

T.C.
HALIÇ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANA BİLİM DALI
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK PROGRAMI

NAT2 GENİ POLİMORFİZMLERİ
VE
MESANE KANSERİ RİSKİ ARASINDAKİ İLİŞKİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Hazırlayan
YAZGI ÖZGER

Tez Danışmanı
Yrd. Doç. Dr. NAGEHAN ERSOY TUNALI

ARALIK, 2013

İSTANBUL

T.C.
HALIÇ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

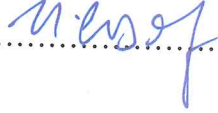
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı Tezli Yüksek Lisans öğrencisi **YAZGI ÖZGER** tarafından hazırlanan “**NAT2 Geni Polimorfizmleri ve Mesane Kanseri Arasındaki İlişki**” adlı bu çalışma jürimizce Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Sınav tarihi: 31.01.2014

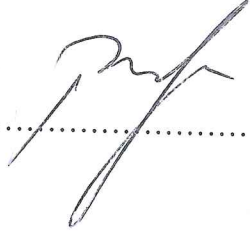
(Jüri Üyesinin Ünvanı, Adı, Soyadı ve Kurumu):

İmzası:

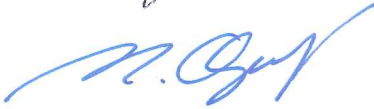
Jüri Üyesi: Yrd. Doç. Dr. Nagehan ERSOY TUNALI
Danışman- HAL.Üniv. Mol.Biy. ve Gen. ABD Üyesi

.....


Jüri Üyesi: Yrd. Doç. Dr. M. Baki YOKEŞ
HAL.Üniv. Mol.Biy. ve Gen. ABD Üyesi

.....


Jüri Üyesi: Yrd. Doç. Dr. Mehmet OZANSOY
Medipol Üniv. Öğr. Üyesi

.....


Jüri Üyesi: Yrd. Doç. Dr. Özlem KURNAZ
HAL.Üniv. Mol.Biy. ve Gen. ABD Üyesi (Yedek)

.....

Jüri Üyesi: Yrd. Doç. Dr. Hatice Yorulmaz
HAL. HAL.Üniv.Hemşirelik ABD (Yedek)

.....

TEŞEKKÜR

Bu alıőma 2011 – 2013 yılları arasında T.C. Haliç Üniversitesi Fen Edebiyat Fakóltesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nün bilimsel araştırma ve uygulama çalıőmalarına verdiği destek ile hazırlanmıştır. Ayrıca bu çalıőmanın uygulama kısmına destek verdiğiinden dolayı Düzen Laboratuvar Grubu'na da teşekkürlerimi bildirmek isterim.

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalıőmamın tamamlanması süresince büyük bir gayret ve özveriyle çalıőmamı takip eden, gösterdiği sabır ve hoşgörüyle bana destek olan tez danışmanım Sayın Yrd. Doç. Dr. Nagehan Ersoy Tunalı'ya çok teşekkür ederim.

Tez yazım süreci boyunca ilgisini eksik etmeyen ve her soruma sabırla cevap veren Uzm. Dr. Kanay Yararbaő'a teşekkür ederim.

Tez çalıőmam boyunca bana yardımcı olan arkadaşlarım Büőra Őenkon ve Günay Karataő'a teşekkürü bir borç bilirim.

Son olarak eğitim hayatım boyunca bana destek olan ve verdiğim her kararın arkasında durarak beni bu günlere getiren sevgili aileme sonsuz teşekkür ederim.

Yazgı ÖZGER

Aralık, 2013

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
KISALTMALAR LİSTESİ.....	III
ŞEKİLLER LİSTESİ	V
TABLolar LİSTESİ	VI
ÖZET	VII
ABSTRACT.....	IX
1. GİRİŞ	1
1.1. Mesane Kanserinin Patolojisi ve Fizyolojisi	2
1.2. Mesane Tümörünün Teşhisi.....	8
1.3. Mesane Kanserinin Tedavisi.....	9
1.4. Mesane Kanseri İle İlişkili Genler	10
1.4.1. Glutasyon S-Transferaz.....	12
1.4.2. Sitokrom P-450 Genleri	12
1.4.3. Metilentetrahidrofolat Redüktaz	13
1.4.4. N-Asetiltransferazlar	14
1.5. Mesane Kanseriyle İlişkili Diğer Faktörler	19
1.5.1. Sigara Tüketimi.....	19
1.5.2. Cinsiyet ve Yaş	20
1.5.3. Aile Öyküsü	20
1.5.4. İdrar Yolu Hastalıkları	20
1.5.5. Diyet ve İlaçlar.....	21
1.5.6. Mesleki Faktörler	21
2. AMAÇ	23
3.GEREÇLER.....	24
3.1. Çalışma İçin Seçilen Örneklerin Tanımı	24
3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	24
3.3. Kullanılan Cihazlar	24

3.4. Agaroz Jel Elektroforezinde Kullanılan Malzemeler	26
3.5. Kullanılan Enzimler, Tamponlar ve Primerler.....	26
3.5.1. Yanak İçi Epitel Hücrelerinden Dna Eldesinde Kullanılan Tamponlar.....	26
3.5.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Malzemeleri	27
3.5.3. Restriksiyon Enzimleri ve Reaksiyon Tamponları	28
3.3.4. Oligonükleotid Primerler	29
3.3.5. DNA Büyüklük Markörleri.....	29
4. YÖNTEMLER	30
4.1. Hızlı Genomik DNA İzolasyonu (RGDE) Metodu	30
4.2. Yanak İçi Epitelinden DNA İzolasyonu	30
4.3. DNA'nın Nitel ve Nicel Analizi	32
4.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	32
4.5. Restriksiyon Kesimi.....	34
4.6. Jel Elektroforezi	35
4.7. Dizi Analizi.....	36
4.8. İstatistiksel Analiz.....	36
5. SONUÇLAR	37
5.1. DNA İzolasyonu	37
5.2. NAT2 Lokusunun PCR Yöntemi İle Çoğaltılması	37
5.3. NAT2 Lokusunun RFLP Yöntemi İle Moleküler Analizi	38
5.3.1. NAT2*6B, NAT2*7A ve NAT2*11A Alellerinin Belirlenmesi.....	38
5.4. Verilerin Değerlendirilmesi	41
5.5. Verilerin İstatistiksel Analizi	46
6. TARTIŞMA	49
7. KAYNAKLAR	53
8. ÖZGEÇMİŞ	60

KISALTMALAR LİSTESİ

μg : Mikrogram

μl : Mikrolitre

BCG : Tüberküloz aşısı (“Bacillus Calmette- Guerin”)

bp : Baz çifti

CHCl_3 : Kloroform

CIS : Karsinoma *in situ*

dNTP : Deoksiribonükleotid

EDTA : Etilen diamin tetraasetik asit

EtBr : Etidyum bromid

EtOH : Etanol

HW : Hardy-Weinberg

L : Litre

M : Molar

MgCl_2 : Magnezyum Klorür

ml : Mililitre

mM : Milimolar

NaCl : Sodyum klorür

NaI : Sodyum iyodür

NaOH : Sodyum hidroksit

NAT : N-asetiltransferaz

nm : Nanometre

PCR : Polimeraz Zincir Reaksiyonu

pmol : Pikomol

RFLP : Restriksiyon Fragman Uzunluk Polimorfizmi

RGDE : Hızlı genomik DNA İzolasyonu (“Rapid Genomic DNA Extraction”)

rpm : Dakikadaki devir sayısı

SDS : Sodyum dodesil sülfat

SNP : Tek nükleotid polimorfizmi

TBE : Tris-Borik asit-EDTA

TE : Tris-EDTA

TUR : Transüretal Rezeksiyon

UCC : Ürotelyal hücre karsinomu

UICC : Uluslararası Kanser Kontrolü Birliği (“Union for International Cancer Control”)

UV : Ultraviyole

V : Volt

WHO : Dünya Sağlık Örgütü

χ^2 : Ki-kare

ŞEKİLLER LİSTESİ

	Sayfa No.
Şekil 1.1. Düşük Dereceli Ürotelyal Karsinom	2
Şekil 1.2. Yüksek dereceli ürotelyal karsinom	4
Şekil 1.3. Mesanenin fizyolojik yapısı.....	5
Şekil 1.4. Mesane ve tümör tipleri	7
Şekil 1.5. Tümörün mesane duvarındaki yayılmasına göre sınıflandırılması.....	7
Şekil 1.6. Asetil transferaz reaksiyonu.....	15
Şekil 1.7. Heterosiklik aminlerin melQx'in nitrenyuma dönüşmesi.....	16
Şekil 5.1. Genomik DNA örneklerinin %1'lik agaroz jeldeki görünümü	37
Şekil 5.2. PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jelde görünümü	38
Şekil 5.3. KpNI kesim ürünlerinin %2'lik agaroz jeldeki görünümü	39
Şekil 5.4. BamHI kesim ürünlerinin %2'lik agaroz jeldeki görünümü	39
Şekil 5.5. TaqI kesim ürünlerinin %3'lik agaroz jeldeki görünümü.....	39
Şekil 5.6. NAT2 C481T Polimorfizminin dizi analizi konfirmasyonu.....	40
Şekil 5.7. NAT2 G857A Polimorfizminin dizi analizi konfirmasyonu	40
Şekil 5.8. NAT2 G590A Polimorfizminin dizi analizi konfirmasyonu	41

TABLULAR LİSTESİ

Sayfa No.

Tablo 1.1. Mesanenin Ürotelyal Neoplazilerinden Who/Isup 1998 Sınıflandırılması	3
Tablo 1.2. Mesane kanseri 2002 TNM sınıflandırılması.....	6
Tablo 4.1. PCR protokolü.....	33
Tablo 4.2. PCR koşulları	33
Tablo 4.3. NAT2 lokusundaki polimorfizmler ve restriksiyon şartları	34
Tablo 5.1. NAT2 lokusundaki polimorfizmler.....	38
Tablo 5.2. Bireylerin cinsiyet ve sigara kullanımına göre dağılımı	41
Tablo 5.3. NAT2 polimorfizmlerinde genotip frekansları	42
Tablo 5.4. Sigara kullanma durumlarına göre NAT2 genotip frekansları.....	43
Tablo 5.5. SNP'lerin varyant alel frekansları	44
Tablo 5.6. NAT2 asetilasyon fenotipleri	44
Tablo 5.7. Hasta bireylerin tümör evrelerine göre asetilasyon fenotipleri	45
Tablo 5.8. NAT2 asetilasyon fenotiplerinin tümör evrelerine göre dağılımı	45
Tablo 5.9. 481 C>T ve 857 G>A polimorfizmi ve mesane kanseri ilişkisi	45
Tablo 5.10. 590 G>A polimorfizmi ve mesane kanseri ilişkisi.....	47
Tablo 5.11. Sigara içen bireylerde 481 C>T ve 857 G>A polimorfizmlerinin mesane kanseri ilişkisi	47
Tablo 5.12. Sigara içen bireylerde 590 G>A polimorfizmlerinin mesane kanseri ilişkisi	47

GENEL BİLGİLER

Adı ve Soyadı :Yazgı Özger
Anabilim Dalı :Moleküler Biyoloji ve Genetik
Programı :Moleküler Biyoloji ve Genetik
Tez Danışmanı :Yrd.Doç.Dr. Nagehan Ersoy Tunalı
Tez Türü ve Tarihi :Yüksek Lisans – Aralık 2013

ÖZET

Genetik faktörler ve çevresel etkiler arasındaki etkileşimler mesane kanseri için risk oluşturmaktadır. En iyi bilinen çevresel risk faktörleri sigara içimi ve meslek sebebi ile maruz kalınan kanserojenlerdir. Mesane kanserine yatkınlık teşkil eden genetik faktörlerin başında ise ksenobiyotik metabolizmasında rol oynayan genlerdeki polimorfizmler gelmektedir. N-asetiltransferaz 2 (NAT2), arilaminlerin ve heterosiklik aminlerin detoksifikasyonunda işlev gören Faz II enzimlerindenidir. NAT2 geni polimorfizmleri bireylerin yavaş, orta ve hızlı asetilasyon fenotiplerine gruplandırılmasını sağlayan N-asetilasyon polimorfizmleridir. NAT2 polimorfizmleri aynı zamanda kanser ve ilaç toksisitesiyle ilişkilendirilmiştir.

Bu tez çalışmasında, NAT2 481C>T, 590G>A ve 857G>A polimorfizmleri ile mesane kanseri arasındaki ilişki araştırılmış ve cinsiyet, yaş, sigara içimi ve tümör evresi bilgileri ile birlikte değerlendirilmiştir. Verilerin istatistiksel değerlendirilmesi sonucunda, erkek olmanın mesane kanseri riskini 9,8 kat, sigara içmenin ise 5,6 kat artırdığı belirlenmiştir.

Tüm bireyler değerlendirmeye alındığında 481C>T polimorfizmi mesane kanseri ile ilişkilendirilme eğilimi göstermiş ($p=0.059$), sadece sigara içen bireyler analiz edildiğinde ise istatistiksel anlamlılığın arttığı ($p=0.005$) ve 481T alelinin

mesane kanserine koruyucu etkisi belirlenmiştir (OR<1). Diğer polimorfizmler ile hastalık arasında bir ilişki bulunmamıştır.

Tüm örnek grubunda ve sadece sigara içen bireylerde asetilasyon fenotipi ile mesane kanseri riski arasında; ve polimorfizmler ile tümör evreleri arasında istatistiksel anlama ulaşan bir ilişki saptanamamıştır.

Anahtar Kelimeler: N-Asetiltransferaz, NAT2, 481C>T, 590G>A, 857G>A, mesane kanseri, polimorfizm

GENERAL INFORMATION

Name and Surname :Yazgı Özger
Field : Molecular Biology and Genetics
Program : Molecular Biology and Genetics
Supervisor : Assist. Prof. Dr. Nagehan Ersoy Tunalı
Degree Awarded and Date : Master of Science –December 2013

ABSTRACT

Interactions between genetic factors and environmental effects pose a risk for bladder cancer. The most well-known environmental risk factors are the carcinogens due to smoking and occupational exposures. Polymorphisms in the genes involved in xenobiotic metabolism are considered as susceptibility factors for bladder cancer. N-acetyltransferase 2 (NAT2) is one of the Phase II enzymes which function in the detoxification of arylamines and heterocyclic amines. NAT2 gene polymorphisms are N-acetylation polymorphisms that allow grouping the individuals as slow, medium and fast acetylators. NAT2 polymorphisms are also associated with cancer and drug toxicity.

In this thesis, the relationship between NAT2 481C>T, 590G>A and 857G>A polymorphisms and bladder cancer are investigated together with gender, age, smoking status and tumor stage. Statistical evaluation of the data revealed that being male and smoking increase the risk of bladder cancer by 9.8 and 5.6-folds, respectively.

481C>T polymorphism showed a trend for the risk of bladder cancer (p=0.059). This trend reached statistical significance when only cigarette smokers are considered (p=0.005), and 481T allele appeared to have a protective effect against bladder cancer (OR<1). The other polymorphisms did not show a statistical significance.

No statistical significance was detected neither between the acetylation phenotype and bladder cancer risk, nor between the polymorphisms and tumor stages, when only the cigarette smokers and all sample groups are considered.

Keywords: N-acetyltransferase, NAT2, 481C>T, 590G>A, 857G>A, bladder cancer, polymorphism

1. GİRİŞ

Mesane kanseri son yıllarda yapılan araştırmalara göre erkeklerde en çok görülen kanserler arasında dördüncü, kadınlarda ise dokuzuncu sırada yer almaktadır (Ouerhani ve ark., 2009). Dünyada yapılan araştırmalarda ise; batı ülkelerinde görülme sıklığı diğer ülkelere göre daha fazladır. Orta Doğu ve Kuzey Afrika lkelerinde artış dikkat çekmektedir (Malats, 2008; Ferlay ve ark., 2008). Erkeklerde İtalya, İspanya, ABD ve Mısır'da görülme olasılığı yüksektir. Kadınlarda ise İtalya, ABD ve İspanya'da yüksek oranda görülmektedir (Ferlay ve ark., 2008). Türkiye'de ise İzmir İl Sağlık Müdürlüğü Kanser Kontrol Birimi, İzmir Kanser Kayıt Merkezi veri tabanına göre ülkemizde nüfus tabanlı kanser kayıt merkezi bulunan sekiz ilin verilerine dayanarak yapılan çalışmalarda 2006 yılında mesane kanseri erkeklerde yüz binde 19.6, kadınlarda yüz binde 2.5 olarak tahmin edilmiştir. alışmalara göre, erkeklerde en sık görülen nc kanser türü olup, tüm kanserler içindeki payı %8.5'tir. Kadınlarda ise 13. sırada yer almaktadır.

Mesane tümörlerinin %90'ını ürotelyal hücre karsinomu (UCC) oluşturmaktadır. Bu tümörler yzeyssel (pTa ve pT1) ve kasa invaziv (pT2, pT3, pT4) olmak üzere sınıflandırılmaktadır. Yzeyssel tümörlerin çoğu operasyondan sonra tekrar oluşmaktadır. Fakat kasa invaziv olan tümörler yzeyssel tümörlere nazaran daha seyrek tekrarlayabilmektedir. İnvaziv tümörler yüksek dereceli yzeyssel tümörlerin ilerlemesi ile oluşmakta ve hastalıkta ölüm riski oluşturmaktadır (Ouerhani ve ark., 2009; Glifti ve ark., 2000).

