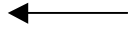
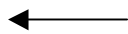


Adınızı soyadınızı giriniz

Tez kabul edildikten sonra yapılan **sabit ciltte sırt yazısı** bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak
Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya
(sol yandaki gibi) olacak .



Tez, Yüksek Lisans'sa, YÜKSEK LİSANS TEZİ;
Doktora ise DOKTORA TEZİ ifadesi kalacak



Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**DETOKSİFİKASYON ENZİMLERİNDEN NAT2 VE
CYP1A2 GEN POLİMORFİZMLERİNİN MEME KANSERİ
İLE İLİŞKİSİNİN İNCELENMESİ**

MEHMET FATİH SEYHAN

**DANIŞMAN
DOÇ. DR. OĞUZ ÖZTÜRK**

**MOLEKÜLER TIP ANABİLİM DALI
MOLEKÜLER TIP PROGRAMI**

İSTANBUL-2011

TEZ ONAYI**TEZ ONAYI**

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalı Moleküler Tıp Programında Mehmet Fatih Seyhan tarafından hazırlanan DETOKSİFİKASYON ENZİMLERİNDEN NAT2 İLE CYP1A2 GEN POLİMORFİZMLERİNİN MEME KANSERİ İLE İLİŞKİSİNİN İNCELENMESİ başlıklı Yülsek Lisans tezi, yapılan tez sınavında Jürimiz tarafından başarılı bulunarak kabul edilmiştir.

21 / 01 / 2011

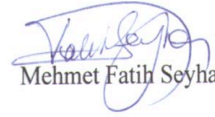
Tez Sınav JürisiÜnvanı Adı Soyadı (Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı)İmzası

- 1.Prof. Dr. Turgay İsbir
- 2.Prof. Dr. İlhan Yaylım-Eraltan
- 3.Doç. Dr. Oğuz Öztürk
- 4.Doç. Dr. Bülent Bayraktar
- 5.Doç. Dr. Hülya Yılmaz-Aydoğan



BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.


Mehmet Fatih Seyhan

İTHAF

Tezimi ablama ithaf ediyorum

TEŞEKKÜR

İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü (DETAE) Moleküler Tıp Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. İlhan Yaylım Eraltan'a,

Yüksek lisans eğitimim süresince danışmanlığımı üstlenen, her konuda bana destek olan saygıdeğer hocam İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü (DETAE) Moleküler Tıp Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Oğuz Öztürk'e

Eğitimim süresince her türlü desteği sağlayan ve başarımda emeği olan Prof. Dr. Turgay İsbir'e

Tezim için gerekli hasta örnekleri ve verilerinin sağlanmasındaki katkılarından dolayı İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Medikal Onkoloji Bilim Dalı öğretim üyesi sayın Prof. Dr. Fuat Hulusi Demirelli'ye ve İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Zerrin Calay'a

Tez çalışmam süresince yardımları ve destekleri için Doç. Dr. Hülya Yılmaz-Aydoğan, Doç. Dr. Bedia Ağaçhan, Doç. Dr. Ş. Ümit Zeybek, Doç. Dr. H. Arzu Ergen, Msc. Özlem Timirci-Kahraman, Msc. Özlem Küçük hüseyin, Msc. Bahar Toptaş, Msc. Canan Cacina olmak üzere tüm Moleküler Tıp Anabilim Dalı çalışanlarına

Tezimin yapımı ve yazımı sırasındaki yardımları ve destekleri için çok değerli arkadaşlarım Dr. Ecz. Özlem Kurt'a, Msc. Mete Bora Tüzüner'e, Msc Yemliha Yıldız, Bio. Leman Melis Yurdum'a, Mol. Bio. Nihal Yiğitbaşı'na

Hiçbir zaman desteğini benden esirgemeyen değerli aileme sonsuz teşekkür ederim

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 4325

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN.....	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ.....	İX
ŞEKİLLER LİSTESİ	Xİ
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	Xİİ
ÖZET	Xİİİ
ABSTRACT	XİV
ZUSAMMENFASSUNG / RESUME	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Meme Yapısı.....	2
2.2. Meme Kanseri Patolojisi.....	2
2.2.1. İnvaziv Meme Kanseri	5
2.2.2. İnvaziv Olmayan (İn situ Karsinom) Meme Kanseri.....	5
2.3. Meme Kanseri Genetiği	5
2.4. Meme Kanserinde Risk Faktörleri	8
2.4.1. Yaş	8
2.4.2. Obezite	8
2.4.3. Alkol	9
2.4.4. İlk adet yaşı (puberte) ve menapoz	9
2.4.5. Çocuk sahibi olma.....	9
2.4.6. Aile Hikayesi	9
2.4.7. Diyet.....	10
2.4.8. Obezite	10
2.4.9. Sigara tüketimi	10
2.5. Biyotransformasyon Mekanizması	10
2.5.1. Faz I Tepkimeleri	11

2.5.1.1. Sitokrom(CYP) P450 enzim ailesi	12
2.5.1.2. CYP1A2	12
2.5.2. Faz II tepkimeleri	14
2.5.2.1. N-asetiltransferaz 2 (NAT 2)	14
3. GEREÇ VE YÖNTEM	17
3.1. Seçilen Örneklerin Tanımı	17
3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	17
3.3. Kullanılan Gereçler	17
3.4. Çözeltiler	18
3.4.1. DNA İzolasyonunda Kullanılan Çözeltiler:	18
3.4.1.1. Eritrosit Parçalama Tamponu (Lysis Buffer):	18
3.4.1.2. 0,5 M Disodyumetilendiaminteraasetat(EDTA) Çözeltisi (pH 8,0):	18
3.4.1.3. 4 M Sodyum Klorür (NaCl) Çözeltisi:	18
3.4.1.4. Lökositleri Parçalama Tamponu (White Blood Cell Buffer- WBL):	18
3.4.1.5. 1 M Tris Tamponu (Stok):	18
3.4.1.6. 9.5 M Amonyum Asestat Çözeltisi:	18
3.4.1.7. %10'luk Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) Çözeltisi:	19
3.4.1.8. Proteinaz K (20mg/ml):	19
3.5. Agaroz Jel Elektroforezinde Kullanılan Çözeltiler:	19
3.5.1. Agaroz Jel Yükleme Tamponu (5X):	19
3.5.2. Etidyum Bromür (10mg/ml):	19
3.5.3. 5X Tris-Borik Asit-Etilendiamintetraasetat(TBE) Tamponu:	19
3.6. Kullanılan Yöntemler:	19
3.6.1. Periferik Kandan DNA İzolasyonu:	19
3.7. Elde Edilen DNA'nın Konsantrasyon ve Kalitesinin Tayini:	20
3.8. PZR Yöntemi ile Gen Bölgelerinin Çoğaltılması ve RFLP Yöntemiyle Polimorfizm Analizi:	20
3.8.1. PZR'da Kullanılan Kimyasal Maddeler:	20
3.8.2. CYP1A2*F Gen Polimorfizmi Tespit Yöntemi:	21
3.8.2.1. CYP1A2*F Enziminin Gen Bölgesinin PZR Yöntemi ile Çoğaltılması:	21
3.8.2.2. CYP1A2*F Enziminin Gen Bölgesinin Kesimi	22
3.8.3. CYP1A2*D Gen Polimorfizmi Tespit Yöntemi	23
3.8.3.1. CYP1A2*D Enziminin Gen Bölgesinin PZR Yöntemi ile Çoğaltılması	23

3.8.3.2. CYP1A2*D Enziminin Gen Bölgesinin Kesimi:.....	25
3.8.4. NAT 2 Gen Polimorfizmi Tespit Yöntemi:	26
3.8.4.1. PZR Şartları:	30
3.8.4.2. PZR Ürünlerinin Kontrolü:	30
3.8.4.3. Kesim yöntemleri	31
3.8.5. Sonuçların Değerlendirilmesinde Kullanılacak İstatistiksel Yöntemler.....	35
4. BULGULAR.....	36
5. TARTIŞMA	48
KAYNAKLAR	55
HAM VERİLER	63
FORMLAR	67
ETİK KURUL KARARI	72
PATENT HAKKI İZNİ	73
TELİF HAKKI İZNİ.....	74
ÖZGEÇMİŞ	75

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından önerilen meme kanserinin histolojik sınıflandırılması	4
Tablo 2-2 Meme kanseri risk faktörleri	8
Tablo 3-1 CYP1A2*F polimorfizmi PZR protokolü	21
Tablo 3-2 CYP1A2*F polimorfizmi PZR şartları	22
Tablo 3-3 CYP1A2*F polimorfizmi kesim protokolü	23
Tablo 3-4 CYP1A2*D polimorfizmi PZR protokolü	24
Tablo 3-5 CYP1A2*D polimorfizmi PZR şartları	24
Tablo 3-6 CYP1A2*D polimorfizmi kesim protokolü	25
Tablo 3-7 NAT 2 allellerini oluşturan nükleotid değişimleri	26
Tablo 3-8 Kesim enzimi tanıma bölgeleri	27
Tablo 3-9 NAT 2 birinci PZR protokolü	30
Tablo 3-10 NAT 2 kesim protokolleri	31
Tablo 3-11 NAT 2 ikinci ve üçüncü PZR protokolü	34
Tablo 4-1 Hasta ve kontrol grubuna ait demografik tablo	36
Tablo 4-2 Meme kanserli hastalar ve kontrollere ait CYP1A2*F gen polimorfizm sonuçlarının genotip frekanslarına göre dağılımı	37
Tablo 4-3 CYP1A2*F gen polimorfizmine ait genotip frekanslarının meme kanseri risk faktörleri ile ilişkisi	37
Tablo 4-4 CYP1A2*F gen polimorfizminin prognostik parametreler ile ilişkisi	38
Tablo 4-5 Meme kanserli hastalar ve kontrollere ait CYP1A2*D gen polimorfizm sonuçlarının genotip frekanslarına göre dağılımı	39
Tablo 4-6 CYP1A2*D gen polimorfizmine ait genotip frekanslarının meme kanseri risk faktörleri ile ilişkisi	39
Tablo 4-7 CYP1A2*D gen polimorfizminin prognostik parametreler ile ilişkisi	40
Tablo 4-8 Kontrol ve hasta grubunda NAT 2 gen polimorfizmlerinin dağılımları	42
Tablo 4-9 NAT 2 Haplotipleme Şeması	43
Tablo 4-10 Hasta ve kontrollerin NAT 2 gen sayım yöntemiyle allel sıklıkları görülmektedir	44
Tablo 4-11 Hasta ve kontrol grubunda NAT 2 aktivite sıklıkları ve yüzdeleri	45

Tablo 5-1 Çalışmamızdaki CYP1A2*F allel dağılımlarının diğer çalışmalar ile karşılaştırılması.....	50
Tablo 5-2 Çalışmamızdaki CYP1A2*D allel dağılımının diğer çalışmalar ile karşılaştırılması.....	51
Tablo 5-3 Çalışmamızdaki NAT 2 asetilleme sonuçlarının diğer çalışmalar ile karşılaştırılması.....	52

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1 Memenin yapısı ve kanser gelişimi	3
Şekil 2-2 CYP1A2 gen bölgesi	13
Şekil 2-4 Arilamin N-asetiltransferaz enzimi tarafından katalizlenen tepkimeler	16
Şekil 3-1 CYP1A2*F PZR jel görüntüsü	22
Şekil 3-2 CYP1A2*F kesim jel görüntüsü	23
Şekil 3-3 CYP1A2*D PZR jel görüntüsü	25
Şekil 3-4 CYP1A2*D kesim jel görüntüsü	25
Şekil 3-5 NAT 2 polimorfizmleri tespit şeması	29
Şekil 3-6 NAT 2 PZR jel görüntüsü	31
Şekil 3-7 1.Kesim jel görüntüsü	32
Şekil 3-8 2.Kesim jel görüntüsü	32
Şekil 3-9 3.Kesim jel görüntüsü	33
Şekil 3-10 4.Kesim jel görüntüsü	34
Şekil 3-11 5.Kesim jel görüntüsü	34
Şekil 4-1 Hasta grubunda emzirme sürelerinin dağılımı	45
Şekil 4-2 Hasta grubunda paritenin dağılımı	46
Şekil 5-1 Dünyada NAT 2 fenotiplerinin dağılımları	53

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

AFB1	Aflatoksin B1
CI	Güvenirlilik aralığı
CYP	Sitokrom P450
CYP 1A2	Sitokrom P450 1A2
IARC	Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı
NAT 2	N-Asetiltransferaz 2
OR	Risk katsayısı
PAH	Polisiklik Aromatik Hidrokarbonlar
WHO	Dünya Sağlık Örgütü

ÖZET

Seyhan, M.F. (2011). Detoksifikasyon Enzimlerinden NAT2 ve CYP1A2 Gen Polimorfizmlerinin Meme Kanseri ile İlişkisinin İncelenmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Tıp ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.

Ksenobiyotiklerin çeşitli enzimlerin etkisi ile vücutta uğradığı kimyasal değişiklikler biyotransformasyon olarak adlandırılır. Faz I ve Faz II enzimleri ksenobiyotiklerin, ilaçların ve endojen bileşiklerin aktivasyonunu ve detoksifikasyonunu katalizlerler. CYP1A2 geninde, CYP1A2 enzim aktivitesini değiştiren çeşitli polimorfizmler tanımlanmıştır. Bu aktivitenin değişmesi enzimin kataliz etmesi gereken heterosiklik ve aromatik aminlerin oranını değiştirir. N-asetiltransferaz 2, arilaminlerin ve heterosiklik aminlerin detoksifikasyonunda işlev gören ve farklı asetilasyon kapasitelerine sahip birçok allel içeren faz 2 enzimlerindendir. Bu çalışmada, 7 anlamsız ve 4 sessiz NAT 2 polimorfizmi ve CYP1A2*F ve CYP1A2*D polimorfizmi PZR-RFLP yöntemleri kullanılarak allel toplulukları oluşturmak üzere incelenmiştir. CYP1A2*F AA ve AC genotipi ile CYP1A2*D deldel genotipini birlikte bulundurma durumunu diğer parametreler ki kare testi ile karşılaştırıldı. Bu genotipi bulunduran kişilerde, hasta grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı fark saptanmıştır (X^2 :7,851 p:0,005 OR:3,556 %95 CI (1,411-8,957)). Ayrıca hasta grubunda kontrol grubuna göre 803G nükleotid polimorfizminin mutant formlarının, hasta grubunda anlamlı bir şekilde yüksek olduğu saptanmıştır (X^2 :16,053 p:0,000 OR: 4,111 %95 CI (2,019-8,370)).

Sonuç olarak bizim bulgularımıza göre CYP1A2*F için A alleli taşımanın, CYP1A2*D için del alleli taşımanın; NAT 2 için ise 803G mutasyonunun meme kanserine yakalanma riskini arttırabileceğini düşünmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: CYP1A2, NAT 2, meme kanseri, biyotransformasyon, polimorfizm
Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 4325

ABSTRACT

Seyhan M.F. (2011). Investigation of gene polymorphisms CYP1A2 and NAT 2 detoxification enzymes. İstanbul University, Institute of Health Science, Molecular Medicine. İstanbul 2011.

Biotransformation is called as some chemical changes caused by xenobiotics with effects of several enzymes. Phase I and Phase II enzymes are catalyzed activation and detoxification of xenobiotics, drugs, endogenic compounds. Various polymorphisms in CYP1A2 gene are changing enzyme activity. These activation changing leads to proportion of heterocyclic amines and aromatic amines. N-acetyltransferase 2 functions for the metabolic detoxification of arylamines and heterocyclic amines and is known to comprise a number of allelic variants with differing acetylation capacities. In this study, seven missense and four silent polymorphisms of N-acetyltransferase 2 and CYP1A2*F and CYP1A2*D polymorphism has been investigated using PCR-RFLP analysis in order to classify subjects into allelic groups. CYP1A2*F AA and AC genotype with CYP1A2*D del/del genotype compared other parameters with chi-square test. Presence of this genotype is found statistically significance in patients than controls (χ^2 :7,851 p:0,005 OR:3,556 %95 CI (1,411-8,957)). Besides mutant form of 803G polymorphism is found statistically high in patients (χ^2 :16,053 p:0,000 OR: 4,111 %95 CI (2,019-8,370)).

In conclusion, we suggest that carrying A allele for CYP1A2*F and del allele for CYP1A2*D; mutation of 803G for NAT 2 together may be risk factor for breast cancer.

Key Words: CYP1A2, NAT2, breast cancer, biotransformation, polymorphism

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University. Project No. 4325

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Son yıllarda sıklığında artış gözlenmektedir. Bu nedenle biyokimya, toksikoloji, moleküler biyoloji, genetik ve epidemiyoloji gibi çeşitli disiplinlerde kanser mekanizması yoğun bir şekilde araştırılmaktadır. Bununla beraber, kanser multifaktöriyel etiyolojisinden dolayı sadece çevre, diyet, genetik ve epigenetik faktörlerle ilişkili olmayıp, aynı zamanda gen-çevre ve gen-beslenme ilişkisinin de etkili olduğu bir hastalıktır. Nitekim uzun yıllar boyunca beslenmeye dayalı yapılan araştırmalarda, besinler ve diğer diyetel bileşiklerin genler ile olan ilişkileri araştırılmış ve bu etkileşimin olası mekanizmaları ve sınıflandırılması üzerine yapılan çalışmalar hız kazanmıştır (Reszka ve ark, 2006).

Diyet (günlük alınan besin miktarı), vitaminlerin, mikro nütrientlerin, antioksidanların ve bitkisel kimyasalların yanısıra kanser ölümlerinin çoğundan sorumlu olan karsinogenlerin ve mutagenlerin de ana kaynağını oluşturmaktadır. Kanser ölümlerinin yaklaşık olarak %35'i diyet (uygunsuz beslenme alışkanlıkları) ile ilişkilidir(Reszka ve ark, 2006).

Karsinogenlerin biyotransformasyon mekanizması Faz I ve Faz II olmak üzere iki evreden oluşur. Biyotransformasyon enzimlerinde meydana gelen mutasyonlar sonucunda DNA adduktları meydana gelmektedir. Bu adduktların da karsinogenezi arttırdığı düşünülmektedir. CYP1A2 Faz I, N-asetiltransferaz ise Faz II enzimlerindendir. Bu iki enzim de çeşitli karsinogenlerin detoksifikasyonunda görev almaktadır.

Bu çalışmada Faz I enzimi ile Faz II enzimindeki polimorfizmlerin meme kanseri ile olan ilişkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Bu çalışmanın CYP1A2 ve NAT 2 gen polimorfizmlerinde ayrı ayrı ve birlikte meydana gelebilecek polimorfizmlerin incelenmesi açısından önemli bir vaka kontrol incelemesi olabileceği düşünülmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Meme Yapısı

Meme süt bezleri (lobüller) ve süt kanalları (ductuslar) olmak üzere iki kısımdan oluşur. Lobüllerin ve ductusların arasındaki boşluğu bağ doku ve yağ dokusu doldurmaktadır. Memede süt salgılayan bölüm lobüllerdir. Lobüller birleşerek lobları meydana getirirler ve ductuslar ile memenin tam ortasında bulunan areola denilen koyu renkli bölgede meme başına açılırlar. Meme başında 6-8 adet toplayıcı geniş duktus vardır..Meme başı çevresi areola denilen sirküler yapıdaki pigmentli alandan oluşur. (Şekil 2.1)

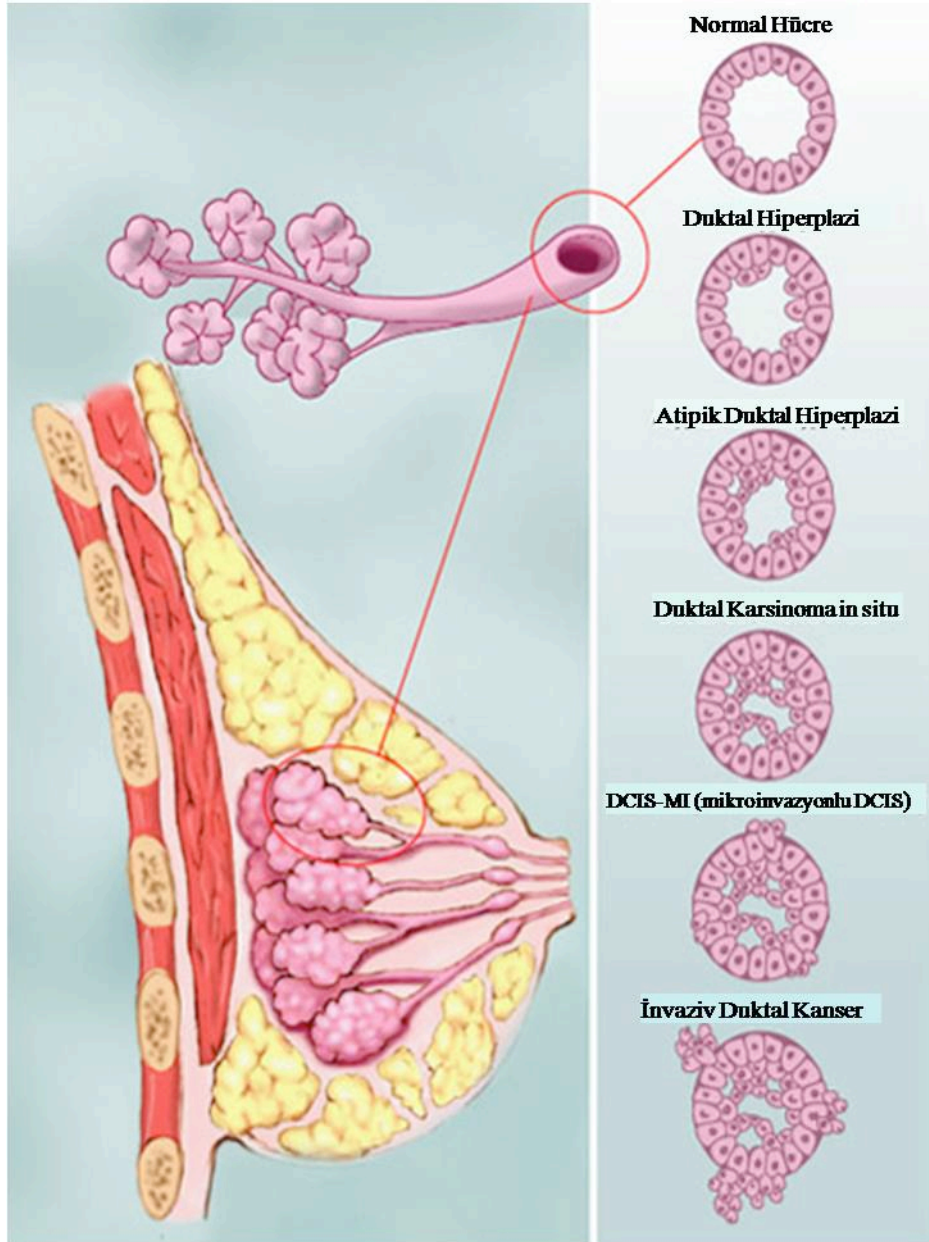
2.2. Meme Kanseri Patolojisi

Memedeki kötü huylu tümörlerinin önemli bölümü adenokarsinomlar oluşturmaktadır ve günümüzde bunların memenin duktal-lobüler (süt kanalları-bezleri) biriminden köken aldığı bilinmektedir.

