

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

**MESANE KANSERİ HASTALARINDA ALDOKETOREDÜKTAZ
1C3 rs12529 POLİMORFİZMİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Hazırlayan
Necip Ozan TİRYAKIOĞLU**

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

İstanbul – 2011

T.C.
HALIÇ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE


Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı Tezli Yüksek Lisans öğrencisi **Necip Ozan Tiryakioğlu** tarafından hazırlanan “**Mesane Kanseri Hastalarında Aldoketoredüktaz 1C3 rs12529 Polimorfizminin Araştırılması**” adlı bu çalışma jürimizce Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Sınav Tarihi :14.02.2011

(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.Ünv.Sağ.Bil.Enst.Fizy.ve Reh.ABD Öğr.Üyesi

.....


Jüri Üyesi :Yrd.Doç.Dr.Kürşat ÖZDİLLİ
HAL.Üniv.Sağ.Bil.Enst.Hemş.ABD.Öğr.Üyesi-Yedek

.....

Jüri Üyesi : Yrd.Doç.Dr.Burcu Irmak YAZICIOĞLU
HAL.Üniv. Mol.Biy.ve Gen.ABD Öğr.Üyesi-Yedek

.....

ÖNSÖZ

Bu çalışma 2008 – 2011 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 bana gösterdiği sonsuz sabır ve verdiği destek ile tez çalışmamın tamamlanmasını mümkün kılan danışmanım Sayın Yrd. Doç. Dr. Nagehan Ersoy Tunalı'ya çok teşekkür ederim. Tez çalışmamda kullanılmak üzere gerekli hasta örneklerine erişimimi sağlayan Uzm. Dr. Ömer Onur Çakır'a ayrıca teşekkür ederim.

Ayrıca sevgili eşime, anne ve babama her zaman yanımda oldukları ve desteklerini hiçbir zaman esirgemedikleri için çok teşekkür ederim.

Son olarak yüksek lisans eğitimim boyunca bana çok yardımcı olan Funda Pehlevan, Aslıhan Dağdemir ve Arş. Gör. Özlem Kurnaz' a teşekkürlerimi sunarım.

İstanbul - 2011

Ozan Tiryakioğlu

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ŞEKİL LİSTESİ.....	V
TABLO LİSTESİ.....	VI
KISALTMALAR.....	VII
GENEL BİLGİLER	IX
GENERAL INFORMATION.....	XI
1. GİRİŞ	1
1.1. Mesane Kanserinin Patofizyolojisi.....	3
1.2. Mesane Kanserinin Tanısı ve Tedavisi.....	5
1.3. Mesane Kanserinde Risk Faktörleri.....	6
1.3.1. Sigara Tüketimi.....	6
1.3.2. Alkol Tüketimi.....	7
1.3.3. Kahve Tüketimi.....	7
1.3.4. Toplam Sıvı Tüketim Miktarı.....	7
1.3.5. Beslenme.....	7
1.3.6. Fiziksel Aktivite.....	8
1.3.7. Mesleki Risk Faktörleri.....	8
1.3.8. Parazitler.....	8
1.3.9. Cinsiyet.....	9

1.3.10. Yaş.....	9
1.4. Mesane Kanserine Genetik Yatkınlık.....	10
1.4.1. N-Asetiltransferazlar.....	10
1.4.2. Glutasyon-S-transferazlar.....	11
1.4.3. Sulfotransferazlar.....	11
1.4.4. Sitokrom P-450 Enzimleri (CYP).....	12
1.4.5. Aldoketoredüktazlar (AKR).....	12
1.4.5.1. AKRler ve PAH Aktivasyonu.....	13
1.4.5.2. Aldoketoredüktazların İşlevleri ve Doku Spesifik İfadeleri.....	14
1.4.5.3. AKR Polimorfizmleri.....	15
1.5. Mesane Kanserinin Moleküler Biyolojisi.....	17
1.5.1. Yüzeysel Papiler Karsinoma ve FGFR3 yoluğı.....	18
1.5.2. Papiler Olmayan Ürotelyal Karsinoma Oluşumunda Etkili Yolaklar	20
2. AMAÇ.....	23
3.MATERYAL.....	24
3.1. Araştırmada Kullanılan Örnekler.....	24
3.2. Hızlı Genomik DNA İzolasyonu Metodu İçin Kullanılan Tamponlar.....	24
3.3. Yanak içi Epitelden DNA izolasyonu İçin Kullanılan Kimyasallar ve Tamponlar.....	25
3.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu İçin Gerekli Enzim ve Kimyasallar.....	26
3.4.1. Oligonükleotid Primerler.....	26

3.5. Restriksiyon Enzimleri ve Reaksiyon Tamponları.....	26
3.6. Elektroforez İçin Kullanılan Tamponlar ve Kimyasallar.....	27
3.7. PZR ürünlerinin saflaştırılması.....	27
3.8. DNA Büyüklük Markörleri.....	28
3.9. Cihazlar.....	28
4.METOD.....	30
4.1. Hızlı Genomik DNA İzolasyonu Metodu.....	30
4.2. Yanak içi epitel dokudan DNA izolasyonu.....	30
4.3. Dizilenecek PZR ürünlerinin saflaştırılması.....	31
4.4. DNA'nın Kantitatif ve Kalitatif Analizi.....	32
4.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	32
4.6. Restriksiyon Fragmenti Uzunluk Polimorfizmi Analizi.....	33
4.7. Agaroz Jel Elektroforezi.....	34
4.8. Mesane Kanserinin Moleküler Analizi.....	35
5. SONUÇLAR.....	38
5.1. Örneklerin Tanımı.....	38
5.2. DNA İzolasyonu.....	38
5.3. rs12529 Polimorfizminin Moleküler Analizi.....	39
5.3.1. rs12529 Polimorfizminin PZR-Restriksiyon Uzunluk Polimorfizmi Metodu ile Belirlenmesi.....	39
5.4. PZR-Restriksiyon Uzunluk Polimorfizmi Sonuçlarının Dizi Analizi ile Teyidi.....	40
5.5. Verilerin İstatistiksel Analizi.....	41

5.5.1. Cinsiyet ve Mesane Kanseri İlişkisinin Araştırılması.....	42
5.5.2. Sigara İçimi ve Mesane Kanseri İlişkisinin İncelenmesi.....	42
5.5.3. Mesane Kanserinin Yaş ile İlişkilendirilmesi.....	43
5.5.4. rs12529 Polimorfizminin Mesane Kanseri ile İlişkilendirilmesi.....	44
6.TARTIŞMA.....	46
7.KAYNAKLAR.....	51
7.1. Makaleler.....	51
7.2. Kitaplar.....	56
7.3. İnternet.....	56
8. ÖZGEÇMİŞ.....	57

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa No
Şekil 1.1. Tümörlerin evrelerine göre mesane dokusuna yayılımı.....	4
Şekil 1.2. Surveillance Epidemiology and End Results (SEER) veribankası bilgilerine göre düzenlenmiş mesane kanseri insidansı ve yaş/cinsiyet ilişkisi.....	10
Şekil 1.3. Aldoketoredüktaz yolağıyla PAH aktivasyonu.....	14
Şekil 1.4. Mesane karsinogenezinde etkin genler ve kromozomal değişimler.....	18
Şekil 1.5. p53 yolağı.....	22
Şekil 5.1. İzole edilen genomik DNA örneklerinin %1'lik agaroz jelde görüntüsü...39	39
Şekil 5.2. PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jelde görüntülenmesi.....	40
Şekil 5.3. Restriksiyon kesimi ürünlerinin %3' lük agaroz jelde görüntülenmesi.....	40
Şekil 5.4. Homozigot yabancı tip örnek kromatogramı.....	41
Şekil 5.5. Heterozigot örnek kromatogramı.....	41
Şekil 5.6. Homozigot varyant örnek kromatogramı.....	41
Şekil 5.7. Hasta Grubunun yaş dağılım grafiği.....	44

TABLO LİSTESİ

	Sayfa No
Tablo 1.1. Türk popülasyonunda Kanser Vakalarına İlişkin Veriler.....	1
Tablo 1.2. Mesane Kanseri için Risk Faktörleri.....	3
Tablo 1.3. Tümör Evreleri.....	4
Tablo 1.4. Mesane Kanserinin Tedavisinde Kullanılan İlaçlar ve Hastaların Yanıt Oranları.....	6
Tablo 1.5. AKR1C3 geni eksonik polimorfizmleri.....	16
Tablo 1.6. Mesane Kanseri ile İlişkili AKR1C3 Polimorfizmleri.....	17
Tablo 3.1. Oligonükleotid Primerler.....	26
Tablo 4.1. PCR Reaksiyonlarının içerikleri.....	36
Tablo 4.2. PZR döngü koşulları.....	36
Tablo 4.3. Restriksiyon ürünlerinin uzunlukları.....	37
Tablo 5.1. rs12529 Polimorfizmi Genotip Dağılımı.....	40
Tablo 5.2. Cinsiyet-Grup Çapraz Tablosu.....	42
Tablo 5.3. Cinsiyet Grup Ki-Kare Testi.....	42
Tablo 5.4. Cinsiyet Risk Tahmini.....	42
Tablo 5.5. Sigara İçimi-Grup Çapraz Tablosu.....	43
Tablo 5.6. Sigara İçimi-Grup Ki-Kare Testi.....	43
Tablo 5.7. Sigara İçimi için Risk Tahmini.....	43
Tablo 5.8. Hasta Grubunun Yaş Gruplarına göre Dağılımları.....	43
Tablo 5.9. Hardy-Weinberg Testi Sonuçları.....	44
Tablo 5.10. Genotipik Asosiyasyon Testi.....	45
Tablo 5.11. Genotip-Grup Ki-Kare Testi.....	45
Tablo 5.12. Lojistik Regresyon Analizi.....	45
Tablo 6.1. Farklı Populasyonlarda rs12529 Genotip Frekansları.....	47

KISALTMALAR

AKR	: Aldo-Keto Redüktaz
(NH₄)₂SO₄	: Amonyum sülfat
BCG	: Bacillus Calmette-Guerin
bç	: Baz çifti
BPB	: Bromofenol mavisi
CDK	: Siklin bağımlı kinaz
CIS	: Karsinoma <i>in situ</i>
CYP	: Sitokrom P-450
df	: Serbestlik derecesi
dNTP	: Deoksiribonükleotid
EDTA	: Etilen diamin tetraasetik asit
EtBr	: Etidyum bromür
FGFR3	: Fibroblast Büyüme Faktörü Reseptörü 3
GST	: Glutasyon S-transferaz
HW	: Hardy-Weinberg
L	: Litre
M	: Molar
MgCl₂	: Magnezyum Klorür
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
NaCl	: Sodyum klorür
NAT	: N-asetiltransferaz
nm	: Nanometre
NQO1	: NAD(P)H dehidrojenaz, kinon 1
OR	: Göreli orantı
PAH	: Polisiklik Aromatik Hidrokarbon
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PUNLMP	: Düşük malin potansiyelli papiler ürothel neoplazm

Rb	: Retinoblastoma
RFLP	: Restriksiyon Fragman Uzunluk Polimorfizmi
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
SULT	: Sulfotransferaz
TBE	: Tris-Borik asit-EDTA
TCC	: Tranzisyonel Hücre Karsinomu
TE	: Tris-EDTA
U	: Ünite
µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre
χ²	: Ki-kare

GENEL BİLGİLER

Adı ve Soyadı : Necip Ozan TİRYAKİOĞLU
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 – Ocak 2011

ÖZET

Mesleki sebeplerle maruz kalınan karsinojenler ve sigara içimi en önemli mesane kanseri risk faktörlerindedir. Karsinojenleri metabolize ederek aktivasyonlarını veya detoksifikasyonlarını sağlayan ksenobiyotik metabolizmasında rol alan enzimleri kodlayan genlerde görülen polimorfizmler, bu enzimlerin işlevlerini etkileyerek bireyler arası metabolik farklılıklara sebep olurlar. Polimorfizmlerden kaynaklanan bu farklılıklar çevresel ve demografik faktörlerle etkileşerek, mesane kanserine bireysel yatkınlık seviyelerini değiştirirler.

Ksenobiyotik metabolizmasında görev alan bir enzim olan AKR1C3, diğer bir çok ksenobiyotik metabolizması enzimi gibi polimorfik bir enzimdir ve bu polimorfizmlerin enzim aktivitesini veya gen ifadesini değiştirerek mesane kanserine yatkınlıkta bireysel farklılıklara sebep olduğu düşünülmektedir.

Bu çalışmada AKR1C3 geninde amino asit değişikliğine sebep olan bir polimorfizm olan rs12529 ile mesane kanseri arasındaki ilişki çevresel ve demografik etkenlerle beraber incelenmiştir. 101 hasta ve 101 kontrolden elde edilen genotip verileri kullanılarak rs12529 polimorfizminin etkisi, göreceli orantı olarak belirlenmiştir. Sigara içimi (OR=9,032) ve cinsiyetin (OR=4,88) mesane kanseri risk faktörü olarak etkileri her faktör için ayrıca belirlendikten sonra rs12529 risk aleli için elde edilen göreceli orantı değeri sigara içimi ve cinsiyet için düzenlenmiştir. Bu sonuçlara göre yabancı genotiple (CC) kıyaslandığında AKR1C3 rs12529 homozigot varyantının (GG) mesane kanseri üzerinde koruyucu etkisi (OR=0,255) olduğu belirlenmiştir. Göreceli orantı değeri sigara içimi ve cinsiyete göre düzenlendiğinde

polimorfizmin koruyucu etkisi daha da belirgin hale gelmektedir (OR=0,243).
Sonuçlar AKR1C3 rs12529 polimorfizminin mesane kanseri riski ile önemli derecede ilişkili olduğunu göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: AKR1C3, mesane kanseri, polimorfizm, rs12529

GENERAL INFORMATION

Name and Surname : Necip Ozan TIRYAKIOĞLU
Field : Molecular Biology and Genetics
Program : Molecular Biology and Genetics
Supervisor : Assist.Prof.Dr.Nagehan ERSOY TUNALI
Degree Awarded and Date : Master – January 2011

SUMMARY

Occupational exposure to carcinogens and cigarette smoking are among the most significant risk factors for bladder cancer. Polymorphisms in genes coding for the xenobiotic metabolizing enzymes affect enzyme activity and therefore cause inter-individual metabolic differences. The interactions of metabolic differences with demographic and environmental factors alter the levels of individual susceptibility to bladder cancer.

AKR1C3 is a xenobiotic metabolising enzyme and the gene coding for this enzyme is a very polymorphic one, which is very common among xenobiotic metabolism genes. These polymorphisms are considered to change the levels of individual susceptibility to bladder cancer by affecting enzyme activity or gene expression.

In this study the relationship between bladder cancer risk and rs12529, a non-synonymous polymorphism in AKR1C3 gene, is investigated in conjunction with environmental and demographic factors. Using genotype data from 101 cases and 101 controls the odds ratios for rs12529 are calculated. After determining the odds ratios for cigarette smoking (OR=9,032) and sex (OR=4,88), the odds ratio for rs12529 risk allele is adjusted for smoking and sex. According to these results rs12529 homozygote variant (GG) has a protective effect (OR=0,255) on bladder cancer when compared with the wild type homozygote (CC). The protective effect of homozygote variant becomes more apparent when the odds ratio is adjusted for cigarette smoking and sex (OR=0,243). These results indicate a strong relationship

between AKR1C3 rs12529 polymorphism and bladder cancer risk.

Keywords: AKR1C3, bladder cancer, polymorphism, rs12529

1. GİRİŞ

Dünyada her yıl yaklaşık 300.000-400.000 arası yeni mesane kanseri vakası görülmektedir. Mesane kanseri, dünya çapında erkeklerde 7. kadınlarda ise 17. en sık görülen kanserdir (Parkin, 2008). Türkiye'de ise erkeklerde en çok rastlanan kanserler arasında 3. her iki cinste toplam kanser oranında ise 5. en sık rastlanan kanserdir (Tablo1.1.) (Globocan, 2008).

Tablo 1.1. Türk Popülasyonunda Kanser Vakalarına İlişkin Veriler

	Erkek	Kadın	Toplam
Popülasyon	37.136.000	36.777.000	73.914.000
Yeni vakaların sayısı	55.800	39.300	95.100
Yaş standardize oran ¹	182/100000	113/100000	145/100000
75 yaşından önce kanser olma riski	%19.8	%11.7	%15.6
Kanserden ölüm sayısı	42.700	24.500	67.200
75 yaşından önce kanser sebebiyle ölüm riski	%15.7	%7.7	%11.5
Sırasıyla en sık görülen 5 kanser	Akciğer	Meme	Akciğer
	Mide	Kolorektum	Göğüs
	Mesane	Mide	Mide
	Prostat	Korpus Uteri	Kolorektum
	Kolorektum	Yumurtalık	Mesane

Globocan, 2008 veritabanından alınmıştır.

1: Yaş ortalamaları farklı popülasyonlarda, kanser insidansını daha rahat karşılaştırabilmek için insidansın medyan yaşa göre düzeltilmiş hali.

Mesane kanserinin en önemli risk faktörü sigara tüketimidir ve vakaların

yaklaşık 2/3'sinde kanserin sigara içimi ile ilişkili olduğu belirlenmiştir (Zeegers vd., 2000). Erkeklerde görülme oranı kadınlarda görülme oranından 3 kat fazladır (Jemal vd., 2008). Erkeklerde en yüksek insidansın 37.1/100000 ile Mısır'da daha sonra 33/100000 ile İspanya'da olduğu belirlenmiştir (Shariat vd., 2009). Mesane tümörleri sitoskopi ve görüntüleme tekniklerine dayanılarak iki ana gruba ayrılır; yüzeysel tümörler (Ta, T1) ve infiltratif tümörler (T2, T3). İlk tanıda hastaların %70'inden fazlasında yalnızca epitel dokuyla sınırlı kanser görülür (Huncharek vd, 2001). Bu kanserler genellikle endoskopik reseksiyon ile alınır. Nükslerin büyük çoğunluğu beş yıl içerisinde görülür. Alınan tümörlerin %50-70 kadarı nüks ederken bunlardan %10-15 kadarı kasa invazyon yapacak kadar ilerler. Hastaların %30'unda ise ilk tanıda kasa invaziv kanser görülür. Bu popülasyonun yaklaşık yarısında iki yıl içerisinde metastaz meydana gelir ve %60'ı 5 yıl içerisinde ölür (Stewart vd, 2003).