Diğer kanser türlerinde olduğu gibi mesane kanserine yol açabilecek risk faktörleri bulunmaktadır. Bu faktörler,

- Kimyasal ajanlara maruz kalma (petrol, boya, deri sanayinde çalışanlar, arsenik vb)
- Sigara
- İleri yaş, erkek ve beyaz ırk
- Yağlı ve kızarmış yiyeceklerin aşırı tüketimi
- Genetik yatkınlık

- Karın alt bölgesine radyoterapi
- Kemoterapi uygulamaları
- Enfeksiyonlar
- Mesane taşı, uzun süreli tahriş
- Aşırı ağır kesici kullanımı
- Düşük sıvı tüketimi
- Doğum kusurlarıdır

Yukarıda sıralanan risk faktörlerinin mesane kanseri gelişimine büyük oranda etkisi vardır. Bu faktörlerin içinde ise sigara içmek ve cinsiyet ilk sırada yer almaktadır (Hsieh ve ark., 1999; McGrath ve ark., 2006; Ouerhani ve ark., 2009; www.cancer.org).

1.1. Mesane Kanserinin Patolojisi ve Fizyolojisi

Dünya Sağlık Örgütü'nün Ürolojik Patoloji Konsensus Sınıflandırılması Derneği (WHO/ISUP) 1998 yılında yaptığı sınıflandırmaya göre “tranzisyonel hücre” terminolojisinin “ürotelyal hücre”, “ürotelyum” olarak değiştirilmesi gerektiği belirtilmektedir. Mesanenin yapısını oluşturan epitel başka bir epitele dönüşmez, sadece tabaka sayısı değişmektedir. Bu nedenle tranzisyonel yerine ürotelyal epitel ve ürotelyal karsinom teriminin kullanılması önerilmektedir (Tablo 1.1).

Tablo 1.1. Mesanenin ürotelyal neoplazilerinde WHO/ISUP 1998 sınıflaması

(Yörükoğlu,2006)

•Normal
•Hiperplazi
Düz (“flat”)
Papiller
•Atipili düz lezyonlar
Reaktif (enflamatuvar atipi)
Anlamı bilinmeyen atipi
Displazi (Düşük dereceli intraepitelyal neoplazi)
Karsinoma in situ (Yüksek dereceli intraepitelyal neoplazi)
•Papiller neoplaziler
Papillom
İnverted papillom
Düşük malignite potansiyelli papiller ürotelyal neoplazi
Düşük dereceli papiller ürotelyal karsinom
Yüksek dereceli papiller ürotelyal karsinom
•İnvaziv neoplaziler
Lamina propria invazyonu
Muskularis propria invazyonu

Doku ve organlardaki hücre sayısının artışı ile ortaya çıkan büyümelere hiperplazi adı verilmektedir. Düz (“flat”) ürotel hiperplazi, sitolojik atipi olmadan önemli ölçüde kalınlaşmış mukozadan oluşur. Düşük malignite potansiyelli papiller ürotelyal neoplazi ile birlikte görülebilir fakat kendi başına malin potansiyeli olduğuna dair bir bilgi yoktur.

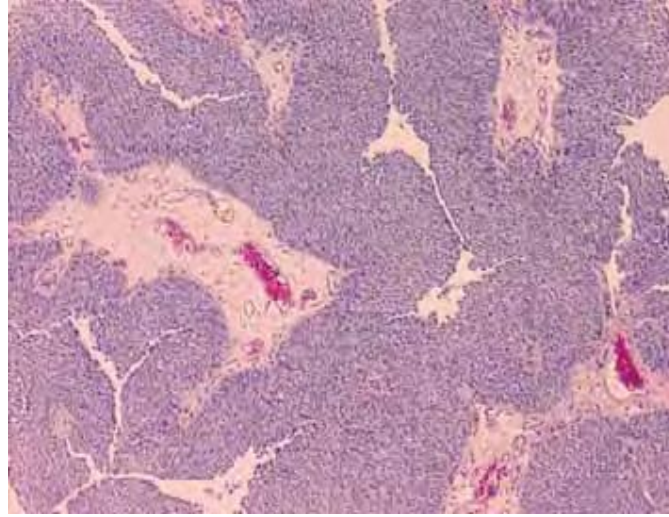
Displazi, neoplazmik olduğuna inanılan sitolojik ve yapısal anormallikleri gösteren fakat karsinoma *in situ*'ya ulaşmamış lezyonlardır.

Karsinoma *in situ* (CIS), ürotelin düz lezyonudur ve invazif kanser özellikleri gösterir. Mesanede birden fazla yerde ortaya çıkabilir.

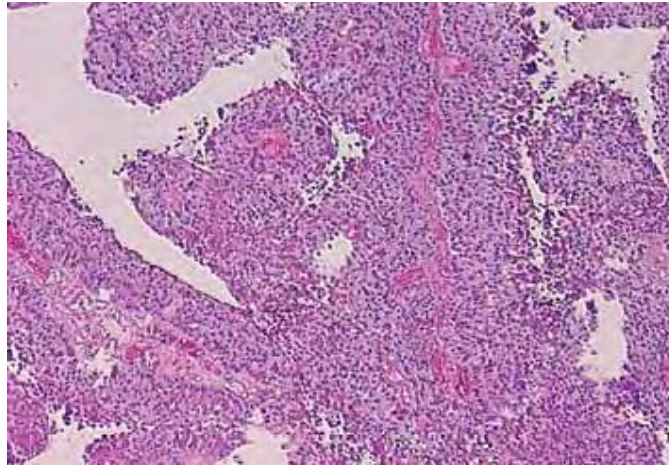
Papiler ürotel hiperplazi dalgalı bir büyüme ile değişen kalınlıktaki ürotel ile karakterize edilir.

Papilloma iyi huyludur. Değişici epitelyal bir tabakanın ince fibrovasküler bir sapla desteklendiği bir tümör tipidir.

Düşük dereceli ürotelyal karsinomlar, düzenli dizilim gösteren ancak yapısal ve hücrel atipisi kolayca fark edilen ürotelyumun döşediği papiller tümörlerdir (Şekil 1.1). Yüksek dereceli ürotelyal karsinomlarda ise yapısal ve hücrel atipi şiddetlidir (Şekil 1.2).

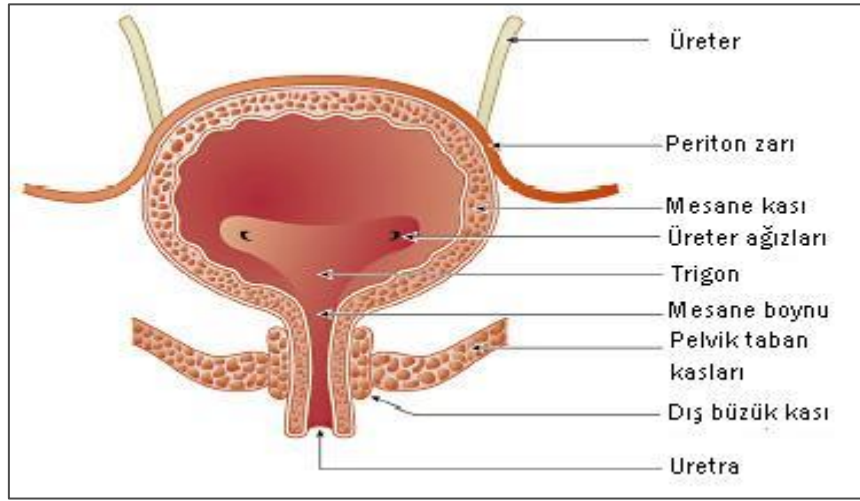


Şekil 1.1. Düşük dereceli ürotelyal karsinom (Yörükoğlu, 2006)



Şekil 1.2. Yüksek dereceli ürotelyal karsinom (Yörükoğlu, 2006)

Mesane, böbreklerde meydana gelen idrarın üreterlerle gelerek atılmadan önce toplandığı düz kaslardan yapılmış balon şeklinde kesedir. İdrar torbası, sidik torbası, *vesicae urinaria* gibi isimleri de vardır. Üreterler, mesanenin tabanında, kas duvarından içeri girer. Bunların giriş noktalarına çok yakın bir yerden idrarı dışarı akıtan üretra adlı kanal, mesaneden ayrılır. Leğen kemiğinin içinde ve karnın ön alt bölgesine yakın olarak yerleşmiştir. Normal erkekte, mesanede 300 ml kadar idrar olabilmektedir. Mesane duvarı düz kastan yapılmıştır. Kasılınca, idrar dışarı atılır. Mesane kasının gevşek olduğu zaman, yavaş dolan mesane, ani dolandan daha fazla genişleme yeteneğindedir (Guyton ve ark., 2003) (Şekil 1.3).



Şekil 1.3. Mesanenin Fizyolojik Yapısı (Erdoğan, 2013)

Mesane tümörlerinde tümörü evrelendirmek çok önemlidir. Bu nedenle mesane içerisine idrar yolu vasıtasıyla ışığı ve kamerası bulunan bir aletle girilmektedir. Mesanenin içinde yer alan tümör, rezektoskop adı verilen aletle kesi açılmadan yine idrar yolu vasıtasıyla çıkarılmaktadır. Bu işleme kısaca TUR adı verilmektedir. Bu işlemin yapılması amacı tümörün derecesinin bilinmesi ve ona uygun tedavi yönteminin seçilmesidir.

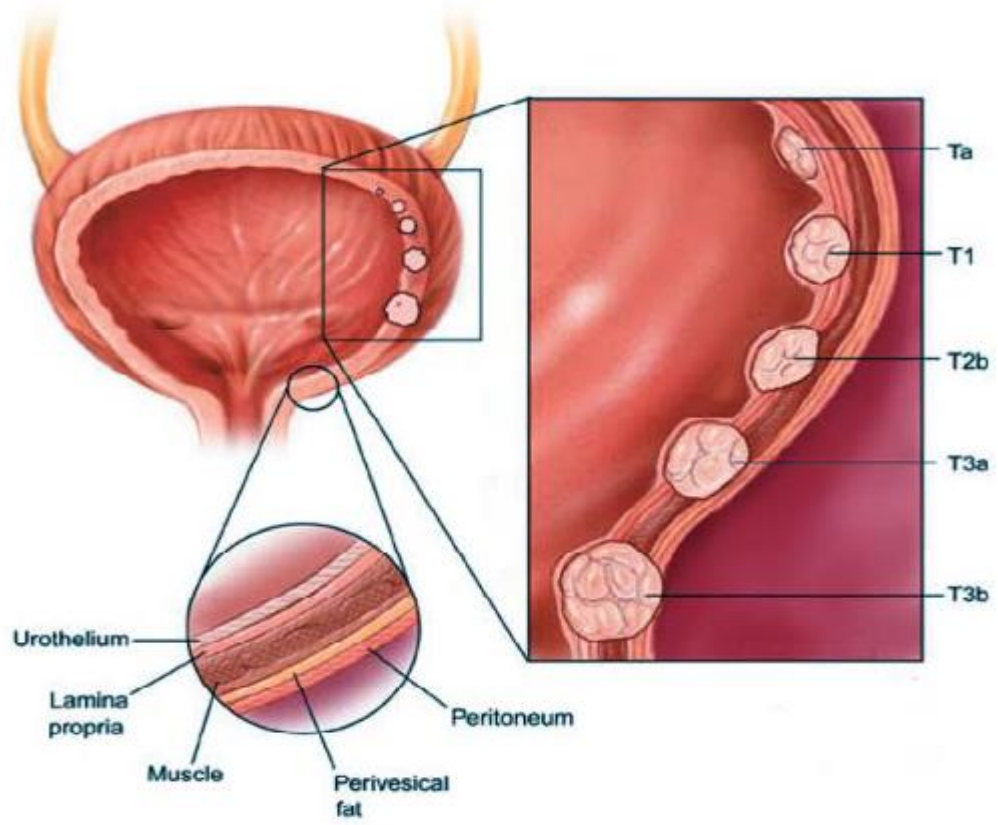
Evrelendirme için günümüzde “Union for International Cancer Control” (UICC) tarafından yapılan 2002 TNM sınıflandırması geniş kabul görmüştür (Sobin ve ark., 2002). T, tümörün mesanedeki durumu ve derinliğini; N, mesane kanserinin lenf bezlerine sıçrayıp sıçramadığını; M, tümörün uzak organlara yayılımının (metastazın) olup olmadığını ifade eder (Tablo 1.2).

Tablo 1.2. Mesane Kanseri 2002 TNM Sınıflandırması

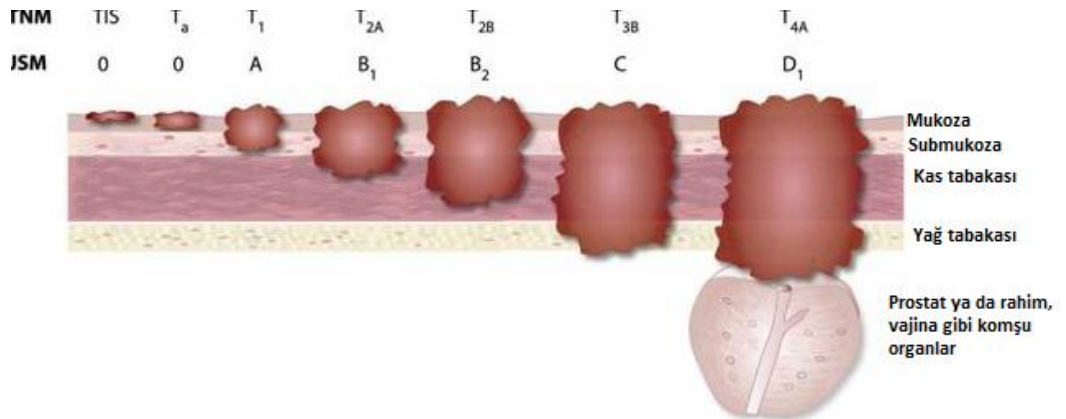
T – PRİMER TÜMÖR
TX Primer tümör değerlendirilemiyor
T0 Primer tümöre ait kanıt yok
Ta Non-invaziv papiller karsinom
Tis Karsinoma in situ: “flat” tümör
T1 Tümör epitel altı dokuyu tutmuş
T2 Tümör kas dokusunu tutmuş
T2a: Tümör yüzeysel kas dokusunu tutmuş (iç yarı)
T2b: Tümör derin kas dokusunu tutmuş (dış yarı)
T3 Tümör perivezikal dokuyu tutmuş
T3a: Mikroskopik olarak
T3b: Makroskopik olarak (ekstravezikal kitle)
T4 Tümör; prostat, uterus, vajina, pelvik duvar, abdominal duvar gibi yapıları tutmuş
T4a: Tümör prostat, uterus veya vajinayı tutmuş
T4b: Tümör pelvik duvar veya abdominal duvarı tutmuş
N – LENF NODLARI
NX Bölgesel lenf nodları değerlendirilemiyor
N0 Bölgesel lenf nodu metastazı yok
N1 Tek bir lenf nodunda 2cm veya daha küçük metastazlar
N2 Tek bir lenf nodunda 2 cm’den büyük, 5cm’den küçük metastazlar, ya da multipl lenf nodlarında 5cm’den büyük olmayan metastazlar
N3 Bir lenf nodunda 5 cm’den büyük metastazlar
M – UZAK METASTAZLAR
MX Uzak metastazlar değerlendirilemiyor
M0 Uzak metastaz yok
M1 Uzak metastazlar

Düz (yüzeysel) mesane tümörlerinin %70’i mukozaya sınırlı Ta tümörler iken, %30’u submukozal invazyon (iyi huylu tümörler) gösteren T1 tümörlerdir (Messing ve ark., 1998). T2 tümörler kas dokusunu tutmuş tümörlerdir. Tutunma yerlerine ve derecelerine göre ikiye ayrılır. T2a düz kas dokusunu tutunmuş (iç yarı), T2b ise derin kas dokusunu tutunmuş tümörlerdir (dış yarı). T3 perivezikal (mesaneyi çevreleyen) dokuyu tutunmuş tümörlerdir. T3a mikroskopik ve T3b

makroskopiktir (Şekil 1.4). T4 prostat, uterus, vajina, pelvik duvar, abdominal duvar gibi yapıları tutmuş tümörlerdir. T4a prostat, uterus veya vajinayı tutmuş, T4b pelvik duvar veya abdominal duvarını tutmuş tümörlerdir (Şekil 1.5).



Şekil 1.4. Mesane ve tümör tipleri (Erdoğan, 2013)



Şekil 1.5. Tümörün mesane duvarındaki yayılmasına göre sınıflaması (Erdoğan, 2013)

T1 tümörlerde 5 yıl içinde %95 oranında nüks gözlenmekte olup, Ta tümörlere oranla daha fazla nüks etme olasılığına sahiptir. Bunun yanı sıra T1 tümörlerde progresyon gelişme olasılığı daha yüksek olup, % 15–20 oranında evre progresyonu izlenebilmektedir (Heney, 1992).

Bazı çalışmalarda yüzeysel mesane tümörlerinde, ilk 1 yılda nüks gelişme olasılığı %33–56.9 (Loening, 1980), ilk 2 yılda %15–70 (Thompson ve ark., 1993), ilk 3 yılda %55 olarak bildirilmiştir (Kiemenev, 1993). 2 yıldan sonraki nüksler daha çok medikal öyküsü olan hastalarda (ağır sigara içiciliği, kimyasal ajanlara maruz kalma gibi) ortaya çıkmaktadır (Thompson ve ark., 1993). 3 yıl içinde T1 tümörlerde %60 nüks meydana gelirken, Ta tümörlerde bu oran %48 olarak bulunmuştur (Heney, 1992).

