

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FARMASÖTİK TOKSİKOLOJİ ANA BİLİM DALI

**BARRETT ÖZOFAGUS HASTALIĞINA GENETİK DUYARLILIKTA
OKSİDATİF DNA HASARI, DNA ONARIM KAPASİTESİ VE İLGİLİ
BAZI GEN POLİMORFİZMLERİNİN ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

Uzm.Ecz.ELA KADIOĞLU

Tez Danışmanı
Prof.Dr.Ali Esat KARAKAYA

ANKARA
Şubat 2008

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FARMASÖTİK TOKSİKOLOJİ ANA BİLİM DALI

**BARRETT ÖZOFAGUS HASTALIĞINA GENETİK DUYARLILIKTA
OKSİDATİF DNA HASARI, DNA ONARIM KAPASİTESİ VE İLGİLİ
BAZI GEN POLİMORFİZMLERİNİN ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

Uzm.Ecz.ELA KADIOĞLU

Tez Danışmanı
Prof.Dr.Ali Esat KARAKAYA

Bu tez TÜBİTAK Bütünleştirilmiş Doktora Burs Programı (BDP) ile desteklenmiştir.

ANKARA
Şubat 2008

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

F.Toksikoloji Ana Bilim Dalı Doktora Programı
çerçevesinde yürütölmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından
Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 11.02.2008



Prof.Dr.Ali Esat Karakaya
Gazi Üniversitesi
Jüri Başkanı



Prof.Dr.Semra Şardaş
Marmara Üniversitesi



Prof.Dr.Meral Torun
Gazi Üniversitesi



Prof.Dr.Benu Karahalil
Gazi Üniversitesi



Doç.Dr.Çetin Kaymak
Kırıkkale Üniversitesi

SEVGİLİ BABAM'A ve ANNEM'E

TEŞEKKÜR

Çalışmamın her aşamasında yol gösterici olan, değerli bilgilerini benimle paylaşan danışman hocam, Prof.Dr.Ali Esat Karakaya'ya,

Çalışmalarına yön veren, sevgisi ve desteğini her zaman hissettiğim, yetişmemi sağlayan sevgili hocam Prof.Dr.Semra Şardaş'a,

İlgi ve destekleri için Prof.Dr.Sema Burgaz, Prof.Dr.İsmet Çok, Prof.Dr.Bensu Karahalil ve Doç.Dr.Neslihan Aygün Kocabaş'a,

Dostlukları ve yardımlarıyla yanımda olduklarını her zaman hissettiğim çalışma arkadaşlarım Öğr.Gör.Dr.Gonca Çakmak Demircigil, Dr.Ecz. Eren Özçağlı, Uzm.Ecz. Ayşe Başak Engin, Uzm.Ecz.Emre Durmaz, Uzm.Ecz.Erdem Coşkun, Uzm.Ecz.Onur Kenan Ulutaş ve Uzm.Ecz.Esra Emerce Tufan'a

Tez izleme jürimde yer alan ve bilgileriyle çalışmama katkı sağlayan Prof.Dr.Meral Torun'a,

Çalışmamda numune temini aşamasındaki yardımlarından dolayı, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Gastroenteroloji Anabilim Dalı çalışanlarından Uzm.Dr.Meltem Ergün'e,

Eğitim ve öğrenim hayatımın her aşamasında gösterdikleri fedakarlık, hoşgörü, güven ve destek için sevgili babam Mustafa Alhayıroğlu, annem Rabia Alhayıroğlu ve kardeşim Emre Alhayıroğlu'na,

Hayatımın her döneminde gösterdiği sonsuz sabır, hoşgörü ve anlayış için sevgili eşim Onur Kadioğlu'na,

TEŞEKKÜR EDERİM.

İÇİNDEKİLER

İçindekiler	I
Şekiller	IV
Tablolar	V
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Barret Özafagus ve Patogenezi	5
2.2. Barret Metaplazisi ve Özofageal Adenokarsinoma Gelişimi	10
2.2.1. Intestinal Metaplazi	11
2.2.2. Displazi ve Özofageal Adenokarsinoma	12
2.3. Barrett Özofagustan Kanser Gelişiminde Rol Oynayan Moleküler Değişiklikler	13
2.4. Barret Özofagus Gelişiminde Rol Oynayan Başlıca Risk Faktörleri	20
2.4.1. Gastroözofageal Reflü Hastalığı	20
2.4.2. Sigara	22
2.4.3. Alkol	23
2.4.4. Diyet	23
2.4.5. Obezite	24
2.4.6. Cinsiyet, Yaş ve Irk	25
2.5. Barrett Özofagus Gelişiminde Genetik İnstabilitenin Önemi	26
2.5.1. Barrett Özofagus ve DNA hasarı	29
2.6. Barrett Özofagus Gelişiminde Bireysel Duyarlılığın Önemi	32
2.7. Reaktif Oksijen Türleri ve Oksidatif DNA Hasarı	34
2.7.1. Oksidatif DNA Hasarı	37
2.7.2. Oksidatif DNA Hasarının Modifiye Comet Yöntemi ile Ölçümü	41
2.8. Antioksidan Savunma Mekanizmaları ve Glutasyon	42
2.9. GSTM1 Geni ve Polimorfizmi	45
2.10. MnSOD Geni ve Val16Ala Polimorfizmi	48
2.11. DNA Onarımı	49
2.11.1. Oksidatif DNA Hasarının Onarımı	51
2.11.2. DNA Onarımının Comet Yöntemiyle Ölçülmesi	55
2.12. hOGG11 Geni ve Ser326Cys Polimorfizmi	55
3. GEREÇ ve YÖNTEM	57
3.1. Çalışma ve Kontrol Grubunun Seçilmesi	57
3.2. Çalışma ve Kontrol Grubundan Biyolojik Materyalin Toplanması	57
3.3. Modifiye Comet Yöntemi	58
3.3.1. Yöntemde Kullanılan Kimyasal Maddeler	58
3.3.2. Yöntemde Kullanılan Aletler	58
3.3.3. Yöntemde Kullanılan Çözeltiler	59
3.3.4. Periferik Kan Lenfositlerinde Oksidatif DNA hasarının Modifiye Comet Yöntemi ile Belirlenmesi	60
3.3.5. Periferik Kan Lenfositlerinde DNA Onarımının Modifiye Comet Yöntemi ile Belirlenmesi	62
3.4. Glutasyonun Spektrofotometrik Olarak Ölçülmesi	63
3.4.1. Yöntemde Kullanılan Kimyasal Maddeler	63

3.4.2. Yöntemde Kullanılan Aletler	63
3.4.3. Yöntemde Kullanılan Çözeltiler	64
3.4.4. Yöntemin Uygulanması	64
3.5. DNA İzolasyonu	65
3.5.1. Yöntemde Kullanılan Alet ve Malzemeler	65
3.6. Bireylerin GSTM1, MnSOD Ala16Val ve hOGG1 Ser326Cys Genotiplerinin İncelenmesi	66
3.6.1. Yöntemde Kullanılan Kimyasal Maddeler	66
3.6.2. Yöntemde Kullanılan Aletler	66
3.6.3. Yöntemde Kullanılan Çözeltiler	67
3.6.4. Gen Spesifik Amplifikasyon için Kullanılan Primerlerin Listesi	68
3.6.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ve RFLP Metodu	68
3.6.6. GSTM1 Genotiplenmesi	69
3.6.6.1. PCR Ürünlerinin Jele Uygulanması ve Elektroforez	69
3.6.7. MnSOD Ala16Val Genotiplenmesi	70
3.6.7.1. PCR	70
3.6.7.2. PCR Ürünlerinin <i>Bsa</i> W I Restriksiyon Enzimi ile Kesilmesi	71
3.6.7.3. Kesim Ürünlerinin Jele Uygulanması ve Elektroforez	71
3.6.8. hOGG1 Ser326Cys Genotiplenmesi	72
3.6.8.1. PCR	72
3.6.8.2. PCR Ürünlerinin <i>Fnu</i> 4H I Restriksiyon Enzimi ile Kesilmesi	73
3.6.8.3. Kesim Ürünlerinin Jele Uygulanması ve Elektroforez	74
3.7. İstatistiksel Analiz Yöntemi	74
4. BULGULAR	76
4. 1. Demografik Bulgular	76
4.2. Modifiye Comet Yöntemi Sonuçları	
4.3. Hasta ve Kontrol Grubunun GSH Konsantrasyonları	83
4.4. Comet Yöntemi Sonuçlarını ve GSH Konsantrasyonu Etkileyebilecek Değişkenlerin İncelenmesi	85
4.5. GSTM1 Genotip Analizi	87
4.6. MnSOD Ala16Val Genotip Analizi Sonuçları	88
4.7. hOGG1 Ser326Cys Genotip Analizi Sonuçları	90
4.8. Comet Yöntemi Sonuçlarının GSTM1 Genotipine Göre Dağılımının Hasta ve Kontrol Grubunda İncelenmesi	92
4.9. Comet Yöntemi Sonuçlarının MnSOD Ala16Val Genotipine Göre Dağılımının Hasta ve Kontrol Grubunda İncelenmesi	93
4.10. Comet Yöntemi Sonuçlarının hOGG1 Ser326Cys Genotipine Göre Dağılımının Hasta ve Kontrol Grubunda İncelenmesi	94
4.11. Comet Yöntemi Sonuçları ile GSH Konsantrasyonu Arasındaki İlişkinin Hasta ve Kontrol Grubunda İncelenmesi	95
4.12. GSH Konsantrasyonunun GSTM1 Genotipine Göre Dağılımının Hasta ve Kontrol Grubunda İncelenmesi	97
4.13. GSH konsantrasyonunun MnSOD Ala16Val Genotipine Göre Dağılımının Hasta ve Kontrol Grubunda İncelenmesi	97
4.14. GSH konsantrasyonunun hOGG1 Ser326Cys Genotipine Göre Dağılımının Hasta ve Kontrol Grubunda İncelenmesi	98
4.15. Gen-Gen Etkileşimlerinin Hastalık Riski Açısından İncelenmesi	99
4.15.1. GSTM1 ve MnSOD Genotiplerinin Kombinasyonunun İncelenmesi	99

4.15.2. GSTM1 ve hOGG1 Genotiplerinin Kombinasyonunun İncelenmesi	99
4.15.3. MnSOD ve hOGG1 Genotiplerinin Kombinasyonunun İncelenmesi	100
5. TARTIŞMA	101
6. SONUÇ	116
7. ÖZET	118
8. SUMMARY	119
9. KAYNAKLAR	120
10. EKLER	137
11. ÖZGEÇMİŞ	140

ŞEKİLLER

Şekil No:	Şekil Adı:	Sayfa No:
1	Barrett Özofagus	6
2	Amerika popülasyonunda özofageal adenokarsinoma ve bazı kanser türlerinin 1975-2001 yılları arasındaki insidansları	7
3	Özofagus kanserinin bazı ülkelerde ve dünya genelindeki insidansı	8
4	Normal ve metaplastik Barrett epiteli	10
5	İntestinal metaplazi, kısa ve uzun segment Barrett özofagusu	11
6	Barrett özofagus ve özofageal adenokarsinoma gelişiminde metaplazi-displazi-karsinoma sürecinin şematik gösterimi	13
7	Barrett metaplazisinden adenokarsinoma gelişimi sırasında meydana gelen değişiklikler	14
8	Hücrede p53 aktivasyonu	17
9	Gastroözofageal reflü ve özofageal adenokarsinoma arasındaki ilişki	22
10	Barrett özofagusta genetik instabilite oluşumu	28
11	Barrett özofagus gelişiminde DNA hasarının etkisi	32
12	Reaktif oksijen türlerinin oluşmasına neden olan başlıca faktörler ve biyolojik sonuçları	35
13	Primidin bazlarının OH radikali ile oluşturdukları katım ürünleri	38
14	C8-OH ürün radikalinden, guanin son ürünlerinin oluşumu	39
15	GSTM1 geninin delesyonu	47
16	SOD2 geninin kromozom 6'daki lokalizasyonu	49
17	DNA'da hasara neden olan başlıca ajanlar, neden oldukları lezyonlar ve ilgili onarım mekanizmaları	51
18	Baz Ekzisyon Tamir Yolağı	52
19	DNA'da 8-OHG lezyonunun onarımı	54
20	hOGG1 geninin kromozom 3'deki lokalizasyonu	55
21	PCR ile çoğaltılan ve GSTM1 genotiplemesi yapılan baz dizilimi	69
22	GSTM1 genotiplemesinin şematik gösterimi	70
23	MnSOD Ala16Val genotiplemesi için PCR ile çoğaltılan 172 bç'lik baz dizilimi	71
24	MnSOD Ala16Val genotiplemesinin şematik gösterimi	72
25	hOGG1 Ser326Cys genotiplemesi için PCR ile çoğaltılan 207 bç'lik baz dizilimi	73
26	hOGG1 Ser326Cys genotiplemesinin şematik gösterimi	74
27	GSTM1 genotiplemesi	87
28	MnSOD Ala16Val genotiplemesi için çoğaltılan PCR ürünleri	88
29	MnSOD PCR ürünlerinin <i>Bsa</i> W1 ile kesilmesi sonucunda oluşan kesim ürünleri	88
30	hOGG1 Ser326Cys genotiplemesi için çoğaltılan PCR ürünleri	90
31	hOGG1 PCR ürünlerinin <i>Fnu</i> 4HI ile kesilmesi sonucunda oluşan kesim ürünleri	90

TABLÖLAR

Tablo No:	Tablo Adı:	Sayfa No:
1	Oksidatif strese bağlı olarak gelişebilecek hastalıklar ve ilgili kanser türlerine örnekler	40
2	Glutasyon S-transferazların sınıflandırılması	46
3	GSTM1 polimorfizmi ve maruziyetin/etkinin biyogöstergeleri arasındaki ilişkiyi inceleyen çalışmalara örnekler	48
4	Oksidatif DNA hasarının Modifiye Comet Yöntemi ile belirlenmesi	62
5	DNA onarım kapasitesinin Modifiye Comet Yöntemi ile belirlenmesi	63
6	Hasta ve kontrol grubunun demografik ve diğer özelliklerinin karşılaştırılması	76
7	Hasta ve kontrol grubunun Comet Yöntemi sonuçları	77
8	Comet Yöntemi sonuçlarını etkileyebilecek parametrelerin düzeltildiği durumda hasta ve kontrol grubu için sonuçlar	78
9	Hasta ve kontrol grubunda Comet Yöntemi sonuçlarını etkileyebilecek parametrelerin incelenmesi	81-82
10	Hasta ve kontrol grubunun GSH konsantrasyonları	83
11	Hasta ve kontrol grubunda GSH konsantrasyonunu etkileyebilecek parametrelerin incelenmesi	84
12	Yaş ile GSH konsantrasyonu ve Comet Yöntemi sonuçları arasındaki korelasyon değerleri	86
13	BMI ile GSH konsantrasyonu ve Comet Yöntemi sonuçları arasındaki korelasyon değerleri	86
14	Hasta ve kontrol grubunun GSTM1 genotip frekansları	87
15	Hasta ve kontrol grubunun MnSOD Ala16Val genotip frekansları	89
16	Hasta ve kontrol grubunda MnSOD Ala16Val alel frekansları	89
17	Hasta ve kontrol grubunda hOGG1 Ser326Cys genotip frekansları	91
18	Hasta ve kontrol grubunda hOGG1 Ser326Cys alel frekansları	91
19	Comet Yöntemi sonuçlarının GSTM1 genotipine göre dağılımı	92
20	Comet Yöntemi sonuçlarının MnSOD Ala16Val genotipine göre dağılımı	94
21	Comet Yöntemi sonuçlarının hOGG1 Ser326Cys genotipine göre dağılımı	95
22	Hasta ve kontrol grubunda Comet Yöntemi sonuçları ile GSH konsantrasyonu arasındaki ilişki	96
23	GSH konsantrasyonunun GSTM1 genotipine göre dağılımı	97
24	GSH konsantrasyonunun MnSOD Ala16Val genotipine göre dağılımı	98
25	GSH konsantrasyonunun hOGG1 Ser326Cys genotipine göre dağılımı	98
26	GSTM1 ve MnSOD genotiplerinin kombinasyonunun hastalık riski açısından incelenmesi	99
27	GSTM1 ve hOGG1 genotiplerinin kombinasyonunun hastalık riski açısından incelenmesi	100
28	MnSOD ve hOGG1 genotiplerinin kombinasyonunun hastalık riski açısından incelenmesi	100

I. GİRİŞ VE AMAÇ

Pek çok hastalığın ve kanserin etiyolojisinde, hem genetik hem de çevresel etkenler rol oynamaktadır. Bu faktörlerin önem derecesi, hastalığın veya kanserin tipine göre farklılık göstermektedir. Günümüzde çeşitli hastalıkların etiyolojisinin belirlenmesinde, özellikle moleküler epidemiyolojik yaklaşımlardan yararlanılmaktadır. Bu yaklaşımların temel amacı, zararlı çevresel etkenlerin belirlenmesi ve kanser gelişme riskinin tahmin edilmesidir. Karsinogenezis, pek çok biyolojik değişikliği içeren uzun bir süreçtir. Bu nedenle, bu süreçte oluşan anormal biyolojik olaylarla ilgili geliştirilen çeşitli biyogöstergeler, moleküler epidemiyoloji çalışmalarında kullanılmaktadır. Bu biyogöstergeler, hastalığa neden olan etkenlere maruziyeti, bireysel duyarlılığı veya hastalığın erken aşamalarında gözlenen etkinin değerlendirilmesini sağlamaktadır¹.

Çeşitli kanser türlerinin etiyolojisi ile ilgili olarak yeni hipotezler geliştirilse de, asıl neden olan biyolojik yollar tam olarak belirlenememiştir. Bu konuda yapılan çalışmalar temel olarak; a) genetik ve çevresel risk faktörlerinin belirlenmesi b) hastalık riski yüksek olan bireylerin belirlenmesi c) premalign ve malign hastalıklar ile ilgili biyogöstergelerin önceden belirlenmesini amaçlamaktadır. Genetik risk faktörlerinin belirlenmesinde öncelikle, karsinogen metabolizmasında, DNA onarımında, hücre döngüsünün kontrolünde, hücre ölümünde ve immün cevapta rol oynayan genlerdeki polimorfizmler incelenmektedir. Genetik polimorfizm çalışmaları, bireylerin maruziyete ve hastalıklara duyarlılıklarının değerlendirilmesini sağlamaktadır. Son zamanlarda riskli genotiplerin kombinasyonlarının incelenmesi hastalığa duyarlılığın belirlenmesinde daha da önem kazanmıştır².

Genotipleme çalışmalarının yanı sıra bireylerin fenotipi ile ilgili çalışmalar da bireylerin hastalıklara duyarlılığının araştırılmasında ve hastalık riski yüksek olan bireylerin belirlenmesinde önemlidir. Genotipleme çalışmaları çevresel etkenlerden bağımsız ve kolay yöntemlerdir ancak sonuçları hastalık ile direkt olarak ilgili olmayabilir. Fenotip çalışmaları ise, pek çok genin ve çevrenin de etkisinin incelendiği, yorumu açısından hastalığa daha yakın ancak validasyon gerektiren yöntemlerdir. Son zamanlarda özellikle DNA onarım genlerindeki polimorfizmlerin çeşitli hastalıklarla ve kanserle olan ilgisini araştıran pek çok çalışma vardır. Ayrıca bu çalışmaların pek çoğunda genetik polimorfizmin (*genotip*) yanı sıra bireylerin DNA onarım kapasitesi (*fenotip*) de çeşitli genotoksik parametreler kullanılarak incelenmiştir^{3,4}. Premalign ve malign hastalıklar ile ilgili olarak geliştirilen biyogöstergeler ise genellikle sitogenetik biyogöstergelerdir. Bu biyogöstergelerden

özellikle kromozomal aberasyon, mikroçekirdek, DNA sarmal kırıklarının (comet yöntemi gibi) tayini en çok kullanılan yöntemlerdendir⁵.

Karsinojenik gelişimin erken aşamasında meydana gelen genetik değişimlerin belirlenmesi, özellikle yüksek risk altındaki bireylerin kanserden korunmasında etkili olabilecek biyogöstergelerin geliştirilmesine olanak sağlar. Bunun en güzel örneklerinden biri Barrett özofagus hastalığıdır². Barrett özofagus, distal özofagusta intestinal metaplaziye uğramış kolumnar (kolonumsu) epitelin, skuamöz (pullu) epitelin yerini almasıyla oluşan premalign (prekanserojen) bir durumdur. Barrett özofagus nedeniyle özofagusta gelişen kanser türü özofageal adenokarsinomadır. Barrett özofagusu olan hastalarda normal özofagusa sahip bireylere göre özofageal adenokarsinoma gelişme riski 30-40 kez daha fazladır. Tüm özofagus kanserlerinin %10-40'ının Barrett özofagus ile ilişkili olduğu tahmin edilmektedir. Her yıl Barrett özofagus hastalarının yaklaşık %0,5'ine adenokarsinoma teşhisi konmaktadır^{6, 7}.

Son yıllarda özofageal adenokarsinoma görülme sıklığı artmış, 1985 yılında özofagus kanserlerinin %3,5 'u adenokarsinoma iken, 2000 yılında bu oran %17'ye yükselmiştir. Batı Avrupa ve Amerika'da ise adenokarsinoma görülme sıklığı %50 civarındadır. Amerika'da yapılan istatistikler, özofageal adenokarsinomanın son 25 yılda insidansı en çok artan major malignitelerden biri olduğunu göstermektedir⁸. Türkiye'de ise özofagus kanser insidansı ve bu hastalığa bağlı olarak gözlenen ölüm sıklığı ile ilgili 1998 yılı verilere göre özofagus kanser insidansı erkeklerde 1,28/100 000 iken kadınlarda 0,66/100 000 olarak belirlenmiştir⁹.

Genellikle kronik gastroözofageal reflü (GÖR) hastalarının %10-12'inde Barrett özofagus gözlenir¹⁰. Endoskopi ve otopsi verilerine göre Barrett özofagus hastalığının her 50-100 kişide bir gözlendiği bilinmekte, insidansı ve prevalansı etnik farklılık gösterebilmektedir¹¹. Amerika'da Barrett özofagus görülme sıklığı 1965-1997 yılları arasında 50 kat artmıştır⁷. Türkiye'de ise 2004 yılında yapılan bir çalışmada endoskopiye giren 395 dispepsi hastasında Barrett özofagus sıklığı %7,4 olarak belirlenmiştir¹². Barrett özofagus ve eroziv özofajit sıklığını belirlemek amacıyla 2006 yılında yapılan bir diğer çalışmada ise 18766 hastanın 84'ünde (%0,4) Barrett özofagus varlığı histopatolojik olarak doğrulanmıştır¹³.

Barrett özofagus ve özofageal adenokarsinoma gelişiminde pek çok çevresel ve genetik faktörler rol almaktadır. Bu faktörlerin etki mekanizmaları genellikle direkt veya dolaylı olarak DNA hasarı ile ilgilidir. Özofajit ve Barrett özofagusun enflamasyon ile ilgili bir durum olduğu

bilinmektedir. Enflamasyon ile ilgili olarak oluşan oksidatif stres ve serbest radikal oluşumu gastroözofageal reflü hastalığı (GÖRH), Barrett özofagus ve adenokarsinoma arasındaki ilişkinin belirlenmesinde önemlidir. Ayrıca asit ve safra tuzları ve buna bağlı olarak ortaya çıkan özofajit de reaktif oksijen türlerinin (ROT) oluşumunu indükleyebilir, antioksidan kapasitesini tüketebilir ve oksidatif stres ile ilgili genlerin ekspresyonunu arttırabilir⁷. Barrett özofagus ve oksidatif DNA hasarı ile ilgili olarak yapılan çalışmalar, özellikle oksidatif DNA ürünlerini ve sitogenetik parametreleri içermektedir¹⁴⁻¹⁶.

Barrett özofagus hastalığına genetik duyarlılığın belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmalarda genel olarak detoksifikasyonda, DNA onarımında ve hücre döngüsünün kontrolünde rol oynayan genlerdeki çeşitli polimorfizmler incelenmiş ve çelişkili sonuçlar elde edilmiřtir¹⁷⁻²⁰.

Özofageal adenokarsinoma hastalığının etiyolojisinde önemli rol oynayan ve premalign bir durum olarak tanımlanan Barrett özofagus gelişimi ile ilgili biyogöstergelerin incelenmesi oldukça önemlidir. Çalışmamız genel olarak bu amaç doğrultusunda, Barrett özofagus hastaları ve sağlıklı kontrol grubundan oluşturulmuş ve aşağıdaki hedeflere yönelik olarak planlanmıştır:

- Barrett özofagus hastalığının etiyolojisinde oksidatif DNA hasarının (okside olmuş pürin ve pirimidin baz hasarlarının) rolünün modifiye Comet yöntemi ile periferik kan lenfositleri (PKL)'de belirlenmesi
- Barrett özofagus hastalarında DNA onarım kapasitelerinin, pürin ve pirimidin baz hasarlarının onarılma kapasitelerinin modifiye Comet yöntemi ile PKL' de belirlenmesi ve kontrol grubu ile kıyaslanması
- Fizyolojik bir antioksidan olan glutatyonun (GSH), kandaki seviyesinin Barrett özofagus hastalarında ve kontrol grubunda spektrofotometrik yöntemle belirlenmesi
- Barrett özofagus hastalığına bireysel duyarlılıkta oksidatif stres ile ilgili olarak, GSTM1 ve MnSOD Ala16Val genotiplerinin; DNA onarımı ile ilgili olarak, hOGG1 Ser326Cys genotiplerinin belirlenmesi ve riskli genotiplerin kombinasyonlarının hastalık riski açısından incelenmesi

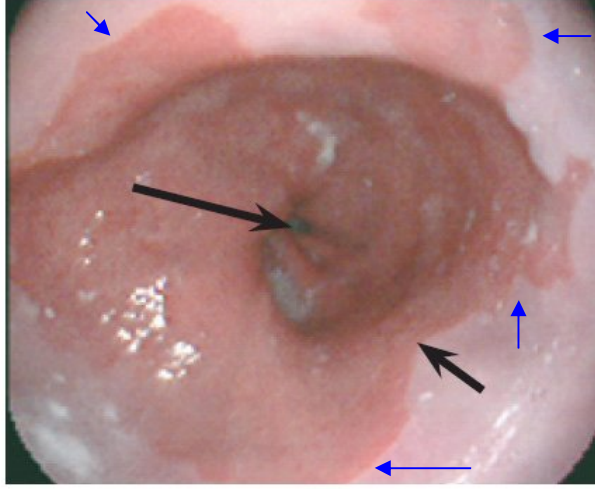
- Barrett özofagus hastalarında ve kontrol grubunda elde edilen modifiye Comet yöntemi sonuçlarının, kan GSH seviyesinin ve incelenen genotiplerin birbiri ile ilişkisinin hastalık riski açısından değerlendirilmesi

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Barrett Özofagus ve Patogenezi

Barrett özofagus, kronik GÖRH'nin bir komplikasyonu olarak gelişen, çok katlı yassı epitelin yerini endoskopik olarak saptanabilen kolumnar epitelin alması ve histolojik olarak goblet hücresi ile intestinal metaplazinin varlığının gösterilmesi şeklinde tanımlanabilir. Özofageal skuamöz epitelin, kolumnar epitle yer değiştirdiği morfolojik değişikliklere metaplazi adı verilmektedir. Uzun yıllar özofagus içinde herhangi bir kolumnar epitel varlığı olarak tanımlanırken, son yıllarda tanı yolları ve etyopatogenezi de görülen gelişmeler nedeniyle ilgi çekmektedir⁷. Barrett özofagusuna ilk kez 1906 yılında Tileston dikkati çekmiş ve distal özofagusta kolumnar mukoza varlığından bahsetmiştir²¹. 1950'de Norman Barrett distal özofagusta kolumnar mukoza varlığının detaylı bir tanımını yapmıştır²². 1953 yılında Allison ve Johnstone özofagusta skuamöz epitelin kolumnar epitele değişimini göstermişler ve bunun GÖR sonucu oluştuğunu bildirmişlerdir.²³

Geleneksel Barrett özofagus tanımı, skuamo-kolumnar junction (SCJ)' dan proksimale doğru uzanan en az 3 cm'lik kolumnar mukoza alanı bulunması ve bu bölgeden alınan biyopsilerde intestinal metaplazi saptanmasıdır (Şekil 1). Bugün kabul edilen Barrett özofagus tanımı ise uzunluk belirtmeksizin özofagusta intestinal metaplazinin saptanmasıdır²⁴. 1998 yılında Amerikan Gastroenteroloji Koleji (ACG) Barrett özofagus'u, her ne uzunlukta olursa olsun endoskopi ile gözlenebilen ve intestinal metaplazi varlığı (intestinal kardia'dan farklı olarak) biyopsi ile onaylanmış, özofageal epitel değişimi olarak tanımlamıştır²⁵.



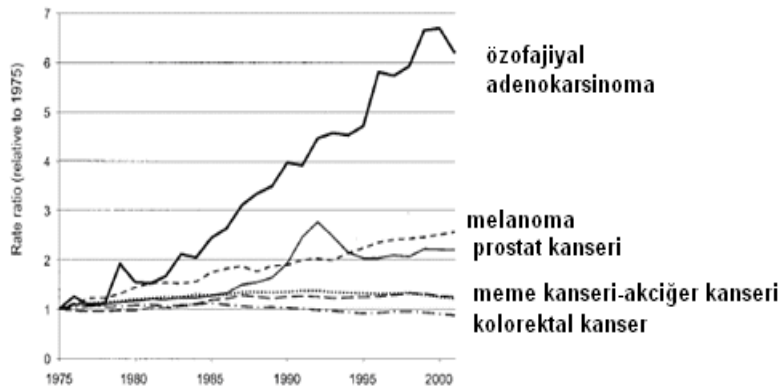
Şekil 1: Barrett Özofagus [Gastroözofageal junction (uzun ok), skuamo-kolumnar junction (kısa ok), Skuamo kolumnar junction'ın proksimaline uzanan Barrett mukozası (mavi oklar)]²⁵

Klasik (eski) tanımlama ile Barrett Özofagusunda 3 tip histolojik epitelin bulunduğu bildirilmiştir. Bunlar; 1. Özelleşmiş kolumnar hücreler: İntestinal metaplazi; 2-Gastrik fundus hücreleri: Fundik tip gastrik epitel; 3-Özofagogastrik bileşke hücreleri: Kardiyak veya junctional hücreler. Erişkinlerde en sık özelleşmiş kolumnar hücreler görülmesine karşın çocuklarda en sık kardiyak tip hücreler görülür. Sadece özelleşmiş tip hücre içeren Barrett mukozasının artan kanser riski ile ilişkili olduğu düşünülmekte ve teşhisi de muköz salgılayan goblet hücrelerinin histolojik olarak tanısıyla mümkün olmaktadır. Bu nedenle bugün için Barrett özofagusunun tanısında özofagusta hangi uzunlukta olursa olsun goblet hücrelerinin bulunduğu intestinal metaplazinin varlığı, gerekli olan tek ölçüttür. ⁷.

Barrett özofagus, premalign (prekanserojen) bir durumdur. Yani Barrett özofagus yüzeyinin, vücudun normal dokularına veya diğer reflü hastalarına göre kansere neden olma olasılığı daha yüksektir. Özofagus kanseri skuamoz hücre karsinoma ve adenokarsinoma olarak iki tipte incelenir. Barrett özofagus nedeniyle özofagusta gelişen kanser türü özofageal adenokarsinomadır.

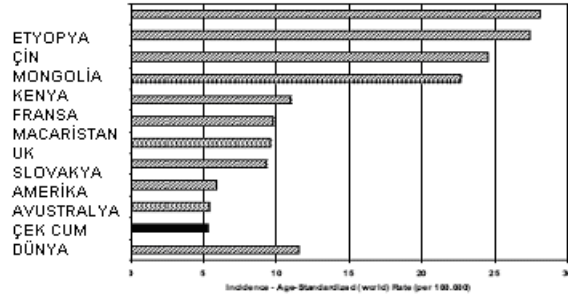
Özofagus kanseri, dünyada erkeklerde en sık görülen 6. kadınlarda ise 9. kanser türüdür²⁷. Çok hızlı ilerler ve genelde ölümcüldür. Görülme sıklığı yaş ile beraber artar ve 50-70 yaşlarında pik yapar. Özofagus kanseri erkeklerde kadınlara göre daha sık görülür (3-5:1 oranında). En sık görülen tipi ise skuamoz hücre karsinomasıdır. Ancak

son yıllarda adenokarsinoma görülme sıklığı da artmış, 1985 yılında özofagus kanserlerinin %3,5'u adenokarsinoma iken, 2000 yılında bu oran %17'ye yükselmiştir. Batı Avrupa ve Amerika'da ise adenokarsinoma görülme sıklığı %50 civarındadır. Özofagus kanserinin sürvisi genellikle pekiyi değildir ve hastaların 5 yıl yaşama oranı genellikle %5'den azdır⁸. Amerika'da yapılan istatistikler, özofageal adenokarsinomanın son 25 yılda insidansı en çok artan major malignitelerden biri olduğunu göstermektedir (Şekil 2). Amerika'da özofageal adenokarsinomanın insidansı 1973-1975 yıllarından 2001 yılına kadar 6 kat artmıştır. Bu artışı hastalığın tanısı ve sınıflandırılmasındaki iyileşmelere bağlayan çalışmalar olduğu gibi bu faktörlerin etkisinin gözlenmediği ve bu artışın diğer faktörlerden bağımsız olarak gerçekleştiğini gösteren çalışmalar da vardır²⁶.

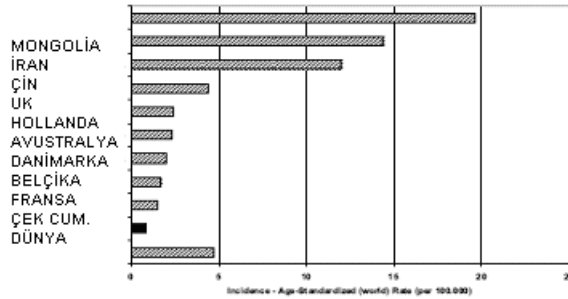


Şekil 2: Amerika popülasyonunda özofageal adenokarsinoma ve bazı kanser türlerinin 1975-2001 yılları arasındaki insidansları (Ulusal Kanser Enstitü verileri)²⁶

2002 verilerine göre özofagus kanseri en sık Çin, Etiyopya ve Mongolia'da görülmüş ve insidansı erkeklerde 100.000'de 28,1 iken kadınlarda 19,6 olarak belirlenmiştir. Avrupa'da ise erkeklerde en çok Fransa (11,0), Macaristan (9,8), Büyük Britanya (9,6) ve Slovakya'da (9,3), kadınlarda ise Büyük Britanya (4,4), Hollanda (2,4) ve Danimarka'da (2,0) görülmüştür (Şekil 3)²⁷. Amerika'da ise 2003 verilerine göre özofagus kanser insidansı erkeklerde 8,6/100 000 iken kadınlarda 2,0/100 000 olarak belirlenmiştir²⁸.



a. Özofagus kanserinin erkeklerdeki insidansı



b. Özofagus kanserinin kadınlardaki insidansı

Şekil 3: Özofagus kanserinin bazı ülkelerde ve dünya genelindeki insidansı⁸.

Özofagus kanseri nedeniyle görülen ölüm vakaları ile ilgili olarak, hastalığın insidans verilerine paralel veriler elde edilmiştir. Dünyada erkeklerde, kanser nedeniyle ölümlerde 5. sırada özofagus kanseri yer alırken, kadınlarda 8. sırada yer almaktadır. 2002 verilerine göre erkeklerde en çok ölüm oranı Etiyopya, Kenya ve Çin'de görülmüş ve ortalama ölüm oranı 100 000'de 27 olarak belirlenmiştir. Kadınlarda ise en yüksek ölüm oranı Mongolia, İran, Kenya ve Çin'de görülmüş ve 100 000'de 16 olarak belirlenmiştir. Avrupa'da ise en çok ölüm oranı erkeklerde Macaristan (9,1/100 000) ve Büyük Britanya (9/100 000) da gözlenirken, kadınlarda en yüksek ölüm oranı Büyük Britanya'da (4,1/100 000), sonra da Hollanda'dadır (2,2/100 000)²⁷. Amerika'da ise 2003 verilerine göre özofagus kanseri nedeniyle ölüm oranları erkeklerde 7,7/100 000 iken kadınlarda 1,7/100 000 olarak belirlenmiştir²⁸.

Türkiye'de özofagus kanser insidansı ve bu hastalığa bağlı olarak gözlenen ölüm sıklığı ile ilgili en son veri Türk Kanser Araştırma ve Savaş Kurumu tarafından yayınlanmıştır. 1998 yılı verilerine göre özofagus kanser insidansı erkeklerde 1,28/100 000 iken kadınlarda 0,66/100 000 olarak belirlenmiştir⁹.

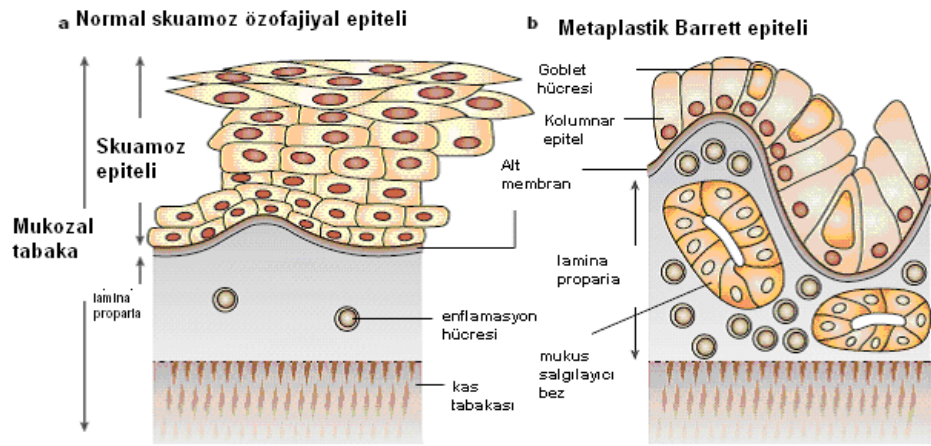
Barrett özofagus prevalansı ve insidansı ile ilgili epidemiyolojik ölçümler, ilgili popülasyondaki endoskopik gözlemlerle oldukça ilişkilidir. Barrett özofagus ile ilgili bu veriler genellikle GÖR semptomları nedeniyle endoskopiye giden hastalardan elde edilir. Genellikle kronik GÖR hastalarının %10-12'inde Barrett özofagus gözlenir. Ancak Barrett özofagus hastalarının yaklaşık 1/3'ünde reflü semptomları gözlenmez¹⁰. Endoskopi ve otopsi verilerine göre Barrett özofagus hastalığının her 50-100 kişide bir gözlemlendiği bilinmekte, insidansı ve prevalansı etnik farklılık gösterebilmektedir¹¹. Amerika'da Barrett özofagus görülme sıklığı 1965-1997 yılları arasında 50 kat artmıştır⁷. Barrett özofagus sıklığı ile ilgili yapılan çalışmaların sonuçları da çeşitlilik göstermektedir. Csendes ve arkadaşlarının 306 kontrol ve 376 GÖR hastalarında yaptıkları çalışmada kontrolde Barrett özofagus sıklığı %1,6 bulunmuş, ancak hasta grubunda ise bu oran %18'e kadar çıkmıştır²⁹. Başka bir çalışmada ise asemptomatik hastaların %25'inde Barrett özofagus saptanırken bunların %7'si uzun %17'si ise kısa segment Barrett olarak belirlenmiştir³⁰.

Türkiye'de ise Barrett özofagusun değişen tanımı halen yaygınlaşmadığı için gerçek prevalansı ve insidansı belirlemek zordur. Toruner ve arkadaşlarının 2004 yılında yaptıkları çalışmada endoskopiye giren 395 dispepsi hastasında Barrett özofagus sıklığı %7,4 olarak belirlenmiş ve bu hastaların diğerlerine göre daha yaşlı, çoğunlukla erkek oldukları ve hastalık ile ilgili semptomları daha uzun süredir taşıdıkları saptanmıştır¹². Yılmaz ve arkadaşları da 2006 yılında Barrett özofagus ve eroziv özofajit sıklığını belirlemek amacıyla yaptıkları çalışmada ise 18766 endoskopik vakanın, 84'ünde (%0,4) Barrett özofagus varlığı histopatolojik olarak doğrulanmış ve vakaların %57'sinin erkek ve yaş ortalamasının da 55,6 olduğu belirlenmiştir¹³.

Barrett özofagus tanısı için hastaya üst gastrointestinal sistem endoskopisi (Gastroskopi) yapılması gerekir. Barrett dokusu yemek borusunun normal dokusundan farklı bir görünüme sahiptir ve endoskopide görülebilir. Bu değerlendirme genelde yeterli olmasına rağmen, tanının doğrulanması için doku örneği alınarak histopatolojik inceleme yapmak gerekir. Histopatolojik tanı, goblet hücrelerinin özel bir boya olan Alcian mavisi ile maviye boyanması ile ayırt edilerek yapılır. Doku örneği alınması aynı zamanda dokuda displazi olarak adlandırılan bazı mikroskobik değişikliklerin aranması için de kullanılır³¹.

2.2. Barrett Metaplazisi ve Özofageal Adenokarsinoma Gelişimi

Barrett özofagusu olan hastalarda normal özofagusa sahip bireylere göre özofageal adenokarsinoma gelişme riski 30-40 kez daha fazladır. Tüm özofagus kanserlerinin %10-40'ının Barrett özofagus ile ilişkili olduğu tahmin edilmektedir. Her yıl Barrett özofagus hastalarının yaklaşık %0,5'ine adenokarsinoma teşhisi konmaktadır^{6,7}.



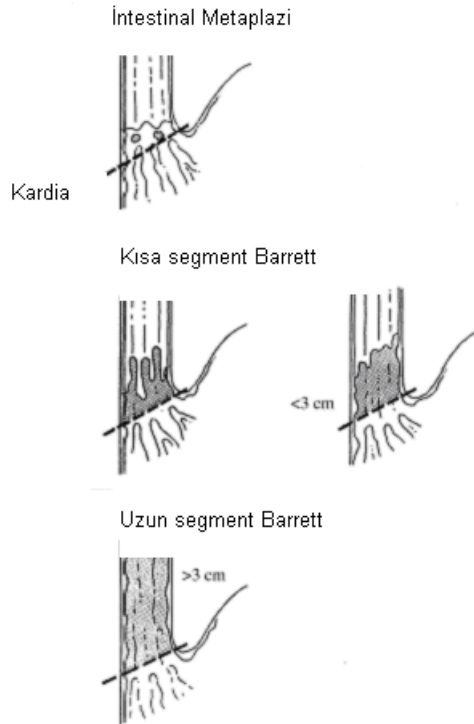
Şekil 4: Normal ve metaplastik Barrett epiteli⁷

Barrett özofagusta metaplastik değişim süreci nadiren in vivo olarak gözlenir ve güvenilir fizyolojik hayvan modelleri de henüz mevcut değildir. Sonuç olarak Barrett özofagus oluşumunun altında yatan moleküler ve hücresel süreci açıklamak için öne sürülen teoriler henüz spekülatiftir. Ancak luminal çevrenin hastalığın oluşumunda önemli olduğu düşünülmektedir. İnsan özofageal epiteli günlük termal stres, metabolize olmamış kimyasallar veya gıda ürünleri gibi pek çok çevresel strese maruz kalmaktadır. Barrett özofagus gelişiminde skuamöz epitelde kronik hasar oluşumunun etkili olabileceği bilinmektedir. Bu kronik hasar sıklıkla mide asit içeriğinin özofagusa reflüsü ile olmaktadır³². Barrett gelişiminde onaylanmış iki hipotez bulunmaktadır. Bunlardan ilki asit ve safra asidine sürekli maruziyet sonucunda alt hücre katmanındaki kök hücrelerin metaplazisi, diğer teori ise kolumnar hücrelerin, başka kaynaklardan (submukozal salgı bezi gibi) orijin alabileceğidir. Metaplaziden sonra bir seri histopatolojik değişimler meydana gelir. Bunlar sırasıyla displazi, karsinoma in situ ve özofageal adenokarsinomadır^{32,33}.

2.2.1. İntestinal Metaplazi (Barrett özofagus)

İntestinal metaplazi gastrik epitelin yerini intestinal tip epitelin alması sonucu meydana gelen, gastrik kanser oluşumunda önemli bir süreçtir. İntestinal metaplazi teşhisi histolojik olarak yapılır ve Goblet hücrelerinin varlığı ile karakterize edilir.

İntestinal metaplazi tanımı kolumnar epitelin uzunluğunun endoskopik olarak belirlenmesi ile sınıflandırılabilir. Kolumnar epitelin 3 cm'e eşit veya daha uzun görüldüğü durum, *uzun segment Barrett*; 3 cm'den kısa görüldüğü durum ise, *kısa segment Barrett* olarak adlandırılmaktadır (Şekil 5)³⁴.

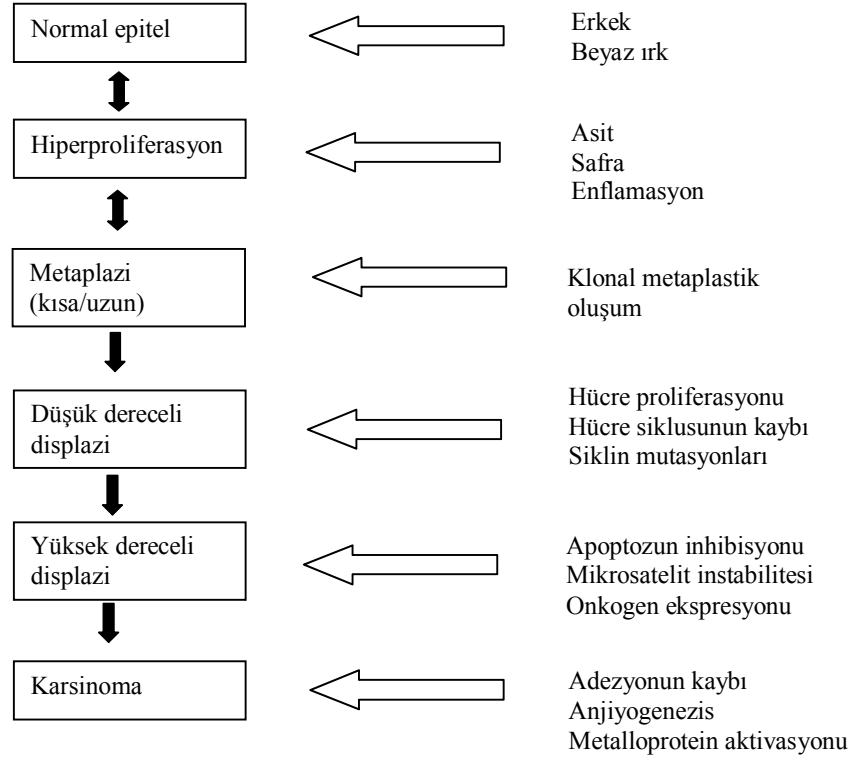


Şekil 5: İntestinal metaplazi, kısa ve uzun segment Barrett özofagusu²⁹

2.2.2. Displazi ve Özofageal Adenokarsinoma

Barrett mukozasındaki prekanserojen veya erken neoplastik değişiklikleri ifade edebilmek için displazi, atipi, karsinoma in-situ, mukozal karsinoma gibi çeşitli terimler kullanılmaktadır. Ancak patoloğlar arasında bu terimlerin kullanımı ve geçerliliği oldukça fark etmektedir. Bu nedenle 2003 yılında Uluslararası Patoloğlar Konsersiyumu ve Dünya Sağlık Örgütü, epitelin preinvaziv neoplastik değişimini ifade etmek için intraepitelial neoplazi terimini önermişlerdir. Ancak günümüzde halen en sık kullanılan terim displazidir³⁵.

Barrett özofagus segmenti içindeki displazi, DNA'daki anormalliklerin sonucu olarak meydana gelen ve histolojik olarak tanımlanan fenotipik değişiklikler olarak tanımlanabilir. Bu tür displazi, düşük dereceli (low grade) ve yüksek dereceli displazi (high grade) olarak sınıflandırılabilir (Şekil 6). Displazinin doğal süreci tam olarak bilinmese de Barrett epitelindeki düşük dereceli displazinin malignite riskini arttırdığı gözlenmiştir. Ancak günümüzde yüksek dereceli displazi, özofageal kanser teşhisinde en güvenilir belirteç olarak kabul edilmektedir³⁴. Barrett epitelinde displazi prevalansı ile ilgili yapılan çalışmalarda belirtilen patolojik incelemeler, özofageal adenokarsinoma hastalığında displazik değişikliğin oldukça sık rastlandığını göstermektedir^{36,37}. Ancak herhangi bir nedenle endoskopiye giden Barrett özofagus hastalarında displazi sıklığının %10'un altında olduğu tahmin edilmektedir³⁴. Günümüzde endoskopik tanı programlarında Barrett özofagusta displazi gelişimi, özofageal kanser teşhisinde fenotipik özellik olarak yer alsa da displazinin subjektif bir tanı olması, displazinin doğal gelişiminin değişken olması, biyopsi örneklerinin değişkenliği, Barrett özofagusun mozaik yapısı gibi olumsuz faktörler göz önüne alınmalı ve kanser riskinin değerlendirilmesinde, displazi tek başına bir biyogösterge olarak değerlendirilmemelidir^{38,39}. Williams ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarda endoskopik, klinik, radyolojik, operatif ve patolojik bulgulara göre özofageal adenokarsinoma teşhisinde Barrett epitelinin varlığının yanı sıra, tümör kütesinin tübüler özofagusun %75'inden fazlasını kaplaması, periözofageal dokuların invazyonunun histolojik olarak kanıtlanması, minimal gastrik içerik, özofagus tıkanıklığına ilişkin klinik semptomların varlığının belirlenmesi gerektiğine dikkat çekmişlerdir³⁴.



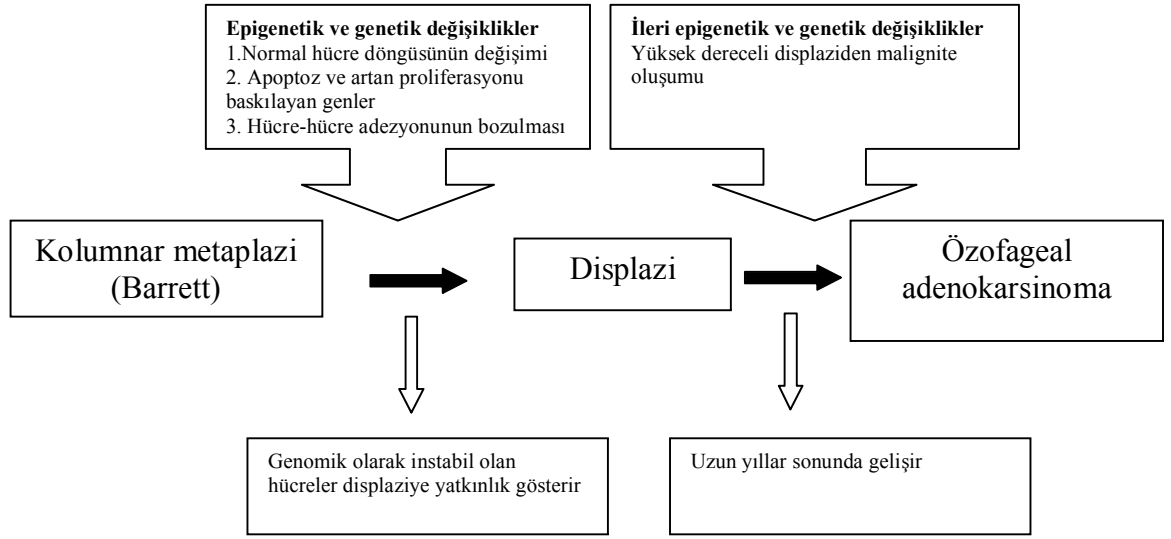
Şekil 6: Barrett özofagus ve özofageal adenokarsinoma gelişiminde metaplazi-displazi-karsinoma sürecinin şematik gösterimi⁴⁰

2.3 Barrett Özofagustan Kanser Gelişiminde Rol Oynayan Moleküler Değişiklikler

Kanser gelişiminde rol oynayan genel biyolojik olaylar (kontROLSÜZ hücre çoğalması, apoptozun inhibisyonu, hücre replikasyonunda artış, invazyon ve metastaza yatkınlık gibi) ve genetik değişiklikler (nokta mutasyonları, kromozomlardaki değişiklikler) Barrett karsinogenezinde de gözlenmektedir.

