

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ
PATOLOJİ ANABİLİM DALI**

Tez danışmanı:

Prof.Dr.Canser Çakalır

**Türk Toplumunda Transizyonel Hücreli
Mesane Kansерlerinde CYP 1A1 ve GST M1
Gen Polimorfizmlerinin İncelenmesi**

UZMANLIK TEZİ

Dr. TÜLİN KILIÇASLAN ÖZTÜRK

İstanbul-2006

Bu çalışma İ.Ü. Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir. Proje No: T-464/250604

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimime ve tezime olan yardım ve katkılardan dolayı Anabilim Dalı Başkanı Prof.Dr.Sergülen Dervişoğlu'na,

Çalışmamın her aşamasında verdiği destek ve özverili yardımları nedeniyle tez danışmanım Prof.Dr.Canser Çakalır'a,

Çalışmama fikirleriyle katkıda bulunan İ.Ü.DETAE Moleküler Tıp Anabilim Dalı Başkanı Prof.Dr.Turgay İsbir'e ve aynı anabilimdalı öğretim üyesi Doç.Dr.Oğuz Öztürk'e,

Patoloji eğitimimi sağlayan tüm hocalarıma,

Beraber çalışmaktan büyük keyif aldığım, bana moral kaynağı olan tüm çalışma arkadaşlarıma,

Çalışmamın laboratuvar aşamalarındaki destekleyici ve özverili yardımlarından dolayı Kerem Nalcı, Karin Atuk ve Sevan Kaltakkıran'a

teşekkür ederim.

Dr.Tülin Kılıçaslan Öztürk

İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ ve AMAÇ	(6-9)
2. GENEL BİLGİLER	(10-23)
2.1. MESANE KANSERİNİN EPİDEMİYOLOJİSİ	
2.2. KİMYASALLARIN MESANE KANSERİNDEKİ YERİ	
2.3. Karsinogen Metabolizması	
2.3.1- CYP1A1 (Arl Hidrokarbon Hidroksilaz Enzimi veya Sitokrom P1–450) Enzimi Özellikleri ve Klinik Önemi	
2.3.2- Glutasyon S-Transferaz Enzimi Moleküler Özellikleri ve Klinik Önemi	
2.3.3- P53 Proteinin Moleküler Özellikleri ve Klinik Önemi	
3. MATERYAL METOD	(24-34)
3.1. SEÇİLEN ÖRNEKLERİN TANIMI	
3.2. KULLANILAN KİMYASAL MADDELER	
3.3. KULLANILAN GEREÇLER	
3.4. ÇÖZELTİLER	
3.4.1. DNA İzolasyonunda Kullanılan Çözeltiler:	
3.4.2. Agaroz Jel Elektroforezi'nde Kullanılan Çözeltiler	
3.4.3. Parafine Gömülmüş Mesane Kanseri Doku Örneklerinden DNA Elde Edilmesi	
3.5. KULLANILAN YÖNTEMLER	
3.5.1. Periferik kandan DNA İzolasyonu	
3.5.2. Parafin Bloktan DNA İzolasyonu	
3.5.3. DNA Saflık Tayini	
3.5.4. DNA Konsantrasyonunun Hesaplanması	
3.5.5. PCR Yöntemiyle DNA'da GST Gen Bölgesinin Çoğaltılması	
3.5.6. PCR Yöntemiyle DNA'da CYP1A1 Gen Bölgesinin Çoğaltılması	
3.5.7. PCR ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi ile Değerlendirilmesi	
3.5.8. Amplifikasyon Ürünlerinde CYP1A1 Gen ekzon 7- İle/Val Polimorfizminin NcoI Enzim Kesimi ile Tespiti	
3.6.1 İMMÜNHİSTOKİMYASAL ÇALIŞMA PROSEDÜRÜ	
3.7. SONUÇLARIN DEĞERLENDİRİLMESİ	

4. BULGULAR	(35-53)
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	(54-62)
6. ÖZET	(63-64)
7. SUMMARY	(65-66)
8. KAYNAKLAR	(67-77)
9. ÖZGEÇMİŞ	(78-80)

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Mesane kanserleri insanlarda en sık rastlanan kanserlerdendir. Mesane kanserlerinin çoğu epitelyal kökenli olup %90'ı değişici epitel hücreli karsinomdur. Bu nedenle mesane kanseri terimi değişici epitel hücreli karsinomalar için kullanılır. İnsan mesane karsinomlarının patogeneğinde sigara içimi, mesleki olarak maruz kalınan klasik aromatik aminler (benzidin, 4-aminodifenil, 1-naftilamin), saç boyalarında kullanılan p-fenilendiamin, içme sularında bulunan arsenik, kronik fenasetin kullanımı, siklofosfamid içeren kemoterapiler, kronik şistozomiazis, iyonize radyasyon, suni tatlandırıcılar suçlanmıştır(1, 2, 3).

Aromatik aminlerin insanlarda kanser oluşturma riski olduğu ilk kez 19. yüzyılda boya sanayisinde çalışmakta olan ve bol miktarda arilaminlere maruz kalan işçilerde mesane kanseri sıklığının arttığının gösterilmesiyle fark edilmiştir(1, 2, 3).

Kimyasalların hasar oluşturabilme durumu kişilerde değişkenlik göstermektedir. Aynı kimyasallara benzer sürelerde maruz kalan kişilerin bazılarında hasar daha fazla olabilmektedir. Bu durum genetik farklılıklardan, beslenme gibi kazanılmış farklılıklardan veya kimyasalların metabolizmalarındaki farklılıklardan oluşabilir. Sigara kullanımı veya çevresel kirlilikler benzopirenler, arilaminler ve benzeri kimyasal kanserojenlerin vücuda girmesine neden olmaktadır. Karsinogenezi başlatacak aromatik veya heterosiklik aminlerin elektrofilik ara ürünlere dönüşebilmeleri için metabolik aktivasyonları gerekmektedir. Bunlar vücutta bir seri oksidasyon ve konjugasyon reaksiyonları ile biyotransforme edilmekte böylece ya detoksifiye edilmekte ya da yeni daha aktif kanserojenlere dönüştürülmektedirler (4). Detoksifikasyon vücutta en çok karaciğerde gerçekleşmektedir. Başlıca iki aşamalıdır. Bunlardan ilki Faz I reaksiyonları olup vücuda giren kimyasallara

fonksiyonel gruplar (okidasyon, hidroksilasyon vs) ekleyerek onların aktivitelerinin bozulmasına veya aktif ürünlere dönüştürüp (elektrofilik) bir sonraki kademede (faz II reaksiyonları) daha çabuk atılabilir hale getirilmesini sağlar. Faz I reaksiyonlar başlıca sitokrom p450 ailesi (CYP1, CYP2, CYP3) ve alt grupları ile oluşturulur. Faz I ile elektrofilik hale getirilen ürünler faz II reaksiyonları ile konjuge (glukronidasyon, asetilasyon, glutasyon transferi, sülfasyon vs) edilerek suda veya safrada çözünür hale getirilip, başlıca idrar ve safra yoluyla atılırlar. Faz II reaksiyonlar başlıca UDP-glukroniltransferazlar, N-asetil transferazlar, Glutasyon S-transferazlar ile oluşturulur(4).

Polimorfizm toplumda sıklığı %1'den daha fazla olan mutasyonlardır. Bireyler farklı polimorfik genlerden dolayı aynı tip genetik yapıya sahip olmadıkları için bazı kişilerde aktiviteleri artan Faz I sitokrom P450 1A1 (CYP1A1) enzimleri veya aktiviteleri azalmış Faz II Glutasyon S-transferaz enzimleri ile kanser riski artışı çeşitli araştırmalarda gösterilmiştir(5).

CYP1A1 (Aril Hidrokarbon Hidroksilaz Enzimi veya Sitokrom P-450) 15. kromozomda yer almaktadır. CYP 1A1'in P-450 grupları içinde en fazla hidrokarbonlarla indüklenabilen enzim aktivitesine sahip olduğu gösterilmiştir(6). CYP1A1 enziminin 7. ekzonunda bir amino asit değişimine (izolösin→valin) bağlı olarak enzimin aktivitesi artmakta ve sonuç olarak faz I reaksiyonu hızlanmaktadır. Bu olayın sonucuna bağlı olarak polisiklik aromatik hidrokarbonların (PAH) metabolizmasında artış gözlenmektedir. Buna bağlı olarak elektrofilik ürünler artmaktadır. Eğer bunları konjuge edip detoksifikasyonu tamamlayacak olan faz II enzimlerinin genetik olarak eksiklikleri varsa, elektrofilik ürünler vücutta daha uzun süre kalacak ve kanser oluşturma riski artacaktır. Örneğin faz II enzimlerinden GST M1'in null genotipi (genin tam yokluğu) taşıyan bireylerde kanser riskinin artabileceği

bildirilmiştir(5). Yüksek enzim aktivitesine sahip homozigot mutant olan CYP 1A1 taşıyan bireyler popülasyonun yaklaşık %10'unda mevcuttur (7, 8). İlk kez Petersen (9) ve Kawajiri (10) 90'lı yılların başında bu polimorfizmle birlikte skuamöz hücreli akciğer kanseri riskinin arttığını göstermişlerdir. Perera sigara içen Japonlarda yaptığı çalışmada riskli genotipe sahip olanların p53 mutasyonunun istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığını göstermiştir(11). Bazı çalışmalarda ise bu polimorfizm ile kanser arasında ilişki kurulamamıştır. Bu polimorfizme beyaz ırkta daha az rastlanırken (5,12,13,14) Uzakdoğu'da, Güney Amerika'da, Amerikan zencilerinde, Hawaii'de yüksek olarak rastlandığı bildirilmiştir(5, 12, 15, 16, 17, 18, 19).

Glutasyon S-transferazlar (GST) ksenobiotiklerin, sitotoksik kemoterapötiklerin ve kanserojenlerin metabolizmasından sorumlu bir enzim ailesi içerisinde yer almaktadır. Bu enzim geniş bir yelpazede yer alan organik bileşiklerin glutasyon ile reaksiyona girmesi ve tiyoester oluşturması yanında detoksifikasyonun ilk kademelerinde yer alarak merkaptöürik asit oluşumundan sorumludur(20).

Harada'nın yaptığı çalışmada GST-M1'in "null" genotipi taşıyanlarda hepatit ve hepatomanın kontrol olgularında fazla olduğu gösterilmiştir (21). Bu bulgu Board'ın GST-M1 null genotipi taşıyanların bazı elektrofilik kanserojenlerden daha yüksek derecede etkilenebileceği görüşünü desteklemektedir(22).

Bu görüşün ışığı altında yapılan çalışmalarda GST M1 null genotipi taşıyanların bazı tip kanserojenlere karşı duyarlılığının arttığı gözlenmiştir. Birçok araştırmacı tarafından mesane kanserleri, akciğer kanserleri, kolorektal kanserler ve skuamöz hücreli kanserlere yatkınlık ile null genotipi arasında ilişki olabileceği ileri sürülmüştür (23,24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31,32, 33). Bazı kanserle ise bu ilişki kurulamamıştır(24,28, 29).

Beyazlarda, Çinlilerde ve Hintlilerde Glutasyon S-transferaz M1 (GSTM1) null genotipi sıklığının %40–50, siyah ırkta ise Glutasyon S-transferaz T1 (GSTT1) null genotipi sıklığının benzer oranda olduğu saptanmıştır(16, 18, 19, 34, 35, 36, 37).

P53 yapısal ve fonksiyon olarak Myc protoonkogen ailesine benzemektedir. Kromozom 17'nin kısa kolunda (17p13.1) bulunmaktadır (38, 39, 40, 41, 42, 43). P53, transkripsiyon düzenleyici aktivitesi olan DNA bağlayıcı bir proteindir. Normal hücrelerde çok az miktarda bulunur. P53 geninde rastlanan mutasyonlar insan kanserleri içinde en fazla (~%40) rastlanan mutasyonlardır(39). Yapılan literatür çalışmalarında p53 mutasyonlarının GST M1 null genotipi taşıyanlarda, patolojik evre, grade, prognoz ile ilişkili olarak arttığı gösterilmiştir. Mutant p53 bulunması durumunda anormal protein birikiminin doku kesitlerinde immünhistokimyasal olarak tespit edilebileceği bildirilmiştir(39).

Yukarda özetlenen bilgilerin ışığı altında çalışmamızda Türk toplumunda sağlıklı kontrol vakalarının kan örnekleri ve transizyonel hücreli mesane karsinomlu hastaların parafin bloklarından elde edilen doku DNA'larından CYP 1A1 ve GST M1 enzimleri gen polimorfizmlerinin incelenmesi planlanmıştır. Ayrıca gen polimorfizmleri ile parafin blok doku kesitlerinde p53 immünhistokimyasal boyanmalarının yoğunluk ve yaygınlık ilişkisinin araştırılması, klinik ve patolojik parametrelerle karşılaştırılması planlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. MESANE KANSERİNİN EPİDEMİYOLOJİSİ

Mesane kanseri tüm dünyada en sık rastlanan 7.kanser olup yıllık yaklaşık 260 bin yeni erkek, 76 bin yeni kadın vaka bildirilmektedir(2) . Tüm dünyadaki kanserlerin yaklaşık %3,2'sini mesane kanseri oluşturmaktadır(2). Prevalans olarak mesane kanseri gelişmiş ülkelerde gelişmekte olan ülkelere göre 6 kat daha fazladır. Her iki cinste de en fazla, Kuzey Amerika, Batı Avrupa ve Avustralya'da görülür. ABD'de yıllık yaklaşık 50-60 bin yeni vaka ve yılda yaklaşık 10 bin civarında ölüm bildirilmektedir. Hastalığın erken teşhis ve tedavisiyle prognozu düzelmiş ve 5 yıllık hayat beklentisi yaklaşık %60-80'lere ulaşmıştır(1, 2, 3).

Mesanenin primer karsinomlarının yaklaşık %90'ı transizyonel hücreli karsinom (DEHC= Değişici epitel hücreli karsinom; üretelyal karsinom), %5-6'sı skuamöz hücreli karsinom, %1'i adenokarsinomdur(3). Kalan yaklaşık %3-4'ü ise az görülen varyantlardır (kötü diferansiye karsinom, küçük hücreli karsinom vs.). Erkeklerde 4. en sık, kadınlarda ise 7. en sık kanserdir. Erkek kadın oranı yaklaşık 3:1 veya 4:1'dir. Çoğunlukla 6-8. dekadlarda rastlanır. Vakaların 2/3'ü 65 yaş sonrasıdır ve 35 yaştan önce nadiren görülür. Latin kökenli olmayan beyaz ırk, diğer ırklara göre anlamlı derecede yüksek riske sahiptir(1, 2, 3).

Oluşumu multifaktöryel olup, risk faktörleri olarak sigara içimi, mesleki olarak kimyasallara maruz kalma (anilin, benzidin, naftilamin), kronik non-steroidal analjezik kullanımı, siklofosfamid içeren kemoterapiler, kronik Şistozomiazis sistiti sayılabilir. Bunların yanında suni tatlandırıcılar, kahve içimi, sık kullanılan kalıcı saç boyaları, iyonize radyasyon, kronik arsenik ile de artmış risk olduğu düşünülmektedir. Bu ajanlara maruz kalmayla beraber hastalığın başlayabilmesi için yaklaşık 20-30 yıllık

bir latent dönem geçmesi gerekmektedir. Sigaranın bırakılmasından sonra yaklaşık 20 yıl boyunca riskin devam ettiği gösterilmiştir(1, 2, 3, 44, 45).