Ta Grade I tümörlerde %55 oranında nüks görülürken, nükslerin %46'sı ilk 12 ay içinde, %13'ü 12.–24. aylar arasında, %27'si 24.–60. aylar arasında gelişmektedir. Yüzeysel tümörlerde 4 yıldan sonraki dönemde de nüks görülebilmesi bu tümörlerin nüks potansiyeli hakkında fikir vermektedir (Holmang, 1995). Beş yıldan sonra da nüks gelişme olasılığı mevcut olup, bu oran %14'tür. Bu nedenle bu gruptaki hastaların 5 yıldan sonra da takibine devam edilmesinde fayda vardır. Az sayıda çalışmada ise, evre ve derecenin nüks açısından önemli bir prognostik faktör olmadığı sonucuna varılmıştır (Mulders ve ark.,1994; Heney, 1992).

1.2. Mesane Tümörünün Teşhisi

Mesane tümörü olan bir grup hastada görülen en belirgin semptom ağrı hissetmeksizin sık idrara çıkma ve idrarda kan görülmesidir. Bazı hastalarda idrarda çıplak gözle görülmeyecek miktarda kan hücreleri mikroskop altında görülmektedir. Bu hastaların % 10'unda malin tümör bulunur. Diğer bir grup hastada ise ağrılı ve sık idrara çıkma ile birlikte tam dolu mesane hissi bulunmaktadır. Yineleyici bakteriyel sistiti olan 50 yaş ve üzeri hastalarda altta yatan bir tümör olasılığı düşünülmektedir. Mesane tümörü olan hastaların %25'inde bu semptomlardan biri veya bir kaç gözlemlenmektedir.

Semptomların görüldüğü hastalarda iş yerinde kimyasal ajanlara maruz kalma (petrol, boya, deri sanayinde çalışanlar, arsenik vb) sigara, aşırı ağır kesici kullanımı, düşük sıvı tüketimi, önceki tümör rezeksiyonu bulguları hastanın öyküsü tanımlar. (Bailey ve Sarosdy, 2001). Duruma göre tam bir klinik tanı için idrar analizi, radyografik incelemeler, sistoskopi, transüretal rezeksiyon ve biyopsi yapılır.

1.3. Mesane Kanserinin Tedavisi

Hastalığın tedavisi ile iyileşme olasılığını etkileyen faktörler bulunmaktadır. Bu faktörler tümörün evresi, tipi ve patolojik özelliğine bağlıdır. Tümörün yüzeysel veya invaziv olması en önemli prognostik faktördür. Erken tanısı konulmuş mesane kanserlerinde uygun tedavi ile tedavi şansı çok yüksektir. Bazı tedavi yöntemleri halen daha klinikte tedavi amacıyla kullanılan standartlaşmış tedaviler iken, bazı tedaviler klinik uygulamaları için değerlendirme aşamasındadır.

Tümöre uygulanan tedavi yöntemleri; transüretal rezeksiyon (TUR) yöntemi tümörün sistostop kullanılarak çıkarılmasıdır. Sistoskopi başlığında anlatıldığı gibi mesaneye idrar yolundan ışık ve kamera içeren bir alet ile girilir ve mesane içerisinde izlenen tümör rezektoskop adını verdiğimiz bir alet ile hastanın cildinde herhangi bir kesi yapmadan bir işlem ile idrar yolundan dışarı çıkarılır.

Intravezikal tedavi, mesane içine ilaç verilerek kanser hücrelerinin öldürülmesine dayanan bir tedavi yöntemidir. Bu tümörler genellikle yüksek grade'li birden fazla sahada görülen tümörlerdir. Cerrahi işlem sonrası mesanede kalan tümör hücrelerinin tekrar çoğalarak tümör oluşturmaması ve mesanenin daha derin katlarına ilerleyerek çevre dokulara sıçramaması için özel tıbbi ilaçlar mesane içerisine verilerek kalan tümör hücreleri yok edilebilir. Tedavi sonrasında sıklıkla 3 ayda bir sistoskopi ve idrar sitolojisi tetkikleri yaptırılması gerekir.

İntravezikal tedavi amacıyla, günümüzde en sık kullanılan ilaçlar, Mitomycin-C, Thiotepa, Doxorubicin, Bacillus Calmette-Guerin (BCG) dir.

Sistektomi yöntemi, mesanenin ameliyat ile çıkarılmasıdır. Bu yöntemlerin dışında kemoterapi, ameliyat ile tedavi edilemeyecek derecede yayılımı olan veya ameliyat sonrası vücuda yayılma tespit edilen hastalarda kullanılır ve radyoterapi yöntemi ise, radyasyon enerjisi kullanılarak kanser hücreleri öldürülür. Bu etki doza bağlıdır. Radyasyon tedavisi tek başına ya da kemoterapi ile kombine ya da cerrahi tedavi öncesinde kullanılabilir. Radyasyon mesaneye direkt uygulanır ve böylece diğer alanlar daha az etkilenir (www.uroonkoloji.com).

1.4. Mesane Kanseri ile İlişkili Genler

İnsanlar birçok yabancı kimyasal maddeye veya ksenobiyotiğe maruz kalır. İlaçlar ksenobiyotik olarak değerlendirilir ve çoğu, insanlarda yaygın olarak metabolize edilir. İlaça yanıtta değişkenlik olduğunu fark eden farmakologlar, bir ilacın etkinliğini, populasyonun %50'sinde beklenen etkisini gösterdiği dozla ifade ederler; çünkü reçete edilen ilacın belirli bir dozunu alan bireyler arasında sıklıkla etkinin değiştiği görülmektedir. Eğer ilacın dozu çok az, doz aralığı yetersiz, ilacın biyoyararlılığı düşük veya metabolize olması ve atılımı hızlı ise; ilacın plazma konsantrasyonları minimum efektif konsantrasyonlara ulaşamayacaktır. Bu da beklenen tedavinin yetersizliği olarak karşımıza çıkacaktır. Aksine, ilacın dozu çok fazla, doz aralığı kısa, metabolize olması ve atılımı hızlı ise; bu ilaç yan etkilere neden olacaktır.

Farmakogenetik, genetik temelli ilaca yanıt değişikliklerini inceleyen, biyokimyasal genetiğin özel bir alanıdır ve genetik varyasyonlara bağlı olarak ilacın vücutta emilimi (yavaş- hızlı), metabolize edilmesi (yavaş-hızlı-çok hızlı), ilacın etki yeri reseptörleri (tam-yetersiz), ilacı ve metabolitlerini atma (yavaş-hızlı) yeteneğindeki farklılıkları inceler.

Genetik faktörler; ilaca yanıtta bireysel farklılıkların %20-40 kadarından, yan etkilerin %50'sinden sorumludur. İlaç-ilaç ve ilaç-besin etkileşimleri de çevresel faktörler olarak rol oynar. Tüm farmakogenetik farklılıklar, poligenik ve multifaktöriyel özelliklerdir. Yani en az iki major gen, yüzlerce modifiye edici gen ve çevresel etkenler söz konusudur. Farmakogenetikte kullanılan temel yöntemler klinik gözlem ile ilaca verilen yanıtın farklılığının saptanması, aile ve ikiz çalışmaları ile genetik ve çevresel faktörlerin etki oranlarının belirlenmesi, ilgili genlerin ve polimorfizmlerinin/mutasyonlarının belirlenmesi, sonuç olarak da genotip fenotip karşılaştırmalarını kapsar. İnsan genomunun birkaç bin metabolize edici gen içerdiği düşünülmektedir. Neredeyse hemen hemen tüm tedavi edici ajanların metabolize edilmesinde görev alan Faz I ve Faz II enzimlerinin yanı sıra hücrenin transport sistemleri ve reseptörlerindeki polimorfizmler ilacın yanıtında değişikliğe neden olacaktır.

Faz I enzimleri ile -OH, -COOH, -SH, -O- veya NH₂ gibi fonksiyonel gruplar ilaca bağlanır. Bu fonksiyonel grupların eklenmesi, ilacın suda çözünürlüğünü biraz artırır, ancak ilacın biyolojik özellikleri belirgin olarak değişebilir, bu da istenmeyen bir özelliktir. Faz I reaksiyonları, hidroliz reaksiyonlarında olduğu gibi işlevsel bir grubu ana bileşiğe sokar ya da ortaya çıkarır. Faz I reaksiyonları genellikle farmakolojik aktivitenin, yani ilacın etkisinin kaybına neden olur; ancak aktivitenin muhafaza edildiği örnekler de vardır.

Faz II enzimleri ilaçların eliminasyonunu ve oksidasyon sonucunda oluşan metabolitlerin inaktivasyonunu kolaylaştırır. Faz II reaksiyonları, ilaçların dokulardan eliminasyonunu kolaylaştıracak şekilde, suda çözünürlüğü ve moleküler ağırlığı artan metabolitlerin oluşumuna neden olur. Faz II konjugasyon reaksiyonları ana bileşik ya da Faz I metabolitinin üzerindeki işlevsel bir grup ve sülfat, aminoasit veya asetat arasında kovalent bir bağlanma oluşmasına neden olur. Bunların fazlası idrar ya da dışkı ile dışarı atılır.

Moleküler onkolojide yapılan ilk çalışmalar onkogenler üzerinde yapılmıştır. Onkogenler normal hücre genleridir, fakat normal gen ürününün

aşırı ekspresyonu veya protein ürününün değişmiş fonksiyonu malin fenotip ve tümör oluşumuna yol açar. Normal gen ürününün aşırı ekspresyonu genellikle gen bölgesindeki kromozomal translokasyon veya gen amplifikasyonu ile gerçekleşir. Mesane tümörü ile ilgili metabolik genler, enzimler ve polimorfizmler tanımlanmıştır. Belirtilen genler;

1.4.1. Glutasyon S-Transferaz

Sitozolik glutasyon transferazlar (GST) faz II enzimlerinin bir süper-ailesidir. Çoğu alt aileleri polimorfik izoenzimleri içerir. Bu enzimlerdeki genetik polimorfizmler kanser, kardiyovasküler ve solunum hastalıklarına kişisel yatkınlığı etkiler. GSTM1, benzopiren gibi karsinojenik polisiklik aromatik hidrokarbonları detoksifiye eder. GSTT1, etilen oksit gibi daha küçük reaktif hidrokarbonları detoksifiye eder. GSTP1, birçok zenobiyotiğin konjugasyonu ve detoksifiyasyonu ile alakalıdır. GSTM1, GSTT1 ve GSTP1 genlerindeki polimorfizmler pek çok kanserde göreceli olarak risk faktörüdür. GSTM1 ve GSTT1'in "null" alelleri özellikle sigara tiryakilerinde mesane kanseri için risk faktörüdür. GSTP1'in mesane kanseri için risk faktörü oluşturup oluşturmadığını anlamak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır. GSTM1 ve GSTT1 genlerindeki polimorfizmler enzim aktivitesinin azalmasına özellikle her iki gendeki homozigot delesyonlar (null genotip) enzimin tamamen aktivitesini kaybetmesine neden olmaktadır. Bu da sigara ile ilişkili kanser hastalıklarının oluşumuna zemin hazırlamaktadır.

1.4.2. Sitokrom P-450 Genleri

Sitokrom P-450 genlerinin yapısında hem proteinlerden oluşan enzim grubu, hem de polipeptit zincirinde sisteinin sülfidril (SH) içeren demir bulunur. Bunlar 450 nm'de en büyük absorpsiyon bandına sahip karbonmonoksit kompleksi oluştururlar. Bu enzimler hayvan dokularında (adrenal bez, karaciğer hücresinin mitokondri ve mikrozomlarında) bitkilerde ve mikroorganizmalarda yaygın şekilde bulunur. Karsinojenlerin, mutagenlerin ve ilaçların zehir etkisini bozar. Sitokrom P-450 (CYP450) enzimleri, faz I ilaç metabolizmasını katalizleyen en

önemli enzimler olan karaciğerdeki mikrozomal enzim süper ailesindedir (Yüksel, 2001).

1.4.3. Metilentetrahidrofolat Redüktaz

Metilentetrahidrofolat redüktaz (MTHFR), 5,10-metilentetrahidrofolat'ı (deoksitimidin monofosfat sentezinde metil donörüdür) 5-metiltetrahidrofolat'a çevirir. Folat eksikliği DNA zincirinin kırılmaları ve urasilin DNA bağlanması ile alakalıdır. Eğer bir MTHFR polimorfik varyantı enzimatik aktiviteyi düşürerek hücrede folat seviyesini düşürürse DNA zincirinin kırılma eğilimini ve kanser oluşumu olasılığını artırır. Diğer yandan varyant MTHFR aktivitesi metil donörleri miktarını etkileyebilir ve sonuç olarak bir anahtar tümör baskılayıcı veya promotörün metilasyon durumunu değişmesine yol açarak mesane karsinogenezine dahil olabilir (İzmirli ve ark.,2011) (www.dartmouth.edu). MTHFR genindeki 677C>T ve 1298A>C polimorfizmleri enzim aktivitesini düşürmektedir. Özellikle MTHFR genin yaygın iki polimorfizmi olan MTHFR C677T ve A1298C polimorfizmleri ile serebrovasküler hastalıklar, venöz tromboz, nöral tüp defektleri, diabet, kanser ve migren gibi bazı hastalıklar arasındaki ilişki vurgulanmıştır (Dikmen, 2004).

1.4.4. N-asetiltransferazlar

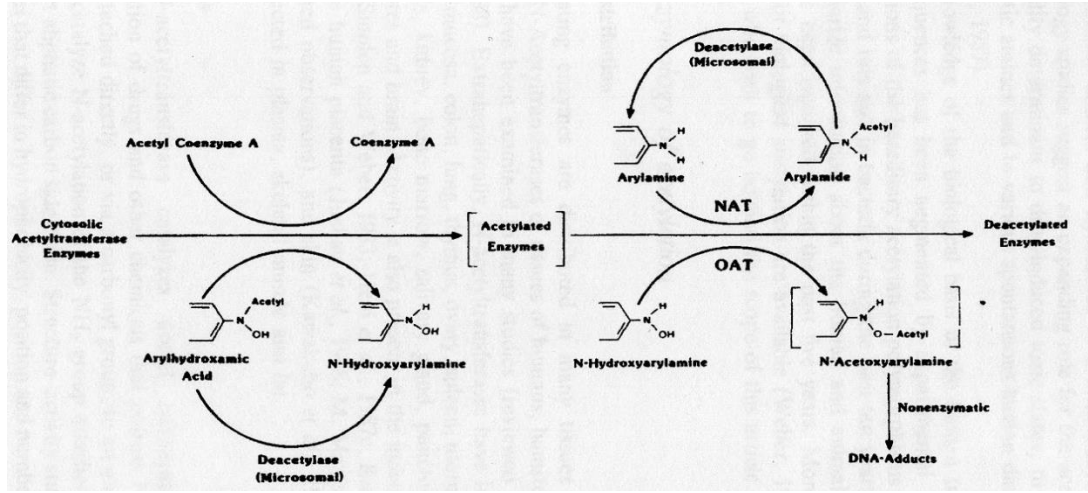
N-asetiltransferaz (NAT) intronsuz protein kodlayan tek ekzon ürünüdür. Farklı iki gen tarafından kodlanır. NAT 1 ve NAT 2 olarak adlandırılan bu iki gen, yapısal olarak birbiriyle benzerlik göstermektedirler (Weber ve ark.,1985).

N-asetiltransferaz geni 8p22 kromozom bölgesinde yerleşik olup, organ ve dokulardaki ifade dağılımları farklıdır. NAT1 çoğu dokuda bulunurken, NAT2 karaciğer ve bağırsakta bulunur. Aminlerin N-asetilasyonunu (genellikle deaktivasyon) ve O-asetilasyonunu (genellikle aktivasyon) katalize ederler (Franekova ve ark., 2008). Katalitik etkilerini, N-ucu bağlanması ile arilaminlerin nitrojen atomuna asetil bağlayıp toksik olmayan N-asetatlar oluşturarak gösterirler. NAT1 enzimi asetil-CoA'dan bir asetil grubunu, içinde folat katabolit paminobenzoilglutamat'ın da bulunduğu arilamin ve hidrazin substratlarına transfer eder (Joanna ve ark.,2003).

Asetiltransferaz tepkimeleri arilaminlerin ve hidrazinlerin N- ve O-asetilasyonu ve N-hidroksilaminleri içermektedir. Sitokrom P450 enzimleri ile oksidasyona uğramalarını takiben asetillenen arilaminlerin, N-Asetilasyon ile vücuttan atılımı kolaylaştırılır ya da O-asetilasyon ile ileri bir oksidasyona maruz kalarak etkinliği artırılır. Arilamin N-konjugasyonu toksik olmayan, stabil N-asetamid olarak adlandırılan N-asetoksi esterlerini (arilamidler, hidrazidler) oluşturur (Meyer, 1994).

N-Asetoksi metabolitleri kararsız olup DNA ile etkileşime girerek tek reaksiyon yapılarını meydana getirir ya da oksijen atomlarının asetillenmesiyle (O-Asetilasyon) veya N,O-Asetilasyon ile daha etkin bir yapıya dönüşürler. Böylece, aril nitrenyum olarak adlandırılan ve önemli kanserojen etkiye sahip bileşikleri meydana getirirler. NAT asetilasyonunun, birçok arilamin ve hidrazin grup ilaçların aktivasyonu ve/veya deaktivasyonunda birincil görev alması sebebiyle, klinik farmakoloji ve toksikolojide önemli bir yeri vardır (Sun ve ark., 2011).