Displazi ve adenokarsinoma genellikle Barrett mukozasının çok uzun yıllar var olmasından sonra gelişir. Metaplastik kolumnar mukoza ve intestinal metaplaziye neden olan patofizyolojik olayların displazi gelişiminde de rol oynadığı düşünülmektedir. Özellikle reflüsü olan bireyler, özofageal kanser gelişiminde yüksek risk grubunu oluşturdıklarından bu hipotezi desteklemektedirler. Ayrıca reflünün süresi ve ciddiyeti de kanser gelişimini etkilemektedir⁴¹. Barrett metaplazisinden

adenokarsinomanın gelişimi gen yapısında, gen ekspresyonunda ve protein yapısında meydana gelen birçok değişikliğin sonucudur (Şekil 7).



Şekil 7: Barrett metaplazisinden adenokarsinoma gelişimi sırasında meydana gelen değişiklikler³³

Bu moleküler değişiklikler, kesin olarak belirlenmemişse de olası değişiklikler pek çok çalışmada gösterilmiştir. Muhtemelen ilk meydana gelen moleküler olay, metaplastik kolonilerin intestinal metaplazi ile beraber çoğalmasındır. Bu durum pek çok kanser türü için geçerlidir. Bazı hücreler, nedeni tam olarak bilinmese de muhtemelen çevresel veya kalıtsal nedenlerden dolayı genetik olarak bozukluk gösterirler. Zamanla çoğalan bu hücreler koloni haline gelirler ve çevredeki normal hücrelerin de genetik yapılarını değiştirirler. Bu koloniler de kansere neden olabilecek genetik değişiklikleri indükleyebilirler¹⁰. Genetik olarak normal olmayan hücrelerin çoğalmasının ardından, hücre döngüsü kontrol noktalarının kaybı ve artan proliferasyon gözlenir. Daha sonra Barrett özofagusta apoptozisin inhibisyonu ve yüksek dereceli displazi hücrelerinin artışı meydana gelir. Hücre adezyonunun değişmesinin ardından invaziv kanser gözlenir⁴².

I.aşama (Hücre proliferasyonunun artışı): Normal hücre bölünmesinin, hücre proliferasyonu ve hücre kaybı arasındaki dengeyi sağlaması ve dokularda belli sayıda hücrenin bulunması çok önemlidir. Eğer proliferasyonun artışı, apoptozun azalması veya her ikisinin aynı anda

gözlenmesi söz konusu ise kontrolsüz çoğalma ve tümör gelişimi meydana gelebilir⁴³.

Normal bir hücrede kromozom sayısı 2N (diploid) olarak ifade edilir. Hücreler içeriklerini ikiye katlayarak (4N) ve sonra da ikiye bölünerek çoğalırlar. Bu memeli hücre bölünmesi çeşitli fazlardan oluşur (G₀, G₁, S, G₂, M). Hücredeki sayısal anomaliler ise anöploid olarak ifade edilir. Hücre veya çekirdek kantitatif bir floresan DNA boyası ile boyandığında, floresanın miktarı direkt olarak hücredeki DNA içeriği ile orantılıdır. Flow sitometri adı verilen bu teknikle yapılan bazı çalışmalarda, normal özofagustan premalign Barrett metaplazisi gelişiminin anöploid ve metaplastik hücrelerde artmış G₂/M fraksiyonuna bağlı olduğunu göstermiştir^{43,44}. Flow sitometri ile yapılan bir çalışmada kontrol grubundaki hücrelerin büyük bir kısmının G₀ (dinlenme) fazında olduğu halde, Barrett metaplazisinde hücrelerin üçte birinin G₁ fazında (hücre bölünmesinin ilk aşaması) olduğunu göstermiştir. Aynı çalışma grubu, Barrett hastalarından alınan biyopsi örneklerinde G₂ evresinde olan hücre sayısında artış olduğunu bildirmiştir¹⁰.

Ayrıca Barrett özofagusta neoplazinin gelişimi sürecinde, büyüme faktörü olan TGF α (transforming growth factor) ve epidermal büyüme faktör reseptörü EGFR (epidermal growth factor receptor)'nin artan ekspresyonu sonucunda büyüme sinyallerinde artış gözlenmiştir⁴⁵.

Barrett neoplazisinin gelişiminden önceki epigenetik değişiklikler, büyüme inhibitör geni olan, 16-kD proteinini kodlayan ve kromozom 9p'de yer alan p16 geninin (MTS1, CDKN2A) metilasyonu suretiyle baskılanmasına neden olur. Bu epigenetik değişiklikler, artan siklin D ve E ekspresyonu ile ilgilidir⁴⁵. p16 geni tümör baskılayıcı gendir ve p53 geni gibi hücrelerin G₁ fazından S fazına geçişini inhibe eder. Dolayısıyla bu gendeki inaktivasyon kontrol edilemeyen hücre çoğalmasına neden olur. p16 genindeki abnormaliteler Barrett özofagusta ilk meydana gelebilecek moleküler değişikliklerdendir ve p53 abnormalitesinden, artan 4N hücrelerinden, anöploid hücrelerden veya yüksek dereceli displaziden önce fark edilebilir. Yapılan çalışmalar p16 geninde pek çok abnormalitenin olduğunu ve Barrett dokularının %85'inde bu abnormalitelerden en az birine rastlandığını göstermektedir. Barrett segmentinin uzunluğu arttıkça p16 genindeki abnormalite sayısı da artmaktadır^{31,46}. Bu durum, Barrett dokusunun önce tek bir hücre klonu şeklinde başladığını ve bunun p16 gen abnormalitesine neden olarak Barrett dokusunun özofagus boyunca yayılması ile sonuçlandığını düşündürmektedir. Ayrıca p16 gen abnormaliteleri, Barrett dokusunda

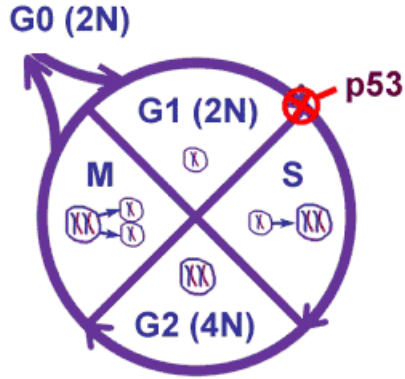
diğer gen abnormalitelerinin oluşmasını veya yayılmasını kolaylaştırabilir³¹.

Ayrıca retinoblastoma geninin lokusu olan kromozom 13q'daki heterozigositenin kaybı (LOH) ve çeşitli mutasyonlar, epitel hücrelerin G₁ fazından S fazına geçmesine ve hücre proliferasyonunun artmasına neden olur. Barrett metaplazisinde retinoblastoma geninin mutasyonuna ilişkin bir bilgi henüz yoksa da normal retinoblastoma protein ekspresyonunun kaybolduğu gözlenmiştir⁴³.

Barrett metaplazisinde hücrenin kontrolsüz çoğalmasında etkili olan bir diğer faktör de normalde çoğalmanın inhibisyonu ile ilgili sinyalleri ileten TGF β reseptörünün kaybı ve *SMAD4* lokusunda (18q21.1) gözlenen mutasyondur⁴⁴.

II.Aşama (Apoptozun inhibisyonu):

İlk aşamada meydana gelen moleküler değişiklikler, Barrett mukozasında hızlı hücre döngüsüne neden olur. Bu hücreler, reflüye bağlı enflamasyon, artmış reaktif oksijen türleri, antioksidan savunma sistemlerinin yetersiz kalması ve aktive olmuş azot bileşiklerine maruziyet sonucunda oluşan patolojik ortamda yer alırlar. Bu kombinasyon epitel hücrelerinde mutajenik baskıya neden olur. Eğer hücrenin p53 geni ve proteini gibi aktif bir hasar kontrol sistemi varsa, hücre döngüsü durdurulur ve DNA hasarı onarılmaya çalışılır. Eğer hasar onarılamıyorsa p53 apoptotik sinyali aktive eder ve mutant hücreleri uzaklaştırır (Şekil 8)⁴⁵. Apoptozis (programlı hücre ölümü) hücre kaybından sorumlu mekanizmalardan biridir. Apoptozis aynı zamanda normal fonksiyonları engelleyecek veya neoplastik oluşuma neden olabilecek, fonksiyonları bozulmuş, DNA'sı hasarlı ve hasta hücrelerin uzaklaştırılmasını sağlayan koruyucu bir mekanizmadır.



Şekil 8: Hücrede p53 aktivasyonu³¹

p53 geni insanlarda ilk belirlenen hücre döngüsü kontrol genidir. Aynı zamanda tümör baskılayıcı gen olarak da bilinir. p53 genindeki genetik anomaliler normal fonksiyonunun bozulmasına ve tümör gelişimine neden olabilir³¹. p53 genindeki mutasyonlar, özofageal adenokarsinomada ve Barrett epitelinde ilk kez 1991 yılında belirlenmiştir¹⁹. Bu bulgu daha sonra yapılan pek çok çalışmada da gösterilmiş ve p53 genindeki varyasyonlar Barrett epitelinde karakterize edilmiştir⁴⁷. Displazinin görülmediği Barrett epitelinde de p53 gen mutasyonuna rastlanması, p53 genindeki değişikliklerin metaplazi-displazi-karsinoma dizisinde erken aşamada meydana geldiğini göstermektedir ve bu nedenle endoskopik tanı programlarında önemli bir biyogösterge olarak kullanılabilir. Yapılan bazı çalışmalar p53 genindeki mutasyonun Barrett epitelinde baz değişimi şeklinde endojen olarak meydana geldiğini göstermektedir. Bu mekanizmanın oksijen ve azot radikallerine maruziyet sonucunda gerçekleştiği bilindiğinden, kronik GÖRH nedeniyle azot oksit üretiminin artması sonucunda meydana geldiği varsayılabilir. Ayrıca kromozom 17p (p53 gen lokusu) deki heterozigositenin kaybının görülme sıklığı non displazik Barrett epitelinden (%6) yüksek dereceli displaziye doğru (%57) artmaktadır³⁴.

Apoptoz mekanizmasında önemli moleküllerden biri de Fas ve Fas ligand (FasL)'dir. Neoplastik değişikliklerin meydana geldiği Barrett epitelindeki hücrelerde Fas ekspresyonunun azaldığı, FasL ekspresyonunun ise arttığı gözlenmiştir. Hasarlı hücrelerde Fas ekspresyonunun azalması, normalde FasL ekspresyonuna neden olan hücreler tarafından indüklenen apoptozdan korunmasına neden olur. Barrett epitelinde artan FasL ekspresyonu ise Fas eksprese eden ve tümörden koruyucu olan normal hücrelerin apoptoza girmesini indükleyebilir^{48,49}.

Apoptozu kontrol eden bir diğer gen de bcl-2 protoonkogenidir. Bu gen apoptozu indükleyen bir proteini kodlamaktadır. Bcl-2 ekspresyonunun reflü özofajitinde, Barrett metaplazisinde ve düşük dereceli displazide (tüm olguların %70-100'ünde) arttığı ancak, yüksek dereceli displazide (olguların %0-25'i) ve kanserde (olguların %0-40'ı) nerdeyse yok denecek kadar az olduğu gözlenmiştir. Bu durum bcl-2 proteininin artan ekspresyonu sonucunda apoptozun inhibisyonu ile ilgili mekanizmanın Barrett metaplazisi-kanser sürecinin ilk aşamalarında gerçekleştiğini göstermektedir⁵⁰.

Siklooksijenaz 2 (COX-2) enzimi prostaglandin sentezinde görev alan, enflamasyon varlığında veya mutajenik bir uyarı olduğunda indüklenen bir enzimdir. COX-2, tümör gelişiminde önemli olan apoptozis, hücre adezyonu, invazyon, metastaz ve anjiyogenezis gibi birçok basamakta rol oynar. Kronik özofajit sonucunda mukozada aşırı miktarda prostaglandin E2 üretilir ve safra asitleri de COX-2 ekspresyonunu uyarırlar. Özofageal adenokarsinomaların ve Barrett metaplazisinin %70-80'inde COX-2'nin eksprese olduğu gözlenmiştir⁴³. Özofageal kanser hücrelerinde COX-2'nin inhibe edilmesi sonucunda apoptozun indüklendiği, proliferatif aktivitenin ve prostaglandin E2'nin sentezinin azaldığı belirlenmiştir. Düzenli olarak aspirin kullanan bireylerde ise COX-2 inhibe olduğundan özofagus kanserinde %40-50 azalma gözlenmiştir⁵¹.

III. aşama (Immortalizasyon, invazyon ve metastaz):

Kanser sürecinde, hücre proliferasyonunu ve/veya apoptozisi kontrol eden mekanizmalardaki aksaklıkların yanı sıra yeni kan damarlarının da oluşması gereklidir (anjiyogenezis). Barrett özofagusun neoplastik gelişim sürecinde vasküler endotel büyüme faktörleri olan VEGF-A, VEGF-C ve VEGF reseptörlerinin (VEGFR'ler) ekspresyonları incelenmiştir. VEGF-C normal epitelde bulunmazken, intestinal metaplazide artmış seviyelerine rastlanmıştır. Ayrıca neoplastik dokuda VEGFR-3 ekspresyonu gözlenmiştir. Damar endotelindeki bu farklılaşmalar Barrett adenokarsinomasının gelişim sürecinde ilk basamaklarında etkili olabilmektedir⁴⁴. Anjiyogenezinin uyarılmasında önemli bir diğer molekül de matriks metalloproteinaz (MMP)'dir. Barrett epitel hücrelerinde MMP sentezinin arttığı tespit edilmiştir⁵².

Normal somatik hücre bölünmesinde, telomerler kısalır. Bunun tersi olarak immortalize olmuş (kendi başına bölünen) hücreler ve kanser hücrelerinde bölünme sırasında telomer kısalması gözlenmez. Telomeraz, kromozom uçlarındaki telomerik DNA'yı sentezleyen ve böylece telomer uzunluğunu koruyan bir ribonukleoprotein kompleksidir.

Çeşitli neoplastik ve preneoplastik durumlarla beraber, telomeraz aktivitesindeki artış, immortalize olmuş hücre sayısının artmasına ve genetik mutasyonların birikmesine neden olabilir⁴³. Barrett epitel hücreleri, telomer uzunluğunu koruyarak sınırsız bölünme potansiyeline sahip olurlar. Morales ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada normal skuamöz özofageal epitel hücrelerinde düşük seviyede telomeraz RNA'ya rastlanırken, Barrett metaplazisinde daha kuvvetli telomeraz RNA ekspresyonuna rastlanmıştır (olguların %70'inde). Bu artış, düşük dereceli displazide olguların %90'ında, yüksek dereceli displazide ve adenokarsinomada ise olguların %100'ünde gözlenmiştir⁵³.

Hücre-hücre adezyonunun (hücrelerin birbirine tutulumu) kanserde azaldığı bilinmektedir. Bu durumda, hücreler proliferasyonun inhibisyonundan ve büyüme kontrol sinyallerinden etkilenmezler. Normal epitelde, E-kadherin-katenin kompleksi kalsiyuma bağlı hücre-hücre adezyonunda başlıca mediatördür. Barrett karsinomaların %60-80'inde E-kadherin ve kateninlerin ekspresyonlarında azalma gözlenmiştir. Ayrıca E-kadherin ve α ve β kateninin azalan ekspresyonunun tümör gelişimi ve lenf nodu metastazı ile ilgili olduğu gözlenmiştir⁵⁴. Bu moleküllerin ekspresyonundaki düşüş ile ilgili herhangi bir mutasyona rastlanmamışsa da özofageal adenokarsinomada E-kadherin lokusunda (16q22) heterozigositenin kaybı gözlenmiştir. β -katenin'in hücre-hücre adezyonunun yanı sıra hücre sinyalizasyonunda da fonksiyonu olduğu bildirilmiştir. Normal şartlarda β -katenin, E-kadherin'e bağlı halde bulunur. Stoplazmada serbest β -katenin seviyesi, β -kateninin hızlı degradasyonu ile düşük seviyede tutulur. β -kateninin degradasyonu, içinde APC (adenomatus poliposis koli) proteininin de bulunduğu protein kompleksi tarafından fosforile edilmesiyle gerçekleştirilir. APC'nin inaktivasyonu ile hücre içinde serbest halde bulunan β -katenin hücre çekirdeğine girerek, transkripsiyon faktörlerine bağlanır ve gen ekspresyonunu aktive eder. Bu genler c-myc onkogeni ve hücre siklusunu düzenleyen siklin D1 gibi hücresel proliferasyonu başlatan genlerdir. Özofageal adenokarsinomada β -kateninin sitoplazmik ve nüklear lokalizasyonunda artış tespit edilmiştir⁵⁵. Ayrıca APC geni kromozom 5q'da lokalize olan ve özofageal adenokarsinomada heterozigositenin kaybı olduğu genlerden biridir⁵⁶.

2.4. Barret Özofagus Gelişiminde Rol Oynayan Başlıca Risk Faktörleri

GÖRH ile özofageal adenokarsinoma arasında çok kuvvetli bir ilişki saptanmıştır ve Barrett özofagus gelişiminde de önemli rolü olduğu düşünülmektedir. Pek çok vaka-kontrol çalışmasında, GÖRH yanında bireylerin yaşam tarzı ile özofageal adenokarsinoma arasındaki ilişki de araştırılmıştır. Barrett özofagus ile ilgili faktörlerin incelendiği çalışmalar sınırlı olmakla beraber başlıcaları, obezite, diyet, sigara ve alkoldür. Bunun dışında etkili olan faktörler ise, cinsiyet, ırk, moleküler değişiklikler, genetik faktörler, enflamasyon ve DNA hasarı olarak sayılabilir^{7,57}.

2.4.1. Gastroözofageal Reflü Hastalığı (GÖRH)

Gastrointestinal sistemin başlıca görevi, vücuda sürekli olarak su, elektrolit ve besin sağlamaktır. Bunun için besin maddelerinin sindirim ve emilime uğrayabileceği uygun bir hızla gastrointestinal kanalda ilerlemesi gerekir. Bu bütünün içinde özofagusun başlıca işlevi, besinlerin farinksten mideye iletilmesini sağlamaktır. Özofagusun diğer bir fonksiyonu ise mide içeriğinin yukarıya geçişini engellemektir. Bu işlevi, anatomik olarak farklı olmayan ancak tonik olarak kasılı olan alt gastroözofageal sfinkter ile gerçekleştirir. Özofagusun sekresyonu tümüyle mukoid niteliktedir ve yutmanın kolaylaşmasını sağlar. Özofagusun büyük bir bölümü, muköz bezlerle kaplıdır. Bu bezler müsin salgılayarak yeni gelen besinlerin mukozaya zarar vermesini önler⁵⁸.

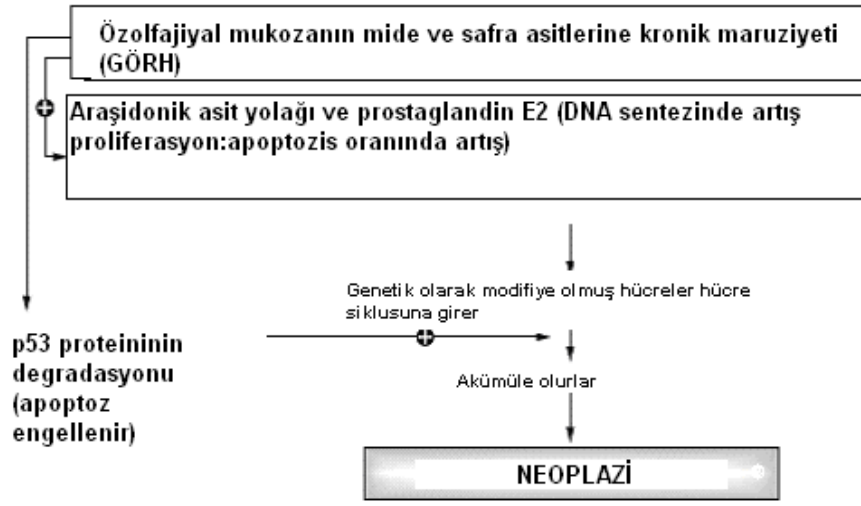
Gastroözofageal reflü (GÖR), mide içeriğinin özofagusa geri kaçması (reflüsü) dir. Mide içeriği asidik olduğundan bu olaya asit reflü de denmektedir. Birçok kişi asit reflüyü özellikle yemeklerden sonra ve akşamları mide ve göğüste yanma hissiyle fark eder. Eğer asit reflü normalden daha sık gözleniyorsa, kişiyi rahatsız edecek boyuta gelmişse veya çeşitli komplikasyonlar oluşmuşsa bu duruma gastroözofageal reflü hastalığı (GÖRH) denir. GÖRH spektrumu geniş bir hastalıktır. Endoskopik incelemeler ve özofagusa asit kaçışının miktarı ve süresinin incelendiği 24 saatlik pH monitorizasyonu bulgularına göre; non-eroziv reflü, eroziv reflü, Barrett özofagus ve fonksiyonel reflü olarak 4 grupta incelenir.⁵⁹ GÖRH'nın en sık görülen semptomu göğüs kemiği arkasında hissedilen yanma (heartburn) ve ekşime hissidir. Yetişkin insanların yaklaşık %20'si haftada en az iki kez bu semptomu yaşamaktadır. GÖR özellikle Batı ülkelerde yaygındır ve popülasyonun en az %30'unda aylık semptomlar gözlenir^{7,60}. Türkiye'de düşük gelir seviyesinin hakim olduğu

Menderes ilçesinde rasgele seçilen 630 kişide yapılan çalışmada GÖRH'nın prevalansının gelişmiş ülkelerle benzer olduğu (yaklaşık %20) ancak semptom profilinin farklı olduğu gözlenmiştir⁶¹.

GÖRH sonucunda özofagus, mide ve safra asidine maruz kalır ve bu içerik de özofagusun normal skuamoz tabakasına hasar verebilir. Ciddi gastroözofageal reflüsü olan hastalarda özofagusun aside maruziyeti uzun süre devam ettiğinden hasar gören normal skuamoz tabakası tekrar iyileşmez ve normal olmayan Barrett özofagus tabakası gözlenir. GÖR hastalarının yaklaşık %10'unda Barrett özofagus gelişimi söz konusudur ve her yıl Barrett hastalarının yaklaşık %0.5'inde özofageal adenokarsinoma gözlenmektedir. Sürekli tekrarlayan (en az haftada bir kez) GÖR semptomları gözlenen bireylerde, özofageal adenokarsinoma görülme sıklığı, normal bireylere göre en az 7-8 kat daha fazladır⁵⁷. Ciddi GÖR hastalarında özofagus tabakası, uzun süre asit hasarına maruz kaldığından, kanser gelişimi gözlenebilir. Anderson ve arkadaşları Barrett özofagus, özofageal adenokarsinoma hastası ve kontrol üzerinde yaptıkları bir araştırmada, GÖR'nün Barrett özofagus ve adenokarsinoma gelişimi ile kuvvetli ilişkisi olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada Barrett hastalarının %72.8'inde, özofageal adenokarsinoma hastalarının %48.5'inde, kontrol grubunun ise %18.9'unda GÖR semptomları tespit edilmiştir⁵⁷.

Gastroözofageal reflünün hangi moleküler mekanizma ile Barrett özofagusa ve özofageal adenokarsinomaya neden olduğu tam olarak açıklanamamıştır. Ancak olasılıklardan biri, reflü içeriğinin direkt veya indirekt olarak genetik değişikliklere neden olduğu ve bunun da hastalığa neden olan prosesleri başlattığı yönündedir. Barrett hastalarında çok uzun süreli asit ve safra reflüsü söz konusu olduğundan, reflü içeriğinin enflamasyon yolağı ile mukozal hasara (özofajit) ve DNA hasarına yol açabileceği düşünülmektedir. Reflünün içeriği oldukça heterojendir. İçeriğinde oro-özofageal (tükürük, özofageal sekresyonlar, besin), gastrik (asit, pepsin, mukus), duodenal (safra asitleri, tripsin, kolesterol ve lipaz) bileşikler bulunabilir. Reflünün en çok ilgi çeken bileşiği asidik olan kısımdır. Deneysel çalışmalar, asit ve pepsinin özofageal mukozaya hasar verdiğini ve kolumnar tip epitel hücrelerinin oluşmasını ve çoğalmasını indüklediğini göstermiştir. Asit dışında diğer faktörler de önemli olabilir. Safra asitleri de tümör başlatıcı etkiye sahip olan duodenogastroözofageal reflüye neden olabilecekleri için önemlidir. Safraya bağlı reflü, Barrett özofagus hastalarında sıklıkla gözlenen bir semptomdur⁷.

Bunun yanında, Barrett mukozasında azalmış antioksidan kapasitesinin de doku hasarına ve genetik hasara yol açtığına ve reflüde serbest radikal artışına bağlı olarak hücresel hasarın arttığına dair bulgular da vardır⁶⁰.



Şekil 9: Gastroözofageal reflü ve özofageal adenokarsinoma arasındaki ilişki⁴⁵

2.4.2. Sigara

Sigara kullanımının özofagus ve orofarinksin skuamoz hücreli karsinomasında bir risk faktörü olduğu bilinmektedir. Ancak sigaranın özofageal karsinomadaki rolü daha tam açıklanamasa da alt özofageal sfinkter basıncını azalttığı ve GÖRH'ni indüklediği düşünülmektedir³⁸. Amerika'da yapılan geniş çaplı bir araştırmada sigara içmenin özofageal adenoma riskini 2.8 kat arttırdığı ve bu etkinin de sigarayı bıraktıktan ancak 20 yıl sonra azaldığı gözlenmiştir⁶². Yapılan pek çok vaka kontrol çalışması da sigara içme ile özofageal adenokarsinoma riski arasında anlamlı pozitif ilişki göstermiştir. Bu çalışmalarda Odds Oranı (OR) genellikle 1.5-3.5 arasında değişmektedir^{63,64}. Bunun yanında bazı çalışmalar da sigara ile özofageal adenokarsinoma arasında bir ilişki bulmamıştır^{65,66}. Barrett özofagus ile sigara içme arasındaki ilişkiyi direkt olarak inceleyen çalışmalarda da farklı sonuçlar bulunmuştur. Johansson ve arkadaşlarının yaptıkları güncel bir çalışmada da sigara içmenin Barrett özofagus riskini 3.3 kat arttırdığı gözlenmiştir⁶⁷. Bu çalışmanın tersine Anderson ve arkadaşları sigara içme alışkanlığı ile Barrett özofagus riski

arasında herhangi bir ilişki bulmazken, özofageal adenokarsinoma arasında pozitif ilişki olduğunu saptamıştır. Bu çalışma sigaranın Barrett özofagustan kansere geçişi indüklediğini, bunu da muhtemelen sigara dumanı içindeki kanserojen bileşiklerin kolumnar epitel hücrelerin proliferasyonunu ve bölünme hızını arttırarak yaptığını düşündürmektedir⁵⁷. Ayrıca tütün çiğnemenin ve esrar içmenin yaygın olduğu bölgelerde (İran, Afganistan, Orta Asya, Çin gibi) özofagus kanserinin görülme sıklığının fazla olduğu bilinmektedir⁸.

2.4.3. Alkol

Alkol kullanımı ve Barrett özofagus ve /veya özofageal adenokarsinoma arasındaki ilişki oldukça çelişkilidir. Bu konuda yapılan bazı çalışmalar, pozitif ilişki saptarken^{68,69}, bazı çalışmalarda ise herhangi bir ilişki gözlenmemiştir^{63,70}. Pozitif bulgular, alkolün de sigara gibi özofageal sfinkter basıncını azaltarak GÖRH'nı indükleyebileceğini ya da özofageal peristalsisini azaltarak etki gösterdiğini düşündürmektedir^{38,68}.

2.4.4. Diyet

Diyetle ilgili olarak bilinen birkaç risk faktörü vardır. Bunlardan en iyi tespit edileni, meyve, sebze ve bazı mikrobeseinlerin tüketiminin özofagus kanserine karşı koruyucu olduğudur. Bu etkiden meyve ve sebzelerin içindeki antioksidanların sorumlu olduğu düşünülmektedir⁷¹. Ayrıca lifli besinlerle beslenmenin de özofagus kanser riskini azalttığı, yağlı besinlerin tüketiminin ise GÖRH oluşumunu indükleyerek tersine özofagus kanser riskini arttırdığı düşünülmektedir⁷. Diğer potansiyel risk faktörleri ise kolesterol değeri yüksek besinlerin ve hayvansal gıdaların tüketimidir⁷². Barrett özofagus ve özofagus kanser riskinin azalmasında beta-karoten, retinol, vitamin C, vitamin E, çinko ve magnezyum gibi mikrobeseinler de oldukça önemlidir. Vitamin C açısından zengin gıdalar tüketen bireylerde, Vitamin C'nin nitrozolama reaksiyonunu inhibe etme özelliğinden dolayı özofagus kanserine yakalanma riskinin azaldığı gözlenmiştir. Ayrıca kafein, progesteron gibi hormonlar ve pek çok ilaç da Barrett özofagus gelişimini indükleyebilir³⁸.

Sıcak içeceklerin ve sıcak-baharatlı yiyeceklerin sıklıkla tüketiminin de Barrett özofagus ve /veya özofagus kanserine neden olabilecek faktörlerden biri olduğu düşünülmektedir. Ancak tüketilen yemeğin veya içeceğin sıcaklığının tam olarak ölçümünün zor ve karmaşık olması nedeniyle direkt bir ilişkinin kurulması oldukça zordur. Bu tip bir

ilişkiyi ortaya koyan epidemiyolojik çalışmalar özofageal kanser insidansının yüksek olduğu ve sıcak içecek tüketiminin popüler olduğu bölgelerde yapıldığından, kesin kanıtlara ulaşmak güç olmaktadır⁸. Yapılan bir çalışmada sıcak içecek, sigara ve alkol tüketiminin kümülatif olduğu bireylerde, özofageal kanser riskinin 7.1 kat arttığı bildirilmiştir⁷³. Bu etkinin patojenik yolağını tahmin etmek güçtür ancak, sıcak içecek tüketiminin kendisi bir karsinojen ya da promoter olarak davranabilir veya içeceğin yüksek ısırsı karsinogenezisden sorumlu olabilir⁷³.

Ayrıca diyetle alınan nitratlar ağız içindeki bakteriler tarafından nitrit bileşiklerine dönüşebilir. Bu nitrit bileşikleri tükürükte bol miktarda bulunur ve asidik mide içeriğı ile etkileşerek reaktif azot bileşiklerine dönüşebilirler³³. Özellikle Çin’de sıklıkla nitrozamin ile kontamine olmuş yiyeceklerin ve N-nitrozo ve mikotoksin açısından zengin olan sebze turşularının tüketimi nedeniyle özofageal kanser riskinin fazla olduğu bilinmektedir⁷⁴.

2.4.5. Obezite

Obezite ile özofageal adenokarsinoma arasındaki ilişki tam açıklanamamışsa da, obezitenin hiatal herni riskini arttırdığı ve karın içi basıncını arttırarak reflüyü indükleyebileceğı düşünölmektedir. Obez hastaların intragastrik basınçlarının ve gastroözofageal basınç gradientlerinin daha yüksek olduğu bilinmektedir⁷⁵. Yakın zamanda yapılan pek çok epidemiyolojik çalışma, obezitenin özofagus adenokarsinomada bağımsız bir risk faktörü olduğunu göstermiştir^{76,77}. Ancak bazı çalışmalarda ise anlamlı bir ilişki bulunmamıştır. Aşırı obez bireylerde (BMI>32) yapılan bir çalışmada kilo kaybının reflü semptomlarını azalttığı gözlenmiştir⁷. Jonge ve arkadaşlarının, 91 özofageal adenokarsinoma ve 244 Barrett özofagus hastasında yaptıkları bir çalışmada, 25’in üzerindeki BMI’in her iki olgu için de risk faktörü olduğu bildirilmiştir⁶³. Jacobson ve arkadaşlarının 10545 kadın üzerinde yaptıkları araştırmada artan BMI ile reflü semptomları arasında pozitif ilişki saptanmıştır⁷⁸. 2500 kişide yapılan başka bir çalışmada ise kısa süreli kilo alımının BMI’den bağımsız olarak reflü semptomlarını arttırdığı gözlenmiştir⁷⁹. Kanada’da yapılan güncel bir çalışmada ise obezite ve GÖRH arasında anlamlı bir ilişki saptanmazken, obezitenin Barrett özofagus riskini 2, özofageal adenokarsinoma riskini ise 5 kat arttırdığı gözlenmiştir⁸⁰. Bu konuda yapılan güncel bir meta analiz çalışmasında da obezitenin GÖRH semptomları, özofajit ve özofageal adenokarsinoma ile istatistiksel olarak anlamlı ilişkisi olduğu bildirilmiştir⁸¹.

2.4.6. Cinsiyet, Yaş ve Irk

Barrett özofagus ve/veya özofageal adenokarsinoma hastalığına yakalanma riskinin erkeklerde kadınlara göre daha fazla olduğu ve beyaz ırkta, riskin diğer ırklara göre arttığı bilinmektedir⁷⁵. Barrett özofagus, tüm yaşlarda görülmesine rağmen 55-63 yaşlar arasındaki erkeklerde, beyazlarda ve gelir düzeyi düşük olan bireylerde daha sık rastlanmaktadır.

2007 kanser istatistiklerine göre özofagus kanseri erkeklerde gittikçe artarken kadınlarda öyle bir artış gözlenmemekle beraber insidansı gittikçe azalan kanser türleri arasında yer almaktadır⁸². Zheng ve arkadaşları ise özofageal adenokarsinomaya yakalanma insidansında erkek: kadın oranının Amerika'da (Connecticut) yaklaşık 5.5 olduğunu bildirmiştir⁸³. Yapılan çalışmalarda, Barrett özofagusa yakalanma riskinin yine erkeklerde daha yüksek olduğu gösterilmiştir³⁸. İtalya'da yapılan çok merkezli bir çalışmada, erkeklerde Barrett özofagus görülme sıklığının bayanlara göre 3 kat daha fazla olduğu bulunmuştur⁶⁸.

Özofageal adenokarsinomanın genellikle 50 yaş ve üzerindeki bireylerde gözleendiği ve görülme sıklığının 55-65 yaşlarında pik yaptığı gösterilmiştir⁷⁵. Devesa ve arkadaşlarının yaptıkları bir meta analiz çalışmasında da özofageal adenokarsinomanın en sık yaşlı erkeklerde görüldüğü ve riskin 65 yaş altında ikiye katlarken, üstünde 3-4 kat arttığı belirlenmiştir⁸⁴. Barret özofagus ve yaş arasındaki ilişkiyi araştıran çalışmalar da bu hastalığa yakalanma riskinin yaklaşık 63 yaşlarında pik yaptığını göstermiştir³¹. Barrett özofagus muhtemelen en sık 40 yaşlarında başlamakta ve tanı genellikle 60'lı yaşlarda konulmaktadır⁸⁵. Csendes ve arkadaşlarının 306 kontrol ve 376 GÖR hastalarında yaptığı prospektif çalışmada hastaların %17.6'sında kısa segment Barrett, %5.9'unda ise uzun segment Barrett gözlenmiş ve Barrett özofagus hastalarının diğer hastalara göre daha yaşlı olduğu belirlenmiştir²⁹.

Yang ve Davis, siyah ırkta özofageal adenokarsinoma görülme sıklığının beyaz ırktakinin %30'u kadar olduğunu bildirmiştir⁸⁶. Barrett özofagusa yakalanma riskinin de beyaz ırkta, siyahlara göre daha yüksek olduğu ve bu oranın da yaklaşık 10-20 olduğu gözlenmiştir. Ancak bu bulguların, beyaz ırkta endoskopiye giden birey sayısının daha fazla olmasından ve sosyoekonomik koşullardan etkilenebileceği düşünülmektedir³⁸.

2.5. Barrett Özofagus Gelişiminde Genetik İnstabilitenin Önemi

Normal hücrelerde hücre bölünmesi (mitoz), her aşamasında farklı birçok mekanizma ile kontrol altında tutulur ve ancak tüm ön koşullar yerine geldikten sonra bir sonraki aşamaya geçilir (cell cycle check point). Ancak kanser hastalığında bu moleküler kontrol mekanizması, genetik mutasyonlar veya çevresel koşullar nedeniyle fonksiyonunu kaybeder. Kontrol mekanizmalarındaki bu fonksiyon kaybına, genellikle hücre çoğalmasını destekleyen (proliferasyon) sinyallerde patolojik artış ve hasarlı DNA parçalarının onarımında rol alan (tümör baskılayıcı) moleküler mekanizmalardaki patolojiler de eşlik eder. Böylece kanserli dokuda, kontrolsüz çoğalmanın yanı sıra “genetik kararsızlık” (genetik instabilite) olarak tarif edilen, mutasyonlara son derece açık ve genetik olarak dengesiz bir durum oluşur⁸⁷.

Kromozomal instabilite ise tüm kromozomda veya kromozomun bir parçasında normal hücrelere göre yüksek oranda katılım veya kayıp oluşmasıdır. Kromozomal instabilite, kanser hücrelerinin yaygın bir özelliğidir ve birçok hücrel mekanizma kanser hücrelerinde sayısal ve yapısal kromozomal instabiliteye neden olur. Uzun yıllar kromozomal instabilitenin kromozom kırıkları ile sınırlı olduğu düşünülmüştür. Son yıllarda DNA hasarına karşı geliştirilen birçok mekanizmadaki problemin kromozomal instabiliteyle ilişkili olabileceği üzerinde durulmaktadır. DNA hasarına cevapta oluşan hatalar ve DNA onarım mekanizmasındaki bozukluklar neoplastik transformasyona yol açabilecek genetik değişikliklere ve kromozomal instabiliteye sebep olabilir⁸⁸.

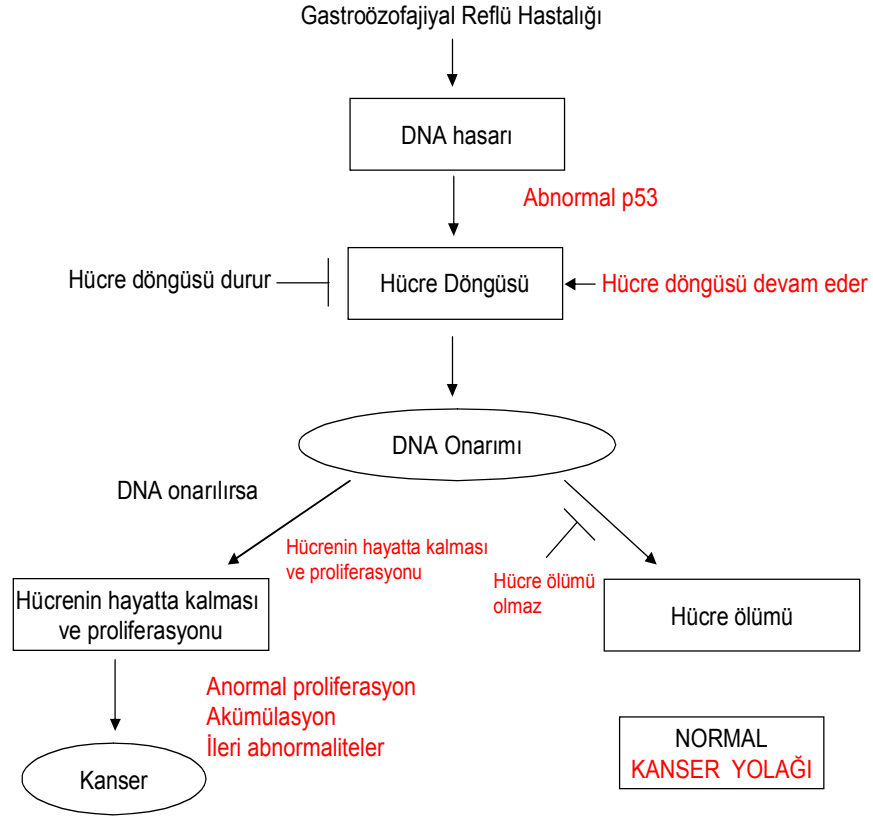
Barrett özofagus oluşumunda genetik ve/veya ailesel faktörlerin rol aldığını gösteren çalışmalar vardır. Ancak bu hastalığın tamamen genetik faktörlere bağlı olduğunu söylemek doğru olmaz. Çünkü Barrett özofagus gelişimde genetik/ epigenetik faktörleri, çevresel faktörleri ve kronik reflü etkisini birbirinden ayırmak zordur¹⁰.

Gastroözofageal reflünün, nonspesifik DNA hasarına yol açtığı düşünülmektedir. Mutajenezisi indükleyen en önemli gen değişiminin, daha önce de bahsedildiği gibi tümör baskılayıcı proteini kodlayan p53 geninde olduğu bilinmektedir. Reflünün DNA hasarını indüklemesi ve p53 geninin inaktivasyonu sonucunda, DNA onarımını ve apoptozu indükleyen hücre döngüsünün bozulması söz konusu olabilir³². p53 genindeki mutasyon dışında, proteomiks çalışmaları anterior gradient-2 adlı proteinin de p53 fonksiyonlarını azaltıcı yönde etkisinin olduğunu göstermiştir. Ayrıca düşük oksijen konsantrasyonu, düşük ekstrasellüler

pH ve termal hasar gibi çevresel faktörlerin de p53 proteininin inaktivasyonunda rol aldığı gösterilmiştir^{32,89}.

Barrett özofagus gelişiminde kromozomal instabilitenin rolü de karyotipleme ve in situ hibridizasyon yöntemleriyle araştırılmıştır. Displazik Barrett ve kanser olgularında en çok gözlenen sayısal anomalilik Y kromozomunun eksikliğidir. Özofageal adenokarsinoma vakalarında tümörlerin %31-93'ünde Y kromozomu eksikliğine rastlanmıştır. Bir çalışmada Barrett özofagusta displazi derecesi arttıkça Y kromozom kaybı görülme yüzdesinin de arttığı gözlenmiştir⁹⁰. Barrett özofagus ve adenokarsinoma en sık erkeklerde görülmesine rağmen, Y kromozomu ile ilişkili spesifik bir onko veya tümör baskılayıcı gen bildirilmemiştir. Muhtemelen, Barrett özofagusta malignite şiddetlendikçe Y kromozomu kaybı gözlenmektedir. Karyotipleme analizleri sonucunda özofageal adenokarsinomada 1p, 3q, 11p-13 ve 22p bölgelerinde yapısal anomalilik olduğu gözlenmiştir. Ayrıca Barrett özofagusta kromozom 5 ve 7 de trizomi, kromozom 3 ve 6 da translokasyon gözlenmiştir. Özofageal adenokarsinomada bildirilen sayısal aberasyonlardan bazıları da kromozom 4, 17, 18 ve 21'deki kayıplardır. Ayrıca premalignitenin tespit edildiği hastalarda, Barrett özofagus ve displazik bölgelerde 6, 7, 11 ve 12. kromozomlarda anozomi gözlenmiştir^{43,91}. Ayrıca Barrett özofagus gelişiminde ve özofageal adenokarsinoma sürecinde etkili olduğu düşünülen ve en sık rastlanan kromozomal instabiliteden biri de 4. ve 8. kromozomlarda görülen anöploididir. Bu aberasyonlar, premalign dönemde de gözlendiğinden, bu kromozomlardaki genlerin Barrett hastalığının başlamasını tetikleyen ve aynı zamanda kanser oluşumunu da indükleyen genler olabileceği düşünülmektedir⁹².

Barrett özofagus ile ilgili genomik instabilitede bir diğer mekanizma da epigenetik faktörlerdir. Epigenetik faktörler kanser oluşumunun erken aşamalarında meydana gelir ve hücrelerin çevresel veya yaşla ilgili faktörlere duyarlılığını arttırırlar. Bunlar DNA'nın hipometilasyonu veya hipermetilasyonu, histonlardaki değişiklikler gibi global değişiklikler olabilir. Barrett özofagusta çeşitli genlerdeki metilasyonda değişikliklerin olduğu belirlenmiştir. Bu erken epigenetik değişiklikler, reflü maruziyeti gibi kronik faktörlerden kaynaklanabilir⁹³.



Şekil 10: Barrett özofagusta genetik instabilite oluşumu³²

Barrett özofagus oluşumu üzerine ailesel etkinin olup olmadığı tam olarak açıklanamamıştır. Önceleri yapılan çalışmalar böyle bir ilişkiden bahsetmezken, son zamanlarda yapılan çalışmalar reflüde, Barrett özofagusta ve özofageal adenokarsinomada kalıtsal faktörlerin de rol oynayabileceğini göstermektedir. Yapılan bazı çalışmalar ailesinde Barrett özofagusu olan bireylerde, yanma belirtilerinin ve özofajitin olmayanlara göre daha sık görüldüğünü bildirmiştir. Chak ve arkadaşlarının yaptıkları geniş çaplı bir çalışmada, Barrett özofagus veya özofageal adenokarsinoma hastası olan bireylerin akrabalarında ve kontrol grubunda yine aynı hastalıkların görülme sıklığını araştırmışlardır. Çalışmada Barrett özofagus veya özofageal adenokarsinoma hastası olan 58 kişi ve ailesinde bu tip herhangi bir hastalığı olmayan 106 kişilik kontrol grubu ele alınmış ve çalışma grubunda ailesel Barret özofagus hikayesi kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur⁹⁴. Ailesel analizlerin bir kısmı da yine ikizlerde kalıtsal faktörlerin reflü oluşumunda %30 civarında etkili olduğunu göstermiştir. Ayrıca yapılan protein analizleri de Barrett özofagusun otozomal dominant kalıtım gösteren bir hastalık olabileceğini

göstermektedir. Son zamanlarda ise GÖR ve Barrett karsinogenesitesinde birkaç tane genetik göstergenin olduğunu belirten çalışmalar vardır^{7,10}.

Barrett özofagus hastalığının genetik faktörlerle ilişkisini ortaya koymak amacıyla 1998 yılında Ailesel Barrett Özofagus Konsorsiyumu kurulmuştur. Pek çok enstitünün yer aldığı bu konsorsiyumda çalışmalar halen devam etmektedir. Çalışmalar üç aşamalı olarak yürütülmekte ve birinci aşamada hastalarda GÖRH sıklığının tespiti, ikinci aşamada genetik faktörlerin ve aile etkisinin belirlenmesi, son aşamada ise ilgili genlerin tespit edilerek linkage analizlerin yapılması amaçlanmıştır. Çalışmalarda endoskopiye gelen veya yeni teşhis konan uzun segment Barrett özofagusu olan hastalar, önceden teşhisi olan veya yeni teşhis konan özofageal adenokarsinoma hastaları alınmaktadır. Bu hastalara, proband (ailede ilk kim hasta?) tespit edebilmek için detaylı bir Ailesel Barrett Özofagus Anketi yapılmaktadır. Bu ankette GÖRH semptomları, Barrett özofagus ve adenokarsinoma ile ilgili risk faktörleri ve ailesel öykü ile ilgili sorular yer almaktadır. Hastalar daha sonra ailesinde hastalık öyküsü olan ve olmayanlar olarak ayrılmakta ve ailesel öyküsü olanların birinci ve ikinci derece akrabalarından da proband alınmakta ve anket uygulanmaktadır⁹⁵. Şu ana kadar yapılan çalışmalar vakaların %7,3'ünde aile öyküsünün olduğunu göstermiştir⁹⁶.

2.5.1. Barrett Özofagus ve DNA Hasarı

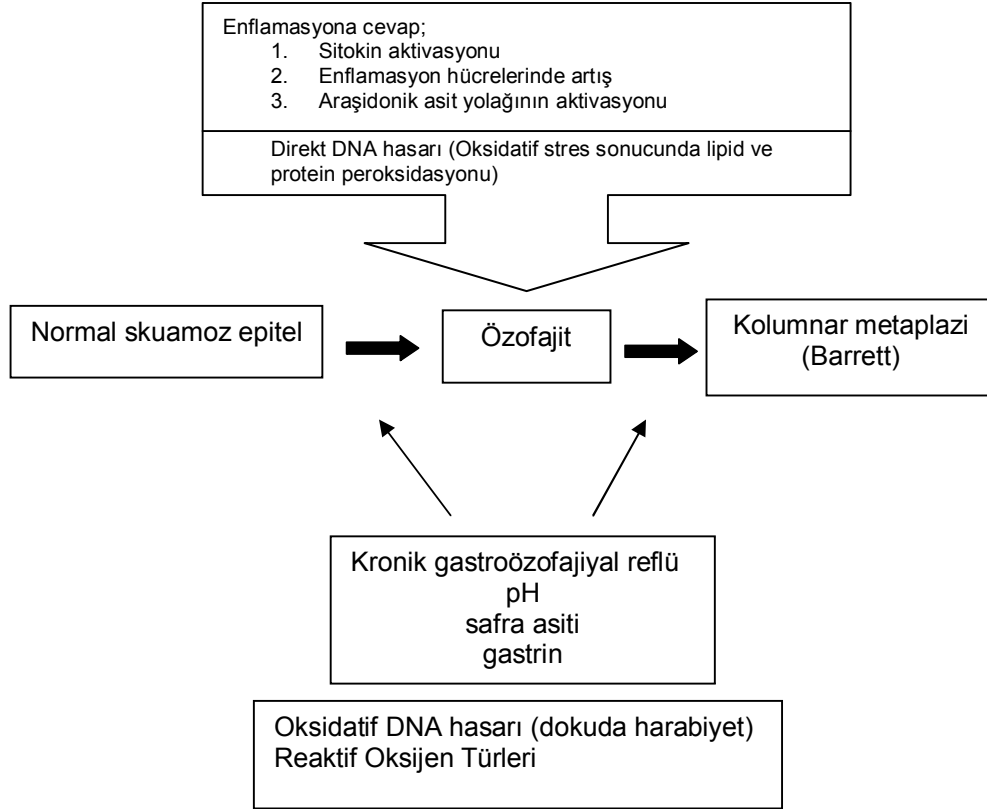
Barrett özofagus ve özofageal adenokarsinoma gelişiminde, pek çok çevresel ve genetik faktörler rol almaktadır. Bu faktörlerin etki mekanizmaları, genellikle direkt veya dolaylı olarak DNA hasarı ile ilgilidir. Özofajit ve Barrett özofagusun enflamasyon ile ilgili bir durum olduğu bilinmektedir. Enflamasyon ile ilgili olarak oluşan oksidatif stres ve serbest radikal oluşumu GÖRH, Barrett özofagus ve adenokarsinoma arasındaki ilişkinin belirlenmesinde önemlidir. Ayrıca asit ve safra tuzları ve buna bağlı olarak ortaya çıkan özofajit de reaktif oksijen türlerinin oluşumunu indükleyebilir, antioksidan kapasitesini tüketebilir ve oksidatif stres ile ilgili genlerin ekspresyonunu arttırabilir⁷. Özofageal epitel hücrelerinin gastrik ve safra asitlerine kronik maruziyeti sonucunda hasar görmesinin ardından hücreler, sitokin ve kemokinler gibi enflamasyon mediatörlerini salgılamaya başlarlar. Bu mediatörler de T lenfosit ve nötrofiller gibi enflamasyon hücrelerinin üretimini artmasına ve kappa B gibi çeşitli faktörlerin salgılanmasına neden olur⁴⁴. Tümör başlatıcı etkisi olduğu düşünülen üç tip enflamasyon mediatörü vardır: (1) Reaktif oksijen ve azot molekülleri; (2) sitokinler (3) prostaglandinler. Göstroözofageal reflü ve Barrett özofagus hastalarında yapılan bir çalışmada, özofageal dokularda reaktif oksijen türlerinin seviyesinin arttığı, kemiluminesans tekniği ile

gösterilmiştir⁹⁷. Benzer çalışmalar da yine özofajit ile reaktif oksijen türlerinin üretimi arasında pozitif korelasyon olduğunu göstermiştir. Özofageal epitelin uzun süre reaktif oksijen türlerine maruziyeti sonucunda oksidatif DNA hasarı ve mutasyonlar görülebilir⁹⁸.

