

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

**MESANE KANSERİ HASTALARINDA NQO1 C609T
POLİMORFİZMİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Hazırlayan
Mehmet Sabri ÇELİKTÜRK**

**Danışman
Yrd. Doç. Dr. Nagehan ERSOY TUNALI**

İstanbul – 2012

T.C.
HALIÇ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

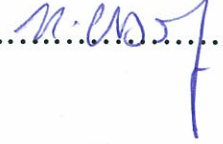
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı Tezli Yüksek Lisans öğrencisi **Mehmet Sabri ÇELİKTÜRK** tarafından hazırlanan “**Mesane Kanseri Hastalarında NQO1 C609T Polimorfizmlerinin Araştırılması**” adlı bu çalışma jürimizce Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Sınav Tarihi : 02.02.2012

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

İmzası :

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

.....


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

.....


Jüri Üyesi : Yrd.Doç.Dr.Hatice YORULMAZ
HAL.Üniv. Hemşirelik MYO Öğr.Üyesi

.....


Jüri Üyesi : Yrd.Doç.Dr.Kürşat ÖZDİLLİ
HAL.Üniv. Hemşirelik MYO Öğr.Üyesi (Yedek)

.....

Jüri Üyesi : Yrd.Doç.Dr.M.Burcu I.YAZICIOĞLU
HAL.Üniv. Mol.Biy.ve Gen.ABD Öğr.Üyesi (Yedek)

.....

ÖNSÖZ

Bu çalışma 2009 – 2012 yılları arasında T.C. Haliç Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nün bilimsel araştırma ve uygulama çalışmalarına verdiği destek ile hazırlanmıştır.

Hem lisans, hem de yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmam boyunca büyük bir özveriyle çalışmamı takip eden ve tez çalışmamın tamamlanmasını mümkün kılan danışmanım Sayın Yrd. Doç. Dr. Nagehan Ersoy Tunalı'ya çok teşekkür ederim.

Ayrıca her zaman yanımda oldukları ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen anne ve babama teşekkür ederim.

Son olarak yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmam boyunca yardımlarını esirgemeyen Arş. Gör. Necip Ozan Tiryakioğlu, Arş.Gör. Deniz Kanca ve Arş. Gör. Özlem Kurnaz'a teşekkürü bir borç bilirim.

İSTANBUL, 2012

Mehmet Sabri ÇELİKTÜRK

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

KISALTMALAR	III
ŞEKİLLER	IV
TABLolar	V
ÖZET	VI
SUMMARY	VII
1. GİRİŞ	1
1.1. Mesane Kanserinin Etiyolojisi	3
1.2. Mesane Kanserinin Patofizyolojisi	4
1.2.1. Mesanenin Yapısı	4
1.2.2. Papilloma	5
1.2.3. Değişici Epitel Hücreli Karsinom	5
1.2.4. Değişici Hücreli Olmayan Karsinomlar	6
1.3. Mesane Kanserinde Evrelendirme	6
1.4. Mesane Kanserinde Prognoz Tayininde Kullanılabilen Moleküler Belirteçler	8
1.5. Mesane Kanseri Risk Faktörleri	9
1.5.1. Sigara kullanımı	9
1.5.2. Yaş	9
1.5.3. Cinsiyet	10
1.5.4. Meslek	10
1.5.5. Alkol Tüketimi	10
1.5.6. Kahve Tüketimi	10
1.5.7. Beslenme	11
1.5.8. Parazitler	11
1.5.9. Arsenik	11
1.5.10. Fenasetin	11
1.5.11. Diğer ilaçlar	12
1.6. Mesane Kanserinde Genetik Yatkınlık	12
1.6.1. N-Asetiltransferazlar	12
1.6.2. Sulfotransferazlar	13
1.6.3. Glutasyon-S-transferazlar	13
1.6.4. Sitokrom P-450 Enzimleri (CYP)	14
1.6.5. NAD(P)H: Kinon Oksidoredüktaz (NQO1) Geni	14
2. AMAÇ	20
3. MATERYAL	21
3.1. Çalışmada Kullanılan Örnekler	21

3.2. Yanak İçi Epitel Dokudan DNA İzolasyonu İçin Kullanılan Tamponlar ve Kimyasallar.....	21
3.3. Hızlı Genomik DNA İzolasyonu İçin Kullanılan Tamponlar ve Kimyasallar	22
3.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu İçin (PZR) Gerekli Kimyasallar	23
3.5. Elektroforezde Kullanılan Kimyasallar ve Tamponlar	23
3.6. PZR Ürünlerinin Saflaştırılması.....	24
3.7. DNA Uzunluk Markörleri	24
3.8. Cihazlar	24
4. METOD.....	26
4.1. Yanak İçi Epitel Dokudan DNA İzolasyonu Metodu	26
4.2. Hızlı Genomik DNA İzolasyon Metodu	26
4.3. DNA'nın Kalitatif ve Kantitatif Analizi	27
4.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	28
4.5. Restriksiyon Fragmenti Uzunluk Polimorfizmi	28
4.6. Agaroz Jel Elektroforezi	29
4.7. Dizi Analizi Yapılacak PZR Ürünlerinin Saflaştırılması.....	29
4.8. Mesane Kanserinin Moleküler Analizi	30
5. SONUÇLAR	32
5.1. Kullanılan Örneklerin Tanımı	32
5.2. DNA İzolasyonu.....	32
5.3. C609T Polimorfizminin Moleküler Analizi.....	33
5.4. C609T Polimorfizminin PZR-Restriksiyon Uzunluk Polimorfizmi Metodu ile Gösterilmesi.....	33
5.5. PZR-RFLP Sonuçlarının DNA Dizi Analizi ile Doğrulanması.....	34
5.6. Genotip ve Alel Dağılımları.....	35
5.7. Elde Edilen Verilerin İstatistiksel Analizi.....	36
5.7.1. Hardy-Weinberg Testi.....	36
5.7.2. Sigara Kullanımı ve Mesane Kanseri İlişkisinin İncelenmesi	36
5.7.3. Cinsiyet ve Mesane Kanseri İlişkisinin İncelenmesi	37
5.7.4. Mesane Kanserinin Yaş ile İlişkilendirilmesi	37
5.7.5. Asosiyasyon Testi	38
6. TARTIŞMA	40
7. KAYNAKLAR	46
8. ÖZGEÇMİŞ.....	52

KISALTMALAR

AP-2	: Aktivatör protein-2
ARE	: Antioksidan cevap elementi
AJCC-UICC	: American Joint Commission for Cancer Union International Contre le Cancer
bç	: Baz çifti
BPB	: Bromofenol mavisi
CIS	: Karsinoma <i>in situ</i>
CYP	: Sitokrom P-450
df	: Serbestlik derecesi
dNTP	: Deoksiribonükleotid
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
EDTA	: Etilen diamin tetraasetik asit
EtBr	: Etidyum bromür
FAD	: Flavın Adenin Dinükleotit
GST	: Glutasyon S-transferaz
HW	: Hardy-Weinberg
L	: Litre
mg	: Miligram
MgCl₂	: Magnezyum klorür
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre
NaCl	: Sodyum klorür
NaOAc	: Sodyum asetat
NAT	: N-asetil transferaz
(NH₄)₂SO₄	: Amonyum sülfat
nm	: Nanometre
NQO1	: NAD(P)H dehidrojenaz, kinon 1
OR	: Görelî orantı
PAH	: Polisiklik aromatik hidrokarbon
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
Rb	: Retinoblastoma
RFLP	: Restriksiyon fragman uzunluk polimorfizmi
ROS	: Reaktif oksijen radikalleri
rpm	: Dakikadaki devir sayısı
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
SULT	: Sülfotransferaz
TE	: Tris-EDTA
TBE	: Tris-Borik asit-EDTA
U	: Ünite
χ²	: Ki-kare
XRE	: Ksenobiyotik cevap elementi

ŞEKİLLER

	Sayfa No
Şekil 1.1. Mesanenin Yapısı	5
Şekil 1.2. Mesane Kanserinin Derecelendirilmesi	7
Şekil 1.3. <i>NQO1</i> Enziminin Detoksifikasyon Şeması	15
Şekil 1.4. <i>NQO1</i> C609T Polimorfizminin Kromozom Üzerinde Gösterimi	16
Şekil 1.5. <i>NQO1</i> Polimorfizmi ve Enzim Aktivitesine Etkileri.....	17
Şekil 1.6. <i>NQO1</i> Geninin Düzenlenmesi	19
Şekil 5.1. Genomik DNA Örneklerinin %1'lik Agaroz Jelde Görüntülenmesi.....	33
Şekil 5.2. PZR Ürünlerinin %2'lik Agaroz Jelde Görüntülenmesi.....	33
Şekil 5.3. Restriksiyon Kesim Ürünlerinin %2'lik Agaroz Jelde Görüntülenmesi ...	34
Şekil 5.4. Heterozigot (C/T) Örnek Kromatogramı	34
Şekil 5.5. Homozigot Varyant (T/T) Örnek Kromatogramı	35
Şekil 5.6. Hasta Grubunun Yaş Dağılım Grafiği	38

TABLULAR

	Sayfa No
Tablo 1.1. Mesane Kanseri Primer Tümör-T Dereceleri.....	7
Tablo 1.2. Mesane Kanseri Lenf Nodu-N Dereceleri.....	7
Tablo 1.3. Mesane Kanseri Uzak Metastaz-M Dereceleri	7
Tablo 4.1. PZR Reaksiyonlarının İçerikleri	30
Tablo 4.2. PZR Döngüsü Koşulları	30
Tablo 4.3. Restriksiyon Ürünlerinin Uzunlukları.....	31
Tablo 5.1. C609T Polimorfizmi Genotip Dağılımı	35
Tablo 5.2. Alel Frekansları	35
Tablo 5.3. Hardy-Weinberg Testi Sonuçları	36
Tablo 5.4. Grup-Sigara İçimi Çapraz Tablosu	36
Tablo 5.5. Grup-Sigara İçimi Risk Tahmini.....	37
Tablo 5.6. Grup-Cinsiyet Çapraz Tablosu.....	37
Tablo 5.7. Cinsiyet-Risk Tahmini	37
Tablo 5.8. Hasta Grubunun Yaş Gruplarına Göre Dağılımları	37
Tablo 5.9. Asosiyasyon Testi	38
Tablo 5.10. Genotipik Etki	38
Tablo 5.11. Genotipik Etki ve Sigara.....	38
Tablo 5.12. Sigara İçimine Göre Genotip Dağılımları ve Risk Oranları.....	39

GENEL BİLGİLER

Adı ve Soyadı : Mehmet Sabri ÇELİKTÜRK
Anabilim Dalı : Moleküler Biyoloji ve Genetik
Programı : Moleküler Biyoloji ve Genetik
Tez Danışmanı : Yrd.Doç.Dr.Nagehan ERSOY TUNALI
Tez Türü ve Tarihi : Yüksek Lisans – Şubat 2012

ÖZET

Karsinojen metabolizmasında görev alan genlerde görülen varyasyonlar, mesane kanserine yatkınlık açısından önemlidir. NAD(P)H:kinon oksidoredüktaz (NQO1), substratına bağlı olarak aktivasyon ya da detoksifikasyon enzimi olarak rol oynar. Genin 609. pozisyonunda görülen C>T polimorfizmi enzimatik aktivitenin azalmasına neden olur. Ayrıca NQO1, sigara dumanındaki karsinojenik maddeleri aktive edebilir. Yapılan epidemiyolojik çalışmalar, sigaranın mesane kanserinin en önemli nedeni olduğunu göstermektedir. Bazı çalışmalarda NQO1 genetik polimorfizmi ile mesane kanseri arasında bir ilişkinin olabileceği saptanmıştır. Bu nedenle NQO1'in mesane kanserine olan yatkınlığın belirlenmesi için aday bir gen olabileceği düşünülmektedir.

Bu çalışmada, NQO1'deki C609T polimorfizmi ile mesane kanserine yatkınlık arasındaki ilişki, cinsiyet ve sigara içimi ile birlikte araştırılmıştır. 174 mesane kanserli hasta ile 146 sağlıklı bireyde NQO1 allellerinin dağılımı polimeraz zincir reaksiyonu ve restriksiyon enzim kesimi ile belirlenmiştir. CC, CT ve TT genotiplerinin dağılımları sırasıyla; kontrol grubunda %56.2, %39.7 ve %4.1; mesane kanserli hasta grubunda %52.3, %41.4 ve %6.3 olarak bulunmuştur. Sonuçlar istatistiksel olarak incelendiğinde çalışılan örnek grubunda mesane kanseri NQO1 C609T polimorfizmi ile ilişkilendirilememiştir. Ancak, erkeklerin kadınlara oranla 5,58 kat daha fazla mesane kanserine yakalanma riskine sahip oldukları ve sigara içenlerin içmeyenlere oranla yaklaşık 3,85 kat risk taşıdıkları belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: NOQ1, mesane kanseri, polimorfizm, C609T

GENERAL INFORMATION

Name and Surname : Mehmet Sabri ÇELİKTÜRK
Field : Molecular Biology and Genetics
Program : Molecular Biology and Genetics
Supervisor : Assist.Prof.Dr.Nagehan ERSOY TUNALI
Degree Awarded and Date : Master of Science – February 2012

SUMMARY

Variations in the carcinogen metabolism genes play important roles in predisposition to bladder cancer. NAD(P)H: quinone oxidoreductase (NQO1), may either act as a detoxification or activation enzyme, depending on its substrate. The C>T polymorphism at the 609th position of the gene results in decreased enzymatic activity. NQO1 may also activate the carcinogens present in tobacco smoke. According to epidemiologic studies, smoking is the strongest known risk factor for bladder cancer. In some population-based case-control studies, NQO1 gene polymorphism has been associated with the development of bladder cancer. For this purpose NQO1 can be regarded as a candidate gene for susceptibility to bladder cancer.

In this study we examined the relationship between NQO1 C609T polymorphism and bladder cancer together with the affect of sex and cigarette smoking status. We identified the genotype distribution for 174 bladder cancer patients and 146 healthy individuals using polymerase chain reaction and restriction enzyme digestion. The distribution of CC, CT and TT genotypes were %56.2, %39.7 and %4.1 for the control group; and %52.3, %41.4 and %6.3 for the patient group, respectively. The statistical analysis revealed that bladder cancer is not associated with the NQO1 C609T polymorphism in our study population. On the other hand, men appeared to have 5,58 fold more risk for bladder cancer compared to women, and cigarette smokers carry 3,85 fold higher risk than non- smokers.

Keywords: NQO1, bladder cancer, polymorphism, C609T

1. GİRİŞ

Kanser, genetik ve çevresel faktörlerin bir araya gelmesiyle ortaya çıkan bir hastalıktır. Çevresel toksinler, vücudumuzda faz-I ve faz-II detoksifikasyon metabolizması ile zararsız hale getirilmektedir. Faz-I enzimleri ile toksik maddelere işlevsel grup ekleyerek çok daha reaktif formlar oluşturmakta, faz-II enzimlerinin konjugasyon reaksiyonları ile etkisiz hale getirilmektedir (Liska, 1998). Kişilerin kansere olan yatkınlığının belirlenmesinde göz önünde bulundurulan mekanizmalardan biri de detoksifikasyon mekanizmalarında rol oynayan enzimlerin gösterdiği polimorfizmlerdir (Estabrook, 1996). Ortaya çıkan polimorfizmler sonucunda enzimlerin niceliksel ve niteliksel özellikleri değişmektedir. Genetik polimorfizm çalışmaları, hastalıklar için risk altındaki kişilerin belirlenmesi ve ilaç tedavisi için yeni hedeflerin belirlenmesine fırsat verir. Kimyasalları ya da karsinojenleri metabolize eden enzim polimorfizmleri kalıtsal ya da çevresel olarak hastalık oluşumunda doğrudan etki gösterirken, DNA onarım genlerindeki polimorfizmler dolaylı etki gösterir (Vineis, 2002). Polimorfizm bir organizmada birden fazla fenotip oluşturan aynı lokustaki birden fazla allelin bulunması durumudur. Polimorfizmin fenotipe yansımaları sonucu gen ürününün ifadesinde farklılıklar olmasına neden olur. Eğer polimorfizm enzimi kodlayan bölgede oluşmuş ise vücuttaki enzim seviyesi popülasyon içerisinde farklılıklar oluşturur. Ortaya çıkan farklılık ksenobiyotiklerin detoksifikasyonunu da etkiler. Enzimlerin bu polimorfik durumları çeşitli hastalıklara ve kansere yatkınlık sağlamaktadır. Bu nedenle, bu konu çalışmaların ilgi odağı haline gelmiştir (Weber, 1997: 3). Enzimlerde meydana gelen bu polimorfizmlerin bireyin sahip olduğu genotipe bağlı olarak çeşitli hastalıklara ve kansere yatkınlık sağladığı düşünülmektedir (Vineis, 2002).

Mesane kanserlerinin çevresel veya mesleki olarak maruz kalınan kimyasallarla ilişkisi 19.yüzyıl sonlarından 20.yüzyıl ortalarına kadar açık bir şekilde ortaya konmuştur. Bununla beraber her kimyasala maruz kalan kişide kanser gelişmemesi bu konudaki araştırmaların kişiler arasındaki diğer farklılıklara

yönelmesine neden olmuştur. Bu kişisel farklılıklar muhtemelen beslenme alışkanlıkları, genetik, yaşadığı çevre ve diğer maruz kalınan kimyasallarla belirlenmektedir. Bunların içinde değişmeyecek tek ve belki de en önemli farklılık genetik altyapıdır (Thier ve diğ., 2003). Ayrıca, genetik yapının yanı sıra maruz kalınan maddenin dozu ve maruz kalma süresi de önemlidir. Diğer yandan yapılan birçok çalışmanın sonucunda genetik özellikler ile çeşitli kanserler arasında ilişkiler gösterilmişken yine bir o kadar çalışmada da bu ilişkinin olmadığı bildirilmiştir. Zararlı kimyasallar vücut içerisine girdikten sonra başta karaciğer olmak üzere çeşitli dokularda, daha az toksik veya hiç zararı olmayan maddelere dönüştürülmek istenmektedir. Bu işleri yapacak detoksifikasyon enzimlerinin aktivitelerinin genetik yapı ile belirlendiği çeşitli araştırmalarda gösterilmiştir (Jung ve Messing, 2000).