Klinik bulgu ve semptomlar:

Tümörün lokalizasyonuna, makroskopik tipine, büyüklüğüne ve invazyonun derinliğine bağlı olarak değişir. En sık rastlanan bulgu ağrısız makroskopik hematuridir. Vakaların yaklaşık %85'inde vardır. Bu vakaların bazılarında belirgin pıhtı da görülür ve buda ağrılı miksiyona neden olur. İri tümörlerin varlığında mesane kapasitesi azalır ve böylece idrar yapma sıklığında artış olur(1, 2, 3, 45). Mesane boynunu tutan veya geniş alanları kaplayan tümörlerde mesane irritasyon bulguları (sık idrara çıkma, sıkışma hissi, dizüri) olur. Üreter ağzı tutulursa hidronefroz gelişebilir. Nadiren ele gelen pelvik kitle ve alt ekstremitelerde ödem olarak kendini gösterir. Ultrason veya bilgisayarlı tomografilerde tümör varlığının gösterilmesi mümkün olabilse de kesin tanı sistoskopi ile konur. Sistoskopi esnasında kitlenin büyüklüğü, yeri, morfolojisi, çevre doku ile ilişkisi değerlendirilir ve biyopsi alınır(1, 2, 3). Bilgisayarlı tomografi ve manyetik rezonans görüntüleme ile komşu organlara invazyon veya ekstra vezikal yayılım araştırılır. Buna rağmen özellikle az diferansiye ve daha derine invazyonlu tümörlerde papiller büyüme paterni eşlik etmiyorsa görüntüleme yöntemleri ile tümörün gösterilmesi zordur(3).

Makroskopi :

Papiller, polipoid, nodüler, solid, ülseratif veya transmural diffüz büyüme paterni gösterirler. Soliter veya multifokal olabilirler. Çevre mukoza normal olabilir veya CIS'nun mikroskobik alanlarını temsilen eritematöz görünüm olabilir (1, 2, 3).

Mesane karsinomu sıklıkla ana tümör kitlesinden farklı alanlarda atipik epitel proliferasyonu, CIS ve erken invaziv karsinom odakları ile birlikte(1, 2, 3).

Tablo1’de mesane tümörlerinin WHO 2004 sınıflaması görülmektedir(2).

Tablo 1

MESANE TÜMÖRLERİNİN WHO 2004 KLASİFİKASYONU

ÜROTELİYAL TÜMÖRLER:

Infiltratif ürotelyal karsinom:

- Squamöz diferansiasyon gösteren varyant
- Glandüler diferansiasyon gösteren varyant
- Trofoblastik diferansiasyon gösteren varyant
- Nested diferansiasyon gösteren varyant
- Mikrokistik
- Mikropapiller
- Lenfoepitelyoma-like
- Lenfoma-like
- Plazmasitoid
- Sarkomatoid
- Dev hücreli
- Undiferansiye

Non-invaziv ürotelyal neoplaziler

- Ürotelyal CIS
- Non-invaziv papiller ürotelyal karsinom, yüksek grade
- Non-invaziv papiller ürotelyal karsinom, düşük grade
- Non-invaziv papiller ürotelyal neoplazi, düşük malign potansiyelli
- Ürotelyal papillom
- Inverted ürotelyal papillom

SKUAMÖZ NEOPLAZMLAR

- SCC
- Verrüköz karsinom
- Skuamöz hücreli papillom

GLANDÜLER NEOPLAZMLAR

- Adenokarsinom
 - Enterik
 - Musinöz
 - Taşlı yüzük hc'li
 - Berrak hücreli

- Villöz adenom

NÖROENDOKRİN TÜMÖRLER

- Küçük hücreli karsinom
- Karsinoid
- Paraganglioma

MELANOSİTİK TÜMÖRLER

- Malign melanom
- Nevüs

MEZENKİMAL TÜMÖRLER

- Rabdomyosarkom
- Leiomyosarkom
- Anjiosarkom
- Osteosarkom
- Malign fibröz histiyositom(MFH)
- Leiomyom
- Hemanjiom
- Diğer

HEMATOPOETİK VE LENFOİD TÜMÖRLER

- Lenfoma
- Plazmositom

DİĞER TÜMÖRLER

- Skene ,Cowper ve Littre glandlarının karsinomları
- Metastatik tümörler ve diğer organlardan uzanan tümörler

Transizyonel hücreli mesane karsinomları iki ayrı hastalık seyri gösterir. Hastaların çoğu (~%75'i) non-invaziv veya erken invazivdir (evre Ta, Tis, T1). Takip edilen non-invaziv veya erken invaziv vakaların sadece %10'unda muskularis propria'yı da tutan, evre T2 ve ötesi invazyon gelişir. Hastalığın ikinci seyir tipi ise invaziv kanserdir(~%25). Bu grupta ilk gelişte musküler tabaka invazyonuyla kendini gösteren vakaların yaklaşık %90'nında daha önceden bildirilmiş mesane kanseri hikayesi yoktur. Malign transizyonel hücreler çeşitli biyolojik yollarla musküler tabaka invazyonu yaparlar. Bunlar neovaskülarite, konnektif doku proteolizi, artmış tümör

hücre motilitesi, tümör hücre embolileri ve immün sistemin yıkımıdır. Musküler tabakanın da yıkımı ile kanser vasküler ve lenfatik kanallara ulaşır ve metastaz yapar (1, 2, 3, 45).

Patolojik Evreleme

Mesane kanserinin evrelemesi tümörün mesane duvarına invazyonun derinliğine göre yapılmaktadır. Mesane kanserinde invazyon derinliği önemli bir prognostik faktördür. Ayrıca tedavi şeklini de belirler. Bu nedenle biyopside invazyon derinliğini değerlendirirken çok dikkatli olmalıdır. Lamina propriada görülen düz kas demetleri (muskularis mukoza) invazyon derinliği değerlendirilirken muskularis proprianın düz kaslarıyla karıştırılmamalıdır. Kas invazyonunun varlığını rapor etmek için tümör muskularis propriaya invaze halde olmalıdır(1, 2, 3).

Lamina propria invazyonunun değerlendirilmesi de önemlidir. Bazen karar vermek zor olabilir. Çünkü tanjansiyel kesit, zedelenme ve koter artefaktı gibi teknik nedenler ve lamina propria invazyonunu ayırt ettiren belirgin kriterlerin olmaması değerlendirmeyi zorlaştırır(2,3). Lamina propria invazyonu patolojik olarak değerlendirilirken invazyon seviyesine göre T1a: invazyon musküleris mukozaya ulaşmamış, T1b: invazyon musküleris mukoza seviyesine kadar gelmiş, T1c: invazyon musküleris mukozayı aşmış şeklinde rapor edilir. Kas tabakası invazyonu ise T2a: musküleris mukozanın yüzeysel (üst yarısı) invazyonu, T2b: derin(tamamına yakın) invazyonu şeklinde rapor edilir(1).

Aşağıda mesane kanserinin “The American Joint Committee on Cancer” (AJCC) tarafından tarif edilmiş TNM sınıflaması görülmektedir (46).

TNM sınıflaması

Primer tümör (T)

- TX: Primer tümör değerlendirilememiştir.
- T0: Primer tümöre ait delil yoktur
- Ta: Non-invaziv papiller karsinom
- Tis: Karsinoma in situ
- T1: Tümör subepitelyal bağ dokusunu (lamina propria) invaze etmiş(T1a,1b,1c)
- T2: Tümör kas tabakasını invaze etmiş
 - pT2a: yüzeysel kas tabakasında (iç yarı)
 - pT2b: derin kas tabakasında (dış yarı)
- T3: Tümör perivezikal dokuları invaze etmiş
 - pT3a: Mikroskopik olarak
 - pT3b: Makroskopik olarak (ekstra vezikal kitle)
- T4: Tümör aşağıdakilerden herhangi birini invaze etmiş:
 - Prostat, uterus, vagina, pelvis duvarı veya abdominal duvar
 - T4a: Tümör prostat, uterus, vaginayı invaze etmiş
 - T4b: Tümör pelvis duvarını veya abdominal duvarı invaze etmiş

Tümör multifokal ise ilgili T kategorisinin sonuna “m” eki takılmalıdır. Örneğin T1m gibi. Yine “is” eki herhangi bir T kategorisine eklenerek eşlik eden in situ karsinom tarif edilir.

Bölgesel lenf nodları (N)

- NX: Bölgesel lenf nodları değerlendirilememiştir
- N0: Bölgesel lenf nodu metastazı yok
- N1: Tek bir noda metastaz var, en büyük çapı ≤ 2 cm
- N2: Tek bir noda metastaz var, en büyük çapı > 2 cm ve ≤ 5 cm; veya çok sayıda lenf nodu metastazı var, en büyük çapı ≤ 5 cm
- N3: En büyük çapı > 5 cm olan lenf nodu metastazı var

Uzak metastaz (M)

- MX: Uzak metastaz değerlendirilememiştir
- M0: Uzak metastaz yok
- M1: Uzak metastaz var

AJCC’ye göre Evre grupları

Evre 0a

- Ta, N0, M0

Evre 0is

- Tis, N0, M0

Evre I

- T1, N0, M0

Evre II

- T2a, N0, M0
- T2b, N0, M0

Evre III

- T3a, N0, M0
- T3b, N0, M0
- T4a, N0, M0

Evre IV

- T4b, N0, M0
- Herhangi T, N1, M0
- Herhangi T, N2, M0
- Herhangi T, N3, M0
- Herhangi T, Herhangi N, M1

Prognostik faktörler:

Transizyonel hücreli mesane kanserlerinde invazyon derinliği, multifokalite, daha önceki ürotelyal tümör hikayesi, tümör boyutu, grade, tümör konfigürasyonu, damar invazyonu başlıca prognostik faktörlerdir(1, 2, 3, 45). Ayrıca tümör hücrelerinin kan grubu antijenlerini (A,B,H) eksprese etmeleri, gen ve kromozom mutasyonları bulundurmaları prognozu etkiler

2.2. KİMYASALLARIN MESANE KANSERİNDEKİ YERİ

Tütün kullanımı:

Mesane kanserinin majör risk faktörüdür. Erkekteki mesane kanserlerinin %66'sından kadında %30'undan sorumlu olarak düşünülmektedir. Sigara içenlerde içmeyenlere oranla 2.6-4 kat kadar daha fazla risk olduğu gösterilmiştir. Sigara kullanma süresi

ve kullanılan miktar da riski belirlemektedir. Sigara içiminin kesilmesiyle beraber risk azalmakta ve yaklaşık 15-20 yıl sonra içmeyenlerle aynı olmaktadır. Yapılan araştırmalarda sigara içenlerde GST M1 null genotipi varlığının mesane kanseri göreceli riskini (Odd Ratio) %1.2-6 kat kadar arttırdığı bildirilmiştir(1, 2, 3, 44, 45).

Meslek:

Rehn tarafından ilk kez 1895 yılında anilin boyaları ile mesane kanserleri arasında ilişki kurulmuştur. Daha sonraki çalışmalarda diğer benzidin, 2-naftilamin, 1-naftilamin gibi mesleki kimyasalların da mesane kanserini arttırdığı gösterilmiştir. Mesleki kimyasalların mesane kanserlerinin yaklaşık %25'inden sorumlu olduğu düşünülmektedir(1, 2, 3, 44, 45).

Fenasetin:

Çok sayıda epidemiyolojik çalışmada kronik aşırı fenasetin içeren analjezik kullananlarda üretelyal kanserlerin (renal pelvis, üreter, mesane) geliştiği gösterilmiştir. Rölatif risk 2.4- 6 ve hatta üzeri bildirilmiştir(1, 2, 3, 44, 45).

Diğer ilaçlar:

Lösemi ve lenfomaların gelişimi ile ilişkisi gösterilen sitotoksik ilaçlardan olan siklofosfamidin metaboliti akrolein'in mesane kanserlerine de neden olduğu gösterilmiştir(1, 2, 3, 44, 45).

Arsenik:

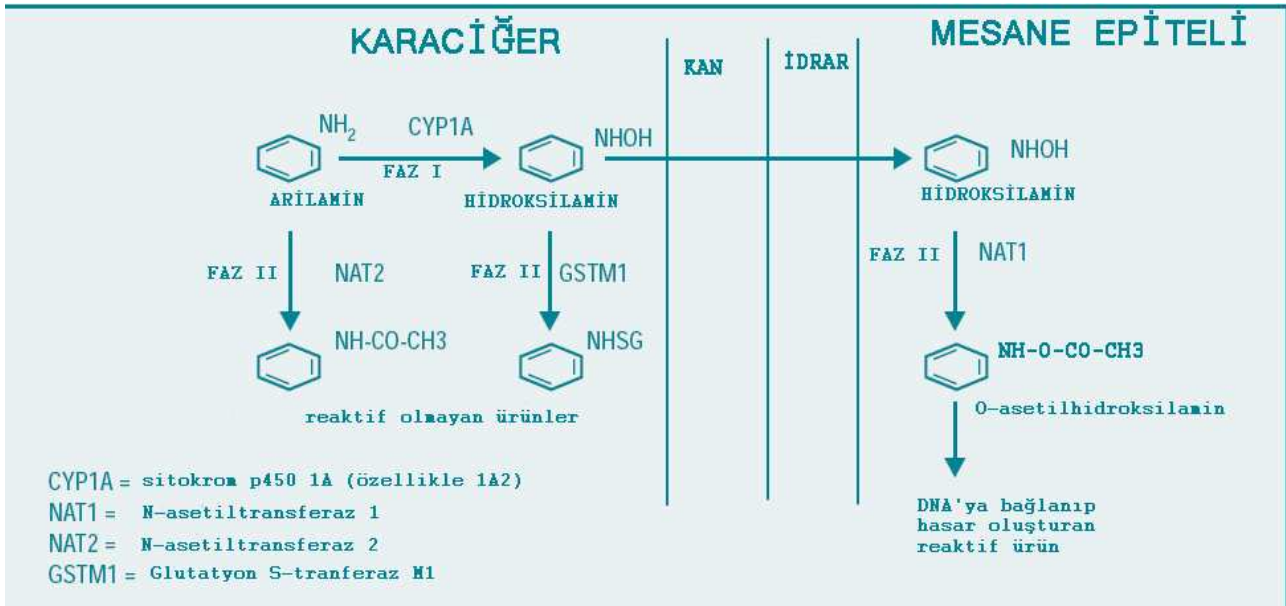
Bir çok çalışmada klorlu içme sularında bir yan ürün olarak veya direk kontaminasyon yoluyla arsenik bulunduğu ve bunun da mesane kanseri riskini arttırabileceği gösterilmiştir. IARC (International Agency for Research on Cancer -Uluslararası kanser araştırmaları ajansı) çalışma grubunun 2004 yılındaki monografında içme sularında bulunan arsenik, insan kanserojeni olarak gösterilmiş ve mesane kanserine neden olduğu bildirilmiştir(1, 2, 3, 44, 45).

Kahve:

Hayvan deneylerinde kahve veya kafein içeren maddelerin kansere neden olduğuna dair bulgu saptanamamış olmasına rağmen bazı epidemiyolojik çalışmalarda kahve içicilerinin içmeyenlere göre daha fazla mesane kanseri riski taşıdığı bildirilmiştir(1, 2, 3).

