mekanizmaları tarafından giderilemezse DNA duplikasyonu ve bunu takiben DNA replikasyonu sonucunda genoma mutasyon yerleşir (46). Beynin, diğer organlara göre bu kimyasal ve metabolitlere karşı daha iyi korunmuş olmasına rağmen sigara dumanı ve çok pişmiş gıdalarda bulunan nitrozaminler kan-beyin bariyerinin aşarlar (72). Teorik olarak kişilerin kansere duyarlılığı, prokarsinojenleri aktive ve detoksifiye etme kapasiteleri arasındaki dengeden etkilenmektedir. Giderek artan bir şekilde tanımlanan ve toplumda yaygın olan genetik polimorfizmler bu işlemlerin her birini etkileyebilir. Böylece bu kalıtsal faktörlere sahip bireylerin primer beyin tümörüne duyarlılığı sigara dumanına maruz kalma ile artabilir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3. 1. Gereçler

- Steril mikrosantrifüj tüpleri (1,5 ml, 0,5 ml, 0,2 ml)
- Steril pipetler (5 ml, 10 ml)
- Steril polipropilen test tüpleri (15 ml, 50 ml)
- Steril sitratlı tüpler (5 ml, Venoject)
- Otomatik pipetler (P10, P20, P200, P1000, Gilson)
- Otomatik pipet uçları (Sarı, mavi, beyaz, Rainin)
- Çeşitli ebatlarda erlen, beher, cam pipet ve mezürler (Teknik cam)
- Mikro santrifüj (Eppendorf 5415C)
- Sabit başlıklı masa üstü santrifüj (Hettich EBA 3S)
- Manyetik karıştırıcı (Nüve MK 218)
- Hassas terazi (Sartorius BL120S)
- pHmetre (Jenco 672 Digital)
- Vorteks (Nuvemix NVM)
- Su banyosu (Memmert WB-10)
- Isıtma bloğu (Stuart Scientific)
- Mikrodalga fırın (Arçelik MD500)
- Derin dondurucu (Ariston)
- Otoklav (Sanyo MLS)
- Otoklav bandı (Bastos Viegas, s.a.)
- Spektrofotometre (Spectro UV-VIS Double Beam PC Scanning)
- Termal cycler (Techne)
- Jel görüntüleme cihazı ve yazıcısı (Wilber Lourmat Photodocumentation and Video Graphic Printer UP-895CE)

- UV transilluminatör (UVP TM-40)
- Jel elektroforez aparatları (Güç kaynağı, Mini ve Wide mini subcell)

3. 2. Kimyasallar

- Primerler (Iontek)
- Restriksiyon endonükleaz *EcoR* V (Fermentas, 10 U/ μ l)
- Restriksiyon endonükleaz *Rsa* I (Fermentas, 10 U/ μ l)
- Restriksiyon endonükleaz *Psy* I (Fermentas, 10 U/ μ l)
- Taq DNA polimeraz (Fermentas, 5 U/ μ l)
- dNTP karışımı (Fermentas, 2 mM)
- Agaroz (Sigma)
- MgCl₂ solüsyonu (Fermentas, 25 mM)
- Proteinaz K (Fermentas, 15 mg/ml)
- DNA Marker 100 bp (Fermentas, 0,5 mg/ml)
- DNA Marker 50 bp (Fermentas, 0,5 mg/ml)
- Tris-base (Applichem)
- Asetik asit (Riedel-de Haen)
- Sükroz (Merck)
- Triton x100 (Sigma)
- Magnezyum Klorür, 6 Sulu (Carlo Erba)
- Etilen Diamin Tetra Asetikasit (EDTA, Bio Basic inc.)
- Sodyum Klorür (Merck)
- % 96'lık saf etil alkol (Riedel-de Haen)
- Sodyum Dodesil Sülfat (SDS, Sigma)
- Etidyum bromid, 1 mg/ml (Applichem)

3. 3. Genel Çözeltiler ve Tamponlar

Lizis Tamponu (pH 7,5)

--10 mM Tris-base

--320 mM sükröz

--% 1 Triton x100

--4 mM MgCl₂.6H₂O (Otoklavlanır)

TE Tamponu (pH 7,5)

--10 mM Tris-base

--1 mM EDTA (Otoklavlanır)

TEN Tamponu (pH 8,0)

--10 mM Tris

--2 mM EDTA

--400 mM NaCl (Otoklavlanır)

TAE_{x5} Tamponu (pH 8,0)

--40 mM Tris-base

--Asetik asit (5,71ml)

--1 mM EDTA

Doymuş NaCl çözeltisi

% 10'lük SDS (Sodyum Dodesil Sülfat)

Jel Yükleme Tamponu (Loadingdye×6, Fermentas)

% 70'lik Etil alkol

3. 4. Hastalar ve Kontrol Grubu

3. 4. 1. Hastalar

Bu çalışma Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Beyin ve Sinir Cerrahisi Anabilim Dalı'nda primer beyin tümörü tanısı alan 105 hasta üzerinde

yapıldı. Yalnızca daha önce herhangi bir kanser hikayesi olmayanlar, ayrıca daha önce radyoterapi veya kemoterapi almamış, yeni primer beyin tümörü tanısı konulmuş hastalar çalışmaya alındı. Hastalar arasında cinsiyet, yaş veya kanserin histopatolojik tipi ile derecesi yönünden bir kısıtlama yapılmadı. Primer beyin tümörünün tanısı histolojik olarak doğrulandı. Tüm hastaların ve kontrollerin Türk anne ve babadan doğmuş olmaları dikkate alındı. Tüm hastalar çalışmaya katılmayı kabul ettiler ve **Ek 1**' de verilen soru formu, soru-cevap şeklinde dolduruldu. Çalışma Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi İnsan Araştırmaları Etik Komitesi tarafından onaylandı (**Ek 2**).

3. 4. 2. Kontroller

Çalışmamızda, Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi'ne başvuran ve daha önce herhangi bir kanser tanısı, radyoterapi veya kemoterapi almamış 150 kişi kontrol grubu olarak alındı. Çalışmaya dahil edilen kontroller için **Ek 1**'de verilen soru formu, soru-cevap şeklinde dolduruldu. Çalışmaya alınan kontrol grubu ile hasta grubu yaş ve cinsiyet yönünden birbiri ile uyumlu bireylerden oluşturuldu.

3. 5. Kan Örneklerinin Toplanması

Kontrollerden ve primer beyin tümörü tanısı konulan hastalardan, herhangi bir kemoterapi veya radyoterapiye başlanmadan önce, 5 ml kan örneği steril, sitratlı tüplere alındı. Kan örneklerinden mümkün olduğunda, laboratuara ulaşır ulaşmaz genomik DNA izole edildi veya örnekler +4 °C'de en fazla 24 saat bekletildikten sonra DNA izole edildi. DNA izolasyonundan geriye kalan kan -20 °C'de korundu.

3. 6. Genomik DNA İzolasyonu

Genomik DNA, salting-out (yüksek tuz konsantrasyonu ile çöktürme) yöntemiyle izole edildi. 1 ml kan 15 ml'lik steril tek kullanımlık polipropilen santrifüj tüpüne alındı, üzerine 3 ml lizis tamponu ilave edildi. Tüp çok yavaş bir şekilde ters-düz edildi ve 15 dakika 2200 rpm' de sabit başlıklı masa üstü santrifüjünde oda sıcaklığında santrifüj edilip dökelti atıldı. Bu işlem iki kez daha tekrarlandıktan sonra çökelti üzerine 600 µl TEN tamponu ilave edildi ve kısa bir süre vortekslendi. Bir 1,5 ml'lik eppendorf tüpüne 40 µl % 10'luk SDS ve 7 µl (15 mg/ml) proteinaz K eklendi. Vortekslenen polipropilen tüp içindeki çökelti bu 1,5 ml'lik eppendorf tüpüne aktarıldı. Eppendorf tüp ısıtma bloğunda 55 °C'de 3,5 saat inkübe edildi. Örneğin üzerine 200 µl doymuş NaCl çözeltisi ilave edildi ve eppendorf santrifüjünde 2600 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. İşlem sonunda dökelti başka bir eppendorf tüpüne alındı ve 3300 rpm'de 30 dakika santrifüj edildi. Dökelti 15 ml'lik tüpe alınıp üzerine 2 ml saf etil alkol ilave edilip DNA çöktürüldü. Çöken DNA pipet ucuyla toplanarak 1,5 ml'lik eppendorf tüpüne alındı ve üzerine 200 µl % 70'lik etil alkol ilave edilerek temizlendi. Tüp içindeki alkol atılarak, DNA üzerine 40 µl TE tamponu eklendi ve bir gün oda sıcaklığında bekletildi. Hazırlanan genomik DNA'lar -20 °C de korundu.