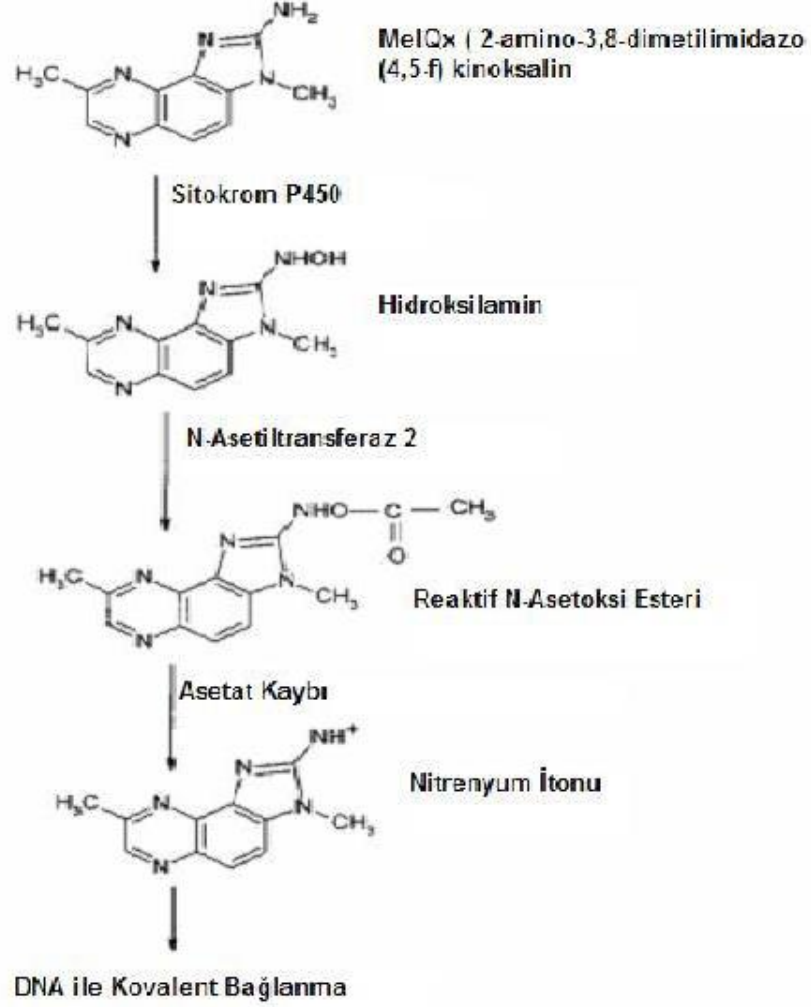
Faz II enzimlerinden biri olan NAT2, heterosiklik arilaminlerin tümör başlangıcıyla alakalı önemli karsinojenler olan elektrofilik nitrenyum iyonlarına biyo-dönüşümünde rol oynarlar. NAT2 çok çeşitli aromatik aminlerin, heterosiklik aminlerin ve hidrazin ilaçların aktivasyon ve deaktivasyonunu katalize eder. NAT2 genindeki bir amino asit değişimi sıklıkla enzim fonksiyonunda aksamaya sebep olur. Homo ve heterosiklik aminler / Hidrazin grubu ilaçlar, çevresel kimyasallar (özellikle tekstil ve boya endüstrisinde yer alan) ve besinlerin pirolizi ile oluşan heterosiklik aminler NAT2 enziminin hedef moleküllerini oluşturur. Çok pişmiş etler, sigara dumanı ve diğer çevresel kaynaklarda bulunan arilaminler, karsinojenik etki oluşturacak elektrofillere dönüşebilmeleri için metabolik aktivasyona ihtiyaç duyarlar. Arilamin metabolizmasında birçok asetiltransferaz tepkimesi vardır ve her biri enzimolojisi, genetik düzenlenme, toksikolojik önemi irdelenerek araştırılmaktadır. Bu yüzden, asetilasyon polimorfizmi hem aktivasyon hem de deaktivasyon yollarını etkiler (Jason ve ark., 2007) (Şekil 1.6).



Şekil 1.6. Asetil transferaz reaksiyonu

NAT asetilasyonunun, birçok arilamin ve hidrazin grup ilaçların aktivasyonu ve/veya deaktivasyonunda birincil görev alması sebebiyle, klinik farmakoloji ve toksikolojide önemli bir yeri vardır (Sun ve ark.,2011).

Heterosiklik aminlerden MelQx (2-amino-3,8-dimetilimidazo(4,5-f) kinoksalin) in nitrenyum şekline dönüşmesi Şekil 1.7.'de görülmektedir.



Şekil 1.7. Heterosiklik Aminlerden MelQx (2-amino-3,8-dimetilimidazo(4,5-f) kinoksalin)in nitrenyuma dönüşmesi

İnsan popülasyonları bireysel asetilasyon kapasitelerine göre farklı gruplara ayrılmışlardır. Ksenobiyotiklerin aktive edilebilme kapasitelerine göre hızlı, orta ve yavaş asetilleyici fenotipler tanımlanmıştır. Homozigot yabanıl tip genotipe sahip bireyler hızlı asetilleyici, heterozigot tipe sahip (bir aleli yavaş diğeri hızlı

olan) bireyler orta asetilleyici, homozigot varyant genotipe sahip bireyler ise yavaş asetilleyici olarak sınıflandırılmıştır (Özbek ve ark., 2010).

Literatürde 13 SNP'ye dayanarak 30 tane NAT2 aleli tanımlanmıştır (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1380286/table/TB1/>).

NAT varyantlarının kanserde kişisel yatkınlığı değiştirdiği düşünülmektedir. Yavaş NAT2 asetilasyon kapasitesi, kolon kanseri riskini düşürürken mesane, meme, karaciğer ve akciğer kanseri riskini artırmaktadır. NAT1 aktivitesinin artması ise akciğer kanseri riskini azaltırken mesane ve kolon kanseri riskini artırmaktadır.

Avrupa popülasyonunda NAT2*5B (481C>T ve 803A>G), NAT2*6A (282C>T ve 590G>A) ve NAT2*7A (857G>A) alelleri bu fenotipleri temsil eden en önemli alellerdir (Thier ve ark., 2003; Franekova ve ark., 2008). Mesane kanseri için risk faktörü olduğu bilinen, sigaradan alınan aromatik aminler NAT enzimleri ile metabolize edildiğinden, NAT polimorfizmlerinin sigara içimiyle alakalı mesane kanserine yatkınlıkta rol oynaması muhtemeldir (Franekova ve ark., 2008; Vinata ve ark., 2011).

NAT 2 alellerinin tasarlanması, 481T ve 803G'nin 341T ile ve 590A ve 857A'nın 282T ile bağlantılı olduğu tahmini yönündedir. Çok polimorfizimli genotiplerin birbiriyle farklı bir arada bulunmaları ile ortaya çıkan farklı haplotipleri, bireysel fenotip tahmininde ve NAT 2 allel tasarımında tartışmalara yol açmıştır. Örneğin; 12 A ve 13 fenotiplerini tanımlayan 803G ve 282T polimorfizmlerinin siyah güney Afrikalılarda yüksek oranlarda bulunduğu ve bu nükleotid değişimlerinin Avrupa popülasyonlarında diğer mutasyonlarla yakından ilişkili olduğu belirlenmiştir (Loktinov ve ark.,2001).

Yapılan bazı çalışmalar 6E ve 5G gibi yeni fenotiplerin ortaya çıkmasını sağlamıştır (Dandara ve ark.,2003). Bu gelişmeler; birçok etnik toplulukta gözlenen genotip-fenotip uyumsuzluğunun beklenmeyen birleşik alellerden kaynaklandığını göstermektedir (Anitha ve ark.,2003).

Yaklaşık yarım asırdır süregelen epidemiyolojik çalışmalar, NAT 2 genotipleri ve bireylerin asetilasyon kapasiteleri arasında ortak sonuçlara varmışlardır. Buna göre; NAT 2*4 fenotipi, hiçbir tek nükleotid polimorfizmini (SNP) içermeyen doğal tipi oluşturmaktadır. T341C içeren tüm NAT 2*5 ailesinin, N-asetilasyon, O-asetilasyon ve N,O-asetilasyon işlevlerinde en fazla azalmaya neden olan aile olduğu, bunu G191A içeren NAT 2*14 ailesinin, G590A içeren NAT 2*6 ailesinin ve G857A içeren NAT2*7 ailesinin sırasıyla takip ettiği belirtilmiştir. Ayrıca, nükleotid değişimlerinin protein ifadesi ve stabilitesi ile ilişkisi de belirlenmiştir. 341C, 434C ve 590A polimorfizmlerinin protein ifadesini azalttığı; 191A, 845C, 857A polimorfizmlerinin ise NAT 2 protein stabilitesini (kararlılığını) azalttığı belirtilmiştir. Bu sonuçlar, insandaki yavaş asetilleyici fenotipin homojen olmadığını, belirli SNP ve alellerin kalıtımına bağlı birçok fenotipten meydana geldiğini göstermektedir (Anitha ve ark.,2003).

NAT 2 genotipleri popülasyonlar arasında farklılık göstermekle birlikte, en iyi beyaz ırkta tanımlanmıştır. Hızlı asetilasyon genotipinin beyaz ırkta NAT 2*4 olarak gözlemlendiği belirtilmiştir. Hızlı asetilasyonun Asya popülasyonunda en sık görülüşü, bu sıklığın bazı etnik topluluklarında %90'a ulaştığı bilinmektedir. ((Loktinov ve ark.,2001; Jiao ve ark., 2007).

Yavaş asetilasyon ise, Kuzey Afrika ve Ortadoğu topluluklarda çoğunluğunda gözlemlenmiştir (Dandara ve ark.,2003). NAT 2 yavaş asetilleyici fenotipi, özellikle mesane, kolorektal, pankreas, akciğer, meme, bas ve boyun skuamöz kanseri olmak üzere birçok kanser için risk etkeni olmuştur.

NAT 2 yavaş asetilleyici fenotipinin mesane kanseri riskini arttırdığı, mesane kanseri riskinin NAT 2*5 genotiplerine sahip bireylerde daha fazla olduğu bildirilmiştir (Hein,2003).

Ayrıca 2007' de yapılan bir çalışmada, NAT2*6A ve herhangi bir yavaş genotipten oluşan karma bir genotipin diyabet geçmişi olan kişilerde pankreas kanseri riskini arttırdığı gözlemlenmiş; bu riskin sigara içenlerde oluşup sigara içmeyenlerde oluşmadığı belirtilmiştir. Başka bir çalışma, Türkiye' deki Tip 2 Diyabet hastalarında özellikle 282T ve 590A nükleotid değişimini içeren

NAT2*6A alleli başta olmak üzere yavaş genotiplerin 5 kat daha fazla diyabet riski taşıdığını ortaya koymuştur (Jiao ve ark., 2007).

1.5. Mesane Kanseriyle İlişkili Diğer Faktörler

Mesane kanseri, kapsamlı epidemiyolojik araştırmalar yapılan ilk kanser türlerinden biridir. Sigara içimi, kronik enfeksiyonlar ve meslek yüzünden maruz kalınan kimyasallar mesane kanserine yol açan faktörlerdir. Günümüzde tüketilen gıdalar da mesane kanserine yol açmaktadır. Tatlandırıcı (sakkarin) böbreklere zarar verdiği gibi mesane kanserine de yol açmaktadır. Kahve ile mesane kanseri arasında ki ilişki tam olarak belli değildir fakat Türkiye’de yapılan çalışmalarda ise kahve tüketim miktarına bağlı olarak içenlerin içmeyenlere göre mesane kanserine yakalanma olasılıkları yüksektir (<http://www.cancer.gov/>) (Eser ve ark., 2012).

1.5.1. Sigara Tüketimi

Sigara, uzun yıllardır mesane kanserine yol açtığı bilinen bir karsinojendir. Sigara içen kişiler, içmeyenlere göre yaklaşık dört kat mesane kanserine yakalanma riski taşımaktadır. Sigara tüketimine bağlı olarak artan riskin sigaranın miktarına, içilen zaman aralığına ve içilen tütüne göre değiştiği savunulmaktadır. Sigara dumanıyla birlikte vücuda pek çok kimyasal alınmaktadır. Bu nedenle sigara içiminin mesane kanseri mekanizması üzerindeki etkisi kesin olarak bilinmemektedir, fakat bu kimyasallardan 2-naftilamin ve 4-aminobifenil en şüpheli iki kimyasal ajan olarak görülmektedir. (Zeegers ve ark., 2004).

Diğer tütün ürünleri ve mesane kanseri arasında henüz bir bağlantı bulunamamıştır. Diğer tütünlerin de sigara tütünü ile yaklaşık aynı içeriğe sahip olması nedeniyle pipo ve puro gibi diğer tütün alışkanlıklarının biyolojik olarak mesane kanserine yol açması olasıdır. Fakat puro ve pipo içenlerin dumanı sigara içenlerden çok daha az solumaları, bu kişilerde mesane kanseri yerine baş/boyun

gibi lokal kanserlerin görülmesini açıklayabilir. Ayrıca pasif içicilerin de kan ve idrarlarında mutajenler tespit edilmiştir (Zeegers ve ark., 2004).

1.5.2. Cinsiyet ve Yaş

Yapılan çalışmalarda 2006 yılında mesane kanseri erkeklerde yüz binde 19.6, kadınlarda yüz binde 2.5 olarak tahmin edilmiştir. Erkeklerde en sık görülen üçüncü kanser türü olup, tüm kanserler içindeki payı %8.5'tir. Kadınlarda ise 13. sırada yer almaktadır. Bu özellikle endüstrileşmiş ülkeler için doğrudur ve mesleki faktörü düşündürmektedir, fakat yapılan bazı çalışmalar meslek ve sigara için düzeltme yapıldıktan sonra bile erkeklerde mesane kanseri oranını daha fazla bulmuştur (Eser ve ark., 2011).

Yapılan araştırmalar mesane kanseri vakalarının üçte ikisinin 65 yaş üstü kişilerde görüldüğünü tespit etmiştir. 55 ve 69 yaşındaki kişilerle karşılaştırıldığında 70 yaş üstündeki bireylerde mesane kanseri için üç kat daha fazla risk görülmüştür. 30 ve 54 yaş arası bireylerle karşılaştırıldığında ise risk göreceli olarak daha fazladır (Eser ve ark., 2012).

1.5.3. Aile Öyküsü

Aile öyküsü de mesane kanseri riskini arttıran bir faktördür. Mesane kanserli hastaların birinci derece akrabalarında mesane kanseri gelişme riski, ailede bu hastalığa yakalanmış kişi bulunmayanlarla karşılaştırıldığında iki kat fazladır. İndeks olgu genç yaşta olduğu zaman riskin daha da arttığı bildirilmektedir. Mesane kanserinin gelişmesine yol açan genetik olayların niteliği tam olarak aydınlatılamamakla birlikte, çok sayıda onkogenlerin ve tümör süpresör genlerin çeşitli seviyelerdeki mutasyonlarının önemli rol oynadığı düşünülmektedir (Jerzy ve ark., 2003).

1.5.4. İdrar Yolu Hastalıkları

Geçirilen idrar yolu hastalıkları da mesane kanseri için bir risk faktörüdür. *Schistosoma hematobium* adlı parazit mesane epitelinde kronik enflamasyona sebep olmaktadır. Diğer enfeksiyonlar, idrar yolu ve böbrek taşları, mesane kanseri riskini çok az yükseltmektedir. Üriner sistem enfeksiyonları ve taşları ile

kalıcı katater uygulaması, mesane epitelinde irritasyona neden olabileceği için mesane kanseri riskini artırabileceği bildirilmektedir. ABD’de, üriner sistem enfeksiyonu öyküsü olan kişilerde, özellikle üç ve daha fazla enfeksiyon durumunda mesane kanseri riskinin iki kat arttığı belirlenmiştir. Ayrıca böbrek taşları riski etkilemezken, üriner sistem taşlarının anlamlı olarak yükselttiği bildirilmiştir (Eser ve ark., 2012).

1.5.5. Diyet ve İlaçlar

Yapılan çalışmalarda meyve ve sebze tüketiminin mesane kanseri ve diğer kanser türlerinin riskini azalttığını göstermiştir. Bol sıvı alımı da mesane kanseri riskini azaltmaktadır, çünkü ürinasyonu arttırmakta, dolayısıyla da mesane epiteli ve karsinojenlerin birbiriyle temas süresini azaltmaktadır. (Olfert ve ark., 2006).

Fenasetin (anilin boyalarına kimyasal yapı açısından benzerlik gösterir) içeren analjezik preparatlarından on yıllık süre içinde 5-15 kg tüketilmesi mesanenin değişici hücreli karsinomu ile ilişkilendirilmiştir. Buna karşın fenasetinin en önemli metaboliti olan asetaminofen (parasetamol) kullanımının riski artırmadığı saptanmıştır. Siklofosomid tedavisi almış hastalarda mesane kanseri riski yaklaşık 9 kat artmasına karşın, olgu kontrollü epidemiyolojik çalışmalarla bu ilişki gösterilememiştir (Eser ve ark., 2012).

1.5.6. Mesleki Faktörler

Meslek faktörü mesane kanseri için büyük risk sayılmaktadır. 1954 yılında kimya endüstrisinde çalışanlarda β -naftilaminin mesane kanseri riskini 200 kat arttırdığı gösterilmiş ve 1985 yılında ilk defa Alman cerrah Rehn, magenta üreticilerinde artmış mesane kanseri oranlarına dikkat çekmiştir (Case ve ark., 1954).