Genel olarak, tanı ve tedavide kaydedilen gelişmelere ve sigara içimi, mesleki kimyasallara maruz kalım gibi risk faktörlerine karşı oluşan bilince rağmen, mesane kanseri insidansı ya sürekli artmakta ya da sabit kalmaktadır (Stewart vd, 2003). Mesane kanseri için risk faktörleri genel olarak dört gruba toplanabilir; genetik yatkınlık, çevresel ve kimyasal etkenler, moleküler anomaliler ve kronik iritasyon. Tablo 1.2.'de bu risk faktörleri sınıflandırılmış ve örneklendirilmiştir. Karsinojenlerin aktivasyonu ve detoksifikasyonu arasındaki denge hücrede biriken DNA hasarının miktarını belirler, dolayısıyla da karsinojen detoksifikasyonu / aktivasyonu ile başlayıp DNA hasarının oluşumunu ve bu hasarın tamirini kapsayan süreçte rol oynayan genler ve kodladıkları proteinler mesane kanserine genetik yatkınlığın araştırıldığı çalışmalarda incelenen temel etmenlerdir (Stern vd., 2002).

Bu genlerin çoğu polimorfiktir ve bu sebeple bireylerin karsinojen metabolizmaları birbirlerinden farklılık gösterir. Bu farklılıkların mesane kanserine yatkınlık durumunu nasıl etkilediği, toplumda mesane kanseri risk gruplarının belirlenmesi açısından önemlidir. Mesane kanserine genetik yatkınlık bağlamında en çok incelenen genler N-asetil transferazlar (NAT'lar) ve glutatyon S- transferazlar (GST'ler) gibi metabolik genler ve kseroderma pigmentosum geni (XP) gibi DNA tamir genleridir.

Tablo 1.2. Mesane Kanseri için Risk Faktörleri

Risk Faktörü Grupları	Risk Faktörleri
Genetik Yatkınlık	Metabolik genlerde ve DNA tamir genlerinde polimorfizmler
Çevresel / Kimyasal Etkenler	Sigara içimi ve sıvı alımı miktarı, mesleki kimyasala maruz kalma oranı
Moleküler Değişimler	Tümör baskılayıcı genlerde ve protoonkogenlerde karsinojen kaynaklı <i>de novo</i> mutasyonlar
Kronik İritasyon	Katater kullanımı, parazit varlığı, mesane taşı

1.1. Mesane Kanserinin Patofizyolojisi

Mesane kanserinin en sık rastlanan tipi değişici hücreli epitel karsinomdur. Skuamöz hücre kanserleri ve adenokarsinomlar ise mesane tümörlerinin yalnızca %10'luk bir kısmını oluştururlar. Değişici hücreli karsinomlar mesane kanserlerinin %90 'nını oluştursa da mesane kanserinin diğer tipleri agresif özellikte oldukları ve genellikle başka tedavi türleri gerektirdikleri için önemlidirler. Skuamöz hücre kanserleri tek başlarına tüm mesane kanseri vakalarının yaklaşık %5'ine tekabül ederler ve genellikle T3 veya daha yüksek derecelerle daha agresif kanserlerdir (Lagwinski vd., 2007).

Urakus karsinomları mesane kanserlerinin yaklaşık %1'lik kısmını oluştururlar. Epitel veya mezenşimal kökenli olabilirler fakat çoğunlukla epitel doku kökenli adenokarsinomlardır (Herr vd., 2007).

Ürotelyal yolun küçük hücreli karsinomu nadir görülen bir mesane kanseri tipidir ve mesane kanseri vakalarının yaklaşık %0,6'lık kısmını oluştururlar. Oldukça hızlı büyürler ancak kemoterapiye hassastırlar (Siefker-Radtke vd., 2004; Abbas vd., 1995).

Mesane kanserinin diğer bir nadir tipi de sarkomatoid karsinomdur ve hem epitel hem mezenşimal kökenli olabilen difazik tümörlerdir (Wright vd., 2007).

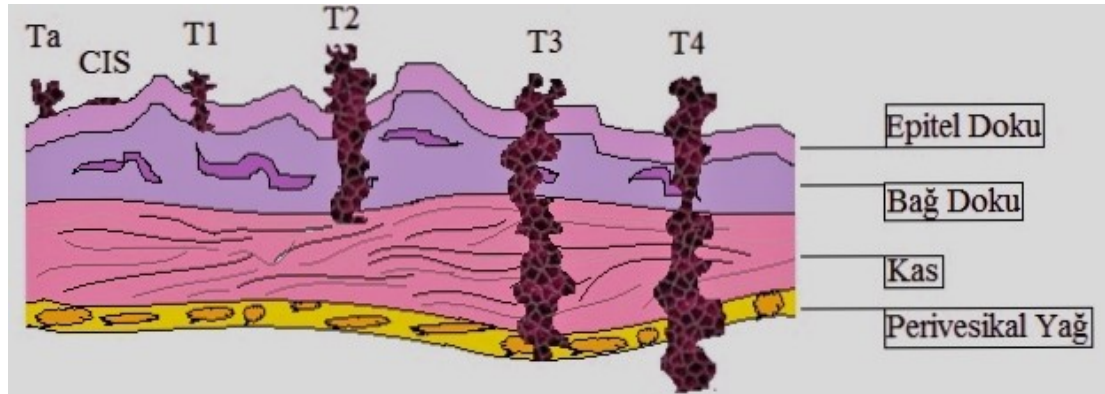
Mesane kanserlerinin bir kısmını tarif etmek için kullanılan "yüzeyel" terimi aslında daha az agresif ve nispeten iyi huylu tümörleri tarif etmek kullanılır. Yüzeyel terimi ile esas kastedilen kasa invaze olmama durumudur. Yüzeyel tümörler (Ta) muscularis propriaya invaze olmazlar, mukozayla sınırlı kalırlar. *In situ* karsinomlar ,

yassı yüksek dereceli invaziv olmayan mesane kanserleridir ve tekrarlama oranları oldukça yüksektir. Lamina propriaya invaze olan bütün lezyonlar ise T1 olarak evrelendirilir.

Tablo 1.3. Tümör evreleri

Ta	İnvaziv olmayan papiler karsinom
Tis/CIS	İn situ karsinom (CIS) : Yassı tümör
T1	Bağ dokuya invazyon
T2	Muscularis propriaya invazyon
T3	Perivesikal dokuya invazyon
T4	Yakın organlara invazyon

Organla sınırlı kalmış lezyonlar T2 olarak evrelendirirken, mesane duvarından perivesikal yağ tabakasına geçen lezyonlar T3 olarak evrelendirilir. T4 evresindeki tümörler perivesikal dokuyu geçerek prostatik stroma, uterus, vajina, seminal vesiküller ve pelvik duvar gibi yakın organ dokularına yayılmıştır (Tablo 1.3., Şekil 1.1.) (Jacobs vd., 2010).



Şekil 1.1. Tümörlerin evrelerine göre mesane dokusuna yayılımı

Mesane tümörleri derecelerine göre 1., 2. ve 3. derece olarak ayrılırlar. 1. derece tümörler kendi içlerinde düşük malin potansiyelli papiler ürotelyal neoplazm (PUNLMP) ve düşük dereceli papiler ürotelyal karsinomları kapsar. PUNLMP olarak derecelendirilen tümörler papilomaya göre ürotelyal tabaka sayısı artmış, fakat malin sitolojik özellikleri göstermeyen lezyonları tanımlamak için kullanılır. 2. derece

karsinomlar patolojik değerlendirme sonucuna göre düşük veya yüksek dereceli kabul edilebilirler. 3. derece karsinomlar ise yüksek dereceli lezyonlardır (Montironi vd., 2005).

1.2. Mesane Kanserinin Tanısı ve Tedavisi

Hematüri, idrarda kan varlığı, mesane kanserinde hastaların yaklaşık %85' inde görülen en yaygın bulgudur (Wakui vd., 2000). Bunun dışında sık idrara çıkma, dizüri, bacaklarda şişme ve pelvik ağrı da mesane kanserinin belirtileri arasındadır. Ayrıca tekrarlayan idrar yolu enfeksiyonları da mesane kanseri belirtilerindedir.

Sistoskopi, mesane kanseri tanısında en çok kullanılan metottur. Ama *in situ* karsinom gibi yassı lezyonların bu metodla belirlenmesi zor olabilmektedir. Sistoskopi sırasında yüksek metabolizmalı hücrelerin görüntülenmesini sağlayan floresan ajanların kullanılması yassı lezyonların tespitini kolaylaştırdığı tespit edilmiştir. İdrar analizi ve biyopsi de tanı koyma aşamasında kullanılan yöntemlerdir. Sistoskopinin yanı sıra manyetik rezonans ve bilgisayarlı tomografi gibi görüntüleme teknikleri tam bir klinik tanı koymak için kullanılmaktadır. Mesane kanseri tedavisinde tedavinin şeklini belirleyen en önemli etken tümör evresi olduğu için tanı aşamasında tümörün doğru evrelendirilmesi çok önemlidir (Jacobs vd., 2010).

Yüzeyel tümörlerin tedavisinde transüretral rezeksiyon gerçekleştirilir. Büyük, çok sayıda veya yüksek dereceli tümörü olduğu belirlenen hastalara transüretral rezeksiyon sonrası intravezikal tedavi uygulanır. Bu işlem katater yoluyla doğrudan mesaneye ilaç verilerek hem tümör nüksünün engellenmesi, hem de geride kalmış olabilecek tümör hücrelerinin yok edilmesi amacıyla gerçekleştirilir. İntrovezikal ilaçların en sık kullanılanları Bacille-Calmette-Guerin (BCG) ve mitomisin-C'dir (Tablo 1.4.) (Kaufman vd., 2006).

Tümörün invaziv özellik gösterdiği durumlarda sistektomi ile mesanenin kısmen veya tamamen alınması söz konusudur. Genellikle sistektomi sonrası nüksü engellemek ve hastalığı tamamen ortadan kaldırmak amacıyla radyasyon ve kemoterapi uygulanır. Kemoterapi uygulaması sırasında sıklıkla tek bir ilaç değil, çeşitli ilaçların bir karışımı kullanılır. Bunların en sık kullanılanları Metotrekstat, Vinblastin ve Sisplatin' den oluşan MVAC veya Gemsitabin ve Sisplatin'den oluşan

GC' dir (Montie vd., 2009).

Tablo 1.4. Mesane Kanserinin Tedavisinde Kullanılan İlaçlar ve Hastaların Yanıt Oranları

Sisplatin	%12-28
Metotrekstat	%29-45
Mitomisin-C	%13-20
Paklitaksel	%42-56
Gemsitabin	%23-28

Kaynak: Kaufman vd., 2006

1.3. Mesane Kanserinde Risk Faktörleri

Mesane kanseri risk faktörlerinin başında sigara ve alkol kullanımı, sıvı alım miktarı, beslenme ve mesleki risk faktörleri gelir. Mesleki risk faktörleri bireyin mesleği ile bağlantılı olarak maruz kaldığı karsinojenler ile ilişkilidir. Boya, deri, plastik ve tekstil işlenmesinde ve üretiminde kullanılan kimyasalların çoğu karsinojen olduğu için bu mesleklerle uğraşan bireyler mesleki olarak mesane kanseri risk grubuna dahildirler. Ayrıca cinsiyet ve yaş da mesane kanseri risk faktörlerindedir. Yapılan çalışmalarla erkeklerin, mesane kanserine yakalanma açısından, kadınlara göre daha fazla risk altında olduğu belirlenmiştir. Mesane kanseri riskinin yaş ile beraber arttığı bilinmektedir. 70 yaş üzeri sigara içen erkekler mesane kanseri açısından en riskli grubu oluşturmaktadırlar.

1.3.1. Sigara Tüketimi

Sigara içimi en önemli mesane kanseri risk faktörüdür. Bir meta-analiz sonucunda sigara içenlerin içmeyenlere nazaran 2,57 kat daha fazla risk altında oldukları belirlenmiştir (Zeegers vd, 2000). Sigaranın bırakılmasından sonra 4 yıl içinde %30, 25 yıl içinde %60 azaldığı ve günlük sigara miktarının ve toplam kullanım süresinin dozaj etkisi göstererek riski arttırdığı belirlenmiştir (Silerman vd, 2006). Filtresiz sigara içen kişilerin, filtreli sigara içen kişilere göre %30-70 daha fazla risk altında olduğu ve sigara dumanının inhalasyonun bu riski daha da arttırdığı bildirilmiştir (Lopez-Abente vd, 1991).

1.3.2. Alkol Tüketimi

Mesane kanseri ve alkol kullanımı arasındaki ilişki birçok çalışmada incelenmiş fakat tutarsız sonuçlar elde edilmiştir (Bruemmer vd., 1997; Mommsen vd., 1983). Yakın zamanda gerçekleştirilen bir meta-analizde alkol kullanımının bir risk faktörü olmadığı gösterilmiş ve alkol tüketiminin erkeklerde mesane kanseri açısından 1,3 kat risk oluşturduğu kadınlarda ise bir risk faktörü olmadığı belirlenmiştir. (Mao vd., 2010).

1.3.3. Kahve Tüketimi

Bu konuda yapılmış bir çok epidemiyolojik çalışma olsa da kahve tüketiminin mesane kanseri üzerine etkisi tam olarak belirlenememiştir. Bunun en önemli sebeplerinden biri bu çalışmalarda kahve tüketiminin yanı sıra sigara içimi ve cinsiyet gibi diğer risk faktörlerinin tam olarak dışlanamamış olmasıdır. Bir meta-analiz çalışmasında kahve tüketiminin mesane kanseri ile ilişkisi incelenmiş ve mesane kanseri riskini 1,18 kat arttırdığı tespit edilmiştir (Zeegers vd, 2001). Yalnızca sigara içmeyen denekler kullanılarak gerçekleştirilen bir çalışmada ise günde on bardak veya daha fazla kahve tüketiminin ise mesane kanseri riskini 1,8 kat yükselttiği bildirilmiştir (Sala vd., 2000).

1.3.4. Toplam Sıvı Tüketim Miktarı

Toplam sıvı alım miktarı ve mesane kanseri ilişkisinin incelendiği çalışmalarda da tutarsız sonuçlar edilmiş, bazı çalışmalarda yüksek sıvı alım miktarı risk faktörü olarak belirlenmişken (Kunze vd., 1992), bazı çalışmalarda da yüksek sıvı alım miktarı koruyucu etken olarak belirlenmiştir (Wilkens vd., 1996).

1.3.5. Beslenme

Beslenme tarzının mesane kanseri riskine etkisinin incelendiği çoğu çalışmada meyve ve sebze ağırlıklı beslenmenin koruyucu etki gösterdiği, düşük meyve, sebze içerikli beslenmenin bir risk faktörü olduğu ve riski 1,4 kat arttırdığı gösterilmiştir (Steinman vd., 2000). Ayrıca et ağırlıklı beslenmenin ve yüksek yağ içerikli diyetlerin de mesane kanserine etkisi araştırılmış ve et ağırlıklı beslenme ile

mesane kanseri arasında bir ilişki bulunamazken, yüksek yağ içerikli diyetlerin bir risk faktörü olduğu (görel risk=1,37 %95CI 1,16-1,62) belirlenmiştir.

1.3.6. Fiziksel Aktivite

Amerika'da 37459 kadının 13 yıl boyunca izlendiği bir çalışma sonunda fiziksel aktivitenin koruyucu bir faktör olduğu (görel risk: 0,66 %95CI 0,43-1,01) bildirilmiştir (Tripathi vd, 2002). Kadınlarda görülen durumun tersine 7588 erkek denek ile yapılan bir çalışmada yüksek fiziksel aktivite gösteren kişilerin 2,06 kat daha fazla mesane kanserine yakalanma riskine sahip oldukları belirlenmiştir (Wannamethee vd, 2001).

1.3.7. Mesleki Risk Faktörleri

Tekstil boyacıları, boya üreticileri ve kauçuk üreticileri gibi kimyasal endüstrisinde çalışan kişiler yüksek miktarda aromatik amine maruz kalmaktadırlar ve bu durum bu kişilerde mesane kanserine yakalanma riskini artırır (Golka vd., 2004). Alüminyum, kömür gazı ve katran üretiminde çalışan kişiler de bu malzemelerin üretiminde kullanılan polisiklik aromatik aminlere yüksek miktarda maruz kaldıkları için risk altındadırlar (Bofetta vd., 1997). Ayrıca şoförler gibi dizel motoru egzostuna maruz kalan kişilerin de yine yüksek risk altında oldukları belirlenmiştir (Bofetta vd., 2001).

1.3.8. Parazitler

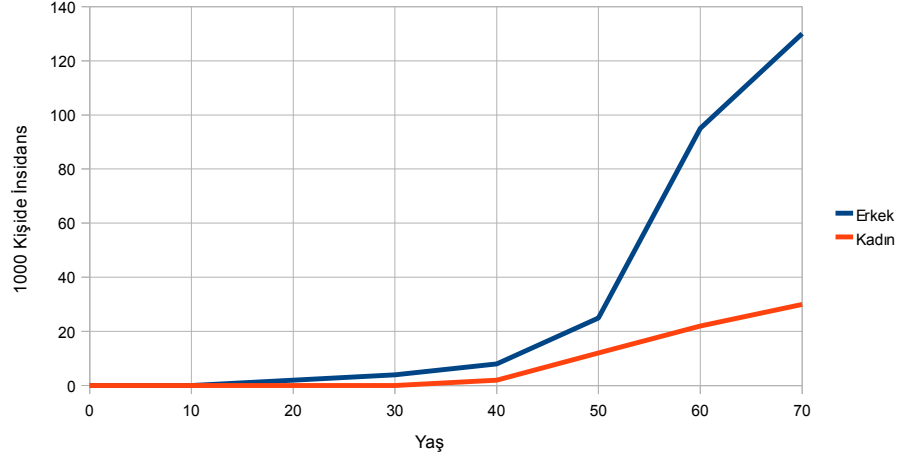
Trematod sınıfından bir yassıkurt olan *Schistosoma haematobium* paraziti mesane içerisinde muscularis propriaya bıraktığı yumurtaları sebebiyle kronik mesane enflamasyonuna sebep olur. Bu parazit ile enfekte olmuş kişilerin kronik iritasyon sebebiyle mesane kanserine daha yatkın oldukları bildirilmiştir (IARC Monogr Eval, 1994). Erkeklerde en yüksek mesane kanseri insidansının görüldüğü Mısır'da bu parazit bir endemik halindedir.