Safra asitleri çok geniş bir pH aralığında özofageal hasara yol açabilirler ancak kronik hasar, asidin pKa'sına bağlıdır. Taurin ile konjuge olan safra asitleri özofageal reflü içeriğinin asidik olduğu durumda (pH 4), glisin ile konjuge safra asitleri pH'nın 4-6 olduğu durumlarda, konjuge olmamış safra asitleri de pH'nın alkali veya nötral olduğu koşullarda kronik mukozal hasara neden olurlar⁴⁵. Yapılan bazı çalışmalar Barrett özofagus hastalarında taurin ile konjuge ve konjuge olmamış safra asit miktarının az veya orta şiddette reflü hastası olanlara göre daha yüksek olduğunu göstermiştir⁹⁹. Safra asidi, sindirimde ve yağların barsaktan emiliminde önemli rol oynar. Ancak bazı çalışmalarda safra asidinin aynı zamanda potansiyel bir insan karsinojeni olduğu iddia edilmiştir. Ancak asit indüksiyonu sonucunda oluşan karsinogenesite ile ilgili herhangi bir mekanizma açıklanmamıştır. Özofageal kanser oluşumunda reflü sırasında safra asidine maruz kalındığı için, bu kanserin gelişiminde safra asitlerinin rolü olduğu düşünülmektedir. Barrett hastalarının çoğunda GÖR görülmekte ve reflü içeriğinin büyük bir kısmını da safra asitleri oluşturmaktadır. Ayrıca bu hastalarda çok daha fazla düzeyde hasara yol açabilen deoksikolik asit (DCA) gibi ikincil safra asitlerine de maruz kalmaktadırlar^{44,100}. Safra asidinin indüklediği karsinogenezis mekanizmasında muhtemelen safra asitleri, hücre membranını ve mitokondriyel membranı hasara uğratarak veya hücre fonksiyonlarına etki ederek rol oynamaktadır. Bu sitotoksite, hücre proliferasyonunu artırarak kansere yol açabilmektedir. Ayrıca safra asitleri düşük konsantrasyonlarda, protein kinaz C, c-myc, COX-2 ve NF-kappaB gibi hücre sinyali ile ilgili faktörleri stimüle ederek de karsinojenik etki gösterebilmektedir^{101,102}. Asidin indüklediği genotoksisite ile ilgili çalışmalarda ise çelişkiler vardır. Çalışmaların çoğunda özofageal hücrelerden çok hepatositler veya kolorektal hücreler kullanılmıştır¹⁰³. Mevcut olan çalışmalar hastadan alınan safra asitlerinin DNA hasarı yapabileceğini, sentetik safra asidinin ise kromozom hasarına ve tek sarmal DNA kırıklarına neden olabileceğini göstermiştir^{16,104}. Bunun tersine bazı çalışmalarda ise safra asidinin genotoksik olmadığı sadece kanser başlatıcı özellikte olduğu belirtilmiştir¹⁰⁵. Safra asidinin reaktif oksijen türü oluşumuna neden olarak oksidatif hasar yaptığı ve bu nedenle genotoksik olduğunu söyleyen ve bu durumun da mitokondriyel membran hasarı ve reaktif oksijen türlerinin sitozole salınması ile ilgili olduğunu belirten çalışmalar da vardır¹⁰⁶. Bu hipotez, safra asitlerinin direkt olarak değil de hücre ile ilgili mediatörler aracılığı ile DNA'da hasar oluşturduğu ile ilgili verileri desteklemektedir.

Ayrıca asidik pH'nın da direkt olarak reaktif oksijen türlerinin oluşumuna ve DNA hasarına yol açtığını gösteren çalışmalar da vardır. Dvorak ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışma, Barrett özofagus hastalarının özofageal mukozalarının, genellikle asidik pH'ya maruz kaldığını ($\text{pH} < 4$) ve bunun da reaktif oksijen türlerinin oluşmasına neden olduğunu göstermiştir¹⁴. Yine aynı çalışma grubunun yaptığı bir çalışmada ise düşük pH'nın yanı sıra ($\text{pH} < 4$) safra asitlerinin de etkisi incelenmiş ve immunokimyasal veriler, epitel hücrelerinde 8-hidroksi-deoksiguanozin varlığını göstermiştir¹⁵.

Barrett özofagus oluşumunda ve buna bağlı olarak adenokarsinoma gelişiminde enflamasyonun rolünün, çeşitli mekanizmalara bağlı olduğu düşünülmektedir. Bunlardan ilki, pek çok enflamasyon ile ilgili sitokinlerin ve büyümeyi düzenleyici faktörlerin metaplazi-displazi-karsinoma sürecinde artmasıdır. İkincisi ise nötrofillerin de yer aldığı enflamasyon hücrelerinin DNA ile etkileşebilecek reaktif oksijen türlerinin oluşmasına neden olmasıdır⁹⁸. Ayrıca reaktif oksijen türleri siklooksijenaz (COX-2) artışına neden olan bir seri reaksiyonu başlatabilir. COX-2 ve prostaglandinler (prostaglandin E_2 gibi) apoptozu engelleyerek, proliferasyonu ve anjiyogenezi artırarak kansere neden olabilir. Ayrıca gastrik asit ve safra asitleri, enflamasyonu kontrol eden araşidonik asit yolağını aktive edebilir. Safra asitleri gibi düşük pH da yine araşidonik asit yolağında önemli bir enzim olan COX-2 enziminin ekspresyonunu indükleyebilir⁴⁵. Daha önce de bahsedildiği gibi Barrett özofagusta COX-2 ekspresyonu, neoplazi gelişim sürecinde artar. Bu durum da araşidonik asit yolağı ile özofageal kanser gelişimi arasındaki bağlantıyı desteklemektedir. COX-2 araşidonik asidin, aralarında prostaglandin E_2 (PGE_2)'nin de bulunduğu çeşitli prostaglandinlere dönüşümünü katalize eder. PGE_2 , Barrett epitel hücrelerinin proliferasyonunu indükler ve bu da premalign Barrett hücrelerinde görülen replikasyonla ilgili hataların birikmesine neden olur. Ayrıca PGE_2 , doğal öldürücü hücre aktivitesini inhibe ederek tümör kontrol mekanizmasını bozabilir. Böylece PGE_2 'nin kronik indüksiyonu genomik olarak instabil olan abnormal hücrelerin birikmesine ve karsinogenezin başlamasına neden olabilir^{44,45}.



Şekil 11: Barrett özofagus gelişiminde DNA hasarının etkisi³³

2.6. Barrett Özofagus Gelişiminde Bireysel Duyarlılığın Önemi

Son yıllarda birçok çalışma genetik polimorfizmin kansere yakalanma riski ile ilişkisini araştırmakta, bazı bireylerin neden kansere daha yatkın olduğu sorusunun cevabını bulmaya çalışmaktadır. Bu çalışmalarda öncelik, ksenobiyotik metabolizmasında rol oynayan enzimlere verilmekte ancak bu çalışmaların istatistiksel güç kazanabilmesi için çok geniş popülasyonlarda sürdürülmesi gerekmektedir. Bu problem genellikle uluslararası işbirliği çalışmalarıyla aşmaya çalışılmaktadır. Çalışmalarda maruziyetin değerlendirilmesi veya erken dönem genotoksik etkilerin belirlenmesi amacıyla biyogöstergelerin uygulanması, duyarlılıkla ilgili sonuçları daha anlamlı hale getirecektir¹⁰⁷.

Son zamanlarda belirlenen genetik instabilitelerden biri de microsatellite instabilitedir (MSI). Microsatellite, yüksek derecede polimorfik, tekrarlanan DNA dizileridir. Normalde sayıları az olan bu tekrar dizilerinin sayısı, tümör hücreleri gibi bazı hücrelerde artmıştır. Bu durumun, DNA'daki yanlış eşleşme onarım sistemindeki bozukluk

nedeniyle (özellikle hMLH1 veya hMSH2 genleri), DNA'nın eşleşmesi sırasında oluşan hataların onarılamaması sonucunda birikmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Çeşitli çalışmalarda Barrett hastalarında MSI gözlenmiştir. Meltzer ve arkadaşları test ettikleri beş dinükleotid microsatellite tekrarların bir veya daha fazlasında MSI saptamışlar ve bu bozukluğa Barrett özofagus hastalarının %7'sinde, özofageal kanser hastalarının ise %22'sinde rastlamışlardır¹⁰⁸. Muzeau ve arkadaşları, Barrett adenokarsinomada inceledikleri 39 lokus için MSI'nin nadiren görüldüğünü bildirmiştir¹⁰⁹. Şu ana kadar yapılan çalışmaların büyük bir çoğunluğu MSI ile Barrett özofagus arasında pozitif yöndeki ilişkinin zayıf olduğunu veya hiç olmadığını göstermektedir. Bulunan pozitif ilişki de özellikle hMLH1 veya hMSH2 genleri ile ilgili kromozom lokuslarındadır^{110,111}. Barrett özofagus hastalarında DNA onarım genlerindeki polimorfizmler de incelenmiş ve özellikle yanlış eşleşme onarım sistemi, baz ekzisyon onarım sistemi ve nükleotid ekzisyon onarım sistemindeki genler polimorfizmleri yönünden ele alınmıştır. Baz ekzisyon onarım sisteminde sorumlu genlerden hOGG1 genindeki mutasyon sıklığını Barrett özofagus hastalarında belirlemek amacıyla yapılan bir çalışmada Barrett hastalarında LOH sıklığı (heterozigositenin kaybı) %34 olarak bulunmuştur¹⁷. Nükleotid ekzisyon onarım sisteminde rol alan genlerden XPD ve XPC genlerinin çeşitli varyasyonlarını (PAT, C22541A, A35931C) ve baz ekzisyon onarım sisteminden de XRCC1 (C26304T, G28152A) ve XRCC3 (C18067T) genlerindeki polimorfizmleri inceleyen çalışmalar mevcuttur¹⁸. Ancak DNA onarım genlerinin ve Barrett özofagus veya özofageal adenokarsinoma gelişimindeki rolü henüz tam olarak bilinmemektedir.

Şu ana kadar yapılan çalışmalar Barrett özofagus ve özofageal adenokarsinoma ile ilgili bazı genlerde çeşitli varyasyonlar olduğunu göstermiştir. Bu genlerden bazıları enflamasyon ile ilgilidir. Sitokinlerdeki polimorfizmlerin midede *Helicobacter pylori* enfeksiyonundaki enflamasyon cevabında rol oynadığını ve atropik gastrit ve adenokarsinoma riskini arttırdığını belirten çalışmalar vardır. Ayrıca sitokin profilinin özofajit, Barrett ve adenokarsinoma sürecinde farklılık gösterdiği ve en çok da interlökin 1 β pozisyonu (IL-1 β), interlökin-10 pozisyonu (IL-10) ve interlökin-4 pozisyonunda anlamlılık olduğu gözlenmiştir¹¹². Gough ve arkadaşları enflamasyona cevabı düzenleyen beş gendeki fonksiyonel polimorfizm sıklığını incelemişlerdir. 150 Barrett hastasında yaptıkları çalışmada interlökin 1 geninde rastlanan polimorfizmin özofajit hastalarına göre 3 kat, interlökin 10 polimorfizminin ise 2 kat daha fazla görüldüğünü bildirmişlerdir¹¹³.

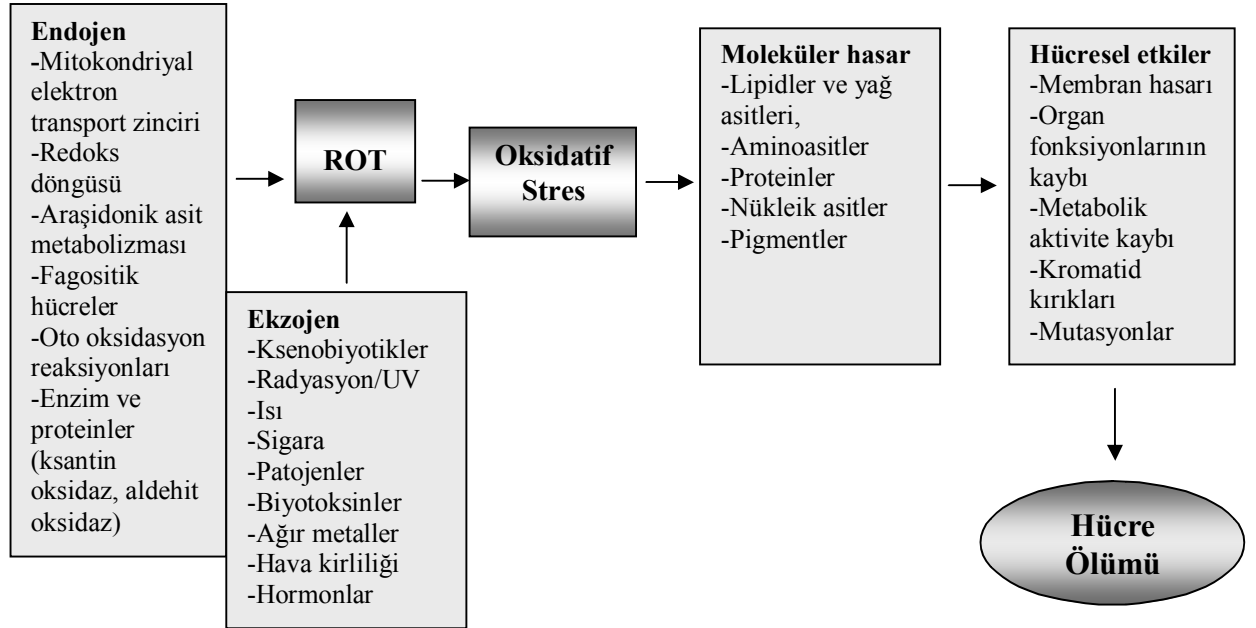
Kanserde mutasyonun en çok görüldüğü genlerden biri de p53 genidir. Daha önce de bahsedildiği gibi Barrett özofagus hastalığında

ve adenokarsinoma gelişiminde p53 genindeki mutasyonlar oldukça önemlidir. Çünkü bu gendeki mutasyonlar, apoptozun engellenmesine ve tümör gelişimine neden olabilmektedir. p53 genindeki mutasyon Barrett özofagus ve özofagus kanserinde, ilk kez 1991 yılında Casson ve arkadaşları tarafından belirlenmiştir¹⁹. Daha sonra yapılan çalışmaların pek çoğunda da bu ilişki doğrulanmıştır. Neshat ve arkadaşları da inceledikleri 12 Barrett özofagus hastasının 7'sinde p53 mutasyonuna rastlamıştır¹¹⁴. Başka bir grup da şu ana kadar yapılmış en geniş çalışmada (n=96) ise Barrett hastalarının %50.8'inde p53 mutasyonuna rastlanmıştır⁴⁷. Dolan ve arkadaşlarının 78 Barrett hastasında yaptıkları çalışmada, PCR-SSCP analizi ile p53 geninde ekzon 5-8'de olmak üzere toplam 15 mutasyon taranmış ve toplamda mutasyonların görülme sıklığı %33 olarak belirlenmiştir¹¹⁵. Murray ve arkadaşlarının yaptıkları güncel bir çalışmada da p53 ekspresyonundaki değişikliklerin Barrett özofagusta malignite gelişmesinde önemli bir gösterge olabileceği ancak bu ilişkinin zayıf olmasından dolayı diğer parametrelerin de dikkate alınması gerektiği belirtilmiştir¹¹⁶.

Faz II enzimlerinden GST'lerin de Barrett özofagustaki rolü çeşitli çalışmalarla araştırılmış ve çelişkili sonuçlar elde edilmiştir. Casson ve arkadaşları 125 Barrett hastası, 126 GÖR hastası ve 56 adenokarsinoma hastasında yaptıkları çalışmada GSTM1, GSTT1 ve GSTP1 genlerindeki polimorfizmler açısından kontrol grubuna göre anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir¹¹⁷. Murphy ve arkadaşları da benzer şekilde GSTP1, MnSOD ve GPX2 genleri için Barrett özofagusa bireysel yatkınlıkla ilgili pozitif yönde anlamlı bir ilişki saptamamışlardır²⁰. Başka bir çalışmada ise GSTP1 geni ve GST aktivitesi, Barrett özofagus riski ile anlamlı olarak ilişkilendirilmiştir¹¹⁸.

2.7. Reaktif Oksijen Türleri ve Oksidatif DNA Hasarı

Ortaklanmamış (eşleşmemiş) elektron içeren atom, atom grubu veya moleküller serbest radikal olarak tanımlanırlar. Serbest radikaller, pozitif yüklü (katyon), negatif yüklü (anyon) veya elektriksel olarak nötral olabilirler. Serbest radikaller, normal aerobik metabolizmanın devamı sırasında hücrelerde oksijen ve metabolitleri oluşurken ortaya çıkabildiği gibi, ısı, ışık, radyasyon ve kimyasallar gibi çeşitli dış kaynakların etkisiyle de ortaya çıkabilmektedir. Başlıca serbest radikal kaynakları, endojen ve ekzojen kaynaklar olarak incelenebilir ve bu faktörler şekil 12'de özetlenmiştir.



Şekil 12: Reaktif oksijen türlerinin oluşmasına neden olan başlıca faktörler ve biyolojik sonuçları¹¹⁹

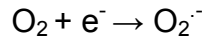
Serbest radikaller, kararsız ve çok reaktif moleküllerdir ve biyolojik olaylarda oldukça önemli görevleri vardır. Örneğin oksijen radikalleri hücre içi sinyal iletimi, gen transkripsiyonu gibi önemli biyolojik olaylarda rol oynarlar. Nitrik oksit (NO) de sinyal iletiminde görev alan çok önemli bir radikaldır ve vücutta hemen hemen tüm hüresel ve organ fonksiyonlarında rol alır. Ancak serbest radikaller, oksidanlar ve diğer reaktif ürünler gibi biyomoleküllerin (protein, amino asit, lipid, DNA) oksidasyonuna neden olurlar ki bu da hücrelerin hasarlanmasına ve ölümüne neden olur. Serbest radikallerin sitotoksik etkileri, memeli hücrelerinde pek çok kronik hastalığın patojenezinde önemlidir. Ancak serbest radikaller aynı zamanda immun sistemde makrofajların aktive olarak patojenlerin uzaklaştırılmasını sağlarlar. Dolayısıyla serbest radikaller fizyolojik seviyede biyolojik olarak çok önemli görevler üstlenirken, patolojik düzeylerde ise son derece zararlı ve sitotoksik aktivite gösterebilirler¹²⁰.

Serbest radikal tanımına göre moleküler oksijen (O_2), bir biradikal (diradikal) olarak değerlendirilir. Biradikal oksijen, radikal olmayan maddelerle yavaş reaksiyona girdiği halde diğer serbest radikallerle kolayca reaksiyona girer. Organizmada geçiş metallerini (Fe^{2+} ve Cu^+ gibi metaller) içeren enzimler vasıtasıyla moleküler oksijene tek elektronların

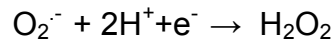
transferi ile oksidasyon reaksiyonları meydana gelir¹²¹. Moleküler oksijen, biradikal doğasının bir sonucu olarak yüksek derecede reaktif oksijen türleri (ROT) oluşturma eğilimindedir. Hücrede normal metabolik yollardaki enzimatik reaksiyonlarda enzimlerin aktif yerinde ara ürünler olarak devamlı şekilde serbest radikaller oluşabilir. Bazen bu serbest radikal ara ürünler enzimlerin aktif yerinden sızarlar, moleküler oksijenle kazara etkileşirler ve sonuçta ROT oluşur. Reaktif oksijen türleri superoksit (O_2^-), hidroksil ($OH^\cdot$), peroksil ($RO_2^\cdot$), alkoksil ($RO^\cdot$), ve hidroperoksil ($HO_2^\cdot$) gibi oksijen merkezli serbest radikallerdir. Nitrik oksit (NO) ve nitrojen dioksit ($NO_2^\cdot$) ise nitrojen serbest radikalleridir (reaktif nitrojen türleri; RNT). Ayrıca hidrojen peroksit (H_2O_2), hipokloröz asit (HOCl), hipobromöz asit (HOBr) ve peroksinitrit ($ONOO^-$) gibi diğer non radikal reaktif ürünler de hücredeki serbest veya proteine bağlı taşıyıcı metaller tarafından serbest radikallere dönüşebilirler¹²⁰. Aşağıda çeşitli reaksiyonlar sonucunda oluşan bazı radikaller ve non radikaller örnek olarak verilmiştir^{122,123}.

Singlet oksijen ($^1O_2$): Oksijenin redüksiyonu sonucu oluşur. Nitrik oksit ve hidrojen peroksitin etkileşmesiyle de oluşur. Güçlü bir oksidandır ve birçok moleküle etkileşir. Membran lipitlerine etki ederek peroksitleri oluşturur. Oluşan bu peroksitler alkoksil radikallerinin oluşumuna neden olurlar.

Süperoksit anyon radikali (O_2^-): Süperoksit radikali hemen tüm aerobik hücrelerde moleküler oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi sonucu oluşur. İndirgenmiş geçiş metallerinin otooksidasyonu süperoksit radikali meydana getirebilir. Süperoksit radikali kendisi direkt olarak zarar vermez. Bu radikal anyonun asıl önemi, hidrojen peroksit kaynağı olması ve geçiş metalleri iyonlarının indirgeyicisi olmasıdır.

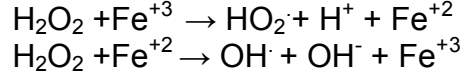


Hidrojen peroksit (H_2O_2): Süperoksit radikaline bir elektron eklenmesiyle oluşan H_2O_2 , güçlü bir oksidan ve sitotoksindir. H_2O_2 bir serbest radikal olmadığı halde reaktif oksijen türleri kapsamına girer ve serbest radikal biyokimyasında önemli bir rol oynar. Çünkü Fe veya diğer geçiş metallerinin varlığında en reaktif ve zarar verici serbest oksijen radikali olan hidroksil radikali oluşturur.



Hidroksil radikali ($OH^\cdot$): H_2O_2 , geçiş metallerinin (Fe^{+2} , Cu^{+2}) varlığında (Fenton reaksiyonu) hidroksil radikali oluşturur. Bu radikal, her molekülü okside edebilen en reaktif serbest radikaldir. $OH^\cdot$

radikali, DNA molekülünün tüm komponentleri ile reaksiyona girer. Ancak bu yüksek reaktivitesine karşın, yarı ömrünün kısa olması, OH[•] radikalinin hareketini dolayısıyla da toksisitesini sınırlandırır.



Nitrik oksit (NO): Lipit peroksil radikali (LOO[•]) ile etkileşerek onu inhibe eder. Ancak süperoksit varlığında çok güçlü oksidan olan peroksinitriti (ONOO⁻) oluşturur. ONOO⁻ direkt doku hasarına neden olabileceği gibi, parçalanıp hidroksil radikali ve nitrojen dioksit oluşturarak da etki gösterebilir.



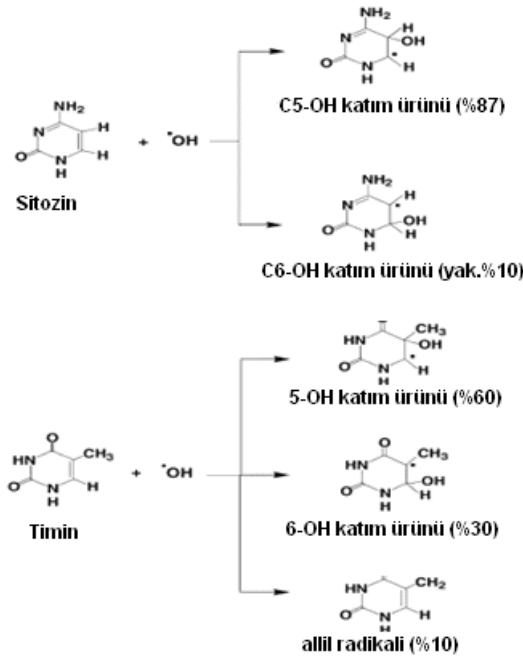
2.7.1 Oksidatif DNA Hasarı

Reaktif oksijen türleri, vücutta DNA, RNA, enzimler, proteinler ve membran geçirgenliğinden sorumlu fosfolipitler gibi temel biyolojik moleküllerin yapısal bütünlüğünü tehdit ederler ve fonksiyonlarında anomalilere neden olurlar. Özellikle mitokondriyel DNA, oksidatif hasara oldukça duyarlıdır^{121,124}. İnsan vücudunun her hücresinde DNA'nın günde 10³ kez oksidatif hasara maruz kaldığı öne sürülmektedir. Başta mitokondriyal elektron transportu olmak üzere ksenobiyotik metabolizması, fagositik aktivasyon, çeşitli sentez ve degradasyon reaksiyonlarında ROT oluşmakta ve prooksidan/antioksidan dengenin prooksidanlar lehine kayması sonucunda gelişen *oksidatif stres*, çeşitli mekanizmalar ile DNA'ya hasar vermektedir¹²⁵. DNA'da ROT tarafından oluşan oksidatif hasar, yaşlanma, kanser, kardiyovasküler hastalıklar gibi doku fonksiyonlarının bozulması ile ortaya çıkan hastalıkların başlıca nedeni ve göstergesi olarak görülmektedir. Serbest oksijen radikalleri, DNA'da oksitlenmiş bazlar, abazik bölgeler, DNA sarmal kırıkları, DNA ve protein arasında çapraz bağlanma gibi çeşitli lezyonları oluştururlar. Bu lezyonlar direkt olarak oluşabildiği gibi, DNA onarımı sırasında da meydana gelebilir. Hücre ve dokularda oksidatif hasara uğramış, birçok purin ve pirimidin lezyonunun tespiti ve miktar analizi yapılmıştır¹²⁶.

Serbest radikaller, özellikle de OH[•], organik bileşiklerle katma ve çıkarma reaksiyonları ile etkileşirler. Hidroksil radikali, DNA çift sarmalına katılarak DNA bazlarından ve şeker molekülündeki C-H bağlarından H atomunun çıkmasına neden olur. Bundan sonraki reaksiyonlar DNA bazlarının karbon veya azot merkezli radikalleri

üzerinden ve şeker kalıntısının karbon merkezli radikalleri üzerinden yürür ve modifiye olmuş şeker ve bazlar, abazik bölgeler, sarmal kırıkları ve DNA-protein çapraz bağlanmaları gibi çeşitli ürünler meydana gelir. Oksidatif baz hasarları genellikle mutasyonlarla sonuçlanırken, deoksiriboz şekerinin hasarı baz çıkarmı veya DNA sarmal kırıkları ile sonuçlanır¹²⁷.

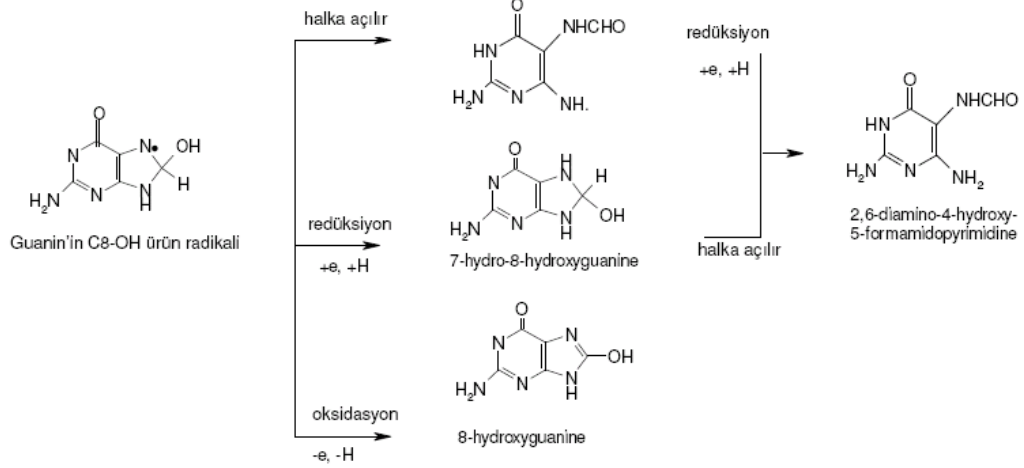
DNA baz hasarları: Hidroksil radikali dört bazdan farklı pek çok ürün oluşmasına neden olurken, singlet oksijen genellikle guanin bazının 8-hidroksiline neden olur. Hidroksil radikali pirimidin (timin ve sitozin) ve purin (adenin, guanin) bazları ile etkileşir. Bu etkileşmenin pozisyonu moleküldeki elektron yoğunluğu ile ilgilidir ve hidroksil radikali en fazla elektron yoğunluğu olan bölgeyi tercih eder. Sitozin bazında katım genellikle C5 (%87) ve seyrek olarak da C6 üzerinden (%10) gerçekleşir. Timin bazında ise katım ürünlerinin %60'ı C5, %30'u C6 üzerinden %10'u da metil grubundan H çıkması sonucu meydana gelir (şekil 13)¹²⁷.



Şekil 13: Pirimidin bazlarının OH radikali ile oluşturdukları katım ürünleri

Purin bazlarında ise hidroksil radikalinin eklenmesiyle C4-OH-, C5-OH-, ve C8-OH- katım ürünleri meydana gelir. C4-OH- ve C5-OH- katım ürünleri sonra dehidrasyona uğrar ve okside olmuş purin radikallerinin ($-\text{H}$) oluşmasına neden olurlar. C8-OH- radikali ise oksidasyon ve redüksiyon sonucunda sırasıyla 8-hidroksipurinleri ve formamidopurinleri oluştururlar. Bunun sonucunda guanin bazında 8-

hidroksiguanin (8-OH-Gua veya 8-oxo-Gua) ve 2,6-diamono-4-hidroksi-5-formamidopirimidin (FapyGua) oluşur (Şekil 14). Adenin bazında da benzer reaksiyonlar sonucunda 8-hidroksiadenin (8-OH-Ade) ve 4,6-diamino-5-formamidopirimidin (FapyAde) oluşur^{123,126}.



Şekil 14: C8-OH ürün radikalinden, guanin son ürünlerinin oluşumu

DNA bazlarında pek çok farklı oksidatif hasar ürünleri tanımlanmış olmasına rağmen, guanin türevi olan 8-OH-Gua ve onun deoksinükleozit formu olan 8-hidroksi-2-deoksiguanozin (8-OHdG) en sık karşılaşılan ve mutajenitesi en iyi bilinendir. Bu lezyon, DNA replikasyonu sırasında GC'den AT'ye dönüşüme neden olarak mutasyona eğilimi artırır. Bu nedenle 8-OH-Gua ve 8-OHdG ölçümü, DNA'daki oksidatif hasarın biyogöstergesi olarak kabul edilmektedir¹²⁸.

DNA şeker hasarları: Hidroksil radikali DNA'daki şeker molekülünün her bir karbon atomundan, H atomunun çıkarılmasına neden olur. Karbon merkezli bu radikaller daha sonraki reaksiyonlar sonucunda çeşitli şeker ürünlerinin, DNA sarmal kırıklarının veya abazik bölgelerin oluşmasına neden olurlar. Bazı şeker ürünleri DNA'dan modifiye olmuş serbest ürünler olarak ayrılırken, bazıları da DNA'nın yapısında kalır veya kırık DNA sarmallarının uçlarına eklenirler^{126, 127}.

DNA-protein çapraz bağları da serbest radikallere bağlı reaksiyonlar sonucunda meydana gelir. Örneğin Timin-tirozin çapraz bağının hem in vitro ortamda hem de memeli kromatininde serbest radikallere maruziyet sonucunda meydana geldiği gösterilmiştir. Bu hasarın büyük ihtimalle timinin allil radikalının, tirozin halkasının C3

pozisyonuna bağlanması ve oksidasyonu sonucunda oluştuğu düşünülmektedir¹²⁶.

Oksidatif stresle oluşan hastalıklar başlıca, antioksidanların azalması (örneğin mutasyonlar antioksidan savunma enzimlerine-Süperoksit dismutaz, Glutasyon peroksidaz gibi-etki edebilir) ve/veya artmış ROT/RNT üretimi veya ROT/RNT üreten doğal sistemlerin aşırı aktivasyonu (örneğin kronik enflamatuvar hastalıklarda fagositik hücrelerin uygunsuz aktivasyonu) sonucunda tetiklenebilir. Oksidatif stres sonucunda oluşan hastalıklar, genellikle kronik enflamasyon kaynaklıdır ve bunlar kalıtsal olabileceği gibi sonradan kazanılan viral, bakteriyel, parazitik enfeksiyonlar veya kimyasal indüksiyonlar sonucunda da oluşabilirler. Kanser de genellikle artmış oksidatif stresin sonucu olabildiği gibi, yine oksidatif stresin indüklediği prekanseröz hastalıkların da bir sonucu olabilir^{129,130}. Bu gibi hastalıklara ve oluşabilecek kanser türlerine ait örnekler tablo 1’de verilmiştir.

Tablo 1: Oksidatif strese bağlı olarak gelişebilecek hastalıklar ve ilgili kanser türlerine örnekler¹²⁹

Hastalık	Kanser	Risk*
<i>Kalıtsal</i>		
Hemokromatozis	Akciğer	219
Crohn’s hastalığı	Kolon	3
Ülseratif kolit	Kolon	6
<i>Viral</i>		
Viral hepatit B	Karaciğer	88
Viral hepatit C	Karaciğer	30
Human papilloma virüs	Serviks	16
<i>Bakteriyel</i>		
Helikobakter pilori	Gastrik	10
Üriner mesane katerizasyonu	Mesane	5-28
Prostatitis	Prostat	2
<i>Parazitik</i>		
Schistosoma hematobium	Mesane	2-14
Schistosoma japonicum	Kolon	1,2-6,0
<i>Kimyasal/fiziksel</i>		
Barrett özofagus	Özofageal	50-100
Pankreatitis	Pankreas	2-3

*Rölatif risk veya OR

2.7.2. Oksidatif DNA Hasarının Modifiye Comet Yöntemi ile Ölçümü

Oksidanlara maruziyet sonucunda oluşan oksidatif stresin ve buna karşı koruyucu bir sistem olan antioksidan aktivitenin fonksiyonel biyogöstergeleri ile ilgili pek çok çalışma vardır. Bu biyogöstergelerin standardizasyonu ve güvenilirliklerini tartışan araştırmalar da her geçen gün artmaktadır¹³¹.

Oksidatif stres ile ilgili biyogöstergeleri temel olarak üç grupta toplamak mümkündür: Bu biyogöstergelere örnekler aşağıda verilmiştir¹³².

- 1) *Lipit peroksidasyon biyogöstergeleri*: Tiyoarbitürik asit-reaktif bileşenleri (Tiyoarbitürik asit-Malondialdehit bileşiği=TBA-MDA gibi), nefesteki hidrokarbonların ölçümü, LDL ölçümü, F₂ isoprostan ölçümü (PGF_{2α}) gibi.
- 2) *Protein oksidasyon biyogöstergeleri*: Protein karbonillerin kolorimetrik veya ELISA yöntemi ile ölçülmesi gibi
- 3) *DNA oksidasyon biyogöstergeleri*:
 - Kromatografik yöntemler (GC-MS/MS, HPLC-ECD, LC-MS/MS): Okside olmuş purin ve pirimidin bazlarının tayini
 - Comet yöntemi: Tek sarmal DNA kırıkları, okside olmuş purin ve pirimidin bazlarının tayini
 - Slot-blot analizleri: Apurinik/apirimidinik bölgeler, okside olmuş purin ve pirimidin bazlarının tayini
 - İmmunohistokimyasal: 8-okso-dG

DNA oksidasyonunun biyogöstergesi olarak en sıklıkla 8-OHG ve onun 2-deoksinükleozid türevi olan 8-hidroksi-2-deoksiguanozin (8-OHdG) ölçülmektedir. 8-OHdG, DNA örneklerinde ve idrarda ölçülebilmektedir. DNA örneklerinde ölçüm için HPLC/ECD ve GC/MS ve ELISA en çok kullanılan yöntemlerdir. 8-OHdG'nin idrarda ölçümü ise bazı kısıtlamalar olmasında karşın en çok tercih edilen ve invaziv olmayan yöntemdir. Bunun için de yine en çok HPLC/ECD, GC/MS yöntemleri tercih edilmektedir. Kromatografik yöntemlerin en büyük dezavantajı deney prosedürü ve DNA izolasyonu sırasında fazladan oksidasyonunun gözlenmesidir. Bu nedenle son zamanlarda DNA izolasyonunun gerekmediği Comet yöntemi gibi enzimatik yöntemler gündeme gelmiştir^{132, 133}.

Tek hücre jel elektroforezi (Single Cell gel Electrophoresis, SCGE) veya Comet Yöntemi, DNA hasarını ölçmek ve analiz etmek amacıyla kullanılan, hızlı, basit, duyarlı ve yaygın kullanım alanına sahip bir yöntemdir. İlk kez 1988 yılında Singh ve arkadaşları tarafından kurulmuştur. Bu yöntemde temel prensip, hücrelerin izole edildikten sonra agar içine gömülerek mikroskobik lamlara yayılması ve lize edilmesi (DNA'nın çıplak hale getirilmesi), sonra da elektroforeze bırakılıp floresan boya ile boyanmak suretiyle değerlendirilmesidir. Artan DNA hasarı sonucunda hücrenin kromozomal DNA'sı, hücre çekirdeğinden elektroforezin anoduna doğru hareket ederek, kuyruklu yıldız benzeri şekil oluşturur. En fazla kullanılan alkali elektroforezde, tek sarmal DNA kırıkları ve alkali pH'da sarmal kırıklarına dönüşen lezyonlar (alkali-labile bölgeler) belirgin hale gelir. Sürüklenen DNA miktarı da hücredeki DNA hasarının düzeyini gösterir. Comet yönteminde DNA hasarının kantitatif olarak tayin edilmesinde gözle sınıflandırmanın yanında kuyruk uzunluğu (tail length=TL), kuyruk momenti (tail moment=TM) ve kuyruktaki DNA yüzdesi (%tail DNA=%TD) en yaygın kullanılan parametrelerdir. Kuyruktaki DNA yüzdesinin belirlenmesi diğer parametrelere göre doz cevap ilişkisini daha iyi yansıtmaması nedeniyle tercih edilmektedir^{134,135}. Comet yöntemi günümüzde sıklıkla genotoksik etkinin biyogöstergesi olarak pek çok maruziyetin incelenmesinde kullanılmaktadır¹³⁶.

Comet yöntemi, Collins ve arkadaşları tarafından 1993 yılında oksidatif DNA hasarının tayini amacıyla modifiye edilmiştir. Bu amaçla normal comet protokolüne bir basamak daha eklenmiş ve hücreler lize edildikten sonra spesifik endonükleazlar ile muamele edilmiştir. Hücreler, okside olmuş pürin bazlarının (özellikle 8-OHG, FapyA, FapyG) tayini için formamidopirimidin DNA glikozilaz (Fpg) enzimi ile, okside olmuş pirimidin bazlarının tayini için ise Endonükleaz III (Endo III) enzimi ile muamele edilmiştir¹³⁷. Bu DNA onarım enzimleri okside olmuş hasarlı bazı tanıyarak o bölgede sarmal kırığı oluşumuna neden olduklarından modifiye comet yöntemiyle tayin edilen ekstra sarmal kırıkları, oksidatif DNA hasarı için bir biyogösterge olarak değerlendirilmektedir. Bu yöntem klasik comet yöntemine göre daha spesifik ve duyarlı olarak kabul edilmektedir. Modifiye comet yönteminde en çok Fpg ve Endo III enzimleri kullanılsa da Endonükleaz IV, siklobütan pirimidin dimerlerinin, Alk A ise 3-metiladeninlerin tayininde kullanılabilmektedir¹³⁸.

2.8. Antioksidan Savunma Mekanizmaları ve Glutasyon

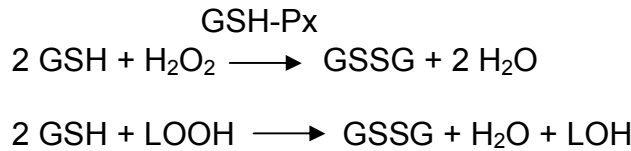
Antioksidanlar, serbest radikaller ve diğer oksidatif stres yapan ajanlarla reaksiyona girerek hücrelere zarar vermelerini önleyen endojen veya ekzojen kaynaklı maddelerdir. Hücrelerin, oksijen

radikallerinin üretilmesi veya bertaraf edilmesi arasındaki dengeyi kontrol edebilmesi için antioksidan sistemleri mevcuttur. Antioksidan sistemleri temel olarak üç gruba ayırmak mümkündür. Bunlar antioksidan enzimler, endojen enzimatik olmayan antioksidanlar ve ekzojen antioksidan moleküllerdir. Genellikle hücresel antioksidan enzimler süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve glutatyon S-transferaz (GST) dir. SOD ve CAT sırasıyla süperoksit anyonunu ve H₂O₂'i uzaklaştırmaktadır. GSH-Px redükte glutatyonu (GSH) kullanarak hidrojen peroksidi redüklemektedir. Son olarak GST, GSH ile ksenobiyotik konjugasyonunu sağlar ve bu ksenobiyotikler için genel metabolik mekanizmadır. Başlıca enzimatik olmayan antioksidanlar GSH, ürik asit ve metal bağlayıcı proteinlerdir. Ekzojen antioksidan moleküller için de β-karoten, vitamin A, C ve E örnek olarak verilebilir¹³⁹.

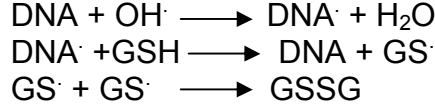
Glutatyon (γ-glutamilsisteinilglisin, GSH):

GSH, serbest tiyol grubu (-SH) içeren antioksidan, antitoksin ve enzim kofaktörü olan ve glisin-sistein-glutamattan oluşan bir tripeptittir. Memeli hücrelerinde özellikle de karaciğerde yüksek konsantrasyonda bulunmaktadır. GSH, başlıca karaciğerde ve daha az miktarlarda da diğer organlarda sırasıyla γ-glutamilsistein sentetaz ve GSH sentetaz enzim reaksiyonları sonucunda sentezlenir. GSH vücutta, protein sentezi, amino asitlerin transmembran transportu, hücre membran bütünlüğünün korunması, immun yanıtın düzenlenmesi, lökotrien ve prostaglandin metabolizmasının düzenlenmesi, enzimleri aktif halde tutmak, reseptör etkisi, metabolizma aracı, radyasyon ve endotoksinlerden koruma ve hücre gelişimi gibi birçok biyolojik aktivitede rol oynar¹⁴⁰.

GSH enzimatik (GSH-Px) veya enzimatik olmayan yollarla serbest radikalleri ve ROT'lerini (hidroksil, lipid peroksil, peroksinitrit, H₂O₂ gibi) yakalayarak uzaklaştırır¹⁴¹.

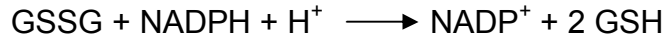


GSH, glutatyon peroksidazlar tarafından kullanılmasına ek olarak oksidatif DNA lezyonlarının doğrudan onarımında yer alır. Hidrojen vererek hasarlı DNA'yı onarır¹⁴¹.



GSH, diğer oksitlenmiş antioksidanların da (α -tokoferol, askorbat) geri dönüşümünde önemli rol oynar. GSH transhidrogenaz gibi enzimler, dehidroaskorbatları askorbata, çeşitli disüflitleri tiyollere geri çevirmekte GSH'ı kofaktör olarak kullanırlar. Ayrıca civa ve bakır gibi metal iyonlar, tiyol gruplarına yüksek afinite gösterirler. GSH, bu metaller ile etkileşir ve kompleks oluşturarak hücreleri metal toksitesine karşı korur.

Bu reaksiyonlarda GSH okside formu olan GSSG (glutatyon disüflit)'ye dönüşür. GSSG daha sonra glutatyon redüktaz ile tekrar GSH'a indirgenir. Bu reaksiyon sayesinde hücrelerde yüksek GSH/GSSG oranının ideal düzeyde kalması sağlanır. NADPH glukozdan sağlanır¹⁴¹.



Bütün bu oksidatif ataklar sonucu mitokondriyal GSH tükenebilir. Düşük GSH seviyesi oksidatif stresin arttığını gösterir. Oksidatif stres GSH'ı tüketir ve bunun sonucunda GSSG hücre dışına taşınır. GSSG/GSH dengesi çok önemlidir ve oksidatif stresin hassas bir göstergesidir¹⁴².

GSH tüketilmesi ile oluşan oksidatif stres ve doku hasarının nedeni; toksik kimyasallara yüksek oranda maruziyet, oksidanlara ve ROT oluşturan maddelere aşırı maruziyet ve GSH sentezi için gerekli sülfürlü amino asitlerin diyetle eksikliği veya açlık nedeniyle NADPH eksikliği ile GSSG'in GSH'a yeterli miktarda geri çevrilememesidir. Total GSH seviyesinin %20-30 kaybı, hücrelerin ROT toksik etkilerine karşı savunma sistemini bozar ve hücrelerde hasar oluşmasına neden olur¹⁴³.

Ayrıca pek çok hastalıkta dokularda GSH konsantrasyonun düşük olduğu belirlenmiştir. Astım, kronik obstrüktif pulmoner hastalık, idiopatik pulmonar fibrozis, neonatal akciğer hastalığı gibi pek çok akciğer hastalığında, siroz gibi karaciğer hastalıklarında, Parkinson, Alzheimer hastalığı gibi santral sinir sistemi hastalıklarında, özellikle iyi kontrol

edilmemiş Diabetes Mellitusda GSH konsantrasyonlarının azaldığı bildirilmiştir^{141,143}.

GSH ve/veya GSSG ölçümü hücre içindeki redoks durumu ile ilgili bilgi vermesi açısından oksidatif stresin tahmininde bir biyogösterge olarak kullanılmaktadır. GSH, enzimatik ve enzimatik olmayan değişik yöntemlerle ölçülebilir. Spektrofotometrik analiz yöntemi ilk kez Ellman tarafından geliştirilmiş ve reaktif olarak 5,5'-dithio-bis (2-nitrobenzoik asit) (DTNB) kullanılmıştır. Beutler ve arkadaşları ise bu yöntemi kan GSH düzeyinin tayini için geliştirmiştir¹⁴⁴. Bu yöntemle göre DTNB'i sülfür bileşiklerine ilave edince kalıcı sarı renk verir ve bu da optik dansite 412 nanometre'de spektrofotometrik olarak ölçülür. Renk gelişimi çoğaltılabilir olduğundan GSH standardına gerek yoktur. Bu yöntem daha da geliştirilmiş ve sülfosalisilik asit disodyum EDTA ile homojenize edilip, santrifüj edilerek proteinden arındırıldıktan sonra DTNB ilave edilerek reaksiyondaki sarı renk spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. GSH ölçümünde kullanılan diğer analitik yöntemler ise HPLC, kapiller elektroforez, nuclear manyetik rezonans ve kütle spektrometrisidir.

2.9. GSTM1 Geni ve Polimorfizmi

GSH, elektrofilik özellikteki ksenobiyotikleri (epoksit türevleri) konjuge eden detoksifikasyon mekanizmasında rol alan bir moleküldür. GSH molekülündeki sülfidril (-SH) grubu güçlü bir nükleofilik grup gibi hareket eder ve ksenobiyotiklerin elektrofilik merkezlerine bağlanarak onları nötralize eder. Bu reaksiyonlar, ksenobiyotik metabolizasyon reaksiyonlarında Faz II konjugasyon reaksiyonları sınıfına girer. GSH ile konjugasyon genellikle tüm türlerde ve memelilerin pek çok organında bulunan geniş bir izoenzim grubu olan Glutasyon S-transferaz (GST) enzimi tarafından katalizlenir. Bu enzimler alifatik aromatik heterosiklik radikallerin, epoksitlerin, aren oksitlerin GSH ile konjugasyonunu (katımını) katalize ederler. Bu katalizasyon, bileşiklerin elektrofilik merkezleriyle GSH molekülünün -SH grubu üzerinden gerçekleşir. İlk önce GSH'ın peptit bağlarının hidrolizi ile molekülden glisinil ve glutamil rezüdülerinin kopması sonucu sistein konjugatı meydana gelir. Sistein konjugatı da, N-asetil transferaz enzimi aracılığıyla amino grubunun asetillenmesiyle son metaboliti olan merkaptürik asit türevine dönüşür. Oluşan merkaptürik asit suda çözünen bir bileşiktir ve idrarla atılır¹⁴⁵.

Glutasyon S-transferazlar (GST'lar), kompleks ve geniş bir enzim ailesidir ve aminoasit/nükleotit dizilimine ve yapısal özelliklerine göre pek çok alt sınıfa ayrılmıştır. İnsanlarda GST enzimlerini kodlayan gen bir

izozim ailesidir ve başlıca sekiz alt gruba ayrılmıştır. Bunlar alfa (A), mu (M), pi (P), sigma (S), teta (T), kappa (K), zeta (Z) ve omega (O)'dır¹⁴⁶.

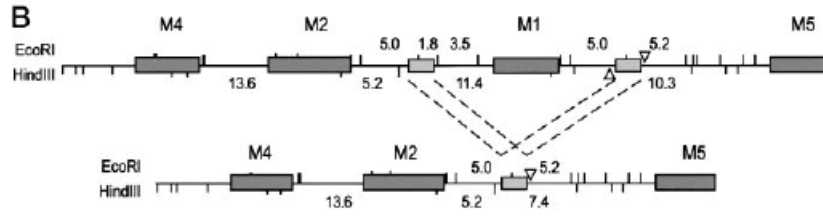
Tablo 2: Glutasyon S-transferazların sınıflandırılması¹⁴⁶

	GST geni							
	Alfa	Mu	Theta	Pi	Zeta	Sigma	Kappa	Omega
Kromozom	6p	1p	22q	11q	14q	4q	-	10q
Genler	A1-A4	M1-M5	T1,T2	P1	Z1	S1	K1	O1
Polimorfik	+	+	+	+	+	?	?	?

GST'lerin aktivasyonu karsinojen moleküllerin detoksifikasyonunda oldukça önemlidir. GST genlerindeki yapısal ve fonksiyonel değişiklikler, ekspresyonlarındaki azalma/farklılaşmalar veya polimorfizmler, hücrenin karsinojenleri ve mutajenleri inaktive etme kabiliyetini azaltabilir veya yok edebilir. Bu durum da karsinojenik etkinin oluşmasında temel mekanizmalardan biridir¹⁴⁷.

Mu sınıfındaki 5 gen (5'-GSTM4-GSTM2-GSTM1-GSTM5-GSTM3-3') şeklinde kromozom 1p kolunda yer almaktadır. GSTM1 geninde polimorfizmler tanımlanmıştır ve GSTM1*0, GSTM1*A ve GSTM1*B kombinasyonları sonucunda oluşan genotipler ve bunların klinik sonuçları da araştırılmıştır. GSTM1*0 genotipi delesyonu, yani gen yoksunluğunu ifade eder ve bu da protein ekspresyonunun olmadığı anlamına gelir [GSTM1 null genotipi=GSTM1(-)]. Şekil 15'de ilgili kromozom üzerinde bu delesyonun yeri gösterilmektedir. GSTM1 null genotip frekansı, beyaz Avrupa ırkında 0,38-0,67, Doğu Asya'da 0,33-0,63, Afrika-Afrika Amerikalılar'da 0,22-0,35 arasında değişmektedir¹⁴⁷. Türkiye'de ise bu oran 0,35-0,52 arasında değişmektedir^{148,149,150}. GSTM1*A ve GSTM1*B ise ekzon 7'de bir baz ile farklılık gösterirler ve bu alellerin kodladığı enzim aktivitesinin benzer olduğu gösterilmiştir¹⁴⁶.