Histolojik olarak meme karsinomları in situ ve invaziv karsinomlar olmak üzere iki ana gruba ayrılmaktadır. İn situ karsinomda habis epitelyum hücreleri bazal membranla çevrili iken, invaziv (infiltratif) karsinomda neoplastik hücreler bazal membranı aşarak stromaya invazyon göstermektedirler. Bu nedenle invaziv karsinomlar, lenf ve kan damarlarını geçerek bölgesel lenf düğümlerine ve uzak organlara metastaz yapabilme kapasitesine sahiptir. (Şekil 2.1)

Meme kanserlerinin yaklaşık olarak %20'si lobül adı da verilen süt bezlerinden, %80'i ise lobüler meme ucunu birbirine bağlayan meme kanallarından köken almaktadır.

En sık rastlanan duktal karsinoma, memenin süt kanallarında başlar. Meme kanseri memenin dışına yayıldığında koltuk altındaki lenfatik nodüller en sık görülen yayılım yerleridir. Kanseri hücrelerinin en sık yayıldığı yerler; memenin diğer lenf nodları, kemik, karaciğer ve akciğerdir.



Şekil 2-1 Memenin yapısı ve kanser gelişimi

(<http://community.breastcancer.org/forum/68/topic/740141>)

Erken evrede bir tümörün, meme içinde henüz oluştuğu yerle sınırlı olması in situ veya noninvaziv olarak adlandırılır. Benzer yaklaşımla, tümörün memenin başka kısımlarına yayılması ise invaziv veya infiltratif olarak adlandırılır. İn situ karsinomda kötü huylu epitelyal hücreler bazal membranla çevrili iken, invaziv (infiltratif) karsinomda neoplastik hücreler bazal membranı aşarak stromaya invazyon göstermektedirler. Bu nedenle invaziv karsinomlar lenf ve kan damarlarını geçerek

bölgesel lenf düğümlerine ve uzak organlara metastaz yapabilme kapasitesine sahiptir. Meme kanseri memenin dışına yayıldığında en sık koltuk altındaki lenfatik nodüller, memenin diğer lenf nodları, kemik, karaciğer ve akciğerde görülmektedir.

Histolojik olarak meme karsinomları in situ ve invaziv karsinomlar olmak üzere iki ana gruba ayrılmaktadır. Günümüzde meme kanserinin histolojik sınıflandırılmasında en çok kullanılan Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından önerilen sınıflamadır (Tablo 2-1) (Ellis ve ark 2000; Hamilton ve Aaltonen editörler. Tumors of Digestive System. Lyon: Who pres;2000).

Tablo 2-1: Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından önerilen meme kanserinin histolojik sınıflandırılması

1. In situ karsinom
İn situ duktal karsinom
İn situ lobuler karsinom
2. İnvaziv karsinom
İnvaziv duktal karsinom
İnvaziv lobuler karsinom
Tübüler karsinom
İnvaziv kribriform karsinom
Medüller karsinom
Müsinöz karsinom
İnvaziv papiller karsinom
İnvaziv mikropapiller karsinom
Apokrin karsinom
Sekretuar (juvenil) karsinom
Adenoid kistik karsinom
Metaplastik karsinom
Nöroendokrin karsinom
Enflamatuar karsinom

2.2.1. İnvaziv Meme Kanseri

Lobüllerin ya da kanalların içindeki anormal hücreler bazal membranı aşarak çevre meme dokusunda yayıldığında invaziv meme kanseri ortaya çıkmaktadır. Bu süreç kanserin lenf düğümlerine, daha ileri evrelerde ise karaciğer, akciğer ve kemik gibi alanlara yayılmasına neden olmaktadır.

2.2.2. İnvaziv Olmayan (İn situ Karsinom) Meme Kanseri

“İn situ”, “özgün yerinde” anlamına gelmektedir. Bu tip meme kanserinde kanser hücreleri özgün lokasyonların kaldığı, çevre dokulara ya da daha uzak bölgelere metastaz yapmadıkları için “in situ” ifadesi kullanılmıştır. Başlıca iki tip in situ karsinom bulunmaktadır. Anormal hücreler lobül içerisinde çoğaldıklarında lobüler karsinom in situ olarak isimlendirilmektedir. Buna karşın anormal hücreler süt kanallarının içinde çoğaldıklarında duktal in situ karsinom olarak tanımlanmaktadır. İn situ karsinom kanserin erken bir dönemi olup yayılım göstermez. Ancak daha tehlikeli olan invaziv forma dönüşebilmektedir.

2.3. Meme Kanseri Genetiği

Meme kanseri, özellikle Batı ülkelerinde kadınlarda en sık görülen kanserdir(Pharoah ve ark 1998; National Cancer Institute. SEER Cancer Statistics Review, 1973-1995. Bethesda, MD: National Cancer Institute, 1999). Meme kanseri İngiltere’de (Pharoah ve ark 1998) 12 kadından birinde, ABD’de (National Cancer Institute. SEER Cancer Statistics Review, 1973-1995. Bethesda, MD: National Cancer Institute, 1999) ise 8 kadından birinde görülmektedir. ABD’de 2006 yılında yaklaşık olarak 213,000 invaziv meme kanseri teşhisi konulmuştur ve bu kadınlardan 41,000’i bu hastalıktan dolayı ölmüştür (Jemal ve ark, 2006). ABD’de, 2006 yılında yeni tanı konulan kanser hastalarının yaklaşık olarak %31’inin meme kanseri olduğu bildirilmiştir (Jemal ve ark , 2006).

Günümüzde kadınlarda ortaya çıkan kanserlerin %32’si ve kansere bağlı ölümlerin %18’i meme kanserine bağlıdır(Harris ve ark 1997). Türkiye’de kadınlar arasında en sık görülen 10 kanser tipi içerisinde meme kanseri birinci sırada yer almaktadır(<http://saglik.gov.tr>, “Sağlık Bakanlığı, Ana ve Çocuk Sağlığı ve Aile Planlaması Genel Müdürlüğü, Meme Kanseri ve Erken Tanı, 1997). Ülkemizde

kadınlarda meme kanseri T.C. Sağlık Bakanlığı 1997 Sağlık istatistiklerine göre 1995'te %23.5 olarak ilk sırada yer almaktadır (<http://saglik.gov.tr/istatistikler.html>, "T.C. Sağlık Bakanlığı, Sağlık İstatistikleri", 1997).

Meme kanserinin hormon ve çevresel etkenlerde genetik yapının ile etkileşiminin bir sonucu olarak oluştuğu düşünülmektedir. Risk faktörleri arasında çevresel kimyasallar, dışarıdan östrojen alımı, östrojen metabolize eden genlerde aktivite değişimleri, geç menopoza, ilk doğumun geç yaşlarda gerçekleşmesi, meme kanseri ile ilgili aile hikayesi, artmış vücut-kitle indeksi, menopoza sonrası obezite, iyonize radyasyon, sigara ile alkol kullanımı, tümör baskılayıcı genler ve DNA tamir genlerindeki çeşitli mutasyonlar bulunmaktadır (Gadducci ve ark 2005; Williams ve ark 2000).

Genetik değişiklikler germline mutasyonlarla kalıtılır veya sonradan somatik mutasyonlarla kazanılır. Sonradan kazanılan mutasyonlar çevresel karsinojenlere maruz kalma sonucu oluşabilir. Bunlar fiziksel (örneğin iyonize radyasyon), kimyasal (örneğin polisiklik hidrokarbonlar) ve biyolojik karsinojenlerdir (örneğin virüsler) (Hu ve ark 2000).

BRCA1, BRCA2, ATM ve p53 genleri yüksek risk taşıyan varyantlarının bulunmasından dolayı, kalıtsal meme kanserine yol açan önemli genler arasında yer almaktadır (Easton D ve ark 1993). Bunlar tümör süpresör genlerdir ve tahmini olarak erken ortaya çıkan meme kanserlerinin ailesel grupta olanlarının yaklaşık olarak %50'sinde etken oldukları bildirilmiştir (Oesterreich S ve Fuqua SA ve ark 1999; Cui J and Hopper JL. 2000). BRCA1 ve BRCA2 proteinleri genomik stabilitenin sağlanmasında, DNA hasarında hücresel cevapta, transkripsiyonel düzenlemede ve hücresel proliferasyonda görev alırlar (Unger MA ve Weber BL ve ark 2000).

Birçok meme ve over kanseri sporadiktir (kalıtsal değildir), ama BRCA 1 ve BRCA 2 gibi tümör süpresör genlerdeki mutasyonlar sonucu oluşan meme kanserinin kalıtsal olduğu gözlenmiştir (King ve ark. 2003). BRCA 1 ve BRCA 2 mutasyonu ile doğan kadınlarda meme kanseri ve over kanser gelişiminin yüksek olduğu bildirilmiştir (Narod 2002). Çeşitli tipte kanser geçmişi olan ailelerde (özellikle BRCA 1 ve BRCA 2 gene sahip olanlarda), hayat boyu meme kanseri oluşumu riski %80 ve hayat boyu over kanseri gelişimi BRCA 1 taşıyıcılarında %40-65 arası; BRCA 2 taşıyıcılarında %20 ise gözlenmiştir (Ford ve ark 1998).

Kalıtsal risk etmenleri içerisinde yer alan BRCA1 ve BRCA2 genlerindeki mutasyonlar kadın taşıyıcılarda 10-20 kat artmış meme kanseri riski ile ilişkilidir (Hopper ve ark 1999; Ford ve ark 1998). Lakin genel toplumda mutasyon taşıyıcıların çok nadir görülmesi, bu genlerin meme kanserlerinin ancak yaklaşık %20'sinin gelişiminde etken olduğuna işaret etmektedir (Pet ve ark 1999). Bu durum BRCA1 ve BRCA2 genlerindeki mutasyonlar gibi “yüksek risk” genetik etmenleri dışında, “düşük risk” genetik etmenlerin de meme kanserinin ortaya çıkmasında büyük rol oynadığını düşündürmektedir

Meme kanserlerinin yaklaşık %10-20'si ailesel bir hastalıktır. Birinci dereceden bir akrabasında hastalık bulunan birinin normal bir insana göre meme kanseri olma olasılığı yaklaşık olarak 1,5-2 kat artmaktadır. Bu derecede ailesel birikimin gerçekleşmesi ancak bazı önemli genetik risk etmenlerinin bulunmasıyla mümkün olabilir (Hopper ve ark 1992; Aalen 1991). Birikimin bir diğer bölümü ise yaşam tarzı gibi genetik olmayan etmenler sonucu oluşabilir. Bu etmenlerin meme kanseri oluşumuna orta derecede etkisi olduğu birçok epidemiyolojik çalışma tarafından gösterilmiştir. Matematiksel modellemeler ise yaşam tarzı gibi etmenlerin meme kanserinin ailesel birikiminin ancak %15'ini açıklayabildiğini göstermektedir (Hopper ve ark 1999)

Düşük risk genetik etmen adayları arasında polimorfizmlerine çok sık rastlanan fakat fonksiyonunun anlaşılması güç olan ve kansere yatkınlığı arttıran genler bulunmaktadır. Varyantlar gen ekspresyon miktarını değiştirebilir ya da modifiye edilmiş DNA transkripsiyonuyla fonksiyonu etkileyebilir. Ayrıca protein kararlılığını azaltabilir, mRNA'nın işlev görmesini ya da üretilen proteinde amino asit değişimlerinin gerçekleşmesine neden olabilirler.

Polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH) ve aflatoksin B1 (AFB1) gibi genotoksik karsinojenlerin DNA bazlarına kovalent olarak bağlanabilme özelliklerinden dolayı kansere neden olduğu düşünülmektedir (Jeffrey A.M. ve ark 1976). P450 enzimleri sayesinde bu bileşiklerin elektrofilik ara moleküller ve selüler makromoleküller ile etkileşime girdikleri bilinmektedir. Bu ara moleküllerin DNA bazlarına kovalent olarak bağlanmasıyla oluşan yapılara karsinojen-DNA adduktları denmektedir (Rundle 2006).

2.4. Meme Kanserinde Risk Faktörleri

Meme kanserinde risk faktörleri Tablo 2-2’de gösterilmiştir.

Tablo 2-2 Meme kanseri risk faktörleri

Meme kanseri görülme riski
Yüksek risk
İlerlemiş yaş
Birinci dereceden yakın bir akrabada meme kanseri
Atipal duktal veya lobüler hiperplazi
Lobüler karsinoma in-situ
BRCA 1 ve BRCA 2 mutasyonları
Artmış mamografik yoğunluk
Aile hikâyesi
Düşük risk
Erken menarş/geç menopoz
Yüksek östrojen ve androjen
30 yaşın üstünde ilk doğum veya hiç doğum yapmamak
Diyet ve alkol tüketimi
Postmenopozal obezite
Egzersiz

2.4.1. Yaş

Meme kanseri insidansı yaş ile artmaktadır. Menopoz sonrası her 10 yılda bu insidans iki kat artmaktadır. Meme kanserini akciğer kanseri ile mukayese edildiğinde gençlerde meme kanseri insidansının daha yüksek olduğu gözlenmiştir (McPherson K. ve ark 2000).

2.4.2. Obezite

Yapılan kohort ve hasta-kontrol çalışmalarından alınan veriler sonucunda, kiloluluk ve obezitenin postmenopozal meme kanseri oluşumunda %30-50 oranında risk oluşturduğu görülmüştür(IARC working group on the evaluation of cancer-preventice agents. 2002 ve Friendenreich 2001- review of anthropometric factors and breast cancer risk. Eur J Cancer Prev. 10, 15-32). Ayrıca kohort çalışmalarından alınan meta-analiz verilerinde, beden kitle indeksinin (BKİ) 28’den yüksek olmasının postmenopozal meme kanseri riskini iki kat arttırdığı bildirilmiştir. (van den Brandt ve ark. 2000- pooled analysis f prospective cohort studies on height, weight and breast cancer risk. Am J Epidemiol. 152, 514-527).

2.4.3. Alkol

Alkol tüketiminin meme kanseri ile olan ilişkisi tam olarak bilinmemekle birlikte birkaç hipotez öne sürülmüştür. Alkol tüketiminin östrojen yanıtı ve mekanizmasındaki düzensizliklere, etanol-asetaldehit metabolitleri ile oluşan mutasyonlara, oksidatif hasar gibi çeşitli mekanizmalar üzerinden meme karsinogenezine yol açabileceği düşünülmektedir (Dumitrescu ve Shields 2005).

Bazı çalışmalarda alkol tüketimiyle meme kanseri insidansı arasında bir bağlantı olabileceği öne sürülmektedir. Örneğin, yüksek oranda alkol kullanan kadınlarda yapılan bir çalışmada, alkol alımının meme kanseri riskini %15 arttırabileceği bulunmuştur(Kuper ve ark 2000). Bununla birlikte meme kanseri insidansı ile alkol tüketimi arasındaki bu bağlantının tam tutarlı olmadığı ve alkolden başka diğer diyetel etmenlerden de kaynaklanabileceği öne sürülmektedir (McPherson ve ark 2000).

2.4.4. İlk adet yaşı (puberte) ve menapoz

Mensturasyona başlama yaşı erken olan veya geç menopoza giren kadınlarda meme kanserine yakalanma riskinin yüksek olduğu rapor edilmiştir. 55 yaşından sonra doğal menapoza giren kadınların, 45 yaşından önce menapoza giren kadınlara göre yaklaşık iki kat daha fazla meme kanseri gelişim riski taşıdığı bildirilmiştir (Berkey ve ark 1999; Bernstein ve ark 1994)

2.4.5. Çocuk sahibi olma

Hiç çocuk sahibi olamama ve ilk doğumun geç yaşta gerçekleşmesinin yaşam süresindeki meme kanseri insidansını arttırdığı belirtilmiştir(Kelsey JL ve ark 1993; Chie WC ve ark 2000; Pathak DR ve ark). 30 yaşından sonra ilk çocuğa sahip olan kadınlarda riskin iki kat daha fazla olduğu bildirilmiştir. En fazla risk taşıyan grubun ise 35 yaşından sonra çocuk sahibi olan kadınlarda olduğu ve bunların hiç çocuk sahip olamayan kadınlardan daha fazla risk taşıdıkları bildirilmiştir. Erken yaşta ikinci çocuğa sahip olmanın meme kanseri riskini azalttığı rapor edilmiştir (Russo ve ark 2000).

2.4.6. Aile Hikayesi

Batı ülkelerinde meme kanserlerinin %10'undan fazlasının genetik yatkınlıkla ilişkili olduğu belirtilmektedir. Meme kanseri gelişiminde genellikle sınırlı penetransla otozomal dominant kalıtımın söz konusu olduğu, yani her iki cinsiyetle hatta bazı ailelerin kendilerinde kanser gelişimi olmadan anormal geni aktarabileceği

bilinmektedir. Ancak meme kanseri gelişimi ile ilgili olabilecek genlerin sayısı şu anda tam olarak bilinmemektedir.

2.4.7. Diyet

Popülasyonlarda günlük yağ alımı ve meme kanseri insidansı arasında yakın bir korelasyon olsa da, meme kanseri ve yağ alımı arasındaki ilişkili tam olarak bulunamamıştır. Bununla birlikte insan diyetinde çok çeşitli doğal karsinojenler bulunmakta olup, bunların çoğunun oksijen radikalleri oluşturarak DNA hasarına yol açabileceği bilinmektedir (Sugimura 2000).

2.4.8. Obezite

Postmenapozal dönemdeki kadınlarda obezitenin meme kanseri riskini iki kat arttırdığı, premenapozal dönemdeki kadınlar arasında ise bu insidansın azaldığı gösterilmiştir (Hunter ve Willet 1993).

2.4.9. Sigara tüketimi

Sigara kullanımının meme kanseri etiyolojisindeki önemi tartışmalı bir konu olsa da, meme kanseri riski ile sigara kullanımı arasında çok zayıf bir bağlantı olabileceği düşünülmektedir (Palmer ve Rosenberg 1993; Ambrosone ve Shields 1999)

2.5. Biyotransformasyon Mekanizması

Besinle alınan doğal bileşikler dışında kalan ve çeşitli yollardan insan vücuduna giren maddelere ksenobiyotikler adı verilir. Yunanca kökenli ksenos (=vücuda yabancı) kelimesinden gelen bu terim, birçok organik ve inorganik maddeleri kapsar. Tarım ve sanayi kaynaklı kimyasal maddeler ile çeşitli bitki kökenli maddeler; ilaçlar, besin katkı maddeleri, insektisid ve fungisidlerin metabolitleri; havayı ve suyu kirleten atıklar, ksenobiyotikler arasında yer almaktadır. Ksenobiyotiklerin çeşitli enzimlerin etkisi ile vücutta uğradığı kimyasal değişiklikler biyotransformasyon olarak adlandırılır. Biyotransformasyon sırasında bazı ksenobiyotikler inaktivasyona uğrarken (biyoinaktivasyon), bazıları biyolojik olarak daha etkin veya toksik metabolitlere dönüşmektedir (biyoaktivasyon).

