

164649

T.C.  
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ BİYOLOJİ  
ANABİLİM DALI

**MESANE KANSERLİ OLGULARDA H-ras PROTO-  
ONKOGEN (81T →C) POLİMORFİZMİNİN  
İNCELENMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Şengül BEKAR**

Samsun  
Ocak-2005

T.C.  
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ BİYOLOJİ  
ANABİLİM DALI

**MESANE KANSERLİ OLGULARDA H-ras PROTO-  
ONKOGEN (81T→C) POLİMORFİZMİNİN  
İNCELENMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Şengül BEKAR**

**Danışman: Yrd. Doç. Dr. Sezgin GÜNEŞ**

**Samsun**

**Ocak-2005**

T.C.  
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Bu çalışma jürimiz tarafından Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

**Başkan:** Prof.Dr. Recep BÜYÜKALPELLİ (O.M.Ü Üroloji A.D)



**Üye:** Prof.Dr. Hasan BAĞCI (O.M.Ü Tıbbi Biyoloji A.D)



**Üye:** Prof. Dr. Gülsen ÖKTEN (O.M.Ü Tıbbi Biyoloji A.D)



**Üye:** Doç. Dr. Cenk Yücel BİLEN (O.M.Ü Üroloji A.D)



**Üye:** Yrd.Doç.Dr. Sezgin GÜNEŞ (O.M.Ü Tıbbi Biyoloji A.D)



Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüştür.



Prof. Dr. Süleyman Çelik  
Enstitü Müdürü

## TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans süresi boyunca bilgi ve tecrübeleriyle bana destek veren, tez çalışmalarım sırasında bana her türlü destek ve yardımı özveriyle gösteren danışmanım Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Yrd. Doç. Dr. Sezgin GÜNEŞ'e, tez çalışmalarımda çalışma grubunun oluşturulmasında yardım ve desteği olan başta Prof. Dr. Recep BÜYÜKALPELLİ olmak üzere Üroloji Anabilim Dalı öğretim üyeleri Prof. Dr. A. Faik YILMAZ, Prof. Dr. Şaban SARIKAYA, Doç. Dr. Ramazan AŞCI ve Doç. Dr. Cenk Yücel BİLEN'e, çalışmalarım sırasında bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım Tıbbi Biyoloji Öğretim Üyesi Prof. Dr. Hasan Bağcı'ya, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Gülsen ÖKTEN'e, Tıbbi Biyoloji Öğretim Üyesi Prof. Dr. Mehmet ELBİSTAN'a ve laboratuvar çalışmalarım sırasında desteğini gördüğüm Yrd. Doç. Dr. Nurten KARA'ya teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarım sırasında her türlü yardım ve desteğini gördüğüm Anabilim Dalımız Araş. Gör. Serbülent YİĞİT'e çok teşekkür ederim.

Desteklerinden dolayı Araş. Gör. Dr. Özlem SEZER'e, Sağlık Teknisyenleri Mustafa DÜZ, Öznur MIRIK, Emine KAHRAMANOĞLU, Hanife AK ve Murat Fidan'a teşekkür ederim.

Yüksek Lisans çalışmalarım sırasında gösterdikleri sabır ve desteklerinden dolayı anneme, kardeşim Esra'ya ve gösterdiği yardım ve desteği için arkadaşım Ercan TURAL'a teşekkür ederim.

**ÖZET****MESANE KANSERLİ  
OLGULARDA H-ras PROTO-ONKOGEN (81T →C)POLİMORFİZMİNİN  
İNCELENMESİ POLİMORFİZMİ**

**Şengül BEKAR, Yüksek Lisans Tezi  
Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Samsun, Ocak 2005**

Mesane kanserinin oluşumunda büyüme faktörleri, adhezyon molekülleri, anjiogenik faktörler, onkogenler [c-erb-B2 (HER-2/neu), H-ras], detoksifikasyon enzimleri (NAT1, NAT2, GSTM1, CYP1A) ve tümör baskılayıcı genler (p53, Rb, p16, p21) önemli rol oynamaktadır. Çalışmamızda H-ras proto-oncogenin 1. ekzonun, 27. kodon, 81.nükleotidinde cDNA'da bulunan T→C tek nükleotid polimorfizminin (Single Nükleotid Polimorfizm: SNP) mesane kanserine olan etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Çalışmamızda histolojik tanıları konulmuş 59 mesane kanserli hasta ve 74 sağlıklı gönüllü birey katılmıştır. H-ras proto-oncogeni 81 C→T polimorfizmini saptamak için polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) tekniğine dayalı Restriksiyon Fragmanı Uzunluk Polimorfizmi (Restriction Fragment Length Polymorphism: RFLP) ve agaroz jel yöntemi kullanılmıştır.

TT genotipi mesane kanserli hastalarda (%64.4) kontrollere (%54.1) oranla daha sık gözlenmiştir. Çalışmamızda TT genotipi taşımanın heterozigot TC genotipine [Olasılıklar oranı (OO), 1.531; 95% Güven Aralığı (GA), 0.733-3.198] ve homozigot CC genotipine [OR, 1.583; 95% CI, 0.354-7.87] oranla istatistiksel olarak anlamsız olmakla birlikte mesane kanseri riskini yaklaşık 1.5 kat artırdığı tespit edilmiştir.

Sonuç olarak bulgularımız mesane kanseri ile H-ras TT, TC ve CC varyantları arasında bir ilişki bulunmadığını göstermektedir. Hasta grubu ve kontrol sayısı artırıldığında olasılık oranının pozitif ya da negatif yönde değişmesi olasılığı bulunmaktadır.

**ABSTRACT****81T→C POLYMORPHISM IN THE H-ras PROTO-ONKOGENE IN  
CASES OF URINARY BLADDER CANCER****Sengul BEKAR, M.Sci. Thesis****Ondokuz Mayıs University Samsun, January 2005**

Growth factors, adhesion molecules, antigenic factors, oncogenes (c-erb-B2 (HER-2/neu), H-ras), tumor suppressor genes (p53, Rb, p16, p21) and detoxification enzymes (NAT1, NAT2, GSTM1, CYP1A) take important roles in oncogenesis of bladder cancer. The purpose of this study was to investigate the association of H-ras proto-oncogene single nucleotide polymorphism (SNP) in codon 27 of exon 1 at position 81 with bladder cancer.

We studied 59 patients with histologically verified bladder cancer and 74 healthy volunteers. The H-ras 81 C→T polymorphism was determined by polymerase chain reaction based restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) and agarose gel electrophoreses methods.

The TT genotype occurred more frequently in bladder cancer patients (%64.4) than in controls (%54.1). We found that patients carrying TT allele had a nearly 1.5-fold increased risk for bladder cancer than individuals who are heterozygote for the genotype CT [Odds Ratio (OR), 1.531; 95% Confidence Interval (CI), 0.733-3.198] and homozygote for the genotype CC [OR, 1.583; 95% CI, 0.354-7.87], there was no statistically significant association between the 81C→T polymorphism and urinary bladder cancer.

Consequently, our findings seem to indicate that there is no association between the H-ras polymorphism (TT, TC and CC) and bladder cancer. There is a possibility that the odds ratio could change either positively or negatively if the sizes of the patients and the control groups are increased.

## İÇİNDEKİLER

<b>I. GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
<b>II. GENEL BİLGİLER.....</b>	<b>3</b>
2.1. Mesane Kanseri Epidemiyoloji ve Etiyolojisi.....	3
2.2. Mesane Kanserinin Evrelendirilmesi.....	3
2.3 Mesane Karsinomlarının Üriner Biyolojik Belirteçleri.....	4
2.3.1. BTA Stat ve BTA TRAK.....	4
2.3.2. Nüklear Matriks Proteinleri .....	5
2.3.3. Fibrin-Fibrinojen Yıkım Ürünü (Accu-Dx).....	5
2.3.4. Hyaluronik asit ve Hyaluronidaz.....	6
2.3.5. Telomeraz.....	6
2.3.6. Kuantisit .....	7
2.3.7. İmmunosit .....	7
2.3.8. Flow Sitometri .....	8
2.3.9. Sitokeratin (CK).....	8
2.3.10. FISH.....	8
2.4. Kanseri Tetikleyen Faktörler.....	9
2.4.1. Çevresel Faktörler .....	9
3.4.1.1. Sigara.....	9
3.4.1.2. İşyeri kimyasallar.....	11
3.4.1.3. Şistomiyazis.....	11
3.4.1.4. Kronik Sistit.....	11
3.4.1.5. Siklofosfamid .....	12
3.4.1.6. Işın tedavisi.....	12
2.4.2. Genetik faktörler.....	12
2.4.3. Cinsiyet, etnik farklılıklar ve yaş .....	13
2.4.4. Diğer Faktörler .....	13
2.5. Kanseri İlerleten Faktörler.....	13
2.5.1. EGF ve EGFR.....	14
2.5.2. Ekstraselüler Matriks ve Hücre Adhezyon Molekülleri .....	14

2.5.3. E-Cadherin.....	14
2.5.4. İntegrinler.....	15
2.5.5. Anjiogenez .....	15
2.6. Mesane Kanseri Gelişimi .....	16
2.6.1. Tümör baskılayıcı genler.....	17
2.6.1.1. p53.....	17
2.6.2.2. RB.....	18
2.6.2. Kromozom 9 delesyonları.....	18
2.6.3. Mikrosatellit Kararsızlığı .....	18
2.6.4. Onkogenler.....	19
2.6.4.1. c-erb-B2 (HER-2/neu).....	19
2.6.4.2. H-ras.....	19
2.7. Ras Aktivasyonu .....	20
2.8. İnsan Kanselerinde Ras Mutasyonları.....	21
2.9. Onkogenik Ras Proteinleri .....	23
2.10. Mesane Kanseri Yatkınlık Genleri.....	23
2.11. Mesane Kanserinde Gen Tedavisi.....	24
<b>III. MATERYAL VE METOD.....</b>	<b>26</b>
3.1. DNA İzolasyonu.....	26
3.1.1. SOLÜSYONLAR.....	26
3.1.2. DNA İzolasyon Yöntemi.....	27
3.1.3. DNA Miktarının Tayini.....	29
3.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR).....	29
3.3 c-Ha-ras1 p21 proteini nükleotid dizisi.....	29
3.3.1 Ras Onkogeni 81T→C Bölgesi PCR Koşulları.....	30
3.4 Restriksiyon Fragment Uzunluğu Polimorfizmi (RFLP).....	30
3.5. Agaroz Jel Elektroforezi .....	31
3.5.1. Solüsyonlar .....	32
3.5.2. Jelin Hazırlanışı.....	32
3.5.3. Agaroz Jel Elektroforezi Sonuçlarının Değerlendirilmesi .....	32
3.6. İstatistiksel Değerlendirme.....	32
<b>IV. BULGULAR.....</b>	<b>33</b>



<b>V. TARTIŞMA.....</b>	<b>38</b>
<b>VI. SONUÇ VE ÖNERİLER.....</b>	<b>41</b>
<b>VII. KAYNAKLAR.....</b>	<b>42</b>
<b>VIII. ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>52</b>



## I.GİRİŞ

Mesane kanseri, insanlardaki kanser sıralamasında 6. sırada yer almakta ve kadınlara kıyasla erkeklerde 4 kat daha fazla görülmektedir (Landman ve Droller, 1998).

Mesane kanseri gelişmiş ülkelerde de 6. sırada yer alan kanser olmakla birlikte, görülen kanserlerin çoğu tranzisyonel hücre karsinomudur (Transitional Cell Carcinoma: TCC). Buna karşın Ortadoğu ülkelerinde ise squamoz hücre karsinomu daha fazla görülmektedir (Sanchez-Carbayo, 2003).

Mesane kanseri, her yıl yeni oluşan kanserlerin yaklaşık %4-5'ini oluşturmaktadır. Erkeklerde kanser sıralamasında 4. sırada yer almakta ve görülen tüm kanserlerin %10'unu oluşturmaktadır. Kadınlarda ise kanser sıralamasında 8. sırada yer almakta ve tüm kanserlerin %4'ünü oluşturmaktadır (Sourvinors ve ark., 2001). Mesane kanseri gelişim riski, beyaz erkeklerde %2.8, siyah erkeklerde %0.9, beyaz kadınlarda %1, siyah kadınlarda ise %0.6'dır (Landman ve Droller, 1998).

Mesane kanseri orta ve ileri yaşlarda daha fazla görülmektedir. Erkeklerde 75 yaştan önce görülme oranı %2-3, kadınlarda ise %0.5-1'dir (Sourvinors ve ark., 2001).

Mesane kanserinin oluşumunda çevresel ve genetik faktörler rol almaktadır. Çevresel etkenler arasında mesane kanseri oluşumu açısından sigara önemli yere sahiptir. Amerika'da, sigara kullanımı mesane kanserinin gelişiminde en önemli etkenlerden biri olarak gösterilmektedir. Sigara kullanan 15.000 mesane kanserli olgu olduğu bilinmekte ve bunların 5000'i yaşamını sürdürmektedir (Landman ve Droller, 1998). Sigara ve diğer kimyasallarda bulunan arilamin 4-aminobifenil (arilamin 4-aminobiphenyl: ABP) mesane kanseri oluşumuna neden olmaktadır (Jung ve Messing, 2000).

Mesane kanseri gelişiminde, bazı tümör baskılayıcı genler (p53, Rb, p21,p16), kromozom 9 delesyonları ve bazı onkogenler [c-erb-B2 (HER-2/neu), H-ras] önemli rol oynamaktadır (Jung ve Messing, 2000).

Mesane kanseri yatkınlık genleri; GSTM1(GST1,MU) 1p13.3, SLC2A (GLUT1) 1p3-p31.3, TP73 (p73) 1p36, MUC1 (PUM,PEM) 1q21, RCA1(HRCA1,TRCB) 3p14.2-3p14.2, VEGF (VEGFA) 6p12, CDKN1A (p21,WAF1,CIP1) 6P21.2, NAT2 (AAC2) 8p23.1-p21.3, NAT1 (AAC1) 8p23.1-p21.3, CDKN2A(p16,INK4A,MTS1) 9p21,

DBCCR19q32-q33, FGFR210q26, HRAS11p15.5, CDKN1B (KIP1,p27) 12p13, FLT1 (FLT) 13q12, RB1 (Rb) 13q14.2, TP53 (p53,) 17p13.1, TIMP217q25, CDKN2D (INKD,p19) 19p13 ve CCNE1 (CCNE,Cyclin E) 19q13.1 yer alır (<http://www.cancerindex.org/geneweb/X2103htm>).

Proto-onkogenler, hücre bölünmesini teşvik etmektedir. Bu genler sürekli çalışır hale gelirse kontrolsüz hücre bölünmesi ve tümör oluşumuna neden olurlar. Proto-onkogenlerin onkogene dönüşümü, nokta mutasyonu, translokasyon ve gen amplifikasyonu ile olmaktadır (Jung ve Messing, 2000).

Biz çalışmamızda, H-ras (Harvey rat sarcoma) (11p15.5) proto-onkogeninde, 1. ekzonda kodon 27'de 81 T→C tek nokta polimorfizmini inceleyerek 81 T→C tek nokta polimorfizmi ile mesane kanseri gelişme riski arasındaki ilişkiyi araştırmayı amaçladık.



## II. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Mesane Kanseri Epidemiyoloji ve Etiyolojisi

Mesane kanseri, tüm kanserlerin %6-10'unu oluşturmaktadır (Landman ve Droller, 1998). Erkeklerde kadınlara göre 4 kat daha fazla görülmekle birlikte etiyojide sigara kullanma ve endüstriyel kanserojenler dikkati çekmektedir (Landman ve Droller, 1998).

Mesane kanserli hastaların yaklaşık %20'sinde 5 yılda bir tümör oluşumunun tekrarı görülmekte, tekrar görülen tümörlerin de %30'nun yüksek degree tümörler olduğu ileri sürülmektedir (Irie, 2003). Düşük grade ve stage tümörlerde rekürens riski yüksek grade tümörlerin progresyon ve metastaz potansiyelleri daha fazladır (Dey, 2003).

### 2.2. Mesane Kanserinin Evrelendirilmesi

Mesane kanserlerinde tranzisyonel hücre karsinomu görülme oranı daha fazladır (%80). Squamoz ve adenokarsinoma görülme oranları ise %5 ve %1-2'dir (Young, 1996).

Mesane kanseri sınıflandırılmasında, UICC (International Union Against Cancer)'nın 2002 yılında kabul ettiği, TNM (Tumor, Node, Metastases) sınıflandırılması kullanılmaktadır (Sobin ve Witteking, 2002).