2.3. KARSİNOJEN METABOLİZMASI

Vücutta bir çok lipofilik karsinojen detoksifiye ve ekskrete edilmek amacıyla polar konjugasyon ile metabolize edilirler. Bu lipofilik maddelerin eliminasyonun en önemli adımı sitokrom p450 (EC1.14.14.1) bağımlı oksidasyondur. P450 ailesi 30'un üzerinde izoenzimden oluşur. Bu enzimler genellikle farklı substratlara karşı spesifite gösterirler(47). Ksenobiotiklerin metabolizması genellikle faz I ve faz II olmak üzere ikiye ayrılır. Faz I metabolizma genellikle sitokrom P450 sistemiyle yapılır. Faz I reaksiyonlar oksidasyon, redüksiyon ve hidroliz reaksiyonlarını içermektedir. Bunların içinde oksidasyon diğerlerine oranla daha önemli bir rol oynamaktadır. Genelde karsinojenlerin elektrofilik maddelere döngüsünde en az bir adım oksidasyon (Faz I) vardır. Bu sayede daha toksik, özellikle de genotoksik bir ara ürün oluşur (örneğin polisiklik aromatik hidrokarbon diol epoksidleri). Bunun yanında bazı faz II reaksiyonları da genotoksik elektrofillerin oluşumu için kritik rol oynayabilirler. Sülfasyon özellikle zayıf elektrofilik aril hidroksilaminlerin ve benzalkollerin aktivasyonunda bilinen bir aktivasyon adımıdır. Bunun yanında asetilasyon, açılasyon ve glukronidasyon ve de nadiren GSH konjugasyonu da aktivasyona sebep olabilir (Resim–1). Özetle yeterli veya doğru detoksifikasyonun yapılamadığı hücrelerde tamir edilemeyen DNA hasarları ortaya çıkabilir(20).



Resim-1: Faz I ve Faz II detoksifikasyon aşamaları (44). NAT2 veya GST etkisi azaldığında mesane epitelinde NAT1 hidroksil aminleri O-asetilasyon ile DNA hasarı oluşturabilecek reaktif ürünlere dönüştürür.

Faz II ise Faz I ürünlerin konjugasyonundan sorumludur. Glukuronik asit, sülfat ve GSH ile konjugasyon genellikle detoksifikasyon ile sonuçlanır ve polar (suda eriyebilir) hale gelen konjugat ekskrete edilir. Ksenobiotiklerin bazıları yalnız birinci Faz, bazıları yalnız ikinci faz reaksiyonlarla, çoğunluğu ise hem Faz I hem de Faz II reaksiyonlarla biyotransformasyona uğrarlar(20).

2.3.1- CYP1A1 (Aril Hidrokarbon Hidroksilaz Enzimi veya Sitokrom P1-450) Enzimi Özellikleri ve Klinik Önemi

İnsanda CYP 1A1 birçok epitelyal dokuda evrimsel olarak iyi korunmuş bir durumda bulunmaktadır. Sigarada bulunan poliaromatik hidrokarbon (PAH) ve aromatik aminler gibi çeşitli prokarsinojen maddelerin aktivasyonunda rol oynar. CYP1A1 (Aril Hidrokarbon Hidroksilaz Enzimi veya Sitokrom P1-450) 15. kromozomda yer almaktadır. P-450 formları içinde en fazla hidrokarbonlarla indüklenabilen enzim aktivitesine sahiptir (6,20). Brookes ve Lawley(48) 1964 yılında PAH'ların DNA'ya bağlanmaları ile kanser ilişkisini göstermişlerdir. Jaiswal 1985

yılında hızlı ve yavaş indükleyen polimorfik varyantlarının olduğunu ve çevre kirliliğine maruz kalan kişilerde olası riski belirleyebileceğini ileri sürmüştür. Petersen(9) ve Kawajiri(10) 90'lı yılların başında bu polimorfizmi tanımlamışlar sonrasında da çeşitli araştırmacılarla birlikte üriner sistem tümörleri, skuamöz hücreli akciğer kanseri, baş-boyun tümörleri, özefagus ve meme kanseri riskinin arttığını göstermişlerdir(9, 49, 50, 51). Perera, sigara içen Japon'larda yaptığı çalışmada riskli genotipe sahip olanlarda p53 mutasyonunun istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığını göstermiştir (11). Ayrıca kronik obstrüktif akciğer hastalığı ve PAH metabolizmasının ilişkili olduğu(52), aterosklerotik damar hasarında da PAH-DNA hasarının rolü olduğu gösterilmiştir(53). CYP1A1 enziminin 7. ekzonunda bir aminoasit değişimi (izolösin→ valin)(15), enzimin aktivitesinde artma ve dolayısıyla faz I reaksiyon hızlanması ve bunun sonucunda da polisiklik aromatik hidrokarbonların metabolizmasının artmasına neden olur. Bu grupta özellikle GST null genotipi taşıyanlarda ise kanser riskinin artmasına sebep olduğu bildirilmektedir (5). Birçok enzimin yanında epoksid hidrolaz ve aril hidrokarbon hidroksilaz (AHH) enziminin sigara içenlerde yüksek olduğu devamında da yaklaşık 60 gün yüksek seyrettiği gösterilmiştir. Bunun yanında aynı çalışmada GST aktivitesinin sigara içenlerde düşük olduğu sigaranın bırakılmasından sonra artmaya başladığı gösterilmiştir. Bu AHH enzimi ile ortaya çıkan oksidasyon ürünlerinin konjugasyonunda GST'nin tüketildiğini düşündürmektedir(54).

2.3.2- Glutasyon S-Transferaz Enzimi Moleküler Özellikleri ve Klinik Önemi

Glutasyon S-Transferazlar (GST; EC2.5.1.18), yine aynı adla anılan bir gen süper ailesinin ürünleridir. Faz II detoksifikasyonda rol oynamaktadır. Bu enzim glutasyon ile çeşitli ksenobiyotik ve reaktif metabolitlerinin konjugasyonunu katalizler. Aminoasit dizi benzerliği ve antikora çapraz cevap oluşturabilirliğine göre alfa, mu,

pi tipi GST olmak üzere üç sınıf alt ünitelerden meydana gelmektedir. Ayrıca yapısal olarak farklı olan, fakat hepsi glutatyon transferinde rol oynayan diğer GST'ler tarif edilmiştir (GST teta- mikrozomal GST)(55).

GST süper ailesi en az beş gen ve gen ailelerinden oluşmaktadır(55). Başlangıçta bir genetik belirleyici olarak düşünülmezken 1981'de Board (22) karaciğerin en aktif olan iki GST enziminin iki ayrı otozomal lokus ürünü olduğunu (GST1=GST μ ve GST2= GST α) ve polimorfizm gösterdiklerini bildirmiştir. Strange ve arkadaşları (56) 1984 yılında GST1'in karaciğer, böbrek, adrenal bez ve midede kolayca gösterilebilen polimorfizmi olduğunu ayrıca iskelet kası ve kalp kasında zayıf bir ekspresyonunun olduğunu, fakat fetal karaciğer, fibroblast, eritrositler, lenfosit ve trombositlerde bulunmadığını göstermişlerdir. GST2'de fetal karaciğer parankim hücresi hariç diğer 4 hücrede gösterilememiştir (56). Pearson ve arkadaşları 1993 yılında mu sınıfı geni 1. kromozomda p13'te haritalamışlardır(57). GST3 (GST pi) ise erişkin karaciğer hariç hemen tüm dokularda ve eritrositlerde gösterilmiştir. İzoenzimlerin dağılımı dokudan dokuya büyük farklılıklar göstermektedir(56).

Kimyasal kanserojenlerin elektrofilik metabolitlerinin DNA gibi makro moleküllere kovalent olarak bağlanmalarının önemi 1960'lı yıllarda anlaşıldıktan sonra makro moleküllere alternatif elektrofilik bölge sunarak DNA üzerinde genotoksik etkileri engelleyecek maddeler araştırılmaya başlanmıştır. Glutatyon (GSH) bu maddelerden biridir ve 1969 yılında Boyland ve Chasseaud (58) tarafından tanımlanmıştır. Bunun yanında GSH ile elektrofilik maddelerin bağlanmalarının GST ile adlandırılan bir enzim tarafından yapıldığını tarif etmişlerdir(58).

GST çok sayıda ksenobiotik, sitotoksik ajanların ve kanserojenlerin metabolizmasından sorumlu bir enzim ailesidir. Bu enzim geniş bir yelpazede yer alan organik bileşiklerle glutatyonun reaksiyona girmesi ve tiyoester oluşumunu,

bazen de detoksifikasyonun ilk adımında yer alarak merkaptörik asit oluşumunu katalizler(55). Ayrıca çeşitli derecelerde, hem halkası, bilirubin, polisiklik hidrokarbonlar ve deksametazon gibi hidrofobik bileşiklere bağlanabilmektedir. Hücrede lipid peroksidasyon ve serbest radikal oluşumu ile ortaya çıkan yan ürünlerin detoksifikasyonunda GST'lerin rol oynadıkları gösterilmiştir (59).

Warholm ve arkadaşları in vitro olarak stiren oksid metabolizma hızını kıyasladıklarında GST M (μ) sınıfı enzimlerin, diğer GST P (π) subtiplerinden 20 kat daha fazla reaksiyon hızına sahip olduğunu, GST A (α) sınıf enzimlerin ise çok az enzimatik aktiviteye sahip olduklarını gösterilmişlerdir(60).

GST M null alleli taşıyanlarda mesane kanseri riskinin arttığı çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir(31, 32, 33, 60)

2.3.3- p53 Proteinin Moleküler Özellikleri ve Klinik Önemi

P53 yapısal ve fonksiyonel olarak Myc protoonkogen ailesine benzemektedir. Kromozom 17'nin kısa kolunda (17p13.1) bulunmaktadır (38). Onbir ekzonun yer aldığı genden, 2.2-2.5 kb büyüklüğünde mRNA ve bundan da 393 aminoasitten oluşan 53 kDa'luk bir protein kodlanır. P53, transkripsiyon düzenleyici aktivitesi olan DNA bağlayıcı proteindir. Üç bölümden oluşmaktadır. Amino-terminal bölümü aktivasyon bölgesini, orta bölümü dizi-spesifik DNA bağlayıcı bölgesini ve multifonksiyonel karboksi terminal bölümü son parçayı oluşturmaktadır(38). Normal hücrelerde çok az miktarda bulunur. Bazı hücrel stres durumlarında miktarı artar. P53 bağımlı iki adet majör cevap vardır. Bunlardan birincisi hücre siklusunun G1/S safhasında p21^{cip1/kip1} proteinin aktivasyonu ile duraklatılmasıdır. İkincisi ise programlı hücre ölümü yani apoptozdur(39). P53 geninde rastlanan mutasyonlar insan kanserleri içinde en fazla (~%40) rastlanan mutasyonlardır. Çok çeşitli transforme

olan hücrelerde artmış miktarda p53 tümör antijeni gösterilmektedir. Ayrıca bu protein birçok aktif çoğalan non-transforme hücrede de artmış olarak gösterilirken, istirahatındaki hücrelerde hiç veya çok az miktarda bulunmaktadır. Dinlenme halindeki hücreler mitojenlerle uyarıldıktan sonra hücre içi mikroyenjeksiyonlarla verilen p53 spesifik antikörlerin siklusun S fazına girişini bloke ettiği gösterilmiştir. En sık rastlanan mutasyonlar kodon 72, 175, 248, 249, 273 ve 282'de bulunmaktadır (38). Kodon 273 mutasyonları tek başına %13 kanser vakasında bildirilmiştir. GC'den AT'ye dönüşüm %42,6 ile en sık rastlanan mutasyondur. GC'den TA' ya dönüş %16,8 ile ikinci en siktir. Sonra sırayla AT'den GC' ye (%10,7), delesyonlar (%8,9), GC'den CG'ye dönüş (%8), AT'den TA' ya dönüş (%5,6), AT'den CG'ye dönüş (%3,7), insersiyonlar (%2,6) ve CC:GG' den TT:AA'ya ikili transisyon (%0,7) olarak bildirilmiştir. Iggo ve arkadaşları tarafından (40) akciğer kanserinde p53 geninin en çok mutasyona uğrayan gen olduğu bildirilmiş ve G den T ye bir çok değişiklik ile aminoasit sırasının değiştiği gösterilmiştir. Chung ve arkadaşları (41) erken başlangıçlı (primer) glioblastomalarda p53 mutasyonları göstermişler ve bu mutasyonları olanların, olmayan glioblastomalılardan daha uzun yaşadığını saptamışlardır. Lee ve Bernstein (42) 1993'te normal p53 'ün hücrelerin gardiyanı olduğu ve devamlı genetik hasara uğrayan hücrelerin proliferasyonlarını engellediğini göstermişlerdir. Mutant p53 taşıyan hücrelerin ise radyasyona bağımlı hücre ölümlerinden kaçarak radyasyon-rezistan hücreler haline geldikleri gösterilmiştir. Caelles (43)1994'te p53'ün sadece apoptoz mediatörü genlerin bir aktivatöründen ziyade hücrelerin yaşamaları için gerekli genlerin baskılayıcısı veya apoptotik yıkımı ile DNA tamirinin enzimatik mekanizmasının bir komponenti olduğunu bildirmiştir. P53 mutasyonları bazı tümörlerde daha az sıklıkta saptanmıştır. Örneğin insan papilloma virüs (HPV)16 ve 18 ile ilişkili serviks kanserlerinde viral protein E6, p53'ün

hızlı yıkımına yol açarak doğal tip p53 miktarlarının azalmasına neden olmaktadır. Bu sayede fonksiyonel olarak azalmış normal p53 hücre çoğalmasını kontrol edememektedir(39).

Mesane kanserlerinde p53 mutasyonlarında GC'den AT'ye ve GC'den CG'ye dönüşler en sık olarak gösterilmiştir. GC'den TA' ya dönüşler özellikle sigara içenlerdeki akciğer kanserleriyle birlikte sık görülen mutasyondur. Bu mutasyon mesane kanserlerinde az olduğu için akciğer kanserlerinde birincil sorumlu olarak görülen sigaradaki benzopirenlerin mesane kanserleri için birincil etyolojik ajan olmadığını düşündürmüştür(39). Diğer yandan mesane kanserlerinde sık rastlanan GC'den CG dönüşümünün 4-aminobifenil ile oluştuğu bilinmektedir. Buradan bakıldığında mesane kanserlerinde sigara ve kimyasal boyalardaki etyolojik ortak noktanın arilaminlere maruz kalınması olduğu söylenebilir(39).

3. MATERYAL METOD

3.1. SEÇİLEN ÖRNEKLERİN TANIMI

Bu çalışmada sağlıklı kontrol ve de transizyonel hücreli mesane karsinomlu olgulardan oluşan iki örnek grubu kullanılmıştır. Birinci grupta bilinen kanser tanısı olmayan ve ailesinde kanser hikayesi rastlanmayan sağlıklı bireyler kontrol grubu olarak tanımlanmışlardır. İkinci grup ise “transizyonel hücreli mesane karsinomu” tanısı almış ve cerrahi tedavi uygulanan hastalardan oluşmaktadır.

Mesane kanserli bireylere ait örnekler İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Patoloji anabilim dalına 2000-2006 tarihleri arasında cerrahi materyelleri getirilen hastalardan temin edilmişlerdir. Buna göre, sistoskopilerinde kitle bulunan ve biyopsilerinde transizyonel hücreli mesane karsinomu tespit edilen hastalara ait parafin bloklar araştırmada kullanılmıştır. Kontrol grubuna herhangi bir organ kanserine ait hikaye ve klinik bulgusu olmayan ve ailesinde bilinen bir kanser hikayesi bulunmayan bireyler alınmıştır.

Kontrol grubunun Glutatyon S-transferaz ve CYP 1A1 gen polimorfizmleri için kan örnekleri steril EDTA’lı tüplere alınarak, DNA izolasyonu için, en geç bir gün içinde çalışılmak üzere oda ısısında saklanmıştır. İ.Ü. Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalında hastaların parafin blok örneklerinden ve sağlıklı kontrollerin kan örneklerinden DNA elde edilmiş ve gen polimorfizmleri çalışılmıştır.