Faz I ve Faz II enzimleri ksenobiyotiklerin, ilaçların ve endojen bileşiklerin aktivasyonunu ve detoksifikasyonunu katalizlerler (The MARIE-GENICA Consortium on Genetic Susceptibility for Menopausal Hormone Therapy Related Breast Cancer risk, 2009). Biyotransformasyonun Faz I enzimleri, genellikle OH, COOH, NH₂ gibi

hidrofilik grupların yerleştirilmesini katalizler. Faz II enzimleri ise asetilasyon, glukuronidasyon, sülfatasyon, vb gibi konjugasyon tepkimelerinde görev alırlar.

Biyotransformasyon enzimlerinin genotoksik bileşiklerin biyoaktivasyonu ve biyoinaktivasyonunda görev almaları nedeniyle bu enzimlerdeki genetik polimorfizmlerin kanser riski oluşumuna neden olan etmenlerden biri olacağı düşünülmektedir (Wormhoudt ve ark 1999)

Polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH) ve aflatoksin B1(AFB1) gibi genotoksik karsinojenler DNA bazlarına kovalent bağlanma özelliklerinden dolayı kansere yol açtığı düşünülmektedir (Jeffrey ve ark. 1976; Weinstein ve ark. 1976).

Sitokrom P450 sistemi tarafından metabolize edilen çeşitli maddeler elektrofilik ara molekülere dönüşürler ve bu ara moleküller sellüler makromoleküller ile etkileşime geçerler. Yukarıda bahsedilen genotoksik karsinojenler bu ara molekülere kovalent bağlanırlar ve karsinojen-DNA adduktlarının oluşmasına neden olurlar(Cavalieri ve ark. 1990).

Bu bağlamda, karsinojen-DNA adduktları vücudun muhtelif karsinojenlere maruz kaldığını ve akabinde detoksifikasyon mekanizmalarının bu olayı tamir edemediklerini göstermektedir. Bu nedenle karsinojen-DNA adduktlarının, belli çevresel etkilere maruz kalmanın (ksenobiyotikler) kanser oluşumuna neden olup olmayacağını araştırmayı planlayan epidemiyolojik çalışmalarda biyomarkır olarak kullanılabileceği düşünülmektedir(Rothman ve ark. 1995; Hemminki ve ark. 2000; Vineis ve ark. 2000)

2.5.1. Faz I Tepkimeleri

Ksenobiyotikler vücuda girdiklerinde ilk olarak biyotransformasyon mekanizmasının Faz I tepkimelerine maruz kalırlar.

Faz I tepkimeleri, ana bileşiğe ya işlevsel bir grup ekler ya da ana bileşikteki işlevsel bir grubu maskeler. Faz I tepkimelerinde oksidasyon (sitokrom P450 enzimleri tarafından), redüksiyon ve hidroliz tepkimeleri gerçekleşir. Faz I tepkimelerinde çoğunlukla sitokrom (CYP) P450 enzimi sorumludur.

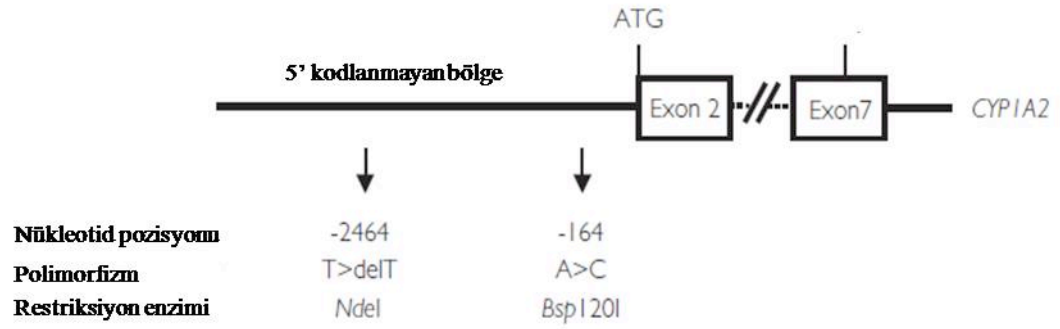
2.5.1.1. Sitokrom(CYP) P450 enzim ailesi

Sitokrom (CYP) P450 enzim ailesi ekzojen ve endojen kaynaklı bileşiklerin oksidasyonunu katalizleyen Faz I enzimlerinde, östrojen, eikozonoid, kolesterol, safra asidi ve yağda çözünen vitaminlerin metabolizmasında görev alırlar. Bu enzim ailesi ismini yapısındaki 450nm’da maksimum absorpsiyon veren pigmentten alır. İsimlerini Buradan alırlar. Bilimsel isimleri ise “hemotiyolat monooksijenazlar”dır(Nebert ve ark 2004). Bütün enzimlerde Phe-X₍₆₋₉₎-Cys-X-Gly (X yerine bütün amino asitler gelebilir) yapısı mevcuttur ve C terminal ucun yakınında 5. pozisyonda oktahedral Hem demir atomu sisteine bağlanmıştır. Bu demir atomu enzimlere pigment özelliğini vermektedir. Bütün memelilerde toplam 18 CYP alt enzim ailesi mevcuttur. Her CYP alt ailesi içindeki enzimlerde büyük oranda amino asit dizisi benzerliği gözlenmiştir (Nebert ve ark 2004).

CYP1 alt ailesi içindeki enzimlerin (CYP1A1, CYP1A2,CYP1B1) aril hidrokarbon hidroksilaz enzimi aktiviteleri vardır. Bu aktivitelerini kullanarak polisiklik aromatik hidrokarbonların (PAH) ve östrojenin metabolize edimesini sağlarlar (Weber ve Nathanson 2000). PAH’ların farede tümör gelişimine neden olduğu ve DNA’da yüksek derecede addukt gelişimi ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. (Liehr ve Roy 1990).

2.5.1.2. CYP1A2

CYP1A2 karaciğerde yüksek oranda bulunan Faz I detoksifikasyon enzimlerindendir (Shimada ve ark 1994). İndüklebilir veya inhibe edilebilir. CYP1A2 insan ilaç metabolizmasında önemli rolü olan ve bazı ilaçların doğrudan metabolize edilmesinde görevli olan bir enzimdir (Ramadoss ve ark. 2005). Bunların dışında, CYP1A2 aril aminler ve heterosiklik aminler gibi bazı ksenobiyotiklerin; retinoid ve üroporfirinojen gibi bazı endobiyotiklerin detoksifikasyonundan (biyotransformasyonundan) sorumludur (Ramadoss ve ark). Kanserojen ve mutajenik maddelerin oluşumunda etken olan başlıca enzimdir. Bu açıdan bakıldığında indüksiyonunun kanserojen, inhibisyonunun ise anti-kanserojen etki yaptığını söylenebilir.



Şekil 2-2 CYP1A2 gen bölgesi

Polisiklik aromatik hidrokarbonlar; sigarada, doğrudan kömürde pişmiş etlerde veya çeşitli çevre kirlenici maddelerde bulunurlar. Bunlar CYP1A2'nin indükleyicileridir. Son 10 yılda CYP1A2'nin arilaminlerin metabolik aktivitesinden sorumlu olduğu tespit edilmiştir (Eaton ve ark 1995). Bununla beraber CYP1A2 yirmi dört ilacın metabolize olmasını sağlayan bir enzimdir. Ayrıca melatoninin, östrojenin ve üroporfirin katabolizmasında da görevlidir (Tsuneoka ve ark 2003).

CYP1A2 geninde, CYP1A2 enzim aktivitesini değiştiren çeşitli polimorfizmler tanımlanmıştır. Bu aktivitenin değişmesi enzimin kataliz etmesi gereken heterosiklik ve aromatik aminlerin oranını değiştirir. CYP1A2 çoğunlukla hidrofilik aminlerin (aminoaz boyaları, 4-aminobifenil, yiyecek kaynaklı heterosiklik aminler gibi) metabolize edilmesinden sorumludur.

Ayrıca CYP1A2, 17 β -östrodiolün östrona dönüştürülmesini sağlayan başlıca enzimlerden biridir. Bundan dolayı CYP1A2'nin östrojen mekanizmasında rol oynayabileceği düşünülmektedir (Hong ve ark, 2004).

Yüksek CYP1A2 aktivitesinin meme kanseri riskinin artmasıyla ilişkili olduğu düşünülmektedir (Hong ve ark, 2004).

CYP1A2 geninde çeşitli polimorfizmler saptanmıştır. Yaygın bir polimorfizm olan CYP1A2*F(rs762551) 5' kodlanmayan promotor bölgesinde 1. intron 734'üncü pozisyonda C>A transversiyonu ile oluşmaktadır ve CYP1A2 enzim aktivitesi üzerinde etki göstermektedir (Sachse C. ve ark 1998).

CYP1A2*1D gen polimorfizmi ise 5' kodlanmayan promotor bölgesinde -2467 pozisyonunda T delesyonu ile oluşmaktadır (Pavanello S. ve ark 2007). Bu polimorfizmin ise enzim aktivitesini azalttığı düşünülmektedir.

2.5.2. Faz II tepkimeleri

Faz II enzimlerinin içinde, N asetil transferaz (NAT), Glutasyon S-transferaz (GST), Sulfotransferaz (SULT) ve UDP Glukuronosiltransferaz (UGT) enzimleri yer almaktadır. Bu enzimler ekzojen veya endojen kaynaklı bileşiklerin konjugasyonundan sorumludur. Faz I enzimleri tarafından oksitlenen metabolitlerin inaktive ve suda çözünebilir hale getirilmesini sağlarlar. İnaktive ve suda çözünebilir hale gelmiş bu ksenobiyotikler ise idrar veya safra yoluyla atılırlar (Smith ve ark 1994; Turesky 2004).

2.5.2.1. N-asetiltransferaz 2 (NAT 2)

N-asetiltransferaz (NAT) 8p22. kromozom bölgesinde yerleşik olup, farklı iki gen tarafından kodlanan bir Faz II detoksifikasyon enzimidir. Bu iki gen de insan ve kemirgenlerde tespit edilmiştir (Hein 1988; Grant ve ark 1997; Hein ve ark 1997). NAT 1 ve NAT 2 olarak adlandırılan bu iki gen yapısal olarak birbiri ile %81 benzerlik göstermektedir (Weber WW ve Hein DW 1985). Organ ve dokulardaki dağılımı farklıdır. NAT 1 çoğu dokuda bulunurken, NAT 2 karaciğer ve barsakta bulunur.

Ksenobiyotikleri aktivasyon kapasitelerine göre; hızlı, orta ve yavaş asetilleyiçi fenotipler tanımlanmaktadır (Narod SA ve ark 1995, Ochs-Balcom HM ve ark 2007). Homozigot doğal tip genotipe sahip bireyler hızlı asetilleyiçi; homozigot değişken genotipe sahip bireyler yavaş asetilleyiçi; heterozigot doğal tipe sahip (bir alleli yavaş, bir alleli hızlı olan) bireyler ise orta asetilleyiçi olarak sınıflandırılmıştır (Weber ve Hein 1985, Alberg ve ark 2004).

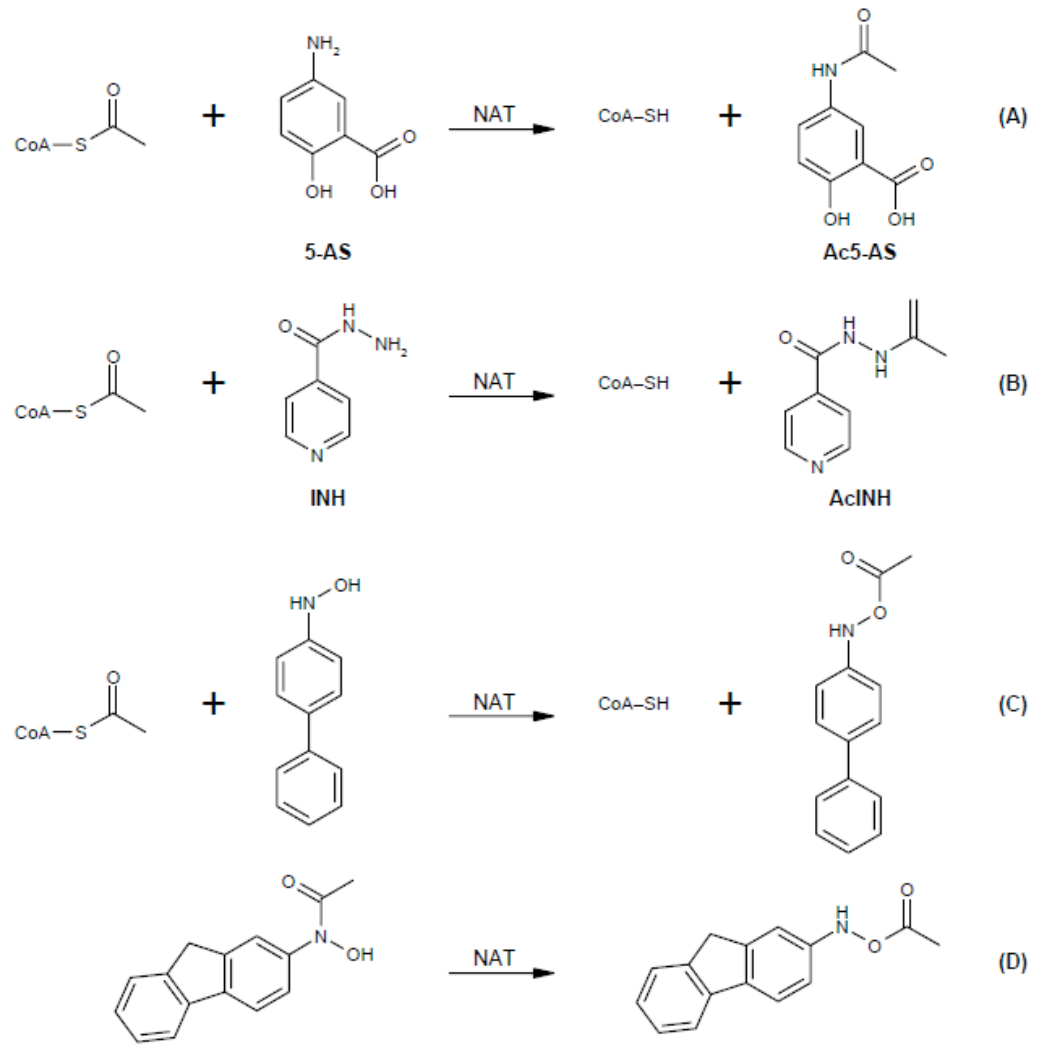
Faz II detoksifikasyon enzimlerinden olan NAT 2 amino ve hidroksi amino gruplarının asetilleşmesini katalizleyen Koenzim A bağımlı transferaz enzimlerindendir. Arilamin ve hidrazin ksenobiyotiklerine maruz kalması sonucu toksik etki meydana gelmesi ve etkinin önlenmesini oluşturan bir dizi metabolik yolda önemli görevleri vardır. NAT 2 katalitik etkisini arilaminlerin nitrojen atomuna asetil bağlayarak gösterirler. Bu şekilde toksik olmayan N-asetatlar sentezlenir. Ayrıca, O-asetilasyon ile de bileşiklerin aktifleşmesini sağlarlar. NAT'a bağımlı asetilasyon, çeşitli ilaç ve

Çevresel ksenobiyotikleri için temel bir biyotransformasyon yoludur (Dairou ve ark. 2005).

Biyolojik olarak, N-asetilasyon ve O-asetilasyon yaparak karsinojenleri inert ve noninert bileşiklere çevrilmesini sağlayan NAT 2 enziminin aktivasyonu önemlidir. Bu aktivasyona bağlı olarak DNA adduktlarının oluşumu gözlenmiştir(Ochs-Balcom ve ark. 2007)

Sigara kullanımı ve fazla pişmiş et tüketimi aril ve heterosiklik aminlere maruz kalınmasına neden olmaktadır. Aril ve heterosiklik aminler ise NAT 2 ‘nin temel substartlarındanr(Ochs-Balcom ve ark. 2007)

Sitokrom P450 enzimleri ile oksidasyona uğramalarını takiben asetillenen arilaminlerin, N-asetilasyon ile vücuttan atılımı kolaylaştırılır ya da O-asetilasyon ile ileri bir oksidasyona maruz kalarak etkinliği arttırılır. Arilamin N-konjugasyonu toksik olmayan stabil N-asetamid olarak adlandırılan N-asetoksi esterlerini (arilamidler, hidrazidler) oluşturulur(Meyer 1994). N-asetoksi metabolitleri kararsız olup DNA ile etkileşime girerek addukt yapılarını meydana getirir ya da oksijen atomlarının asetillenmesiyle daha etkin bir yapıya dönüşürler. Böylece aril nitrenyum olarak adlandırılan ve önemli kanserojen etkiye sahip bileşikleri meydana getirirler.



Şekil 2-3 Arilamin N-asetiltransferaz enzimi tarafından katalizlenen tepkimeler

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Seçilen Örneklerin Tanımı

Bu çalışmada İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Medikal Onkoloji BD'na meme kanseri nedeniyle başvuran hastalardan, gönüllü onay formunun imzalanmasından sonra periferik kan örnekleri alınmıştır. Laboratuvar çalışması İ.Ü. Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü (DETAE) Moleküler Tıp AD'ında yapılmıştır. Kontrol grubu için ise; ailesinde ve kendisinde diğer maligniteler ve meme kanseri hikayesi olmayan bireylerden periferik kan örnekleri kullanılmıştır

3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Agaroz, Amonyum asetat, Amonyum klorür, Amonyum sülfat, Asetik asit, Borik asit, Bromfenol blue, DNA marker, EDTA, Etanol (%99), Etidyum Bromid, Hidroklorik asit, İzopropanol, Potasyum bikarbonat, Potasyum hidroksit, Primerler, Proteinaz K, Sodyum dodesil (lauryl) sülfat, Sodyum hidroksit, Sodyum klorür, Trizma baz, Taq polimeraz, Xylene blue, dNTP set, restriksiyon enzimi (CYP 1A2 için BspI20 ve Nde I; NAT 2 için Msp 1, Kpn 1, Taq 1, Bam H1, Fok 1, Dra 3, Aci 1, Dde 1)

3.3. Kullanılan Gereçler

Bioer PZR Cihazı, Otoklav, Etüv, Hot plate, Dijital Görüntüleme sistemi, Elektroforez için güç kaynağı (E-C Apparatus Corporation), Hassas terazi (Mettler), Polaroid kamera (DS34 Direct screen instant camera), Isıtıcı manyetik karıştırıcı (Elektromag), Mikrodalga fırın (Philco), Mikrosantrifüj (TDX), pH metre (Hanna), Pipet takımı (Eppendorf), Falkon santrifüj (Hettich), Spektrofotometre (Biochrom-S2100 diode array spectrophotometer), Su banyosu (Elektromag), UV transilluminator (Stratagene UV/White light Transilluminator), Elektroforez Sistemi (E-C 350 MIDICELL).

3.4. Çözeltiler

3.4.1. DNA İzolasyonunda Kullanılan Çözeltiler:

3.4.1.1. Eritrosit Parçalama Tamponu (Lysis Buffer):

Amonyum klorürden 8,74 gr, potasyum bikarbonattan 1 gr, 0,5 molarlık Etilen diamine tetra asetat (EDTA)'dan 200 µl ölçülü kap içine alındı. ddH₂O'dan 900 ml eklenerek çözeltinin pH'sı 1 normal NaOH ile 7,4'e ayarlandı. Daha sonra balon joje içine alınarak 1 litreye tamamlandı. Çözelti ısıya dayanıklı cam şişelere aktararak 120°C'de 15 dakika otoklavlandıktan sonra +4°C'de saklandı

3.4.1.2. 0,5 M Disodyumetilendiaminteraasetat(EDTA) Çözeltisi (pH 8,0):

Etilen diamin tetra asetattan 186,1 gram tartılarak ölçülü kap içine alındı ve 800 mililitre ddH₂O eklendikten sonra manyetik karıştırıcı yardımıyla çözdürüldü. Karışımın pH'sı sodyum hidroksit çözeltisi ile 8,0'e ayarlanarak ddH₂O ile 1 litreye tamamlandı. Çözelti 120°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildi.

3.4.1.3. 4 M Sodyum Klorür (NaCl) Çözeltisi:

Sodyum klorürden 233,6 gram tartılarak ölçülü kaba alındı ve üzerine 800 mililitre ddH₂O ilave edildi. Manyetik karıştırıcı yardımıyla iyice çözdürüldükten sonra ölçülü balon kaba aktararak 1litreye tamamlandı. Hazırlanan çözelti 120°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildi.

3.4.1.4. Lökositleri Parçalama Tamponu (White Blood Cell Buffer- WBL):

Balon jojeye 25 ml 4 molar sodyum klorür ve 50 ml 0.5 molar etilen diamin tetra asetat (EDTA) aktararak 1lt tamamlandı. Hazırlanan çözelti 120°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildikten sonra oda ısısında saklandı.