3. 7. DNA Kalitesi ve Miktarının Belirlenmesi

İzole edilen DNA örneklerinin PZR reaksiyonunda kullanılabilir kalitede olup olmadığı, yani izolasyon sırasındaki hatalardan kaynaklanabilen degradasyon (DNA'nın küçük parçalara ayrılması) olup olmadığı, örneklerin % 0.8'lik agaroz jelde elektroforeze tabi tutularak görüntülenmesi ile kontrol edildi.

DNA derişimi ise spektrofotometrik olarak belirlendi. İzole edilen DNA örnekleri 1/50 oranında sulandırılarak 260 nm'de absorbanları ölçüldü. Aynı

örneğin 280 nm'deki absorbanısı da alınarak içerisindeki protein kirliliği belirlendi. A_{260}/A_{280} oranı 1,5'in altındaki DNA örnekleri için yeniden DNA izolasyonu yoluna gidildi. A_{260} 'da ölçülen 1 değeri 50 µg/ml çift zincirli DNA ya karşılık geldiğinden yoğunluk aşağıdaki formülden yararlanılarak hesaplandı.

DNA (µg/ml) = $A_{260} \times 50 \times$ sulandırma faktörü

3. 8. Genotipleme

Mikrozomal epoksit hidrolaz enzimini kodlayan gende polimorfizm olup olmadığı polimeraz zincir reaksiyonu ve restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi yöntemi kullanılarak belirlendi.

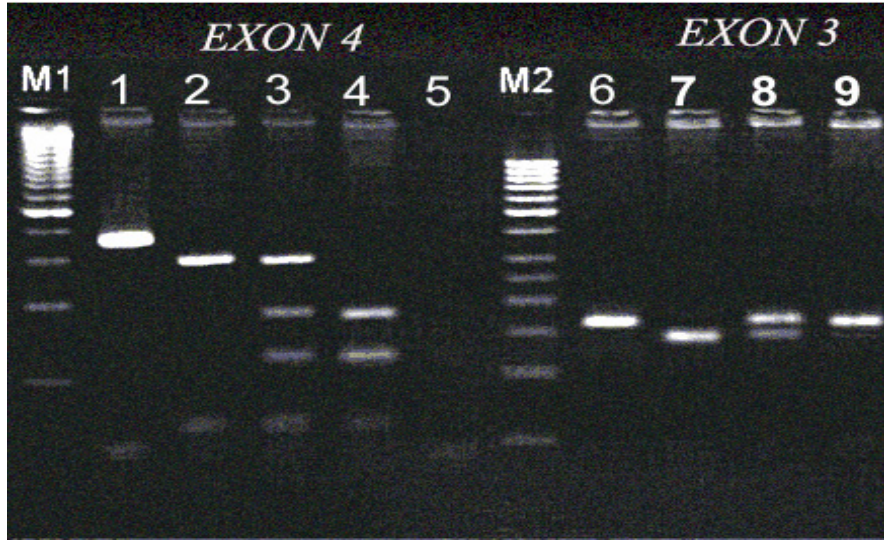
3. 8. 1. Ekzon 3 Polimorfizminin Belirlenmesi

PZR reaksiyonu toplam hacim olarak 50 µl, her bir primerden 10 pmol (F: 5' **GGG GTC CTG AAT TTT GCT CC** 3', R: 5' **CAA TCT TAG TCT TGA AGT GAC GGT** 3'), 5 µl dNTP, 50 ng DNA, 0,5 µl Taq DNA polimeraz, 5 µl Tag DNA polimeraz tamponu, 8 µl MgCl₂ içerecek şekilde hazırlandı. DNA, 95 °C'de 7 dakikalık başlangıç denatürasyonunu takiben 95 °C'de 1 dakika, 53 °C'de 1 dakika, 72 °C'de 1 dakika olacak şekilde 35 döngü ve 72 °C'de 10 dakika PZR programı ile amplifiye edildi. 14 µl PZR ürünü (163 bp) 10 U *Psy* I restriksiyon endonükleaz ile 37 °C'de bir gece restriksiyona tabi tutuldu. Restriksiyon ürünü (yabanıl tip: 140, 23 bp, polimorfik heterozigot: 163,140,23 bp, polimorfik homozigot: 163 bp) % 2,5'lük agaroz jelde elektroforeze tabi tutulduktan sonra jel görüntüleme cihazında fotoğraflandı (Şekil 5).

3. 8. 2. Ekzon 4 Polimorfizminin Belirlenmesi

PZR reaksiyonu toplam hacim olarak 50 µl, her bir primerden 50 pmol (F: 5' **GGG GTA CCA GAC CTG ACC GT** 3', R: 5' **AAC ACC GGG CCA CCC TTG GC** 3'), 5 µl dNTP, 50 ng DNA, 0,5 µl Taq DNA polimeraz, 5 µl Tag DNA

polimeraz tamponu, 4 µl MgCl₂ içerecek şekilde hazırlandı. DNA, 94 °C'de 5 dakikalık başlangıç denatürasyonunu takiben 94 °C'de 30 saniye, 63 °C'de 30 saniye, 72 °C'de 45 saniye olacak şekilde 35 döngü ve 72 °C'de 5 dakika PZR programı ile amplifiye edildi. 14 µl PZR ürünü (357 bp) 10 U *Rsa* I restriksiyon endonükleaz ile 37 °C'de bir gece restriksiyona tabi tutuldu. Restriksiyon ürünü (yabanıl tip: 295,62 bp, polimorfik heterozigot: 295,174,121,62 bp, polimorfik homozigot: 174,121,62 bp) % 2,5'luk agaroz jelde elektroforeze tabi tutulduktan sonra jel görüntüleme cihazında fotoğraflandı (Şekil 5).



Şekil 5. Mikrozomal epoksit hidrolaz ekzon-3 ve ekzon-4 genotiplerinin PZR-RFLP paternleri.

M 1: Gene Ruler 100 bp DNA ladder (3000, 2000, 1500, 1200, 1031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 bp).

1 : ekzon-4 PZR ürünü

2 : His/His (Yabanıl tip)

3 : His/Arg (Heterozigot polimorfik)

4 : Arg/Arg (Homozigot polimorfik)

5 : negatif kontrol (ekzon 4)

M 2: Gene Ruler 50 bp DNA ladder (1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 250, 200, 150, 100, 50 bp)

6 : ekzon-3 PZR ürünü

7 : Tyr/Tyr (Yabanıl tip)

8 : His/Tyr (Heterozigot polimorfik)

9 : His/His (Homozigot polimorfik)

3. 9. Agaroz Jel Elektrofrez

İzole edilen DNA örnekleri, PZR ürünleri ve RFLP sonucu oluşan DNA fragmentleri agaroz jelde büyüklüklerine göre ayrıldı. Jeller Tris-Asetat-EDTA (TAE) tamponu içinde hazırlandı ve elektroforeze tabi tutuldu. Jelin hazırlanması aşamasında 1 mg/ml etidyum bromid eklendi. Jel üzerindeki kuyucuklara yükleme sırasında DNA örneği üzerine 1/6 hacim yükleme tamponu eklendi. Elektrofrez 100 V da 45 dakika yapıldı. Jeller jel görüntüleme sistemi kullanılarak fotoğraflandı.

4. İstatistiksel Değerlendirme

Bu çalışmada primer beyin tümörü hastaları ve kontroller sigara alışkanlığı ve ailede kanser hikayesi yönünden Khi kare (χ^2) testi kullanılarak (yanılma değeri $\alpha=0.05$) karşılaştırıldı. Ayrıca primer beyin tümörü oluşumu, tümör histolojisi, genotipler arasındaki ilişkiler Khi kare (χ^2) ve Lojistik regresyon testi ile değerlendirildi. İlişkinin derecesi % 95 CI (Confidence Interval: Güvenlik aralığı) da OR (Odds Ratio: İhtimal oranı, relatif riskin tahmini) olarak tarif edildi. Verilerin istatistiksel analizi Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) programı (Versiyon 14) kullanılarak yapıldı.

4. BULGULAR

Bu çalışma Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Beyin ve Sinir Cerrahisi Anabilim Dalı'nda primer beyin tümörü tanısı alan 105 hasta ve yine aynı hastaneye kanser dışındaki hastalıklar nedeniyle başvuran 150 kontrol üzerinde yapıldı. Çalışmaya herhangi bir kanser hikayesi olmayan, yeni primer beyin tümörü tanısı konulmuş hastalar alındı.