3.2. KULLANILAN KİMYASAL MADDELER

Agaroz (MBI Fermentas) , Amonyum asetat (Sigma A-8920), Amonyum klorid (Sigma A-5666), Asetik asit (MECK K-04134156), Borik asit (Sigma B-6768), Hidroklorik asit (% 37 Merck K-13190114), Brom fenol blue (Sigma B-6896), dNTP

seti (MBI Fermentas), EDTA (dihidrat) (Merck K-90602121), Etanol (%99 Sigma), Etidium bromid (Sigma E-8751), Hidrojen peroksit (%35 Merk K-22035097), Mineral yağ (Sigma M-5904), Potasyum bikarbonat (Merck K-126223552), Sodium doedocyl (lauryl) sulfate (Sigma L-5750), Sodyum hidroksit (Merck C754962), Kalium dihidrojen fosfat (A 741071 Merck), Sodyum klorid (Carlo Erba 368257), Trizma base (Sigma T-1503), Taq polimerase (Promega), Metaphor agaroz (FMC 50182), Agaroz (Sigma A 9414) Xylene cyanol (Sigma X-4126), Ficoll 400 (Sigma F-9378), Sodium Klorür (Carlo Erba 368257), Trizma Baz (Sigma T 1503), DNA marker (50 bp DNA ladder, MBI Fermentas), Proteinaz K (Sigma), Sodyum karbonat (Sigma S 7795), Primerler (MBI Fementas), NcoI restriksiyon enzimi(MBI Fermentas), Di sodyum hidrojen fosfat (Carlo Erba 480137), Sodyum dihidrojen fosfat (sigma s-9638), n-Oktan (Carlo Erba 111-65-9), Xylene (Carlo Erba1330-20-7), tween20 (sigma p9416), DakoCytomation monoclonal anti-human p53 protein klon DO7 antikoru.

GST gen bölgesi için kullanılan primer dizileri (24, 61):

P1:5'CgCCATCTTgTgCTACATTgCCCg 3'

P2: 5' ATCTTCTCCTCTTCTgTCTC 3'

P3: 5' TTC TggATTgTAgCAgATCA 3'

CYP 1A1(ekzon 7, İle/Val)polimorfizmi için kullanılan primerler(62, 63);

P1: 5'gAAAggCTgggTCCACCCTCT3'

P2: 5'CCAggAAgAgAAAgACCTCCCAgCgggCCA3'

3.3. KULLANILAN GEREÇLER

Thermal Cycler cihazı (Applied Biosystem, Gold Plate 9700), Otoklav, Etüv, Hot plate, Kodak Dijital Görüntüleme sistemi, Elektroforez için güç kaynağı (E-C Apparatus Corporation), Hassas terazi (Mettler), Polaroid kamera (DS34 Direct

screen instant camera), Isıtıcıli 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. ÇÖZELTİLER

3.4.1. Periferik kandan DNA İzolasyonunda Kullanılan Çözeltiler:

1. Eritrosit Parçalama Tamponu (Lysis Buffer)

8.74 gram NH_4Cl , 1 gram KHCO_3 , 200 ml EDTA (0.5 molarlık EDTA kullanılır.)'nın tartımları yapılarak Erlen içine alındı. 900 mililitre ddH₂O eklendi ve 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 120⁰C'de 15 dakika otoklavlandı ve +4⁰C'de muhafaza edildi.

2. 0.5 Molar Disodium EthyleneDiamineTetraAcetate (EDTA) (pH 8.0)

186.1 gram EDTA tartılarak beher içine alındı ve 800 ml ddH₂O eklendi. Manyetik karıştırıcı yardımıyla çözündürüldü ve pH'sı NaOH ile 8.0'e ayarlanarak ddH₂O ile 1 litreye tamamlandı. 120⁰C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildi.

3. 4 Molar Sodium Chloride (NaCl)

233.6 gram NaCl tartılarak erlene alındı. Üzerine 800 mililitre ddH₂O ilave edildi ve manyetik karıştırıcı yardımıyla iyice çözündürüldü. Balon jojeye aktararak 1 litreye tamamlandı. 120⁰C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildi.

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

25 mililitre 4 molar NaCl ve 50 mililitre 0,5 molar 50 mililitre EDTA direk balon jojeye konularak 1 litreye tamamlandı. 120⁰C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildi. Oda ısısında saklandı.

5. 1 Molar Tris

121.1 gram Tris base tartılarak ve bir behere alındı. Üzerine 42 mikrolitre hidroklorik asit (HCL) ile yaklaşık 800 mililitre ddH₂O eklenerek manyetik karıştırıcı yardımıyla iyice çözündürüldü. Daha sonra balon jojeye aktarıldı ve 1 litreye tamamlandı. 120 ⁰C 'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildi.

6. 9,5 Molar Amonyum asetat

73.22 gram amonyum asetat tartılarak beher içine alındı. Üzerine 80 mililitre ddH₂O eklenerek manyetik karıştırıcıda çözündürüldü. Balon jojeye aktarıldı ve ddH₂O ile 100 mililitreye tamamlandı. 0.22 mikronluk filtreden geçirilerek sterilize edildi ve +4 ⁰C'de muhafaza edildi.

7. %10'luk Sodium dodecyl sulfat (SDS)

10 gr SDS tartıldı. SDS tozlarını kaldırmamaya dikkat ederek beher 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 edildi ve oda ısısında muhafaza edildi.

8. Proteinaz K (20 mg/ml)

20 miligram proteinaz K tartılarak steril bir gode içinde steril ddH₂O ile 1 mililitreye tamamlandı. -20 °C'de muhafaza edildi.

3.4.2. Agaroz Jel Elektroforezi'nde Kullanılan Çözeltiler

1. Etidyum Bromür(10 mg/ml)

10 mg etidyum bromür tartılarak steril ddH₂O ile 10 mililitreye tamamlandı.

2. Agaroz Jel Yükleme Tamponu (5x)

20 gram Ficoll 400, 1 gram SDS, 0.2 mililitre 0.5 molarlık EDTA, 1 mililitre 1 molarlık Tris (pH 8.0), 200 miligram Brom fenol blue, 200 miligram Xylen cyanol tartılarak steril ddH₂O ile 100 mililitreye tamamlandı. Oda ısısında muhafaza edildi.

3. 50x Tris-Asetik asit-EDTA (TAE)

242 g Tris base tartılarak bir behere alındı. Üzerine 57,1 mililitre Glacial acetic acid ve 100 ml 0,5 molarlık EDTA ve 800 mililitre ddH₂O ilave edilerek manyetik karıştırıcıda çözündürüldü. Balon jojeye aktararak 1 litreye tamamlandı. 120°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildi ve oda ısısında muhafaza edildi.

5x Tris-Borik asit-EDTA (TBE)

54 gram Tris base ve 27,5 gram Boric acid tartılarak beher içine aktarıldı. Üzerine 20 mililitre 0.5 molarlık EDTA (pH'sı 8.0) ve 800 ml ddH₂O ilave edilerek manyetik karıştırıcıda çözündürüldü. Çözelti balon jojeye aktararak 1 litreye tamamlandı ve 120 °C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildi. Oda ısısında bırakıldı.

3.4.3 Parfine gömülmüş mesane kanseri doku örneklerinden DNA elde edilmesi

Transisyonel hücreli mesane kanseri tanısı konulmuş parafine gömülmüş doku örneği, Xyslen, %100 lük Etanol, HPLC-Grade Aseton, Tris-HCl, EDTA, Proteinaz-K, Tween 20 kullanılarak DNA izolasyonu yapıldı. Digesyon Çözeltisi 50mM Tris-HCL (pH 8.5), 1mM EDTA, 500µg/mL Proteinaz-K, %0.1 Tween 20 karışımı içerrecek şekilde hazırlandı.

3.5. KULLANILAN YÖNTEMLER

3.5.1. Periferik kandan DNA İzolasyonu

10 ml periferik kan örneği steril EDTA'lı tüplere alındıktan sonra çalışma için falkon tüpüne aktarıldı. Üzerine 1:3 oranında (30ml) eritrosit parçalama çözeltisi eklenerek karıştırıldı ve +4°C'de 15 bekletildi. +4°C'den çıkarılan örneklerin 1500 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek süpernatant kısımları atıldı ve pelletleri tamamen süspanse edilerek üzerlerine tekrar 15-20 ml eritrosit parçalama çözeltisi eklendi. Örnekler +4°C'de 15 dakika bekletildikten sonra 1500 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatantları atılarak pelletleri süspanse edildi. Süspanse olan pellet üzerine 500 µl %10'luk SDS 50µl proteinaz K (20 mg/ml) ve 9.4 ml lökosit parçalama çözeltisi eklenerek 56 °C su banyosunda 1 gece inkübe edildi. İnkübasyon sonrası her 1 ml örnek başına 0.37 ml 9.5 M 'lık amonyum asetat çözeltisi eklendikten sonra yavaşça karıştırıldı ve 3000 rpm'de 25 dakika santrifüj edilerek proteinler çöktürüldü. Santrifüj sonrası süpernatant kısmı temiz bir falkona aktarılarak üzerine 1:2 oranında %99'luk absolü alkol eklendi ve böylece DNA'nın presipitasyonu sağlandı. Yoğunlaşan DNA'nın alkol yüzeyine çıkması beklendi ve DNA steril bir mikropipet ucuyla alındı. DNA %70'lik alkolde yıkanarak ve korunmak üzere Tris-EDTA çözeltisi içinde çözündürüldü. DNA örnekleri +4°C'de muhafaza edildi(64).

3.5.2. Parafin bloktan DNA İzolasyonu:

Parafin bloktan 5-10 µ'luk kesit alındı. 1 ml octane eklendi, 30 dk. oda ısısında karıştırıldı. Mikrosantrifüjde tam hızda 3-5 dk. çöktürüldü. Octane uzaklaştırıldı (pastör pipetle). Bu kademeler tekrarlandı. 0,5 ml %100 etanol eklendi, karıştırıldı. Mikrosantrifüjde yukarıdaki gibi çöktürüldü. Pastör pipeti ile dikkatlice etanol uzaklaştırıldı. Son üç aşama tekrar edildi. Pipetle etanol uzaklaştırıldı. Isıtma bloğuna yerleştirildi. 2–3 damla aseton eklendi. 37- 50 °C derecede aseton uçuruldu. Pellet üzerine 200 µg/ml Protein kinaz K içeren 100µl digesyon tamponu eklendi (çok doku içeren örnekler 200 µl digesyon buffer ile yapıldı) 3 saat 55 °C derecede inkübe edildi (veya 37 °C derecede gece boyu). Kapakta kalan sıvıyı çöktürmek için hızla çevirildi. 95 °C derecede 8-10 dk inaktive edildi. 30 sn hızlı santrifüj edilerek, artık parafin, doku vs. çöktürüldü. Supernatantı alınıp PCR için (1–10µ) -20 °C'de saklandı(65).

3.5.3 DNA Saflık Tayini

DNA örnekleri Tris-EDTA çözeltisi ile 1/100 oranında sulandırıldı. 260 nm'de DNA'nın ve 280 nm'de RNA ve proteinin vermiş olduğu absorbans Tris EDTA çözeltisi ile spektrofotometre sıfırlanarak ölçüldü.

260 nm'de okunan absorbans / 280 nm'de okunan absorbans oranından DNA saflığı saptandı.

3.5.4. DNA Konsantrasyonunun Hesaplanması

Çift iplikli DNA'nın 260 nm'de vermiş olduğu 1 absorbans = 50 µg/ml=50ng/µl 'dir. Bu temel bilgiden bilgiden faydalanarak DNA formülü aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

DNA Konsantrasyonu (ng/µl): Sulandırma katsayısı (100) x A₂₆₀ x 50

3.5.5. PCR Yöntemiyle DNA'da GST Gen Bölgesinin Çoğaltılması

İki gruba ait DNA örneklerinden GST gen bölgesinin çoğaltılması için 50 µl hacminde PCR karışımı hazırlandı. 37.5 µl ddH₂O, 2.5 ünite Taq polimeraz enzimi , 5µl Taq Polimeraz enziminin çalışması için gereksinim duyduğu 10 x Reaksiyon çözeltisi (MgCl₂'süz) , 3µl MgCl₂ eklendi, GST gen bölgesine özgü primerler sırasıyla 300, 150, 150 ng eklendi, herbiri 200 mM olacak şekilde deoksinükleotid trifosfat karışımı (dNTP) kullanarak PCR reaksiyon ortamı hazırlandı ve DNA örnekleri yaklaşık 500 ng olacak şekilde PCR karışımlarına eklendi. Örneklerin PCR'ları Applied Biosystem, Gold Plate 9700 thermal cycler aleti ile aşağıda belirtilen koşullarda gerçekleştirildi(24,66).

PCR gen bölgesi için kullanılan amplifikasyon koşulu:

Başlangıçta 94⁰C' de 2 dk ilk denatürasyon sonra 35 siklus 94⁰C'de 1dakika denatürasyon, 60⁰C'de 1 dakika bağlanma, 72⁰C'de 1 dakika uzama uygulandı.

Son üç kademe 35 döngü yapıldı. 72⁰C'de 5 dakika son uzama için bekletildi

3.5.5. PCR Yöntemiyle DNA'da CYP1A1 Gen Bölgesinin Çoğaltılması

İki gruba ait DNA örneklerinden CYP1A1 gen bölgesinin çoğaltılması için 50 µl hacminde PCR karışımı hazırlandı. 36.5 µl ddH₂O , 2.5 ünite Taq polimeraz enzimi , 5µl Taq Polimeraz enziminin çalışması için gereksinim duyduğu 10 x Reaksiyon çözeltisi , CYP 1A1 gen bölgesine özgü primer çifti 20'şer pmol eklendi, herbiri 200 mM olacak şekilde deoksinükleotid trifosfat karışımı (dNTP) kullanarak PCR reaksiyon ortamı hazırlandı ve DNA örnekleri yaklaşık 500 ng olacak şekilde PCR karışımlarına eklendi. Örneklerin PCR'ları Applied Biosystem, Gold Plate 9700 thermal cycler aleti ile aşağıda belirtilen koşullarda gerçekleştirildi (63,66).

PCR gen bölgesi için kullanılan amplifikasyon koşulu:

Başlangıçta 94°C' de 2 dk ilk denatürasyon sonra 35 siklüs 94°C'de 1dakika denatürasyon, 60°C'de 1 dakika bağlanma, 72°C'de 1 dakika uzama uygulandı. Son üç kademe 35 döngü yapıldı. 72°C'de 5 dakika son uzama için bekletildi

3.5.6. PCR ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi ile değerlendirilmesi

PCR sonrası oluşan amplifikasyon ürünlerinin incelenmesi için %2'lük agaroz jel hazırlandı. Örnekler agaroz jel elektroforezinde hazırlanmış olan jele tatbik edilerek 100 volt'luk elektrik akımında yürütüldü.

%2'lük Agaroz Jelin Hazırlanması:

4 g agaroz tartılarak behere alındı. Üzerine 200 ml 1xTBE çözeltisi eklenerek mikrodalga fırında kaynatıldı. Daha sonra üzerine 3 µl 10 mg/ml'lik etidyum bromür eklenerek karıştırıldı. Yaklaşık 70°C'ye soğutularak küvete döküldü. Tarak yerleştirildi ve jel soğumaya bırakıldı. Jel donduktan sonra tank 1xTBE çözeltisi ile dolduruldu. Alınan 15 µl PCR ürünleri son konsantrasyonu 1x olacak şekilde eklenen 5x'lık yükleme tamponu ile karıştırılarak jeldeki kuyucuklara yüklendi. Kuyucuklardan birine 50bp DNA markerı yüklendi. Yükleme işlemi bittikten sonra elektrotlar yerleştirilerek örnekler 100-120 V'ta yürütüldü. Elektroforez tamamlandıktan sonra jel UV altında incelendi ve Kodak digital jel görüntüleme sistemi veya Polaroid kamera ile jelin fotoğrafı çekildi.