### Primer tümör (T)

**T<sub>x</sub>** = Primer tümörün durumu bilinmiyor

**T<sub>0</sub>** = Primer tümöre ait kanıt yok

**T<sub>is</sub>** = Karsinoma in situ

**T<sub>a</sub>** = Tümör epitel ile sınırlı

**T<sub>1</sub>** = Tümör epitel ve lamina propriayı invaze etmiş

**T<sub>2a</sub>** = Yüzeysel adale tabakasında invazyon

**T<sub>2b</sub>** = Derin adale tabakasında invazyon

**T<sub>3a</sub>** = Perivezikal yağ dokusunda mikroskopik invazyon

**T<sub>3b</sub>** = Perivezikal yağ dokusunda makroskopik invazyon

**T<sub>4a</sub>** = Komşu organlar (vajen, uterus veya prostat) invaze

**T4b** = Pelvik duvar veya abdominal duvar invaze

**Lenf nodu (N)**

**N<sub>x</sub>** = Lenf nodlarının durumu bilinmiyor

**N<sub>0</sub>** = Lenf nodlarında metastaz yok

**N<sub>1</sub>** = Tek bir lenf nodunda  $\leq 2$  cm çapında metastaz

**N<sub>2</sub>** = Tek bir lenf nodunda 2-5 cm çaplı veya çok sayıdaki lenf nodunda  $< 5$  cm çaplı metastazlar

**N<sub>3</sub>** = Lenf nodunda  $> 5$  cm çaplı metastaz

**Uzak metastaz (M)**

**M<sub>x</sub>** = Uzak metastazların durumu bilinmiyor

**M<sub>0</sub>** = Uzak metastaz yok

**M<sub>1</sub>** = Uzak metastaz var

**2.3 Mesane Karsinomlarının Üriner Biyolojik Belirteçleri:**

Mesane tümör Antijen Testi: Mesane tümör antijen testi üç ayrı testi içerir; orijinal mesane tümör testi, mesane tümör antijen Stat testi (Bladder Tumor Antigen Stat Test: BTA Stat) ve mesane tümör antijen Trak testi (Bladder Tumor Antigen TRAK Test: BTA TRAK) testi. Orijinal BTA testi idrarda temel membran antijeninin kalitatif tanımlanmasını sağlayan testtir (Ianari, 1997). İnvaziv karsinomun tümör hücrelerince üretilen ptoteazlar tarafından bazal membran parçalanmaktadır. Bazal membran fragmanları idrarda bulunan belirli polipeptidlerdir. Orijinal BTA testinin üriner sitolojiden daha duyarlı olduğu bildirilmiştir (Ianari, 1997). Bu testin duyarlılığının üriner infeksiyonu olanlarda azaldığı bildirilmiştir (Landman ve Droller, 1998; Johnston, 1997).

**2.31. BTA Stat ve BTA TRAK:**

BTA stat ve BTA TRAK testlerinde, mesane membranı tarafından mesane kanserine karşı salınan H faktör ölçülmektedir. BTA stat, testinin duyarlılığı farklı grade tümörlerde %57-83 arasında bildirilmektedir. Bu testin özgüllüğü ise %68-72 arasında değişmektedir (Thomas, 1999). BTA TRAK testinin duyarlılığının %62-77, özgüllüğünün ise %50-75 olduğu birçok çalışmada bildirilmiştir (Thomas, 1999; Heicappell, 1999; Ellis, 1997).

Mesane kanserinde BTA stat testinin, sistoskopi ile birlikte ek test olarak kullanılmasını Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi (American Food and Drug Administration: FDA) onaylamıştır (Dey, 2003).

### 2.3.2. Nükleer Matriks Proteinleri

Nükleer matriks proteinleri (Nuclear Matrix Proteins: NMP), hücre çekirdeği iskeletinin parçalarıdır (Berezney, 1974). Bu non-kromatin yapı, çekirdek şeklini destekler, DNA'yı organize eder, DNA replikasyonu, transkripsiyonu ve gen ekspresyonunda rol oynar (Pardoll, 1980; Gordon, 1993). NMP-22 hücre replikasyonu sırasında kromatinin yavru hücrelere eşit dağılımında görevli olan nükleer mitotik araçtır (Yang, 1992). Bu protein mitoz sırasında mitotik iğ ipliklerine bağlı bulunmaktadır. NMP-22 interfaz nükleer matriksinde oldukça düşük seviyede bulunmaktadır. NMP-22'nin, apoptozis sırasında tümör hücrelerinin çekirdeğinden salındığı düşünülmektedir. NMP-22 konsantrasyonu, mesane kanserinde normal mesaneden izole edilen ortalama düzeyden 25 kat daha fazladır (Keese SK., 1996). NMP-22 testinin duyarlılığı %68.5-88.5 ve özgüllüğü de %65.2-91.3 oranında değişmektedir (Landman ve ark., 1998; Poulakis, 2001; Eissa - Friedrich, 2002; Ponsky, 2001; Ramakumar, 1999).

Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi, mesane kanserinin ailesel öyküsü olması durumunda NMP-22 testinin tanı testi olarak kullanılmasını onaylamıştır (Dey, 2003).

### 2.3.3. Fibrin-Fibrinojen Yıkım Ürünü (Accu-Dx):

Mesane kanseri hücreleri, plazminojen, fibrinojen ve pıhtı faktörleri gibi plazma proteinlerinin sentezlenmesiyle mikrovasküler sistemde permeabilityyi artıran vasküler endotelyal büyüme faktörü üretirler. Pıhtılaşma faktörleri hızlı bir şekilde fibrinojeni fibrine, plazminojeni plazmine dönüştürür. Fibrin daha sonra plazmin tarafından fibrin yıkım ürüne dönüştürülür (Fibrin degradation product: FDP) (Tsihlias, 2000).

Accu-Dx, fibrin-fibrinojen yıkım ürünü belirleyen bir immün assay testtir. Accu-Dx, mesane kanserini belirlemede %68.2 spesifiteye sahiptir. Accu-Dx testi hematüri hastalarında fibrinojeni tanımlayarak yanlış pozitif sonuç gösterebilir (Dey, 2003).

#### 2.3.4. Hyaluronik asit ve Hyaluronidaz:

Hyaluronik asit (HA), normal doku ve doku sıvısında bulunan sülfatlanmamış bir glikozaminoglikandır. HA konsantrasyonu, mesane, kolon, akciğer kanseri gibi bazı kanserlerde yükselmektedir (Pham, 1997; Kundson, 1989; Auvinen, 1997). HA su ile birleşip şişerek tümör hücrelerinin göçü için yer açar (Kundson, 1989). HA özel hücre yüzey reseptörü etkileşimi sayesinde tümör hücre göçünü artırır (Peach, 1993). Ayrıca HA, tümör hücrelerinin etrafında koruyucu tabaka oluşturarak bağışıklık sisteminden kurtulmaları için yardımcı olur (Hobarth, 1992). Hyaluronidaz (HAaz), HA'yı küçük parçalara ayıran bir enzimdir. HAaz mesane kanserli hastaların idrarında belirlenmiştir (Pham, 1997). HA testi, tümör derecelerine göre bir farklılık göstermeksizin mesane kanserinin belirlenmesinde %83 duyarlılık, %90 özgüllük göstermektedir (Lokeshwar, 2000). HAaz testi de %82.5 duyarlılık, %83.8 özgüllük göstermektedir (Lokeshwar, 2000). HA ve HAaz testlerinin duyarlılığı, üriner endojen HA, HAaz seviyesi arasındaki kritik dengeye bağlıdır. HA testi mesane kanserini, HAaz testi de onun derecesini belirler. Yüksek HA'ya sahip hastalarda yanlış negatif sonuç verebilir. HA ve HAaz testlerinin kombine kullanımı, HA ve HAaz testlerinin tek tek kullanımına nazaran tümörlerinin tüm derece ve fazlarında daha anlamlıdır (Lokeshwar, 2000).

#### 2.3.5. Telomeraz:

Telomerazlar, ökaryot kromozomlarında DNA replikasyonunun her siklusundan sonra, kopye edilmeyen nükleotid dizisidir (Holt, 1996). Kromozomların sonunda bulunan bu özelleşmiş yapılar her bir döngüde ardışık kısalarak hücre ölümüne yol açarlar. Telomeraz, telomerlerin uzunluğunun korunmasına yardım eden bir ribonükleoprotein polimerazdır. Telomeraz germ hücrelerinde ve çeşitli tümör hücrelerinde bulunmaktadır. Yetişkin somatik dokularında inaktiftirler. İdrarda bulunan, hücrelerdeki telomeraz aktivitesinin ölçümü mesane kanserinin belirlenmesinde yardımcı olabilecek bir belirteç olarak düşünülmektedir (Dey, 2003).

Telomeraz aktivitesinin standart ölçüm tekniği telomerik tekrar aksiyon protokolü (Telomeric repeat action protocol-TRAP) formundaki polimeraz zincir reaksiyonudur (Polymerase chain reaction: PCR). Mesane kanserinin belirlenmesinde telomerazın tüm duyarlılığı %70-86 ve özgüllüğü %60-90 arasındadır (Landman, 1998; Ramakumar, 1999; Kavalier, 1998; Yokota, 1998; Myfield, 1998). Telomeraz

aktivitesinin belirlenmesinde çeşitli zorluklar bulunmaktadır. Bu teknik idrarın acil işlem görmesini gerektirir. Taq polimeraz inhibitörleri ya da ribonükleazlar ile kontamine edilmiş idrar örnekleri bu belirlemeyi etkileyebilir ve yanlış negatif sonuçlara yol açabilir (Liu, 2000). Kronik ve şiddetli ateşli hastalıklarda da yanlış pozitif sonuçlara yol açabilir (Myfield, 1998). Bu yanlış bulgular, aktive olmuş lenfositler gibi proliferatif hücrelerde, telomeraz aktivitesinin artmasından kaynaklanabilir (Greider, 1996; Ito, 1998).

### **2.3.6. Kuantisit :**

Kuantisit sistem, mesane kanserinin bireysel riskini belirlemek için, DNA nükleus içeriğini ve ışık mikroskobu görüntüsünün morfometrik analizini kullanır (Van Der Poel, 1996). Preparatlar, Feulgen Schiff metoduna göre boyanır. Bu test bir laboratuvar testidir. Mesane kanserlerinde duyarlılığı %59-69, özgüllüğü ise %70'tir (Van Der Poel, 1996). Bu testte karşılaşılan çeşitli sorunlar mevcuttur. Bu test daha fazla sayıda hücre elde edilmesi için mesanenin yıkanmasını, teknik deneyim ve pahalı görüntü analiz sistemi gerektirir. Bu teknik şu anda rutin test olarak kullanılmamaktadır (Van Der Poel, 1996).

### **2.3.7. İmmunosit :**

İmmunosit testi, immunoflorasan testi ile sitolojinin kombinasyonudur. Bu test, üç florasan monoklonal antikor kullanılarak mesane kanseri için spesifik belirteçleri belirler (Fradet ve ark., 1997). Teksas kırmızısı ile boyalı 19A21 antikoruna yüksek moleküler ağırlığa sahip karsinogenik embriyonik antijeni tanır (Fradet ve ark., 1990). Florasan işaretli MO344 ve LDQ10 monoklonal antikorlar mesane kanserli hücreler tarafından fakat normal hücreler tarafından salgılanmayan maddeleri tanımlar. İmmunosit testinin mesane kanserini belirlemedeki duyarlılığı %86, özgüllüğü %79.4'dür (Mian ve ark., 1999; Pfister ve ark., 2003). Bu testin uygulanabilirliği, deneyimli teknisyen ve laboratuvarları gerektirir. Ayrıca FDA tarafından onaylanması da beklenmektedir (Sanchez-Carbayo, 2000).



### 2.3.8. Flow Sitometri

DNA flow sitometri ile (DNA flow cytometry: DNA FCM), yıkanmış mesane preparatlarında, kısa sürede çok sayıda DNA içeriği analiz edilir (Kumar ve ark., 2001). Sitokiyometrik DNA boyası ile boyanmış hücre çekirdeği lazerden geçirilir ve floresan ışımalar kaydedilir. Floresan ışımaya çekirdekteki DNA miktarı ile oranlanır. Bu şekilde en son yapılan histogram 10.000 hücre içermektedir. Sağlıklı insan periferik kan lenfositleri, diploid kontrol olarak kullanılmalıdır. DNA FCM'nin duyarlılığı %45-%95 özgüllüğü de %83-%100'dür (Kumar ve ark., 2001; Planz ve ark., 2000; Badalement ve ark., 2000; Gregorie ve ark., 1997). Flow sitometrinin sitoloji ile kombinasyonu duyarlılık ve özgüllüğünü arttırmaktadır (Kumar ve ark., 2001). DNA FCM maliyetli yüksek bir tekniktir, laboratuarda yaygın olarak kullanılmamaktadır (Sanchez-Carbayo, 2000).

### 2.3.9. Sitokeratin (CK)

Her epitel çeşidi için farklı bir sitokeratin şekli mevcuttur. Sitokeratinlerin bu farklı durumları metastaz ve malignansi işlemi sırasında oluşur. İdrardaki CK seviyesinin ölçümü mesane kanserinin taranmasında yardımcı olabilmektedir. Sitokeratin-20 (CK-20) normal ürotelyal hücrelerde görülmezken, ürotelyal karsinomlarda belirlenmiştir (Moll ve ark., 1992). Pek çok çalışmada idrarda CK-20'nin mesane kanserli hastalarda önemli derecede arttığı görülmüştür ve duyarlılığı %91 özgüllüğü de %67-100'dür (Buchumensky ve ark., 1998; Klein ve ark., 1998). Sanchez-Carbayo ve arkadaşları CK18'in ölçümünün mesane kanserlerinin belirlenmesinde yararlı olabileceğini bildirmişlerdir. CK18'in duyarlılığı %66.2 özgüllüğü ise %88.4'tür (Sanchez –Carbayo ve ark., 2000).

### 2.3.10. Floresans in situ Hibridizasyon (FISH) Tekniği:

Bu teknik mesane karsinomunun taramasında potansiyel teşhis tekniğidir. Kromozom 9'daki kayıplar mesane karsinomunun genetik değişiminde çok yaygındır. Sitogenetik çalışmalarda kromozom 1, 7, 11, 17 ve diğerlerinde sıklıkla değişimler gösterilmiştir (Sandberg ve Berger, 1997). İnterfaz FISH tekniğinde yapısal anomalili hücreleri belirlemek için işaretli DNA problemleri kullanılır. Bu tekniğin duyarlılığı %81 özgüllüğü ise %98'dir (Halling ve ark., 2000). FISH, biyopside herhangi bir ürotelyal

karsinom bulgusu bulunmadan önce idrar ya da mesane duvarından alınan örneklerle, tümör tekrarını belirleme yeteneğine sahip bir tekniktir.

## **2.4. Kanseri Tetikleyen Faktörler**

Kanserin tetiklenmesinde etkili çevresel ve genetik faktörler bulunmaktadır.

### **2.4.1. Çevresel Faktörler**

- 3.4.1.1. Sigara
- 3.4.1.2. İşyeri kimyasallar
- 3.4.1.3. Şistomiyazis
- 3.4.1.4. Kronik mesane iltihabı
- 3.4.1.5. Siklofamid
- 3.4.1.6. Işın tedavisi

### **2.4.2. Genetik faktörler**

### **2.4.3. Cinsiyet, etnik farklılıklar ve yaş (Jung ve Messing, 2000).**

#### **2.4.1. Çevresel Faktörler:**

Mesane kanseri oluşumunda çevresel karsinojenler önemli rol oynamaktadır (Jung ve Messing, 2000).

Mesane kanseri oluşumunda görülen cinsiyet ve ırk farklılıkları, genetik etkiyi akla getirmektedir. Aynı ırklarda görülen farklılıklar ise çevresel etkenleri düşündürmektedir (Landman ve Droller, 1998).

#### **2.4.1.1. Sigara kullanımı :**

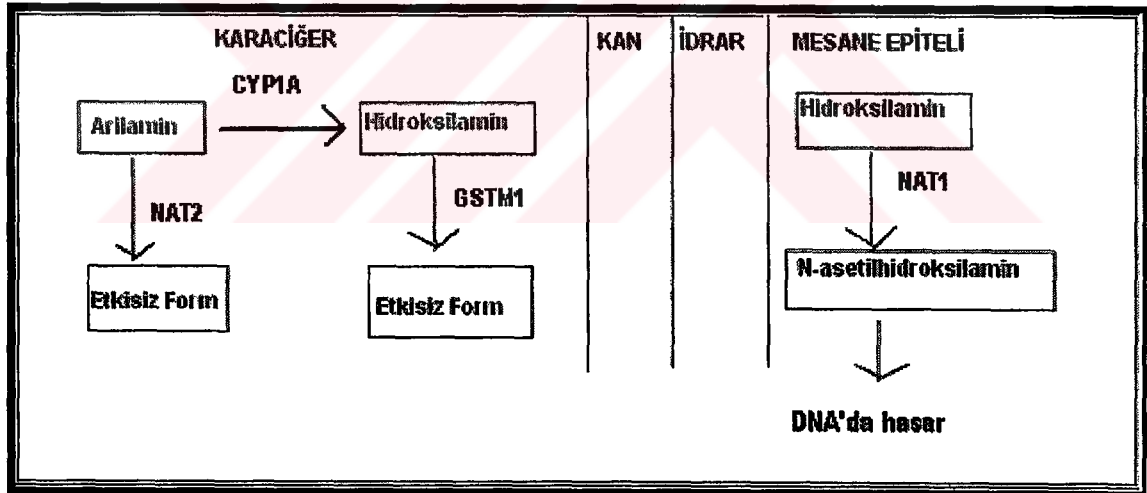
Sigara kullanımı ile mesane kanseri oluşumu arasında güçlü bir ilişkinin varlığı 30'dan fazla olgu-kontrol çalışmasında gösterilmiştir. Filtresiz sigara kullanımı bu hastalığın riskini %50 artırır. Filtrenin, karsinojenlerin etkisini azalttığı düşünülmektedir (Landman ve Droller, 1998).