NOQ1 kinon ve kinon türevlerinden iki elektron indirgeyen bir flavoproteindir. Bir çok dokuda ifade edilen *NQO1*, ksenobiyotiklerden iki elektron indirgenmesini katalize ederek semikinon ve serbest radikal oluşumunu engeller. Dolayısıyla hücreyi oksidatif stres, sitotoksiklik, mutajenlik ve karsinojenlikten korur. İndirgeme sonucunda oluşan hidrokinonlar faz-II enzimleri ile konjugasyona girerek detoksifiye olurlar ve vücuttan atılırlar. *NQO1* kimyasal toksisiteye ve karsinojeniteye karşı hücreleri koruyucu etkisi nedeniyle son zamanlardaki çalışmaların ilgi kaynağı olmuştur (Joseph ve diğ., 2000).

Ksenobiyotik metabolizmasında önemli yere sahip olan *NQO1* enzimini kodlayan gen üzerinde meydana gelen mutasyon sonucunda ortaya çıkan polimorfizm enzimin etkisini azaltmakta ya da ortadan kaldırmaktadır. 16. kromozomun kısa kolunda lokalize olmuş *NQO1* geninin 6. ekzonunun 609. nükleotidinde C→T dönüşümü aminoasitlerden prolinin serine dönüşmesine neden olmaktadır. Polimorfik aleli heterozigot olarak taşıyan bireylerde enzim aktivitesi düşük iken, homozigot olarak taşıyan bireylerde enzim aktivitesi ortadan kalkmaktadır (Traver ve diğ., 1997). *NQO1* geni aynı zamanda tümör baskılayıcı genlerden *p53* geninin kararlılığını sağladığı için bu genin varyantını taşıyan bireylerde *p53* geni kararlı olmadığından diğer kromozomal düzensizliklerin oluşmasına meyilli bir ortam yaratılmıştır. Genomik kararsızlık nedeniyle mutasyonların hedefi haline gelen hücre nihayetinde kanserleşir (Iskander ve Jaiswal, 2005).

1.1. Mesane Kanserinin Etiyolojisi

Mesane tümörlerinin oluşumunda çevresel ve genetik faktörlerin etkili olduğu düşünülmektedir. Mesane kanserinin gelişiminde rol oynayan çevresel faktörler sigara, mesleki karsinojenler, tedavi amaçlı siklofosfamid kullanımı ve pelvik radyoterapidir. Mesane kanserinin gelişiminde rol oynayan diğer etkenler cinsiyet, ırk ve yaştır. Mesane kanserinin gelişiminde çok sayıda onkogenlerin ve tümör süpresör genlerin mutasyonları önemli rol oynamaktadır. Onkogenler, hücresele seviyede dominant etkiye sahip genlerdir; yani aktive edildiklerinde veya ekspresyon seviyeleri arttığında tek bir mutant alel, bir hücreyi normal fenotipten malin fenotipe dönüştürmeye yetebilir. Mesane kanseriyle ilişkili en iyi bilinen onkogenler H-ras, erb-B2 ve c-myc'dir. Tümör baskılayıcı genler ise onkogenlerin tersine hücre çoğalmasını engelleyici özelliktedir. Tümör baskılayıcı genlerin kanser gelişiminde etkili olabilmesi için her iki alelin fonksiyonunu yitirmesi gerekir. Dolayısıyla bu genler kanser gelişimindeki etkileri bakımından resesif özelliktedirler. Kromozom 13q'daki retinoblastoma geni (Rb) ve kromozom 17p'deki p53 geni, en iyi çalışılmış tümör baskılayıcı genlerdir (Iskander ve Jaiswal, 2005). Kanserin ilerlemesinde anjiyogenez gelişimi, hücre dışı matriks ve hücre adezyon moleküllerindeki çeşitli anormallikler etkili olmaktadır. Ayrıca mesane kanserinin gelişiminde ve ilerlemesinde mikrosatellit kararsızlığı ve çeşitli epigenetik faktörlerin de etkili olduğu gösterilmiştir. Mesane kanserinin gelişiminde ve ilerlemesinde rol oynayan karmaşık mekanizmaların anlaşılması için yeni çalışmalara ihtiyaç vardır.

Üriner sistemde meydana gelen kanserlerinin büyük kısmı mesaneden gelişir. Mesane kanseri insanlarda en sık rastlanan kanserlerdendir. Kanser türleri içinde önemli bir yer tutan mesane kanseri, Batı ülkelerinde yapılan çalışmalara göre sıklık sıralamasında erkeklerde dördüncü sırayla tüm kanserlerin %5-10'unu, kadınlardaysa sekizinci sıradaki yeriyle % 4'ünü oluşturmaktadır (Messing ve Catalona, 1998: 2337). Çocuklar da dahil olmak üzere her yaşta görülebilir, ancak orta yaş ve ileri yaşlarda görülme oranı yüksektir. Erkeklerde kansere bağlı ölüm nedenleri arasında beşinci sırada yer alır (Petersen, 1992: 260). Yaşlılarda mesane kanserinden ölüm oranı daha yüksektir. Tanı sırasında yaş ortalaması yaklaşık 65 yaştır. Erkeklerde görülme oranı kadınlarda görülme oranından 3 kat fazladır (Jemal ve diğ., 2008). Erkeklerde en yüksek insidansın 1/100000 ile Mısır'da, daha sonra 33/100000 ile İspanya'da olduğu belirlenmiştir (Shariat ve diğ., 2009). Mesane kanseri olgularında

tanı konulduğu anda bulguların yaklaşık %85'i mesanede lokalize olup, %15'i bölgesel lenf düğümlerine veya uzak bölgelere yayılmış olarak görülür (Petersen, 1992: 260 ; Messing ve Catalona, 1998: 2337). Mesane kanserlerinin çoğu epitelyal kökenli olup %95'i tranzisyonel karsinomdur. Bu nedenle mesane kanseri terimi değişici epitel hücreli karsinomalar için kullanılır. İnsan mesane karsinomlarının patogeneğinde sigara içimi, mesleki olarak maruz kalınan aromatik aminler (benzidin, 4-aminodifenil, 1-naftilamin), saç boyalarında kullanılan p-fenilendiamin, içme sularında bulunan arsenik, kronik fenasetin kullanımı, siklofosfamid içeren kemoterapiler, kronik sistozomiazis, iyonize radyasyon ve suni tatlandırıcıların etkisi olduğu düşünülmektedir (Sternberg, 2004: 2045 ; Eble ve diğ., 2004 ; Vogelzang ve diğ., 2006: 355).

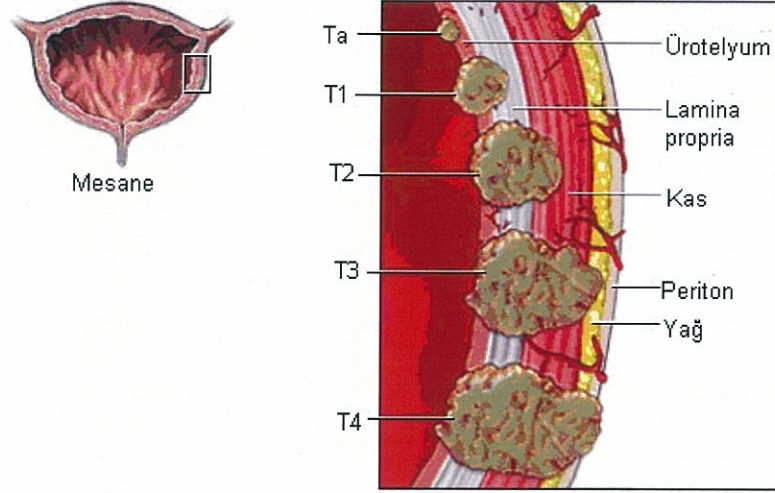
1.2. Mesane Kanserinin Patofizyolojisi

Çoğu transisyonel epitel hücreli karsinomlar olmakla birlikte tüm mesane kanserlerinin %95'i epitelyal malignitelerdir (Tanagho ve McAninch, 2004: 487).

1.2.1. Mesanenin Yapısı

Mesane duvarında en iç tabakayı ürotelyum olarak adlandırılan epitelyal yüzey oluşturur ve içten dışa doğru lamina propria, muskularis propria ve adventisya tabakaları yer alır (Şekil 1.1.). Bu tabakalar ürotelyal karsinomlara sahip hastaların evrelemesi, tedavi seçimi ve beklenen sağ kalım süresinin belirlenmesi için hem patolojik hem de klinik olarak kullanılmaktadır. Bu nedenle mikroskopik tanının doğru yapılması önem taşımaktadır (Reuter, 1997: 835).

Ürotelyum, ekstraselüler matriksten (kollajen, glikozaminoglikanlar, adeziv glikoproteinler) ibaret bazal membran üzerine oturan 3-7 katman değişici epitel hücrelerden oluşmuştur. Epitelyum hücrelerin görünümü değişkenlik gösterir. Aktif olarak çoğalan bazal membran üzerindeki bazal hücreler, luminal hücreler ve belki de normal mesane epitelinin en önemli özelliği olan büyük şemsiyeye benzer sıkıca birbirine bağlı hücreler görülür. Mesanenin musküler duvarında, farklı yönlere giden kas demetleri mevcuttur. Bunlar mesane boynu düzeyinde birbirlerine yaklaştığında içte ve dışta uzunlamasına ve ortada dairesel düzenli tabaka olmak üzere 3 bölge ayırt edilebilir (Williams ve Stein, 2004).



Şekil 1.1. Mesanenin yapısı (Williams ve Stein, 2004)

1.2.2. Papilloma

Dünya Sağlık Örgütü'ne (DSÖ) göre papillom, normal karakterde değişikliktir. Epitel dökümlü fibrovasküler stromada bulunan benin kaynaklı bir tümör türüdür. Tüm ürotelyal karsinom olgularının %1'ini oluşturur. Prognoz iyidir ve ayrıca ilerleme riski olmadığı kabul edilmektedir (Williams ve Stein, 2004).

1.2.3. Değişici Epitel Hücreli Karsinom

Tüm mesane kanserlerinin yaklaşık %90'ı değişikliktir. Epitel hücreli karsinomlardır. Bu tümörler sıklıkla papiller ve lezyonlar halinde görülür. Papiller yapıda olanlar genellikle yüzeysel olmasına karşın, sapsız olan tümörler invazivdir.

Karsinom *in situ* (CIS) düz, papiller yapıda olmayan, neoplazik epitel olarak bilinir. Ürotelyum normal hücre polaritesinden yoksun, hücreler geniş ve göze çarpan nükleuslara sahiptir. CIS bir lezyonun yakınında veya uzağında lokalize olabilir veya nadir makroskopik tümörleri olmayan hastada fokal veya yaygın lezyonlar halinde oluşabilir. Tümörün seyri değişkendir ve invaziv olabilir.

Tümör invazyonunun sıklığı, tekrarlama ve ilerleme tümörün derecesiyle güçlü bir korelasyon içindedir (Williams ve Stein, 2004).

1.2.4. Değişici Hücreli Olmayan Karsinomlar

Adenokarsinom: Tüm mesane kanserlerinin %2'sinden azını oluşturur. Histolojik açıdan adenokarsinomlar mukus salgılar, kolloid veya yüzük şeklinde görülebilirler. Bu tip tümörlerde genellikle kas tutulumu vardır.

Yassı Epitel Hücreli Karsinom: Tüm mesane kanserlerinin %5-10'unu oluşturur ve sıklıkla kronik enfeksiyon ve mesane taşı öyküsüyle ilişkilidir. Mısır, Afrika'nın bazı bölgeleri ve Orta Doğu'da tüm mesane kanserlerinin yaklaşık %60'ını oluşturur. Bu tümörlere tanı konulduğunda sıklıkla invaziv karakterdedir.

Farklılaşmamış Karsinomlar: Nadir görülen mesane tümörlerindedir. Bu tümör tipinde epiteliyal elemanlar yoktur. Histolojik açıdan akciğer lezyonlarını andıran küçük hücreli bir tip tanımlanmıştır.

Mikst Karsinom: Tüm mesane karsinomlarının yaklaşık %4-6'sını oluşturur. Değişici epitel hücreleri, yassı epitel hücreleri ve farklılaşmamış bileşenleri içerir.

Mesanede görülen nadir epitelyal karsinomlar karsinoid tümörler, villöz adenomalar, karsinosarkomalar ve melanomlardır. Mesanede nadir görülen ve epitel kökenli olmayan kanserler lenfomalar, feokromositomalar, koryokarsinomlar ve çeşitli mezenşimal tümörlerdir (Williams ve Stein, 2004).

1.3. Mesane Kanserinde Evrelendirme

Mesane kanserinin klinik ve patolojik evrenmesi hastalara uygulanacak olan uygun tedavinin seçilmesinde çok önemli rol oynar. Mesane kanseri klinikte yüzeysel ve invaziv kanser olarak tanımlanır. Yüzeysel kanserler mesanenin muskularis propria'sına invaze olmayan tümörleri içerirken (evre Ta, Tis ve T1) (Şekil 1.2.) , (Tablo 1.1), invaziv kanserler muskularis propria ve ötesine invaze tümörleri içermektedir (evre T2, T3, T4) (Şekil 1.2.) , (Tablo 1.1.). Bu sebeple, patolojik evrelemede en önemli olan aşama, tümörün muskularis propria'ya invaze olup olmadığının tespit edilmesidir.

1946 yılında öne sürülmüş olan sistemin modifikasyonu olan Marshall ve American Joint Commission for Cancer Union International Contre le Cancer (AJCC-UICC) sınıflandırmaları günümüzde klinikte uygulanan iki ana sistemdir. Her iki evreleme sisteminde de, mesane duvarı içine invazyon derinliği, bölgesel ve

uzak metastaz paterni temel alınmaktadır (Tablo 1.2. ve Tablo 1.3.) (Grignon, 1997: 221).

Tablo 1.1. Mesane Kanseri Primer Tümör-T Dereceleri (Tanagho ve McAninch, 2004: 487).

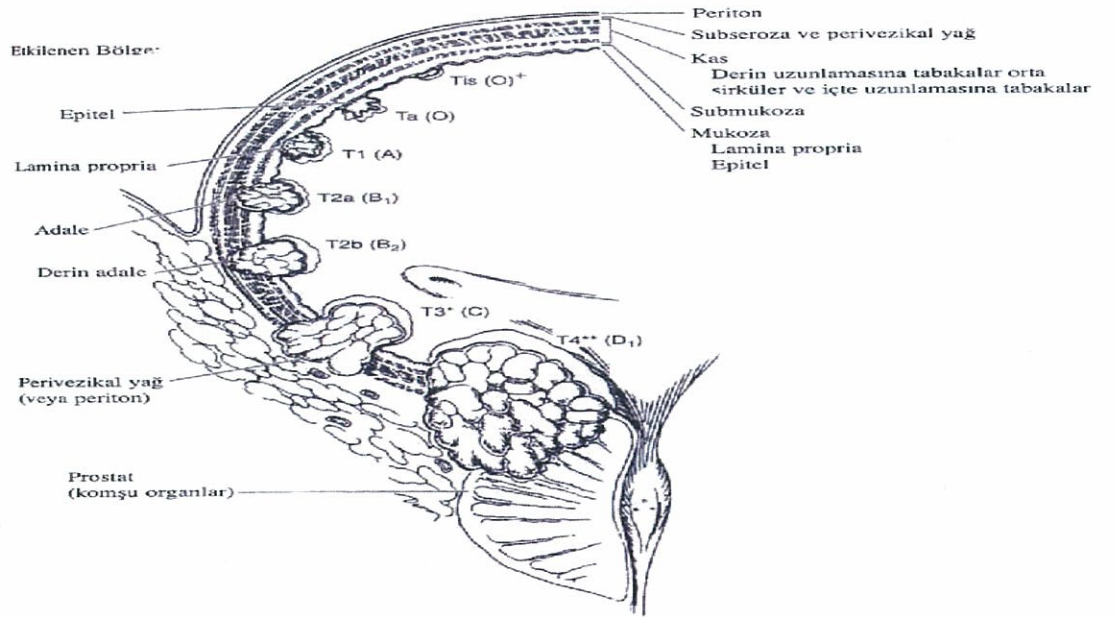
T0	Primer tümörün kanıtı yok.
Ta	Non-invaziv papiller karsinom.
Tis	Karsinom in situ.
T1	Tümör subepiteliyal konnektif dokuya (lamina propria) invaze.
T2	Tümör yüzeysel kas tabakasına invaze.
T3	T3a: Tümör derin kas tabakasına invaze./ T3b: Tümör perivezikal yağ tabakasına invaze.
T4	Tümör prostat, uterus, vajina, pelvik duvarı veya abdominal duvara invaze.

Tablo 1.2. Mesane Kanseri Lenf Nodu-N Dereceleri (Tanagho ve McAninch, 2004: 487).

N0	Bölgesel lenf nodu metastazı yok.
N1	En büyük çapı 2 cm veya daha küçük olan bir tane metastatik lenf nodu.
N2	Çapı 2 cm'den büyük, ama 5 cm'den küçük bir tane metastatik lenf nodu veya hiç birisinin çapı 5 cm'den büyük olmayan çoklu lenf nodu metastazı.
N3	En büyük çapı 5 cm'den büyük lenf nodu metastazı.

Tablo 1.3. Mesane Kanseri Uzak Metastaz-M Dereceleri (Tanagho ve McAninch, 2004: 487).

M0	Uzak metastaz yok.
M1	Uzak metastaz var.



Şekil 1.2. Mesane kanserinin Derecelendirilmesi (Tanagho ve McAninch, 2004: 487).

1.4. Mesane Kanserinde Prognoz Tayininde Kullanılabilen Moleküler Belirteçler

Normal hücresel proliferasyon hücresel döngülerden düzenli bir şekilde geçmeyi gerektirirken, malignite kontrolsüz çoğalma ile karakterize edilir. Siklinler ve sikline bağımlı kinazlar gibi hücre döngüsüne bağımlı protein kompleksleri bu ilerlemeleri sıkıca kontrol etmektedir. Bu protein kompleksleri p53 geni ve retinoblastoma (Rb) geni gibi hücre döngüsündeki geçiş noktalarında bulunan önemli proteinleri fosforile eder. Hücre döngüsündeki kontrol kaybı karsinogenezin gelişmesinde önemli ve erken bir adım olabilir.