Tablo 1. Primer beyin tümörü hastaları ve kontrollerin özellikleri

	Kontrol	Hasta
Birey sayısı	n (%)	n (%)
Cinsiyet		
Toplam	150	105
Erkek	75 (50)	55 (52)
Kadın	75 (50)	50 (48)
Yaş		
Aralık	14–80	11–82
Yaş ortalaması		
Erkek	50.0 ± 7.2	49.6 ± 16.3
Kadın	45.4 ± 15.8	47.5 ± 17.6
Sigara hikayesi		
İçenler	38 (25)	38 (36)
Erkek	35 (92)	30 (79)
Kadın	3 (8)	8 (21)
Ailede kanser hikayesi	9 (6)	17 (16)

Hastalar arasında cinsiyet, yaş veya kanserin histopatolojik tipi ile derecesi yönünden bir kısıtlama yapılmadı. Primer beyin tümörünün tanısı histolojik olarak doğrulandı. Primer beyin tümörü hastaları ve kontrollerin cinsiyet, yaş aralığı, yaş ortalaması, sigara içme durumu, ailede kanser hikayesi gibi özellikleri Tablo 1’de verilmiştir. Kontrollerin 75’i (% 50) erkek, 75’i (% 50) kadın bireylerden oluşurken hastaların 55’i (% 52) erkek, 50’si (% 48) kadındı. Hastaların ve kontrollerin yaş ortalaması sırasıyla erkeklerde 50.0 ± 7.2 ve 49.6 ± 16.3 iken kadınlarda 45.4 ± 15.8 ve 47.5 ± 17.6 olarak bulundu.

Primer beyin tümörlü hastalar ve kontroller sigara içme durumu yönünden değerlendirildiğinde hastaların ve kontrollerin 38’inin (sırasıyla; % 36, % 25) sigara içtiği gözlemlendi. Sigara içen kontrollerin 35’i (% 92) erkek ve 3’ü (% 8) kadın, sigara içen hasta grubunun ise 30’u (% 79) erkek ve 8’i (% 21) kadındı (Tablo 1). Sigara alışkanlığı bakımından kontroller ve primer beyin tümörü hastaları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmedi ($\chi^2 : 3.5$, P : 0.1) (Tablo 2).

Tablo 2. Primer beyin tümörü hastalarının ve kontrollerin sigara alışkanlığı yönünden karşılaştırılması

Sigara alışkanlığı	İçen	İçmeyen
Birey	n (%)	n (%)
Hasta	38 (36)	67 (64)
Kontrol	38 (25)	112 (75)
$\chi^2 :$		3.5
P :		0.1

Ailede kanser görülme sıklığı yönünden hastalar ve kontroller karşılaştırıldığında, kontrollerin 9'unun (% 6) ve kanser hastalarının 17'sinin (% 16) 1. derece akrabalarında kanser vakası görüldüğü izlendi. Ailede kanser bulunma sıklığı bakımından kontroller ve primer beyin tümörü hastaları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlemlendi (χ^2 : 7.0, P: 0.01) (Tablo 3). Hasta grubunun 1. derece akrabalarında kanser bulunma sıklığı kontrollere göre daha yüksekti.

Tablo 3. Primer beyin tümörü hastaları ve kontrollerin ailede kanser hikayesi yönünden analizi

Ailede kanser hikayesi	Var	Yok
Birey sayısı	n (%)	n (%)
Hasta	17 (16)	88 (84)
Kontrol	9 (6)	141 (94)
χ^2 :	7.0	
P :	0.01	

4.1. mEH Polimorfizmi ve Primer Beyin Tümörü İlişkisi

4.1.1. Ekzon 3 Polimorfizmi

Hasta ve kontrollerin mEH ekzon 3 polimorfizmi yönünden istatistiksel olarak analizi Tablo 4'de verilmiştir. Buna göre 150 kontrolün 83'ü (% 55) yabancı genotipe (Tyr/Tyr) sahipken 67'si (% 45) polimorfik genotipe (% 37 Tyr/His, % 8 His/His) sahipti. Yüziki primer beyin tümörü hastasının 58'inin (% 57) yabancı genotipi, 44'ünün (% 43) ise polimorfik genotipi (% 36 Tyr/His, % 7 His/His)

taşıdığı belirlendi. Primer beyin tümörü hastaları ve kontroller arasında mEH ekzon 3 polimorfizmi yönünden istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmedi (χ^2 : 0.05, P : 0.8, Ham OR: 1.0 % 95 CI: 0.6-1.7) (Tablo 4). Veriler lojistik regresyon modeli uygulanarak analiz edildiğinde, ailede kanser hikayesi ile sigara içimi faktörlerinin etkisini ortaya koyarak hesaplanan düzeltilmiş OR değerinin ham OR değerinden farklı olmadığı gözlemlendi (Düzeltilmiş OR: 1.0 % 95 CI: 0.6-1.7) (Tablo 4). Bu çalışmaya toplam 105 hasta alınmasına rağmen bazı hastaların DNA örneklerinin amplifikasyonunda yaşanan problemler nedeniyle ekzon-3 polimorfizmi 102 hastada belirlenebildi.

Tablo 4. Primer beyin tümörü hastaları ve kontrollerin mEH ekzon 3 polimorfizmi yönünden analizi

Genotip	Hasta	Kontrol	Ham OR	Düzeltilmiş OR
Birey sayısı	n (%)	n (%)	(% 95 CI)	(% 95 CI)*
Tyr/Tyr	58 (57)	83 (55)	1.0 (ref.)	1.0 (ref.)
Tyr/His, His/His	44 (43)	67 (45)	1.0 (0.6-1.7)	1.0 (0.6-1.7)
χ^2 :	0.05			
P :	0.8			

*ailede kanser hikayesi ve sigara içimi faktörleri yönünden düzeltildi.

4.1.2. Ekzon 4 Polimorfizmi

Hasta ve kontrollerin mEH ekzon 4 polimorfizmi yönünden istatistiksel olarak analizi Tablo 5’de verilmiştir. Yüzelli kontrolün 104’ü (% 69) yabanıl (His/His) genotipe sahipken 46’sı (% 31) polimorfik genotipe (% 30 His/Arg, % 1 Arg/Arg) sahipti. Yüzbeş primer beyin tümörü hastasının 85’inin (%81) yabanıl genotipi

(His/His), 20'sinin ise (% 19) polimorfik genotipi (% 18 His/Arg, % 1 Arg/Arg) taşıdığı belirlendi. Dolayısıyla polimorfik genotipin sıklığı kontrollerde hastalara göre daha yüksek bulundu ve iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılığın olduğu gözlemlendi (χ^2 : 4.3, P: 0.03) (Tablo 5). mEH ekzon 4 polimorfizmi taşımayanlarda primer beyin tümörü oluşma riski yabancı tip taşıyanlara oranla 1.8 kat daha fazla bulundu (Ham OR: 1.8 % 95 CI: 1.0-3.4). Veriler lojistik regresyon modeli uygulanarak analiz edildiğinde, ailede kanser hikayesi ile sigara içimi faktörlerinin etkisinin ham OR'u değiştirmedikleri gözlemlendi (Düzeltilmiş OR: 1.8 % 95 CI: 1.0-3.4) (Tablo 5).

Tablo 5. Primer beyin tümörü hastaları ve kontrollerin mEH ekzon 4 polimorfizmi yönünden analizi

Genotip	Hasta	Kontrol	Ham OR	Düzeltilmiş OR
Birey sayısı	n (%)	n (%)	(% 95 CI)	(% 95 CI)*
His/His	85 (81)	104 (69)	1.0 (ref.)	1.0 (ref.)
His/Arg, Arg/Arg	20 (19)	46 (31)	1.8 (1.0-3.4)	1.8 (1.0-3.4)
χ^2 :	4.3			
P :	0.03			

*ailede kanser hikayesi ve sigara içimi faktörleri yönünden düzeltildi.

4.2. Primer Beyin Tümörünün Histopatolojik Tipi ile Genotip Sıklıkları

Arasındaki İlişki

Primer beyin tümörü hastaları tümörün histopatolojik tipine göre sınıflandırıldığında en yaygın tümör tipinin astrositoma olduğu (% 37) ve bunu menengioma (% 30) ile hipofiz adenomanın (% 9) izlediği görüldü. Diğerleri (%

24) adı altında gruplandırılan tümör tipleri ise medulloblastoma, kolloid kist, kraniofarinjioma ve akustik nöroma'yı kapsamaktaydı (Tablo 6). Hastalardaki primer beyin tümörünün histopatolojik tipi ile incelenen gen varyantları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki gözlenmedi. Polimorfik genotip dağılımları tümör tiplerinde benzerdi. Meningioma (% 15) ve astrositomada (% 15) mEH ekzon 4 polimorfizmi (His/Arg, Arg/Arg) görülme sıklığı diğer (% 36) primer beyin tümörlerinde görülme sıklığından daha düşük olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki gözlenmedi (sırasıyla, χ^2 : 0.2, P: 0.7, OR: 0.7 % 95 CI: 0.2-2.5 ve χ^2 : 0.3, P:0.6, OR: 0.7 % 95 CI: 0.2-2.2) (Tablo 6).

