

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

TÜRK MESANE KANSERİ HASTALARINDA SİTOKROM P-450
POLİMORFİZMLERİNİN ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Hazırlayan
KUTLUHAN İNCEKARA

Tez Danışmanı
Yrd. Doç. Dr. NAGEHAN ERSOY

OCAK, 2009
İSTANBUL

T.C.
HALIÇ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı Yüksek Lisans öğrencisi **Kutluhan İNCEKARA** tarafından hazırlanan “Türk Mesane Kanseri Hastalarında Sitokrom P-450 Polimorfizmlerinin Araştırılması” adlı bu çalışma jürimizce Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Sınav Tarihi : 22.01.2009

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

İmzası :

Jüri Üyesi: Yrd.Doç.Dr.Nagehan ERSOY
(Danışman–H.Ü.Mol.Biy.ve Gen. ABD Öğr.Üyesi)

.....
n.erso

Jüri Üyesi : Prof.Dr.Hande ÇAĞLAYAN
(Boğaziçi Üniv. Öğr.Üyesi)

.....
Hande Çaylayan

Jüri Üyesi : Yrd.Doç Dr.Baki YOKEŞ
(H.Ü.Mol.Biy.ve Gen. ABD Öğr.Üyesi)

.....
Baki Yokeş

Jüri Üyesi : Yrd.Doç Dr.Ergül BERBER
H.Ü.Mol.Biy.ve Gen. ABD Öğr.Üyesi (Yedek)

.....
—

Jüri Üyesi : Yrd.Doç Dr.Hülya YAZICI ÖZBEK
İstanbul Üniv. Öğr.Üyesi (Yedek)

.....
—

ÖNSÖZ

Bu çalışma 2006 – 2009 yılları arasında T.C. Haliç Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nün bilimsel araştırma ve uygulama çalışmalarına verdiği destek ile hazırlanmıştır.

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmamın tamamlanması süresince büyük bir gayret ve özveriyle çalışmamı takip eden, gösterdiği sabır ve hoşgörüsü bana destek olan tez danışmanım Sayın Yrd. Doç. Dr. Nagehan Ersoy'a çok teşekkür ederim. Bu çalışmaya hasta bilgi ve örneklerini temin eden Uzm. Dr. Ömer Onur Çakır'a ve biyoistatistik değerlendirmelerde yardımcı olan Doç. Dr. Nural Bekiroğlu'na ayrıca teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam boyunca bana yardımcı olan yüksek lisans arkadaşlarım Arş. Gör. Mustafa Ömür Köse ve Aysun Acar'a teşekkürü bir borç bilirim.

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

Kutluhan İncekara
Ocak, 2009

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No.</u>
ÖNSÖZ	I
İÇİNDEKİLER	II
ŞEKİLLER LİSTESİ	V
TABLolar LİSTESİ	VI
KISALTMALAR LİSTESİ	VIII
ÖZET	X
SUMMARY	XII
1. GİRİŞ	1
1.1. Mesane Kanserin Patofizyolojisi	2
1.2. Mesane Kanserin Kliniği	5
1.2.1. Yüzeysel Mesane Kanserin Tedavisi	5
1.2.2. Kas İnvazyonu Yapan ve İlerlemiş Mesane Kanserin Tedavisi	6
1.3. Mesane Kanserin Moleküler Biyolojisi	6
1.3.1. Karsinogenezin Başlangıcı, Onkogenler ve Kromozomal Değişiklikler	7
1.3.1.1. Ras Genleri	7
1.3.1.2. c-myc	8
1.3.1.3. c-erbB-2	8
1.3.1.4. Tümör Baskılayıcı Genler	8
1.3.2. Hücre Döngüsü ve Regülasyonu	9
1.3.2.1. Retinablastoma ve p53	10
1.3.2.2. Tranzisyonel Hücre Karsinomunda Hücre Döngüsünün Düzenlenmesi	10
1.4. Mesane Kansere Yol Açtığı Düşünülen Mesleki, Çevresel ve Genetik Faktörler	11
1.4.1. Çevresel Faktörler	12
1.4.1.1. Sigara ve Diğer Tütün Ürünleri	12
1.4.1.2. Cinsiyet ve Yaş	12
1.4.1.3. Aile Öyküsü	13
1.4.1.4. İdrar Yolu Hastalıkları	13
1.4.1.5. Diyet, Sıvı Alımı ve İlaçlar	13
1.4.2. Mesleki Faktörler	13
1.4.3. Genetik Faktörler	14

1.5. Mesane Kanserinin Genetiği	15
1.5.1. Mesane Kanseri ile İlgili DNA Tamir Genleri ve Polimorfizmler	15
1.5.1.1. XRCC Genleri	15
1.5.1.2. XP Genleri	16
1.5.2. Mesane Kanseri ile İlgili Metabolik Genler ve Polimorfizmler	17
1.5.2.1. NAT Genleri	17
1.5.2.2. GST Genleri	18
1.5.2.3. Sülfotransferaz 1A1 (SULT1A1)	18
1.5.2.4. NAD(P)H dehidrojenaz, kinon 1 (NQO1)	18
1.5.2.5. MTHFR	19
1.5.2.6. Sitokrom P-450 (CYP) Genleri	19
2. AMAÇ	23
3. GEREÇLER	24
3.1. Çalışmada Kullanılan Örnekler	24
3.2. Kimyasallar	24
3.3. Tamponlar, Solüsyonlar ve Enzimler	24
3.3.1. Kit ile DNA İzolasyonu	24
3.3.2. Hızlı Genomik DNA İzolasyonu (RGDE) Metodu ile Kandan DNA İzolasyonunda Kullanılan Tamponlar ve Solüsyonlar	25
3.3.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Tamponları ve DNA Polimeraz Enzimleri	25
3.3.4. Restriksiyon Enzimleri ve Reaksiyon Tamponları	26
3.3.5. Elektroforez Tamponları ve Jel Sistemleri	28
3.3.6. Oligonükleotid Primerler	28
3.3.7. DNA Büyüklük Markörleri	29
3.3.8. Cihazlar	29
4. YÖNTEMLER	31
4.1. Periferel Kan Örneklerinden DNA İzolasyonu	31
4.1.1. RGDE Metodu	31
4.1.2. Kit ile DNA İzolasyonu	31
4.2. Yanak İçi Epitelinden Kit ile DNA İzolasyonu	32
4.3. DNA'nın Nitel ve Nicel Analizi	33
4.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu	33
4.5. Restriksiyon Enzimi Analizi	35

4.6. Jel Elektroforezi	36
4.6.1. Agaroz Jel Elektroforezi ve Etidyum Bromid Boyaması.....	36
4.7. Mesane Kanseri Hastalığının Moleküler Analizi.....	37
5. SONUÇLAR	38
5.1. Örneklerin Tanımı.....	38
5.2. DNA İzolasyonu	38
5.3. CYP Lokuslarının PCR-RFLP Yöntemi ile Moleküler Analizi.....	39
5.3.1. CYP1A1 Lokusunun Moleküler Analizi.....	39
5.3.2. CYP1B1 Lokusunun Moleküler Analizi.....	43
5.3.3. CYP2D6 Lokusunun Moleküler Analizi.....	44
5.3.4. CYP2E1 Lokusunun Moleküler Analizi	45
5.4. Verilerin İstatistiksel Analizi	48
5.4.1. Hardy-Weinberg Analizi ve Alel Frekansları	48
5.4.2. CYP Polimorfizmlerinin Mesane Kanseri ile İlişkilendirilmesi	50
5.4.2.1.Çapraz Tablolar ve Ki-Kare Bağımsızlık Testi.....	51
5.4.2.2. PLINK ile Asosiyasyon Testleri	56
5.4.3. Cinsiyet ve Hastalık İlişkisinin Araştırılması	58
5.4.4. Yaş ve Hastalık İlişkisinin Araştırılması.....	59
5.4.5. Sigara İçimi ve Hastalık İlişkisinin Araştırılması	60
5.4.6. Lojistik Regresyon Analizi ve Görelî Orantılar	61
6. TARTIŞMA	62
7. KAYNAKLAR	71
8. ÖZGEÇMİŞ	80

ŞEKİLLER LİSTESİ

	<u>Sayfa No.</u>
Şekil 1.1. Yassı ürotel karsinoma in situ	3
Şekil 1.2. Alçak dereceli ve yüksek dereceli papiler karsinoma.....	4
Şekil 1.3. Mesane ve tümör tipleri	4
Şekil 1.4. Mesane tümörlerinin iki farklı moleküler yolağı.....	7
Şekil 1.5. INK4A/ARF lokusu ve hücre döngüsü regülasyonu.....	11
Şekil 1.6. Karsinojenlerin metabolik aktivasyon yolları.....	15
Şekil 1.7. m1, m2, m3 ve m4 mutasyonlarının insan CYP1A1 geni üzerinde lokalizasyonu	20
Şekil 1.8. CYP1B1 geninin yapısı	21
Şekil 5.1. Genomik DNA örneklerinin %1'lik agaroz jelde görünümü	39
Şekil 5.2. M3F-P80 PCR ürününün %2'lik agaroz jelde görüntülenmesi.....	39
Şekil 5.3. MspI restriksiyon kesimi ürünlerinin %2'lik agaroz jelde görüntülenmesi.....	40
Şekil 5.4. M2F-M2R PCR ürününün %2'lik agaroz jelde görünümü	40
Şekil 5.5. BsrDI kesim ürünlerinin %2'lik agaroz jelde görünümü	40
Şekil 5.6. BsaI kesim ürünlerinin %2'lik agaroz jelde görünümü.....	40
Şekil 5.7. 1B1FEco57I – 1B1REco57I PCR ürününün %2'lik agaroz jelde görünümü	43
Şekil 5.8. Eco57I kesim ürünlerinin %2'lik agaroz jelde görünümü.....	43
Şekil 5.9. 2D6*Bex3 – 2D6*Bint4 PCR ürününün %2'lik agaroz jelde görünümü .	44
Şekil 5.10. ScrFI kesim ürünlerinin %2'lik agaroz jelde görünümü	44
Şekil 5.11. 2E1*5bF – 2E1*5bR PCR ürününün %2'lik agaroz jelde görünümü.....	45
Şekil 5.12. PstI kesim ürünlerinin %2'lik agaroz jelde görünümü	45
Şekil 5.13. RsaI kesim ürünlerinin %2'lik agaroz jelde görünümü.....	46
Şekil 5.14. 2E1*6 – 2E1*62 PCR ürününün %2'lik agaroz jelde görünümü.....	46
Şekil 5.15. DraI kesim ürünlerinin %2'lik agaroz jelde görünümü	46
Şekil 5.16. Mesane Kanserli Hastaların Frekans – Yaş Grafiği	60

TABLOLAR LİSTESİ

	<u>Sayfa No.</u>
Tablo 1.1. Ürotel neoplazmların Dünya Sağlık Örgütü'nce sınıflandırılması	2
Tablo 1.2. Mesane kanserinin semptomları.....	5
Tablo 1.3. Yüzeysel mesane kanserinin pratik sınıflandırılması	5
Tablo 1.4. Bilinen mesane karsinojenleri ve bunlara maruz kalınan endüstriyel alanlar	14
Tablo 3.1. CYP lokuslarındaki polimorfik bölgeleri çoğaltmak için kullanılan primer dizileri	28
Tablo 4.1. Polimeraz zincir reaksiyonu içerikleri	34
Tablo 4.2. PCR ısı döngüsü şartları.....	34
Tablo 4.3. Restriksiyon enzimi kesim şartları	36
Tablo 4.4. CYP lokuslarındaki polimorfizmler	37
Tablo 5.1. CYP1A1 (m1) genotip frekansları	41
Tablo 5.2. CYP1A1 (m3) genotip frekansları	41
Tablo 5.3. CYP1A1 (m2) genotip frekansları	41
Tablo 5.4. CYP1A1 (m4) genotip frekansları	41
Tablo 5.5. CYP1A1 mutasyonlarının ve alellerinin frekansları	42
Tablo 5.6. CYP1A1 genotip dağılımları	42
Tablo 5.7. Gruplara göre CYP1A1 genotip dağılımı	42
Tablo 5.8. CYP1B1 genotip frekansları	43
Tablo 5.9. CYP2D6 genotip frekansları	44
Tablo 5.10. PstI genotip frekansları	47
Tablo 5.11. RsaI genotip frekansları	47
Tablo 5.12. DraI genotip frekansları	47
Tablo 5.13. CYP1A1 (m1) polimorfizmi frekansları	48
Tablo 5.14. CYP1A1 (m2) polimorfizmi frekansları	48
Tablo 5.15. CYP1A1 (m4) polimorfizmi frekansları	48
Tablo 5.16. CYP1B1 polimorfizmi frekansları	49
Tablo 5.17. CYP2D6 polimorfizmi frekansları	49
Tablo 5.18. CYP2E1 PstI polimorfizmi frekansları	49
Tablo 5.19. CYP2E1 RsaI polimorfizmi frekansları	49
Tablo 5.20. CYP2E1 DraI polimorfizmi frekansları	49
Tablo 5.21. Örneklerin Hardy-Weinberg Uygunluk Testi (PLINK).....	50

Tablo 5.22. Grup * CYP1A1 m1 çapraz tablosu.....	51
Tablo 5.23. Grup * CYP1A1 m1 ki-kare testleri.....	51
Tablo 5.24. Grup * CYP1A1 m2 çapraz tablosu.....	51
Tablo 5.25. Grup * CYP1A1 m2 ki-kare testleri.....	52
Tablo 5.26. Grup * CYP1A1 m4 çapraz tablosu.....	52
Tablo 5.27. Grup * CYP1A1 m4 ki-kare testleri.....	52
Tablo 5.28. Grup * CYP1A1 alelleri çapraz tablosu.....	53
Tablo 5.29. Grup * CYP1A1 alelleri ki-kare testleri	53
Tablo 5.30. Grup * CYP1B1 çapraz tablosu	53
Tablo 5.31. Grup * CYP1B1 ki-kare testleri.....	54
Tablo 5.32. Grup * CYP2D6 çapraz tablosu.....	54
Tablo 5.33. Grup * CYP2D6 ki-kare testleri.....	54
Tablo 5.34. Grup * CYP2E1*5B (PstI) çapraz tablosu.....	55
Tablo 5.35. Grup * CYP2E1*5B (PstI) ki-kare testleri	55
Tablo 5.36. Grup * CYP2E1*6 (DraI) çapraz tablosu	55
Tablo 5.37. Grup * CYP2E1*6 (DraI) ki-kare testleri	56
Tablo 5.38. Fisher ile düzeltilmiş test sonuçları (PLINK)	57
Tablo 5.39. Cinsiyet * Grup çapraz tablosu	58
Tablo 5.40. Cinsiyet * Grup ki-kare testleri.....	58
Tablo 5.41. Risk tahmini	58
Tablo 5.42. Yaş - Grup istatistikleri	59
Tablo 5.43. T Testi	59
Tablo 5.44. Sigara Kullanımı * Grup çapraz tablosu	60
Tablo 5.45. Sigara Kullanımı * Grup ki-kare testleri.....	60
Tablo 5.46. Risk tahmini	61
Tablo 5.47. Lojistik regresyon analizi.....	61

KISALTMALAR LİSTESİ

(NH₄)₂SO₄	: Amonyum sülfat
BCG	: Bacillus Calmette-Guerin
bç	: Baz çifti
BPB	: Bromofenol mavisi
CDK	: Siklin bağımlı kinaz
CH₅N₃·HCl	: Guanidin hidrolorit
CH₅N₃·HSCN	: Guanidin tiyosiyenat
CIS	: Karsinoma in situ
CYP	: Sitokrom P-450
df	: Serbestlik derecesi
dNTP	: Deoksiribonükleotid
EDTA	: Etilen diamin tetraasetik asit
EtBr	: Etidyum bromid
FGFR3	: Fibroblast Büyüme Faktörü Reseptörü 3
GDP	: Guanozin difosfat
GST	: Glutatyon S-transferaz
GTP	: Guanozin-5'-trifosfat
HW	: Hardy-Weinberg
L	: Litre
LD	: Bağlantı eşitsizliği
LOH	: Heterozigotluğun kaybı
M	: Molar
MgCl₂	: Magnezyum Klorür
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
MTHFR	: Metilentetrahidrofolat redüktaz
NaCl	: Sodyum klorür
NaI	: Sodyum İyodit
NAT	: N-asetiltransferaz
nm	: Nanometre
NQO1	: NAD(P)H dehidrojenaz, kinon 1
OR	: Göreli orantı

PAH	: Polisiklik Aromatik Hidrokarbon
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PM	: Zayıf metabolizör
PUNLMP	: Alçak malin potansiyelli papiler ürothel neoplazm
Rb	: Retinoblastoma
RFLP	: Restriksiyon Fragman Uzunluk Polimorfizmi
RGDE	: Rapid Genomic DNA Extraction
SCC	: Skuamöz Hücre Karsinomu
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
SNP	: Tek nükleotid polimorfizmi
SULT	: Sulfotransferaz
TBE	: Tris-Borik asit-EDTA
TCC	: Tranzisyonel Hücre Karsinomu
TE	: Tris-EDTA
U	: Ünite
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre
χ²	: Ki-kare

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

TÜRK MESANE KANSERİ HASTALARINDA SİTOKROM P-450
POLİMORFİZMLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Hazırlayan
Kutluhan İncekara

Tez Danışmanı
Yrd. Doç. Dr. Nagehan Ersoy

Ocak, 2009

ÖZET

Mesane kanseri, dünya genelinde erkeklerde dördüncü, kadınlarda yedinci en sık görülen kanser türüdür. En iyi bilinen etiyolojik risk faktörleri, meslek sebebi ile maruz kalınan kanserojenler ve sigara içimidir. Genetik faktörler ve çevre arasındaki etkileşimin mesane kanseri oluşumu için farklı seviyelerde yatkınlık oluşturduğu düşünülmektedir.

Sitokrom P-450 (CYP) süper-ailesi enzimleri polisiklik aromatik hidrokarbonlar, nitroaromatik bileşikler ve arilaminler gibi kanserojenlerin metabolizmasının ilk basamaklarından birini katalizler. Bu enzim sistemi hayli polimorfiktir ve CYP genleri içindeki bu polimorfizmler pek çok kanser türü ile ilişkili bulunmuştur. Buna ek olarak, CYP polimorfizm frekansları etnik varyasyon gösterir ve bu nedenle popülasyona yönelik çalışmalar gerektirmektedir.

Bu çalışmada, CYP1A1 (m1, m2, m3, m4), CYP1B1 (Leu432Val), CYP2D6 (int3/ex4) and CYP2E1 (*Pst*I, *Rsa*I, *Dra*I) polimorfizmleri, cinsiyet, yaş ve sigara içimi gibi çevresel faktörler ile birlikte Türk popülasyonunda çalışılmış ve bu polimorfizmler ile mesane kanseri arasındaki ilişki araştırılmıştır. İncelenen

CYP1A1, CYP2D6 ve CYP2E1 polimorfizmleri hastalıkla ilişkilendirilememiş, ancak CYP1B1 432Val alelinin mesane kanseri oluşumu riskini arttırdığı bulunmuştur (düzeltilmiş OR = 3,080, 95% CI: 1,204 – 7,874). Yaş, cinsiyet ve sigara içimi de mesane kanserinin artan riski ile alakalı bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: Sitokrom P-450, CYP1A1, CYP1B1, CYP2D6, CYP2E1, mesane kanseri, polimorfizm

SUMMARY

Bladder cancer is the fourth most common cancer in men and the seventh in women globally. Well-known etiological risk factors are occupational exposure to certain carcinogens and cigarette smoking. It is thought that the interaction between genetic factors and the environment accounts for the different levels of susceptibilities to the development of bladder cancer.

The cytochrome P-450 (CYP) superfamily of enzymes catalyses one of the first steps in the metabolism of carcinogens such as polycyclic aromatic hydrocarbons, nitroaromatic compounds and arylamines. This enzyme system is highly polymorphic and these polymorphisms within CYP genes have been found to be associated with many cancer types. In addition, frequency of CYP polymorphisms shows ethnic variations among populations, so it necessitates population based studies.

In this study, CYP1A1 (m1, m2, m3, m4), CYP1B1 (Leu432Val), CYP2D6 (int3/ex4) and CYP2E1 (*Pst*I, *Rsa*I, *Dra*I) polymorphisms and their interaction with environmental factors such as sex, age and smoking are studied in Turkish population and association between these polymorphisms and bladder cancer is investigated. Investigated CYP1A1, CYP2D6 and CYP2E1 genes are shown not to be associated with the disease, however, it is found that CYP1B1 432Val allele increases the risk of bladder cancer (adjusted OR = 3,080, 95% CI: 1,204 – 7,874). Age, sex and smoking are also found to be associated with increased risk of bladder cancer.

Keywords: Cytochrome P-450, CYP1A1, CYP1B1, CYP2D6, CYP2E1, bladder cancer, polymorphism

1. GİRİŞ

Mesane kanseri bugün dünyada en çok görülen kanserler arasında erkeklerde dördüncü, kadınlarda yedinci sırada yer almaktadır ve idrar yollarında görülen en önemli kanserdir (Sobti vd., 2005; Shen vd., 2003; Sanyal vd., 2003). En yüksek oranlar Kuzey Amerika, Batı Avrupa, Doğu Avrupa'nın güneyi ve Asya'nın pek çok bölümünde görülmüştür (Moore vd., 2004). 2000 yılında dünyada yaklaşık 336000 yeni vaka teşhis edilmiştir (Shen vd., 2003). Amerika'da 2005 yılında 63210 yeni vaka bildirilmiş ve mesane kanseri 13100 kişinin ölümüne sebebiyet vermiştir (Lin vd., 2006). Mısır gibi gelişmekte olan ülkelerde ise toplam kanser vakalarının % 30,8'ini mesane kanseri oluşturmaktadır (Anwar vd., 1996). Türkiye'de ise Türk Kanser Araştırma ve Savaş Kurumu'nun hazırladığı Kanser Yüğü 2006 Raporu'na göre mesane kanseri, görülen kanser türleri arasında yaklaşık % 7,8 ile üçüncü sırada yer almaktadır.

Teşhis edilen mesane tümörlerinin yaklaşık % 90'ı Tranzisyonel Hücre Karsinomu (TCC), % 5'i ise Skuamöz Hücre Karsinomu'dur (SCC). Skuamöz hücre karsinomu şistozomiyazis, kateter yerleştirme, siklofosamid kemoterapi gibi kronik mesane irritasyonu durumlarında daha yaygındır. Geri kalan % 5 ise adenokarsinom, karsinosarkom ve diğer sarkom benzeri lezyonlardır. Teşhis aşamasında hastaların çoğu yüzeysel tümöre (Ta ve T1) sahiptir fakat % 10-30 kadarında invaziv (T2 ve üstü) tümör görülür. Yüzeysel tümörlerin yaklaşık % 70'i ilk operasyondan sonra tekrarlar ve hastaların % 10-15'inde tümör daha invaziv forma ilerler. Hastalığın ileri aşamalarında radikal sistektomi gibi kapsamlı cerrahi müdahale (T2, T3b) veya kemoterapi ve radyoterapi (T4, N+ veya M+) uygulanır. Yüksek tekrarlama oranı (% 70) ve hastalığın ilerleme eğilimi yüzeysel mesane kanseri olan hastaların titiz takibini gerektirmektedir (Halachmi vd., 2001)

Pek çok epidemiyolojik ve laboratuvar çalışmalarında sigara içimi, mesleki ve diğer çevresel faktörler yüzünden maruz kalınan kimyasalların mesane kanseri için risk oluşturduğu bildirilmiştir. Bunların başında aromatik aminler (2-naftilamin, benzin, 4-aminobifenil, vs.), polisiklik aromatik hidrokarbonlar ve N-nitrozo bileşikler gelir (Choi vd., 2003; Hung vd., 2004a; Anwar vd., 1996; Hung vd., 2004b; Shen vd., 2003). Aromatik aminler gibi pek çok kimyasal karsinojen tek

başına genetik hasar yaratmak için yeterli değildir ve mutasyon yaratabilmeleri için metabolik aktivasyon gereklidir.

Bu bileşiklerin aktivasyonu ve detoksifikasyonunu sağlayan zenobiyotik mekanizmada yer alan enzimleri kodlayan genler insanda polimorfizm gösterir. Bu polimorfizmlerin enzim aktivitesini değiştirdiği düşünülmektedir. Dolayısıyla bu kimyasalların kanser yapıcılığı sadece maruz kalma oranına değil, aynı zamanda bireyin sahip olduğu genetik yapıya da bağlıdır.

Bu karsinojenlerin DNA'da direkt ya da dolaylı olarak yol açtığı hasarı tamir etmek ve genom bütünlüğünü korumak amacıyla değişik biyolojik mekanizmalar hasara cevap verir. DNA tamir kapasitesindeki varyasyon DNA hasarına karşı değişik biyolojik cevaplara, sonuçta da neoplazm geliştirmek için değişik yatkınlığa sebep olur. DNA tamir genlerinde amino asit değişimine sebep olan polimorfizmler kişinin DNA hasarını tamir etme kapasitesini etkileyebilir ve sonuçta kişiyi kansere yatkın kılabilir (Shen vd., 2003).

Sonuç olarak mesane kanserine, maruz kalınan kimyasallar ve ilgili genlerdeki moleküler farklılıklar ortak sebep olmaktadır. Bu genlerin alel frekansı etnik farklılıklar göstermekte ve popülasyonlara yönelik çalışmalar gerektirmektedir.

1.1. Mesane Kanserinin Patofizyolojisi

Malin mesane tümörlerinin yaklaşık %90-95'i ürotel hücre (tranzisyonel hücre) karsinomudur. Geri kalanı ise mezenşimal neoplazmlar ve diğer epitel tümör tipleridir (Reuter, 2006). Mesane kanseri, tümörün sitolojik ve büyüme paterni karakteristiklerine göre sınıflandırılmış ve tümörün dokuda ilerleyişine göre evrelendirilmiştir. Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) 1998'de yayınladığı sınıflandırma Tablo 1.1' de gösterilmiştir.

Tablo 1.1. Ürotel neoplazmların Dünya Sağlık Örgütü'nce sınıflandırılması (Reuter, 2006)

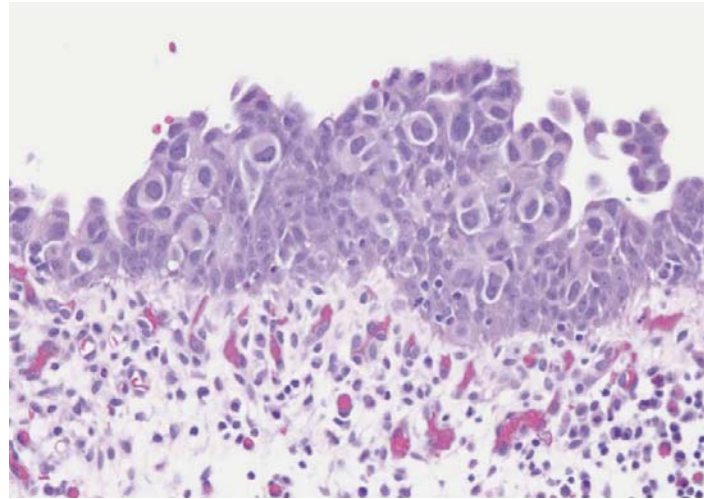
- Normal
- Hiperplazi
 - Yassı hiperplazi
 - Papiler hiperplazi
- Atipili yassı lezyonlar
 - Reaktif (inflamatuvar) atipi
 - Dispalazi
 - Karsinoma in situ
- Papiler neoplazmlar
 - Papiloma
 - PUNLMP (Alçak malin potansiyelli papiler ürotel neoplazmlar)
 - Papiler karsinoma, yüksek dereceli
 - Papiler karsinoma, alçak dereceli

Yassı ürotel hiperplazi, sitolojik atipi olmadan önemli ölçüde kalınlaşmış mukozadan oluşur. Alçak dereceli papiler ürotel neoplazmlar ile birlikte görülebilir fakat kendi başına malin potansiyeli olduğuna dair bir bilgi yoktur.

Papiler ürotel hiperplazi dalgali bir büyüme ile değişen kalınlıktaki ürotel ile karakterize edilir. Papiler ürotel tümörlerin tersine bu lezyonlar ayırt edici fibrovasküler yapılardan yoksundur.