İnvaziv mesane kanseri görülen hastalarda en yaygın olarak tanımlanmış moleküler belirteç p53 ifadenmesidir. p53 geni hücre döngüsünün düzenlenmesinde anahtar rol oynayan bir tümör baskılayıcı gendir. DNA hasarı oluştuğunda p53 proteinin miktarı artarak hücre döngüsünün durmasına ve bu esnada DNA'nın tamir edilmesine neden olur. Normal p53 ifadenmesi olan hastalarla karşılaştırıldığında p53 ifadenmesi bozulmuş hastalarda hastalığın yenileme riski artmış ve genel sağ kalımın kötüleşmiş olduğu görülmektedir. İmmünohistokimyasal p53 boyanması göstermeyen pT1, pT2 ve P3a kanserlerde tekrarlama oranları sırasıyla %7, %12, %11 iken, p53 boyanması pozitif kanserlerde oranları sırasıyla %62, %56, %80 düzeyindedir (Anafarta ve diğ., 1998: 707 ; Tanagho ve McAninch, 2004: 487).

İmmünohistokimyasal yöntemlerle belirlenen Rb ifade değişimleri yüksek derece ve evredeki mesane kanserleriyle ilişkilendirilmiştir. Doğal tip, p53 ve Rb'lerini muhafaza eden tümörlü hastalarla karşılaştırıldığında invaziv mesane kanserli hastalarda hem p53 hem de Rb'i inceleyen çalışmalar her iki gende oluşan ifade değişimli mesane tümörlü hastalarda daha kötü bir prognoz ve daha düşük bir genel sağ kalımın varlığını düşündürmektedir (Anafarta ve diğ., 1998: 707).

Mesane kanserli hastalarda prognoz ile ilişkili olabilen tümör büyüme fraksiyonu ve çeşitli hücresel adezyon molekülü ifadenmesi (E-kaderin) gibi başka belirteçler de değerlendirilmektedir.

1.5. Mesane Kanseri Risk Faktörleri

Günümüzde yüzeysel ve yavaş ilerleyen mesane tümörlerinin oluşumunda genetik yatkınlığın varlığı, agresif değişici epitel karsinomlarının ve skuamoz hücre karsinomlarının ise çeşitli karsinojenlerin, kimyasalların etkisiyle sonradan geliştiği düşünülmektedir. Mesane kanserinin oluşumunda birçok faktörün rol aldığı bilinmektedir. Etyolojik faktörler arasında genetik yatkınlığın dışında, sigara, mesleki karsinojenler, kronik enfeksiyonlar, mesane taşı/yabancı cisimler, analjezikler, pelvik radyasyon ve sitotoksik kemoterapi sayılabilir (Tanagho ve McAninch, 2004: 487). Yapay tatlandırıcıların kullanımı da bir risk faktörü olarak öne sürülmüştür. Enfeksiyon ve taşların indükte ettiği fiziksel travmalar, malignite riskini artırmaktadır. Mesane kanserinin gelişmesine yol açan genetik olayların niteliği tam olarak aydınlatılamamakla birlikte, birden fazla genetik mekanizmanın etkili olduğu düşünülmektedir (Anafarta ve diğ., 1998: 707 ; Tanagho ve McAninch, 2004: 487).

1.5.1. Sigara Kullanımı

Sigara içimi, mesane kanserinin majör risk faktörüdür. Erkeklerde mesane kanserlerinin %66'sından kadınlarda ise %30'undan sorumlu olarak düşünülmektedir. Genellikle sigara kullanmayanlara göre, sigara kullananlarda mesane kanseri gelişme riski 2.6-4 kat daha artmış olup, aradaki ilişkinin doza bağlı olduğu düşünülmektedir (Anafarta ve diğ., 1998: 707). Sigara kullanma süresi ve kullanılan miktar da riski belirlemektedir. Sigara içiminin kesilmesiyle beraber risk azalmakta ve yaklaşık 15-20 yıl sonra içmeyenlerle aynı olmaktadır (Walsh ve diğ., 1997: 2329).

1.5.2. Yaş

Mesane kanseri tüm yaşlarda görülmekle birlikte genellikle orta yaş ve üstü yaşlarda görülmektedir ve kanser tanısı konulma yaşı yaklaşık 70 civarındadır (Messing ve Catalona, 1998: 2337). Yaş ile birlikte artan mesane kanseri riskini açıklamak için çeşitli fikirler ortaya atılmıştır. Artan yaş ile beraber karsinojenlere maruz kalma oranının ve biriken DNA hasarı miktarının arttığı ve bu sebeple yaş ile beraber kanser riskinin de arttığı öne sürülmüştür.

1.5.3. Cinsiyet

Erkeklerin kadınlara oranla yaklaşık 3-4 kat daha fazla mesane kanserine yakalanma riski vardır. Erkeklerde mesane kanserine yakalanma riski kadınlara göre 3-4 kat daha fazla olsa da, mesane kanseri nedeniyle ölüm oranı sadece iki kat daha fazladır ve kadınlarda ise hastalık çoğunlukla ilerlemiş durumlarda anlaşılabilir. Mesane kanseri erkeklerde kansere bağlı ölümler arasında %3'lük, kadınlarda ise %1,5'lük orana sahiptir (Jemal ve diğ., 2008).

1.5.4. Meslek

Mesleki maruziyet durumunda ise, erkeklerde %15-35 ve kadınlarda %1-6 oranında sorumlu olduğu görülmüştür. Kimyasal sanayi, petrol, kauçuk, boya, deri ve basım fabrikalarında çalışanlar yüksek risk altındadır. Spesifik mesleki karsinojenler arasında benzidin, beta naftilamin ve 4-aminobifenil sayılabilir ve bu ajanlara maruz kalma ile tümör gelişimi arasındaki latent dönem uzayabilir. Farklı malin hastalıkların tedavisi için siklofosfamid alan hastalar da risk grubu altındadır. Rehn tarafından ilk kez anilin boyaları ile mesane kanserleri arasında ilişki kurulmuştur. Mesleki kimyasalların mesane kanserlerinin yaklaşık %25'inden sorumlu olduğu düşünülmektedir (Walsh ve diğ., 1997: 2329 ; Jung ve Messing, 2000 ; Sternberg, 2004: 2045 ; Eble ve diğ., 2004 ; Vogelzang ve diğ., 2006: 355).

1.5.5. Alkol Tüketimi

Mesane kanseri ve alkol kullanımı arasındaki ilişki birçok çalışmada incelenmiş fakat tutarsız sonuçlar elde edilmiştir (Bruemmer ve diğ., 1997). Alkol tüketiminin erkeklerde mesane kanseri açısından 1,3 kat risk oluşturduğu kadınlarda ise herhangi bir risk faktörü oluşturmadığı gösterilmiştir (Mao ve diğ., 2010).

1.5.6. Kahve Tüketimi

Hayvan deneylerinde kahve veya kafein içeren maddelerin kansere neden olduğuna dair bulgu saptanamamış olmasına rağmen bazı epidemiyolojik çalışmalarda kahve içicilerinin içmeyenlere göre daha fazla mesane kanseri riski

taşıdığı bildirilmiştir (Sternberg, 2004: 2045 ; Eble ve diğ., 2004 ; Vogelzang ve diğ., 2006: 355).

1.5.7. Beslenme

Yapılan birçok çalışmada meyve ve sebze ağırlıklı beslenmenin mesane kanseri açısından koruyucu etki gösterdiği, düşük meyve ve sebze içeren beslenme tarzının ise mesane kanseri açısından bir risk faktörü (1,4 kat) olduğu bildirilmiştir (Steinmaus ve diğ., 2000).

1.5.8. Parazitler

Trematod sınıfından bir yassıkurt olan *Schistosoma haematobium* mesane içerisinde muscularis propiaya bıraktığı yumurtaları sayesinde kronik mesane enflamasyonuna sebep olmaktadır. Bu parazit ile enfekte olmuş kişilerin mesane kanserine daha yatkın oldukları bildirilmiştir (IARC Monographs Evaluation.,1994).

1.5.9. Arsenik

Birçok çalışmada klorlu içme sularında bir yan ürün olarak veya direk kontaminasyon yoluyla arsenik bulunduğu ve bunun da mesane kanseri riskini arttırabileceği gösterilmiştir. IARC (International Agency for Research on Cancer – Uluslararası kanser araştırmaları ajansı) çalışma grubunun 2004 yılındaki araştırmasında içme sularında bulunan arsenik, insan kanserojeni olarak belirtilmiş ve mesane kanserine neden olduğu bildirilmiştir (Walsh ve diğ., 1997: 2329 ; Jung ve Messing, 2000 ; Sternberg, 2004: 2045 ; Eble ve diğ., 2004 ; Vogelzang ve diğ., 2006: 355).

1.5.10. Fenasetin

Çok sayıda epidemiyolojik çalışmada aşırı fenasetin içeren analjezik kullananlarda üretelyal kanserlerin (renal pelvis, üreter, mesane) geliştiği gösterilmiştir. Rölatif risk 2.4- 6 ve hatta üzeri bildirilmiştir (Walsh ve diğ., 1997:

2329 ; Jung ve Messing, 2000 ; Sternberg, 2004: 2045 ; Eble ve diğ., 2004 ; Vogelzang ve diğ., 2006: 355).

1.5.11. Diğer İlaçlar

Lösemi ve lenfomaların gelişimi ile ilişkisi gösterilen sitotoksik ilaçlardan olan siklofosfamidin mesane kanserlerine de neden olduğu gösterilmiştir (Walsh ve diğ., 1997: 2329 ; Jung ve Messing, 2000 ; Sternberg, 2004: 2045 ; Eble ve diğ., 2004 ; Vogelzang ve diğ., 2006: 355).

1.6. Mesane Kanserinde Genetik Yatkınlık

Polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH) ve aromatik aminler gibi DNA'ya bağlanarak hasara sebep olan ürotelyal karsinogenlerin metabolizmasında rol oynayan enzimleri kodlayan genlerde görülen polimorfizmler mesane kanserine genetik yatkınlık açısından önem arz ederler. Karsinogen metabolizmasındaki aktivasyon-detoksifikasyon dengesi, detoksifiye edilen veya tam tersine aktive edilen karsinogenlerin, dolayısıyla da bu karsinogenlerin sebep oldukları DNA hasarının miktarını belirler. Bu süreçte görev alan enzimlerin çoğu oldukça polimorfiktir. Bu polimorfizmler nükleotid değişimleri, delesyonlar veya insersiyonlar şeklinde görülür. Enzim aktivitesinin artmasına, azalmasına veya tamamen kaybolmasına sebep olabilen bu polimorfizmler aktivitesini etkiledikleri enzimin işlevine ve enzim aktivitesini nasıl etkilediklerine bağlı olarak koruyucu etki gösterebilecekleri gibi, mesane kanseri riskini arttırabilirler (Franeкова ve diğ., 2008).

1.6.1. N-Asetiltransferazlar

N-asetiltransferazlar aromatik aminlerin aktivasyonunda ve detoksifikasyonunda rol oynayan enzimlerdir. İnsan N-asetiltransferaz (NAT)'ının farklı substrat spesifitesine sahip iki alt izoenzimden oluştuğu bilinmektedir. NAT çoğu memeli hücrelerinde vardır. NAT1 ve NAT2; farklı genler tarafından kodlanır. NAT1 geni birçok hücre tarafından sentez edilirken, NAT2 karaciğer ve bağırsaklar tarafından sentezlenir (Sim ve diğ., 2003). Bu genlerden NAT2'de görülen

polimorfizmler mesane kanseri ile özellikle ilişkili bulunmuştur. NAT2, ilaç ve karsinojenlerinin aktivasyonu veya detoksifikasyonunda önemlidir. NAT2 geni ve mutant formlarından oluşan yabancı tip alel ile asetilasyon polimorfizmi ve bunun sonucunda hızlı ve yavaş asetilatör oluşur. Bir araştırmacının sonuçlarına göre bir kişi NAT2 yabancı tip alelinin en az bir genini taşıyorsa hızlı asetilasyon fenotipine sahip olurken, NAT2'nin her iki allelinde de mutasyon varsa yavaş asetilasyon fenotipine sahip olur (Lutz, 2000 ; Shibuta ve diğ., 1994). Elde edilen bilgilere göre NAT2 yavaş asetilasyon genotipi mesane kanseri ile yüksek oranda ilişkilidir. NAT1 ile ilişkili çalışmalarda ise tutarsız sonuçlar elde edilmiştir.

1.6.2. Sülfotransferazlar

Sülfotransferazlar birçok ksenobiyotiğin ve ilacın sülfonasyonunu katalizleyen enzimlerdir. Bu gen ailesi çok polimorfik olmamasına rağmen SULT1 A1 geni oldukça polimorfik bir genidir ve bu polimorfizmlerden Arg213His polimorfizminin meydana getirdiği His213 aleli daha az aktiftir ve mesane kanserinde koruyucu etki gösterdiği belirlenmiştir (Zheng ve diğ., 2003).

1.6.3. Glutatyon-S-transferazlar

Glutatyon S-Transferazlar, yine aynı adla anılan bir gen süper ailesinin ürünleridir. Faz II detoksifikasyonunda rol oynamaktadır. Bu enzim glutatyon ile çeşitli ksenobiyotik ve reaktif metabolitlerinin konjugasyonunu katalizler.

GSTM genleri, kromozom 1p13.3 lokusunda haritalanmıştır (Pearson ve diğ., 1993). En çok karaciğer, testis, beyin, adrenal, böbrek, pankreas, kalpte ve az miktarda akciğerde sentezlenir (Eaton ve Bammler, 1999).

İnsan GSTP1 geni kromozom 11(11q13) lokusunda haritalanmıştır (Ali-Osman ve diğ., 1997). Başlıca beyin, akciğer, kalp, testis, adrenal bez, böbrek, pankreas ve karaciğerde sentezlenir (Eaton ve Bammler, 1999). Ayrıca normal insan epitel dokusunda da yaygın olarak sentezlenmektedir. İnsan GSTP1 geni polimorfik olup, her ikisi de amino asit değişimiyle sonuçlanan iki genetik polimorfizm bulunmaktadır.

GSTM1 delesyonlu bireylerde mesane kanseri için göreceli oranı 1,5 (%95 CI= 1,3-1,6) olarak belirlenmiştir (Garcia-Closas ve diğ., 2005). GSTT1 ve GSTP1

genlerinde görülen polimorfizmlerin incelendiği çalışmaların sonuçları ise tutarsızdır (Brockmoller ve diğ., 1996).

1.6.4. Sitokrom P-450 Enzimleri (CYP)

CYP'ler faz I ilaç metabolizmasında rol oynayan en önemli enzimlerdir. CYP enzimleri, 400-530 aminoasitten yapılmış proteinlerdir. Bazı dizilimi benzerliklerine göre, CYP sistemi 40 farklı aile içinde sınıflandırılır. CYP sisteminin tıpta çok önemli etkileri vardır. Bunlar; terapötik maddeleri inaktive veya aktive etme, kimyasal maddeleri oldukça yüksek derecede reaktif moleküllere dönüştürme ve istenmeyen hücre hasarı, hücre ölümü veya mutasyon gibi olaylara neden olma, steroid hormon sentezindeki bazı adımlara katılma, yağ asidi ve bunların türevlerinin metabolizması gibi olaylardır (Özerol, 1996 ; Çetin, 1999).

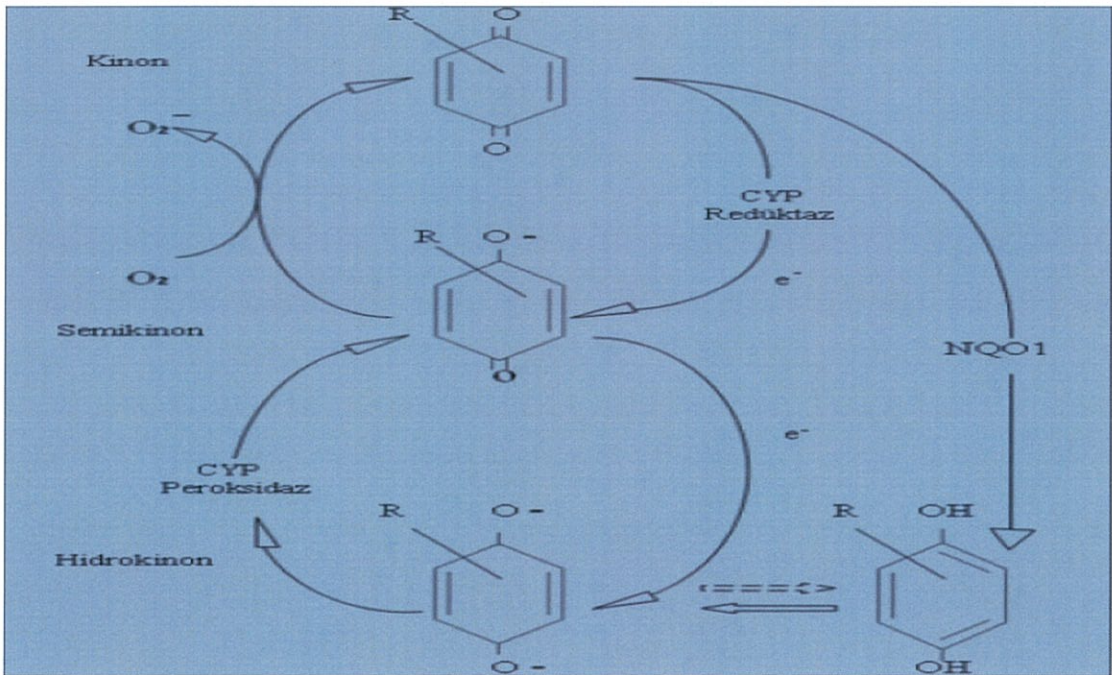
CYP enzimlerinin özellikleri; birçok dokuda işlev görmeleri, hepatositlerde en yüksek derişimde bulunmaları, primer olarak oksidatif metabolizmayı düzenlemeleri olarak özetlenebilir. Hücre içinde bulunduğu yere göre:mitokondride bulunan CYP enzimleri ve endoplazmik retikulumda bulunan ksenobiyotik CYP enzimleri olmak üzere iki grupta incelenirler (Nemeroff ve diğ., 1996 ; Çetin, 1999). En önemli CYP izoenzimleri CYP3A4, CYP2D6, CYP2C9 ve CYP2C19'dur (Rogers ve diğ., 2002 ; Linder ve diğ., 2002). CYP2D6, CYP2E1, CYP2C19 genlerinde görülen polimorfizmlerin mesane kanseri riskini arttırdığı belirlenmiştir (Anwar ve diğ., 1996 ; Brockmoller ve diğ., 1996 ; Choi ve diğ., 2003).