3.4.1.5. 1 M Tris Tamponu (Stok):

Tris baz'dan 121,1 gr tartılarak bir ölçülü kaba alındı. Üzerine 42 µl hidroklorik asit ile yaklaşık 800 ml ddH₂O eklenerek manyetik karıştırıcı yardımıyla iyice çözdürüldü. Daha sonra balon jojeye aktarıldı ve 1 litreye tamamlandı. Hazırlanan çözelti 120°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildi.

3.4.1.6. 9.5 M Amonyum Asetat Çözeltisi:

Amonyum asetattan 73,22 gr tartılarak ölçülü kap içine alınır. Üzerine 80 mililitre ddH₂O eklenerek manyetik karıştırıcıda çözdürülür. Ölçülü balon kaba

aktarılır ve ddH₂O ile 100 mililitreye tamamlanır. 0,22 mikronluk filtreden geçirilerek sterilize edilir ve +4°C’de saklandı.

3.4.1.7. %10’luk Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) Çözeltisi:

Sodyum dodesil sülfattan 10 gr tartıldı. SDS tozlarını kaldırmamaya dikkat ederek ölçülü kap içine alındı ve üzerine 80 mililitre ddH₂O eklendi. Manyetik karıştırıcı yardımı ile çözündürüldü ve pH’sı 7,2’ye ayarlandı. 0,22 mikronluk filtreden geçirilerek sterilize edilip ve oda ısısında saklandı.

3.4.1.8. Proteinaz K (20mg/ml):

Proteinaz K’dan 20 ml gr tartılarak steril bir gode içinde steril ddH₂O ile 1 mililitreye tamamlandı ve -20°C’de saklandı.

3.5. Agaroze Jel Elektroforezinde Kullanılan Çözeltiler:

3.5.1. Agaroze Jel Yükleme Tamponu (5X):

Yükleme tamponu için 20 gram Ficoll 400, 1 gram SDS, 1,2 mililitre 0,5 molarlık etilen diamin tetra asetat, 1 mililitre 1 molarlık Tris (pH 8,0), 200 miligram Bromo fenol mavisi, 200 miligram Ksilen siyanol tartılarak steril ddH₂O ile 100 mililitreye tamamlandı. Oda ısısında saklandı.

3.5.2. Etidyum Bromür (10mg/ml):

Etidyum bromürden 10 gram tartılarak steril ddH₂O ile 10 mililitreye tamamlandı.

3.5.3. 5X Tris-Borik Asit-Etilendiamintetraasetat(TBE) Tamponu:

TBE hazırlamak için 54 gram tris baz ve 27,5 gram borik asit, 20 mililitre 0,5 molarlık EDTA (pH’sı 8,0) ve 800 mililitre ddH₂O manyetik karıştırıcıda çözündürüldükten sonra balon jojeye aktararak 1 litreye tamamlandı. Hazırlanan çözelti 120 °C’de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildi ve oda ısısında saklandı.

3.6. Kullanılan Yöntemler:

3.6.1. Periferik Kandan DNA İzolasyonu:

EDTA’lı tüplerle alınan 10ml’lik kan örnekleri çalışma için falcon tüplerine aktarıldı. Üzerilerine 1:3 oranında lizis solüsyonu eklenerek +4°C’de 15dk bekletildi. Daha sonra 1500rpm’de 10dk santrifüj edilip ve süpernatant kısımları atılarak pelletler

tamamen süspansiyon durumuna getirildi ve üzerlerine tekrar 15-20ml. lizis çözeltisi eklendi. Örnekler +4°C'de 15dk bekledikten sonra 10dk 1500rpm'de santrifüj edildi. Süpernatant kısımları atılıp ve süspanse olan pellet üzerine 500 µl %10'luk SDS, 75µl proteinaz K ve lökosit parçalama çözeltisi eklenerek 56°C'de su banyosunda bir gece inkübe edildi. İnkübasyondan sonra 1ml örnek başına 0,37ml 9,5M'lık amonyum asetat çözeltisi eklendikten sonra karıştırıldı ve 3000rpm'de 25dk santrifüj edilerek proteinler çöktürüldü. Santrifüj sonrası süpernatant kısmı 50ml'lik temiz bir tüpe aktarıldı ve üzerine 1:2 oranında %99'luk absolü alkol eklendi ve DNA'nın presipitasyonu sağlandı. Yoğunlaşan DNA'nın alkol yüzeyine çıkması beklenip ve DNA mikropipet ucuyla alındı. DNA %70'lik alkolde yıkandı ve korunmak üzere Tris-EDTA çözeltisinde çözündürülerek +4°C'de saklandı.

3.7. Elde Edilen DNA'nın Konsantrasyon ve Kalitesinin Tayini:

Elde edilen DNA örneklerinde konsantrasyon ve miktar tayini yapmadan önce her örnekten 20µl alınarak üzeri 380µl 0,5X TE tamponu ile tamamlandı ve bu şekilde 1/20 dilüsyonu sağlandı. Bu dilüsyon örneklerinin daha sonra spektrofotometrede 260 nm ve 280 nm dalga boylarında OD ölçümleri yapıldı.

Spektrofotometrede 260 nm ve 280 nm dalga boylarında yapılan ölçümlerle DNA'nın saflığı ve konsantrasyonu belirlendi. DNA'nın 50µg/ml çift iplikçikli içeriğinin 260 nm dalga boyunda bir optik densite (OD) verdiği kabul edilmektedir. 260 nm'deki ölçüm değeri aşağıdaki formüle uygulanarak DNA konsantrasyonu hesaplandı.

DNA Konsantrasyonu: $OD_{260} \times 50\mu\text{g/ml} \times \text{Sulandırma oranı}$

DNA örneklerinin saflığı OD_{260}/OD_{280} oranı kullanılarak belirlendi. Yeterince iyi saflıkta kabul edilen DNA'nın OD_{260}/OD_{280} değeri yaklaşık 1,8'dir. Ortamda fenol veya protein mevcutsa bu oran 1,8'den küçük olacaktır. OD_{260}/OD_{280} değeri 2'den büyükse ortamda RNA bulunduğu anlamına gelir.

3.8. PZR Yöntemi ile Gen Bölgelerinin Çoğaltılması ve RFLP Yöntemiyle Polimorfizm Analizi:

3.8.1. PZR'da Kullanılan Kimyasal Maddeler:

DNA Taq polimeraz enzimi (5U/µl) (Fermentas EPO402)

PZR reaksiyonundaki konsantrasyonu 2,5 unite olacak şekilde 50 µl'lik PZR karışımına 0,5 µl eklendi.

10 X DNA Taq PZR Tamponu (NH₄)₂SO₄'lü (Fermentas EP0402)

Tris-HCl'den 100mM (pH 8,8, 25°C'de), 500mM KCl ve %0,8 Nonidet P40 içeren 10X Taq PZR tamponundan 50 µl'lik PZR karışımına 5 µl eklendi.

MgCl₂ (25mM/ml, Fermentas EP0402)

MgCl₂'den 50 µl'lik PZR karışımına 4 µl eklendi.

dNTP'ler (100 µmol/ml) (Fermentas R0171)

dNTP'lerden (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) 10' ar µl alınıp (toplam 40 µl) 1 ml'lik tüpe kondu ve üzerine 960 µl distile su eklenerek (dH₂O) 1000 µl 1mM 'lık dNTP karışımı hazırlandı ve -20 °C derin dondurucuda saklandı. 50 µl'lik PZR karışımına 6 µl eklendi.

3.8.2. CYP1A2*F Gen Polimorfizmi Tespit Yöntemi:

3.8.2.1. CYP1A2*F Enziminin Gen Bölgesinin PZR Yöntemi ile Çoğaltılması:

380 bp'lik CYP1A2*F gen polimorfizminin belirlenmesi için 5-AGG TAT CAG CAG AAA GCC AGC AC-3 forward primeri ve 5-GCT GAG GGT GAG ATG GAG ACA T reverse primeri kullanılmıştır. Primerle kullanılmadan önce 100pmol/µl'lik stoklar hazırlanmıştır. PZR'da kullanılmadan önce 10 pmol/µl olacak şekilde sulandırılmıştır.

CYP1A2*F gen bölgesi optimize edilmiş PZR protokolü(Tablo 3-1) ve PZR şartları (Tablo 3-2) ile amplifiye edilmiştir.

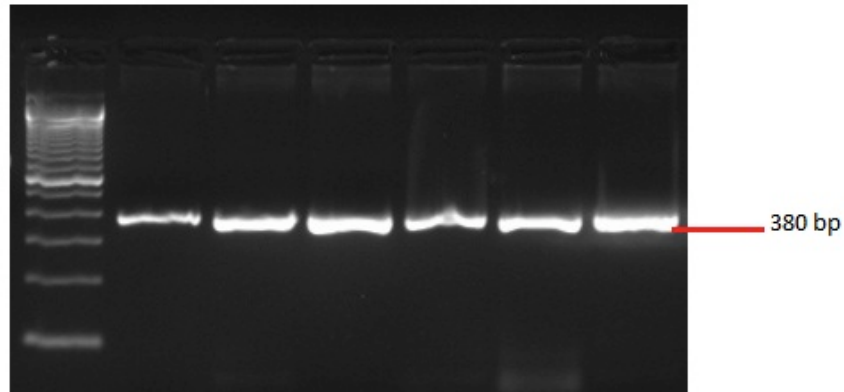
Tablo 3-1 CYP1A2*F polimorfizmi PZR protokolü

Miktarlar	
Su	15 µl
dNTP	1.2 µl (1mM)
10 x buffer	2.5 µl
Mg	2 µl
Primer F Primer R	1 µl +1 µl
Taq	0.3 µl
DNA	1 µl

Tablo 3-2 CYP1A2*F polimorfizmi PZR şartları

94 °C	2 dakika
94 °C 59 °C 72°C	30 saniye 10 saniye 1 dakika
	35 döngü
72°C	7 dakika

PZR sonrası oluşan amplifikasyon ürünlerinin incelenmesi için %2'lük agaroz jel hazırlanır. Örnekler jele yüklenerek 120 voltluk elektrik akımında yürütülürler. PZR ürününün jel görüntüsü Şekil 3-1'deki gibidir.

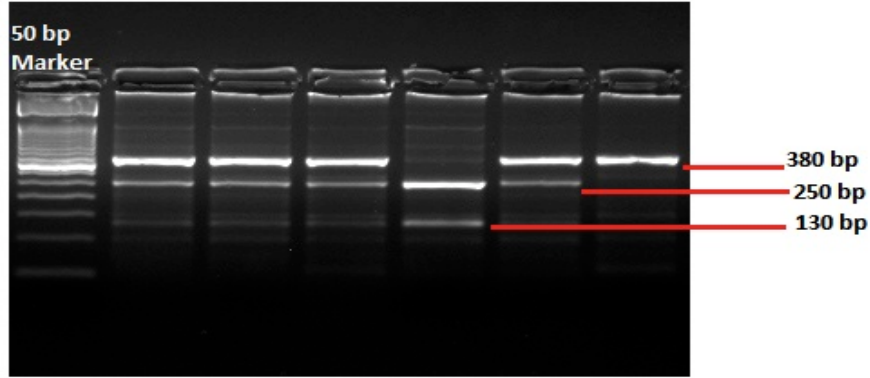
**Şekil 3-1 CYP1A2*F PZR jel görüntüsü**

3.8.2.2. CYP1A2*F Enziminin Gen Bölgesinin Kesimi

Çoğaltılan PZR ürünleri ApaI Restriksiyon Endonükleaz enzimi ile kesilmiştir(Tablo 3-3). Kesim işlemi ApaI enzimi için optimum sıcaklık olan 37°C'de 3 saat sürmüştür. Kesim sonrası oluşan ürünlerin incelenmesi için %3'lük agaroz jel hazırlanır. Örnekler jele yüklenerek 120 voltluk elektrik akımında yürütülürler. Jel görüntüsü Şekil 3-2'deki gibidir.

Tablo 3-3 CYP1A2*F polimorfizmi kesim protokolü

Kimyasallar	Miktar
PZR ürünü	10 µl
Distile Su	18 µl
10x Buffer	2 µl
Enzim: ApaI	1 µl



Şekil 3-2 CYP1A2*F kesim jel görüntüsü

Markerdan sonraki ilk üç örnekte heterozigot(hem kesilmiş, hem de kesilmemiş) AC genotipi görülmektedir. Dördüncü örnekte homozigot mutant CC genotipi görülmektedir. Son örnekte ise homozigot doğal tip AA genotipi görülmektedir. Kesimler 250 ve 140 bç.lik bantlar oluşturmaktadır.

3.8.3. CYP1A2*D Gen Polimorfizmi Tespit Yöntemi

3.8.3.1. CYP1A2*D Enziminin Gen Bölgesinin PZR Yöntemi ile Çoğaltılması

167 bç'lik CYP1A2*D gen polimorfizminin belirlenmesi için 5-TGA GCC ATG ATT GTG GCA TA-3 forward primeri ve 5-AGG AGT CTT TAA TAT GGA CCC AG-3 reverse primeri kullanılmıştır. Primerle kullanılmadan önce 100pmol/µl'lik stoklar hazırlanmıştır. PZR'da kullanılmadan önce 10 pmol/µl olacak şekilde sulandırılmıştır.

CYP1A2*D gen bölgesi optimize edilmiş PZR protokolü (Tablo 3-4) ve PZR şartları (Tablo 3-5) ile amplifiye edilmiştir.

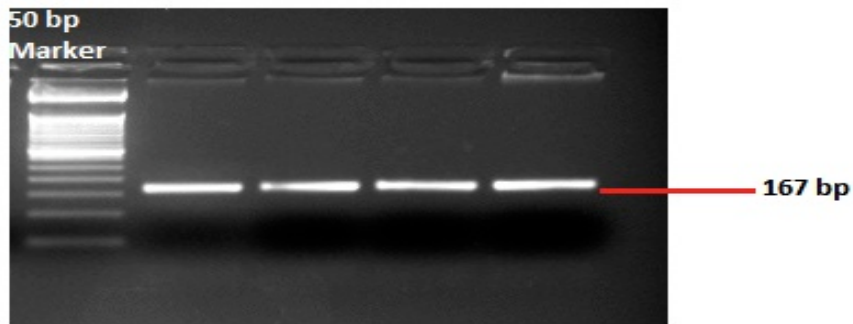
Tablo 3-4 CYP1A2*D polimorfizmi PZR protokolü

Miktarlar	
Su	16.4 µl
dNTP	1.2 µl (1mM)
10 x buffer	2.5 µl
Mg	1.5 µl
Primer F Primer R	1 µl +1 µl
Taq	0.4 µl
DNA	1 µl

Tablo 3-5 CYP1A2*D polimorfizmi PZR şartları

94 °C	2 dakika
94 °C	30 saniye
55 °C	10 saniye
72 °C	1 dakika
35 döngü	
72 °C	7 dakika

PZR sonrası oluşan amplifikasyon ürünlerinin incelenmesi için %2'lük agaroz jel hazırlanır. Örnekler jele yüklenerek 120 voltluk elektrik akımında yürütülürler. PZR ürününün jel görüntüsü Şekil 3-3'deki gibidir.



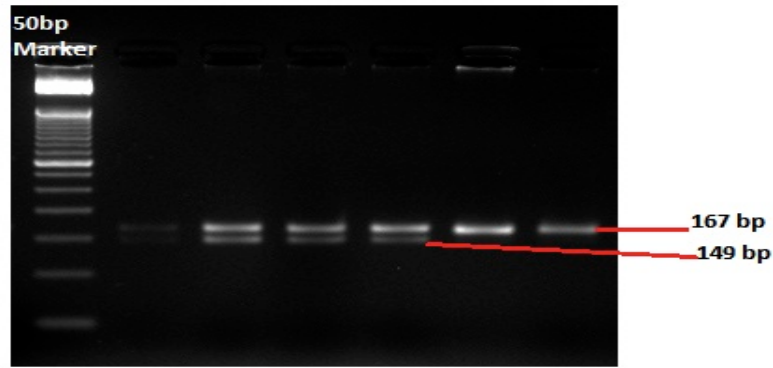
Şekil 3-3 CYP1A2*D PZR jel görüntüsü

3.8.3.2. CYP1A2*D Enziminin Gen Bölgesinin Kesimi:

Çoğaltılan PZR ürünleri *NedI* Restriksiyon Endonükleaz enzimi ile kesilmiştir(Tablo 3-6). Kesim işlemi *NedI* enzimi için optimum sıcaklık olan 37°C’de overnight sürmüştür. Kesim sonrası oluşan ürünlerin incelenmesi için %3’lük agaroz jel hazırlanır. Örnekler jele yüklenerek 120 voltluk elektrik akımında yürütülürler. Jel görüntüsü Şekil 3-4’deki gibidir.

Tablo 3-6 CYP1A2*D polimorfizmi kesim protokolü

Kimyasallar	Miktar
PZR ürünü	10 µl
Distile Su	9 µl
10x Buffer	1 µl
Enzim: <i>NedI</i>	0,5 µl



Şekil 3-4 CYP1A2*D kesim jel görüntüsü

Markerdean sonraki ilk dört örnekte heterozigot T/Tdel genotipi görülmektedir. Son iki örnekte ise homozigot doğal tip TT görülmektedir. Sadece 149 bandı görülmesi ise homozigot mutant Tdel/Tdel genotipi oluşmaktadır. Kesimler 149 ve 18 bç.lik bantlar oluşturmaktadır.

3.8.4. NAT 2 Gen Polimorfizmi Tespit Yöntemi:

8p22. kromozomda yer alan NAT 2 geninin 2. ekzonunun 866 baz çift(bp)lik bölgesi incelenmiş, 7'si missense, 4'ü sessiz mutasyonlara sebep olan 11 noktada baz değişimlerine bağlı nükleotid yer değişimleri araştırılmıştır. Missense mutasyonlar, amino asit değişiminin gerçekleştiği; sessiz mutasyonlar ise herhangi bir amino asit değişiminin olmadığı mutasyonlardır.

Tablo 3-7 NAT 2 allellerini oluşturan nükleotid değişimleri

Nükleotid	Baz Değişimi	Amino Asit Değişimi
191	G→A	Arg64Gln
341	T→C	Ile114Thr
434	A→C	Gln145Pro
590	G→A	Arg197Gln
803	A→G	Lys268Arg
845	A→C	Lys282Thr
857	G→A	Gly286Glu
111	T→C	-
282	C→T	-
481	C→T	-
759	C→T	-

866 bp.lik bu bölge, Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) yöntemiyle çoğaltılmış, polimorfizmler Kesim Parça Uzunluğu Polimorfizmi (RFLP) yöntemiyle belirlenmiştir. 11 polimorfizm 2'si nested olmak üzere toplam 3 PZR ve 5 kesimle tesbit edilmiştir.

866 bp.lik bölge, ilk olarak 5'- GGCTATAAGAACTCTAGGAAC-3 forward primeri ve 5'-AAGGGTTTATTTTGTTCCTTATTCTAAAT-3 reverse primeri ile çoğaltılır. Elde edilen ürün için 3 farklı RFLP kesimi uygulanır. 1. Kesimde MspI ve KpnI kesim (restriksiyon) enzimleri ile 191, 434, 481 polimorfizmleri araştırılır. 2.

Kesimde TaqI ve Bam HI enzimleri ile 111, 590, 759 ve 857 polimorfizmleri, 3. kesimde ise Fok I ve Dra III ile 282 ve 845 polimorfizmleri araştırılır.