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

Karsinoma *in situ* (CIS), ürotelin yassı lezyonudur ve invazif kanser prekürsörlerini gösterir (Şekil 1.1.).



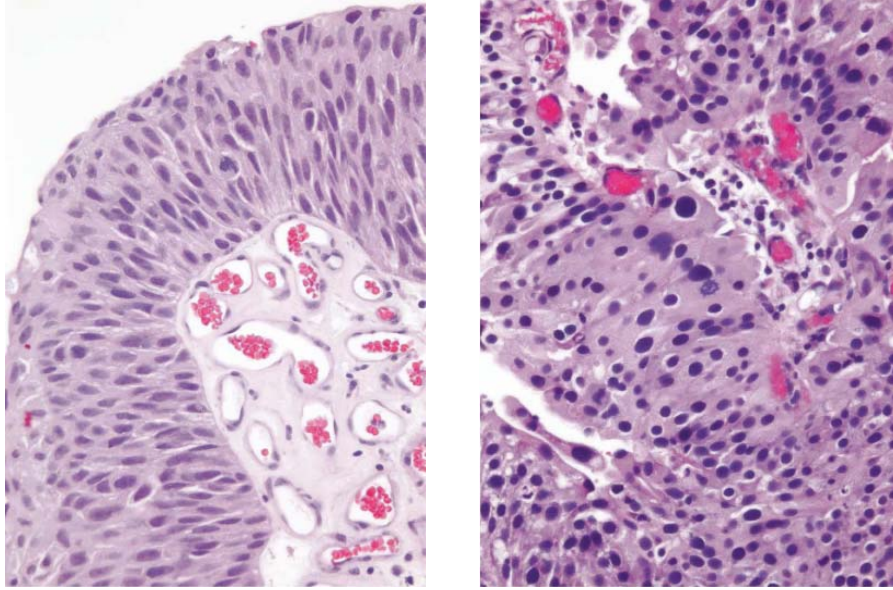
Şekil 1.1. Yassı ürotel karsinoma *in situ* (Kırkcalı vd., 2005)

Papiloma, normal ürotel ile çevrilmiş merkezi fibrovasküler yapıların ayrık, papiler büyümesidir. Normal görünümlü ürotelin papiler yapı göstermesi ile teşhis edilir. Bu lezyonların çoğu alındıktan sonra tekrar etmez.

PUNLMP, malin olmanın sitolojik özelliklerini göstermeyen fakat papilomaya göre daha kalınlaşmış bir ürotele sahip olan lezyondur. Biyolojik olarak çok düşük ilerleme riskine sahiptir.

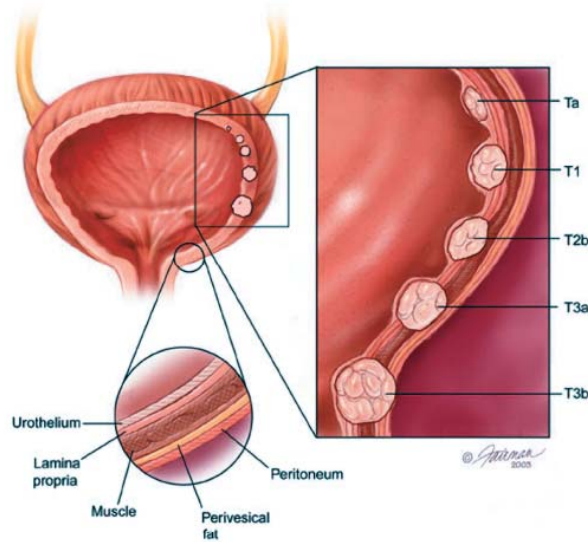
Alçak dereceli papiler karsinoma, genel olarak muntazam görünümlüdür fakat yapısal ve sitolojik özelliklerindeki varyasyonlar mikroskop altında yüksek büyütme gücüyle rahatça görülebilir (Şekil 1.2.).

Yüksek dereceli papiler karsinoma düzensiz bir görünüme, önemli ölçüde yapısal ve sitolojik anormalliklere sahiptir (Şekil 1.2.). Mikroskop altında düşük büyütme gücüyle tanımlanabilir (Kırkcalı, 2005).



Şekil 1.2. Alçak dereceli (sol) ve yüksek dereceli (sağ) papiler karsinoma (Kırkcalı, 2005)

Mesane içi boş ve esnek bir organdır. Mesane tümörleri yüzeysel (Ta ve T1) ve invazif (T2, T3, T4) oluşlarına göre derecelendirilir (Şekil 1.3.). Ta tümörleri ekzofitik yani dışa doğru büyüme gösterirler ve ürotelyumun ötesine geçmezler. T1 tümörleri lamina propriyaya invaze olmuştur, fakat henüz muskularis propriya'ya geçmemiştir. T2 tümörleri musküler propriyaya, T3 tümörleri perivezikal dokuya invaze olmuştur. T4 tümörleri ise diğer organ yapılarına ulaşmıştır (Luis vd., 2007).



Şekil 1.3. Mesane ve tümör tipleri (Luis vd., 2007)

1.2. Mesane Kanserinin Kliniği

Mesane tümörü olan bir hastada görülen en belirgin semptom ağrısız hematüridir. Bununla birlikte Tablo 1.2’de verilen diğer semptomlar da hastalıkta sıklıkla görülebilir.

Semptom	Tanımı
Ağrısız hematüri	Ağrı, sık idrara çıkma veya dizüri olmaksızın idrarda kan görülmesi. Hastaların %30 kadarında idrar yolu malignitesi bulunur.
Mikroskopik hematüri	İdrarda çıplak gözle görülmeyecek miktarda kırmızı kan hücrelerinin bulunması. Bu hastaların yaklaşık %10’unda malin hastalık bulunur.
İrritatif Semptomlar	Dizüri, sık idrara çıkma, suprapubik ağrı ile birlikte tam dolu mesane. Mesane tümörü olan hastaların %25’inde bu semptomlardan biri veya daha çoğu bulunur.
Yineleyici idrar yolu enfeksiyonu	Yineleyici bakteriyel sistiti olan yaşlı (50 ve üzeri) hastalarda altta yatan bir tümör olasılığı düşünülür.
Sistematik semptomlar	Bel ağrısı, kilo kaybı, bitkinlik, anoreksi, kemik ağrısı, patolojik kırık, öksürük.

Semptomların görüldüğü hastalarda sigara, iş yerinde maruz kalınan olası karsinojenler, önceki tümör rezeksiyonu gibi hastanın öyküsü tanımlanır. Duruma göre tam bir klinik tanı için idrar analizi, radyografik incelemeler, sistoskopi, transüretal rezeksiyon ve biyopsi yapılır.

1.2.1. Yüzeysel Mesane Kanserinin Tedavisi

İnvazif olmayan ve yüzeysel tümörleri (Ta ve T1) olan hastalar bazı prognostik faktörlere göre sınıflandırılabilirler (Tablo 1.3.).

Yüzeysel tümör özelliklerine göre	
İyi	Kötü
Tek tümör	Çok sayıda tümör
Evre Ta	Evre T1
Düşük grade	Yüksek grade
Hiç alan değişikliği yok	Atipi veya displazi
Diploid	Anöploid
Negatif sitoloji	Pozitif sitoloji
Özelliklere ve yineleme öyküsüne göre	
Baş belası	İyi özellikli, tek oluşumlu ve nadir yinelemeler
Can sıkıcı	İyi özellikli fakat sık yinelemeler
Tehlikeli	Kötü özellikli, herhangi bir oluşum veya yineleme

Soliter, düşük dereceli Ta lezyonu olan hastalar yineleme veya progresyon için düşük risk altındadırlar. Çok sayıda düşük dereceli Ta tümörleri olan hastalar atipi ve displazi gösteriyorsa yineleme veya progresyon için orta dereceli risk altındadırlar. Sık yinelemeler gösteren düşük dereceli Ta tümörleri olan hastalara her yinelemede cerrahi rezeksiyon yapılması gereklidir. Bu durum “can sıkıcı”dır fakat yaşamı tehdit etmez ve mesane korunur. Karsinoma *in situ*'su olan veya CIS ile birlikte veya CIS olmaksızın yüksek dereceli, yüksek evreli papiler tümörleri olan hastalar yineleme ve progresyon için yüksek veya çok yüksek risk altındadırlar.

Mesane kanserinin tedavisinde anti-kanser ilaçlarının intravezikal olarak kullanımı söz konusu olmaktadır. Bu yöntemin yinelemenin önlenmesinde hafif bir yararı olduğu fakat evrede ilerlemenin önlenmesine yararı olmadığı bilinmektedir. En sık kullanılan ajanlar tiotepa, doksorubisin, ipirubisin ve mitomisin C'dir. İntravezikal kemoterapiye ek olarak BCG ile immunoterapi de uygulanmaktadır. BCG'nin yinelemenin önlenmesinde en etkili ajan olduğu ve ayrıca tümör progresyonunu önlediği gösterilmiştir (Bailey ve Sarosdy, 2001).

1.2.2. Kas İnvazyonu Yapan ve İlerlemiş Mesane Kanserinin Tedavisi

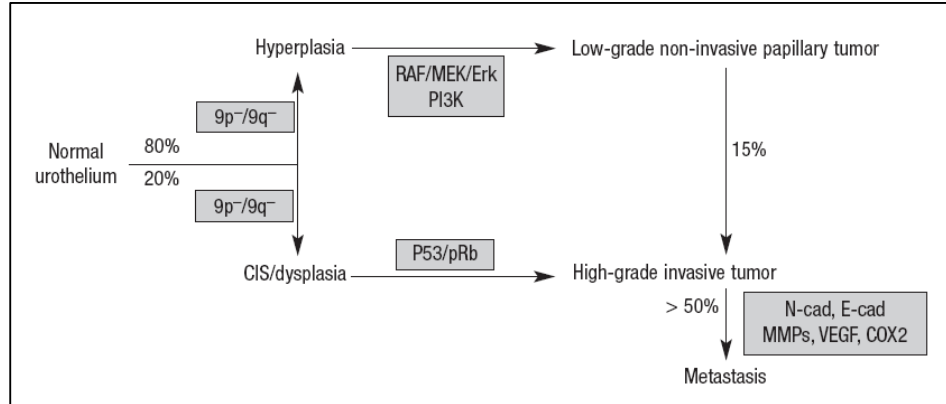
Mesane kanserinde kas invazyonu görülmesi kötü prognozun işaretidir. Bu hastalara radyoterapi ve mesanenin çıkarılmasını (sistektomi) içeren tedaviler uygulanır. Bu hastaların 5 yıl içinde sağ kalım oranı %50 civarındadır.

T4 tümörü olan hastaların sadece %10'u 5 yıl içinde sağ kalır. Metastatik tümörü olanların ise %95'i 1 yıl içinde ölür. Bu yüzden bu hastaların tedavisi yaşam süresini uzatmaktan çok yaşam kalitesini arttırmaya yönlendirilir (Bailey ve Sarosdy, 2001).

1.3. Mesane Kanserinin Moleküler Biyolojisi

Mesane kanserinde papiler ve non-papiler olmak üzere en az iki yolak olduğu düşünülmektedir (Şekil 1.4.). Papiler lezyonlar hiperplazik ürotelyumdan meydana gelirken invazif tümörler displazik ürotelyumdan meydana gelir. Papiler tümörler genellikle RAF/MEK/ERK ve PIK3CA yolağındaki genlerin değişimi ile alakalıdır (Ör. FGFR3). Non-papiler invazif tümörler ise p53 ve pRb yolağındaki değişimlerle alakalıdır. Her iki yolağın da başlangıcında 9. kromozomda değişimler olduğu düşünülmektedir (Luis vd., 2007).

Düşük dereceli mesane kanserli hastaların yaklaşık %80'i süperfisyel mukoza ile sınırlıdır. Bu yüzeysel tümörlerin tekrarlama riski %70'lerdedir ve bunların da yaklaşık %30'u daha yüksek dereceye ve evreye ilerleme gösterir. Tüm mesane kanserli hastaların %15-30 kadarı başta kas invazif özellik gösterir ve bunların da yaklaşık %50'si 2 yıl içinde metastatik olarak nükseder (Williams ve Stein, 2004).



Şekil 1.4. Mesane tümörlerinin iki farklı moleküler yolağı (Luis vd., 2007)

1.3.1. Karsinogenezin Başlangıcı, Onkogenler ve Kromozomal Değişiklikler

Mesane kanserindeki DNA değişiklikleri sitogenetikten heterozigotluğun kaybına (LOH) kadar pek çok yönden çalışılmıştır. DNA değişikliklerinin mutasyonlar, translokasyonlar, alel kaybı gibi pekçok nedeni olabilir. Bu değişimler ifade edilen protein ürünlerini değiştirebilir.

Moleküler onkolojideki ilk çalışmalar onkogenler üzerine yoğunlaşmıştır. Onkogenler normal hücrel genlerdir, fakat normal gen ürününün aşırı ekspresyonu veya protein ürününün değişmiş fonksiyonu malin fenotip ve tümör oluşumuna yol açar. Normal gen ürününün aşırı ekspresyonu genellikle güçlü bir promotörün olduğu gen bölgesindeki kromozomal translokasyon veya gen amplifikasyonu ile gerçekleşir. Mutasyona uğramış protein ürününün ekspresyonu malin fenotipin aktivasyonuna da yol açabilir.

1.3.1.1. Ras Genleri

H-ras geni mesane kanserinin gelişmesi ve ilerlemesiyle ilgili olduğu düşünülen aktif bir onkogendir. Ras gen ailesi üzerinde yapılan mutasyon çalışmaları mesane kanserlerinin %20'sinde H-ras geninin kodon 12 ve 61 bölgelerinde değişimler olduğunu göstermiştir (Williams ve Stein, 2007). H-ras, K-ras ve N-ras,

RAF/MEK/ERK ve PI3K/AKT/PTEN kaskadlarını aktive eden monomerik GTPaz'ları kodlarlar. Diğer GTP bağlanan proteinler gibi Ras, açma-kapama düğmesi gibi işleyen iki farklı konformasyona sahiptir. GTP bağlıyken aktif, GDP bağlıyken inaktif durumdadır. Onkogenik Ras mutasyonları Ras'ı aktive edici proteinlerin (GAPs) etkisine duyarsızlaştırırlar ve molekülün sürekli olarak GTP bağlanmış aktif formda kalmasına sebep olurlar (Luis vd., 2007; Alberts vd., 2002).

1.3.1.2. c-myc

Myc gen ailesi DNA bağlanma aktivitesi de olan nükleer fosfoproteinleri kodlarlar ve hücrel proliferasyon için önemli bir düzenleyicidirler. c-myc onkogeni mesane kanseri de dahil olmak üzere pek çok tümörde aşırı eksprese olmaktadır. Kromozomal translokasyonlar ve gen amplifikasyonları myc geninin aşırı eksprese olmasına sebep olur ve bu da hücrel proliferasyon ile sonuçlanır. C-myc geninin mesane kanserindeki mekanizması tam bilinmemekle birlikte, bu genin aşırı ekspresyonunun yüksek dereceli mesane kanseri ile ilişkili olduğu saptanmıştır.

1.3.1.3. c-erbB-2

Proto-onkogen c-erbB-2 (HER-2/neu), epidermal büyüme faktörü reseptörüne benzeyen bir transmembran glikoproteini kodlar. Tirozin kinaz aktivitesi vardır ve hücrel büyümeyi stimule edebilir. Son zamanlarda yapılan birkaç çalışma erbB-2 ekspresyonunun mesane kanserli hastalarda yüksek evreli tümörler, artmış tümör progresyonu, metastaz görülmesindeki artış ve yaşam süresinin kısalması ile alakalı olduğunu göstermiştir. Fakat başka çalışmalar bu sonuçlarla çelişmektedir ve erbB-2'nin mesane kanseri üzerindeki etkilerini tam olarak anlamak için daha fazla araştırma gerekmektedir.

1.3.1.4. Tümör Baskılayıcı Genler

Moleküler teknikler kullanılarak son yıllarda yapılan kapsamlı araştırmalar, farklı kromozomlarda birkaç anahtar tümör baskılayıcı genin bulunmasını sağlamıştır. Yüksek dereceli, kas invazyonu yapan mesane kanserlerinde kromozom 3 ve 8'in kısa kollarında delesyonlar tespit edilmiştir. Yüzeysel tranzisyonel hücre karsinomunda hiç görülmezken, invazif TCC'nin %50'sinden fazlasında 8p delesyonları gözlenmiştir. Kromozom 8'in kısa kolundaki heterozigotluğun kaybı aynı zamanda TCC'nin yüksek derece ve evreleriyle de alakalıdır. Mesane

kanserinde bulunan en önemli kromozomal delesyonlar kromozom 9, 13 ve 17'dedir. Bunlar da kromozom 13'teki retinoblastoma (Rb), kromozom 17'deki p53 ve kromozom 9'daki p21 tümör baskılayıcılarıyla alakalıdır.

Kromozom 9'daki delesyonlar TCC'de en çok görülen kromozom anormallikleridir ve her aşama ve evredeki TCC'nın %50'sinden fazlasında bulunur. Kas invazif mesane tümörlerinde diğer kromozomal değişiklikler görülse de Ta ve T1 tümörlerinin çok azında kromozom 9 haricinde değişiklikler görülür. Bu durum, kromozom 9 genlerindeki inaktivasyonun mesane kanseri gelişiminin ilk aşamalarıyla alakalı olduğu hipotezini desteklemektedir.

Kromozom 9'daki delesyonların çoğu özellikle kompleks genomik bir bölge olan 9p21'de (INK4A/ARF ve INK4B) bulunmuştur ve bu bölge negatif hücre döngüsü regülatörleri ve potansiyel tümör baskılayıcılar olan üç farklı proteini, p16, p14ARF ve p15'i kodlar.

Tümör baskılayıcıları etkileyen diğer iki önemli kromozomal değişim p53 ve Rb gen bölgelerindedir. Yüksek dereceli mesane TCC'nda kromozom 17p'de LOH yüksek frekanslarda görülmektedir. Rb geni ise ilk izole edilen tümör baskılayıcı genidir. p53 gibi Rb geninin de mesane kanseri progresyonunda önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir. Rb gen mutasyonları mesane tümörlerinin %25-30'unda tespit edilmiştir. Ancak Rb'de yanlış anlamlı mutasyonlar nadirdir ve mutasyona hassas bölgeler bulunamamıştır.

Yüzeyel ve kas invazif TCC'nin mesanede histolojik olarak birbirinden farklı olduğu ve klinik olarak da birbirinden farklı davrandığı bilinmektedir. Bu bulgulara dayanarak mesane kanserinin, kanser oluşumu için çoklu genetik yollara sahip olduğu söylenebilir (Williams ve Stein, 2004).

1.3.2. Hücre Döngüsü ve Regülasyonu

Normal hücresel proliferasyon, siklin ve siklin bağımlı kinazların da içinde bulunduğu protein kompleksleri aracılığıyla düzenlenen hücre döngüsü ile gerçekleşir. Bu döngüde G0 ve G1 fazları geçişlerini kontrol eden tümör baskılayıcı genler tanımlanmıştır. Bu genlerin protein ürünleri olan p53, pRb, p16, ve p14, mesane tümörlerinde hücre döngüsünün devamı için hayati önem taşır. Bir veya daha çok tümör baskılayıcı genin inaktivasyonu ve hücre döngüsünün kontrolünün kaybı karsinogenezin ilk aşamalarında görülmektedir. Genin inaktivasyonu mutasyon, delesyon veya metilasyon ile gerçekleşebilmektedir ve fonksiyonun değişebilmesi

için p53 haricindeki çoğu durumda her iki alelin de inaktivasyonu gerekmektedir. İnaktivasyon iki yolla gerçekleşebilmektedir. Birincisinde, kişi mutant alelin birini kalıtım yoluyla almıştır ve ikinci sağlıklı kopya da çevresel yolla alınan mutajenler veya DNA replikasyon / tamir mekanizmasındaki hata yüzünden kaybedilir. İkinci durumda ise genin her iki kopyası birbirinden bağımsız somatik ve çevresel olaylarla kaybedilir.

1.3.2.1. Retinablastoma ve p53

Değişmiş Rb gen ekspresyonu TCC'nin de içinde bulunduğu pek çok tümörde rapor edilmiştir. pRb proteini hücre döngüsünü G-S1 kontrol noktasında inhibe eder. Fakat pRb, pek çok hücre döngüsünü düzenleyen protein ile etkileşim içindedir. Bunlar; (1) pRb'nin inaktivasyonunu fosforilasyonla katalize eden siklinler, (2) p21, p16, ve p27'yi de içeren siklin bağımlı kinaz (cdk) inhibitörleri, (3) S fazına geçiş için gerekli transaktivasyon genlerinden sorumlu transkripsiyon faktörlerinin E2F ailesidir. Bu etkileşimlerden herhangi birindeki değişim kontrolsüz hücre büyümesine yol açabilir. İmmünokimyasal teknikler ve moleküler analizler Rb değişimlerinin mesane kanserinin ileri aşamaları ve evreleriyle ilişkili olduğunu göstermiştir.

p53 genindeki mutasyonlar insan tümörlerinde en yaygın görülen genetik hasarlardır. Hücrede bir DNA hasarı oluştuğunda p53 proteinleri artar ve hücre döngüsünü durdururlar. Böylece DNA'daki hasarın giderilmesi ve hatanın ilerlemesinin önlenmesi sağlanır. p53'ün diğer bir fonksiyonu da p21^{WAF1/CIP1} ekspresyonunu düzenlemesidir. p53 genindeki mutasyonlar çoğu zaman fonksiyonu bozuk anormal proteinler üretilmesine yol açar (Williams ve Stein, 2004).

1.3.2.2. Tranzisyonel Hücre Karsinomunda Hücre Döngüsünün Düzenlenmesi

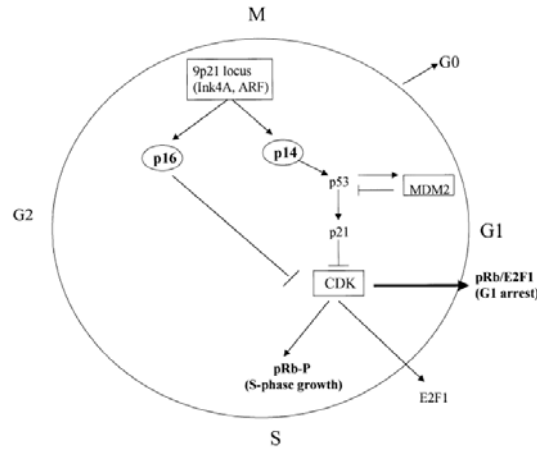
9p21 lokusundaki delesyonlar pek çok mesane tümörü ve mesane kanseri hücre hatlarında tespit edilmiştir. Bu lokus hücre döngüsü için çok önemlidir çünkü p16 ve p14 proteinleri bu lokustaki genlerden ifade edilmektedir.

p16 (diğer isimleriyle INK4A, MTS1, CDKN2A) Rb'nin fosforilasyonundan sorumlu siklin-D'yi bloke eden bir CDK inhibitörüdür. p16 mutasyonları ve delesyonları mesane kanseri hücre hatlarında, skuamoz hücre karsinomunda ve şistozomiyazla alakalı mesane kanserlerinde sıklıkla görülmektedir. p16'nın

inaktivasyonu, pRb'nin fosforilasyonunun inhibe edilememesi ve devamında hücre proliferasyonu anlamına gelir.

9p21 lokusundaki diğer gen olan p14 (ARF, farede p19) p53'ü dolayısıyla da p21 ekspresyonunu stimüle eder, ayrıca proto-onkogen ürünü olan MDM2 ile etkileşerek p53'ün hücresel düzeyini kontrol eder (Şekil 1.5.). p14 CDK'lara bağlanamaz veya CDK inhibitörü gibi davranamaz, fakat p21 üzerindeki etkisi nedeniyle hücre döngüsünü herhangi bir noktada durdurabilir.

Normal hücrelerde MDM2 p53'e bağlanarak onu inaktive eder ve degradasyon için işaretler. p14'ün MDM2'ye bağlanması ise MDM2'yi uzaklaştırarak p53'ün degradasyonunu önler. MDM2 geni amplifikasyonları mesane kanserinde pek sık görülmektedir (Williams ve Stein, 2004).



Şekil 1.5. INK4A/ARF lokusu ve hücre döngüsü regülasyonu (Williams ve Stein, 2004)

1.4. Mesane Kanserine Yol Açtığı Düşünülen Mesleki, Çevresel ve Genetik Faktörler

Mesane kanseri, akciğer kanseri ile birlikte ciddi epidemiyolojik araştırmalar yapılan ilk kanser türlerinden biridir. Sigara içimi, meslek yüzünden maruz kalınan kimyasallar ve kronik enfeksiyonlar gibi mesane kanserine yol açan faktörler yıllardır bilinmektedir. Günümüzde tüketilen gıdalarla ilgili faktörler de bu çerçevede düşünülmektedir.

1.4.1. Çevresel Faktörler

1.4.1.1. Sigara ve Diğer Tütün Ürünleri

Sigara, uzun yıllardır mesane kanserine yol açtığı bilinen ve tanımlanan bir karsinojendir. Sigara içen kişiler, içmeyenlere göre yaklaşık iki ile dört kat arası mesane kanserine yakalanma riski taşımaktadır. Sigara içiminin getirdiği riskin miktara, zamana ve içilen tütüne göre göreceli olarak değiştiği savunulmaktadır. Bazı çalışmalar ise günlük 15-20 sigaranın bir eşik değeri olduğunu ve mesane kanseri için asıl belirleyici faktörünün kullanım süresi olduğunu savunmaktadır (Olfert vd., 2006). Sigara dumanıyla birlikte vücuda pek çok kimyasal alınmaktadır. Bu nedenle sigara içiminin mesane kanseri mekanizması üzerindeki etkisi kesin olarak bilinmemektedir, fakat bu kimyasallardan 2-naftilamin ve 4-aminobifenil en şüpheli iki kimyasal ajan olarak görülmektedir. Sigaradaki bileşiklerin mesane üzerindeki karsinogenik etkilerinin yanında, mesane epitelindeki hiperplazi temel alınarak sigara içiminin proliferasyonu arttırdığı bulunmuştur (Zeegers vd., 2004).

Diğer tütün ürünleri ve mesane kanseri arasında henüz bir bağlantı bulunamamıştır. Diğer tütünlerin de sigara tütünü ile yaklaşık aynı içeriğe sahip olması nedeniyle pipo ve puro gibi diğer tütün alışkanlıklarının biyolojik olarak mesane kanserine yol açması olasıdır. Fakat puro ve pipo içenlerin dumanı sigara içenlerden çok daha az solumaları, bu kişilerde mesane kanseri yerine baş/boyun gibi lokal kanserlerin görülmesini açıklayabilir. Ayrıca pasif içicilerin de kan ve idrarlarında mutajenler tespit edilmiştir (Zeegers vd., 2004).

1.4.1.2. Cinsiyet ve Yaş

Genel olarak mesane kanseri erkeklerde kadınlara oranla üç veya beş kat daha fazla görülmektedir. Bu özellikle endüstrileşmiş ülkeler için doğrudur ve mesleki faktörü düşündürmektedir, fakat yapılan bazı çalışmalar meslek ve sigara için düzeltme yapıldıktan sonra bile erkeklerde mesane kanseri oranını daha fazla bulmuştur.

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

1.4.1.3. Aile Öyküsü

Aile öyküsü de mesane kanseri riskini arttıran bir faktördür. Mesane kanseri hastalarının birinci derece yakınlarında %200 mesane kanseri riski rapor edilmiştir.

1.4.1.4. İdrar Yolu Hastalıkları

Geçirilen idrar yolu hastalıkları da mesane kanseri için bir risk faktörüdür. *Schistosoma hematobium* adlı parazit mesane epitelinde kronik enflamasyona sebep olmaktadır. Bu parazitin görüldüğü Mısır ve Zambia gibi ülkelerde yüksek oranda mesane kanseri bildirilmiştir. Bu tarz gelişmekte olan ülkelerde TCC yerine skuamöz hücre karsinomu eğilimi vardır. Diğer enfeksiyonlar, idrar yolu ve böbrek taşları, mesane kanseri riskini çok az yükseltmektedir.