β -naftilamin, kömür ve kömür katranının distilasyonu ile elde edilen bir aromatik amindir. Karsinojenik etkileri yüzünden endüstride kullanımı İsviçre,

İngiltere ve İtalya gibi pek çok ÷lkede yasaklanırken Amerika gibi bazı ÷lkelerde de kullanımı kısıtlanmış ve denetim altına alınmıştır. Boyalar, metaller, endüstriyel yağlar ve polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH) da mesane kanseri riskinin artmasına neden olmaktadır. Sonuç olarak maden işçileri, baca temizleyiciler, ocakçılar, demirciler, zift ve asfalt yapanlar gibi pek çok endüstriyel meslek sahibi PAH'lara maruz kalmaktadır. Boyayla alakalı üretimde, kauçuk ve kablo üretiminde, tekstil ve deri işlerinde, kömür, alüminyum ve petrol endüstrilerinde kullanılan kimyasallara maruz kalanların kansere yakalanma riskleri diğer insanlara göre daha fazla artmaktadır (Eser ve ark., 2012).

2. AMAÇ

Mesane kanseri, dünyada en çok görülen kanser türleri arasında yer almaktadır. Bu kanser türü erkeklerde daha fazla görülmektedir. Yapılan pek çok çalışma sigara içimi, meslek ve diğer çevresel faktörler sebebiyle maruz kalınan kimyasalların mesane kanseri için çevresel risk faktörü olduğunu göstermiştir. Mesane kanserine yatkınlık teşkil eden genetik faktörlerin başında ise ksenobiyotik metabolizmasında rol oynayan genlerdeki polimorfizmler gelmektedir. N-asetiltransferaz 2 (NAT2), arilaminlerin ve heterosiklik aminlerin detoksifikasyonunda işlev gören Faz II enzimlerindenidir. NAT2 çeşitli aromatik aminlerin, heterosiklik aminlerin ve hidrazin ilaçların aktivasyon ve deaktivasyonunu katalize eder, heterosiklik arilaminlerin tümör başlangıcıyla alakalı önemli karsinojenler olan elektrofilik nitrenyum iyonlarına biyodönüşümünde rol oynar. NAT2 geni polimorfizmleri bireylerin yavaş, orta ve hızlı asetilasyon fenotiplerine gruplandırılmasını sağlayan N-asetilasyon polimorfizmleridir.

Bu tez kapsamında NAT2 481C>T, 590G>A ve 857G>A polimorfizmlerinin ve bu polimorfizmlerin oluşturduğu asetilasyon fenotiplerinin mesane kanseri riskine etkisi olgu-kontrol grupları ile araştırılacaktır. Bununla birlikte yaş, cinsiyet ve sigara kullanımının mesane kanseri oluşumundaki katkıları belirlenecek ve sigara kullanımı ile tümör evresi bilgileri asetilasyon fenotipleri ile ilişkilendirilecektir.

3. GEREÇLER

3.1. Çalışma İçin Seçilen Örneklerin Tanımı

Bu çalışmaya dahil edilen hasta grubu kan örnekleri 2010-2012 tarihleri arasında Bağcılar Eğitim ve Araştırma Hastanesi Üroloji Kliniği'nde takip edilen ve mesane kanseri teşhisi konulan 129 hastadan gönüllü onam formu imzalanarak alınmıştır. 129 hastadan EDTA'lı tüp içine 5ml kan örneği alınmıştır. Her hasta için yapılan ankette hastanın yaşı, cinsiyeti, mesleği, vücut kitle indeksi, sigara-alkol kullanımı, hastalık evresi, tümör derecesi ve nüks bilgileri elde edilmiştir.

Kontrol grubu için ise 148 gönüllü sağlıklı bireyden gönüllü onam formu imzası ile swab yardımıyla yanak içi epitel hücreleri alınmıştır. Her birey için yapılan ankette bireyin hastanın yaşı, cinsiyeti, mesleği, vücut kitle indeksi, sigara-alkol kullanımı bilgileri ve sağlık durumları, kanser açısından aile öyküleri sorgulanmıştır.

3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Bu çalışmada kullanılan tüm kimyasallar moleküler biyoloji kalitesindedir.

3.3. Kullanılan Cihazlar

Buzdolapları	: Beko 8742 Arçelik 3061 Plus (TÜRKİYE)
Derin Dondurucular	: -20°C, 2021 D (Arçelik, TÜRKİYE) -20°C, GSD26410NE (Bosch, ALMANYA)

Dokümantasyon Sistemleri	: Bio-RAD Universal Hood II (BIO-RAD, ITALYA)
	: Loccus Biotechnologia Gel Imaging Systems (Brezilya)
Otoklav	: Dik Tip Otoklav (BES, TÜRKİYE)
Tartılar	: Hassas Terazi, XB 220 A (Presica, İSVİÇRE)
	: Terazi, KB 400-2 (KERN, ALMANYA)
Santrifüjler	: Mikrosantrifüj, MiniSpin Plus (Eppendorf, ALMANYA)
Yatay Elektroforez Sistemleri	: Sub-Cell GT (BIO-RAD, İTALYA)
Isı Bloğu	: DB 2D (Techne, İNGİLTERE)
Güç Kaynakları	: EPS 301 (Amersham Pharmacia Biotech, İSVEÇ)
	: PowerPac Basic (BIO-RAD, İTALYA)
	: PowerPac Universal (BIO-RAD, İTALYA)
Manyetik Karıştırıcılar	: MR 3001 (Heidolph, ALMANYA)
Spektrofotometreler	: Implen nanophotometer (ALMANYA)
Thermo-Cyclers	: Techne TC-512 (İNGİLTERE)
	: Applied Biosystems (AMERİKA)
Vorteks	: Heidolph REAX (ALMANYA)

Su Banyoları : Nüve BM 402 (TÜRKİYE)
Su Arıtma Sistemi : Millipore Milli Q Synthesis A10
(FRANSA)

3.4. Agaroz Jel Elektroforezinde Kullanılan Malzemeler

10X TBE (Tris-Borik asit-EDTA) : 890 mM Tris-Base,
890 mM Borik Asit,
20 mM Na₂EDTA.2H₂O, (pH 8.3)
10X Bromofenol Mavisi (BPB) : 2.5 mg/ml BPB
Etidyum Bromid (EtBr) : 10 mg/ml
% 1 veya 2'lik Agaroz Jel : 0.5 X TBE Tamponunda % 1,% 2
ve % 3 (w/v) agaroz

3.5. Kullanılan Enzimler, Tamponlar ve Primerler

3.5.1. Yanak içi Epitel Hücrelerinden DNA Eldesinde Kullanılan Tamponlar

Hücre Lizis Tamponu (pH 8.0) : 10 mm/L Tris-HCl,
% 11 (w/v) Sükroz,
5 mm/L MgCl₂
% 1 (v/v) Triton X-100

Hücre Çekirdeği Lizis Tamponu (pH 8.0)	: 10 mm/L Tris-HCl, % 1 (w/v) SDS, 10 mm/L EDTA, 10 mm/L Sodyum Sitrat
Sodyum Klorür (NaCl)	: dH ₂ O'da 5M
Kloroform (CHCl ₃)	: Saf kloroform (% 100)
İzopropanol (C ₃ H ₈ O)	: Saf izopropanol (% 100)
TE Tamponu	: 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.1mM EDTA (pH 8.0)

3.5.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Malzemeleri

10X MgCl ₂ 'süz Tampon	: 750 mM Tris-HCl, (pH 8.8) 200 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ % 0.1 Tween 20, (Fermentas, LİTVANYA)
MgCl ₂	:dH ₂ O'da 20 mM (Fermentas, LİTVANYA)
Deoksiribonükleotidler (dNTP)	: 100 mM dATP, dCTP, dGTP ve dTTP (Fermentas, LİTVANYA)
Taq DNA Polimeraz	: Rekombinant Taq DNA Polimeraz (Fermentas, LİTVANYA)

3.5.3. Restriksiyon Enzimleri ve Reaksiyon Tamponları

KpnI	: 10 U/μl (Fermentas, LİTVANYA)
KpnI Reaksiyon Tamponu	: Buffer Tango (Fermentas, LİTVANYA) 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM MgCl ₂ , 0.02% Triton X-100, 0.1 mg/ml BSA
KpnI Tanıma Dizisi	: 5'...G GTAC [^] C... 3' 3'...C [^] CATG G... 5'
BamHI	: 10 U/μl (Fermentas, LİTVANYA)
BamHI Reaksiyon Tamponu	: Buffer Tango (Fermentas, LİTVANYA) 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM MgCl ₂ , 0.02% Triton X-100, 0.1 mg/ml BSA
BamHI Tanıma Dizisi	: 5'...G [^] GATC C... 3' 3'...C C TAG [^] G... 5'
TaqI	: 10 U/μl (Fermentas, LİTVANYA)
TaqI Reaksiyon Tamponu	: Buffer Tango (Fermentas, LİTVANYA) 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM MgCl ₂ , 0.02% Triton X-100, 0.1 mg/ml BSA

TaqI Tanıma Dizisi : 5'...T[^]CG A... 3'
3'...A GC[^]T... 5

3.3.4. Oligonükleotid Primerler

NAT2 genini çoğaltmak için kullanılan primerler;

İleri primer (NAT2F): 5'...GCTGGGTCTGGAAGCTCCTC...3',

Geri primer (NAT2R): 5'..TTGGGTGATACATACACAAGGG..3'

3.3.5. DNA Büyüklük Markörleri

GeneRuler 50 bç DNA markörü: 50, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500, 600,700, 800, 900, 1000 baz çiftlik fragmentler içeren DNA markörü (Fermentas, LİTVANYA).

GeneRuler 100 bç DNA markörü: 80, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800,900, 1000 baz çiftlik fragmentler içeren DNA markörü (Fermentas, LİTVANYA).

4. YÖNTEMLER

4.1. Hızlı Genomik DNA İzolasyonu (RGDE) Metodu

Hastalardan toplanarak EDTA'lı tüplerde saklanan kan örneklerinden 500'er µl alınarak 1.5 ml'lik Eppendorf tüpe aktarılır ve üzerine 1000 µl hücre lizis tamponu eklenir. Tüp hafifçe çalkalanarak tampon ve kan örneğinin birbirine karışması sağlanır ve 6000 rpm'de 2 dakika santrifüj edilir. Süpernatant atılır, pellet 1000 µl hücre lizis tamponunda tekrar çözülür ve yine 6000 rpm'de 2 dakika santrifüj edilir. Bu aşama krem rengi pellet elde edene kadar 1-2 defa tekrarlanır. Pelletin üzerine 300 µl hücre çekirdeği lizis tamponu eklenir ve pelletin çözülmesi sağlanır. 100 µl 5M NaCl ve 600 µl kloroform eklenerek tüp nazikçe çalkalanır ve ardından 6000rpm'de 2 dakika santrifüj edilir. Bu aşamada tüpte iki faz gözlenir. Alttaki organik faza karıştırmadan üstteki faz bir mikropipet yardımıyla dikkatlice alınır ve yeni bir Eppendorf tüpe aktarılır. Üzerine 600 µl izopropanol eklenerek tüp nazikçe birkaç defa çevrilir. Bu aşamada DNA yoğunlaşarak gözle görülür hale gelecektir. DNA'yı çökeltmek amacıyla tüp 13000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilir. Süpernatant atılarak tüp yaklaşık 10-15 dakika oda sıcaklığında kurumaya bırakılır. DNA, 50-100 µl TE tamponunda çözülerek ileride kullanılmak üzere 4°C veya -20°C'de saklanır.

Hasta grubu için bu tez öncesinde yukarıda anlatılan şekilde elde edilmiş ve laboratuvarımızda saklanmakta olan DNA örnekleri kullanılmıştır.

4.2. Yanak İçi Epitelinden DNA İzolasyonu

Gönüllü deneklerden yanak içi epitel hücrelerini elde etmek için steril pamuklu çubuk kullanılır. Her bir denekten steril pamuklu çubuğu iki yanağa 1-2 dk sürmeleri istenir. Ardından steril pamuklu çubuklar kendi kutularına koyulur ve DNA elde edilene kadar +4°C buzdolabında saklanır.

Gönüllü deneklerden steril pamuklu çubuk yardımı ile alınan yanak içi epitel hücrelerinden DNA elde etmek için;

- Yanak içi epitel doku örneği taşıyan swab 600-700 µl lizis tamponu içeren 1,5 ml'lik tüplere yerleştirilerek çubukların sapları kesilir.
- Tampon hacminin en az 500 µl olduğuna emin olduktan sonra 25 ul 10 mg/ml Proteinaz K ile overnight 55°C de inkübe edilir.
- Ertesi gün ısı bloğundan alınan tüplerden pamuklu çubuklar tüpün çevresine ve ağzına bastırılarak emilen tüm tamponun hücrelerle beraber tüpe bırakılması sağlanır. Pamuklu çubuklar tüpten çıkarılır.
- Üzerine 300 µl fenol eklenir. 13.000 rpm ' de 3 dk santrifüj edilir. Yeni tüp çıkarılır.
- Sıvı faz yeni tüpe aktarılır. İnterfaz alınmaz.
- Yeni tüpe aktarılan sıvı faza eşit hacimde kloroform (CHCl₃) eklenir.
- Tüp 13.000 rpm 'de 3 dk santrifüj edilir.
- Sıvı faz yeni tüpe aktarılır. İnterfaz alınmaz ve üzerine 1/10 hacminde 3M NaOH eklenip karıştırılır ve üzerine toplam hacim 0,6 sı kadar izopropanol eklenir.
- Tüpler -20 C de 1 saat inkübe edilir.
- İnkübasyon sonrası tüpler 16.000 rpm de 10 dk santrifüj edilerek DNA çöktürülür.
- DNA pelleti 500 ul %70 EtOH eklenir ve 16.00 rpm' de 10 dk santrifüj edilir.
- Süpernatant atılır 15-20 dk kurumaya bırakılır.
- DNA 50 µl 1X low TE tamponu eklenir ve oda sıcaklığında 2-3 gün bırakılarak çözünmesi sağlanır.
- DNA içeren tüpler +4°C de saklanabilir.

4.3. DNA'nın Nitel ve Nicel Analizi

Gönüllü deneklerden swab yardımı ile alınan yanak içi epitel hücrelerinden elde edilen DNA'lar %1'lik agaroz jel hazırlanarak yürütülmüş ve UV altında gözlemlenmiştir.

Çözünmüş DNA'nın tam konsantrasyonu ve saflığı spektrofotometrik analiz ile saptanabilir. DNA örneği damıtılmış su ile seyreltilir ve optik yoğunluğu 260 nm (A260) ve 280 nm'de (A280) okunur. 50 µg çift zincirli DNA'nın 260 nm'deki absorbansı 1.0 birim kabul edilerek örnek DNA'nın konsantrasyonu aşağıdaki formülle hesaplanabilir.

$$\text{Konsantrasyon } (\mu\text{g/ml}) = \text{seyreltme faktörü} \times A260 \times 50 \mu\text{g/ml}$$

DNA'nın saflığı A260/A280 oranına bakılarak tahmin edilebilir. 1.8 (\pm 0.1) oranına sahip örnekler saf olarak düşünülür. 1.8'den büyük değerler RNA kontaminasyonunu, düşük değerler ise protein kontaminasyonunu işaret eder.

4.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) moleküler genetikte kullanılan en temel tekniklerden birisidir. PCR, belirli DNA dizilerinin enzimatik sentezi için kullanılan bir metottur. PCR'ın temel prensibi, iki kısa sentetik oligonükleotid primerin her birinin DNA'da istenilen bölgenin homolog zincirlerinin karşı uçlarına bağlanacak şekilde hibridize edilmesi ve bu bölgenin polimeraz enzimi ile çoğalmasının sağlanmasıdır.

Bu çalışmada 547 bp'lik NAT2 geni NAT2F ve NAT2R primerleri ile Tablo 4.1. ve Tablo 4.2'de belirtilen şartlar kullanılarak çoğaltılmıştır.

Tablo 4.1. PCR protokolü

Kimyasallar	Konsantrasyonları
Tampon	1X NH ₂ SO ₄
MgCl ₂	3 mM
dNTP	0.3 mM
Primerler	5 pmol
Taq polimeraz	1.5 U
DNA	150 ng
Toplam hacim	25 µl

Tablo 4.2. PCR koşulları

Başlangıç Denatürasyonu	94°C, 4 dakika
Denatürasyon	94°C, 15 saniye
Bağlanma	60°C , 1 dakika
Uzama	60°C , 5 dakika
Döngü Sayısı	35 döngü

PCR sonrası oluşan amplifikasyon ürünleri %2' lik agaroz jelde analiz edilmiştir.

4.5. Restriksiyon Kesimi

Restriksiyon enzimleri veya diğer adıyla restriksiyon endonükleazları çift zincirli DNA'yı şeker fosfat bağından kopararak keser. Bir gen üzerindeki tek nükleotid polimorfizmleri bir veya daha fazla restriksiyon enzimi için tanıma bölgesi oluşturabilir veya aksine, var olan bir tanıma bölgesinin kaybolmasına sebep olabilir. PCR ile çoğaltılan ilgili gen bölgesi çeşitli restriksiyon enzimleri ile *in vitro* reaksiyona sokularak oluşun fragment uzunlukları incelenir (RFLP) ve gen üzerindeki polimorfizmler hakkında yorum yapılabilir.