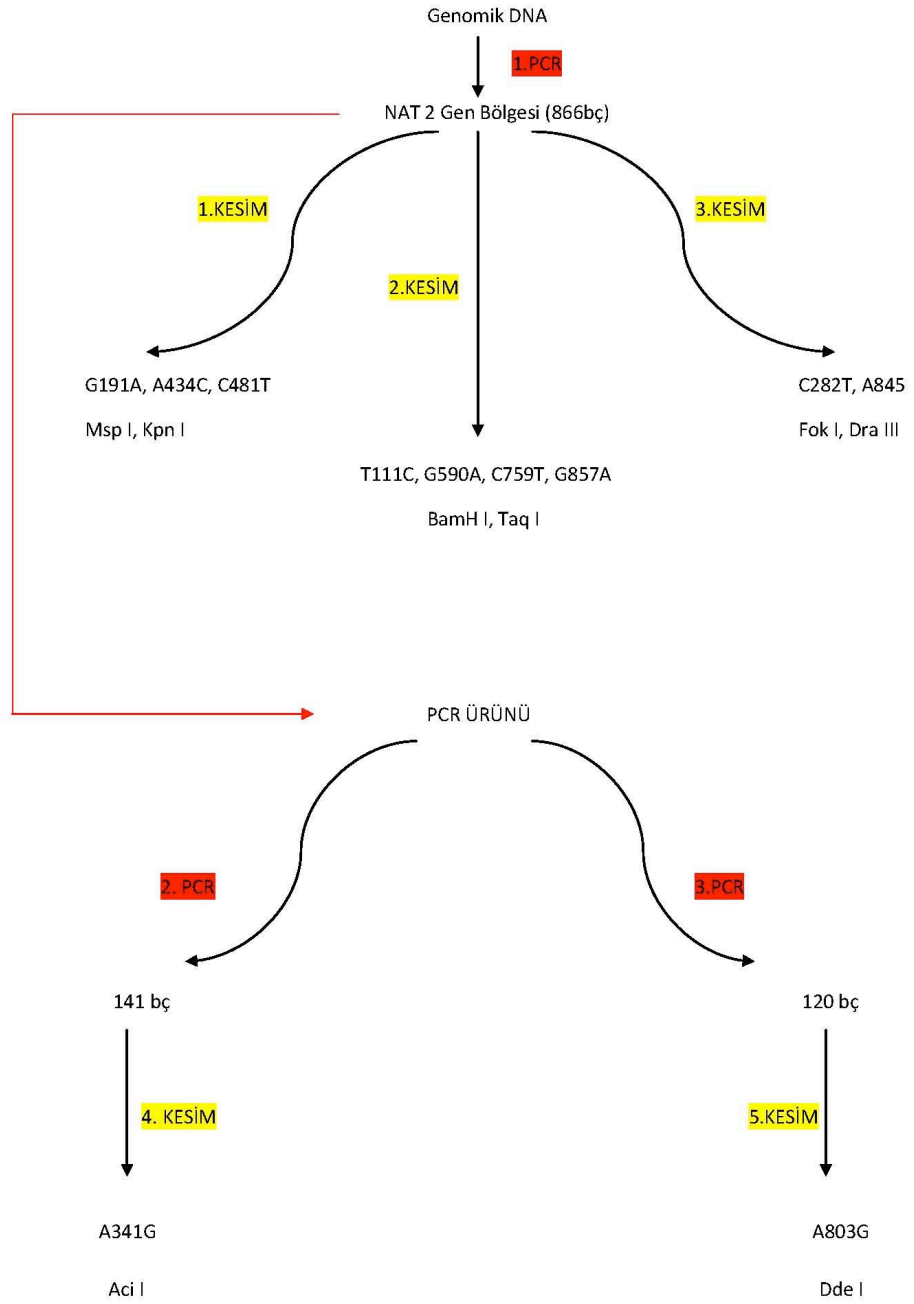
Birinci PZR ürününün içinden iki bölge, Nested PZR olarak adlandırılan bir yöntemle çoğaltılır. 141bp.lik ve 120 bp.lik bu iki bölge sırasıyla;
 5-CACCTTCTCCTGCAGGTGACCG-3 F,
 5-TGTCAAGCAGAAAATGCAAGGC-3 R ve
 5-TGAGGAAGAGGTTGAAGAAGTGCT-3 F,
 5-AAGGGTTTATTTTGTTCCTTATTCTAAAT-3 R
 primerleri ile çoğaltılıp 341 ve 803 polimorfizmleri araştırılır. T341C polimorfizmi Acil kesim enzimi, A803G polimorfizmi ise DdeI kesim enzimi kullanılarak araştırılmıştır(Şekil 3-1).

PZR Protokolü

2. ekzonun 866 bp.lik bölgesinin çoğaltımı için 27 µl dH₂O (pH=8.3), 5 µl Tris HCl + KCl, 4 µl MgCl₂, 6 µl dNTP, 3 µl forward primer (NAT 2 F), 3 µl reverse primer (NAT 2 R), 0.5 µl Taq Pol, 1 µl gDNA kullanılarak V_t= 50 µl. ye tamamlanır. 94°C'de 5', ön inkübasyon 94° C 1', 55° C 172° C 1' lık. 35 döngüden oluşan bağlanma safhası ve 72°C uzama safhaları ile PZR gerçekleştirilir.

Tablo 3-8 Kesim enzimi tanıma bölgeleri

Enzim		
Msp I	5'... CCGG... 3' 3'... GGCC... 5'	NAT 2 1. kesim
Kpn I	5'... GGTACG... 3' 3'... CCATGG... 5'	NAT2 1. kesim
Taq I	5'... TCGA... 3' 3'... AGCT... 5'	NAT 2 2. kesim
Bam HI	5'... GGATCC... 3' 3'... CCTAGG... 5'	NAT 2 2. kesim
Fok I	5'... GGATG(N) ₈ ... 3' 3'... CCTAC(N) ₁₀ ... 5'	NAT 2 3. kesim
Dra III	5'... CACNNNGTG... 3' 3'... GTGNNNCAC... 5'	NAT 2 3. kesim
Aci I	5'... CCGC... 3' 3'... GGCG... 5'	NAT 2 4. kesim
Dde I	5'... CTNAG... 3' 3'... GANTC... 5'	NAT 2 5. kesim



Şekil 3-5 NAT 2 polimorfizmleri tespit şeması

3.8.4.1. PZR Şartları:

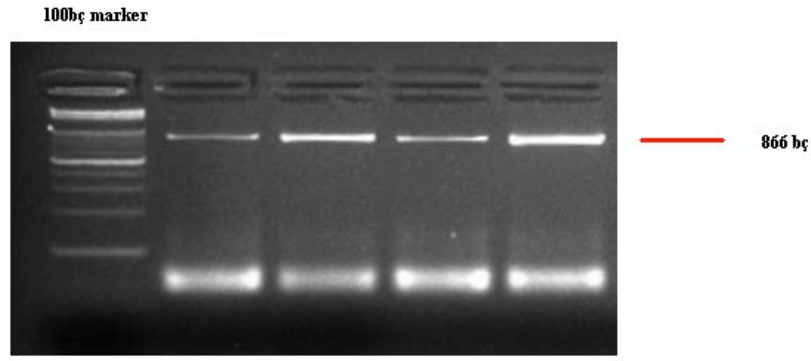
2. ekzonun 866 bp.lik bölgesinin çoğaltımı için 27 µl dH₂O (pH=8.3), 5 µl Tris HCl + KCl, 4 µl MgCl₂, 6 µl dNTP, 3 µl forward primer (NAT 2 F), 3 µl reverse primer (NAT 2 R), 0.5 µl Taq Pol, 1 µl gDNA kullanılarak V_t= 50 µl. ye tamamlanır. 94°C’de 5', ön inkübasyon 94° C 1', 55° C 172° C 1' lık. 35 döngüden oluşan bağlanma safhası ve 72°C uzama safhaları ile PZR gerçekleştirilir.

Tablo 3-9 NAT 2 birinci PZR protokolü

Miktarlar	
Su	27 µl
dNTP	6 µl (1mM)
10 x buffer	5 µl
Mg	4 µl
Primer 1 Primer 2	3 µl +3 µl
Taq	0.5 µl
DNA	1 µl

3.8.4.2. PZR Ürünlerinin Kontrolü:

PZR ürünlerinin kontrolü için %2’lik agaroz jel hazırlandı. PZR ürününün 10 µl’si, yükleme tamponundan 1µl alınarak karıştırıldı ve %2’lik agaroz jeldeki kuyulara yükleme yapıldı. PZR ürünleri (Fermentas 100 bp marker) DNA moleküler marker ile birlikte yürütüldü. Yürütme sonrası jel üzerindeki bantlar, UV ışık altında incelendi. PZR görüntüsü aşağıdaki gibidir.



Şekil 3-6 NAT 2 PZR jel görüntüsü

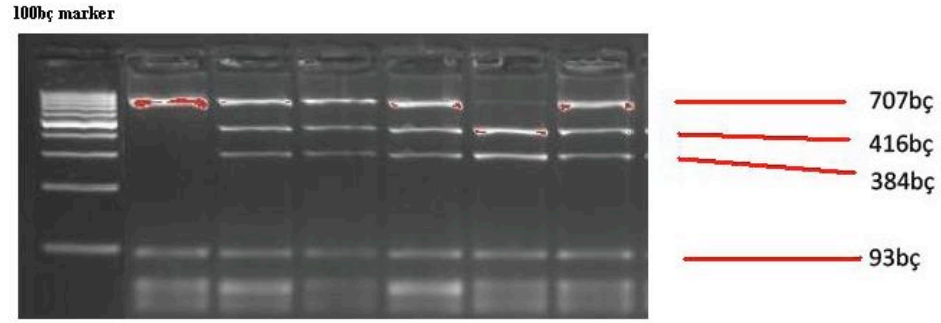
3.8.4.3. Kesim yöntemleri

Tablo 3-10 NAT 2 kesim protokolleri

	1.KESİM	2.KESİM	3.KESİM	4.KESİM	5.KESİM
SU	13 µl	13 µl	13 µl	18 µl	10 µl
TAMPON	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl
ENZİM	Msp I: 1 µl	BamH I: 1 µl	Fok I: 0,5 µl	Aci I:0,5 µl	Dde I: 0,5 µl
	Kpn I: 0,5µl	Taq I: 0,5 µl	Dra III: 0,5 µl		
PCR ÜRÜNÜ	15 µl	15 µl	15 µl	10 µl	10 µl
SICAKLIK	37°C'de 3 buçuk saat	37°C + 65°C'de 3 buçuk saat	37°C + 55°C'de 3 buçuk saat	37°C'de 3 buçuk saat	37°C'de 3 buçuk saat

1. Kesim:

191/434/481. Nükleotid polimorfizmleri araştırılır., 2 µl Kpn I Tamponu, 0.5 µl Kpn I, 1 µl Msp I, 13 µl distile su kullanılarak 37°C de >3 sa. inkübe edilir(Tablo 3-4).

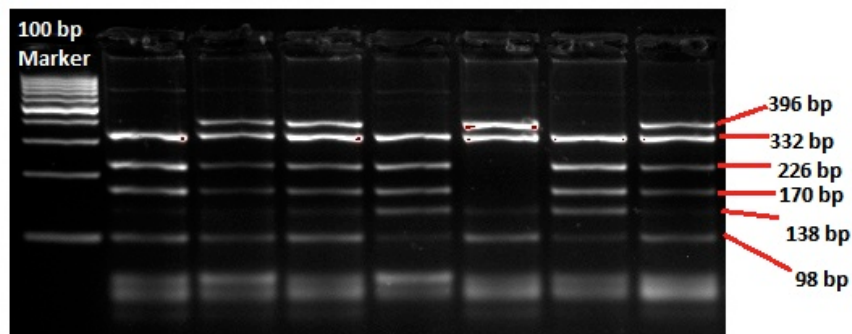


Şekil 3-7 1.Kesim jel görüntüsü

66, 93, 290, 416 ve 707 bç'den oluşan beş tip bant; farklı birlikteliklerinde 481 mutasyonunun varlığını, hiç mutasyon olmadığını ve heterozigot genotipi göstermektedir. 1. sütunda mutasyon olmadığı, 2. sütunda heterozigot yapı gözükmektedir. 190 ve 434 polimorfizmleri hiçbir örnekte saptanmamıştır.

1. Kesim:

111, 590, 759, 857. Nükleotid polimorfizmleri araştırılır. 15 µl PZR Ürünü, 2 µl Taq I tamponu, 0.5 µl Taq I, 1 µl Bam HI, 13 µl distile su ile 37°C de >3 sa ve 65°C de >3 sa. inkübe edilir(Tablo 3-4).

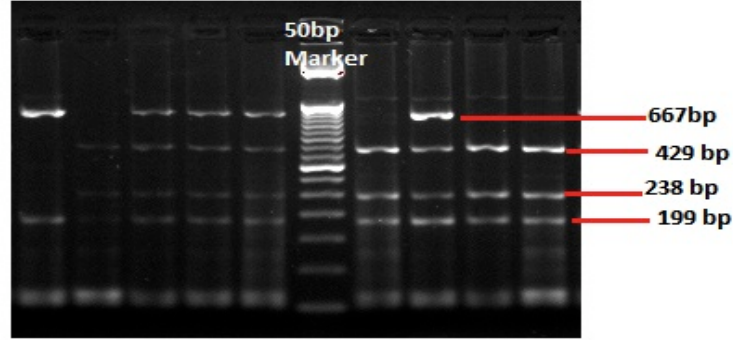


Şekil 3-8 2.Kesim jel görüntüsü

40, 98, 138, 170, 226, 332 ve 396 bç.lık bantların farklı birlikteliklerinde 590 ve 857 polimorfizmlerinin birlikte veya tek başına bulunması; ve mutasyon olmadığı anlaşılmaktadır. 111 ve 759 polimorfizmleri hiçbir örnekte saptanmamıştır.

2. Kesim:

282,845. Nükleotid polimorfizmleri araştırılır. 15 µl PZR Ürünü; 2 µl Tango tamponu, 0.5 µl Fok I, 0.5 µl Dra III, 13 µl distile su ile 37° C de >3 sa ve 55° C de >3 sa. inkübe edilir(Tablo 3-4).



Şekil 3-9 3.Kesim jel görüntüsü

199, 238, 429 ve 667 bç.lik bantların farklı birlikteliklerinde 282 polimorfizminin homozigot ve heterozigot yapı şeklinde bulunup bulunmadığı anlaşılmaktadır. Bu resimde ve diğer örneklemelerimizde 845 polimorfizmi saptanmamıştır.

4. ve 5. Kesim:

141 bp.lik ve 120 bp.lik bölgelerin **nested PZR** ile çoğaltımı için; 12.5 µl dH₂O, 2.5 µl Tris HCl tamponu (pH=8.3), 2 MgCl₂, 3 dNTP, 1.5 µl forward ve reverse primerler, 0.5 Taq Pol, 1.5 µl gDNA 25 µl toplam hacimde karıştırılır.

94 °C 5' ön inkübasyon, 94° C, 58° C 1' ve 72° C 1' den oluşan 30 döngülük bağlanma ve 72° C 5' uzamaya tabi tutulur(Tablo 3-8).

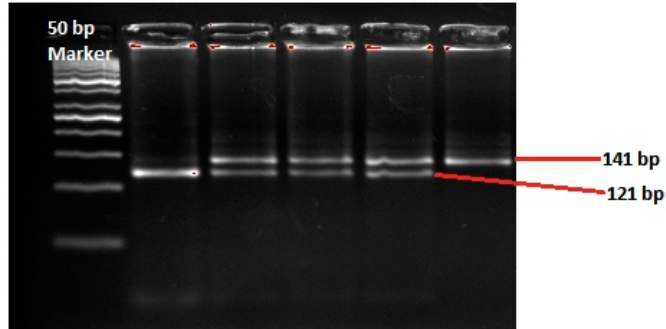
141 bp.lik bölgenin kesimi için; 10 µl PZR Ürünü, 2 µl O Tamponu, 0.5 µl Aci I ve 18 µl distile su içeren bir karışım ile gerçekleştirilir. 37°C de >3 sa. inkübe edilir. 120 bp.lik bölgenin kesimi için; 10 µl PZR Ürünü, 2.5 µl H Tamponu, 0.5 µl Dde I ve 10 µl dH₂O içeren bir karışım ile gerçekleştirilir. 37°C de >3 sa. inkübe edilir(Tablo3-4).

Kesim ürünlerinin % 1,5'lik agaroz jelde elektroforezleri tamamlandıktan sonra jel UV altında incelenmiş ve genotipler tespit edilmiştir.

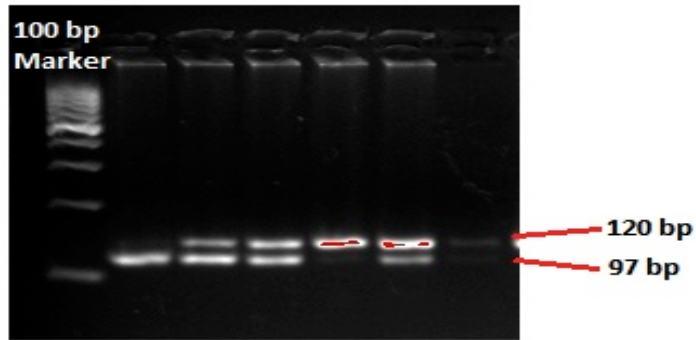
Tablo 3-11 NAT 2 ikinci ve üçüncü PZR protokolü

	Miktarlar
Su	12,5 µl
dNTP	3 µl
10 x buffer	2.5 µl
Mg	2 µl
Primer 3 ve 4 (2.pcr)	1.5 µl(10 pmol) 1.5 µl(10 pmol)
Primer 5 ve 2 (3.pcr)	
Taq	0.5µl
DNA	1 µl

Nested PZR (341 İÇİN) Kesimi



Şekil 3-10 4.Kesim jel görüntüsü



Şekil 3-11 5.Kesim jel görüntüsü

3.8.5. Sonuçların Değerlendirilmesinde Kullanılacak İstatistiksel Yöntemler

Bu çalışmanın istatistiksel analizleri için SPSS 11.0 paket programı kullanılmıştır. İstatistiksel anlamlılık $p<0.05$ olarak alınmıştır.

Genotip ve allellerin görülme sıklığının gruplar arası farklılıklarının değerlendirilmesinde Ki kare testi ve Student's t testi kullanılmıştır. Allel sıklıkları gen sayımı yöntemi kullanılarak yapılmıştır.

CYP 1B1, NAT 2 polimorfizmlerinin hasta ve kontrol gruplarındaki genotip ve alel dağılımları incelenerek meme kanseri gelişimindeki olası riskleri belirlenmeye çalışılmıştır.

4. BULGULAR

Hasta grubu meme kanserli kadınlardan oluştuğu için kontrol grubu olarak çalışmaya 94 adet kendisinde veya yakın akrabalarında kanser ile geçirilmiş önemli sağlık sorunu görülmemiş kadınlar dahil edilmiştir. Hasta grubuna 2005-2009 yılları arasında Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Medikal Onkoloji Bilim Dalı'nda tedavi gören kişilerin 65 tanesi dahil edilmiştir. Bu hastaların hepsi kemoterapi görmüştür.

Kontrol ve hasta grubunun yaş, boy, kilo ortalaması Tablo 4-1'de verilmiştir. Hasta grubunda sigara içenlerin sayısı 13'tür. Sigara içim oranları ve tüketen kişi sayısının azlığı Türk toplumunda 40 yaş üzeri kadınlarda sigara kullanımının düşük olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Tablo 4-1 Hasta ve kontrol grubuna ait demografik tablo

	Kontrol	Hasta
Boy	157±6,6 (n=51)	161±7,4 (n=43)
Kilo	81.49±13.55 (n=51)	72.36±12.36 (n=33)
yaş	45.39±14.55 (n=92)	50.92±12.12 (n=60)

Meme kanseri ve kontrol grupları arasında CYP1A2*F genotip dağılımları sırasıyla incelendiğinde AA, AC, CC genotip dağılımları hasta grubunda sırasıyla % 42,2, %56,3, %1,6; kontrol grubunda ise sırasıyla %36,7, %44,4, %18,9 bulunmuştur (Tablo 4-2). Her iki grup istatistiksel olarak karşılaştırıldığında homozigot mutant genotipin kontrol grubunda daha fazla olduğu gözlenmiştir (χ^2 :10,955 p:0,004).

Tablo 4-2 Meme kanserli hastalar ve kontrollere ait CYP1A2*F gen polimorfizm sonuçlarının genotip frekanslarına göre dağılımı

CYP1A2*F	KONTROL n(%)	HASTA n(%)
Genotip		
AA	33(%36,7)	27(%42,2)
AC	40(%44,4)	36(%56,3)
CC	17(%18,9)	1(%1,6)

CYP1A2*F gen polimorfizmine ait genotip frekansının meme kanserli hastaların menapoz, sigara kullanımı, alkol kullanımı, hormon replasman tedavisi, ilk doğum yaşı, doğum kontrol hapı kullanımı parametrelerinin değerlendirilmesi Tablo 4-3'te verilmiştir.

Tablo 4-3 CYP1A2*F gen polimorfizmine ait genotip frekanslarının meme kanseri risk faktörleri ile ilişkisi

		CYP1A2*F AA n(%)	CYP1A2*F AC n(%)	CYP1A2*F CC n(%)	p değeri	OR %95 CI
Menapoz	Pre	16 (%64,0)	17 (%51,5)	1(%100)	0,437	
	Post	9 (%36,0)	16 (%48,5)	-		
Sigara	İçme	6 (%35,3)	7 (%25)	-	0,620	
	İçmeme	11 (%64,7)	21(%75)	1(%100)		
Alkol	İçme	0(%0)	3(%4,9)		0,090	
	İçmeme	57(%100)	58(%95,1)			
Hormon Replasman Tedavisi	Tedavi olma	5(%31,3)	4 (%14,3)	-	0,352	
	Tedavi olmama	11(%68,8)	24(%85,7)	1(%100)		

İlk Doğum Yaşı	20'den önce	4(%23,5)	4(%14,3)	-	0,842	
	20'den sonra	11(%64,7)	22(%78,6)	1(%100)		
	Doğum yok	2(%11,8)	2(%7,1)	-		
Doğum Kontrol Hapı	Kullanan	1(%6,3)	7(%25)	-	0,263	
	Kullanmayan	15(%93,8)	21(%75)	1(%100)		

CYP1A2*F gen polimorfizmine ait genotip frekansının meme kanserli hastaların prognostik parametreler ile ilişkisi Tablo 4-4'te verilmiştir.