1.3.9. Cinsiyet

Erkekler kadınlara nazaran yaklaşık 3-4 kat daha fazla mesane kanserine yakalanma riskine sahiptirler (Şekil 1.2). Mesane kanseri riski açısından cinsiyetler arası görülen farkın karsinojenlere farklı maruz kalma oranına ve anatomik, hormonal ve sosyal farklara bağlı olduğu düşünülmüştür. 1998 ve 2008 yılları arasında Amerika'da erkeklerde yıllık mesane kanseri vakası kadınlara göre %50'den fazla ve %25 daha hızlı arttığı belirlenmiştir (Jemal vd., 2008). Erkeklerde mesane kanseri riski kadınlara göre 3-4 kat daha fazla olsa da, mesane kanseri sebebiyle ölme ihtimalleri yalnızca iki kat daha fazladır ve kadınlarda hastalık genellikle daha ilerlemiş aşamalarda tanımlanır. Mesane kanseri erkeklerde kanserler sebebiyle ölümler arasında %3'lük kadınlarda ise %1,5'lik bir orana sahiptir. Dolayısıyla aslında mesane kanseri kaynaklı ölüm insidansı erkeklerde kadınlara göre daha düşüktür (Jemal vd., 2008). Cinsiyetler arası fark tütün ve egzost dumanı gibi karsinojen kaynaklarına erkek ve kadınların daha farklı oranlarda maruz kalmasıyla açıklanmak istenildiyse de, bu etkenler kontrol altında tutulduğunda bile mesane kanseri riskinde cinsiyete bağlı farklılıkların sabit kaldığı belirlenmiştir (Hartge vd, 2000).

1.3.10. Yaş

Tütün tüketimi gibi artan yaş da mesane kanseri için en önemli risk faktörlerindedir (Şekil 1.2.). Mesane kanseri herhangi bir yaşta görülebilse de genellikle orta yaşlı ve yaşlı insanlarda görülen bir hastalıktır ve mesane kanseri tanısının medyan yaşı 70 yaşdır. 65 yaşından büyük kişilerde genel olarak kanser insidansı 11 kat ve 65 yaşından küçük kişilere oranla mesane kanseri kaynaklı ölüm oranları 15 kat fazladır (Messing vd., 2008). Yaş ile beraber mesane kanseri riskindeki artışı açıklamak için çeşitli fikirler öne sürülmüştür. Artan yaş ile beraber karsinojenlere maruz kalma oranının ve biriken DNA hasarı miktarının arttığı ve bununla beraber artan yaşın neoplastik süreçlere sebep olan hücresel olayların gelişimi ve birikimi gerekli zamanı sağladığı ve bu sebeple yaş ile beraber riskin de arttığı öne sürülmüştür.



Şekil 1.2. Surveillance Epidemiology and End Results (SEER) veribankası bilgilerine göre düzenlenmiş mesane kanseri insidansı ve yaş/cinsiyet ilişkisi

1.4. Mesane Kanserine Genetik Yatkınlık

Polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH) ve aromatik aminler gibi DNA'ya bağlanarak hasara sebep olan ürotelyal karsinojenlerin metabolizmasında rol oynayan enzimleri kodlayan genlerde görülen polimorfizmler mesane kanserine genetik yatkınlık açısından önem arz ederler. Karsinojen metabolizmasındaki aktivasyon-detoksifikasyon dengesi, detoksifiye edilen veya tam tersine aktive edilen karsinojenlerin, dolayısıyla da bu karsinojenlerin 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 (Franekova vd., 2008).

1.4.1. N-Asetiltransferazlar

N-asetiltransferazlar aromatik aminlerin aktivasyonunda ve detoksifikasyonunda rol oynayan enzimlerdir. Bu enzimleri kodlayan genlerden NAT2'de görülen polimorfizmler mesane kanseri ile özellikle ilişkili bulunmuştur.

NAT2 alelleri polimorfiklik durumlarına göre yavaş ve hızlı asetilleyici olarak iki gruba ayrılırlar. İki işlevsel NAT2 alelinin eksikliğinin yavaş asetilasyon fenotipine sebep olduğu belirlenmiştir. 31 araştırmanın verilerinin birleştirilmesi ile elde edilen bilgilere göre NAT2 yavaş asetilasyon genotipi mesane kanseri ile yüksek oranda ilişkilidir (görelî orantı: 1,4 %95CI 1,2-1,6) (Garcia-Closas vd, 2005). NAT ailesinden diğêr bir gen olan NAT1 ile ilişkilî çalışmalarda tutarsız sonuçlar elde edilmiştir (Cascorbi vd, 2001; Hung vd, 2004).

1.4.2. Glutatyon-S-transferazlar

Büyük bir enzim ailesi olan glutatyon-S-transferazlar, glutatyon konjugasyonu ile elektrofillerin detoksifikasyonunda görev alırlar. PAH epoksidler ve oksidatif stres yan ürünleri de dahil olmak üzere oldukça fazla substrat ile etkileşirler. Sık rastlanan bir polimorfizm olan GSTM1 delesyon enzim aktivitesinin kaybına sebep olur ve bir çok çalışmada mesane kanseri ile ilişkilendirilmiştir. Bu polimorfizm üzerine yapılan bir meta-analiz sonucunda GSTM1 delesyonlu bireylerde mesane kanseri için görelî orantı 1,5 (%95CI 1,3-1,6) olarak belirlenmiştir (Garcia-Closas vd, 2005). GSTT1 ve GSTP1 genlerinde görülen polimorfizmlerin incelendiği çalışmaların sonuçları ise tutarsızdır (Cascorbi vd, 2001; Brockmoller vd, 1996; Lee vd, 2002.). Ancak beyaz ırkın yaklaşık %20'sinin GSTT1 delesyonlu olduğu ve bu polimorfizmin mesane kanseri riskini arttırdığı tespit edilmiştir (Abdel-Rahman vd, 1998; Srivastava vd, 2004).

1.4.3. Sulfotransferazlar

Sulfotransferazlar bir çok ksenobiyotiğin ve ilacın sulfonasyonunu katalizleyen enzimlerdir. Bu gen ailesi çok polimorfik olmamasına rağmen SULT1 A1 geni oldukça polimorfiktir. Bu polimorfizmlerden Arg213His polimorfizminin meydana getirdiği His213 aleli daha az aktiftir ve mesane kanserinde koruyucu etki gösterdiği belirlenmiştir (Zheng vd, 2003).

1.4.4. Sitokrom P-450 Enzimleri (CYP)

CYP'ler faz I ilaç metabolizmasında rol oynayan en önemli enzimlerdir. İnsanlarda 20'den fazla CYP enziminin varlığı belirlenmiştir ve bu enzimler yüksek oranda polimorfizm gösterirler. CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, CYP2C19, CYP2D6 ve CYP2E1 genlerinde görülen polimorfizmlerin mesane kanseriyle olan ilişkisine dair sınırlı bilgi olsa da (Cascorbi vd, 2001; Brockmoller vd, 1996; Lee vd, 1994), CYP2D6, CYP2E1, CYP2C19 genlerinde görülen polimorfizmlerin mesane kanseri riskini arttırdığı belirlenmiştir (Choi vd, 2006; Anwar vd, 1996, Brockmoller vd, 1996).

1.4.5. Aldoketoredüktazlar (AKR)

Aldoketoredüktazlar, karbonil gruplarını alkol türevlerine dönüştüren enzimlerdir. Doğal substratları arasında şeker, lipid aldehitler, steroidler ve prostaglandinler vardır. İlaç öncüllerini ve PAH'lar gibi bazı karsinojenleri aktive ederler. Ayrıca sisplatin ve daunorubisin gibi kemoterapi ajanlarına karşı direnç oluşumunda rol oynarlar.

Aldoketoredüktazların esas görevleri aldehitlerin ketona redüklenerek birincil ve ikincil alkollerin oluşturulmasıdır (Flynn vd., 1982; Penning vd., 2004). Bu reaksiyon sülfonasyon gibi konjugasyon reaksiyonlarının gerçekleşmesine imkan sağladığı için AKR'ler faz I ilaç metabolizması enzimleri olarak tanımlanmışlardır. İnsan AKR'leri ilaçlar, karsinojenler ve reaktif aldehitler gibi bir çok farklı substratla etkileşirler ve bu kimyasalların metabolizasyonlarında kilit bir rol oynarak aktivasyonlarını ve detoksifikasyonlarını gerçekleştirirler.

Bugüne kadar keşfedilmiş 15 AKR ailesi vardır. İnsan AKR'leri AKR1, AKR6 ve AKR7 ailelerine dahildirler. Keşfedilen 13 insan AKR'sinin 8' i, (AKR1A1, AKR1B1, AKR1B10, AKR1C1, AKR1C2, AKR1C3, AKR1C4 ve AKR1D1) AKR1 ailesindedir.

AKR'lerin büyük çoğunluğu 34-37kDa' luk monomerik proteinlerdir. Bu enzimlerin aktif bölgesinde tirozin, aspartik asit, lizin ve histidinden oluşan bir katalitik dörtlü bulunur ve bu bölge AKR süper ailesine dahil genler arasında yüksek oranda korunmuştur. Substrat bağlanma bölgesi ise oldukça çeşitlilik gösterir. Kendi

içlerinde en fazla homoloji gösteren grup AKR1C enzimleridir. Bu enzimler kendi aralarında %86 homoloji gösterirler (Penning vd., 2007)

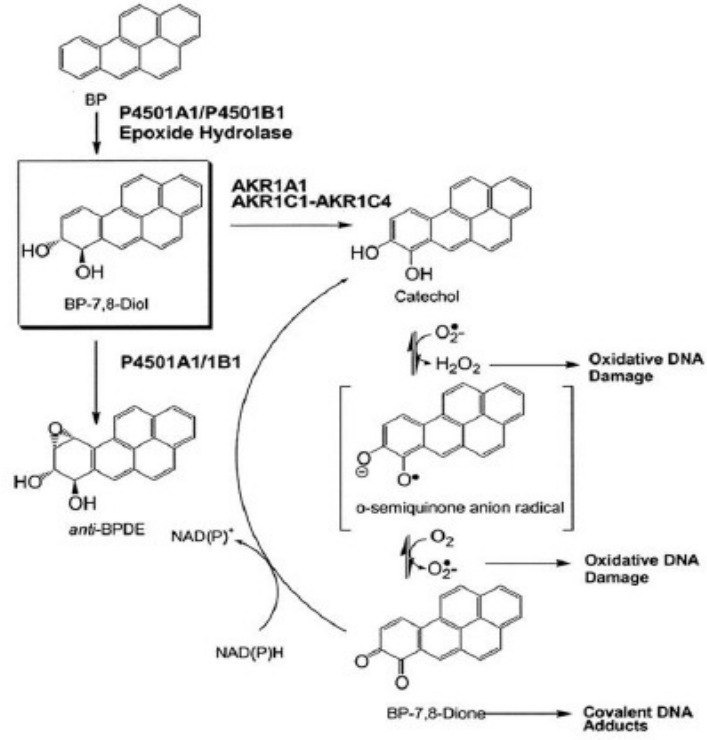
1.4.5.1. AKRler ve PAH Aktivasyonu

Polisiklik aromatik hidrokarbonların aktivasyonunu sağlayan üç farklı yolak vardır. Bunlar P-450 peroksidaz kaynaklı radikal katyonların oluşumu, P-450 kaynaklı diol-epoksitlerin oluşumu ve AKR kaynaklı reaktif o-kinonların oluşumudur.

AKR1A1, AKR1C1, AKR1C2, 1AKR1C3 ve AKR1C4 BP-7,8-diol' ün NADP⁺ bağımlı oksidasyonunu gerçekleştirerek ketol oluşumunu sağlarlar. Ketol tautomerizasyon sonucu bir katekol olan 7,8-dihidrobenzo(a)pirene dönüşür. Oluşan katekol oksidasyona hassastır ve otooksidasyona uğrayarak bir o-kinon olan BP-7,8 diona dönüşür. AKR'ler aracılığı ile oluşturulan PAH o-kinonlar reaktiflerdir ve DNA, RNA ve proteinlerle reaksiyona girerler (Penning vd., 2007). Katekolden otooksidasyon ile o-kinon oluşumu sırasında her aşamada reaktif oksijen türevleri oluşur. o-kinon NADPH varlığında tekrar katekole redüklenebilir. Katekolün o-kinona oksidasyonu sırasında yine reaktif oksijen türevleri açığa çıkar. Hücresel redüksiyon ajanları tükenene kadar devam eden bu redoks döngüsü hücrede reaktif oksijen türevlerinin amplifikasyonuna sebep olur (Şekil 1.3.). Bu süreçte oluşan elektrofilik sinyaller antioksidan cevap elementi (ARE) içeren genlerin ifadesinin tetiklenmesine bu durum da RAS' ın hedeflerinin aktivasyonuna sebep olur (Penning vd., 2007). RAS proteinleri ekstraselüler büyüme sinyallerini nükleusa iletirler ve transkripsiyonel aktivasyonlarını sağladıkları genler hücre proliferasyonunu tetikler. Dolayısıyla AKR'ler tarafından üretilen o-kinonlar karsinogenezin hem başlangıcında hem de ilerlemesinde etkilidirler.

PAH aktivasyonunda rol oynayan 5 insan AKR'sinden AKR1A1, BP-7,8-diol' ün oksidasyonuna en yüksek katalitik eğilimi gösteren AKR'dir.

o-kinon oluşumunda rol oynayan AKR izoformlarının çeşitli kanserlerin, özellikle de akciğer kanserinin oluşumunda önemli rolü olduğu düşünülmektedir.



Şekil 1.3. Aldoketoredüktaz yolağıyla PAH aktivasyonu (Kaynak: Penning vd., 2007)

1.4.5.2. Aldoketoredüktazların İşlevleri ve Doku Spesifik İfadeleri

AKR1C1, AKR1C2, AKR1C3 ve AKR1C4 genlerinin çok benzer yapıları vardır. 9 ekson içerirler ve 10. kromozoma lokalize olmuşlardır. AKR1C genlerinin ifadesi, promotorlarında bulunan antioksidan cevap elementleri aracılığıyla regüle edilir. Küçük hücreli dışı akciğer kanseri hastaları ile gerçekleştirilen bir çalışmada AKR1C1 ve AKR1C2 ifadeleri tümör dokusunda ve normal dokuda karşılaştırmalı olarak ölçülmüş ve tümör dokusunda ifadesinin 50 kat daha fazla olduğu belirlenmiştir (Hsu vd., 2001). Bu çalışmanın teyidi amacıyla AKR1C1, AKR1C2 ve AKR1C3 izoformlarının ifadeleri akciğer adenokarsinom hücrelerinde ölçülmüş ve benzer sonuçlar elde edilmiştir (Palackal vd., 2002). Ayrıca artmış AKR1C3 ifadesinin prostat kanserinde hücresel hayatta kalma oranlarını arttırdığı ve anjiyogenezi tetiklediği belirlenmiştir (Dozmorov vd., 2010).

AKR1A1, D-gliserlaldehitin gliserole redüksiyonunda ve trigliserid ve

koloestrol oluşumunda rol oynar. Sırasıyla en çok böbreklerde ve karaciğer eksprese olduğu belirlenmiştir .

AKR1B1, poliol yolağının ilk aşamasını sentezler. Karaciğer başta olmak üzere iskelet kaslarında, böbreklerde, testislerde ve prostatta yüksek miktarda eksprese olur.

AKR1B10 esasen barsakta eksprese olur. Normal akciğer dokusunda ekspres olmazken küçük hücreli dışı akciğer kanserinde yüksek miktarda eksprese olduğu belirlenmiştir .

AKR1D1 ve AKR7A2'nin ise özellikle karaciğerde yüksek miktarda eksprese olduğu bildirilmiştir (Penning vd., 2007).

1.4.5.3. AKR Polimorfizmleri

AKR1C1 ve AKR1C2 arasındaki yapısal fark yalnızca yedi aminosit olsa da, işlevleri farklıdır. Farklı amino asitler T38V, R47H, L54V, C87S, V151M, R170H ve Q172I'dir. Bu amino asitlerin çoğu oldukça polimorfiktir. AKR1C1' de T38A, T38I ve R47H polimorfizmleri görülürken, AKR1C2' de H47R, S87C, L172Q ve V38A polimorfizmleri görülür. Önceleri bu polimorfizmlerin, enzimlerin AKR1C1 ve AKR1C2 enzimlerinin kinetik özelliklerinin arasında kalan bir enzim aktivitesi göstermesine sebep olacağı düşünülmüş olsa da, bu fikrin doğru olmadığı belirlenmiştir. Bunun en önemli sebebi bu yedi amino asitten yalnızca bir tanesinin substrat bağlama bölgesinde bulunuyor olmasıdır.

Bugüne kadar AKR1C3 geninin eksonlarında onyediyedi polimorfizm belirlenmiştir. Bu polimorfizmlerin dokuzu amino asit değişikliğine sebep olurken diğer sekiz polimorfizm işlevsel olarak eş anlamlıdır (Tablo 1.5.).

AKR1C4*5 (L311V) polimorfizmi C-terminal ilimikte bulunur ve substrata bağlanma özgünlüğünü etkilediği belirlenmiştir (Kume vd., 1999). AKR1C3 polimorfizmlerinden AKR1C3*4'ün proteinde erken sonlanmaya sebep olduğu belirlenmiştir. A230G polimorfizmi ise dolaşımda düşük testosteron seviyeleri ile ilişkilendirilmiştir (Jakobsson vd., 2007).