NAT2 genindeki NAT2*6B, NAT2*7A ve NAT2*11A polimorfizmlerinin ve bu polimorfizmlerin belirlediği 590G>A, 857G>A ve 481C>T alellerinin belirlenmesi için Tablo 4.3'te belirtilen enzimler ve restriksiyon şartları kullanılmıştır.

Tablo 4.3. NAT2 Lokusundaki Polimorfizmler ve Restriksiyon Şartları

Polimorfik bölge	Nükleotid Değişimi	Kesim Enzimi	Konsantrasyon	Sıcaklık	Süre
NAT2*6B	590G>A	TaqI	0.9 U	65 °C	4saat
NAT2*7A	857G>A	BamHI	1.2 U	37 °C	16 saat
NAT2*11A	481C>T	KpnI	1.2 U	37 °C	16 saat

4.6. Jel Elektroforezi

Jel elektroforezi DNA fragmanlarını tespit etmek ve ayırmak için standart bir metottür. DNA fragmanları uygun bir tamponun içine bir jele yüklenmiş olarak negatif elektrottan (katot) pozitif elektrota (anot) yürütülerek ayrılır. DNA iskeletindeki negatif yüklü fosfat gruplarının varlığı nedeniyle DNA molekülleri anoda doğru yürür. DNA bantları etidyum bromid (EtBr) veya gümüş boyaması ile görünür hale getirilir.

Agaroz jel elektroforezi DNA fragmanlarını moleküler ağırlıklarına göre ayırır. Değişik agaroz konsantrasyonları değişik ayırım kapasitesi sağlar. Yüksek konsantrasyonlar kısa fragmanları ayırmada daha spesifiktir. Agaroz jel agarozun 0.5X TBE tamponu içinde çözünmesi ve kaynatılması ile hazırlanır. EtBr, son konsantrasyona 0.5 mg/ml olacak şekilde ve degradasyonu engellemek için jel solüsyonu 50°C'ye soğutulduktan sonra konur. Solüsyon jel kabına dökülür, taraklar yerleştirilir ve jelin polimerize olması için beklenir.

Polimerizasyondan sonra jel içinde 0.5X TBE tamponu bulunan yatay jel elektroforez aparatına konur, taraklar jelden nazikçe çıkarılır ve böylece örnekleri üklemek için kuyucuklar oluşturulmuş olur. Agaroz jeller genellikle 100-150 Voltta (V) 10-45 dakika yürütülür. Bu çalışmada PCR örnekleri %2'lik; restriksiyon enzimi kesim ürünleri ise %2'lik ve %3'lük agaroz jelde EtBr boyaması ile UV ışığı altında analiz edilmiştir.

4.7. Dizi Analizi

Araştırma toplam 148 sağlıklı ve 129 mesane kanserli bireyden elde edilen DNA örnekleri ile gerçekleştirilmiştir. N-asetiltransferaz geni 8p22 bölgesinde yer almakta ve bu bölgede bulunan polimorfizmlerin belirlediği 590G>A, 857G>A ve 481C>T alelleri için NAT2F ve NAT2R primerleri kullanılarak 547 bp'lik bölge PCR ile çoğaltılmıştır. PCR ürünleri % 2'lik agaroz jelde yürütülerek kontrol edilmiştir. Daha sonra PCR ürünleri restriksiyon kesim enzimleri ile kesilerek agaroz jelde görüntülenmiştir. Hasta ve kontrol bireylerin fenotipleri belirtilmiştir. Ayrıca elde edilen sonuçların doğruluğunu kontrol etmek amacıyla PCR örnekleri Roche pürifikasyon kiti yardımı ile pürifiye edilmiş ve ürünler dizi analizine gönderilmiş ve polimorfizmler incelenmiştir.

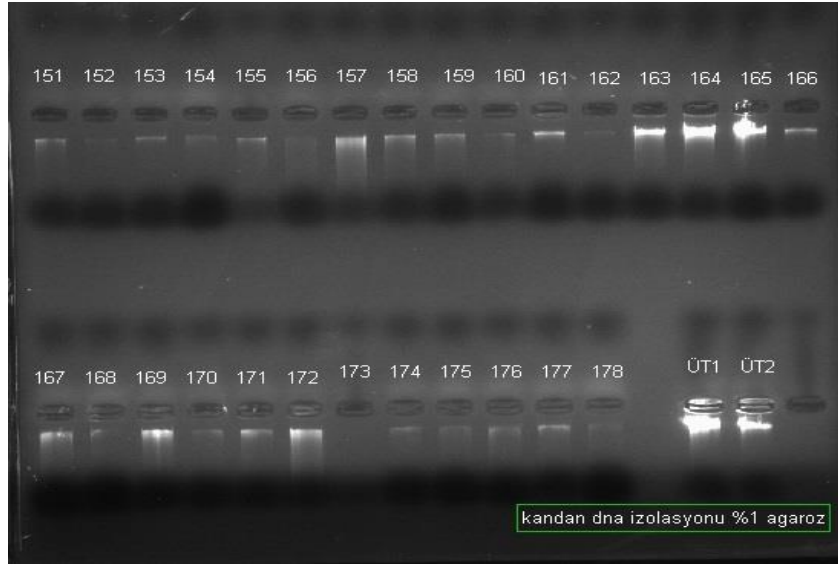
4.8. İstatistiksel Analiz

Hasta ve kontrol gruplarına ait genotip verileri SPSS 21.0 ve PLINK programları ile istatistiksel analize tabi tutulmuştur. Hasta ve kontrol gruplarının genotip dağılımları açısından dengeleri Hardy Weinberg Denge (HWD) testi ile incelenmiştir. Cinsiyet ve sigara kullanımının mesane kanseri ile ilişkisi ki-kare bağımsızlık testi ile incelenmiştir. Hastalık ve polimorfizmler arasındaki ilişki lojistik regresyon analizi ile belirlenmiştir. Dengenin sağlanmadığı durumlarda hastalık ile incelenen polimorfizm arasındaki ilişki, HWD'in sağlanmasını gerektirmeyen aditif genotipik model ile incelenmiştir. Tüm analizlerde anlamlılık sınırı $p < 0,05$ olarak kabul edilmiştir.

5. SONUÇLAR

5.1. DNA İzolasyonu

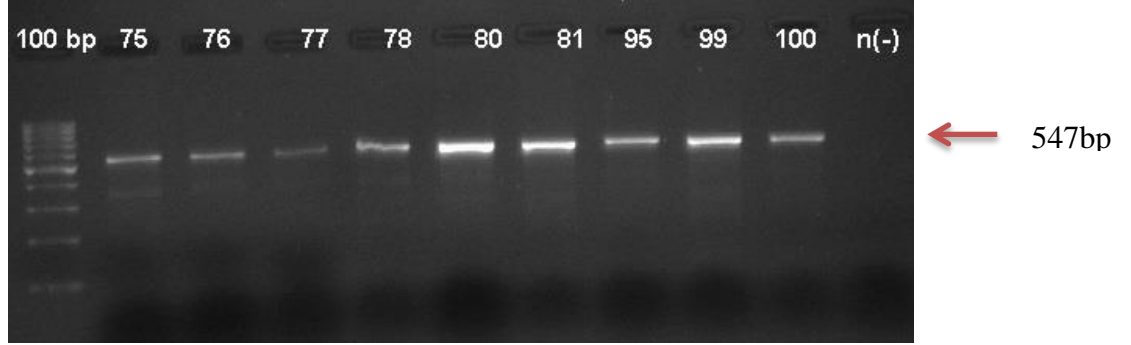
Kan ve yanak içi epitelyum hücrelerden elde edilen DNA örnekleri (5 µl) alınarak %1'lik agaroz jelde incelenmiş ve DNA'nın kırılmadan elde edildiği doğrulanmıştır (Şekil 5.1.).



Şekil 5.1. Genomik DNA örneklerinin %1'lik agaroz jelde görünümü

5.2. NAT2 lokusunun PCR Yöntemi ile Çoğaltılması

547 bp'lik NAT2 PCR ürünleri agaroz jel elektroforezi ve EtBr boyaması ile UV ışığı altında görüntülenmiştir (Şekil 5.2.).



Şekil 5.2. PCR ürünlerinin 2'lik agaroz jelde görüntülenmesi

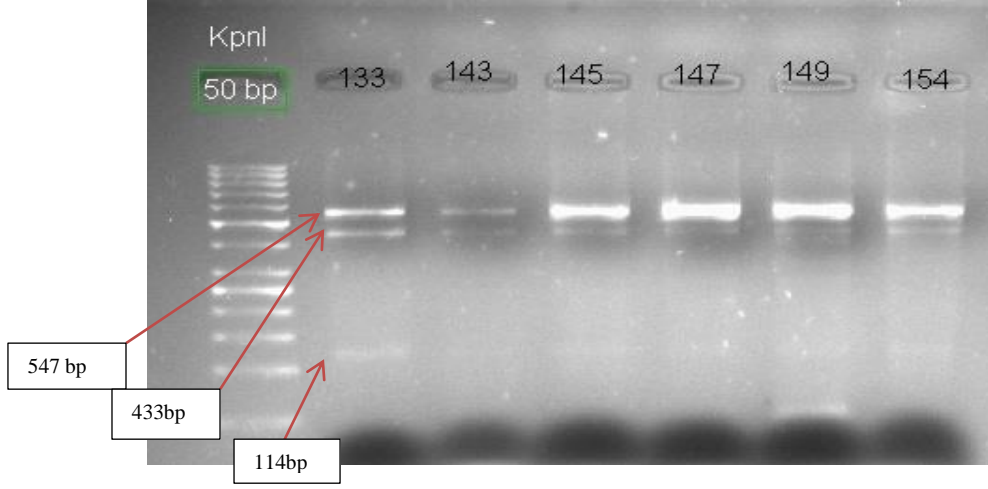
5.3. NAT2 lokusunun RFLP Yöntemi ile Moleküler Analizi

5.3.1. NAT2*6B, NAT2*7A ve NAT2*11A Alellerinin Belirlenmesi

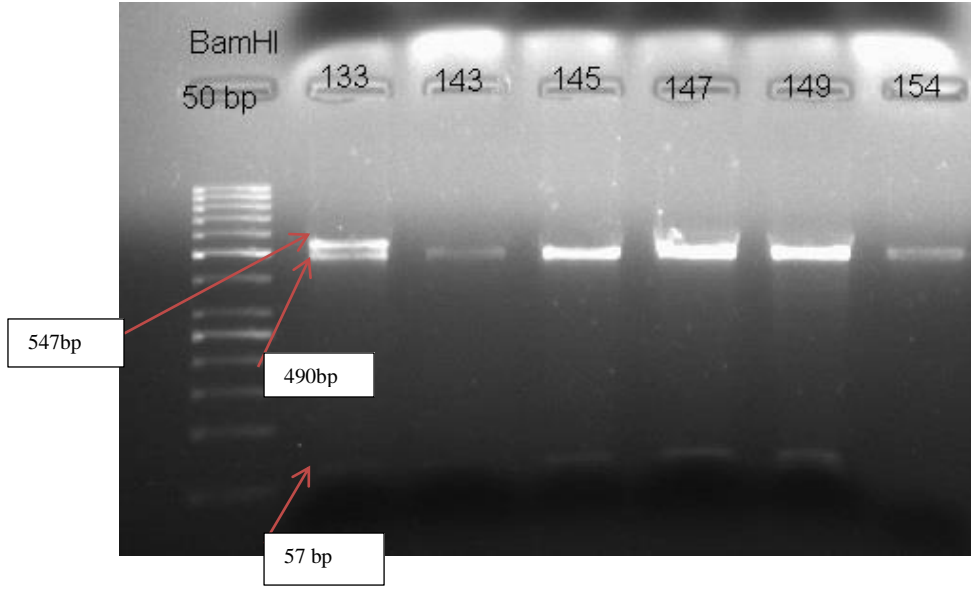
547 bp'lik NAT2 amplifikasyon ürünleri KpnI, BamHI ve TaqI restriksiyon enzimleri ile kesilerek %2'lik ve %3'lük agaroz jelde görüntülenmiştir. Kesimlerden beklenen fragment uzunlukları Tablo 5.3.'te agaroz jel analizleri ise Şekil 5.3., Şekil 5.4. ve Şekil 5.5.'te gösterilmiştir.

Tablo 5.1. NAT2 Lokusundaki Polimorfizmler

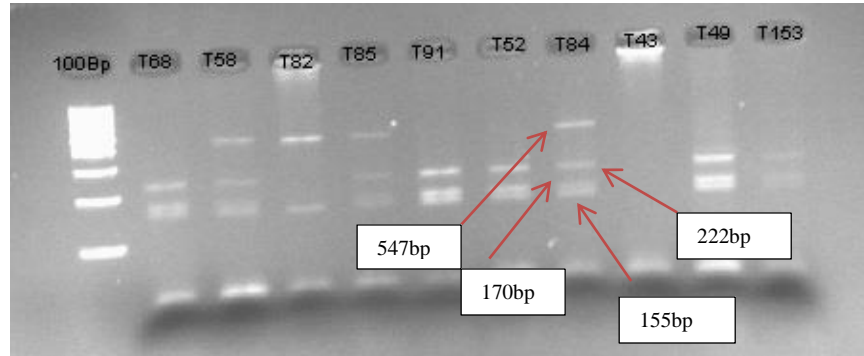
Polimorfik bölge	SNP Tanımlayıcı	Nükleotid Değişimi	PCR(bp)	Fragmanlar (bp)
NAT2*6B	rs1799930	590G>A	547	222+170+155
NAT2*7A	rs1799931	857G>A	547	490+57
NAT2*11A	rs1799929	481C>T	547	433+114



Şekil 5.3. KpnI kesim ürünlerinin %2'lik agaroz jeldeki görüntüsü

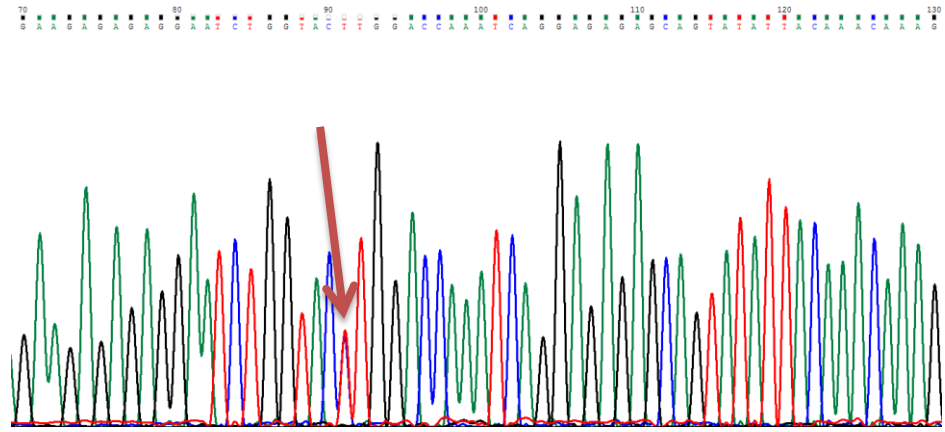


Şekil 5.4. BamHI kesim ürünlerinin %2'lik agaroz jeldeki görüntüsü

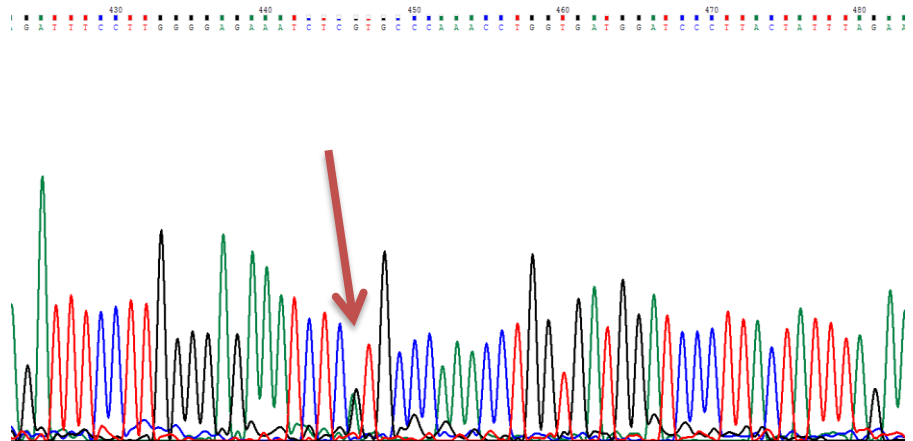


Şekil 5.5. TaqI kesim ürünlerinin %3'lük agaroz jeldeki görüntüsü

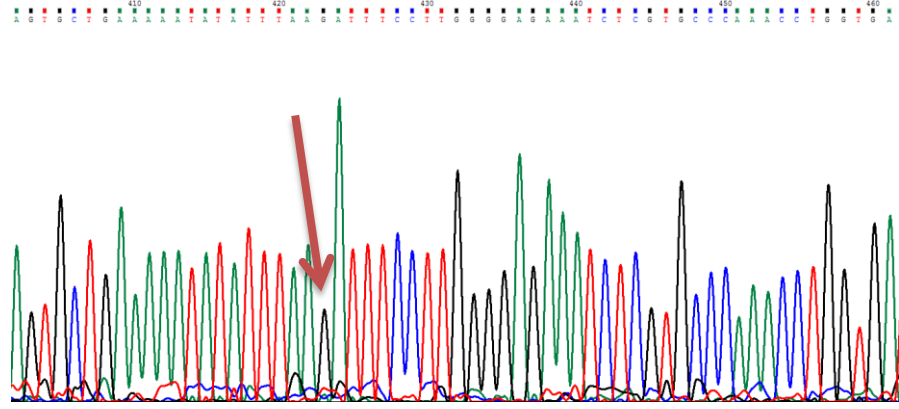
Hasta ve kontrol bireyler RFLP yöntemi ile tayin edilmiştir. Örnekler her aşamada konfirme edilip sonuçların doğruluğu gösterilmiştir. Polimorfizm taşıyan ve taşımayan örnekler dizi analizi ile doğrulayıp, KpNI ile kesilen 133 nolu bireyin dizi analizi görüntüsü Şekil 5.6., BamHI ile kesilen 133 nolu bireyin dizi analizi görüntüsü Şekil 5.7. ve TaqI ile kesilen 84 nolu bireyin dizi analizi görüntüsü ise Şekil 5.8.'de gösterilmiştir.