1.6.5. NAD(P)H: Kinon Oksidoredüktaz (NQO1) Geni

NQO1, kromozom 16q22.1'de lokalize, 6 ekzon ve 5 introndan oluşan, yaklaşık 20 kb uzunluğunda bir gendir (Iskander ve Jaiswal, 2005) (Şekil 1.4.). NQO1, substratına bağlı olarak kinonları biyoaktif veya detoksifiye eden, 2 elektronlu bir redüktazdır. NQO1 enziminin detoksifikasyon reaksiyonları Şekil 1.3.'de gösterilmiştir (Sørensen ve diğ., 2005). Kinonlar, oldukça reaktif bileşikler olup, egzoz gazı, sigara dumanı ve şehir havasında bol miktarda bulunduğu gibi, yediğimiz pek çok besinin içinde de doğal olarak bulunur (Vineis, 2002). Kinonların tek elektron indirgeme reaksiyonları, sitokrom P450 enzimi tarafından gerçekleştirilir. Reaksiyon sonucunda semikinonlar oluşur (Iskander ve Jaiswal,

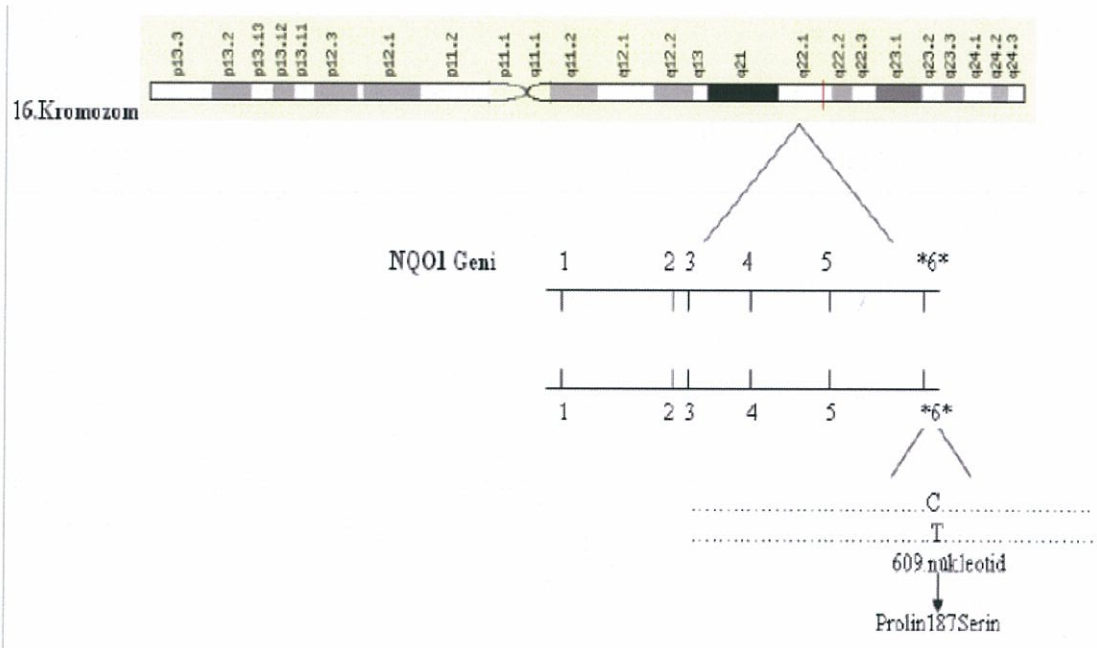
2005). Semikinonlar, moleküler oksijen varlığında redoks reaksiyonları ile reaktif oksijen çeşitlerini meydana getirirler. Bunun sonucunda oksidatif stres ve DNA hasarı oluşur (Jaiswal, 2000). NQO1'in en fazla bilinen fonksiyonu, kinonların indirgenmesi reaksiyonudur. Enzim tek basamakta 2 elektron indirgenmesini sağlayarak reaktif ve toksik semikinon ara metabolitinin oluşumunu önler (Xu ve diğ., 2001). NQO1 tarafından gerçekleştirilen iki elektron indirgenmesi reaksiyonu ile hücrel tek elektron indirgenme reaksiyonu yarış halindedir (Cenas ve diğ., 2004).

NQO1 ayrıca, nitroaromatik maddeler ve heterosiklik aminler gibi çevresel karsinojenleri de biyoaktif edebilir (Chen ve diğ., 2000). Ayrıca antioksidan bir enzim olarak görev yapar. Ubikinonların ve vitamin E'nin antioksidan formlarının oluşumunu sağlar (Flora ve diğ., 1994). Bu enzim, yüksek oranda antioksidan koruma gerektiren dokularda fazla miktarda bulunur (Sarbia ve diğ., 2003). NQO1, p53 proteininin stabilizasyonu için de gereklidir. p53 proteininin hücrel seviyesi, modifikasyonlar ve interaksiyonlar yoluyla düzenlenir. Ancak NQO1'in p53'ü nasıl kararlı hale getirdiği henüz bilinmemektedir (Siegel ve Ross, 2000). Polimorfik olarak inaktif olan bireylerin tümör gelişimine karşı neden daha hassas oldukları, NQO1'in p53 üzerindeki etkisi yönüyle de açıklanabilir.



Şekil 1.3. NQO1 enziminin detoksifikasyon şeması (Sørensen ve diğ., 2005).

Homozigot varyant genotipi, beyaz popülasyonda %2 gibi nadir, Asyalılarda ise %20 gibi siktir. Bu varyasyonlar kemoterapide önemlidir. Ksenobiyotik metabolizmasına katılan enzimlerden *ubikinon oksidoredüktaz*, *sitokrom P450 redüktaz* gibi enzimler kinon ve türevlerinden bir elektron kopararak semikinon bileşiklerin oluşmasına neden olurlar. Oluşan bu bileşikler oksidatif stres, DNA hasarı, membran hasarı, sitotoksositeye neden olarak reaktif oksijen türevlerini oluştururlar (Estabrook, 1996). İnsanlarda *NAD(P)H kinon oksidoredüktaz-1* (NQO1) ve *NRH kinon oksidoredüktaz-2* (NQO2) olmak üzere iki sitosolik formu vardır. Son zamanlarda çalışmalar daha ziyade NQO1 üzerine yoğunlaşmıştır.



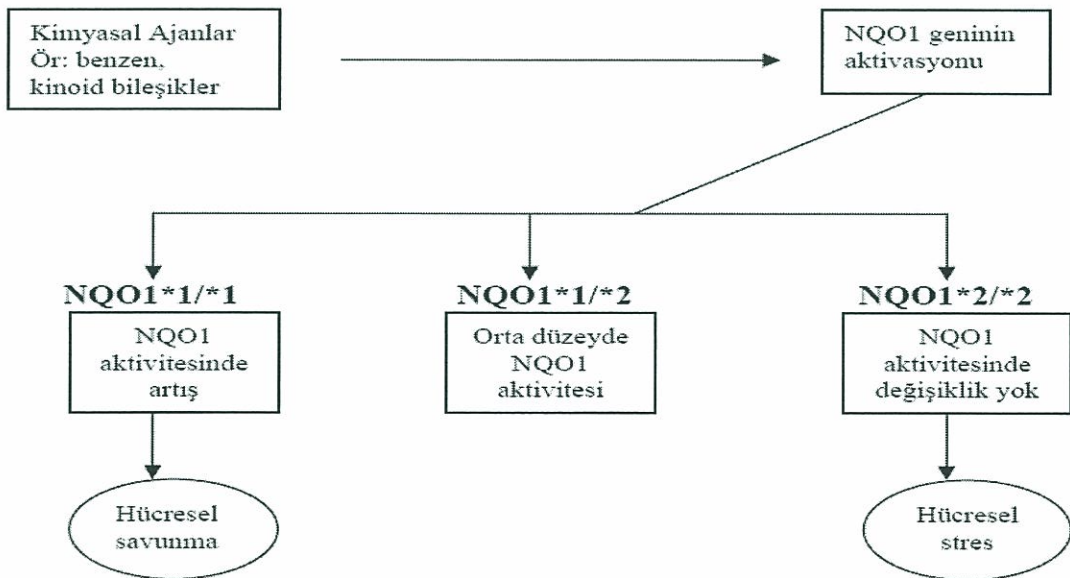
Şekil 1.4. NQO1 C609T polimorfizminin kromozom üzerinde gösterimi (Lin vd., 1999).

Enzimin yaklaşık 40 yıllık bir geçmişi vardır. 1958 yılında Ernster ve Navazio tarafından kısmi olarak saflaştırılmış ve bazı özellikleri tanımlanmıştır (Yu ve Kensler, 2005). NQO1 tanımlanmasının ardından yapısal olarak NQO1'a çok benzeyen flavoprotein yapısında olan ikinci bir enzim tanımlanmıştır. İlk kez Liao ve William-Ashman tarafından keşfedilen bu enzim *NRH: kinon oksidoredüktaz-2* (NQO2) olarak adlandırılmıştır (Chen ve diğ., 2000). Diğer enzimlere olan üstünlükleri ve biyolojik fonksiyonları nedeniyle NQO'ların farklı sitozolik formları içerisinde en çok çalışılan enzim NQO1'dir. NQO1 kinon ve kinon türevlerinden iki elektron indirgeyen bir flavoproteindir. İndirgeme işlemi *NAD(P)H* ve *FAD* (flavin

adenindinükleotit) yardımıyla oluşur. Reaksiyon sonucunda hidrokinon bileşikleri oluşur. Kinonlardan bir elektron indirgenmesiyle semikinon bileşikleri oluşur ve bu bileşikler serbest oksijenle reaksiyona girerek reaktif oksijen radikalleri (ROS) oluştururlar. Reaktif oksijen radikalleri DNA, RNA ve proteinlere zarar vererek hücrel hasara neden olurlar. *NQO1* enzimi kinoid bileşiklerin detoksifikasyonunda yer aldığı gibi bileşiklerin reaktif formunu da aktive edebilme özelliğine sahiptir. *NQO1* kimyasal toksisiteye ve karsinojeniteye karşı hücreleri koruyucu etkisi nedeniyle son zamanlardaki çalışmaların ilgi kaynağı olmuştur (Joseph ve diğ., 2000).

NQO1'deki genetik polimorfizm, ekzon 6'da 609. pozisyonda C yerine T nokta mutasyonu ile, proteinde prolin yerine serin oluşumudur (Traver ve diğ., 1997). 609. pozisyonda meydana gelen homozigot C→T mutasyonu, *NQO1* aktivitesinin kaybına sebep olur. *In vitro* çalışmalarda varyant *NQO1*'in normal tipten daha düşük (%4'ü kadar) bir aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir (Park ve diğ., 2003). Normal tip ile karşılaştırıldığında homozigot varyant kinon redüktaz aktivitesinin sadece %2-4'üne sahipken, heterozigot varyantta enzim aktivite derecesinde 3 kat azalma vardır.

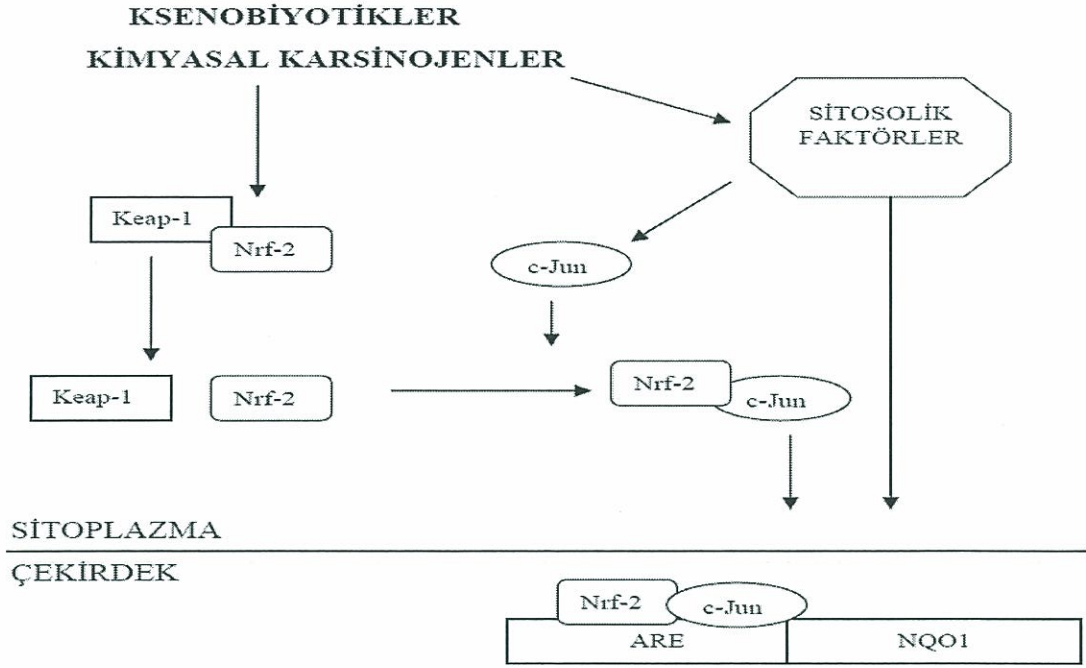
Mutant *NQO1* (*NQO1**2) geninin yarılanma ömrü çok kısadır, hemen yıkıma uğrar. İki alleli de mutant olan bireylerde enzim aktivitesi görülmezken, heterozigot bireylerde orta düzeyde aktivite gözlenir (Ross, 2005).(Şekil 1.5).



Şekil 1.5. *NQO1* polimorfizmi ve enzim aktivitesine etkileri (Ross, 2005).

NQO1 gen ifadesi, ksenobiyotiklere, antioksidanlara, ağır metallere, UV, iyonize radyasyona cevabı arttırır. Bu sayede hücre oksidatif stresten, serbest radikallerden ve kanserden korunmuş olur (Ross, 2005). NQO1 iki düzine genin indüklenmesini sağlayarak hücrel savunmayı tetikler. Bu genler; *Glutasyon-S-transferaz* (hidrofobik elektrofilleri ve reaktif oksijen türevleriyle konjugasyona girer), *UDP- glukroniltransferaz* (ksenobiyotikler ve ilaçlarla konjugasyon yaparlar), *γ-glutaminsistein sentetaz* (glutasyon mekanizmasında anahtar rolü oynar). Ksenobiyotik bileşikler organizmaya girdiğinde hücrel savunma mekanizması aktif olarak işlemeye başlar. Bu mekanizmada NQO1 önemli bir role sahiptir (Ross ve diğ., 2000). NQO1 kinon oksidasyonunda doğrudan görev almasının yanında *CoQ* (ko-enzim Q), E vitamini gibi çeşitli doğal antioksidanların indirgenmesinde ve bu bileşiklerin bu şekilde kararlı kalmasına yardımcı olmaktadır. İndirgenmiş formdaki antioksidanlar tüm hücrelerde ve membranlarda bulunur. Hücre membranının fizyokimyasal yapısının düzenlenmesinde görev alır. NQO1 aynı zamanda tümör baskılayıcı genlerden p53 kararlılığını korumasında görev alır. p53 bağlanarak daha kararlı bir hale geldiği düşünülmektedir (Iskander ve Jaiswal, 2005). Genin regülasyonu, promoter bölgesindeki *cis* elementler vasıtasıyla olmaktadır. NQO1 genini kontrol eden *cis* elementler tespit edilmiştir. Bunlar antioksidant cevap elementi (*ARE*), ksenobiyotik cevap elementi (*XRE*), aktivatör protein-2 (*AP-2*) gibi elementleridir. Bu elementler genin hem indüklenmesine hem de baskılanmasını sağlar. Çeşitli antioksidant, oksidanlar maruziyetinde *NQO1* geni *ARE* elementiyle pozitif düzenlenir. *NQO1* geni gibi birçok detoksifikasyon enzimlerinin düzenlenmesi *ARE cis* elementi vasıtasıyla yapılmaktadır. *ARE* bölgesine bağlanan bir takım transkripsiyon faktörleri tanımlanmıştır. Bunlar; *AP-1*, *Nrf-1*, *Nrf-2*, *Maf*, *c-Jun*, *Jun-B*, *Jun-D*, *c-Fos*' dur. *Nrf-2* ksenobiyotiklere veya antioksidanlara maruz kalmamış olan normal hücrelerin sitoplazmasında *Keap-1* proteini tarafından tutulmuştur. Hücre ksenobiyotiklere maruz kaldığında *Keap-1* ve *Nrf-2* birbirinden ayrılır, serbest kalan *Nrf-2* çekirdeğe transloke olur (Yu ve Kensler., 2005). *Keap-1*'in oksidatif strese duyarlı bir sensör protein olduğu düşünülmektedir. Burada *c-Jun* faktörüyle heterodimerize olarak *ARE* bölgesine bağlanır. *Nrf-2* ile *c-Jun* birbirine bağlanmasını çeşitli bilinmeyen sitosolik faktörler sitümüle eder. Bu sayede transkripsiyon tetiklenir ve gen ifade edilir. *Nrf-2* ve *c-Jun* gibi *Nrf-1*, *Jun-B*, *Jun-D*'de *ARE* bölgesine bağlanarak düzenleme yapabilmektedir. Diğer transkripsiyon

faktörleri de benzer mekanizmalara sahip olduğu düşünülmektedir. *NQO1* gen ifadesinin düzenlenmesi Şekil 1.6.'de gösterilmiştir (Jaiswal, 2000).



Şekil 1.6. *NQO1* geninin düzenlenmesi (Jaiswal, 2000).

2. AMAÇ

Dünyada en çok görülen kanser türlerinden biri olan mesane kanseri, sigara içimi ve mesleki risk faktörleri gibi bireyin karsinojenlere maruz kalma miktarını belirleyen çevresel faktörlerle yüksek oranda ilişkilidir.

Faz I ve Faz II enzimi olarak adlandırılan aktivasyon ve detoksifikasyon enzimleri karsinojen metabolizmasında görev alırlar ve polimorfik enzimlerdir. Bir Faz II enzimi olan NQO1 enzimi de hücrede detoksifikasyondan sorumludur. NQO1 enzimi mutajenik, karsinojenik, sitotoksik ve oksidatif strese sebep olan kimyasallara karşı hücrenin korunmasında rol oynayan bir detoksifikasyon enzimidir. NQO1 geni üzerindeki polimorfizmler karsinojen metabolizmasını etkileyerek hücrelerde biriken karsinojen miktarını etkiler. Bu polimorfizme bağlı olarak bireylerin kansere yatkınlıkları değişkenlik gösterebilir.