Sigara kullanımının bırakıldığı ilk 4 yıl boyunca mesane kanseri riskinde %30-60 oranında azalma beklendiği bildirilmiştir (Hartge ve ark.,1987).

İtalya, Fransa, Arjantin ve Uruguay'da yapılan 5 olgu-kontrol çalışmasında siyah tütün içenlerde, sarı tütün içenlerden 2-3 misli fazla oranda TCC riski olduğu bildirilmiştir (De Stefani ve ark., 1993). Siyah tütün içimi, sarı tütünden daha fazla

üriner mutejenite ile ilişkilidir (Mohtashamipur ve ark., 1987). Sigara kullanımı ile mesane kanseri oluşum mekanizmasının, polisiklik aromatik hidrokarbonlar, aromatik aminler ve doymamış aldehitler gibi sigarada bulunan pek çok kimyasalla ilgili olduğu düşünülmektedir. Bunlar arasında özellikle aromatik aminlerden, arilamin 4-aminobiphenil (ABP) ve o-toluidine'nin mesane kanseri oluşumuyla ilişkisinin daha fazla olduğu görülmüştür (Landman ve Droller, 1998). .

Sigarada ve endüstriyel bazı kimyasallarda bulunan arilaminlerden, arilamin 4-aminobifenil (arilamin 4-aminobiphenyl: ABP) pek çok araştırmacı tarafından çalışılmıştır (Şekil 1). DNA hasarı (DNA addukt: kimyasal karsinojenlerle DNA'nın kovalent modifikasyonu) oluşumu, sitokrom p450 1A2 (CYP1A2), N-asetiltransferaz (N-acetyltransferase 2: NAT 2) ve glutatyon S-transferaz M1 (GSTM1) gibi karaciğer enzimleri tarafından etkilenmektedir. Ayrıca sigara kullanan bireylerde yavaş NAT2/hızlı CYP1A2 fenotipleri olanlara oranla hızlı NAT2/yavaş CYP1A2 fenotiplerinde mesane kanserine yakalanma riski daha fazla görülmektedir (Hein ve ark.,1995).



**Şekil 1.** Mesane kanserinde arilamin metabolizması (Jung ve Meissing., 2000)

Arilamin N-asetiltransferaz 1 (NAT1) genindeki 3\*, 4\*, 10\*, 11\*, 14\*, 15\*, 17\* ve 22\* NAT1 haplotiplerinin mesane kanserindeki rolü tartışmalıdır. NAT1 üretelyumda eksprese edilir. NAT1 geni polimorfizmi mesane kanserini sigara, çalışma ortamı gibi çevresel faktörler ve NAT2 geni ile birlikte etkiler. Bu çalışmada 3\*, 4\*, 10\*, 11\*, 14\*, 15\*, 17\* ve 22\* NAT1 haplotip frekansı 425 Alman mesane kanserli

hasta ve 343 kontrol çalışılarak PCR-RFLP ile analiz edilmiştir. Sonuç olarak, NAT\*10 allelik frekansının mesane kanserli hastalarda %15.1 daha az olduğu görülmüştür (Cascorbi ve ark., 2001).

Bazı çalışmalarda da NAT1\*10 genotipinin mesane kanserli hastalarda daha fazla ifade edildiği bildirilmektedir (Bell ve ark., 1993; Taylor ve ark., 1998). Ayrıca DNA hasarı sayısının artmasına neden olur (Badawi ve ark., 1997). Buna karşın, şimdiye kadar yayınlanmış olan sonuçlar bu bilgilerle uyumsuzdur (Okkels ve ark., 1997).

Düşük NAT2 aktivitesi olan bireylerin özellikle bir takım kimyasallara maruz kalması ve sigara kullanması durumunda mesane kanserine yakalanma riski artar. 2000 Avrupalı hasta ve 2500 kontrol kullanılarak yapılan çalışmada NAT2 yavaş asetilörlerle mesane kanseri riski arasında istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar bildirilmiştir (OR,1.4; %95 CI, 1.2-1.6) (Marcus ve ark., 2000).

#### **2.4.1.2. İşyeri Kimyasalları:**

Mesane kanseri olgularının boya (Jung ve Messing, 2000), lastik, tekstil (Taylor ve ark., 1998) ürünlerinin üretiminde çalışan bireylerde görülme sıklığı %20'dir (Badawi ve ark., 1997).

#### **2.4.1.3. Şistozomiyazis:**

Batı ülkelerinde ender görülen şistozomiyazis diğer ülkelerde daha sık görülmekte ve mesane kanseri oluşumuna neden olmaktadır. *Schistosoma haematobium cystitis*, hem squamoz hem de TCC'li mesane kanseri oluşumlarında görülmektedir. Şistozomiyazisin mesane kanseri oluşturma mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte, bu ilişkisinin nitrit ve N-nitrozo (NNC) bileşiklerinden kaynaklandığı düşünülmektedir (Badawi ve ark., 1997). NNC'ler nitrozaminler içermektedir. Bu bileşikler belirli DNA dizilerini alkilleyerek tümör oluşumuna neden olurlar (Jung ve Messing, 2000).

#### **2.4.1.4. Kronik Sistit:**

Kronik sistit, mesane kanseri squamoz hücre karsinomu oluşumunda büyük risk oluşturmaktadır (Stonehill ve ark., 1996). Karsinogenezin mekanizması tam

bilinmemekle birlikte, tekrar eden kronik irritasyonla, metaplazi, displazi ve son olarak karsinoma gelişmektedir. Bu durumun da yine yükselen NNC'lerden kaynaklandığı düşünülmektedir (Tamir ve ark., 1996). NNC'ler DNA dizilerini alkilemeleri nedeniyle karsinogeniktirler (Jung ve Messing, 2000).

#### **2.4.1.5. Siklofosfamid:**

Siklofosfamid alan hastalarda mesane kanseri görülme riski 9 kat fazladır (Tutle ve ark., 1998). TCC'li hastaların çoğu hastalık sürecinde hızlıca gelişip yüksek evreli hale gelmekte ve kasa invaze olmaktadır (Fernandes ve ark., 1996). Artan bu riskin de siklofosfamidin kumulatif dozundan kaynaklandığı düşünülmektedir (50 g'dan fazla) (Travis ve ark., 1995). Siklofosfamid kaynaklı 19 hastada yapılan çalışmada 9 (%43) hastada p53 mutasyonu saptanmıştır (Khan ve ark., 1998).

#### **2.4.1.6. Işın Tedavisi:**

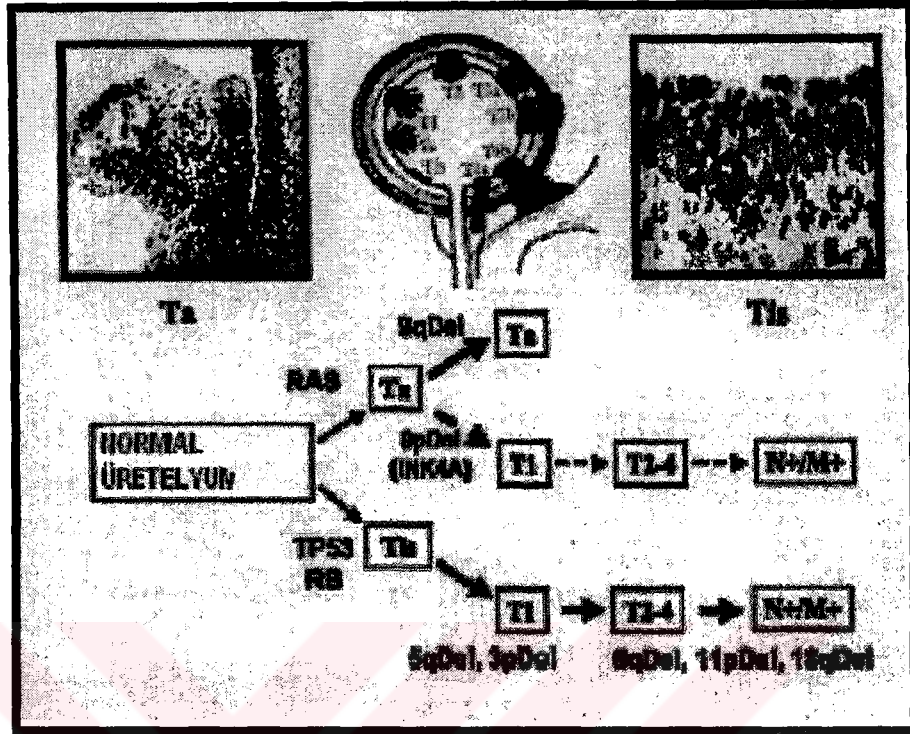
Pelvis ve ovaryum, servikal ve prostat kanserlerinde uygulanan radyasyon tedavilerinin mesane kanseri oluşumunda yüksek risk teşkil ettiği bilinmektedir. Mesane kanseri oluşumu radyasyon tedavisinden yaklaşık 5-10 yıl sonra meydana gelmektedir. Radyasyonun mesane kanserine yol açmasının serbest radikallerle ilgili olduğu düşünülmekte ve bunların doğrudan DNA mutasyonlarına neden olduğu bilinmektedir (Jung ve Messing., 2000).

#### **2.4.2. Genetik Faktörler:**

Newyork'ta yaşayanlar ve Utah'ta yaşayanlarla yapılan çalışmada, mesane kanserli birinci dereceden akrabalar arasında mesane kanserine yakalanma riskini 1.9 ve 1.5 gibi yüksek oranlarda bulmuşlardır (Jung and Meissing, 2000). Kiemeney ve arkadaşları ise (Kiemeney ve ark., 1997) İzlandalılarla yaptıkları çalışmada birinci dereceden akrabalar arasında benzer bir risk bulunmasına karşın ikinci-üçüncü dereceden akrabalar arasında böyle bir risk bulamamışlardır.

Yüzeyel tümörlerin invaziv hale dönüşmesi kromozom 9 ve 17'deki çok sayıdaki genetik değişikliklerle olmaktadır. Yüzeyel tümörler (Ta) genellikle kromozom 9'daki delesyonlarla olmaktadır. Diğer bozukluklar daha yüksek derece ve evreli tümörlerde görülür (Olumi ve ark., 1990).

Mesane kanserinin oluşumunda çeşitli genetik faktörler etkilidir (Şekil 2)



Şekil 2. Mesane kanserinde görülen genetik değişiklikler (Sanchez-Carbayo, 2004).

#### 2.4.3. Cinsiyet, Irk ve Yaş:

Mesane kanseri, erkeklerde 4 kat daha fazla oranda görülmektedir. Bunun sebepleri sigara kullanımı ve mesleki kimyasallara maruz kalmanın erkeklerde daha fazla olmasıdır. Diğer bir etken ise CYP1A2 aktivitesinin erkek ve bayanlarda farklı olmasıdır. CYP1A2 aktivitesinin progesteron hormonu tarafından tetiklendiği düşünülmektedir (Landman ve ark., 1998).

#### 2.4.4. Diğer Faktörler:

Mesane kanseri riskini artıran diğer faktörler; analjezikler, kahve ve suni tatlandırıcılardır. Mesane kanseri olgularıyla yapılan bir çalışmada kahve ve suni tatlandırıcı kullanımı tümör evre ve dereceleri stageleri arasında bir bağlantı bulunamamıştır (Sturgeon ve ark., 1994).

#### 2.5. Kanseri İlerleten Faktörler

Kanserin tetiklenmesinde rol alan etkenler kadar ilerlemesinde de etkili olan bir takım faktörler bulunmaktadır.

### **2.5.1. Epidermal Büyüme Faktörleri (Epidermal Growth Factor : EGF) ve Epidermal Büyüme Faktör Reseptörleri (Epidermal Growth Factor Receptor : EGFR)**

Büyüme faktörü reseptörlerinin anormal fonksiyonu ya da ekspresyonu malignant hücrelerin çoğalma kapasitesini artırabilir. EGF'nin idrarda yüksek konsantrasyonda bulunması potansiyel mitojenitenin göstergesi olmasına rağmen yapılan çalışmalarda mesane kanserli hastaların idrarında EGF'nin düşük konsantrasyonda olduğu bulunmuştur. EGFR ekspresyonu immunohistokimyasal olarak grade ve stage artışı ve zayıf prognoz ile ilişkili bulunmuştur (Messing, 1990). Ayrıca TCC'li hastalarda normal görünümlü üreteriyumda anormal EGFR ekspresyonu görülmüştür (Rao ve ark., 1993). Bu durum üreteriyumda bir bozukluğun olduğunu desteklemektedir (Theodorescu ve ark., 1998). Ayrıca gerçekleşen anormal EGFR ekspresyonu mesane kanseri tümörögenезisi başlangıcında oluşan olaylardandır. Malign üreteriyumda EGFR'lerin uyarılması transepitelyal motilite, tümör invazyonu ve proliferasyonu teşvik eder (Messing, 1990).

### **2.5.2. Ekstraselüler Matriks ve Hücre Adhezyon Molekülleri :**

Ekstraselüler matriks ve hücre adhezyon moleküllerinin tümör metastazlarında doğal bariyer görevi görmeleri sebebiyle pek çok araştırmacı tarafından çalışılmıştır. Hücre adhezyon molekülleri ve ekstraselüler matriksin diğer bileşenleri üreteriyal hücrelere, birbirlerine ve bazal laminaya bağlanırlar. Bu bağlanma, benzer yapıların bir araya toplanmasını ve lokal motiliteyi sağlar. Buna ek olarak, bu moleküller hücreler arası iletişim sağlar ve bunlar membrana bağlı büyüme faktörü reseptörlerinin ifade ve işlevinin regülasyonunu sağlar, ekspresyonu etkiler, hücre döngüsünü düzenleyen molekülleri ve üreteriyal karsinogenezle ilgili diğer ürünleri aktive eder (Jung ve Messing, 2000).

### **2.5.3. E-Cadherin:**

E-Cadherin, normal epitel hücrelerinde, bütünlüğü korumada yardımcı olan, hücrelerin birbirine yapışmasını sağlayan moleküldür.

E-Cadherin'in ekspresyonunun azalması, tümör tekrarının artması ve invaziteyle ilişkili bulunmuştur (Lipponen ve Eskelinen, 1995). Cadherin bağlı moleküllerin

E-Cadherin'in ekspresyonunun azalması, tümör tekrarının artması ve invaziteyle ilişkili bulunmuştur (Lipponen ve Eskelinen,1995). Cadherin bağlı moleküllerin yokluğunun (alfa, beta ve gamma cateninler) tümör grade ve stage ilerlemesinde etkili olduğu görülmüştür. Bunun yanı sıra, cadherin-cadherin kompleksinde çoklu anomalilerin varlığı tümör evre ve derecelerinin ilerlemesine ve mesane kanserli hastaların prognozunun kötü olmasında etkilidir (Shimazui ve ark., 1996).

Mesane kanserli hücrelerde E-Cadherin aktivitesinin azalmasının olası mekanizması araştırılmıştır. Bu mekanizmalar arasında E-cadherin geninde baskılama ya da mutasyon meydana gelerek, 16q'nun allelik kaybı, azalan E-Cadherin protein ekspresyonuna neden olur. E-Cadherin ekspresyonunun hangi mekanizma ile azaldığı hala tam olarak bilinmemektedir (Jung and Messing, 2000).

#### **2.5.4. İntegrinler:**

İntegrinler, transmembran heterodimerik protein familyasıdır. Bunlar (laminin, fibronektin ve kollagen gibi) birbirlerine ve ekstraselular matriks bileşenlerine reseptör olarak bağlanır. İntegrin normalde kollagen VI ile ilişkilidir. Alfa 6-beta- 4, üreteryum bazal membranında hemidesmozomal bağlanma kompleksi formu ve hücre göçünde bariyer görevi yapar. Mesane kanserli hücrelerde alfa 6-beta- 4 integrinin collagen VII ile ilişkisi malignite ile oluşan üreteryal bariyer fonksiyon bozukluklarını açıklayabilir . Bu olaylar özellikle integrinlerin yapı ve fonksiyonunda sorun olduğu durumlarda, ayrıca angiogenik, mitojenik ya da mutajenik özellikler mesane duvarında olağan dışı olayların oluşmasına neden olmaktadır (Liebert ve ark., 1994).