GSTM1 genindeki delesyon, özellikle kanser ile ilgili moleküler epidemiyoloji çalışmalarında oldukça önemlidir. Çünkü popülasyon a) Potansiyel karsinojenleri detoksifiye edebilen grup ve b) Potansiyel karsinojenleri detoksifiye edemeyen grup olarak çok iyi tanımlanabilen iki gruba ayrılabilir.



Şekil 15: GSTM1 geninin delesyonu¹⁵¹

GSTM1 null genotipi ve kanser arasındaki ilişki en çok mesane kanseri, ve akciğer kanseri arasında gösterilmiştir. Ayrıca meme, özofagus, baş-boyun, kolon, larinks kanseri gibi kanser türleriyle ilişkilendirilen çalışmalar da vardır^{149,152-157}.

GSTM1 geninin karsinogenezisteki rolü ile ilgili olan hipotez, ciddi somatik değişikliklerin genellikle GSTM1 null olan bireylerde daha sık gözlemlendiğini iddia etmektedir. Bu somatik değişiklikler ksenobiyotiklerin karsinogenik etkilerine duyarlılığın göstergesi olabilmektedir. Somatik genetik hasarın ölçülmesi, karsinogenik bileşiklere maruziyeti (maruziyetin biyogöstergesi) veya bu bileşiklerin karsinogenezis yolağındaki erken etkileri (etkinin biyogöstergesi) gösterebilmektedir. Bu hipotezi inceleyen çalışmalar DNA hasarı ve GSTM1 polimorfizmi arasındaki ilişkiyi ortaya koymayı amaçlamaktadır¹⁴⁷. Tablo 3'de bu tür çalışmalara örnekler verilmiştir.

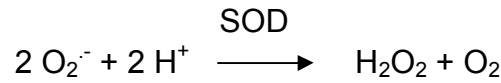
Tablo 3: GSTM1 polimorfizmi ve maruziyetin/etkinin biyogöstergeleri arasındaki ilişkiyi inceleyen çalışmalara örnekler

Biyogösterge	Örnek	GSTM1 polimorfizmi ile ilişki	Kaynak
PAH DNA katım ürünleri	Akciğer doku örneği (n=90)	Var	158
	Sigara	Var	159
Kromozomal Aberasyon	Benzene maruz işçiler (n=82)	Var	160
	1,2:3,4-diepoksibutan	Yok	161
	Sigara (n=72)	Var	162
	X-ray indüksiyonu	Var	163
	Bleomisin indüksiyonu	Yok	164
Kardeş Kromatid Değişimi (SCE)	Stiren	Var	165
	1,2:3,4-diepoksibutan	Yok	161
Mikroçekirdek (MN)	1,2:3,4-diepoksibutan	Yok	161
	Sigara (n=72)	Var	162
Comet Yöntemi (DNA sarmal kırıkları- oksidatif DNA hasarı)	Kömür fırını işçileri	Yok	166
	Stiren	Var	167
	Bleomisin indüksiyonu	Yok	164

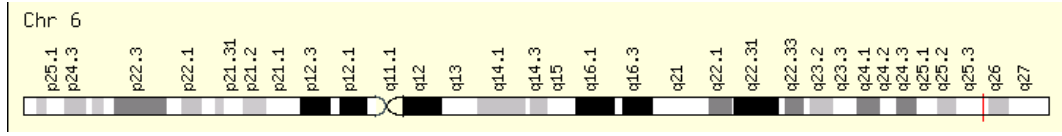
*var: DNA hasarı/katım ürünleri GSTM1 (-) bireylerde anlamlı derecede yüksek

2.10. MnSOD Geni ve Ala16Val Polimorfizmi

Süperoksit dismutaz (SOD), süperoksit radikalının H_2O_2 ve oksijene dismutasyonunu katalizleyen ve hemen hemen bütün aerobik organizmalarda bulunan bir enzimdir. Oluşan H_2O_2 ise glutatyon peroksidaz veya katalaz tarafından uzaklaştırılır.



İnsanlarda SOD'un üç formu bulunmaktadır. SOD1 sitoplazmada, SOD2 mitokondride, SOD3 ise ekstrasellüler sıvıda yer alır. SOD1 ve SOD3 kofaktör olarak bakır ve çinkoyu kullanırken SOD2 mangany kullanır. SOD enzimini kodlayan genler sırasıyla 21, 6, ve 4. kromozomlarda lokalize olmuştur¹⁶⁸.



Şekil 16: SOD2 geninin kromozom 6'daki lokalizasyonu¹⁸²

Manganez süperoksit dismutaz (MnSOD, SOD2, EC 1.15.1.1) mitokondride süperoksit radikalini uzaklaştırdığı bilinen tek enzimdir ve dolayısıyla oksidatif strese karşı koruyucu rolü çok önemlidir. MnSOD, aerobik hayatın devamı için vazgeçilmez olduğu kanıtlanmış tek SOD formudur ve yoksunluğu mitokondriyal süperoksit seviyesinin artmasına ve oksidatif strese neden olur. MnSOD ekspresyonu oksidatif stres, hipoksi, tümör nekrozis faktör α (TNF α), interlekin-1 (IL-1) ve lipopolisakkarit tarafından indüklenir¹⁶⁸.

MnSOD geninde çeşitli mutasyonlar saptanmıştır. MnSOD genindeki tek nokta polimorfizmi (C $\rightarrow$ T) 16. kodonda 9. pozisyonda aminoasit değişimine (Ala $\rightarrow$ Val) neden olur. Bu polimorfizm (Ala16Val) MnSOD enziminin mitokondrideki işlevini etkileyebilmektedir. Protein analizleri, bu aminoasit değişikliğinin proteinin yapısının, heliks yapıdan β -pleated sheet konformasyonuna dönüştüğünü göstermiştir¹⁶⁹. Yapılan bazı çalışmalar bu değişimin enzimin hücresel işlevini ve mitokondri içine transportunu etkilediğini savunmaktadır. Bunun sonucunda da mitokondri süperoksit radikallerine karşı en güçlü savunma mekanizmasını kaybederek protein oksidasyonlarına ve DNA mutasyonlarına açık hale gelecektir. Mitokondriyal DNA'da oluşan mutasyonların tümör gelişiminde önemli olabileceği çeşitli çalışmalarla gösterilmiş, özellikle meme, prostat, mesane ve deri kanseri ile ilişkilendirilmiştir¹⁷⁰⁻¹⁷².

MnSOD geninde Ala16Val polimorfizminin sıklığı ile ilgili C ve T alel frekansları sırasıyla Avrupa ırkında 0,39 ve 0,60; Afrika-Amerika'da 0,45 ve 0,55; Asya ırkında ise 0,36 ve 0,64 olarak tespit edilmiştir. Türkiye'de ise genotip sıklıkları TT için 0,33; TC için 0,45 ve CC için de 0,22 olarak bulunmuştur¹⁷³.

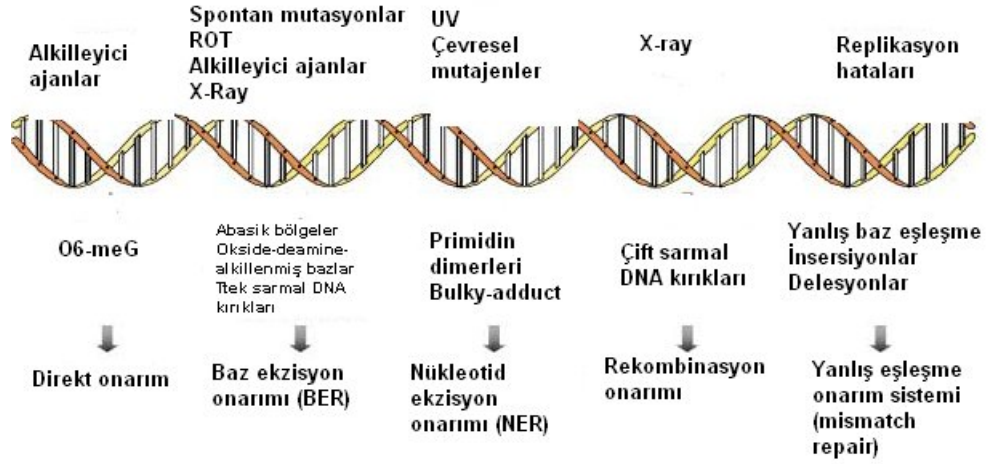
2.11. DNA Onarımı

Canlı organizmaların devamlılıklarını korumaları, kimyasal formu DNA olan büyük miktardaki genetik bilginin doğru olarak çoğalmasına bağlıdır. Bu düzenin sağlanması genetik bilginin devamlı kontrolüne ve onarımına ihtiyaç duyar. Gıdalar da dahil olmak üzere birçok

çevresel ajanın değişik tipte DNA hasarı yaparak genetik dengeyi bozduğu bilinmektedir. Bunlar başlıca iyonize radyasyon, UV ışını, alkilleyici ajanlar, polisiklik aromatik hidrokarbonlar ve heterosiklik aromatik aminler olarak sayılabilir. Bunun yanında DNA ayrıca oksijen metabolizması sırasında ortaya çıkan reaktif oksijen türleri gibi endojen işlemler sırasında da hasarlanabilir. Tek bir insan hücresi, günde DNA'da hasar oluşturabilecek yaklaşık 10^4 - 10^6 kadar olaya maruz kalmakta, ve dolayısıyla 10^{12} kadar hücreye sahip olan yetişkin bir insan, günde yaklaşık 10^{16} - 10^{18} onarım işlemine ihtiyaç duymaktadır^{174,175}.

DNA onarımı, bakteri, maya, drosophilla, balık, amip kemiriciler ve insan da dahil olmak üzere tüm organizmalarda bulunur ve genom bütünlüğünün sağlanmasında temel rol oynar. DNA onarımı hücre ölümü, mutasyonlar, replikasyon hataları, kalıcı DNA hasarı ve genomik instabiliteyi azaltan proseslerden biridir. Bu prosesteki herhangi bir abnormalite kanser ve yaşlanma ile ilgilidir¹⁷⁴.

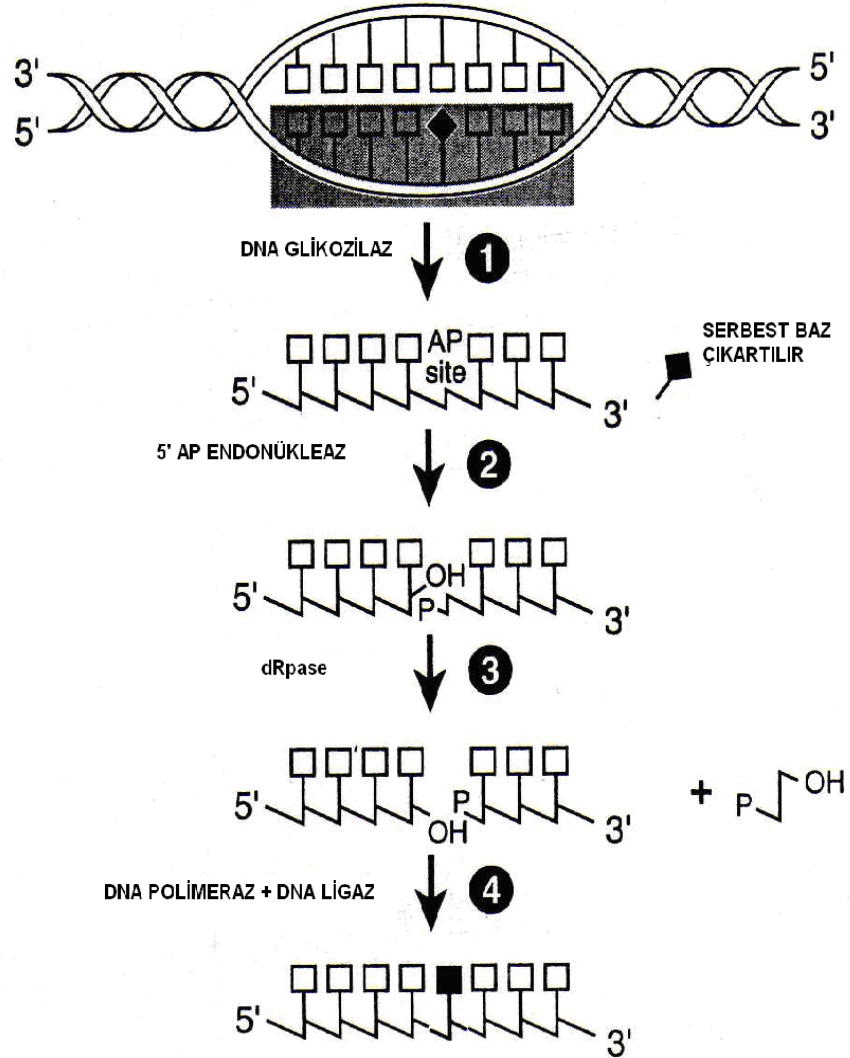
Memelilerde hasarlı DNA'nın yapısını ve normal nükleotid sekansını düzelten, enzimatik onarım sistemleri bulunmaktadır. Bu sistemler arasında; fotolizaz ve alkil transferaz enzimleri gibi DNA hasarını direkt olarak düzeltenler olduğu gibi, oldukça fazla sayıda enzimin katılmasını gerektiren daha kompleks nükleotid ve baz ekzisyon sistemleri vardır. Ayrıca replikasyondan sonraki yanlış eşleşme onarım sistemleri DNA zincirinde direkt olarak karşıdaki nükleotidlerin hasarından doğan ve DNA replikasyonunu bloke eden boşlukları tamir edebilmektedirler. DNA onarım sistemindeki tüm mekanizmaların temelinde yatan prensipler sırasıyla hasarın belirlenmesi, hasarın uzaklaştırılması, DNA sentezi ve ligasyon'dur¹⁷⁴. DNA'da hasara neden olan başlıca ajanlar, neden oldukları lezyonlar ve ilgili onarım mekanizmaları şekil 17'de açıklanmıştır.



Şekil 17: DNA'da hasara neden olan başlıca ajanlar, neden oldukları lezyonlar ve ilgili onarım mekanizmaları¹⁷⁴

2.11.1. Oksidatif DNA Hasarının Onarımı

Oksidatif DNA lezyonlarının onarılmasında ana yolak, diğer DNA onarım mekanizmalarına kıyasla Baz Ekzisyen Onarımıdır (BEO) (Şekil 18). 8- oxoG glikozilazlar (Fpg veya MutM/OGG) ve MutY homolog (MutY/MYH) glikozilazlar ve MutT/MTH hücreleri en önemli mutajenik lezyon olan 8-OHG'nin onarımında görev alırlar. BEO yolağında rol alan anahtar enzimler DNA glikozilazlardır. Bu enzim grubu hasarlı bazları tanır ve abazik bölgeyi oluşturmak için baz ve deoksiriboz arasındaki N-glikozidik bağı hidrolizleyerek hasarlı bazı DNA'dan çıkarır. Bu glikozilaz aktiviteden sonra hasarlı bazların ayrılmasıyla oluşan, "AP bölgeleri" (apürinik/apirimidinik bölgeler) yolağın ikinci enzimi olan AP endonükleaz veya AP liyaz ile 5' fosfodiester bağı hidrolizlenerek DNA sarmal kırığı oluşur. Memeli hücrelerinde AP bölgeleri DNA polimeraz ile doldurulur ve kalan DNA sarmal kırığı ise DNA liyaz tarafından uzaklaştırılır¹⁷⁶.

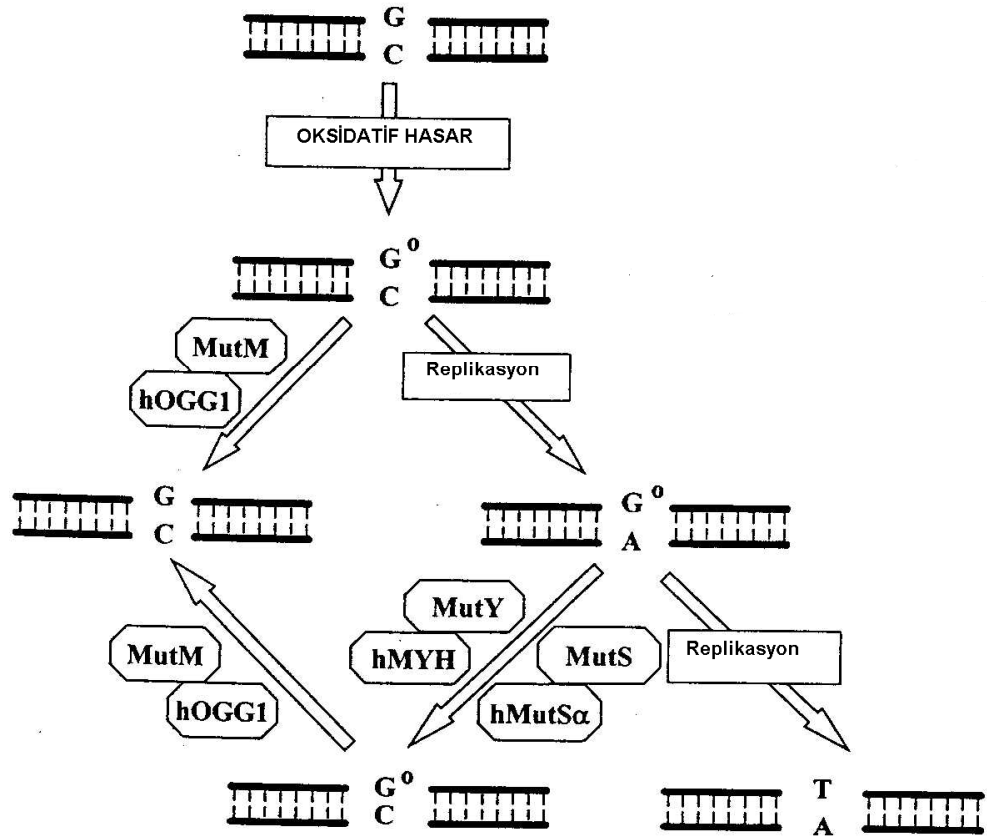


Şekil 18: Baz Ekzisyon Tamir Yolağı

BEO yolağı temel olarak iki türlü gerçekleşir. Kısa BEO yolağı (1 nükleotid onarımı) ve uzun BEO yolağı (2-6 nükleotit onarımı)'nın her ikisi de AP endonükleazlara ihtiyaç duyarlar ancak DNA sentezinde ve ligasyonda görev alan enzimler farklılık göstermektedir. 8-OHG onarımının ana yolağı kısa yoldur. Ancak kısa yolak bileşenleri olmadığında veya doygunluğa ulaştığında yerini uzun yolağa doldurmaktadır. BEO enzimleri de iki ana alt gruba ayrılırlar. Bunlardan biri sadece glikozidik bağın hidrolizini katalizleyen monofonksiyonel glikozilazlar, diğeri ise ek olarak abazik bölge oluşumu için liyaz aktivitesinin de bulunduğu bifonksiyonel glikozilazlardır^{176,177}.

DNA’da okside pirimidin baz lezyonlarının onarımı: Timin ve Sitozin bazlarında genellikle C5/C6 üzerinden gerçekleşen lezyonlar, primer olarak Endonükleaz III (Endo III veya Nth proteini) ve Endonükleaz VIII (Endo VIII veya Nei proteini) tarafından tanınırlar. Endo III, timin glikol, ürea, sitozin hidratları, urasil hidratları gibi pek çok hasarlı bazı tanıyan spesifik bir DNA glikozilazdır. Endo III’ün glikozilaz aktivitesi dışında AP liyaz aktivitesi de vardır. Dolayısıyla bu enzim hem glikozilaz hem de AP endonükleaz olarak adlandırılabilir. Endo III bu aktivitesi sayesinde hem hasarlı bölgeyi tanır hem de hasarlı bazın çıkarılması sonucunda oluşan abazik bölgeyi keserek (β -eliminasyon) DNA sarmal kırığının oluşmasında neden olur¹⁷⁸. Daha sonraki onarım basamakları BEO yolağında açıklandığı şekilde devam eder.

DNA’da okside pürin baz lezyonlarının onarımı [MutM (Fpg) ve 8-OHG Glikozilazlar (OGG)]: *E.coli*’de MutM (formamidopirimidin-DNA glikozilaz=Fpg) glikozilaz, pürin bazında hem halkanın açılmasıyla oluşan lezyonlarının hem de 8-OHG katım ürünlerinin onarılmasında rol oynarlar (Şekil 19). MutM, 8-OHG ve Fapy lezyonlarını tanır ve onarılmasını sağlar. MutM proteini hasarlı bazı tanıyan ve çıkaran glikozilaz aktivitesi ve oluşan abazik bölgeyi kesip DNA sarmal kırığı oluşmasına neden olan β eliminasyon aktivitesiyle çok fonksiyonlu bir BEO enzimidir. Ancak 8-OHG lezyonlarının onarımında MutT ve MutY proteinlerine de ihtiyaç duyulmaktadır. Bu üç genin kodladığı enzimler fonksiyonel işbirliği yaparak bakteride 8-OHG kaynaklı mutasyonları önlemede önemli rol oynarlar¹⁷⁶.



Şekil 19: DNA'da 8-OHG lezyonunun onarımı¹⁷⁶

Mayada (*Saccharomyces cerevisiae*) ve memelilerde ise OGG enzimleri, bakteriyel MutM/Fpg proteininin fonksiyonel analogu olarak belirlenmiştir. OGG1, *E.coli*'deki Fpg'nin fonksiyonel fakat yapısal olmayan homologudur ve benzer substrat spesifiteleri vardır. OGG1, yapı olarak ise Endo III ve MutY proteinlerine benzerlik göstermektedir. İnsanlarda ise OGG1 geninin homologu (hOGG1=human OGG1) ilk kez 1997 yılında tanımlanmış ve aynı mayadaki gibi 8-OHG ve Fapy lezyonları üzerine DNA glikozilaz etkisinin olduğu bulunmuştur. İnsanlarda bu genden iki tip OGG1 (hOGG1) formunun kodlandığı bulunmuştur. Bunlardan α -hOGG1 çekirdekte, β -hOGG1 ise mitokondride bulunmaktadır¹⁷⁹.

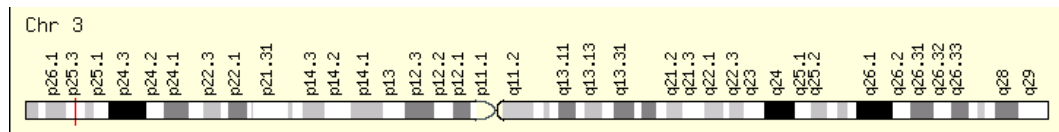
2.11.2. DNA Onarımının Comet Yöntemiyle Ölçülmesi

DNA onarımında rol alan genlerdeki polimorfizmler (OGG1 geninde rastlandığı gibi) ve buna bağlı olarak DNA onarımındaki bireysel duyarlılık, genotip çalışmaların konusu olmuştur. Bunun yanında fenotipik varyasyonları inceleyen çalışmalar da oldukça önemlidir. Bu çalışmaların amacı, bireylerin DNA hasarını onarma kapasitelerini (DNA onarım kapasitesi) incelemektir¹⁸⁰.

Moleküler epidemiyoloji çalışmalarında özellikle BEO kapasitesinin incelenmesi için farklı yöntemler mevcuttur. Bunlardan en sık olarak indirekt yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemde lenfositler DNA hasarı yapan kimyasal (H_2O_2 , bleomisin gibi) ya da fiziksel (X-ray-Challenge yöntemi gibi) bir ajanla indüklenirler. Daha sonra, oluşan lezyonların geri dönüşü izlenir. Bu yöntemde ya hücrelerin DNA onarım kapasitesi incelenir veya kalan DNA hasarı (rezidüel DNA hasarı) belirlenerek yorum yapılabilir. Bu yöntem için, Comet ve Kromozomal Aberasyon gibi çeşitli genotoksikite testleri kullanılmaktadır. Comet yöntemi protokolüne spesifik endonükleazların eklenmesiyle (Fpg veya Endo III), okside olmuş purin ve pirimidin bazlarının BEO mekanizması ile onarımı da izlenebilmektedir^{134,180}. Hücresel onarım kapasitesinin belirlenmesinin dışında in vitro onarımı inceleyen oligonükleotid ve plazmid yöntemler de vardır. Son zamanlarda comet yönteminin in vitro onarımın tayininde de kullanılabilir olduğu gösterilmiştir. Bu yöntemle hücreler Ro 19-8022 maruz bırakarak OGG1 aktivitesi ölçülebilmektedir¹⁸¹.

2.12 hOGG1 geni ve Ser326Cys polimorfizmi

hOGG1 geni, kromozom 3p25'de lokalize olan, yaklaşık 16,7 kb uzunluğunda ve 8 ekzondan oluşan bir gendir (şekil 20). hOGG1 geni α -hOGG1 ve β -hOGG1 olmak üzere iki proteinin kodlanmasından sorumludur. hOGG1 geni pek çok izoform şeklinde eksprese edilmesine rağmen sadece 1 α formu çekirdekte translokasyon sinyali vermekte ve 8-OHG için temel onarım proteini özelliği göstermektedir¹⁸⁴.



Şekil 20. hOGG1 geninin kromozom 3'deki lokalizasyonu¹⁸²

DNA onarım genlerindeki polimorfizmler, protein fonksiyonlarında ve bireylerin hasarlı DNA'yı onarma kapasitelerinde değişmelere yol açabilmektedir. Onarım kapasitesindeki yetersizlikler de genetik instabilite ve karsinogenezise neden olabilir. Ayrıca Xeroderma pigmentosum, Cockayne sendromu, Ataxia telangiectasia, Fankoni Anemisi gibi kalıtsal hastalıkların da DNA onarım enzimlerinin aktivitesindeki bozukluklardan kaynaklandığı bilinmektedir¹⁸³.

Yapılan çalışmalarda hOGG1 geninde birçok tek nokta polimorfizmine rastlanmıştır. Bu polimorfizmlerden özellikle ekzon 7'de 1245. pozisyonda yer alan C/G polimorfizmi, kodon 326'da Serinden Sisteine (Ser326Cys) aminoasit değişimine neden olmakta ve bu polimorfizmin çeşitli kanser türlerinde risk faktörü olduğuna dair çalışmalar bulunmaktadır. *E.Coli*'de Serin aleli ile kodlanmış proteinin Sistein aleline göre daha fazla DNA tamir aktivitesine sahip olduğu belirlenmiştir^{183,184}.

Farklı popülasyonlarda hOGG1 için farklı genotip dağılımları söz konusudur. Yapılan çalışmalarda, homozigot mutant (Cys/Cys) frekansının en yüksek Çin (%24,2-13,4) ve Japonya'da olduğunu en az da Macaristan (%2,7), Avustralya (%3,6), Amerika beyaz ırkı (%1,8) ve Avrupa beyaz ırkında (%2-6) gözlenmiştir. Türk popülasyonunda ise homozigot serin frekansının %50, heterozigot varyant frekansının %41 ve homozigot sistein frekansının da %9 olduğu bulunmuştur¹⁸⁵.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Çalışma ve Kontrol Grubunun Seçilmesi

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Gastroenteroloji Anabilim Dalı'na gastroözofagiyal reflü şikayetleri ile başvuran, uzman hekimler tarafından yapılan endoskopik incelemede Barrett özofagus tanısı konulan ve patolojik inceleme ile bu tanının doğrulandığı hastalar çalışma grubuna alınmıştır (n=40). Barrett özofagus dışında başka herhangi bir hastalığı olmayan bu bireyler çalışma hakkında bilgilendirilmiş ve hazırlanan anket formu doldurularak venöz kan örnekleri alınmıştır.

Kontrol grubu (n=40), yine aynı kliniğe başvuran ancak endoskopi sonucunda Barrett özofagusun veya başka herhangi bir hastalığın gözlenmediği, yaş, cinsiyet ve sigara içme alışkanlıkları çalışma grubu ile uyumlu olacak şekilde mesleki olarak herhangi bir genotoksik maddeye maruz kalmamış sağlıklı bireylerden oluşturulmuştur. Bu kişilere de anket formu doldurulmuş ve venöz kan örnekleri alınmıştır.

Çalışmada değerlendirilecek parametrelerin tespiti amacıyla, yaş, cinsiyet, ağırlık-boy, sigara ve alkol tüketimi, beslenme alışkanlığı, ailesel öykü gibi soruları içeren anket formu tüm bireylere uygulanmıştır. Bu anket formunun bir örneği ekte sunulmuştur.

Çalışmamızda kullanılan tüm testler, Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi F. Toksikoloji Anabilim dalı laboratuvarlarında ve yine aynı fakültenin merkez laboratuvarında yapılmıştır.

3.2. Çalışma ve Kontrol Grubundan Biyolojik Materyalin Toplanması

Çalışmamızda, biyolojik materyal olarak, çalışma ve kontrol grubuna alınan bireylerin periferik kan örnekleri EDTA veya heparin içeren vakumlu kan tüplerine toplanmıştır. Heparinli tüpe alınan kan örneklerinde aynı gün içinde modifiye comet yöntemi uygulanmış ve kan GSH tayini yapılmıştır. EDTA'lı tüplerdeki kan örneklerinden ise DNA izole edilmiştir. Örnekler DNA izolasyonu yapılana kadar -20°C'de saklanmıştır. .

3.3. Modifiye Comet Yöntemi

3.3.1. Yöntemde Kullanılan Kimyasal Maddeler

- Sodyum klorür (NaCl) (Merck)
- Potasyum klorür (KCl) (Merck)
- Dimetilsülfoksit (DMSO) (Merck)
- Sodyum hidroksit (Merck)
- Potasyum hidroksit (Merck)
- Fosfat tampon tabletleri (PBS) (Sigma, P-4417)
- Histopaque 1077 (Sigma, 1077-1)
- Düşük kaynama dereceli agar (LMA) (Sigma, A-4018)
- Yüksek kaynama dereceli agar (HMA) (Sigma, A-7174)
- Etilendiamin tetraasetikasit (EDTA, Sigma, ED2SS)
- Trizma Base (Sigma, T-1503)
- Triton-X 100 (Sigma, 9002-93-1)
- Hepes (Sigma, H-3375)
- Albumin bovin Fraction V (BSA) (Sigma A-9418)
- Hidrojen peroksit (H₂O₂) (%30, 8,8 M) (Merck)
- Endonükleaz III enzimi [Dr. Andrew Collins'den satın alındı (Oslo Üniversitesi, Oslo, Norveç)]
- Formamidopirimidin DNA glikozilaz (Fpg) [Dr. Andrew Collins'den satın alındı (Oslo Üniversitesi, Oslo, Norveç)]

3.3.2. Yöntemde Kullanılan Aletler

- Hassas terazi (Shimadzu)
- Dijital üstten kefeli terazi (Sartorius)
- pH metre (Sartorius)
- Soğutmalı santrifüj (Nüve)
- Elektroforez tankı ve güç kaynağı (thermo)
- 37°C'lik Etüv (Nüve)
- Floresan ataçmanlı mikroskop (Zeiss Axioscope 2)
- Mikrodalga fırın
- Otomatik mikropipetler (Rainen)
- Rodajlı lam (Menzel, superfrost)
- Lamel (32x64 boyutunda)
- Ependorf tüpleri
- Plastik pastör pipeti
- Parafilm
- Cam şale

3.3.3. Yöntemde Kullanılan Çözeltiler

- **Fosfat tamponu (PBS)**

Bir tane PBS tableti 200 ml distile suda çözüldü ve +4°C'de muhafaza edildi.

- **Yüksek kaynama dereceli agar (%1)**

Distile su içinde hazırlandı.

- **Düşük kaynama dereceli agar (%0,65)**

PBS içinde hazırlandı.

- **10 M NaOH çözeltisi**

NaOH.....400 g
Distile su.....ym 1000 ml

- **0,2 M EDTA çözeltisi**

EDTA.....74,4 g
Distile su.....ym 1000 ml

- **10 M KOH çözeltisi**

KOH.....561,1 g
Distile su.....ym 1000 ml

- **Stok 100 µg/ml Etidyum Bromür (EB) çözeltisi**

EB.....5 mg
Distile su ym 50 ml

Hazırlanan stok çözelti +4°C'de saklandı. Lamlar boyanacağı zaman çözelti, distile su ile 1:5 oranında seyreltilerek kullanıldı.

- **Stok Lizis çözeltisi**

2,5 M NaCl.....146,1 g
100 mM EDTA.....37,2 g
10 mM Tris.....1,2 g
Distile su.....ym 1000 ml

Çözeltinin pH'sı 10 M NaOH ile 10'a ayarlandı. Hazırlanan stok lizis çözeltisi oda sıcaklığında saklandı. Kullanılacak her 100 ml lizis çözeltisi için, 89 ml stok lizis çözeltisi, 10 ml DMSO ve 1 ml Triton-X 100 karıştırıldı.

- **Endonükleaz III ve Fpg için stok enzim tampon çözeltisi (X10)**

40 mM HEPES.....	95.32 g
0.1 M KCl.....	74.55 g
0.5 mM EDTA.....	1.86 g
BSA (0.2mg/ml).....	0.2 g
Distile su	ym 1000 ml

Çözeltinin pH sı 10 M KOH ile 8'e ayarlandı. Çözelti x10 hazırlandığı için stok enzim buffer olarak uygun hacimlerde (50, 100 ml) bölünüp -20'de saklandı. Taze olarak 1/10 oranında seyreltildi. pH tekrar kontrol edilip kullanıldı.

- **Elektroforez tamponu (%3 NaOH, %0,5 EDTA)**

0,3 M NaOH.....	37,5 ml
1 mM EDTA.....	6,75 ml
Distile su.....	ym 1250 ml

- **Nötralizasyon tamponu**

0,4 M Tris.....	48,5 g
Distile su.....	ym1000 ml

Çözeltinin pH'sı derişik HCl ile 7,5'e ayarlandı.

- **Enzim dilüsyonları:**

- **Fpg (3000x)**

Stok çözelti 1/3000 oranında seyreltilerek kullanıldı.

5 µl stok Fpg çözeltisi, önce %10 gliserol içeren enzim tampon çözeltisi ile 500 µl'ye tamamlandı ve 10 µl hacimler halinde -80°C'de saklandı (100x). Kullanılacağı zaman enzim buffer ile 300 µl'ye tamamlandı. Her bir lam için 50 µl enzim çözeltisi yeterli olmaktadır.

- **Endo III (1000x)**

Stok çözelti 1/10000 oranında seyreltilerek kullanıldı.

5 µl stok Fpg çözeltisi, önce enzim tampon çözeltisi ile 500 µl'ye tamamlandı ve 10 µl hacimler halinde -80°C'de saklandı (100x). Kullanılacağı zaman enzim buffer ile 300 µl'ye tamamlandı. Her bir lam için 50 µl enzim çözeltisi yeterli olmaktadır.

3.3.4. Periferel Kan Lenfositlerinde Oksidatif DNA hasarının Modifiye Comet Yöntemi ile Belirlenmesi

Çalışmaya başlanmadan önce %1'lik HMA çözeltisi hazırlandı. Lamlar bu agar çözeltisine batırılarak kaplandı ve oda sıcaklığında kurutuldu.

Lenfosit çözeltisinin hazırlanması: Tüm modifiye comet deneyleri için (oksidatif DNA hasarı ve DNA onarımı) her bireyden yaklaşık 2 ml lenfosit çözeltisi elde etmek gereklidir (her birey için toplam 18 lam çalışıldı). Bu amaçla her birey için 4 kromozom tüpünün her birine 5 ml olmak üzere toplam 20 ml PBS konuldu (+4°C) ve her birine 400 µl (toplam 2 ml) heparinli kan eklenerek karıştırıldı. Buzda 10-15 dakika bekletildi. Daha sonra her bir tüpün dibine 400 µl Histopaque 1077 eklendi. 1060 rpm, +4°C'de 3 dakika santrifüj edildi. Ayrılan lenfositler (2 ml) ependorf tüpüne konuldu. Bu aşamada lenfositlere Tripan Mavisi Canlılık testi yapıldı ve canlılık oranları ≥99% olarak tespit edildi.

Hücrelerin lama yayılması: Hücreler 37°C'deki PBS içinde hazırlanmış %0,65'lik LMA ile karıştırılarak önceden HMA ile kaplanmış lamlara yayıldı. 32x64 lamelle kapatılarak buzdolabında agar katılaşınca kadar bekletildi.

Hücrelerin lize edilmesi: Katılaştıran agarın üzerindeki lamel çekildi ve lizis çözeltisinde bir gece +4°C'de bekletildi.

Hücrelerin Endo III ve Fpg enzimleri ile muamele edilmesi: Lamlar lizis çözeltisinden alındı ve 3 kez 5 dakika +4°C'de enzim tamponu ile yıkandı. Bu arada enzim dilüsyonları buz üzerinde hazırlandı. Lamlar kalan sıvıdan kurtararak enzim çözeltilerinden ve sadece enzim tamponundan 50 µl ekleyip 32x64 lamelle kapatıldı. Lamlar nemli bir kutuya koyularak 37°C'de Endo III veya sadece enzim tamponu ile muamele edilen lamlar 45 dk, Fpg ile muamele edilenler ise 30 dk bekletildi.

Hücrelerin alkali ile muamele edilmesi ve elektroforez: Soğuk elektroforez çözeltisi tankın içine dolduruldu. Akım 25 Volt 300 mA olacak şekilde çözelti miktarı ayarlandı. Lamlar son kenarları anoda doğru gelecek şekilde dizildi ve soğuk elektroforez çözeltisi ile dolu olan tank içinde 20 dk bekletildi. Sonrasında 20 dk 25 V, 300 mA'de elektroforez uygulandı.

Nötralizasyon ve boyama: Elektroforezden çıkartılan lamlar +4°C'de nötralizasyon tamponu ile 3 defa 5'er dk bekletilerek nötralize edildi. Daha sonra lamlar 50 µl EB ile boyandı.

Değerlendirme: Lamlar Comet Görüntü Analiz Programı (COMET III, Perceptives-UK) kullanılarak floresan ataçmanlı mikroskopta 40x büyütmede değerlendirildi. Bunun için her birey için iki lamdan (25x2) toplam 50 hücre sayıldı. Bu çalışmada DNA hasarının değerlendirilmesi amacıyla kuyruktaki DNA yüzdesi (kuyruktaki %DNA) [%tail DNA (%TD) = %tail intensity (%TI)] parametresi kullanılmıştır.

Periferal lenfositlerde okside olmuş pirimidin bazlarının (Endo III ile) ve okside olmuş pürin bazlarının (Fpg ile) tayini için kullanılan modifiye comet yönteminin temel basamakları tablo 4’de gösterilmiştir.

Tablo 4: Oksidatif DNA hasarının Modifiye Comet Yöntemi ile belirlenmesi

LENFOSİTLER (6 ependorf)		
Lama yayma, Lizis, Enzim tamponu ile üç kere yıkama		
+50 µl Enzim tamponu (2 lam)	+50 µl (Enzim tamponu+Endo III) (2 lam)	+50 µl (Enzim tamponu+Fpg) (2 lam)
45 dk 37°C	45 dk 37°C	30 dk 37°C
Alkali ile muamele, Elektroforez, Boyama, Değerlendirme		
Bazal DNA hasarı (A)	Bazal DNA hasarı+Okside olmuş pirimidinler (B)	Bazal DNA hasarı+Okside olmuş pürinler (C)

Dolayısıyla;

Okside olmuş pirimidin baz hasarı (Endo III)=B-A

Okside olmuş pürin baz hasarı (Fpg)=C-A

şeklinde matematiksel olarak hesaplanmıştır.

Hücrelerdeki Bazal DNA hasarı ise sadece enzim tamponu ile muamele edilen lamlardaki hücreler değerlendirilerek bulunmuştur.

3.3.5. Periferal Kan Lenfositlerinde DNA Onarımının Modifiye Comet Yöntemi ile Belirlenmesi¹³⁴

Çalışma ve kontrol grubundaki bireylerin %DNA Onarım Kapasitelerinin belirlenmesi amacıyla, alınan kanlarından izole edilen lenfositler önce 50 µM H₂O₂ ile muamele edildi. Tüm işlemler buz üzerinde gerçekleştirildi. Sonra bu lenfositler ikiye ayrıldı ve birinci tüp DNA onarımının gerçekleşmesi amacıyla 1 saat 37°C’de inkübe edildi. Süre sonunda yukarıda açıklanan modifiye comet protokolü uygulandı. İkinci tüp ise H₂O₂ ile muamele edildikten hemen sonra lama yayıldı. Daha sonra modifiye comet protokolü uygulandı.

Periferal lenfositlerde % DNA onarım kapasitesinin, okside olmuş pirimidin bazlarının % onarım kapasitesinin ve okside olmuş pürin bazlarının % onarım kapasitesinin tayini için kullanılan modifiye comet yönteminin temel basamakları tablo 5’de gösterilmiştir.

Tablo 5: DNA onarım kapasitesinin Modifiye Comet Yöntemi ile belirlenmesi

LENFOSİTLER (12 ependorf)	
+ 50 µM H₂O₂ (6 ependorf)	+ 50 µM H₂O₂ (6 ependorf)
-----	1 saat 37°C'de onarım
Lama yayma, Lizis, Enzim tamponu ile üç kere yıkama	
+50 µl Enzim Tamponu (2 lam) (D)	+50 µl Enzim Tamponu (2 lam) (E)
+50 µl (Enzim tamponu+Endo III) (2 lam) (F)	+50 µl (Enzim tamponu+Endo III) (2 lam) (G)
+50 µl (Enzim tamponu+Fpg) (2 lam) (H)	+50 µl (Enzim tamponu+Fpg) (2 lam) (J)
Alkali ile muamele, Elektroforez, Boyama, Değerlendirme	

DNA onarım kapasitesi (%) = (D-E/D)x100

Pirimidin Baz Hasarının Onarılma Kapasitesi (%) = (F-G/F)x100

Pürin Baz Hasarının Onarılma Kapasitesi (%) = (H-J/H)x100

şeklinde matematiksel olarak hesaplanmıştır.

3.4. Glutasyonun Spektrofotometrik Olarak Ölçülmesi¹⁴⁴

3.4.1. Yöntemde Kullanılan Kimyasal Maddeler

- Glasiyel metafosforik asit (Merck)
- Etilendiamin tetraasetikasit (EDTA, Sigma, ED2SS)
- Sodyum klorür (NaCl) (Merck)
- Disodyum hidrojen fosfat (Na₂HPO₄) (Merck)
- 5,5'-ditiobis (2 nitrobenzoik asit) (DTNB) (Sigma, D8130)
- Sodyum sitrat (Fluka, 71498)
- Fosfat tampon tabletleri (PBS) (Sigma, P-4417)

3.4.2. Yöntemde Kullanılan Aletler

- Beckman DU-600 spektrofotometrisi
- 1000-5000 mikrolitre aralığında otomatik pipet

3.4.3. Yöntemde Kullanılan Çözeltiler

- **Çöktürme çözeltisi**

Glasiyel metafosforik asit.....1,67 g
EDTA.....0,2 g
NaCl.....30 g
Distile su.....ym 100 ml

- **Fosfat çözeltisi**

Bir tane PBS tableti 200 ml distile suda çözüldü ve +4°C'de muhafaza edildi.

- **5,5'-ditiobis (2 nitrobenzoik asit) (DTNB) Reajanı**

DTNB.....40 mg
Sodyum sitrat.....1 g
Distile su.....ym 100 ml

3.4.4. Yöntemin Uygulanması

8 ml fosfat çözeltisine 1,2 ml çöktürme çözeltisi, 0,8 ml distile su ve 1 ml DTNB rejanı eklenerek kör hazırlandı.

1.8 ml distile suya 0,2 ml kan ilave edildi. 3 ml çöktürme çözeltisi hemolizata karıştırıldı. 5 dakika 3000 rpm'de santrifüj edildi. Süzüntünün 2 ml'si 8 ml fosfat çözeltisine ilave edilip, 1 ml DTNB rejanı ile sarı renk oluşturularak UV-spektrofotometre küvetinde optik dansite 412 nanometre'de Beckman DU-600 spektrofotometrede köre karşı ölçüldü.

Sonuçların konsantrasyona çevrilmesi:

Beckman DU-600 gibi bir bant genişliğine sahip kalorimetre veya spektrofotometre ile 412 nm'de kandaki GSH içeriği fotometri kanununa göre aşağıdaki formülle hesaplandı.

$$A = E \times C \times l$$

A: absorbans

E: ekstinksiyon katsayısı ($13,600 \mu\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)

C: konsantrasyon

l: Işığın kat ettiği yol

Deney sırasındaki seyreltme faktörleri de hesaba katılarak sonuçta okunan absorbans 10,11 ile çarpılarak $\mu\text{M/ml}$ olarak konsantrasyona çevrildi.

3.5. DNA İzolasyonu

DNA İzolasyon Kiti (E.Z.N.A.[®], kat no: D3392) kullanılarak toplanan kan örneklerinden DNA izolasyonu yapıldı. Kan örneği, öncelikle 250 µl Buffer BL , 25 µl Proteaz Enzimi ve 5 ul RNaz eklenerek +42 °C denatürasyon ortamında lize edildi. Spin kolona aktarılan lizat içerisindeki DNA'lar matrikse bağlanırken, hemogloblin, hücresel artıklar ve diğer proteinler, yıkama solüsyonu ile uzaklaştırıldı. Son olarak elüsyon tamponu ile DNA elde edildi.

Kitin İçeriği:

BİLEŞENLER	50 TEST
HiBind [®] DNA Kolon	50 adet
2 ml santrifüj tüpleri	150 adet
Tampon BL	20 ml
Yıkama Tamponu (Konsantre)	24 ml x 2
HB Tamponu	30 ml
Elution Tamponu	30 ml
Proteaz Enzimi	70 mg
RNaz	300 µl

3.5.1. Yöntemde Kullanılan Alet ve Malzemeler

- Mikrosantrifüj (Boeco, 02405-13)
- Nükleaz free 1,5 ml tüp (Corning, 3622)
- Sıcak su banyosu ya da kuru ısıtıcı blok (70°C'ye çıkabilir özellikte olmalıdır)
- Absolu Etanol

Kalite ve verimlilik tespiti:

DNA'nın kalitesi, hem 260 nm hem de 280 nm de absorbans ölçümü sonucu tespit edilir. Absorbanslarının oranının (A_{260}/A_{280}) 1.7 ile 1.9 arasında olması DNA'nın %85-95 saflıkta olduğunu göstermektedir. Çalışmamızda elde edilen ilk 5 DNA örneğinin kalitesi nanodrop'da ölçüldü ve A_{260}/A_{280} oranlarının istenen değerler içinde olduğu tespit edildi.

3.6. Bireylerin GSTM1, MnSOD Ala16Val ve hOGG1 Ser326Cys Genotiplerinin İncelenmesi

3.6.1. Yöntemde Kullanılan Kimyasal Maddeler

- 100 mM dATP (Fermentas)
- 100 mM dGTP (Fermentas)
- 100 mM dTTP (Fermentas)
- 100 mM dCTP (Fermentas)
- Taq DNA polimeraz (5U/μl) (Fermentas)
- 10X Taq Buffer (Fermentas)
- 25 mM MgCl₂ (Fermentas)
- 100 bp'lik DNA ladder (Amresco)
- BsaW I restriksiyon enzimi (5U/μl) (NEB, R0567S)
- Fnu4H I restriksiyon enzimi (5U/μl) (NEB, R0178S)
- Steril su (AppliChem)
- Normal Agar (Prona Basic Agarose)
- Nüsilv Agar (Prona gamma micropor agarose)
- Trizma Baz (Sigma, T-1503)
- Etilendiamin Tetra Asetik Asit (EDTA) (Sigma, ED2SS)
- Borik asit (Sigma, B-0252)
- 6X yükleme boyası (Fermentas)
- Etidyum Bromür (Sigma)

3.6.2. Yöntemde Kullanılan Aletler

- PCR aleti (Thermal Cyclers-Techne)
- Mikrosantrifüj (Spectrofuge 24D-Labnet)
- Mikrodalga fırın
- Hassas terazi
- Etüv
- Kuru ısıtıcı (hot block)
- Elektroforez tankı (Maxicell Primo)
- Elektroforez güç kaynağı (Therma EC 250)
- Jel kalıbı
- Jel tarakları
- Mikrotiter kabı
- UV-transilluminatör ve jel görüntüleme sistemi (Syngene)
- Mikropipetler (Finntip)
- DNAaz, RNAaz free steril ependorf tüpleri (0,5-1,5 ml)
- Steril mavi, sarı ve beyaz pipet uçları

3.6.3. Yöntemde Kullanılan Çözeltiler

- **12,5 mM dNTP çözeltisi:** 100 mM'lık dATP, dGTP, dTTP ve dCTP nükleotid stok çözeltileri karıştırılıp seyreltildi. Bunun için her bir stok çözeltiden 5 µl alınıp steril distile su ile 40 µl'ye tamamlandı.
- **TBE Tamponu (10X)**
Trizma Baz.....108 g
Borik Asit.....55 g
EDTA.....9,3 g
Distile su.....ym 1000 ml

Otoklavda sterilize edilip oda sıcaklığında saklandı.
- **TBE Tamponu (1X)**
10X TBE tamponu 1:10 oranında steril distile su ile seyreltilerek hazırlandı.
- **Etidyum Bromür çözeltisi (10 mg/ml)**
Etidyum Bromür.....100 mg
Distile su.....ym 10 ml
- **%2'lik Normal Agaroz Jel:** Kullanılacak jelin boyutuna göre gerekli olan çözelti miktarı belirlendi. Buna göre normal agarın 1X TBE içindeki %2'lik çözeltisi hazırlandı. Bunun için her 2g normal agar 100 ml 1X TBE tamponu ile karıştırıldı, mikrodalgada ısıtılarak çözüldü. Üzerine 3 µl Etidyum Bromür çözeltisinden ilave edilip iyice karıştırıldı. Bu karışım tarakları yerleştirilmiş jel kalıplarına hava kabarcığı kalmayacak şekilde döküldü ve katılaşması için bir süre oda sıcaklığında bekletildi. Sonra taraklar dikkatlice çekildi.
- **%3'lük Nüsv Agaroz Jel:** %2'lik Normal jel gibi hazırlandı. Ancak normal agar yerine 1X TBE içinde %3'lük nüsv agar çözeltisi kullanıldı.
- **DNA ladder çözeltisi:** 10 µl 0,5 µg/ml DNA ladder, 10 µl (6X) yükleme boyası ve 40 µl steril distile su karıştırılarak buzdolabında saklandı.

3.6.4. Gen Spesifik Amplifikasyon için Kullanılan Primerlerin Listesi

Primer	Dizilimi (5'-3')	Hedef Gen	Büyüklik	Kaynak
GSTM1-AA1(Thermo)	CAG CAT CTT GTG CTA CAT TGC CCG	GSTM1	231 bç*	163
GSTM1-AA2 (Thermo)	ATC TTC TCC TCT TCT GTC TC			
GSTM1-AA3 (Thermo)	TTC TGG ATT GTA GCA GAT CA			
MnSOD-F (Thermo)	CAG CCC AGC CTG CGT AGA CGG	MnSOD	172 bç	186
MnSOD-R (Thermo)	GCG TTG ATG TGA GGT TCC AG			
OGG1-F (lontek)	ACT GTC ACT AGT CTC ACC AG	hOGG1	207 bç	187
OGG1-R (lontek)	TGA ATT CGG AAG GTG CTT GGG GAA T			

bç=baz çifti

Toz halinde satın alınan her bir primer çözeltisi önce steril distile su ile 100 µM konsantrasyona getirildi ve ana stok çözelti olarak -20°C'de saklandı. Bu çözeltiden PCR karışımında kullanmak için ara stok çözelti olarak steril distile su ile 25 µM'lık çözelti hazırlandı ve -20°C'de saklandı.