Tablo 6. Primer beyin tümörü hastalarında kanserin histopatolojik tipi ile gen varyantları arasındaki ilişki

Histopatolojik tip	Hasta	Meningioma	Astrositoma	H. Adenoma	Diğer
Birey sayısı	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
mEH Ekzon 3	102 (100)	30 (29)	39 (38)	9 (9)	24 (24)
Tyr/Tyr	58 (57)	19 (63)	23 (59)	5 (55)	11 (46)
Tyr/His, His/His	44 (43)	11 (37)	16 (41)	4 (45)	13 (54)
χ^2 :	-	0.4	0.05	0.01	0.9
P :	-	0.5	0.8	1.0*	0.3
OR (% 95 CI):	-	0.7 (0.3-1.9)	0.9 (0.4-2.0)	1.0 (0.2-4.8)	1.5 (0.5-4.1)
mEH Ekzon 4	105 (100)	32 (30)	39 (37)	9 (9)	25 (24)
His/His	85 (81)	27 (84)	33 (85)	9 (100)	16 (64)
His/Arg, Arg/Arg	20 (19)	5 (16)	6 (15)	-	9 (36)
χ^2 :	-	0.2	0.3	2.1	3.3
P :	-	0.7	0.6	0.3*	0.1
OR (% 95 CI):	-	0.7 (0.2-2.5)	0.7 (0.2-2.2)	-	2.4 (0.8-6.8)

* Fisher exact.

TARTIŞMA SONUÇ

Günümüzde kardiyovasküler hastalıklardan sonra en büyük ikinci ölüm nedeni kanserdir ve bu önemli sağlık sorunundan biride primer beyin tümörüdür. Türkiye’de primer beyin tümörleri en sık görülen on kanser arasında yer alır (76). Primer beyin tümörlerinin nedenleri henüz tam açıklanmamış olmakla birlikte yaş, cinsiyet, etnik köken gibi özellikler risk faktörleri arasında sayılmaktadır. Yapılan bir çalışmada beyaz ırkın gliomadan daha çok etkilendiği, hasta yaşı ve tümör histopatolojisi ile hayatta kalmanın çok kuvvetli bir şekilde ilişkili olduğu gösterilmiştir. Primer beyin tümörü erkeklerde daha yaygındır, ancak menengioma tipi kadınlarda daha fazla görülür (71). Bu çalışmada hastaların % 52,4’ü erkek iken, % 47,6’sı kadın hasta olmuştur (Tablo 1) ve bunların içinde menengioma % 60’lık oranla en çok kadınlarda görülmüştür. Bu açıdan çalışmamızın sonuçları literatür ile uyumluluk göstermektedir. Yüksek doz iyonize radyasyon ve bazı genetik bozuklukların da risk faktörü olabileceği bildirilmiştir. Primer beyin tümörü ABD’de çocuklarda lösemiden sonra % 30 oranıyla görülen en yaygın kanserdir. Aileleri tarım sektöründe çalışan çocuklarda, tarımda kullanılan pestisitlerin de beyin tümörü riskini artırdığı bildirilmiştir (77). Bazı çalışmaların sonuçları, kimyasal karsinojenlerin primer beyin tümörü oluşumunda da önemli bir risk faktörü olabileceğine işaret etmektedir. Yapılan bir çalışmada, çalışan kadınların maruz kaldığı PAH (OR: 1.1 % 95 CI: 1.1-1.2), benzen (OR: 1.1 % 95 CI: 1.0-1.2), tarımsal böcek ve mantar ilaçları (OR: 1.3 % 95 CI: 1.1-1.5) gibi kimyasalların primer beyin tümörü riskini arttırdığı bildirilmiştir (78).

Prokarsinojen metabolizmasındaki genetik değişikliklerin diğer kanserlerde olduğu gibi beyin tümörleri için de kişisel yatkınlık oluşturma olasılığı üzerinde

durulmalıdır. Vücuda giren prokarsinojenler insan enzim sistemleri tarafından aktivasyon ve detoksifikasyona uğrarlar. Örneğin benzo (a) pren insanlarda karsinojen olarak bilinen bir moleküldür. Bu molekül sigara içimi ve soluduğumuz havayla hücrelerimize ulaşır. Ligand-reseptör kompleksi oluşturarak promotor bölgelere bağlanır ve karsinojen metabolize eden enzimlerin indüklenmesine yol açar. Böylece faz I (oksidasyon) ve faz II (konjugasyon) basamaklarından sonra suda çözülebilen ve idrarla atılabilen ürünler oluştururlar. Fakat oksidasyon sonrası oluşan ara ürünler çok daha reaktif ve dolayısıyla da karsinojendir. Bu ara ürünler DNA'ya bağlanıp DNA-adduct, spesifik hücre-gen mutasyonları ve onkogen mutasyonlarının meydana gelmesine neden olurlar. Solunan karsinojenlerin aktive deaktive edilmesi kişiden kişiye değişmektedir. Karsinojen metabolize eden hem faz I hem de faz II enzimlerindeki polimorfizmler ile kanser riski arasındaki ilişkiyi inceleyen moleküler epidemiyoloji çalışmaları çelişkili sonuçlar ortaya çıkarmıştır. Çünkü prokarsinojen metabolizması polimorfizmlerinin sıklığı populasyonlar arasında farklılık göstermektedir ve bir popülasyonda yatkınlık oluşturan bir faktör diğerinde oluşturmaz. Farklı popülasyonlarda karsinojen metabolizması enzimi olan mEH'in polimorfizminin sıklığı, bu çalışmada elde edilen sonuçlarla birlikte tablo 7'de verilmiştir. Bizim popülasyondaki mEH ekzon 3 polimorfizm sıklığı, Avusturya popülasyonundaki mEH ekzon 3 polimorfizm sıklığı ile benzerdir. Kafkas ve Finlandiya popülasyonundaki ekzon 3 homozigot ve heterozigot allel sıklığı da çalışmamızla uyumludur. mEH ekzon 4 polimorfizm sıklığı ise, Kanada popülasyonunda mEH ekzon 4 polimorfizm sıklığı ile benzer bulunmuştur. Finlandiya popülasyonundaki ekzon 4 homozigot ve heterozigot allel sıklığı da çalışmamızla uyumlu bulunmuştur (Tablo 7).

Tablo 7: Farklı populasyonlarda mEH genotip sıklıkları

Populasyonlar	Ekzon-3 (%)			Ekzon-4 (%)		
	Tyr/Tyr	Tyr/His	His/His	His/His	His/Arg	Arg/Arg
Finlandiya (19)	52	36	12	74	26	<1
Sudan (65)	65	26	9	57	38	5
Kafkasya (88)	50	33	17	67	29	4
Latin (62)	23	52	25	76	24	<1
Japon (50)	25	44	31	67	28	5
Kore (64)	28	29	43	73	21	6
Kanada (59)	14	34	52	69	27	4
Avusturya (20)	48	43	9	68	29	3
Bu çalışma	55	37	8	69	30	1

Yüzbeş primer beyin tümörü hastası ve 150 kontrolü içeren çalışmamızda zenobiyotik metabolizmasında hem faz I hem de faz II enzimi olarak değerlendirilen mEH'in polimorfik varyantları ile primer beyin tümörü arasındaki ilişki incelenmiştir. Bu çalışmanın sonuçlarına göre mEH ekzon-3 polimorfizmi ile primer beyin tümörü arasında bir ilişki bulunamamıştır (χ^2 : 0.05, P: 0.8, OR: 1.0 % 95 CI: 0.6-1.7) (Tablo 4). Kontrollerde mEH ekzon 3 polimorfizm sıklığı primer beyin tümürlü hastalarinki ile aynı bulunmuştur. De Roos ve ekibi mEH ekzon 3 polimorfizmi taşıyan elli yaş üzeri bireylerde glioma riski (OR: 2.0 % 95 CI: 1.0-3.9) belirlemiştir. Yine bu genotipi taşıyan sigara içen bireylerde de glioma riski (OR: 2.2 % 95 CI: 1.2-4.2) tespit edilmiştir. Ayrıca bu genotip kadınlarda da glioma risk artışıyla ilişkilendirilmiştir (OR: 2.2 % 95 CI: 1.1-4.6) (83). mEH ekzon 3 polimorfizmi yönünden bizim sonuçlarımız sözü edilen