#### **2.5.5. Anjiogenez:**

Tümör gelişimi ve metastazı için nonvaskülarizasyon ve anjiogenez (angiogeneziz) gereklidir. Anjiogenez vasküler endotelyal büyüme faktörü (Vascular Endothelial Growth Factor: VEGF) ya da temel büyüme faktörü (Basic Fibroblast Growth Factor: b-FGF) ile gerçekleştirilebilir. Bu faktörler tümör hücreleri tarafından ya da tümör ilişkili stromal hücrelerden, ekstraselular matriks ya da infiltrat tümörlerin inflamatuvar hücreleri tarafından üretilir. İmmünohistokimyasal yöntemler kullanılarak, artan mikrovasküler yoğunluğunun tümör gelişimi ve mesane kanserli hastaların yaşam süresinin azalmasıyla ilişkili olduğu bulunmuştur (Bochner ve ark.,



1995). Bununla birlikte, b-FGF'nin idrarda artışı, otokrin motilite faktör (Autocrine motility factor: AMF) gibi angiogenik faktör (Guirquis ve ark., 1998), AMF reseptörü (Korman ve ark., 1996), hyalürik asit ve ürünleri tümör görüntülenmesinde mesane kanserli hastalarda görülmektedir. Trombospondin-1 (Thrombospondin-1) ekstraselüler matriks glikoproteinidir ve bu proteinin az ifadesinin mesane kanserli hastalarda, mesanede tekrarlayan tümörlerle ilişkili olduğu bulunmuştur (Grosfield ve ark., 1997).

## 2.6. Mesane Kanseri Gelişimi

Mesane kanseri gelişiminde çeşitli etkenler rol almaktadır (Şekil 3).

### 2.6.1. Tümör baskılayıcı genler:

2.6.1.1. p53

2.6.2.2. RB

2.6.2.3. p21, p16

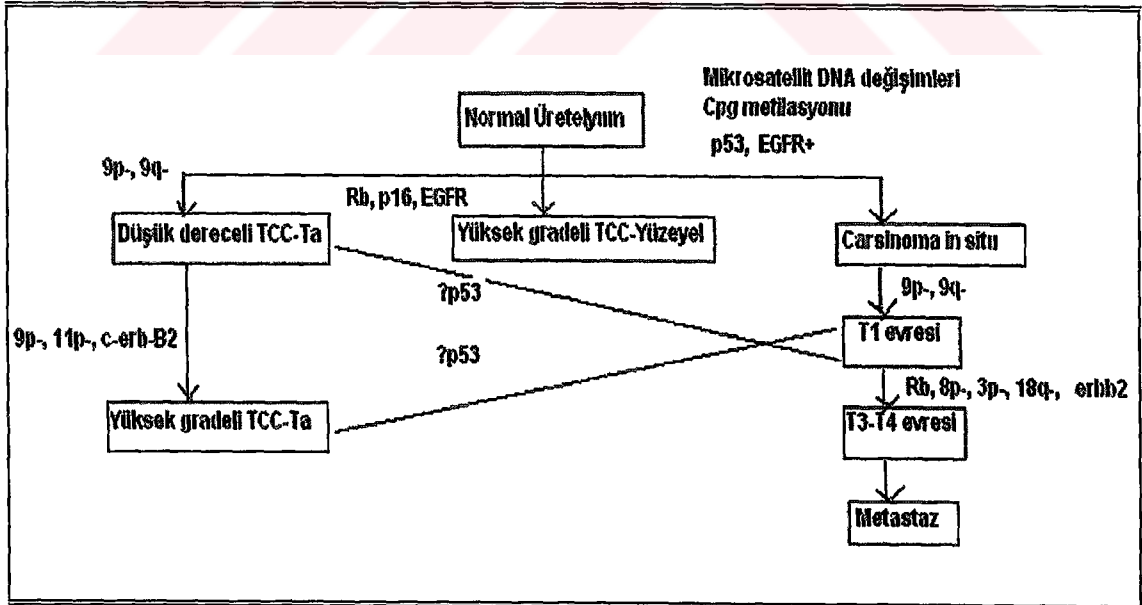
### 2.6.2. Kromozom 9 delesyonları

### 2.6.3. Mikrosatellit Kararsızlığı

### 2.6.4. Onkogenler:

2.6.4.1. c-erb-B2 (HER-2/neu),

2.6.4.2. H-ras



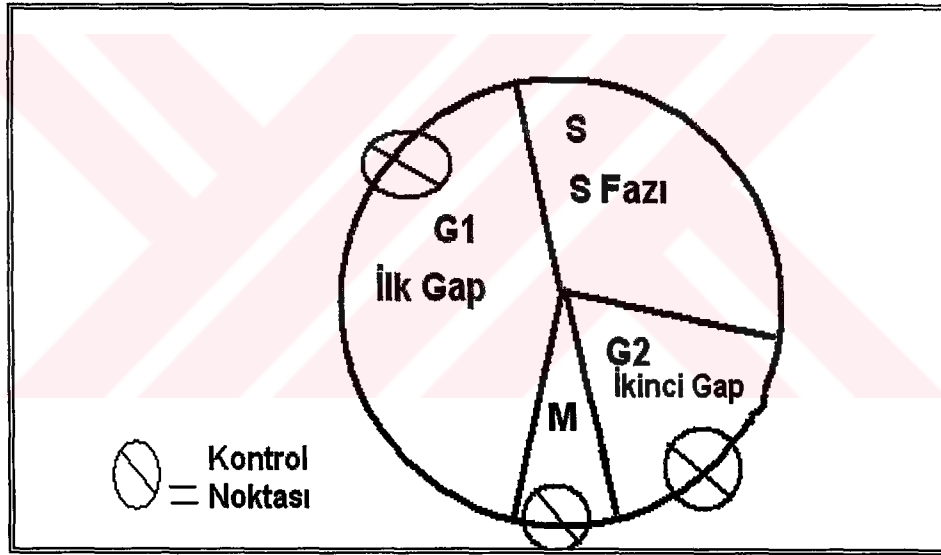
Şekil 3. Mesane kanseri oluşum mekanizmaları (Jung ve Meising , 2000).

### 2.6.1. Tümör Baskılayıcı Genler

Tümör baskılayıcı genler, hücre bölünmesini baskılayan bir grup gendir. Normal aleller tümör gelişimini baskılar. Her iki alelde işlev kaybı, kontrolsüz hücre bölünmesine ve tümör oluşumuna neden olur (Jung and Meising , 2000).

#### 2.6.1.1. p53 Geni (17p13.1):

p53 geni, transkripsiyon faktörü görevi gören 53kDa proteinini kodlar. P53 geninin görevi, G1 fazından S fazına geçişi kontrol etmektir (Şekil 4). Normal p53 gen ürünü varken G1/M kontrol noktasında apoptozis meydana gelir. Mutasyonlu p53 gen ürünü varken, hücre kontrol noktasını geçer ve kontrolsüz hücre bölünmesi gerçekleşir (Jung and Meising , 2000).



Şekil 4. Hücre siklusu ([http://www.cofc.edu/poolel/cell\\_cycle.jpg](http://www.cofc.edu/poolel/cell_cycle.jpg) )

Mutasyonlu p53 kanserle yakından ilişkili olmasına rağmen, mesane kanseri ile ilgili rolü tartışmalıdır. Sarkis ve arkadaşları, mutasyonlu p53'ün yaşam için prognostik belirteç olduğunu ve invaziv mesane tümörlü neoadjuvanlı, M-VAC'lı başarısız terapilerde bir indikatör olduğunu göstermiştir (Sarkis ve ark.1995).

Bunun aksine Cote ve arkadaşları, lokal ve bölgesel geniş TCC'li hastaların anormal p53 ekspresyonu için, sisplatinli adjuvan kemoterapisinden faydalanmakta olduklarını göstermiştir (Cote ve ark., 1997).

Bunun aksine Cote ve arkadaşları, lokal ve bölgesel geniş TCC'li hastaların anormal p53 ekspresyonu için, sisplatinli adjuvan kemoterapisinden faydalanmakta olduklarını göstermiştir (Cote ve ark., 1997).

Kasa invaze TCC'lerin %50'sinde mutant p53 proteinin aşırı ekspresyonu görülmüştür (Habuchi ve ark., 1992). Mutant p53'ün varlığı, kasa invaze TCC'lerde ölüm riskini iki kat arttırdığı bulunmuştur (Esrig ve ark., 1994).

Yüzeyel tümörlerde (T1), P53 mutasyonun az oranda görülmesine rağmen, hastalığın gelişiminde daha yüksek oranda rol aldığı tespit edilmiştir. P53 proteini, hücre döngüsünü durdurabilir ve apoptozisi başlatır (Jung and Meising , 2000).

#### **2.6.1.2. (Retinoblastoma) Rb geni (13q14.1-13q14.2) :**

Rb geni bir çekirdek fosfoproteinini kodlamaktadır (pRb). pRb bir hücre döngüsü düzenleyicisi olarak görev yapar . Fosforile olmamış Rb transkripsiyon faktörü proteini olan E2F'e bağlanarak negatif regülasyonu sağlar. Rb fosforile olduğu zaman cycin/CDK kompleksi ile transkripsiyon faktörü E2F1 ayrılır ve gen aktif hale gelir.

Kanserleşmiş hücrelerde her iki allel de hasarlıdır. pRb hasarının tümör evre ve derece artışıyla ilişkili olduğu bulunmuştur (Xu ve ark., 1993).

Rb gen mutasyonları mesane kanseri olgularının %30'unda görülmektedir (Cordon-Cardo ve ark., 1992).

#### **2.6.2. Kromozom 9 delesyonları**

Mesane kanserinde görülen kromozom delesyonları; 9p: %51, 9q: %57, diğer kromozomlarda ise; 11p: %32, 17p: %32, 8p: %23, 4p: %22, 13q: %15 şeklindedir (<http://cancerres.aacrjournals.org/cgi/content/abstract/54/2/531>).

Kromozom 9'daki delesyonlar tüm derece ve evrelerdeki mesane kanseri olgularının %60'undan fazlasında görülmekte ve kanseri tetiklemektedir (Tsai ve ark., 1990). 9q'da meydana gelen delesyon sonucu oluşan yüzeyel TCC'ler, p53 ve pRb inaktivasyonu sonucu meydana gelirler.

#### **2.6.3. Mikrosatellit Kararsızlığı**

İnsan genomunda tekrarlayan DNA dizilerindeki tekrar sayılarındaki kararsızlığı (1-4 bp), mikrosatellit kararsızlığı olarak adlandırılır. Mikrosatellit DNA dizileri, DNA

gen ya da onkogen oluşumuna neden olarak tümör oluşumu ve gelişimine neden olur (Jung ve Messing, 2000).

#### **2.6.4. Onkogenler**

Onkogenler; mutasyon, gen amplifikasyonu, kromozomal translokasyonlar gibi olaylar sonucu yapısal değişikliğe uğrayarak kontrol dışı kalırlar ve onkogenik aktivite kazanırlar (Jung and Meissing , 2000).

##### **2.6.4.1. c-erb-B2 (HER-2/neu)**

c-erb-B2 (eritroblastic leukemia) EGFR'ye benzer bir protein kodlamaktadır. Aşırı eksprese olmuş c-erb-B2 (HER-2/neu) EGFR'ler gibi tirozin kinaz aktivitesiyle hücre bölünmesini uyarır ve hücre normalden fazla bölünür (Jung ve Meissing, 2000).

Coombs ve arkadaşlarının çalışmaları sonucu yüksek derece ve evreli tümörlerle aşırı eksprese olmuş c-erb-B2 arasında bağlantı bulunmuştur (Coombs ve ark., 1991). Mellon ve arkadaşları ise çalışmalarında bu ilişkiyi görememiştir (Mellon ve ark., 1996).

##### **2.6.4.2. H-ras (11p 15.5)**

Ras proto-onkogeni, H-ras (Harvey Rat Sarkoma), K-ras (Human Keratin Ras) ve N-ras (Neuroblastoma Ras) p21 olarak adlandırılan 21-kDa proteinini kodlar (Wong-Staal ve ark, 1981). TipC memeli retrovirüsünde HaMSV (Harvey strain of murine sarcoma virus) insan DNA dizisine homolog, onkogenik nükleik asit dizisi içeren klonlanmış DNA dizisi tanımlanmıştır. Görülen bu homolojide dizide hiçbir ara dizi görülmemiştir. Bu da memeli evriminde dizinin korunduğunu göstermekte ve muhtemelen de normal hücre bölünmesi ve farklılaşmasında rol almaktadır. Onkogenik HaMSV geninde allelik varyasyon tanımlanmıştır. Bir grup hücresel genden elde edilen retrovirüslerdeki değişime uğramış genler evrimsel olarak oldukça korunmuştur. V-onc olarak adlandırılan viral genler arasındaki benzerlik büyük bilimsel ve tıbbi merak konusudur (Chang ve ark., 1982),

Ras genleri karakteristik housekeeping genlerdir (Paciucci ve Pellicer, 1991; Jeffers ve Pellicer, 1994). H-ras; 3kb, N-ras; 7b, K-ras; 35kb'den fazladır (Barbacid

1987; Lowy ve Willumsen, 1993). Ras genleri; H-ras (15p15.5), K-ras2(4q44), N-ras (1p13.2) ([www.ncbi.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=search&DB=gene](http://www.ncbi.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=search&DB=gene)).

Ras proteinleri stoplazmada serbest ribozomlarda sentezlenir ve yarı ömrü 24sa.'tir (Ulsh ve Shih, 1984). Bu proteinler, posttranslasyonel modifikasyonlardan sonra plazma membranının iç yüzünde yer alırlar. Bu modifikasyonlar Ras'ın aktivasyonu için gereklidir (Willumsen ve ark., 1984).

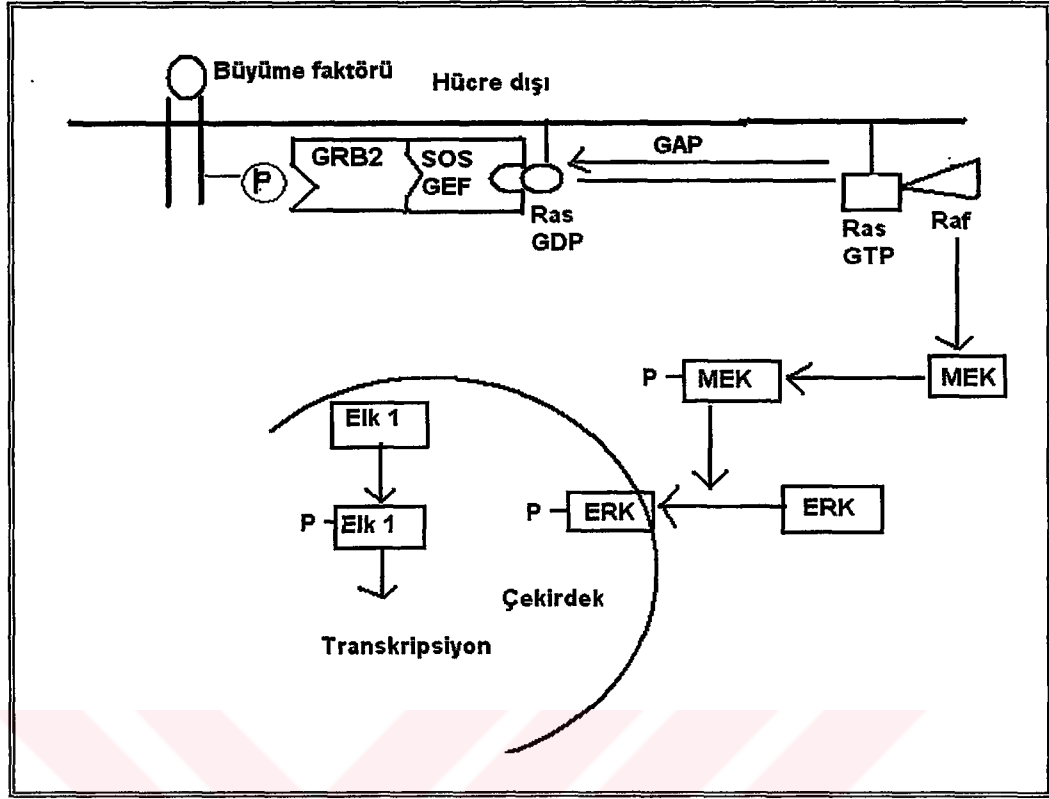
Ras proteinleri, transkripsiyon, translasyon, hücre iskeleti organizasyonu, Golgi vezikül şekillenmesi, hücre-hücre bağlantılarını sağlama görevleri vardır (Matsumoto ve ark., 1997).

İnsan kanserlerinde ras proto-onkogeni (H-, K4A-, K4B- ve N-ras) mutasyonları en sık görülen genetik değişikliklerdendir (Bos, 1989).

Mesane kanseri de dahil olmak üzere, birçok kanserde, H-, K4A-, K4B- VE N-ras genlerinin 1. ekzonun 12. ve 13. kodonları ve 2. ekzonun 61. kodonundaki mutasyonlar bu genlerin aktivasyonuna (onkogene dönüşümüne) neden olmaktadır (Lowy ve Willumsen, 1993).

## 2.7. Ras Aktivasyonu

Ras döngüleri, diğer G proteinlerinde olduğu gibi GDP'ye bağlı inaktif form ile GTP'ye bağlı aktif form arasında gerçekleşir (Şekil 5). Dinlenme durumunda Ras GDP'ye bağlı durumdadır (Buday ve ark., 1993). Eksternal bir ligand olan epidermal büyüme faktörlerinin reseptöre bağlanmasından sonra reseptörde dimerizasyon meydana gelir ve intrinsik reseptör tirozinkinaz aktive olur. Daha sonra reseptörün intraselüler bölümünde spesifik tirozin amino asitlerinin oto fosforilasyonu gerçekleşir (Adjei, 2001).