Tablo 4-4 CYP1A2*F gen polimorfizminin prognostik parametreler ile ilişkisi

		CYP1A2*F AA n(%)	CYP1A2*F AC n(%)	CYP1A2*F CC n(%)	p değeri	OR %95 CI
ER	Var	12(%63,2)	18(%64,3)		0,937	1,050(0,313-3,525)
	Yok	7(%36,8)	10(%35,7)			
PR	Var	9(%47,4)	18(%66,7)		0,191	2,222(0,666-7,413)
	Yok	10(%52,6)	9(%33,3)			
cerbB-2 (Her-2/Neu)	Var	8(%44,4)	6(%30)		0,357	0,536(0,141-2,033)
	Yok	10(%55,6)	14(%70)			

Meme kanseri ve kontrol grupları arasında CYP1A2*D genotip dağılımları sırasıyla incelendiğinde TT, Tdel, deldel genotip dağılımları hasta grubunda sırasıyla % 37,7, %36,1, %26,2; kontrol grubunda ise sırasıyla %48,9, %37,5, %13,6 bulunmuştur (Tablo 4-5). Her iki grup istatistiksel olarak karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir (X^2 :4,073 p:0,130).

Tablo 4-5 Meme kanserli hastalar ve kontrollere ait CYP1A2*D gen polimorfizm sonuçlarının genotip frekanslarına göre dağılımı

CYP1A2*D	KONTROL n(%)	HASTA n(%)
Genotip		
TT	43(%48,9)	23(%37,7)
Tdel	33(%37,5)	22(%36,1)
deldel	12(%13,6)	16(%26,2)

CYP1A2*D gen polimorfizmine ait genotip frekansının meme kanserli hastaların menapoz, sigara kullanımı, alkol kullanımı, hormon replasman tedavisi, ilk doğum yaşı, doğum kontrol hapı kullanımı parametrelerinin değerlendirilmesi Tablo 4-6’te verilmiştir.

Tablo 4-6 CYP1A2*D gen polimorfizmine ait genotip frekanslarının meme kanseri risk faktörleri ile ilişkisi

		CYP1A2*D TT n(%)	CYP1A2*D Tdel n(%)	CYP1A2*D deldel n(%)	p değeri	OR %95 CI
Menapoz	Pre	10 (%47,6)	12 (%60)	9(%60)	0,666	
	Post	11 (%52,4)	8 (%40)	6(%40)		
Sigara	İçme	4 (%25)	5 (%33,3)	2(%16,7)	0,613	
	İçmeme	12 (%75)	10(%66,7)	10(%83,3)		
Alkol	İçme	0(%0)	3(%4,9)		0,090	
	İçmeme	57(%100)	58(%95,1)			

Hormon Replasmant Tedavisi	Tedavi olma	4(%25)	3 (%20)	1(%8.3)	0,525	
	Tedavi olmama	12(%75)	12(%80)	11(%91.7)		
İlk Doğum Yaşı	20'den önce	-	6(%40)	3(%25)	0,105	
	20'den sonra	14(%87.5)	8(%53,3)	8(%66.7)		
	Doğum yok	2(%12.5)	1(%6.7)	1(%8.3)		
Doğum Kontrol Hapı	Kullanan	1(%6.3)	3(%20)	3(%25)	0,367	
	Kullanmayan	15(%93.7)	12(%80)	9(%75)		

CYP1A2*D gen polimorfizmine ait genotip frekansının meme kanserli hastaların prognostik parametreler ile ilişkisi Tablo 4-7’te verilmiştir.

Tablo 4-7 CYP1A2*D gen polimorfizminin prognostik parametreler ile ilişkisi

		CYP1A2*D TT n(%)	CYP1A2*D Tdel n(%)	CYP1A2*D deldel n(%)	p değeri	OR %95 CI
ER	Var	12(%70,6)	7(%46,7)	9(%75)	0,236	
	Yok	5(%29,4)	8(%53,3)	3(%25)		
PR	Var	10(%58,8)	7(%50)	8(%66,7)	0,690	
	Yok	7(%41,2)	7(%50)	4(%33,3)		
cerbB-2 (Her-2/Neu)	Var	5(%31,3)	7(%50)	1(%16,7)	0,314	
	Yok	11(%68,8)	7(%50)	5(%83,3)		

CYP1A2*F gen polimorfizminde homozigot mutant fenotip bulundurmanın enzim aktivitesini arttırıcı etki yaptığı ile ilgili bulguların olduğu çalışmalardan genel bilgide bahsedilmiştir. Keza CYP1A2*D gen polimorfizminde homozigot mutant fenotip bulundurmanın enzim aktivitesi azaltıcı etki yaptığı ile ilgili bulguların olduğu çalışmalardan da bahsedilmiştir. CYP1A2*F AA ve AC genotipi ile CYP1A2*D deldel genotipini birlikte bulundurma durumunu diğer parametreler ki kare testi ile karşılaştırıldı. Bu genotipi bulunduran kişilerin hasta grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı fark saptanmıştır (X^2 :7,851 p:0,005 OR:3,556 %95 CI (1,411-8,957)).

CYP1A2*F CC genotipi ile CYP1A2*d TT genotipini birlikte bulundurma durumunu diğer parametreler ki kare testi ile karşılaştırıldı. İki grup arasında bu iki alleli bulundurmada istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. (X^2 :0,831 p:0,768 OR:0,695 %95 CI (0,062-7,834)).

CYP1A2*F AC ve CC genotipi ile CYP1A2*d TT ve Tdel genotipini birlikte bulundurma durumunu diğer parametreler ile ki kare testi ile karşılaştırdık. İki grup arasında bu iki alleli bulundurmada istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. (X^2 :2,117 p:0,146 OR:0,615 %95 CI (0,319-1,186)).

NAT 2 geninde gereç ve yöntem bölümünde ayrıntıları sunulmuş olan sırasıyla 111C, 191A, 282T, 341C, 434C, 481T, 590A, 759T, 803G, 845C ve 857A nükleotid polimorfizmleri çalışılmıştır. Hem hasta, hem de kontrol grubunda 111C, 191A, 434C, 759T ve 845A nükleotid polimorfizmlerine rastlanmamıştır. Kontrol grubu ve hastaların 282T, 341C, 481T, 590A, 803G ve 857A nükleotid polimorfizmlerinin sıklığı Tablo 4-8'te gösterilmiştir.

Hasta grubunda 803G nükleotid polimorfizminin mutant formlarının, hasta grubunda anlamlı bir şekilde yüksek olduğu saptanmıştır (X^2 :16,053 p:0,000 OR: 4,111 %95 CI (2,019-8,370)). Her iki grup arasında 282T, 341C, 481T, 590A ve 857A nükleotid polimorfizmlerinin dağılımının farklı olmadığı gözlenmiştir.

Tablo 4-8 Kontrol ve hasta grubunda NAT 2 gen polimorfizmlerinin dağılımları

NAT2	Nükleotid değişimi		KONTROL	HASTA	
		N=92	%	N=65	%
kesim1	mutasyon yok	44	49,4	32	50,0
	481+	10	11,2	10	15,6
	481+-	35	39,3	22	34,4
kesim2	mutasyon yok	24	27,0	24	37,5
	590+	9	10,1	4	6,3
	857+	5	5,6	3	4,7
	590+-	44	49,4	22	34,4
	857+-	4	4,5	9	14,1
	590 857+	2	2,2	2	3,1
kesim3	mutasyon yok	24	28,6	27	42,2
	282+	9	10,7	10	15,6
	282+-	51	60,7	27	42,2
kesim4	mutasyon yok	44	47,8	28	44,4
	341+	8	8,7	9	14,3
	341+-	40	43,5	26	41,3
kesim5	mutasyon yok	74	80,4	32	50,0
	803+	5	5,4	7	10,9
	803+-	13	14,1	25	3

NAT 2 gen polimorfizmleri Sabbagh ve ark. tüm dünyadaki haplotiplerin değerlendirilmesinde kullanılan yöntemi ile adlandırılmıştır. Hangi nükleotid değişimin hangi haplotipe neden olduğunu gösteren kılavuz Tablo 4-9’te görülmektedir. Hem hasta, hem kontrol grubunun NAT 2 polimorfizmlerinin kombinasyonları yapılarak genotiplendirme yapılmış. Allel sıklıkları Tablo 4-10’da görülmektedir.

Tablo 4-9 NAT 2 Haplotipleme Şeması

Nükleotid değişimi	G191A	C282T	T341C	C345T	C403G	C481T	G590A	G609T	C638T	A803G	G838A	G857A
Aminoasit değişimi	R64Q	-	I114T	-	L135VE	-	R197Q	E203D	P213L	K268R	V280M	G286
HAPLOTİP												
<i>NAT2*4</i>	G	C	T	C	C	C	G	G	C	A	G	G
<i>NAT2*5A</i>	.	.	C	.	.	T	.	.	.	.	.	.
<i>NAT2*5B</i>	.	.	C	.	.	T	.	.	.	G	.	.
<i>NAT2*5C</i>	.	.	C	.	.	.	.	.	.	G	.	.
<i>NAT2*5D</i>	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<i>NAT2*5E</i>	.	.	C	.	.	.	A	.	.	.	.	.
<i>NAT2*5M</i>	.	T	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<i>NAT2*6A</i>	.	T	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.
<i>NAT2*6B</i>	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.
<i>NAT2*6C</i>	.	T	.	.	.	.	A	.	.	G	.	.
<i>NAT2*7A</i>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A
<i>NAT2*7B</i>	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A
<i>NAT2*11A</i>	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.
<i>NAT2*12A</i>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.
<i>NAT2*12B</i>	.	T	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.
<i>NAT2*12C</i>	.	.	.	.	.	T	.	.	.	G	.	.
<i>NAT2*13</i>	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<i>NAT2*14A</i>	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<i>NAT2*14B</i>	A	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<i>NAT2*12g</i>	.	.	.	.	.	.	.	T	.	G	.	.
<i>NAT2*6J</i>	.	T	.	.	.	.	A	.	.	.	.	A
<i>NAT2*12H</i>	.	.	.	.	G	.	.	.	.	G	.	.
<i>NAT2*6K</i>	.	T	.	.	.	.	A	.	T	.	.	.
<i>NAT2*6L</i>	.	T	.	T	.	.	A	.	.	.	.	.

Tablo 4-9’te görülen kılavuzda haplotiplerden turuncu ile yazılmış olanlar hızlı asetilleyci allelleri, siyah ile yazılmış olanlar ise yavaş asetilleycileri göstermektedir. Nükleotid değişimlerinin birlikteliği NAT2* şeklinde haplotipleri oluşturmaktadır. Bu haplotiplerin enzim aktivitesi üzerine etkileri yavaş, orta, hızlı olarak ortaya çıkmaktadır. Nükleotid değişimlerinden kırmızı ile yazılmış olanlar bizim çalışmamızda görülmüş olanlardır. Nükleotid değişimlerinden siyah ile yazılmış olanlar ise bizim çalışmamızda görülmeyen değişimlerdir.

Gen polimorfizmleri belirlendikten sonra NAT 2 aktivitesi allel dağılımına göre yapıldı. Buna göre NAT*5, NAT2*6, NAT2*7 ve NAT2*14 alleli taşıyanlar ya da bu allellerin kendi içlerinde heterozigot kombinasyonları yavaş asetilleyiciler olarak değerlendirilirler. Hızlı ve yavaş asetilleyicilerin birlikte kombinasyonları ise orta asetilleyiciler olarak değerlendirilirler. Bu genotipler fenotipik aktiviteleri açısından birlikte değerlendirildiğinde hasta grubunun orta asetilleyici fenotipe sahip olma oranının kontrol grubundan daha fazla sıklıkta olduğu gözlenmiştir (Tablo 4-11).

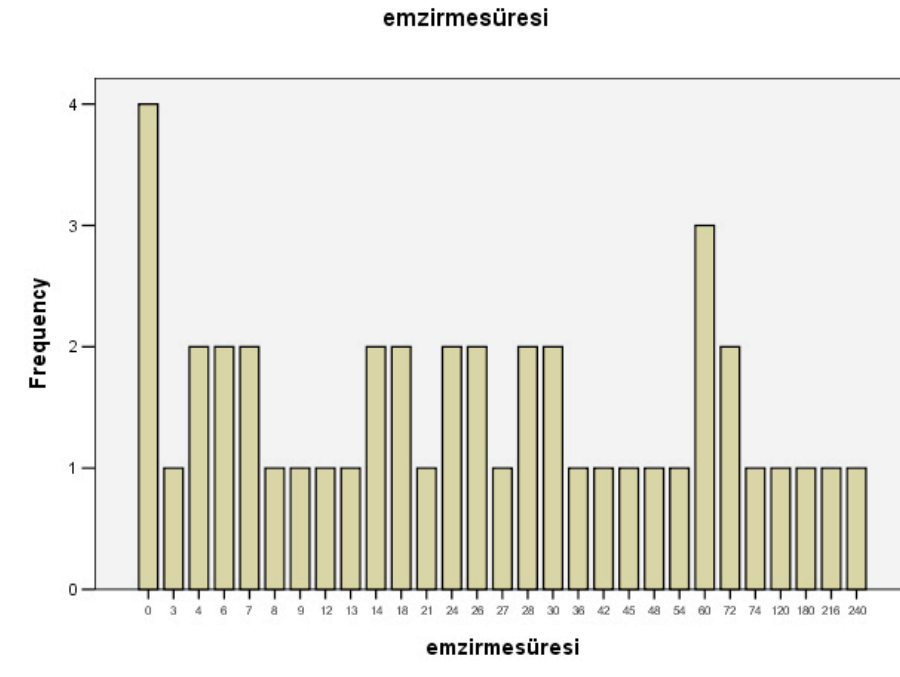
Tablo 4-10 Hasta ve kontrollerin NAT 2 gen sayım yöntemiyle allel sıklıkları görülmektedir.

		Kontrol		Hasta	
		N	%	N	%
Haplotip NAT2	*4	22	33,9	24	26,1
	*5A	4	6,1	23	25,0
	*5B	30	46,1	17	18,5
	*5C	3	4,6	2	2,2
	*5D	3	4,6	16	17,4
	*5E	1	1,5	4	4,3
	*6A	29	44,6	48	52,2
	*6B	3	4,6	8	8,7
	*6C	3	4,6	7	7,6
	*6J	3	4,6	7	7,6
	*7A	9	13,8	3	3,3
	*7B	5	7,7	4	4,4
	*11A	2	3,1	7	7,6
	*12A	-	-	1	1,1
	*12B	2	3,1	-	-
	*12C	2	3	4	4,4
	*13	3	4,6	1	1,1
	*13B	5	7,7	8	8,7
	Total	194	100,0	130	100

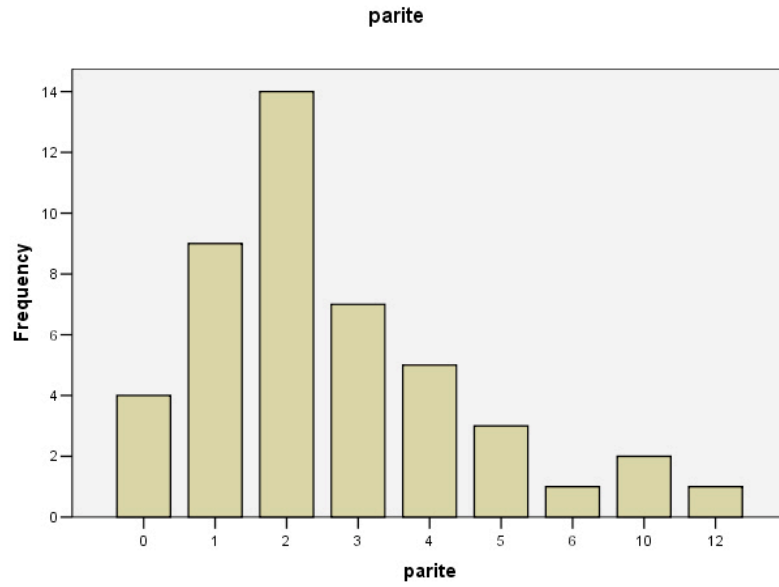
Tablo 4-11 Hasta ve kontrol grubunda NAT 2 aktivite sıklıkları ve yüzdeleri

			NAT2aktivite			Toplam
			yavaş	orta	hızlı	
	Kontrol	Sayı	55	29	8	92
		Yüzde	59,8%	31,5%	8,7%	100,0%
	Hasta	Sayı	35	25	5	65
		Yüzde	53,8%	38,5%	7,7%	100,0%
Toplam		Sayı	90	54	13	157
		Yüzde	57,3%	34,4%	8,3%	100,0%

Hasta grubu ile yaptığımız anketlerde emzirme süresi, çocuk sahibi olma(parite), ilk adet yaşı, doğum kontrol hapi kullanma, hormon tedavisi gibi veriler elde ettik. Bu verilerin sonuçları ve gen polimorfizmleri ile ilgili sonuçları aşağıda verilmiştir.



Şekil 4-1 Hasta grubunda emzirme sürelerinin dağılımı



Şekil 4-2 Hasta grubunda paritenin dağılımı

Hasta grubunda NAT 2 aktivitesi ile östrojen reseptörü sayısı karşılaştırıldığında, orta asetilleyicilerin yavaş ve hızlı asetilleyicilere göre daha fazla östrojen reseptörü bulundurduğu saptanmıştır. Hasta grubunda NAT 2 aktivitesi ile cerb2 varlığı karşılaştırıldığında, yavaş asetilleyicilerin en fazla, hızlı asetilleyicilerin ise en az sayıda cerb2 bulundurduğu saptanmıştır. Hasta grubunda NAT 2 aktivitesi ile progesteron reseptörü sayısı karşılaştırıldığında, hızlı asetilleyicilerin en fazla, yavaş asetilleyicilerin ise en az sayıda progesteron reseptörü bulundurduğu saptanmıştır.

NAT 2 aktivitesi ile menapoz durumu karşılaştırıldığında, yavaş asetilleyicilerin orta ve hızlı asetilleyicilere göre daha geç menapoza girdiği tespit edilmiştir. NAT 2 aktivitesi ile yaş karşılaştırıldığında, orta asetilleyicilerin en genç, hızlı asetilleyicilerin ise en yaşlı bireylerde görüldüğü tespit edilmiştir. NAT 2 aktivitesi ile ilk doğum yaşı karşılaştırıldığında, orta asetilleyicilerin en erken doğum yaptıkları, hızlı asetilleyicilerin ise en geç doğum yaptıkları saptanmıştır. NAT 2 aktivitesi ile düşük yapan hastalar karşılaştırıldığında, orta asetilleyicilerin en fazla düşük yaptığı görülmüştür.

Hasta grubumuzda yavaş asetilleyicilerin ortalama 2,5 çocuk, orta asetilleyicilerin ortalama 3,5 çocuk, hızlı asetilleyicilerin ise ortalama 2 çocuk yaptığı görülmüştür. Hasta grubumuzda en fazla emzirenlerin orta asetilleyiciler olduğu saptanmıştır. Hasta grubumuzda ilk adet yaşının en geç orta asetilleyicilerde olduğu tespit edilmiştir. Hasta grubumuzda hızlı asetilleyicilerin en fazla hormon tedavisi gördüğü, orta asetilleyicilerin ise en az hormon tedavisi gördüğü saptanmıştır. Hasta grubumuzda doğum kontrol hapı kullanımının en fazla orta asetilleyicilerde, en az yavaş asetilleyicilerde olduğu görülmüştür.

5. TARTIŞMA

Meme kanseri kadınlarda görülen en yaygın ve en etkili hastalıklardan biridir (Aygün-Kocabaş N. ve ark 2003). Dünyada her yıl yaklaşık 570.000 yeni olgu tespit edilmektedir. Kadınlarda görülen kanserlerin yaklaşık %18'ini meme kanseri oluşturur.

Meme kanserinde primer risk faktörleri arasında yaş, östrojen metabolizması, çocuk sahibi olmama, menapoz sonrası obezite gösterilmektedir (Henderson 1993, Toniolo 1997). Epidemiyolojik çalışmalar çevrenin meme kanseri gelişiminde önemli role sahip olabileceğini göstermektedir (Li ve ark 1996). Çevresel kirleticilere maruz kalma (taşıtların ve endüstriyel atıkların dahil), sigara tüketimi veya pestisitlerin meme kanseri oluşumunda etkili olduğu saptanmıştır (Hein 2000).

Meme kanseri gelişimi ile ilgili yapılan in vitro çalışmalarda, hayvan modellemelerinde ve insanlar ile ilgili yapılan çalışmalarda polisiklik aromatik karbonlar ile aril aromatik ve heterosiklik aminlere maruz kalmanın karsinogenezi arttırdığı çeşitli çalışmalarda tespit edilmiştir (Rundle ve ark 2000, Thompson ve Ambrosone 2000). Polisiklik aromatik karbonlar ile aril aromatik ve heterosiklik aminler biyotransformasyonda sitokrom enzimleri ve NAT 2 gibi Faz 2 enzimleri ile metabolize edilip, itrah edilirler.