3.6.5 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ve RFLP Metodu

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) DNA içerisinde yer alan, dizisi bilinen iki segment arasındaki özgün bir bölgeyi enzimatik olarak çoğaltmak için uygulanan bir yöntemdir. Metod basitçe tüp içerisinde nükleik asitlerin uygun koşullarda çoğaltılması esasına dayanır. Bir çeşit in vitro klonlama olarak da tanımlanan PCR yönteminin esası; 94°C-98°C aralığında gerçekleştirilen DNA'nın iki zincirinin yüksek sıcaklıkta birbirinden ayrılması (Denatürasyon), 37°C-65°C aralığında gerçekleştirilen sentetik oligonükleotidlerin hedef DNA'ya bağlanması (bağlanma=annealing) ve 72°C'de gerçekleştirilen zincirin yeni çift zincirli DNA'lar oluşturacak şekilde uzaması (Uzama=Extension) aşamalarından oluşur ve bu siklusların belirli sayıda tekrarlanmasına dayanır¹⁸⁸. Çalışmamızda PCR yöntemini inceleyeceğimiz genetik polimorfizmin bulunduğu gen sekansını çoğaltmak amacıyla kullandık. PCR ile çoğaltılan gen bölgesindeki ilgili baz değişiminin belirlenmesi için RFLP (Restriksiyon Fragment Length Polymorphism) yöntemini uyguladık. Bu metot ise DNA molekülünün bir restriksiyon enzimi ile muamele edilmesi sonucunda oluşan DNA fragmentlerinin, jel elektroforezi sonucunda büyüklüklerine göre ayrılması esasına dayanmaktadır¹⁸⁸.

3.6.6. GSTM1 Genotiplemesi

DNA örneklerinde GSTM1 delesyonunun saptanması için PCR uygulandı. Bu amaçla her bir örnek için; 0,25 mM dNTP çözeltisi, 1,5 mM MgCl₂ çözeltisi, her bir primer çözeltisinden 0,4 µM (GSTM1 AA1, AA2 ve AA3), 1x taq buffer ve 1 ünite taq DNA polimeraz çözeltisi steril distile su ile 9 µl hacme tamamlandı. Bu karışıma 1 µl DNA örneği eklendi iyice karıştırıldı ve PCR cihazına kondu. Ayrıca kör (blank) olarak DNA örneğinin eklenmediği bir karışım da hazırlandı.

GSTM1 PCR'ı için şartlar:

Şartlar	°C	Süre (dakika)
Başlangıç denatürasyonu	94	2
Denatürasyon	94	1
Bağlanma	53	1.30
Uzama	72	2
Son uzama	72	10
Siklus Sayısı	35	

GSTM1-AA3 primeri özel olarak GSTM1 genini amplifiye ederken, GSTM1-AA1 ve GSTM1-AA2, mü sınıfı başka bir geni (GSTM4) de amplifiye etmektedir. Bu üç primerle kontrol olarak kabul edilen 158 baz çiftlik ve GSTM1 (+) genotipi gösteren 231 baz çiftlik iki ürün elde edildi. (Şekil 21)

5'...**CGCCATCTTGTGCTACATTGCCCG**(*GSTM1AA1*)CACACAACCTG
TGTGAGTGTGGGTGGCTGCAATGTGTGGGGGAAGGTGGCCTCCT
CCTTGGCTGGGCTGTGATGCTGAGATTGAGTCTGTGTTTTGTGGGT
GGCAGGTGGG**GAGACAGAAGAGGAGAAGAT**(*GSTM1AA2*)TCGTGT
GGACATTTTGGAGAACCAGACCATGGACAACCATATGCAGCTGGGC
ATGATCTGCTACAATCCAGAA(*GSTM1AA3*)...3'

Şekil 21: PCR ile çoğaltılan ve GSTM1 genotiplemesi yapılan baz dizilimi (primerler koyu renk ile gösterilmiştir)¹⁸⁹

3.6.6.1. PCR Ürünlerinin Jele Uygulanması ve Elektroforez

GSTM1 genotiplemesi için yapılan PCR sonunda elde edilen ürünlerin gözlenmesi için ürünler mikrotiterde 6X yükleme boyası ile karıştırılıp %2'lik normal jele yüklendi (8 µl PCR ürünü 2 µl boya ile

kariştırıldı) ve 1X TBE ile dolu olan elektroforez tankına yerleştirildi. Ayrıca oluşan ürünlerin büyüklüğünü kontrol etmek için 100 bp'lik DNA ladder de jele yüklendi. Elektroforez tankı 110 V akımda 20 dakika süre çalıştırıldı. İşlem sonunda sürüklenen ürünler UV-transilluminatörde gözlemlendi. (Şekil 22)

DNA ladder	Örnek 1	Örnek 2	Örnek 3
231 bp			
158 bp			
	GSTM1 (+)	GSTM1 (-)	Kör

Şekil 22. GSTM1 genotiplemesinin şematik gösterimi

3.6.7. MnSOD Ala16Val Genotiplemesi

3.6.7.1. PCR

DNA örneklerinde MnSOD Ala16Val genotiplemesi için ilk önce tek nokta mutasyonunu içeren gen dizilimi PCR ile çoğaltıldı. Bu amaçla her bir örnek için; 0,25 mM dNTP çözeltisi, 1,5 mM MgCl₂ çözeltisi, her bir primer çözeltisinden 0,3 µM (MnSOD-F ve MnSOD-R), 1x taq buffer ve 1 ünite taq DNA polimeraz çözeltisi steril distile su ile 19 µl hacme tamamlandı. Bu karışıma 1 µl DNA örneği eklendi iyice karıştırıldı ve PCR cihazına kondu. Ayrıca kör (blank) olarak DNA örneğinin eklenmediği bir karışım da hazırlandı.

MnSOD Ala16Val genotiplemesi için PCR şartları:

Şartlar	°C	Süre (dakika)
Başlangıç denatürasyonu	94	2
Denatürasyon	94	1
Bağlanma	66	1
Uzama	72	1
Son uzama	72	7
Siklus sayısı	33	

PCR sonucunda 172 bç'lik PCR ürünü elde edildi. Bu ürünün baz dizilimi, Ala/Val aminoasit değişimine neden olan tek nokta mutasyonunun yeri ve primer dizilimleri Şekil 23'de verilmiştir.

```
5'..CAGCCCAGCCTGCGTAGACGGTCCCGCGGCGCTGACTGACCGG  
GCTGTGCTTTCTCGTCTTCAGCACCCAGCAGGCAGCTGGCTCCGGC/TT  
TTGGGGTATCTGGGCTCCAGGCAGAAGCACAGCCTCCCCGACCTGC  
CCTACGACTACGGCGCCCTGGAACCTCACATCAACGC...3'
```

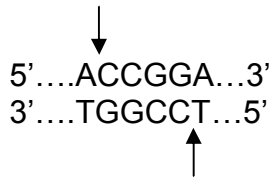
Şekil 23: MnSOD Ala16Val genotiplemesi için PCR ile çoğaltılan 172 bç'lik baz dizilimi (MnSOD-F ve MnSOD-R primerleri ve tek nokta mutasyonu koyu renk ile gösterilmiştir)¹⁹⁰

Çoğaltılan PCR ürünlerinin kontrolü için 10 µl PCR ürünü, 2 µl yükleme boyası ile karıştırıldı, %2'lik normal agaroz jele yüklendi 110 V'da 20 dakika elektroforeze tabi tutuldu ve 172 bç'lik ürünler UV-transilluminatörde gözlemlendi.

3.6.7.2. PCR Ürünlerinin BsaW I Restriksiyon Enzimi ile Kesilmesi

PCR ile elde edilen ürünler MnSOD Ala16Val genotiplemesi için BsaW I restriksiyon enzimi ile tek nokta mutasyonunun olduğu yerden kesilir. Bu amaçla, ependorfa her bir örnek için 7,6 µl steril distile su, 10 µl PCR ürünü, 2 µl 10X reaksiyon buffer (NEB buffer 2) ve 2 ünite (0,4 µl) BsaW I enzimi karıştırıldı. Karışım 60 °C'de kuru ısıtıcı üzerinde 16 saat inkübe edildi.

BsaW I enziminin tanıma bölgesi:



3.6.7.3. Kesim Ürünlerinin Jele Uygulanması ve Elektroforez

%3'lük nüvis agaroz jel içi 1X TBE ile dolu olan elektroforez tankına yerleştirildi. MnSOD Ala16Val genotiplemesi için çoğaltılan PCR ürünlerinin BsaW I restriksiyon enzimi ile kesilmesi ile elde edilen ürünlerin gözlenmesi için kesim ürünleri mikrotiterde 6X yükleme boyası ile

karıştırılıp %3'lük nüsvi jelle yüklendi (8 µl kesim ürünü 2 µl boya ile karıştırıldı). Ayrıca oluşan ürünlerin büyüklüğünü kontrol etmek için 100 bp'lik DNA ladder de jelle yüklendi. Elektroforez tankı 110 V akımda 20 dakika süre ile çalıştırıldı. İşlem sonunda sürüklenen ürünler UV-transilluminatörde gözlemlendi. (Şekil 24) Agaroz jelle 89 ve 83 bp'lik bantların ayrımı gözlenemediğinden genotiplendirme yapılırken Val genotiplendirmesi için 89bp'deki tek bantın gözlenmesi yeterli kabul edilmiştir.

DNA ladder	Örnek 1	Örnek 2	Örnek 3	Örnek 4
172 bp	■	■		
89 bp		■	■	
83 bp		■	■	
	MnSOD Ala/Ala	MnSOD Ala/Val	MnSOD Val/Val	Kör

Şekil 24: MnSOD Ala16Val genotiplendirmesinin şematik gösterimi

3.6.8. hOGG1 Ser326Cys Genotiplendirmesi

3.6.8.1. PCR

DNA örneklerinde hOGG1 Ser326Cys genotiplendirmesi için ilk önce tek nokta mutasyonunu içeren gen dizilimi PCR ile çoğaltıldı. Bu amaçla her bir örnek için; 0,25 mM dNTP çözeltisi, 1,5 mM MgCl₂ çözeltisi, her bir primer çözeltisinden 0,3 pmol (OGG1-F ve OGG1-R), 1x taq buffer ve 1 ünite taq DNA polimeraz çözeltisi steril distile su ile 19 µl hacme tamamlandı. Bu karışıma 1 µl DNA örneği eklendi iyice karıştırıldı ve PCR cihazına kondu. Ayrıca kör (blank) olarak DNA örneğinin eklenmediği bir karışım da hazırlandı.

hOGG1 Ser326Cys genotiplendirmesi için PCR şartları

Şartlar	⁰ C	Süre
Başlangıç denatürasyonu	94	2 dakika
Denatürasyon	94	15 saniye
Bağlanma	60	30 saniye
Uzama	72	35 saniye
Son uzama	72	10 dakika
Siklus sayısı	33	

PCR sonucunda 207 bç'lik PCR ürünü elde edildi. Bu ürünün baz dizilimi, Ser/Cys aminoasit değişimine neden olan tek nokta mutasyonunun yeri ve primer dizilimleri Şekil 25'de verilmiştir.

5'...**ACTGTCACTAGTCTCACCAG**CCCTGACCCCAGTGTACCCTCCT
CCCCACACAGACTCCACCCTCCTACAGGTGCTGTTCAAGTGCCGACC
TGCGCCAAT**C/G**CCGCCATGCTCAGGAGCCACCAGCAAAGCGCAGA
AAGGGTTCAAAGGGCCGGAAGGCTAGATGGGGCACCCCTGGACAA
AGAA**ATTCCCCAAGCACCTTCCCCTCCAT**...3'

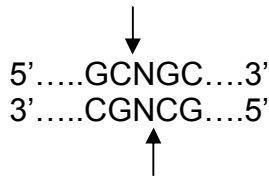
Şekil 25: hOGG1 Ser326Cys genotiplemesi için PCR ile çoğaltılan 207 bç'lik baz dizilimi (OGG1-F ve OGG1-R primerleri ve tek nokta mutasyonu koyu renk ile gösterilmiştir)¹⁹¹

Çoğaltılan PCR ürünlerinin kontrolü için 10 µl PCR ürünü, 2 µl yükleme boyası ile karıştırıldı, %2'lik normal agaroz jele yüklendi 110 V'da 20 dakika elektroforeze tabi tutuldu ve 207 bç'lik ürünler UV-transilluminatörde gözlemlendi.

3.6.8.2. PCR Ürünlerinin Fnu4H I Restriksiyon Enzimi ile Kesilmesi

PCR ile elde edilen ürünler hOGG1 Ser326Cys genotiplemesi için Fnu4H I restriksiyon enzimi ile tek nokta mutasyonunun olduğu yerden kesilir. Bu amaçla, ependorfa her bir örnek için 7,6 µl steril distile su, 10 µl PCR ürünü, 2 µl 10X reaksiyon buffer (NEB buffer 4) ve 2 ünite (0,4 µl) Fnu4H I enzimi karıştırıldı. Karışım 37°C'lik etüvde 16 saat inkübe edildi.

Fnu4H I enziminin tanıma bölgesi:



3.6.8.3. Kesim Ürünlerinin Jele Uygulanması ve Elektroforez

%3'lük nüsv agaroz jel içi 1X TBE ile dolu olan elektroforez tankına yerleştirildi. hOGG1 Ser326Cys genotiplemesi için çoğaltılan PCR ürünlerinin, Fnu4H I restriksiyon enzimi ile kesilmesi sonucunda elde edilen ürünlerin gözlenmesi amacıyla kesim ürünleri mikrotiterde 6X yükleme boyası ile karıştırılıp %3'lük nüsv jele yüklendi (8 µl kesim ürünü 2 µl boya ile karıştırıldı). Ayrıca oluşan ürünlerin büyüklüğünü kontrol etmek için 100 bç'lik DNA ladder de jele yüklendi. Elektroforez tankı 110 V akımda 20 dakika süre ile çalıştırıldı. İşlem sonunda sürüklenen ürünler UV-transilluminatörde gözlemlendi (Şekil 26). Agaroz jelde 107 ve 100 bç'lik bantların ayrımı gözlenemediğinden genotipleme yapılırken Cys genotiplemesi için 107 bç'deki tek bantın gözlenmesi yeterli kabul edilmiştir.

DNA ladder	Örnek 1	Örnek 2	Örnek 3	Örnek 4
207 bç	■	■		
107 bç		■	■	
100 bç		■	■	
	OGG1 Ser/Ser	OGG1 Ser/Cys	OGG1 Cys/Cys	Kör

Şekil 26. hOGG1 Ser326Cys genotiplemesinin şematik gösterimi

3.7. İstatistiksel Analiz Yöntemi

Verilerin analizi SPSS 11.5 paket programında yapıldı. Tanımlayıcı istatistikler sürekli değişkenler için ortalama $\pm$ std.sapma biçiminde kategorik değişkenler ise gözlem sayısı ve (%) şeklinde gösterildi. Sürekli ölçümlü değişkenlerin dağılımının normal dağılım varsayımına uygun olup olmadığı Shapiro Wilk testiyle incelendi. Bağımsız gruplar arasında ölçümle elde edilen özellikler yönünden farkın anlamlılığı, bağımsız grup sayısı iki olduğunda Student's t veya Mann Whitney U testiyle, bağımsız grup sayısı ikiden fazla olduğunda Tek Yönlü Varyans Analizi (One-Way ANOVA) veya Kruskal Wallis testiyle incelendi. Tek Yönlü Varyans analizi ya da Kruskal Wallis test istatistiğinin anlamlı görüldüğü yerlerde farka neden olan grubu belirlemek amacıyla sırasıyla; post hoc Tukey testi ya da Kruskal Wallis çoklu karşılaştırma testi kullanıldı. Olası tüm grup içi karşılaştırmalarda Bonferroni Düzeltmesine başvuruldu. GSH ve Comet parametrelerinin hem birbirleriyle hem de

sürekli değişkenler ile aralarında istatistiksel olarak anlamlı doğrusal ilişkinin olup olmadığı Pearson'un Korelasyon testiyle araştırıldı. Tek değişkenli istatistiksel işlemler sonucunda vaka ve kontrol grupları arasında comet parametreleri yönünden ortaya çıkan anlamlı farklılıklar yaş, cinsiyet, BMI, sigara, alkol ve beslenmeye göre düzeltme yapılarak çoklu doğrusal regresyon analizi ile yeniden incelendi. Grup etkisine ilişkin regresyon katsayısı, %95 güven aralığı ve anlamlılık düzeyleri hesaplandı. Dağılımı normale uymayan bağımlı değişkenlerin regresyon çözümlemesinde logaritmik dönüşümü kullanıldı. Kategorik karşılaştırmalar için Ki-Kare testi kullanıldı. GSTM1, MnSOD ve hOGG1 gen bölgelerindeki genotiplerin uyumluluğu Hardy-Weinberg dengesine göre hesaplatıldı. Aynı zamanda gen gen etkileşimleri dikkate alınarak referans kategorilere karşın riskli kategorilerin Odds Oranı ve %95 güven sınırları hesaplandı. $p < 0,05$ için sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4. 1. Demografik Bulgular

Çalışmamıza gönüllü olarak katılan hasta ve kontrol grubundaki bireyler, anket formundaki soruların yanıtlarına göre yaş, cinsiyet, BMI gibi demografik özellikleri açısından ve hastalık için risk faktörü olarak kabul edilen sigara ve alkol tüketimi, beslenme alışkanlığı ve meyve/sebze tüketimi açısından değerlendirildi. Bu özelliklerden BMI'in hasta grubunda kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olduğu gözlemlendi ($p=0,018$). Diğer özelliklerin hiçbirisi, gruplar arasında istatistiksel olarak farklı bulunmadı ($p>0,05$) (Tablo 6).

Tablo 6: Hasta ve kontrol grubunun demografik ve diğer özelliklerinin karşılaştırılması

	HASTA (n=40)	KONTROL (n=40)	p
Yaş (ort±SD)	46,3±15,4 (17-73)	43.2±13.4 (21-78)	>0,05
Cinsiyet (Erkek/Kadın)	23 (%57,5)/17 (%42,5)	16 (%40)/24 (%60)	>0,05
BMI (kg/m²) (ort±SD)	25,4±4,0	27,8±4,6	0,018
Sigara (sigara/gün)			
İçmeyen	24 (%60)	26 (%65)	>0,05
1-20 adet içen	9 (%22,5)	9 (%22,5)	>0,05
> 20 adet içen	7 (%17,5)	5 (%12,5)	>0,05
Alkol alışkanlığı (var/yok)	8 (%20)/32(%80)	5 (%12,5)/35 (%87,5)	>0,05
Beslenme alışkanlığı			
Sebze	12 (%30)	17 (%42,5)	>0,05
Karışık	21 (%52,5)	21 (%52,5)	>0,05
Et	7 (17,5)	2 (%5)	>0,05
Meyve tüketimi (günde)			
Az	4 (%10)	6 (%15)	>0,05
Orta	22 (%55)	15 (%37,5)	>0,05
Sık	14 (%35)	19 (%47,5)	>0,05

4.2. Modifiye Comet Yöntemi Sonuçları

Hasta ve kontrol grubunda bazal DNA hasarı, H₂O₂ indüksiyonu sonucunda oluşan pirimidin ve pürin baz hasarı, hücrelerin H₂O₂ indüksiyonuna duyarlılıkları, % DNA onarım kapasitesi, pirimidin ve pürin baz hasarlarının yüzde onarılma kapasiteleri Modifiye Comet yöntemi ile periferik kan lenfositlerinde incelenmiştir. Sonuçlar, kuyruktaki %DNA olarak ifade edilmiş ve tablo 7'de gösterilmiştir.

Tablo 7: Hasta ve kontrol grubunun Comet Yöntemi sonuçları (ortalama±standart sapma)

		Hasta	Kontrol	p
Bazal DNA hasarı	Sigara içen	7,96±1,73	6,87±1,50	>0,05
	Sigara içmeyen	7,52±1,49	6,45±1,34	0,010
	Toplam	7,70±1,6	6,66±1,40	<0,001
Pirimidin baz hasarı	Sigara içen	1,97±1,64	1,38±0,94	>0,05
	Sigara içmeyen	3,27±2,65	1,62±1,20	0,009
	Toplam	2,75±2,36	1,54±1,11	0,001
Pürin baz hasarı	Sigara içen	2,38±3,34	1,45±1,87	>0,05
	Sigara içmeyen	3,20±2,28	2,50±2,09	>0,05
	Toplam	2,87±2,74	2,13±2,06	>0,05
H₂O₂ duyarlılık	Sigara içen	13,28±2,52	10,59±1,82	>0,05
	Sigara içmeyen	16,19±5,22*	10,77±2,06	<0,001
	Toplam	15,02±4,54	10,71±1,96	<0,001
DNA onarım kapasitesi (%)	Sigara içen	30,59±16,49	31,55±16,99	>0,05
	Sigara içmeyen	30,15±14,35	29,90±9,16	>0,05
	Toplam	30,33±15,04	30,48±12,27	>0,05
Pirimidin baz hasarının onarılma kapasitesi (%)	Sigara içen	30,18±17,78	29,93±12,13	>0,05
	Sigara içmeyen	27,24±11,96	30,43±11,45	>0,05
	Toplam	28,42±14,42	30,25±11,54	>0,05
Pürin baz hasarının onarılma kapasitesi (%)	Sigara içen	28,17±14,75	28,05±8,45	>0,05
	Sigara içmeyen	27,65±15,55	27,90±12,02	>0,05
	Toplam	27,86±15,05	27,96±10,79	>0,05

Değerler kuyruktaki %DNA olarak ifade edilmiştir. *grup içi, p=0,025

Comet yöntemi sonuçlarına göre Bazal DNA hasarı, hasta grubunda (7,70±1,6) kontrole (6,66±1,40) göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (p<0,001). Bu anlamlılık her iki gruptaki sigara içmeyen bireyler kıyaslandığında da devam etmekte (p=0,010) ancak sigara içen bireylerde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmemektedir (p>0,05).

Hasta ve kontrol grubu okside olmuş pirimidin baz hasarı açısından kıyaslandığında hasta grubunun (2,75±2,36) kontrole (1,54±1,11) göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek pirimidin baz hasarına sahip olduğu gözlenmiştir (p=0,001). Bu anlamlılık her iki gruptaki sigara içmeyen bireyler kıyaslandığında da gözlenmektedir (p=0,009). Ancak sigara içen bireylerde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır (p>0,05). Hasta (2,87±2,74) ve kontrol (2,13±2,06) grubundaki pürin baz hasarı kıyaslandığında ise istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır (p>0,05).

Hasta ve kontrol grubundaki bireylerden alınan periferik kan lenfositlerinin H_2O_2 indüksiyonuna duyarlılıkları kıyaslandığında, hasta grubunun ($15,02 \pm 4,54$) kontrol grubuna ($10,71 \pm 1,96$) göre daha duyarlı olduğu ve bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlenmiştir ($p < 0,001$). Bu anlamlılık her iki gruptaki sigara içmeyen bireyler kıyaslandığında da gözlenmektedir ($p < 0,001$). Ayrıca hasta grubunda sigara içmeyen bireylerin ($16,19 \pm 5,22$) sigara içen bireylere ($13,28 \pm 2,52$) göre H_2O_2 indüksiyonuna daha duyarlı oldukları saptanmıştır. ($p = 0,025$)

Hasta ve kontrol grubunda %DNA onarım kapasitesi, pirimidin ve pürin baz hasarlarının yüzde onarılma kapasiteleri kıyaslandığında her üç parametre için de anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir ($p > 0,05$).

İstatistiksel olarak anlamlı farklılığın gözlemlendiği bazal DNA hasarı, pirimidin baz hasarı ve H_2O_2 indüksiyonunu etkileyebilecek parametreler olan yaş, cinsiyet, BMI, sigara içme, alkol tüketimi, beslenme alışkanlığı ve meyve-sebze tüketimine göre düzeltme yapıldığında sonuç aynı kalmış istatistiksel anlamlılık devam etmiştir. Bu veriler ile ilgili regresyon modeli tablo 8’de verilmiştir.

Tablo 8: Comet Yöntemi sonuçlarını etkileyebilecek parametrelerin düzeltildiği durumda hasta ve kontrol grubu için sonuçlar

Bağımlı Değişkenler	Regresyon Katsayısı	% 95 Güven Aralığı		p değeri
		Alt Sınır	Üst Sınır	
Bazal DNA hasarı	1,255	0,508	2,003	0,001
Pirimidin baz hasarı	0,462	0,109	0,504	0,01
H_2O_2 duyarlılık	0,318	0,199	0,437	<0,001

Hasta ve kontrol grubunda elde edilen Comet sonuçlarının çeşitli değişkenlere bağlı olarak değişimi incelenmiş ve sonuçlar Tablo 9’da verilmiştir.

Hasta olan 40 yaş üzerindeki bireylerin bazal DNA hasarı ($7,66 \pm 1,70$), pirimidin baz hasarı ($2,72 \pm 1,86$) ve H_2O_2 duyarlılıkları ($14,64 \pm 4,06$) 40 yaş üzerindeki kontrol grubuna göre (sırasıyla; $6,44 \pm 1,36$; $1,46 \pm 1,28$; $10,44 \pm 2,03$) istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Hasta grubunda 40 yaşın altındaki bireylerde ($15,73 \pm 5,41$) ise H_2O_2 duyarlılıkları kontrol grubuna ($11,11 \pm 1,83$) göre anlamlı olarak

yüksek bulunmuştur. p değerleri Bonferroni düzeltmesine göre $<0,025$ olduğunda anlamlı kabul edilmiştir. Ayrıca kontrol grubunda 40 yaşın üstünde olan bireylerin ($24,46 \pm 10,01$) yine aynı grupta 40 yaşın altında olan bireylere ($33,20 \pm 10,01$) göre pürin baz hasarının yüzde onarılma kapasitesinin istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olduğu bulunmuştur ($p=0,01$).

Comet yöntemi sonuçları cinsiyet açısından değerlendirildiğinde erkek hastaların bazal DNA hasarının ($7,77 \pm 1,74$) erkek kontrol grubuna ($6,46 \pm 1,419$) göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu gözlenmiştir. Hem erkek hem de kadın hasta grubunun H_2O_2 duyarlılıkları (sırasıyla; $14,30 \pm 3,31$; $16,00 \pm 5,78$) kontrol grubundaki erkek ve kadın bireylere göre (sırasıyla; $10,06 \pm 1,44$; $11,14 \pm 2,16$) anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. p değerleri Bonferroni düzeltmesine göre $<0,025$ olduğunda anlamlı kabul edilmiştir. Ayrıca hasta grubundaki erkek bireylerin ($25,61 \pm 14,61$) yine hasta grubundaki kadın bireylere ($36,71 \pm 13,51$) göre %DNA onarım kapasiteleri istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuştur ($p=0,019$).

Hasta ve kontrol grubundaki bireyler BMI açısından üç gruba ayrılmıştır. BMI'leri 18,5-24,9 arasında olanlar normal, 25-29,9 arasında olanlar kilolu, 30 veya daha yüksek olanlar ise obez olarak değerlendirilmiştir. Pirimidin baz hasarı ve H_2O_2 duyarlılığı hasta grubundaki obez bireylerde (sırasıyla; $4,80 \pm 2,36$; $17,37 \pm 5,26$) kontrol grubundaki obez bireylere göre (sırasıyla; $1,45 \pm 1,47$; $10,38 \pm 2,09$) istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Normal kilolu ve kilolu bireylerde ise bu anlamlılık sadece H_2O_2 duyarlılığı açısından tespit edilmiştir. p değeri Bonferroni düzeltmesine göre $<0,0167$ olduğunda anlamlı kabul edilmiştir.

Hasta grubunda alkol kullanmayan bireylerin, pirimidin baz hasarı ve H_2O_2 duyarlılıkları (sırasıyla; $3,24 \pm 2,34$; $15,24 \pm 4,92$) kontrol grubunda alkol kullanmayan bireylere göre (sırasıyla; $1,54 \pm 1,14$; $10,61 \pm 15,24$) anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. p değeri Bonferroni düzeltmesine göre $<0,025$ olduğunda anlamlı kabul edilmiştir. Ayrıca hasta grubu içinde alkol kullanan bireylerdeki pirimidin ve pürin baz hasarının (sırasıyla; $0,80 \pm 1,21$; $0,41 \pm 2,37$) alkol kullanmayan bireylere kıyasla (sırasıyla; $3,24 \pm 2,34$; $3,49 \pm 2,49$) anlamlı olarak düşük olduğu gözlenmiştir (p değeri sırasıyla; 0,007; 0,003). Alkol kullanmayan hasta grubunun pirimidin baz hasarı yüzde onarım kapasitesinin ($25,88 \pm 13,87$) alkol kullananlara göre ($38,57 \pm 12,63$) istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olduğu gözlenmiştir ($p=0,024$).

Beslenme alışkanlıkları yönünden dengeli beslenen hasta grubunda gözlenen bazal DNA hasarının ($7,84 \pm 1,52$) dengeli beslenen kontrol grubuna göre ($6,55 \pm 1,23$) istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu bulunmuştur. Yine dengeli beslenen hasta grubunun H_2O_2 duyarlılığının ($15,08 \pm 4,32$) kontrol grubuna göre ($11,14 \pm 2,14$) istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu gözlenmiştir. Bireyler meyve tüketimi yönünden incelendiğinde ise tüketimin az olduğu hasta grubunda ($14,80 \pm 2,74$) kontrol grubuna göre ($9,56 \pm 1,60$) anlamlı olarak yüksek H_2O_2 duyarlılığı saptanmıştır. Orta düzeyde meyve tüketimine sahip hasta grubunda ise hem pirimidin baz hasarı hem de H_2O_2 duyarlılığı açısından (sırasıyla; $3,18 \pm 2,82$; $16,51 \pm 4,86$) kontrol grubuna göre (sırasıyla $1,59 \pm 0,93$; $10,64 \pm 1,74$) istatistiksel olarak anlamlı yüksek sonuçlar elde edilmiştir. p değerleri Bonferroni düzeltmesine göre $<0,0167$ olduğunda anlamlı kabul edilmiştir.

Tablo 9: Hasta ve kontrol grubunda Comet Yöntemi sonuçlarını etkileyebilecek parametrelerin incelenmesi (ortalama±standart sapma)

	N		Bazal DNA Hasarı		Pirimidin Baz Hasarı		Pürin Baz Hasarı		H ₂ O ₂ duyarlılık	
	Kontrol	Hasta	Kontrol	Hasta	Kontrol	Hasta	Kontrol	Hasta	Kontrol	Hasta
YAŞ										
≤40	16	14	6,82±1,46	7,77±1,39	1,66±0,82	2,81±3,17	2,32±2,25	3,84±2,91	11,11±1,83	15,73±5,41*
>40	24	26	6,44±1,36	7,66±1,70*	1,46±1,28	2,72±1,86*	2,01±1,96	2,36±2,55	10,44±2,03	14,64±4,06*
p (grup içi)										
CİNSİYET										
Kadın	24	17	6,69±1,41	7,60±1,39	1,70±1,10	3,21±2,87	2,46±1,91	3,43±2,85	11,14±2,16	16,00±5,78*
erkek	16	23	6,46±1,41	7,77±1,74*	1,30±1,19	2,41±1,91	1,64±2,23	2,47±2,64	10,06±1,44	14,30±3,31*
p (grup içi)										
BMI (kg/m²)										
Normal	10	19	6,29±1,09	7,30±1,35	1,43±0,95	2,49±2,63	2,31±2,10	3,40±2,73	10,30±1,39	13,60±3,82 [#]
Kilolu	16	15	7,10±1,35	8,09±1,72	1,68±0,87	2,27±1,59	1,63±2,37	1,92±2,75	11,26±2,12	15,89±4,78 [#]
Obez	14	6	6,24±1,56	7,96±1,88	1,45±1,47	4,80±2,36 [#]	2,58±1,61	3,60±2,48	10,38±2,09	17,37±5,26 [#]
p (grup içi)										
ALKOL										
içen	5	8	6,86±1,89	8,51±1,89	1,50±1,02	0,80±1,21	0,28±2,25	0,41±2,37	11,40±1,24	14,17±2,50
içmeyen	35	32	6,56±1,34	7,50±1,46	1,54±1,14	3,24±2,34*	2,40±1,92	3,49±2,49	10,61±15,24	15,24±4,92*
p (grup içi)						0,007		0,003		
Beslenme										
sebze	17	12	6,83±1,57	7,38±1,36	1,84±1,22	2,73±2,38	1,94±2,21	3,15±1,44	10,36±1,70	14,80±5,95
et	2	7	5,13±0,82	7,82±2,21	0,33±0,11	3,49±2,92	1,73±0,94	2,73±4,06	9,09±0,29	15,23±2,57
dengeli	21	21	6,55±1,23	7,84±1,52 [#]	1,41±0,99	2,52±2,23	2,33±2,06	2,76±2,91	11,14±2,14	15,08±4,32 [#]
p (grup içi)										
Meyve tüketimi										
Az	6	4	6,42±1,83	8,81±2,37	1,28±1,70	2,13±0,92	0,84±2,44	1,35±4,10	9,56±1,60	14,80±2,74 [#]
orta	15	22	6,48±1,27	7,52±1,54	1,59±0,93	3,18±2,82 [#]	1,84±1,29	3,40±2,86	10,64±1,74	16,51±4,86 [#]
sık	19	14	6,74±1,41	7,66±1,40	1,57±1,08	2,25±1,74	2,77±2,27	2,48±2,02	11,13±2,15	12,75±3,57
p (grup içi)										

Değerler kuyruktaki %DNA olarak ifade edilmiştir. *p<0,025 kontrole göre (Bonferroni düzeltmesi), [#]p<0,0167 kontrole göre (Bonferroni düzeltmesi)

Tablo 9 devamı

	N		DNA onarım kapasitesi (%)		Pirimidin baz hasarının onarılma kapasitesi (%)		Pürin baz hasarının onarılma kapasitesi (%)	
	Kontrol	Hasta	Kontrol	Hasta	Kontrol	Hasta	Kontrol	Hasta
YAŞ								
≤40	16	14	33,84±13,42	36,07±15,69	32,30±12,24	27,37±13,20	33,20±10,01	26,91±18,07
>40	24	26	28,24±11,17	27,24±14,01	28,89±11,10	28,98±15,26	24,46±10,01	28,37±13,51
<i>p (grup içi)</i>							0,010	
CİNSİYET								
Kadın	24	17	33,82±13,34	36,71±13,51	31,20±12,43	25,32±13,22	27,72±10,72	28,14±16,21
erkek	16	23	25,47±8,62	25,61±14,61	28,83±10,28	30,71±15,13	28,30±11,25	27,65±14,50
<i>p (grup içi)</i>				0,019				
BMI (kg/m²)								
Normal	10	19	29,92±10,53	31,28±14,58	27,53±9,59	31,81±14,03	33,77±9,56	32,21±17,48
Kilolu	16	15	28,20±10,78	26,73±13,19	29,98±10,23	24,71±15,14	25,46±10,22	24,70±10,84
Obez	14	6	33,48±14,99	36,31±20,65	32,50±14,28	26,95±13,60	26,65±11,42	21,96±13,90
<i>p (grup içi)</i>								
ALKOL								
içen	5	8	30,91±5,34	28,75±18,99	34,60±8,71	38,57±12,63	28,58±9,83	31,46±18,45
içmeyen	35	32	30,42±13,02	30,73±14,22	29,63±11,86	25,88±13,87	27,87±11,05	26,95±14,28
<i>p (grup içi)</i>						0,024		
Beslenme								
sebze	17	12	28,32±12,40	34,12±15,97	29,34±11,53	26,72±15,20	25,29±10,18	26,37±17,22
et	2	7	33,78±0,72	27,21±18,40	32,26±13,73	28,08±15,94	34,03±10,89	33,83±18,51
dengeli	21	21	31,91±12,79	29,20±13,63	30,80±11,94	29,50±14,12	29,54±1,22	26,71±12,67
<i>p (grup içi)</i>								
Meyve tüketimi								
Az	6	4	32,32±13,18	22,24±13,81	29,14±16,61	23,81±12,73	35,19±9,70	31,42±10,11
orta	15	22	30,99±15,37	33,24±16,99	33,28±10,45	29,16±14,93	27,95±8,39	28,37±16,23
sık	19	14	29,49±9,59	28,06±11,30	28,22±10,69	28,57±14,80	25,68±12,19	26,03±14,91
<i>p (grup içi)</i>								

Değerler kuyruktaki %DNA olarak ifade edilmiştir.

4.3. Hasta ve Kontrol Grubunun GSH Konsantrasyonları

Hasta grubunda ortalama GSH konsantrasyonu $1,12 \pm 0,32$, kontrol grubunda ortalama GSH konsantrasyonu ise $1,24 \pm 0,36$ olarak bulunmuştur. Hasta ve kontrol grubunda ortalama GSH konsantrasyonları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. ($p > 0,05$). GSH konsantrasyonları her iki grupta sigara içme alışkanlığına göre de incelenmiş ve sigara içen kontrol grubundaki bireylerin ($1,44 \pm 0,41$) sigara içen hasta bireylere göre ($1,08 \pm 0,32$) istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek GSH konsantrasyonuna sahip olduğu bulunmuştur ($p = 0,018$). Kontrol grubunda sigara içen ve içmeyen bireyler GSH konsantrasyonları yönünden kıyaslandığında sigara içmeyen bireylerin ($1,44 \pm 0,41$) içenlere göre ($1,14 \pm 0,28$) daha yüksek GSH konsantrasyonuna sahip olduğu gözlenmiştir ($p = 0,018$) (Tablo 10).

Tablo 10: Hasta ve kontrol grubunun GSH konsantrasyonları

	GSH konsantrasyonu ($\mu\text{M/ml}$) (ortalama $\pm$ SD)		p değeri*
Hasta (n=36)	Sigara içen (n=15)	$1,08 \pm 0,32$	0,018
	Sigara içmeyen (n=21)	$1,14 \pm 0,33$	0,814
	<i>p (grup içi)</i>		0,657
	Toplam	$1,12 \pm 0,32$	0,074
Kontrol (n=40)	Sigara içen (n=14)	$1,14 \pm 0,28$	
	Sigara içmeyen (n=26)	$1,44 \pm 0,41$	
	<i>p (grup içi)</i>		0,018
	Toplam	$1,24 \pm 0,36$	

* kontrole göre

Hasta ve kontrol grubunda elde edilen GSH konsantrasyonunun çeşitli değişkenlere bağlı olarak değişimi incelenmiş ve sonuçlar Tablo 11’de verilmiştir. Her iki grupta yaş, cinsiyet, BMI, alkol kullanımı, beslenme alışkanlığı ve meyve tüketimi ile GSH konsantrasyonu arasındaki ilişki incelenmiş ve bu parametrelerin hiçbirinin GSH konsantrasyonunu etkilenmediği gözlenmiştir ($p > 0,05$).

Tablo 11: Hasta ve kontrol grubunda GSH konsantrasyonunu etkileyebilecek parametrelerin incelenmesi

	GSH KONSANTRASYONU ($\mu\text{M/ml}$) (ortalama$\pm$SD)		
	KONTROL (n=36)	HASTA (n=40)	p değeri*
YAŞ			
≤ 40	1,23 $\pm$ 0,32	1,20 $\pm$ 0,46	>0,05
>40	1,25 $\pm$ 0,39	1,07 $\pm$ 0,18	>0,05
p (grup içi)	>0,05	>0,05	
CİNSİYET			
<i>Kadın</i>	1,24 $\pm$ 0,37	1,15 $\pm$ 0,35	>0,05
<i>Erkek</i>	1,25 $\pm$ 0,34	1,09 $\pm$ 0,30	>0,05
p (grup içi)	>0,05	>0,05	
BMI (kg/m^2)			
<i>Normal</i>	1,26 $\pm$ 0,32	1,03 $\pm$ 0,25	>0,05
<i>Aşırı kilolu</i>	1,17 $\pm$ 0,39	1,18 $\pm$ 0,33	>0,05
<i>Obez</i>	1,31 $\pm$ 0,35	1,23 $\pm$ 0,45	>0,05
p (grup içi)	>0,05	>0,05	
ALKOL			
<i>İçen</i>	1,40 $\pm$ 0,31	1,22 $\pm$ 0,43	>0,05
<i>İçmeyen</i>	1,22 $\pm$ 0,36	1,10 $\pm$ 0,30	>0,05
p (grup içi)	>0,05	>0,05	
Beslenme			
<i>Sebze</i>	1,19 $\pm$ 0,22	1,08 $\pm$ 0,37	>0,05
<i>Et</i>	1,01 $\pm$ 0,01	1,02 $\pm$ 0,24	>0,05
<i>Dengeli</i>	1,31 $\pm$ 0,45	1,19 $\pm$ 0,31	>0,05
p (grup içi)	>0,05	>0,05	
Meyve tüketimi			
<i>Az</i>	1,30 $\pm$ 0,34	0,89 $\pm$ 0,21	>0,05
<i>Orta</i>	1,27 $\pm$ 0,33	1,16 $\pm$ 0,32	>0,05
<i>Sık</i>	1,20 $\pm$ 0,40	1,13 $\pm$ 0,34	>0,05
p (grup içi)	>0,05	>0,05	

*kontrole göre

4.4. Comet Yöntemi Sonuçlarını ve GSH Konsantrasyonu Etkileyebilecek Değişkenlerin İncelenmesi

Sürekli değişken olduklarından yaş ve BMI'in Comet yöntemi sonuçlarını ve GSH konsantrasyonlarını hasta ve kontrol grubunda ve toplamda ne kadar etkilediği araştırılmış ve sonuçlar tablo 12 ve 13'de verilmiştir. Bu verilere göre kontrol grubunda ve toplam popülasyonda yaş ile pürin baz hasarının yüzde onarılma kapasitesi arasında ters yönlü ve istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon gözlenmiştir (sırasıyla p değerleri: 0,002; 0,016). Yine toplam popülasyonda BMI ile pürin baz hasarının yüzde onarılma kapasitesi arasında ters yönlü ve istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon gözlenmiştir ($p=0,026$). Diğer Comet parametreleri için ise anlamlı bir ilişki bulunmamıştır ($p>0,05$).

Tablo 12: Yaş ile GSH konsantrasyonu ve Comet Yöntemi sonuçları arasındaki korelasyon değerleri

YAŞ								
	GSH konsantrasyonu (µM/ml)	Bazal DNA Hasarı	Pirimidin Baz Hasarı	Pürin Baz Hasarı	H ₂ O ₂ duyarlılık	DNA onarım kapasitesi (%)	Pirimidin baz hasarının onarılma kapasitesi (%)	Pürin baz hasarının onarılma kapasitesi (%)
KONTROL	-0,139	-0,094	-0,098	0,181	-0,114	-0,115	-0,106	-0,483
<i>p değeri</i>	0,392	0,562	0,548	0,263	0,483	0,479	0,516	0,002*
HASTA	-0,170	-0,029	0,015	-0,220	0,012	-0,001	0,033	-0,137
<i>p değeri</i>	0,321	0,861	0,925	0,172	0,942	0,995	0,840	0,398
Toplam	-0,161	-0,015	0,018	-0,044	0,039	-0,049	-0,031	-0,268
<i>p değeri</i>	0,165	0,893	0,873	0,700	0,730	0,668	0,782	0,016*

Veriler korelasyon katsayısı=r değeri, *p<0,05

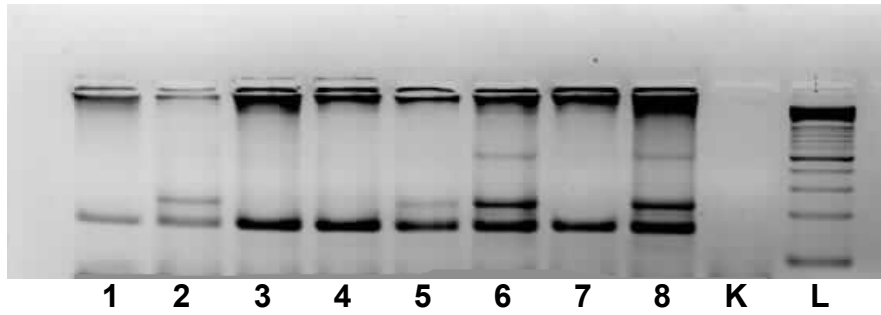
Tablo 13: BMI ile GSH konsantrasyonu ve Comet Yöntemi sonuçları arasındaki korelasyon değerleri

BMI								
	GSH konsantrasyonu (µM/ml)	Bazal DNA Hasarı	Pirimidin Baz Hasarı	Pürin Baz Hasarı	H ₂ O ₂ duyarlılık	DNA onarım kapasitesi (%)	Pirimidin baz hasarının onarılma kapasitesi (%)	Pürin baz hasarının onarılma kapasitesi (%)
KONTROL	-0,53	-0,130	0,112	0,105	-0,044	0,084	0,236	-0,218
<i>p değeri</i>	0,747	0,423	0,490	0,518	0,788	0,607	0,143	0,178
HASTA	0,322	0,149	0,166	-0,093	0,233	0,120	-0,164	-0,307
<i>p değeri</i>	0,056	0,360	0,306	0,570	0,147	0,461	0,311	0,054
Toplam	0,206	-0,086	0,040	-0,041	-0,036	0,099	0,045	-0,249
<i>p değeri</i>	0,075	0,450	0,726	0,718	0,752	0,383	0,690	0,026*

Veriler korelasyon katsayısı=r değeri, *p<0,05

4.5. GSTM1 Genotip Analizi Sonuçları

İzole edilen DNA'lar, GSTM1 genotiplemesi için PCR'a uygulanmış ve PCR ürünleri jele yüklenerek elektroforeze tabi tutulmuştur. GSTM1 (+) olan bireyler 157 bp ve 230 bp'de bant vermektedirler. Şekil 25'de GSTM1 (+) veya GSTM1 (-) genotipleri görülmektedir.



Şekil 27: GSTM1 genotiplemesi. 1, 3, 4, 5, 7 GSTM1(-); 2, 6, 8 GSTM1 (+); K=Kör, L=100 bp'lik DNA ladder

GSTM1 (-) genotip frekansı, hasta grubunda %67,5 kontrol grubunda %57,5 bulunmuştur. GSTM1 (+) genotip frekansı ise hasta grubunda %32,5 kontrol grubunda %42,5 olarak bulunmuştur. Hasta ve kontrol grubundaki bireylerin her iki genotip frekansları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir. GSTM1 (-) genotipinin hastalık riskini arttırdığına dair bir sonuç da bulunmamıştır (OR= 1,53, %95 GA=0,62-3,82, p=0,356) (Tablo 14).

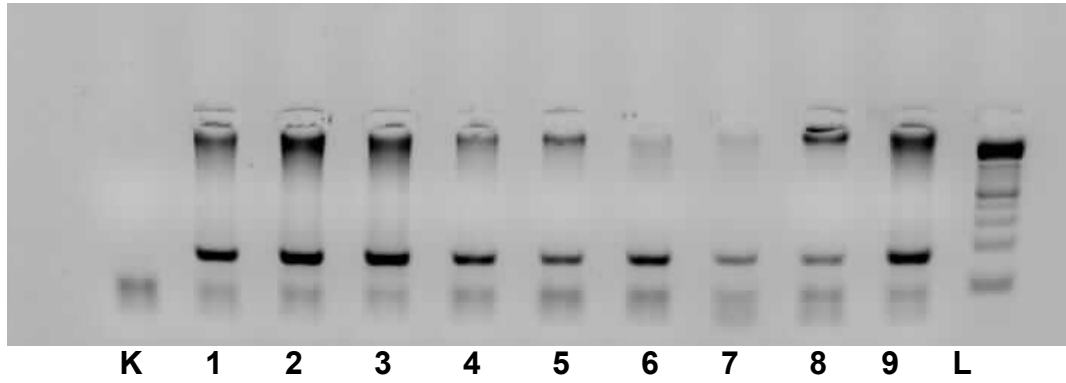
Tablo 14: Hasta ve kontrol grubunun GSTM1 genotip frekansları

GSTM1	Kontrol n (%)	Hasta n (%)	OR (%95GA)	p
(+)	17 (42,5)	13 (32,5)	1,0	0,356
(-)	23 (57,5)	27 (67,5)	1,53 (0,62 – 3,82)	

GSTM1 alel frekansları dağılımı Hardy-Weinberg eşitliğine göre uyumlu bulunmuştur ($\chi^2=0,452$, p=0,501)

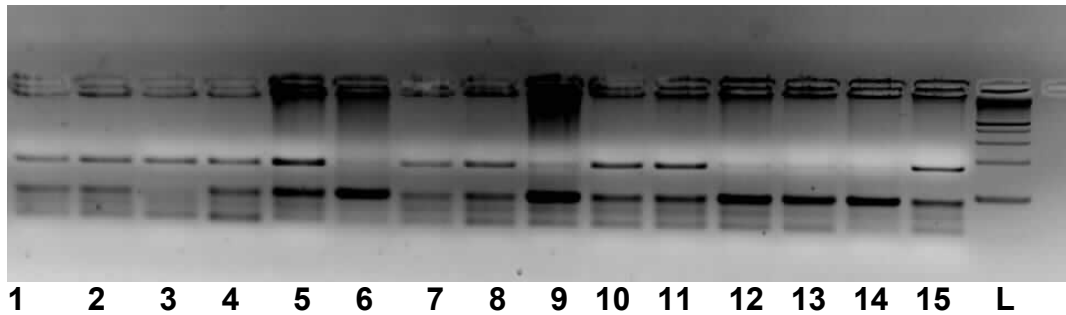
4.6. MnSOD Ala16Val Genotip Analizi Sonuçları

İzole edilen DNA'lar, MnSOD Ala16Val genotiplemesi için PCR'a uygulanmış ve PCR ürünleri jele yüklenerek elektroforeze tabi tutulmuştur. 172 bp'de bant veren bu PCR ürünleri Şekil 26'da gösterilmektedir.



Şekil 28: MnSOD Ala16Val genotiplemesi için çoğaltılan PCR ürünleri. K=Kör, L=100 bp'lik DNA ladder

MnSOD PCR ürünleri Ala16Val genotiplemesi için *BsaW*1 enzimi ile kesilmiştir. Kesim sonucunda oluşan ürünlerin jele yüklenerek elektroforezde sürüklenmesiyle Ala/Ala genotipi için 172 bp'de tek bant, Ala/Val genotipi için 172 bp ve 88 bp'de çift bant ve Val/Val genotipi için de 88 bp'de tek bant gözlenmiştir (Şekil 27).



Şekil 29: MnSOD PCR ürünlerinin *BsaW*1 ile kesilmesi sonucunda oluşan kesim ürünleri. 3 Ala/Ala; 1, 2, 4, 5, 7, 8, 10, 11, 15 Ala/Val; 6, 9, 12, 13, 14 Val/Val. L=100 bp'lik DNA ladder

Tablo 15: Hasta ve kontrol grubunun MnSOD Ala16Val genotip frekansları

MNSOD	Kontrol n(%)	Hasta n (%)	OR (%95GA)	p
Ala/Ala	8 (20,0)	9 (22,5)	1,0	-
Ala/Val	23 (57,5)	20 (50,0)	0,77 (0,25 – 2,38)	0,653
Val/Val	9 (22,5)	11 (27,5)	0,92 (0,25 – 3,37)	0,900
Ala/Val+Val/Val	32 (80,0)	31 (77,5)	0,86 (0,29 – 2,52)	0,785

Hasta ve kontrol grubunda Ala16Val genotip ve alel frekansları incelenmiş ve sonuçlar sırasıyla Tablo 15 ve Tablo 16’da verilmiştir. Ala/Ala, Ala/Val ve Val/Val genotip frekansları hasta grubunda sırasıyla %22,5, %50, %27,5; kontrol grubunda ise %20, %57,5, %22,5 bulunmuştur. Bu genotip dağılımları hasta ve kontrol grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir fark göstermemektedir (sırasıyla p değerleri=0,653, 0,900). Ala/Val veya Val/Val genotipine sahip olmanın Ala/Ala genotipine kıyasla hastalık riski açısından anlamlı bir farka neden olmadığı gözlenmiştir [sırasıyla OR (%95GA); 0,77 (0,25-2,38), 0,92 (0,25-3,37)]. Ala/Ala referans genotipine karşılık Ala/Val heterozigot ve Val/Val homozigot mutant genotipleri toplamı (Ala/Val+Val/Val) riskli varyant genotipler olarak hasta ve kontrol gruplarında karşılaştırılmış ve istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç bulunmamıştır (p=0,785, OR=0,86, %95 GA=0,29-2,52).