Şekil 5. Ras Aktivasyonu

([www.ncbi.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=search&DB=gene](http://www.ncbi.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=search&DB=gene))

Ras gen ürünü membrana bağımlı monomerik bir G proteinidir. Bu protein reseptöre bağlanmada moleküler kontrolü sağlar ayrıca sitoplazmik ve nükleer olayları azaltmak için tirozinkinaz aktivasyonunda non-reseptördür.

Her memeli hücresi birbiriyle yakın ilişkili 3 ras proto-onkogene sahiptir (K-, N-H-) fakat bunlar birbirinden farklı proteinler üretirler. Ras geninin mutasyon sonucu oluşan ürünleri sürekli sinyal oluşumuna neden olur. Sürekli sinyal oluşumu hücrenin sürekli uyarılması ve hücre proliferasyonuna neden olur. Ayrıca apoptozisi inhibe eder (Adjei, 2001).

## 2.8. İnsan Kanserlerinde Ras Mutasyonları

Onkogenik ras ilk olarak kemirgenlerin fibroblastlarında görülmüştür (Shin, 1981). İkinci olarak ise sıçan tümörlerinde yüksek oranda görülmüştür (Adams ve Cory, 1991). Onkogenik ras'lar birçok araştırmacı tarafından ayrıntılı olarak çalışılmıştır (Bos, 1989).

Ras mutasyonları çeşitli tümör tiplerinde yüksek frekansta görülmektedir (Tablo1). Tanımlanmış olan mutasyonlar az sayıdaki bölgeyle sınırlıdır (12., 13., 59., ve 61. aminoasitler). Bunlar ras proteinlerinin GAP ( GTPase Activating Protein) bağlı GTP hidrolizisini durdurur (Adjei, 2001).

Ras geninin nokta mutasyonları Ras proteininin sürekli aktivasyonuna neden olur. Ras geninin bu mutasyonlu formları GTPaz aktivitesini zayıflatır. Mutasyonlar bir ras geniyle sınırlıdır ve frekansı da doku ve tümör tipine göre değişiklik gösterir (Adjei, 2001).

**Tablo 1.** İnsan kanserlerinde ras mutasyonları sıklığı ( Przybojewska ve ark., 2000)

<b><u>Kanser-bölge-tümör</u></b>	<b><u>mutasyon frekansı%</u></b>	<b><u>Sık görülen ras izoformu</u></b>
Non cell akciğer kanseri (adenokarsinomu)	33	K
Kolorektal	44	K
Pankreas	90	K
Foliküler Tiroid	53	H, K, N
Farklılaşmamış papillar Tiroid	60	H, K, N
Papillar Tiroid	0	-
Seminoma	43	K, N
Melanoma	13	N
Mesane	10	H
Karaciğer	30	N
Böbrek	10	H
Miyelodisplastik sendrom	40	N, K
Akut miyelogenous lösemi	30	N

Ras geni mutasyonları, meme, ovaryum, mide, özefagus ve prostatta az görülmesine karşın pankreasın bütün adenokarsinomlarında, kolon ve tiroid kanserlerinin % 50'sinde görülür. Kolon ve pankreatik kanserlerdeki mutasyonlar sadece K-ras geninde görülür. Üriner sistem ve mesane kanserlerinde mutasyonlar ilk olarak H-ras geninde, lösemilerdeki mutasyonlar ise N-ras geninde görülür. Tiroid

karsinomlarında nadir olarak bu üç gen de görülmektedir (Visvenathan ve ark.,1988; Fujita ve ark., 1984).

Ras geninde görülen onkogenik mutasyonlar bütün kanserlerin %30'unu oluşturmaktadır (Adjei, 2001).

K-ras mutasyonları non-small cell akciğer, kolorektal, pankreatik kanserlerde, N-ras mutasyonları melanoma, hepatosellularkanser ve hematolojik malignansiler de görülür (Adjei, 2001).

### **2.9. Onkogenik Ras Proteinleri :**

Ras, membrana bağlı Guanozintrifosfat (GTP)/Guanozindifosfat (GDP) bir G proteindir ve "moleküler anahtar" olarak görev yapar. Hücre membranından çekirdeğe sinyal gönderir. Bu kimyasal sinyaller protein sentezini, hücre regülasyonunu, proliferasyonunu ve farklılaşmasını sağlar. Ras klasik heterotrimerik G proteinlerinin tersine monomerik yapıya sahiptir. Her ras proteini yaklaşık 190 amino asit içerir bunlar amino ve karboksil terminalinde yüksek derecede korunur. Proteinler arasında görülen farklılığın çoğu C-terminali yakınında 25 aminoasitlik değişkenlik gösteren bölgeden kaynaklanır. Bu değişkenlik onların fonksiyonunda değişikliğe neden olur (Valencia ve ark., 1991; Boguski ve McCornick1993).

Ras familyası Ras H, K, M, N, R, Rap (1 ve 2) ve Rai gibi çeşitli sayıda farklı üyeler içerir. Bunlar %50 dizi benzerliği gösterir. Bu familya diğer küçük monomerik G protein familyalarıyla Rho/Rac/CDC42, Rab/Ypt, Ran, Arf ve Rad familyaları gibi en az %30 homoloji gösterirler (Wittinghofer ve Herrmann, 1995).

Rap proteinleri, Ras ile benzer efektör bölge içerdiği için ilgi çekici bir araştırma konusudur (Adjei, 2001).

### **2.10. Mesane Kanseri Yatıklık Genleri:**

Mesane kanserinin oluşumunda çeşitli genler rol almaktadır (Tablo 2).



**Tablo 2. Mesane Kanseri Yatkınlık Genleri**

(http://www.cancerindex.org/geneweb/X2103htm)

GEN	YERİ
1- GSTM1 (GST1,MU)	1p13.3
2- SLC2A (GLUT1)	1p3-p31.3
3- TP73 (p73)	1p36
4- MUCI (PUM,PEM)	1q21
5- RCA1(HRCA1,TRCB)	3p14.2-3p14.2
6- VEGF (VEGFA)	6p12
7- CDKN1A (p21,WAF1,CIP1)	6P21.2
8- NAT2 (AAC2)	8p23.1-p21.3
9- NAT1 (AAC1)	8p23.1-p21.3
10- CDKN2A(p16,INK4A,MTS1)	9p21
11- DBCCR1	9q32-q33
12- FGFR2	10q26
13- HRAS	11p15.5
14- CDKN1B (KIP1,p27)	12p13
15- FLT1 (FLT)	13q12
16- RB1 (Rb)	13q14.2
17- TP53 (p53,)	17p13.1
18- TIMP2	17q25
19- CDKN2D (INKD,p19)	19p13
20- CCNE1 (CCNE,Cyclin E)	19q13.1

### 2.11. Mesane Kanserinde Gen Tedavisi

Mesane, anatomik yapısından dolayı gen tedavisi açısından uygun bir organdır. Endoskopisi kolay olmakla birlikte tedavi edici ajanları vezikal kavitede uzun süre tutulabilmektedir. Ayrıca glikozaminoglikan (GAG) tabakası mesane mukozası üzerinde bulunur ve uygun olan tedavi edici gen aktarımı için yer açmaktadır. GAG tabakasına zarar vererek bu bariyeri istediğimiz forma adapte edebiliriz. Bu şekilde

çeşitli gen aktarımı çalışmaları uygulanabilir. Bu çalışmalar adenoviral ipliklerin modifikasyonu, viral infektiviteyi artıran materyallerin birlikte aktarımı ve GAG tabakasının zarar görmesi şeklinde tedavi edici genlerin mesane kanserli hücrelere aktarımını sağlamaktadır (Irie, 2003).

Mesane kanserinde gen transferi pek çok araştırmacı tarafından çalışılmıştır. Yüzeyel, lokal invaziv ve ilerlemiş metastatik hastalarda intralezyonel ve intravezikal aşılama gereklidir. Tedavi edici genin intravezikal aşılması için GAG tabakası engeldir. Mesane kanseri tedavisinde özellikle ilerlemiş, tekrarlayan yüzeyel kanserlerde ve tedaviye dirençli CIS'te uygulanan bu uygulamalar her zaman başarılı değildir. Moleküler biyoloji ve genetik alanındaki avantajlar kanser tedavisinde yeni yaklaşımlar getirmektedir. Bu çalışmalar (gen tedavisi) çeşitli malignansilere karşı ümit vericidir (Irie, 2003).



### III. MATERYAL VE METOD

Şubat 2004-Aralık 2004 tarihleri arasında OndokuzMayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Servisinde mesane tümörü tanısı konularak tedavi uygulanmakta olan 59 olgu ile aynı demografik özelliklere sahip mesane tümörü olmayan 74 olgu kontrol grubu olarak çalışmaya alındı. Tüm olguların histopatolojik sonuçları, meslekleri, yaşam tarzları (sigara kullanımı), aile öyküsü, daha önce geçirilen hastalıkları, hastalığının ilk kez veya tekrar olup olmadığını ayrıntılı olarak sorgulayan detaylı bir anamnez alındı. Çalışma grubunu oluşturan 53'ü erkek 6'sı kadın olan hastaların yaşları 47-82 arasında değişmekteydi. Yaşların ortalaması 65.32 ( $\pm 1.23$ ), medyan 67 olarak saptandı. 54 erkek ve 20 kadından oluşan 74 kişilik kontrol grubunun yaşları 40-87 arasında değişmekteydi. Kontrol grubunun yaşlarının ortalaması 63.73 ( $\pm 1.18$ ), medyan 63 olarak saptandı. Mesane tümörleri stage olarak 5'i Ta, 21'i T1, 30'u  $\geq T2$ , 11'i G1, 23'ü G2 ve 22'ü G3 grade saptanmıştır. Tüm olgular çalışma hakkında bilgilendirilerek çalışmaya katılmaları konusunda aydınlatılmış onayları alındı.

Mesane kanserli hasta ve sağlıklı kontrollerden, EDTA'lı tüplere alınan kan örneklerinden DNA'lar saflaştırıldı. DNA ekstraksiyonu 'Salting out' yöntemi ile yapıldı. DNA örnekleri çalışılincaya kadar  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı.

Çalışmamızda H-ras proto-onkogeninde 1. ekzonda 200 bp'lik bölge PCR ile çoğaltıldı ve PCR ürünleri *DraIII* [*Alkaligenes denitrificans*: *AdeI* (*DraIII*)] restriksiyon enzimi ile kesilerek 81T→C polimorfizmi değerlendirildi (Johne ve ark., 2003).

#### 3.1. DNA İzolasyonu

Her olgudan EDTA içeren vakumlu tüplere 5 ml tam kan alındı. Kandan DNA izolasyonu 'Salting out' yöntemi kullanılarak yapıldı (Miller ve ark., 1988).

##### 3.1.1. SOLÜSYONLAR

**Lizis Tamponu:** 320 mM Sucrose (Merck)

10 mM Tris (Merck) pH 7.5

4 mM  $\text{MgCl}_2$  (Merck)

%1 Triton X 100 (Sigma)

Distile suyla 1000 ml'ye tamamlandı. Solüsyon hazırlandıktan sonra otoklavlandı.

**TEN tamponu** : 10 mM Tris (Merck) pH 8

2 mM EDTA (Merck)

400 mM NaCl (Merck)

Distile suyla 50 ml'ye tamamlandı. Solüsyon hazırlandıktan sonra otoklavlandı.

**Proteinaz K (Sigma) Solüsyonu** :

10 ml 500 mM'lık Tris (pH 8) solüsyonu içine 100 mM'lık  $\text{CaCl}_2$ 'den 0.1 ml ilave edilir ve 100 mg proteinaz K solüsyona eklendi. Bu şekilde 10 mg/ml proteinaz K solüsyonu hazırlandı.

**% 10 SDS (Sodyum Dodesil Sülfat) (Merck)**

10 gr SDS alınıp ve 100 ml distile su içinde çözüldü.

**Doymuş NaCl Solüsyonu (6M) : (Doymuş tuz çözeltisi)**

7 g tartılıp, distile su ile 20 ml'ye tamamlandıktan sonra otoklavlandı.

**TE Solüsyonu** : 10 mM Tris pH 7.5

1mM EDTA

Bunu hazırlamak için 500 mM Tris pH 7.5 stok solüsyonundan 1 ml, 100 mM EDTA stok solüsyonundan 0.5 ml alınıp distile su ile 50 ml'ye tamamlandı.

### 3.1.2. DNA İzolasyon Yöntemi

1.Gün:

1. 5 ml EDTA'lı tüm kan 50 ml'lik polipropilen tüpe alındı.
2. Kan örneğinin üç katı hacimde (15 ml) lizis tamponu konuldu. Kapağı kapatılıp tüp birkaç kez ters yüz edildi.
3. 2200 rpm'de 4°C'de 15 dakika santrifüj yapıldı. Üstteki süpernatant atıldı.
4. Lizis tamponu ile yıkama işlemi iki kez daha yapıp aynı devirde ve sıcaklıkta santrifüj edildi.

5. Üstteki süpernatant atıldı. Dipte kalan temiz çökelti üzerine 3 ml TEN tamponu konuldu ve kısa süre vortekslendi. Sonra 200 µl %10'luk SDS ve 50µl Proteinaz K ilave edildi ve elle tüpe yumuşak bir şekilde vurularak karıştırıldı.
6. Bir gece 37°C'de inkubatörde hafif çalkalamayla inkübe edildi

## II.Gün :

7. Ertesi gün örneklerin üzerine 1 ml 6 M'lık NaCl solüsyonundan konuldu ve 30 saniye hızlı bir şekilde elle çalkalandı veya kısa bir süre vortekslendi.
8. 2600 rpm'de 15 dakika santrifüj yapıldı.
9. Üstteki süpernatant 15 ml'lik bir tüpe alındı ve tekrar 3300 rpm'de oda ısısında 30 dakika santrifüj edildi.
10. Süpernatant başka bir 15 ml'lik bir tüpe alındı (dipteki çökeltinin süpernatant karışmamasına dikkat edildi). Çökelti atıldı.
11. Süpernatantın iki katı hacimde absolü etil alkol ilave edilerek DNA çöktürüldü.
12. Plastik pastör pipeti ucu ile DNA alındı ve içinde 1 ml % 70 etil alkol bulunan Eppendorf tüpüne konuldu.
13. 10 dakika mikrofüjde santrifüj yapıldıktan sonra üstteki alkol ince uçlu pastör pipeti ile çekilerek atıldı. Dipte çöktürülen DNA, tüplerin ağzı açık bırakılarak 37°C'de etüvde 10 dakika kadar bekletilerek alkol uçuruldu.
14. DNA örneği üzerine 150 µl TE tamponu katıldı ve tüplerin ağzı kapatıldıktan sonra 37°C'de etüvde çözünmesi için birkaç saat bırakıldı.
15. DNA örnekleri çözüldükten sonra 10 µl stok DNA örneği, içinde 1 ml distile su bulunan Eppendorf tüpüne alındı. Vortekslendikten sonra spektrofotometrede 260 nm ve 280 nm'de optik dansite ölçülerek DNA'nın miktarı ve saflığı tayin edildi.
16. Stok DNA örnekleri -20°C'de saklandı.

### 3.1.3. DNA Miktarının Tayini

Elde edilen DNA'lardan 2'şer µl örnek alındı ve 18 µl distile su eklenerek seyreltildi. UV spektrofotometrede (Vilber Lourmat), 260 ve 280 nm dalga boylarında okundu. 260 nm dalga boyunda okunan değer DNA solüsyonu içindeki DNA miktarını, 280 nm'de okunan değer ise solüsyondaki protein miktarını göstermektedir. 260 ve 280 nm dalga boyunda okunan değerlerin birbirlerine oranının (OD260/OD280) 1.5'in altında olmaması gerekir. Eğer bu değer 1.5'in altında ise DNA ekstraksiyonun tekrarlanması gerekir. PCR reaksiyonunda kullanılan DNA yeteri kadar temiz olmaması, bu reaksiyonu inhibe edebilir. 260 nm dalga boyunda bulunan değer 1.5 ve üzerinde ise elde edilen DNA'nın konsantrasyonu (Miller ve ark., 1988):

**DNA KONSANTRASYONU= OD<sub>260</sub> x Sulandırma Katsayısı (100) x 50 µg/ml (çift zincirli, ds DNA'lar için standart değer)**

çarpılarak bulunur.

### 3.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Polimeraz zincir reaksiyon 59 mesane kanserli ve 72 kontrol olmak üzere toplam 131 kişiye uygulandı. H-ras proto-onkogeninde ekzon 1'de 81T→C polimorfizmini kapsayan bölge değerlendirildi

### 3.3 c-Ha-ras1 p21 proteini nükleotid dizisi

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&val=190890>).