Tablo 1.5. AKR1C3 geni eksonik polimorfizmleri

Ekson	Polimorfizm	İşlev	Nükleotid değişikliği	Amino Asit değişikliği	Alel
3	rs7741	Eş anlamlı	G90A	P30	AKR1C3*1A
4	rs12387	Eş anlamlı	G312A	K104	AKR1C3*1B
6	rs1131124	Eş anlamlı	G495A	V165	AKR1C3*1C
3	rs1804061	Eş anlamlı	A117G	K39	AKR1C3*1D
6	rs1937839	Eş anlamlı	G459A	K153	AKR1C3*1E
8	rs7342072	Eş anlamlı	C705T	L235	AKR1C3*1F
6	rs17849485	Eş anlamlı	C546T	L182	AKR1C3*1G
3	rs28943574	Eş anlamlı	A231G	E77	AKR1C3*1H
1	rs12529	Yanlış anlamlı	C15G	Q5H	AKR1C3*2
6	rs1131132	Yanlış anlamlı	C525G	M175I	AKR1C3*3
3	rs1804062	Yanlış anlamlı	G106T	E36term	AKR1C3*4
9	rs1804059	Yanlış anlamlı	G879T	M293I	AKR1C3*5
4	rs4987102	Yanlış anlamlı	G316A	A106T	AKR1C3*6
3	rs11551177	Yanlış anlamlı	A230G	E77G	AKR1C3*7
9	rs11551178	Yanlış anlamlı	G883T	A295S	AKR1C3*8
5	rs28943579	Yanlış anlamlı	G434A	C145Y	AKR1C3*9
5	rs28943580	Yanlış anlamlı	C772T	R258C	AKR1C3*10

(Kaynak: <http://www.med.upenn.edu/akr/polymorphisms.shtml>)

AKR polimorfizmleri ile çeşitli kanser tipleri arasındaki ilişkiyi araştırmak amacıyla gerçekleştirilen çalışmaların sayısı oldukça azdır.

AKR polimorfizmlerinin Hogdkin dışı lenfoma ile ilişkisi incelenmiş ve AKR1A1 rs2088102 polimorfizminin Hogdkin dışı lenfoma riskini arttırdığı belirlenirken, AKR1C1 rs8483 ve AKR1C3 rs12529 polimorfizmleri ile Hogdkin dışı lenfoma arasında bir ilişki bulunmamıştır (Lan vd., 2004). Prostat kanseri ile AKR1C3 polimorfizmlerinin incelendiği bir diğer araştırmada ise rs12529 polimorfizmi ile prostat kanseri arasında bir bağlantı bulunmamış, rs7741 polimorfizminin ise artmış prostat kanseri riski ile ilişkili olduğu belirlenmiştir (Cunningham vd., 2007). AKR1C3*2 (rs12529/Q5H) aleli ise akciğer kanserinde risk faktörü olarak belirlenmişken (OR:1,84 %95CI 0,98-3,45), mesane kanserinde koruyucu faktör olarak bulunmuştur (Lan vd., 2007, Figuerova vd., 2008).

Figuerova vd. tarafından gerçekleştirilen araştırmada AKR1C3 geni üzerinde mesane kanserine yatkınlığı etkilemesi muhtemel olan iki bölgede toplam sekiz

polimorfizm tespit edilmiş ve mesane kanseri risk faktörü olarak etkileri belirlenmiştir (Tablo1.6.).

Tablo 1.6. Mesane Kanseri ile İlişkili AKR1C3 Polimorfizmleri

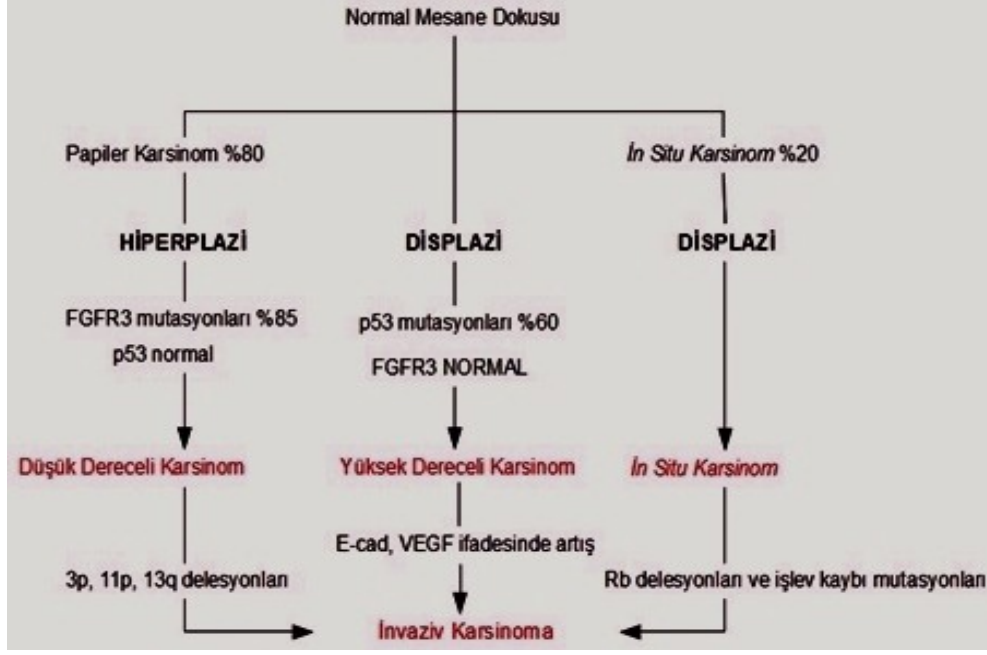
Polimorfizm	Genotip	Görelî Orantı
rs12529	GG	OR 0,78 %95CI (0,52-1,18)
rs1937845	GG	OR 0,74 %95CI (0,57-0,96)
rs3763676	AG	OR 1,28 %95CI (1,05-1,55)
rs4881400	GG	OR 0,53 %95CI (0,33-0,85)
rs461368	TT	OR 0,42 %95CI (0,20-0,91)
rs127755701	GG	OR 1,41 %95CI (1,05-1,90)

(Kaynak: Figuerova vd., 2008)

1.5. Mesane Kanserinin Moleküler Biyolojisi

Mesane kanseri karsinogenezinde, biri yüzeysel papiler karsinom diğeri ise daha saldırgan *in situ* karsinomaya veya invaziv karsinom oluşumuna sebep olan iki farklı yolak vardır. Ürotelyal neoplazmların %70'i yerel olarak tekrarlama eğilimi gösteren ve nadiren invazyon veya metastaz yapan yüzeysel papiler karsinomlardır. Geri kalan %30 ise daha agresif, invazyon ve metastaza eğilimli papiler olmayan karsinomlardır (American Cancer Society, 2008; Kim vd, 2008; Mitra vd, 2006). İnzaziv veya metastatik hastalığı olan kişilerde agresif terapötik müdahaleye rağmen tedavi oranı %20-%50 arasındadır (Sanchez-Carbayo vd, 2007). Papiler ve daha agresif papiler olmayan yassı ürotelyal karsinomların birbirlerinden farklı özgün moleküler profilleri vardır ve iki farklı moleküler yolak aracılığı ile gelişirler (Şekil 1.4.).

Düşük dereceli ve invaziv olmayan papiler mesane kanserinde genellikle FGFR3 geni ve FGFR3 yolağında görev alan PI3KCA ve Ras proteinlerini kodlayan genler mutasyona uğramış veya ifadeleri değişmişken, papiler olmayan yassı ürotelyal kanserlerde p53, Rb gibi doğrudan hücre döngüsünün kontrolünde rol oynayan tümör baskılayıcı veya onkojenik etkisi olan genler mutasyona uğramış veya ifade edilmişleri değişime uğramışlardır.



Şekil 1.4. Mesane Karsinogenezinde Etkin Genler ve Kromozomal Değişimler (Chen vd., 2010' dan uyarlanmıştır.)

Bu yolların birbirlerini dışlayıp dışlamadıkları ise bilinmemektedir (Mitra vd, 2006; Mitra vd, 2007).

1.5.1. Yüzeysel Papiler Karsinoma ve FGFR3 yolağı

Kromozom 9p ve 9q delesyonları ve FGFR3 mutasyonları yüzeysel papiler karsinomlarda ilk ve en sık meydana gelen olaylardır (Wollf 2007). Düşük dereceli invaziv olmayan papiler neoplazmların %70'den fazlasında FGFR3 geninde çeşitli mutasyonların varlığı tespit edilmiştir. 16,5 kilobazlık FGFR3 geninin kromozomal lokasyonu 4p16.3' tür ve toplam 19 ekson içerir. Fibroblast büyüme faktörü ailesinden 806 amino asit uzunluğunda bir protein kodlar. FGFR3 proteini bir ekstraselüler bölgeden, bir transmembran bölgeden ve sitoplazmik bir tirozin kinaz bölgesinden oluşur. Proteinin ekstraselüler kısmı fibroblast büyüme faktörleri ile etkileşir ve sitoplazmik kısım büyüme faktörü sinyallerini tirozin kinaz aktivitesiyle ileterek hücre büyümesi, farklılaşma ve anjiyogenez gibi hücreyel olayları düzenler (Monsonogo-Ornan vd, 2000). Papiler ürotelyal neoplazmlarda karşılaşılan FGFR3 mutasyonlarının %50-80'inin transmembran bölgenin içerdiği immunoglobulin benzeri IgII ve IgIII bölgelerini kodlayan ekson 7'de olduğu belirlenmiştir. Bu bölgede

meydana gelen mutasyonlar genellikle devamlı otofosforilasyon sonucu aşırı FGFR3 aktivitesi ile sonuçlanırlar. Bu mutasyonlardan en sık görüleni IgII ve IgIII bölgeleri arasında bulunan bir amino asitin sisteine dönüşümüne yol açar. Bu dönüşüm sonucu proteinin intraselüler bölgesinde sürekli otofosforilasyon ve lizozomal yıkım yolağına azalmış translokasyon oluşur. Bu durum ise reseptörün aşırı ve uzun süreli aktivite göstermesine yol açar (Monsonago-Ornan, 2000). Aktive olmuş FGFR3, fosfatidilinositol 3 kinaz (PI3K) yolağını tetikler. PI3 kinazlar bir regülatör (p85) ve bir katalitik alt birimden (p110) oluşurlar. Hücre dışı büyüme sinyallerini algılayan FGFR3 gibi tirozin kinaz reseptörleri tarafından aktive edildiklerinde p110 altbirimleri PIP2' yi (fosfatidilinositol -4,5 bifosfat) PIP3' e (fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfat) dönüştürür. PIP3, AKT'nin fosforilenmesini sağlar. Fosforillenme sonucu aktive olan AKT ise mTOR kompleksini aktive ederek hücre büyümesi ve proliferasyonunu tetikleyen genlerin ifadesini başlatır (Sarbasov vd, 2005; Bozulic vd, 2008). Düşük dereceli mesane kanserlerinde hücre döngüsü kontrolünde rol oynayan PI3 kinazlardan en sık mutasyona uğrayanın PIK3CA olduğu ve 542., 545., ve 1047. kodon mutasyonlarının yüzeyel mesane tümörlerinin yaklaşık %20'sinde görüldüğü belirlenmiştir (Zhao vd, 2008). Tirozin kinaz yolağında FGFR3' dan sonra yer alan proteinlerinden bir diğeri de Ras proteinleridir. Ras proteinleri GTP bağlanması ile aktive olurken, GTP' nin GDP' ye hidrolizi sonucu inaktive olan proteinlerdir ve esas işlevleri hücre büyümesini ve farklılaşmayı tetikleyen sinyallerin iletimidir. Ras ailesine dahil olan dört adet protoonkogen vardır. HRAS, KRAS, RRAS ve NRAS (McCormick vd, 1995). HRAS geninde 12., 13. ve 61. kodon mutasyonlarına papiller mesane kanserlerinin yaklaşık %30-40'ında rastlanmıştır (Buyru vd., 2003; Zhu vd., 2004). Bu mutasyonlardan mesane kanserinde oldukça sık rastlanan ve 12. kodonda bulunan glisinin valine dönüşümü ile sonuçlanan mutasyon HRAS proteininin sürekli aktif olmasına ve sonuçta büyüme faktörü sinyallerinin sürekli iletilmesi sebebiyle kontrolsüz hücre bölünmesine ve tümör oluşumuna sebep olur. Bunun dışında NRAS geninde G12R, Q61L ve Q61R, KRAS2 geninde ise G12A ve G12V mutasyonlarının papiller mesane tümörlerinde görüldüğü belirlenmiştir. Ayrıca Ras ve FGFR3 mutasyonlarının beraber görülmedikleri, dolayısıyla da büyük ihtimalle birbirlerini dışladıkları bildirilmiştir (Jebar vd., 2005).

1.5.2. Papiller Olmayan Yassı Ürotelyal Karsinoma Oluşumunda Etkili Genler ve Yolaklar

Papiller olmayan yassı ürotelyal karsinomlar p53-Mdm2-p14 ve retinoblastoma-p16 genlerinde ve bu genlerin dahil olduğu yolaklarda değişimler gösterirler (Mitra vd, 2006; Mitra vd, 2007; Sugano vd, 2006; Sarkis vd, 1993). Hem p53, hem de Rb hücrel homeostazını hücre döngüsünü ve proliferasyonu kontrol ederler (Ehdaie vd, 2008; Mitra vd, 2006; Chatterjee vd, 2004). Retinoblastoma yolağı hücre döngüsünü Ras-MAPK sinyal yolağı ile aldıkları hücre dışı büyüme sinyalleri ile düzenler. Ras-MAPK yolağı hücre dışı büyüme sinyallerini nükleusa iletir. Nükleusta siklin/siklin bağımlı kinaz kompleksleri retinoblastoma proteininde fosforilasyona sebep olurlar. Hücrel stres durumunda retinoblastoma proteinin esas görevi hücre döngüsünün devamlılığının düzenlenmesiyken, p53 proteininin esas görevi apoptozu tetiklemek veya hücre döngüsünü G1 fazında durdurmaktır.

p53 yolağında meydana gelen değişimlerin hastaların hayatta kalma süresinin önemli bir göstergesi olduğu bildirilmiştir (Lu vd, 2002). p53 mutasyonlarının da *in situ* karsinomun lamina propia ve mesane duvarına sıçramasında önemli bir etken olduğu belirlenmiştir (Mitra vd, 2006; Spruck vd, 1994). Ayrıca normal p53 yolaklarına sahip olan hastaların önemli derecede düşük ölüm oranları gösterdikleri de bildirilmiştir. p53 yolakları değişime uğramış hastalarda ise kanser çok daha agresif bir seyir izler, hastaların ölüm oranları daha yüksektir ve ortalama hayatta kalma süreleri de daha azdır (Chatterjee vd, 2004). Papiller olmayan yassı ürotelyal karsinomlarda genellikle hem p53 hem de Rb proteinin değişime uğradığı belirlenmiştir (Cordon-Cardo vd, 2004).

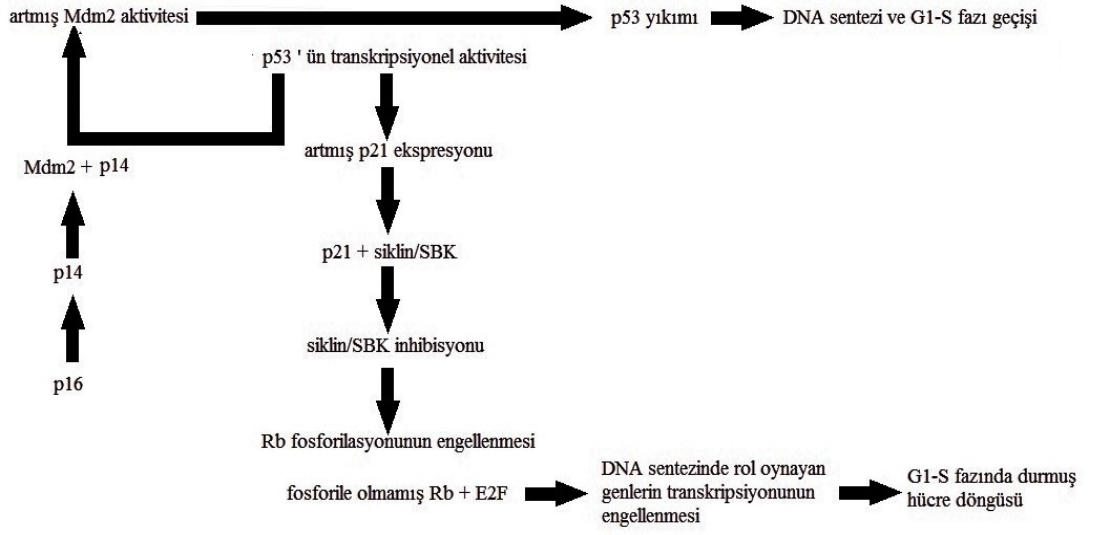
p53 geninde meydana gelen mutasyonlar genellikle yanlış anlamlı mutasyonlardır ve ubiquitin yolağı tarafından degrade edilmeye dirençli, yarı ömürleri daha uzun proteinlerin oluşumuna sebep olurlar. p53 hücre döngüsünü G1-S fazında durdurur ve bu işlevini p21 proteini aracılığı ile gerçekleştirir. Hücrel strese veya DNA hasarına yanıt olarak p53, bir siklin bağımlı kinaz inhibitörü olan p21'in ifadesini transkripsiyonel aktivasyon ile artırır. p21, siklin/siklin bağımlı kinaz komplekslerini inhibe ederek retinoblastoma proteininin fosforilasyonunu engeller. Fosforillenmemiş Rb transkripsiyon faktörü E2F'ye bağlanarak E2F'nin nükleusa geçmesini ve DNA sentezi için gerekli genlerin transkripsiyonunu başlatmasını

engeller. Sonuçta DNA sentezi engellenmiş ve hücre döngüsü G1-S fazında durdurulmuş olur (Mitra vd, 2006; Chatterjee vd, 2004; Weinberg vd, 1995) (Şekil 1.5.).

p53 mutasyonları hücre döngüsü kontrolünün kaybına ve apoptoz sinyallerine yanıt verilmemesine sebep olur. Dolayısıyla p53 geninde görülen mutasyonlar papiller olmayan yassı ürotelyal karsinomlar da dahil olmak üzere bir çok kanser türünde önem arz ederler. p53 mutasyonları daha agresif tümörler, artmış tekrar riski ve azalmış hayatta kalma oranıyla ilişkilendirmiştir (Mitra vd, 2006). p53 yolağında yer alan ve bu yolağın kontrolünde rol oynayan önemli proteinlerden biri de Mdm2 proteindir. Mdm2, p53 proteininin negatif regülatörüdür. Mdm2' nin ifade edilmesi p53 tarafından tetiklenir ve Mdm2 p53' e bağlanarak p53'ü baskılar. Dolayısıyla Mdm2 ifadesinin artması veya bu proteinde aktivite artmasına sebep olan mutasyonlar, hücre döngüsünü proliferasyon yönünde tetikleyici etki gösterirler. Yassı ürotelyal karsinomlarda Mdm2 amplifikasyonu görülmüş ve amplifikasyon seviyesinin artmış tümör derece ve evresiyle ilişkili olduğu bildirilmiştir (Stein vd, 1998; Lianes vd, 1998).