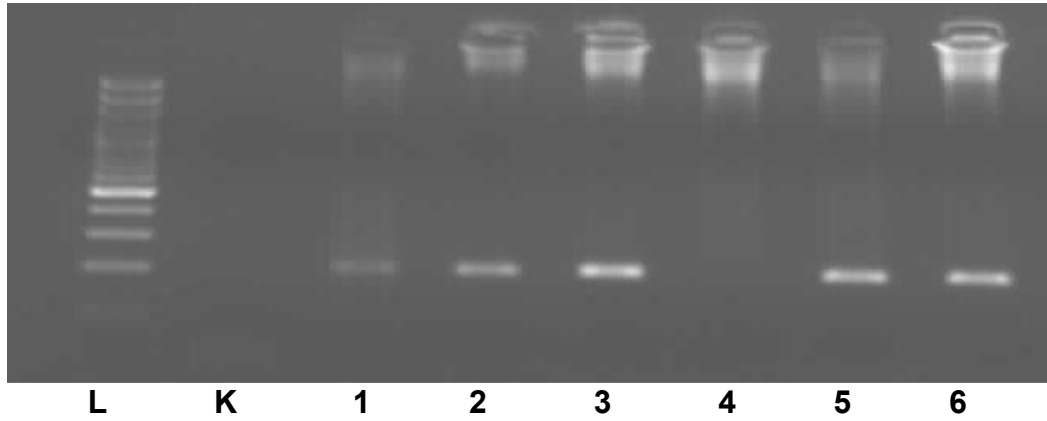
Tablo 16: Hasta ve kontrol grubunda MnSOD Ala16Val alel frekansları

Alel	Kontrol n (%)	Hasta n (%)	OR (%95GA)	p
Ala	39 (48,8)	38 (47,5)	1,0	0,874
Val	41 (51,2)	42 (52,5)	1,05 (0,56 – 1,95)	

Hasta ve kontrol grubunda Ala16Val alel frekansları incelenmiş ve sonuçlar tablo 16’da verilmiştir. Hasta grubunda Ala alel frekansı 0,48 Val alel frekansı 0,52; kontrol grubunda ise Ala alel frekansı 0,49 Val alel frekansı ise 0,51 bulunmuştur. Kontrol ve hasta grupları arasındaki bu dağılım istatistiksel olarak anlamlı bir fark göstermemektedir (p=0,874). Val mutant aleline sahip olmak Ala aleline göre hastalık açısından anlamlı bir riske neden olmamaktadır (OR=1,05; %95 GA=0,56-1,95). MnSOD Ala16Val alel frekansları dağılımı Hardy-Weinberg eşitliğine göre uyumlu bulunmuştur ($\chi^2=0,908$, p=0,340).

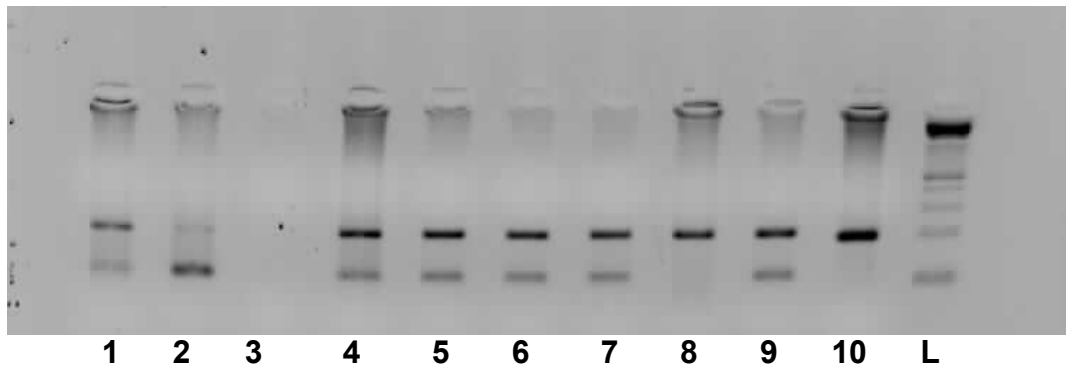
4.7. hOGG1 Ser326Cys Genotip Analizi Sonuçları

İzole edilen DNA'lar, hOGG1 Ser326Cys genotiplemesi için PCR'a uygulanmış ve PCR ürünleri jele yüklenerek elektroforeze tabi tutulmuştur. 207 bp'de bant veren bu PCR ürünleri Şekil 28'de gösterilmektedir.



Şekil 30: hOGG1 Ser326Cys genotiplemesi için çoğaltılan PCR ürünleri. K=Kör, L=100 bp'lik DNA ladder

hOGG1 PCR ürünleri Ser326Cys genotiplemesi için *Fnu4H I* enzimi ile kesilmiştir. Kesim sonucunda oluşan ürünlerin jele yüklenerek elektroforezde sürüklenmesiyle Ser/Ser genotipi için 207 bp'de tek bant, Ser/Cys genotipi için 207 bp ve 107 bp'de çift bant ve Cys/Cys genotipi için de 107 bp'de tek bant gözlenmiştir (Şekil 29).



Şekil 31: hOGG1 PCR ürünlerinin *Fnu4H I* ile kesilmesi sonucunda oluşan kesim ürünleri. 8, 10 Ser/Ser; 1, 4, 5, 6, 7, 9 Ser/Cys; 2 Cys/Cys. L=100 bp'lik DNA ladder

Hasta ve kontrol grubunda Ser336Cys genotip ve alel frekansları incelenmiş ve sonuçlar sırasıyla Tablo 17 ve Tablo 18’de verilmiştir. Ser/Ser, Ser/Cys ve Cys/Cys genotip frekansları hasta grubunda sırasıyla %32,5, %62,5, %5; kontrol grubunda ise %52,5, %42,5, %5 bulunmuştur. Bu genotip dağılımları hasta ve kontrol grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir fark göstermemektedir (sırasıyla p değerleri= 0,065, 1,00). Ser/Cys veya Cys/Cys genotipine sahip olmanın Ser/Ser genotipine kıyasla hastalık riski açısından anlamlı bir farka neden olmadığı gözlenmiştir [sırasıyla OR (%95GA); 2,38 (0,94-5,99), 1,61 (0,20-12,91). Ser/Ser referans genotipine karşılık Ser/Cys heterozigot ve Cys/Cys homozigot mutant genotipleri toplamı (Ser/Cys+Cys/Cys) riskli varyant genotipler olarak hasta ve kontrol gruplarında karşılaştırılmış ve istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç bulunmamıştır (p=0,07, OR=2,30, %95 GA=0,93-5,69).

Tablo 17: Hasta ve kontrol grubunda hOGG1 Ser326Cys genotip frekansları

hOGG1	Kontrol n (%)	Hasta n (%)	OR (%95GA)	p
Ser/Ser	21 (52,5)	13 (32,5)	1,0	-
Ser/Cys	17 (42,5)	25 (62,5)	2,38 (0,94 – 5,99)	0,065
Cys/Cys	2 (5,0)	2 (5,0)	1,61 (0,20 – 12,91)	1,00
Ser/Cys+Cys/Cys	19 (47,5)	27 (67,5)	2,30 (0,93 – 5,69)	0,070

Hasta ve kontrol grubunda Ser326Cys alel frekansları incelenmiş ve sonuçlar tablo 18’de verilmiştir. Hasta grubunda Ser alel frekansı 0,64, Cys alel frekansı 0,36; kontrol grubunda ise Ser alel frekansı 0,74, Cys alel frekansı ise 0,26 bulunmuştur. Kontrol ve hasta grupları arasındaki bu dağılım istatistiksel olarak anlamlı bir fark göstermemektedir (p=0,172, OR=1,60, %95 GA=0,81-3,14). hOGG1 Ser326Cys alel frekansları dağılımı Hardy-Weinberg eşitliğine göre uyumlu bulunmuştur ($\chi^2=0,381$, p=0,537).

Tablo 18: Hasta ve kontrol grubunda hOGG1 Ser326Cys alel frekansları

Alel	Kontrol n (%)	Hasta n (%)	OR (%95GA)	p
Ser	59 (73,8)	51 (63,8)	1,0	0,172
Cys	21 (26,2)	29 (36,2)	1,60 (0,81 – 3,14)	

4.8. Comet Yöntemi Sonuçlarının GSTM1 Genotipine Göre Dağılımının Hasta ve Kontrol Grubunda İncelenmesi

Hasta ve kontrol grubunda elde edilen Comet yöntemi sonuçları bu gruptaki GSTM1 genotip dağılımlarına göre incelenmiş ve sonuçlar tablo 19’da verilmiştir. GSTM1 (-) genotipine sahip olan bireyler, referans genotip olan GSTM1 (+)’e göre kıyaslandığında comet yöntemi sonuçlarının hiçbirisi için anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p>0,05$). Sonuçlar sadece aynı genotip içinde hasta ve kontrol grubunda istatistiksel olarak farklılık göstermiştir. Buna göre hasta grubunda GSTM1(-) olan bireylerin kontrol grubunda GSTM1 (-) olan bireylere göre bazal DNA hasarları, pirimidin baz hasarları ve H_2O_2 duyarlılıkları istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. (sırasıyla p değerleri=0,007, 0,009, $<0,001$). Hasta grubunda GSTM1 (+) olan bireylerin ise kontrol grubunda GSTM1 (+) olan bireylere göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek H_2O_2 duyarlılığına sahip oldukları gözlenmiştir ($p=0,022$) (Tablo 19).

Tablo 19: Comet Yöntemi sonuçlarının GSTM1 genotipine göre dağılımı

		GSTM1 (-)	p*	GSTM1 (+)	p*
Bazal DNA hasarı	Hasta	7,72±1,67*	0,007	7,66±1,45	0,100
	Kontrol	6,50±1,33		6,73±1,52	
p değeri**		>0,05			
Pirimidin baz hasarı	Hasta	2,81±2,38*	0,009	2,62±2,42	0,244
	Kontrol	1,39±1,13		1,74±1,09	
p değeri**		>0,05			
Pürin baz hasarı	Hasta	2,84±2,56	0,055	2,94±3,20	0,744
	Kontrol	1,76±2,25		2,64±1,71	
p değeri**		>0,05			
H ₂ O ₂ duyarlılık	Hasta	14,90±4,37*	<0,001	15,28±5,05*	0,022
	Kontrol	10,17±1,45		11,44±2,34	
p değeri**		>0,05			
DNA onarım kapasitesi (%)	Hasta	29,86±13,80	0,977	31,30±17,91	0,869
	Kontrol	29,76±10,67		31,45±14,45	
p değeri**		>0,05			
Pirimidin baz hasarının onarılma kapasitesi (%)	Hasta	29,63±14,36	0,540	25,91±14,80	0,667
	Kontrol	31,96±11,99		27,94±10,82	
p değeri**		>0,05			
Pürin baz hasarının onarılma kapasitesi (%)	Hasta	30,52±16,20	0,972	22,32±10,86	0,555
	Kontrol	30,39±10,58		24,67±10,49	
p değeri**		>0,05			

*kontrole göre, ** GSTM1 (+)’e göre

4.9. Comet Yöntemi Sonuçlarının MnSOD Ala16Val Genotipine Göre Dağılımının Hasta ve Kontrol Grubunda İncelenmesi

Hasta ve kontrol grubunda elde edilen Comet yöntemi sonuçları bu gruplardaki MnSOD Ala16Val genotip dağılımlarına göre incelenmiş ve sonuçlar tablo 20’de verilmiştir. Sonuçlar grup içinde Val/Val, Ala/Val birbirleriyle ve referans genotip olan Ala/Ala genotipi ile kıyaslandıklarında comet yöntemi sonuçları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p>0,05$). Yine Ala/Val+Val/Val genotiplerinin toplamı Ala/Ala genotipine göre kıyaslandığında comet yöntemi sonuçları açısından istatistiksel bir fark gözlenmemiştir ($p>0,05$). Sonuçlar sadece aynı genotip içinde hasta ve kontrol grubunda istatistiksel olarak farklılık göstermiştir. Buna göre Ala/Ala genotipini taşıyan bireyler hasta ve kontrol grubunda kıyaslandıklarında hasta grubunun H_2O_2 duyarlılıkları kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0,0167$). Ala/Val genotipini taşıyanlar hasta ve kontrol grubunda kıyaslandıklarında hasta grubunun bazal DNA hasarının ve H_2O_2 duyarlılığının kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğu gözlenmiştir ($p<0,0167$). Val/Val genotipini taşıyan bireyler hasta ve kontrol grubunda kıyaslandığında comet parametreleri açısından herhangi anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Ala/Val+Val/Val genotipini taşıyan bireyler hasta ve kontrol grubunda kıyaslandığında ise hasta grubunun bazal DNA hasarının, pirimidin baz hasarının ve H_2O_2 duyarlılıklarının kontrole göre anlamlı derecede yüksek olduğu gözlenmiştir ($p<0,025$) (Tablo 20).

Tablo 20: Comet Yöntemi sonuçlarının MnSOD Ala16Val genotipine göre dağılımı

		Ala/Ala	Ala/Val	Val/Val	Ala/Val+ Val/Val
Bazal DNA hasarı	Hasta	7,19±1,24	7,94±1,41*	7,67±2,10	7,85±1,66**
	Kontrol	6,87±1,29	6,57±1,42	6,42±1,54	6,53±1,43
p değeri[#]		>0,05		>0,05	>0,05
Pirimidin baz hasarı	Hasta	2,09±1,67	2,64±2,45	3,49±2,67	2,94±2,52**
	Kontrol	1,50±0,85	1,40±1,24	1,92±0,97	1,55±1,18
p değeri[#]		>0,05		>0,05	>0,05
Pürin baz hasarı	Hasta	3,49±2,84	2,62±2,49	2,83±3,24	2,69±2,73
	Kontrol	2,99±2,77	2,05±2,12	1,58±0,71	1,92±1,83
p değeri[#]		>0,05		>0,05	>0,05
H₂O₂ duyarlılık	Hasta	14,04±2,64*	15,34±4,74*	15,24±5,57	15,31±4,96**
	Kontrol	10,53±1,04	10,66±2,05	10,99±2,45	10,75±2,14
p değeri[#]		>0,05		>0,05	>0,05
DNA onarım kapasitesi (%)	Hasta	30,43±13,89	30,07±14,94	30,72±17,42	30,30±15,57
	Kontrol	31,12±14,59	31,50±12,13	27,28±11,32	30,32±11,89
p değeri[#]		>0,05		>0,05	>0,05
Pirimidin baz hasarının onarılma kapasitesi (%)	Hasta	22,41±15,98	30,33±14,15	29,86±13,59	30,16±13,73
	Kontrol	31,03±12,71	30,29±11,77	29,46±11,21	30,06±11,44
p değeri[#]		>0,05		>0,05	>0,05
Pürin baz hasarının onarılma kapasitesi (%)	Hasta	28,17±16,13	27,97±16,60	27,38±12,29	27,76±15,00
	Kontrol	35,34±11,31	25,75±10,62	27,03±8,73	26,11±10,00
p değeri[#]		>0,05		>0,05	>0,05

*p<0,0167 kontrole göre, **p<0,025 kontrole göre, [#] grup içi karşılaştırmalar

4.10. Comet Yöntemi Sonuçlarının hOGG1 Ser326Cys Genotipine Göre Dağılımının Hasta ve Kontrol Grubunda İncelenmesi

Hasta ve kontrol grubunda elde edilen Comet yöntemi sonuçları bu gruptaki hOGG1 Ser326Cys genotip dağılımlarına göre incelenmiş ve sonuçlar tablo 21’de verilmiştir. Sonuçlar hasta ve kontrol grubu arasında karşılaştırıldığında Ser/Ser genotipini taşıyan hasta grubunun bazal DNA hasarının, aynı genotipi taşıyan kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu bulunmuştur (p<0,0167). Ser/Cys genotipine sahip hasta grubunun ise pirimidin baz hasarlarının ve H₂O₂ duyarlılıklarının aynı genotipi taşıyan kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu gözlenmiştir (p<0,0167). Cys/Cys genotipini taşıyan hasta ve kontrol grubunda ise comet parametreleri açısından herhangi bir fark gözlenmemiştir. Ancak Ser/Cys heterozigot ve Cys/Cys homozigot mutant genotipleri toplamı (Ser/Cys+Cys/Cys) riskli varyant genotipler olarak hasta ve kontrol grubunda kıyaslandığında hasta grubunda pirimidin baz hasarının, pürin

baz hasarının ve H₂O₂ duyarlılıklarının kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu gözlenmiştir (p<0,025).

Comet yöntemi sonuçları referans genotip olan Ser/Ser genotipine karşı kıyaslandığında Ser/Cys genotipini taşıyan hasta grubunun istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek pirimidin baz hasarına sahip olduğu gözlenmiştir (p<0,0167). Cys/Cys genotiplerini taşıyan bireyler comet parametreleri açısından Ser/Ser genotipine göre kıyaslandığında her iki grupta da istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Ancak Ser/Cys heterozigot ve Cys/Cys homozigot mutant genotipleri toplamı (Ser/Cys+Cys/Cys) riskli varyant genotipler olarak Ser/Ser referans genotipine karşı kıyaslandığında pirimidin baz hasarının istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu bulunmuştur (p<0,025).

Tablo 21: Comet Yöntemi sonuçlarının hOGG1 Ser326Cys genotipine göre dağılımı

		Ser/Ser	Ser/Cys	Cys/Cys	Ser/Cys+ Cys/Cys
Bazal DNA hasarı	Hasta	7,80±1,51*	7,62±1,70	7,97±0,90	7,65±1,64
	Kontrol	6,52±1,49	6,67±1,39	6,71±0,37	6,68±1,31
Pirimidin baz hasarı	Hasta	1,39±1,63	3,43±2,47**	3,08±2,06	3,40±2,41**
	Kontrol	1,61±1,09	1,52±1,21	0,94±0,48	1,46±1,16
Pürin baz hasarı	Hasta	2,06±1,74	3,39±3,13	1,68±1,38	3,27±3,06**
	Kontrol	2,74±1,94	1,53±2,12	0,84±0,83	1,46±2,02
H₂O₂ duyarlılık	Hasta	14,19±4,87	15,62±4,50*	12,95±2,53	15,43±4,41**
	Kontrol	11,04±2,02	10,50±1,89	9,06±1,64	10,35±1,88
DNA onarım kapasitesi (%)	Hasta	31,82±15,40	29,91±15,68	25,93±2,16	29,61±15,11
	Kontrol	34,31±12,38	27,36±10,91	16,72±7,23	26,24±10,95
Pirimidin baz hasarının onarılma kapasitesi (%)	Hasta	33,11±12,88	26,75±14,71	18,75±19,67	26,16±14,80
	Kontrol	32,56±11,89	28,53±11,15	20,71±5,65	27,70±10,88
Pürin baz hasarının onarılma kapasitesi (%)	Hasta	28,15±14,57	27,48±15,70	30,63±18,65	27,71±15,54
	Kontrol	29,25±11,35	26,95±10,77	22,91±2,36	26,52±10,25

*p<0,0167 kontrole göre, #p<0,0167 Ser/Ser genotipine göre, **p<0,025 kontrole göre, *p<0,025 Ser/Ser genotipine göre

4.11. Comet Yöntemi Sonuçları ile GSH Konsantrasyonu Arasındaki İlişkinin Hasta ve Kontrol Grubunda İncelenmesi

Comet yöntemi sonuçları ile GSH konsantrasyonu arasındaki ilişki hasta ve kontrol grubunda incelenmiş ve sonuçlar Tablo 22’de verilmiştir. Bu sonuçlara göre hasta grubundaki bireylerin H₂O₂ duyarlılıkları ile GSH konsantrasyonu arasında pozitif yönde istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmışken (r=0,373, p=0,025) diğer parametreler için anlamlı bir ilişki bulunmamıştır.

Tablo 22: Hasta ve kontrol grubunda Comet Yöntemi sonuçları ile GSH konsantrasyonu arasındaki ilişki

GSH Konsantrasyonu							
	Bazal DNA Hasarı	Pirimidin Baz Hasarı	Pürin Baz Hasarı	H ₂ O ₂ duyarlılık	DNA onarım kapasitesi (%)	Pirimidin baz hasarının onarılma kapasitesi (%)	Pürin baz hasarının onarılma kapasitesi (%)
KONTROL	0,032	-0,140	-0,180	0,059	0,034	0,255	0,161
<i>p değeri</i>	0,844	0,390	0,266	0,718	0,835	0,113	0,320
HASTA	0,241	0,097	-0,087	0,373	0,314	0,072	-0,115
<i>p değeri</i>	0,157	0,572	0,616	0,025*	0,062	0,678	0,505
Toplam	0,058	-0,049	-0,158	0,104	0,163	0,173	0,013
<i>p değeri</i>	0,622	0,672	0,174	0,373	0,158	0,136	0,912

Veriler korelasyon katsayısı=r değeri, *p<0,05

4.12. GSH Konsantrasyonunun GSTM1 Genotipine Göre Dağılımının Hasta ve Kontrol Grubunda İncelenmesi

GSH konsantrasyonunun GSTM1 genotipine göre dağılımı hasta ve kontrol grubunda incelenmiş ve sonuçlar tablo 23'de verilmiştir. Bu sonuçlara göre hasta ve kontrol grubunda GSH konsantrasyonunun GSTM1 genotipinden bağımsız olarak değiştiği gözlenmiştir ($p>0,05$). Hasta ve kontrol grubunda GSTM1(-) olan bireylerin GSH konsantrasyonları karşılaştırıldığında hasta grubunun GSH konsantrasyonunun kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olduğu gözlenmiştir ($p<0,05$).

Tablo 23: GSH konsantrasyonunun GSTM1 genotipine göre dağılımı

GSH konsantrasyonu ($\mu\text{M/ml}$)	n	GSTM1 (+)	GSTM1 (-)
Hasta	40	1,17 $\pm$ 0,37	1,09 $\pm$ 0,30*
$p^{\#}$			>0,05
Kontrol	36	1,19 $\pm$ 0,42	1,28 $\pm$ 0,31
$p^{\#}$			>0,05

* $p<0,05$ kontrole göre, $\#$ GSTM1(+)'e göre

4.13. GSH konsantrasyonunun MnSOD Ala16Val Genotipine Göre Dağılımının Hasta ve Kontrol Grubunda İncelenmesi

GSH konsantrasyonunun MnSOD Ala16Val genotipine göre dağılımı hasta ve kontrol grubunda incelenmiş ve sonuçlar tablo 24'de verilmiştir. Bu sonuçlara göre hasta ve kontrol grubunda GSH konsantrasyonunun MnSOD Ala16Val genotipinden bağımsız olarak değiştiği gözlenmiştir ($p>0,05$). Hasta ve kontrol grubunda GSH konsantrasyonları yönünden Ala/Ala, Ala/Val veya Val/Val genotipine sahip bireyler arasında yapılan karşılaştırmalar sonucunda da istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p>0,05$). Benzer şekilde Ala/Val+Val/Val genotipine sahip bireyler Ala/Ala genotipine sahip olanlarla GSH konsantrasyonları yönünden karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p>0,05$).

Tablo 24: GSH konsantrasyonunun MnSOD Ala16Val genotipine göre dağılımı

GSH konsantrasyonu (µM/ml)	n	Ala/Ala	Ala/Val	Val/Val	Ala/Val+ Val/Val
Hasta	40	1,08±0,34	1,13±0,29	1,13±0,39	1,13±0,32
<i>p</i> [#]			>0,05	>0,05	>0,05
Kontrol	36	1,27±0,25	1,19±0,37	1,35±0,41	1,23±0,38
<i>p</i> [#]			>0,05	>0,05	>0,05

[#]grup içi karşılaştırmalar

4.14. GSH Konsantrasyonunun hOGG1 Ser326Cys Genotipine Göre Dağılımının Hasta ve Kontrol Grubunda İncelenmesi

GSH konsantrasyonunun hOGG1 Ser326Cys genotipine göre dağılımı hasta ve kontrol grubunda incelenmiş ve sonuçlar tablo 25'de verilmiştir. Bu sonuçlara göre hasta ve kontrol grubunda GSH konsantrasyonunun hOGG1 Ser326Cys genotipinden bağımsız olarak değiştiği gözlenmiştir ($p>0,05$). Hasta ve kontrol grubunda GSH konsantrasyonları yönünden Ser/Ser, Ser/Cys veya Cys/Cys genotipine sahip bireyler arasında yapılan karşılaştırmalar sonucunda da istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p>0,05$). Benzer şekilde Ser/Cys+Cys/Cys genotipine sahip bireyler Ser/Ser genotipine sahip olanlarla GSH konsantrasyonları yönünden karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p>0,05$).

Tablo 25: GSH konsantrasyonunun hOGG1 Ser326Cys genotipine göre dağılımı

GSH konsantrasyonu (µM/ml)	n	Ser/Ser	Ser/Cys	Cys/Cys	Ser/Cys+ Cys/Cys
Hasta	40	1,20±0,37	1,09±0,29	0,91±0,42	1,08±0,29
<i>p</i> [#]			>0,05	>0,05	>0,05
Kontrol	36	1,23±0,30	1,30±0,43	0,94±0,02	1,26±0,42
<i>p</i> [#]			>0,05	>0,05	>0,05

[#]grup içi karşılaştırmalar

4.15. Gen-Gen Etkileşimlerinin Hastalık Riski Açısından İncelenmesi

4.15.1. GSTM1 ve MnSOD Genotiplerinin Kombinasyonunun İncelenmesi

GSTM1 ile MnSOD genotiplerinin kombinasyonu hastalık riski açısından incelenmiş ve sonuçlar tablo 26'da verilmiştir. GSTM1 (+) ve MnSOD Ala/Ala genotiplerinin kombinasyonu riskin gözlenmediği (risk=0) referans grup olarak kabul edilmiştir. Buna göre GSTM1 (+) ve Ala/Val+Val/Val genotip kombinasyonu veya GSTM1 (-) ve Ala/Ala kombinasyonu risk kategorisine göre riskin 1 olduğu kombinasyonlar olarak; GSTM1 (-) ve Ala/Val+Val/Val kombinasyonu ise riskin en yüksek olduğu (risk=2) kombinasyon olarak kabul edilmiştir. Buna göre risk 1 ve risk 2'deki kombinasyonlar riskin 0 olduğu kombinasyona göre kıyaslanmış ve hastalık riski açısından anlamlı bir sonuç elde edilmemiştir.

Tablo 26: GSTM1 ve MnSOD genotiplerinin kombinasyonunun hastalık riski açısından incelenmesi

Risk	GSTM1	MnSOD	Kontrol (n)	Hasta (n)	Crude OR(%95 GA)
0	(+)	Ala/Ala	2	2	1,00
1	(+)	Ala/Val+Val/Val	15	11	0,733 (0,089-6,041)
1	(-)	Ala/Ala	6	7	1,167 (0,124-10,990)
2	(-)	Ala/Val+Val/Val	17	20	1,176 (0,149-9,266)

4.15.2. GSTM1 ve hOGG1 Genotiplerinin Kombinasyonunun İncelenmesi

GSTM1 ile hOGG1 genotiplerinin kombinasyonu hastalık riski açısından incelenmiş ve sonuçlar tablo 27'de verilmiştir. GSTM1 (+) ve hOGG1 Ser/Ser genotiplerinin kombinasyonu riskin gözlenmediği (risk=0) referans grup olarak kabul edilmiştir. Buna göre GSTM1 (+) ve Ser/Cys+Cys/Cys genotip kombinasyonu veya GSTM1 (-) ve Ser/Ser kombinasyonu risk kategorisine göre riskin 1 olduğu kombinasyonlar olarak; GSTM1 (-) ve Ser/Cys+Cys/Cys kombinasyonu ise riskin en yüksek olduğu (risk=2) kombinasyon olarak kabul edilmiştir. Buna göre risk 1 ve risk 2'deki kombinasyonlar riskin 0 olduğu kombinasyona göre kıyaslanmış ve hastalık riski açısından anlamlı bir sonuç elde edilmemiştir.

Tablo 27: GSTM1 ve hOGG1 genotiplerinin kombinasyonunun hastalık riski açısından incelenmesi

Risk	GSTM1	hOGG1	Kontrol (n)	Hasta (n)	Crude OR(%95 GA)
0	(+)	Ser/Ser	10	5	1,00
1	(+)	Ser/Cys+Cys/Cys	7	8	2,286 (0,522-10,010)
1	(-)	Ser/Ser	11	8	1,454 (0,356-5,944)
2	(-)	Ser/Cys+Cys/Cys	12	19	3,167 (0,868-11,551)

4.15.3. MnSOD ve hOGG1 Genotiplerinin Kombinasyonunun İncelenmesi

MnSOD ile hOGG1 genotiplerinin kombinasyonu hastalık riski açısından incelenmiş ve sonuçlar tablo 28’de verilmiştir. MnSOD Ala/Ala ve hOGG1 Ser/Ser genotiplerinin kombinasyonu riskin gözlenmediği (risk=0) referans grup olarak kabul edilmiştir. Buna göre MnSOD Ala/Ala ve Ser/Cys+Cys/Cys genotip kombinasyonu veya Ala/Val+Val/Val ve Ser/Ser kombinasyonu risk kategorisine göre riskin 1 olduğu kombinasyonlar olarak; Ala/Val+Val/Val ve Ser/Cys+Cys/Cys kombinasyonu ise riskin en yüksek olduğu (risk=2) kombinasyon olarak kabul edilmiştir. Buna göre risk 1 ve risk 2’deki kombinasyonlar riskin 0 olduğu kombinasyona göre kıyaslanmış ve hastalık riski açısından anlamlı bir sonuç elde edilmemiştir.

Tablo 28: MnSOD ve hOGG1 genotiplerinin kombinasyonunun hastalık riski açısından incelenmesi

Risk	MnSOD	hOGG1	Kontrol (n)	Hasta (n)	Crude OR(%95 GA)
0	Ala/Ala	Ser/Ser	3	2	1,00
1	Ala/Ala	Ser/Cys+Cys/Cys	5	7	2,10 (0,251-17,594)
1	Ala/Val+Val/Val	Ser/Ser	18	11	0,917 (0,132-6,379)
2	Ala/Val+Val/Val	Ser/Cys+Cys/Cys	14	20	2,143 (0,316-14,545)

5. TARTIŞMA

Karsinojenik gelişimin erken aşamasında meydana gelen genetik değişimlerin belirlenmesi, özellikle yüksek risk altındaki bireylerin kanserden korunmasında etkili olabilecek biyogöstergelerin geliştirilmesine olanak sağlar. Bunun örneklerinden biri de Barrett özofagus hastalığıdır². Barrett özofagus, özofageal adenokarsinomanın bilinen tek prekürsörüdür. Barrett özofagusu olan hastalarda normal özofagusa sahip bireylere göre özofageal adenokarsinoma gelişme riski 30-40 kez daha fazladır. Tüm özofagus kanserlerinin %10-40'ının Barrett özofagus ile ilişkili olduğu tahmin edilmektedir. Özofagus kanserinin en sık görülen tipi skuamöz hücre karsinoması olmasına rağmen son yıllarda adenokarsinoma görülme sıklığı da artmış, 1985 yılında özofagus kanserlerinin %3,5 'u adenokarsinoma iken, 2000 yılında bu oran %17'ye yükselmiştir⁸.

Özofagus kanseri nedeniyle oluşabilecek ölüm sayısını düşürmenin en iyi yolu kanserin erken teşhisidir. Bu nedenle özellikle endoskopi ve histopatolojik inceleme sonucunda Barrett özofagusun teşhisi oldukça önemli bir erken tanıdır⁷. Barrett metaplazisinden sonra bir seri histopatolojik değişimler meydana gelir. Bunlar sırasıyla displazi, karsinoma in situ ve özofageal adenokarsinomadır. Displazi ve adenokarsinoma genellikle Barrett mukozasının çok uzun yıllar var olmasından sonra gelişir⁴¹.

Barrett özofagusa neden olabilecek risk faktörleri, çeşitli çalışmalarda incelenmiştir. GÖRH ile özofageal adenokarsinoma arasında çok kuvvetli bir ilişki saptanmıştır ve Barrett özofagus gelişiminde de önemli rolü olduğu düşünülmektedir. Barrett özofagus ile ilgili diğer faktörlerin incelendiği çalışmalar sınırlı olmakla beraber başlıcaları, obezite, diyet, sigara ve alkoldür. Bunun dışında etkili olan faktörler ise, cinsiyet, ırk, moleküler değişiklikler, genetik faktörler, enflamasyon ve DNA hasarı olarak sayılabilir^{7,57}.

Oksidatif stres, ROT nedeniyle oluşan yaşamın kaçınılmaz biyolojik olaylarından biridir. Serbest radikaller normal aerobik metabolizmanın devamı sırasında hücrelerde oksijen ve metabolitleri oluşurken ortaya çıkabildiği gibi, ısı, ışık, radyasyon ve kimyasallar gibi çeşitli dış kaynakların etkisiyle de ortaya çıkabilmektedir. Oksidatif stres pek çok dejeneratif hastalığın nedeni olabileceğinden kaçınılması gereken bir durum olarak kabul edilmektedir¹⁹². Serbest oksijen radikalleri, DNA'da oksitlenmiş bazlar, abazik bölgeler, DNA sarmal kırıkları, DNA ve protein arasında çapraz bağlanma gibi çeşitli lezyonları oluştururlar¹²⁶. DNA

bazlarında pek çok farklı oksidatif hasar ürünleri tanımlanmış olmasına rağmen, guanin türevi olan 8-OH-Gua ve onun deoksinükleozit formu olan 8-hidroksi-2-deoksiguanozin (8-OHdG) en sık karşılaşılan ve mutajenitesi en iyi bilinendir. Bu lezyon, DNA replikasyonu sırasında GC'den AT'ye dönüşüme neden olarak mutasyona eğilimi artırır. Bu nedenle 8-OH-Gua ve 8-OHdG ölçümü, DNA'daki oksidatif hasarın biyogöstergesi olarak kabul edilmektedir¹²⁸.

DNA'da oluşan oksidatif hasarın biyogöstergesi olarak kullanılan pek çok yöntem mevcuttur. İlk kez 1988 yılında kurulan bir genotoksisite testi olan Comet yöntemi daha sonraki yıllarda spesifik endonükleazlar (okside olmuş pirimidinler için endo III ve pürinler için Fpg) kullanılarak modifiye edilmiş ve DNA'da purin veya pirimidin baz hasarlarının belirlenmesinde kullanılmaya başlanmıştır¹³⁷. Yine aynı yöntemde lenfositlerin DNA hasarı yapan kimyasal (H₂O₂, bleomisin gibi) ya da fiziksel (X-ray-Challenge yöntemi gibi) bir ajanla indüklenmesi ve oluşan lezyonların geri dönüşünün izlenmesiyle hücrelerin DNA onarım kapasitesi incelenmektedir. Protokolde, spesifik endonükleazların eklenmesiyle okside olmuş purin ve pirimidin bazlarının onarımı da belirlenebilmektedir^{134, 180}.

Barrett özofagus ve özofageal adenokarsinoma gelişiminde rol alan faktörlerin etki mekanizmaları, genellikle direkt veya dolaylı olarak DNA hasarı ile ilgilidir. Özellikle enflamasyon ile ilgili olarak oluşan oksidatif stres ve serbest radikal oluşumu, GÖRH-Barrett özofagus-adenokarsinoma arasındaki ilişkinin belirlenmesinde önemlidir. Ayrıca asit ve safra tuzları ve buna bağlı olarak ortaya çıkan özofajit de ROT'nin oluşumunu indükleyebilir, antioksidan kapasitesini tüketebilir ve oksidatif stres ile ilgili genlerin ekspresyonunu arttırabilir⁷. Ayrıca asidik pH'nın ve safra asitlerinin de ROT'nin oluşumuna ve DNA hasarına yol açtığını gösteren çalışmalar da vardır^{14,45}.

Son yıllarda birçok çalışma, genetik duyarlılığın kansere veya diğer hastalıklara yakalanma riski ile ilişkisini araştırmakta, bazı bireylerin neden hastalıklara daha yatkın olduğu sorusunun cevabını bulmaya çalışmaktadır. Bu çalışmalarda öncelik ksenobiyotik metabolizmasında veya DNA onarımında rol oynayan enzimlere verilmektedir. Şu ana kadar yapılan çalışmalar, Barrett özofagus ve özofageal adenokarsinoma ile ilgili bazı genlerde çeşitli polimorfizmlerin olduğunu göstermiştir^{17, 18,19, 112,117,118}.

Polimorfizm çalışmalarında genellikle hızlı ve kolay bir metot olan PCR-RFLP metodu kullanılmaktadır. Ancak genetik polimorfizm çalışmalarının yanı sıra erken dönem genotoksik etkilerin belirlenmesi amacıyla özellikle sitogenetik biyogöstergelerin de uygulanmasının, bireysel duyarlılıkla ilgili sonuçları daha da anlamlı hale getireceği düşünülmektedir. Bu nedenle son zamanlarda özellikle genotoksik parametrelerin, genetik polimorfizm testleri ile kombine edildiği çalışmalara önem verilmektedir^{107, 193}.

Çalışmamızda yukarıda bahsedilen temel unsurlardan yola çıkarak, Barrett özofagus hastalığına genetik duyarlılıkta oksidatif DNA hasarı, DNA onarım kapasitesi ve ilgili bazı gen polimorfizmlerinin rolünü araştırdık. Bu amaçla endoskopik ve histopatolojik olarak Barrett özofagus teşhisi konmuş bireylerde ve Barrett özofagus gözlenmeyen sağlıklı kontrol grubunda kan GSH konsantrasyonunu, modifiye Comet Yöntemi uygulayarak oksidatif DNA hasarını ve DNA onarımını, PCR-RFLP metodu ile de GSTM1, MnSOD Ala16Val ve hOGG1 Ser326Cys genetik polimorfizmlerini ve elde edilen sonuçların birbirleriyle ilişkisini inceledik.

Çalışmamızın Comet yöntemi ile elde edilen sonuçlarına göre, Barrett özofagus hastalarında gözlenen bazal DNA hasarının kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğunu bulduk. Bu anlamlılığın her iki gruptaki sigara içmeyen bireyler kıyaslandığında da devam ettiğini ancak sigara içen bireylerde böyle bir etkinin olmadığını gözlemledik. Barrett özofagus hastalığında, oksidatif DNA hasarının etkisini incelemek amacıyla uyguladığımız modifiye Comet yönteminde ise, hücrelerin Endo III veya Fpg ile muamele edilmesi sonucunda sırasıyla gözlenen pirimidin ve pürin baz hasarlarını, hasta ve kontrol grubunda kıyasladık. Bu sonuçlara göre, Barrett özofagus hastalarında kontrol grubuna kıyasla, istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek pirimidin baz hasarı gözledik. Ancak pürin baz hasarı, iki grup arasında anlamlı bir fark göstermedi. Bu sonuçları, DNA hasarını etkileyebilecek (yaş, sigara, cinsiyet gibi) faktörleri normalize ederek tekrar incelediğimizde, anlamlılığın devam ettiğini gördük.

Barrett özofagus hastalığında, oksidatif DNA hasarının rolünün incelendiği çalışmaların sonuçları çelişkilidir. Bazı çalışmalar bizim çalışmamızla uyumlu sayılabilecek sonuçlar bulurken, bazıları ise Barrett özofagus hastalığı ve oksidatif DNA hasarı ile ilgili anlamlı herhangi bir sonuç bulmamışlardır. Oksidatif hasarın göstergesi olarak ROT'nin Barrett özofagus hastalarında ölçüldüğü çalışmalar mevcuttur. Olyae ve arkadaşlarının GÖR ve Barrett özofagus hastalarında yaptıkları çalışmada, özofageal dokularda ROT seviyesinin arttığı kemiluminesans

tekniki ile gösterilmiş, yine aynı dokuda miyeloperoksidaz seviyesinin de yüksek olduğu bulunmuştur⁹⁷. Farhadi ve arkadaşlarının yaptıkları benzer bir çalışma da, özofajit ile ROT'lerinin üretimi arasında pozitif korelasyon olduğunu kemiluminesans yöntemi ile göstermiştir⁹⁸. Barrett özofagusun kronik özofajit sonucunda indüklendiği bilindiğinden, özofajit ile ROT ve oksidatif DNA hasarını inceleyen çalışmalar da mevcuttur. Özofageal epitelin uzun süre ROT'ne maruziyeti sonucunda oksidatif DNA hasarı ve mutasyonlar görülebilir. Wetscher ve arkadaşlarının yaptıkları iki ayrı çalışmada ROT'nin rolü, reflü özofajit ve Barrett hastalarında incelenmiş ve lipid peroksidasyonun, reflü şiddetine bağlı olarak arttığı ve en yüksek seviyeye Barrett hastalarında rastlandığı gözlenmiştir. Yine aynı çalışmalarda, süperoksit dismutaz seviyesinin de hasara bağlı olarak düştüğü gözlenmiştir^{194,195}. Rantanen ve arkadaşlarının GÖR hastalarında yaptıkları çalışmada 20 hastadan 12'sinde Barrett özofagus tespit edilmiş ve miyeloperoksidaz aktivitesinin bu hastalarda daha yüksek olduğu ancak seviyesinin antireflü operasyonundan sonra düştüğü gözlenmiştir¹⁹⁶. Sihvo ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada ise, displazinin de gözlemlendiği Barrett epitelinde SOD aktivitesinin arttığı Barrett epitelindeki miyeloperoksidaz seviyesinin ise adenokarsinoma hücrelerinden bile fazla olduğu gözlenmiştir¹⁹⁷. Sihvo ve arkadaşlarının yaptıkları bir diğer çalışmada da, miyeloperoksidaz seviyesinin reflü-Barrett-karsinoma sürecinde arttığı bulunmuştur¹⁹⁸. Jimenez ve arkadaşları da reflü özofajitinde ve Barrett özofagus hastalarında süperoksit anyon radikali ve serbest azot türlerinin arttığını kemilüminesans tekniği ile göstermiştir¹⁹⁹.

Barrett özofagus ve oksidatif DNA hasarı ile ilgili olarak, hasta ve kontrol gruplarından alınan örneklerde DNA katım ürünlerinin ölçüldüğü çalışmalar da vardır. Salminen ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada, Barrett özofagus ve özofageal adenokarsinoma hastalarının kontrol grubuna göre daha yüksek seviyede DNA katım ürünlerine sahip olduğu, 32-P-postlabeling metot ile gösterilmiştir²⁰⁰. Oksala ve arkadaşları da, Barrett özofagusu olan veya olmayan GÖR hastalarında DNA katım ürünlerine yine aynı yöntemle bakmışlar ve miktarların benzer olduğunu görmüşlerdir. Ayrıca aynı çalışmada antireflü operasyonu geçiren hastaların, operasyon sonrasında bakılan DNA katım ürünleri miktarlarında herhangi bir düşüş gözlenmemiş, dolayısıyla araştırmacılar bu operasyonunun GÖR nedeniyle meydana gelen DNA hasarını normalize etmediği sonucuna varmışlardır²⁰¹. Sihvo ve arkadaşları da yaptıkları iki çalışmada Barrett epitelinde artmış DNA katım ürünleri olduğunu bildirmişlerdir^{197,198}.

Asidik pH'nın ve safra asitlerinin de ROT'nin oluşumuna ve DNA hasarına yol açtığını gösteren çalışmalar vardır. Dvorak ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışma, Barrett hastalarının özofageal mukozalarının genellikle asidik pH'ya maruz kaldığını ($\text{pH} < 4$) ve bunun da ROT'nin oluşmasına neden olduğunu göstermiştir¹⁴. Yine aynı çalışma grubunun yaptığı bir çalışmada ise düşük pH'nın yanı sıra ($\text{pH} < 4$) safra asitlerinin de etkisi incelenmiş ve immunokimyasal veriler, epitel hücrelerinde 8-hidroksi-deoksiguanozin (8-OHdG) varlığını göstermiştir¹⁵. Barrett özofagus varlığında, özofageal dokularda 8-OHdG varlığına dair başka çalışmalar da vardır. Rasanen ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada Barrett metaplazisi, Barrett özofagus ve yüksek dereceli displazisi ve adenokarsinoması olan 3 grup hastanın özofagus örneklerinde kontrole göre yüksek miktarda 8-OHdG olduğu HPLC ile belirlenmiştir²⁰². Chen ve arkadaşlarının sıçanlarda yaptıkları deneysel çalışma sonuçları da, benzer şekilde Barrett hücrelerinde artmış 8-OHdG ve malondialdehit (MDA) miktarları belirlenmiştir²⁰³.

Çalışmamızdaki gibi genotoksisite testi olarak Comet yöntemini uygulayan ve Barrett özofagus gelişiminde DNA hasarının rolünü inceleyen çalışmalar az sayıdadır. Olliver ve arkadaşları 2003 yılında yayınladıkları çalışmada, histolojik olarak Barrett özofagus tanısı konulan hastalardan aldıkları mukozal biyopsi örneklerinde ve normal skuamoz epitelinde (A549) modifiye Comet yöntemi uygulayarak oksidatif DNA hasarını değerlendirmişlerdir²⁰⁴. Çalışmanın sonucunda bizim sonuçlarımızla uyumlu olarak, Barrett özofagus dokusunda bazal DNA hasarının istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığını bulmuşlardır. Yine bizim çalışmamıza benzer şekilde Fpg ile muamele edilen hücrelerde okside olmuş pürin baz hasarının arttığını ancak bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığını bulmuşlardır.

Olliver ve arkadaşlarının yaptıkları bir diğer çalışmada ise, Barrett hastalarının özofageal ve gastrik mukozalarındaki DNA hasarı modifiye Comet yöntemi ile değerlendirilmiş ve kontrol grubu ile kıyaslanmıştır⁶⁰. Bu çalışmada da, diğeriyle benzer şekilde Barrett epitelinde skuamoz ve gastrik mukozaya göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek DNA hasarı gözlenmiştir. Fpg enzimi tüm mukoza tiplerinde DNA hasarını arttırmış ancak 3 doku arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Bu sonuç bizim çalışmamızın sonuçları ile uyumludur. Olliver ve arkadaşlarının bu çalışmasında, özofageal adenokarsinoma hastalarında Barrett özofagus hastaları ile benzer seviyede DNA ve pürin baz hasarı olduğu bulunmuş ve ancak kanser hastalarında kontrol grubuna göre anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Bu sonuç, Barrett özofagus hastalarında kanser gelişiminde, genetik instabilitenin rolünü ortaya koyduğundan önemlidir. Yine aynı çalışmada Barrett hastaları, DNA hasar

derecelerine göre 4 gruba ayrılmış ve en yüksek risk grubunda olan hastaların en az risk grubundakilere göre kanser veya yüksek dereceli displazi geliştirme riskinin 9,4 kat daha fazla olduğu bulunmuştur. Olliver ve arkadaşları yaptıkları her iki çalışmada da pirimidin baz hasarının belirlenmesi amacıyla Endo III kullanmadıklarından, sonuçlarımızı bu yönden tartışmak mümkün olmamaktadır.

Jolly ve arkadaşlarının 2004 yılında yayınladıkları çalışmada ise, normal özofagus veya Barrett özofagus hücre kültüründe, asit ve safra asitlerinin DNA üzerindeki direkt etkilerini gözlemek amacıyla Comet yöntemi uygulanmıştır¹⁶. Bu çalışmanın sonucunda safra asidinin, nötral pH'da Barrett hücrelerinde DNA hasarına neden olduğu bulunmuştur. Clemons ve arkadaşları ise Barrett özofagus ve adenokarsinoma hücrelerinde nitrik oksit ve asidin DNA hasar yapıcı etkilerini Comet yöntemi ile incelemişlerdir²⁰⁵. Bu çalışmanın sonunda, aside maruziyetin her iki hücre tipinde de çift sarmal DNA kırıklarını arttırdığı, nitrik oksidin ise aynı etkiyi hücre tipine (adenokarsinoma>Barrett özofagus) ve doza bağlı olarak gösterdiği bulunmuştur. Jenkins ve arkadaşları da safra asidi türevi olan deoksikolik asidin, ROT oluşumuna bağlı olarak özofageal adenokarsinoma hücrelerinde mikroçekirdek sıklığını arttırdığını bulmuşlardır¹⁰¹. Barrett hastalarının çoğunda gözlenen GÖR içeriğinin büyük bir kısmını safra asitleri oluşturduğundan yukarıda bahsedilen bu üç çalışma, Barrett özofagus hastalığında gözlenen DNA hasarının olası bir nedenine dikkat çekmesi açısından oldukça önemlidir.

White ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada, uzun süredir proton pompası inhibitörü kullanan 100 Barrett özofagus hastasında, Vitamin C ve Vitamin E kullanımının, DNA hasarına karşı koruyucu etkisi Comet yöntemi ile incelenmiştir. Çalışmanın sonunda vitamin alan ve almayan gruplar arasında, plazmada ve gastrik sıvıda askorbik asit, total Vitamin C ve E konsantrasyonlarının arttığı, ancak bu artışın DNA hasarı üzerinde anlamlı bir etkisinin olmadığı gözlenmiştir²⁰⁶.

Çalışmamızın amaçlarından biri de, Barrett özofagus hastalarında ve kontrol grubunda oksidatif hasar yapıcı bir ajan olan H₂O₂'e duyarlılığın ve DNA onarımının araştırılmasıydı. Çalışmamızda ve yukarıda bahsedilen çeşitli in vitro veya in vivo çalışmalarda Barrett özofagus hastalarında artan DNA hasarı gözlenmiştir. Bu hasarın yeteri kadar onarılamaması, Barrett özofagus nedeniyle kanser gelişimine neden olabilir. Bu hipotezle yola çıktığımız çalışmamızın bu bölümünde, gereç ve yöntem kısmında ayrıntılı olarak açıklandığı gibi H₂O₂'ye duyarlılığın ve % DNA onarım kapasitesinin, okside olmuş pirimidin veya pürin bazlarının % onarım kapasitesinin tayini amacıyla lenfositler önce H₂O₂ ile muamele

edildi ve DNA hasarı indüklendi. Daha sonra hücreler 37°C'de inkübe edildi ve DNA hasarının geri dönüşü modifiye Comet yöntemiyle değerlendirildi. Bu yöntemin sonucunda Barrett özofagus hastalarının, kontrol grubuna göre H₂O₂'e daha duyarlı olduğu ve bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlemlendi. Bu anlamlılık her iki gruptaki sigara içmeyen bireyler kıyaslandığında da devam etti ancak hasta grubunda sigara içmeyen bireylerin sigara içen bireylere göre H₂O₂ indüksiyonuna daha duyarlı oldukları saptandı. Ancak hasta ve kontrol grubunda %DNA onarım kapasitesi, pirimidin ve pürin baz hasarlarının yüzde onarılma kapasiteleri kıyaslandığında her üç parametre için de anlamlı bir farklılık gözlenmedi. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda Barrett özofagus hastalığında, DNA onarımının rolünü, ilgili onarım genlerindeki varyasyonları inceleyerek araştıran çalışmalar vardır^{17,18}. Ancak bizim çalışmamızda olduğu gibi, DNA onarım kapasitesini ayrıntılı inceleyen başka bir çalışmaya rastlamadık. Chao ve arkadaşlarının 2006 yılında yayınladıkları bir çalışmada, 220 Barrett özofagus hastasından alınan kan örneklerinde, Bleomisin indüksiyonuna duyarlılık kromozomal aberasyon yöntemiyle incelenmiş ve bu hastalar kanser riski açısından 3 ay-10,1 yıl süre ile izlenmişlerdir. Bu prospektif çalışmanın sonunda Bleomisin indüksiyonuna daha duyarlı olan bireylerin anöploidi ve kanser geliştirme risklerinin istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu gözlenmiştir²⁰⁷. Chao ve arkadaşlarının bu çalışmasında DNA onarım kapasitesi incelenmediğinden, çalışmamızın sonuçlarını bu yönden kıyaslamak zor olsa da, çalışmamızda benzer şekilde hasta grubunun mutajene duyarlılığı daha yüksek bulunmuştur.