Bu tez çalışmasında, NQO1 geni C609T polimorfizminin incelenmesi ve Türk popülasyonunda bu polimorfizmin mesane kanserine yatkınlığı nasıl etkilediğinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Sağlıklı ve hasta bireylerden alınan örneklerde bu polimorfizmin frekansı karşılaştırılarak mesane kanseri ile ilişkisi, cinsiyet ve sigara içiminin etkisi ile birlikte incelenecek ve gen-çevre etkileşimi ortaya koyulacaktır.

3. MATERYAL

3.1. Çalışmada Kullanılan Örnekler

Bu çalışmada hasta grubu örnekleri 2008-2011 yılları arasında Şişli Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi ve Bağcılar Eğitim ve Araştırma Hastanesinde mesane kanseri teşhisi koyulmuş olan hastalardan alınan kan örnekleri ile oluşturulmuştur. Toplam hasta sayısı 174, kontrol örneklerinin sayısı ise 146 kişi olarak belirlenmiştir. Her hastadan EDTA'lı tüplerde alınan 10 ml kan örneği -20°C'de saklanmıştır. Hastaların cinsiyet, yaş, doğum yeri, meslek, alkol ve sigara kullanımı, kullanım miktarı ve süresi ile ilgili bilgiler hastalara uygulanan anket ile elde edilmiştir. Kontrol grubu örnekleri ise ailesinde ve kendisinde kanser hikayesi bulunmayan gönüllü kişilerin yanak içi epitel doku örneklerinden sağlanmıştır. Hastalara uygulanan anket aynı şekilde gönüllü denekler için de uygulanmıştır.

3.2. Yanak İçi Epitel Dokudan DNA İzolasyonu İçin Kullanılan Tamponlar ve Kimyasallar

Lizis Tamponu	: 50 mM Tris (pH= 8,0) 50 mM EDTA 50 mM Sükroz 100 mM NaCl %1 (w/v) SDS
Sodyum Asetat (NaOAc)	: 3 M
Proteinaz K	: 10 mg/ml
Saf İzopropanol	

Etanol	: %70
Fenol (pH= 8,0)	: Tris ile doyurulmuş
Saf Kloroform	
Kloroform-İzoamil Alkol (24:1)	: Saf Kloroform ve İzoamil alkol 24' e 1 oranında karıştırılır.
Low-TE Tamponu (pH= 8,0)	: 10 mM Tris (pH= 8,0) 0,1 mM EDTA (pH= 8,0)

3.3. Hızlı Genomik DNA İzolasyonu İçin Kullanılan Tamponlar ve Kimyasallar

Hücre Çekirdeği Lizis Tamponu (pH= 8,0): 10 mM Tris-HCl
%1 (w/v) SDS
10 mM EDTA
10 mM Sodyum Sitrat

Hücre Lizis Tamponu (pH= 8,0) : 10 mM Tris-HCl
%11 (w/v) Sükroz
5 mM MgCl₂
%1 (v/v) Triton X-100

Saf Kloroform

Saf İzopropanol

5 M NaCl

1X TE Tamponu (pH= 8,0) : 20 mM Tris-HCl
0,1 mM EDTA

3.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) İçin Gerekli Kimyasallar

10X MgCl ₂ 'süz Tampon	: 200 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ 750 mM Tris-HCl, (pH 8.8) % 0.1 Tween 20, (Fermentas, LİTVANYA)
MgCl ₂	: dH ₂ O'da 25 mM (Fermentas, LİTVANYA)
Deoksiribonükleotidler (dNTP)	: 100 mM dATP, dCTP, dGTP ve dTTP (Fermentas, LİTVANYA)
Taq DNA Polimeraz	: Rekombinant Taq DNA Polimeraz (Fermentas, LİTVANYA)
Primerler	NQO1F : 5'-TCCTCAGAGTGGCATTCTGC-3' NQO1R : 5'-TCTCCTCATCCTGTACCTCT-3'

3.5. Elektroforezde Kullanılan Kimyasallar ve Tamponlar

10X TBE (Tris-Borik asit-EDTA)	: 890 mM Tris 890 mM Borik Asit, 20 mM Na ₂ EDTA.2H ₂ O, (pH= 8.3)
Agaroz Jel	: 0,5 X TBE Tamponunda %1 ve %2'lik (w/v) agaroz
10X Bromofenol Mavisi (BPB)	: 2,5 mg/ml BPB
Etidyum Bromür (EtBr)	: 10 mg/ml

3.6. PZR Ürünlerinin Saflaştırılması

Dizi analizi için PZR ürünleri "High Pure PCR Product Purification Kit" (Roche, ALMANYA) kullanılarak saflaştırılmıştır.

3.7. DNA Uzunluk Markörleri

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

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

3.8. Cihazlar

Tartı	: Hassas Terazi, Sartorius BL 120S (ALMANYA)
Derin Dondurucular	: -20°C, 2021 D (Arçelik, TÜRKİYE) -20°C, GSD26410NE (Bosch,ALMANYA)
Yatay Elektroforez Sistemleri	: MultiSub Midi (Cleaver Scientific, İNGİLTERE) miniRapide Cleaver Scientific, İNGİLTERE)
Isı Bloğu	: DB 2D (Techne, İNGİLTERE)
Görüntüleme Sistemleri	: Bio-RAD UniversalHoodII (BIO-RAD İTALYA)
Otoklav	: Dik Tip Otoklav (BES, TÜRKİYE)

Buzdolapları	: Beko 8742 , Arçelik 3061 Plus (TÜRKİYE)
Manyetik Karıştırıcılar	: MR 3001 (Heidolph, ALMANYA)
Vorteks	: Heidolph REAX (ALMANYA)
Su Banyosu	: Memmert (ALMANYA)
PZR Cihazları	: Techne TC-512 (İNGİLTERE) : Techne TechGene (İNGİLTERE)
Santrifüjler	: Mini Spin Plus (Eppendorf, ALMANYA) : Centrifuge 5415 R (Eppendorf, ALMANYA)
Mikrodalga Fırın	: MD 592 SUPER (Arçelik, İSVEÇ)
Güç Kaynakları	: EC250-90 Thermo Elektron Corporation : EPS301 (Amersham Pharmacia Biotech, İSVEÇ)

4. METOD

4.1. Yanak İçi Epitel Dokudan DNA İzolasyonu Metodu

Yanak içi epitel doku örneği taşıyan pamuklu çubuk, 1.5 ml'lik 600-700 µl lizis tamponu içeren tüpe yerleştirilir. 50 µl 10 mg/µl proteinaz K ile 55°C'de 30dk-1saat arası veya 10 mg/µl proteinaz K ile oda sıcaklığında gece boyunca inkübe edilir. Pamuklu çubuğun tüpün içinde çeperele ve tüpün ağzına bastırılarak tamponu hücrelerle birlikte bırakması sağlanır ve pamuklu çubuk tüpten çıkarılır. Üzerine 300 µl fenol ve 600 µl kloroform eklenir. 12000g'de 2 dakika santrifüj edilir. Oluşan üst faz yeni bir Eppendorf tüpe aktarılır. Bu aşamada üst faz alınırken ortadaki ara faz çok kalın ise tekrar 300 µl fenol ve 600 µl kloroform eklenerek bu aşama tekrarlanır. Yeni tüplere alınan üst faza eşit hacimde (yaklaşık 400-500 µl) kloroform:izoamilalkol (24:1 oranında) eklenir. Tüp tekrar 12000g'de 2 dakika santrifüj edilir. Üst faz tekrar yeni bir tüpe alınır ve 1/10 hacimde 3M sodyum asetat(NaOAc) eklenip karıştırılır ve üzerine 0,6X %100'lük izopropanol eklenir. Tüpler -20°C'de gece boyunca inkübe edilerek DNA presipite edilir. Bu inkübasyon sırasında tüpler ara sıra ters-düz edilir. İnkübasyon sonrası tüpler 12000g'de 10 dakika santrifüjlenerek DNA çöktürülür. Oluşan DNA pelleti 500 µl %70'lik etanol ile 12000g'de 5 dakika santrifüjlenerek yıkanır. Süpernatant atıldıktan sonra tüpler yaklaşık 15-20 dakika kurumaya bırakılır. Son olarak DNA, 50 µl Low-TE eklenerek ve oda sıcaklığında 2-3 gün çözülmesini beklenir. DNA içeren tüpler +4°C'de veya -20°C'de saklanabilir.

4.2. Hızlı Genomik DNA İzolasyon Metodu

EDTA'lı tüplerde saklanan kan örneklerinden 500 µl alınır ve 1.5 ml'lik Eppendorf tüplere aktarılır. Üzerine 1000 µl hücre lizis tamponu eklenir. Tüp hafifçe çalkalanarak tampon ve kan örneğinin birbirine karışması sağlanır. Örnek 6000 rpm hızda 2 dakika santrifüj edilir ve süpernatant atılır. Pellet 1000 µl hücre lizis tamponunda tekrar çözülür ve 6000 rpm'de 2 dakika santrifüj edilir. Bu aşama krem

rengi pellet elde edene kadar 1-2 kez tekrarlanır. Pelletin üzerine 300 µl hücre çekirdeği lizis tamponu eklenir ve pelletin çözülmesi sağlanır. Üzerine 100 µl 5M NaCl ve 600 µl kloroform eklenir. Tüp nazikçe çalkalanır ve 6000 rpm'de 2 dakika santrifüj edilir. Bu aşamada tüpte 2 faz gözlenir. Alttaki organik faza karıştırmadan üstteki faz dikkatlice alınır ve üst faz yeni bir tüpe aktarılır. Üzerine 600 µl soğuk izopropanol eklenir. Tüp birkaç defa nazikçe çevrilir. DNA bu aşamada yoğunlaşarak gözle görülür hale gelir. DNA'yı çökertmek amacıyla tüp 13000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilir ve süpernatant atılır. Tüp oda sıcaklığında yaklaşık 15 dakika kurumaya bırakılır. DNA 50-100 µl TE tamponunda oda sıcaklığında çözülmeye bırakılır. Kısa süreli saklamalarda +4°C'de daha uzun süreli saklamalarda -20°C'de saklanabilir.

4.3. DNA'nın Kalitatif ve Kantitatif Analizi

İzole edilen DNA örneklerinin kalitatif analizi örneklerin %1'lik agaroz jelde yürütülmesi ile belirlenir. Agaroz jelde yürütülen DNA'nın görüntüleme sisteminde görüntülendiğinde jelde birden fazla, beklenmeyen bir bant görüldüğünde veya sürüntü şeklinde bantlar oluşturması DNA izolasyonu sırasında DNA'nın parçalandığını gösterir ve bu DNA'nın PZR işlemi için kullanmaya uygun olmadığını gösterir. Agaroz jel elektroforezi sonrası PZR işleminde kullanmak üzere uygun olduğu belirlenen örnekler spektrofotometrik analizden geçirilerek miktarının ve saflığının belirlenmesi gerekmektedir. Bu amaçla TE tamponu içerisinde çözülmüş DNA örnekleri seyreltilerek spektrofotometre ile 260nm'de absorpsanları ölçülür ve aşağıdaki formül ile DNA miktarı belirlenir;

$$\text{Konsantrasyon } (\mu\text{g/ml}) = \text{dilüsyon faktörü} \times A_{260} \times 50 \mu\text{g/ml}$$

Bunun yanında sadece miktarının ölçülmesi değil PZR işleminden önce DNA'nın saflığının da belirlenmesi gerekmektedir. Bu amaçla spektrofotometrede nükleik asitlerin maksimum absorpsan gösterdiği 260nm'de ve proteinlerin maksimum absorpsan gösterdiği 280nm'de absorpsan ölçümü yapılarak A260/A280 oranı belirlenir. PZR gibi işlemlerde kullanılacak olan DNA örneklerinin 1,7-1,8 oranlarında saf olması gerekmektedir. Bu oranın düşük olması protein kontaminasyonu, büyük olması ise RNA veya fenol kontaminasyonu olduğu gösterir.

4.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

PZR, genetik materyaller üzerinde seçilmiş bir veya birden fazla bölgenin, kimyasal olarak sentezlenmiş olan oligonükleotid primerler ve saflaştırılarak elde edilmiş olan Taq polimeraz enzimleri kullanılarak bir otomatik termal döngü sistem yardımıyla *in vitro* şartlar altında çoğaltılması metodudur.

PZR işleminde amaç, dizilimi bilinen iki bölge arasında bulunan bir DNA parçasını çoğaltmaktır. Bir DNA polimeraz tarafından katalizlenen bir seri tepkimenin primerleri olarak iki oligonükleotid kullanılır. Bu oligonükleotidler tipik olarak farklı dizilere sahiptir. Bu oligonükleotidler, kalıp DNA'nın karşı dizilerinde uzanan ve çoğaltılacak DNA parçası yanında bulunan dizilere eşirler. Kalıp DNA ilk önce iki oligonükleotidin ve dört deoksiribonükleozid trifosfatın (dNTP) varlığında ısıyla denatüre edilir. Daha sonra tepkime karışımının ısısı, oligonükleotid primerlerinin kalıp dizilere yapışmasına olanak verecek şekilde düşürülür. Primerler yapıştıktan sonra uygun bir ısıya çıkartılarak DNA polimeraz ile uzatılır. Bu aşamalar birçok kez tekrarlanır. Amplifikasyonun bir döngüsünün ürünleri bir sonraki döngü için kalıp görevi gördüğünden her bir başarılı döngü temel olarak istenilen DNA ürününün miktarını ikiye katlar. Bu sayede 30-40 döngü sonunda tek bir kopya DNA'dan milyonlarca kopya elde edilmiş olur.

4.5. Restriksiyon Fragmenti Uzunluk Polimorfizmi

Restriksiyon endonükleazlar yani restriksiyon enzimleri çift sarmal DNA'da özel nükleotid dizilerini tanıyan ve DNA'nın her iki ipliğini kesen enzimlerdir. Bu restriksiyon enzimleri bakterilerden izole edilirler ve bugüne kadar 1200'den fazla restriksiyon enzimi tanımlanmıştır.

Tek bir nükleotid farklılığının bile bir DNA dizisinin kesilip kesilmeyeceğini belirlemesi, RFLP metoduyla nokta mutasyonlarının veya tek nükleotid değişimlerinin incelenmesine olanak sağlamıştır. Uygun enzimin belirlenmesinden sonra polimorfik bölge polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltılır ve çoğaltılan dizi restriksiyon enzimi ile reaksiyona sokulur. Restriksiyon sonrası elde edilen ürünler agaroz jel elektroforezi ile uzunluklarına göre ayrılır ve kesilip kesilmedikleri dolayısıyla da tanıma bölgesinde hangi nükleotidi içerdikleri yani genotipleri belirlenir.

4.6. Agaroz Jel Elektroforezi

Elektroforez moleküllerin bir elektrik alandaki hareketlerinin izlendiği bir tekniktir. Çözünmüş durumdaki moleküllerin elektrik yüklerinin kütlelerine oranıyla belirlenen hızlarda, elektriksel alanda hareket etmeleri prensibine dayanır. Ayrılacak olan moleküllerin hareketi moleküllerin yüküne, boyutuna, biçimine, kimyasal içeriğe ve uygulanan elektriksel alana bağlıdır.

Jel yaklaşık 55°C'ye kadar soğutulup son konsantrasyonu 0,5 mg/ml olacak şekilde etidyum bromür eklenir. Bu solüsyon jel yatağına dökülür ve yükleme kuyucuklarını oluşturmak üzere tarak takılarak soğumaya bırakılır. Jel polimerize olduktan sonra elektroforez tankına doldurulmuş tampon çözeltisinin içine bırakılır ve taraklar çıkarılır. Ayırımı yapılacak örnekler yükleme boyası ile karıştırılarak taraklarla oluşturulmuş kuyucuklara yüklenir. Elektroforez sona erdikten sonra agaroz jel UV ışığı altında incelenir. Jel yapısındaki EtBr floresan bir boyadır ve nükleik asitlerin bazları arasına girerek DNA'ya bağlanır ve UV ışığı altında ışımaya yaparak DNA'yı bize gösterir.

Bu çalışmada PZR ürünlerinin ve restriksiyon ürünlerinin görüntülenmesinde %2'lik agaroz jel kullanılmıştır.

4.7. Dizi Analizi Yapılacak PZR Ürünlerinin Saflaştırılması

50 µl PZR ürünü içeren her bir tüpe 250 µl bağlanma tampon eklenir. Toplama tüpünün içine filtreli tüp konur, PZR ürünleri filtreli tüpe aktarılır ve maksimum hızda (14500 rpm) 1 dakika santrifüj edilir. Filtre tüpü çıkarılır ve toplama tüpünde biriken solüsyon dökülür. Aynı filtre tüpü tekrar toplama tüpüne takılır ve filtre tüpünün üzerine 250 µl yıkama solüsyonu eklenir. Maksimum hızda 1 dakika santrifüj edilir. Filtre tüpü çıkarılır, toplama tüpünde biriken solüsyon atılır. Yüksek saflık elde etmek amacıyla tekrar filtre tüpü toplama tüpüne takılır ve tekrar 100 µl yıkama solüsyonu konarak aynı işlem tekrarlanır. Filtreli tüpler temiz 1.5 ml'lik tüplere takılır. Filtreli tüplere 50-100 µl arası elüsyon tamponu eklenir, yaklaşık 1 dakika beklenir ve maksimum hızda 1 dakika santrifüj edilir. Saflaştırılan PZR ürünü tüpte birikmiş olur.

4.8. Mesane Kanserinin Moleküler Analizi

Bu çalışmada NQO1 geni üzerindeki C609T tek nükleotid polimorfizminin mesane kanserine yatkınlık üzerindeki etkisi PZR-Restriksiyon uzunluk polimorfizmi metodu kullanılarak incelenmiştir. Polimorfik bölge için özgün primerler kullanılarak reaksiyonlar hazırlanmıştır (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. PZR Reaksiyonlarının İçerikleri

	Reaksiyon Miktarları
DNA	50-100 ng
Tampon	1X
dNTP(mM)	0,4
MgCl ₂ (mM)	2,5
Primerler(μM)	0,5
Taq Pol.	1U

Reaksiyonların hazırlanmasının ardından polimorfik bölge belirtilen koşullarda ve sürede gerçekleştirilen PZR işlemi ile çoğaltılmıştır (Tablo 4.2.).