Nükleer fosfoprotein Rb 13q14' te lokalize olan retinoblastoma geni tarafından kodlanır ve yassı papiller olmayan ürotelyal kanserde önemli bir tümör baskılayıcıdır. Rb geninde görülen delesyonlar ve işlev kaybına sebep olan mutasyonlar daha agresif tümörlerle ilişkilendirmiştir. Rb inaktivasyonun en sık karşılaşılan sebebi 13q delesyonudur. Rb daha önce belirtildiği gibi tümör baskılayıcı işlevini fosforile olmamış formunda transkripsiyon faktörü E2F' ye bağlanıp, nükleusa geçmesini engelleyerek gösterdiği için Rb proteininin işlev kaybının yanı sıra aşırı eksprese edilmesi ve hiperfosforile olması da tümör oluşumunu tetikler.

Siklin bağımlı kinazlar tarafından aktive edilen ve G1-S hücre döngüsü geçişini tetikleyen siklin D1'in aşırı ifade edilmesi ve p16'nın azalmış ifadesi, Rb ifadesinin artmasına ve Rb'nin hiperfosforilasyonuna sebep olur. Hiperfosforile Rb, E2F'den ayrılır ve E2F nükleusa geçerek proliferasyonu tetikleyen proteinlerin transkripsiyonunu başlatır.



Şekil 1.5. p53 yolağı. (SBK: Siklin Bağımlı Kinaz, Rb: retinoblastoma)

Rb'nin hiperfosforilasyonu tümör baskılayıcı yolların inaktivasyonuna sebep olduğu için Rb'yi fosforilleyen siklin bağımlı kinaz inhibitörlerini inhibe eden çeşitli yarısentetik ilaçlar geliştirilme aşamasındadır (Mitra vd, 2007).

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. Çevresel faktörlere bağlı olarak maruz kalınan PAH'lar ve nitrozamin türevleri gibi kimyasallar insan vücudunda metabolize edilirlir, detoksifiye edilerek vücuttan atılır veya aktive edilerek DNA'ya hasar veren karsinojenlere dönüştürülürler. Karsinojen metabolizmasında işlevlerine göre Faz I enzimleri ve Faz II enzimleri olarak gruplandırılmış enzimler görev alır. Faz I enzimleri genellikle karsinojenik potansiyeli olan kimyasalları aktive ederek aktif karsinojenlere dönüştürürken, Faz II enzimleri genellikle detoksifikasyonlarını gerçekleştirir. Faz I ve Faz II enzimlerinin çoğu oldukça polimorfiktir. Bu polimorfizmler enzim aktivitesini değiştirerek karsinojen metabolizmasını ve hücrede biriken karsinojen miktarını etkilerler. Dolayısıyla Faz I ve Faz II enzimlerinde görülen polimorfizmlere bağlı olarak kansere yatkınlık bireysel farklılık gösterir.

Bu tez kapsamında, bir Faz I enzimi olan ve mesane kanseri ile ilişkisi dünyada daha önce yalnızca bir kez çalışılmış olan AKR1C3 enziminde rs12529 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 beraber incelenmiştir.

Sonuçta rs12529 polimorfizminin çevresel faktörlere bağlı olarak mesane kanseri riskini nasıl etkilediğinin belirlenmesi hedeflenmektedir.

3.MATERYAL

3.1. Araştırmada Kullanılan Örnekler

Bu araştırmada hasta grubu örnekleri 2008-2011 yılları arasında Őiřli Etfal Eğitim ve Araştırma hastanesi ve Bağcılar Eğitim ve Araştırma hastanesinden mesane kanseri hastalarından alınan kan örnekleri ile oluşturulmuştur. Her hastadan toplam 10ml kan örneği alınmış ve EDTA'lı tüplerde kullanılmaya kadar -20⁰ C'de saklanmıştır. Hastalara uygulanan anket ile hastaların cinsiyet, yaş, doğum yeri, meslek, alkol ve sigara içimi, içim miktarı ve süresi ile ilgili bilgiler de edinilmiştir. Kontrol grubunu oluşturan örnekler ise kendisinde veya ailesinde kanser hikayesi bulunmama şartı dışında rastgele seçilen gönüllü deneklerden alınan yanak içi epitel doku örneklerinden elde edilmiştir. Ayrıca gönüllü deneklere uygulanan anket ile hasta grubu için geçerli olan bilgiler edinilen edinilmiştir. Bu araştırmaya, çalışma hakkında bilgilendirilmiş ve onayı alınmış 101'i hasta ve 101'i kontrol olmak üzere toplam 202 kişi dahil edilmiştir.

3.2. Hızlı Genomik DNA İzolasyonu Metodu İçin Kullanılan Kimyasallar ve Tamponlar

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

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

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

Saf Kloroform
Saf İzopropanol
5 M NaCl

3.3. Yanak içi Epitelden DNA izolasyonu İçin Kullanılan Kimyasallar ve Tamponlar

Lizis Tamponu : 50 mM Tris (pH:8,0)
50 mM EDTA
50 mM Sükroz
100 mM NaCl
%1 (w/v) SDS

Low-TE tamponu (pH:8,0) : 10 mM Tris (pH:8,0)
0,1 mM EDTA (pH:8,0)

3 M Sodyum asetat (NaOAc) 0,2 µm membran filtre ile filtrelenmelidir.

Proteinaz K : Steril suda 10 mg/ml

Saf İzopropanol

%70 Etanol : Distile su içinde %70 EtOH

Saf Fenol

Saf Kloroform

Kloroform-İzoamil Alkol (24:1) : Saf Kloroform ve %100 'lük İzoamil alkol sırasıyla 24' e 1 oranında karıştırılır.

3.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu İçin Gerekli Enzim ve Kimyasallar

10X MgCl₂'süz Tampon : 200 mM (NH₄)₂SO₄
750 mM Tris-HCl, (pH 8.8)
% 0.1 Tween 20,
(Fermentas, LİTVANYA)

MgCl₂ : dH₂O'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)

3.4.1. Oligonükleotid Primerler

Tablo 3.1. Oligonükleotid Primerler

Lokus	Polimorfizm	Primerler
AKR1C3	rs12529	5'-CCTCCTACATGCCATTGGTT-3'
		5'-CAACCCAATACGGGTTTCAC-3'

3.5. Restriksiyon Enzimleri ve Reaksiyon Tamponları

Bts-I : 10000 U /ml
(New England BioLabs, ABD)

Reaksiyon Tamponu	: NEB Buffer 4 (pH:7,9) 20 mM Tris-asetat 10mM Magnezyum-asetat 50mM Potasyum-asetat 1mM Ditiyotritol
BSA 100X	: Bovin Serum Albumin 10mg/ml
Tanım Dizisi	: 5'...GCAGTGNN^...3' 3'...CGTCAC^NN ...5'

3.6. Elektroforez İçin Kullanılan Tamponlar ve Kimyasallar

10X TBE (Tris-Borik asit-EDTA)	: 890 mM Tris-Baz, 890 mM Borik Asit, 20 mM Na ₂ EDTA.2H ₂ O, (pH 8.3)
10X Bromofenol Mavisi (BPB)	: 2,5 mg/ml BPB
Etidyum Bromür (EtBr)	: 10 mg/ml
Agaroz Jel	: 0,5 X TBE Tamponunda %1, %2 ve %3'lük (w/v) agaroz
Nu micropore agaroz jel	: 0,5 X TBE tamponunda %3 'lük (w/v) Nu micropore agaroz

3.7. PZR ürünlerinin saflaştırılması

Dizileme işlemi için PZR ürünlerinin saflaştırılması gerekmektedir. Bu işlem için "High Pure PCR Product Purification Kit" (Roche, ALMANYA) kullanılmıştır.

3.8. DNA Büyüklük Markörleri

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

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

3.9. Cihazlar

Otoklav	: Dik Tip Otoklav (BES, TÜRKİYE)
Tartı:	: Hassas Terazı, XB220 A (Presica, İSVİÇRE)
Santrifüjler	: MiniSpin Plus (Eppendorf, ALMANYA)
Derin Dondurucular	: -20°C, 2021 D (Arçelik, TÜRKİYE) -20°C, GSD26410NE (Bosch, ALMANYA)
Görüntüleme Sistemleri	:Bio-RAD UniversalHoodII (BIO-RAD İTALYA)
Yatay Elektroforez Sistemleri	: MultiSub Midi (Clever Scientific-İNGİLTERE) miniRapide Cleaver Scientific-(İNGİLTERE)
Isı Bloğu	: DB 2D (Techne, İNGİLTERE)
Güç Kaynakları	: EPS 301 (Amersham Pharmacia Biotech, İSVEÇ) PowerPac Basic (BIO-RAD, İTALYA)
Manyetik Karıştırıcılar	: MR 3001 (Heidolph, ALMANYA)

Buzdolapları	: Beko 8742 , Arçelik 3061 Plus (TÜRKİYE)
Spektrofotometreler	: Shimadzu UV 1601 (JAPONYA)
Thermo-Cycler	: Techne TC-512 (İNGİLTERE)
Vorteks	: Heidolph REAX (ALMANYA)
Su Banyoları	: Nüve BM 402 (TÜRKİYE)
Su Arıtma Sistemi	: Millipore Milli Q Synthesis A10 (FRANSA)

4.METOD

4.1. Hızlı Genomik DNA İzolasyonu Metodu

Hasta grubunu oluşturan örneklerden DNA izolasyonunu gerçekleştirmek için hızlı genomik DNA izolasyonu metodu kullanılmıştır.

EDTA'lı tüplerden 500' er µl kan alınarak 1,5 ml'lik tüplere aktarıldıktan sonra üzerlerine 1000 µl hücre lizis tamponu eklenir ve tüp çalkalanarak tampon ve kanın karışması sağlandıktan sonra 6000 rpm'de 2 dk santrifüjlenir. Santrifüj sonrası süpernatant atılır ve bu aşamaya kadar gerçekleştirilen işlemler pellet beyaz-krem rengi bir renk alana kadar tekrarlanır. Krem rengi pelletin elde edilmesinden sonra pelletin üzerine 300 µl çekirdek lizis tamponu eklenir ve pelletin çözünmesi sağlanır. Daha sonra 100 µl 5M NaCl ve 600 µl kloroform eklenir ve tüp hafifçe çalkalanarak karıştırılmasının ardından 6000 rpm' de 2 dk santrifüjlenir. Santrifüj sonrası tüpte oluşan fazlardan en alt faza ve beyaz arafaza dokunulmadan yalnızca üst faz alınır ve yeni bir tüpe aktarılır. Yeni tüpe aktarılan fazın üzerine 600 µl soğuk izopropanol eklenir ve tüp 13000 rpm'de 1dk boyunca santrifüjlenir. Santrifüj işleminden sonra süpernatant atılır ve pellet oda sıcaklığında 15 dk kurutulur. Daha sonra pelletin üzerine 100 µl TE tamponu eklenir ve oda sıcaklığında çözünmeye bırakılır. TE tamponu içinde çözülmüş DNA kısa süre için +4°C'de veya daha uzun süreler için -20°C'de saklanabilir.

4.2. Yanak içi epitel dokudan DNA izolasyonu

Kontrol grubunu oluşturan örneklerden DNA izolasyonunu gerçekleştirmek için yanak içi epitel hücrelerinden DNA izolasyonu metodu kullanılmıştır. Pamuklu çubukların epitel doku örneği alınacak kişinin çubuğu yanağının iç kısmına yaklaşık 1 dk boyunca sürmesi ile elde edilen yanak içi epitel doku örnekleri örneğin bulunduğu pamuklu çubukla beraber 1,5ml'lik 600-700 µl arası lizis tamponu taşıyan

tüpe yerleştirilir. Örnek lizis tamponu içerisinde uzun süre saklanabilir ama bu durumda lizis tamponunu fazladan eklemek örneğin uzun süre beklemesi sebebiyle oluşabilecek sorunları önler. Örneklerden DNA izole edilmek istendiği zaman tampon hacminin en az 500 µl olduğuna emin olunduktan sonra 50 µl 10mg/ml Proteinaz K ile 55°C'de 30dk-1 saat veya oda sıcaklığında gece boyu inkübe edilir. İnkübasyon sonrası örnek çubuğunun pamuğu tüpün çeperlerine bastırılarak emdiği bütün tamponu ve hücreleri tüpün içine bırakması sağlandıktan sonra tüpten çıkarılır. Daha sonra tüpün üzerine 300 µl fenol ve 600 µl kloroform eklenir ve 12000g'de 2dk santrifüjlenir. Santrifüj sonrası tüpte oluşan fazlardan en alt faza ve beyaz ara faza dokunulmadan yalnızca sulu üst faz alınır ve yeni bir tüpe aktarılır. Bu işlem sırasında beyaz arafazın fazla kalın olduğu farkedilirse sulu faz yeni tüpe aktarıldıktan sonra eski tüpte tekrar Proteinaz K ile inkübasyon ve fenol-kloroform ile çöktürme işlemi tekrarlanır, santrifüj sonrası oluşan üst faz alınarak daha önce yeni tüpe aktarılmış sulu fazın üzerine eklenir. Yeni tüpe aktarılmış sulu fazın üzerine eşit hacimde (yaklaşık 500 µl) kloroform:izoamil alkol (24:1) eklenir ve tüp 12000 g' de 2 dk santrifüjlenir. Santrifüj sonrası oluşan sulu faz alınarak yeni bir tüpe aktarılır üzerine 1/10 hacimde sodyumasetat eklenip karıştırıldıktan sonra 0,6 hacimde izopropanol eklenir ve tüp -20°C'de geceboyu inkübe edilerek DNA'nın presipite olması sağlanır. Bu işlem sırasında tüplerin belirli aralıklarla ters-düz edilmesi DNA eldesini olumlu etkiler. İnkübasyon sonrası tüpler 12000 g'de 10 dk santrifüjlenerek DNA çöktürülür. DNA pelleti 500 µl %70'lik etanol ile 12000 g'de 5 dk boyunca santrifüjlenir. Santrifüj işlemi sonrası süpernatant atılır ve pellet kurumaya bırakılır. Pellet kurduktan sonra üzerine 50 µl Low-TE tamponu eklenir ve oda sıcaklığında 2-3 gün bekletilerek pellet halinde elde edilen DNA'nın çözünmesi sağlanır. İzole edilmiş örnekler kısa süre için +4°C'de veya daha uzun süreler için -20°C'de saklanabilir.

4.3. Dizilenecek PZR ürünlerinin saflaştırılması

PZR ürünü içeren her tüpe 50 µl PZR ürünü için 250 µl bağlanma tamponu eklenir. Filtreli tüpler toplama tüplerinin içerisine yerleştirildikten sonra PZR ürünleri mikropipet ile filtreli tüpe aktarılır ve maksimum hızda (14000 rpm) 1 dk boyunca santrifüjlenir. Santrifüj sonrası filtreli tüp çıkartılır ve toplama tüpündeki

solüsyon atılır. Daha sonra filtre tüpü yine aynı toplama tüpüne yerleştirilir ve ve filtreli tüpe 250 µl yıkama solüsyonu eklenerek maksimum hızda 1 dk boyunca santrifüjlenir. Santrifüjün ardından yine filtreli tüp çıkartılır ve toplama tüpündeki solüsyon atılır. Optimum saflığı ve yıkama tamponunun cam fiberlerden tamamen ayrılmasını sağlamak için aynı işlem 100 µl yıkama tamponu ile tekrarlanır ve filtreli tüpler temiz 1,5ml'lik tüplere aktarılır. Filtreli tüpe 50 µl elüsyon tamponu eklendikten sonra yaklaşık 1dk beklenir ve tüpler yine 1dk boyunca maksimum hızda santrifüjlenir ve 1,5 ml yeni tüpte saflaştırılmış PZR ürünleri elde edilir.

4.4. DNA'nın Kantitatif ve Kalitatif Analizi

İzole edilen DNA örneklerinin kalitatif analizi örneklerin agaroz jelde yürütülmesi ile belirlenir. Agaroz jelde yürütülen DNA'nın görüntüleme sisteminde görüntülendiğinde jelde birden fazla veya sürüntü şeklinde bantlar oluşturması DNA'nın izolasyon sırasında parçalandığına ve PZR gibi işlemler için kullanmaya elverişli olmadığına işaret eder. Agaroz jel elektroforezi sonrası PZR işleminde kullanmak üzere uygun olduğu belirlenen örnekleri spektrofotometrik analizden geçirilerek miktarının ve saflığının belirlenmesi gerekmektedir. Bu amaçla TE tamponu içerisinde çözülmüş DNA örnekleri seyreltilerek spektrofotometre ile 260nm'de absorbansları ölçülür ve aşağıdaki formül ile DNA miktarı belirlenir;

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

Miktarı belirlenen DNA'nın PZR' da kullanılmadan önce saflığının da belirlenmesi gerekir. Bu amaçla yine spektrofotometrede nükleik asitlerin maksimum absorbans gösterdiği 260nm'de ve proteinlerin maksimum absorbans gösterdiği 280nm'de absorbans ölçümü yapılarak A_{260}/A_{280} 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.