Çalışmamızda Comet yöntemi sonuçlarının, çeşitli değişkenlere bağlı olarak değişimini de inceledik. Yaptığımız çalışma sonuçlarına göre, kontrol grubunda 40 yaşın üstünde olan bireylerin, 40 yaşın altında olan bireylere göre pürin baz hasarının yüzde onarılma kapasitesinin istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olduğunu gördük. Ayrıca kontrol grubunda ve toplam popülasyonda, yaş ve BMI ile pürin baz hasarının yüzde onarılma kapasitesi arasında ters yönlü ve istatistiksel olarak anlamlı korelasyon gözlenmiştir. DNA onarım mekanizmasının yaşa bağlı olarak yavaşlaması, DNA hasarının birikmesi yaşlılık ve pek çok dejeneratif hastalığın gelişmesinde temel mekanizma olarak kabul edilmektedir. BEO mekanizmasında yaşa bağlı olarak gelişen değişiklikler, çeşitli deneysel çalışmalarda incelenmiştir²⁰⁸. Atanma ve arkadaşlarının çalışmasında, abazik bölgelerin miktarının yaşa bağlı olarak arttığı gözlenmiştir. Aynı çalışmada H₂O₂ ile indüklenen hücrelerin gençlerde yaşlılara kıyasla daha hızlı onarıldığı gözlenmiştir²⁰⁹.

Çalışmamızda, erkek hastaların %DNA onarım kapasitesinin, kadın hastalara göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olduğunu bulduk. Yapılan çalışmaların bazıları bizim çalışmamızla benzer sonuçlar bulurken²¹⁰ bazılarında cinsiyet açısından herhangi bir fark gözlenmemiştir²¹¹. Ayrıca çalışmamızın sonuçları alkol kullanan hasta grubunun kullanmayanlara göre daha düşük pürin ve pirimidin baz hasarına ve daha yüksek pirimidin baz hasarı onarım kapasitesine sahip olduğunu göstermektedir. Bu sonuç, alkol ve DNA hasarı ile ilgili yapılan çalışmaların çoğu ile uyuşmamaktadır. Çünkü bu çalışmalar genellikle alkolün özellikle karaciğer hücrelerindeki olumsuz etkilerinden ve kronik alkol kullanımının DNA hasarını arttıran ve DNA onarımını azaltan etkilerinden bahsetmektedir^{212,213}. Çalışmamızın bu sonucu muhtemelen, az sayıda bireyin alkol kullanması (n=8) ve bu nedenle istatistiksel değerlendirmenin tam verimli olmayışından kaynaklanmaktadır.

Hücrelerin, oksijen radikallerinin üretilmesi veya bertaraf edilmesi arasındaki dengeyi kontrol edebilmesi için antioksidan sistemleri mevcuttur. GSH, serbest tiyol grubu (-SH) içeren antioksidan, antitoksin ve enzim kofaktörü olan ve glisin-sistein-glutamattan oluşan bir tripeptittir. GSH enzimatik veya enzimatik olmayan yollarla serbest radikalleri ve ROT'lerini (hidroksil, lipit peroksil, peroksinitrit, H₂O₂ gibi) yakalayarak uzaklaştırır¹⁴¹. Bunun sonucunda da GSH molekülü yükseltgenir yani okside olur. Dolayısıyla hücrelerdeki redükte ya da okside GSH seviyesi oksidatif stresi yansıtır.

Çalışmamızda, Barrett özofagus hastalarından ve kontrol grubundan alınan kan örneklerinde, redükte GSH seviyesini spektrofotometrik olarak araştırdık. Bu amaçla hasta ve kontrol grubundaki bireyleri, sigara içen ve içmeyenler olarak gruplandırıp, bu gruplardaki GSH konsantrasyonunu da değerlendirdik. Sonuç olarak sigara içme durumuna göre ayırmadan, sadece hasta ve kontrol grubunu GSH konsantrasyonları yönünden karşılaştırdığımızda, istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulmadık. Ancak sigara içen hasta grubundaki bireylerin sigara içen kontrol grubundaki bireylere göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük GSH konsantrasyonuna sahip olduğunu gördük. Bu sonuç, hastalığın ancak sigara kullanımı ile beraber değerlendirildiğinde, GSH konsantrasyonunda anlamlı bir düşüşe neden olduğunu göstermektedir. Ayrıca kontrol grubunda sigara içen ve içmeyen bireylerin GSH konsantrasyonları karşılaştırıldığında, sigara içmeyen bireylerin içenlere göre GSH konsantrasyonlarının daha yüksek olduğunu bulduk. Bu sonuç da, sigaranın oksidatif strese ve GSH havuzunun tükenmesine neden olan etkisini doğrulamaktadır²¹⁴. Çalışmamızda Comet yöntemi sonuçları ile GSH konsantrasyonu arasındaki ilişki hasta ve kontrol grubunda incelendi ve sadece hasta grubundaki bireylerin H₂O₂

duyarlılıkları ile GSH konsantrasyonu arasında pozitif yönde istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptandı.

Sihvo ve arkadaşları displazi gözlenen veya gözlenmeyen Barrett özofagus hastalarında ve GÖR hastalarında, GSH konsantrasyonunun, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olduğunu bulmuşlardır¹⁹⁷. Başka bir çalışmada da GÖR, Barrett ve adenokarsinoma hastalarında GSH konsantrasyonunun giderek düştüğü ve GSH konsantrasyonu ve DNA katım ürünlerinin miktarı arasında negatif korelasyon olduğu gözlenmiştir¹⁹⁸. Rantanen ve arkadaşları da GSH konsantrasyonunun GÖR hastalarında kontrole göre daha düşük olduğunu ve antireflü operasyondan 6 ay ve 4 yıl sonra da bu düşüşün devam ettiğini bildirmiştir¹⁹⁶. Lieshout ve arkadaşları da yaptıkları çalışmada Barrett özofagus epitelinde ve normal epitelde GSH içeriğini HPLC ile ölçmüşler ve Barrett epitelinde normal epitele göre daha düşük seviyede GSH bulunduğunu bildirmişlerdir²¹⁵. Peters ve arkadaşları da Barrett epitelinde normal epitele göre GSH içeriğinin daha düşük olduğunu bulmuştur²¹⁶. Bizim çalışmamızın sonuçları ile uyumlu olarak, Jimenez ve arkadaşları Barrett özofagus hastalarında ve kontrolde GSH konsantrasyonunu spektrofotometrik olarak incelemiş ancak herhangi bir fark bulmamıştır¹⁹⁹. Ayrıca deneysel olarak oluşturulan reflü özofajit ve Barrett özofagusunda da GSH içeriğinin düştüğü bulunmuştur^{67, 217}.

Çalışmamızda PCR-RFLP metodu ile GSTM1, MnSOD Ala16Val ve hOGG1 Ser326Cys genetik polimorfizmlerini de inceledik. GSTM1 ve MnSOD Ala16Val genetik polimorfizmlerini seçmemizin nedeni, temel olarak oksidatif hasar ile ilgili koruyucu mekanizmalarda rol alan enzimleri kodlayan genler olmasıydı. hOGG1 Ser326Cys genetik polimorfizmini ise, BEO mekanizmasında rol alan glikozidaz enziminin kodlanmasından sorumlu gen olduğu için çalıştık.

GSTM1 geninde tanımlanan polimorfizmlerden biri olan GSTM1*0 genotipi, delesyonu yani gen yoksunluğunu ifade eder ve bu da protein ekspresyonunun olmadığı anlamına gelir [GSTM1 null genotipi=GSTM1 (-)]. GSTM1 genindeki delesyon, özellikle kanser ile ilgili moleküler epidemiyoloji çalışmalarında oldukça önemlidir. Çünkü popülasyon a) potansiyel karsinojenleri detoksifiye edebilen grup ve b) potansiyel karsinojenleri detoksifiye edemeyen grup olarak çok iyi tanımlanabilen iki gruba ayrılabilir. GSTM1 (-) genotipi ve kanser arasındaki ilişki en çok mesane kanseri, ve akciğer kanseri arasında gösterilmiştir¹⁴⁷. Ayrıca meme, özofagus, baş-boyun, kolon, larinks kanseri gibi kanser türleriyle ilişkilendirilen çalışmalar da vardır^{149, 152-157}.

GSTM1 geninde delesyon şeklinde gözlenen varyasyonu, Barrett özofagus ve kontrol grubunda incelediğimizde, iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulmadık. Sonuçlarımıza göre Barrett özofagus hastalarının %67,5'i GSTM1 geninden yoksunken, kontrol grubunun %57,5'inin bu genden yoksun olduğu gözlemlendi. Bu farkın anlamlı olmadığı ve GSTM1 (-) genotipine sahip olmanın hastalık riskini arttırmadığı sonucunda vardık. Çalışmamızda GSTM1 polimorfizmi ile GSH konsantrasyonu arasındaki ilişkiyi de hasta ve kontrol grubunda inceledik. Sonuçlarımız GSH konsantrasyonunun, her iki grupta da GSTM1 genotipinden bağımsız olarak değiştiğini gösterdi. Şu ana kadar Barrett özofagus hastalarında GSTM1 polimorfizminin rolünü araştıran iki çalışmaya rastladık^{117,218}. Bu her iki çalışmanın sonuçları da bizim çalışmamızla uyumludur. Casson ve arkadaşlarının 125 Barrett hastası, 126 GÖR hastası ve 56 adenokarsinoma hastasında yaptıkları çalışmada, her üç grup hasta için GSTM1, GSTT1 ve GSTP1 genlerindeki polimorfizmler açısından, kontrol grubuna göre anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir¹¹⁷. Kala ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada da benzer şekilde, reflü özofajit ve Barrett özofagus hastalarında GSTM1, GSTT1 ve GSTP1 polimorfizmleri incelenmiş ve GSTM1 polimorfizmi kontrole göre farklılık göstermemiştir²¹⁸. Yukarıda bahsedilen çalışmalarda GSTM1 geninin yanı sıra GST gen ailesinden diğer genler de incelenmiş ve farklı sonuçlar elde edilmiştir. Casson ve arkadaşları GSTT1 ve GSTP1 genetik polimorfizmlerini incelemiş ancak Barrett özofagus hastaları ve kontrol grubu arasında anlamlı bir fark bulmamıştır¹¹⁷. Murphy ve arkadaşları da benzer şekilde GSTP1 geni için Barrett özofagusa bireysel yatkınlıkla ilgili pozitif yönde anlamlı bir ilişki saptamamışlardır²⁰. Kala ve arkadaşları ise, reflü özofajit veya Barrett özofagus hastaları ve kontrol grubu arasında GSTT1 genetik polimorfizmi için anlamlı bir fark gözlemezken, GSTP1 B mutant alelinin, Barrett özofagus hastalarında kontrole göre daha sık gözlemlendiğini bildirmiştir²¹⁸. Lieshout ve arkadaşları da benzer şekilde GSTP1 B mutant alelinin, Barrett özofagus ve adenokarsinoma hastalarında kontrole göre daha sık gözlemlendiğini ve GST enzim aktivitesinin bu aleli taşıyanlarda daha düşük olduğunu bildirmiştir¹¹⁸.

Ayrıca Barrett hastalarında, GST enzimlerinin ekspresyon düzeyini veya GST enzim aktivitesini inceleyen çalışmalar da mevcuttur^{215, 216,219,220}. Lieshout ve arkadaşları, Barrett özofagus hastalarında GST enzim aktivitesinin %35 oranında, GST mü ve GST pi seviyelerinin ise sırasıyla %24 ve %30 oranlarında düştüğünü bildirmiştir²¹⁵. Cobbe ve arkadaşları, Barrett özofagus hastalarının ancak %50'sinde GSTM1 geninin bulunduğunu, GSTP1 ve GSTA1 enzimlerin ekspresyonunun ise bu hastalarda azaldığını bulmuştur²²⁰.

Ayrıca çalışmamızda, Barrett özofagus hastalarında ve kontrol grubunda elde edilen Comet yöntemi sonuçlarının, GSTM1 genotipine göre dağılımını inceledik. Sonuç olarak, GSTM1 (-) genotipine sahip olan bireyler, referans genotip olan GSTM1 (+)'e göre kıyaslandığında, comet yöntemi sonuçlarının hiçbirisi için anlamlı bir fark bulmadık. GSTM1 genotipi ile, çeşitli genetik değişikliklerin ilişkisini, özellikle kansere duyarlılık yönünden inceleyen çalışmalar mevcuttur¹⁶⁰⁻¹⁶⁷. Ancak Barrett özofagus hastalığında, Comet yöntemi veya diğer genotoksisite testleri ile (mikroçekirdek, SCE, Kromozomal aberasyon gibi) GSTM1 polimorfizmi arasındaki ilişkiyi inceleyen başka bir çalışmaya rastlamadık. GSTM1 geninin karsinogenezdeki rolü ile ilgili olan hipotez, ciddi somatik değişikliklerin genellikle GSTM1 (-) olan bireylerde daha sık gözlemlendiğini iddia etmektedir. Bu somatik değişiklikler ksenobiyotiklerin karsinogenik etkilerine duyarlılığın göstergesi olabilmektedir¹⁴⁷. Dusinska ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada normal bir popülasyonda GSTM1, T1, P1 genotipleri, GSH konsantrasyonu ve çeşitli comet parametreleri incelenmiştir. Bu çalışmanın sonunda, GSTM1(-) genotipine sahip bireylerin GSH konsantrasyonlarının, GSTM1(+) genotipine sahip olanlara göre daha düşük olduğu, ancak comet parametrelerinin (bazal DNA hasarı, pürin ve pirimidin baz hasarı, H₂O₂ duyarlılık) GSTM1 genotipinden bağımsız olarak değiştiği bulunmuştur²²¹.

Manganez süperoksit dismutaz (MnSOD, SOD2, EC 1.15.1.1), mitokondride süperoksit radikalini uzaklaştırdığı bilinen tek enzimdir. Dolayısıyla, bu enzimin oksidatif strese karşı koruyucu rolü çok önemlidir. MnSOD, aerobik hayatın devamı için vazgeçilmez olduğu kanıtlanmış tek SOD formudur ve yoksunluğu mitokondriyal süperoksit seviyesinin artmasına ve oksidatif strese neden olur¹⁶⁸. MnSOD genindeki tek nokta polimorfizmi (C/T), 16. kodonda 9. pozisyonda aminoasit (Alanin/Valin) değişimine neden olur. Bu polimorfizm (Ala16Val) MnSOD enziminin mitokondrideki işlevini etkileyebilmektedir¹⁶⁹. Mitokondriyal DNA'da oluşan mutasyonların tümör gelişiminde önemli olabileceği çeşitli çalışmalarla gösterilmiş, özellikle meme, prostat, mesane ve deri kanseri ile ilişkilendirilmiştir¹⁷⁰⁻¹⁷².

Çalışmamızda, Barrett özofagus hastalarında ve kontrol grubunda, MnSOD Ala16Val genetik polimorfizminin sıklığını ve bu polimorfizmin Barrett hastalığındaki rolünü inceledik. Ayrıca elde ettiğimiz Comet yöntemi sonuçlarının ve GSH konsantrasyonlarının bu polimorfizme göre dağılımını da inceledik. Kontrol grubunda Alanin (Ala) wild alel sıklığını %48,8, hasta grubunda ise %47,5 olarak bulduk. Valin (Val) mutant aleli ise kontrol grubunda %51,2, hasta grubunda ise %52,5 sıklıkta gözlemlendi. Bu dağılımlar birbiri ile istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermedi. Sonuçlarımıza göre, Ala/Ala homozigot wild, Ala/Val

heterozigot ve Val/Val homozigot mutant genotip dağılımları hasta ve kontrol grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir fark göstermedi. Ala/Val veya Val/Val genotipine sahip olmanın Ala/Ala genotipine kıyasla hastalık riski açısından anlamlı bir farka neden olmadığını gördük. Yine Ala/Ala referans genotipine karşılık Ala/Val heterozigot ve Val/Val homozigot mutant genotipleri toplamını (Ala/Val+Val/Val) riskli varyant genotipler olarak hasta ve kontrol gruplarında karşılaştırdık ve anlamlı bir fark bulmadık. Çalışmamızda hasta ve kontrol grubunda elde ettiğimiz Comet yöntemi sonuçları ve GSH konsantrasyonları, GSTM1 polimorfizminde olduğu gibi, MnSOD Ala16Val genotiplerinden bağımsız olarak değişti.

Barrett özofagus veya reflü özofajit hastalarında SOD seviyesini veya aktivitesini, MnSOD genin ekspresyonundaki değişiklikleri ve MnSOD polimorfizmini inceleyen az sayıda çalışma vardır ve bu çalışmaların sonuçları çelişkilidir. Wetscher ve arkadaşları iki farklı çalışmada, özofajitte ve Barrett özofagusta SOD seviyesini incelemişler ve SOD seviyesinin en fazla ciddi düzeyde özofajiti olan Barrett hastalarında düştüğünü, ancak orta seviyede özofajiti olan Barrett özofagus hastalarında SOD seviyesinin yüksek olduğunu bildirmişlerdir^{194,195}. Sihvo ve arkadaşları ise, GÖR ve Barrett özofagus hastalarında SOD aktivitesini incelemişler ve sadece displazik Barrett özofagus mukozasında arttığını bulmuşlar ve bu sonucu, enflamasyon sitokinlerinin SOD ekspresyonunu arttırmasında bağlamışlardır¹⁹⁷. Jimenez ve arkadaşları ise, özofajiti olan hastalarda ve Barrett özofagus hastalarında, mukozal SOD aktivitesinin azaldığını, ancak Cu, ZnSOD ve MnSOD ekspresyonlarının hasarın şiddetine bağlı olarak arttığını ve en yüksek artışın, Barrett özofagus mukozasında gözlemlendiğini bildirmiştir¹⁹⁹. Hermann ve arkadaşları ise tersine, MnSOD ekspresyonunun Barrett özofagus, düşük ve yüksek dereceli displazi ve özofageal adenokarsinoma hastalarında kontrole göre azaldığını bulmuşlardır²²². Li ve arkadaşları da sıçanlarda yaptıkları çalışmada, MnSOD ekspresyonunun özofajit ve Barrett özofagus olgularında 1-2 ayda azaldığını ancak displazi ve adenokarsinoma gelişim sürecinde arttığını bulmuşlardır²²³. Piazuolo ve arkadaşları da sıçanlarda oluşturdukları Barrett özofagus modelinde, süperoksit radikali ve peroksinitrit oluşumuna bağlı olarak SOD seviyesinin ve aktivitesinin azaldığını, MnSOD ekspresyonunun değişmediğini bildirmiştir²²⁴. Biz çalışmamızda, SOD aktivitesini veya seviyesini ölçmediğimiz ve MnSOD ekspresyonunu araştırmadığımız için sonuçlarımızı yukarıda bahsedilen çalışmalarla kıyaslamak zordur. Ancak çalışmamıza benzer şekilde MnSOD Ala6Val polimorfizmi ile Barrett özofagus riski arasındaki ilişkiyi inceleyen tek bir çalışmaya rastladık. Murphy ve arkadaşlarının 2007 yılında yayınladıkları ve 207 özofageal adenokarsinoma, 189 Barrett özofagus ve 223 kontrol bireyde yaptıkları bu çalışmada, sonuçlarımıza uyumlu şekilde MnSOD polimorfizmi ve Barrett özofagus hastalığına bireysel duyarlılık yönünden anlamlı bir ilişki bulunmamıştır. Aynı sonuç

özofageal adenokarsinoma hastaları için de geçerlidir. Murphy ve arkadaşlarının, aynı çalışmada MnSOD geninde yaptıkları haplotip analizleri de Barrett özofagus hastalığı yönünden anlamlı bir ilişki göstermemiştir²⁰.

Hücrelerde fonksiyonların devamında ve kanserden korunmada genomik bütünlüğün devamı çok önemli olduğundan DNA onarım moleküllerini kodlayan genler, başlıca kansere duyarlılık genleri olarak kabul edilmektedir¹⁸³. İnsanlarda, hOGG1 geni pürin bazında hem halkanın açılmasıyla oluşan lezyonlarının, hem de 8-OHG katım ürünlerinin BEO yoluyla onarılmasında rol oynayan bir glikozidaz enzimidir. Yapılan çalışmalarda hOGG1 geninde birçok tek nokta polimorfizmine rastlanmıştır. Bu polimorfizmlerden özellikle ekzon 7'de 1245. pozisyonda yer alan C/G polimorfizmi, kodon 326'da Serinden Sisteine (Ser326Cys) aminoasit değişimine neden olmakta ve bu polimorfizmin çeşitli kanser türlerinde risk faktörü olduğuna dair çalışmalar bulunmaktadır. *E.Coli* de Serin aleli ile kodlanmış proteinin Sistein aleline göre daha fazla DNA tamir aktivitesine sahip olduğu belirlenmiştir^{183,184}.

Çalışmamızda, Barrett özofagus hastalarında ve kontrol grubunda hOGG1 Ser326Cys genetik polimorfizminin sıklığını ve bu polimorfizmin Barrett hastalığındaki rolünü inceledik. Ayrıca elde ettiğimiz Comet yöntemi sonuçlarının ve GSH konsantrasyonlarının bu polimorfizme göre dağılımını da inceledik. Serin (Ser) wild alel sıklığını kontrol grubunda %73,8, hasta grubunda ise %63,8 olarak bulduk. Sistein (Cys) mutant aleli ise kontrol grubunda %26,2, hasta grubunda ise %36,2 sıklıkta gözlemlendi. Kontrol ve hasta grupları arasındaki bu dağılım, istatistiksel olarak anlamlı bir fark göstermedi. Ser/Ser, Ser/Cys ve Cys/Cys genotip dağılımları da hasta ve kontrol grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermedi. Ser/Cys veya Cys/Cys genotipine sahip olmanın, Ser/Ser referans genotipine kıyasla hastalık riski açısından anlamlı bir farka neden olmadığı gözlemlendi. Ser/Ser referans genotipine karşılık Ser/Cys heterozigot ve Cys/Cys homozigot mutant genotipleri toplamı (Ser/Cys+Cys/Cys) riskli varyant genotipler olarak hasta ve kontrol gruplarında karşılaştırıldı ve yine istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç bulunmadı.

Barrett özofagus hastalığında bazı DNA onarım genlerindeki polimorfizmleri veya çeşitli mutasyonların rolünü inceleyen birkaç çalışma mevcuttur^{17,18,225}. Casson ve arkadaşları 126 GÖR, 125 Barrett özofagus ve 56 özofageal adenokarsinoma hastalarında yaptıkları çalışmada, XPD (Arg156Gln, Lys751Gln), XRCC1 (Arg194Trp, Arg399Gln), XRCC3 (Thr241Met) ve XPC (delesyon) genetik polimorfizmlerinin rolünü incelemişlerdir. Bu çalışmada XRCC1 mutant genotipinin, GÖR ve Barrett

hastalarında koruyucu rol oynadığını, XPC mutant genotip sıklığının özofageal kanser hastalarında yüksek olduğunu, ancak XPD mutant genotipinin bu hastalarda koruyucu rol oynadığını bulmuşlardır¹⁷. Falkenback ve arkadaşları ise Barrett özofagusu bağı olarak gelişen kanser hastalarında, yanlış eşleşme onarım sistemindeki bozuklukları araştırmak amacıyla, bu yolaktaki proteinlerin ekspresyon düzeylerini incelemişler ve sadece 2 hastada MLH1 ve MLH2 proteinlerinde azalma saptamışlardır²²⁵. Raja ve arkadaşları ise 37 Barrett özofagus hastasında MXI1, hOGG1, p53, MTS1, DCC ve APC genlerindeki mutasyon sıklıklarını sekanslama yöntemi ile incelemişler ve bu hastaların % 34'ünde hOGG1 geni ile ilgili mutasyona rastlamışlardır. Raja ve arkadaşları, bu genlerdeki toplam mutasyon sıklığı ile metaplazi-displazi zinciri arasında, pozitif yönde bir korelasyon olduğunu bildirmişlerdir¹⁸.

DNA onarım genlerinden XRCC1, XRCC3, XPD, XPC genlerindeki çeşitli polimorfizmler özofagus kanser riski açısından da incelenmiştir²²⁶. hOGG1 Ser326Cys polimorfizmi ve özofagus kanseri arasındaki ilişki, Çin'de yapılan çalışmalarda incelenmiş ve Cys/Cys genotipinin bu kanser türü için bireysel duyarlılığa neden olduğu bildirilmiştir. Ancak bu çalışmalarda araştırılan kanser türü adenokarsinoma değil de skuamoz tipi olduğundan Barrett özofagusu ile ilişkilendirmek mümkün değildir²²⁷⁻²²⁹.

DNA onarım genleri ile ilgili polimorfizmlerin çeşitli genotoksik biyogöstergeler ile ilişkisini inceleyen çalışmalar son yıllarda artmıştır. Modifiye comet yöntemi kullanılarak elde edilen oksidatif DNA hasarı ve DNA onarım kapasitesi ile ilgili biyogöstergelerin, DNA onarım genlerindeki çeşitli polimorfizmlerle olan ilişkisini, çeşitli maruziyet durumlarında veya hastalıklarda inceleyen çalışmalar da mevcuttur^{3, 4, 193, 211, 230}.

Çalışmamızda elde ettiğimiz Comet yöntemi sonuçlarını referans genotip olan Ser/Ser genotipine karşı kıyasladığımızda Cys/Cys genotiplerini taşıyan bireyler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmezken, Ser/Cys genotipini taşıyan hasta grubunun istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek pirimidin baz hasarına sahip olduğu gözlemlendi. Ser/Cys heterozigot ve Cys/Cys homozigot mutant genotipleri toplamı (Ser/Cys+Cys/Cys) riskli varyant genotipler olarak Ser/Ser referans genotipine karşı kıyaslandığında yine pirimidin baz hasarının istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu bulundu. Bu sonuç OGG1 enziminin pürin baz hasarına spesifik olduğu düşünüldüğünden ilginçtir. Ancak son zamanlarda BEO yolağındaki enzimlerin substrat spesifitesi ile ilgili olarak yapılan çalışmalarda *E.Coli* ve *S.cerevisiae*'de

yapılan alıřmalar Fpg proteininin pirimidin baz hasarlarına da dūřuk aktivite gōsterdiğini bildirmektedir^{231, 232}.

hOGG1 Ser326Cys genotip analizinde, varyant genotiplere sahip olan bireylerin, DNA onarım kapasitesi, pirimidin ve pūrin baz hasarlarının onarılma kapasiteleri, referans genotipe gōre kıyaslandığında dūřtūğūnū, ancak bu dūřūřūn istatistiksel olarak anlamlı olmadığını bulduk. Ŗzellikle DNA onarım kapasitesi, kontrol grubundaki Cys/Cys genotipine sahip bireylerde (16,72±7,23), Ser/Ser genotipine sahip olanlara gōre (34,31±12,38) iki katı kadar dūřmūř olmasına rağmen, bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi. Hasta ve kontrol gruplarındaki, GSH konsantrasyonları ise, GSTM1 ve MnSOD Ala16Val polimorfizmlerinde olduėu gibi, hOGG1 Ser326Cys genotipinden bağımsız olarak değışti.

Genetik polimorfizm çalışmaları, bireylerin maruziyete ve hastalıklara duyarlılıklarının değeriendirilmesini sağlamaktadır. Son zamanlarda, riskli genotiplerin kombinasyonlarının incelenmesi, hastalığa duyarlılığın belirlenmesinde daha da Ŗnem kazanmıştır. Bōylece gen-gen etkileşimlerinin, çeşitli hastalıklar açısından değeriendirilmesi mōmkūn olmaktadır². Biz de alışmamızda, Barrett Ŗzofagus hastalığına bireysel duyarlılığı araştırmak amacıyla, Ŗ farklı genetik polimorfizmin (GSTM1, MnSOD Ala16Val, hOGG1 Ser326Cys) kombinasyonlarını inceledik. Bu amaçla Ŗnce risk kategorisine gōre farklı genotip kombinasyonları oluşturduk. Daha sonra bu kombinasyonları riskin gōzlenmediėini dūřūndūğūmūz, referans kombinasyona (wild genotip) karşı hastalık riski açısından kıyasladık. Çalışmamızda, bu kombinasyonlardan hiçbirinin, Barrett Ŗzofagus hastalığına bireysel duyarlılıkta, kontrole gōre istatistiksel olarak anlamlı bir fark oluşturmadığı sonucuna vardık.

6. SONUÇ

Barrett özofagus hastalığı, başlıca gastroözofageal reflü hastalığı sonucunda oluşan ve neredeyse tüm özofageal adenokarsinomaların nedeni olan premalign bir hastalıktır. Bu nedenle popülasyondaki Barrett hastaları, yüksek risk grubunda hastalar olarak kabul edilmektedir. Ancak bazı Barrett özofagus hastalarında kanser gelişirken bazılarında gelişmemesinin nedeni tam olarak bilinmemektedir. Şu ana kadar, yüksek ve düşük riskli hasta gruplarının birbirinden ayrılmasını sağlayacak sağlıklı klinik bir gösterge yoktur²¹⁹. Barrett özofagus hastalığının etiyolojisinde rol oynayan genetik değişimlerin belirlenmesi, özellikle yüksek risk altındaki bireylerin özofagus adenokarsinoma tipi kanserden korunmasında etkili olabilecek biyogöstergelerin geliştirilmesine olanak sağlayacaktır². Çalışmamızda premalign bir lezyon olan Barrett özofagus hastalığının etiyolojisinde, oksidatif stres ile ilgili olarak, oksidatif DNA hasarının ve GSH konsantrasyonunun, bireysel duyarlılık ile ilgili olarak da DNA onarım kapasitesinin, GSTM1, MnSOD Ala16Val ve hOGG1 Ser326Cys genetik polimorfizmlerinin rolünü inceledik. Ayrıca oksidatif stres ile ilgili incelediğimiz parametrelerin bireysel duyarlılık ile ilişkisini de araştırdık.

Çalışmamızın sonuçları, Barrett özofagus hastalığının gelişiminde, DNA hasarının ve okside olmuş pirimidin baz hasarının rol oynayabileceğini gösterdi. Çalışmamıza göre, GSH konsantrasyonunun ölçümü, güvenilir bir oksidatif stres göstergesi olarak kabul edilse de Barrett özofagus hastalığı için tek başına klinik bir gösterge olmadığı, ancak sigara içen Barrett özofagus hastalarında GSH konsantrasyonunun, kontrole göre anlamlı derecede düştüğü belirlendi. Barrett özofagus hastalığına bireysel duyarlılık ile ilgili olarak ise, bu hastaların H₂O₂ indüksiyonuna kontrol grubuna göre daha duyarlı olduğu, ancak bu indüksiyon sonucunda oluşan hasarın onarımının kontrole göre farklı olmadığını bulduk. Ancak yaşın, pürin baz hasarlarının onarılma kapasitesini etkilediğini ve 40 yaş üzerindeki bireylerin onarma kapasitelerinin daha düşük olduğunu gördük.

İncelediğimiz genetik varyasyonların (GSTM1, MnSOD Ala16Val ve hOGG1 Ser326Cys) hiçbirinin, Barrett özofagus hastalığına yakalanma riskini arttırmadığı sonucunda vardık. GSTM1 ve MnSOD genotip analizindeki riskli varyasyonları, referans genotipe göre, Comet yöntemi sonuçları veya GSH konsantrasyonu açısından kıyasladığımızda anlamlı bir fark bulmadık. Ancak hOGG1 Cys mutant alelini taşıyan hasta grubunun Ser alelini taşıyanlara göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek pirimidin baz hasarına sahip olduğunu gözledik. Ayrıca DNA

onarım kapasitesi, kontrol grubundaki Cys/Cys genotipine sahip bireylerde, Ser/Ser genotipine sahip olanlara göre iki katı kadar düşmüş olmasına rağmen, bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi. Çalışmamızda, Barrett özofagus hastalığına bireysel duyarlılığı araştırmak amacıyla, üç farklı genetik polimorfizmin (GSTM1, MnSOD Ala16Val, hOGG1 Ser326Cys) kombinasyonlarını da inceledik. Ancak bu kombinasyonlardan hiçbirinin, Barrett özofagus hastalığına bireysel duyarlılıkta, kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark oluşturmadığı sonucuna vardık.

Çalışmamızın yukarıda özetlenen sonuçları, Barrett özofagus hastalığının gelişiminde, oksidatif DNA hasarının rolü olabileceğine ancak bu hastalığa bireysel duyarlılıkta DNA onarımının ve GSTM1, MnSOD Ala16Val ve hOGG1 Ser326Cys genetik polimorfizmlerinin rolü olmadığına dikkat çekmektedir. Çalışmamız bu konuda yapılan kapsamlı bir çalışma olduğundan önemlidir. Daha ileri düzeyde, yaptığımız çalışmada incelenen parametrelerin, Barrett özofagus, GÖR ve özofageal adenokarsinoma hastalığında karşılaştırmalı olarak incelenmesi düşünülebilir. Ayrıca bu hastalıklarda, hedef doku olarak özofagus epitel hücrelerin de incelenmesi daha sağlıklı yorum yapmamıza olanak sağlayabilir. Çalışmamızda incelediğimiz duyarlılık genlerinin yanı sıra, farklı genlerin bir arada araştırılması da ilerdeki çalışma hedefi olarak belirlenebilir.

7. ÖZET

Barrett özofagus hastalığının etiyolojisinde rol oynayan genetik değişimlerin belirlenmesi, özellikle yüksek risk altındaki bireylerin özofagus adenokarsinoma tipi kanserden korunmasında etkili olabilecek biyogöstergelerin geliştirilmesine olanak sağlayacaktır.

Çalışmamızın amacı, Barrett özofagus hastalığının etiyolojisinde, oksidatif stres ile ilgili olarak, oksidatif DNA hasarının ve GSH konsantrasyonunun, bireysel duyarlılık ile ilgili olarak da DNA onarım kapasitesinin, GSTM1, MnSOD Ala16Val ve hOGG1 Ser326Cys genetik polimorfizmlerinin rolünü incelemektir. Ayrıca oksidatif stres ile ilgili incelediğimiz parametrelerin bireysel duyarlılık ile ilişkisini de araştırdık. Çalışmamız, klinik olarak teşhis edilen Barrett özofagus hastaları (n=40) ve sağlıklı kontrol grubundan (n=40) oluşturuldu.

Hasta ve kontrol grubunda bazal DNA hasarı, H₂O₂ indüksiyonu sonucunda oluşan pirimidin ve pürin baz hasarı, hücrelerin H₂O₂ indüksiyonuna duyarlılıkları, % DNA onarım kapasitesi, pirimidin ve pürin baz hasarlarının yüzde onarılma kapasiteleri, spesifik endonükleazlar (Endo III ve Fpg) kullanılarak modifiye edilen, Comet yöntemi ile periferik kan lenfositlerinde incelendi. Hasta grubunun kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bazal DNA hasarı ve pirimidin baz hasarına sahip olduğu gözlemlendi (p<0,05). Hasta grubunun, kontrole göre H₂O₂ indüksiyonuna daha duyarlı olduğu gözlemlendi (p<0,001). Hasta ve kontrol grubundaki %DNA onarım kapasitesi, pirimidin ve pürin baz hasarlarının yüzde onarılma kapasiteleri istatistiksel olarak farklı değildi (p>0,05). GSH konsantrasyonunun, sigara içen hastalarda kontrole göre anlamlı derecede düştüğü gözlemlendi (p<0,05). PCR-RFLP metodu ile incelediğimiz genetik varyasyonların hiçbirinin, tek başına veya kombine olarak, Barrett özofagus hastalığına yakalanma riskini arttırmadığı sonucuna vardık. Ancak, hOGG1 Cys mutant alelini taşıyan hasta grubunun Ser alelini taşıyanlara göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek pirimidin baz hasarına sahip olduğunu gözledik (p<0,05). Çalışmamızın sonuçları, Barrett özofagus hastalığının gelişiminde, oksidatif DNA hasarının rolü olabileceğine, ancak bu hastalığa bireysel duyarlılıkta DNA onarımının ve GSTM1, MnSOD Ala16Val ve hOGG1 Ser326Cys genetik polimorfizmlerinin rolü olmadığına dikkat çekmektedir.

8. SUMMARY

Determination of the genetic alterations, which play a role in the ethiology of the Barrett's esophagus, will provide developing new biomarkers to protect the high risk population, against esophageal adenocarcinoma disease.

The aim of our study was to investigate the role of oxidative DNA damage, GSH concentration as oxidative stress parameters and DNA repair capacity, GSTM1, MnSOD Ala16Val and hOGG1 Ser326Cys genetic polymorphisms as individual susceptibility parameters in the ethiology of Barrett's esophagus. We have also investigated the relation of these two group of parameters. Our study was consisted of Barrett's esophagus patients who are clinically diagnosed (n=40) and a healthy control group (n=40).

Basal DNA damage, pyrimidine and purine base damage afer H_2O_2 induction, H_2O_2 sensitivity, DNA repair capacity%, oxidized pyrimidine and purine base damage repair%, were evaluated in peripheral blood lymphocytes with modified Comet assay by using spesific endonucleases (Endo III and Fpg). The patient group showed elevated levels of basal DNA damage and pyrimidine base damage as compared to control group ($p<0,05$). The H_2O_2 sensitivity was also elevated in patient group as compared to control group ($p<0,05$). DNA repair capacity%, oxidized pyrimidine and purine base damage repair capacity% were not statistically different between patient and control group ($p>0,05$). GSH concentration was found to be significantly lower in smoking patients than controls ($p<0,05$). None of the genetic variations either alone or in combination, changed the risk of having Barrett's esophagus disease as determined with PCR-RFLP method. However, patients carrying the Cys mutant allele showed elevated levels of pyrimidine base damage, as compared to patients carrying Ser wild allele ($p<0,05$). In conclusion, the results of this study points out the role of oxidative DNA damage in Barrett's esophagus however, DNA repair capacity, GSTM1, MnSOD Ala16Val and hOGG1 Ser326Cys genetic polymorphisms seem to have no effect on individual susceptibility in progressing the disease.

9. KAYNAKLAR

1. Au WW. Usefulness of biomarkers in population studies: From exposure to susceptibility and to prediction of cancer. *Int. J. Hyg. Environ.-Health* 2007; 210: 239–246.
2. Wild CP, Lawb GR, Romanb E. Molecular epidemiology and cancer: promising areas for future research in the post- genomic era. *Mutation Research* 2002; 499:3–12.
3. Akaa P, Mateucaa R, Buchetb JP, Thierensc H, Kirsch-Volders M. Are genetic polymorphisms in OGG1, XRCC1 andXRCC3 genes predictive for the DNA strand break repair phenotype and genotoxicity in workers exposed to low dose ionising radiations? *Mutation Research* 2004; 556: 169–181
4. Mateucaa R, Akaa PV, De Boecka M, Hauspieb R, Kirsch-Volders M, Lisonc D. Influence of hOGG1, XRCC1 and XRCC3 genotypes on biomarkers of genotoxicity in workers exposed to cobalt or hard metal dusts. *Toxicology Letters* 2005; 156: 277–288.
5. Bonassi S, Ugolini D, Kirsch-Volders M, Strömberg U, Vermeulen R, Tucker JD. Human Population Studies with Cytogenetic Biomarkers: Review of the Literature and Future Prospectives *Environmental and Molecular Mutagenesis* 2005; 45: 258-270.
6. Bonino JA, Sharma P. Barrett's esophagus. *Curr Opin Gastroenterol* 2005; 21:461–465.
7. Wild CP Hardie LJ. Reflux, Barrett's Oesophagus and Adenocarcinoma: Burning Questions. *Nature Reviews Cancer*. 2003; 3: 676–684.
8. Kollarova H, Machova L, Horakova D, Janoutova G, Janout V. Epidemiology of Esophageal Cancer – An Overview Article. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2007; 151(1):17–28.
9. Türk Kanser Araştırma ve Savaş Kurumu, Kanser İstatistikleri. [online]. Available from: URL: <http://www.turkcancer.org/>
10. Altorki NK, Oliveria S, Schrupp DS. Epidemiology and Molecular Biology of Barrett's Adenocarcinoma. *Seminars in Surgical Oncology* 1997; 13:270–280.
11. Rajendra S, Kutty K, Karım N, Ethnic Differences in the Prevalence of Endoscopic Esophagitis and Barrett's Esophagus: The Long and Short of It All. *Digestive Diseases and Sciences* 2004; 49 (2): 237–242.
12. Toruner M, Soykan I, Ensar A, Kuzu I, Yurdaydın C, Özden A. Barrett's esophagus: prevalence and its relationship with dyspeptic symptoms. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 2004; 19 (5) :535-540.
13. Yılmaz N, Tuncer K, Tunçyürek M, Özütemiz Ö, Bor S. The prevalence of Barrett's esophagus and erosive esophagitis in a tertiary referral center in Turkey. *Turk J Gastroenterol* 2006; 17 (2): 79-83.

14. Dvorak K, Fass R, Dekel R, Payne M, Chavarria M, Dvorakova B ve ark. Esophageal acid exposure at $\text{pH} \leq 2$ is more common in Barrett's esophagus patients and is associated with oxidative stres. *Diseases of the Esophagus* 2006; 19: 366–372.
15. Dvorak K, Payne CM, Chavarria M, Ramsey L, Dvorakova B, Bernstein H ve ark. Bile acids in combination with low pH induce oxidative stres and oxidative DNA damage: relevance to the pathogenesis of Barrett's oesophagus. *Gut* 2007;56.763–771.
16. Jolly AJ, Wild CP, Hardie LJ. Acid and bile salts induce DNA damage in human oesophageal cell lines. *Mutagenesis* 2004; 19 (4) 319–324.
17. Raja S, Finkelstein SD, Baksh FK, Gooding WE, Swalsky PA, Godfrey TE ve ark. Correlation Between Dysplasia and Mutations of Six Tumor Suppressor Genes in Barrett's Esophagus. *Ann Thorac Surg* 2001;72: 1130 –5.
18. Casson AG, Zheng Z, Evans SC, Veugelers PJ, Porter GA, Guernsey DL. Polymorphisms in DNA repair genes in the molecular pathogenesis of esophageal (Barrett) adenocarcinoma. *Carcinogenesis* 2005; 26 (9): 1536–1541.
19. Casson AG, Mukhopadhyay T, Cleary KR, Ro JY, Levin B, Roth JA. p53 Gene Mutations in Barrett's Epithelium and Esophageal Cancer. *Cancer Research* 1991; 5: 4495–4499.
20. Murphy SJ, Hughes AE, Patterson CC, Anderson LA, Watson PRG, Johnston BT. A population-based association study of SNPs of GSTP1, MnSOD, GPX2 and Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma. *Carcinogenesis* 2007; 28 (6): 1323–1328.
21. Tileston W. Peptic ulcer of the esophagus. *Am J Med Sci.* 1906; 132: 240.
22. Barrett NR. Chronic peptic ulcer of the oesophagus and oesophagitis. *Br J Surg* 1950; 38: 175.
23. Allison PR, Johnstone AS. The oesophagus lined with gastric mucous membrane. *Thorax* 1953; 8: 87.
24. Ödemiş B, Yüksel O, Oğuz D. Barrett özofagus. *Güncel Gastroenteroloji* 2002; 6: 195–199.
25. Shalauta MD, Saad R Barrett's Esophagus. *Am Fam Physician* 2004;69: 2113-8.
26. Pohl H, Welch HG. The Role of Overdiagnosis and Reclassification in the Marked Increase of Esophageal Adenocarcinoma Incidence. *J Natl Cancer Inst* 2005; 97: 142– 6.
27. CANCER Mondial. Globocan 2002. [online]. Available from: URL: <http://www-dep.iarc.fr/>
28. United States Cancer Statistics, 2003. Incidence and Mortality. 2006. [online]. Available from: URL: <http://www.cdc.gov/uscs/>
29. Csendes A, Smok G, Burdiles P, Quesada F, Huertas C, Rojas J ve ark. Prevalence of Barrett's esophagus by endoscopy and histologic studies:a

- prospective evaluation of 306 control subjects and 376 patients with symptoms of gastroesophageal reflux. *Diseases of the Esophagus* 2000; 13: 5-11.
30. Gerson LB, Shetler K, Triadafilopoulos G. Prevalence of Barrett's esophagus in asymptomatic individuals. *Gastroenterology* 2002;123(2):461-7.
 31. An in-depth information source about Barrett's esophagus. [online] 2007. [cited 2007 Nov]. Available from: URL : www.barrettsinfo.com
 32. Fitzgerald RC. Molecular basis of Barrett's oesophagus andoesophageal adenocarcinoma. *Gut* 2006; 55: 1810–1820.
 33. Mehta S, Johnson IT, Rhodes M. Systematic review: the chemoprevention of oesophageal adenocarcinoma. *Aliment Pharmacol Ther* 2005; 22: 759–768.
 34. Williams LJ, Guernsey DL, Casson AG. Biomarkers in the molecular pathogenesis of esophageal (Barrett) adenocarcinoma. *Current Oncology* 2006; 13 (1): 33–43.
 35. Stein HJ, Feith M, Rahden BAH, Siewert R. Approach to Early Barrett's Cancer. *World J. Surg.* 2003; 27: 1040–1046.
 36. Haggitt RC. Barrett's esophagus, dysplasia, and adenocarcinoma. *Hum Pathol.* 1994; 25(10): 982–93.
 37. Buttar NS, Wang KK, Sebo TJ, Riehle DM, Krishnadath KK, Lutzke LS ve ark. Extent of high-grade dysplasia in Barrett's esophagus correlates with risk of adenocarcinoma. *Gastroenterology.* 2001; 120(7): 1630-9.
 38. Kim R, Weissfeld JL, Reynolds JC, Kuller LH. Etiology of Barrett's Metaplasia and Esophageal Adenocarcinoma. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 1997; 6: 369–377.
 39. Koppert LB, Wijnhoven PL, Van Dekken H, Tilanus Hw, Dinjens WNM. The Molecular Biology of Esophageal Adenocarcinoma. *Journal of Surgical Oncology* 2005; 92: 169–190.
 40. Aldulaimi D, Jankowski J. Barrett's esophagus: an overview of the molecular biology. *Diseases of the Esophagus* 1999; 12: 177–180.
 41. Oberg S, Wenner J, Johansson J, Walther B, Willen R. Barrett Esophagus: Risk Factors for Progression to Dysplasia and Adenocarcinoma. *Ann Surg* 2005; 242: 49–54.
 42. Jankowski JA, Wright NA, Meltzer SJ, Triadafilopoulos G, Geboes K, Casson AG. Molecular Evolution of the Metaplasia-Dysplasia-Adenocarcinoma Sequence in the Esophagus. *American Journal of Pathology* 1999; 154 (4): 965–973.
 43. Wijnhoven BPL, Tilanus HW, Dinjens WNM. Molecular Biology of Barrett's Adenocarcinoma. *Annals Of Surgery* 2001;233: 322–337.
 44. Atherfold PA, Jankowski JA. Molecular biology of Barrett's cancer. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 2006; 20 (5): 813-827.

45. Buttar NS, Wang KK. Mechanisms of Disease: carcinogenesis in Barrett's esophagus. *Nature Clinical Practice Gastroenterology & Hepatology* 2004; 1(2): 106–112.
46. Klump B, Hsieh CJ, Holzmann K, Gregor M, Porschen R. Hypermethylation of the CDKN2/p16 promoter during neoplastic progression in Barrett's esophagus. *Gastroenterology* 1998; 115 (6):1381–6.
47. Schneider PM, Casson AG, Levin B, Garewal HS, Hoelscher AH, Becker K ve ark. Mutations of p53 in Barrett's esophagus and Barrett's cancer: a prospective study of ninety-eight cases. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1996; 111(2): 323–31.
48. Younes M, Schwartz MR, Finnie D, Younes A. Overexpression of Fas ligand (FasL) during malignant transformation in the large bowel and in Barrett's metaplasia of the esophagus. *Hum Pathol.* 1999; 30(11):1309–13.
49. Younes M, Lechago J, Ertan A, Finnie D, Younes A. Decreased expression of Fas (CD95/APO1) associated with goblet cell metaplasia in Barrett's esophagus *Hum Pathol.* 2000; 31(4): 434–8.
50. Goldblum JR, Rice TW. bcl-2 protein expression in the Barrett's metaplasia-dysplasia-carcinoma sequence. *Mod Pathol.* 1995; 8(8): 866-9.
51. Funkhouser EM, Sharp GB. Aspirin and reduced risk of esophageal carcinoma. *Cancer.* 1995; 76(7): 1116–9.
52. Salmela MT, Karjalainen-Lindsberg ML, Puolakkainen P, Saarialho-Kere U. Upregulation and differential expression of matrilysin (MMP-7) and metalloelastase (MMP-12) and their inhibitors TIMP-1 and TIMP-3 in Barrett's oesophageal adenocarcinoma. *British Journal of Cancer* 2001; 85(3): 383–392.
53. Morales CP, Lee EL, Shay JW. In Situ Hybridization for the Detection of Telomerase RNA in the Progression from Barrett's Esophagus to Esophageal Adenocarcinoma. *Cancer* 1998; 83: 652–9.
54. Krishnadath KK, Tilanus HW, Van Blankenstein M, Hop WCJ, Elisa Kremers D, Dinjens WNM ve ark. Reduced Expression Of The Cadherin–Catenin Complex In Oesophageal Adenocarcinoma Correlates With Poor Prognosis. *Journal Of Pathology* 1997; 182: 331–338.
55. Kyrgidis A, Kountouras Jannis, Zavos C, Chatzopoulos D. New Molecular Concepts of Barrett's Esophagus: Clinical Implications and Biomarkers. *Journal of Surgical Research* 2005; 125: 189–212.
56. Zhuang Z, Vortmeyer AO, Mark EJ, Odze R, Emmert-Buck MR, Merino MJ ve ark. Barrett's Esophagus: Metaplastic Cells with Loss of Heterozygosity at the APC Gene Locus Are Clonal Precursors to Invasive Adenocarcinoma. *Cancer Research* 1996; 56: 1961-1964.
57. Anderson A, Watson RGP, Murphy SJ, Johnston BT, Comber H, Mc Guigan J ve ark. Risk factors for Barrett's oesophagus and oesophageal adenocarcinoma: Results from the FINBAR study. *World J Gastroenterol* 2007; 13(10): 1585-1594.
58. National Digestive Diseases Information Clearinghouse. 2007. [online]. Available from: URL: <http://digestive.niddk.nih.gov/>

59. Karamanolis G, Sifrim D. Developments in pathogenesis and diagnosis of gastroesophageal reflux disease. *Curr Opin Gastroenterol* 2007; 23: 428–433.
60. Olliver JR, Hardie LJ, Gong YY, Dexter S, Chalmers D, Harris KM ve ark. Risk Factors, DNA Damage, and Disease Progression in Barrett's Esophagus. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005;14 (3):620–5.
61. Bor S, Mandıracıoğlu A, Kitapçıoğlu G, Caymaz Bor C, Gilbert RJ. Gastroesophageal reflux disease in a low-income region in Turkey. *Am J Gastroenterology* 2005; 100: 759-765.
62. Wu AH, Wan P, Bernstein L. A multiethnic population based study of smoking alcohol and body size and risk of adenocarcinomas of the stomach and esophagus (United States). *Cancer causes and control* 2001; 12: 721-732.
63. De Jonge PJF, Steyerberg E, Kuipers EJ, Honkoop P, Leonieke M. Wolters M ve ark. Risk Factors for the Development of Esophageal Adenocarcinoma in Barrett's Esophagus. *Am J Gastroenterol* 2006;101:1421–1429.
64. Vaughan TL, Davis S, Kristal A, Thomas DB. Obesity, Alcohol, and Tobacco as Risk Factors for Cancers of the Esophagus and Gastric Cardia: Adenocarcinoma versus Squamous Cell Carcinoma. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 1995; 4: 85-92.
65. Levi F, Ollyo JB, La Vecchia C, Boyle P, Monnier P, Savary M. The consumption of tobacco, alcohol and the risk of adenocarcinoma in Barrett's oesophagus. *Int J Cancer*. 1990; 45(5): 852–4.
66. Lagergren J, Bergstrom R, Lindgren A, Nyren O. The Role Of Tobacco, Snuff And Alcohol Use In The Aetiology Of Cancer Of The Oesophagus And Gastric Cardia. *Int. J. Cancer* 2000; 85: 340–346.
67. Johansson J, Hakansson HO, Mellblom L, Kempas A, Johansson KE, Granath F ve ark. Risk factors for Barrett's oesophagus: A population-based approach. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 2007; 42: 148–156.
68. Conio M, Filiberti R, Bianchi S, Ferraris R, Marchi S, Ravelli P ve ark. Risk Factors For Barrett's Esophagus: A Case-Control Study. *Int. J. Cancer* 2002; 97: 225–229.
69. Gray MR, Donnelly RJ, Kingsnorth AN. The role of smoking and alcohol in metaplasia and cancer risk in Barrett's columnar lined oesophagus. *Gut* 1993; 34: 727–731.
70. Zhang ZF, Kurtz RC, Sun M, Karpeh M, Yu GP, Gargon N ve ark. Adenocarcinomas of the Esophagus and Gastric Cardia: Medical Conditions, Tobacco, Alcohol, and Socioeconomic Factors. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 1996; 5: 761–768.
71. Lagergren J. Adenocarcinoma of oesophagus: what exactly is the size of the problem and who is at risk? *Gut* 2005;54:1–5.