1500 tccgcacgc tgggttcag ctgcacaggt aggcacgctg cagtcctgc tgctggcgt

1560 tggggcccag ggaccgctgt gggttgccc ttcagatggc cctgccagca gctgcctgt

**Primer F→**

1620 ggggcctggg gctgggcctg ggctggctg agcagggcc c tcctggcag **gtggggcagg**

1680 aga ccctgta ggaggacccc gggccgcagg ccctgagga gcgatgacgg aatataagct

1740 ggtggtggtg ggcgccggcg gtgtgggcaa gagtgcgctg accatccagc tgatccagaa

1800 **ccatttt** ↓ **gtg** gacgaatacg acccactat agaggtgagc **ctagegccgc cgtccaggtg**

1860 **cc** agcagctg ctgcgggcga gccaggaca cagccaggat agggctggct gcagcccctg

**← Primer R**

1920 gtcccctgca tgggtctgtg gccctgtctc ctgcttcctc tagaggaggg gagtcctcg  
 1980 tctcagcacc ccaggagagg agggggcatg agggggcatga gaggtaccag ggagaggctg

### 3.3.1 Ras Onkogeni 81T→C Bölgesi PCR Koşulları

Ras proto-onkogeni 1. ekzonundaki ilgili bölge 5' CTT GGC AGG TGG GGC AGG AGA 3' ve 5'GGC ACC T GG ACG GCG GCG CTA G 3' primerleri (İontek) kullanılarak çoğaltıldı. PCR, 25 µl reaksiyon hacminde, 1xPCR reaksiyon tamponu, 4.5 mM MgCl<sub>2</sub> (Promega), 200mM dNTP (Fermentas), her primerden 1µl, %7.5'lük dimetil sülfoksit (DMSO) (Sigma), 100 ng genomik DNA ve 1,25 U Taq DNA polimeraz (Promega) kullanılarak Techne Gradient Thermocycle'da yapıldı. Taq DNA polimeraz başlangıç denaturasyonundan sonra Hot Start olarak ilave edildi.

#### Reaksiyon Şartları:

3 dk. 95°C başlangıç denaturasyonu  
 94°C de 30 sn. denaturasyon  
 60°C de 10sn hibridizasyon 38 döngü  
 72°C de 1dk. sentez

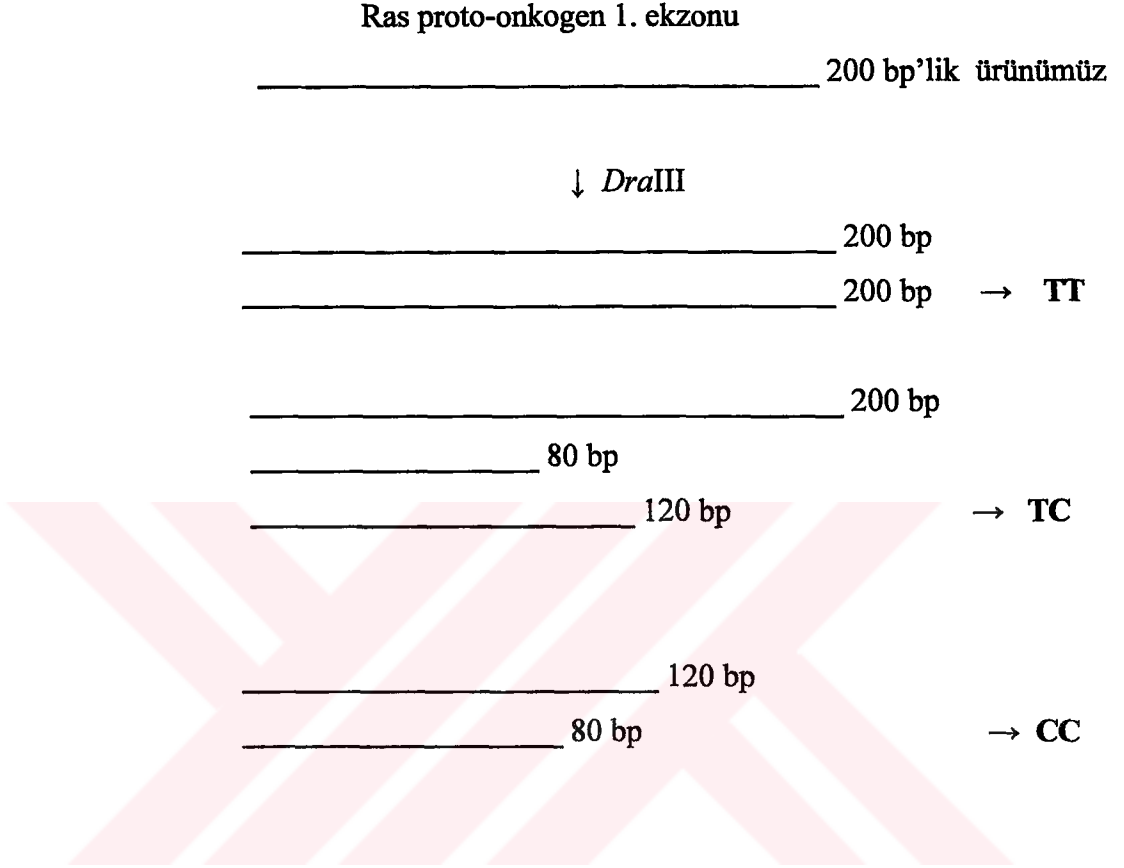
72°C de 10dk. son sentez şeklindeydi.

PCR ürünleri %3'lük Amresco agaroz jele, 25 µl'lik PCR ürününün 10 µl'si, 2 µl 6x jel yükleme tamponu (6x loading dye) (Sigma) ilave edilerek yüklendi. Elektroforez (Consort) 125 volt'da 25 dakika süreyle yapıldı. Elektroforez sonunda, jel >320 nm boyunda transillüminatörde (Vilbert Lourmart) önce 200 bp'lik ürünün varlığı kontrol edildi. 200 bp'lik, PCR ürünü gözlenen örnekler *DraIII* restriksiyon enzimi ile kesildi.

### 3.4 Restriksiyon Fragment Uzunluğu Polimorfizmi (Restriksiyon Fragment Length Polymorphism: RFLP):

*DraIII* (*Alcaligenes denitrificans: AdeI*) restriksiyon enzim kesimi: *DraIII* restriksiyon enziminin tanıma bölgesi 5'....CACNNN ↓ GTG ....3' ve 3'....GTG ↑ N

NNCAC.....3' dir. 15 µl PCR ürünü, 1.6 µl G tampon u ve 5 ünite *DraIII* enzimi (Fermentas) ve 1,6 µl G buffer ile 37°C'de 16 saat inkübe edildi.



### 3.5. Agaroz Jel Elektroforezi

#### 3.5.1. Solüsyonlar :

1. 5x TBE tamponu : 54 gr Tris bazı (Merck)  
 27.5 gr Borik asit (Merck)  
 20 ml 0.5 M Edta (pH 8.0) (Merck)

Distile su ile 1 litreye tamamlanır.

2. **Etidium Bromid (EtBr)** (Sigma): Stok solüsyondan 10 mg/ml, çalışma solüsyonu ise 0.5 µg/µl olarak hazırlandı.

3. **Jel Yükleme Tamponu** (Sigma): 6X konsantrasyon [% 0.25 w/v Bromfenol blue, % 0.25 w/v Xylene cyanol FF, % 40 sükröz,] olarak hazırlandı.



#### **4. 'Size Marker' (Moleküler Standartlar):**

**100 bp DNA Ladder** (Fermentas): 80, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 ve 1000 bp olmak üzere 11 farklı parça içermekteydi.

#### **3.5.2. Jelin Hazırlanışı**

% 3 agaroz jeller hazırlandı (Amresco) Tampon solüsyon olarak 1x TBE kullanıldı. % 3'lük jel için 3.3 gr agaroz tartıldı ve 110 ml 1 X TBE içinde kaynatıldı. 75°C'ye kadar soğutulup içerisine 110ml EtBr ilave edildi. Tarağı yerleştirilen jel kabına döküldü. En az 1 saat 4 °C'de bekledikten sonra PCR ürünleri jele yüklendi.

#### **3.5.3. Agaroz Jel Elektroforezi Sonuçlarının Değerlendirilmesi :**

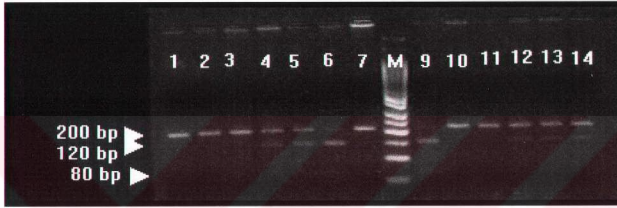
Kesim işlemi tamamlanan RFLP örneklerine, 6x jel yükleme tamponundan 1/5 oranında ilave edilerek, %3'lük agaroz jele (Amresco) yüklendi. Agaroz jelde 120 voltta 30 dk. yürütüldü ve jel fotoğrafları, UV görüntü analiz sisteminde (Biolab) çekildi. RFLP ürünleri incelenerek, markerdan yardımıyla DNA parçalarının uzunluğu hesaplandı. Jel fotoğrafları, UV görüntü analiz sisteminde (Biolab) çekildi.

#### **3.6. İstatistiksel Değerlendirme**

İstatistiksel analizler için SPSS10 programı kullanılarak ki-kare ve %95'lik güven aralığında OR testleri yapıldı. Genotiplerin görülme sıklığı yüzde değer olarak hesaplandı. Allellerin her birinin gen frekansları bulunarak çalışılan populasyonun denge kontrolü Hardy-Weinberg ve ki-kare testleri ile belirlendi.

#### IV. BULGULAR

Çalışmamızda, PCR optimizasyon süresi sonunda 200 bp'lik ürünler elde ettik. PCR ürünlerini *Dra*III restriksiyon enzimi ile keserek üç farklı genotip elde edildi. Bu genotipler: 200 bp uzunluğunda tek bant gözlediğimiz TT, 200 bp (homozigot), 120 bp ve 80 bp uzunluğunda üç bant gözlediğimiz CT (heterozigot) ve 120 bp, 80 bp şeklinde iki bant gözlediğimiz ise CC (homozigot) genotipidir (Şekil 6).

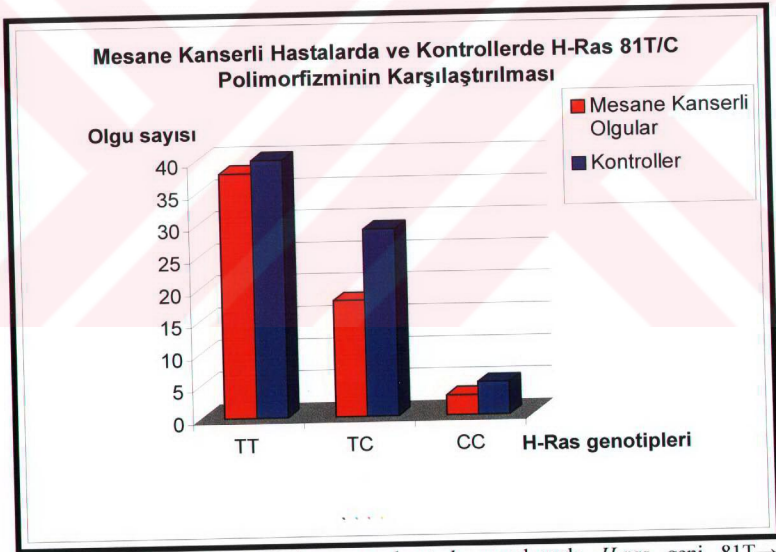


**Şekil 6.** Ras geni 81T →C bölgesinde *Dra*III restriksiyon enzimi ile tanımlanan polimorfik alleller. 1, 2, 3, 7, 10, 11 no'lu kuyulardaki ampliconların genotipi: TT; 4, 5, 12, 13, 14 no'lu kuyulardaki ampliconların genotipi: CT; 6, 9 no'lu kuyulardaki ampliconların genotipi: CC'dir.

Çalışma ve kontrol gruplarından elde ettiğimiz genotip frekansları Tablo 3 ve 81T →C Grafik 1'de görülmektedir. Ayrıca mesane tümörlerinin histopatolojik bulgulara göre genotip frekansı verileri (Tablo 4) ile çalışma ve kontrol grupları arasındaki *H-ras* geni 81T →C polimorfizminin demografik verileri Tablo 5'de görülmektedir.

**Tablo 3:** Mesane kanserli hasta ve kontrol guruplarında *H-ras* geni 81T→C polimorfizmi genotip frekansları

H-Ras 81 T/C Genotipleri	Mesane Kanserli Hastalar (%)	Kontroller (%)	OR (% 95 CI)	P	X <sup>2</sup>
T/T (%)	38 (%64.4)	40 (%54.1)	1.00		
C/T (%)	18 (%30.5)	29 (%39.2)	1.531 (0.733-3.198)	0.26	1.29
C/C (%)	3 (%5.1)	5 (%6.7)	1.583 (0.354-7.087)	0.54	0.3
Toplam	59	74			



**Grafik 1:** Mesane kanserli hasta ve kontrol guruplarında *H-ras* geni 81T→C polimorfizminin karşılaştırılması

**Tablo 4:** Mesane kanserli hastalar ve kontroller arasında *H-ras* geni 81T→C polimorfizmi demografik verileri

Demografik Veriler	H-ras genotipi	Mesane Kanserli Hastalar	Kontroller	OR (%95 CI)
Kadın	TT	6	13	
	CT+CC	-	7	Değerlendirilemedi
Erkek	TT	32	27	1.00
	CT+CC	21	27	1.52 (0.71-3.28)
≤65yaş	TT	15	25	1.00
	CT+CC	12	20	1.00 (0.38-2.61)
>65yaş	TT	23	15	1.00
	CT+CC	9	14	2.38 (0.83-6.89)
Riskli Meslek	TT	22	14	1.00
	CT+CC	8	12	2.36 (0.77-7.21)
Risksiz Meslek <sup>a</sup>	TT	16	22	1.00
	CT+CC	12	22	1.33 (0.51-3.46)
Sigara Kullanan <sup>b</sup>	TT	31	20	1.00
	CT+CC	19	22	1.8 (0.78-4.12)
Sigara kullanmayan	TT	7	17	1.00
	CT+CC	2	11	2.26 (0.32-2.03)

<sup>a</sup> 1 hasta ve 4 kontrolün meslek bilgilerine ulaşamadığı için değerlendirilmeye alınmamıştır.

<sup>b</sup> 1 hasta ve 4 kontrolün sigara kullanım bilgilerine ulaşamadığı için değerlendirmeye alınmamıştır.

**Tablo 5:** Hasta grubu histopatolojik sonuçlarına göre 81T→C genotip frekansı  
3 hastanın patoloji sonucuna ulaşamadığı için değerlendirilmeye alınamamıştır.

Mesane Kanseri Evreleri	CC (%)	CT (%)	TT (%)
Kontroller	5 (%6.7)	29 (%39.2)	40 (%45.9)
G1	2 (%18.2)	3 (%27.2)	6 (%54.6)
G2	1 (%4.3)	12 (%52.2)	10 (%43.5)
>G3	--	1 (%4.5)	21 (%95.5)
Ta	1 (%20)	1 (%20)	3 (%60)
T1	2 (%9.5)	6 (%28.6)	13 (%61.9)
>T2	--	9 (%30)	21 (%70)

Alel frekansları  $\chi^2$  Testi ile hesaplandı. Beklenen ve gözlenen değerler birbirine oldukça yakın oranlarda bulundu (Tablo 6, 7, 8).

**Tablo 6.** Mesane kanserli hasta ve kontrollerin alel frekansları

Gruplar	Toplam	Mesane Kanserli Hasta	Kontrol	OR(%95CI)
T aleli	118	94	109	1.00
C aleli	148	24	39	1.4 (0.76-2.6)

$P= 0.25$ ,  $X^2=1.31$

**Tablo7.** H-ras proto-onkogeni hasta genotip dağılımı ve alel frekansları

Genotipler	Gözlenen frekanslar (%)	Beklenen frekanslar (%)	$X^2$	Aleller	Alel frekansları
T/T	38	37.76	0.339	T	0,795
T/C	18	19.82		C	0.205
C/C	3	2.36			

**Tablo 8.** H-ras proto-onkogeni kontrol grubu genotip dağılımı ve alel frekansları

<b>Genotipler</b>	<b>Gözlenen frekanslar (%)</b>	<b>Beklenen frekanslar (%)</b>	<b>X<sup>2</sup></b>	<b>Aleller</b>	<b>Alel frekansları</b>
T/T	40	39.96	0.134	T	0.735
T/C	29	28,50		C	0.262
C/C	5	5,08			

## V. TARTIŞMA

Ras gen ailesi proto-onkogeni, 189 amino asitlik 21-kDa'luk protein kodlamaktadır. Normal ras proteinleri hücre büyüme ve farklılaşmasını kontrol etmektedir. Proteine GTP bağlandığında moleküler şalter açılmakta ve GTP GDP'ye hidroliz olduğunda ise kapanmaktadır. Bu protein plazma zarından sinyal geçişinin düzenlenmesinde görev yapar, ayrıca bu gen ailesi tek bir nükleotid değişikliği ile tümör oluşturan bir onkogene dönüşebilir. Ras geninin nokta mutasyonları sonucu oluşan ras proteini açık pozisyona gelir ve sürekli sinyal oluşumuna neden olur. Sürekli sinyal oluşumu apoptozisi inhibe ederek hücrenin sürekli uyarılmasına ve hücre proliferasyonuna neden olur. Gerçekleşen bu olaylar sonucu tümör oluşmaktadır (Campell ve ark., 2004).