N-asetilasyon polimorfizmi keşfedilmiş ve farmakogenetik özellikleri çalışılmış ilk farklılaşmış gen yapılarından biridir. N-asetilasyon kapasitesinde genetik olarak belirlenmiş farklılıklar tedaviye cevapta ve ilaç yan etkilerinin gelişmesinde önemli belirteçlerdendir (Sabbagh A. ve Darlu P. 2005; Meisel P 2002). Çeşitli etnik topluluklarda bu polimorfizmin genetik temelini anlayabilmek için araştırmalar devam edilmektedir (Sabbagh A. ve Darlu P. 2005; Delomenie C ve ark 1996; Asproдини EK. ve ark 1998). Bireylerarası genetik farklılıklar NAT aktivitesinde değişimlere yol açar ve hastalıklara yatkınlığa neden olabilmektedir. NAT2*4, NAT2*11A, NAT2*12A, NAT2*12B, NAT2*12C, NAT2*13, NAT2*13B allelleri hızlı fenotipi belirlerken, diğer alleller yavaş fenotipi belirler. Allellerin birinde hızlı, birinde yavaş asetilleyici fenotipin varlığında ise orta asetilleyici fenotip ortaya çıkmaktadır.

Yaklaşık yarım asırdır süren epidemiyolojik çalışmalar NAT 2 genotipleri ve bireylerin asetilasyon kapasiteleri arasında ortak sonuçlara varmışlardır. Buna göre,

NAT2*4 fenotipi hiçbir tek nükleotid polimorfizmi (TNP) içermeyen doğal tipi oluşturmaktadır. 341C içeren tüm NAT2*5 ailesinin N-asetilasyon, O-asetilasyon ve N,O-asetilasyon işlevlerinde en fazla azalmaya neden olan aile olduğu; bunu 191A içeren NAT2*14 ailesinin; 590A içeren NAT2*6 ailesinin ve 857A içeren NAT2*7 ailesinin takip ettiği gösterilmiştir.

Bununla beraber nükleotid değişimlerinin protein ifadesi ve stabilitesi (kararlılığı) ile ilişkisi de belirlenmiştir. 341C, 434C ve 590A polimorfizmlerinin protein ifadesini azalttığı; 191A, 845C ve 857A polimorfizmlerinin ise NAT 2 protein stabilitesini azalttığı belirlenmiştir. Bu sonuçlar insandaki yavaş asetilleyici fenotipten homojen olmadığını, belirli TNP ve allellerin katılımına bağlı birçok fenotipten meydana geldiğini göstermektedir (Sabbagh A. ve Darlu P. 2005).

NAT 2 genotipleri populasyonlar arasında farklılık göstermekle birlikte en iyi beyaz ırkta tanımlanmıştır (Loktionov A ve ark 2002; Evans DA 1989; Jiao L ve ark 2007; Yalın S. ve ark 2007). Hızlı asetilasyon genotipinin beyaz ırkta NAT 2*4 olarak belirtilmiştir. Hızlı asetilasyon Asya popülasyonunda en sık görüldüğü, bu sıklığın bazı etnik topluluklarda %90'a ulaştığı bilinmektedir (Loktionov A ve ark 2002; Lin HJ ve ark 1993; Xie HG ve ark 1997). Yavaş asetilasyon ise Kuzey Afrika ve Ortadoğu topluluklarının çoğunda tespit edilmiştir (Evans DA 1989). NAT 2 yavaş asetilleyici fenotipi özellikle mesane, kolorektal, pankreas, akciğer, meme, baş ve boyun skuamöz kanseri olmak üzere birçok kanser için risk etkeni olmuştur.

Çalışmamızda, Faz 1 enzimi olan CYP1A2 ile Faz 2 enzimi olan NAT 2 enziminin polimorfizmlerinin meme kanseri ile olan ilişkisini bulmayı amaçladık.

NAT 2 asetilasyonu ve meme kanseri arasında anlamlı ilişkiler bulunan birçok çalışma yapılmıştır. Bunların arasında NAT 2 asetilasyonu ise meme kanseri arasında anlamlı ilişkiler bulan ve hiçbir bağlantı bulamayan çalışmalar olmuştur (Hein DW. ve ark 2000). Alberg ve ark. Hızlı asetilasyonun menapoz sonrası dönemdeki kadınlarda dahil tüm kadınlarda meme kanseri riskini arttırdığını, menapoz sonrası kadınlarda bu riskin en yüksek seviyelere ulaştığını bildirmişlerdir (Huang CS. ve ark 1999; Sillanpaa P ve ark 2005).

Çalışmamızda kontrol ve hasta gruplarının NAT 2 asetilleme durumuna bakıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır.

CYP1A2*F allel dağılımları ile bu gen ile yapılmış diğer çalışmalardaki allel dağılımları Tablo 5-1’de gösterilmiştir.

Tablo 5-1 Çalışmamızdaki CYP1A2*F allel dağılımlarının diğer çalışmalar ile karşılaştırılması

Yazar	Yıl	Ülke	Etnik	Genotip Dağılımı		
				AA	AC	CC
Bageman E ve ark	2008	Isveç	Beyaz ırk	%51.3	%39.7	%9
Chida M. ve ark	1999	Japonya	Asyalı	%39	%44.6	%16.4
Sachse C. ve ark.	1998	Almanya	Beyaz Irk	%46	%43	%11
Skarke. ve ark	2005	Almanya	Beyaz Irk	%45.3	%45.9	%8.9
Fujihara J. ve ark	2007	Ovambo	Asyalı	%29,3	%49,2	%21,4
Fujihara J. ve ark	2007	Kore	Asyalı	%47,2	%42,4	%10,4
Fujihara J. ve ark	2007	Moğolistan	Asyalı	%62,1	%33,3	%4,6
Bizim çalışmamız	2010	Türkiye	Beyaz Irk	%42.2	%56.3	%1.6

CYP1A2*D allel dağılımları ile bu gen ile yapılmış diğer çalışmalardaki allel dağılımları Tablo 5-‘de gösterilmiştir.

Tablo 5-2 Çalışmamızdaki CYP1A2*D allel dağılımının diğer çalışmalar ile karşılaştırılması

Yazar	Yıl	Ülke	Etnik	Genotip Dağılımı		
				TT	Tdel	deldel
Chida M. ve ark	1999	Japonya	Asyalı	%33.8	%48.4	%17.8
Skarke. ve ark	2005	Almanya	Beyaz Irk	%85.3	%13.7	%1
Pavanello S. ve ark	2007	İtalya-Tunus	Kuzey Afrika	%78,2	%17,8	%4
Bizim çalışmamız	2010	Türkiye	Beyaz Irk	%37.7	%36.1	%26.2

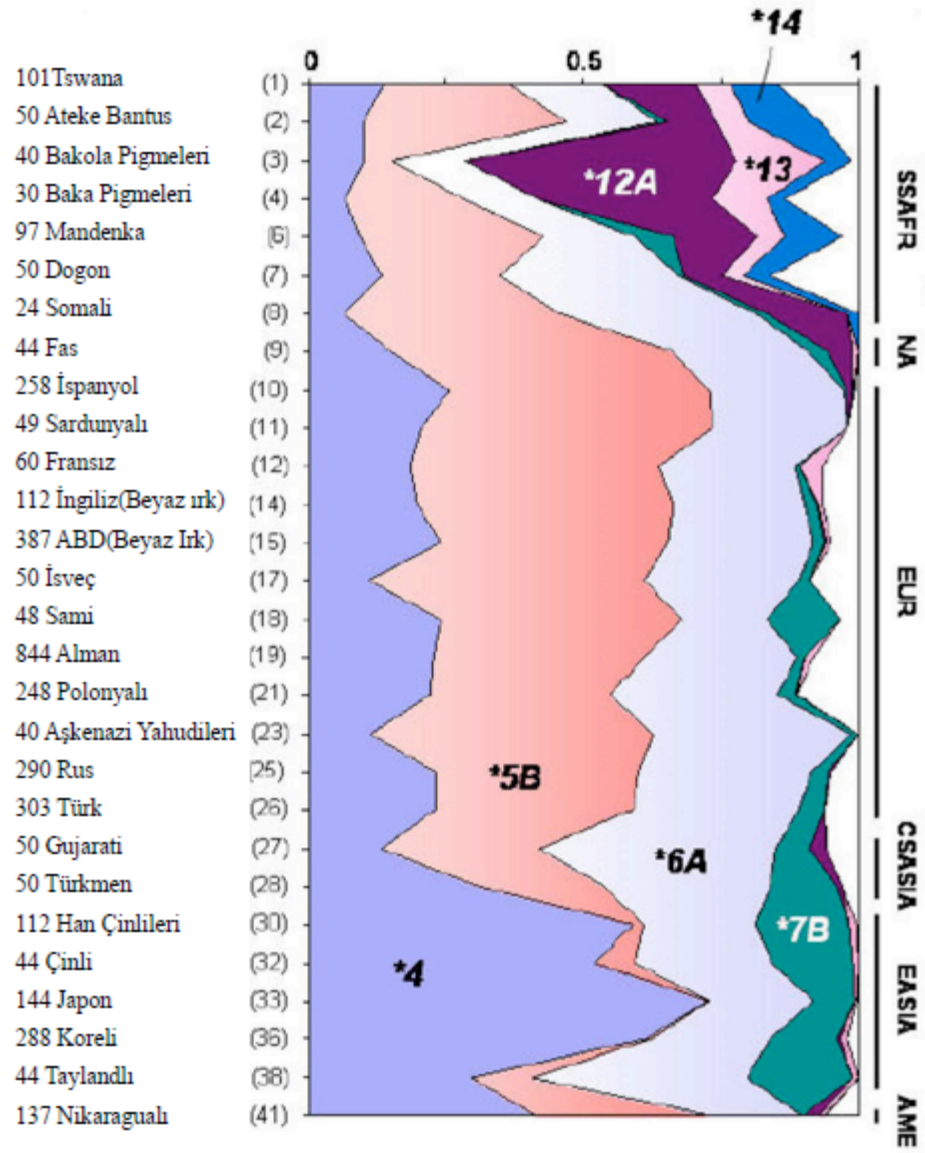
Çalışmamız ile van der Hel OL. ve arkadaşlarının meme kanseri ile ilişkisini inceledikleri çalışma karşılaştırıldığında, çalışmamızda hasta grubunda NAT2*4 genotip sıklığı %21.1, NAT2*5A genotip sıklığı %25, NAT2*5B genotip sıklığı %18.5, NAT2*5C genotip sıklığı %2.2, NAT2*6A genotip sıklığı %52.2, NAT2*6B genotip sıklığı %8.7, NAT2*6C genotip sıklığı %7.6, NAT2*7B genotip sıklığı %4.4, NAT2*12A genotip sıklığı %1, NAT2*12B genotip hiç görülmektedir, NAT2*13genotip sıklığı %1.1; van der Hel OL ve arkadaşlarının çalışmasında ise hasta grubunda NAT2*4 genotipi sıklığı %21.3, NAT2*5A genotipi sıklığı %2.2, NAT2*5B genotipi sıklığı %42.8, NAT2*5C genotipi sıklığı %2.0, NAT2*6A genotipi sıklığı %28.7, NAT2*6B genotipi sıklığı %0.2, NAT2*6C genotipi sıklığı %0.2, NAT2*7B genotipi sıklığı %2.4, NAT2*12A genotipi sıklığı%0.2 olarak bulunmuş ve NAT2*12B ve NAT2*13 genotipi hiç görülmemiştir.

Çalışmamızda bulduğumuz NAT 2 asetilleme aktivitesi sonuçları ile NAT 2 asetilleme aktivasyonu çalışılmış diğer araştırmalardaki asetilleme aktivite sonuçları Tablo 5-3’de gösterilmiştir.

Tablo 5-3 Çalışmamızdaki NAT 2 asetilleme sonuçlarının diğer çalışmalar ile karşılaştırılması

Yazar	Yıl	Ülke	Etnik	Asetilleme		
				Yavaş	Orta	Hızlı
Pavicic WH. ve ark	2009	Arjantin	Latin	%44.7	%47.9	%7.4
Huang C. ve ark	1999	Tayvan’daki Çinliler	Asyalı	%85.3	%13.7	%1
Rouissi K. ve ark.	2009	Tunus	Kuzey Afrika	%36	%41.6	%22.4
Zhang YW. ve ark	2009	Kore	Asyalı	%11.9	%43.3	%44.8
Bagcı-Ceyhan B. ve ark	2004	Türkiye	Beyaz Irk	%47	%42	%11
Bizim çalışmamız	2010	Türkiye	Beyaz Irk	%53.8	%38.5	%7.7

Ayrıca Sabbagh ve arkadaşlarının 2008 yılında yaptığı araştırmada bütün dünyadaki NAT 2 fenotiplerinin dağılımları Şekil 5-1’de gösterilmiştir. Çalışmamızın sonuçları bu şekilde verilen sonuçlarla örtüşmektedir. Sabbagh ve arkadaşlarında olduğu gibi biz de Türk toplumunda *5B, *6A ve *4 fenotiplerini çoğunlukta bulduk.



Şekil 5-1 Dünyada NAT 2 fenotiplerinin dağılımları

(Sabbagh ve ark. 2008)

Sonuç olarak,

- Kontrol grubu ile hasta grubunun NAT 2 aktiviteleri karşılaştırıldığında, kontrol grubunda yavaş asetilleme aktivitesini hasta grubuna göre daha fazla; hasta grubunda ise orta asetilleme aktivitesini kontrol grubuna göre daha fazla bulduk. Ancak iki sonuçta da istatistiksel olarak bir anlamlılık saptanmamıştır.
- Hasta grubunda kontrol grubuna göre 803G nükleotid polimorfizminin mutant formlarının, hasta grubunda anlamlı bir şekilde yüksek olduğu saptanmıştır (X^2 :16,053 p:0,000 OR: 4,111 %95 CI (2,019-8,370)).
- CYP1A2*F AA ve AC genotipi ile CYP1A2*d deldel genotipini birlikte bulundurma durumunu diğer parametreler ki kare testi ile karşılaştırıldı. Bu genotipi bulunduran kişilerin hasta grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı fark saptanmıştır (X^2 :7,851 p:0,005 OR:3,556 %95 CI (1,411-8,957)). CYP1A2*F genotipinde A alleli ile CYP1A2*D genotipinde deldel allelini birlikte bulundurmanın enzim aktivitesini azaltabileceğini düşünüyoruz. Bu azalmanın da meme kanseri gelişimi ile ilişkili olabileceğini düşünüyoruz.
- Hasta sayımızın azlığından dolayı emzirme süresi, ilk adet yaşı, parite, hormon tedavisine maruz kalma, menapoz, doğum kontrol hapi gibi faktörler ile meme kanseri gelişimi arasında istatistiksel bir sonuç bulunamamıştır.

Hasta sayılarını arttırarak bu çalışmayı sürdürüp CYP1A2 ve NAT 2 genlerinin meme kanseri ile olan ilişkisini daha güçlü istatistiki ortaya koymayı planlıyoruz.

KAYNAKLAR

- Aalen, O.O. (1991). Modelling the influence of risk factors on familial aggregation of disease. *Biometrics*, **47**, 933-946.
- Alberg, A.J., Daudt, A., Huang, H.Y., Hoffman, S.C., Comstock, G.W., Helzlsouer, K.J. ve ark. (2004). N-acetyltransferase 2 (NAT2) genotypes, cigarette smoking and the risk of breast cancer. *Cancer detection and prevention*, **28**, 187-193.
- Ambrosone, C.B. ve Shields, P.G. (1999). Smoking as a risk factor for breast cancer. İçinde A.M. Bowcock (Ed.), *Breast cancer: molecular genetics, pathogenesis and therapeutics*. Totowa New Jersey: Human Pres Inc; 519, 36.
- Asproдини E K, Zifa E, Papageorgiou I, Benakis A. (1998).Determination of N-acetylation phenotyping in a Greek population using caffeine as a metabolic probe. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, **23**:501-506.
- Berkey, C.S., Frazier, A.L., Gardner, J.D. ve Colditz, G.A. (1999). Adolescence and breast carcinoma risk. *Cancer*, **85**, 2400-2409.
- Bernstein, L., Henderson, B.E., Hanisch, R., Sullivan-Halley, J. ve Ross, R.K. (1994). Physical exercise and reduced risk of breast cancer in young women. *Journal of the National Cancer Institute*, **86**, 1403-1408.
- Bethesda, M.D. (1999). Cancer Statistics Review, 1973–1995. National Cancer Institue. SEER. National Cancer Institue.
- Cavaliere, E.L., Rogan, E.G., Devanesan, P.D., Cremonesi, P., Cerny, R.L., Gross, ML. ve ark. (1990). Binding of benzo[a]pyrene to DNA by cytochrome P-450 catalyzed one-electron oxidation in in rat liver microsomes and nuclei, *Biochemistry*, **29**, 4820–4827.
- Chida M, Yokoi T, Fukui T, Kinoshita M, Yokota J, Kamataki T. (1999). Detection of three genetic polymorphisms in the 5'-flanking region and intron 1 of human CYP1A2 in the Japanese population. *Japanese Journal of Cancer Research*, **90**:899-902
- Chie, W.C., Hsieh, C., Newcomb, P.A., Longnecker, M.P., Mittendorf, R., Greenberg, E.R. ve ark. (2000). Age at any full-term pregnancy and breast cancer risk. *American Journal of Epidemiology*, **151**, 715-722.
- Cui, J. ve Hopper, J.L. (2000). Why are the majority of hereditary cases of early-onset breast cancer sporadic? A simulation study. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, **9**, 805-812.

- Dairou, J., Dupret, J. ve Rodrigues-Lima, F. (2005). The xenobiotic-metabolizing enzymes arylamine N- Acetyltransferases in human lens epithelial cells: inactivation by cellular oxidants and UVB-Induced Oxidative Stress. *Molecular Pharmacology*, **67**, 1229-1306.
- Delomenie C, Sica L, Grant DM, Krishnamoorthy R, Dupret JM. (1996). Genotyping of the polymorphic N-acetyltransferase (NAT2*)gene locus in two native African populations. *Pharmacogenetics*, **6**:177-185.
- Dumitrescu, R.G. ve Shields, P.G. (2005). The etiology of alcohol-induced breast cancer. *Alcohol*, **35**, 213-225.
- Easton, D., Ford, D. ve Peto, J. (1993). Inherited susceptibility to breast cancer. *Cancer Surveys*, **83**, 95-113.
- Eaton, D.L., Gallagher, E.P., Bammler, T.K. ve Kunze, K.L. (1995). Role of cytochrome P4501A2 in chemical carcinogenesis: implications for human variability in expression and enzyme activity. *Pharmacogenetics*, **5**, 259-274.
- Ellis, I.O., Pinder, S.E., Lee, A.H.S. ve Elston, C.W. (2000). Tumors of the breast. İçinde C.D.M. Fletcher (Ed.), *Diagnostic Histopathology of Tumors*. (2nd ed.). London: Churvhill Livingstone; 865-930.
- Evans D A P. N-acetyltransferase. *Pharmacology & Therapeutics*, 1989, 42: 157-274.
- Ford, D., Easton, D.F., Stratton, M., Narod, S., Golgar, D., Devilee, P. ve ark. (1998). Genetic heterogeneity and penetrance analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in breast cancer families. The Breast Cancer Linkage Consortium. *American Journal of Human Genetics*, **62**, 676-689.
- Friendenreich, C.M. (2001). Review of anthropometric factors and breast cancer risk. *European Journal of Cancer Prevention*, **10**, 15-32.
- Gadducci, A., Biglia, N., Sismondi, P. ve Genazzani, A.R. (2005). Breast cancer and sex steroids: critical review of epidemiological, experimental and clinical investigations on etopathogenesis, chemoprevention and endocrine treatment of breast cancer. *Gynecological Endocrinology*, **20**, 343-360.
- Grant, D.M., Hughes, N.C., Janesic, S.A., Goodfellow, G.H., Chen, H.J., Gaedigk, A. ve ark. (1997). Human acetyltransferase polymorphisms. *Mutation Research*, **376**, 61-70.
- Hamilton, S.R. ve Aaltonon, L.A. (Eds.). (2000). *Tumors of Digestive System*. Lyon: Who pres.