4.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Polimeraz zincir reaksiyonu, kaynak DNA'nın belirli bir bölgesinin enzimatik olarak, sayısı reaksiyonun her döngüsünde üstel artacak şekilde çoğaltıldığı bir

tekniktir. Reaksiyonu gerçekleştirmek için temel olarak DNA'nın denatürasyonu, primerlerin bağlanması ve enzimatik çoğalma işlemleri için gerekli olan farklı sıcaklıkları sağlayan bir termal döngü cihazı, çoğaltılacak bölgeyi içeren kalıp DNA, DNA'nın denatüre olduğu sıcaklıklarda aktivite gösterebilen bir DNA polimeraz ve çoğaltılacak bölgenin uçlarına bağlanarak diziyi sınırlayan ve DNA polimeraz enzimi için primer görevi gören primerler gereklidir. Ayrıca reaksiyonu gerçekleştirirken DNA polimeraza ko-faktör görevi gören magnezyum iyonları, yeni sentezlenen zincirin uzaması için gerekli dNTP'ler ve reaksiyon için uygun koşulları sağlayan tampon da reaksiyonun gerçekleştirileceği ortama eklenmelidir. Magnezyum iyonları, dNTP'lere de bağlandıkları için reaksiyon kurulurken dNTP'lerden daha yüksek konsantrasyonda kullanılmalı ama yanlış bağlanan primerleri ve ayrıca çift zincirli DNA'yı stabile ettikleri için çok fazla da kullanılmamalıdır, dNTP'ler ise hem magnezyum iyonlarını bağladıkları hem de yüksek konsantrasyonda DNA polimerazın hata payını arttırdıkları için yine uygun miktarda kullanılmalıdır. Bunların yanı sıra kullanılacak olan primerlerin çoğaltılmak istenen diziyeye özgül olmasına, kalıp diziyeye bağlanmayı etkileyecek şekilde kendi üstlerine katlanmayacak veya diğer primere bağlanarak primer çifti oluşturmayacak şekilde tasarlanmalarına dikkat edilmelidir.

Polimeraz zincir reaksiyonu temel olarak üç aşamanın defalarca tekrarlanması ile gerçekleşir. Bu aşamalar sırasıyla denatürasyon, bağlanma ve uzamadır. Denatürasyon aşamasında yeni sentezlenen zincire kalıp görevi görecek olan DNA zincirleri ısı ile birbirinden ayrılır ve her kalıp zincirden iki DNA ipliği elde edilir. Bağlanma aşamasında primerler denatüre olmuş ipliklere çoğaltılmak istenen dizinin uçlarına gelecek şekilde bağlanırlar. Uzama aşamasında ise primerler kalıp ipliğe eşlenik olarak uzatılırlar. Tek bir polimeraz zincir reaksiyonu döngüsünü meydana getiren bu aşamalar tekrarlanırken her döngüde sentezlenen diziler sonraki döngüde kalıp olarak kullanılırlar ve bu sayede 30-40 döngü sonunda tek bir kopya DNA'dan milyonlarca kopya elde edilmiş olur.

4.6. Restriksiyon Fragmenti Uzunluk Polimorfizmi Analizi

Endonükleazlar veya diğer adlarıyla restriksiyon enzimleri, esasen bakterilerin virüs enfeksiyonuna karşı hücre içine giren yabancı DNA'yı tanıyıp

keserek, parçalamak için savunma amaçlı kullandıkları enzimlerdir. Endonükleazlar hedef DNA zinciri üzerinde 4-6 baz uzunluğunda belirli bir diziyi tanıyarak, zinciri bu diziden veya diziden belirli bir uzaklıkta bir bölgeden her iki zincir üzerinde de karşılıklı olarak aynı noktadan veya birkaç baz farklı noktalardan keserler. Karşılıklı olarak iki DNA ipliğinin aynı noktadan kesilmesi sonucu küt, farklı noktalardan kesilmesi sonucu ise yapışık uçlu DNA zincirleri oluşur. Her endonükleazın farklı bir diziyi tanınması ve DNA'yı yalnızca bu bölgeden kesmesi Restriksiyon Fragmenti Uzunluk Polimorfizmi (RFLP) tekniğinin geliştirilmesine olanak sağlamıştır. Dolayısıyla tek bir nükleotid farklılığının bile bir DNA dizisinin kesilip kesilmeyeceğini belirlemesi, RFLP metoduyla nokta mutasyonlarının veya tek nükleotid değişimlerinin incelenmesine imkan vermiştir. Ticari olarak üretilip, satılan ve farklı tanıma dizilerine sahip oldukları için farklı mutasyon ve polimorfizmlerin analizinde kullanılan bir çok endonükleaz mevcuttur. RFLP analizi ile polimorfizm tespiti yapılırken yapılması gereken ilk işlem uygun endonükleazı belirlemektir. Polimorfizme özgül olarak seçilecek enzimin polimorfik bölgeye özgül tanıma dizisine sahip olması gerekir. Bu sayede genomik DNA üzerinde tanıma dizisine tekabül eden bölgede meydana gelen nükleotid değişimleri kesim bölgesi kaybına veya kazanımına sebep olur. Uygun enzimin belirlenmesinden sonra polimorfik bölge polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltılır ve çoğaltılan dizi endonükleaz 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.

4.7. Agaroz Jel Elektroforezi

DNA molekülü içerdiği fosfat grupları nedeniyle negatif yüklüdür ve bu özelliği sebebiyle bir elektrik alanda uygun ortam içerisinde negatif elektrottan pozitif elektroda doğru hareket eder. DNA'nın elektrik alanda yaptığı bu hareketin hızı DNA molekülünün uzunluğuna bağlıdır. Daha uzun diziler pozitif elektroda daha yavaş ilerlerken daha kısa diziler daha hızlı ilerler ve dolayısıyla uygun ortam içerisinde bir elektrik alanda DNA molekülleri negatif elektroda doğru ilerlerken büyüklüklerine göre ayrılabilirler. Elektroforez tekniği bu prensipten faydalanır. Bu teknikte agaroz moleküllerinin TBE tamponu içerisinde ısı ile çözünüp, uygun bir

kaba dökülerek soğumaya bırakılması sırasında polimerleşmeleri ile oluşan agaroz jel DNA' nın içerisinde negatif elektroda doğru hareket ettiği ortamı oluşturur. Jel, iyonik kuvveti ile pozitif ve negatif elektrodlar arasında iletkenliği ve elektrik alanın oluşumunu sağlayan TBE tamponu içeren bir tanka yerleştirilir ve DNA örnekleri jele yüklenir. Tankın bir güç kaynağına bağlanması ile tankta bulunan negatif ve pozitif elektrodlar arasında TBE tamponunun sağladığı iletkenlik aracılığı ile bir akım oluşur ve jele yüklenen DNA örnekleri negatif elektrottan pozitif elektroda doğru hareket ederken boylarına göre ayrılırlar. Bu işlem sonunda jelde ilerleyen örnekleri görebilmek için DNA'ya interkalant bağlanan ve UV altında ışımaya yapan bir molekül olan etidyum bromür jel soğuyarak polimerize olmadan önce yaklaşık 50°C'lik agaroz-TBE çözeltisine 0,5mg/ml son konsantrasyona sahip olacak şekilde eklenir ve elektroforez sonunda her örneğin ne kadar ilerlediğinin görülebilmesini sağlar. Ayrıca örneklerin jele yüklenmesi sırasında hem örneklerin elektroforez sırasında çok ilerleyerek jelden çıkmalarını hem de örneklerin jel içinde yüklendikleri kuyucuklardan çıkıp tanka dağılmasını önlemek amacıyla görünür ışık aralığında işlem sırasında jel üzerinde hareketi gözlemlenebilen yükleme boyası kullanılır. Bu amaçla örnekler jele yüklenmeden önce 5ul örnek için yaklaşık 1ul yükleme boyası ile karıştırılır. Örnekler ise jelin döküldüğü ve soğuyarak polimerize olduğu kaba önceden yerleştirilmiş tarakların polimerizasyon sonrası jelden çıkarılmasının sonucu oluşan kuyucuklara yüklenir. Yüklenen örneklerin optimum ayrımı için jele 5V/cm gerilim uygulanması gerekir.

Bu araştırmada izole edilen DNA örneklerinin fragmantasyonu %1'lik, PZR ürünleri %2'lik, restriksiyon ürünleri ise %3'lük jel kullanılarak analiz edilmiştir.

4.8. Mesane Kanserinin Moleküler Analizi

Bu araştırmada AKR1C3 geni üzerindeki rs12529 tek nükleotid polimorfizminin mesane kanserine yatkınlık oluşturmadaki rolleri PZR-Restriksiyon uzunluk polimorfizmi metodu kullanılarak incelenmiştir. Her polimorfik bölge için o bölgeye özgün primerler kullanılarak belirtilen şartlarda reaksiyonlar hazırlanmıştır (Tablo 3.1., Tablo 4.1.).

Tablo 4.1. PCR Reaksiyonlarının içerikleri

	Son Konsantrasyon
Tampon	1 X
dNTP(mM)	0,4
MgCl ₂ (mM)	2,5
Primerler (pmol)	10
Taq. Pol.	1U
DNA	50 - 100 ng

Reaksiyonların hazırlanmasından sonra polimorfik bölge belirtilen koşullarda gerçekleştirilen PZR ile çoğaltılmıştır (Tablo 4.2.).

Polimeraz zincir reaksiyonunun ardından PZR ürünleri, reaksiyonun kontrolü amacıyla üründen 8 µl alınarak yükleme boyası ile beraber %2'lik agaroz jele yüklenmiş ve jelde 100bç büyüklük markörü ile beraber 120V'da 15dk boyunca yürütülmüştür. PZR ürünlerinin agaroz jel ile kontrolü sonrası her PZR üründen 8 µl alınarak kurulan restriksiyon reaksiyonları 55°C'de üç saat restriksiyon enzim kesimine tabi tutulmuşlardır.

Tablo 4.2. PZR döngü koşulları

Polimorfizm	rs12529
Başlangıç Denatürasyonu	94°C, 5dk.
Denatürasyon	94°C, 30sn
Bağlanma	59°C, 45sn
Uzama	72°C, 60sn
Son Uzama	72°C,5dk
Döngü Sayısı	30

Kesim sonrası oluşan restriksiyon ürünlerinin uzunlukları, her üründen 8 µl 'nin yükleme boyası ile beraber %3'lük agaroz veya nu micropore agaroz jele yüklenerek jelde 50bç büyüklük markörü ile beraber 100V'da 60dk boyunca yürütülmeleri ile belirlenmiştir. Jelde görüntülenen bantlara göre her örnek için genotipler belirlenmiştir (Tablo 4.3.).

Tablo 4.3. Restriksiyon ürünlerinin uzunlukları

Kesim enzimi / Polimorfizm	Polimorfik Homozigot (bç)	Yabanıl Tip Homozigot (bç)	Heterozigot (bç)
Bts-I / (rs12529)	135,153 (G/G)	288 (C/C)	288,153,135 (G/C)

Ayrıca rastgele seçilen örnekler PCR-RFLP ile belirlenen genotiplerinin teyidi amacıyla dizi analizi ile incelenmiştir. Dizi analizi işlemi İontek A.Ş 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. Örneklerin Tanımı

Bu çalışmaya 101 mesane kanseri hastası ve 101 sağlıklı birey olmak üzere toplam 202 kişi dahil edilmiştir. Genotip bilgileri çalışmaya dahil edilen hastaların, hasta bilgi formu ile sağlanan hastalık evresi, tümör derecesi ve nüks bilgileri istatistik analizler için kullanılmıştır. Ayrıca hem hasta grubunu hem de kontrol grubunu oluşturan tüm bireylerin cinsiyet, yaş, meslek, sigara içimi miktarı ve süresine dair bilgiler de yine istatistik analizlerde kullanılmıştır.

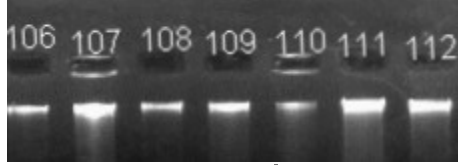
Hasta grubu %78 oranında erkek, %22 oranında ise kadın bireyden oluşmaktadır ve hasta bireylerin yaşları 25-89 arasında olup, yaş ortalamaları ise 66,65 yaştır. Hastaların %80'i sigara içerken %20'si sigara içmemektedir. Hastaların %59'u ilk kez tedavi olurken, hastaların %3'ünde tümör 2.kez, %24' ünde 3.kez, %14' ünde ise 4 ile 15 kez arasında nüks etmiştir. Hastalardan alınan tümörlerin %28'i 1.derece, %36'sı 2. derece, %35'i ise 3.derecedir. Tümörlerin %53'ü pTa, %34'ü pT1, %9'u pT2 ve %3'ü pT3 evresindedir.

Kontrol grubunun %43'ü erkek, %57'si kadınlardan oluşmaktadır. Bu bireylerin yaşları 21-87 yaş arasında değişmektedir ve yaş ortalamaları 31,26 yaş olarak belirlenmiştir. Kontrol grubuna dahil olan bireylerin %30'u sigara içerken %70'i içmemektedir. Kontrol ve hasta grubunu oluşturan bireylerin mesane kanseri oluşumu için mesleki risk taşımadıkları belirlenmiştir.

5.2. DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu hasta grubunu oluşturan bireylerin kan örneklerinden Bölüm 4.1' de anlatılan metod ile gerçekleştirilmiştir. Kontrol grubunu oluşturan bireylerden alınan yanak içi epitel hücrelerinden DNA izolasyonu ise Bölüm 4.2'de açıklanan metod kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İzole edilen örneklerin fiziksel

hasara uğramadan izole edildiklerini doğrulamak amacıyla DNA örneklerinden 1-3 µl alınarak, %1'lik agaroz jelde incelenmiş ve DNA örneklerinin izolasyon sürecinde kırılmadan elde edildikleri teyid edilmiştir (Şekil 5.1.). Örneklerin saflıkları ve konsantrasyonları ise spektrofotometrik analizlerle belirlenmiştir.



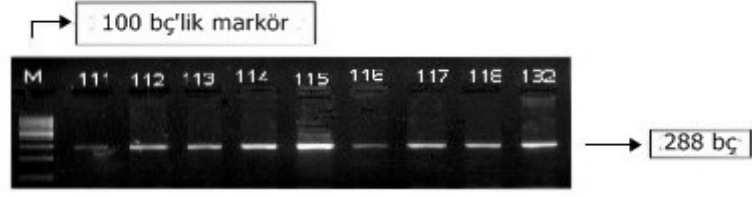
Şekil 5.1. İzole edilen Genomik DNA örneklerinin %1'lik agaroz jelde görüntülenmesi

5.3. rs12529 Polimorfizminin Moleküler Analizi

Hasta ve kontrol grubundan izole edilen DNA örneklerinden, incelenen polimorfizmin bulunduğu gen lokusu, bölüm 4.4'te belirtilmiş olan koşullarda gerçekleştirilen PZR ile çoğaltılmıştır. PZR ürünlerinin uzunlularını ve kalitelerini kontrol etmek amacıyla, reaksiyonlar %2'lik agaroz jelde etidyum bromür boyaması ile UV ışığı altında görüntülenmiştir. Uygun şekilde çoğalan ürünler Bölüm 4.5.'te belirtilen şartlar kullanılarak restriksiyon enzim kesimine tabii tutulmuş ve kesim ürünleri %3'lük agaroz jele yüklendikten sonra 100V'da 50dk yürütülerek incelenmiştir. PZR-restriksiyon uzunluk polimorfizmi metodu ile belirlenen genotipler DNA dizi analizi ile doğrulanmıştır.

5.3.1. rs12529 Polimorfizminin PZR-Restriksiyon Uzunluk Polimorfizmi Metodu ile Belirlenmesi

rs12529 polimorfizminin bulunduğu gen bölgesi Bts-I-F ve Bts-I-R primerleri kullanılarak PZR metodu ile çoğaltılmış ve 288 bç'lik PZR ürünü elde edilmiştir (Şekil 5.2.). PZR ürünleri Bts-I restriksiyon enzimi ile kesilerek %3'lük agaroz jelde görüntülenmiştir (Şekil 5.3.). Bts-I enzimi, PZR ile çoğaltılan polimorfik bölgeyi 153bç ve 135bç'lik iki parçaya ayırmaktadır.



Şekil 5.2. PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jelde görüntülenmesi



Şekil 5.3. Restriksiyon kesimi ürünlerinin %3' lük agaroz jelde görüntülenmesi

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

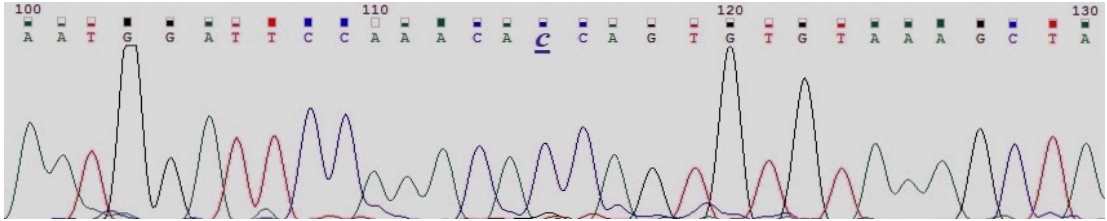
Tablo 5.1. rs12529 Polimorfizmi Genotip Dağılımı

GRUP	Genotip								
	CC			CG			GG		
	N	%	Frek.	N	%	Frek.	N	%	Frek.
Hasta	13	12,9	0,129	81	80,1	0,801	7	6,93	0,069
Kontrol	16	15,8	0,158	59	58,4	0,584	26	25,7	0,257
Toplam	29	14,35	0,1435	140	68,7	0,688	33	16,8	0,168

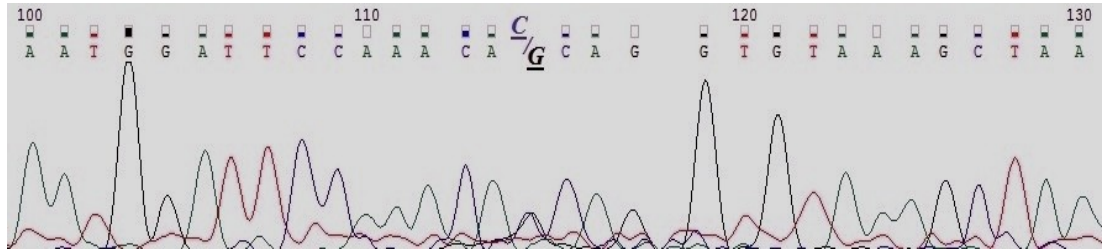
5.4. PZR-Restriksiyon Uzunluk Polimorfizmi Sonuçlarının Dizi Analizi ile Teyidi

PZR-Restriksiyon Uzunluk Polimorfizmi metodu ile genotipi belirlenen örneklerden rastgele seçilen 5 adedi dizi analizine tabii tutulmuş ve sonuçlar karşılaştırılmıştır. Dizi analizi sonuçları ile PZR-restriksiyon uzunluk polimorfizmi metodu sonuçları tamamen örtüşmektedir. Bu durum çalışmada kullanılan metod ile

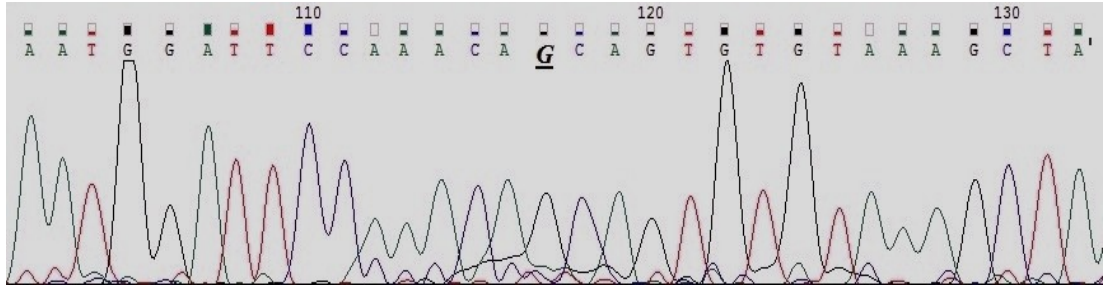
belirlenen genotiplerin doğruluğunu göstermektedir. Şekil 5.4., 5.5., ve 5.6. sırasıyla homozigot yabanıl tip genotipi (C/C), heterozigot genotipi (C/G) ve homozigot varyant genotipi göstermektedir (G/G).