Polimeraz Zincir Reaksiyonundan sonra oluşan PZR ürünleri, kontrol amacıyla oluşan ürünlerden 8 μl alınıp yükleme boyasıyla beraber %2'lik jele yüklenerek ve 50 bç'lik büyüklük markörü ile beraber 120V'da 15 dk yürütülmüştür. Ürünlerin agaroz jelde kontrolü sonucu her PZR ürününden jeldeki bandın parlaklığına ve kalitesine göre 1-10 μl arasında alınarak örnekler restriksiyon enzimi ve tamponu ile beraber 37°C'de 2 saat boyunca kesime tabi tutulmuştur.

Tablo 4.2. PZR Döngüsü Koşulları

Başlangıç Denatürasyonu	94°C, 5dk
Denatürasyon	94°C, 30sn
Bağlanma	57°C, 30sn
Uzama	72°C, 45sn
Son Uzama	72°C, 5dk
Döngü Sayısı	30

Kesim sonucu oluşan restriksiyon ürünlerinin uzunlukları, her üründen 10'ar μl alınıp yükleme boyasıyla beraber %2'lik agaroz jele yüklenerek jelde 50 bç'lik büyüklük markörü ile 120V'da 25-30 dk yürütülerek gösterilmiştir. Jelde görüntülenen bantlara göre her örnek için genotipler belirlenmiştir (Tablo 4.3.).

Tablo 4.3. Restriksiyon Ürünlerinin Uzunlukları

Kesim enzimi-- Polimorfizm	Yabancıl Tip Homozigot(bç)	Polimorfik Homozigot(bç)	Heterozigot (bç)
HinfI / C609T	195,35 (CC)	151,44,35 (TT)	195,151,44,35 (CT)

Rastgele seçilen örnekler PZR-RFLP ile belirlenen genotipleri doğrulamak amacıyla dizi analizi ile incelenmiştir. Dizi analizi işlemi İontek A.Ş, İSTANBUL tarafından gerçekleştirilmiştir. Her hasta ve kontrol örneğinin genotipi restriksiyon sonrası gerçekleştirilen jel elektroforezi ile bant boylarına göre belirlendikten sonra elde edilen veriler istatistiksel olarak mesane kanserine yatkınlık açısından PLINK programı ile değerlendirilmiştir.

5. SONUÇLAR

5.1. Kullanılan Örneklerin Tanımı

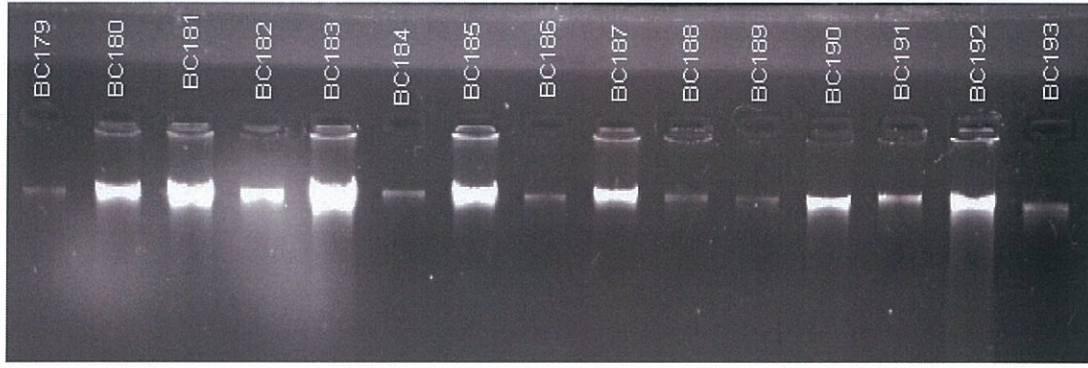
Bu tez çalışmasına 174 mesane kanseri hastası ve 146 sağlıklı birey olmak üzere 320 kişi dahil edilmiştir. Çalışmaya dahil edilen hastaları ve kontrol grubunu oluşturan kişilerin cinsiyet, yaş ve sigara içimine ait bilgiler yapılan istatistiksel analizlerde kullanılmıştır.

Oluşturulan hasta grubunun %81'i erkek, %19'u ise kadın bireylerden oluşturulmuştur ve yaş ortalamaları ise 66,8 yaştır. Hastaların %74'ü sigara kullanırken %26'sı sigara kullanmamaktadır.

Kontrol grubunun ise %43'ü erkek, %57'si kadınlardan oluşmaktadır. Kontrol bireylerinin yaş ortalaması ise 60 yaştır. Kontrol grubuna dahil edilen kişilerden %30'i sigara kullanırken %70'i ise sigara kullanmamaktadır.

5.2. DNA İzolasyonu

Hasta grubunu oluşturan bireylerin kan örneklerinden Bölüm 4.2.'de anlatılan Hızlı Genomik DNA İzolasyonu metodu ile DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Kontrol grubunu oluşturan bireylerin DNA izolasyonu ise Bölüm 4.1.'de anlatılan Yanak İçi Epitel Dokudan DNA İzolasyonu Metodu ile gerçekleştirilmiştir. İzole edilen DNA'ların kırılmadan ve hasara uğramadan izole edildiklerini göstermek için 1-3 µl arasında alınarak yükleme boyasıyla birlikte %1'lik agaroz jele yüklenerek incelenmiş ve izole edilen DNA örneklerinin izolasyon sürecinde kırılmadan elde edildiği gösterilmiştir (Şekil 5.1.). Elde edilen DNA'ların saflıkları ve konsantrasyonları spektrofotometrik ölçümlerle analiz edilmiştir.



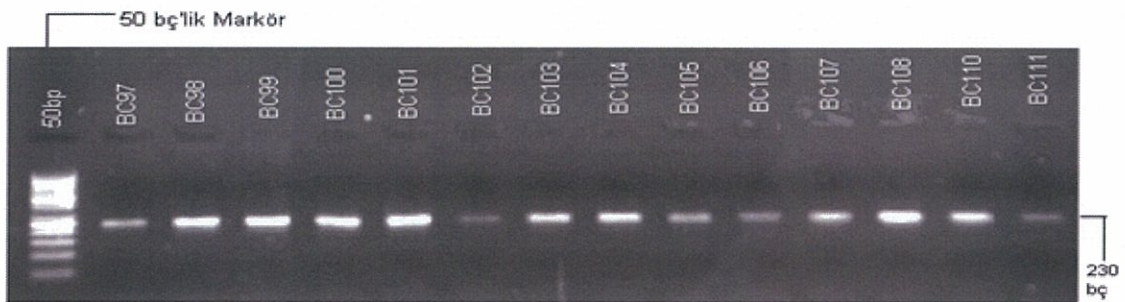
Şekil 5.1. Genomik DNA Örneklerinin %1'lik Agaroz Jelde Görüntülenmesi

5.3. C609T Polimorfizminin Moleküler Analizi

İncelenen polimorfizmin yer aldığı gen lokusu, hasta ve kontrol örneklerinden izole edilen DNA örneklerinden, Tablo 4.1. ve Tablo 4.2.'de belirtilen koşullarda PZR yöntemi ile çoğaltılmıştır. Elde edilen PZR ürünlerinin uzunlukları ve parlaklıkları etidyum bromür boyamasıyla %2'lik jelde UV ışığı altında görüntülenerek kontrol edilmiştir. Doğru şekilde çoğalan örnekler belirlenen şartlar altında restriksiyon enzim kesim reaksiyonuna tabi tutularak oluşan kesim ürünleri yükleme boyasıyla birlikte %2'lik jele yüklenerek 50 bç'lik markör eşliğinde 120V'da 30dk yürütülerek incelenmiştir. Bu sayede belirlenen genotipler DNA dizi analizi yöntemi ile doğrulanmıştır.

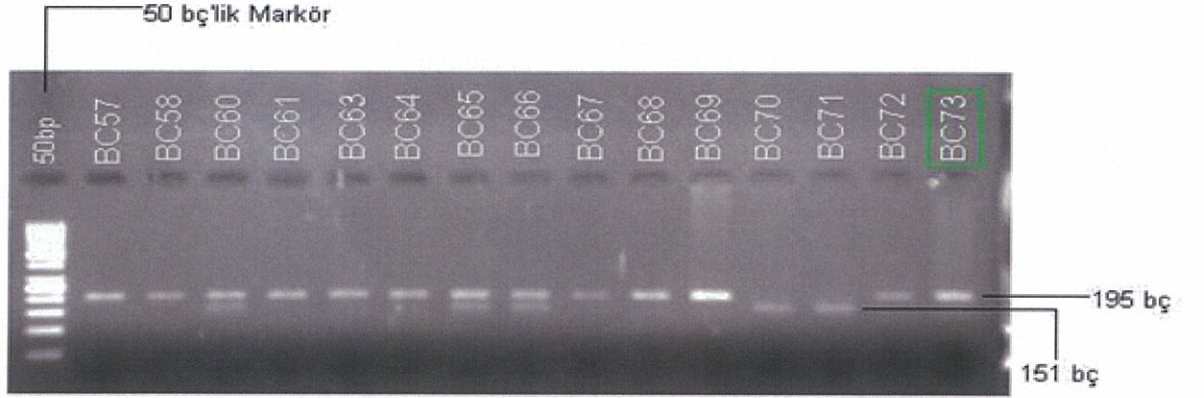
5.4. C609T Polimorfizminin PZR-Restriksiyon Uzunluk Polimorfizmi Metodu ile Gösterilmesi

NQO1-F ve NQO1-R primer çifti kullanılarak polimorfizmin bulunduğu gen bölgesi PZR metodu ile çoğaltılıp 230 bç'lik PZR ürünü elde edilmiştir (Şekil 5.2.).



Şekil 5.2. PZR Ürünlerinin %2'lik Agaroz Jelde Görüntülenmesi

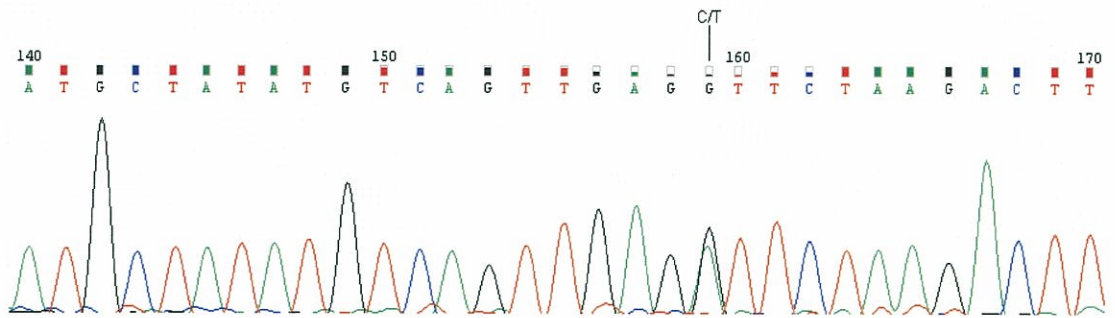
Elde edilen PZR ürünleri HinfI restriksiyon enzimi kesimine tabi tutularak kesim ürünleri %2'lik agaroz jelde UV ışığı altında görüntülenmiştir (Şekil 5.3.). HinfI enzimi kesimi sonucunda 195 bç ve 35 bç'lik iki parça oluşmaktadır. Homozigot mutant örneklerde ise 195 bç'lik parça 151 bç ve 44 bç'lik iki ayrı parçaya ayrılmaktadır (Şekil 5.3.).



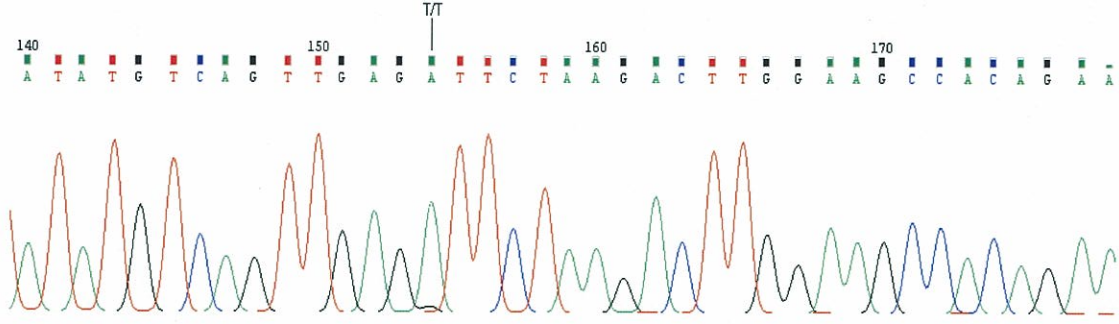
Şekil 5.3. Restriksiyon Kesim Ürünlerinin %2'lik Agaroz Jelde Görüntülenmesi

5.5. PZR-RFLP Sonuçlarının DNA Dizi Analizi ile Doğrulanması

PZR-Restriksiyon Uzunluk Polimorfizmi metodu ile genotipi belirlenen örneklerden bazıları DNA dizi analizine tabii tutulmuş ve elde edilen sonuçlar karşılaştırılmıştır. Dizi analizi sonuçları ile PZR-RFLP sonuçları incelendiğinde sonuçların birbiriyle örtüştüğü görülmektedir (Şekil 5.4. ve Şekil 5.5.).



Şekil 5.4. Heterozigot (C/T) Örnek Kromatogramı



Şekil 5.5. Homozigot varyant (T/T) Örnek Kromatogramı

5.6. Genotip ve Alel Dağılımları

Restriksiyon ürünlerinin jelde yürütülmesi sonucu elde edilen kesim paternleri kullanılarak hasta ve kontrol grubunu oluşturan bütün örneklerin genotip ve alel frekansları belirlenmiştir (Tablo 5.1. ve Tablo 5.2.).

Tablo 5.1. C609T Polimorfizmi Genotip Dağılımı

Grup	Genotip					
	CC		CT		TT	
	N	%	N	%	N	%
Hasta	91	52,3	72	41,4	11	6,3
Kontrol	82	56,2	58	39,7	6	4,1
Toplam	173	54,1	130	40,6	17	5,3

Tablo 5.2. Alel Frekansları

	C Aleli N / Alel Frekansı	T Aleli N / Alel Frekansı	Toplam N / Alel Frekansı
Hasta	254 / 72,98	94 / 27,02	348 / 100
Kontrol	222 / 76,02	70 / 23,98	292 / 100

5.7. Elde edilen Verilerin İstatistiksel Analizi

NQO1 C609T polimorfizmin mesane kanseri ile ilişkilendirilmesi PLINK 1.07 programı ile gerçekleştirilmiştir. Mesane kanseri üzerinde etkili olan faktörlerden cinsiyet, yaş ve sigara kullanımının mesane kanseri oluşumuna olan etkileri PLINK 1.07 programı ile incelenmiş ve elde edilen veriler polimorfizm ile birlikte değerlendirilerek risk analizi gerçekleştirilmiştir.

5.7.1. Hardy-Weinberg Testi

Genotip tayini sonrası genotip frekanslarının Hardy-Weinberg dengesine uygunluğu PLINK yazılımı ile test edilmiştir. Test sonuçlarına göre kontrol popülasyonu Hardy-Weinberg dengesindedir ($p>0,05$) ve genotip frekansları hasta popülasyonu ile karşılaştırarak kontrol grubu olarak kullanılmaya uygundur (Tablo 5.3.).

Tablo 5.3. Hardy-Weinberg Testi Sonuçları

SNP	Grup	CC	CT	TT	p
C609T	Hasta	91	72	11	0,5702
	Kontrol	82	58	6	0,3658
	Toplam	173	130	17	0,3041

5.7.2. Sigara Kullanımı ve Mesane Kanseri İlişkisinin İncelenmesi

PLINK 1.07 programı ile hasta ve kontrol grubu sigara içimine göre gruplandırılarak analiz edilmiştir (Tablo 5.4.). Yapılan analiz sonucunda sigara içenlerin sigara içmeyenlere oranla mesane kanserine yakalanma riskinin önemli derecede arttığı belirlenmiştir (Tablo 5.5.).

Tablo 5.4. Grup-Sigara İçimi Çapraz Tablosu

Grup	Sigara İçen	Sigara İçmeyen
Kontrol	43	103
Hasta	130	44

Tablo 5.5. Grup-Sigara İçimi Risk Tahmini

Kontrol/Hasta OR	(%95 CI)	df	p
3,853	(2,315-6,412)	1	0,000002

5.7.3. Cinsiyet ve Mesane Kanseri İlişkisinin İncelenmesi

PLINK 1.07 programı kullanılarak cinsiyet etmeni ve mesane kanseri ilişkisi analiz edilmiştir (Tablo 5.6.). PLINK 1.07 programı kullanılarak yapılan analizde erkeklerin kadınlara oranla mesane kanserine yakalanma riskinin yaklaşık 5,6 kat daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Tablo 5.7.).

Tablo 5.6. Grup-Cinsiyet Çapraz Tablosu

Grup	Cinsiyet		Toplam
	Erkek	Kadın	
Kontrol	63	83	146
Hasta	142	32	174
Toplam	205	115	320

Tablo 5.7. Cinsiyet Risk Tahmini

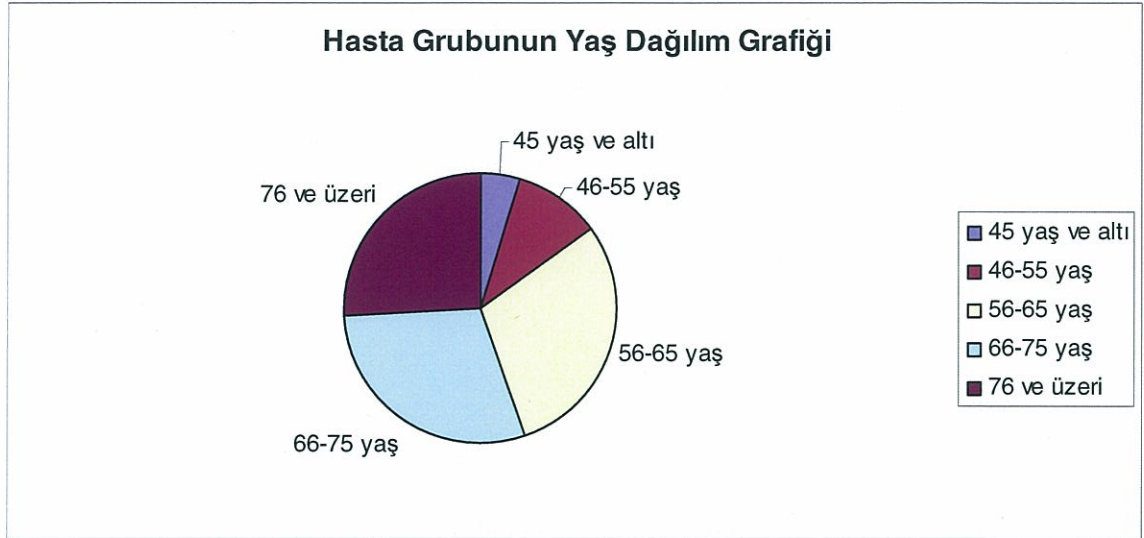
Erkek/Kadın OR	(%95 CI)	df	p
5,587	(3,278-9,523)	1	0,000002

5.7.4. Mesane Kanserinin Yaş ile İlişkilendirilmesi

Hasta grubunu oluşturan bireylerin yaşlarına bakıldığında, 25 yaşından başlayıp 92 yaşına kadar yaş grubunda olan bireylerin olduğu ve yaş ortalamasının 66,8 yaş olduğu belirlenmiştir. Bu hastaların yaklaşık %55'inin 65 yaş üzeri olduğu belirlenmiştir. Hasta grubunu oluşturan bireylerin yaş bilgileri 10 yıllık aralıklarla yaş gruplarına ayrılmıştır ve bu yaş gruplarına denk gelen birey sayısı ve yüzdesi belirlenmiştir (Tablo 5.8., Şekil 5.6.).