3.5.7. Amplifikasyon Ürünlerinde CYP1A1 Gen ekzon 7- İle/Val Polimorfizminin NcoI Enzim Kesimi ileTespiti

Amplifiye olan PCR ürünleri %2'lik agarozda gösterildikten sonra NcoI Restriksiyon Endonükleaz enzimi ile kesildi(32). Kesim işlemi şu prosedüre göre uygulandı: 15 µl PCR amplifikasyon ürünü alınıp, 2.5 µl didistile su , 2 µl Y-Tango tamponu ve 0.5 µl NcoI Restriksiyon Endonükleaz enzimi eklendi

Kesim işlemi için karışım hazırlandıktan sonra örnekler 37 °C su banyosunda 1 saat inkübe edildi. Kesim ürünleri% 2'lük Metaphor agaroz'da 1xTBE çözeltisi içinde, 120 volt'luk elektrik akımında yürütüldü. Elektroforez tamamlandıktan sonra jel UV altında incelendi ve Kodak digital kamera ile fotoğrafı çekildi.

3.6.1 İmmünohistokimyasal Çalışma Prosedürü

Çalışmada DakoCytomation monoclonal anti-human p53 protein klon DO7 antikoru kullanıldı. % 10'luk formaldehit ile fikse edilmiş, parafin bloklara gömülü dokulardan 3 mikronluk kesitler poli-L-lizinele kaplanmış özel lamlara alındı. Lamlar bir gece boyunca 56 C'ye ayarlanmış etüvde bekletildi. Ertesi gün şalelere alınan lamlar sırasıyla 3 kez 5'er dakika ksilen, 3 kez 5'er dakika %100 alkol, 3 kez 5'er dakika %90'lık alkolde bekletilerek deparafinize edildi ve distile suya alınarak rehidratasyon sağlandı. Sonra antijen retrieval aşamasına geçildi. Lamlar, sitrat tampon solüsyonuna (180 ml distile su+ 20 ml sitrat buffer) alınıp mikrodalgada 700 W'da 3 kez 5'er dakika işleme tabi tutuldu. İşlem sonunda lamlar mikrodalgadan çıkarılıp 20 dakika oda sıcaklığında bırakıldı. Tekrar şalelere alınan lamlar, distile suda yıkandıktan sonra kenarları kurulanıp dokuların etrafı PAP-PEN kalemle çizilip sonra inkübasyon mapesine dizildi. Her dokunun üzerine hidrojen peroksit damlatılıp 10 dakika beklenerek endojen peroksidaz blokajı sağlandı. Bu süre sonunda lamlar distile suda yıkanıp 5 dakika tamponlu fosfat tampon (PBS) solüsyonunda bekletildi. Sonra silkelenerek tekrar inkübasyon mapesine dizilen lamlara 10 dakika Ultra V Blok

uygulandı, kullanıma hazır P53 primer antikoru(Clone DO-7,Dako) damlatıldı. İki saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasındaki 5 dakika PBS'te bekletildi. Sonra dokulara hazır "Primer antibody enhancer" Solüsyonu (İmmünovision-Sitogen) damlatılıp 30 dakika beklendi. Bu süre sonunda, dokular yine PBS'de yıkanıp Poly-HRP anti-Mouse/Rabbit Ig G (İmmünovision-Sitogen) damlatıldı; tekrar 30 dakika bekletildi. Sürenin bitiminde dokular PBS'de yıkanıp ardından 2,5 ml AEC substrat buffer içine bir damla AEC kromojen damlatılarak hazırlanan solüsyon, dokulara damlatıldı. Dokuların kırmızı renk aldığı görülünce lamalar çeşme suyunda yıkandı. Ardından Mayer hematoksilende 5 dakika tutulup karşıt boyama yapıldıktan sonra lamalar gliserin jel ile kapatılıp ışık mikroskobunda bakılmaya hazır hale getirildi.

İmmünohistokimyasal Çalışmanın Değerlendirilmesi:

Primer antikolar için pozitif kontrol olarak kolon adenokarsinom dokusu, negatif kontrol olarak otopside elde edilen normal mesane dokusu kullanıldı. Antikor için kabul edilen boyanma,çekirdek boyanması(nükleer boyanma) şeklindedir. Yüz tümör hücresinde p53 antikoru ile pozitif çekirdek boyanması gösteren hücre adedi sayıldı ve bu boyanmaların 3+ üzerinden yoğunlukları değerlendirildi.

3.7. SONUÇLARIN DEĞERLENDİRİLMESİ

Elde edilen sonuçlar windows için hazırlanmış SPSS 7.5 paket programı kullanılarak değerlendirilmiştir. Değerlendirmede Pearson k2 testi, Fisher's exact test, risk belirlenmesi için (Odd Ratio , %95 güvenlik aralığı), Student T testi kullanılmıştır.

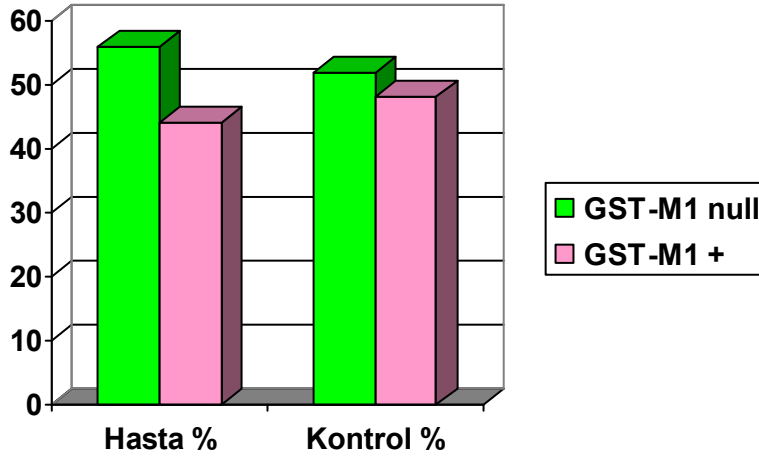
4. BULGULAR

Kontrol grubu olarak çalışmaya 101 adet sağlıklı kişi dahil edilmiştir. Kontrollerin 33 tanesi kadın (% 32,6), 68 tanesi (%67,4) erkek olup, yaş ortalaması $56,46 \pm 12,86$, yaş aralığı 32-96 dır. Kontrol grubunun sigara içimi $22,34 \pm 5,13$ paket/yıl olarak saptanmıştır. Yapılan genetik polimorfizmlerden GST-M1 51(%52) kontrolde null, 47(%48) kontrolde pozitif olup 3 vakada PCR sonuçları çıkmamıştır. CYP 1A1 polimorfizmi ise 57(56,4) kontrolde homozigot doğal (wild), 42 (%41,6) kontrolde heterozigot mutant, 2 (%2,0) kontrolde homozigot mutant saptanmıştır (Tablo-2).

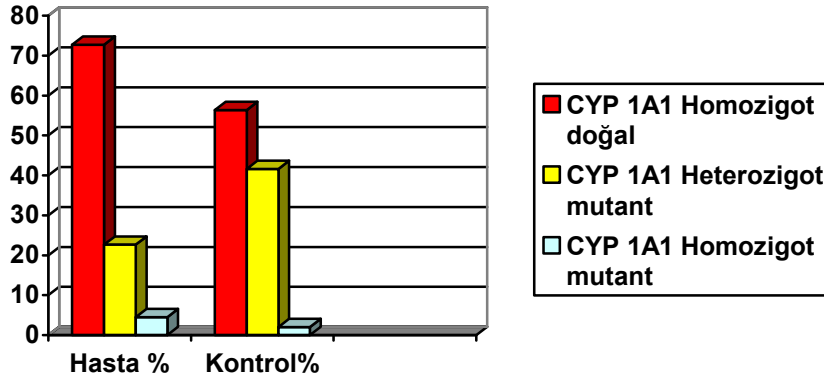
Çalışma grubuna 2000–2006 yılları arasında Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'na cerrahi materyalleri gönderilmiş ve transizyonel hücreli mesane karsinomu tanısı almış 100 adet hasta dahil edilmiştir. Hastaların 19 (%19) tanesi kadın, 81 (%81) tanesi erkek olup erkek: kadın oranı yaklaşık 4:1 olarak saptanmıştır. Hasta grubunun yaş ortalaması $63,96 \pm 14,42$, yaş aralığı 20-91dir. Hastaların sigara tüketimi ortalama $34,77 \pm 2,46$ paket/yıl olup 21 vaka hiç sigara içmemiş ve 11 vakanın da sigara öyküsü alınamamıştır. Hasta grubunda GST-M1 gen polimorfizmi bakıldığında 43(%55,8) vakada null genotipi, 34 (%44,2) vakada M1 pozitif genotipi bulunmuştur. CYP1A1 gen polimorfizmi ise 48(%72,7) vakada homozigot doğal (wild), 15 (%22,7) vakada heterozigot mutant, 3 (%4,5) vakada homozigot mutant bulunmuştur. Tümör doku örneklerinin formol tespiti ve parafin bloklaması aşamalarında DNA denatürasyonları oluşabildiği için vakaların 23'ünde GST-M1, 34'ünde CYP1A1 3 kez çalışılmasına rağmen PCR ürünü elde edilememiştir (Tablo-2). Şekil 1 ve 2'de genotip dağılımları hasta ve kontrol grubuna göre verilmiştir. Genotiplerin agaroz jel fotoğrafları resim 1 ve 2'de yer almaktadır

Tablo-2 Kontrol ve hasta gruplarının gen polimorfizm genotip dağılımları.

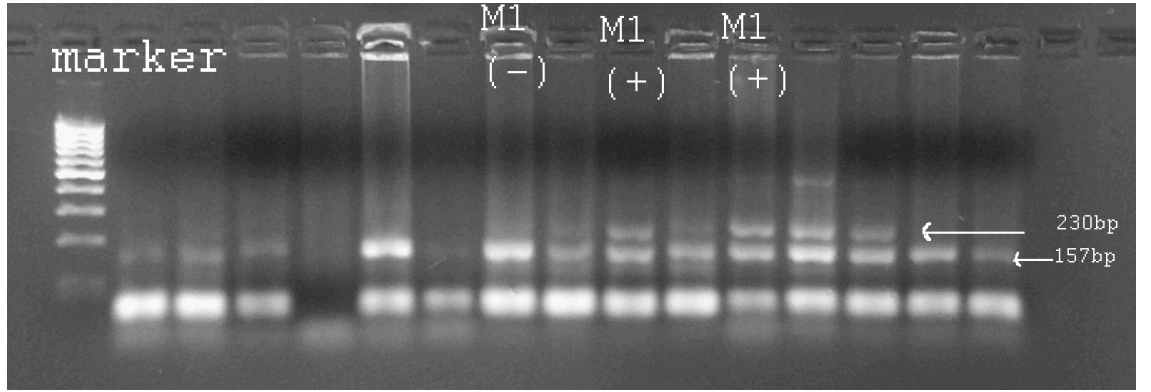
	GST M1		CYP 1A1		
	M1 null	M1+	Homozigot doğal	Heterozigot mutant	Homozigot mutant
Hasta	43 (%55,8)	34 (%44,2)	48 (%72,7)	15 (%22,7)	3 (%4,5)
Kontrol	51(%52)	47 (%48)	57 (%56,4)	42 (%41,6)	2 (%2)



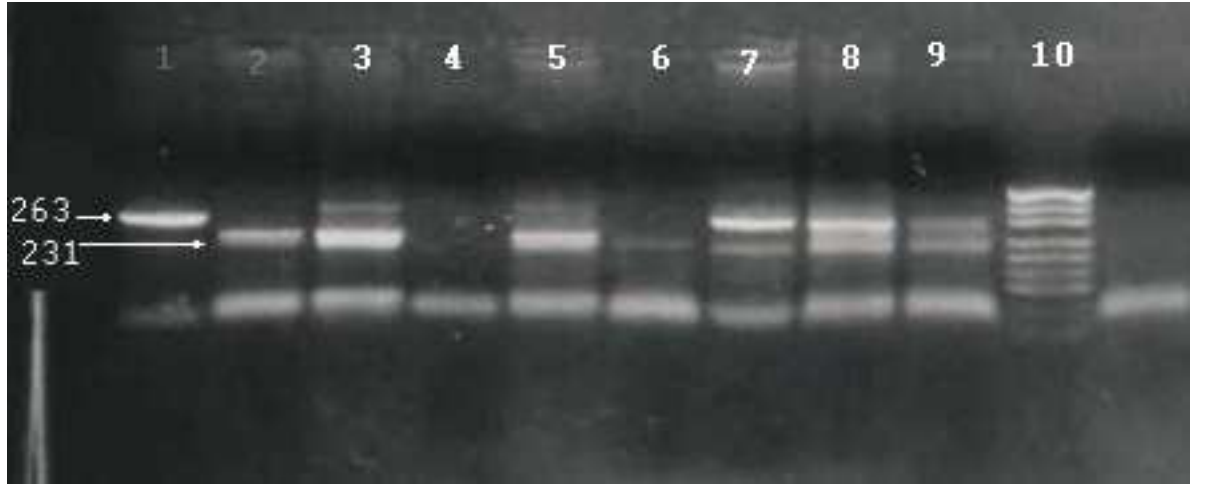
Şekil-1 Kontrol ve hasta gruplarının GST-M1 gen polimorfizmlerinin dağılımı



Şekil-2 Kontrol ve hasta gruplarının CYP1A1 gen polimorfizmlerinin dağılımı



Resim 3. GST M1 gen polimorfizminin %2'lik agaroz jel elektroforezindeki görüntüsü. GST-M1 (+) vakalarda 230 bp ve 157 bp olmak üzere çift, GST-M1 null vakalarda ise 157 bp'lik tek bant görülmektedir.



Resim 3. CYP 1A1 gen polimorfizmine ait %4'lük agaroz jel elektroforezinde yapılan çalışma örneği görülmektedir. Bir nolu kolonda NCol restriksiyon enzimi ile kesilmemiş tek 263 bp'lik band (Homozigot mutant genotip) görülmektedir. Kolon2, 3, 4 ve 6'da NCol restriksiyon enzimi ile tam kesilmiş tek 231 bp'lik band (homozigot doğal genotip) görülmektedir. Kolon 7, 8 ve 9'da hem kesilmiş 231 bp'lik band hem de kesilmemiş 263 bp'lik band birlikte (heterozigot mutant) görülmektedir.

Hasta örneklerinin 82 (%82) tanesi TUR, 18 (%18) tanesi rezeksiyon materyali olup Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı'ndan gelmiştir. Hastaların grade açısından 36'sı (%36) düşük grade, 64'ü (%64) yüksek grade olarak değerlendirilmiştir. Vakaların birinde glandüler, 12'sinde skuamöz olmak üzere toplam 13'ünde diferansiasyon saptanmıştır. Tümörlerin mikroskopik olarak 24'ü (%24) invaziv, 64'ü (%64) papiller, 12'si (%12) mikst (invaziv+diğer paternler) büyüme paternindedir. Vakaların 53'ünde (%53) lamina propria, 31'inde (%31) kas tabakası invazyonu görülmüş olup 16 (%16) vakada vasküler, 12 (%12) vakada perinöral invazyon saptanmıştır. Toplam 7 (%7) vakada perivezikal yağlı doku tutulumu mevcuttur. Vakaların 19'unda (%19) multifokalite, 14'ünde (%14) mesane dışı yayılım ve yine 14'ünde (%14) çevre mesanede in situ karsinom olduğu görülmüştür. Rezeksiyon uygulanan 18 (%18) vakanın 6'sında pelvik lenf nodu tutulumu saptanmıştır. Hastaların alınan klinik hikayesinde, 7 (%7) tanesinin özgeçmişinde, yine 7(%7) tanesinin birinci derece akrabalarında kanser hikayesi olduğu öğrenilmiştir. Vakaların 67(%67) tanesinde bir ve daha fazla nüks olduğu, ayrıca 13 (%13) tanesinin ise uzak organ metastazları olduğu görülmüştür. Vakalarımızın yakın zamanda hayatta olup olmadıkları sorgulandığında 2 tanesinin hastalık nedenleri dışında (biri akut miyokard enfarktüsü, diğeri trafik kazası), 23 tanesinin ise mesane kanseri nedeniyle öldüğü, 64 tanesinin sağ ve sağlıklı olduğu saptanmış 15 tanesine ise ulaşılamamıştır. Hastaların patolojik ve klinik bulgularının GST-M1 ve CYP 1A1 gen polimorfizmleri ile ilişkileri tablo-3a ve 3b'de görülmektedir.