1.4.1.5. Diyet, Sıvı Alımı ve İlaçlar

Pek çok çalışma meyve ve sebze tüketiminin mesane kanseri riskini azalttığını göstermiştir. Çokça sıvı alımı da mesane kanseri riskini azaltmaktadır, çünkü ürinyasyonu arttırmakta, dolayısıyla da mesane epiteli ve karsinojenlerin birbiriyle temas süresini azaltmaktadır. Fenasetin içeren analjeziklerin fazla tüketimi de fenasetinin anilin türevi olması nedeniyle mesane kanseri riskini arttırmaktadır (Olfert vd., 2006).

1.4.2. Mesleki Faktörler

Sigara içiminden sonra, meslek faktörü de mesane kanseri için en büyük ikinci risk sayılmaktadır. 1985 yılında ilk defa Alman cerrah Rehn, magenta üreticilerindeki artmış mesane kanseri oranlarına dikkat çekti. 1954 yılında ise kimya endüstrisinde çalışanlarda β -naftilaminin mesane kanseri riskini 200 kat arttırdığı gösterildi (Case vd., 1954). β -naftilamin, kömür ve kömür katranının distilasyonu ile elde edilen bir aromatik amindir. Karsinojik etkileri yüzünden endüstride kullanımı İsviçre, İngiltere ve İtalya gibi pek çok ülkede yasaklanırken Amerika gibi bazı ülkelerde de kullanımı kısıtlanmış ve denetim altına alınmıştır.

Aromatik aminlerin yanında boyalar, metaller, endüstriyel yağlar ve polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH) da mesane kanseri riskinin artması ile alakalıdır. Organik materyallerin piroliz veya pirosentezindeki tamamlanmamış yanmayı içeren işlemler PAH'ları ortaya çıkarmaktadır. Sonuç olarak maden işçileri, baca temizleyiciler, ocakçılar, demirciler, zift ve asfalt yapanlar gibi pek çok endüstriyel

meslek sahibi PAH'lara maruz kalmaktadır. Aromatik amin üretiminde, boyayla alakalı üretimde, kauçuk ve kablo üretiminde, tekstil ve deri işlerinde, kömür, alüminyum ve petrol endüstrilerinde bahsi geçen kimyasal ajanlara maruz kalınmaktadır. En bilinen mesane karsinojenleri ve bu karsinojenlere maruz kalınabilecek endüstriyel alanlar Tablo 1.4'de verilmiştir (Olfert vd., 2006).

Tablo 1.4. Bilinen mesane karsinojenleri ve bunlara maruz kalınan endüstriyel alanlar (Bailey ve Sarosdy, 2001)

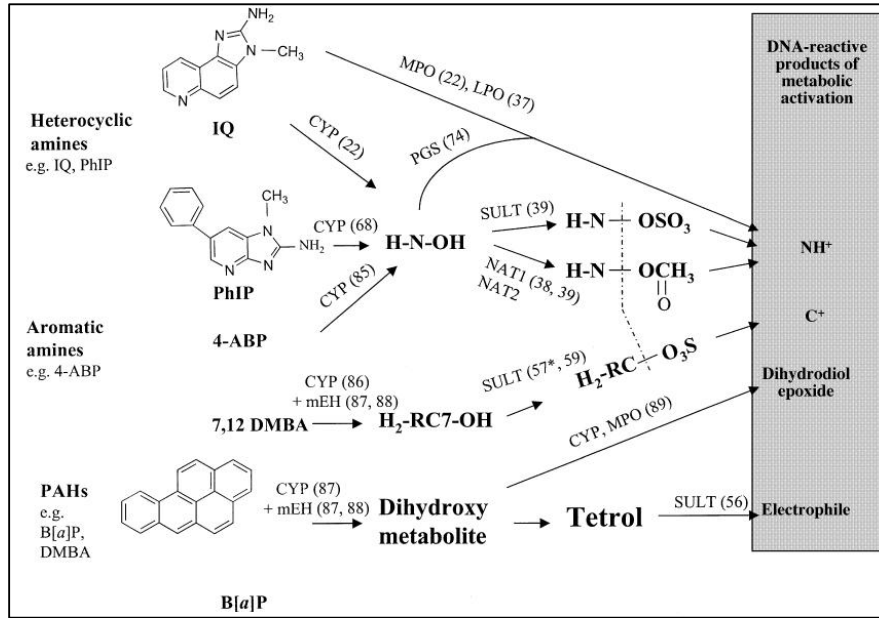
Mesane Karsinojenleri	Endüstriyel Alanlar
• 2-naftilamin	• Kimyasal boya üretimi
• Benzidin	• Kauçuk üretimi (özellikle lastik ve kablolar)
• 4-aminobifenil	• Kömür gazı üretimi
• Diklobenzidin	• Arıtma
• Ortodianizidin	• Ateşleyici üretimi
• Ortolidin	• Tarım ilaçları
• Fenasitin	• Tekstil baskı atölyeleri
• Klornafazin	
• Siklofosfamid	

1.4.3. Genetik Faktörler

Çoğu zaman maruz kalınan çevresel veya mesleki kimyasallar tamamen aktif halde değildirler. Bu kimyasalların etkileri vücutta birtakım aktive veya inaktive edici enzim veya yolaklarla düzenlenir (Thier vd., 2003). Kimyasal prokanserojenik bileşikler gibi çevresel risk faktörleri potansiyel kanserojen formlarına dönüşebilmek için oksidatif (Faz I) enzimlerle (çoğunlukla CYP enzimleri) metabolik olarak aktive edilmelidir. Çoğu kanserojen ise Faz II enzimleri ile detoksifiye edilir. Sonuç olarak bu zenobiyotik ve metabolize edici enzimleri kodlayan lokuslardaki genetik polimorfizmler, çevresel kimyasalların kanserojenik etkilerine karşı hastalığa yatkınlıkta kişisel varyasyonlara sebep olur (Longuemaux vd., 1999). İnsanda karsinojenlerin aktivasyonu ile ilgili olası yolaklar Şekil 1.6.'da verilmiştir.

Mutasyonun tehlikelerinden ve genetik bilginin değişmesinden kaçınmak amacıyla hücreler çoklu DNA tamir mekanizmalarını aktive etme kapasitesine sahiptir. Her tamir yoluğu pek çok molekülü içerir. DNA tamir genlerindeki polimorfizmler protein fonksiyonunu ve kişinin hasar görmüş DNA'yı tamir kapasitesini değiştirebilir. DNA tamir kapasitesindeki bu farklılık kişiyi

kanserojenlere daha hassas, kanser oluşumuna da daha yatkın kılar (Franekova vd., 2008).



Şekil 1.6. Karsinojenlerin metabolik aktivasyon yolları (Williams, 2001)

1.5. Mesane Kanserinin Genetiği

Mesane kanserinde rolü olan polimorfik genler, DNA tamir genleri ve metabolik genler olarak iki ana başlık halinde incelenebilir.

1.5.1. Mesane Kanseri ile İlgili DNA Tamir Genleri ve Polimorfizmler

1.5.1.1. XRCC Genleri

Yapılan çalışmalar XRCC1 ve XRCC3 genlerindeki amino asit değişiminin mesane, kolon, meme ve akciğer kanseriyle alakalı olduğunu göstermiştir. DNA tamir geni XRCC grup 1 (XRCC1), içsel ve dışsal oksidanların yol açtığı tek zincir kırılmaları ve hasar görmüş DNA'nın baz eksizyon tamiri mekanizmalarında yer alan bir proteini kodlar. XRCC1, tamir reaksiyonlarının çoklu enzimatik bileşikleriyle etkileşebilir. Arg194Trp, Arg280His ve Arg399Gln insanda yaygın görülen üç polimorfizmdir. Arg399Gln polimorfizmi, azalan DNA tamir kapasitesinin birkaç fenotipik markörü ile alakalıdır. XRCC1 Arg399Gln polimorfizminin mesane kanserinde rolü bulunmaktadır. Arg399Gln varyantı için homozigot olan örnekler arasında yabancı tip 1 ve 2 alellerine göre daha düşük risk gözlenmiştir. Bu bağlantı

ağır sigara tiryakileri arasında daha güçlüdür. Diğer yandan XRCC1 kodon 280 varyant aleli ve mesane kanseri arasında bir bağlantı bulunamamıştır. Kodon 194 varyant alelinin ise koruyucu etkisi olduğu düşünülmektedir.

XRCC grup 3 (XRCC3) geni ise çift zincir kırılmalarının homolog rekombinasyon yolu ile tamiri, kromozomal ayrılma ve DNA'nın çapraz bağlarının tamiri için gereklidir. XRCC3 geni kodon 241'deki bir polimorfizm olan Thr – Met değişimine sebep olur. Shen ve arkadaşları (2003) XRCC3 kodon241 polimorfizminin özellikle sigara tiryakilerinde mesane kanserine karşı koruyucu bir etkisi olduğunu göstermiştir. Stern ve arkadaşları (2002) ise kodon241Met alelinin en az birine sahip olunmasının mesane kanseri için pozitif bir etkisi olduğuna dair küçük bir kanıt bulmuştur. Sigara tiryakileri arasında Met aleline sahip bireyler, olmayanlara oranla iki kat risk altındadır (Franekova vd., 2008).

1.5.1.2. XP Genleri

XP(A-G) proteinleri DNA hasarının tanınması ve kesilmesi işlemlerinde önemli bir role sahiptir. XP proteinleri, DNA zinciri ayrımı (XPA, replikasyon proteini A ile kompleksi), tamir kompleksi formasyonu (XPC, hHR23B ile kompleksi; XPF, ERCC1 ile kompleksi), ve tamir faktörü alımının da dahil olduğu nükleotid eksizyon tamiri işleminin pek çok aşamasında anahtar elemanlardır.

XPG geni xeroderma pigmentosum tamamlayıcı grup G'den sorumludur ve nükleotid eksizyon tamirinin iki kesme işlemi için hayati olan 1186 amino asitlik bir endonükleaz kodlar. Ekzon 15'deki bir SNP (G3507C, Asp1104His) ve mesane kanseri arasında bir ilişki gözlenmiştir. homozigot genotip C/C risk faktörü olarak düşünülmektedir.

XPC geninde C/A SNP'sinin ekzon 15 kodon 939'da lizini glutamine çevirdiği bilinmektedir. Sanyal ve arkadaşları (2004) bu polimorfizm ve mesane kanseri riski arasında güçlü bir bağlantı gözlemiştir. Diğer yandan Sak ve arkadaşları (2005) bu polimorfizm ve mesane kanseri arasında herhangi bir bağlantı bulamamıştır. XPC geni ve mesane kanseri arasındaki bağlantı hala açık değildir ve daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

XPB geni üzerinde pek çok polimorfizm tanımlanmıştır fakat hiçbiri ile mesane kanseri arasında bir bağlantı bulunamamıştır (Franekova vd., 2008).

1.5.2. Mesane Kanseri ile İlgili Metabolik Genler ve Polimorfizmler

1.5.2.1. NAT Genleri

N-asetiltransferaz 1 (NAT1) ve 2 (NAT2) tek ve intronsuz protein kodlayan ekzonların ürünleridir. NAT1 ve NAT2 insanda kromozom 8p22'de yer alır. NAT'ın iki izoenzimi, NAT1 ve NAT2, polimorfiktirler ve her ikisi de aromatik ve heterosiklik aminlerin N-asetilasyonunu (genellikle deaktivasyon) ve O-asetilasyonunu (genellikle aktivasyon) katalize ederler (Franekova vd., 2008).

NAT1 enzimi, asetil-CoA'dan bir asetil grubunu içinde folat katabolit p-aminobenzoilglutamat'ın da bulunduğu arilamin ve hidrazin substratlarına transfer eder. Şimdiye kadar pek çok NAT1 varyant aleli tanımlanmıştır (<http://louisville.edu/medschool/pharmacology/NAT.html>). Bunlardan birkaçının (NAT1*14 ve NAT1*15 gibi) enzim aktivitesinin bulunmadığı bilindiği halde bazılarının fonksiyonel önemi hala bilinmemektedir.

Faz II enzimlerinden biri olan NAT2, heterosiklik arilaminlerin tümör başlangıcıyla alakalı önemli karsinojenler olan elektrofilik nitrenyum iyonlarına biyo-dönüşümünde rol oynarlar. NAT2 çok çeşitli aromatik aminlerin, heterosiklik aminlerin ve hidrazin ilaçların aktivasyon ve deaktivasyonunu katalize eder. 13 SNP'ye dayanarak 30 tane NAT2 aleli tanımlanmıştır (<http://louisville.edu/medschool/pharmacology/NAT.html>). NAT2 genindeki bir amino asit değişimi sıklıkla enzim fonksiyonunda aksamaya sebep olur. Avrupa popülasyonunda NAT2*5B, NAT2*6A ve NAT2*7A bunlardan en önemlileridir (Thier vd., 2003; Franekova vd., 2008).

NAT varyantlarının kanserde kişisel yatkınlığı değiştirdiği düşünülmektedir. Yavaş NAT2 asetilasyon kapasitesi, kolon kanseri riskini düşürürken mesane, göğüs, karaciğer ve akciğer kanserleri riskini arttırmaktadır. NAT1 aktivitesinin artması ise akciğer kanseri riskini azaltırken mesane ve kolon kanseri riskini arttırmaktadır. Mesane kanseri için risk faktörü olduğu bilinen, sigaradan alınan aromatik aminler, NAT enzimleri ile metabolize edildiğinden sigara içimiyle alakalı mesane kanserini modüle ederler (Franekova vd., 2008).

1.5.2.2. GST Genleri

Sitozolik glutatyon transferazlar (GST) faz II enzimlerin bir süper-ailesidir. Çoğu alt-aileleri polimorfik izoenzimleri içerir. Bu enzimlerdeki genetik polimorfizmler kanser, kardiyovasküler ve solunum hastalıklarına kişisel yatkınlığı etkiler.

GSTM1, benzopiren gibi karsinojenik polisiklik aromatik hidrokarbonları detoksifiye eder. GSTT1, etilen oksit gibi daha küçük reaktif hidrokarbonları detoksifiye eder. GSTP1, birçok zenobiyotikin konjugasyonu ve detoksifiyasyonu ile alakalıdır. GSTM1, GSTT1 ve GSTP1 genlerindeki polimorfizmler pek çok kanserde göreceli olarak risk faktörüdür. GSTM1 ve GSTT1'in "null" alelleri özellikle sigara tiryakilerinde mesane kanseri için risk faktörüdür. GSTP1'in mesane kanseri için risk faktörü oluşturup oluşturmadığını anlamak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

1.5.2.3. Sülfotransferaz 1A1 (SULT1A1)

Sülfotransferazlar (SULT) pek çok zenobiyotik, ilaç ve endojen bileşikleri sülfonasyonunu katalize eden enzimlerin süpergen ailesindedir. Sülfotransferazlar yetişkinlerde ve gelişen insan fetüsünde ana detoksifikasyon enzim sistemlerinden biri olarak rol oynarlar. Popülasyonda SULT için genelde fazla SNP görülmez fakat 1A1 izoformunda yaygındır ve pek çok tümör bölgesinde kanser riskiyle ilişkilendirilmiştir. SULT1A1 genindeki G/A polimorfizmi Arg/His amino asit değişimine yol açar. His213 aleli aktivitesi düşüktür ve termal stabilitesi azdır. Yapılan çalışmalar bu polimorfizmin mesane kanserinde koruyucu etkisi olduğunu göstermiştir.

1.5.2.4. NAD(P)H dehidrojenaz, kinon 1 (NQO1)

NQO1, zenobiyotik ve endojen kinonların elektrofilik ve oksidize edici metabolitlerine karşı hücre sel savunmada yer alan kimyasal koruyucu bir enzimdir. NQO1 aynı zamanda hücre içindeki süperoksitleri temizler. Bu gendeki polimorfizmler enzim aktivitesini etkiler. NQO1 genindeki bir C/T transizyonu kodon 187'de prolin/serin değişimine yol açarak enzim aktivitesini büyük ölçüde düşürür. Varyant alelin mesane kanserinin yüksek riski ile ilişkisi bulunmuştur (Franekova vd., 2008).

1.5.2.5. MTHFR

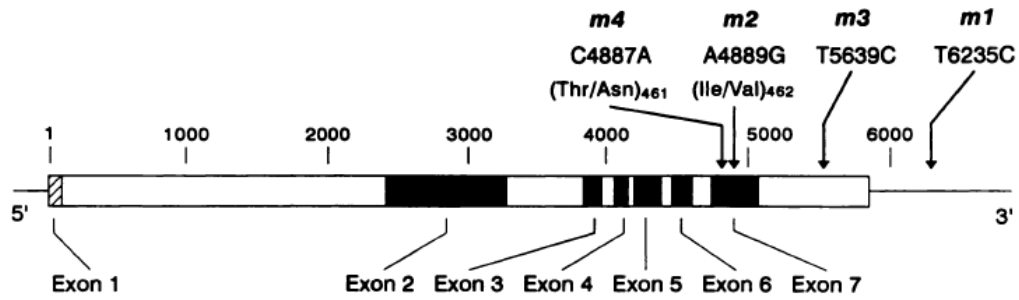
Metilentetrahidrofolat redüktaz, 5,10-metilentetrahidrofolat'ı (deoksitimidin monofosfat sentezinde metil donörüdür) 5-metiltetrahidrofolat'a çevirir. Folat eksikliği DNA zincirinin kırılmaları ve urasilin DNA bağlanması ile alakalıdır. Eğer bir MTHFR polimorfik varyantı enzimatik aktiviteyi düşürerek hücrede folat seviyesini düşürürse DNA zincirinin kırılma eğilimini ve kanser oluşumu olasılığını arttırır. Diğer yandan varyant MTHFR aktivitesi metil donörleri miktarını etkileyebilir ve sonuç olarak bir anahtar tümör baskılayıcı veya promotörün metilasyon durumunu değişmesine yol açarak mesane karsinogenezinin dahil olabilir. MTHFR genindeki 677C>T ve 1298A>C polimorfizmleri enzim aktivitesini düşürmektedir. Şimdiye kadar bu polimorfizmlerin mesane kanseri ile ilgisini araştıran çalışmalar birbiriyle çelişkili sonuçlar vermiştir (Karagas vd., 2005).

1.5.2.6. Sitokrom P-450 (CYP) Genleri

CYP enzimleri, faz I ilaç metabolizmasını katalizleyen en önemli enzimler olan karaciğerdeki mikrozomal enzim süper ailesindedir. 20'den fazla CYP enzimi mevcuttur ve bu enzim sistemi bir hayli polimorfiktir (<http://www.cypalleles.ki.se/>). Birkaç CYP geni için mesane kanseri riski çalışması yapılmıştır.

İnsan CYP1A1 enzimi pek çok epitel dokusunda bulunur ve PAH'lar ve aromatik aminler gibi tütünden gelen prokarsinojenlerin aktivasyonunda rol alır. Beyaz ırk popülasyonunun %10'u CYP1A1 enziminin benzo[a]pyrene hidroksilaz diye anılan bir formuna sahiptir ve bu form sigara içenlerde bronşiyal, larenjyal ve ağız boşluğu tümörleri ile alakalı bulunmuştur. Heme-bağlanma bölgesindeki CYP1A1 Ile-Val (m2) mutasyonu mikrozomal enzim aktivitesinde ve CYP1A1 *MspI* (m1) mutasyonu deneysel olarak katalitik aktivitede artmaya sebep olur. Ekzon 7 Ile-Val mutasyonuna sahip sigara içicilerinin beyaz kan hücrelerinde içmeyenlere göre daha fazla PAH-DNA birleşimleri bulunmuştur. Homozigot CYP1A1 *MspI* aleli frekansında önemli etnik farklılıklar gözlenmiştir. *MspI* ve Val alellerinin her ikisi de beyaz ırkta Japon popülasyonuna göre daha nadirdir. Beyaz ırk ve Japon popülasyonunda yapılan iki çalışmada (Kato vd., 1995; Brockmöller vd., 1996) mesane kanseri ile önemli bir bağlantı bulunamamıştır fakat immünohistokimyasal yollarla mesane tümörünün aşaması ve yüksek CYP1A1 ekspresyonu arasında bir korelasyon tespit edilmiştir (Bartsch vd., 2000).

CYP1A1 mutasyonlarının frekansı değişik etnik gruplar arasında varyasyon göstermektedir. m1 ve m2 mutasyonları uzak Asya popülasyonlarında yüksek prevalans gösterirken, beyaz ırkta düşük frekans göstermektedir. m1 ve m2 mutasyonları tüm çalışmalarda birbiriyle alakalı bulunmuştur. m4 mutasyonu Alman ve Polonyalı popülasyonlarında araştırılırken, m3 mutasyonu ise sadece Afrikalılarda tespit edilmiştir. Moleküler ve epidemiyolojik çalışmalarda m1 ve m2 mutasyonunu içeren CYP1A1*2B aleli akciğer kanserinin artan riski ile alakalı olduğu bulunmuştur (Aynacioglu vd., 1998). CYP1A1 geni üzerinde bu dört önemli mutasyon (m1, m2, m3, m4) Şekil 1.7.'de gösterilmiştir.

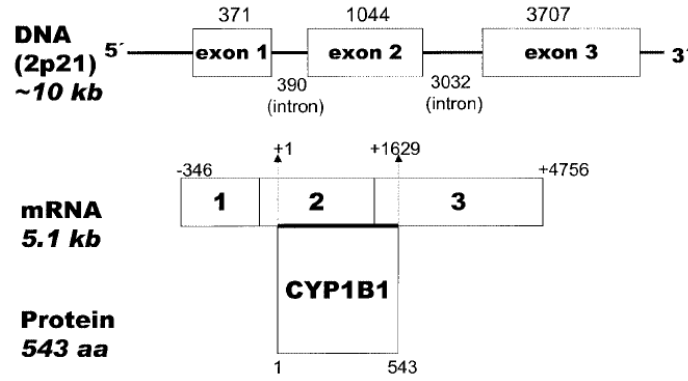


Şekil 1.7. m1, m2, m3 ve m4 mutasyonlarının insan CYP1A1 geni üzerinde lokalizasyonu (Cascorbi vd., 1996)

İnsan CYP1B1 geni kromozom 2p21'de bulunmakta olup, üç ekzon ve iki intronu ile yaklaşık 10kb uzunluğundadır. mRNA'sı 5.1 kb uzunluğundadır ve protein dizisi 543 amino asitten oluşur (Şekil 1.8.). mRNA'sı pek çok ekstrahepatik dokuda eksprese edilmesine rağmen insan dokularında CYP1B1 protein seviyesi genellikle çok düşüktür. 2001 yılında Spivack vd., mRNA ve protein ekspresyonlarına dayanarak CYP1B1'in insanda genellikle akciğerde eksprese edildiğini iddia etmiştir ve bu fikir CYP1B1'nin akciğerde kanser metabolizmasındaki önemli bir faz I enzimi olabileceğini düşündürmüştür. CYP1B1'in normal insan dokularında genellikle düşük olan ekspresyonunun tam tersine meme, kolon, akciğer, deri, lenf düğümü, beyin, testis ve özofagusun da içinde bulunduğu pek çok kanserde aşırı eksprese olduğu gözlemlenmiştir (Thier vd., 2002).

CYP1B1, pek çok PAH'ları, aromatik ve heterosiklik aminleri aktive eder. CYP1B1'in aynı zamanda aflatoksin B1'i mutajenik metabolitlere ve o-hydroxylating estradiol'ü 4-hidroksiestradiole aktive edici özel bir fonksiyonu

bulunmaktadır. İnsan CYP1B1'i benzo[a]pyrene'i karsinojenik metabolit diol epoksit 2'ye metabolizmasını gerçekleştirir. Aynı zamanda 7,12-dimethylbenz[a]anthracene' i biyoaktif eder. Bu durum, CYP1B1'in tütün içimine özel karsinojenlerin aktivasyonu ile potansiyel ilişkisini gösterir.



Şekil 1.8. CYP1B1 geninin yapısı (Thier vd., 2002)

Yapılan çalışmalar, CYP1B1 genindeki polimorfizmlerin, özellikle de kodon 432 polimorfizminin, insan solunum yolu ve meme kanserlerinde farklı kişisel yatkınlığa katkıda bulunan prokarsinojenlere ve steroid hormonlara karşı katalitik fonksiyonunda değişimlere sebep olabileceğine işaret etmektedir. CYP1B1'in Leu432/Val432 alelik varyantlarının PAH metabolizması üzerindeki etkisi tam olarak anlaşılammıştır. Shimada vd. (2001), benzo[a]pyrene'nin 7,8-dihydrodiol metabolitine dönüşümü için Leu432 enziminde yüksek aktivite gözlemlemiştir. İnsan baş ve boyun kanserinde, sigara içimi göz önünde bulundurulduğunda, CYP1B1 kodon 432 polimorfizminin sigara içenler arasında hastalığa yatkınlık faktörü olduğu belirlenmiştir (Thier vd., 2002)

CYP2D6 geni, substratları aromatik aminler ve tütün nitrosaminleri de içeren debriskinin hidroksilaz enzimini kodlar. CYP2D6 lokusu 22q13.1'de haritalanmıştır. Bu gen üzerindeki homozigot resesif mutasyonlardan dolayı beyaz ırkın yaklaşık % 5-10'u çeşitli maddeleri metabolize edemezler ve zayıf metabolizör (PM) olarak adlandırılır. Zayıf metabolizör fenotipin mesane kanseri yatkınlığının düşüklüğüyle alakalı olması, bu enzimin prokarsinojenlerin karsinojenlere dönüşümüyle alakalı olabileceğini işaret etmektedir. CYP2D6 lokusunda PM fenotipinden sorumlu en yaygın mutasyonlar tanımlanmıştır. Ekzon 3 ve intron 4 birleşimindeki G/A transizyonu erken bitiş kodonu ve hatalı mRNA'ya sebep olmakta ve mutant alellerin

yaklaşık %80'ini oluşturmaktadır. Tüm CYP2D6 geninin delesyonu PM alellerinin %15'ini oluşturmaktadır (Sobti vd., 2005; Febbo vd., 1998).

CYP2E1, etanolün yanında, sigara içimiyle gelen N'-nitrosornicotine, 4-methylnitrosamino-1,3-pyridyl-1-butanone ve diğer uçucu nitrosaminleri de içeren pek çok prokarsinojeni metabolize eder. Chlorzoxazone 6-hidroksilasyonu CYP2E1 tarafından katalizlenir. İnsan CYP2E1 geninde, muhtemelen gen-çevre etkisiyle yorumlanabilecek, kişiler arası yaygın ekspresyon varyasyonları tespit edilmiştir. Sigara dumanına maruz bırakılan farelerde CYP2E1 indüklenmiştir (Bartsch vd., 2000).

CYP2E1 geni üzerinde en sık çalışılan RFLPler, genin 5' ucunda yer alan ve değişmiş enzim ekspresyonu ile alakalı *PstI/RsaI* (mutant alel: CYP2E1*5B) ve intron 6'da yer alan *DraI* (mutant alel: CYP2E1*6) polimorfizmleridir. Bu polimorfizmler birlikte CYP2E1*5A alelini oluşturur. Ayrıca *RsaI* (G₋₁₂₅₉C) ve *PstI* (C₋₁₀₉₁T) birbirleriyle tam LD halindedir. CYP2E1*6 alel varyantı Avrupa popülasyonunun yaklaşık %10'unda görülmüştür. Yakın bir zamanda, Haufroid vd. (2002) CYP2E1*6 alelinin en az birine sahip bireylerde homozigot yabanıl tipteki bireylere göre daha düşük chlorzoxazone metabolik oranları bulmuştur. Avrupalılar ve Asyalıların CYP2E1*5A alel frekansları arasında önemli etnik farklar bulunmuştur. Bu alel için Avrupalıların yaklaşık %5'i heterozigotken Asyalıların %37'si heterozigot ve %6'sı homozigottur. CYP2E1*5A alelinin bu keskin inter-etnik farklılıklarından dolayı genetik polimorfizmler, enzim ekspresyonu ve kimyasal metabolizması hala net değildir ve yapılan çalışmalar birbiriyle çelişmektedir (Bolt vd., 2003).