Şekil 5.6. NAT2 C481T polimorfizmin dizi analizi konfirmasyonu



Şekil 5.7. NAT2 G857A polimorfizmin dizi analizi konfirmasyonu



Şekil 5.8. G590A polimorfizmin dizi analizi konfirmasyonu

5.4. Verilerin Değerlendirilmesi

Araştırma toplam 148 sağlıklı ve 129 mesane kanserli bireyden elde edilen DNA örnekleri ile gerçekleştirilmiştir. Sağlıklı kontrol grubunu oluşturan örneklerin yaş aralığı 20-80 yaş olup, yaş ortalaması 60,7 yaşdır. Hasta grubu örneklerinin yaş aralığı ise 31-89 yaş arasındadır ve yaş ortalaması 66,4 yaşdır. Her iki grubun cinsiyet ve sigara kullanım oranları Tablo 5.2’te gösterilmiştir.

Tablo 5.2. Bireylerin cinsiyet ve sigara kullanımına göre dağılımı

	Hasta grubu n, (%)	Kontrol grubu n, (%)
Cinsiyet		
Kadın	16 (13,11)	75 (60)
Erkek	106 (86,89)	50 (40)
Toplam	122 (100)	125 (100)
Sigara		
İçenler	86 (75,43)	46 (36,5)
İçmeyenler	28 (24,57)	80 (63,5)
Toplam	114 (100)	126 (100)

Mesane kanseri hastaları ve kontrol grubundaki bireylerin genotip dağılımları Tablo 5.3.' te, sigara içme durumlarına göre genotip dağılımları Tablo 5.4'da gösterildiği şekildedir.

Tablo 5.3. NAT2 polimorfizmlerinde genotip frekansları

Genotipi	Hasta			Kontrol			
	Kadın	Erkek	Toplam	Kadın	Erkek	Toplam	
NAT2*6B	GG	8(61,53)	34(40)	42(42,85)	22(38,6)	20(62,5)	42(47,3)
	GA	5(38,47)	42(49,41)	47(47,95)	34(59,7)	9(28,13)	43(48,2)
	AA	0	9(10,59)	9(9,2)	1(1,7)	3(9,37)	4(4,5)
	Toplam	13(100)	85(100)	98(100)	57(100)	32(100)	89(100)
NAT2*7A	GG	8(50)	55(56,7)	63(55,8)	30(42,85)	22(51,16)	52(46,1)
	GA	0	4(4,13)	4(3,54)	5(7,15)	6(14)	11(9,7)
	AA	8(50)	38(39,17)	46(40,7)	35((50)	15(34,88)	50(44,2)
	Toplam	16(100)	97(100)	113(100)	70(100)	43(100)	113(100)
NAT2*11A	CC	9(52,95)	74(70,48)	83(68,01)	38(50,6)	22(46,8)	60(49,2)
	CT	1(5,89)	6(5,72)	7(5,8)	14(18,7)	10(21,2)	24(19,7)
	TT	7(41,17)	25(23,80)	32(26,2)	23(30,7)	15(32)	38(31,2)
	Toplam	17(100)	105(100)	122(100)	75(100)	47(100)	122(100)

Tablo 5.4. Sigara kullanma durumlarına göre NAT2 genotip frekansları

Genotipi	Sigara Kullanan			Sigara Kullanmayan			
	Kadın	Erkek	Toplam	Kadın	Erkek	Toplam	
NAT2*6B	GG	0	26(37,2)	26(36,2)	7(70)	7(63,6)	14(66,7)
	GA	2(100)	38(54,2)	40(55,5)	3(30)	2(18,2)	5(23,8)
	AA	0	6(8,6)	6(8,3)	0	2(18,2)	2(9,5)
Toplam	2(100)	70(100)	72(100)	10(100)	11(100)	21(100)	
NAT2*7A	GG	2(100)	45(54,9)	47(56)	6(46,2)	6(42,8)	12(44,4)
	GA	0	4(4,9)	4(4,7)	0	0	0
	AA	0	33(40,2)	33(39,2)	7(53,8)	8(57,2)	15(55,6)
Toplam	2(100)	82(100)	84(100)	13(100)	14(100)	27(100)	
NAT2*11A	CC	2(100)	61(73,5)	63(74,1)	7(53,8)	9(64,2)	16(59,3)
	CT	0	3(3,7)	3(3,5)	0	0	0
	TT	0	19(22,8)	19(22,4)	6(46,2)	5(35,8)	11(40,7)
Toplam	2(100)	83(100)	85(100)	13(100)	14(100)	27(100)	

Genotip frekansları üzerinden alel frekansları da hesaplanmış, varyant alellerin frekansları Tablo 5.5’de gösterilmiştir.

Tablo 5.5. SNP’lerin varyant alel frekansları

SNP	Varyant alel	Hastalarda frekansı(%)	Kontrollerde frekansı (%)
C481T	T	29	41
G857A	A	42	49
G590A	A	33	29

Hasta ve kontrol gruplarının NAT2 asetilasyon fenotipleri, genotiplerinden faydalanılarak hesaplanmış ve bireyler hızlı, orta ve yavaş asetilasyon gruplarına ayrılmıştır (Tablo 5.6).

Tablo 5.6. NAT2 asetilasyon fenotipleri

Grup	Hasta (%)	Kontrol (%)
Hızlı	13(11,6)	20(15,39)
Orta	29(25,9)	13(10)
Yavaş	70(62,5)	97(74,61)
Toplam	112(100)	130(100)

Mesane kanseri hasta grubunu oluşturan bireyler tümör evrelerine ve asetilasyon fenotiplerine göre gruplandırılmış ve Tablo 5.7’ de gösterilmiştir.

Tablo 5.7. Hasta bireylerin tümör evrelerine göre asetilasyon fenotipleri

Tümör	Asetilasyon			Toplam n, %
	Hızlı n, %	Orta n, %	Yavaş n, %	
pTa	2(7,7)	10(38,5)	14(53,9)	26(100)
pT2	0	4(50)	4(50)	8 (100)
pT3	0	1(50)	1(50)	2 (100)
pT4	1(100)	0	0	1 (100)
Toplam	4	23	29	46(100)

Yukarıdaki tabloya ek olarak, bireyler erken (pTa ve pT1) ve geç evre (pT2 ve üzeri) hastalar olmak üzere iki gruba ayrılmış ve buna göre fenotip dağılımları Tablo 5.8’te gösterilmiştir.

Tablo 5.8. NAT2 asetilasyon fenotiplerinin tümör evrelerine göre dağılımı

Tümör Evreleri	Asetilasyon		
	Hızlı	Orta	Yavaş
Erken evre (pTa + pT1)	3(75)	18(78,2)	24(82,7)
Geç evre (pT2+ pT3+ pT4)	1(25)	5(21,8)	5(17,3)
Toplam	4(100)	23(100)	29(100)

5.5. Verilerin İstatistiksel Analizi

Veriler, incelenen parametreler açısından istatistiksel analize tabi tutulmuştur. Cinsiyet ve sigara kullanımı mesane kanseri oluşumu için risk faktörü teşkil etmektedir. Erkek olmanın mesane kanseri riskini 9,8 kat artırdığı bulunmuştur ($p = 0,000000000001581$; $OR = 9,750$; $\%95CI = 4,941 - 19,241$). Sigara içmenin ise mesane kanseri riskini 5,6 kat artırdığı belirlenmiştir ($p = 0,0000000007785$; $OR = 5,547$; $\%95CI = 3,041 - 10,119$).

Araştırılan her üç polimorfizmin mesane kanseri ile ilişkisi aditif, dominant, resesif, kodominant ve alelik modeller üzerinde incelenmiştir. Analizler öncelikle tüm hasta ve kontrol grubunu dahil ederek yapılmış, daha sonra sadece sigara içen bireylerin dahil edildiği gruplamalar ile tekrar edilmiştir.

481C>T ve 857G>A polimorfizmleri için hasta ve kontrol grubu Hardy Weinberg dengesinde bulunmamıştır, bu nedenle HW dengesi gerektirmeyen aditif genotipik model uygulanarak varyantların mesane kanseri oluşumuna etkisi hesaplanmıştır (Tablo 5.9). 481C>T polimorfizmi hastalıkla ilişkilendirilme eğilimi göstermiştir ($p = 0,059$). 590G>A polimorfizmi hiçbir modelde hastalık ile ilişkilendirilememiştir (Tablo 5.10).

Sadece sigara içen bireyler değerlendirmeye alındığında, 481C>T polimorfizmi hastalıkla kuvvetli bir şekilde ilişkilendirilmiş ve T alelinin koruyucu etkisi bulunmuştur ($p = 0,05$, $OR = 0,539$) (Tablo 5.11). Sigara içen bireylerde diğer polimorfizmler ile hastalık ilişkisi saptanmamıştır. (Tablo 5.11, 5.12)

Tablo 5.9. 481C>T ve 857G>A polimorfizmlerinin mesane kanseri ile ilişkisi

SNP	Model	p	OR	%95 CI
481C>T	Aditif	0,059	0,761	0,573 – 1,011
857G>A	Aditif	0,648	1,064	0,815 – 1,389

Tablo 5.10. 590G>A polimorfizmi ve mesane kanseri ilişkisi

Model	p	OR	%95 CI
Additive	0,858	1,039	0,681 – 1,587
Dominant	0,858	1,052	0,606 – 1,826
Resesif	0,902	1,035	0,599 – 1,789
Kodominant	AG ; 0,873	AG ; 1,048	AG ; 0,589 – 1,863 AA ; 0,405 – 2,822
	AA ; 0,892	AA ; 1,070	
Alelik	0,8621	1,037	0,6882 – 1,563

Tablo 5.11. Sigara içen bireylerde 481C>T ve 857G>A polimorfizmlerinin mesane kanseri ile ilişkisi

Model	p	OR	%95 CI
481C>T	0,005	0,539	0,350 – 0,831
857G>A	0,884	1,031	0,684-1,555

Tablo 5.12. Sigara içen bireylerde 590 G>A polimorfizmlerinin mesane kanseri ile ilişkisi

Model	p	OR	%95 CI
Additive	0,248	1,552	0,737 – 4,567
Dominant	0,173	1,864	0,761 – 1,826
Resesif	0,212	1,773	0,722 – 4,355
Kodominant	AG ; 0,174	AG ; 1,909	AG ; 0,751 – 4,852 AA ; 0,287 – 9,086
	AA ; 0,586	AA ; 1,615	

Tüm örnek grubunda ve sadece sigara içen bireylerde polimorfizmlerin tümör evresi ile ilişkisi sırasıyla muhtemel bütün modeller kullanılarak incelenmiş ve hiçbir ilişki belirlenememiştir ($p=0,952$ ve $p= 0,975$).

Tüm örnek grubunda ve sadece sigara içen bireylerde asetilasyon fenotipi ile mesane kanseri arasında da istatistiksel anlama ulaşan bir ilişki saptanamamıştır ($p=0,345$ ve $p=0,326$).

6. TARTIŞMA

Mesane kanseri son yıllarda yapılan araştırmalara göre erkeklerde en çok görülen kanserler arasında dördüncü, kadınlarda ise dokuzuncu sırada yer almıştır (Ouerhani ve ark., 2009). 2006 yılında yapılan çalışmada, mesane kanseri erkeklerde yüz binde 19.6, kadınlarda yüz binde 2.5 olarak tahmin edilmiştir. Erkek olmanın mesane kanseri riskini 9,8 kat artırdığı bulunmuştur (Eser ve ark., 2011).

N-asetiltransferaz varyantlarının kanserde kişisel yatkınlığı değiştirdiği düşünülmüştür. Avrupa popülasyonunda NAT2*5B (481C>T, 803A>G), NAT2*6A (282C>T , 590G>A) ve NAT2*7A (857G>A) alelleri bu fenotipleri temsil eden en önemli alellerdir (Thier ve ark., 2003; Franekova ve ark., 2008). Yapılan dört çalışmada mesane kanseri riski NAT2*5 haplotipine sahip bireylerde yüksek bulunmuştur (Brockmoller ve ark., 1996; El Desoky ve ark., 2005; Filiadis ve ark., 1999; Okkels ve ark., 1997).

Önceki çalışmalarda NAT2*12 allellerinin 803A> G (K268R) SNP karakteristiği ve NAT2*13 allellerinin 282C>T SNP karakteristiği NAT2 katalitik aktivitesini değiştirmedini açıkça göstermiştir (Hein ve ark., 1994; Fretland ve ark., 2001).

341T>C (I114T) SNP, NAT2 proteinlerinde ve aktivitelerinde çok büyük bozulmalara neden olarak protein yıkımı ile sonuçlanan NAT2*5 alelleri ve haplotipleri ile ilişkilidir (Hein ve ark., 1994; Fretland ve ark., 2001).

Bir çalışmada standart referansın özgüllüğü ve seçiciliği kesin olarak hesaplanamaz. Bu nedenle farklı kombinasyonlar denenerek NAT2 polimorfizmlerinin özgünlüğü hesaplanmıştır. Bu verilere dayanarak tek polimorfizm ile yapılan çalışmaların özgünlüğü % 77.7 dir. 2 kombinasyon şeklinde yapılan farklı bir çalışmada ise, % 96.1 fenotipi ile doğruluk göstermiştir. Dört farklı SNP panelinde ise bu oran %98.4 'dür. (Hein ve Doll, 2012).

Mesane kanseri için risk faktörü olduğu bilinen, sigaradan alınan aromatik aminler NAT2 enzimleri ile metabolize edildiğinden, NAT2 polimorfizmlerinin sigara içimiyle alakalı mesane kanserine yatkınlıkta rol oynaması muhtemeldir (Franekova ve ark., 2008; Vinata ve ark., 2011).

Son zamanlarda, NAT2*5 aleline sahip sigara içen kadınların meme kanseri riski ile de ilişkili bulunmuştur (van der Hel ve ark.,2004). Bu sonuçlar NAT2 yavaş asetilatör fenotipi homojen değil, daha ziyade çeşitli SNP ve haplotiplerle beraber, farklı mekanizmaların birden fazla yavaş asetilatör fenotipine sahip olduğunu göstermektedir.

Mesane kanserlerinde, mutasyon sayısı ile tümör invazyon artışı ve evre arasında bir korelasyon bulunmuştur (Lorenzo ve ark., 2008). Lorenzo ve arkadaşlarının çeşitli tümör tipleriyle yaptıkları çalışmada Ta evre tümörlerde %30.3, T1 evre tümörlerde ise %43.7 oranında, yine aynı grubun yaptığı başka bir çalışmada ise T1 evre tümörlerde yüksek oranda mutasyon saptanmıştır.

Sigara içenler arasında NAT2 yavaş asetilasyonun 4-ABP hemoglobin adüktlerin yüksek seviyede olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, yüksek dereceli mesane tümörlerinde ABP-DNA NAT2 yavaş asetilasyona sahip olanların ve sigara içenlerde daha yüksek seviyelerde olduğu bulunmuştur. Yayınlanmış 21 çalışmada yapılan incelemelerde NAT2 yavaş asetilatörlerde mesane kanseri riski için bu artışın yeterli olmadığını bildirilmiştir (Green ve ark., 2000).

Avrupa, Japonya, Amerika Birleşik Devletleri ve İspanya'da yapılan çalışmalarda NAT2 yavaş asetilasyonunun sigara içenlerde, özellikle de uzun süreli sigara içenlerde, mesane kanseri riskini belirgin derecede artırdığı bildirilmiştir. Japonya'da ise homozigot hızlı asetilasyon genotipinin yüksek görülme sıklığı nedeniyle, hızlı asetilasyonun heterozigot asetilasyona göre mesane kanserinde daha yüksek bir risk faktörü olduğu belirtilmiştir (Hein, 2006).

NAT2 alel frekanslarında etnik farklılıkların olduğu gözle çarpmaktadır. Ancak, Carreon ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalarda ise NAT2 polimorfizminin

rolü etnik grup ile ilgili olmadığını daha çok bu polimorfizminin kanserojen madde ile birlikte farklılık gösterdiği bulunmuştur (Carreon ve ark., 2006).

Çinli işçiler arasında yapılan bir çalışmada ise, hızlı ve yavaş NAT2 asetilatörlerinin mesane kanseri riskinde farklılık gösterdiği bulunmuştur. Daha sonra yapılan başka bir çalışmada ise benzidine maruz kalan Çinli işçilerin yavaş NAT2 asetilatör genotipine sahip olanlarının mesane kanser riskinde, azalma yönünde ilişkili olduğunu bulunmuştur. Hatta yavaş asetilasyona sahip bireylerde koruyucu etkiye sahip oldukları yapılan çalışmada gösterilmiştir (MA ve ark., 2004).