Çalışmamızdaki PCR ve RFLP tekniklerinde kullandığımız primerler ve restriksiyon enzimi Johne ve arkadaşlarının (2003) kullandıklarındandır. Literatürde PCR şartları ve programında belirtilmemiş olan kısımlar denemeler yapılarak optimize edilmiş ve başarılı PCR ürünleri elde edilmiştir.

Johne ve arkadaşlarının 2003 yılında insan H-ras geninde 81T→C SNP ile mesane kanseri riskini belirlemeye yönelik yaptıkları çalışmada; tümör dokusundan ve lökositlerden genomik DNA analiz etmişlerdir. Yapılan çalışmada, 312 mesane kanserli hasta, 254 hastane kontrol grubu ve 106 sağlıklı gönüllüden oluşan ikinci bir kontrol grubu çalışılmıştır. Çalışmanın sonucunda 312 mesane kanserli olguda; CC: 42, CT: 119, TT: 151, 254 hastane kontrol grubunda; CC: 18, CT: 130, TT: 106, diğer 106 sağlıklı kontrol grubunda ise, CC: 8, CT: 40, TT: 58 genotip bulunmuştur. Mesane kanserlilerde, CC genotip frekansı (%13.5), kontrol grubuna (%7.1) göre daha yüksek bulunmuştur. Kontrol grubu ve mesane kanserli hastalar arasında görülen bu farklılık istatistik olarak da anlamlıdır (OR, 2.04; %95 CI, 1.15-3.61;  $P=0.014$ ). İkinci kontrol grubu olan sağlıklı gönüllülerle yapılan karşılaştırmada elde edilen sonuçlar aynı eğilimi göstermektedir (OR ,1.91; %95 CI, 0.87-4.16). Elde edilen bu sonuçların yanında, histopatolojik sonuçlara bakıldığında, CC genotip frekansının yüksek dereceli histopatoloji sonuçları olanlarda daha yüksek oranda olduğu görülmüştür (G1: %11.8,

G2: %11.7,  $\geq$ G3: %14.5, Ta: %6.4, Tis: %50, T1: %14.4,  $\geq$ T2: %16.8) (Johne ve ark., 2003).

Çalışmamızda 59 mesane kanserli hasta ve 74 kontrol DNA'sının RFLP analizi sonucunda mesane kanserli hastaların %5.1'inde CC, %30.5'inde TC ve %64.4'ünde TT; kontrol grubundaki bireylerin %6.7'sinde CC, %39.2'inde TC ve %54.1'nde TT genotipleri belirlendi. CC genotip frekansı Johne ve arkadaşlarının bulgularının aksine kontrol grubumuzda daha yüksek (CC genotip frekansı mesane kanserli hastalarda %5.1, kontrol grubunda %6.7) görüldü. H-ras proto-onkogeni 81T→C polimorfizmi TT genotip frekansının mesane kanserli hastalarda %64.4, kontrollerde ise %54.1 olarak bulunmuştur. TT genotipi bulgularımız da Johne ve arkadaşlarının bulgularıyla çelişmektedir (Johne ve ark., 2003). Bu durum hasta ve kontrol grubumuzun sayısının azlığıyla ilgili olabileceği gibi ilgili polimorfizmin etnik farklılıklar göstermesinden de kaynaklanabilir. Çalışma grubu ve kontrol grubu arasındaki kadın erkek oranı (kadın/erkek çalışma grubu= 56/9; kontrol grubu= 74/20) farklı olması da sonuçlar arasındaki değişkenliğin nedeni olabilir.

Johne ve arkadaşları CC genotipi ve erken yaş (<65), kadın mesane kanserli hastalar, yılda 20 paketten fazla sigara kullananlar ve mesleki karsinojenlerle karşı karşıya kalanlar arasında anlamlı derecede ilişki gözlemiştir (Johne ve ark., 2003). Çalışmamızda CC genotipine sahip kadın mesane kanserli hastanın olması nedeniyle CC genotipi taşıyan kadınlarda risk faktörü hesaplanamadı. H-ras 81/C polimorfizmi ile cinsiyet, yaş, sigara kullanımı ve karsinojenlere maruz kalma arasında istatistiksel anlamı olan ilişki görülmedi.

Ras proto-onkogeni 81. nükleotiddeki T→C değişimi p21 ras'ın yapısını değiştirmemekte ve her durumda histidin amino asidi kodlamaktadır. Wobble baz konumunda bulunan polimorfizmin, H-ras'ın 4. ekzonundan 1 kb'luk uzaklıkta intronlarında bulunan transkripsiyonel etki artırıcı aktiviteye sahip değişken sayıda ardışık tekrarlarla (variable number of tandem repeats: VNTR) genlerle bağlantılı olabileceği bildirilmiştir (Green ve Krontiris, 1993). Değişken sayıda ardışık tekrarlarla mesane kanseri arasında bir ilişkinin var olduğu bildirilmiştir (Krontiris ve ark., 2003 ). Mesane kanseriyle ilişkili olduğu düşünülen diğer bölge 1. ekzonun 5'ucundan 80 bp uzaklıkta buluna hekzanükleotit tekrarlarıdır (Kotsinas ve ark., 2003).



Sanyal ve arkadaşları, 302 mesane kanserli olgu ve 121 sağlıklı kontrolle yaptıkları çalışmada H-ras geni 81T→C polimorfizmin çalışmışlardır. Johne ve arkadaşlarının (Johne ve ar., 2003) aksine istatistiksel olarak anlamsız olmakla birlikte CC alelinin mesane kanseri riskini azalttığını bildirmişlerdir (OR, 0.12; %95 CI, 0.02-0.67;  $P=0.006$ ). Bulgularımız, Sanyal ve arkadaşlarının bulgularıyla paralellik göstermektedir (Sanyal ve ark., 2004)

Çalışmamız H-ras geni ile mesane kanseri arasındaki ilişkiyi değerlendiren ikinci çalışmadır. Çalışma ve kontrol gruplarımızdaki olgu sayısının Johne ve arkadaşlarının çalışmalarındakine göre daha az olmakla birlikte elde ettiğimiz sonuçlar Johne ve arkadaşlarının çalışmasının aksine H-ras geni 81T→C polimorfizminin mesane kanseri ile ilişkisi olmadığını göstermiştir (Johne ve ark., 2003).



## VI. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmaya Şubat 2004-Aralık 2004 tarihleri arasında OMÜ Tıp Fakültesi Üroloji Servisinde tedavi gören ve mesane kanseri histopatolojik tanıları konan 59 mesane kanserli olgu, hasta grubu ile aynı yaş ve sosyoekonomik konuma sahip 74 kişilik kontrol grubu araştırmaya dahil edildi. Polimeraz zincir reaksiyon toplam 133 kişiye uygulandı.

Çalışmamız sonunda H-ras proto-onkogeni 1. ekzonda yer alan 81T→C polimorfizminin (TT, TC ve CC) mesane kanseri riskini 1.5 kat arttırmakla birlikte istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır. Sonuçlarımızın kesinlik kazanması için hasta sayısının artırılması gerekmektedir.



## KAYNAKLAR

- Adams JM, Cory S. (1991). Transgenic models of tumor development. *Science*, **254**, 1161-7.
- Adjei A. (2001). Blocking ras signaling for cancer therapy. *Journal of the National Cancer Institute*, **193(14)**, 1061-1073.
- Auvinen, P.K., Parkkin, E.N.J., Johanson, R.T., Agren, V.M., Tammi, R.H., Eskelinen, M.J.(1997). Expression of Hyaluronan in benign and malignant lesions. *Int J Cancer (Ped Oncol)*, **74**, 477-81.
- Badalament, R.A., Hermansen, D.K., Kimmel, M., Gay, H.(1987). The sensitivity of bladder wash flow cytometry, bladder wash cytology and voided cytology in the detection of bladder carcinoma. *Cancer*, **60**, 1423-1427.
- Badawi, A.F., Hirvonen, A., Bell, D.A., Lang, N.P., and Kadlubar, F.F. (1997). Role of aromatic amine acetyltransferases, NAT1 and NAT2, in carcinogen-DNA adduct formation in the human urinary bladder. *Cancer Res*, **55**, 5230-5237.
- Baithun, S., Daruwala, P., Oliver, R.T.D. (1998). Squamous change in bladder cancer and its relevance to understanding clonal evolution in development of bladder cancer. *Bladder Cancer*, **31**, 17-27.
- Barbacid, M. (1987). Ras genes. *Annu Rev Biochem*, **56**, 779-827.
- Bell, D.A., Badawi, A.F., Lang, N.P., Ilett, K.F., Kadlubar, F.F., and Hirvonen A. (1995). Polymorphism in the N-acetyltransferase 1 (NAT1) Polyadenylation signal: association of NAT\*10 allele with higher N-acetylation activity in bladder and colon tissue. *Cancer Res*, **55**, 5226-5229,.
- Berezney R., Coffey D.S. (1974). Identification of a nuclear protein matrix. *Biochem Biophys Res Commun*, **60**, 1410-7.
- Bochner, B.H., Cote, R.J., Weidner, N., Groshen, S., Chen, S.C., Skinner, D.G. and Nichols, P.W. (1995). Angiogenesis in bladder cancer: relationship between microvessel density and tumor prognosis. *J Natl Cancer Inst*, **87**, 1603-1612.
- Boguski, M.S, McCornick, F. (1993). Proteins regulating Ras and its relatives. *Nature*, **366**, 643-54.
- Bos, J.L.(1989). ras oncogene in human cancer: review. *Cancer Res*, **49**, 1682-1689.
- Buchumensky, V., Klein, A., Zemer, R., Kessler, O.J., Zinilichan, S., Nissenkorn I. (1998). Cytokeratin-20: a new marker for early detection of bladder cell carcinoma. *J Urol*, **160**, 1971-4.

- Buday, I., Downward, J. (1993). Epidermal growth factor regulates p21 ras through the formation of a complex of receptor, Grb2 adapter protein, and sos nucleotide Exchange factor. *Cell*, **73**, 611-20.
- Campbell, P.M., Der, C. (2004). Oncogenic Ras and its role in tumor cell invasion and metastasis. *Seminars in Cancer Biology*, **14**, 105-114.
- Cascorbi, I., Roots, I. and Brockmüller J. (2001). Association of NAT1 and NAT2 polymorphism to urinary bladder cancer: significantly reduced risk in subjects with NAT1\*10. *Cancer Research*, **61**, 5051-5056
- Chang, E. H., Gonda, M. A., Ellis, R. W., Scolnick, E. M., Lowy, D. R., (1982). Human genome contains four genes homologous to transforming genes of Harvey and Kirsten murine sarcoma viruses. *Proc Nat Acad Sci*, **79**, 4848-4852.
- Coombs, L.M., Pigott, D.A., Sweeney, E. (1991). Amplification and over-expression of c-erbB-2 in transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Br J Cancer*, **63**, 601-608.
- Cordon-Cardo, C., Waetinger, D., Petrylak, D. (1992). Altered expression of the retinoblastoma gene product: prognosis indicator in bladder cancer. *J Natl Cancer Ins*, **84**, 1251-1256.
- Cote, R.J., Esrig, D., Groshen, S. (1997). P53 and treatment of bladder cancer. *Nature*, **384**, 123-124.
- De Stafani, E., Barrios, E. and Fiero, L. (1993). Black (air-cured) and blond (flue cured) tobacco and cancer risk III: oesophageal cancer. *European Forum on Cancer*, **29A**, 801-803.
- Dey, P. (2004). Urinary markers of bladder carcinoma. *Clinica Chimica Acta*, **340**, 57-65.
- Eissa, S., Swellam, M., Sadek, M., Mourad, S., Ahmady, O., Khalifa, A. (2002) Comparative evaluation of the nuclear matrix protein, fibronectin, urinary bladder cancer antigen and voided urinary cytology in the detection of bladder tumors. *J Urol*, **168**, 465-9.
- Ellis, W.J., Blumenstein, B.A., Ihsak, L.M., Enfield, D.L.I. (1997). Clinical evaluation of the BTA TRAK assay and comparison to voided urine cytology and the Bard BTA test in patients with recurrent bladder tumors. *Urology*, **50**, 882-7.
- Esrig, D., Elmanjian, D., Groshen, S. (1994). Accumulation of nuclear p53 and tumor progression in bladder cancer. *N Engl J Med*, **331**, 1259-1264.
- Fernandes, E.T., Manivel, J.C., Reddy, P.K. (1996). Cyclophosphamide associated bladder cancer: a highly aggressive disease. Analysis of 12 cases. *J Urol*, **156**, 1931-1933.

- Fradet, Y., La Rue, H., Parent, V., Bergeron, A., Dufour, C., Boucher, L. (1990). Monoclonal antibody against a tumor associated sialoglycoprotein of superficial papillary bladder tumors and cervical condylomas. *Int J Cancer*, **46**, 990-997.
- Fradet, Y., Lockhart, C. (1997). Performance characteristics of a new monoclonal antibody test for bladder cancer: immunocyt<sup>TM</sup>. *Can J Urol*, **4**, 400-5.
- Fujita, J., Yoshida, O., Yuasa, Y., Rhim, J.S., Hatanaka, M., Aaronson, S.A. (1984). Ha-ras oncogenes are activated by somatic alterations in human urinary tract tumors. *Nature*, **309**, 464-6.
- Green, M., and Krontiris, T.G. (1993). Allelic variation of reporter gene activation by HRAS1 minisatellite. *Genomics*, **17**, 429-434.
- Gregoire, M., Fradet, Y., Mayer, F., Tetu, B., Bois, R., Bedard, G. (1997). Diagnostic accuracy of urinary cytology and deoxyribonucleic acid flow cytometry and cytology on bladder washing during follow up for bladder tumor. *J Urol*, **157**, 1660-4.
- Greider, C.W. (1996). Telomerase length regulation. *Annu Rev Biochem*, **65**, 337-365.
- Grossfield, G.D., Ginsberg, D.A., Stein, J.P., (1997). Thrombospondin-1 expression in bladder cancer: association with p53 alterations, tumor angiogenesis, and tumor progression. *J Natl Cancer Inst*, **89**, 219-227.
- Gordon, J.N., Shu, W.P., Schluskel, R.N., Droller, M.J., Liu, B.C. (1993). Altered extracellular matrices influence cellular processes and nuclear matrix organizations of overlying human bladder urothelial cells. *Cancer Res*, **53**, 4971-7.
- Guirguis, R., Schiffmann, E., Liu, B. (1998). Detection of autocrine motility factor in urine as a marker of bladder cancer. *J Natl Cancer Inst*, **80**, 1203-1211.
- Habuchi, T., Ogawa, O., Kakeni, Y., (1992). Allelic loss of chromosome 17p in urothelial cancer: strong association with invasive phenotype. *J Urol*, **148**, 1595-1599.
- Halling, K.C., King, W., Sokolava, I.A., Meyer, R.G., Burkhadt, H.M., Halling A.C.I. (2000). A comparison of cytology and fluorescence in situ hybridization for the detection of urothelial carcinoma. *J Urol*, **164**, 1768-75.
- Hartge, P., Silverman, D., Hoover, R. (1987). Changing cigarette habits and bladder cancer risk: a case-control study. *Journal of the National Cancer Institute*, **78**, 1119-1125.

- Heicappell, R., Wettig, I.C., Schostac, M., Muller, M., Steiner, U., Sauter, T., (1999) Quantitative detection of human complement factor H-related protein in transitional cell carcinoma of urinary bladder. *Eur Urol*, **35**, 81-7.
- Hein, D.W., Doll, M.A., Rustan, T.D., and Ferguson, R.J. (1995). Metabolic activation of *N*-hydroxyarylamines and *N*-hydroxyarylamides by 16 recombinant human NAT2 allozymes: effects of 7 specific *NAT2* nucleic acid substitutions. *Cancer Res*, **55**, 3531-3536.
- Hobarth, K., Maier, U., Merberger, M. (1992). Topical chemoprophylaxis of superficial bladder cancer by mitomycin C and adjuvant hyaluronidase. *Eur Urol*, **21**, 206-10.
- Holt, S.E., Shay, J.W., Wright W.E. (1996). Refining the telomere-telomerase hypothesis of aging and cancer. *Nat Biotechnol*, **14**, 836-9.
- Ito, H.K., Kyo, S., Kanaya, T., Takakura, M., Inoue, M., Namiki, M. (1998). Expression of human telomerase subunits and correlation with telomerase activity in urothelial cancer. *Clin Cancer Res*, **4**, 1603-8.
- Ianary, A., Sernberg, C.N., Rosetti, A., VanBijn A., Deidda, A., Giannarelli, D. (1997). Results of Bard BTA in monitoring patients with history of transitional cell cancer of the bladder. *Urology*, **49**, 786-789.
- Irie, A. (2003). Advances in gene therapy for bladder cancer. *Current Gene therapy*, **3**, 1-11.
- Jeffers, M. And Pellicer, A. (1994). Identification of multiple promoters within the N-ras proto-onkogene. *BiochemBiophys Asisto*, **1219**, 623-635
- Johne, A., Roots, I., and Brockmöller, J. (2003). A single nucleotide polymorphism in the human H-ras proto-onkogene determines the risk of urinary bladder cancer. *Cancer epidemiology, biomarkers and prevention*, **12**, 68-70.
- Johnston, B., Morales A., Emerson L., Lundie M.(1997). Rapid detection of bladder cancer: a comparative study of point of care tests. *J Uro*, **158**, 2098-2101.
- Jung ,I. and Messing, E. (2000). Molecular mechanisms and pathways in Bladder Cancer development and progression. *Cancer control*, **7(4)**, 325-334.
- Kavaler, E., Landman, J., Chang, Y., Droller, N J., Liu, B.C. (1998). Detecting human bladder carcinoma cells in voided urine samples by assaying for the presence of telomerase activity. *Cancer*, **82**, 708-14.
- Keese, S.K., Briggman, J.V., Thill, G., Wu, YJ. (1996). Utilization of nuclear matrix proteins for cancer diagnosis. *CRC Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, **6**, 189-214.