2. AMAÇ

Mesane kanseri dünyada en çok görülen kanser türleri arasında yer almaktadır. Yapılan pek çok çalışma sigara içimi, meslek ve diğer çevresel faktörler sebebiyle maruz kalınan kimyasalların mesane kanseri için risk faktörü olduğunu göstermiştir. Aromatik aminler, PAH'lar ve N-nitrozo bileşikler gibi pek çok kimyasal tek başına mutasyon yaratacak kapasitede değildir ve biyo-aktivasyonları gerekmektedir. Bu prokarsinojenler faz I enzimi olarak adlandırılan oksidatif enzimler ile metabolik olarak aktive edilir. Çoğu kanserojen ise faz II enzimleri tarafından detoksifiye edilir. Aktivasyon ve detoksifikasyon arasındaki bu denge vücuttaki biyo-aktif zehirli maddelerin dozunu belirler. Enzim aktiviteleri arasındaki kişisel farklılıklar vücuttaki bu aktif kimyasalların dozunu ve dolayısıyla kansere kişisel yatkınlığı da etkilemektedir.

Faz I metabolizmasını katalizleyen en önemli enzimler oldukça polimorfik CYP enzim süper-ailesidir. CYP polimorfizmlerinin bazılarının enzim aktivitesini değiştirdiği, dolayısıyla maruz kalınan zehirli kimyasalların vücuttaki biyo-aktif dengeyi değiştirerek kansere yatkınlığı etkilediği düşünülmektedir. Ancak bu polimorfizmler popülasyonlar arasında etnik farklılıklar göstermektedir. Bu nedenle CYP polimorfizmlerinin farklı popülasyonlarda çalışılması, kanserle ilişkisinin açıklığa kavuşturulması ve gen-çevre ilişkisinin kurulabilmesi açısından önem taşımaktadır.

Bu tez kapsamında mesane kanseri üzerinde çok az çalışılmış, fakat diğer kanser türleri ile ilişkili bulunmuş CYP1A1, CYP1B1, CYP2D6 ve CYP2E1 genleri üzerindeki dokuz polimorfizmin Türk popülasyonunda incelenmesi ve mesane kanseri ile ilişkisinin saptanması hedeflenmiştir. Hasta ve sağlıklı bireylerin taşıdıkları polimorfizmlerin alel frekansları karşılaştırılarak bu polimorfizmlerin Türk popülasyonunda mesane kanseri için bir risk teşkil edip etmediği belirlenecektir. Ek olarak, yaş, cinsiyet ve sigara kullanımı gibi çevresel faktörlerin mesane kanserine etkisi araştırılacak ve bu faktörlerin genetik polimorfizmlerle etkileşimi incelenecektir. Bu sayede Türk mesane kanseri hastalarında CYP polimorfizmleri ve çevresel faktörlerin hastalık için oluşturdukları risk faktörlerinin ilk kez belirlenmesi ve bu konuda yapılacak olan ileriki çalışmalar için belirleyici olması hedeflenmektedir.

3. GEREÇLER

3.1. Çalışmada Kullanılan Örnekler

Bu araştırmadaki hasta grubu örnekleri ve bu hastalara ait patolojik bilgiler, Mart 2006 – Mart 2008 tarihleri arasında İstanbul Şişli Etfal Hastanesi Üroloji Polikliniği'ne başvuran ve mesane kanseri teşhisi konulan hastalardan alınmıştır. Her hastadan moleküler analizi yapılmak üzere 10 ml kan temin edilmiş ve bu kanlar DNA izolasyonu gerçekleştirilene kadar EDTA içeren tüpler içerisinde +4°C'de saklanmıştır. Her hasta ile yapılan anketlerle hastaların cinsiyet, yaş, doğum yeri, meslek gibi demografik bilgileri yanında sigara içimi, miktar ve süresi bilgileri de elde edilmiştir.

Çalışmadaki kontrol grubu örnekleri ise gönüllü deneklerden alınan ağız içi epitel hücreleri ile oluşturulmuştur. Herhangi bir kanser geçmişi olmama şartı dışında denekler tamamen rastgele seçilmiştir. Tüm gönüllü deneklere de anket uygulanarak hasta grubu için belirtilen bilgilere ulaşılmıştır.

Bu çalışmada 62'si hasta ve 73'ü kontrol olmak üzere toplam 135 kişi ile çalışılmıştır. Hasta ve kontrol grubu örnekleri, bireylerin çalışma hakkında bilgilendirilmesi ve yazılı onaylarının alınmasından sonra toplanmıştır.

3.2. Kimyasallar

Bu çalışmada kullanılan tüm katı ve sıvı kimyasallar moleküler biyoloji kalitesinde olup, aksi belirtilmediği takdirde marka olarak Sigma (ABD) ya da Merck (ALMANYA) tercih edilmiştir.

3.3. Tamponlar, Solüsyonlar ve Enzimler

3.3.1. Kit ile DNA İzolasyonu

Kan örneklerinden DNA izolasyonu amacıyla High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche, ALMANYA) kullanılmıştır.

Yanak içi epitelinden DNA izolasyonu amacıyla Puregene Genomic DNA Purification Kit (Gentra Systems, ABD) kullanılmıştır.

3.3.2. Hızlı Genomik DNA İzolasyonu (RGDE) Metodu ile Kandan DNA İzolasyonunda Kullanılan Tamponlar ve Solüsyonlar

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

Hücre Çekirdeği Lizis Tamponu (pH 8.0) : 10 mm/L Tris-HCl,
% 1 (w/v) SDS,
10 mm/L EDTA,
10 mm/L Sodyum Sitrat

Sodyum Klorür (NaCl) : dH₂O'da 5M

Kloroform (CHCl₃) : Saf kloroform (%100)

İzopropanol (C₃H₈O) : Saf izopropanol (%100)

TE Tamponu : 20 mM Tris-HCl (pH 8.0),
0.1 mM EDTA (pH 8.0)

3.3.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Tamponları ve DNA Polimeraz Enzimleri

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)
	: Fast Start DNA polimeraz (Roche, ALMANYA)

3.3.4. Restriksiyon Enzimleri ve Reaksiyon Tamponları

MspI	: 20 U/μl (New England BioLabs, ABD)
Reaksiyon Tamponu	: NE Buffer 2 (New England BioLabs, ABD) 50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl ₂ , 1 mM ditiyotretiyol, pH 7.9
Tanıma Dizisi	: 5' C [^] CGG 3' 3' GG [^] CC 5'
BseMI (BsrDI)	: 5 U/μl (Fermentas, LİTVANYA)
Reaksiyon Tamponu	: Buffer R (Fermentas, LİTVANYA) 10 mM Tris-HCl (pH 8.5), 10 mM MgCl ₂ , 100 mM KCl, 0.1 mg/ml BSA
Tanıma Dizisi	: 5' GCAATGNN [^] 3' 3' CGTTAC [^] NN 5'
Eco31I (BsaI)	: 10 U/μl (Fermentas, LİTVANYA)
Reaksiyon Tamponu	: Buffer G (Fermentas, LİTVANYA) 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM MgCl ₂ , 50 mM NaCl, 0.1 mg/ml BSA
Tanıma Dizisi	: 5' GGTCTC(N) ₁ [^] 3' 3' CCAGAG(N) ₅ [^] 5'
Eco57I	: 5 U/μl (Fermentas, LİTVANYA)
Reaksiyon Tamponu	: Buffer G + SAM (Fermentas, LİTVANYA) 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM MgCl ₂ , 50 mM NaCl, 0.1 mg/ml BSA + 0.01 mM S-adenosylmethionine (SAM)
Tanıma Dizisi	: 5' CTGAAG(N) ₁₆ [^] 3' 3' GACTTC(N) ₁₄ [^] 5'

ScrFI	: 10 U/μl (Roche, ALMANYA)
Reaksiyon Tamponu	: SuRE/Cut Buffer B (Roche, ALMANYA) 100 mM Tris-HCl, 50 mM MgCl ₂ , 1 M NaCl, 10 mM 2-Merkaptoetanol, pH 8.0
Tanıma Dizisi	: 5' CC [^] NGG 3' 3' GGN [^] CC 5'
PstI	: 10 U/μl (Roche, ALMANYA)
Reaksiyon Tamponu	: SuRE/Cut Buffer H (Roche, ALMANYA) 500 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl ₂ , 1 M NaCl, 10 mM Dithioeritritol, pH 7.5
Tanıma Dizisi	: 5' CTGCA [^] G 3' 3' G [^] ACGTC 5'
RsaI	: 10 U/μl (Roche, ALMANYA)
Reaksiyon Tamponu	: SuRE/Cut Buffer L (Roche, ALMANYA) 100 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl ₂ , 10 mM Dithioerytritol, pH 7.5
Tanıma Dizisi	: 5' CT [^] AC 3' 3' CA [^] TG 5'
DraI	: 10 U/μl (Roche, ALMANYA)
Reaksiyon Tamponu	: SuRE/Cut Buffer M (Roche, ALMANYA) 100 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl ₂ , 500 mM NaCl, 10 mM Dithioerytritol, pH 7.5
Tanıma Dizisi	: 5' TTT [^] AAA 3' 3' AAA [^] TTT 5'

3.3.5. Elektroforez Tamponları ve Jel Sistemleri

10X TBE (Tris-Borik asit-EDTA)	: 890 mM Tris-Base, 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 Bromid (EtBr)	: 10 mg/ml
% 1 veya 2'lik Agaroz Jel	: 0.5 X TBE Tamponunda %1 veya %2 (w/v) agaroz

3.3.6. Oligonükleotid Primerler

Tablo 3.1. CYP lokuslarındaki polimorfik bölgeleri çoğaltmak için kullanılan primer dizileri

Lokus	Polimorfizm	Primer Dizisi (5'→ 3')
CYP1A1 m1 CYP1A1 m3	rs4646903 (<i>Msp</i> I)	1A1 M3F: GGCTGAGCAATCTGACCCTA 1A1 P80: TAGGAGTCTTGTCTCATGCCT
CYP1A1 m2 CYP1A1 m4	rs1048943 (<i>Bsr</i> DI) rs1799814 (<i>Bsa</i> I)	1A1 M2F: CTGTCTCCCTCTGGTTACAGGAAGC 1A1 M2R: TTCCACCCGTTGCAGCAGGATAGCC
CYP1B1	rs1056836 (<i>Eco</i> 57I)	1B1F <i>Eco</i> 57I: GTGGTTTTTGTCAACCAGTTG 1B1R <i>Eco</i> 57I: GCCTCTTGCTTCTTATTGGCA
CYP2D6	rs3892097 (<i>Scr</i> FI)	2D6*B ex3: GCCTTCGCCAACCCTCCG 2D6*B int4: AAATCCTGCTCTTCCGAGGC
CYP2E1 5B CYP2E1 5B	rs3813867 (<i>Pst</i> I) rs2031920 (<i>Rsa</i> I)	2E1*5bF: CCAGTCGAGTCTACATTGTCA 2E1*5bR: TTCATTCTGTCTTCTAACTGG
CYP2E1 6	rs6413432 (<i>Dra</i> I)	2E1*6: TCGTCAGTTCCTGAAAGCAGG 2E1*62: GAGCTCTGATGCAAGTATCGCA

3.3.7. DNA Büyüklük Markörleri

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

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

3.3.8. Cihazlar

Otoklav : Dik Tip Otoklav (BES, TÜRKİYE)

Tartılar : Hassas Terazî, XB 220 A (Presica, İSVİÇRE)
Terazi, KB 400-2 (KERN, ALMANYA)

Santrifüjler : Mikrosantrifüj, MiniSpin Plus (Eppendorf, ALMANYA)

Derin Dondurucular : -20°C, 2021 D (Arçelik, TÜRKİYE)
-20°C, GSD26410NE (Bosch, ALMANYA)

Dokümantasyon Sistemleri : Bio-RAD Universal Hood II (BIO-RAD, İTALYA)

Yatay Elektroforez Sistemleri : Flowgen (İNGİLTERE)
Sub-Cell GT (BIO-RAD, İTALYA)

Isı Bloğu : DB 2D (Techne, İNGİLTERE)

Güç Kaynakları	: EPS 301 (Amersham Pharmacia Biotech, İSVEÇ) PowerPac Basic (BIO-RAD, İTALYA) PowerPac Universal (BIO-RAD, İTALYA)
Manyetik Karıştırıcılar	: MR 3001 (Heidolph, ALMANYA)
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. YÖNTEMLER

4.1. Periferel Kan Örneklerinden DNA İzolasyonu

Bu çalışmada kan örneklerinden DNA elde etmek için RGDE metodu ve DNA izolasyon kiti kullanılmıştır.

4.1.1. RGDE Metodu

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

4.1.2. Kit ile DNA İzolasyonu

Kitlerin çalışma prensibi, nükleik asitlerin sodyum iyodit (NaI), guanidin tiyosiyenat ($\text{CH}_5\text{N}_3\cdot\text{HSCN}$), guanidin hidrolorit ($\text{CH}_5\text{N}_3\cdot\text{HCl}$) gibi kaotropik tuzların varlığında silise adsorbe eğilimidir. Değişik tipteki nükleik asitler solüsyonun iyonik gücüne ve pH'sına göre silise az veya çok adsorbe olur. Nükleik asidi silisten kurtarmak için her zaman düşük konsantrasyonlu tuz tamponu veya su kullanılır.

Bir kaotropik tuzun varlığında (guanidinHCl) Proteinaz K ile kısa bir inkübasyon hücrelerin lizis olmasını sağlar ve Proteinaz K tüm nükleazları inaktive

eder. Hücresel nükleik asitler özel santrifüj tüpündeki cam fiber süngere bağlanır. Küçük kontaminant moleküllerden kurtulmak için yapılan yıkama ve spin aşamaları boyunca nükleik asitler bu süngere bağlı kalır. Son olarak düşük tuz tamponu ile yapılan elüsyon nükleik asitleri cam fiber süngerden ayırır (www.roche-applied-science.com). Bu tezde kullanılan kitin uygulanışı aşağıdaki gibidir:

- 1.5 ml steril mikrosantrifüj tüpüne 200 µl kan, 200 µl bağlanma tamponu ve 40 µl proteinaz K solüsyonu eklenir. İyiçe karıştırılır ve 72°C'de 10 dakika inkübasyona bırakılır.
- İnkübasyondan sonra 100 µl izopropanol eklenir ve örnekler cam fiber süngerli özel tüplere mikropipet yardımı ile aktarılır.
- Tüpler 8000 rpm'de 1 dakika boyunca santrifüj edilir. Santrifüjden sonra filtreli tüpün altındaki toplama tüpleri değiştirilir.
- İnhibitörlerden arındırmak için filtreli tüpe 500 µl inhibitör uzaklaştırma tamponu eklenir, 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj yapılır ve toplama tüpleri tekrar değiştirilir.
- Örneği yıkamak için 500 µl yıkama tamponu eklenir, 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilir ve toplama tüpleri değiştirilir.
- Yukarıdaki yıkama aşaması tekrarlanır.
- Tüpte kalan tampondan tamamen kurtulmak için tüpler en yüksek hızda (yaklaşık 13000 rpm) santrifüj edilir.
- Filtreli tüpler 1.5 ml mikrosantrifüj tüplerinin içine konur.
- Nükleik asitleri elde etmek için filtreli tüpe önceden 70°C'ye ısıtılmış 200 µl elüsyon tamponu eklenir ve 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilir.
- Altta kalan 1.5 ml mikrosantrifüj tüpünün içinde genomik DNA elde edilmiş olur.

4.2. Yanak İçi Epitelinden Kit ile DNA İzolasyonu

Bu çalışmada kullanılan kitin çalışma prensibi, hücre lizisi, protein presipitasyonu, DNA presipitasyonu ve DNA hidrasyonu olmak üzere dört aşama ile özetlenebilir. Bütün aşamalarda kit ile birlikte gelen solüsyonlarla kitin protokolü uygulanmıştır.

Gönüllü deneklerden yanak içi epitel hücrelerini elde etmek için kit ile birlikte gelen steril naylon fırçalar kullanılmıştır. Her bir denekten fırçayı her iki yanağının

içine bir dakika boyunca sürtmeleri istenmiştir. Ardından fırçaların sapı kesilip, ucu, içinde kit ile birlikte gelen hücre lizis solüsyonu bulunan bir eppendorf tüpe koyularak protokol uygulanana kadar bekletilmiştir. Bu solüsyonun içinde hücreler iki yıl boyunca stabildir.

Son aşamada DNA 20 µl DNA hidrasyon solüsyonu ile çözülmemektedir. Bu da kit'in kullanım kılavuzuna göre konsantrasyonun yaklaşık ortalama 50 ng/µl olmasını sağlamaktadır.

4.3. DNA'nın Nitel ve Nicel Analizi

İzole edilen genomik DNA, ekstrasyon prosedürü sırasında DNA fragmentasyon olasılığına karşı test edilir. Bu amaçla bölüm 4.6.1.'de açıklanan metod ile yüzde birlik (ağırlık/hacim) agaroz jel hazırlanır. UV ışığının altında tek ve sıkı bir bant gözlemlenmesi DNA örneğinde fragmentasyon olmaması olarak yorumlanabilir. Çıkarılan DNA'nın miktarı ve kalitesi, bu özellikleri bilinen bir DNA standardı ile karşılaştırılarak tahmin edilebilir.

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

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

DNA'nın saflığı A_{260}/A_{280} oranına bakılarak tahmin edilebilir. 1.8 (± 0.1) oranına sahip örnekler saf olarak düşünülebilir. 1.8'den büyük değerler RNA kontaminasyonunu, düşük değerler ise protein kontaminasyonunu işaret eder.

4.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

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

Tipik bir PCR reaksiyonu çoğaltılacak DNA'yı, istenilen bölgeyi hedefleyen ileri ve geri primerleri, reaksiyon tamponunu, MgCl₂, dNTP'leri ve Taq polimeraz enzimini içerir. Taq polimeraz aktivitesi için serbest Mg⁺² iyonlarına ihtiyaç duyulur. Reaksiyon tamponu enzim aktivitesi için gerekli iyonları içerecek şekilde hazırlanır ve dNTP'ler de DNA sentezi için gerekli nükleotidleri sağlar. Nükleotidler iki değerlikli katyonları yakaladığı için Mg⁺² konsantrasyonu nükleotid konsantrasyonundan biraz daha fazla tutulmalıdır. Mg⁺² ve diğer tuzlar primerlerin kalıp DNA'ya hibridizasyonunu da etkileyebilir.

Kalıp denatürasyonu, primer bağlanması ve bağlanan primerlerin ısıya dayanıklı Taq polimeraz tarafından uzatılmasını içeren döngünün seri halinde tekrarı, sınırları primerlerin 5' uçları tarafından belirlenen özel fragmanın üssel artışı ile sonuçlanır. Bir döngüde primer uzaması ile sentezlenen ürün bir sonraki döngüde kalıp görevi göreceği için DNA kopyalarının sayısı teorik olarak her döngüde ikiye katlanacaktır. Sonuç olarak 30 döngülük bir PCR hedef DNA dizisini milyonlarca kez katlayacak bir ürün verebilir.

Bu çalışmada yapılan polimeraz zincir reaksiyonu şartları Tablo 4.1. ve Tablo 4.2.'de verilmiştir.

Tablo 4.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu İçerikleri						
	Polimorfik Bölgeler					
	CYP 1A1 (m1,m3)	CYP 1A1 (m2,m4)	CYP 1B1	CYP 2D6	CYP 2E1 5b	CYP 2E1 6
Tampon (1X)	NH ₂ SO ₄	NH ₂ SO ₄	NH ₂ SO ₄	NH ₂ SO ₄	NH ₂ SO ₄	NH ₂ SO ₄
MgCl₂ (mM)	2	2.5	4	1.5	1.5	1.5
dNTP (mM)	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
Primerler (pmol)	0.32	0.4	0.4	0.48	0.4	0.4
Taq Pol. (u)	1	1	1	1	1	1
DNA (ng)	50-100	50-100	50-100	50-100	50-100	50-100
Toplam hacim (µl)	25	25	25	25	25	25

Tablo 4.2. PCR Isı Döngüsü Şartları						
	Polimorfik Bölgeler					
	CYP 1A1 (m1,m3)	CYP 1A1 (m2,m4)	CYP 1B1	CYP 2D6	CYP 2E1 5b	CYP 2E1 6
Başlangıç Denatürasyonu	94°C, 5dk.	94°C, 5dk.	94°C, 5dk.	94°C, 5dk.	94°C, 5dk.	94°C, 5dk.
Denatürasyon	94°C, 30sn	94°C, 30sn	94°C, 1dk.	94°C, 1dk.	94°C, 1dk.	94°C, 1dk.
Bağlanma	63°C, 1dk.	63°C, 1dk.	62°C, 1dk.	57°C, 1dk.	55°C, 1dk.	61°C, 1dk.
Uzama	72°C, 1dk.	72°C, 1dk.	72°C, 1dk.	72°C, 1dk.	72°C, 1dk.	72°C, 1dk.
Son Uzama	72°C, 5dk.	72°C, 5dk.	72°C, 5dk.	72°C, 5dk.	72°C, 5dk.	72°C, 5dk.
Döngü Sayısı	35	35	30	30	35	35

4.5. Restriksiyon Enzimi Analizi

Bakteriler hücre içine giren yabancı DNA'ları özel endonükleazlar aracılığıyla tanıyıp keserler ve bu sayede belirli bakteriofajlara direnç gösterirler. Bu özel endonükleazlar restriksiyon enzimleri veya restriksiyon endonükleazları olarak adlandırılır.

Restriksiyon enzimleri veya diğer adıyla restriksiyon endonükleazları çift zincirli DNA'yı şeker fosfat bağından kopararak keser. Bu kesim çift zincirin karşılıklı fosfat bağlarında simetrik veya asimetrik şekilde olabilir. Kesim simetrik ise DNA parçaları herhangi bir şekilde birbirine tutunamayacağı için küt uç oluşur, fakat enzim DNA'nın her iki zincirini tam karşılıklı kesmemiş ise yapışkan uçlar oluşur ve bu uçlardaki bazlar hidrojen bağı kurarak birbirine tekrar yapışabilir. Her restriksiyon enzimi DNA üzerinde 4-6 baz çiftlik belirli diziyi tanır ve ancak bu tanıma bölgesi bulunduğu zaman DNA'yı bu bölgeden veya bu bölgeye belirli bir uzaklıktan ve de her tanıma bölgesi için bir kesim yapacak şekilde ayırır. Bu bakımdan restriksiyon endonükleazları moleküler biyolojide oldukça kullanışlı enzimlerdir ve günümüzde çeşitli bakterilerden saflaştırılan, farklı tanıma bölgelerine sahip, kör ve yapışkan uçlu kesim yapabilen pek çok restriksiyon enzimi ticari olarak mevcuttur.

Farklı tanıma bölgelerine sahip pek çok enzimin var oluşu bu enzimlerin ilgili gen üzerinde oluşan bir mutasyonu veya polimorfizmi taramak için sıkça kullanılmasına olanak sağlamıştır. Teorik olarak bir gen üzerinde oluşan nokta mutasyonları bir veya daha fazla restriksiyon enzimi için tanıma bölgesi oluşturabilir veya aksine, var olan bir tanıma bölgesinin kaybolmasına sebep olabilir. PCR ile çoğaltılan ilgili gen bölgesi çeşitli restriksiyon enzimleri ile in vitro reaksiyona sokularak gen üzerindeki polimorfizmler hakkında yorum yapılabilir.

Tipik bir restriksiyon PCR ürünü, enzim tamponu, restriksiyon enzimi ve su içerir. Reaksiyon tamponu son konsantrasyonda 1X olacak şekilde konur. Reaksiyon sıcaklığı kullanılan restriksiyon enziminin optimum çalışma sıcaklığı olmalıdır. Çok yüksek sıcaklıklar enzimin bozulmasına ve deaktivasyonuna yol açarken çok düşük sıcaklıklarda enzimin aktivitesini düşürür veya tamamen durdurabilir. Yüksek enzim konsantrasyonu "star" aktivitesine yol açıp spesifik olmayan fazladan kesimlere yol açacağından enzim konsantrasyonu kullanılan DNA miktarına göre doğru ayarlanmalıdır. Enzim konsantrasyonunun düşük olması ise reaksiyon süresini uzatır. Reaksiyon süresi, kullanılan enzim ve DNA oranı ile enzimin türüne bağlıdır.

Reaksiyonun süresinin gereğinden uzun tutulması yine star aktivitesine yol açabilir. Bu yüzden enzim miktarı, DNA miktarı ve reaksiyon süresi doğru ayarlanıp optimize edilmelidir. Bu tezde kullanılan enzimlerin optimize olmuş şartları tablo 4.3.'de verilmiştir.

Tablo 4.3. Restriksiyon Enzimi Kesim Şartları			
Kesim Enzimi	Miktar (u)	Sıcaklık (°C)	Süre (saat)
<i>MspI</i>	4	37	4
<i>BsrDI</i>	2	55	2
<i>BsaI</i>	2	37	2
<i>Eco57I</i>	2	37	16
<i>ScrFI</i>	2	37	2
<i>PstI</i>	2	37	2
<i>RsaI</i>	2	37	2
<i>DraI</i>	2	37	2

4.6. Jel Elektroforezi

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

4.6.1. Agaroz Jel Elektroforezi ve Etidyum Bromid Boyaması

Agaroz jel elektroforezi DNA fragmanlarını moleküler ağırlıklarına göre ayırır. Değişik agaroz konsantrasyonları değişik ayırım kapasitesi sağlar. Yüksek konsantrasyonlar kısa fragmanları ayırmada daha spesifiktir.

Agaroz jel agarozun 0.5X TBE tamponu içinde çözünmesi ve kaynatılması ile hazırlanır. EtBr, son konsantrasyona 0.5 mg/ml olacak şekilde ve degradasyonu engellemek için jel solüsyonu 50°C'ye soğutulduktan sonra konur. Solüsyon jel kabına dökülür, taraklar yerleştirilir ve jelin polimerize olması için beklenir. Polimerizasyondan sonra jel içinde 0.5X TBE tamponu bulunan yatay jel elektroforez aparatına konur, taraklar jelden nazikçe çıkarılır ve böylece örnekleri yüklemek için kuyucuklar oluşturulmuş olur. Örnekler BPB yükleme tamponu ile son konsantrasyon 1X olacak şekilde karıştırılır ve mikropipet kullanılarak jeldeki kuyucuklara yüklenir. Elektrik akımı verilmesi ile birlikte DNA anoda doğru hareket etmeye başlar. Agaroz jeller genellikle 100-150 Voltta (V) 10-45 dakika yürütülür.

Voltaj yükseldikçe agaroz jelin ayırma etkisi azalır. DNA fragmanlarının optimum ayırımını sağlamak için 5V/cm akım uygulanmalıdır. Elektroforez tamamlandığında DNA bantları UV ışığı altında gözlemlenir.

Bu çalışmada PCR örnekleri ve restriksiyon enzimi kesim ürünlerinin tamamı %2'lik agaroz jelde EtBr boyaması ile UV ışığı altında gözlemlenmiş ve görüntülenmiştir.

4.7. Mesane Kanseri Hastalığının Moleküler Analizi

Bu tezde mesane kanseri hastalığı ile CYP1A1, CYP1B1, CYP2D6 ve CYP2E1 polimorfizmleri arasındaki ilişkinin araştırılması için PCR-RFLP metodu kullanılmıştır. İlgili gen bölgeleri, uygun primer ve enzimler kullanarak PCR yöntemi ile çoğaltılmış ve bunu takiben polimorfik DNA dizileri, restriksiyon enzimi kesimi ve agaroz jel elektroforezi ile incelenmiştir. PCR ürünleri ve kesim sonrası oluşan fragmanların boyları Tablo 4.4.'de gösterilmiştir. Hasta ve kontrol grubunda saptanan polimorfizmlerin verileri SPSS 15.0 ve PLINK programları ile istatistiksel olarak incelenmiştir.