Tablo-3a Patolojik bulgularla GST-M1 ve CYP1A1 gen polimorfizmlerinin ilişkileri

Patolojik parametreler		Sayı	GST-M1		CYP 1A1		
		n (%)	Null n (%)	M1 (+) n (%)	homozigot doğal n (%)	heterozigot mutant n (%)	homozigot mutant n (%)
Hasta Cinsiyet	Erkek	81 (81)	36 (54,5)	30 (45,5)	41 (70,7)	14 (24,1)	3 (5,2)
	Kadın	19 (19)	7 (63,6)	4 (36,4)	7 (87,5)	1 (12,5)	0
	Toplam n (%)	100	43	34	48	14	3
Grade	Düşük	36 (36)	16 (55,2)	13 (44,8)	16 (69,6)	7 (30,4)	0
	Yüksek	64 (64)	27 (56,2)	21 (43,8)	32 (74,4)	8 (18,6)	3 (7,0)
Diferansiasyon	glandüler	1 (1)	0	1 (100)	1 (100)	0	0
	skuamoz	12 (12)	6 (66,7)	3 (33,3)	5 (62,5)	2 (25)	1 (12,5)
Büyüme paterni	invaziv	24 (24)	10 (58,8)	7 (41,2)	12 (85,7)	1 (7,1)	1 (7,1)
	papiller	64 (64)	29 (58)	21 (42)	29 (69)	12 (28,6)	1 (2,4)
	mikst	12 (12)	4 (40)	6 (60)	7 (70)	2 (20)	1 (10)
Lamina propria invazyonu	var	53 (53)	19 (48,7)	20 (51,3)	25 (73,5)	7 (20,6)	2 (5,9)
	yok	47 (47)	24 (63,2)	14 (36,8)	23 (71,9)	8 (25)	1 (3,1)
Kas invazyonu	var	31 (31)	12 (50)	12 (50)	16 (80)	2 (10)	2 (10)
	yok	69 (69)	19 (54,3)	16 (45,7)	20 (64,5)	10 (32,3)	1 (3,2)
Vasküler invazyon	var	16 (16)	9 (75)	3 (25)	9 (75)	2 (16,7)	1 (8,3)
	yok	84 (84)	34 (52,3)	31 (47,7)	39 (72,7)	13 (24,1)	2 (3,7)
Perinöral invazyon	var	12 (12)	9 (75)	3 (25)	7 (87,5)	0	1 (12,5)
	yok	88 (88)	37 (53,6)	32 (46,4)	41 (70,7)	15 (25,9)	2 (3,4)
Multifokalite	var	19 (19)	11 (68,8)	5 (31,3)	13 (81,3)	3 (18,8)	0
	yok	81 (81)	32 (52,5)	29 (47,5)	35 (70)	12 (24)	3 (6)
Mesane dışı yayılım	var	14 (14)	7 (53,8)	6 (46,2)	9 (75)	1 (8,3)	2 (16,7)
	yok	26 (26)	13 (56,5)	10 (43,5)	16 (88,9)	2 (11,1)	0
Çevre mesanede in situ karsinom	var	14 (14)	5 (55,6)	4 (44,4)	6 (85,7)	0	1 (14,3)
	yok	86 (86)	13 (56,5)	10 (43,5)	16 (88,9)	1 (5,6)	1 (5,6)
Perivezikal yağlı doku invazyonu	var	7 (7)	3 (75)	1 (25)	3 (75)	1 (25)	0
	yok n (%)	4	2 (50)	2 (50)	3 (100)	0	0
Pelvik lenf nodu tutulumu	var n (%)	6	4 (80)	1 (20)	4 (100)	0	0
	yok n (%)	7	2 (40)	3 (60)	5 (100)	0	0
Cerrahi tedavi	TUR	82 (82)	33 (52,4)	30 (47,6)	38 (71,7)	14 (26,4)	1 (1,9)
	Rezeksiyon	18 (18)	10 (71,4)	4 (28,6)	10 (76,9)	1 (7,7)	2 (15,4)

Tablo-3b Klinik bulgularla GST-M1 ve CYP 1A1 gen polimorfizmlerinin ilişkisi

Klinik parametreler		GST-M1			CYP 1A1		
		Sayı	null	M1(+)	Homozigot Doğal	Heterozigot Mutant	Homozigot Mutant
Kanserojenle temas	var	27	11	10	10	3	2
	n (%)	(27)	(52,4)	(47,6)	(66,6)	(20)	(13,3)
	yok	62	32	23	38	12	1
Özgeçmişte kanser hikayesi	n (%)	(62)	(58,2)	(41,8)	(74,5)	(23,5)	(2)
	var n (%)	7	3	3	5	1	0
	(7)	(7)	(50)	(50)	(83,3)	(16,7)	
Ailede kanser hikayesi	yok	82	40	30	43	14	3
	n (%)	(82)	(57,1)	(42,9)	(71,7)	(23,3)	(5)
	var	7	2	2	3	0	0
Sigara içimi	(7)	(7)	(50)	(50)	(100)		
	yok	82	41	31	45	15	3
	n (%)	(82)	(56,9)	(43,1)	(71,4)	(23,8)	(4,8)
Nüks	yok	19	11	8	12	3	1
	(19)	(19)	(57,9)	(42,1)	(75)	(18,8)	(6,2)
	1-10 p/yıl	4	1	3	3	0	0
Sağ kalım	(4)	(4)	(25)	(75)	(100)		
	≥10 p/yıl	54	31	23	33	12	2
	(54)	(54)	(57,4)	(42,6)	(70,2)	(25,5)	(4,3)
Uzak organ metastazı	var	67	31	24	33	13	2
	n (%)	(81,7)	(56,4)	(43,6)	(68,8)	(27,1)	(4,2)
	yok	15	7	6	9	2	0
Hasta grubunun parafin blok kesitlerine uygulanan p53 immünohistokimyasal boyamada 73 (%73) vakada pozitif boyanma görülmüş, 27'sinde (%27) ise boyanma saptanmamıştır. Boyanan vakaların (%73) hepsinde %1 ve üzeri, 59 (%59) vakada %3 ve üzeri, 56 (%56) vakada %5 ve üzeri, 49 (%49) vakada %10 ve üzerinde boyanma görülmüştür. Boyanan vakaların %24'ünün soluk (+), %31'inin orta (++), %18'inin yoğun (+++) olarak boyandığı saptanmıştır. Hastaların p53 boyanmaları ve GST-M1 ve CYP 1A1 gen polimorfizmlerinin ilişkileri tablo-4'te görülmektedir.	n (%)	(18,3)	(53,8)	(46,2)	(81,8)	(18,2)	
	ölü	23	12	8	13	3	1
	n (%)	(26,4)	(60)	(40)	(76,5)	(17,6)	(5,9)
Hasta grubunun parafin blok kesitlerine uygulanan p53 immünohistokimyasal boyamada 73 (%73) vakada pozitif boyanma görülmüş, 27'sinde (%27) ise boyanma saptanmamıştır. Boyanan vakaların (%73) hepsinde %1 ve üzeri, 59 (%59) vakada %3 ve üzeri, 56 (%56) vakada %5 ve üzeri, 49 (%49) vakada %10 ve üzerinde boyanma görülmüştür. Boyanan vakaların %24'ünün soluk (+), %31'inin orta (++), %18'inin yoğun (+++) olarak boyandığı saptanmıştır. Hastaların p53 boyanmaları ve GST-M1 ve CYP 1A1 gen polimorfizmlerinin ilişkileri tablo-4'te görülmektedir.	hayatta	64	29	25	35	11	2
	n (%)	(73,6)	(53,7)	(46,3)	(72,9)	(22,9)	(4,2)
	var	13	7	4	8	0	1
Hasta grubunun parafin blok kesitlerine uygulanan p53 immünohistokimyasal boyamada 73 (%73) vakada pozitif boyanma görülmüş, 27'sinde (%27) ise boyanma saptanmamıştır. Boyanan vakaların (%73) hepsinde %1 ve üzeri, 59 (%59) vakada %3 ve üzeri, 56 (%56) vakada %5 ve üzeri, 49 (%49) vakada %10 ve üzerinde boyanma görülmüştür. Boyanan vakaların %24'ünün soluk (+), %31'inin orta (++), %18'inin yoğun (+++) olarak boyandığı saptanmıştır. Hastaların p53 boyanmaları ve GST-M1 ve CYP 1A1 gen polimorfizmlerinin ilişkileri tablo-4'te görülmektedir.	n (%)	(14,6)	(63,6)	(36,4)	(88,9)		(11,1)
	yok	76	36	29	40	15	2
	n (%)	(85,4)	(55,4)	(44,6)	(70,2)	(26,3)	(3,5)

Hasta grubunun parafin blok kesitlerine uygulanan p53 immünohistokimyasal boyamada 73 (%73) vakada pozitif boyanma görülmüş, 27'sinde (%27) ise boyanma saptanmamıştır. Boyanan vakaların (%73) hepsinde %1 ve üzeri, 59 (%59) vakada %3 ve üzeri, 56 (%56) vakada %5 ve üzeri, 49 (%49) vakada %10 ve üzerinde boyanma görülmüştür. Boyanan vakaların %24'ünün soluk (+), %31'inin orta (++), %18'inin yoğun (+++) olarak boyandığı saptanmıştır. Hastaların p53 boyanmaları ve GST-M1 ve CYP 1A1 gen polimorfizmlerinin ilişkileri tablo-4'te görülmektedir.

Tablo-4 p53 boyanma ve genetik polimorfizmlerin ilişkisi.

		Sayı	GST-M1		CYP 1A1		
		n (%)	Null n (%)	M1 (+) n (%)	homozigot doğal n (%)	heterozigot mutant n (%)	homozigot mutant n (%)
p53 boyanma yaygınlığı	yok	27 (27)	9 (45)	11 (55)	15 (93,8)	1 (6,3)	0
	≥ %1	73 (73)	34 (59,6)	23 (40,4)	33 (66)	14 (28)	3 (6)
	≥%3	59 (59)	30 (65,2)	16 (34,8)	25 (62,5)	12 (30)	3 (7,5)
	≥%5	56 (56)	30 (69,8)	13 (30,2)	23 (62,2)	11 (29,7)	3 (8,1)
	≥10	49 (49)	28 (71,8)	11 (28,2)	22 (66,7)	8 (24,2)	3 (9,1)
	soluk	24 (24)	12 (66,7)	6 (33,3)	12 (75)	4 (25)	0
p53 yoğunluğu	orta	31 (31)	14 (53,8)	12 (46,2)	14 (60,9)	7 (30,4)	2 (8,7)
	yoğunluk	18 (18)	8 (61,5)	5 (38,5)	7 (63,6)	3 (27,3)	1 (9,1)

GST-M1 polimorfizmi kontrol ve hasta grupları arasında farklı bulunmamıştır($p>0,05$). Bununla beraber GST-M1null genotipi varlığı hasta grubunda vasküler invazyon, perinöral invazyon, multifokal tutulum, pelvik lenf nodu tutulumu, uzak metastaz, hastalıktan ölüm ve kanserojen teması ile istatistiki açıdan anlamlılık olmamasına rağmen artmış göreceli risk (Odd Ratio) bulunmuştur($p>0,05$). Tablo 5’de detaylı istatistiki değerler görülmektedir. Ayrıca p53 ile %1, %3, %5 ve %10’un üzerinde boyanma yüzdeleri ölçüt alınarak, GST M1(+) ve GST-M1 null genotipli hastalar kıyaslandığında, null genotipli vakalarda istatistiki açıdan ileri derecede anlamlı fark gözlenmiştir (tablo–5 ve 6) ($p<0,05$). Vakalara ait p53 immünohistokimyasal boyanma örnekleri resim 5-17’te görülmektedir.

Tablo-5 GST-M1 null genotipinin, M1 (+) genotip taşıyan vakalara göre klinik ve patolojik parametrelerle ilişkisi

GST-M1 null genotipi						
		Sayı n (%)		χ^2 (ki- kare)	P değeri	Göreceli risk – (%95 güvenlik aralığı) (OR- %95 CI)
		null	M1			
Vasküler invazyon	var	9 (75)	3 (25)		> 0,05	2,42 (0,71- 8,27)
	yok	34 (52,3)	31 (47,7)			
Perinöral invazyon	var	9 (75)	3 (25)		> 0,05	2,42 (0,52- 11,27)
	yok	37 (53,6)	32 (46,4)			
Multifokalite	var	11 (68,8)	5 (31,3)		> 0,05	1,61 (0,61- 4,28)
	yok	32 (52,5)	29 (47,5)			
Pelvik LAP	var	4 (80)	1 (20)		> 0,05	3,2 (0,5- 18,47)
	yok	2 (40)	3 (60)			
Uzak metastaz	var	7 (63,6)	4 (36,4)		> 0,05	1,34 (0,42- 4,26)
	yok	36 (55,4)	29 (44,6)			
Ölüm	ölü	12 (60)	8 (40)		> 0,05	1,20 (0,56- 2,60)
	Sağ	29 (53,7)	25 (46,3)			
Kanserojen teması	var	11 (52,4)	10 (47,6)		>0,05	1,11 (0,697-1,76)
	yok	32 (58,2)	23 (41,8)			
p53 ≥%1 boyanma		34 (59,6)	23 (40,4)		>0,05	1,169 (0,88-1,54)
p53 ≥%3 boyanma		30 (65,2)	16 (34,8)	4,07	0,044	1,48 (0,98- 2,22)
p53 ≥%5 boyanma		30 (69,8)	13 (30,2)	7,65	0,006	1,82 (1,14- 2,9)
p53 ≥%10 boyanma		28 (71,8)	11 (28,2)	8,15	0,004	2 (1,18- 3,43)

Tablo-6 GST-M1 null genotipinin, M1 (+) genotip taşıyan vakalara göre p53 ilişkisi

GST-M1 null genotipi			
Student t testi			
	Vaka N (%)	Ortalama± SE	P değeri
p53 ile ortalama boyanma yüzdesi	Null 43 (%55,8)	21,34± 3,84	0,01
	M1 (+) 34 (%44,1)	7,32± 1,66	

CYP 1A1 gen polimorfizmine bakıldığında hasta grubunda heterozigot mutant genotipinin kontrol grubundan daha az olduğu bulunmuştur ($p<0.05$). CYP mutant allel taşıyanlarla (hem heterozigot mutantlar hem de homozigot mutantlar) p53 boyanma yüzdeleri açısından (%1,%3 ve %5'in üzerinde boyanma) homozigot doğal genotip taşıyan hastalarda anlamlı derecede fark görülmüştür ($p<0.05$). p53'ün %10'dan fazla boyandığı vakalarda istatistiki fark saptanmamıştır($p>0,05$). Detaylı istatistik verileri tablo-7'de görülmektedir.