çalışmanın sonuçları ile uyumlu değildir. Ancak Baxter ve arkadaşlarının yumurtalık kanseri ile mEH ekzon 3 polimorfizmi arasında yaptıkları çalışmanın sonuçları bizim çalışmamızla benzerdir (67). Benhamou ve arkadaşlarının akciğer kanseri ile mEH ekzon 3 polimorfizmi arasında yaptıkları çalışmada da bir ilişki bulunamamıştır (53). Biyodönüşüm enzimlerini kodlayan tek bir gendeki polimorfizm tek başına kanser gelişimi için yeterli olmayabilir ve kanser gelişimi için zenobiyotik metabolizmasında görev alan biyodönüşüm enzimlerindeki polimorfizmlerden birkaçının birlikte taşınması gerekebilir. Ayrıca zenobiyotik metabolizmasında görev alan enzimleri kodlayan genler ile kanser oluşumundan sorumlu başka genler arasında linkaj olabilir. Yine beyin tümörlerine de neden olduğu düşünülen faktörler arasında başka genetik mekanizmalar da vardır. Beyin tümörlerinin patogenetik mekanizmalarında onkogenler, tümör baskılayıcı genler ve tümör gelişimindeki mekanizmalar etkili olurlar. Tümör gelişimi için gerekli genetik değişiklikler kalıtım yolu (germ-line mutasyonlar) ile ya da değişik faktörlerin etkisi ile olmaktadır. Tümör baskılayıcı genlerin germ-line mutasyonları bunda etkili olabilir. Örneğin P 53'ün germ-line mutasyonu pek çok beyin tümörü ile ilişkilendirilmiştir. Beyin tümörlerinde PTEN, RB 1, CDKN 2A, CDKN 2B, P14^{ARF}, P 53 gibi tümör baskılayıcı genlerde kayıp varken, CDK 4, MDM 2, EGFR gibi protoonkogenlerde amplifikasyon olduğu bildirilmiştir. Nörofibromin proteinini kodlayan NF 1, merlin proteinini kodlayan NF 2, von Hippel Lindau sendromunda VHL geni gibi tümör baskılayıcı genlerin de beyin tümörleriyle ilişkili olduğu bildirilmiştir (79, 80). Siyah ırkta görülen gliomaların % 42'sinde ve beyaz ırkta görülen gliomaların % 13'ünde P 53 mutasyonu saptanmıştır (78). Çalışmamızda mEH ekzon-4 polimorfizmi ile primer beyin tümörü arasında bir ilişki bulunmuştur (χ^2 : 4.3, P: 0.03, OR: 1.8 % 95 CI: 1.0-3.4)

(Tablo 5). Kontrollerde mEH ekzon 4 polimorfizm sıklığının primer beyin tümörlü hastalara oranla daha yüksek olduğu görülmüştür. Bu çalışmada mEH ekzon 4 polimorfizminin primer beyin tümörüne karşı koruyucu faktör olabileceği görülmektedir. mEH prokarsinogenlerin hem aktivasyonu hem de deaktivasyonunda görevli bir enzim olarak, içerdiği polimorfizmler karsinogenin yapısına göre kanser oluşumu için hem risk faktör hem de koruyucu bir faktör olarak değerlendirilmektedir (20). Burada alınan karsinogenin tipi önem kazanmaktadır. Primer beyin tümörü ile mEH ekzon 4 polimorfizmi arasındaki ilişkiyi inceleyen bir çalışmaya rastlanılamamıştır. Fakat diğer kanserlerle ilişkisi incelenmiştir. Örneğin akciğer kanseri ile mEH polimorfizmi arasında yapılan bir çalışmanın sonucuna göre, sigara içenlerde yavaş allelin koruyucu olabileceği (ekzon 3), hızlı allelin (ekzon 4) ise risk oluşturabileceği bildirilmiştir (57). Ancak yavaş alleli taşıyan ve sigara içmeyenlerde, alınan kimyasalların metabolize olma hızının az olmasından dolayı akciğer kanserinin oluşabileceği bildirilmiştir (88). Kolorektal polipte çok pişmiş et ve sigara tüketimi varlığında yavaş fenotipi bir risk artışıyla ilişkilendiren çalışmalar da vardır (61, 62).

Sigara kullanımı bakımından hasta ve kontroller arasında istatistiksel olarak önemli bir farklılığın olmadığı gözlenmiştir (χ^2 : 3.5, P: 0.1) (Tablo 2). Lee ve ekibi filtresiz sigara içiminin glioma ile ilişkili olduğunu bildirmişse de, sigara içiminin yetişkin beyin tümörleri ile direkt ilişkisi gösterilememiştir (81). Bu açıdan bakıldığında bu çalışmanın sonuçları literatür ile uyumludur. Bununla birlikte oldukça yeni bir çalışmanın sonuçları sigara içimi ile glioma riski arasında pozitif ilişki olabileceğini destekler sonuçlar içermektedir (82). Sigara içimi ile beyin tümörlerinin ilişkili olabileceği hipotezi epidemiyolojik çalışmalarda yoğun bir biçimde araştırılmaktadır. Bu konuda yapılan bir çalışmada GSTM 3 B*/B*

genotipine sahip sigara içen bireylerde glioma ve menengioma riski olduğu bildirilmiştir (sırasıyla, OR: 4.1 % 95 CI: 1.3-12.6, OR: 8.6 % 95 CI: 2.3-32.5) (83). Hamilelik sırasında annenin yada öncesinde ebeveynlerin sigara içimi ile çocukluk çağı beyin tümörleri arasında bir ilişki bulunamamıştır (OR: 0.9 %95 CI: 0.7-1.3). Sigara dumanında bulunan maddelerin annede biyoaktivasyonu sırasında ortaya çıkan reaktif epoksitlerin DNA üzerindeki zararlı etkileri teratogeneze neden olabilir (84). Sigara dumanında bulunan ve karsinojenik olduğu bilinen N-nitrözaminler ratlarda glioma oluşumunu indüklemektedir. Ayrıca nitrozaminlerin kan-beyin bariyerini aştığı bildirilmiştir (71, 72). Sigara dumanı hem serbest radikallerden hem de radikal olmayan oksidanlardan oluşur. Bunlar sigara dumanının DNA, protein ve lipitler üzerinde oluşturduğu biyolojik harabiyetten sorumludur. Sigaranın katran fazında bulunan nikotin, polifenol, aldehit, nitrozamin ve PAH'lar bu fazın karsinojenik olmasından sorumludur (9, 75). Sigara dumanının karsinojenik etkisi karsinojenlerin DNA'ya ulaşması, bozuk tekrarların ve mutasyonların oluşmasına neden olmasındandır. Bu mekanizmada sigara dumanı karsinojenlerinin metabolizmada biyoaktivasyonu sonucu oluşan aktif metabolit DNA'ya bağlanarak, DNA-adduct meydana getirir. Oluşan DNA-adductlar tamir mekanizmaları tarafından giderilemezse DNA dublikasyonu ve bunu takiben DNA replikasyonu sonucunda genoma mutasyon yerleşir (46). Daha fazla sayıda deneği içeren, iyi planlanmış, istatistiksel gücü yüksek epidemiyolojik çalışmaların birikimi sonucu sigara içimi ile primer beyin tümörlerinin en azından bazı tipleri arasında pozitif ilişki saptanabileceği düşünülmektedir.

Primer beyin tümörleri ve ailede kanser hikayesi değerlendirildiğinde, bu çalışmada primer beyin tümürlü hastaların birinci derece akrabalarındaki kanser

olgularının (% 16) kontrollere oranla (% 6) daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Bu çalışmada ailede kanser hikayesi olma durumunun beyin tümörü riskiyle ilişkisi bulunmuştur (χ^2 : 7.0, P: 0.01) (Tablo 3). Bazı gliomaların bu tip kalıtım yoluyla oluştuğunu söyleyen çalışmalar da vardır (77). Grossman ve arkadaşları ise beyin tümörlerinin ailede herhangi bir kalıtsal hastalık olmadan da meydana gelebileceğini, birçok ailede gözlenebilen bir yatkınlığın ise çevresel nedenlerle ilişkili olabileceğini iddia etmektedir (85). Primer beyin tümörü oluşumunda da diğer tümörler gibi genetik mekanizmaların etkili olabileceği ve bunun kalıtımla geçebileceği yönünde yapılan çalışmalar bilinmektedir (86). Çalışmamızın sonuçları da bu yöndeki iddiaları destekler niteliktedir.

Hastalardaki primer beyin tümörünün histopatolojik tipi ile incelenen gen varyantları arasında anlamlı bir ilişki bulamadık (Tablo 6). Amerikan popülasyonunda yapılan bir çalışmada glioma ile mEH ekzon 3 polimorfizmi arasında bir ilişki bulunmuştur (83). Bizim sonuçlarımıza göre bir ilişkinin saptanamamasının nedeni histopatolojik tiplerdeki hasta sayısının yetersiz olması olabilir. Daha fazla sayıda primer beyin tümörü hastasını içeren çalışmalarda beyin tümörlerinin spesifik tiplerine göre bir değerlendirme yapmak daha uygun olabilir. Örneğin 422'si glioma olmak üzere 782 primer beyin tümörlü hastayı kapsayan ve biyodönüşüm enzimlerinden GSTP1 ve GSTT1 polimorfizmleri ile primer beyin tümörünün histopatolojik tipleri arasındaki ilişkiyi inceleyen bir çalışmada, bu enzimlerdeki polimorfizmlerin glioma için risk faktörü olabileceği bildirilmiştir (87). Ayrıca mEH enziminin beynin değişik bölgelerindeki ifadesi aynı değildir. Dolayısıyla enzimler beynin farklı bölgelerinde farklı oranlarda aktivite göstereceğinden primer beyin tümörleri ile polimorfizmler arasındaki ilişkinin tümörün histopatolojik tipine göre farklı olma olasılığı vardır.