Tablo 4.4. CYP Lokuslarındaki Polimorfizmler					
Polimorfik Bölge	SNP Tanımlayıcı	Nükleotid Değişimi	Kesim Enzimi *	PCR (bç)	Fragmanlar (bç)
CYP1A1 m1	rs4646903	3801 T>C	<i>MspI</i> +	898	692 + 206
CYP1A1 m2	rs1048943	2455 A>G	<i>BsrDI</i> -	204	149 + 55
CYP1A1 m3		3205 T>C	<i>MspI</i> +	898	802 + 96
CYP1A1 m4	rs1799814	2453 C>A	<i>BsaI</i> -	204	139 + 65
CYP1B1	rs1056836	4326 C>G	<i>Eco57I</i> -	390	330 + 60
CYP2D6	rs3892097	IVS3-1G>A	<i>ScrFI</i> -	334	230 + 104
CYP2E1 5B	rs3813867	-1293 G>C	<i>PstI</i> +	413	295 + 118
CYP2E1 5B	rs2031920	-1053 C>T	<i>RsaI</i> -	413	352 + 61
CYP2E1 6	rs6413432	7632 T>A	<i>DraI</i> -	995	121 + 874 + 572 + 302
* + : Mutasyon sonucu kesim bölgesi kazanımı - : Mutasyon sonucu kesim bölgesi kaybı					

5. SONUÇLAR

5.1. Örneklerin Tanımı

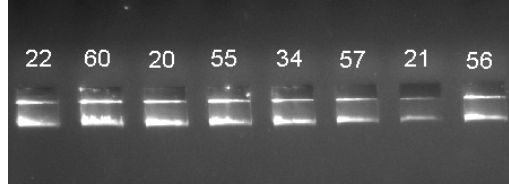
Bu araştırmaya 62 mesane kanseri hastası ve 73 sağlıklı birey olmak üzere toplam 135 kişi dahil edilmiştir. Tüm bireylerin cinsiyeti, yaşı, mesleği, sigara içim süresi ve miktarı sorgulanmıştır. Hasta bireylerde ise bu bilgilere ek olarak hastalık evresi, tümör derecesi ve nüks bilgileri değerlendirmeye dahil edilmiştir.

Hasta grubu 50 erkek (% 80,6) ve 12 kadın (% 19,4) bireyden oluşmaktadır. Hasta bireylerin yaşları 28-89 aralığında olup yaş ortalaması 67 olarak belirlenmiştir. Bu bireylerin % 17,1'i hiç sigara içmemişken % 82,9'u geçmişte bir süre sigara kullanmış veya halen kullanmaktadır. Hastalardan alınan tümörlerin %57,9'u pTa, %31,6'sı pT1, geri kalanı da pT2 ve pT3 olarak evrelendirilmiştir. Bu tümörlerin %22'si birinci, %43,9'u ikinci, %34,1'i üçüncü derece tümörlerdir. Hastaların %54,8'i ilk defa tedavi görüyorken, hastalardan %19'unda tümörler ikinci defa, %9,5'inde üçüncü defa, geri kalanında ise 3 – 15 kez nüks etmiştir.

Kontrol grubu 39 erkek (% 53,4) ve 34 kadın (% 46,6) sağlıklı bireyden oluşmaktadır. Bireylerin yaşları 19-52 arasında olup yaş ortalaması 26'dır. Sağlıklı bireylerin % 58,9'unun hiç sigara kullanmadığı, % 41,1'inin ise geçmişte veya halen sigara içtiği belirlenmiştir. Ayrıca hasta ve kontrol grubundaki bireylerin meslek bilgileri sorgulanmış ve riskli olarak görülen mesleklerin değerlendirmeye alınamayacak kadar az olduğu saptanmıştır.

5.2. DNA İzolasyonu

EDTA içeren tüplerde saklanan hasta grubuna ait kan örneklerinden bölüm 4.1.'de anlatılan yöntemlerle DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen DNA örneklerinden 3 µl alınarak %1'lik agaroz jelde incelenmiş ve DNA'nın kırılmadan elde edildiği doğrulanmıştır (Şekil 5.1.). DNA örneklerinin saflık ve konsantrasyon analizleri spektrofotometrik ölçümlerle belirlenmiştir. Sağlıklı bireylerden alınan yanak içi epitel hücrelerinden ise bölüm 4.2.'de açıklanan yöntemle DNA izole edilmiştir.



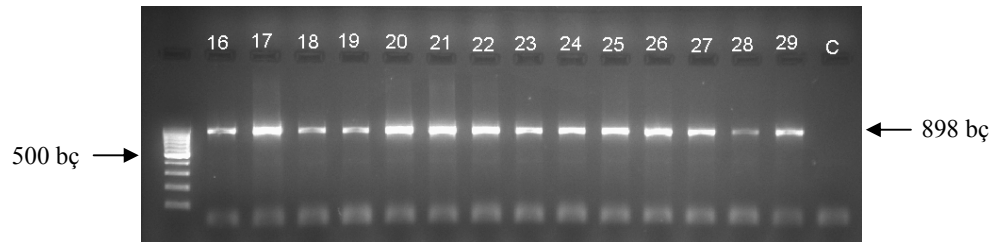
Şekil 5.1. Genomik DNA örneklerinin %1'lik agaroz jelde görünümü

5.3. CYP Lokuslarının PCR-RFLP Yöntemi ile Moleküler Analizi

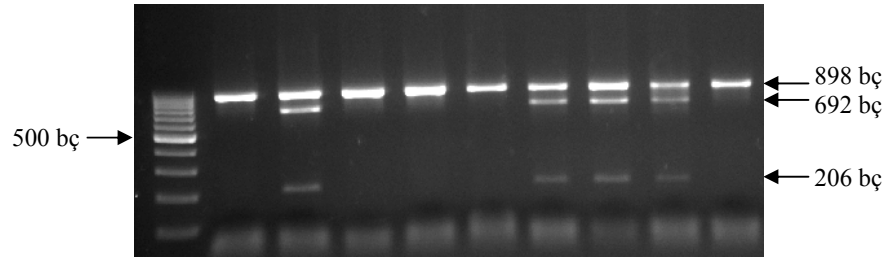
Araştırılan CYP lokusları, hasta ve kontrol grubuna ait DNA örnekleri kullanılarak bölüm 4.4.'te belirtilen şartlarla PCR yöntemi ile çoğaltılmıştır. Çoğalan gen bölgeleri agaroz jel elektroforezi ve EtBr boyaması ile UV ışığı altında görüntülenmiştir. Başarılı bir şekilde amplifiye olan bölgeler bölüm 4.5.'te belirtilen şartlar kullanılarak restriksiyon analizine tabii tutulmuş ve ardından agaroz jel elektroforezi yöntemi ile incelenmiştir. Restriksiyon analizi ile belirlenen aleller DNA dizi analizi ile doğrulanmıştır.

5.3.1. CYP1A1 Lokusunun Moleküler Analizi

CYP1A1 lokusunda bulunan dört polimorfizmin (m1,m2,m3,m4) tespiti için iki çift primer ve üç adet restriksiyon enzimi kullanılmıştır. m1 ve m3 aynı polimorfik bölge üzerindedir. Bu polimorfik bölge M3F ve P80 primerleri ile sınırlandırılarak PCR yöntemi ile çoğaltılmış ve 898 bç'lik amplifikasyon ürünü elde edilmiştir (Şekil 5.2.). PCR ürünleri *MspI* restriksiyon enzimi ile kesilerek %2'lik agaroz jelde görüntülenmiştir (Şekil 5.3.). *MspI* kesimi PCR ürününü m1 polimorfizmi için 692 bç ve 206 bç'lik, m3 polimorfizmi için ise 802 bç ve 96 bç'lik iki parçaya ayırmaktadır. m3 polimorfizmi bu çalışmadaki örneklerde gözlenmediği için gösterilmemiştir.

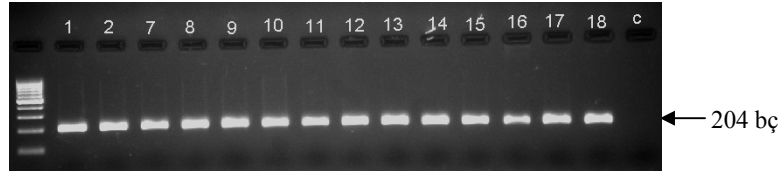


Şekil 5.2. M3F-P80 PCR ürününün %2'lik agaroz jelde görüntülenmesi (100 bç markör)

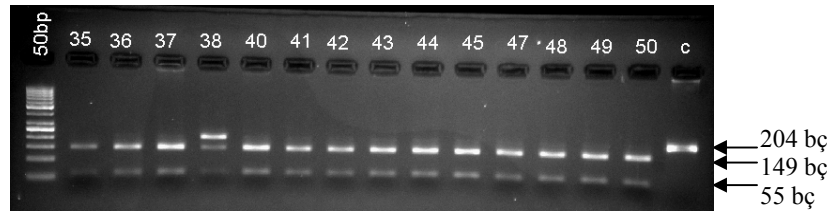


Şekil 5.3. MspI restriksiyon kesimi ürünlerinin %2'lik agaroz jelde görüntülenmesi (100 bç markör)

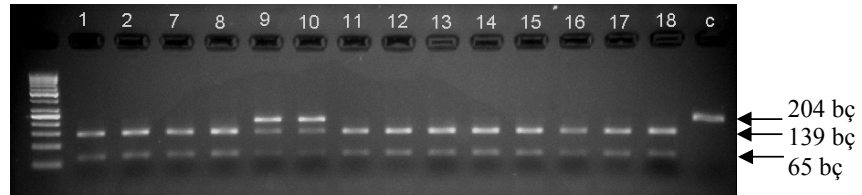
m2 ve m4 polimorfizmlerini tespit etmek amacıyla bu polimorfizmlerin bulunduğu bölge M2F ve M2R primerleri ile sınırlandırılarak PCR yöntemi ile çoğaltılmış ve 204 bç'lik amplifikasyon ürünü elde edilmiştir (Şekil 5.4.). Elde edilen PCR ürünü m2'nin tespiti için *BsrDI*, m4'ün tespiti için ise *BsaI* restriksiyon enzimi ile kesilmiştir. *BsrDI* enzimi kesim sonucunda 149 bç ve 55 bç'lik, *BsaI* enzimi ise 139 bç ve 65 bç'lik fragmanlar oluşturmaktadır (Şekil 5.5. ve Şekil 5.6.).



Şekil 5.4. M2F-M2R PCR ürününün %2'lik agaroz jelde görünümü (100 bç markör)



Şekil 5.5. BsrDI kesim ürünlerinin %2'lik agaroz jelde görünümü (50 bç markör)



Şekil 5.6. BsaI kesim ürünlerinin %2'lik agaroz jelde görünümü (50 bç markör)

Tüm restriksiyon ürünlerinin kesim paternleri incelenerek hasta ve kontrol grubu örneklerinin taşıdıkları genotip frekansları belirlenmiştir (Tablo 5.1.,5.2.,5.3. ve 5.4) ve bu genotiplere göre oluşturdukları aleller tespit edilmiştir (Tablo 5.5., 5.6. ve 5.7.).

Tablo 5.1. CYP1A1 (m1) Genotip Frekansları

Grup		Frekans	Yüzde
Hasta	T T	40	64,5
	C T	21	33,9
	C C	1	1,6
	Toplam	62	100,0
Kontrol	T T	52	72,2
	C T	20	27,8
	C C	0	0
	Toplam	72	100,0

Tablo 5.2. CYP1A1 (m3) Genotip Frekansları

Grup		Frekans	Yüzde
Hasta	T T	62	100,0
Kontrol	T T	73	100,0

Tablo 5.3. CYP1A1 (m2) Genotip Frekansları

Grup		Frekans	Yüzde
Hasta	A A	55	88,7
	G A	7	11,3
	Toplam	62	100,0
Kontrol	A A	66	90,4
	G A	7	9,6
	Toplam	73	100,0

Tablo 5.4. CYP1A1 (m4) Genotip Frekansları

Grup		Frekans	Yüzde
Hasta	C C	57	91,9
	A C	5	8,1
	Toplam	62	100,0
Kontrol	C C	65	89,0
	A C	8	11,0
	Toplam	73	100,0

Tablo 5.5. CYP1A1 Mutasyonlarının ve alellerinin frekansları

	Nükleotid Değişimleri				Alel Frekansları	
	m1	m3	m2	m4	n	%
CYP1A1*1	T	T	A	C	214	79,3
CYP1A1*2A	<u>C</u>	T	A	C	29	10,7
CYP1A1*2B	<u>C</u>	T	<u>G</u>	C	14	5,2
CYP1A1*3	T	<u>C</u>	A	C	0	0,0
CYP1A1*4	T	T	A	<u>A</u>	13	4,8
Mutasyon frekansı (n)	43	0	14	13		
(%)	15,9	0,0	5,2	4,8		

Cascorbi vd. (1996)'den adapte edilmiştir.

Tablo 5.6. CYP1A1 Genotip Dağılımları

Genotip	Frekans	%	Beklenen (%) ^a
*1/*1	83	61,5	62,9
*1/*2A	27	20,0	17,0
*1/*2B	11	8,1	8,3
*1/*4	10	7,4	7,6
*2A/*2A	0	0,0	1,1
*2A/*2B	1	0,7	1,1
*2A/*4	1	0,7	1,0
*2B/*2B	0	0,0	0,3
*2B/*4	2	1,5	0,5
*4/*4	0	0,0	0,2
Total	135	100,0	100,0

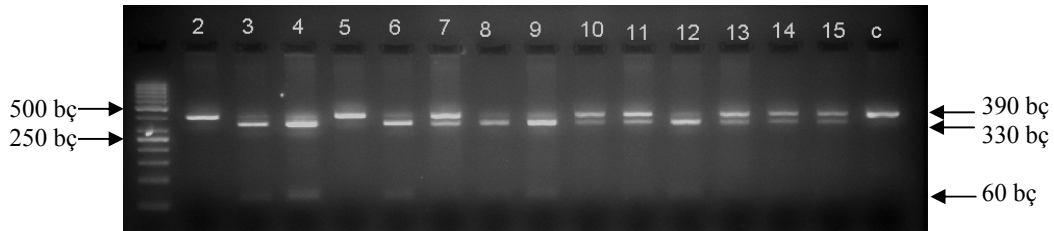
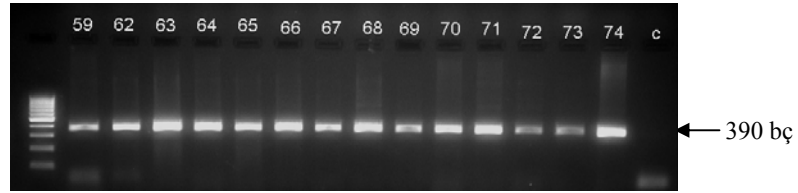
^a Beklenen değerler Tablo 5.5.'ten Hardy-Weinberg eşitliği ile hesaplanmıştır.

Tablo 5.7. Gruplara Göre CYP1A1 Genotip Dağılımı

	Hasta		Kontrol	
	Frekans	Yüzde	Frekans	Yüzde
*1/*1	37	59,7	46	63,0
*1/*2A	14	22,6	13	17,8
*1/*2B	5	8,1	6	8,2
*1/*4	3	4,8	7	9,6
*2A/*2A	0	0,0	0	0,0
*2A/*2B	1	1,6	0	0,0
*2A/*4	1	1,6	0	0,0
*2B/*2B	0	0,0	0	0,0
*2B/*4	1	1,6	1	1,4
*4/*4	0	0,0	0	0,0
Total	62	100,0	73	100,0

5.3.2. CYP1B1 Lokusunun Moleküler Analizi

CYP1B1 geni üzerinde 4316 C>G mutasyonunu bulunduran polimorfik bölge, 1B1F *Eco57I* ve 1B1R *Eco57I* primerleri ile sınırlandırılarak PCR yöntemi ile çoğaltılmış, 390 bç'lik amplifikasyon ürünü elde edilmiş ve % 2'lik agaroz jelde görüntülenmiştir (Şekil 5.7.). *Eco57I* restriksiyon enzimi ile kesilen amplifikasyon ürünleri %2'lik agaroz jelde incelenmiştir. 390 bç'lik PCR ürünününün *Eco57I* enzimi ile kesimi 330 bç ve 60 bç'lik fragmentler oluşturmaktadır.



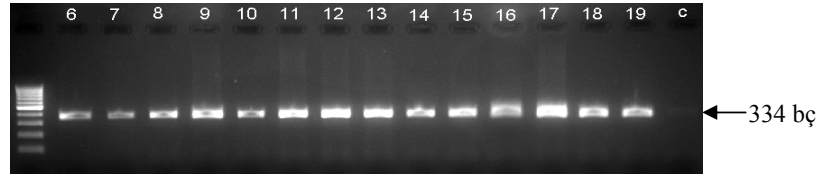
Tüm restriksiyon ürünlerinin kesim paternleri incelenerek hasta ve kontrol gruplarının taşıdıkları genotip frekansları ve aleller belirlenmiştir (Tablo 5.8.). *Eco57I* restriksiyon kesimi ile belirlenen 4316 C>G mutasyonu aynı zamanda CYP1B1*3 alelini oluşturmaktadır.

Tablo 5.8. CYP1B1 Genotip Frekansları

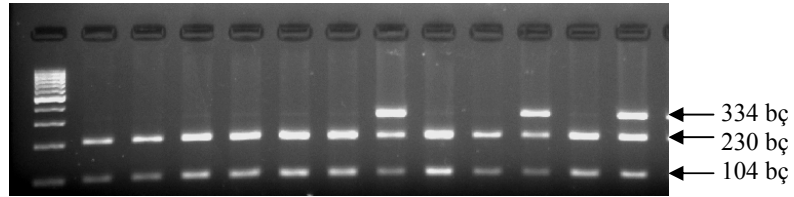
Grup		Frekans	Yüzde
Hasta	C C	18	29,0
	G C	40	64,5
	G G	4	6,5
	Toplam	62	100,0
Kontrol	C C	37	50,7
	G C	30	41,1
	G G	6	8,2
	Toplam	73	100,0

5.3.3. CYP2D6 Lokusunun Moleküler Analizi

İlgili polimorfik bölge, 2D6*B ex3 ve 2D6*B int4 primerleri ile sınırlandırılarak PCR yöntemi ile çoğaltılmış ve 334 bç'lik amplifikasyon ürünü elde edilmiştir. PCR ürünleri %2'lik agaroz jelde gözlenerek reaksiyonun başarısı doğrulanmıştır (Şekil 5.9.). Elde edilen PCR ürünleri *ScrFI* restriksiyon enzimi ile kesilerek %2'lik agaroz jelde incelenmiştir (Şekil 5.10.). *ScrFI* restiriksiyon enzimi 334 bç'lik PCR ürünü 230 bç ve 104 bç'lik iki parçaya bölmektedir.



Şekil 5.9. 2D6*Bex3 – 2D6*Bint4 PCR ürününün %2'lik agaroz jelde görünümü (100bç markör)



Şekil 5.10. *ScrFI* kesim ürünlerinin %2'lik agaroz jelde görünümü (100 bç markör)

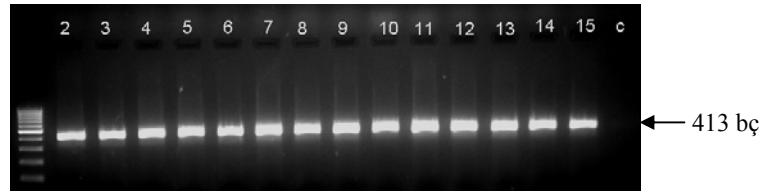
Tüm restriksiyon ürünlerinin kesim paternleri incelenerek hasta ve kontrol grubunun taşıdıkları genotip frekansları ve aleller belirlenmiştir (Tablo 5.9.).

Tablo 5.9. CYP2D6 Genotip Frekansları

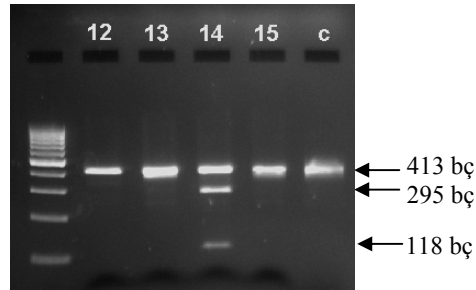
Grup		Frekans	Yüzde
Hasta	G G	43	69,4
	A G	18	29,0
	A A	1	1,6
	Toplam	62	100,0
Kontrol	G G	56	76,7
	A G	15	20,5
	A A	2	2,7
	Toplam	73	100,0

5.3.4. CYP2E1 Lokusunun Moleküler Analizi

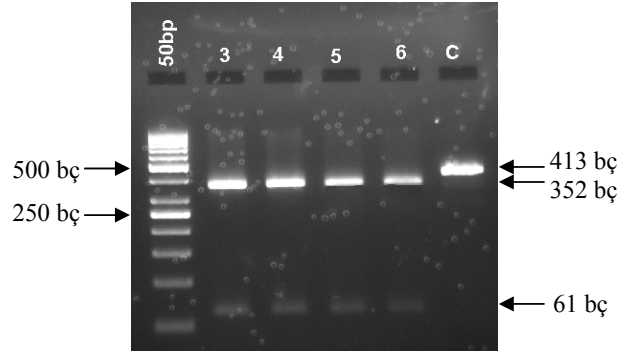
CYP2E1 lokusunda bulunan üç polimorfizmin tespiti için iki çift primer ve üç enzim kullanılmıştır. *PstI* ve *RsaI* polimorfik bölgeleri, 2E1*5bF ve 2E1*5bR primerleri ile sınırlandırılarak PCR yöntemi ile çoğaltılmış ve 413 bç'lik ürünler elde edilmiştir (Şekil 5.11.). Amplifiye olan bölgeler %2'lik agaroz jelde doğrulandıktan sonra *PstI* ve *RsaI* restriksiyon enzimleri ile kesilmiş ve kesim ürünleri %2'lik agaroz jelde görüntülenerek sonuçlar yorumlanmıştır. Bu PCR ürünününün *PstI* restriksiyon enzimi ile kesimi 295 bç ve 118 bç'lik fragmanlar oluşturmaktadır (Şekil 5.12.). *RsaI* restriksiyon enzimi ile kesimi ise 352 bç ve 61 bç'lik parçalar oluşturmaktadır (Şekil 5.13.). Üçüncü polimorfik bölge de 2E1*6 ve 2E1*62 primerleri kullanılarak PCR yöntemi ile çoğaltılmış ve PCR ürünleri *DraI* restriksiyon enzimi ile kesilmiştir. PCR ve kesim ürünlerini gözlemlemek için %2'lik agaroz jel kullanılmıştır. Bu bölgenin PCR ürünü 995 bç uzunluğundadır (Şekil 5.14.). PCR ile çoğaltılan bu bölgenin üzerinde mutasyondan bağımsız olan bir tanıma bölgesi olduğundan PCR ürünü polimorfizmden bağımsız olarak 121 bç ve 874 bç'lik fragmanlara ayrılmakta, 874 bç'lik fragman da mutasyonun varlığına göre 572 bç ve 302 bç'lik iki parçaya ayrılmaktadır (Şekil 5.15.).



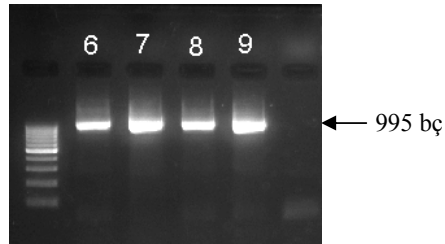
Şekil 5.11. 2E1*5bF – 2E1*5bR PCR ürünününün %2'lik agaroz jelde görünümü (100 bç markör)



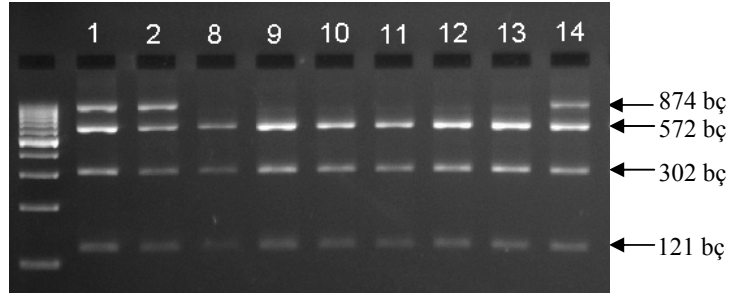
Şekil 5.12. *PstI* kesim ürünlerinin %2'lik agaroz jelde görünümü (100 bç markör)



Şekil 5.13. RsaI kesim ürünlerinin %2'lik agaroz jelde görünümü (50 bç markör)



Şekil 5.14. 2E1*6 – 2E1*62 PCR ürününün %2'lik agaroz jelde görünümü (100 bç markör)



Şekil 5.15. DraI kesim ürünlerinin %2'lik agaroz jelde görünümü (100 bç markör)

Tüm restriksiyon ürünlerinin kesim paternleri incelenerek hasta ve kontrol grubu örneklerinin taşıdıkları genotip frekansları belirlenmiştir (Tablo 5.10., 5.11. ve 5.12.). Ayrıca veriler incelendiğinde PstI ve RsaI'in beklenildiği üzere tam bağlantı eşitsizliğinde olduğu saptanmıştır.

Tablo 5.10. PstI Genotip Frekansları

Grup		Frekans	Yüzde
Hasta	G G	58	93,5
	C G	4	6,5
	Toplam	62	100,0
Kontrol	G G	70	95,9
	C G	3	4,1
	Toplam	73	100,0

Tablo 5.11. RsaI Genotip Frekansları

Grup		Frekans	Yüzde
Hasta	C C	58	93,5
	T C	4	6,5
	Toplam	62	100,0
Kontrol	C C	70	95,9
	T C	3	4,1
	Toplam	73	100,0

Tablo 5.12. DraI Genotip Frekansları

Grup		Frekans	Yüzde
Hasta	T T	55	88,7
	A T	7	11,3
	Toplam	62	100,0
Kontrol	T T	61	83,6
	A T	12	16,4
	Toplam	73	100,0

5.4. Verilerin İstatistiksel Analizi

CYP1A1, CYP1B1, CYP2D6 ve CYP2E1 genleri üzerindeki polimorfizmlerin PCR-RFLP yöntemi ile elde edilen genotipleri ve bu genotiplerin oluşturduğu alel frekansları hasta ve kontrol grubunda karşılaştırılmış ve görülen farkların önemi istatistiksel olarak tespit edilmiştir. Ayrıca tüm bulguların Hardy-Weinberg Dengesi' sine uygunluğu istatistiksel olarak test edilmiştir. Cinsiyet, yaş ve sigara içimi gibi etmenler genetik farklılıklarla birlikte ele alınmış ve hastalık oluşturma riski analiz edilmiştir. İstatistiksel analizler SPSS 15.0 ve PLINK v1.04 programları yardımıyla yapılmıştır.

5.4.1. Hardy-Weinberg Analizi ve Alel Frekansları

Her polimorfizme ait gözlemlenen genotip frekanslarından yararlanılarak alel frekansları (Tablo 5.13 – 5.20) ve beklenen genotip frekansları Hardy-Weinberg prensibine göre hesaplanmış, beklenen ve gözlemlenen frekanslar ki-kare uygunluk testi ile değerlendirilmiştir. Ancak ki-kare testi için oluşturulan tablolarda bazı değerler beşten küçük olduğundan sonuçlar Fisher's Exact Test ile düzeltilmelidir. Bu amaçla Hardy-Weinberg Testi PLINK programı aracılığıyla yapılmıştır (Tablo 5.21.).