- Khan, M.A., Travis, L.B., Lynch, C.F., (1998). P53 mutations in cyclophosphamide-associated bladder cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **7**, 397-403.
- Kiemeny, L.A., Moret, N.C., Witjes, J.A. (1997). Familial transitional cell carcinoma among the population of Iceland. *J Urol*, **157**, 1649-1651.
- Klein, A., Zamer, R., Buchumonsky, V., Klaper, R., Nissenkorn, I.(1998). Expression of cytokeratin 20 in urinary cytology of patients with bladder carcinoma. *Cancer*, **82**, 349-54.
- Krontiris, T.G., Devlin, B., Karp, D.D., Robert, N.J., and Reisch, N. (1993). An association between the risk of cancer and mutations HRAS1 minisatellite locus. *N Engl J Med*, **329**, 517-523.
- Korman, H.J., Peabody, J.O., Cerny I.C. (1996). Autocrine motility factor receptor as a possible urine marker for transitional cell carcinoma of the bladder. *J Urol*, **155**, 347-349.
- Kotsinas, A., Gorgoulis, V.G., Zacharatos, P., Mariatos, G., Kokotas, Liloglou, T., Ikonomonopoulos, J., Zoumpourlis, V., Kyroudy, A., Field, J.K., Asimacopoulos, P.J., and Kittas, C. (2001). Additional characterisation of a hexanucleotide polymorphic site in the first intron of human H-Ras gene: comparative study of its alterations in non-small cell lung carcinomas and sporadic invasive breast carcinomas. *Cancer Genet Cytogenet*, **126**, 147-154.
- Kumar, U.N., Dey, P., Mondal, A.K., Singh, S.K., Vohra, H. (2001). DNA flowcytometry and bladder irrigation cytology in detection of bladder carcinoma. *Diagene Cytopathol* , **24**, 153-6.
- Kundson, W. (1996). Tumor-associated hyaluronan. *Am J Pathol*, **6**, 1721.
- Landman J. , Droller, M.(1998). Risk factors in clonal development from superficial to invasive bladder cancer. *Bladder Cancer*, **31**, 5-15.
- Landman J., Chang Y., Kavalier E., Droller M.J., Liu B.C (1998). Sensitivity and specificity of NMP-22, telomerase, and BTA in the detection of human bladder cancer. *Urology*, **52**, 398-402.
- Liebert, M., Washington, R., Wedemeyer, G., (1994). Loss of co-localization of alpha 6 beta 4 integrin and collagen VII in bladder cancer. *Am J Pathol*, **144**, 787-799.
- Lipponen, P.K., Eskelinen, M.J. (1995). Reduced expression of E-cadherin is related to invasive disease and frequent recurrent in bladder cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*, **21**, 303-308.
- Liu, BC-S, Loughlin, K.R. (2000). Telomerase in human bladder cancer. *Urol Clin North Am*, **27**, 115-23.

- Lokehsvar, V.B., Obek, C., Pham, H.T., Wei, D., Young, M.J., Duncan R.C. (2000) Urinary hyaluronic acid and hyaluronidase: markers for bladder cancer detection and evaluation grade. *J Urol*, **163**, 348-56.
- Lowy, D.R. and Willumsen, B. M. (1993). Function and regulation of ras. *Annu. Rev. Bioche*, **62**, 851-891.
- Marcus, P. M., Hayes, R. B., Vineis, P., Garcia-Closas, M., Caporaso, N. E., Autrup, H., Branch, R. A., Brockmöller, J., Ishizaki, T., Karakaya, A. E., Ladero, J. M., Mommsen, S., Okkels, H., Romkes, M., Roots, I., and Rothman, N. (2000). Cigarette smoking *N*-acetyltransferase 2 acetylation status, and bladder cancer risk: a case series meta-analysis a gene-environment interaction. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **9**, 461-467.
- Matsumoto, K., Asono, T., and Endo, T., (1997). Novel small GTPase M-Ras participates in reorganization of actin cytoskeleton. *Oncogene* **15**, 2409- 2417.
- Mellon, J.K., Lunec, J., Wright, C., (1996). C-erb B-2 in bladder cancer: molecular biology, clinical correlation with epidermal growth factor receptors and prognostic value. *J Urol*, **155**, 321-326.
- Messing, E.M. (1990). Clinical implications of the expression of epidermal growth factor receptors in human transitional cell carcinoma. *Cancer Res*, **50**, 2530-2537.
- Mian, C., Pycha, A., Wiener, H., Haitel, A., Lodde, M., Marberger, M. (1999). Immunocyt\* : a new tool for detecting transitional cell cancer of urinary tract. *Urinary Tract*, **161**, 1486-1489.
- Miller, S. A., Dykes, D. D., Polsky, H. F. (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucl. Acid Res*, **16**, 12215
- Mohtashampur, E., Norpoth, K. and Lieder, F. (1987). Urinary excretion of mutagens in smokers of cigarettes with various tar and nikotin yields, black tobacco, and cigars. *Cancer Letters*, **34**, 103-112,
- Moll, R., Lowe, A., Laufer, J., Franke, W.W. (1992). Cytokeratin 20 in human carcinomas. A new histodiagnostic marker detected by monoclonal antibodies. *Am J Pathol*, **140**, 427.
- Myfield, M.P., Shah, T., Flannigan, G.M., Hamilton Steward, P.A., Bibby, M.C. (1998) Telomerase activity in malignant and benign bladder conditions. *Int J Mol Med*, **1**, 835-40.
- Okkels, H., Sigsgaard, T., Wolf, H., and Autrup, H. (1997). Arylamine *N*-transferase 1 (*NAT1*) and (*NAT2*) polymorphisms in susceptibility to



- bladder cancer: the influence of smoking. *Cancer Epidemio Biomark Prev*, **6**, 225-231.
- Olumi, A.F., Tsai, Y.C., Nichols, P.W.(1990). Allelic loss of chromosome 17 distinguishes high grade from low grade transitional cell carcinomas of the bladder. *Cancer Research*, **50**, 7081-7083.
- Paciucci, R., And Pellicer, A. (1991): Dissection of the Mouse N-ras gene upstream regulatory sequenced, overlapping with an adjacent gene. *Mol. Cell Biol*, **11**, 1334- 1343.
- Pardoll D.M., Vogelstein B., Coffey D.S. (1980). A fixed site of DNA replication of cells. *Cell*, **19**, 527-36.
- Peach, R.J., Hollenbaugh, D., Stamenkovic, I., Aruffo, A., (1993). Identification of hyaluronic acid binding in extracellular domain of CD44. *J Cell Biol*, **122**, 257-64.
- Pfister, C., Chautard, D., Dewonec, M., Perin, P., Chopin, D., Rischmann, P. (2003). Immunocyt test improves the diagnostic accuracy of urinary cytology: results of a French Multicenter study. *J Urol*, **169**(3), 921-4.
- Pham, H.T., Block, N.L., Lokeshwar, V.B (1997). Tumor-derived hyaluronidase: a diagnostic urine marker for high-grade bladder cancer. *Cancer Res*, **57**, 778-83.
- Planz, B., Synek, C., Roben, J., Bocking, A., Marberger, M. (2000). Diagnostic accuracy of DNA image cytometry and urinary cytology with cell from voided urine in the detection of bladder cancer. *Urol*, **56**, 782-6.
- Ponsky, L.E., Sharma, S., Pandrangi, L., Kedia, S., Nelson, D., Agarwal, A., (2001). Screening and monitoring for bladder cancer: refining the use of NMP22. *J Urol*, **166**, 75-8.
- Poulakis, V., Witzsch, U., Vries, D., Altmannsberger, H-M, Manyak, M.J., Becht E.( 2001) A comparison of urinary nuclear matrix protein-22 and bladder tumor antigen tests with voided urinary cytology in detecting and following bladder cancer: the prognostic value of false-positive results. *BJU Int*, **88**, 692-701.
- Przybojewska, B., Jagiello, A., and Jalmunza, P. (2000). H-ras, K-ras and N-ras gene activation in human bladder cancers. *Cancer Genet. Cytogenet*, **121**,73-77
- Ramakumar, S., Bhuiyan, J., Besse, J.A., Roberts, S.G., Wollan, P.C., Blute, M.L. (1999). Comparison of screening methods in the detection of bladder cancer. *J Urol*, **161**, 388-94.
- Rao, J.Y., Hemstreet, G.P., Hurst, R.E. (1993). Alterations in phenotypic biochemical markers in bladder epithelium during tumor/genesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 8287-8291.

- Sanchez-Carbayo, M., Urrutia, M., Gonzalez de Buitrago, J.M., Navajo, J.A., (2000). Evaluation of two new urinary tumor markers: bladder tumor fibronectin and cytokeratin 18 for the diagnosis of bladder cancer. *Clin Cancer Res*, **6(9)**, 3585-94.
- Sanchez-Carbayo M.(2003). Use of High-Throughput DNA microarrays to identify biomarkers for Bladder cancer. *Clinical Chemistry*, **49(1)**, 23-31.
- Sanchez-Carbayo M.(2004). Recent advances in bladder cancer diagnostics. *Clinical Biochemistry*, **37**, 562-571.
- Sandberg, A.A., Berger, C.S. (1994). Review of chromosome studies in urological tumors 11. Cytogenetics and molecular genetics of bladder cancer. *J Urol*, **151**, 545-60.
- Sanyal, S., Festa, F., Sakano, S., Zhang, Z., Steineck, G., Norming, U., Wijkström, H., Larson, P., Kumar, and Hemminki, K. (2004). Polymorphisms in DNA repair and bladder cancer. *Carcinogenesis*, **25(5)**, 729-734.
- Sarkis, A.S., Bajorin, D.F., Reuter, V.E. (1995). Prognostic value of p53 nuclear overexpression in patients with invasive bladder cancer treated with neoadjuvant MVAC. *Clin Onc*, **13**, 1384-1390.
- Shih, C., Padhy, L.C., Murray, M., Weinberg, R.A. (1981). Transforming genes of carcinomas and neuroblastomas introduced into Mouse fibroblasts. *Nature*, **290**, 261-4.
- Shimazui, T., Schalken, J.A., Girolodi L.A., (1996). Prognostic value of cadherin-associated molecules (alpha-, beta-, and gamma-catenins and p120cas) in bladder tumors. *Cancer Res*, **56**, 4154-4158.
- Sobin, DH and Witteking, Ch. (2002). TNM Classification of Malignant Tumours . 6th edn. Wiley-Liiss: Newyork,
- Stonehill, W.H., Dmochowski, R.R., Patterson, A.L. (1996). Risk factors for bladder tumors in spinal cord injury patients. *J Urol*, **55**, 1248-1250.
- Sturegon, S.R., Hartge, P., Silverman, D.T. (1994). Associations between bladder cancer risk factors and tumor stage and grade at diagnosis. *Epidemiology*, **5**, 218-225
- Tamir, S, Tannenbaum, SR. (1996). The role of nitric oxide (NO) in the carcinogenic process . *Biochim Biophys Acta*, **1288**, F31-36.
- Taylor, J., Umbach, D., Stephens, E., Castranio, T., Paulson, D., Robertson, C., Mohler, J., and Bell, D. (1998). The role of N-acetylation polymorphism in

smoking-associated bladder cancer: evidence of a gene-gene exposure three-way interaction. *Cancer Res*, **58**, 3603-3610.

Theodorescu, D., Laderoute, K.R., Calaoagan, J.M. (1998). Inhibition of human bladder cancer motility by genistein is dependent on epidermal growth factor receptor but not p21 ras gene expression. *Int J Cancer*, **78**, 775-782.

Thomas, L., Leyh, H., Marberger, M., Bombardieri, E., Bassi, P., Pagano, F. (1999). Multicenter trial of the quantitative BTA TRAK assay in the detection of bladder cancer. *Clin Chem*, **45**, 472-7.

Travis, L.B., Curtis, R.E., Glimelius, B.(1995).Bladder and kidney cancer following cyclophosphamide therapy for non-Hodgkin's lymphoma. *J Natl Cancer Inst*, **87**, 524-530.

Tsai, Y.C., Nichols, P.W., Hiti, A.L. (1990). Allelic losses of chromosome 9, 11 and 17 in human bladder cancer. *Cancer Res*, **50**, 44-47.

Tsihlias, J., Grossman, H.B. (2000). Utility of fibrin1/fibrinogen degradation products in superficial bladder cancer. *Urol Clin North Am*, **27**, 39-46

Tutle, T.M., Williams, G.M., Marshall, F.F.(1988). Evidence for cyclophosphamide-induced transitional cell carcinoma in a renal transplant patient. *J Urol*, **140**, 1009-1011.

Ulsh L. And Shin T.Y. (1984). Metabolic turnover of human c-ras H p21 protein of EJ bladder carcinoma and its normal cellular and viral homologs. *Mol Cell Bio*, **4**, 1647-1652.

Valencia, A., Chardin, P., Wittinghofer, A., Sander, C. (1991). The ras protein family: evolutionary tree and role of conserved amino acids. *Biochemistry*, **30**, 4637-48.

Van der Poel, H.G., Witjes, J.A., van Stratum, P., Boon, M.E., Debruyne, F.M., Schalken, J.A. (1996).Quanticyt Karyometric analysis of bladder washing for patients with superficial bladder cancer. *Urology*, **48**, 357-64.

Visvanathan, K.V., Pocck, R.D., Summerhayes, I.C. (1988). Preferential and novel activation of H-ras in human bladder carcinomas. *Oncogene Res*, **3**, 77- 86.

Willumsen, B.M., Christensen A., Hubbert, N.L., Popugeorge, A.G. and Lowy, D.R. (1984).The p21 ras C-terminus is required for transformation and membrane association. *Nature*, **310**, 583-586.

Wittinghofer, A., Herrman, C. (1995). Ras-effector interactions, the problem of specificity. *FEBS Lett* , **369**, 52-6.

- Wong-Staal, F., Dalla-Favera, R., Franchini, G., Gelmann, E. P., Gallo, R. C.(1981). Three distinct genes in human DNA related to the transforming genes of mammalian sarcoma retroviruses. *Science*, **213**, 226-228
- Xu, H.J., Cairns, P., Hu, S.X. (1993). Loss of RB protein expression in primary bladder cancer correlates with loss of heterozygosity at the RB locus and tumor progression. *Int J Cancer*, **53**, 781-784.
- Yang, C.H., Lambie, E.J., Synder, M. (1992). NuMA: an unusually long coiled-coil related protein in the mammalian nucleus. *J Cell Biol*, **116**, 1303-17.
- Yokota, K., Kanda, K., Inoue, Y., Kanayama, H., Kagawa, S. (1998). Semiquantitative analysis of telomerase activity in exfoliated human urothelial cells and bladder transitional cell carcinoma. *Br J Urol*, **82**, 727-32.
- <http://www.ncbi.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=search&DB=gene>
- <http://www.cancerindex.org/geneweb/X2103htm>
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&val=190890>
- [http://www.cofc.edu/poolel/cell\\_cycle.jpg](http://www.cofc.edu/poolel/cell_cycle.jpg)

## ÖZGEÇMİŞ

**Adı Soyadı:** Şengül BEKAR

**Doğum Yeri:** Şişli

**Doğum Tarihi:** 15.01.1979

**Medeni Durumu:** Bekar

**Yabancı Dil:** İngilizce

**E-mail:** sengulbekar@yahoo.com

**Eğitim Durumu:** 1986-1991 Yedikule ilkokulu- Seyfi Demirsoy İlkokulu

1991-1994 Samsun Atatürk Ortaokulu

1994-1997 Samsun Atatürk Lisesi

1997-2001 OMÜ Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü

**Görev Yeri:** OMÜ Tıp Fakültesi Genetik Labaratuarı

**Yüksek Lisans:** 2002-2005 OMÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji A.D.

**Yüksek Lisans Tez Konusu:** Mesane Kanserli Olgularda H-Ras Proto-Onkogen (81T→C) Polimorfizminin İncelenmesi