5.4. Homozigot yabanıl tip (C/C) örnek kromatogramı



5.5. Heterozigot (G/C) örnek kromatogramı



5.6. Homozigot varyant (G/G) örnek kromatogramı

5.5. Verilerin İstatistiksel Analizi

Hasta ve kontrol grubundan PZR-Restriksiyon uzunluk polimorfizmi metodu ile elde edilen genotip ve alel frekanslarının Hardy-Weinberg Dengesine uygunluğu ki-kare testi ile değerlendirilmiştir. rs12529 polimorfizminin mesane kanseri ile ilişkilendirilmesi SPSS 15 ve PLINK v1.07 yazılımları ile gerçekleştirilmiştir. Cinsiyet, yaş ve sigara kullanımının mesane kanseri oluşumuna etkileri SPSS 15 yazılımı ile incelenmiş ve ardından bu etmenler genetik polimorfizmle birlikte

değerlendirilerek risk analizi gerçekleştirilmiştir. Tüm ilişkilendirme analizlerinde $p < 0,05$ değerleri istatistiksel anlamlılık olarak kabul edilmiştir.

5.5.1. Cinsiyet ve Mesane Kanseri İlişkisinin Araştırılması

Cinsiyet etkeni ve mesane kanseri ilişkisi, oluşturulan çapraz tablolardan (Tablo 5.2.) SPSS 15 programı kullanılarak yapılan ki-kare testi (Tablo 5.3.) aracılığı ile incelenmiş ve erkek olmanın hastalığa yakalanma riskini kadın olmaya nazaran yaklaşık 5 kat arttırdığı belirlenmiştir (Tablo 5.4.).

Tablo 5.2. Cinsiyet-Grup Çapraz Tablosu

Grup	Cinsiyet		Toplam
	Erkek	Kadın	
Kontrol	43	58	101
Hasta	79	22	101
Toplam	122	80	202

Tablo 5.3. Cinsiyet Grup Ki-Kare Testi

Pearson X^2	df	P
26,823	1	0,005

$p=0,005$ için $X^2 > 7,88$

Tablo 5.4. Cinsiyet Risk Tahmini

Kadın/Erkek OR	%95 CI
4,844	(2,617-8,963)

5.5.2. Sigara İçimi ve Mesane Kanseri İlişkisinin İncelenmesi

Sigara içimi ve mesane kanseri arasındaki ilişkinin incelenilebilmesi için hasta ve kontrol grubu sigara kullanımına göre gruplanmış ve SPSS 15 programı ile oluşturulan çapraz tablo (Tablo 5.5.) aracılığı ile analiz edilmiştir. Yapılan analiz sonucunda sigara içenlerin mesane kanserine yakalanma riskinin içmeyenlere göre istatistiksel olarak önemli derecede arttığı belirlenmiştir (Tablo 5.6., 5.7.).

Tablo 5.5. Sigara İçimi-Grup Çapraz Tablosu

Grup	Sigara İçen	Sigara İçmeyen
Kontrol	30	71
Hasta	52	13

Tablo 5.6. Sigara İçimi-Grup Ki-Kare Testi

Pearson X ²	df	P
38,459	1	0,005

p=0,005 için X²>7,88

Tablo 5.7. Sigara İçimi için Risk Tahmini

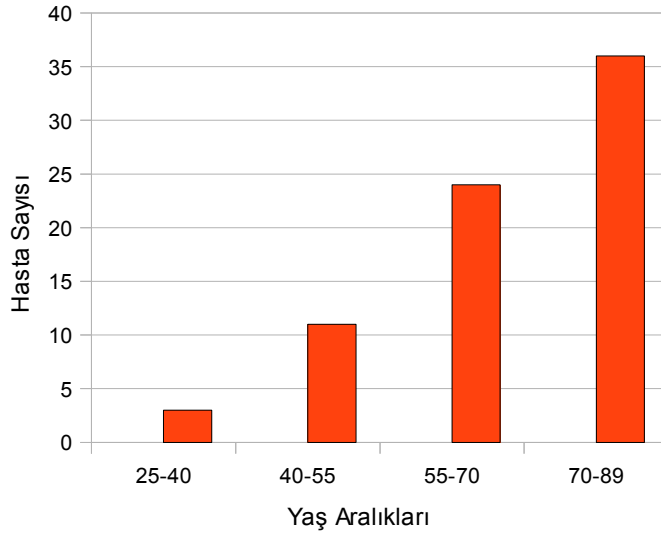
Sigara İçmeyen / Sigara İçen OR	(%95CI)
9,032	(4,308-18,938)

5.5.3. Mesane Kanserinin Yaş ile İlişkilendirilmesi

Hasta grubunu oluşturan bireylerin yaşları incelendiğinde, yaş aralığının 25-89 arasında değiştiği ve yaş ortalamasının 66,65 yaş olduğu ve hastaların yaklaşık %49'unun 70 yaşın üzerinde olduğu belirlenmiştir. Bu bilgilerin yanı sıra hasta grubu 15 yıllık aralıklarla yaş gruplarına ayrılmıştır ve bu aralıklara tekabül eden birey sayısı ve yüzdesi belirlenmiştir (Tablo 5.8., Şekil 5.7.). Bu veriler mesane kanseri insidansının yaş ile doğru orantılı olarak arttığını göstermektedir.

Tablo 5.8. Hasta Grubunun Yaş Gruplarına göre Dağılımları

Yaş aralığı	25-40	40-55	55-70	70-85	85 +
	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)
Hasta	3 (4,16)	11 (14,67)	24 (32,6)	32 (43,24)	4 (5,33)



Şekil 5.7. Hasta Grubunun Yaş Dağılım Grafiği

5.5.4. Hardy-Weinberg Denge 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 5.9.).

Tablo 5.9. Hardy-Weinberg Testi Sonuçları

SNP	Grup	CC	CG	GG	Gözlemlenen genotip frekansları	Beklenen genotip frekansları	P
rs12529	Hasta	13	81	7	0,802	0,4988	0,047
	Kontrol	16	59	26	0,5842	0,4951	0,1069
	Toplam	29	140	33	0,68810	0,4997	0,45

5.5.5. rs12529 Polimorfizminin Mesane Kanseri ile İlişkilendirilmesi

rs12529 polimorfizminin mesane kanseri ile ilişkisinin incelenmesi amacıyla ilk olarak genotip verilerinden SPSS 15 yazılımı aracılığı ile çapraz tablolar oluşturularak genotiplerin sayıları, frekansları ve yüzde oranları hasta ve kontrol gruplarında ayrı ayrı belirlenmiştir (Tablo 5.1.). Daha sonra genotip verileri, genotipik ve alelik etkileşim açısından önem arz edip etmediklerinin belirlenebilmesi için

PLINK programı ile analiz edilmiştir. Bu analiz sonucunda rs12529 polimorfizminin hasta ve kontrol grubu arasında genotipik dağılımda görülen farklılığın istatistiksel açıdan önemli olduğu belirlenmiştir (Tablo 5.10.).

Tablo 5.10. Genotipik Asosiyasyon Testi

Polimorfizm	Grup	CC	CG	GG	X ²	P
rs12529	Hasta	13	81	7	14,71	0,00064
	Kontrol	16	59	26		

p=0,0005 için X²>12,12

PLINK programı ile gerçekleştirilen asosiyasyon testlerinde rs12529 polimorfizminin hasta ve kontrollerde gösterdiği farklı dağılım frekansının istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendikten sonra genotip verileri SPSS programı ile lojistik regresyon gerçekleştirilerek görelî orantı değeri belirlenmiş ve bu değerler çapraz tablo ki-kare testleri ile (Tablo 5.11.) mesane kanseri için risk faktörü oldukları belirlenen sigara içimi ve cinsiyet için düzenlenmiştir (Tablo 5.12.).

Tablo 5.11. Genotip-Grup Ki-Kare Testi

Genotip	X ² _a	P ^a	X ² _b	P
GG	8,359	0,004	6,152	0,013

a: Yalnızca genotipik etki için elde edilen değeri

b: Cinsiyet ve sigara için düzeltilmiş değeri

p=0,005 için X²>7,88

Tablo 5.12. Lojistik Regresyon Analizi

Genotip	OR ^a (%95 CI)	OR ^b (%95 CI)
GG	0,255 (0,101-0,644)	0,243 (0,80-0,743)

a: Yalnızca genotipik etki için elde edilen değeri

b: Cinsiyet ve sigara için düzeltilmiş değeri

6. TARTIŞMA

Karsinogenez esasen hücre döngüsü kontrol mekanizmasında rol alan genlerde meydana gelen değişimlerin sonucunda normal hücre döngüsünün bozulması sebebiyle ortaya çıksa da, karsinogenez sürecinin yalnızca onkogenlerde işlev kazanımına ve tümör baskılayıcı genlerde işlev kaybına sebep olan mutasyonlarla açıklanamayacağı artık kabul görmüş bir gerçektir. Bu durum özellikle kanser kalıtımı ve kansere yatkınlıkta bireyler arası farklılıklar söz konusu olduğunda ortaya çıkmaktadır. Bunun en önemli sebebi hücre kontrol mekanizmasında görev alan genlerde görülen mutasyonların *de novo* mutasyonlar olmasıdır. Bu mutasyonların oluşumu, kişinin maruz kaldığı karsinojen miktarına, bu karsinojenlerin ne kadarının aktive veya detoksifiye edildiğine ve aktive edilen karsinojenlerin sebep olduğu hasarın ne kadarının tamir edildiğine bağlıdır. Bu sebeple, söz konusu kansere yatkınlık olduğunda incelenmesi gereken genomik etkenler onkogenler ve tümör baskılayıcı genler değil, bu genlerde *de novo* mutasyon oluşumunda rol oynayan genler, diğer bir deyişle hücre kontrol mekanizmasında görev alan genlerin mutasyona uğrama oranını ve ihtimalini etkileyen metabolik genler ve DNA tamir genleridir. Metabolik genler, bireyin maruz kaldığı karsinojenlerin aktivasyonunu ve detoksifikasyonunu gerçekleştirirler. Aktivasyon ve detoksifikasyon arasındaki denge DNA'ya bağlanarak mutasyon oluşturabilecek moleküllerin miktarını ve hücrede birikme hızını belirler. Karsinojen metabolizmasında rol alan genler oldukça polimorfiktir ve bu polimorfizmler enzim aktivitesinde değişikliklere yol açarak aktive veya detoksifiye edilen karsinojen miktarını etkilerler.

AKR'ler bu metabolizmada yer alan ve esas görevleri karbonil grubu içeren ksenobiyotiklerin alkollere dönüşümünü katalizlemek olan enzimlerdir. Egzost dumanında bulunan polisiklik aromatik hidrokarbonları ve sigara dumanındaki nitroz amin türevlerini aktive ettikleri belirlenmiştir (Penning vd., 2007a). Karsinojen metabolizmasında rol alan diğer çoğu gen gibi AKR'ler de oldukça polimorfik

genlerdir. AKR polimorfizmlerinin kanserle olan ilişkisi daha önce biri akciğer kanseri diğeri mesane kanseri olmak üzere dört çalışmada incelenmiş ve çelişkili sonuçlar elde edilmiştir (Figuroa vd., 2008; Lan vd., 2004; Lan vd., 2007; Cunningham vd., 2007).

Bu tez çalışmasında 101 sağlıklı bireyden ve 101 mesane kanseri hastasından alınan örneklerde AKR1C3 genindeki rs12529 polimorfizmi incelenmiştir. PZR-Restriksiyon uzunluk polimorfizmi metodu ile elde edilen genotip frekanslarının Hardy-Weinberg dengesine uygunluğu PLINK programı kullanılarak test edilmiştir. Tablo 5.9'da görüldüğü üzere kontrol popülasyonu Hardy-Weinberg dengesindeyken ($p>0,05$), hasta popülasyonu dengede değildir ($p<0,05$). Kontrol popülasyonunun Hardy-Weinberg dengesinde olması seçilen kontrol grubunun uygunluğunu gösterirken hasta popülasyonunun dengede olmaması beklenildiği üzere genotip dağılımının normal dağılım göstermediğini belirtir ve rs12529 polimorfizminin mesane kanseri ile ilişkili olabileceğine işaret eder. Kontrol grubunun genotip frekansları National Health Institute Core Genotyping Facility veritabanında bildirilen frekanslarla kıyaslandığında kontrol popülasyonu genotip frekansları en fazla Afrika kökenli popülasyonla yakınlık göstermesine rağmen yine de diğer popülasyonların genotip dağılımlarından oldukça farklılık gösterdiği belirlenmiştir (Tablo 6.1.).

Tablo 6.1. Farklı Popülasyonlarda rs12529 Genotip Frekansları

Popülasyon	Genotip Frekansları		
	CC	CG	GG
Kontrol*	0,158	0,584	0,257
Afrika	0,250	0,583	0,167
Hispanik	0,387	0,452	0,161
Avrupa	0,261	0,435	0,304
Uzakdoğu	0,042	0,125	0,833

* : Bu çalışmada kontrol grubuna dahil edilen sağlıklı bireyler.

Çalışma kapsamında cinsiyet, yaş ve sigara tüketimi de mesane kanseri risk faktörü olan demografik ve çevresel etkenler olarak incelenmiştir. %78'i erkeklerden

oluşan hasta grubu incelendiğinde mesane kanseri ve cinsiyet arasında önemli bir ilişki olduğu bulunmuştur, ($X^2=26,823$ $df=1$ $p=0,005$). İstatistiksel değerlendirme sonucunda erkeklerin kadınlara nazaran 4,84 kat daha fazla mesane kanserine yakalanma riskine sahip oldukları belirlenmiştir (%95CI=2,617-8,963). Daha önce yapılan çalışmalarda bu sonuçlara uygun olarak erkeklerin mesane kanserine yakalanma riskinin kadınlara nazaran 4-5 kat daha fazla olduğu bildirilmiştir (Jemal vd., 2008).

Mesane kanseri için başka bir risk faktörü olan yaş da bu çalışmada mesane kanseri ile ilişkisi açısından incelenmiş ve daha önce yapılan araştırmalarda belirtildiği gibi artan yaşın mesane kanseri için bir risk faktörü olduğu belirlenmiştir (Messing vd., 2008). Bu çalışma kapsamında incelenen hasta grubunun %49'u 70 yaşın üzerindedir. Çalışmada incelenen hasta ve kontrol grubu mesane kanseri için en önemli risk faktörü olduğu bilinen sigara tüketimi açısından araştırıldığında sigara içmenin mesane kanseri riskini yaklaşık 9 kat arttırdığı belirlenmiştir (OR=9,032 %95CI=4,308-18,938). Daha önce gerçekleştirilen çalışmalarda sigara içmenin mesane kanseri riskini yaklaşık 3 kat arttırdığı belirlenmiştir (Zeegers vd., 2000).

AKR1C3 polimorfizmlerinin kanserle olan ilişkisinin incelendiği daha önce gerçekleştirilmiş dört çalışmadan yalnızca bir tanesinde AKR1C3 ve mesane kanseri bağlantısı araştırılmıştır. Diğer üç çalışmada AKR1C3 polimorfizmlerinin Hodgkin dışı lenfoma, akciğer kanseri ve prostat kanseri ile ilişkisi araştırılmıştır.

Lan vd. tarafından 119 hasta ve 113 kontrol kullanılarak gerçekleştirilen çalışmada rs12529 (His/Gln) polimorfizminin akciğer kanseri ile bağlantısı incelenmiş ve GG genotipi yaklaşık 2 kat artmış akciğer kanseri riski ile ilişki bulunmuştur (Lan vd., 2004). Yine Lan vd., tarafından gerçekleştirilen başka bir çalışmada ise AKR1A1 rs2088102, AKR1C1 rs8483 ve AKR1C3 rs12529 polimorfizmlerinin hodgkin dışı lenfoma ile olan ilişkileri 518 hasta ve 597 kontrol kullanılarak incelenmiştir. Bu çalışma sonunda AKR1C1 ve AKR1C3 polimorfizmleri ilişkili bulunmazken, AKR1A1 rs2088102 polimorfizminin 1,7 kat artmış risk ile ilişkili olduğu belirlenmiştir (Lan vd., 2007).