Bu çalışma popülasyonu Türk popülasyonunun tamamını yansıtabilecek kadar geniş değilse de, buradan elde edilecek sonuçların, bu alanda yapılacak diğer çalışmaların sonuçları ile birlikte değerlendirilerek Türk popülasyonunda biyodönüşüm enzimlerini kodlayan gen varyantlarının sıklığının belirlenmesi ve bunun primer beyin tümörleri ve diğer kanserlerle ilişkisinin saptanmasında katkı yapacağına inanıyoruz. Ayrıca farklı popülasyonlardan elde edilen sonuçların birikiminin ileride primer beyin tümörlerinin genetik temellerinin daha iyi tanımlanmasına katkıda bulunacağını düşünüyoruz.

Moleküler epidemiyoloji, çevresel karsinojenlere maruz kalma ile ilişkili riskleri değiştiren yatkınlık ve genetik faktörlerin önemini anlaşılmasına katkıda bulunmuştur. Moleküler epidemiyolojinin gelecek önceliği kansere yatkınlık oluşturan genotiplerin kombinasyonu açısından karsinojenlere maruz kalan bireyleri analiz etmektir. Önceden kanser riskini tahmin adına DNA adduct, sitogenetik hasar ve mutasyonlar gibi belirteçlerin belirlenmesi kanserden ölüm oranını büyük ölçüde azaltacaktır. DNA çip teknolojisi ve gen analizi kansere yatkınlık genlerindeki mutasyonların belirlenmesinde hızı artıracaktır ve gen varyantlarının fonksiyonel farklılığının karakterize edilmesi kolaylaşacaktır. Genetik yatkınlık faktörlerinin sıklığı ve dağılımının, yatkın bireylerin ve alt grupların bilinmesi ve özellikle düşük düzeydeki maruz kalmada bile yatkınlığı olabilecek kesin risk altındaki bireylerin tespiti hastalıkların başlamadan önlenmesi açısından önemlidir. Böylece bu kişiler çok sıkı bir sigara bırakma programına veya ilaçla hastalığın önceden önlenmesi programına alınabilirler. Bu kişiler genel popülasyon için uygulaması mümkün olmayan kanser izleme programlarına alınabilirler ve ayrıca çalışma şartları da onlara uygun olarak değiştirilebilir. Bu seviyeye gelinebilmesi için daha fazla sayıda kansere yatkınlık

geninin belirlenmesi, gen-çevre ve gen-gen ilişkisinin incelenmesi ve geniş toplumsal çalışmaların yapılmaya ihtiyacı vardır.

KAYNAKLAR

1. Causes and Risk Factors. ABTA (American Brain Tumor Association) resmi sitesi (info@abta.org), 4, 18–20.
2. Liska, D.J. *Alternative Medicine Review*, 1998, 3, 187–198.
3. Omiecinski, C.J., Hassett, C., Hosagrahara, V. Epoxide hydrolase polymorphism and role in toxicology. *Toxicology Letters*, 2000, 112, 365–370.
4. Hosagrahara, V.P., Rettie, A.E., Hassett, C., Omiecinski, C.J. Functional analysis of human microsomal epoxide hydrolase genetic variants. *Chemico – Biological Interactions*, 2004, 150, 149–159.
5. Williams, J.A. Single nucleotide polymorphisms, metabolic activation and environmental carcinogenesis: why molecular epidemiologists should think about enzyme expression. *Carcinogenesis*, 2001, 22, 209–214.
6. Autrup, H. Carcinogen metabolism in cultured human tissues and cells. *Carcinogenesis*, 1990, 11, 707–712.
7. To-Figueras, J., Gene, M., Gomez-Catalan, J., Pique, E., Borrego, N., Corbella, J. Lung cancer susceptibility in relation to combined polymorphisms of microsomal epoxide hydrolase and glutathione S-transferase P1. *Cancer Letters*, 2001, 173, 155–162.
8. Hengstler, J.G., Arand, M., Herrero, M.E., Oesch, F. Polymorphisms of N-acetyltransferases, glutathione S-transferases, microsomal epoxide hydrolase and sulfotransferases: influence on cancer susceptibility. *Recent Results in Cancer Research*, 1998, 154, 47–85.
9. Hatice Pınarbaşı. Bir Türk populasyonunda GSTM1 polimorfizmi ve akciğer kanseri ilişkisi. 2002 C.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Anabilim Dalı (Doktora Tezi).

10. Best, W. Metabolism of Xenobiotics. Lecture 11.
11. Raunio, H., Pelkonen, O. Genetic factors in the activation and inactivation of chemical carcinogens. *Cancer Genetics*, 1995, 1, 230–258.
12. Kane, A.S. Applied Toxicology. UMCP. akane@umaryland.edu.
13. Reactome: Xenobiotic Metabolism. www.reactome.org.
14. Haufroid, V., Lison, D. Genotyping and phenotyping of metabolic enzymes relevant for the interpretation of biomarkers of exposure. *Archives of Public Health*, 2002, 60, 187–202.
15. Çelik, V.K., Armutçu, F., Aker, A. İnsan plasental glutatyon S- transferazların izolasyonu, kinetik özellikleri ve bazı ilaçlarla *in vitro* etkileşimi. *C. Ü. Tıp Fakültesi Dergisi*, 2003, 25, 187–192.
16. Arand, M., Cronin, A., Oesch, F., Mowbray, S.L., Jones, T.A. The telltale structures of epoxide hydrolases. *Drug Metabolism Reviews*, 2003, 35, 365–383.
17. Oesch, F. Mammalian epoxide hydrolases: inducible enzymes catalysing the inactivation of carcinogenic and cytotoxic metabolites derived from aromatic and olefinic compounds. *Xenobiotica*, 1973, 3, 305–340.
18. J. Fretland, A., Omiecinski, C.J. Epoxide Hydrolases: Biochemistry and molecular biology. *Chemico-Biological Interactions*, 2000, 129, 41–59.
19. Laasanen, J., Ramppanen, E.L., Hiltunen, M., Helisalmi, S., Mannermaa, A., Punnonen, K., Heinonen, S. Two exonic single nucleotide polymorphisms in the microsomal epoxide hydrolase gene are jointly associated with pre – eclampsia. *European Journal of Human Genetics*, 2002, 10, 569–573.
20. Gsur, A., Zidek, T., Schnattinger, K., Feik, E., Haidinger, G., Hollaus, P., Mohn – Staudner, A., Armbruster, C., Madersbacher, S., Schatzl, G., Trieb, K., Vutuc, C., Micksche, M. Association of microsomal epoxide hydrolase polymorphisms and

- lung cancer risk. *British Journal of Cancer*, 2003, 89, 702–706.
21. Tronstad – Elfström, L. Characterization of epoxide hydrolases from yeast and potato. Uppsala University, 2005.
 22. Seidegard, J., Ekström, G. The Role of Human glutathione transferases and epoxide hydrolases in the metabolism of xenobiotics. *Environmental Health Perspectives*, 1997, 105, 791–799.
 23. Falany, C.N., McQuiddy, P., Kasper, C.B. Structure and organization of the microsomal xenobiotic epoxide hydrolase gene. *The Journal of Biological Chemistry*, 1987, 262, 5924–5930.
 24. Skoda, R.C., Demierre, A., McBride, O.W., Gonzalez, F.J., Meyer, U.A. Human microsomal xenobiotic epoxide hydrolase. *The Journal of Biological Chemistry*, 1988, 263, 1549–1554.
 25. McCarver, D.G., Hines, R.N. The Ontogeny of drug – metabolizing enzymes: phase II conjugation enzymes and regulatory mechanisms. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2002, 300, 361–366.
 26. IHOP – Information Hyperlinked over Proteins. Regiospecific expression of cytochrome P – 450s and microsomal epoxide hydrolase in human brain tissue. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 1993.
 27. Newman, J.W., Morisseau, C., Hammock, B.D. Epoxide hydrolases: their roles and interactions with lipid metabolism. *Progress in Lipid Research*, 2005, 44, 1–51.
 28. Friedberg, T., Holler, R., Löllmann, B., Arand, M., Oesch, F. The catalytic activity of the endoplasmic reticulum – resident protein microsomal epoxide hydrolase towards carcinogens is retained on inversion of its membrane topology. *Biochemical Journal*, 1996, 319, 131–136.