Tablo 5.13. CYP1A1 (m1) polimorfizmi frekansları

CYP1A1 (m1) - rs4646903		
	T	C
Hasta	0.815	0.185
Kontrol	0.861	0.139
Toplam	0.840	0.160

Tablo 5.14. CYP1A1 (m2) polimorfizmi frekansları

CYP1A1 (m2) - rs1048943		
	A	G
Hasta	0.944	0.056
Kontrol	0.952	0.048
Toplam	0.948	0.052

Tablo 5.15. CYP1A1 (m4) polimorfizmi frekansları

CYP1A1 (m4) - rs1799814		
	C	A
Hasta	0.960	0.040
Kontrol	0.945	0.055
Toplam	0.952	0.048

Tablo 5.16. CYP1B1 polimorfizmi frekansları

CYP1B1 - rs1056836		
	G	C
Hasta	0.387	0.613
Kontrol	0.288	0.712
Toplam	0.333	0.667

Tablo 5.17. CYP2D6 polimorfizmi frekansları

CYP2D6 - rs3892097		
	G	A
Hasta	0.839	0.161
Kontrol	0.870	0.130
Toplam	0.856	0.144

Tablo 5.18. CYP2E1 PstI polimorfizmi frekansları

CYP2E1 (PstI) - rs3813867		
	G	C
Hasta	0.968	0.032
Kontrol	0.979	0.021
Toplam	0.974	0.026

Tablo 5.19. CYP2E1 RsaI polimorfizmi frekansları

CYP2E1 (RsaI) - rs2031920		
	C	T
Hasta	0.968	0.032
Kontrol	0.979	0.021
Toplam	0.974	0.026

Tablo 5.20. CYP2E1 DraI polimorfizmi frekansları

CYP2E1 (DraI) - rs6413432		
	C	T
Hasta	0.944	0.056
Kontrol	0.918	0.082
Toplam	0.930	0.070

Tablo 5.21. Örneklerin Hardy-Weinberg Uygunluk Testi (PLINK)

LOKUS	SNP	A1	A2	TEST	GENO	O(HET)	E(HET)	P
CYP1B1	Eco57I	G	C	ALL	10/70/55	0.5185	0.4444	0.07995
CYP1B1	Eco57I	G	C	AFF	4/40/18	0.6452	0.4745	0.007131
CYP1B1	Eco57I	G	C	UNAFF	6/30/37	0.411	0.4098	1
CYP2E1	PstI	C	G	ALL	0/7/128	0.05185	0.05051	1
CYP2E1	PstI	C	G	AFF	0/4/58	0.06452	0.06243	1
CYP2E1	PstI	C	G	UNAFF	0/3/70	0.0411	0.04025	1
CYP2E1	DraI	A	T	ALL	0/19/116	0.1407	0.1308	1
CYP2E1	DraI	A	T	AFF	0/7/55	0.1129	0.1065	1
CYP2E1	DraI	A	T	UNAFF	0/12/61	0.1644	0.1509	1
CYP2E1	RsaI	T	C	ALL	0/7/128	0.05185	0.05051	1
CYP2E1	RsaI	T	C	AFF	0/4/58	0.06452	0.06243	1
CYP2E1	RsaI	T	C	UNAFF	0/3/70	0.0411	0.04025	1
CYP1A1	MspI(m1)	C	T	ALL	1/41/92	0.306	0.2694	0.1953
CYP1A1	MspI(m1)	C	T	AFF	1/21/40	0.3387	0.3022	0.672
CYP1A1	MspI(m1)	C	T	UNAFF	0/20/52	0.2778	0.2392	0.3385
CYP1A1	MspI(m3)		T	ALL	0/0/135	0	0	1
CYP1A1	MspI(m3)		T	AFF	0/0/62	0	0	1
CYP1A1	MspI(m3)		T	UNAFF	0/0/73	0	0	1
CYP1A1	BsrDI(m2)	G	A	ALL	0/14/121	0.1037	0.09833	1
CYP1A1	BsrDI(m2)	G	A	AFF	0/7/55	0.1129	0.1065	1
CYP1A1	BsrDI(m2)	G	A	UNAFF	0/7/66	0.09589	0.09129	1
CYP1A1	BsaI(m4)	A	C	ALL	0/13/122	0.0963	0.09166	1
CYP1A1	BsaI(m4)	A	C	AFF	0/5/57	0.08065	0.07739	1
CYP1A1	BsaI(m4)	A	C	UNAFF	0/8/65	0.1096	0.1036	1
CYP2D6	ScrFI	A	G	ALL	3/33/99	0.2444	0.2472	1
CYP2D6	ScrFI	A	G	AFF	1/18/43	0.2903	0.2706	1
CYP2D6	ScrFI	A	G	UNAFF	2/15/56	0.2055	0.2264	0.335

Tablo 5.21’de görülen A1 ve A2 minör ve majör alelleri TEST test grubunu, GENO genotip sayılarını, O(HET) ve E(HET) gözlenen ve beklenen heterozigot frekanslarını temsil etmektedir. Bu analiz sonucunda P değeri 0.05’ten büyük olan grupların Hardy-Weinberg Dengesi’ne uygun olduğu kabul edilmiştir.

5.4.2. CYP Polimorfizmlerinin Mesane Kanseri ile İlişkilendirilmesi

Her bir polimorfizmin hastalıkla ilişkisi PLINK v1.04 ve SPSS 15.0 programları ile değerlendirilmiştir. SPSS 15.0 programında hasta ve kontrol grupları ile çapraz tablolar hazırlanarak ki-kare bağımsızlık testi uygulanmıştır. PLINK programı ise “Cochran-Armitage Trend”, “dominant gene action (1df)”, “recessive gene action (1df)”, “genotypic (2 df)” ve “allelic” testlerini her polimorfizm ve her grup için otomatik olarak yapmaktadır. Her iki program için de 0,05’ten küçük P değerleri istatistiksel olarak önemli kabul edilmiştir.

5.4.2.1. Çapraz Tablolar ve Ki-kare Bağımsızlık Testi

Hasta ve kontrol grupları ile oluşturulan çapraz tablolar ve χ^2 bağımsızlık testleri sonuçları Tablo 5.22.-5.35 ile gösterilmiştir.

Tablo 5.22. Grup * CYP1A1 m1 Çapraz Tablosu

		CYP1A1 m1			
		T T	C T	C C	Toplam
Grup	Kontrol	52	20	0	72
	Hasta	40	21	1	62
	Toplam	92	41	1	134

Tablo 5.23. Grup * CYP1A1 m1 Ki-Kare Testleri

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)	Point Probability
Pearson Chi-Square	1,854(a)	2	,396	,397		
Continuity Correction						
Likelihood Ratio	2,233	2	,327	,397		
Fisher's Exact Test	1,795			,397		
Linear-by-Linear Association	1,233(b)	1	,267	,287	,175	,077
N of Valid Cases	134					

a 2 hücre (%33,3) 5'ten küçük tahmin edildi. Minimum tahmin ,46.

b Standardize edilmiş istatistik 1,110.

Hesaplanan teorik değerlerden ikisi 5'ten küçük olduğundan dolayı Tablo 5.23.'deki Fisher's Exact Testin sonuçları göz önünde bulundurulmalıdır. Buna göre m1 polimorfizmi için $\chi^2 = 1,795$, $P = 0,397$ bulunmuştur.

Tablo 5.24. Grup * CYP1A1 m2 Çapraz Tablosu

		CYP1A1 m2		
		A A	G A	Toplam
Grup	Kontrol	66	7	73
	Hasta	55	7	62
	Toplam	121	14	135

Tablo 5.25. Grup * CYP1A1 m2 Ki-Kare Testleri

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)	Point Probability
Pearson Chi-Square	,104(b)	1	,747	,783	,482	
Continuity Correction(a)	,002	1	,968			
Likelihood Ratio	,104	1	,747	,783	,482	
Fisher's Exact Test				,783	,482	
Linear-by-Linear Association	,104(c)	1	,748	,783	,482	,210
N of Valid Cases	135					

a Yanlızca 2x2 tablo için hesaplandı.

b 0 hücre (% ,0) 5'ten küçük tahmin edildi. Minimum tahmin 6,43.

c Standardize edilmiş istatistik ,322.

Tablo 5.26. Grup * CYP1A1 m4 Çapraz Tablosu

		CYP1A1 m4		
		C C	A C	Toplam
Grup	Kontrol	65	8	73
	Hasta	57	5	62
Toplam		122	13	135

Tablo 5.27. Grup * CYP1A1 m4 Ki-Kare Testleri

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)	Point Probability
Pearson Chi-Square	,323(b)	1	,570	,771	,394	
Continuity Correction(a)	,076	1	,783			
Likelihood Ratio	,326	1	,568	,771	,394	
Fisher's Exact Test				,771	,394	
Linear-by-Linear Association	,320(c)	1	,571	,771	,394	,199
N of Valid Cases	135					

a Yanlızca 2x2 tablo için hesaplandı.

b 0 hücre (% ,0) 5'ten küçük tahmin edildi. Minimum tahmin 5,97.

c Standardize edilmiş istatistik -,566.

Tablo 5.24. ve Tablo 5.26 2x2 tablolarıdır ve bu tablolarda hesaplanan teorik değerlerden hiçbirisi 5'ten küçük değildir fakat bu değerlerden bir veya bir kaç 5 ile 25 arasında kaldığından Yates Ki-kare ("continuity correction") kullanılmalıdır. Bu durumda değerlendirme yapılırken CYP1A1 m2 polimorfizmi için $P = 0,968$, CYP1A1 m4 polimorfizmi için ise $P = 0,783$ alınmalıdır.

Tablo 5.28. Grup * CYP1A1 Alelleri Çapraz Tablosu

		CYP1A1							
		*1/*1	*1/*2A	*1/*2B	*1/*4	*2A/*2B	*2A/*4	*2B/*4	Toplam
Grup	Kontrol	46	13	6	7	0	0	1	73
	Hasta	37	14	5	3	1	1	1	62
	Toplam	83	27	11	10	1	1	2	135

Tablo 5.29. Grup * CYP1A1 Alelleri Ki-Kare Testleri

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)	Point Probability
Pearson Chi-Square	3,833(a)	6	,699	,813		
Continuity Correction						
Likelihood Ratio	4,627	6	,592	,811		
Fisher's Exact Test	3,945			,779		
Linear-by-Linear Association	,165(b)	1	,685	,720	,366	,044
N of Valid Cases		135				

a 7 hücre (%50,0) 5'ten küçük tahmin edildi. Minimum tahmin ,46.

b Standardize edilmiş istatistik ,406.

Tablo 5.29. oluşturulurken beklenen değerlerden yedisi 5'ten küçük olduğundan dolayı bu tabloda Fisher's Exact Test'in sonuçları göz önünde bulundurulmalıdır. CYP1A1 alelleri için $\chi^2 = 3,945$, $P = 0,779$ bulunmuştur. Hasta ve kontrol popülasyonu alel dağılımında istatistiksel olarak önemli bir fark yoktur.

Tablo 5.30. Grup * CYP1B1 Çapraz Tablosu

		CYP1B1			
		C C	G C	G G	Toplam
Grup	Kontrol	37	30	6	73
	Hasta	18	40	4	62
	Toplam	55	70	10	135

Tablo 5.31. Grup * CYP1B1 Ki-Kare Testleri

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)	Point Probability
Pearson Chi-Square	7,546(a)	2	,023	,022		
Continuity Correction						
Likelihood Ratio	7,640	2	,022	,025		
Fisher's Exact Test	7,538			,021		
Linear-by-Linear Association	3,553(b)	1	,059	,066	,040	,019
N of Valid Cases	135					

a 1 hücre (%16,7) 5'ten küçük tahmin edildi. Minimum tahmin 4,59.

b Standardize edilmiş istatistik 1,885.

Tablo 5.31. oluşturulurken beklenen değerlerden biri 5'ten küçük olduğundan dolayı bu tabloda Fisher's Exact Test'in sonuçları göz önünde bulundurulmalıdır. CYP1B1 *Eco57I* polimorfizmi için $\chi^2 = 7,538$, $P = 0,021$ bulunmuştur. Bu değerler hasta ve kontrol popülasyonundaki genotip dağılımının önemli düzeyde farklı olduğunu göstermektedir.

Tablo 5.32. Grup * CYP2D6 Çapraz Tablosu

		CYP2D6			
		G G	A G	A A	Toplam
Grup	Kontrol	56	15	2	73
	Hasta	43	18	1	62
Toplam		99	33	3	135

Tablo 5.33. Grup * CYP2D6 Ki-Kare Testleri

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)	Point Probability
Pearson Chi-Square	1,426(a)	2	,490	,485		
Continuity Correction						
Likelihood Ratio	1,428	2	,490	,485		
Fisher's Exact Test	1,510			,485		
Linear-by-Linear Association	,517(b)	1	,472	,496	,292	,105
N of Valid Cases	135					

a 2 hücre (%33,3) 5'ten küçük tahmin edildi. Minimum tahmin 1,38.

b Standardize edilmiş istatistik ,719.

Tablo 5.33. oluşturulurken beklenen değerlerden biri 5'ten küçük olduğundan dolayı bu tabloda Fisher's Exact Test'in sonuçları göz önünde bulundurulmalıdır. CYP2D6 *ScrFI* polimorfizmi için $\chi^2 = 1,510$, $P = 0,485$ bulunmuştur.

Tablo 5.34. Grup * CYP2E1*5B (*PstI*) Çapraz Tablosu

		CYP2E1*5B		
		G G	C G	Toplam
Grup	Kontrol	70	3	73
	Hasta	58	4	62
Toplam		128	7	135

Tablo 5.35. Grup * CYP2E1*5B (*PstI*) Ki-Kare Testleri

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)	Point Probability
Pearson Chi-Square	,374(b)	1	,541	,703	,409	
Continuity Correction(a)	,049	1	,824			
Likelihood Ratio	,373	1	,542	,703	,409	
Fisher's Exact Test				,703	,409	
Linear-by-Linear Association	,371(c)	1	,542	,703	,409	,251
N of Valid Cases	135					

a Yanlızca 2x2 tablo için hesaplandı.

b 2 hücre (%50,0) 5'ten küçük tahmin edildi. Minimum tahmin 3,21.

c Standardize edilmiş istatistik ,609.

Tablo 5.35. oluşturulurken beklenen değerlerden ikisi 5'ten küçük olduğundan dolayı bu tabloda Fisher's Exact Test'in sonuçları göz önünde bulundurulmalıdır. CYP2E1 *PstI* polimorfizmi için $P = 0,703$ bulunmuştur. Ayrıca *PstI* ve *RsaI* polimorfizimleri tam LD'de olduklarından dolayı *RsaI* için ki-kare testi de aynı sonucu vermektedir ve bu yüzden *RsaI* için ki-kare testi tekrar gösterilmemiştir.

Tablo 5.36. Grup * CYP2E1*6 (*DraI*) Çapraz Tablosu

		CYP2E1*6		
		T T	A T	Toplam
Grup	Kontrol	61	12	73
	Hasta	55	7	62
Toplam		116	19	135

Tablo 5.37. Grup * CYP2E1*6 (DraI) Ki-Kare Testleri

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)	Point Probability
Pearson Chi-Square	,735(b)	1	,391	,462	,273	
Continuity Correction(a)	,371	1	,543			
Likelihood Ratio	,745	1	,388	,462	,273	
Fisher's Exact Test				,462	,273	
Linear-by-Linear Association	,729(c)	1	,393	,462	,273	,139
N of Valid Cases	135					

a Yanlızca 2x2 tablo için hesaplandı.

b 0 hücre (% ,0) 5'ten küçük tahmin edildi. Minimum tahmin 8,73.

c Standardize edilmiş istatistik -,854.

Tablo 5.36. 2x2 tablodur ve bu tablo için hesaplanan teorik değerlerden hiçbiri 5'ten küçük değildir; fakat bu değerlerden bir veya bir kaç 5 ile 25 arasında kaldığından Yates Ki-kare kullanılmalıdır. Bu durumda değerlendirme yapılırken CYP2E1 *DraI* polimorfizmi için $P = 0,543$ alınmalıdır.

5.4.2.2. PLINK ile Asosiyasyon Testleri

PLINK programı ile yapılan testlerin sonuçları Tablo 5.38.'de verilmiştir. Uygulanan model testlerin tamamının sonuçları Fisher's Exact Test ile yine PLINK programı tarafından düzeltilmiştir ve sonuçlar P değeri olarak elde edilmiştir. GENO genotipik testtir ve genotip sayılarını karşılaştırır. Bu yüzden SPSS ile yapılan ki-kare testi ile aynı sonucu vermektedir. TREND, Cochran-Armitage Trend Testi; ALLELIC, alelik testi; DOM, dominant gene ve REC, resesif gen testlerini ifade etmektedir. 0,05'ten küçük P değerleri test edilen SNP ve hastalık arasında bir ilişki olabileceğini ifade etmektedir.

Tablo 5.38. Fisher ile Düzeltilmiş Test Sonuçları (PLINK)

LOKUS	SNP	A1	A2	TEST	AFF	UNAFF	P
CYP1B1	Eco57I	G	C	GENO	4/40/18	6/30/37	0.0207
CYP1B1	Eco57I	G	C	TREND	48/76	42/104	0.0585
CYP1B1	Eco57I	G	C	ALLELIC	48/76	42/104	0.09313
CYP1B1	Eco57I	G	C	DOM	44/18	36/37	0.01385
CYP1B1	Eco57I	G	C	REC	4/58	6/67	0.7532
CYP2E1	PstI	C	G	GENO	0/4/58	0/3/70	0.7026
CYP2E1	PstI	C	G	TREND	4/120	3/143	0.5408
CYP2E1	PstI	C	G	ALLELIC	4/120	3/143	0.7065
CYP2E1	PstI	C	G	DOM	4/58	3/70	0.7026
CYP2E1	PstI	C	G	REC	0/62	0/73	1
CYP2E1	DraI	A	T	GENO	0/7/55	0/12/61	0.4619
CYP2E1	DraI	A	T	TREND	7/117	12/134	0.3914
CYP2E1	DraI	A	T	ALLELIC	7/117	12/134	0.4793
CYP2E1	DraI	A	T	DOM	7/55	12/61	0.4619
CYP2E1	DraI	A	T	REC	0/62	0/73	1
CYP2E1	RsaI	T	C	GENO	0/4/58	0/3/70	0.7026
CYP2E1	RsaI	T	C	TREND	4/120	3/143	0.5408
CYP2E1	RsaI	T	C	ALLELIC	4/120	3/143	0.7065
CYP2E1	RsaI	T	C	DOM	4/58	3/70	0.7026
CYP2E1	RsaI	T	C	REC	0/62	0/73	1
CYP1A1	MspI(m1)	C	T	GENO	1/21/40	0/20/52	0.3966
CYP1A1	MspI(m1)	C	T	TREND	23/101	20/124	0.265
CYP1A1	MspI(m1)	C	T	ALLELIC	23/101	20/124	0.3205
CYP1A1	MspI(m1)	C	T	DOM	22/40	20/52	0.3565
CYP1A1	MspI(m1)	C	T	REC	1/61	0/72	0.4627
CYP1A1	MspI(m3)	0	T	GENO	0/0/62	0/0/73	1
CYP1A1	MspI(m3)	0	T	TREND	0/124	0/146	NA
CYP1A1	MspI(m3)	0	T	ALLELIC	0/124	0/146	1
CYP1A1	MspI(m3)	0	T	DOM	0/62	0/73	1
CYP1A1	MspI(m3)	0	T	REC	0/62	0/73	1
CYP1A1	BsrDI(m2)	G	A	GENO	0/7/55	0/7/66	0.7833
CYP1A1	BsrDI(m2)	G	A	TREND	7/117	7/139	0.7466
CYP1A1	BsrDI(m2)	G	A	ALLELIC	7/117	7/139	0.7888
CYP1A1	BsrDI(m2)	G	A	DOM	7/55	7/66	0.7833
CYP1A1	BsrDI(m2)	G	A	REC	0/62	0/73	1
CYP1A1	BsaI(m4)	A	C	GENO	0/5/57	0/8/65	0.7711
CYP1A1	BsaI(m4)	A	C	TREND	5/119	8/138	0.57
CYP1A1	BsaI(m4)	A	C	ALLELIC	5/119	8/138	0.7769
CYP1A1	BsaI(m4)	A	C	DOM	5/57	8/65	0.7711
CYP1A1	BsaI(m4)	A	C	REC	0/62	0/73	1
CYP2D6	ScrFI	A	G	GENO	1/18/43	2/15/56	0.4854
CYP2D6	ScrFI	A	G	TREND	20/104	19/127	0.4705
CYP2D6	ScrFI	A	G	ALLELIC	20/104	19/127	0.4914
CYP2D6	ScrFI	A	G	DOM	19/43	17/56	0.435
CYP2D6	ScrFI	A	G	REC	1/61	2/71	1

5.4.3. Cinsiyet ve Hastalık İlişkisinin Araştırılması

Mesane kanseri hastalığının cinsiyet ile olan ilişkisi, hasta ve kontrol grubundaki kadın ve erkek oranlarının SPSS 15.0 programında ki-kare bağımsızlık testi yapılarak karşılaştırılması ile araştırılmıştır (Tablo 5.39.). Tablo 5.40.'ta görüldüğü üzere $\chi^2=9,88$, $P = 0,002$ bulunmuştur. Bu sonuçlar mesane kanseri hastalığıyla cinsiyet arasında önemli bir bağlantı olduğunu göstermektedir. Tablo 5.41.'de de görüldüğü gibi erkekler kadınlardan 3,6 kat daha fazla hastalığa yakalanma riski taşımaktadır.

Tablo 5.39. Cinsiyet * Grup Çapraz Tablosu

		Grup		
		Kontrol	Hasta	Toplam
Cinsiyet	Kadın	34	12	46
	Erkek	39	50	89
Toplam		73	62	135

Tablo 5.40. Cinsiyet * Grup Ki-Kare Testleri

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	11,058(b)	1	,001		
Continuity Correction(a)	9,880	1	,002		
Likelihood Ratio	11,431	1	,001		
Fisher's Exact Test				,001	,001
Linear-by-Linear Association	10,976	1	,001		
N of Valid Cases	135				

a Yanlızca 2x2 tablo için hesaplandı.

b 0 hücre (% ,0) 5'ten küçük tahmin edildi. Minimum tahmin 21,13.

Tablo 5.41. Risk Tahmini

	Value	95% Confidence Interval	
		Upper	Lower
Odds Ratio for Cinsiyet (Kadın / Erkek)	3,632	1,665	7,924
For cohort Grup = Kontrol	1,687	1,261	2,257
For cohort Grup = Hasta	,464	,276	,781
N of Valid Cases	135		

5.4.4. Yaş ve Hastalık İlişkisinin Araştırılması

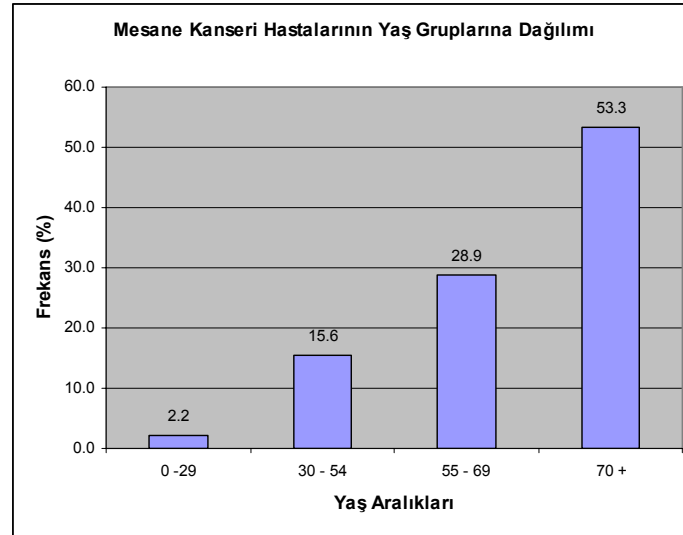
Mesane kanseri hastalığının yaş ile ilişkisi Student T Testi ile hasta ve kontrol gruplarının yaş ortalaması karşılaştırılarak yapılmıştır (Tablo 5.42 ve Tablo 5.43.). Elde edilen [T=20,964; df=116; P<0,001] sonuç, mesane kanseri hastalığının görülme olasılığının yaş ile çok önemli derecede alakalı olduğunu göstermektedir. Buna ek olarak hastalar 0-29, 30-54, 55-69 ve 70 yaş üstü olarak gruplara ayrılmıştır (Şekil 5.16). Bu dağılıma göre vakaların % 97,8'inin 30 yaşının üstünde olduğu ve 70 yaş üstü grubun toplam vakaların % 53,3'ünü oluşturduğu görülmektedir. Ayrıca hastalığın görülme sıklığı 30-54 yaşa 55-69 yaşa, 55-59 yaştan da 70+ yaşa geçerken yaklaşık 1,9 kat artmıştır.

Tablo 5.42. Yaş - Grup İstatistikleri

Yas	Grup	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error
					Mean
Yas	Hasta	45	66,96	14,110	2,103
	Kontrol	73	25,51	7,326	,857

Tablo 5.43. T Testi

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2- tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Upper	Lower
Yas	Equal variances assumed	24,925	,000	20,964	116	,000	41,449	1,977	37,533	45,365
	Equal variances not assumed			18,248	58,846	,000	41,449	2,271	36,903	45,994



Şekil 5.16. Mesane Kanseri Hastaların Frekans – Yaş Grafiği

5.4.5. Sigara İçimi ve Hastalık İlişkinin Araştırılması

Sigara kullanımı ve mesane kanseri arasındaki olası bağlantının araştırılması için hasta ve kontrol popülasyonu sigara kullanımına göre gruplandırılmış (Tablo 5.44.) ve ki-kare testi ile değerlendirilmiştir (Tablo 5.45.).

Tablo 5.44. Sigara Kullanımı * Grup Çapraz Tablosu

		Grup		
		Kontrol	Hasta	Toplam
Sigara Kullanımı	İçmiyor	43	7	50
	İçiyor	30	34	64
Toplam		73	41	114

Tablo 5.45. Sigara Kullanımı * Grup Ki-kare Testleri

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)	Point Probability
Pearson Chi-Square	18,658(b)	1	,000	,000	,000	
Continuity Correction(a)	16,997	1	,000			
Likelihood Ratio	19,964	1	,000	,000	,000	
Fisher's Exact Test				,000	,000	
Linear-by-Linear Association	18,494(c)	1	,000	,000	,000	,000
N of Valid Cases		114				

a Yalnızca 2x2 tablo için hesaplandı.

b 0 hücre (,0%) 5'ten küçük tahmin edildi. Minimum tahmin 17,98.

c Standardize edilmiş istatistik 4,300.

Yapılan istatistik değerlendirme sonucunda sigara kullanımının hastalık ile önemli derecede ilişkisi bulunmuştur ($\chi^2=16.997$; df:1; $P<0,001$; OR:6,962(2,7 – 17,8), (Tablo 5.46.).

Tablo 5.46. Risk Tahmini

	95% Confidence Interval		
	Value	Upper	Lower
Odds Ratio for Sigara Kullanımı (içmiyor / içiyor)	6,962	2,726	17,780
For cohort Grup = Kontrol	1,835	1,381	2,437
For cohort Grup = Hasta	,264	,128	,544
N of Valid Cases	114		

5.4.6. Lojistik Regresyon Analizi ve Göreli Orantılar

Ki-kare testleri sonucunda kontrol ve hasta grubu dağılımlarında istatistiksel olarak önemli farklar görülen CYP1B1 geni *Eco57I* polimorfizmine SPSS programında lojistik regresyon analizi uygulanarak göreli orantılar elde edilmiştir. Bu göreli orantı değerleri, hastalık ile ilişkili olduğu bilinen ve ki-kare testlerinde de anlamlı farklar görülen çevresel faktörlere (sigara içimi ve cinsiyet) göre düzeltilmiştir (Tablo 5.47.). Kontrol ve hasta grupları yaş faktörü için uygun görülmediğinden değerlendirmeye alınmamıştır. Lojistik regresyon analizindeki modellerin uygunluğu Hosmer-Lemeshow Test ile doğrulanmıştır.

Tablo 5.47. Lojistik Regresyon Analizi

	Sig. ^a	OR ^b (95,0% C.I.)	OR ^a (95,0% C.I.)
CYP1B1 (Leu/Leu)	,032	1,0 (ref.)	1,0 (ref.)
CYP1B1 (Leu/Val)	,011	3,537 (1,338 – 9,351)	2,741 (1,313 – 5,720)
CYP1B1 (Val/Val)	,854	1,192 (,182 – 7,821)	1,370 (,343 – 5,474)
CYP1B1 (Leu/Val + Val/Val)	,019	2,512 (1,229 – 5,136)	3,080 (1,204 – 7,874)

a Sigara içimi ve cinsiyet için düzeltilmiş
b Ham değerler

6. TARTIŞMA

İnsan genomundaki genetik varyasyon, genetik ve çevresel faktörlerin birlikte karakterize ettiği kompleks hastalıklardan biri olan kanser araştırmaları için çok güçlü bir kaynaktır. Popülasyona atfedilen kanser kalıtımının az rastlanan gen hataları ile değil, genellikle DNA dizisindeki polimorfik varyasyonlarla ilişkili olduğu giderek anlaşılır hale gelmiştir. Bu görüş, mesane kanseri de dahil olmak üzere pek çok kanser oluşum mekanizması için kabul edilmiştir (Kim ve Quan, 2005). Çoğu kanser türü, genomik ve çevresel faktörlerin karmaşık etkileşimlerinin bir sonucudur. Çevresel faktörlerin ve onlara eşlik eden genetik modülatörlerin tespiti için zenobiyotik ve endobiyotik metabolizmasına dahil olan biyolojik anahtarların araştırılması önem taşımaktadır (Thier vd., 2003).