Cunningham vd. tarafından gerçekleştirilen araştırmada AKR1C3 rs12529 ve rs7741 polimorfizmlerinin sporadik ve ailesel prostat kanseri ile olan ilişkisi incelenmiş ve rs12529 polimorfizminin prostat kanseri ile bir ilişkisi

bulunamamışken rs7741 polimorfizminin ailesel prostat kanseri riskini 1,53 kat, sporadik prostat kanseri riskini ise 1,21 kat arttırdığı belirlenmiştir (Cunningham vd., 2007). Figueroa ve arkadaşları mesane kanseri ile bağlantılı olarak ilk önce AKR1C3 geni üzerinde risk faktörü olabilecek polimorfizmleri içeren bölgeleri belirlemek amacıyla bir haplotip analizi gerçekleştirmiş ve ilki promotordan başlayarak 1.introna kadar devam eden bölge, ikincisi ise 5. ve 8. intronlar arasında kalan bölge olmak üzere iki bölge belirlemiştir (Figueroa vd., 2008). Promotordan başlayarak 1.introna kadar devam eden bölgede rs1937845, rs3763676, rs12529, rs1937843 polimorfizmleri bulunmaktadır. 5. ve 8. intronlar arasında kalan bölgede ise rs4881400, rs12775701 ve rs4641368 polimorfizmleri bulunur. Figueroa vd. tarafından gerçekleştirilen bu çalışmada rs3763676, rs12775701 ve rs1937843 artmış mesane kanseri riski ile bağlantılı bulunmuşken; rs1937845, rs12529, rs4881400 ve rs4641368 polimorfizmleri koruyucu faktör olarak belirlenmişlerdir. rs12529 polimorfizmi GG genotipi için Figueroa vd tarafından belirlenen göreceli orantı değeri 0,78'dir (%95CI=0,52-0,1,18).

AKR1C3 rs12529 polimorfizminin mesane kanseri ile ilişkisinin araştırıldığı bu tez çalışmasında, hasta ve kontrol gruplarının genotip dağılımlarında önemli farklar olduğu belirlenmiş ($X^2=14,71$, $p=0,00064$) ve homozigot varyant genotip (GG) ile mesane kanseri arasında önemli bir ilişki olduğu belirlenmiştir ($X^2=8,359$, $p=0,004$). Bu sonuçlara göre rs12529 homozigot varyant genotip mesane kanseri için koruyucu etki göstermektedir (OR=0,255 %95CI=0,101-0,644) ve Figueroa vd. tarafından gerçekleştirilmiş çalışmanın sonuçları ile örtüşmektedir. Bu değerler mesane kanserinde önemli risk faktörleri oldukları bilinen cinsiyet ve sigara tüketimi durumuna göre düzeltildiğinde rs12529 GG genotipinin koruyucu etkisinin daha da belirgin hale geldiği belirlenmiştir (OR=0,243 %95CI=0,80-0,743).

Lan vd. tarafından gerçekleştirilen çalışmada ise rs12529 homozigot varyantı akciğer kanserinde risk faktörü olarak belirlenmiştir (Lan vd., 2004). Bu durumun sebebinin akciğer ve mesane kanseri patofizyolojisindeki farklılıklar olması mümkün olsa da, akciğer ve mesane kanserinde aynı karsinogenler etkili olduğu ve AKR1C3 bu karsinogenler üzerinde aynı etkiyi gösterdiği için bu durumun çevresel, demografik ve alelik farklılıkların bir sonucu olması daha muhtemeldir. Tablo 6.1 incelendiğinde Lan vd.'nin akciğer ile ilgili çalışmasında kontrol ve hasta grubunu

oluşturan uzakdoğu kökenli populasyonun genotip frekansları açısından diğer bütün populasyonlardan oldukça farklı olduğu görülecektir.

AKR1C3 geninde görülen polimorfizmlerin enzim aktivitesi ve genin ifade edilmesi üzerine etkisinin incelenmesi bir kaç çalışma ile sınırlı kalmıştır. Jakobsson vd. tarafından yapılan bir araştırmada rs3763676 polimorfizminin transkripsiyonel aktiviteyi değiştirdiği ve azalmış AKR1C3 ifadesiyle ilişkili olabileceği bildirilmiştir (Jakobsson vd., 2007). Nagaraj vd. oral kanser hücrelerinin sigara dumanı özütüne maruz bırakılması sonucu CYP1A1, CYP1B1, AKR1C1 ve AKR1C3 ifadesinin arttığını bildirmiştir (Nagaraj vd., 2006). Ayrıca insan akciğer karsinomu A549 hücre hattında da normal akciğer dokusunda ifade edilmeyen AKR1C3' ün yüksek miktarda ifade edildiği belirlenmiştir (Palackal vd., 2002). Dozmorov vd. ise artmış AKR1C3 ifadesinin prostat kanseri hücrelerinde artmış hayatta kalma oranı ve anjiyogenez ile bağlantılı olduğunu tespit etmiştir (Dozmorov vd., 2010).

Bu tez çalışmasında AKR1C3 rs12529 GG genotipinin mesane kanseri riskini azalttığı belirlenmiştir. Daha önce mesane kanseri ve AKR1C3 polimorfizmleri arasındaki bağlantıyı inceleyen yalnızca bir çalışma İspanyol populasyonunda gerçekleştirildiği ve Türk populasyonu üzerine hiç çalışma yapılmadığı göz önünde bulundurulduğunda bu tez çalışmasında elde edilen sonuçların teyidi ve AKR1C3 polimorfizmlerinin mesane kanseri üzerine olan etkisinin daha iyi anlaşılabilmesi için daha geniş hasta ve kontrol gruplarında tekrarlanmış araştırmalara ihtiyaç olduğu söylenebilir. Ayrıca AKR1C3 polimorfizmlerinin gen ve enzim aktivitesi üzerine işlevsel etkileri de tek bir polimorfizm ile bağlantılı gerçekleştirilmiş bir çalışma dışında daha önce araştırılmış değildir ve proteinde amino asit değişikliğine yol açan polimorfizmlerin hiç birinin işlevsel etkisi bilinmemektedir. AKR1C3 geninde çeşitli karsinojenlere ve patolojik durumlara bağlı olarak görülen ifade değişiklikleri göz önüne alındığında bu polimorfizmlerin enzim aktivitesinde ve gen ifadesinde sebep oldukları değişimlerin araştırılması daha da önem kazanmaktadır. AKR1C3 geni polimorfizmlerinin istatistiki ve işlevsel analizleri, kansere yatkınlık ve karsinojen metabolizması bağlamında mesane karsinogenezinin daha iyi anlaşılmasını sağlayacak ve karsinojenlere maruz kalma açısından farklı kanser tiplerine bireysel yatkınlığın belirlenmesinde ve kansere karşı korunmada faydalı olacaktır.

7. KAYNAKLAR

7.1. Makaleler

Abbas F., Civantos F., Benedetto P., vd. (1995). Small cell carcinoma of the bladder and prostate. *Urology* 46:617-630.

Abdel-Rahman SZ., Anwar Wa., Abdel-Aal WF. vd. (1998). GSTM1 and GSTT1 genes are potential risk modifiers for bladder cancer. *Cancer Detection and Prevention* 22:129-138.

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

Barboro P., Rubagotti A., Orecchia P., Spina B vd., (2008). Differential proteomic analysis of nuclear matrix in muscle-invasive bladder cancer: potential to improve diagnosis and prognosis. *Cellular Oncology* 30(1):13-26.

Boffetta P., Jourenkova N., Gustavsson P. (1997). Cancer risk from occupational and environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Cancer Causes and Control* 8:444-472.

Boffetta P., Silverman DT. (2001). A meta-analysis of bladder cancer and diesel exhaust exposure. *Epidemiology* 12:125-130.

Bozusic L., Surucu B., Hynx D. vd. (2008). PKBalpha/Akt1 acts downstream of DNA-PK in the DNA doublestrand break response and promotes survival. *Molecular Cell* 30:203-213.

Brockmoller J., Cascorbi I., Kerb R. vd. (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.

Buyru N., Tıǧlı H., Özcan F. vd. (2003) . Ras oncogene mutations in urine sediments

of patients with bladder cancer. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 36(4):111-116.

Chatterjee SJ., Datar R., Youssefzadeh D. vd.(2004). Combined effects of p53, p21, and pRb expression in the progression of bladder transitional cell carcinoma. *Journal of Clinical Oncology* 22(6):1007–13.

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

Cordon-Cardo C. (2004). p53 and RB: simple interesting correlates or tumor markers of critical predictive nature? *Journal of Clinical Oncology* 2004; 22(6):975–977.

Cunningham JM. vd. (2007). Evaluation of genetic variations in the androgen and estrogen metabolic pathways as risk factors for sporadic and familial prostate cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention* 16:969–978.

Ehdaie B., theodorescu D. (2008). Predicting tumor outcomes in urothelial bladder carcinoma: turning pathways into clinical biomarkers of prognosis. *Expert Review of Anticancer Therapy* 8(7):1103-1110.

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

Figuroa JD., Malats N., Garci-Closas M. vd. (2008). Bladder cancer risk and genetic variation in AKR1C3 and other metabolizing genes. *Carcinogenesis* 29(10):1955-1962.

Golka K., Wiese A., Assennato G., Bolt HM. (2004). Occupational exposure and urological cancer. *World Journal of Urology* 21:382–391.

Hartge P., Harvey EB., Linehan WM. vd. (1990). Unexplained excess risk of bladder in men. *Journal of National Cancer Institute* 82:1636-1640.

Herr HW., Bochner BH., Sharp D. vd. (2007) Urachal carcinoma: contemporary surgical outcomes. *Journal of Urology* 178:74-78.

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.

Jakobsson J. vd. (2007). A novel polymorphism in the 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 5 (aldo-keto reductase 1C3) gene is associated with lower serum testosterone levels in caucasian men. *The Pharmacogenomics Journal* 7:282–289.

Jebar AH., Hurst Cd. vd., (2005). *FGFR3* and *Ras* gene mutations are mutually exclusive genetic events in urothelial cell carcinoma. *Oncogene* 24: 5218–5225

Jemal A., Siegel R., Ward E. vd. (2008). Cancer statistics. *CA: a cancer journal for clinicians* 58:71-96.

Kim W-J., Bae S-C., (2008). Molecular biomarkers in urothelial bladder cancer. *Cancer Science* 99(4):646-652.

Kunze E., Chang-Claude J., Frentzel-Beyme R. (1992). Life style and occupational risk factors for bladder cancer in Germany. A case-control study. *Cancer* 69:1776–1790.

Lan Q. vd.. (2004). Oxidative damage-related genes AKR1C3 and OGG1 modulate risks for lung cancer due to exposure to PAH-rich coal combustion emissions. *Carcinogenesis* 25:2177–2181.

Lan Q. vd. (2007). Genetic polymorphisms in the oxidative stress pathway and susceptibility to non-Hodgkin lymphoma. *Human Genetics* 121:161–168.

Lagwinski N., Thomas A., Stephenson AJ. vd. (2007). Squamous cell carcinoma of the bladder: a clinicopathologic analysis of 45 cases. *American Journal of Surgical Pathology* 31:1777-1787.

Lianes P., Charytonowicz E., Cordon-Cardo C. vd. (1998) Biomarker study of primary nonmetastatic versus metastatic invasive bladder cancer. *Clinical Cancer Research* 4:1267–1271.

Lopez-Abente G., Gonzalez CA., Errezola M vd. (1991). Tobacco smoke inhalation pattern, tobacco type, and bladder cancer in Spain. *American Journal of Epidemiology* 134:830–839.

Lu M-L., Wikman F., Orntoft TF. vd. (2002) Impact of alterations affecting the p53 pathway in bladder cancer on clinical outcome, assessed by conventional and array-based methods. *Clinical Cancer Research* 8: 171–9.

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* (2010) 21:1843–1850.

McCormick F. (1995). Ras-related proteins in signal transduction and growth control. *Molecular Reproduction and Development* 42(4):500-506.

Mitra AP., Datar RH., Cote RJ. (2006). Molecular pathways in invasive bladder cancer: new insights into mechanisms, progression and target identification. *Journal of Clinical Oncology* 24(35):5552-5564.

Sanchez-Carboya M., Cordon-Cardo C. (2007). Molecular alterations associated with bladder cancer progression. *Seminars in Oncology* 34(2):75-84.

Mitra AP., Birkhahn M., Cote JR. (2007). p53 and retinoblastoma pathways in

bladder cancer. *World Journal of Urology* 25(6):563–571.

Mommsen S., Aagaard J., Sell A (1983). An epidemiological study of bladder cancer in a predominantly rural district. *Scandinavian Journal of Urology and Nephrology* 17:307–312.

Montie JE., Clark PE., Eisenberger MA. vd. (2009). Bladder cancer. *The Journal of National Comprehensive Cancer Network* 7:8-39.

Montironi R., Lopez-Beltran A.(2005) The 2004 WHO classification of bladder tumors: a summary and commentary. *International Journal of Surgical Pathology* 13:143-153.

Nagaraj NS, Beckers S , Mensaha JK, vd., (2006). Cigarette smoke condensate induces cytochromes P450 and aldo-keto reductases in oral cancer cells. *Toxicology Letters* 165:182–194.

Palackal NT., Lee H., Harvey R., Blair I. vd. (2002). Activation of polycyclic aromatic hydrocarbon trans-dihydrodiol proximate and their functional overexpression in human lung carcinoma (A549) cells. *Journal of Biological Chemistry* 277(27):24799-24808.

Parkin DM. (2008). The global burden of urinary bladder cancer. *Scandinavian Journal of Urology and Nephrology* (218):12-20.

Penning TM., Drury JE. (2007a). Human Aldo-Keto Reductases: Function, gene regulation and single nucleotide polymorphisms. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 464(2):241-250.

Penning TM., Jin Y. (2007). Aldo-Keto Reductases and bioactivation/detoxication. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 47:263-292.

Sala M., Cordier S., Chang-Claude J. vd. (2000). Coffee consumption and bladder cancer in nonsmokers: a pooled analysis of case control studies in European countries. *Cancer Causes and Control* 11:925–931

Sarbassov D., Guertin, DA., Ali SM. vd. (2005). Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictorTOR complex. *Science* 307:1098–1101.

Sarkis AS., Dalbagni G., Cordon-Cardo C. vd. (1993). Nuclear overexpression of p53 protein in transitional cell bladder carcinoma: a marker for disease progression. *Journal of National Cancer Institute*. 85(1):53–9.

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

Siefker-Radtke AO., Dinney CP., Abrahams NA. vd. (2004). Evidence supporting

preoperative chemotherapy for small cell carcinoma of the bladder: a retrospective review of the M. D. Anderson cancer experience. *Journal of Urology* 172:481-484.

Silverman DT., Devesa SS., Moore LE., Rothman N. (2006). Bladder cancer. In: Schottenfeld D., Fraumeni J., *Cancer Epidemiology and prevention*. New York Oxford University Press.

Spruck CH., Ohneseit PF, Gonzalez-Zulucta M. vd. (1995). Two molecular pathways to transitional cell carcinoma of the bladder. *Cancer Research*. 54:784–8.

Srivastava DS., Kumar A., Mittal B. vd. (2004). GSTM1 and GSTT1 genes in bladder cancer: A study from North India. *Archives of Toxicology* 78:430-434.

Stein JP., Ginsberg DA., Grossfeld GD. vd. (1998). Effect of p21 WAF1/CIP1 expression on tumor progression in bladder cancer. *Journal of The National Cancer Institute* 90(14):1072–1079.

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

Stewart BW., Kleihus P., vd. (2003). *World cancer report*. Lyon, IARC press.

Stern MC., Johnson LR., Bell DA vd. (2002). XPD Codon 751 polymorphism, metabolism genes, smoking and bladder cancer risk. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention* 11:1004-1011.

Sugano K, Kakizoe T. (2006). Genetic alterations in bladder cancer and their clinical applications in molecular tumor staging. *Nature Clinical Practice Urology* 3(12):642–652.

Tripathi A., Folsom AR., Anderson KE. (2002). Iowa Women's Health Study. Risk factors for urinary bladder carcinoma in postmenopausal women. The Iowa Women's Health Study. *Cancer* 95:2316–2323.

Wakui M., Shiigai T. (2000) Urinary tract cancer screening through analysis of urinary red blood cell volume distribution. *International Journal of Urology* 7:248-253.

Wannamethee SG., Shaper AG., Walker M. (2001). Physical activity and risk of cancer in middle-aged men. *British Journal of Cancer* 85:1311–1316.

Wilkens LR, Kadir MM, Kolonel LN, Nomura AM vd. (1996). Risk factors for lower urinary tract cancer: the role of total Fluid consumption, nitrites and nitrosamines, and selected foods. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention* 5:161–166.

Wright JL., Black PC., Brown GA. vd. (2007). Differences in survival among patients with sarcomatoid carcinoma, carcinosarcoma and urothelial carcinoma of the bladder. *The Journal of Urology* 178:2302-2306.

Zeegers MP., Dorant E., Goldblum RA., van den Brandt PA. (2001). Are coffee, tea and total fluid consumption associated with bladder cancer risk? Results from the Netherlands Cohort Study. *Cancer Causes and Control* 12:231-238.

Zeegers MP., Tan FE., Dorant E., van Den Brandt PA. (2000). The impact of characteristics of cigarette smoking on urinary tract cancer risk: a meta- analysis of epidemiologic studies. *Cancer* 89:630-639

Zhao L., Vog PK. (2008). Helical domain and kinase domain mutations in p110(alpha) of phosphatidylinositol 3-kinase induce gain of function by different mechanisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105: 2652-2657.

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

Zhu D., Xing D., Shen X vd. (2004). A method to quantitatively detect H-ras point mutation based on electrochemiluminescence. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 324(2): 9464-969.

7.2. KİTAPLAR

Messing EM. (2008). Urothelial tumors of the bladder. *Campbell-Walsh Urology*. 9. ed. Philadelphia: Saunders-Elsevier. 2407-2446.

7.3. İNTERNET

Single Nucleotide Polymorphisms in Human AKR Genes (2009). Erişim tarihi: 22 Aralık 2010, <http://www.med.upenn.edu/akr/polymorphisms.shtml>

Globocan Faststats, Turkey (2008.) Erişim tarihi: 12 Ağustos 2010, <http://globocan.iarc.fr/factsheets/populations/factsheet.asp?uno=792>

National Cancer Institute, Core Genotyping Facility, Variant Genomic Positioning System (2009). Erişim tarihi: 3 Aralık 2010, <http://variantgps.nci.nih.gov/cgfseq/pages/home.do>

8. ÖZGEÇMİŞ

Necip Ozan Tiryakioğlu, 1984 yılında İstanbul' da doğdu. 2003 yılında İstanbul Alman Lisesi'nden mezun olduktan sonra 2004 yılında Haliç Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nde başladığı yüksek öğrenimini 2008 yılında tamamladı.

Yüksek lisans eğitimine Haliç Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nde devam etti. 2008 yılından beri Haliç Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nde Araştırma Görevlisi olarak görev yapmaktadır.