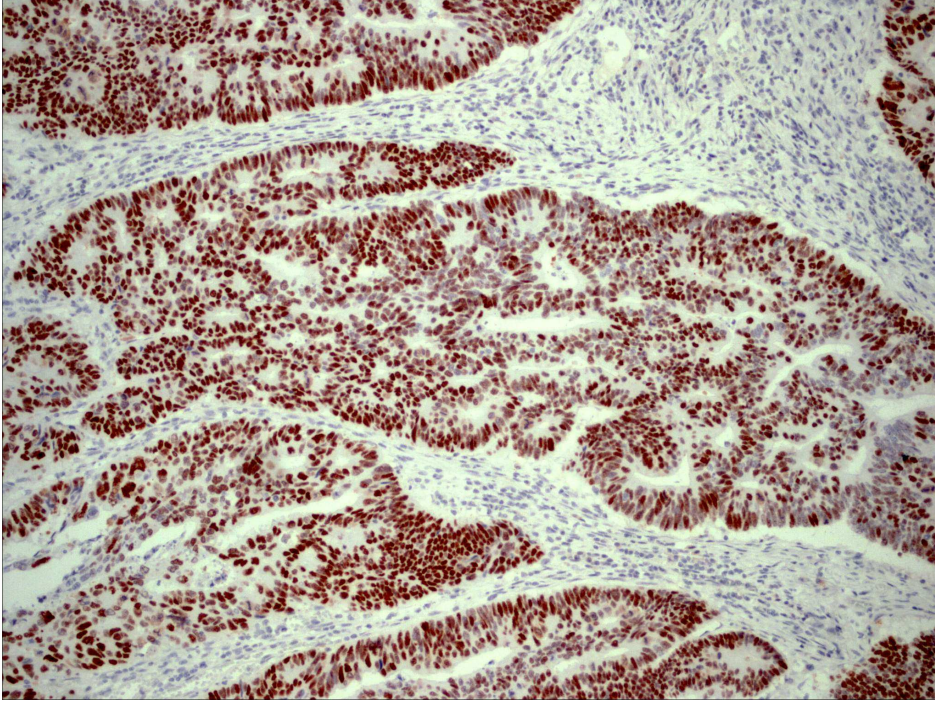
Tablo-7 CYP mutant allel taşıyanların (heterozigot mutant +homozigot mutant) homozigot doğal genotip taşıyanlara göre klinik ve patolojik parametrelerle ilişkisi,

CYP heterozigot+ homozigot mutant genotipleri					
	Sayı n (%)		χ^2 (ki-kare)	P değeri	Göreceli risk – (%95 güvenlik aralığı) (OR- %95 CI)
	Homozigot doğal	Heterozigot veya homozigot mutant			
p53 $\geq$ %1 boyanma	33 (66)	17 (34)	4,70	0,03	7,72 (0,94- 63,55)
p53 $\geq$ %3 boyanma	25 (62,5)	15 (37,5)	5,35	0,021	4,60 (1,17- 17,97)
p53 $\geq$ %5 boyanma	23 (62,2)	14 (37,8)	4,73	0,029	3,80 (1,09- 13,24)
p53 $\geq$ %10 boyanma	22 (66,7)	11 (33,3)		>0,05	1,85 (0,61- 5,60)
P53 orta/ yoğun boyanma	21 (61,7)	13 (38,3)		>0,05	1,54 (0,58- 4,07)

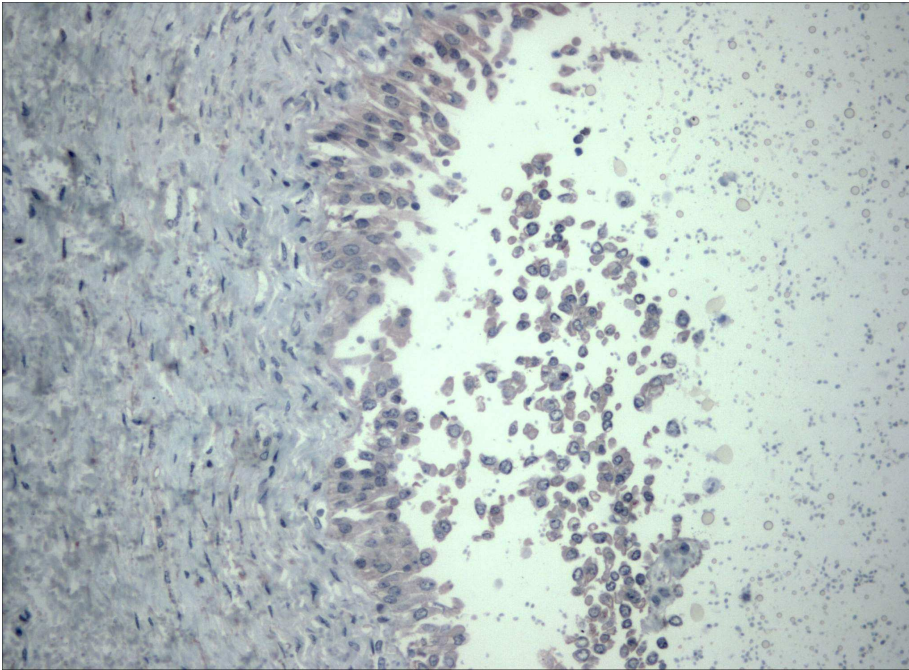
Tüm p53 boyanma yüzdeleri ile yüksek grade, invaziv ve mikst (invaziv+diğer büyüme paternleri) büyüme paternleri, bazı boyanma yüzdeleri ile de lamina propria invazyonu, kas tabakası invazyonu, vasküler invazyon, perinöral invazyon, perivezikal yağlı doku tutulumu arasında ileri derecede anlamlı ilişki saptanmıştır (Tablo–5) ($p<0,05$). Hastanın özgeçmişinde kanser varlığı, ölüm, sigara içimi ile de bazı boyanma yüzdeleri arasında istatistiki anlam bulunmamakla birlikte artmış göreceli risk gözlenmiştir($p>0,05$).

İnvaziv ve mikst büyüme paternlerinin aynı zamanda kas invazyonu, vasküler invazyon, perinöral invazyon, multifokalite, perivezikal yağlı doku

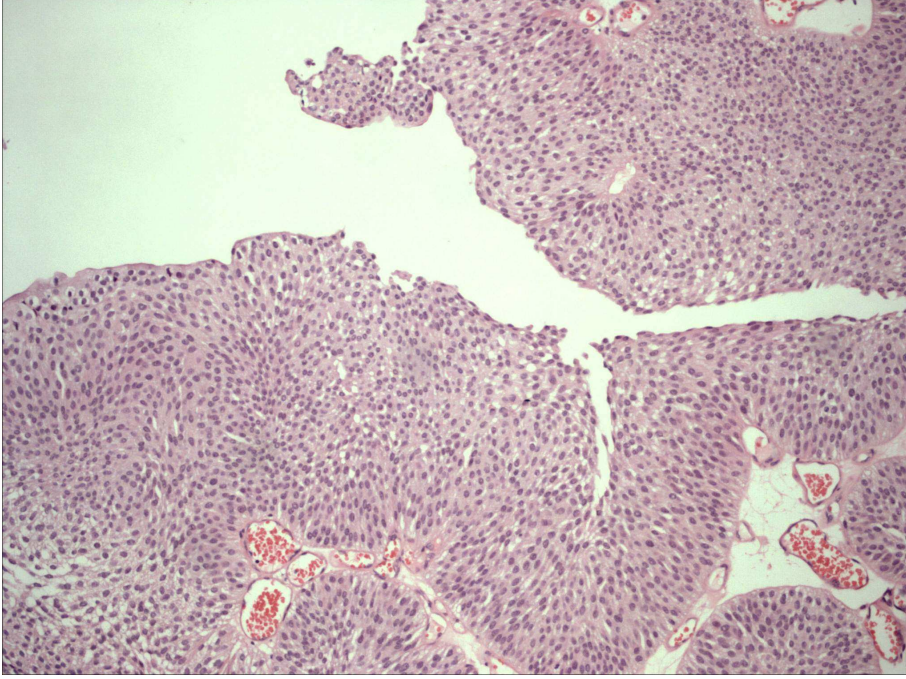
invazyonu, mesane dışı yayılım, evre mesane mukozasında in situ yayılım, uzak metastaz, 40 paket/yıl ve üzeri sigara içimi, hastanın özgeçmişinde bulunan başka bir organ kanseri ve hastanın 1. derece akrabalarında bulunan kanser hikayesi ile istatistiki anlamlı ilişki bulunmuştur ($p<0,05$) (Tablo-8).



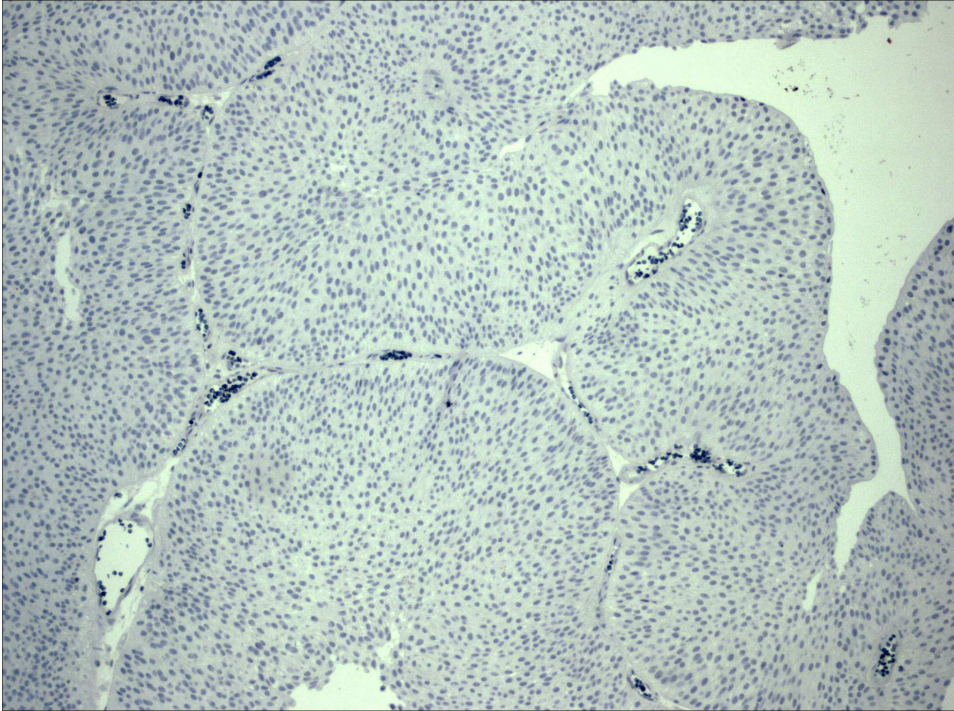
Resim 5. Pozitif kontrol: p53 immünhistokimyasal boya ile kolon karsinomunda pozitif boyanma X100 (CTF patoloji protokol no 8024/2004).



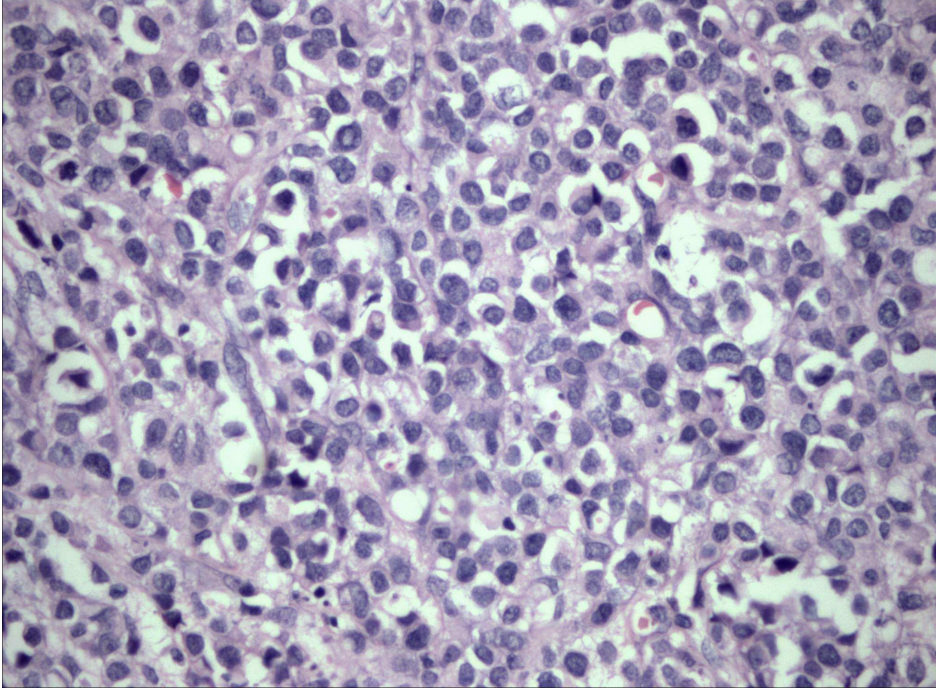
Resim 6: Negatif kontrol: p53 immünhistokimyasal boya ile boyanmam   normal mesane mukoza epiteli X200 (CTF patoloji protokol no otopsi 7/2005).



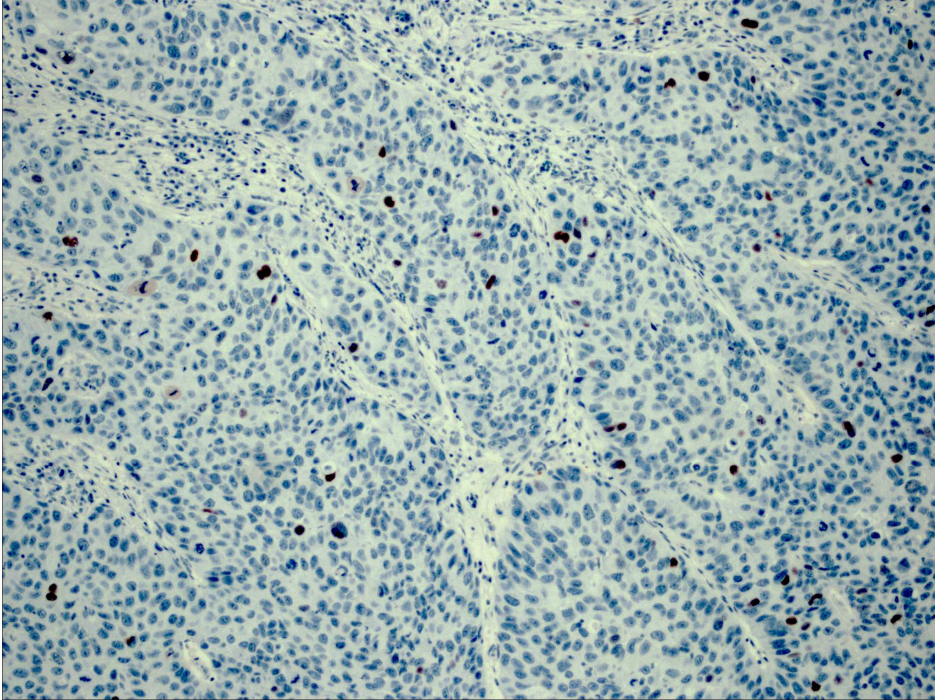
Resim 7: Düşük gradeli transizyonel hücreli karsinom H&E X 100(CTF patoloji protokol no 242/2005).