Tablo 5.8. Hasta grubunun yaş gruplarına göre dağılımları

Yaş aralığı	45 yaş ve altı	46-55	56-65	66-75	76 +
Hasta	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)
	8 (%5)	18 (%10)	52 (%30)	51 (%29)	45 (%26)



Şekil 5.6. Hasta grubunun yaş dağılım grafiği

5.7.5. Asosiyasyon Testi

Yapılan testte tüm genotipik etki, TT genotipi, TT genotipine ek olarak erkek olma ve sigara kullanımı gibi etkenler birlikte incelenmiş ve çeşitli sonuçlar elde edilmiştir (Tablo 5.10-5.12.).

Tablo 5.9. Asosiyasyon Testi

	OR	CI	P
Genotipik Etki	1,187	(0,8192-1,72)	0.3647
TT Genotipi	1,575	(0,5678-4,367)	0.383
TT Genotipi+Erkek	1,504	(0,606-3,734)	0.3788
TT Genotipi+Sigara	0,9606	(0,3964-2,328)	0.9291

Tablo 5.10. Genotipik etki

Genotip	OR	%95CI	p
CC	1.0 (Ref)	-	-
CT	1,119	0,708-1,1766	0,631
TT	1,652	0,585-4,667	0,342
CT+TT	1,190	0,765-1,851	0,440

Tablo 5.11. Genotipik Etki ve Sigara

Genotip	OR*	%95CI*	P*
CC	1.0 (Ref)	-	-
CT	1,109	0,664-1,1854	0,692
TT	0,789	0,258-2,41	0,678
CT+TT	1,081	0,659-1,773	0,758

*Sigara içimine göre düzenlenmiştir.

Tablo 5.12. Sigara içimine göre genotip dağılımları ve risk oranları

NQO1	Sigara içenler				Sigara içmeyenler			
	Hasta/Kontrol	OR	%95CI	p	Hasta/Kontrol	OR	%95CI	p
CC	66/23	1.0 (Ref.)	-	-	25/59	1.0 (Ref.)	-	-
CT	54/15	1,255	0,597- 2,638	0,550	18/43	0,988	0,480- 2,034	0,974
TT	10/5	0,697	0,216- 2,254	0,547	1/1	2,360	0,142- 3,924	0,546
CT+TT	64/20	1,186	0,594- 2,367	0,629	19/44	0,980	0,480- 1,997	0,955

6. TARTIŞMA

Kişilerin kansere olan yatkınlığının belirlenmesinde göz önünde bulundurulan etkenlerden biri detoksifikasyon mekanizmalarında rol oynayan enzimlerin gösterdiği polimorfizmlerdir (Estabrook, 1996). Ortaya çıkan polimorfizmler sonucunda enzimlerin niceliksel ve niteliksel özellikleri değişmektedir. Genetik polimorfizm çalışmaları, hastalıklar için risk altındaki kişilerin belirlenmesi ve ilaç tedavisi için yeni hedeflerin belirlenmesine fırsat verir. Kimyasalları ya da karsinojenleri metabolize eden enzim polimorfizmleri kalıtsal ya da çevresel olarak hastalık oluşumunda doğrudan etki gösterirken, DNA onarım genlerindeki polimorfizmler dolaylı etki gösterir (Vineis, 2002). Eğer polimorfizm enzimi kodlayan bölgede oluşmuş ise vücuttaki enzim seviyesi populasyon içerisinde farklılıklar oluşturabilir. Ortaya çıkan farklılık ksenobiyotiklerin detoksifikasyonunu da etkiler. Enzimlerin bu polimorfik durumları çeşitli hastalıklara ve kansere yatkınlık sağlamaktadır. Bu nedenle, bu konu çalışmaların ilgi odağı haline gelmiştir (Weber, 1997: 3).

Ksenobiyotik metabolizmasında önemli yere sahip olan *NQO1* enzimini kodlayan gen üzerinde meydana gelen nükleotid değişimi sonucunda ortaya çıkan C609T polimorfizmi, enzimin etkisini azaltmakta ya da ortadan kaldırmaktadır. Polimorfik aleli heterozigot olarak taşıyan bireylerde enzim aktivitesi düşük iken, homozigot olarak taşıyan bireylerde enzim aktivitesi ortadan kalkmaktadır (Traver ve diğ., 1997).

Japon populasyonunda yapılan ve 8 farklı kanser türünde (özefagus, mide, kolon, rektum, akciğer, meme, prostat kanseri, lenfoma) *NQO1* C609T polimorfizminin etkisinin araştırıldığı çalışmada; akciğer kanseri dışında diğer kanser tipleri ile polimorfizm arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır (Hamajima ve diğ., 2002).

Akciğer kanseri ile ilgili çalışmalar incelendiğinde; akciğer kanseri riskinde *NQO1* C609T polimorfizminin etkisini araştıran 21 vaka-kontrol çalışması incelenmiş, beyaz populasyonda varyant genotiplerle akciğer kanseri riski arasında

bağlantı görülmemiştir. Asyalılarda bütün varyant genotipler için bir ilişki gösterilememiş fakat Asya populasyonunda yapılan çalışmalar arasında güçlü heterojenlik görülmüştür. Beyaz ırktakinin aksine varyant allel taşıyan Asyalılarda akciğer kanseri riskinin azaldığı görülmüştür (Traver ve diğ., 1997). Akciğer kanseri histolojisine bakıldığında beyaz ırkta adenokarsinom ve küçük hücreli karsinomda NQO1 C609T polimorfizminin etkisi görülmemiştir. T alel taşıyıcılarında ise muhtemelen skuamöz hücreli karsinom riski yüksektir. Asyalılarda NQO1 varyant genotipinin koruyucu etkisinin sadece adenokarsinom için görüldüğü, skuamöz hücreli karsinom için görülmediği gösterilmiştir (Traver ve diğ., 1997). İngiliz populasyonunda yapılan bir diğer çalışmada da NQO1 C609T polimorfizminin küçük hücreli akciğer kanseri üzerine olan etkisi araştırılmış ve herhangi bir risk oluşturmadığı gösterilmiştir (Lewis ve diğ., 2001).

Lösemi ile ilgili çalışmalar incelendiğinde; Türk populasyonunda yapılan ve NQO1 C609T polimorfizminin pediatrik akut lösemiler üzerindeki etkisinin araştırıldığı çalışmada polimorfizmin bir etkisinin olmadığını göstermişlerdir. Olgu ve kontrol grupları arasında yapılan genotip ayırımında istatistiksel bir anlam bulunamamıştır (Sırma ve diğ., 2004). Avrupa populasyonunda yapılmış bir çalışmada çeşitli kromozom anomalisi taşıyan (*MLL/AF4*, *BCR/ABL*, *TEL/AML1*) 138 Pediatrik ALL hastası ile Burkitt's lenfoma hastası olan 71 hasta ile 190 sağlıklı bireyi NQO1 C609T polimorfizmi açısından karşılaştırmışlardır. İstatistiksel değerlendirme sonucunda, ALL hastaları kontrol grubuyla kıyaslandığında NQO1 C609T polimorfizminin hastalık için bir risk oluşturmazken, sadece Burkitt's lenfoma hastaları kontrol grubuyla kıyaslandığında anlamlı bir sonuç (OR= 1,81; %95 CI= 1,04-3,15; p=0,036) elde edilmiştir. Yaş ve cinsiyet açısından kıyaslandığında yine anlamlı sonuçlar elde edilmemiştir (Kracht ve diğ., 2004).

Prostat kanseri ile ilgili Türk populasyonunda yapılan bir çalışmada prostat kanseri ile NQO1 C609T polimorfizmi arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır (Ergen ve diğ., 2007).

Mesane kanseri ile ilgili çalışmalar incelendiğinde; İtalya'daki bir çalışmada NQO1 C609T polimorfizminin genotip ve çevresel faktörlerle birlikte mesane kanseri üzerine olan etkisi araştırılmış ve aromatik aminler gibi kimyasal maddelere maruz kalmayanlarda 1,35 kat (OR= 1,35; %95 CI= 0,87-2,10), kimyasal maddelere maruz kalanlarda ise 1,62 kat (OR= 1,62; %95 CI= 0,55-4,74) risk olduğu gösterilmiştir (Rayjean ve diğ., 2004). Amerika'da beyaz ırktan bireylerle yapılan

başka bir çalışmada *NQOI* C609T polimorfizminin mesane kanseri üzerine etkisi sigara kullanımı ve cinsiyetle birlikte incelenmiştir. Yapılan çalışmanın sonucunda homozigot mutant alele sahip olan bireylerin mesane kanseri açısından yüksek riske sahip oldukları gösterilmiştir (OR=1,51; %95 CI= 1,01–2,25). Erkeklerde ise yine mesane kanseri açısından bir risk söz konusudur (OR=1,75; %95 CI= 1,08-2,85). Sigara kullanımı ile ilişkisine bakıldığında ise sigara kullananların kullanmayanlara oranla risk teşkil ettiği (OR= 1,78; %95 CI= 1,06-3,00) gösterilmiştir (Park ve diğ., 2003). Yine Amerika’da beyaz ırktan bireylerle yapılan başka bir çalışmada ise *NQOI* C609T polimorfizminin mesane kanseri üzerine etkisi tespit edilememiştir (Terry ve diğ., 2005). Tayvan’da yapılan bir çalışmada CT ve TT genotipine sahip olan bireylerin mesane kanseri açısından yüksek riske sahip oldukları gösterilmiştir (OR= 1,50; 95% CI= 1,03-2,10). Sigara kullanımı ile ilişkisine bakıldığında ise sigara kullananların kullanmayanlara oranla risk teşkil ettiği gösterilmiştir (OR= 8,60; 95% CI= 2,50-29,7) (Wang ve diğ., 2008). Kaşmir populasyonunda yapılan başka bir çalışmada homozigot mutant alele sahip olan bireylerin mesane kanseri açısından yüksek riske sahip oldukları (OR= 1,90) ve sigara kullananların kullanmayanlara oranla artmış riskli (OR= 3,47) olduğu gösterilmiştir (Arshad ve diğ., 2011). Kore’de beyaz populasyonda yapılan başka bir çalışmada TT genotipine sahip bireylerin mesane kanseri açısından risk oluşturduğu gösterilmiştir (OR= 1,20; 95% CI= 1,00-1,43) (Chun ve diğ., 2006). Asya kökenli Koreli bireylerle yapılan çalışmada da TT genotipine sahip olan bireylerin mesane kanseri açısından yüksek riske sahip oldukları (OR = 1,60) gösterilmiştir (Choi ve diğ., 2003). İsveçte yapılan bir çalışmada homozigot mutant alele sahip olan bireylerin mesane kanseri açısından yüksek riske sahip oldukları (OR= 1,4; 95% CI= 1,0–1,8) gösterilmiştir (Sanyal ve diğ., 2004). Arjantin’de yapılan başka bir çalışmada CT+TT genotipine sahip bireylerin mesane kanseri açısından yüksek riske sahip oldukları (OR= 1,3; 95% CI= 0,5-3,5) gösterilmiştir. Sigara kullanımı ile ilişkisine bakıldığında ise sigara kullananların kullanmayanlara göre önemli oranda teşkil ettiği gösterilmiştir (OR= 8,6; 95% CI= 2,7-27) (Moore ve diğ., 2004).

Yapılan çalışmalarda incelenen kanser tipine ve populasyonuna bağlı olarak birbiriyle çelişkili sonuçlar elde edilmiştir. Bunun nedeni, etnik grupların bu polimorfizm açısından farklılık göstermesidir. *NQOI* geninin 609. nükleotidinin sitozinden timine dönüşmesiyle ortaya çıkan polimorfizmin insan populasyonunun ortalama %50’sinde görüldüğü, bunun %10’nun bu polimorfizm için homozigot

özellik gösterdiği düşünülmektedir. Fakat bu oranlar etnik gruplar arasında rastlanma sıklığı açısından farklılıklar göstermektedir. Avrupa kökenlilerde %4, Meksika kökenli Amerikalılarda %16, Afrika kökenli Amerikalılarda %5, Asya kökenlilerde %20 olarak hesaplanmıştır (Kelsey ve diğ., 1997).

Bu tez çalışmasında 174 mesane kanseri hastası ve 146 sağlıklı bireyden alınan örnekler kullanılarak PZR-Restriksiyon uzunluk polimorfizmi metodu ile *NQOI* geni üzerindeki C609T (Pro187Ser) polimorfizmi incelenmiştir.

Çalışma kapsamında mesane kanseri risk faktörü olan cinsiyet, yaş, sigara ve maruz kalınan kimyasal maddeler gibi çevresel faktörler incelenmiştir. Hastaların %81'i erkek, %19'u ise kadındır. Sonuçlar istatistiksel olarak incelendiğinde mesane kanseri ve cinsiyet arasında önemli bir ilişki olduğu gösterilmiştir ($p<0.01$). İstatistiksel olarak erkeklerin kadınlara oranla 5,6 kat daha fazla mesane kanserine yakalanma riskine sahip oldukları belirlenmiştir (%95CI=3,278-9,523) (Tablo 5.7.). Daha önce yapılan çalışmalarda da erkeklerin mesane kanserine yakalanma riski kadınlardan yüksek bulunmuştur (Castelao ve diğ., 2001 ; Gupta ve diğ., 2009 ; Jemal ve diğ., 2008 ; Samanic ve diğ., 2006).

Mesane kanseri için diğer bir risk faktörü olan yaşın mesane kanseri ile ilişkisi incelenmiştir. Bu çalışmada incelenen hasta grubundaki bireylerin %55'i 65 yaş, %85'i 55 yaş üzerindedir (Tablo 5.8.). Daha önceden de yapılan çalışmalarda belirtildiği gibi artan yaşın mesane kanseri için bir risk faktörü olduğu belirlenmiştir (Gupta ve diğ., 2009 ; Messing ve Catalana, 1998: 2337 ; Zimichev ve diğ., 2010).

Bir diğer risk faktörü olan sigara kullanımı ile mesane kanseri arasında önemli bir ilişki gösterilmiştir ($p<0,01$). Mesane kanserine yakalanma riski sigara içenlerde içmeyenlere oranla yaklaşık 3,85 kat fazladır ($p<0,01$) (Tablo 5.5.).

Yapılan çalışma sonunda istatistiksel sonuçlar incelendiğinde genotipik etkiye yani CC, CT ve TT genotiplerine ayrı ayrı bakıldığında ihtimaller oranı 1,187 (%95 CI=0,8192-1,72) olarak hesaplanmıştır. Fakat bu değer istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0,36$) (Tablo 5.9.). TT genotipi ve (CC+CT) genotipleri incelendiğinde ihtimaller oranı 1,575 (%95 CI=0,5678-4,367) olarak hesaplanmıştır. Fakat bu değer istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0,38$) (Tablo 5.9.). Sigara kullanan ve TT genotipine sahip kişilere bakıldığında da aynı şekilde istatistiksel olarak anlamlı sonuç elde edilememiştir ($p=0,92$). Erkek olup ve TT genotipine sahip kişiler incelendiğinde istatistiksel olarak anlamlı sonuç elde edilememiştir ($p=0,38$) (Tablo 5.9.).

Yapılan istatistiksel analizde genotipik etki araştırılmıştır. Genotipik olarak CC genotipini referans alarak CT genotipine sahip bireylerde ihtimaller oranı 1,119; (%95 CI=0,708-1,176; p=0,631) olarak, TT genotipine sahip bireylerde ihtimaller oranı 1,652; (%95 CI=0,585-4,667; p=0,342) olarak, CT+TT genotipine sahip bireylerde ise ihtimaller oranı 1,190; (%95 CI=0,765-1,851; p=0,440) olarak hesaplanmıştır (Tablo 5.10.). Aynı şekilde genotipik etki ve sigara kullanımı incelendiğinde sigara içen bireylerde CC genotipi referans alınarak CT genotipine sahip bireylerde ihtimaller oranı 1,109; (%95 CI=0,664-1,185; p=0,692) olarak, TT genotipine sahip bireylerde ihtimaller oranı 0,789; (%95 CI=0,258-2,411; p=0,678) olarak, CT+TT genotipine sahip bireylerde ise ihtimaller oranı 1,081; (%95 CI=0,659-1,773; p=0,758) olarak hesaplanmıştır (Tablo 5.11.).