29. Morisseau, C., Hammock, B.D. Epoxide hydrolases: mechanisms, inhibitor designs, and biological roles. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 2005, 45, 311–33.
30. Larsen, J.C., Larsen, P.B. Chemical carcinogens. *The Royal Society of Chemistry*, 1998, 10, 33–56.
31. Eriksson, E., Albrechtsen, H.J., Auffarth, K., Baun, A., Boe – Hansen, R., Mikkelsen, P.S., Ledin, A. Hazard identification of rainwater collected for non – potable reuse in households. *Environment and Research DTU*, 2002.
32. Arand, M., Plana, M.E.H., Hengstler, J.G., Lohmann, M., Cronin, A., Oesch, F. Detoxification strategy of epoxide hydrolase the basis for a threshold in chemical carcinogenesis. *EXCLI Journal*, 2003, 2, 22–30.
33. Abdel – Rahman, S.Z., Ammenheuser, M.M., Ward Jr, J.B. Human sensitivity to 1,3-butadiene: role of microsomal epoxide hydrolase polymorphisms. *Carcinogenesis*, 2001, 22, 415–423.
34. Krause, R.J., Sharer, J.E., Elfarra, A.A. Epoxide hydrolase – dependent metabolism of butadiene monoxide to 3-butene-1,2-diol in mouse, rat, and human liver. *Drug Metabolism And Disposition*, 1997, 25, 1013–1015.
35. Guengerich, F.P., Mason, P.S., Stott, W.T., Fox, T.R., Watanabe, P.G. Roles of 2 – haloethylene oxides and 2 – haloacetaldehydes derived from vinyl bromide and vinyl chloride in irreversible binding to protein and DNA. *Cancer Research*, 1981, 41, 4391–8.
36. Riley, R.J., Maggs, J.L., Lambert, C., Kitteringham, N.R., Park, B.K. An in vitro study of microsomal metabolism and cellular toxicity of phenytoin, sorbinil and mianserin. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 1988, 26, 577–88.
37. Miyata, M., Fernandez – Salguero, P., Kimura, S., Gonzalez, F.J., Kudo, G., Lee,

- Y.H., Yang, T.J., Gelboin, H.V. Microsomal epoxide hydrolase is required for the carcinogenic activity of 7,12 – dimethylbenz (a) anthracene. *Journal of Biological Chemistry*, 1999, 274, 23963–23968.
38. Heinemann, F.S., Ozols, J. The covalent structure of microsomal epoxide hydrolase. II. The complete amino acid sequence. *Journal of Biological Chemistry*, 1984, 259, 797–804.
39. Janssen, D.B., Fries, F., van der Ploeg, J., Kazemier, B., Terpstra, P., Witholt, B. Cloning of 1,2-dichloroethane degradation genes of *Xanthobacter autotrophicus* GJ10 and expression and sequencing of the *dhlA* gene. *The Journal of Bacteriology*, 1989, 171, 6791–6799.
40. Kessler, R., Hamou, M.F., Albertoni, M., Tribolet, N., Arand, M., Van Meir, E.G. Identification of the putative brain tumor antigen BF7/GE2 as (de)toxifying enzyme mEH. *Cancer Research*, 2000, 60, 1403–1409.
41. Craft, J.A., Bulleid, N.J., Jackson, M.R., Burchell, B. Induction of microsomal epoxide hydrolase by nitrosamines in rat liver. Effect on messenger ribonucleic acids. *Biochemical Pharmacology*, 1998, 15, 297–302.
42. Kerr, B.M., Rettie, A.E., Eddy, A.C., Loiseau, P., Guyot, M., Wilensky, A.J., Levy, R.H. Inhibition of human liver microsomal epoxide hydrolase by valproate and valpromide: in vitro/in vivo correlation. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 1989, 46, 82–93.
43. Spiegelstein, O., Kroetz, D.L., Levy, R.H., Yagen, B., Hurst, S.I., Levi, M., Haj – Yehia, A., Bialer, M. Structure activity relationship of human microsomal epoxide hydrolase inhibition by amide and acid analogues of valproic acid. *Pharmaceutical Research*, 2000, 17, 216–221.
44. Morisseau, C., Newman, J.W., Dowdy, D.L., Goodrow, M.H., Hammock, B.D.

- Inhibition of microsomal epoxide hydrolases by ureas, amides, and amines. *Chemical Research in Toxicology*, 2001, 14, 409–415.
45. Prestwich, G.D., Lucarelli, I., Park, S.K., Louny, D.N., Moody, D.E., Hammock, B.D. Cyclopropyl oxirenes: reversible inhibitors of cytosolic and microsomal epoxide hydrolases. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1985, 273, 361–72.
46. Hirvonen, A. Polymorphisms of xenobiotics-metabolizing enzymes and susceptibility to cancer. *Environmental Health Perspectives*, 1999, 107, 37–47.
47. Lüleci, G., Sakızlı, M., Alper, Ö. Renkli genetik atlası. Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul. Polimorfizm, 2000, 156–160.
48. Meral Yılmaz. Pre – eklampsi, eklampsi ve HELLP sendromu riski ve insan mikrozomal epoksid hidrolaz geni ekzon–4 polimorfiziminin araştırılması. 2005 C.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, (Yüksek lisans tezi).
49. Hassett, C., Omiecinski, C.J., Aicher, L., Sidhu, J.S. Human mEH: genetic polymorphism and functional expression in vitro of aminoacid variants. *Human Molecular Genetic*, 1994, 3, 421–428.
50. Takeyabu, K., Yamaguchi, E., Suzuki, I., Nishimura, M., Hizawa, N., Kamakami, Y. Gene polymorphism for mEH and susceptibility to emphysema in a Japanese population. *European Respiratory Journal*, 2000,15, 891–894.
51. Shiseki, K., Itoda, M., Saito, Y., Nakajima, Y., Maekawa, K., Kimura, H., Goto, Y., Saitoh, O., Katoh, M., Ohnuma, T., Kawai, M., Sugai, K., Ohtsuki, T., Suzuki, C., Minami, N., Ozawa, S., Sawada, J. Five novel single nucleotide polymorphism in the EPHX gene encoding microsomal epoxide hydrolase. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 2003, 18, 150–153.

52. Öztürk, M. Bilkent Üniversitesi Moleküler Biyoloji Bölümü.
www.genetikbilimi.com.
53. Benhamou, S., Reinikainen, M., Bouchardy, C., Dayer, P., Hirvonen, A. Association between lung cancer and microsomal epoxide hydrolase genotypes. *Cancer Research*, 1998, 58, 5291–5293.
54. Lin, P., Wang, S.L., Chen, K.W., Lee, H.S., Tsai, K.J., Chen, C.Y., Lee, H. Association of CYP1A1 and mEH polymorphisms with lung squamous cell carcinoma. *British Journal of Cancer*, 2000, 82, 852–857.
55. Yin, L., Pu, Y., Liu, T.Y., Tung, Y.H., Chen, K.W., Lin, P. Genetic polymorphisms of NAD(P)H quinone oxidoreductase, CYP1A1 and microsomal epoxide hydrolase and lung cancer risk in Nanjing, China. *Lung Cancer*, 2001, 33, 133–41.
56. Zhao, H., Spitz, M.R., Gwyn, K.M., Wu, X. Microsomal epoxide hydrolase polymorphisms and lung cancer risk in non – Hispanic whites. *Molecular Carcinogenesis*, 2002, 33, 99–104.
57. Wu, X., Gwyn, K., Amos, I.C., Maman, N., Hong, W.K., Spitz, M.R. The association of microsomal epoxide hydrolase polymorphisms and lung cancer risk in African – Americans and Mexican – Americans. *Carcinogenesis*, 2001, 22, 923–928.
58. Figueras, J.T., Gene, M., Gomez – Catalan, J., Pigue, E., Borrego, N., Coballero, M., Cruellas, F., Raya, A., Dicenta, M., Corbella, J. Microsomal epoxide hydrolase and glutathione S-transferase polymorphisms in relation to laryngeal carcinoma risk. *Cancer Letters*, 2002, 187, 95–101.
59. Gasson, A.G., Zheng, Z., Chiasson, D., MacDonald, K., Riddell, D.C., Guernsey, J.R., Guernsey, D.L., McLaughlin, J. Associations between genetic