129 mesane kanseri hastası ve 148 sağlıklı birey ile yapılan bu çalışmada NAT2*6B (590G>A), NAT2*7A (857G>A) ve NAT2*11A (481C>T) alellerinin dağılımları incelenerek mesane kanseri için oluşturdukları risk incelenmiştir. Buna ek olarak NAT2 alelleri temel alınarak oluşturulan asetilasyon fenotipleri ile mesane kanseri arasındaki ilişki araştırılmıştır. Tüm SNP'ler için homozigot yabanıl olan genotipler hızlı asetilasyon, herhangi bir SNP için heterozigot genotipler orta asetilasyon, bir ya da daha fazla homozigot varyant, ya da iki veya daha fazla heterozigot genotipe sahip olan bireyler yavaş asetilasyon fenotipleri olarak tanımlanmıştır (Hein ve Doll, 2012).

Hasta ve kontrol gruplarına ait genotip verileri SPSS 21.0 ve PLINK programları ile istatistiksel analize tabi tutulmuştur. Hasta ve kontrol gruplarının genotip dağılımları Hardy Weinberg Denge (HWD) testi ile incelenmiştir. Cinsiyet ve sigara kullanımının mesane kanseri ile ilişkisi ki-kare bağımsızlık testi ile incelenmiştir. Hastalık ve polimorfizmler arasındaki ilişki lojistik regresyon analizi ile belirlenmiştir. Dengenin sağlanmadığı durumlarda hastalık ile incelenen polimorfizm arasındaki ilişki, HWD'in sağlanmasını gerektirmeyen aditif genotipik model ile incelenmiştir. Tüm analizlerde anlamlılık sınırı $p < 0,05$ olarak kabul edilmiştir.

NAT2 481C>T polimorfizmi hastalıkla ilişkilendirilme eğilimi göstermiş ($p=0,059$) sadece sigara içen bireyler değerlendirmeye alındığında ise istatistiksel anlamlılığın arttığı ve bu polimorfizmin hastalıkla kuvvetli bir şekilde ilişkili

olduğu bulunmuştur. Aditif test sonuçlarına göre, T alelinin mesane kanserine karşı koruyucu etkisi belirlenmiştir. Diğer polimorfizmler ile mesane kanseri riski arasında bir ilişki saptanamamıştır.

Gerek tüm örnek grubu incelendiğinde, gerekse sadece sigara içen bireyler gruplandığında asetilasyon fenotipi ile mesane kanseri arasında istatistiksel anlama ulaşan bir ilişki saptanamamıştır.

Mesane kanseri hasta grubunu oluşturan bireyler tümör evrelerine ve asetilasyon fenotiplerine göre gruplandırılmış, ancak asetilasyon fenotipi ile tümör evresi arasında bir ilişki bulunamamıştır.

Popülasyonlara yönelik yapılacak ileriki çalışmalar bu genlerin mesane kanseri ile ilişkisini netleştirecektir. Yapılacak çalışmalarda farklı alel kombinasyonları denenmesi mesane kanserine yol açan faktörlerin daha iyi anlaşılmasını sağlayacaktır. Ayrıca çalışmaya dahil edilen birey sayısının artırılması da daha güçlü istatistiki ilişkiler ortaya koyacaktır.

7. KAYNAKLAR

7.1. Kitap

Guyton A, Hall J.(2003). Tıbbi Biyoloji. Prof.Dr.Zeynep Solakoğlu (Çev). Nobel Tıp Kitabevi, Ankara.

Gülçiftçi Z (2000). Mesanenin non invaziv papiller ürotelyal tümörlerinin WHO/ISUP konsensus sınıflamasına göre yeniden sınıflandırılması ve alt grupların p53 ve ki-67 ekspresyonları ile korelasyonu. Doktora Tezi. Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi Patoloji Bölümü, İstanbul.

Ganong W. F.(2002). Tıbbi Fizyoloji. (20. Baskı). Nobel Tıp Kitabevi, Ankara.

Kutsal Y (2006). Mesane tümörü patolojisi. Üroonkoloji Bülteni 3: 3-9.

Lokeshwar, Vinata B., Merseburger, Axel S., Hautmann, Stefan H. Bladder Tumors: Molecular Aspects and Clinical Management (2011). Bladder Tumors. Humana Press.

Messing EM and Catalona W.(1998) Urothelial tumors of the urinary tract: Campbell' s Urology. Walsh PC, Retik AB, Vaughan ED, Wein AJ (Ed) (7baskı) Philadelphia WB Saunders. 2327-2410.

Raymond W ve Ruddon, M.D (2007). Cancer Biology. Fourth Edition,USA.

Sobin D ve Witteking C (2002). Classification of Malignant Tumours. New York.

7.2. Makale

Alexandre Loktionov,William Moore, Steven P. Spencer, Hester Vorster, Theo Nell, Ian K. O'neill, Sheila A. Bingham, John H. Cummings (2002). Differences in N-acetylation genotypes between Caucasians and Black South Africans: implications for cancer prevention. Cancer Detection and Prevention. 26(1):15-22.

Anitha A ve Banerjee M (2003). Arylamine N-acetyltransferase 2 polymorphism in the ethnic populations of South India. Int J Mol Med.11(1):125-31.

Brockmüller J, Cascorbi I, Kerb R, Roots I (1996). Combined analysis of inherited polymorphisms in arylamine N-acetyltransferase 2, glutathione S-transferases M1 and T1, microsomal epoxide hydrolase, and cytochrome P450 enzymes as modulators of bladder cancer risk. *Cancer Res.* 56(17):3915-25.

Carreón T, Ruder AM, Schulte PA, Hayes RB, Rothman N, Waters M, Grant DJ, Boissy R, Bell DA, Kadlubar FF, Hemstreet GP, Yin S, LeMasters GK (2006). NAT2 slow acetylation and bladder cancer in workers exposed to benzidine. *Int J Cancer.* 118(1):161-8.

Case R, Hosker M, McDonald D, Pearson J (1993). Tumours of the urinary bladder in workmen engaged in the manufacture and use of certain dyestuff intermediates in the British chemical industry. I. The role of aniline, benzidine, alpha-naphthylamine, and beta-naphthylamine. *Br. J. Ind. Med.* 11, 75-104.

Dandara C, Masimirembwa CM, Magimba A, Kaaya S, Sayi J, Sommers DK, Snyman Jr, Hasler Ja (2003). Arylamine N-acetyltransferase (NAT2) genotypes in Africans: the identification of a new allele with nucleotide changes 481C>T and 590G>A. *Pharmacogenetics.* 13(1):55-8.

Dikmen M (2004). Metilentetrahidrofolat Redüktaz (MTHFR) Enziminin Moleküler Biyolojisi ve Hastalıklarla İlişkisi. *Kocaeli Tıp Dergisi* 5:9-16.

El Desoky ES, AbdelSalam YM, Salama RH, El Akkad MA, Atanasova S, von Ahsen N, Armstrong VW, Oellerich M (2005). NAT2*5/*5 genotype (341T>C) is a potential risk factor for schistosomiasis-associated bladder cancer in Egyptians. *Ther Drug Monit.* 27(3):297-304.

Eser S ve Özdemir R (2012). Dünya ve Türkiye’de mesane kanseri epidemiyolojisi Bladder cancer epidemiology in the world and in Turkey. *Üroonkoloji Dergisi.* Cilt: 11, Sayı: 1.

Filiadis I, Georgiou I, Alamanos Y, Kranas V, Giannakopoulos X, Lolis D (1999). Genotypes of N-acetyltransferase-2 and risk of bladder cancer: a case-control study. *The Journal of Urology.* 161(5):1672-5.

Fretland AJ, Doll MA, Leff MA, Hein DW (2001). Functional characterization of nucleotide polymorphisms in the coding region of N-acetyltransferase 1. *Pharmacogenetics*. 11(6):511-20.

Green J, Banks E, Berrington A, Darby S, Deo H ve Newton R (2000). N-acetyltransferase 2 and bladder cancer: an overview and consideration of the evidence for gene–environment interaction. *Br J Cancer*. 83(3): 412–417.

Hein DW, Doll MA, Rustan TD, Gray K, Ferguson RJ, Feng Y (1994). Construction of Syrian hamster lines congenic at the polymorphic acetyltransferase locus (NAT2): acetylator genotype-dependent N- and O-acetylation of arylamine carcinogens. *Toxicol Appl Pharmacol*. 124(1):16-24.

Hein D (2002). Molecular Genetics and Function of NAT 1 and NAT 2: role in aromatic amine metabolism and carcinogenesis. *Mut Res*.65, 506-507.

Hein D (2006). N-acetyltransferase 2 genetic polymorphism: effects of carcinogen and haplotype on urinary bladder cancer risk. *Oncogene*. 25, 1649–1658.

Heney N (1992). Natural history of superficial bladder cancer. Prognostic features and long-term disease course. *Urol Clin North Am*.19(3):429-33.

Heney N, Nocks B, Daly J, Prout G, Newall J, Griffin P, Perrone T, Szyfelbein W (1982). Ta and T1 bladder cancer: location, recurrence and progression. *Br J Urol*. 54(2):152-7.

David W Hein ve Mark A Doll (2012). Accuracy of various human NAT2 SNP genotyping panels to infer rapid, intermediate and slow acetylator phenotypes. *Pharmacogenomics*. 13(1):31-41.

Holmång S, Hedelin H, Anderström C, Johansson S (1995). The relationship among multiple recurrences, progression and prognosis of patients with stages Ta and T1 transitional cell cancer of the bladder followed for at least 20 years. *J Urol*. 153(6):1823-6.

Hsieh F, Pu YS, Chern HD, Hsu L, Chiou HY, Chen CJ (1999). Genetic polymorphisms of N-acetyltransferase 1 and 2 and risk of cigarette smoking-related bladder cancer. *Br J Cancer*. 81(3):537-41.

İzmirli M, Inandiklioğlu N, Abat D, Alptekin D, Demirhan O, Tansug Z, Bayazit Y (2011). MTHFR Gene Polymorphisms in Bladder Cancer in the Turkish Population. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 12:1833-1835.

Summerscales JE ve Josephy PD (2004). Human Acetyl CoA:Arylamine N-Acetyltransferase Variants Generated by Random Mutagenesis. *Mol Pharmacol*. 65(1):220-6.

Jason M. Walraven, John O. Trent ve David W. Hein (2007). Computational and Experimental Analyses of Mammalian Arylamine N-acetyltransferase Structure and Function. *Drug Metab Dispos*. 35(6): 1001–1007.

Kiemeney L, Witjes J, Heijbroek R, Verbeek A, Debruyne F (1993). Predictability of recurrent and progressive disease in individual patients with primary superficial bladder cancer. . Source Department of Epidemiology, University of Nijmegen, The Netherlands. 150(1):60-4.

Li Jiao, Mark A. Doll, David W. Hein, Melissa L. Bondy, Manal M. Hassan, James E. Hixson, James L. Abbruzzese, And Donghui Li (2007). N-acetyltransferase 2 polymorphism in patients with diabetes mellitus. *Cell Biochem Funct*. 25:407–11.

Liu L, Vett Av, Zhang N, Walters K J, Wagner C R,N Hanna PE (2007). Arylamine N-Acetyltransferases: Characterization of the Substrate Specificities and Molecular Interactions of Environmental Arylamines with Human NAT1 and NAT2. *Chem Res Toxicol*. 20: 1300–1308.

Loening S, Narayana A, Yoder L, Slymen D, Weinstein S, Penick G, Culp D (1980). Factors influencing the recurrence rate of bladder cancer. *Urol*. 123(1):29-31.

Ma QW, Lin GF, Chen JG, Xiang CQ, Guo WC, Golka K, Shen JH (2004). Polymorphism of N-acetyltransferase 2 (NAT2) gene polymorphism in shanghai population: occupational and non-occupational bladder cancer patient groups. *Biomed Environ Sci.*17(3):291-8.

Malats N (2008). Genetic epidemiology of bladder cancer: scaling up in the identification of low-penetrance genetic markers of bladder cancer risk and progression. *Scand J Urol Nephrol Suppl.* 42 (218): 131-40.

Meyer U (1994). Polymorphism of human acetyltransferases. *Environ Health Perspect.* 102(Suppl 6): 213–216.

Monica M, Dominique M, Immaculata D(2006).Polymorphisms in GSTT1, GSTM1, NAT1 and NAT2 genes and bladder cancer risk in men and women. *BMC Cancer.* 6:239-259.

Mulders P, Meyden A, Doesburg W, Oosterhof G, Debruyne F (1994). Prognostic factors in pTa-pT1 superficial bladder tumours treated with intravesical instillations. The Dutch South-Eastern Urological Collaborative Group. *Br J Urol.* 73(4):403-8.

Sinharib Ç, Dr. Ahmet E, Dr. Kutsal Y (2007). Non-ürotelyal mesane kanserleri. *Üroonkoloji Bülteni* 4:9-14.

Sun Q, Harper T, Dierks E, Zhang L, Chang S, Rodrigues A, Marathe P (2011). 1-Aminobenzotriazole, a Known Cytochrome P450 Inhibitor, Is a Substrate and Inhibitor of N-Acetyltransferase. *Drug Metab Dispos.* 39(9):1674-9

Thompson R, Campbell E, Kramer H, Jacobs S, Naslund M (1993). Late invasive recurrence despite long-term surveillance for superficial bladder cancer. *J Urol.* 149(5):1010-1.

Okkels H, Sigsgaard T, Wolf H, Autrup H (1997). Arylamine N-acetyltransferase 1 (NAT1) and 2 (NAT2) polymorphisms in susceptibility to bladder cancer: the influence of smoking. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 6(4):225-31.

Olfert S, Felknor S, Delclos G (2006). An updated review of the literature: risk factors for bladder cancer with focus on occupational exposures. *South Med J.* 99(11):1256-63.

Osian, Gelu, Procopciuc, Lucia, Vlad, Liviu, Iancu, Cornel, Cristea, Paul G, Mocan, Teodora, Mocan, Lucian (2010). NAT2 Polymorphisms and Sporadic Colorectal Cancer Survival. *Journal of Gastrointestinal & Liver Diseases.* p361-368.

Ouerhani S, Rouissi K, Marrakchi R, Riadh Ben Slama M, Sfaxi M, Ayed M, Chebil M, Elgaaied A (2009). Do smoking and polymorphisms in xenobiotic metabolizing enzymes affect the histological stage and grade of bladder tumors? *Bull Cancer.* 96(5):E23-9.

Ozbek YK, Oztürk T, Tüzüner BM, Calay Z, Ilvan S, Seyhan FM, Kisakesen HI, Oztürk O, Isbir T (2010). Combined Effect of CYP1B1 Codon 432 Polymorphism and N-Acetyltransferase 2 Slow Acetylator Phenotypes in Relation to Breast Cancer in the Turkish Population. *Anticancer Res.*30(7):2885-9.

van der Hel OL, Peeters PH, Hein DW, Doll MA, Grobbee DE, Ocké M, Bueno de Mesquita HB (2004). GSTM1 null genotype, red meat consumption and breast cancer risk (The Netherlands). *Cancer Causes Control.* 15(3):295-303.

Yüksel N (2001). Sitokrom P450 Enzim sistemi ve ilaç etkileşimleri. *Klinik Psikiyatri.* Ek 1:5-1. Ankara.

Weber W, Hein D (1985). N-acetylation pharmacogenetics. *Pharmacol Rev.* 37(1):25-79.

Zeegers MP, Kellen E, Buntinx F, van den Brandt PA. (2004). The association between smoking, beverage consumption, diet and bladder cancer: a systematic literature review. *World J Urol.* 21:392-401.

7.3. İnternet

American Cancer Society

<http://www.cancer.org/cancer/bladdercancer/detailedguide/bladder-cancer-risk-factors>. Erişim tarihi: 7 Temmuz 2013.

Dartmouth Toxic Metals <http://www.dartmouth.edu/> . Erişim tarihi: 8 Aralık 2013.

Ferlay J, Shin Hr, Bray F (2008). Cancer Incidence and Mortality Worldwide Globocan. Erişim Tarihi: 06 Temmuz 2013.

<http://www.cancerresearchuk.org/cancer-info/cancerstats/world/the-global-picture/>

NAT2 Erişim: <http://snpedia.com/index.php/NAT2>. Erişim tarihi: 26 Aralık 2013.

NAT2 (N-acetyltransferase 2 (arylamine N-acetyltransferase))

<http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/NAT2ID41498ch8p22.html>.

Erişim Tarihi: 7 Temmuz 2013.

National Cancer Institute at the National Institutes of Health

<http://www.cancer.gov/cancertopics/factsheet/Risk/artificial-sweeteners>.

Erişim tarihi: 19.01.2014

The American Journal of Human Genetics

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1380286/table/TB1/>.

Erişim tarihi: 12 Aralık 2013.

Prof.Dr.Tibet Erdoğan. Erişim Tarihi: 14 Temmuz 2013.

http://www.davincirobotikcerrahi.com/index.php?goto=norojen_mesane

8. ÖZGEÇMİŞ

1987 yılında Elazığ merkezde doğan Yazgı Özger, ilk orta ve lise eğitimini Elazığ'da tamamladı.

Yükseköğrenimini Haliç Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nde yaptı ve 2011 yılında mezun oldu.

Yüksek lisans eğitimine Haliç Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nde devam etti. 2013- Ağustos'tan beri Düzen Laboratuvar Grubun'da Moleküler Biyolog olarak görev yapmaktadır.