Zenobiyotiklerin oksidatif metabolizması için sitokrom P450 enzim süperailisi pek çok endojen (hormon, yağ asitleri, vs.) ve ekzojen (PAH, aromatik aminler, vs.) kimyasalın oksidasyonunu katalizler. Bu faz I enzimleri çoğunlukla kimyasal ve zehirli maddelerin aktivasyonuna dahil olurken, faz II enzimleri (GST, sülfotransferazlar, vs.) de genellikle birincil metabolitlerin detoksifikasyonuna katılırlar. Aktivasyon ve detoksifikasyon arasındaki bu denge biyo-aktif zehirli maddelerin dozunu belirler ve sonuç olarak hastalık riskini etkiler (Thier vd., 2003).

Pek çok metabolik enzimlerde ve diğer genlerdeki genetik polimorfizmlerin mesane kanseri riskini arttıran modülatörler olduğu bulunmuştur. Mesane kanseri riski ile ilgili en çok çalışılan polimorfizmler özellikle N-asetil-transferazlar, glutatyon S-transferazlar ve DNA tamir mekanizmasındaki enzimler gibi önemli enzim genleri üzerindeki polimorfizmler olmuştur (Franeckova vd., 2008). CYP polimorfizmleri, akciğer, baş ve boyun kanseri gibi diğer sigara içimiyle ilgili araştırmalarda sıkça çalışılmış olmasına rağmen mesane kanseri ile yapılan çalışmalar çok az sayıdadır.

Bu çalışma kapsamında 62 mesane kanseri hastası ve 73 sağlıklı bireyden alınan örneklerle CYP1A1, CYP1B1, CYP2D6 ve CYP2E1 genleri üzerinde seçilmiş toplam dokuz polimorfizm çalışılmıştır. Yapılan PCR-RFLP çalışmaları sonucunda her bir polimorfizmin alel frekansları elde edilmiştir. Bu alel frekanslarının Hardy-Weinberg Dengesi'ne uygunluğu PLINK programı yardımı ile ölçülmüştür. Frekansı çok düşük genotipler için standart Asimtotik Test yerine Exact Test kullanılmıştır

(Wigginton vd., 2005). Hasta ve kontrol gruplarının test sonucu elde edilen p değerleri Tablo 5.21.'de gösterilmektedir. P değerinin 0,05'ten büyük olması varsayılan dağılıma yani Hardy-Weinberg'e (HW) uygunluğu belirtmektedir (Daniel W.W., 1999; Özdamar K., 2003). Bu bilgiler çerçevesinde kontrol grubu tüm polimorfizmler için HW dengesindedir; fakat hasta popülasyonunun CYP1B1 (*Eco571*) için HW dengesinde olmadığı görülmektedir. Ancak hasta popülasyonu rasgele seçilmiş bireylerden oluşmamaktadır ve HW dengesinde olmayabileceği gibi, bu durum *Eco571* polimorfizminin hastalıkla alakalı olabileceği hakkında bir ipucu vermektedir. Ayrıca, kontrol grubunun frekans verileri Kanser Genom Anatomisi Projesi SNP500Kanser Veritabanı'ndaki (<http://snp500cancer.nci.nih.gov>) frekanslarla karşılaştırıldığında, bu verilere yakın sonuçlar elde edildiği görülmektedir (Tablo 6.1.). Tablo 6.1.'de CYP1B1 geninin genotipik ve alelik frekanslarının diğer polimorfizmlerden farklı olarak beyaz ırk yerine İspanyol kökenlilerde rastlanan frekanslara benzediği görülmektedir.

Bu çalışmada genetik faktörler ile birlikte çevresel faktörler de değerlendirilmiştir. İlk olarak cinsiyet ve mesane kanseri için bir değerlendirme yapılmış ve aralarında sıkı bir ilişki bulunmuştur ($\chi^2=9,88$; $P=0,002$). Yapılan istatistiksel değerlendirmeye göre erkekler, bayanlara göre yaklaşık olarak 3,6 kat daha fazla (%95 CI: 1,6 – 7,9) mesane riski taşımaktadır. Hasta grubu incelendiğinde %80,6'sını erkek bireylerin oluşturduğu görülmektedir. Daha önce yapılan çalışmalar da erkeklerde mesane kanserinin üç ile beş kat arasında daha fazla görüldüğünü bildirmektedir (Olfert vd., 2006). Sigaranın da mesane kanseri ile ilişkisi pek çok çalışmada doğrulanmış ve mesane kanseri için bir risk faktörü olduğu kabul görmüştür. Sigara kullanımı için değerlendirme yapıldığında sigara içimi ve mesane kanseri arasında önemli derecede ilişki bulunmuştur [$\chi^2=16.997$; $df:1$; $P<0,001$; OR:6,962 (2,7–17,8)]. Mesane kanseri oluşumu için araştırılan diğer bir çevresel faktör ise yaştır. Yapılan çalışmalarda mesane kanseri hastalarının üçte ikisinin 65 yaş üzerinde olduğu tespit edilmiştir (Olfert vd., 2006). Bu tez çalışmasında da mesane kanseri hastalarının %53,3'ünü 70 yaş üstü, %28,9'unu da 55 ve 69 yaş arasındaki bireyler oluşturmaktadır. Mesane kanseri ve yaş ilişkisini tespit etmek amacıyla Student T-Testi uygulanmış ve istatistiki olarak çok büyük bir fark bulunmuştur. Ancak kontrol grubunun yaş ortalaması hasta grubundan önemli derece düşüktür ve karşılaştırma yapmak için uygun değildir. Fakat genotip dağılımı kontrol veya hasta grubunda yaş ile değişmeyeceği için bu durum frekans ve genotip

değerlendirmelerini etkilemeyecektir (Wenzlaff vd., 2005). Ancak bu durumdan dolayı yaş faktörü lojistik regresyon analizine dahil edilmemiştir.

Tablo 6.1. Genotipik ve Alelik Frekansların SNP500Cancer Verileri ile Karşılaştırılması

Polimorfizm	Popülasyon	Genotipik			Alelik	
		CC	CT	TT	C	T
CYP1A1 (m1) rs4646903	Kontrol	0.000	0.278	0.722	0.139	0.861
	Beyaz Irk	(0.000)	(0.379)	(0.621)	(0.190)	(0.810)
CYP1A1 (m2) rs1048943	Kontrol	0.904	0.096	0.000	0.952	0.048
	Beyaz Irk	(0.774)	(0.226)	(0.000)	(0.887)	(0.113)
CYP1A1 (m4) rs1799814	Kontrol	0.110	0.890	0.055	0.945	0.055
	Beyaz Irk	(0.129)	(0.871)	(0.065)	(0.935)	(0.065)
CYP1B1 rs1056836	Kontrol	0.507	0.411	0.082	0.712	0.288
	İspanyol Beyaz Irk	(0.522) (0.323)	(0.435) (0.452)	(0.043) (0.226)	(0.739) (0.548)	(0.261) (0.452)
CYP2D6 rs3892097	Kontrol	0.027	0.205	0.767	0.130	0.870
	Beyaz Irk	(0.032)	(0.419)	(0.548)	(0.242)	(0.758)
CYP2E1 (PstI) rs3813867	Kontrol	0.041	0.959	0.021	0.979	0.021
	Beyaz Irk	(0.032)	(0.968)	(0.016)	(0.984)	(0.016)
CYP2E1 (RsaI) rs2031920	Kontrol	0.959	0.041	0.979	0.021	0.021
	Beyaz Irk	(0.968)	(0.032)	(0.984)	(0.016)	(0.016)
CYP2E1 (DraI) rs6413432	Kontrol	0.000	0.164	0.836	0.082	0.918
	Beyaz Irk	(0.000)	(0.129)	(0.871)	(0.065)	(0.935)

Diğer lokuslardan farklı olarak CYP1A1 için bakılan dört polimorfizm, beş farklı alelin tespit edilmesini sağlamaktadır (Cascorbi vd., 1996; Aynacioglu vd., 1998). Tablo 5.5., 5.6. ve 5.7.'de elde edilen aleller ve bu alellerin genotipik dağılımları belirtilmiştir. Aynacioğlu ve arkadaşlarının 1998'de Türk popülasyonu üzerinde yaptığı frekans çalışmasında CYP1A1*2A, *2B ve *4 alellerinin diğer beyaz ırka mensup popülasyonlara göre oldukça yüksek olduğu gösterilmiştir. Ayrıca m1 ve m2 mutasyonlarının Türklere beyaz ırk popülasyonlarına göre daha yüksek, uzak doğu popülasyonlarına göre ise çok daha düşük bir frekansa sahip olduğunu belirtmiştir (Aynacioglu vd., 1998). Bu tezde de CYP1A1 ile ilgili alınan sonuçlar,

Aynacioğlu vd.'nin (1998) aldığı sonuçlar ile oldukça yakındır ve bu çalışmayı doğrulamıştır. Ayrıca sadece Afrikalılar'da rastlandığı belirtilen (Cascorbi vd., 1996) m3 mutasyonuna bu tez çalışmasında da rastlanmamıştır.

CYP1A1 mutasyonları ile yapılan çalışmalar popülasyonlara ve çalışılan kanser tipine göre farklı sonuçlar vermiştir. CYP1A1 m1 mutasyonunun Almanlarda ve Şilililerde yapılan çalışmalarda akciğer kanseri riskini arttırdığı belirtilmiştir (Cascorbi vd., 1996; Quinones vd., 2001). Yapılan diğer çalışmalar Japon popülasyonunda m1 mutasyonunun meme kanseri ve kolon kanseri için bir risk olmadığını ve hatta sigara içmeyenlerde kolon kanseri için riski düşürdüğünü bildirmiştir (Ishibe vd., 1998; Inoue vd., 2000). CYP1A1 m2 mutasyonunun baş ve boyun skuamöz hücre karsinomunda, akciğer kanserinde ve GSTM1 (null) genotipi ile birlikte prostat kanserinde risk artırıcı bir faktör olarak belirtilmiştir (Morita vd., 1999; Murata vd., 2001; Quinones vd., 2001). Hiç sigara kullanmamış Koreli kadınlar üzerinde yapılan bir çalışma ise m2 mutasyonunun akciğer kanseri riskini düşürdüğü belirtmiştir (Yoon vd., 2008). Japon ve beyaz ırk popülasyonunda yapılan iki çalışma ise, CYP1A1 ve mesane kanseri arasında önemli bir bağlantı olmadığını belirtmiştir (Bartsch vd., 2000). Yapılan bu tez çalışmasında ise CYP1A1 lokusu için m1 ($\chi^2= 1,795$ P = 0,397), m2 ($\chi^2= 0,002$ P = 0,968), m4 ($\chi^2= 0,076$ P = 0,783) mutasyonları değerlendirildiğinde, bu mutasyonların mesane kanseri hastalığı ile bağlantısı tespit edilememiştir. Ayrıca bu polimorfizmlerin oluşturduğu *1, *2A, *2B, *3 ve *4 alelleri (<http://www.cypalleles.ki.se/cyp1a1.htm>) ve bu alellerin oluşturduğu genotip dağılımı belirlenmiştir. Genotiplerin kontrol ve hasta popülasyonunda dağılımı arasında önemli bir fark görülmemiştir (Tablo 5.29.).

CYP2D6 lokusunda zayıf metabolizör fenotipinden sorumlu en yaygın mutasyon, ekzon 3 ve intron 4 birleşimindeki G/A transizyonudur (Sobti vd., 2005; Febbo vd., 1998). Smith vd.'nin 1992'de yaptığı CYP2D6'nın intron3/ekzon 4 G/A transizyonu odaklı kapsamlı çalışmasında lösemi, melanoma ve mesane kanseri genotip dağılımlarında önemli bir farklılık gözlemlendiği belirtilirken; teratom, prostat, meme, kolon ve akciğer kanserlerinin CYP2D6 ile bir bağlantısı bulunamamıştır. Bu çalışmada aynı zamanda mesane kanseri için farklılığın büyük oranda heterozigotlardan kaynaklandığı homozigot mutantlarda önemli bir farklılık olmadığı ve ek çalışmaların gerekliliğinden de bahsedilmiştir (Smith vd., 1992). Febbo vd.'nin 1998'de beyaz ırk üzerinde yaptığı çalışma, CYP2D6 ile prostat kanseri arasında bir bağlantı bulamamıştır (Febbo vd., 1998). Mısırlılar'da yapılan

bir çalışmada ise CYP2D6'nın mesane kanseri üzerinde tek başına bir etkisi olmadığı, fakat GSTM1 (null) genotipi ile birlikte değerlendirildiğinde bir risk faktörü olduğu belirtilmiştir (Anwar vd., 1996). Kuzey Hindistan'da yapılan başka bir çalışma ise CYP2D6'nın heterozigot fenotipinin mesane kanseri riskiyle bir bağlantısı olmadığını, fakat zayıf metabolizör yani homozigot mutant genotipin kanser riskini 1,5 kat arttırdığını bildirmiştir (Sobti vd., 2005). Bu tez çalışması kapsamında da CYP2D6 geninde intron3/ekzon4 G/A transizyonu araştırılmış ve genotip dağılımlarının hasta ve kontrol gruplarında istatistiksel olarak önemli bir farklılık göstermediği ($\chi^2=1,510$ P=0,485); sonuç olarak bu polimorfizmin mesane kanseriyle bir ilişkisi olmadığı saptanmıştır. Ancak bu polimorfizmin frekansı Türk popülasyonunda oldukça düşüktür ve hatta beyaz ırk popülasyonunda gözlemlenen frekansın altındadır (Tablo 6.1.). Bu nedenle, bu polimorfizmin daha yüksek frekans gösterdiği popülasyonlarda çalışılması daha sağlıklı sonuçlar verecektir. Bunun yanı sıra CYP2D6 ilaçların yaklaşık %25'inin (örn. beta-bloker ve trisiklik antidepresanlar) metabolizmasında yer almaktadır (Sachse vd., 1997). Pek çok ilacın terapötik etkinliği ve tedavideki yan etkileri CYP2D6 aktivitesine bağlı olduğundan, bu çalışma ileride uygulanacak kişisel ilaç tedavileri için rutin olarak yapılacak genotip taramaları için faydalı olacaktır.

CYP2E1 *PstI/RsaI* ve *DraI* polimorfizmleri akciğer kanseri başta olmak üzere pek çok kanser türünde çalışılmıştır. Kato vd.'nin 1992 ve 1994'te Amerikalı ve Japon denekler üzerinde yaptığı iki çalışmada *PstI/RsaI* ve *DraI* polimorfizmleri ile akciğer kanseri arasında bir bağlantı olmadığı belirtilmiştir (Kato vd. 1992; Kato vd., 1994). 2001 yılında Şili'de yapılan bir çalışma Kato vd.'nin yaptığı çalışmayı doğrularak akciğer kanseri ve CYP2E1 geni arasında bir bağlantı olmadığını belirtmiştir (Quinones vd., 2001). Yine 2001 yılında Japon popülasyonu üzerinde yapılan bir çalışma prostat kanseri ve *PstI* polimorfizmleri arasında bağlantı bulunmadığını belirtirken (Murata vd., 2001), 2007 yılında Çin'de yapılan başka bir çalışma rektal kanser ile *RsaI* polimorfizmini bağlantılı bulmuştur (Gao vd., 2007). Japon popülasyonunda baş ve boyun kanseri ve *PstI* polimorfizmi arasında bağlantı olmadığı da bildirilmiştir (Morita vd., 1999). Mesane kanseri ve CYP2E1 ile daha önce yapılan iki çalışma birbiri ile çelişmektedir. 1996 yılında Mısırlı mesane kanseri hastaları üzerinde yapılan bir çalışma, CYP2E1 *PstI* polimorfizmi ile mesane kanseri arasında bir bağlantı bulamamıştır (Anwar vd., 1996). Ancak 2003 yılında Koreli erkekler üzerinde yapılan başka bir çalışma CYP2E1 ve mesane kanseri arasında bir

bağlantı bulunduğunu belirtmektedir (Choi vd., 2003). Bu tez çalışması kapsamında da CYP2E1 *PstI*, *RsaI* ve *DraI* polimorfizmlerinin mesane kanseri için bir risk faktörü olup olmadığı araştırılmıştır. *RsaI* (G-1259C) ve *PstI* (C-1091T) polimorfizmlerinin birbirleriyle tam LD halinde olduğu bilinmektedir (Bolt vd., 2003). Ancak Kato vd. (1992) sekiz vakanın bu duruma uymadığını belirtmiştir (Kato vd., 1992). Bu nedenle bu tez çalışmasında da *PstI* ve *RsaI* polimorfizmlerinin her ikisi de incelenmiş ve tüm örneklerin Türk popülasyonunda da tam bağlantı eşitsizliğinde olduğu bulunmuştur. 2001 yılında yapılan bir çalışma *PstI/RsaI* ve *DraI* polimorfizmlerinin Türk popülasyonunda frekanslarını bildirmiştir (Ömer vd., 2001). Bu tez çalışmasında bulunan alel ve genotip frekansları, 2001 yılında bildirilen frekanslarla örtüşmektedir. *PstI/RsaI* polimorfizmleri CYP2E1*5B, *DraI* polimorfizmi de CYP2E1*6 alellerini oluşturmaktadır (<http://www.cypalleles.ki.se/cyp2e1.htm>). Yapılan istatistiksel analiz sonucunda, CYP2E1*5B ve CYP2E1*6 alellerinin genotip dağılımlarının mesane kanseri hastaları ve sağlıklı kontrol grupları arasında önemli bir fark ($P=0,703$ ve $P=0,543$) bulunamamıştır.

Daha önce yapılan çalışmalarda CYP1B1 geni pek çok kanser türü ile ilişkili bulunmuştur. Ko vd.'nin 2001 yılında yaptığı çalışma CYP1B1'in sigara içimi göz önünde bulundurulduğunda baş ve boyun kanseri ile ilişkili olduğunu bildirmiştir (Ko vd. 2001). Tanaka vd. CYP1B1'in 119G-T varyantını prostat kanseri ile ilişkili bulurken, Val432Leu polimorfizminin prostat kanserini etkilemediğini bildirmiştir (Tanaka vd. 2002). 2007'de yapılan iki çalışma ise CYP1B1 genini kolorektal kanser ve lösemi ile ilişkilendirmiştir (Fan vd., 2007; Vineis vd., 2007). 2002'de Türk popülasyonunda yapılan bir çalışma ise CYP1B1*3 alelinin meme kanseri ile alakalı olduğunu bildirmiştir (Kocabas vd., 2002). Hiç sigara içmemiş Koreli kadınlarda yapılan bir araştırma ise CYP1B1 Leu432Val ve CYP1A1 Ile462Val polimorfizmleri birlikte değerlendirildiğinde akciğer kanseri için bir risk faktörü olduğunu belirtmiştir (Yoon vd., 2007). Bu çalışmalara karşıt olarak Watanabe vd. CYP1B1 Val432Leu polimorfizminin, akciğer ve meme kanseri ile bağlantısının bulunmadığını belirtmiştir (Watanabe vd., 2000). Yine 2004 yılında Hung vd. yaptığı çalışmada mesane kanseri ve CYP1B1 arasında bir bağlantı bulamamıştır (Hung vd., 2004). Japon popülasyonunda yapılan başka bir çalışma ise renal kanser ile CYP1B1 Val432Leu değişimi arasında bir bağlantı bulmuştur (Sasaki vd., 2004).

Bu tez çalışmasında CYP1B1'in üzerindeki, CYP1B1*3 alelini belirleyen (<http://www.cypalleles.ki.se/cyp1b1.htm>) Leu432Val polimorfizmi ile mesane kanseri arasındaki ilişki araştırılmıştır. Hasta ve kontrol popülasyonu arasındaki genotip dağılımı incelenmiş ve arada istatistiksel olarak önemli bir fark ($\chi^2= 7,538$ df:2, P=0,021) bulunmuştur. PLINK ile yapılan bağlantı analizi de bu sonucu doğrulamaktadır. Bu dağılımı mesane kanserini etkileyen diğer faktörler ile birlikte değerlendirmek ve göreceli orantıları elde etmek için lojistik regresyon analizi yapılmıştır. Lojistik regresyon analizinde de CYP1B1 tek başına veya çevresel faktörlerle birlikte değerlendirildiğinde mesane kanseri için bir risk oluşturmaktadır (Tablo 5.47.). Sonuçlar ki-kare testlerinde önemli çevresel faktörler olarak bulunan cinsiyet ve sigara içimine göre düzeltildiğinde, %95 güven aralığında, CYP1B1 (Leu/Val) için OR:2,741 (1,313 – 5,720), CYP1B1 (Leu/Val + Val/Val) için OR: 3,080 (1,204 – 7,874) olarak bulunmuştur. CYP1B1'in 432. kodonundaki G/C değişimi protein yapısında Val-Leu amino asit değişimine sebep olmaktadır ve CYP1B1'in yabancıl tip aleli G olarak tanımlanmıştır (Bailey vd., 1998; Stoilov vd., 1998). Ancak yapılan bu tez çalışmasında bu değişimin Türk popülasyonunda çok yüksek frekansta görüldüğü tespit edilmiştir. Yabancıl tip olarak bildirilen G alelinin her ikisine sahip bireyler toplam 135 kişiden sadece 10'unda saptanmıştır. Benzer genotip dağılımı daha önce de belirtildiği gibi İspanyol kökenlilerde bulunmuştur. Aynı zamanda Kocabas vd.,'nin yaptığı çalışmada belirttiği alel ve genotip frekansları bu tez çalışmasındaki frekanslarla birebir örtüşmekte ve yapılan bu çalışmalar birbirini doğrulamaktadır (Kocabas vd., 2002). Lojistik regresyon analizinde Val/Val aleli istatistiksel olarak önemli görülmemektedir. Fakat eğer 432Val aleli hastalığın artmış riski ile alakalıysa, Val/Val genotipinin de hastalıkla alakalı görülmesi beklenir. Bu durum 432Val alelinin frekansının Türk popülasyonunda çok düşük olması ve denek sayısının yeterli büyüklüğe ulaşmamış olabileceğinden kaynaklanıyor olabilir. Yine de hasta grubunda heterozigotların neden arttığı ileride yapılacak çalışmalarla açığa kavuşacaktır.

Bunun yanı sıra, yabancıl tip alelin hastalığın artmış riskiyle alakalı olduğu görülmektedir. Bu durum kolorektal, renal ve akciğer kanserleri için yapılan çalışmalarda da bildirilmiştir (Fan vd., 2007; Sasaki vd., 2004; Yoon vd., 2007; Wenzlaff vd., 2005). İnsan dokularından elde edilen mRNA'larla yapılan blot analizleri CYP1B1'in yetişkin böbrek, prostat, uterus ve meme dokularında göreceli olarak daha fazla eksprese edildiğini göstermiştir (Shimada vd., 1996). Üriner

sedimentler ve üreter örneklerinden yapılan hücre kültürü çalışmaları bu hücrelerde CYP1B1'in diğer CYP genlerine göre daha fazla eksprese edildiğini bildirmiştir (Roos vd.,2005). CYP1B1 hem polisiklik aromatik hidrokarbonların hem de aril aminlerin aktivasyonunu katalizleyebilmektedir. CYP1B1 dihidrodiollerin metabolik aktivasyonunda da önemli bir aktivite göstermektedir. Bu aktivitenin ürünü olan diol epoksitler pek çok tümör modelinde potansiyel kanserojenlerdir (Shimada vd., 1996). İnsan CYP1B1 varyantlarıyla yapılan çalışmalar, benzo[a]pyrene gibi PAH'ları ve dihidrodiollerin aktivasyonunu katalize ederken Leu432 varyantının Val432 varyantına göre biraz daha aktif olduğunu göstermiştir. Ancak 17 β -oestradiol 4-hidroksilasyon aktiviteleri Val432 aleli ile daha yüksek olma eğilimindedir (Shimada vd., 1999; Shimada vd., 2000). Testosteronun 6 β -hidroksilasyonu için ise iki Leu432 varyantının Val432 varyantlarına göre daha yüksek V_{max}/K_m oranına sahip olduğu bildirilmiştir (Shimada vd., 1999). Bu çalışmalara zıt olarak Aklillu vd. 2005 yılında bu varyantların B[a]P metabolizmasında katalitik farklılık göstermediğini bildirmiştir (Aklillu vd., 2005). Yapılan çalışmalar, kullanılan metot ve substrat farklılıkları nedeniyle çelişkili sonuçlar vermesine rağmen CYP1B1 Val432Leu polimorfizminin enzim aktivitesinde bir değişikliğe sebep olabileceği hakkında güçlü deliller sunmaktadır. CYP1B1'in geniş çapta karsinojenik kimyasalı aktive etmesi ve sigara içimiyle de çok çeşitli karsinojene maruz kalınması mekanizmanın net bir şekilde ortaya konmasını zorlaştırmaktadır. Bunlara ek olarak genel mekanizma oluşturulurken vücutta biriken karsinojenlerin faz I ve faz II mekanizmalarının arasındaki denge ile alakalı olduğu göz önünde tutularak, faz II genlerinin deaktive edici etkileri de hesaba katılmalıdır.

Bu çalışmada, denek sayısının azlığına rağmen, elde edilen veriler diğer çalışmalar ile karşılaştırıldığında oldukça iyi sonuçlar bulunduğu görülmektedir. Sonuç olarak CYP1A1, CYP2D6 ve CYP2E1 genleri ile mesane kanseri arasında bir bağlantı bulunamamıştır, fakat CYP1B1'in 432Val varyantının mesane kanseri riskini 2,7 ile 3,0 kat arasında arttırdığı gözlemlenmiştir. Bunun yanı sıra CYP1B1*3 alel frekansının Türk popülasyonunda oldukça yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Bu durum aynı zamanda Türk popülasyonunu CYP1B1 Val432Leu polimorfizmi çalışmaları için uygun kılmaktadır. CYP genleri ile mesane kanseri üzerinde yapılan çalışmalar sadece Türkiye'de değil dünya üzerinde de çok az sayıdadır. Bu yüzden yapılan bu çalışma gelecek çalışmalara da yol gösterecek olması açısından önem taşımaktadır. Alel frekanslarının etnik farklılıklar göstermesi bu çalışmanın

diğer popülasyonlarda da tekrarlanmasını gerektirmektedir. Popülasyona yönelik yapılacak ileriki çalışmalar bu genlerin mesane kanseri ile ilişkisini netleştirecektir. Ayrıca faz II enzim polimorfizmleri ile yapılacak çalışmalar ve bu çalışmaların faz I enzim polimorfizmleri ile birlikte değerlendirilmeleri zenobiyotik mekanizmanın daha iyi aydınlatılması ve mesane kanserinin yol açan faktörlerin daha iyi anlaşılmasını sağlayacaktır. Risk faktörlerinin belirlenmesi ve bu faktörlerin metabolik etkilerinin tam olarak anlaşılması ile birlikte kansere karşı kişisel yatkınlığın belirlenmesi, kişisel ilaç tedavileri ve belirli kimyasallara karşı kişisel korunma sağlanacaktır. Mesane kanseri oluşum mekanizmasının açıklığa kavuşması diğer kanser tiplerinin de anlaşılmasına yardımcı olarak, kanserden genel bir korunma stratejisi oluşturulmasında yol gösterici olacaktır.