72. Mayne ST, Navarro SA. Diet, Obesity and Reflux in the Etiology of Adenocarcinomas of the Esophagus and Gastric Cardia in Humans. *J. Nutr.* 2002; 132:3467–3470.
73. Sewram V, De Stefani E, Brennan P, Boffetta P. Mate Consumption and the Risk of Squamous Cell Esophageal Cancer in Uruguay. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 2003; 12: 508–513.
74. Hung HC, Huang MC, Lee JM, Wu DC, Hsu HK, Wu MT. Association between diet and esophageal cancer in Taiwan. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 2004; 19: 632–637.
75. Pera M, Manterola C, Vidal O, Grande L. Epidemiology of Esophageal Adenocarcinoma. *Journal of Surgical Oncology* 2005;92:151–159.
76. Bu X, Ma Y, Der R, Demeester T, Bernstein L, Chandrasoma PT. Body Mass Index is Associated with Barrett Esophagus and Cardiac Mucosal Metaplasia. *Dig Dis Sci* 2006; 51:1589–1594.
77. El-Serag HB, Kvapil P, Hacken-Bitar J, Kramer JR. Abdominal Obesity and the Risk of Barrett's Esophagus. *Am J Gastroenterol* 2005;100:2151–2156.
78. Jacobson BC, Somers SC, Fuchs CS, Kelly CP, Camargo CA Jr. Body-mass index and symptoms of gastroesophageal reflux in women. *N Engl J Med.* 2006;354(22):2340-8.
79. Rey E, Moreno-Elola-Olaso C, Artalejo FR, Locke GR 3rd, Diaz-Rubio M. Association between weight gain and symptoms of gastroesophageal reflux in the general population. *Am J Gastroenterol.* 2006;101(2):229-33.
80. Veugelers PJ, Porter GA, Guernsey DL, Casson AG. Obesity and lifestyle risk factors for gastroesophageal reflux disease, Barrett esophagus and esophageal adenocarcinoma. *Diseases of the Esophagus* 2006;19: 321–328.
81. Hampel H, Abraham NS, El-Serag HB. Meta-Analysis: Obesity and the Risk for Gastroesophageal Reflux Disease and Its Complications. *Ann Intern Med.* 2005;143:199–211.
82. Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray Taylor, Xu J, Thun MJ. Cancer Statistics, 2007. *CA Cancer J Clin* 2007;57: 43–66.
83. Zheng T, Mayne ST, Holford TR, Boyle P, Liu W, Chen Y et al. The time and age-period-cohort effects on incidence of adenocarcinoma of the stomach in Connecticut from 1955–1989. *Cancer.* 1993;72(2):330–40.
84. Susan S. Devesa, William J. Blot, P, Joseph F. Fraumeni, Jr. Changing Patterns in the Incidence of Esophageal and Gastric Carcinoma in the United States. *Cancer* 1998;83: 2049–53.
85. Cameron AJ, Lomboy CT. Barrett's esophagus: age, prevalence, and extent of columnar epithelium. *Gastroenterology* 1992;103:1241–1245.
86. Yang PC, Davis S. Incidence of cancer of the esophagus in the US by histologic type. *Cancer.* 1988;61(3):612–7.

87. Reynolds TV, Rockwell S, Glazer PM. Genetic Instability Induced by the Tumor Microenvironment. *Cancer Research* 1996; 56: 5754-5757.
88. Gollin SM. Mechanisms leading to chromosomal instability. *Seminars in Cancer Biology* 2005; 15: 33-42.
89. Pohler E, Craig AL, Cotton J, Lawrie L, Dillon JF, Ross P, Kernohan N, Hupp TR. The Barrett's Antigen Anterior Gradient-2 Silences the p53 Transcriptional Response to DNA Damage. *Molecular & Cellular Proteomics* 2004; 3: 534-547.
90. Krishnadath KK, Tilanus HW, Blankenstein M, Hop WCJ, Teijgeman R, Mulder AH ve ark. Accumulation of Genetic Abnormalities during Neoplastic Progression in Barrett's Esophagus *Cancer Research* 1995; 55: 1971-1976.
91. Finley JC, Reid BJ, Odze RD, Sanchez CA, Galipeau P, Li X ve ark. Chromosomal Instability in Barrett's Esophagus Is Related to Telomere Shortening. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006;15(8):1451-7.
92. Doak S H, Jenkins G J S, Parry E M, D'Souza F R, Griffiths A P, Toffazal N ve ark. Chromosome 4 hyperploidy represents an early genetic aberration in premalignant Barrett's oesophagus. *Gut* 2003;52:623-628.
93. Eads CA, Lord RV, Kurumboor SK, Wickramasinghe K, Skinner ML, Long TI ve ark. Fields of Aberrant CpG Island Hypermethylation in Barrett's Esophagus and Associated Adenocarcinoma. *Cancer Research* 2000; 60: 5021-5026.
94. Chak A, Lee T, Kinnard M F, Brock W, Faulx A, Willis J ve ark. Familial aggregation of Barrett's oesophagus, oesophageal adenocarcinoma, and oesophagogastric junctional adenocarcinoma in Caucasian adults. *Gut* 2002;51: 323-328.
95. Balcom HM, Falk G, Grady WM, Kinnard M, Willis J, Elston R ve ark. Consortium approach to identifying genes for Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma. *Translational Research* 2007;150:3-17.
96. Chak A, Ochs-Balcom H, Falk G, Grady WM, Kinnard M, Willis JE ve ark. Familiality in Barrett's Esophagus, Adenocarcinoma of the Esophagus, and Adenocarcinoma of the Gastroesophageal Junction. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006;15(9):1668-73.
97. Olyaei M, Sontag S, Salman W, Schnell T, Mobarhan S, Eiznhamer D ve ark. Mucosal reactive oxygen species production in oesophagitis and Barrett's oesophagus. *Gut* 1995; 37: 168-173.
98. Farhadi A, Fields J, Banan A, Keshavarzian A. Reactive Oxygen Species: Are They Involved in the Pathogenesis of GERD, Barrett's Esophagus, and the Latter's Progression Toward Esophageal Cancer? *The American Journal Of Gastroenterology* 2002; 97(1): 22-26.
99. Nehra D, Howell P, Williams C P, Pye J K, Beynon J. Toxic bile acids in gastro-oesophageal reflux disease: influence of gastric acidity. *Gut* 1999;44: 598-602.
100. Hosch SB, Stoecklein NH, Izbicki JH. Molecular markers and staging of early esophageal cancer. *Langenbecks Arch Surg* (2003) 388: 77-82.

101. Jenkins GJS, D'Souza FR, Suzen SH, Eltahir ZS, James SA., Parry JM ve ark. Deoxycholic acid at neutral and acid pH, is genotoxic to oesophageal cells through the induction of ROS: the potential role of anti-oxidants in Barrett's oesophagus. *Carcinogenesis* 2007; 28 (1): 136–142.
102. Shirvani VN, Ouatu-Lascar R, Kaur BS, Omary MB, Triadafilopoulos G. Cyclooxygenase 2 expression in Barrett's esophagus and adenocarcinoma: Ex vivo induction by bile salts and acid exposure. *Gastroenterology*. 2000;118(3):487–96.
103. Theisen J, Peters JH, Stein HJ. Experimental Evidence for Mutagenic Potential of Duodenogastric Juice on Barrett's Esophagus. *World J. Surg.* 2003; 27: 1018–1020.
104. Kaur BS, Ouatu-Lascar R, Omary MB, Triadafilopoulos G. Bile salts induce or blunt cell proliferation in Barrett's esophagus in an acid-dependent fashion. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000; 278:1000–1009.
105. Mori Y, Nii H, Masuda A, Mizumoto K, Konishi Y, Une M ve ark. Absence of mutagenic action of 5 beta-cholan-24-oic acid derivatives in the bacterial fluctuation and standard Ames tests. *Mutat Res.* 1991; 262(4): 267–74.
106. Venturi M, Hambly RJ, Glinghammar B, Rafter JJ, Rowland IR. Genotoxic activity in human faecal water and the role of bile acids: a study using the alkaline comet assay. *Carcinogenesis* 1997; 18 (12): 2353–2359.
107. Norppa H. Genetic susceptibility, biomarker responses, and cancer. *Mutation Research* 2003; 544: 339–348.
108. Meltzer SJ, Yin J, Manin B, Mun-Gan R, Cottrell J, Hudson E ve ark. Microsatellite Instability Occurs Frequently and in Both Diploid and Aneuploid Cell Populations of Barrett's-associated Esophageal Adenocarcinomas. *Cancer Research* 1994; 54: 3379-3382.
109. Muzeau F, Flejou JF, Belghiti J, Thomas G, Hamelin R. Infrequent microsatellite instability in oesophageal cancers. *Br J Cancer.* 1997;75(9):1336-9.
110. Cohen MC, Vergani P, Vigovich F, Thomson M, Taylor CJ, Hammond D. Investigation of Genomic Instability in Paediatric Barrett's Oesophagus Using Laser Microdissection on Paraffin-embedded Endoscopic Biopsies. *JPGN* 2007; 45: 44–49.
111. Shiraishi H, Mikami T, Yoshida T, Tanabe S, Kobayashi N, Watanabe M ve ark. Early genetic instability of both epithelial and stromal cells in esophageal squamous cell carcinomas, contrasted with Barrett's adenocarcinomas. *J Gastroenterol* 2006; 41: 1186–1196.
112. McColl KEL, Gillen D. Prediction of Malignant Potential in Reflux Disease. *Am J Gastroenterol.* 2005; 100: 1019–1020.
113. Gough MD, Ackroyd R, Majeed AW, Bird NC. Prediction of malignant Potential in Reflux Disease: Are Cytokine Polymorphisms Important? *Am J Gastroenterol.* 2005; 100: 1012–1018.

114. Neshat K, Sanchez CA, Galipeau PC, Blount PL, Levine DS, Joslyn G, Reid BJ. p53 mutations in Barrett's adenocarcinoma and high-grade dysplasia. *Gastroenterology*. 1994;106(6):1589–95.
115. Dolan K, Walker SJ, Gosney J, Field JK, Sutton R. TP53 mutations in malignant and premalignant Barrett's esophagus. *Diseases of the Esophagus* 2003; 16: 83–89.
116. Murray L, Sedo A, Scott M, McManus D, Sloan J M, Hardie L J ve ark. TP53 and progression from Barrett's metaplasia to oesophageal adenocarcinoma in a UK population cohort. *Gut* 2006; 55: 1390–1397.
117. Casson AG, Zheng Z, Porter GA, Guernsey DL. Genetic polymorphisms of microsomal epoxide hydroxylase and glutathione S-transferases M1, T1 and P1, interactions with smoking, and risk for esophageal (Barrett) adenocarcinoma. *Cancer Detection and Prevention* 2006; 30: 423–431.
118. Lieshout EMM, Roelofs HMJ, Dekker S, Mulder CJJ, Wobbes T, Jansen JBMJ ve ark. Polymorphic Expression of the Glutathione S-Transferase P1 Gene and Its Susceptibility to Barrett's Esophagus and Esophageal Carcinoma. *Cancer Research* 1999; 59: 586–589.
119. Scandalios JG. The rise of ROS. *Trends in Biochemical Sciences* 2002; 27(9): 483–486.
120. Fang YZ, Yang S, Wu Gu. Free Radicals, Antioxidants, and Nutrition. *Nutrition* 2002;18: 872– 879.
121. Joe M. McCord. The Evolution of Free Radicals and Oxidative Stres. *AmJ Med*. 2000;108:652– 659.
122. Burçak G, Andican G. Oksidatif DNA Hasarı Ve Yaşlanma. *Cerrahpaşa J Med* 2004; 35: 159–169.
123. Aust AE, Eveleigh JF. Mechanisms of DNA Oxidation. *PSEBM* 1999; 222: 246–252.
124. Halliwell B, Aruoma OI. DNA damage by oxygen derived species. *FEBS* 1991; 281: 9–19.
125. Scandalios JG. Oxidative Stres Responses-what have genome-scale studies taught us? *Genome Biology* 2002; 3(7).
126. Dizdaroglu M, Jaruga P, Birincioglu M, Rodriguez H. Free Radical-Induced Damage To DNA: Mechanisms and Measurement. *Free Radical Biology & Medicine* 2002 32(11): 1102–1115.
127. Evans MD, Dizdaroglu M, Cooke MS. Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. *Mutation Research* 2004; 567: 1–61.
128. De Zwart LL, Meerman JHN, Commandeur JNM, Vermeulen NPE. Biomarkers Of Free Radical Damage Applications in Experimental Animals and in Humans. *Free Radical Biology & Medicine* 1999; 26: 202–226.

129. Hussain SP, Hofseth LJ, Haris CC. Radical Causes of Cancer. *Nature* 2003; 3: 276–285.
130. Loft S, Poulsen HE. Cancer risk and oxidative DNA damage in man. *J Mol Med* 1996; 74: 297–312.
131. Ferguson LR, Philpott M, Karunasinghe N. Oxidative DNA Damage and Repair: Significance and Biomarkers. *J. Nutr.* 2006; 136: 2687–2689.
132. Mayne ST. Antioxidant Nutrients and Chronic Disease: Use of Biomarkers of Exposure and Oxidative Stress Status in Epidemiologic Research. *J. Nutr.* 2003; 133: 933–940.
133. Collins AR. Assays for oxidative stress and antioxidant status: applications to research into the biological effectiveness of polyphenols. *Am J Clin Nutr* 2005;81: 261–7.
134. Collins AR. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol Biotechnol.* 2004;26(3):249–61.
135. Moller P. The Alkaline Comet Assay: Towards Validation in Biomonitoring of DNA Damaging Exposures. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 2006; 98: 336–345.
136. Brendler-Schwaab S, Hartmann A, Pfuhler S, Gunter S. The in vivo comet assay: use and status in genotoxicity testing. *Mutagenesis* 2005; 20(4): 245–254.
137. Collins AR, Duthie SJ, Dobson VL. Direct enzymic detection of endogenous oxidative base damage in human lymphocyte DNA. *Carcinogenesis*. 1993;14(9):1733–5.
138. Collins AR, Dusinska M, Gedik CM, Stetina R. Oxidative Damage to DNA: Do We Have a Reliable Biomarker? *Environ Health Perspect* 1996; 104:465–469.
139. Dreher D, Junod AF. Role of oxygen free radicals in cancer development. *Eur J Cancer.* 1996;32(1):30–8.
140. Wu G, Fang YZ, Yang S, Lupton JR, Turner ND. Glutathione Metabolism and Its Implications for Health. *J. Nutr.* 2004; 134: 489–492.
141. Kidd PM. Glutathione: Systemic Protectant against oxidative and free radical damage. *Alt Med Rev.* 1997; 2(3): 155–176.
142. Valencia E, Marin A, Hardy G. Glutathione-Nutritional and Pharmacological Viewpoints: Part II. *Nutrition* 2001; 17: 485– 486.
143. Sen CK. Nutritional biochemistry of cellular glutathione. *Journal of Nutritional Biochemistry* 1997; 8: 660–672.
144. Beutler E, Duron O, Kelly BM. Improved method for the determination of blood glutathione. *J Lab Clin Med.* 1963;61:882-8.

145. Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutathione S-Transferases The First Enzymatic Step in Mercapturic Acid Formation. *J Biological Chem.* 1974; 249:7130–7139.
146. Strange RC, Spiteri MA, Ramachandran S, Fryer AA. Glutathione-S-transferase family of enzymes. *Mutation Research* 2001; 482: 21–26.
147. Rebbeck TR. Molecular Epidemiology of the Human Glutathione S-Transferase Genotypes GSTM1 and GSTT1 in Cancer Susceptibility. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 1997; 6: 733–743.
148. Toruner GA, Akyerli C, Ucar A, Aki T, Atsu N, Ozen H ve ark. Polymorphisms of glutathione S-transferase genes (GSTM1, GSTP1 and GSTT1) and bladder cancer susceptibility in the Turkish population. *Arch. Toxicol.* 2001; 75: 459–464.
149. Aktas D, Ozen H, Atsu N, Tekin A, Sozen S, Tuncbilek E. Glutathione S-transferase M1 gene polymorphism in bladder cancer patients: a marker or invasive bladder cancer? *Cancer Genet. Cytogenet.* 2001; 125:1–4.
150. Ada AO, Süzen SH, Iscan M. Polymorphisms of cytochrome P450 1A1, glutathione S-transferases M1 and T1 in a Turkish population. *Toxicology Letters* 2004;151:311–315.
151. Xu S, Wang Y, Roe B, Pearson WR. Characterization of the Human Class Mu Glutathione S-Transferase Gene Cluster and the GSTM1 Deletion. *The Journal Of Biological Chemistry* 1998; 273: 3517–3527.
152. Cheng L, Sturgis EM, Eicher SA, Char D, Spitz MR, Wei Q. Glutathione-S-transferase polymorphisms and risk of squamous-cell carcinoma of the head and neck. *Int J Cancer.* 1999; 84(3): 220–4.
153. Cabelguenne A, Lorient MA, Stucker I, Blons H, Koum-Besson E, Brasnu D ve ark. Glutathione-associated enzymes in head and neck squamous cell carcinoma and response to cisplatin-based neoadjuvant chemotherapy. *Int J Cancer.* 2001;93(5):725-30.
154. Hou SM, Ryberg D, Falt S, Deverill A, Tefre T, Borresen AL ve ark. GSTM1 and NAT2 polymorphisms in operable and non-operable lung cancer patients. *Carcinogenesis.* 2000;21(1):49-54.
155. Gawrońska-Szklarz B, Lubinski J, Kladny J, Kurzawski G, Bielicki D, Wojcicki M ve ark. Polymorphism of geneve in patients with colorectal cancer and colonic polyps. *Exp Toxicol Pathol.* 1999; 51(4-5): 321-5.
156. Helzlsouer KJ, Selmin O, Huang HY, Strickland PT, Hoffman S, Alberg AJ ve ark. Association between glutathione S-transferase M1, P1, and T1 genetic polymorphisms and development of breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 1998; 90(7): 512–8.
157. Tan W, Song N, Wang GQ, Liu Q, Tang HJ, Kadlubar FF ve ark. Impact of genetic polymorphisms in cytochrome P450 2E1 and glutathione S-transferases M1, T1, and P1 on susceptibility to esophageal cancer among high-risk individuals in China. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2000; 9(6): 551–6.

158. Kato S, Bowman ED, Harrington AM, Blomeke B, Shields PG. Human lung carcinogen-DNA adduct levels mediated by genetic polymorphisms in vivo. *J Natl Cancer Inst.* 1995; 87(12): 902–7.
159. Lodovici M, Luceri C, Guglielmi F, Bacci C, Akpan V, Fonnesu ML ve ark. Benzo(a)pyrene diol epoxide (BPDE)-DNA adduct levels in leukocytes of smokers in relation to polymorphism of CYP1A1, GSTM1, GSTP1, GSTT1, and mEH. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2004;13(8): 1342–8.
160. Kim SY, Choi JK, Cho YH, Chung EJ, Paek D, Chung HW. Chromosomal aberrations in workers exposed to low levels of benzene: association with genetic polymorphisms. *Pharmacogenetics.* 2004;14(7): 453–63.
161. Schlade-Bartusiak K, Sasiadek M, Kozłowska J. The influence of GSTM1 and GSTT1 genotypes on the induction of sister chromatid exchanges and chromosome aberrations by 1,2:3,4-diepoxybutane. *Mutat Res.* 2000; 465(1–2): 69–75.
162. Palma S, Cornetta T, Padua L, Cozzi R, Appolloni M, Ievoli E, Testa A. Influence of glutathione S-transferase polymorphisms on genotoxic effects induced by tobacco smoke. *Mutat Res.* 2007; 633(1): 1–12.
163. Karahalil B, Sardaş S, Kocabaş NA, Alhayiroğlu E, Karakaya AE, Civelek E. Chromosomal aberrations under basal conditions and after treatment with X-ray in human lymphocytes as related to the GSTM1 genotype. *Mutat Res.* 2002; 515(1-2): 135-40.
164. Kocabaş NA, Karahalil B, Karakaya AE, Sardaş S. Influence of GSTM1 genotype on comet assay and chromosome aberrations after induction by bleomycin in cultured human lymphocytes. *Mutat Res.* 2000;469(2): 199–205.
165. Bernardini S, Hirvonen A, Järventaus H, Norppa H. Influence of GSTM1 and GSTT1 genotypes on sister chromatid exchange induction by styrene in cultured human lymphocytes. *Carcinogenesis.* 2002;23(5):893–7.
166. Chen Y, Bai Y, Yuan J, Chen W, Sun J, Wang H ve ark. Association of polymorphisms in AhR, CYP1A1, GSTM1, and GSTT1 genes with levels of DNA damage in peripheral blood lymphocytes among coke-oven workers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2006;15(9):1703–7.
167. Slyskova J, Dusinska M, Kuricova M, Soucek P, Vodickova L, Susova S ve ark. Relationship between the capacity to repair 8-oxoguanine, biomarkers of genotoxicity and individual susceptibility in styrene-exposed workers. *Mutat Res.* 2007;634(1–2):101–11.
168. Afonso V, Champy R, Mitrovic D, Collin P, Lomri A. Reactive oxygen species and superoxide dismutases: Role in joint diseases. *Joint Bone Spine* 2007; 74: 324–329.
169. Elsakka NE, Webster NR, Galley HF. Polymorphism in the manganese superoxide dismutase gene. *Free Radical Research* 2007; 41(7): 770–778.
170. Ambrosone CB, Freudenheim JL, Thompson PA, Bowman, E. Vena JE, Marshall JR ve ark. Manganese Superoxide Dismutase (MnSOD) Genetic

- Polymorphisms, Dietary Antioxidants, and Risk of Breast Cancer. *Cancer Research* 1999; 59: 602–606.
171. Han J, Colditz GA, Hunter DJ. Manganese superoxide dismutase polymorphism and risk of skin cancer (United States). *Cancer Causes Control*. 2007;18(1): 79-89.
 172. Kang D, Lee KM, Park SK, Berndt SI, Peters U, Reding ve ark. Functional variant of manganese superoxide dismutase (SOD2 V16A) polymorphism is associated with prostate cancer risk in the prostate, lung, colorectal, and ovarian cancer study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2007;16(8): 1581-6.
 173. Kocabas NA, Sardas S, Cholerton S, Daly AK, Elhan AH, Karakaya AE. Genetic polymorphism of manganese superoxide dismutase (MnSOD) and breast cancer susceptibility. *Cell Biochem Funct* 2005; 23: 73–76.
 174. Scharer OD. Chemistry and biology of DNA repair. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2003;42: 2946-2974
 175. Christmann M, Tomicic MT, Roos WP, Kaina B. Mechanisms of human DNA repair: an update. *Toxicology* 2003; 193: 3–34.
 176. Lu AL, Li X, Gu Y, Wright PM, Chang DY. Repair of oxidative DNA damage. *Cell Biochemistry and Biophysics* 2001;35:141-170.
 177. Hosfield DJ, Daniels DS, Mol CD, Putnam CD, Parikh SS, Tainer JA. DNA damage recognition and repair pathway coordination revealed by the structural biochemistry of DNA repair enzymes. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*. 2001; 68: 315–47.
 178. Wallace SS. AP Endonucleases and DNA glycosylases that recognize oxidative DNA damage. *Env. Mol. Mut.* 1988; 12: 431-477.
 179. Aburatani H, Hippo Y, Ishida T, Takashima R, Matsuba C, Kodama T ve ark. Cloning and Characterization of Mammalian 8-Hydroxyguanine--specific DNA Glycosylase/Apurinic, Apyrimidinic Lyase, a Functional mutM Homologue. [*Cancer Research* 1997; 57: 2151–2156.
 180. Collins AR. Investigating oxidative DNA damage and its repair using the comet assay. *Mutation Research* 2007.
 181. Gaivao I, Piasek A, Brevik A, Shaposhnikov S, Collins AR. Comet assay-based methods for measuring DNA repair in vitro; estimates of inter- and intra-individual variation. *Cell Biol Toxicol* 2007.
 182. Genecard:OGG1 [online]. 2007 [cited 2007 Oct 29]. Available from: URL: (<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=OGG1>)
 183. Ellen L. Goode, Cornelia M. Ulrich, John D. Potter. Polymorphisms in DNA Repair Genes and Associations with Cancer Risk. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 2002; 11:1513–1530.
 184. Kohno T, Shinmura K, Tosaka M, Tani M, Kim SR, Sugimura H ve ark. Genetic polymorphisms and alternative splicing of the hOGG1 gene, that is

- involved in the repair of 8-hydroxyguanine in damaged DNA. *Oncogene* 1998; 16: 3219–3225.
185. Karahalil B, Kocabas NA. hOGG1 SER326CYS genetic polymorphism in a Turkish population. *Arch Toxicol* 2005; 79: 377–380.
 186. Park SY, Lee KH, Kanga D, Lee KHHad EH, Honga YC. Effect of genetic polymorphisms of MnSOD and MPO on the relationship between PAH exposure and oxidative DNA damage. *Mutation Research* 2006; 593:108–115.
 187. Sugimura H, Kohno T, Wakai K, Nagura K, Genka K, Igarashi H ve ark. hOGG1 Ser326Cys Polymorphism and Lung Cancer Susceptibility. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 1999; 8: 669–674.
 188. Campbell NA, Reece JB. *Biology*. 6th ed. Benjamin Cummings-Pearson Education. 2006.
 189. ENSG00000134184 [online]. 2007 [cited 2007 Oct 30]. Available from: URL: <http://www.ensembl.org>
 190. ENSG00000112096. Reference SNP (refSNP) Cluster Report: rs4880 [online]. 2007 [cited 2007 Oct 30]. Available from: URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>
 191. ENSG00000114026 Reference SNP (refSNP) Cluster Report: rs1052133 [online]. 2007 [cited 2007 Oct 30]. Available from: URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>
 192. Volkovova K, Dusinska M, Collins AR. From oxidative DNA damage to molecular epidemiology. *J. Appl. Biomed.* 2006; 4: 39–43.
 193. Vodicka P, Kumar R, Stetina R, Sanyal S, Soucek P, Haufroid V ve ark. Genetic polymorphisms in DNA repair genes and possible links with DNA repair rates, chromosomal aberrations and single-strand breaks in DNA. *Carcinogenesis* 2004; 25(5): 757–763.
 194. Wetscher GJ, Hinder RA, Bagchi D, Hinder PR, Bagchi M, Perdakis G, McGinn T. Reflux esophagitis in humans is mediated by oxygen-derived free radicals. *Am J Surg.* 1995; 170(6): 552–6.
 195. Wetscher GJ, Hinder RA, Klingler P, Gadenstatter M, Perdakis G, Hinder PR. Reflux esophagitis in humans is a free radical event. *Dis Esophagus.* 1997; 10(1): 29–32.
 196. Rantanen TK, Rasanen JV, Sihvo EIT, Ahotupa MO, Farkkila MA, Salo JA. The Impact of Antireflux Surgery on Oxidative Stress of Esophageal Mucosa Caused by Gastroesophageal Reflux Disease: 4-yr Follow-Up Study. *Am J Gastroenterol* 2006; 101: 222–228.
 197. Sihvo EIT, Salminen JT, Rantanen TK, Ramo OJ, Ahotupa M, Farkkila M ve ark. Oxidative Stress Has a Role in Malignant Transformation in Barrett's Oesophagus. *Int. J. Cancer* 2002; 102: 551–555.
 198. Sihvo EIT, Ruotula T, Auvinen MI, Koivistoinen A, Harjula AL, Salo JA. Simultaneous progression of oxidative stress and angiogenesis in malignant

- transformation of Barrett esophagus. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2003;126:1952–7.
199. Jimenez P, Piazzuelo E, Sanchez MT, Ortego J, Soteras F, Lanas A. Free radicals and antioxidant systems in reflux esophagitis and Barrett's esophagus. *World J Gastroenterol* 2005; 11(18): 2697-2703
 200. Salminen JT, Ramo OJ, Ahotupa MO, Farkkila MA, Salo JA. Increased DNA adducts in Barrett's esophagus and reflux-related esophageal malignancies. *Ann Med.* 2002; 34(7–8): 565-70.
 201. Oksala NKJ, Atalay M, Rantanen TK. Antireflux surgery and esophageal mucosal DNA damage. *Pathophysiology* 13; 2006: 23–27.
 202. Rasanen JV, Sihvo EIT, Ahotupa MO, Farkkila MA, Salo JA. The expression of 8-hydroxydeoxyguanosine in oesophageal tissues and tumours. *EJSO* 2007;1–5.
 203. Chen X, Ding YW, Yang G, Bondoc F, Lee MJ, Yang CS. Oxidative damage in an esophageal adenocarcinoma model with rats. *Carcinogenesis* 2000; 21(2): 257–263.
 204. Olliver JR, Hardie L J, Dexter S, Chalmers D, Wild CP. DNA damage levels are raised in Barrett's oesophageal mucosa relative to the squamous epithelium of the oesophagus. *Biomarkers* 2003; 8 (6): 509-521.
 205. Clemons NJ, McColl KE, Fitzgerald RC. Nitric oxide and acid induce double-strand DNA breaks in Barrett's esophagus carcinogenesis via distinct mechanisms. *Gastroenterology* 2007; 133(4): 1198–209.
 206. White KLM, Chalmers DM, Martin IG, Everett SM, Neville PM, Naylor G ve ark. Dietary antioxidants and DNA damage in patients on long-term acid suppression therapy: a randomized controlled study. *British Journal of Nutrition* 2002; 88: 265–271.
 207. Chao DL, Maley CC, Wu X, Farrow DC, Patricia C, Galipeau PC ve ark. Mutagen Sensitivity and Neoplastic Progression in Patients with Barrett's Esophagus: A Prospective Analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006;15(10):1935–40.
 208. Gorbunova V, Seluanov A, Mao Z, Hine C. Changes in DNA repair during aging. *Nucleic Acids Research* 2007; 35: 7466–7474.
 209. Atanma H, Cheung I, Ames BN. A method for detecting abasic sites in living cells: Age-dependent changes in base excision repair. *PNAS* 2000; 97: 686–691.
 210. Paz-Elizura T, Elingera D, Leitner-Dagana Y, Blumensteina S, Krupskyb M, Berrebi A ve ark. Development of an enzymatic DNA repair assay for molecular epidemiology studies: Distribution of OGG activity in healthy individuals. *DNA repair* 2007; 6: 45–60.
 211. Marcona F, Andreoli C, Rossi S, Verdina A, Galati R, Crebelli R. Assessment of individual sensitivity to ionizing radiation and DNA repair efficiency in a healthy population. *Mutation Research* 541; 2003: 1–8.

212. Topinka J, Binkova B, Sram RJ, Fojtikova I. DNA-repair capacity and lipid peroxidation in chronic alcoholics. *Mutat Res.* 1991; 263(3): 133–6.
213. Navasumrit P, Margison GP, O'Connor PJ. Ethanol modulates rat hepatic DNA repair functions. *Alcohol and Alcoholism* 2001; 36(5): 369-376.
214. Reddy S, Finkelstein EI, Wong PSY, Phung A, Cross CE, Van Der Vliet A. Identification Of Glutathione Modifications By Cigarette Smoke. *Free Radical Biology & Medicine*, 2002; 33: 1490–1498.
215. Lieshout EMM, Tiemessen DM, Witteman BJM, Jansen JBMJ, Peters WHM. Low Glutathione and Glutathione S-Transferase Levels in Barrett's Esophagus as Compared to Normal Esophageal Epithelium. *Jpn. J. Cancer Res.* 1999; 90: 81–85.
216. Peters WH, Roelofs HM, Hectors MP, Nagengast FM, Jansen JB. Glutathione and glutathione S-transferases in Barrett's epithelium. *Br J Cancer.* 1993;67(6):1413–7.
217. Lee JS, Ohc TY, Ahnc BO, Choc H, Won, Kim WB ve ark. Involvement of oxidative stress in experimentally induced reflux esophagitis and Barrett's esophagus: clue for the chemoprevention of esophageal carcinoma by antioxidants. *Mutation Research* 2001; 480–481: 189–200.
218. Polymorphisms of glutathione S-transferase M1, T1 and P1 in patients with reflux esophagitis and Barrett's esophagus. *J Hum Genet* 2007; 52: 527–534.
219. Herszenyi L, Hritz I, Pregun I, Sipos F, Juhasz M, Molnar B ve ark. Alterations of glutathione S-transferase and matrix metalloproteinase-9 expressions are early events in esophageal carcinogenesis. *World J Gastroenterol* 2007; 13(5): 676–682.
220. Cobbe SC, Scobie GC, Pohler E, Hayes JD, Kernohan NM, Dillon JF. Alteration of glutathione S-transferase levels in Barrett's metaplasia compared to normal oesophageal epithelium. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology* 2003; 15: 41–47.
221. Dusinska M, Ficek A, Horska A, Raslova K, Petrovska H, Vallova B ve ark. Glutathione S-transferase polymorphisms influence the level of oxidative DNA damage and antioxidant protection in humans. *Mutation Research* 2001; 482: 47–55.
222. Hermann B, Li Y, Ray MB, Wo JM, Martin II RCG Association of Manganese Superoxide Dismutase Expression With Progression of Carcinogenesis in Barrett Esophagus. *Arch Surg.* 2005; 140: 1204–1209.
223. Li Y, Wo JM, Su RR, Ray MB, Martin RCG. Alterations in Manganese Superoxide Dismutase Expression in the Progression From Reflux Esophagitis to Esophageal Adenocarcinoma. *Annals of Surgical Oncology* 2007;14(7):2045–2055.

224. Piazzuelo E, Cebrián C, Escartín A, Jiménez P, Soteras F, Ortego J ve ark. Superoxide dismutase prevents development of adenocarcinoma in a rat model of Barrett's esophagus. *World J Gastroenterol* 2005;11(47):7436–7443.
225. Dan Falkenback D, Johanssona J, Halvarsson B, Nilbert M. Defective mismatch-repair as a minor tumorigenic pathway in Barrett esophagus-associated adenocarcinoma. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 2005; 157: 82–86.
226. Hiyama T, Yoshihara M, Tanaka S, Chayama K. Genetic polymorphisms and esophageal cancer risk. *Int. J. Cancer* 2007; 121: 1643–1658.
227. Xing D, Tan W, Song N, Lin D. Genetic polymorphism in hOGG1 and susceptibility to esophageal cancer in Chinese. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi*. 2000;17(6):377–80.
228. Xing DY, Tan W, Song N, Lin DX. Ser326Cys polymorphism in hOGG1 gene and risk of esophageal cancer in a Chinese population. *Int J Cancer*. 2001; 95(3): 140–3.
229. Xing D, Tan W, Lin D. Genetic polymorphisms and susceptibility to esophageal cancer among Chinese population (review). *Oncol Rep*. 2003; 10(5): 1615-23.
230. Collins AR, Gaivao I. DNA base excision repair as a biomarker in molecular epidemiology studies. *Molecular Aspects of Medicine* 2007; 28: 307–322.
231. Ide H. DNA substrates containing defined oxidative base lesions and their application to study substrate specificities of base excision repair enzymes. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*. 2001; 68: 207–21.
232. Cadet J, Bourdat AG, D'Ham C, Duarte V, Didier Gasparutto D. Romieu A ve ark. Oxidative base damage to DNA: specificity of base excision repair enzymes. *Mutation Research* 2000; 462:121

10. EKLER

ANKET FORMU

1. Ad-Soyad:
2. Yaşınız:
3. Cinsiyetiniz: Bayan () Bay ()
4. Ev/İş adresiniz:
5. Telefon:
6. Yaşadığınız şehir ve süresi:
7. Ağırlığınız (kg):
8. Boyunuz (cm):
9. Mesleğiniz ve çalışma süresi:
10. Düzenli olarak aldığınız ilaç tedavisi var mı? Hangi sıklıkta? En son ne zaman aldınız?
Kemoterapi () Radyoterapi ()
11. Vitamin takviyesi alıyor musunuz? Hangi sıklıkta? Ne kadar zamandır?
12. Sigara içiyor musunuz? Ne kadar zamandır?
Evet, her gün () Hayır, eskiden içerdim ()
()
Evet, bazen () Hayır, hiç içmedim ()
13. Eğer eskiden içiyordusanız ne kadar zaman önce bıraktınız?
6 ay önce () 5-10 yıl önce ()
1 yıl önce () 10 yıldan fazla ()
1-5 yıl önce ()
14. Günde ne kadar içiyorsunuz/içiyordunuz?
Sigara (adet).....
Puro (adet).....
Tütün (gram).....
15. Sigara içilen ortamlarda sıkça bulunuyor musunuz?
Evet () Hayır ()
16. Alkol kullanıyor musunuz? [Rakı () , şarap () , bira ()] Miktarı?
Hergün () Ayda 1-2 kez ()
Haftada 1-2 kez () Sadece özel durumlarda ()
Hiç içmem ()
17. Düzenli olarak egzersiz yapıyor musunuz?
Haftada 1-2 kez () Daha fazla ()
En son ne zaman yaptınız?
18. Beslenme alışkanlığınızda size en fazla uyan tanım aşağıdakilerden hangisidir?
Et ağırlıklı diyet [Haşlama () , ızgara ()]
Sebze ağırlıklı diyet ()
Karışık diyet ()
19. Ne tip et [tavuk () , balık () , hindi eti () kırmızı et ()] tüketiyorsunuz?
20. Hangi sıklıkta kırmızı et tüketiyorsunuz?
Her gün ()
Haftada 1-2 kez () Ayda 1-2 kez ()

- 21. Hangi sıklıkta meyve tüketiyorsunuz?**
Her gün ()
Haftada 1-2 kez ()
Ayda 1-2 kez ()
- 22. Hangi sıklıkta sebze tüketiyorsunuz?**
Her gün ()
Haftada 1-2 kez ()
Ayda 1-2 kez ()
- 23. Çay/kahve içme alışkanlığınız var mı?**
Günde 1-2 bardak/fincan () 3 veya daha fazla bardak/fincan ()
- 24. Hangi sıklıkta baharatlı-acılı yiyecekler tüketiyorsunuz?**
Her gün ()
Haftada 1-2 kez ()
Ayda 1-2 kez ()
- 25. Takip ettiğiniz özel bir diyet var mı?**
- 26. Son yıllarda röntgen çektirdiniz mi? Evet () Hayır ()**
Göğüs röntgeni() Diş röntgeni () Diğer ()
- 27. Son 2 yılda herhangi bir viral enfeksiyon geçirdiniz mi?**
Sarılık() Kızamık() Kızamıkçık() Su çiçeği() Kabakulak() Menenjit()
- 28. Aile bireylerinde veya sizde genetik bir hastalık var mı? Tipi?**
Evet () Hayır ()
- 29. Herhangi bir hastalığı olan (kendinizde ve/veya ailenizde):**
Kanser () Karaciğer() Böbrek() Alzheimer, erken bunama() Parkinson()
Diğer()

Teşekkürler....

ETİK KURUL İZİNİ



T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
YEREL ETİK KURULU

Tarih	Sayı	Konu
21.11.2005	279	Etik Kurul Kararı Hk.

Fakültemiz Öğretim Üyesi Prof.Dr. Selahattin Ünal'ın sorumlu araştırmacısı olduğu **"Barrenitt özofagus ve özofajiyal adenokarsinoma hastalığının oluşumunda oksidatif DNA hasarının rolünün araştırılması"** başlıklı çalışması, Etik Kurulumuzca incelenerek uygun bulunmuştur.

Prof.Dr.Tunc D. GİRSEL
BAŞKAN

Prof.Dr.Feyla MEMİŞ
ÜYE

Prof.Dr.Ceyda KARADENİZ
ÜYE (Katılmadı)

Prof.Dr.Candan TUNCER
ÜYE

Prof.Dr.Ayşel ARICIOĞLU
ÜYE

Prof.Dr.Ayla GÜLEKON
ÜYE

Prof.Dr.Esin ŞİMŞEK
ÜYE

Prof.Dr.Fatma AKAR
ÜYE

Doç.Dr.Canan ULUOĞLU
ÜYE

Doç.Dr.Aykın ŞİMŞEK

Doç.Dr.Nesrin ÇOBANOĞLU

11. ÖZGEÇMİŞ

Adı: Ela

Soyadı: Kadioğlu

Doğum Yeri ve Tarihi: Ankara, 15.03.1977

Eğitimi:

2002- : Doktora; Gazi Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Toksikoloji Anabilim Dalı

1999–2002: Yüksek lisans; Gazi Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Toksikoloji Anabilim Dalı

1995–1999: Lisans; Gazi Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi

1988–1995: Cankaya Milli Piyango Anadolu Lisesi

1984-1988 : Bahçelievler Ulubatlı Hasan İlkokulu

Yabancı Dili: İngilizce

Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar: Türk Toksikoloji Derneği

Bilimsel Etkinlikleri:

2003- Bursiyer; TÜBİTAK-Bilim Adamı Yetiştirme Grubu Yurt İçi-Yurt Dışı Doktora Burs Programı

Uluslararası Dergilerde Yayınlanmış Makaleler

Karahalil, B, Şardaş, S., Kocabaş, N.A., **Alhayiroğlu, E.**, Karakaya, A.E., Civelek, E: Chromosomal Aberrations Under Basal Conditions and After Treatment with X-ray in Human Lymphocytes as Related to the GSTM1 Genotype. Mutation Research, 515 (2002) 135-140.

Çok İ., Şardaş S., **Kadioğlu E.**, Özcagli E.: Assessment of DNA Damage in Glue Sniffers by Alkaline Comet Assay. Mutation Research, 557 (2004) 131–136.

Kadioğlu E, Sardas S, Aslan S, Isik E, Esat Karakaya A: Detection of oxidative DNA damage in lymphocytes of patients with Alzheimer's disease. Biomarkers, 9(2) (2004) 203–9.

Kaymak C, **Kadioğlu E**, Basar H, Sardas S.: Genoprotective role of vitamin E and selenium in rabbits anaesthetized with sevoflurane. Hum Exp Toxicol., 23(8) (2004) 413-9.

Sardas S., İzdes S., Özcagli E., Kanbak O., **Kadioğlu E.**: The role of antioxidant supplementation in occupational exposure to waste anaesthetic gases. Int Arch Occup Environ Health. 2006 May 19.

Bayram M., Soyer C., **Kadioğlu E.**, Sardas S.: Assessment of DNA damage in postmenopausal women under osteoporosis therapy. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2006 Feb 25.

Kaymak C , **Kadioğlu E**, Özcagli E., Osmanoglu G, İzdes S, Agalar C, Basar H , Sardas S. Oxidative DNA Damage and Total Antioxidant Status in Rats During Experimental Gram-Negative Sepsis. Human and Experimental Toxicology. 2008 (kabul edildi)

Ulusal Dergilerde Yayınlanmış Makaleler

Çalık T., **Kadioğlu E.**: Sivrisinek kovucu bileşikler ve insane sağlığı; DEET (N,N-dietil-3-metilbenzamid) içeren preparatlar. Güncel Eczacılık 118 (2003) 15–19.

Kadioğlu E., Çalık T.: Parkinson hastalığı ve tarım ilaçları. Güncel Eczacılık 135 (2005) 16-20.

Ulusal Kongrelerde Sunulmuş Bildiriler

Ertürk Ş., Karabıyık L., **Alhayiroğlu E.**, Özatamer O., Şardaş S.: Sevofluranın DNA Hasarı Üzerindeki Etkilerinin Benign ve Malign Olgular Arasında Karşılaştırılması. Klinik Toksikoloji Derneği 7. Toplantısı Kocaeli Üniversitesi, İzmit, 18-20 Mayıs, 2001.

Karabıyık L., Şardaş S., **Alhayiroğlu E.**, Türkan H., Karakaya A.E.: Desfluran ile Sevofluranın Genotoksik Etkilerinin Tavşan Lenfositlerinde Tek Hücre Jel Elektroferez. Türk Anesteziyoloji ve Reanimasyon Kongresi, 28-30 Ekim 2002.

Kaymak Ç., **Kadioğlu E.**, Başar H., Şardaş S.: Tavşanlardaki sevofluran anestezisi uygulamasında vitamin-E ve selenyumun DNA hasarı üzerindeki rolü. Türk Anesteziyoloji ve Reanimasyon Kongresi, Belek-Antalya, 1-5 Aralık 2004.

Kaymak Ç., **Kadioğlu E.**, Osmanoglu G., Ozcagli E., İzdes S., Agalar C, Basar H., Sardas S.: Ratlardaki deneysel gram-negatif sepsis modelinde oksidatif DNA hasarının incelenmesi. Turk Anesteziyoloji ve Reanimasyon Dernegi XL. Ulusal Kongresi, 25-28 Ekim 2006 İstanbul.

Uluslararası Kongrelerde Sunulmuş Bildiriler

Alhayiroğlu E., Sardas S., Ertürk Ş.: Determination of DNA Damage by Alkaline Halo Assay And Comet Assay in Sevoflurane Anaesthetized Breast cancer Patients. EUROTOX-2001. İstanbul, Turkey, September 13-16, 2001.

Ertürk Ş., Karabıyık L., **Alhayiroğlu E.**, Özatamer O., Sardas S.: Comparison of DNA Damage Between Malignant and Non-Malignant Patients Anaesthetized with Sevoflurane. EUROTOX-2001. İstanbul, Turkey, September 13-16, 2001.

Alhayiroğlu E., Civelek E., İzdeş S., Şardaş S.: Assessment of DNA Damage in Nurses Occupationally Exposed to Anesthetic Gases And Protective Role of Antioxidant Supplementation. 7th International Symposium on Pharmaceutical Sciences. Ankara, Turkey, June 24-27, 2003.

Alhayiroğlu E., Şardaş S., Aslan S., Işık E., Karakaya A.E.: Detection of Oxidative DNA Damage in Lymphocytes of Patients with Alzheimer's Disease. 5th International Congress of Turkish Society of Toxicology. Antalya, Turkey, October 30- November 2, 2003.

Alhayiroğlu E., Kaymak Ç., Başar H., Şardaş S.: Genoprotective Role of Vitamin-E and Selenium in Rabbits Anaesthetized with Sevoflurane. 5th International Congress of Turkish Society of Toxicology. Antalya, Turkey, October 30- November 2, 2003.

Civelek E., Şardaş, Kocabaş N.A., Karahalil B., **Alhayiroğlu E.**, Karakaya A.E.: Chromosomal Aberrations Under Basal Conditions and After Treatment with X-ray in Human Lymphocytes as Related to the GSTM1 Genotype. 5th International Congress of Turkish Society of Toxicology. Antalya, Turkey, October 30- November 2, 2003.

İzdeş S., Şardaş S., **Alhayiroğlu E.**, Kaymak Ç., Civelek E.: Assessment of Genotoxic Damage by Alkaline Comet Assay in Nurses Occupationally Exposed to Anaesthetic Gases or Antineoplastic Drugs. 5th International Congress of Turkish Society of Toxicology. Antalya, Turkey, October 30- November 2, 2003.

Kadioğlu E., Ozcagli E., Cok I., Sardas S.: Assessment of DNA damage in glue sniffers by use of the alkaline comet assay. 35th Annual Meeting of the European Environmental Mutagen Society. Kos Island, Greece, 3-7 July, 2005.

Ozcagli E., **Kadioglu E.**, Izdes S., Kaymak C., Sardas S.: Assessment of genotoxic damage by alkaline comet assay in nurses occupationally exposed to anaesthetic gases or antineoplastic drugs. 35th Annual Meeting of the European Environmental Mutagen Society. Kos Island, Greece, 3-7 July, 2005.

Aygun Kocabas N., Ozcagli E., Cakmak G.D, Coskun E., **Kadioglu E.**, Karahalil B., Burgaz S., Sardas S.: Effects of glutathione S-transferase (GST) polymorphisms on chromosomal aberrations and micronucleus frequencies in a Turkish population. 35th Annual Meeting of the European Environmental Mutagen Society. Kos Island, Greece, 3-7 July, 2005.

Kadioglu E., Daly A.K., Sardas S., Karakaya A.E.: SER326CYS Polymorphism in HOGG1 Gene and its susceptibility to Barrett's esophagus and esophageal carcinoma. 42nd Congress of the European Societies of Toxicology, Eurotox 2005, Cracow, Poland, 11-14 September , 2005.

Sardas S., **Kadioglu E.**, Isik E., Aslan S., Karakaya A.E: Detection of oxidative DNA damage in lymphocytes of patients with Alzheimer's disease. 9th International Conference on Environmental Mutagens & 36th Annual Meeting of The Environmental Mutagen Society. San Francisco, USA, 3-8 September 2005.

Ozcagli E., Sardas S., Izdes S., Kanbak O., **Kadioglu E.**: The role of antioxidant supplementation in occupational exposure to waste anaesthetic gases 8th International Symposium on Pharmaceutical Sciences (ISOPS-8), Ankara-Turkey, June 13-16, 2006.

Kaymak Ç., **Kadioglu E.**, Osmanoglu G., Izdes S., Agalar C., Basar H., Sardas S: Oxidative DNA damage and total antioxidant status evaluation in gram-negative sepsis rat model. 6th International Congress of Turkish Society of Toxicology, Antalya-Turkey, November 2-5, 2006.

Durmaz E., Karahalil B., Cakmak GD., **Kadioglu E.**, Şardaş S., Burgaz S., Kocabaş NA.: Bleomycin-induced chromosomal aberrations frequencies in a Turkish population. The 5th International Conference on Environmental Mutagens in Human Populations, Antalya-Turkey, May 20-24, 2007.

Kadioglu E., Bayram M., Soyer C., Şardaş S.: Assessment of DNA damage in postmenapausal women under osteoporosis therapy. The 5th International Conference on Environmental Mutagens in Human Populations, Antalya-Turkey, May 20-24, 2007.

Karabiyik L., Şardaş S., **Kadioglu E.**, Türkan H., Karakaya A.E: Assessment of the genotoxic effect of desflurane in human lymphocytes and comparison with sevoflurane in rabbit lymphocytes using alkaline comet assay. The 5th International Conference on Environmental Mutagens in Human Populations, Antalya-Turkey, May 20-24, 2007.

Katıldığı eğitim kursları:

“Proteom Analizleri ve Uygulama Alanları”, Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü, Haziran 2005.

“Genom Bilimi Kursu”, Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü, Mayıs 2006.

“İleri Işık Mikroskopi Kursu”, Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü, Mayıs 2006.

“DNA hasarı, onarımı ve hastalıklarla ilişkisi” konulu kurs (Dr. Miral Dizdaroğlu) Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mayıs 2007.