- Harris, J., Morrow, M. ve Norton, L. (1997). *Malignant tumors of the breast cancer principles. Practice of Oncology*., J. Devita, T. Vincent et all (Eds.), Kitabın ismi? Philadelphia: 1557. ????
- Hein D W, Doll M A, Fretland A J, Leff M A, Webb S J, Xiao G H, Devanaboyina U, Nangju N A, Feng Y. (2000). Molecular Genetics and Epidemiology of the NAT 1 and NAT 2 Acetylation Polymorphisms. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, **9**, 29-42.
- Hein, D.W., Doll, M.A., Fretland, A.J., Gray, K., Deitz, A.C., Feng, Y. ve ark. (1997). Rodent models of the human of the human acetylation polymorphism: comparisons of recombinant acetyltransferases. *Mutation Research*, **376**, 101-106.
- Hein, DW. (1988). Acetylator genotype and arylamine-induced carcinogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta*, **948**, 37-66.
- Hemminki, K., Koskinen, M., Rajaniemi, H. ve Zhao, C. (2000). DNA adducts, mutations and cancer. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, **32**, 264-275.
- Henderson, B.E., Ross, R.K., Judd, H.L., Kralio, M.D. ve Pike, M.C. (1985). Do regular ovulatory cycles increase breast cancer risk? *Cancer*, **56**, 1206-1208.
- Hong, C.C., Tang, B.K., Hammond, G.L., Tritchler, D., Yaffe, M. ve Boyd, N.F. (2004). Cytochrome P450 1A2 (CYP1A2) activity and risk factors for breast cancer: a cross-sectional study. *Breast Cancer Research*, **6**, 352-365.
- Hopper, J.L. ve Carlin, J.B. (1992). Familial aggregation of a disease consequent upon correlation between relatives in a risk factor measured on a continuous scale. *American Journal of Epidemiology*, **136**, 1138-1147.
- Hopper, J.L., Southey, M.C., Dite, G.S., Jolley, D.J., Giles, G.G., McCredie, M.R. ve ark. (1999). Population based estimate of the average age-specific cumulative risk of breast cancer for a defined set of protein-truncating mutations in BRCA1 and BRCA2. Australian Breast Cancer Family Study. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, **8**, 741-747.
- <http://saglik.gov.tr>, “T.C. Sağlık Bakanlığı, Ana ve Çocuk Sağlığı ve Aile Planlaması Genel Müdürlüğü, Meme Kanseri ve Erken Tanı, 1997.
- <http://saglik.gov.tr/istatistikler.html>, “T.C. Sağlık Bakanlığı, Sağlık İstatistikleri”, 1997.
- Hu, Y.F., Russo. I.H. ve Russo, J. (2000). Prevention of human breast cancer. *J Women’s Cancer*. In press

- Huang C S, Chern H D, Shen C Y. et al. (1999). Association between N-acetyltransferase 2 (NAT2) genetic polymorphism and development of breast cancer in post-menopausal Chinese women in Taiwan, an area of great increase in breast cancer incidence. *International Journal of Cancer*, **82**:175–9.
- Hunter, D.J. ve Willett, W.C. (1993). Diet, body size, and breast cancer. *Epidemiologic Reviews*, **15**, 110-132.
- IARC working group on the evaluation of cancer-preventive agents. 2002 ve Friendenreich CM. 2001- review of anthropometric factors and breast cancer risk. *Eur J Cancer Prev*. 10, 15-32
- Jeffrey, A.M., Jennette, K.W., Blobstein, S.H., Weinstein, I.B., Beland, F.A., Harvey, R.G. ve ark. (1976). Letter: benzo[a]pyrene-nucleic acid derivative found in vivo: structure of a benzo[i]pyrenetetrahydrodiol epoxide-guanosine adduct. *Journal of the American Chemical Society*, **98**, 5714-5715.
- Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Murray, T., Xu, J., Smigal, C. ve ark. (2006). Cancer Statistics, *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, **56**, 106-130.
- Jiao L, Doll M A, Hein D W, Bondy M L, Hassan M M, Hixson J E, Abbruzzese J L, Li D. (2007). Haplotype of N-Acetyltransferase 1 and 2 and Risk of Pancreatic Cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prevention*, **16** (11): 2379–2386.
- Kelsey, J.L., Gammon, M.D. ve John, E.M. (1993). Reproductive factors and breast cancer. *Epidemiologic Reviews*, **15**, 36-47.
- King, M.C., Marks, J.H. ve Mandell, J.B. (2003). Breast and ovarian cancer risks due to inherited mutations in BRCA1 and BRCA2. The New York Breast Cancer Study Group. *Science*, **302**, 643-646.
- Kuper, H., Ye, W., Weiderpass, E., Ekbom, A., Trichopoulos, D., Nyren, O. ve ark. (1990). Alcohol and breast cancer risk: the alcoholism paradox. *British Journal of Cancer*, **83**, 949-951.
- Liehr, J.G. ve Roy, D. (1990). Free radical generation by redox cycling of estrogens. *Free Radical Biology & Medicine*, **8**, 415-423.
- Lin H J, Han C, Lin B K, Hardyt S. (1993). Slow Acetylator Mutations in the Human Polymorphic N-acetyltransferase Gene in 786 Asians, Blacks, Hispanics and Whites: Application to Metabolic Epidemiology. *American Journal of Human Genetics*, **52**:827-834.

- Loktionov A ve ark. (2002). Differences in N-acetylation genotypes between Caucasians and Black South Africans; Implications for cancer prevention. *Cancer Detection and Prevention*, **26**; 15-22.
- McPherson, K., Steel, C.M. ve Dixon, J.M. (2000). ABC of Breast Diseases, breast cancer epidemiology, risk factors and genetics. *British Medical Journal*, **321**, 624-628.
- Meisel P. (2002) Arylamine N-acetyltransferases and drug response. *Pharmacogenomics*, **3**:349-366.
- Meyer, U.A. (1994). Polymorphism of Human Acetyltransferases. *Environmental Health Perspectives*, **102**, 213-216.
- Narod, S.A. (2002). Modifiers risk of hereditary breast and ovarian cancer. *Nature Reviews. Cancer*, **2**, 113-123.
- Narod, S.A., Ford, D., Devilee, P., Barkardottir, R.B., Lynch, H.T., Smith, S.A. ve ark. (1995). An evaluation of genetic heterogeneity in 145 breast-ovarian cancer. Breast Cancer Linkage Consortium. *American Journal of Human Genetics*, **56**, 254-264.
- Nebert, D.W., Dalton, T.P., Okey, A.B. ve Gonzales, F.J. (2004). Role of aryl hydrocarbon receptor- mediated induction of the CYP1 enzymes in environmental toxicity and cancer. *The Journal of Biological Chemistry*, **279**, 23847-23850.
- Ochs-Balcom, H.M., Wiesner, G. ve Elston, R.C. (2007). A meta-analysis of the association of the N-acetyltransferase 2 gene (NAT2) variants with breast cancer. *American Journal of Epidemiology*, **166**, 246-254.
- Oesterriech, S. ve Fuqua, S.A. (1999). Tumor suppressor genes in breast cancer. *Endocrine-related Cancer*; **6**, 405-419.
- Palmer, J.R. ve Rosenberg, L. (1993). Cigarette smoking and risk of breast cancer. *Epidemiologic Reviews*, **15**, 145-156.
- Pathak, D.R., Osuch, J.R. ve He, J. (2000). Breast carcinoma etiology: current knowledge and new insights into the effects of reproductive and hormonal risk factors in black and white populations. *Cancer*, **88**, 1230-1238.
- Pavicic WH, Laguens M, Richard SM. (2009). Analysis association between mitochondrial genome instability and xenobiotic metabolizing genes in human breast cancer. *Molecular Medicine*. **15**:160-5
- Peto, J., Collins, N., Barfoot, R., Seal, S., Waren, W., Rahman, N. ve ark. (1999). Prevalence of BRCA1 and BRCA2 gene mutations in patients with early-onset breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, **91**, 943-949.

- Pharoah, P.D. ve Mackay, J. (1998). Absolute risk of breast cancer in women at increased risk: a more useful clinical measure than relative risk? *Breast*, **7**, 255-259.
- Ramadoss, P., Marcus, C. ve Perdew, G.H. (2005). Role of the aryl hydrocarbon receptor in drug metabolism. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, **1**, 9-21.
- Rothman, N., Stewart, W. ve Schulte, P. (1995). Incorporating biomarkers into cancer epidemiology: a matrix of biomarker and study design categories. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, **4**, 301-311.
- Rouissi K, Ouerhani S, Marrakchi R, Ben Slama MR, Sfaxi M, Ayed M, Chebil M, El Gaaied AB. (2009). Combined effect of smoking and inherited polymorphisms in arylamine N-acetyltransferase 2, glutathione S-transferases M1 and T1 on bladder cancer in Tunisian population. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, **190**:101-7
- Rundle, A. (2006). Carcinogen-DNA adducts as a biomarker for cancer risk. *Mutation Research*, **600**, 23-36.
- Russo, J., Hu, Y.F., Yang, X. ve Russo, I.H. (2000). Developmental, cellular and molecular basis of human breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute. Monographs*, **27**, 17-37.
- Sabbagh A, Darlu P. (2005). Inferring haplotypes at the *NAT2* locus: the computational approach. *BMC Genetics*, **6**:30.
- Sabbagh A, Langaney A, Darlu P, Gerard N, Krishnamoorthy R, Poloni ES. (2008). Worldwide distribution of *NAT2* diversity: implications for *NAT2* evolutionary history. *BMC Genetics*, **27**:9:21
- Sachse C, Brockmöller J, Bauer S, Roots I. (1999). Functional significance of a C→A polymorphism in intron 1 of the cytochrome P450 CYP1A2 gene tested with caffeine. *British Journal of Clinical Pharmacology*. **4**:445-9
- Shimada, T., Yamazaki, H., Minura, M., Inui, Y. ve Guengerich, F.P. (1994). Interindividual variations in human liver cytochrome P450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **270**, 414-423.
- Sillanpaa P, Hirvonen A, Kataja V, et al. (2005). *NAT2* slow acetylator genotype as an important modifier of breast cancer risk. *International Journal of Cancer*,; **114**:579–84.

- Skarke C, Kirchhof A, Geisslinger G, Lötsch J. (2005). Rapid genotyping for relevant CYP1A2 alleles by pyrosequencing. *European Journal of Clinical Pharmacology*, **61**:887-92
- Smith, C.A., Smith, G. ve Wolf, C.R. (1994). Genetic polymorphisms in xenobiotic metabolism. *European Journal of Cancer*, **30**, 1921-1935.
- Sugimura, T. (2000). Nutrition and dietary carcinogens. *Carcinogenesis*, **21**, 387-395.
- The MARIE-GENICA Consortium on Genetic Susceptibility for Menopausal Hormon therapy Related Breast Cancer Risk, 2009.
- Tsuneoka, Y., Dalton, T.P., Miller, M.L., Clay, C.D., Shertzer, H.G., Talaska, G. ve ark. (2003). 4-aminobiphenyl-induced liver and urinary bladder DNA adduct formation in Cyp1a2 (-/-) and Cyp1a2 (+/+) mice. *Journal of the National Cancer Institute*, **95**, 1227-1237.
- Turesky, R.J. (2004). The role of genetic polymorphisms in metabolism of carcinogenic heterocyclic aromatic amines. *Current Drug Metabolism*, **5**, 169-180.
- Unger, M.A. ve Weber, B.L. (2000). Recent advances in breast cancer biology. *Current Opinion in Oncology*, **12**, 521-525.
- van den Brandt, P.A., Spiegelman, D, Yaun, S.S., Adami, H.O., Beeson, L., Folsom, A.R. ve ark. (2000). Pooled analysis of prospective cohort studies on height, weight and breast cancer risk. *American Journal of Epidemiology*, **152**, 514-527.
- Vatsis, K.P., Weber, W.W., Bell, D.A., Dupret, J.M., Evans, D.A., Grant, D.M. ve ark. (1995). Nomenclature for N-acetyltransferases. *Pharmacogenetics*, **5**, 1-17.
- Vineis, P. ve Perera, F. (2000). DNA adducts as markers of exposure to carcinogens and risk of cancer. *International Journal of Cancer*, **88**, 325-328.
- Weber, B.L. ve Nathanson, K.L. (2000). Low penetrance genes associated with increased risk for breast cancer. *European Journal of Cancer*, **36**, 1193-1199.
- Weber, W.W. ve Hein, D.W. (1985). N-acetylation pharmacogenetics. *Pharmacological Reviews*, **37**, 25-79.
- Weinstein, I.B., Jeffrey, A.M., Jennette, K.W., Blobstein, S.H., Harvey, R.G., Haris, C. ve ark. (1976). Benzo(a)pyrene diol epoxides as intermediates in nucleic acid binding in vitro and in vivo. *Science*, **193**, 592-595.
- Williams, J.A. ve Philips, D.H. (2000). Mammary expression of xenobiotic metabolizing enzymes and their potential role breast cancer. *Cancer Research*, **60**, 4667-4677.

Wormhoudt, L.W., Commandeur, J.N. ve Vermeulen, N.P. (1999). Genetic polymorphisms of human N-acetyltransferase, cytochrome P450, glutathione-S-transferase and epoxide hydrolase enzymes: relevance to xenobiotic metabolism and toxicity. *Critical Reviews in Toxicology*, **29**, 59-124.

Xie H G, Xu Z H, Ou-Yang D S, Shu Y, Yang D L, Wang J S, Yan X D, Huang S L, Wang W; Zhou H H. (1997). Meta-analysis of phenotype and genotype of NAT2 deficiency in Chinese populations. *Pharmacogenetics*, **7**:503-14

Yalin S, Hatungil R, Tamer L, et al. (2007). N-acetyltransferase 2 polymorphism in patients with diabetes mellitus. *Cell Biochemistry Function*, **25**:407

Zhang YW, Eom SY, Kim YD, Song YJ, Yun HY, Park JS, Youn SJ, Kim BS, Kim H, Hein DW. (2009). Effects of dietary factors and the NAT2 acetylator status on gastric cancer in Koreans. *International Journal of Cancer*, **125**:139-45

HAM VERİLER

Crosstab

			CYP1A2F			Total
			AA	AC	CC	
grup	kontrol	Count	33	40	17	90
		% within grup	36,7%	44,4%	18,9%	100,0%
		% within CYP1A2F	55,0%	52,6%	94,4%	58,4%
		% of Total	21,4%	26,0%	11,0%	58,4%
	meme ca	Count	27	36	1	64
		% within grup	42,2%	56,3%	1,6%	100,0%
		% within CYP1A2F	45,0%	47,4%	5,6%	41,6%
		% of Total	17,5%	23,4%	,6%	41,6%
Total	Count	60	76	18	154	
	% within grup	39,0%	49,4%	11,7%	100,0%	
	% within CYP1A2F	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	
	% of Total	39,0%	49,4%	11,7%	100,0%	

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	10,955(a)	2	,004
Likelihood Ratio	13,630	2	,001
Linear-by-Linear Association	4,489	1	,034
N of Valid Cases	154		
a 0 cells (,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 7,48.			

Symmetric Measures

		Value	Asymp. Std. Error(a)	Approx. T(b)	Approx. Sig.
Interval by Interval	Pearson's R	-,171	,072	-2,143	,034(c)
Ordinal by Ordinal	Spearman Correlation	-,146	,076	-1,816	,071(c)
N of Valid Cases		154			

a Not assuming the null hypothesis.

b Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis.

c Based on normal approximation.

Crosstab

			CYP1A2D			Total
			TT	Tdel	deldel	
grup	kontrol	Count	43	33	12	88
		% within grup	48,9%	37,5%	13,6%	100,0%
		% within CYP1A2D	65,2%	60,0%	42,9%	59,1%
		% of Total	28,9%	22,1%	8,1%	59,1%
	meme ca	Count	23	22	16	61
		% within grup	37,7%	36,1%	26,2%	100,0%
		% within CYP1A2D	34,8%	40,0%	57,1%	40,9%
		% of Total	15,4%	14,8%	10,7%	40,9%
Total	Count	66	55	28	149	
	% within grup	44,3%	36,9%	18,8%	100,0%	
	% within CYP1A2D	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	
	% of Total	44,3%	36,9%	18,8%	100,0%	

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	4,073(a)	2	,130
Likelihood Ratio	4,025	2	,134
Linear-by-Linear Association	3,568	1	,059
N of Valid Cases	149		
a 0 cells (,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 11,46.			

Symmetric Measures

		Value	Asymp. Std. Error(a)	Approx. T(b)	Approx. Sig.
Interval by Interval	Pearson's R	,155	,082	1,906	,059(c)
Ordinal by Ordinal	Spearman Correlation	,148	,082	1,814	,072(c)
N of Valid Cases		149			
a Not assuming the null hypothesis.					
b Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis.					
c Based on normal approximation.					

Crosstab

			NAT2aktivite			Total
			yavaş	orta	hızlı	
grup	kontrol	Count	55	29	8	92
		% within grup	59,8%	31,5%	8,7%	100,0%
		% within NAT2aktivite	61,1%	53,7%	61,5%	58,6%
		% of Total	35,0%	18,5%	5,1%	58,6%
	meme ca	Count	35	25	5	65
		% within grup	53,8%	38,5%	7,7%	100,0%
		% within NAT2aktivite	38,9%	46,3%	38,5%	41,4%

		% of Total	22,3%	15,9%	3,2%	41,4%
Total		Count	90	54	13	157
		% within grup	57,3%	34,4%	8,3%	100,0%
		% within NAT2aktivite	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%
		% of Total	57,3%	34,4%	8,3%	100,0%

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	,814(a)	2	,666
Likelihood Ratio	,810	2	,667
Linear-by-Linear Association	,222	1	,638
N of Valid Cases	157		
a 0 cells (,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 5,38.			

Symmetric Measures

		Value	Asymp. Std. Error(a)	Approx. T(b)	Approx. Sig.
Interval by Interval	Pearson's R	,038	,080	,470	,639(c)
Ordinal by Ordinal	Spearman Correlation	,049	,080	,608	,544(c)
N of Valid Cases		157			
a Not assuming the null hypothesis.					
b Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis.					
c Based on normal approximation.					

FORMLAR**MOLEKÜLER TIP ANABİLİM DALI****Protokol:****Tarih:****Hasta no:****Meme Kanseri Kontrol Grubu****Ad-Soyad:****Cinsiyet:****Tel:****Yaş:****Boy:****Kg:****Uyku:**

Tıbbi Özgeçmiş		
Bugüne Kadar Geçirdiğiniz	√ / X	Hastalığınızın Adı
Ağır Hastalıklar		
Ameliyatlar		
Herhangi bir kanser türü		
Diğer Meme Hastalıkları		

Aile Öyküsü :

Beslenme Tipi		
		Miktar
Kırmızı Et		Haftalık
Haşlama		Sıklık / gr
Kızartma		Sıklık / gr
Izgara		Sıklık / gr
Meyve		Günlük
		<100gr - az 100-200gr - orta >200gr - çok
Sebze		Günlük

Çiğ		<100gr - az 100-200gr - orta >200gr - çok
Pişmiş		<100gr - az 100-200gr - orta >200gr - çok
Süt ve süt ürünleri		Günlük
Tahıllar		Günlük
Hamur işi		<100gr - az 100-200gr - orta >200gr - çok
ekmek		<100gr - az 100-200gr - orta >200gr - çok
makarna		<100gr - az 100-200gr - orta >200gr - çok
İçecekler		
Kahvaltı		
Ev/hazır çorba		
Baklagiller		
Yağ		
Yemek		Sıklık / gr
salata		Sıklık / gr
kızartma		Sıklık / gr

Üreme Sistemine bağlı etkenler

İlk Doğum Yaşı	20den önce	20den sonra
Doğum Yapmamış		
Emzirme Süresi		
İlk Adet Yaşı		
Menopoz Yaşı		
Hormon Tedavisi		
Vücut-Kitle İndeksi		
Doğum Kontrol Hapı		

SOSYAL ALIŞKANLIKLAR

SİĞARA	Pasif	Aktif (paket/yıl)
ALKOL		

Eğitim				
Meslek				
Gelir Düzeyi (Aylık)	1000 YTL'den az	1-5(bin YTL)	6- 10 (bin YTL)	10 (bin YTL)den fazla

ETİK KURUL KARARI



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ
DEKANLIĞI



Sayı : 13837
Konu :

İstanbul / /

İstanbul Üniversitesi
Deneyel Tıp Araştırma Enstitüsü Müdürlüğüne

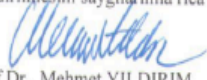
12 Mayıs 2009

İLGİ: 16.04.2009 tarihli, 323 sayılı yazınıza:

Enstitünüz Moleküler Tıp Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç.Dr.OĞUZ ÖZTÜRK'ün danışmanlığında Yüksek Lisans Öğrencisi M.FATİH SEYHAN'ın yürütücülüğünde "Detoksifikasyon Enzimlerden NAT2 ile CYP1A2 Gen Polimorfizmlerinin Meme Kanseri ile İlişkinin İncelenmesi" başlıklı Yüksek Lisans Tezi hakkında ilgi yazınız ve ekleri 05 Mayıs 2009 tarihinde toplanan Fakültemiz Etik Kurulunca müzakere edilmiş olup, Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) desteği alınması koşuluyla etik açıdan uygun olduğuna karar verilmiştir.

Bilgilerinizi durumun adı geçen anabilim dalı başkanlığına bildirilmesini saygılarımla rica ederim.

EKİ:
1 dosya


Prof.Dr. Mehmet YILDIRIM
Dekan Yardımcısı ve Etik
Kurul Başkanı

Not: Yanıtlarda yazınızın gün sayısının belirtilmesi rica olunur.Tel(0212)414,3000

PATENT HAKKI İZİNİ

TELİF HAKKI İZİNİ

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Mehmet Fatih	Soyadı	Seyhan
Doğ.Yeri	İstanbul	Doğ.Tar.	04.03.1986
Uyruğu	T.C.	TC Kim No	30581230350
Email	m.fatih.seyhan@gmail.com	Tel	

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora		
Yük.Lis.		
Lisans	Uludağ Üniversitesi	2007
Lise		

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.			-
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	Çok iyi	İyi	İyi	67.5	

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı			
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

Özel İlgi Alanları (Hobileri):