- polymorphisms of phase I and phase II metabolizing enzymes, P53 and susceptibility to esophageal adenocarcinoma. *Cancer Detection and Prevention*, 2003, 27, 139–146.
60. Jourenkova – Mironova, N., Mitrunen, K., Bouchardy, C., Dayer, P., Benhamou, S., Hirvonen, A. High – activity microsomal epoxide hydrolase genotypes and risk of oral, pharynx, and larynx cancers. *Cancer Research*, 2000, 60, 534–536.
61. Ulrich, C.M., Bigler, J., Whitton, J.A., Bostick, R., Fosdick, L., Potter, J.D. Epoxide hydrolase Tyr113His polymorphism is associated with elevated risk of colorectal polyps in the presence of smoking and high meat intake. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*, 2001, 10, 875–882.
62. Cortessis, V., Seigmund, K., Chen, Q., Zhou, N., Diep, A., Frankl, H., Lee, E., Zhu, Q.S., Haile, R., Levy, D. A case – control study of microsomal epoxide hydrolase, smoking, meat consumption, glutathione S-transferase M3 and risk of colorectal adenomas. *Cancer Research*, 2001, 61, 2381–2385.
63. Smith, C.A.D., Harrison, D.J., Association between polymorphism in gene for microsomal epoxide hydrolase and susceptibility to emphysema. *The Lancet*, 1997, 350, 630–33.
64. Yim, J.J., Park, G.Y., Lee, C.T., Kim, Y.W., Han, S.K., Shim, Y.S., Yoo, C.G. Genetic susceptibility to chronic obstructive pulmonary disease in Koreans: combined analysis of polymorphic genotypes for microsomal epoxide hydrolase and glutathione S-transferase M1 and T1. *Thorax*, 2000, 55, 121–125.
65. Timersma, E.W., Omer, R.E., Bunschoten, A., Veer, P.V., Kok, F.J., Idris, M.O., Kadaru, A.M.Y., Fedail, S.S., Kampman, E. Role of genetic polymorphism of glutathione S-transferase T1 and microsomal epoxide hydrolase in aflatoxin – associated hepatocellular carcinoma. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and*

- Prevention, 2001, 10, 785–791.
66. McGlynn, K.A., Rosvold, E.A., Lustbader, E.D., Hu, Y., Clapper, M.L., Zhou, T., Wild, C.P., Xia, X., Baffoe-Bonnie, A., Ofori-Adjei, D., Chen, G., London, W.T., Shen, F., Buetow, K.H. Susceptibility to hepatocellular carcinoma is associated with genetic variation in the enzymatic detoxification of aflatoxin B1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1995, 92, 2384–2387.
67. Baxter, S.W., Choong, D.Y.H., Campbell, I.G., Microsomal epoxide hydrolase polymorphisms and susceptibility to ovarian cancer. *Cancer Letters*, 2002, 177, 75–81.
68. Lancaster, J.M., Brownlee, H.A., Bell, D.A., Futreal, P.A., Marks, J.R., Berchuck, A., Wiseman, R.W., Taylor, J.A. Microsomal epoxide hydrolase polymorphism as a risk factor for ovarian cancer. *Molecular Carcinogenesis*, 1996, 17, 160–2.
69. National Cancer Institute (NCI) sitesi. U.S. National Institute of Health (Amerika Birleşik Devletleri Ulusal Sağlık Enstitüsü). www.cancer.gov.
70. Central Brain Tumor Registry of the United States (CBTRUS). 1998–2002, 34–35.
71. Wrensch, M., Minn, Y., Chew, T., Bondy, M., S. Berger, M. Epidemiology of Primary Brain Tumors: Current concepts and review of the literature. *Neuro-Oncology*, 2002, 4, 278–299.
72. Cooper, S.F., Lemoyne, C., Gauvreau, D. Identification and quantitation of N-nitrosamines in human postmortem organs. *Journal of Analytical Toxicology*, 1987, 11, 12–8.
73. Cocco, P., Heineman, E.F., Dosemeci, M. Occupational risk factors for cancer of the Central Nervous System (CNS) among U.S. women. *American Journal of Industrial Medicine*, 1999, 36, 70–74.

74. Kelsey, K.T., Wrensch, M., Zuo, Z.F., Miike, R., Wiencke, J.K. A population – based case – control study of the CYP2D6 and GSTT1 polymorphisms and malignant brain tumors. *Pharmacogenetics*, 1997, 7, 463–468.
75. Köktürk, N., Öztürk, C., Kırıçoğlu, C.E. Sigara ve akciğer kanseri. *Solunum* 2003, 5, 139–145.
76. T.C. Sağlık Bakanlığı Kanser Savaş Dairesi istatistikleri.
77. Ertan, A.E., Şengelen, M., Vaizoğlu, S.A. Önlenbilir çocukluk çağı kanserleri. *C.Ü. Tıp Fakültesi Dergisi*, 2004, 26, 48–54.
78. Chen, P., Aldape, K., Wiencke, J.K., Kelsey, K.T., Miike, R., Davis, R.L., Liu, J., Kesler – Diaz, A., Takahashi, M., Wrensch, M. Ethnicity delineates different genetic pathways in malignant glioma. *Cancer Research*, 2001, 61, 3949–3954.
79. Sav, A. Beyin tümörlerinin tanı ve evrelemede genetik yöntemler. *Türk Nöroşirürji Dergisi*, 2006, 16, 2–5.
80. Ferlin, N. The Epidemiology, Biology and Genetics of Human Astrocytic Tumours. *Oncology-pathology*. Karolinska Institutet, 2005.
81. Lee, M., Wrensch, M., Miike, R. Dietary and tobacco risk factors for adult onset glioma in the San Francisco Bay Area (California, USA). *Cancer Causes and Control*, 1997, 8, 13–24.
82. Silvera, S.A., Miller, A.B., Rohan, T.E. Cigarette smoking and risk of glioma: a prospective cohort study. *International Journal of Cancer*, 2006, 118, 1848–51.
83. De Roos, A.J., Rothman, N., Brown, M., A.Bell, D., S.Pittman, G., R.Shapiro, W., G.Selker, R., A.Fine, H., M.Black, P., D.İnskip, P. Variation in genes relevant to aromatic hydrocarbon metabolism and the risk of adult brain tumors. *Neuro-oncol*, Advance Publication, 2006.

84. Toyran, M. Gebelikte sigara içiminin çocuk sağlığı üzerindeki etkileri. *Klinik pediatri*, 2005, 4, 17–23.
85. Grossman, S.A., Osman, M., Hruban, R., Piantadosi, S. Central nervous system cancers in first-degree relatives and spouses. *Cancer Investigation*, 1999, 17, 299–308.
86. Wrensch, M., Fisher, J.L., Schwartzbaum, J.A., Bondy, M., Berger, M., Aldape, K.D. The molecular epidemiology of gliomas in adults. *Neurosurgical Focus*, 2005, 19, 1–6.
87. De Roos, A.J., Rothman, N., Inskip, P.D., Linet, M.S., Shapiro, W.R., Selker, R.G., Fine, H.A., Black, P.M., Pittman, G.S., Bell, D.A. Genetic polymorphisms in GSTM 1, P1, T1, and CYP2E1 and the risk of adult brain tumors. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*, 2003, 12, 14–22.
88. Zhou, W., Thurston, S.W., Liu, G., Xu, L.L., Miller, D.P., Wain, J.C., Lynch, T.J., Su, L., Christiani, D.C. The interactions between microsomal epoxide hydrolase polymorphisms and cumulative cigarette smoking in different histological subtypes of lung cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*, 2001, 10, 461–466.

Ek 1. Hasta ve Kontrollere Ait Sorgu Formu

No:		
Tarih:		
Adı Soyadı:		
Cinsiyeti:		
Adres:		
Tel Ev:		
Tel Cep:		
Doğum Yeri:		
Doğum Tarihi:		
Dedelerinin Doğum Yeri:		
Mesleği:		
Mesleğinin Özellikleri:		
Sigara:	Evet	Hayır
Ne Kadar Zamandır İçiyor:		
Günlük Kaç Tane İçiyor:		
Histopatolojik Tanı:		
Ailede Ca Hikayesi:		



T.C.
CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ETİK KURUL BAŞKANLIĞI

SAYI : B.30.2.CUM.0.1H.00.00/
KONU :

09 / 12 / 2003

Karar No :4

Etik Kurul Kararı : 2003 / 4

Yürütücülüğünü Yrd.Doç.Dr.Hatice PINARBAŞI'nın yapacağı ;
" CYP2E1, CYP1A1 ve GST1'in genetik poliformizmi ile primer beyin tümörü
riski arasındaki ilişkinin incelenmesi "adlı Araştırma Görevlisi Dr.Yavuz SİLİĞ
ve Yrd.Doç.Dr.Mustafa GÜRELİK'e ait Grup Projesinin Yerel Etik Kurul
Kararında uygun olduğuna ;

Karar Verilmiştir.

Prof.Dr.A.Oktay İSİK

Prof.Dr.Suat TOPAKTAŞ

Prof.Dr.Fahrettin GÖZE

Ö.Sebtken
Prof.Dr.Öge ÇETİNKAYA

Doç.Dr.Tijen KAYA

Doç.Dr.Okay BULUT

Doç.Dr.Serdar SOYDAN

2 25