Yapılan çalışmada hasta grubunun %74'ü sigara kullanmakta, %26'sı ise sigara kullanmamaktadır. Kontrol grubunda ise bunun tam tersi olarak bireylerin %30'u sigara kullanmakta, %70'i ise sigara kullanmamaktadır. Hasta ve kontrol gruplarında sigara içen ve içmeyenler arasında dengesiz bir durum görülmektedir. Bu nedenle hastalığın nedeninin sigara mı yoksa genotipik etki mi olduğu konusunu aydınlatmak amacıyla Tablo 5.12. oluşturulmuştur. Bu tabloda hasta ve sağlıklı bireylerin genotipleri sigara kullanma durumlarına göre sınıflandırılmıştır. Sigara içen ve içmeyen hasta ve kontrol grubu genotipleri kendi grupları içinde istatistik analiz ile değerlendirilmiştir. CC genotipi referans olarak alınmıştır. Sigara kullananlarda CT genotipi olan bireylerde ihtimaller oranı 1,255 (%95 CI= 0,597-2,638; p= 0,550), TT genotipine sahip bireylerde ihtimaller oranı 0,697 (%95 CI= 0,216-2,254; p= 0,547), CT+TT genotipine sahip bireylerde ise ihtimaller oranı 1,186 (%95 CI= 0,594-2,367; p= 0,629) olarak; sigara kullanmayanlarda ise CT genotipine sahip bireylerde ihtimaller oranı 0,988 (%95 CI= 0,480-2,034; p= 0,974), TT genotipine sahip bireylerde ihtimaller oranı 2,360 (%95 CI= 0,142-3,924; p= 0,546), CT+TT genotipine sahip bireylerde ise ihtimaller oranı 0,980 (%95 CI= 0,480-1,997; p= 0,955) olarak hesaplanmıştır. Hesaplanan değerler incelendiğinde istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar elde edilememiştir. Buna rağmen sigara içen CT ve CT+TT genotipine sahip bireylerde ihtimaller oranı 1'den yüksek bulunmuştur. Homozigot mutant genotipte ise tam tersi olarak sigara içmeyenlerde ihtimaller oranı 2.4 kat artmıştır. Bu da mesane kanserine yatkınlıkta polimorfik etkinin sigara içmeyenlerde daha belirgin olduğunu göstermektedir. Bu durum şu şekilde açıklanabilir. Metabolik gen polimorfizmleri söz konusu olduğunda polimorfik

etkiler sigara kullanımı gibi çevresel etkenlerin yokluğunda daha belirgindir. Çevresel etkenlerin hastalığa yatkınlık üzerine olan etkileri, polimorfik etkileri maskeleyebilir. Sigara gibi karsinojen kaynaklarına çok fazla maruz kalındığında karsinojen metabolizmasında rol oynayan enzimler substrat doygunluğu yaşarlar ve bu sebeple metabolik hızı belirleyen etken enzimin yapısına bağlı doğal hızından ziyade substrat miktarı haline gelir. Karsinojen kaynaklı substrat doygunluğu yaşanmadığı zaman reaksiyon hızını belirleyen esas etken enzimin yapısıdır. Dolayısıyla bu durumda polimorfizmlerin etkileri enzimin hızının belirlenmesinde çok daha fazla etkili olurlar.

Sonuç olarak çalışmada artan yaşın, sigara kullanımının ve cinsiyetin mesane kanseri üzerinde etkili olduğu saptanmıştır. Ancak, NQO1 C609T polimorfizminin mesane kanseri için risk faktörü oluşturmadığı sonucuna varılmıştır.

7. KAYNAKLAR

Ali-Osman F, Akande O, Antoun G, Mao JX, Buolamwini J (1997). Molecular cloning, characterization and expression in *Escherichia coli* of full-length cDNAs of three human glutathione S-transferase variants. Evidence for differential catalytic activity of the encoded proteins. *J Biol Chem.* 272(15): 10004-12.

Anafarta K, Göğüş O, Bedük Y, Arıkan N (1998). *Temel Üroloji*. Güneş Kitapevi, Ankara.

Anwar WA, Abdel-Rahman SZ, El-Zein RA (1996). Genetic polymorphism GSTM1, CYP2E1 and CYP2D6 in Egyptian bladder cancer patients. *Carcinogenesis.* (17):1923-1929.

Arshad AP, Nighat PK, Zafar AS, Amin MS, Saleem MW, Mushtaq AS (2011). Association of Bladder Cancer Risk with an NAD(P)H:Quinone Oxidoreductase Polymorphism in an Ethnic Kashmiri Population. *Biochemical Genetics.* (7-8):417-426.

Brockmoller J, Cascorbi I, Kerb R (1996). Combined analysis of inherited polymorphisms in arylamine N-acetyltransferase 2, glutathione S-transferase M1 and T1, microsomal epoxide hydrolase and cytochrome P450 enzymes as modulators bladder cancer risk. *Cancer Research.* (56):3915-3925.

Bruemmer B, White E, Vaughan TL, Cheney CL (1997). Fluid intake and the incidence of bladder cancer among middle-aged men and women in a three-county area of western Washington. *Nutrition and Cancer.* (29):163-168.

Castelao JE, Yuan MJ, Skipper PL, Tannenbaum SR, Gago-Dominguez M, Crowder SJ, Ross RK, Yu MC (2001). Gender- and Smoking-Related Bladder Cancer Risk. *J Natl Cancer Inst.* (93):538-45

Cenas N, Anusevicius Z, Nivinskas H, Miseviciene L, Sarlauskas J (2004). Structureactivity relationships in two-electron reduction of quinones. *Methods Enzymol.* (382):258-77.

Chen S, Wu K, Know R (2000). Structure-Function Studies of DT-Diaphorase (NQO1) and NRH: Quinone Oxidoreductase (NQO2). *Free Radical Biology & Medicine.* 29(3/4):276-284.

Chun C, Zhang Z, Berthiller J, Boffetta P, Hashibe M (2006). NAD(P)H:Quinone Oxidoreductase 1 (NQO1) Pro187Ser Polymorphism and the Risk of Lung, Bladder, and Colorectal Cancers: a Meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 15(5):979-987.

Choi JY, Lee KM, Cjo SH (2003). CYP2E1 and NQO1 genotypes, smoking and bladder cancer. *Pharmacogenetics*. (13):349-355.

Çetin M (1999). Drug Interactions in Psychiatric Practice. *Bull Clin Psychopharmacol*. (9):78-92.

Eaton DL and Bammler TK. (1999) Concise review of the glutathione S-transferases and their significance to toxicology. *Toxicol Sci*. (49):156-64.

Eble NJ, Sauter G, Epstein JI, Sesterhann IA (2004). Pathology and genetics; Tumours of the urinary system and male genital organs. WHO classification of Tumours. *IARC Press*. (7):89-154.

Ergen A, Gormus U, Narter F, Zeybek U, Bulgurcuoglu S, Isbir T (2007). Investigation of NAD(P)H:Quinone Oxidoreductase 1 (NQO1) C609T Polymorphism in Prostate Cancer. *Anticancer Res*. (27):4107-4110.

Estabrook R.W (1996). Cytochrome P450: From a single protein to a family of proteins with some personal reflections, Cytochrome P450: Metabolic and Toxicological Aspects, Ionnides. *Boca Rator FL: CRC Pres*. Newyork. 3-28.

Flora S, Bennicelli C, D'Agostini F, Izzotti A, Camoirano A (1994). Cytosolic activation of aromatic and heterocyclic amines: inhibition by dicoumarol and enhancement in viral hepatitis B. *Environ. Health Perspect*. (6):69-74.

Franekova M, Halasova E, Bukovska E, Luptak J, Dobrota D (2008). Gene polymorphisms in bladder cancer. *Urologic Oncology*. 26(1):1-8.

Garcia-Closas M, Malats N, Silverman D, Dosemeci M, Kogevinas M, Hein DW, Tardon A, Serra C, Carrato A, Garcia-Closas R, Lloreta J, Castano-Vinyals G, Yeager M, Welch R, Chanock S, Chatterjee N, Wacholder S, Samanic C, Tora M, Fernandez F, Real FX, Rothman N (2005). NAT2 slow acetylation, GSTM1 null genotype, and risk of bladder cancer: results from the Spanish Bladder Cancer Study and meta-analyses. *Lancet*. 366(9486): 649-659.

Grignon D (1997). Neoplasms of the Urinary Bladder. *Urologic Surgical Pathology*, Missouri.

Gupta P, Jain M, Kapoor R, Muruganandham K, Srivastava A, Mandhani A (2009). Impact of age and gender on the clinicopathological characteristics of bladder cancer. *Urol Res*. 2(25):207-210.

Hamajima N, Matsuo K, Iwata H, Shinoda M, Yamamura Y, Kato T, Hatooka S, Mitsudomi T, Suyama M, Kagami Y, Ogura M, Ando M, Sugimura Y, Tajima K (2002). NAD(P)H: quinone oxidoreductase1 (NQO1) C609T polymorphism and the risk of eight cancer for Japanese. *Int J Clin Oncol*. (7):103-108.

IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans (1994). Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. *IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*. (61):1-241.

- Iskander K and Jaiswal AK. (2005) Quinone oxidoreductases in protection against mylogenous hyperlasia and benzene toxicity. *Chemico-Biological Interactions*. (153):147-157.
- Jaiswal AK (2000). Regulation of genes encoding NAD(P)H:quinone oxidoreductases. *Free Radic Biol Med*. (3-4):254-62.
- Jemal A, Siegel R, Ward E (2008). Cancer statistics. *CA: a cancer journal for clinicians*. (58):71-96.
- Joseph P, Long DJ, Klein-Szanto AJ, Jaiswal AK (2000). Role of NAD(P)H: Quinone Oxidoreductase 1 (DT Diaphorase) in Protection aganist Quinone Toxicity. *BioChemical Pharmacology*. (60):207-214.
- Jung I and Messing E. (2000) Molecular mechanisms and pathways in bladder cancer development and progression. *Cancer Control*. (4):325-34.
- Kelsey KT, Wiencke JK, Christiani DC, Zuo Z, Spitz MR, Xu X, Lee BK, Schwartz BS, Traver RD, Ross D (1997). Ethnic variation in the prevalance of a commen NQO1: quinone oxidoreductase polymorphism and its implicatins of anti-cancer chemotherapy. *Br J Cancer*. (76):852-854.
- Kracht T, Schrappe M, Strehl S, Reither A, Elsner H, Trka J, Cario G, Viehmann S, Harbortt J, Brokhardt A, Metzler M, Langer T, Repp R, Marschalek R, Welte K, Haas O, Stanulla M (2004). NQO1 polymorphism in distinct entities of pediatric hematologic neoplasms. *Pediatric Malignacies*. (89):1492-1497.
- Lewis SJ, Cherry NM, Niven RM, Barber PV, Povey AC (2001). Polymorphism in the NAD(P)H: quinone oxidoreductase gene and small cell lung cancer risk in a UK population, *Lung Cancer*. (34):177-183.
- Linder MW, Looney S, Adams JE (2002). Warfarin dose adjustments based on CYP2C9 genetic polymorphisms. *J Thromb Thrombolysis*. (14):227-232.
- Liska DJ (1998). The detoxification enzyme systems. *Altern Med Rev*. 3(3):187-98.
- Lutz W (2000). N-acetyltransferase genetic polymorphism and its role in the development of neoplastic disease. *Med Prac*. (51):277-84.
- Mao Q, Lin Y, Zheng X, Qin J, Yang K, Xie L (2010). A meta-analysis of alcohol intake and risk of bladder cancer. *Cancer Causes and Control*. (21):1843–1850.
- Messing EM and Catalona W. (1998) *Urothelial Tumors of the Urinary Tract*. WB Saunders, Philadelphia.
- Moore LE, Wiencke JK, Batesa MN, Zhengb S, Reyc OA, Smitha AH (2004). Investigation of genetic polymorphisms and smoking in a bladder cancer case–control study in Argentina. *Cancer Letters*. (211):199–207.

- Nemeroff CB, DeVane CL, Pollack BV (1996). Newer antidepressants and the cytochrome P450 system. *Am J Psychiatry*. (153):311-320.
- Özerol E (1996). Cytochrome P450-containing monooxygenase enzyme systems. *Journal of Turgut Özal Medical Center*. 3(33):257-275.
- Park S, Zhao H, Margaret RS, Grossman B, Wu X (2003). An association between *NQO1* genetic polymorphism and risk of bladder cancer. *Mutat Res*. (536):131-137.
- Pearson WR, Vorachek WR, Xu SJ (1993). Identification of class-mu glutathione transferase genes *GSTM1-GSTM5* on human chromosome 1p13. *Am J Hum Genet*. (53):220-233.
- Petersen, RO (1992). *Urinary Bladder In. Urologic Pathology*. JB Lippincott Company, Philadelphia.
- Rayjean JH, Boffetta P, Brennan P, Malaveille C, Gelatti U, Placidi D, Carta A (2004). Genetic polymorphisms of MPO, COMT, MnSOD, NQO1, interactions with environmental exposures and bladder cancer risk. *Carcinogenesis*. 25(6): 973-978.
- Reuter VE (1997). *Urinary Bladder, Ureter and Renal Pelvis*. Histology for Pathology. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia.
- Rogers JF, Nafziger AN, Bertino JS (2002). Pharmacogenetics affects dosing, efficacy and toxicity of cytochrome P450 metabolised drugs. *Am J Med*. (113):746-750.
- Ross D (2005). Functions and distribution of NQO1 in human bone marrow: Potential clues to benzene toxicity. *Chemico-Biological Interactions*. 137-146.
- Ross D, Kepa JK, Winski SL, Beall HD, Anwar A, Siegel D (2000). NAD(P):quinone oxidoreductase (NQO1): chemoprotection, bioactivation, gene regulation genetic polymorphisms, *Chemico-Biological Interactions*. (129):77-97.
- Samanic C, Kogevinas M, Dosemeci M, Malats N, Real FX, Garcia-Closas M, Serra C, Carrato A, García-Closas R, Sala M, Lloreta J, Tardón A, Rothman N, Silverman DT (2006). Smoking and bladder cancer in Spain: effects of tobacco type, timing, environmental tobacco smoke, and gender. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 15(7): 1348-54.
- Sanyal S, Festa F, Sakano S, Zhang Z, Steineck G, Wijkström H, Larsson P, Kumar R, Hemminki K (2004). Polymorphisms in DNA repair and metabolic genes in bladder cancer. *Carcinogenesis*. 25(5): 729-734.
- Sarbia M, Bitzer M, Siegel D, Ross D, Shulz WA, Zotz RB, Kiel S, Geddert H, Kandemir Y, Walter A, Willers R, Gabbert HE (2003). Association between NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1 (NQO1) activation C609T polymorphism and adenocarcinoma of the upper gastrointestinal tract. *Int J Cancer*. (3):381-6.

Shariat SF, Sfakianos JP, Droller MJ (2009). The effect of age and gender on bladder cancer: a critical review of the literature. *British Journal of Urology International*. (105):300-308.

Shibuta K, Nakashima T, AbeMet (1994). Molecular genotyping for N-acetylation polymorphism in Japanese patients with colorectal cancer. *Cancer*. (15):3108-12.

Sırma S, Agaoglu I, Yıldız I, Cayli D, Horgusluoglu E, Anak S, Yüksel L, Unuvar A, Celkan T, Apak H, Karakas Z, Devecioglu O, Ozbek U (2004). NQO1: quinone oxidoreductase 1 null genotype is not associated with pediatric de nova acute leukemia. *Pediatr Blood Cancer*. (43):568-570.

Siegel D and Ross D.(2000) Immunodetection of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) in human tissues. *Free Radic Biol Med*. (3-4):246-53.

Sim E, Pinter K, Mushtag A (2003). Arylamine N-acetyltransferases: a pharmacogenomic approach to drug metabolism and endogenous function. *Biochem Soc Trans*. (31):615-9.

Steinmaus CM, Nunez S, Smith AH (2000). Diet and bladder cancer: a metaanalysis of six dietary variables. *American Journal of Epidemiology*. (151):693–702.

Sternberg, SS (2004). *Diagnostic Surgical Pathology*. The C.V. Mosby Company, Washington.

Sørensen M, Autrup H, Tjønneland A, Overvad K, Nielsen OR (2005). Genetic polymorphisms in CYP1B1, GSTA1, NQO1 and NAT2 and the risk of lung cancer. *Cancer Letters*. (221):185-190.

Tanagho EA and McAninch JW (2004). *Smith's General Urology*. The McGraw-Hill Companies, Michigan.

Terry PD, Umbach DM, Taylor JA (2005). No association between SOD2 and NQO1 genotypes and risk of bladder cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. (14):753-754.

Thier R, Bruning T, Roos PH, Rihs HP, Golka K, Ko Y, Bolt HM (2003). Markers of genetic susceptibility in human environmental hygiene and toxicology: the role of selected CYP, NAT and GST genes. *Int J Hyg Environ Health*. 206(3):149-71.

Traver RD, Siegel D, Beall HD, Phillips RM, Gibson NW, Franklin WA, Ross D (1997). Characterization of a polymorphism in NAD(P): quinone oxidoreductase. *Br J Cancer*. (75):69-75.

Vineis S (2002). Relationship between polymorphism of xenobiotic metabolising enzymes and susceptibility to cancer. *Toxicology*. (24):457-462.

Vogelzang NJ, Scardio PT, Shipley WU, Debruyne FMJ, Linehan WM (2006). *Comprehensive textbook of genitourinary oncology*. Lippincott Williams and Wilkins, California.

Walsh P, Retik AB, Vaughan ED, Wein AJ (1997). *Bladder Cancer*. Saunders Company, Los Angeles.

Wang YH, Lee YH, Tseng PT, Shen CH, Chiou HY (2008). Human NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) and sulfotransferase 1A1 (SULT1A1) polymorphisms and urothelial cancer risk in Taiwan. *Cancer Res Clin Oncol*. 134(2):203-9.

Weber W (1997). *Pharmacogenetics*. Oxford University, London.

Williams SG and Stein JP. (2004) Molecular Pathways in Bladder Cancer. *Urol Res*. (32):373–385.

Xu LL, Wain JC, Miller DP, Thurston SW, Su L, Lynch TJ, Christiani DC (2001). The NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 gene polymorphism and lung cancer: differential susceptibility based on smoking behavior. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 10(4):303-9.

Yu X and Kensler T. (2005) Nrf-2 as a target for chemoprevention. *Mutation Research*. 591:92-102.

Zheng L, Wang Y, Schabath MB (2003). Sulfotransferase 1A1 (SULT1A1) polymorphism and bladder cancer risk: A case-control study. *Cancer Letters*. 202:61-69.

Zimichev AA, Prianichnikova MB, Maklakov VN (2010). Epidemiology of bladder cancer in the Samara region. *Urologiia*. (2):44-7.

8.ÖZGEÇMİŞ

Mehmet Sabri Çeliktürk, 1987 yılında İstanbul'da doğdu. 2004 yılında Küçükyalı Rezan Has Lisesi'nden mezun olduktan sonra 2005 yılında Haliç Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nde yüksek öğrenimine devam etti ve 2009 yılında mezun oldu. Yüksek lisans eğitimine aynı yıl başlayarak Haliç Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nde devam etti.