7. KAYNAKLAR

7.1. Kitap

ALBERTS B., JOHNSON A., LEWIS J., RAFF M., ROBERTS K., WALTER P., **Molecular Biology of the Cell**, Garland Science, New York, 2002

BAILEY M., SAROSDY M., **Fast Facts – Mesane Kanseri**, Çev. Murat KAHRAMANOĞLU, AND Danışmanlık ve Yayıncılık, 2001

BEKİROĞLU Nural, **Açıklamalı Biyoistatistik Terimleri Sözlüğü**, Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul, 1998

DANIEL W.W., **Biostatistics: A Foundation for Analysis in the Health Sciences**, John Wiley & Sons Inc., New York, 1999

DAWSON B., TRAPP R.G., **Basic & Clinical Biostatistics**, Lange Medical Books/McGraw-Hill, New York, 2004

NORUSIS M.J., **SPSS Regression Models 10.0**, SPSS Inc., Chicago, 1999

ÖZDAMAR Kazım, **SPSS ile Biyoistatistik**, Kaan Kitabevi, Eskişehir, 2003

SHAM Pak, **Statistics in Human Genetics**, Arnold, London, 1998

7.2. Makale

AKLILLU, E., OVREBO, S., BOTNEN, I.V., OTTER, C., INGELMAN-SUNDBERG, M., "Characterization of common CYP1B1 variants with different capacity for benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol epoxide formation from benzo[a]pyrene", **Cancer Res.**, Sayı:65, 5105-5111, Haziran 2005.

AL-SUKHUN, S., HUSSAIN, M., "Current understanding of the biology of advanced bladder cancer", **Cancer**, Sayı:97, 2064-2075, Nisan 2003.

ANWAR, W.A., ABDEL-RAHMAN, S.Z., EL-ZEIN, R.A., MOSTAFA, H.M., AU, W.W., "Genetic polymorphism of GSTM1, CYP2E1 and CYP2D6 in Egyptian bladder cancer patients", **Carcinogenesis**, Sayı:17, 1923-1929, Eylül 1996.

AYNACIOGLU, A.S., CASCORBI, I., MROZIKIEWICZ, P.M., ROOTS, I., "High frequency of CYP1A1 mutations in a Turkish population ", **Arch. Toxicol.**, Sayı:72, 215-218, Mart 1998.

BAILEY, L.R., ROODI, N., DUPONT, W.D., PARL, F.F., " Association of cytochrome P450 1B1 (CYP1B1) polymorphism with steroid receptor status in breast cancer", **Cancer Res.**, Sayı:58, 5038-5041, Kasım 1998.

BARTSCH, H., ROJAS, M., NAIR, U., NAIR, J., ALEXANDROV, K., "Genetic cancer susceptibility and DNA adducts: studies in smokers, tobacco chewers, and coke oven workers", **Cancer Detect. Prev.**, Sayı:23, 445-453, 1999.

BARTSCH, H., NAIR, U., RISCH, A., ROJAS, M., WIKMAN, H., ALEXANDROV, K., "Genetic polymorphism of CYP genes, alone or in combination, as a risk modifier of tobacco-related cancers", **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.**, Sayı:9, 3-28, Ocak 2000.

BOLT, H.M., ROOS, P.H., THIER, R., "The cytochrome P-450 isoenzyme CYP2E1 in the biological processing of industrial chemicals: consequences for occupational and environmental medicine", **Int. Arch. Occup. Environ. Health**, Sayı:76, 174-185, Nisan 2003.

BROCKMOLLER, J., CASCORBI, I., KERB, R., ROOTS, I., "Combined analysis of inherited polymorphisms in arylamine N-acetyltransferase 2, glutathione S-transferases M1 and T1, microsomal epoxide hydrolase, and cytochrome P450 enzymes as modulators of bladder cancer risk", **Cancer Res.**, Sayı:56, 3915-3925, Eylül 1996.

CASCORBI, I., BROCKMOLLER, J., ROOTS, I., "A C4887A polymorphism in exon 7 of human CYP1A1: population frequency, mutation linkages, and impact on lung cancer susceptibility", **Cancer Res.**, Sayı:56, 4965-4969, Kasım 1996.

CASE, R.A., HOSKER, M.E., MCDONALD, D.B., PEARSON, J.T., "Tumours of the urinary bladder in workmen engaged in the manufacture and use of certain dyestuff intermediates in the British chemical industry. I. The role of aniline, benzidine, alpha-naphthylamine, and beta-naphthylamine ", **Br. J. Ind. Med.**, Sayı:11, 75-104, Nisan 1954.

CHEN, X.P., HAN, X.M., JIANG, C.H., HUANG, S.L., LIU, Z.Q., ZHU, B., ZHOU, G., ZHOU, H.H., "Phenotype distribution and gender-related differences of CYP2E1 activity in a Chinese population", **Xenobiotica**, Sayı:32, 1053-1062, Kasım 2002.

CHINEGWUNDOH, F.I., KAISARY, A.V., "Polymorphism and smoking in bladder carcinogenesis", **Br. J. Urol.**, Sayı:77, 672-675, Mayıs 1996.

CHOI, J.Y., LEE, K.M., CHO, S.H., KIM, S.W., CHOI, H.Y., LEE, S.Y., IM, H.J., YOON, K.J., CHOI, H., CHOI, I., HIRVONEN, A., HAYES, R.B., KANG, D., "CYP2E1 and NQO1 genotypes, smoking and bladder cancer", **Pharmacogenetics**, Sayı:13, 349-355, Haziran 2003.

FAN, C., JIN, M., CHEN, K., ZHANG, Y., ZHANG, S., LIU, B., "Case-only study of interactions between metabolic enzymes and smoking in colorectal cancer", **BMC Cancer**, Sayı:7, 115, 2007.

FEBBO, P.G., KANTOFF, P.W., GIOVANNUCCI, E., BROWN, M., CHANG, G., HENNEKENS, C.H., STAMPFER, M., "Debrisoquine hydroxylase (CYP2D6) and prostate cancer", **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.**, Sayı:7, 1075-1078, Aralık 1998.

FRANEKOVA, M., HALASOVA, E., BUKOVSKA, E., LUPTAK, J., DOBROTA, D., "Gene polymorphisms in bladder cancer", **Urol. Oncol.**, Sayı:26, 1-8, Ocak 2008.

GAO, C.M., TAKEZAKI, T., WU, J.Z., CHEN, M.B., LIU, Y.T., DING, J.H., SUGIMURA, H., CAO, J., HAMAJIMA, N., TAJIMA, K., "CYP2E1 Rsa I polymorphism impacts on risk of colorectal cancer association with smoking and alcohol drinking", **World J. Gastroenterol.**, Sayı:13, 5725-5730, Kasım 2007.

GHANAYEM, B.I., SANDERS, J.M., CHANAS, B., BURKA, L.T., GONZALEZ, F.J., "Role of cytochrome P-450 2E1 in methacrylonitrile metabolism and disposition", **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, Sayı:289, 1054-1059, Mayıs 1999.

GOLKA, K., WIESE, A., ASSENNATO, G., BOLT, H.M., "Occupational exposure and urological cancer", **World J. Urol.**, Sayı:21, 382-391, Şubat 2004.

GRZYBOWSKA, E., BUTKIEWICZ, D., MOTYKIEWICZ, G., CHORAZY, M., "The effect of the genetic polymorphisms of CYP1A1, CYP2D6, GSTM1 and GSTP1 on aromatic DNA adduct levels in the population of healthy women", **Mutat. Res.**, Sayı:469, 271-277, Eylül 2000.

HALACHMI, S., MADEB, R., KRAVTSOV, A., MOSKOVITZ, B., HALACHMI, N., NATIV, O., "Bladder cancer--genetic overview", **Med. Sci. Monit.**, Sayı:7, 164-168, Ocak 2001.

HANNA, I.H., DAWLING, S., ROODI, N., GUENGERICH, F.P., PARL, F.F., "Cytochrome P450 1B1 (CYP1B1) pharmacogenetics: association of polymorphisms with functional differences in estrogen hydroxylation activity", **Cancer Res.**, Sayı:60, 3440-3444, Temmuz 2000.

HUNG, R.J., BOFFETTA, P., BRENNAN, P., MALAVEILLE, C., HAUTEFEUILLE, A., DONATO, F., GELATTI, U., SPALIVIERO, M., PLACIDI, D., CARTA, A., SCOTTO DI, C.A., PORRU, S., "GST, NAT, SULT1A1, CYP1B1 genetic polymorphisms, interactions with environmental exposures and bladder cancer risk in a high-risk population", **Int. J. Cancer**, Sayı:110, 598-604, Temmuz 2004.

HUNG, R.J., BOFFETTA, P., BRENNAN, P., MALAVEILLE, C., GELATTI, U., PLACIDI, D., CARTA, A., HAUTEFEUILLE, A., PORRU, S., "Genetic polymorphisms of MPO, COMT, MnSOD, NQO1, interactions with environmental exposures and bladder cancer risk", **Carcinogenesis**, Sayı:25, 973-978, Haziran 2004.

INOUE, H., KIYOHARA, C., MARUGAME, T., SHINOMIYA, S., TSUJI, E., HANDA, K., HAYABUCHI, H., ONUMA, K., HAMADA, H., KOGA, H., KONO, S., "Cigarette smoking, CYP1A1 MspI and GSTM1 genotypes, and colorectal adenomas", **Cancer Res.**, Sayı:60, 3749-3752, Temmuz 2000.

ISHIBE, N., HANKINSON, S.E., COLDITZ, G.A., SPIEGELMAN, D., WILLETT, W.C., SPEIZER, F.E., KELSEY, K.T., HUNTER, D.J., "Cigarette smoking, cytochrome P450 1A1 polymorphisms, and breast cancer risk in the Nurses' Health Study", **Cancer Res.**, Sayı:58, 667-671, Şubat 1998.

KARAGAS, M.R., PARK, S., NELSON, H.H., ANDREW, A.S., MOTT, L., SCHNED, A., KELSEY, K.T., "Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) variants and bladder cancer: a population-based case-control study", **Int. J. Hyg. Environ. Health**, Sayı:208, 321-327, 2005.

KATO, S., SHIELDS, P.G., CAPORASO, N.E., HOOVER, R.N., TRUMP, B.F., SUGIMURA, H., WESTON, A., HARRIS, C.C., "Cytochrome P450IIE1 genetic polymorphisms, racial variation, and lung cancer risk", **Cancer Res.**, Sayı:52, 6712-6715, Aralık 1992.

KATO, S., SHIELDS, P.G., CAPORASO, N.E., SUGIMURA, H., TRIVERS, G.E., TUCKER, M.A., TRUMP, B.F., WESTON, A., HARRIS, C.C., "Analysis of cytochrome P450 2E1 genetic polymorphisms in relation to human lung cancer", **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.**, Sayı:3, 515-518, Eylül 1994.

KIM, W.J., QUAN, C., " Genetic and epigenetic aspects of bladder cancer", **J. Cell Biochem.**, Sayı:95, 24-33, Mayıs 2005.

KIRKALI, Z., CHAN, T., MANOHARAN, M., ALGABA, F., BUSCH, C., CHENG, L., KIEMENEY, L., KRIEGMAIR, M., MONTIRONI, R., MURPHY, W.M., SESTERHENN, I.A., TACHIBANA, M., WEIDER, J., "Bladder cancer: epidemiology, staging and grading, and diagnosis", **Urology**, Sayı:66, 4-34, Aralık 2005.

KIYOHARA, C., "Genetic polymorphism of enzymes involved in xenobiotic metabolism and the risk of colorectal cancer ", **J. Epidemiol.**, Sayı:10, 349-360, Eylül 2000.

KNOWLES, M.A., "Molecular subtypes of bladder cancer: Jekyll and Hyde or chalk and cheese?", **Carcinogenesis**, Sayı:27, 361-373, Mart 2006.

KO, Y., ABEL, J., HARTH, V., BRODE, P., ANTONY, C., DONAT, S., FISCHER, H.P., ORTIZ-PALLARDO, M.E., THIER, R., SACHINIDIS, A., VETTER, H., BOLT, H.M., HERBERHOLD, C., BRUNING, T., "Association of CYP1B1 codon 432 mutant allele in head and neck squamous cell cancer is reflected by somatic mutations of p53 in tumor tissue", **Cancer Res.**, Sayı:61, 4398-4404, Haziran 2001.

KOCABAS, N.A., SARDAS, S., CHOLERTON, S., DALY, A.K., KARAKAYA, A.E., "Cytochrome P450 CYP1B1 and catechol O-methyltransferase (COMT) genetic polymorphisms and breast cancer susceptibility in a Turkish population", **Arch. Toxicol.**, Sayı:76, 643-649, Kasım 2002.

KOCABAS, N.A., SARDAS, S., KARAKAYA, A.E., "Polymorphisms related to estrogen and xenobiotic metabolism in healthy Turkish women", **Arch. Med. Res.**, Sayı:36, 19-23, Ocak 2005.

LIN, J., DINNEY, C.P., GROSSMAN, H.B., JHAMB, M., ZHU, Y., SPITZ, M.R., WU, X., "E-cadherin promoter polymorphism (C-160A) and risk of recurrence in patients with superficial bladder cancer", **Clin. Genet.**, Sayı:70, 240-245, Eylül 2006.

LONGUEMAUX, S., DELOMENIE, C., GALLOU, C., MEJEAN, A., VINCENT-VIRY, M., BOUVIER, R., DROZ, D., KRISHNAMOORTHY, R., GALTEAU, M.M., JUNIEN, C., BEROUD, C., DUPRET, J.M., "Candidate genetic modifiers of individual susceptibility to renal cell carcinoma: a study of polymorphic human xenobiotic-metabolizing enzymes", **Cancer Res.**, Sayı:59, 2903-2908, Haziran 1999.

LUIS, N.M., LOPEZ-KNOWLES, E., REAL, F.X., "Molecular biology of bladder cancer", **Clin. Transl. Oncol.**, Sayı:9, 5-12, Ocak 2007.

MOORE, L.E., WIENCKE, J.K., BATES, M.N., ZHENG, S., REY, O.A., SMITH, A.H., "Investigation of genetic polymorphisms and smoking in a bladder cancer case-control study in Argentina", **Cancer Lett.**, Sayı:211, 199-207, Ağustos 2004.

MORITA, S., YANO, M., TSUJINAKA, T., AKIYAMA, Y., TANIGUCHI, M., KANEKO, K., MIKI, H., FUJII, T., YOSHINO, K., KUSUOKA, H., MONDEN, M., "Genetic polymorphisms of drug-metabolizing enzymes and susceptibility to head-and-neck squamous-cell carcinoma", **Int. J. Cancer**, Sayı:80, 685-688, Mart 1999.

MURATA, M., WATANABE, M., YAMANAKA, M., KUBOTA, Y., ITO, H., NAGAO, M., KATOH, T., KAMATAKI, T., KAWAMURA, J., YATANI, R., SHIRAIISHI, T., "Genetic polymorphisms in cytochrome P450 (CYP) 1A1, CYP1A2, CYP2E1, glutathione S-transferase (GST) M1 and GSTT1 and susceptibility to prostate cancer in the Japanese population", **Cancer Lett.**, Sayı:165, 171-177, Nisan 2001.

MURRAY, G.I., MELVIN, W.T., GREENLEE, W.F., BURKE, M.D., "Regulation, function, and tissue-specific expression of cytochrome P450 CYP1B1", **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, Sayı:41, 297-316, 2001.

NOCK, N.L., TANG, D., RUNDLE, A., NESLUND-DUDAS, C., SAVERA, A.T., BOCK, C.H., MONAGHAN, K.G., KOPROWSKI, A., MITRACHE, N., YANG, J.J., RYBICKI, B.A., "Associations between smoking, polymorphisms in polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) metabolism and conjugation genes and PAH-DNA adducts in prostate tumors differ by race", **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.**, Sayı:16, 1236-1245, Haziran 2007.

OLFERT, S.M., FELKNOR, S.A., DELCLOS, G.L., "An updated review of the literature: risk factors for bladder cancer with focus on occupational exposures", **South. Med. J.**, Sayı:99, 1256-1263, Kasım 2006.

OMER, B., OZBEK, U., AKKOSE, A., KILIC, G., "Genetic polymorphism of cytochrome P450 2E1 in the Turkish population", **Cell Biochem. Funct.**, Sayı:19, 273-275, Aralık 2001.

PURCELL, S., NEALE, B., TODD-BROWN, K., THOMAS, L., FERREIRA, M.A., BENDER, D., MALLER, J., SKLAR, P., DE BAKKER, P.I., DALY, M.J., SHAM, P.C., "PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses", **Am. J. Hum. Genet.**, Sayı:81, 559-575, Eylül 2007.

QUINONES, L., LUCAS, D., GODOY, J., CACERES, D., BERTHOU, F., VARELA, N., LEE, K., ACEVEDO, C., MARTINEZ, L., AGUILERA, A.M., GIL, L., "CYP1A1, CYP2E1 and GSTM1 genetic polymorphisms. The effect of single and combined genotypes on lung cancer susceptibility in Chilean people", **Cancer Lett.**, Sayı:174, 35-44, Aralık 2001.

REUTER, V.E., "The pathology of bladder cancer", **Urology**, Sayı:67, 11-17, Mart 2006.

ROOS, P.H., BELIK, R., FOLLMANN, W., DEGEN, G.H., KNOPF, H.J., BOLT, H.M., GOLKA, K., "Expression of cytochrome P450 enzymes CYP1A1, CYP1B1, CYP2E1 and CYP4B1 in cultured transitional cells from specimens of the human urinary tract and from urinary sediments", **Arch. Toxicol.**, Sayı:80, 45-52, Ocak 2006.

SACHSE, C., BROCKMOLLER, J., BAUER, S., ROOTS, I., " Cytochrome P450 2D6 variants in a Caucasian population: allele frequencies and phenotypic consequences", **Am. J. Hum. Genet.**, Sayı:60, 284-295, Şubat 1997.

SANYAL, S., FESTA, F., SAKANO, S., ZHANG, Z., STEINECK, G., NORMING, U., WIJKSTROM, H., LARSSON, P., KUMAR, R., HEMMINKI, K., "Polymorphisms in DNA repair and metabolic genes in bladder cancer", **Carcinogenesis**, Sayı:25, 729-734, Mayıs 2004.

SASAKI, M., TANAKA, Y., OKINO, S.T., NOMOTO, M., YONEZAWA, S., NAKAGAWA, M., FUJIMOTO, S., SAKURAGI, N., DAHIYA, R., "Polymorphisms of the CYP1B1 gene as risk factors for human renal cell cancer", **Clin. Cancer Res.**, Sayı:10, 2015-2019, Mart 2004.

SCHOKET, B., PAPP, G., LEVAY, K., MRACKOVA, G., KADLUBAR, F.F., VINCZE, I., "Impact of metabolic genotypes on levels of biomarkers of genotoxic exposure", **Mutat. Res.**, Sayı:482, 57-69, Ekim 2001.

SCHWARZ, D., KISSELEV, P., CASCORBI, I., SCHUNCK, W.H., ROOTS, I., "Differential metabolism of benzo[a]pyrene and benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol by human CYP1A1 variants", **Carcinogenesis**, Sayı:22, 453-459, Mart 2001.

SHEN, M., HUNG, R.J., BRENNAN, P., MALAVEILLE, C., DONATO, F., PLACIDI, D., CARTA, A., HAUTEFEUILLE, A., BOFFETTA, P., PORRU, S., "Polymorphisms of the DNA repair genes XRCC1, XRCC3, XPD, interaction with environmental exposures, and bladder cancer risk in a case-control study in northern Italy", **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.**, Sayı:12, 1234-1240, Kasım 2003.

SHIELDS, P.G., CAPORASO, N.E., FALK, R.T., SUGIMURA, H., TRIVERS, G.E., TRUMP, B.F., HOOVER, R.N., WESTON, A., HARRIS, C.C., "Lung cancer, race, and a CYP1A1 genetic polymorphism", **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.**, Sayı:2, 481-485, Eylül 1993.

SHIMADA, T., HAYES, C.L., YAMAZAKI, H., AMIN, S., HECHT, S.S., GUENGERICH, F.P., SUTTER, T.R., "Activation of chemically diverse procarcinogens by human cytochrome P-450 1B1", **Cancer Res.**, Sayı:56, 2979-2984, Temmuz 1996.

SHIMADA, T., WATANABE, J., KAWAJIRI, K., SUTTER, T.R., GUENGERICH, F.P., GILLAM, E.M., INOUE, K., "Catalytic properties of polymorphic human cytochrome P450 1B1 variants", **Carcinogenesis**, Sayı:20, 1607-1613, Ağustos 1999.

SHIMADA, T., WATANABE, J., INOUE, K., GUENGERICH, F.P., GILLAM, E.M., "Specificity of 17beta-oestradiol and benzo[a]pyrene oxidation by polymorphic human cytochrome P4501B1 variants substituted at residues 48, 119 and 432", **Xenobiotica**, Sayı:31, 163-176, Mart 2001.

SMITH, C.A., MOSS, J.E., GOUGH, A.C., SPURR, N.K., WOLF, C.R., "Molecular genetic analysis of the cytochrome P450-debrisoquine hydroxylase locus and association with cancer susceptibility", **Environ. Health Perspect.**, Sayı:98, 107-112, Kasım 1992.

SOBTI, R.C., AL-BADRAN, A.I., SHARMA, S., SHARMA, S.K., KRISHAN, A., MOHAN, H., "Genetic polymorphisms of CYP2D6, GSTM1, and GSTT1 genes and bladder cancer risk in North India", **Cancer Genet. Cytogenet.**, Sayı:156, 68-73, Ocak 2005.

STOILOV, I., AKARSU, A.N., ALOZIE, I., CHILD, A., BARSOUM-HOMSY, M., TURACLI, M.E., OR, M., LEWIS, R.A., OZDEMIR, N., BRICE, G., AKTAN, S.G., CHEVRETTE, L., COCA-PRADOS, M., SARFARAZI, M., "Sequence analysis and homology modeling suggest that primary congenital glaucoma on 2p21 results from mutations disrupting either the hinge region or the conserved core structures of cytochrome P4501B1", **Am. J. Hum. Genet.**, Sayı:62, 573-584, Mart 1998.

TANAKA, Y., SASAKI, M., KANEUCHI, M., SHIINA, H., IGAWA, M., DAHIYA, R., "Polymorphisms of the CYP1B1 gene have higher risk for prostate cancer", **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, Sayı:296, 820-826, Ağustos 2002.

THIER, R., GOLKA, K., BRUNING, T., KO, Y., BOLT, H.M., "Genetic susceptibility to environmental toxicants: the interface between human and experimental studies in the development of new toxicological concepts", **Toxicol. Lett.**, Sayı:127, 321-327, Şubat 2002.

THIER, R., LEWALTER, J., SELINSKI, S., BOLT, H.M., " Possible impact of human CYP2E1 polymorphisms on the metabolism of acrylonitrile", **Toxicol. Lett.**, Sayı:128, 249-255, Mart 2002.

THIER, R., BRUNING, T., ROOS, P.H., BOLT, H.M., "Cytochrome P450 1B1, a new keystone in gene-environment interactions related to human head and neck cancer?", **Arch. Toxicol.**, Sayı:76, 249-256, Haziran 2002.

THIER, R., BRUNING, T., ROOS, P.H., RIHS, H.P., GOLKA, K., KO, Y., BOLT, H.M., "Markers of genetic susceptibility in human environmental hygiene and toxicology: the role of selected CYP, NAT and GST genes ", **Int. J. Hyg. Environ. Health**, Sayı:206, 149-171, Haziran 2003.

VINEIS, P., CAPORASO, N., "Tobacco and cancer: epidemiology and the laboratory", **Environ. Health Perspect.**, Sayı: 103, 156-160, Şubat 1995.

VINEIS, P., VEGLIA, F., GARTE, S., MALAVEILLE, C., MATULLO, G., DUNNING, A., PELUSO, M., AIROLDI, L., OVERVAD, K., RAASCHOU-NIELSEN, O., CLAVEL-CHAPELON, F., LINSEISEN, J.P., KAAKS, R., BOEING, H., TRICHOPOULOU, A., PALLI, D., CROSIGNANI, P., TUMINO, R., PANICO, S., BUENO-DE-MESQUITA, H.B., PEETERS, P.H., LUND, E., GONZALEZ, C.A., MARTINEZ, C., DORRONSORO, M., BARRICARTE, A., NAVARRO, C., QUIROS, J.R., BERGLUND, G., JARVHOLM, B., DAY, N.E., KEY, T.J., SARACCI, R., RIBOLI, E., AUTRUP, H., "Genetic susceptibility according to three metabolic pathways in cancers of the lung and bladder and in myeloid leukemias in nonsmokers", **Ann. Oncol.**, Sayı:18, 1230-1242, Temmuz 2007.

VODICKA, P., SOUCEK, P., TATES, A.D., DUSINSKA, M., SARMANOVA, J., ZAMECNIKOVA, M., VODICKOVA, L., KOSKINEN, M., DE ZWART, F.A., NATARAJAN, A.T., HEMMINKI, K., "Association between genetic polymorphisms and biomarkers in styrene-exposed workers", **Mutat. Res.**, Sayı:482, 89-103, Ekim 2001.

VODICKA, P., KUMAR, R., STETINA, R., MUSAK, L., SOUCEK, P., HAUFROID, V., SASIADEK, M., VODICKOVA, L., NACCARATI, A., SEDIKOVA, J., SANYAL, S., KURICOVA, M., BRISIAK, V., NORPPA, H., BUCHANCOVA, J., HEMMINKI, K., "Markers of individual susceptibility and DNA repair rate in workers exposed to xenobiotics in a tire plant", **Environ. Mol. Mutagen.**, Sayı:44, 283-292, 2004.

WATANABE, J., SHIMADA, T., GILLAM, E.M., IKUTA, T., SUEMASU, K., HIGASHI, Y., GOTOH, O., KAWAJIRI, K., "Association of CYP1B1 genetic polymorphism with incidence to breast and lung cancer", **Pharmacogenetics**, Sayı:10, 25-33, Şubat 2000.

WENZLAFF, A.S., COTE, M.L., BOCK, C.H., LAND, S.J., SANTER, S.K., SCHWARTZ, D.R., SCHWARTZ, A.G., "CYP1A1 and CYP1B1 polymorphisms and risk of lung cancer among never smokers: a population-based study", **Carcinogenesis**, Sayı:26, 2207-2212, Aralık 2005.

WIGGINTON, J.E., CUTLER, D.J., ABECASIS, G.R., "A note on exact tests of Hardy-Weinberg equilibrium", **Am. J. Hum. Genet.**, Sayı:76, 887-893, Mayıs 2005.

WILLIAMS, J.A., "Single nucleotide polymorphisms, metabolic activation and environmental carcinogenesis: why molecular epidemiologists should think about enzyme expression", **Carcinogenesis**, Sayı:22, 209-214, Şubat 2001.

WILLIAMS, S.G., STEIN, J.P., "Molecular pathways in bladder cancer", **Urol. Res.**, Sayı:32, 373-385, Aralık 2004.

YOON, K.A., KIM, J.H., GIL, H.J., HWANG, H., HWANGBO, B., LEE, J.S., "CYP1B1, CYP1A1, MPO, and GSTP1 polymorphisms and lung cancer risk in never-smoking Korean women", **Lung Cancer**, Sayı:60, 40-46, Nisan 2008.

ZEEGERS, M.P., KELLEN, E., BUNTINX, F., VAN DEN BRANDT, P.A., "The association between smoking, beverage consumption, diet and bladder cancer: a systematic literature review", **World J. Urol.**, Sayı:21, 392-401, Şubat 2004.

7.3. İnternet

Human Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature Committee,
Erişim: <http://www.cypalleles.ki.se/> (5 Ocak 2009)

LEE, C., FAMOYE, F., SPSS Online Training Workshop,
Erişim: <http://calcnet.mth.cmich.edu/org/spss/toc.htm> (5 Ocak 2009)

PURCELL, S., PLINK: Whole genome data analysis toolset,
Erişim: <http://pngu.mgh.harvard.edu/purcell/plink/> (5 Ocak 2009)

UCLA: Academic Technology Services, Statistical Consulting Group., SPSS Topics Logistic Regression,
Erişim: http://www.ats.ucla.edu/stat/Spss/topics/logistic_regression.htm (5 Ocak 2009)

8. ÖZGEÇMİŞ

1981 yılında Balıkesir'in Burhaniye ilçesinde doğan Kutluhan İncekara, ilk, orta ve lise eğitimini Edremit'te tamamladı.

Yüksek öğrenimini Boğaziçi Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nde yaptı ve 2005 yılında mezun oldu.

Yüksek lisans eğitimine Haliç Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nde devam etti. 2007 yılından beri Haliç Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nde araştırma görevlisi olarak görev yapmaktadır.