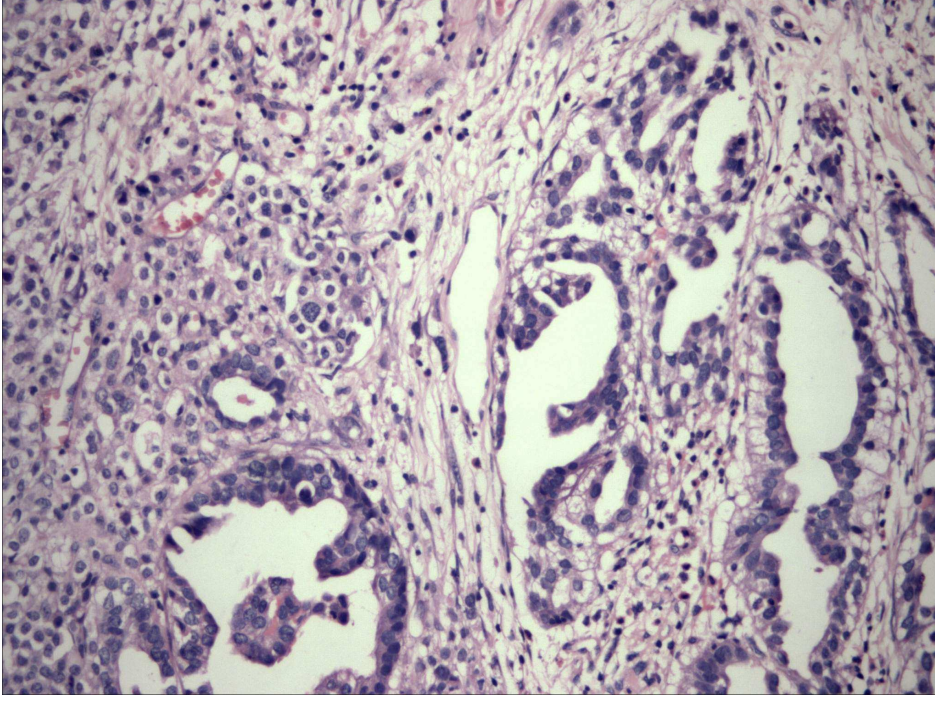
Resim 8: Aynı vakanın p53 ile negatif immünhistokimyasal boyası X100 (CTF patoloji protokol no 242/2005).



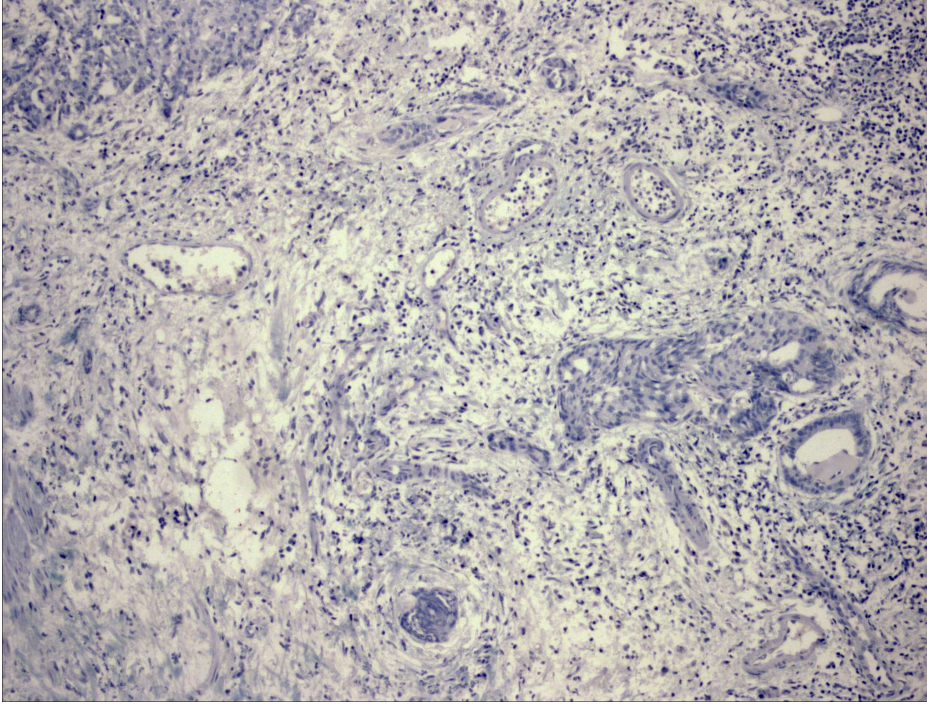
Resim 9: Yüksek gradeli transizyonel hücreli karsinom H&E X400(CTF patoloji protokol no 12132/2005).



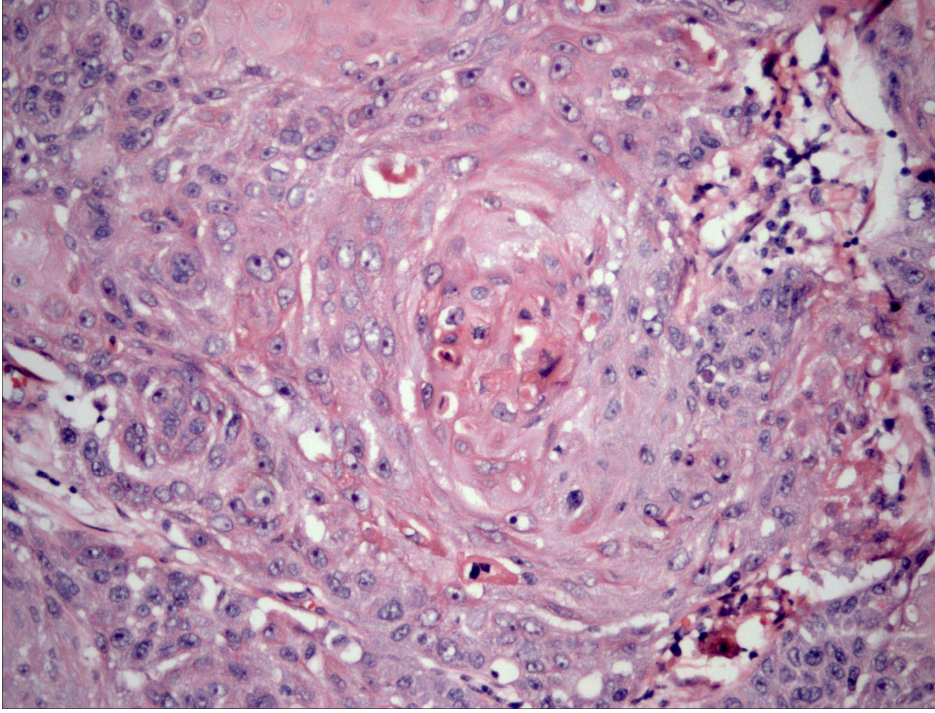
Resim 10: Yüksek gradeli transizyonel hücreli karsinomda, düşük oranda (%10'dan az) ve yoğun (+++) p53 boyanması X100 (CTF patoloji protokol no 4782/2001).



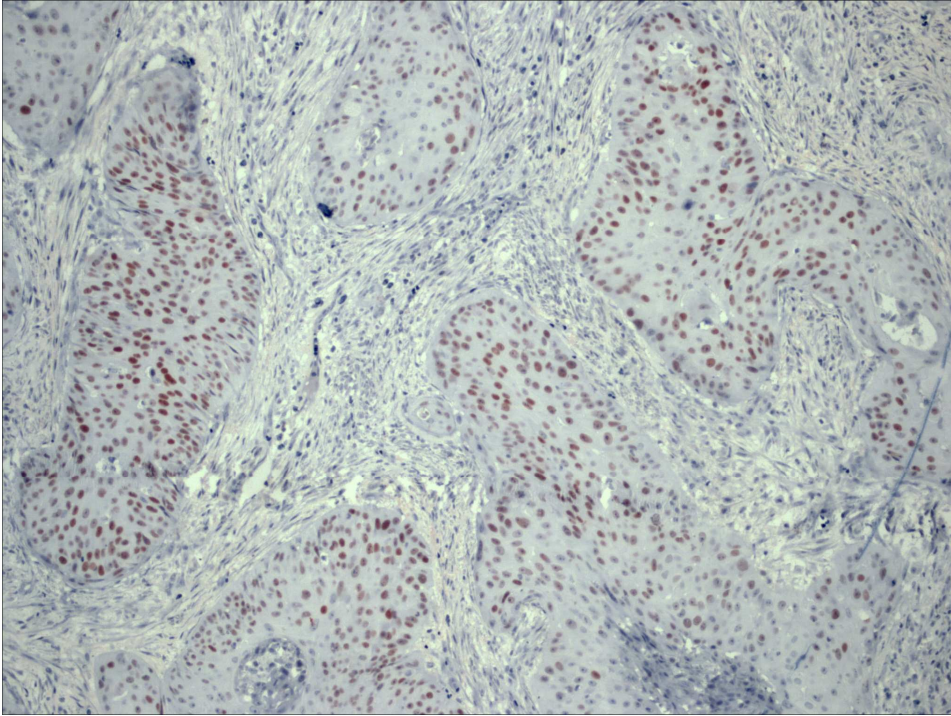
Resim 11: Glandüler diferansiasyon gösteren yüksek grade'li, transizyonel hücreli karsinom H&E X 200 (CTF patoloji protokol no 12132/2005).



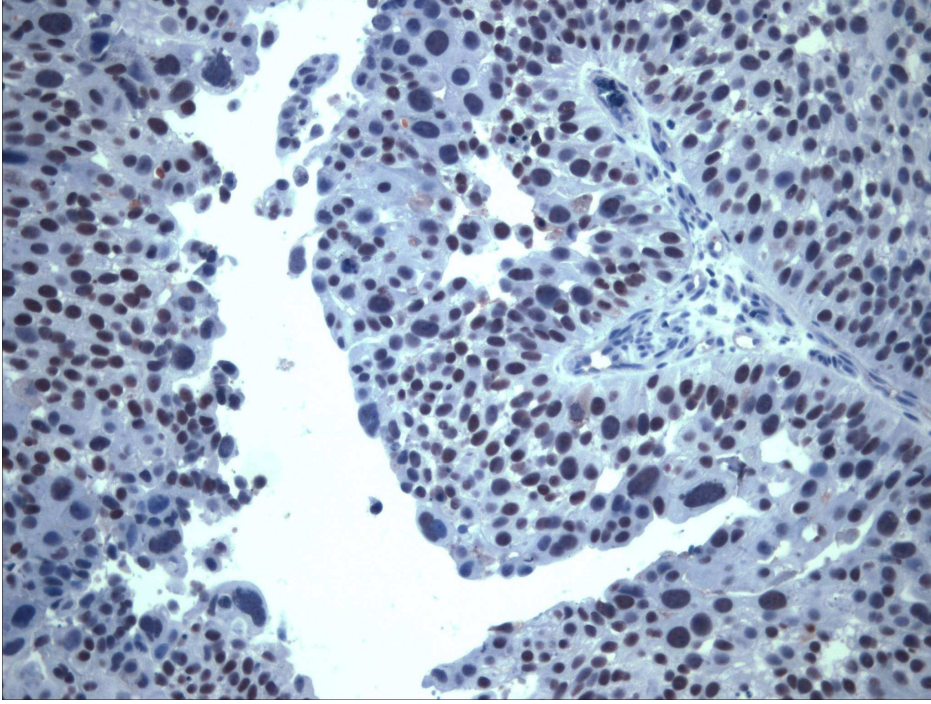
Resim 12: Aynı vakanın p53 ile negatif boyanması X 100 (CTF patoloji protokol no 12132/2005) .



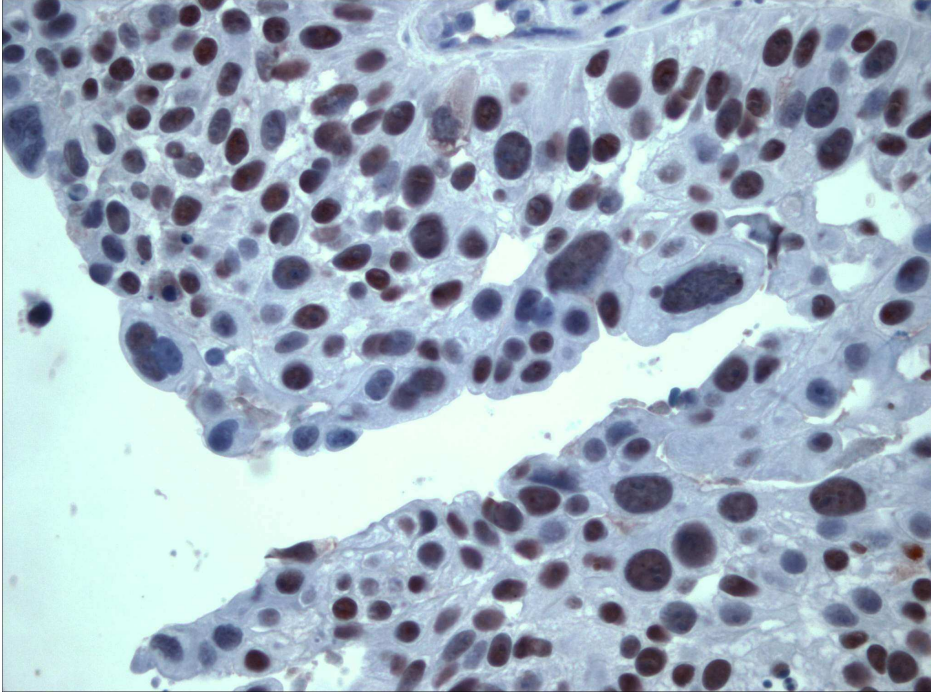
Resim 13: Skuamöz diferansiasyon gösteren yüksek gradeli transizyonel hücreli karsinom H&E X 200(CTF patoloji protokol no 13333/2005)



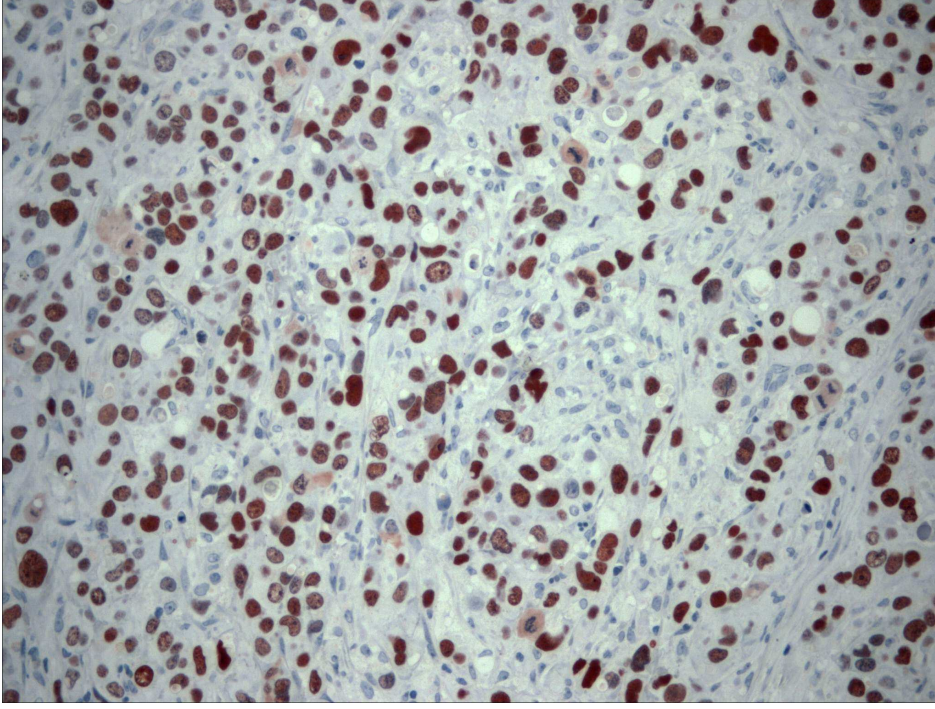
Resim 14: Aynı vakanın başka bir alanında p53 ile yüksek oranda yoğun boyanma X100(CTF patoloji protokol no 13333/2005).



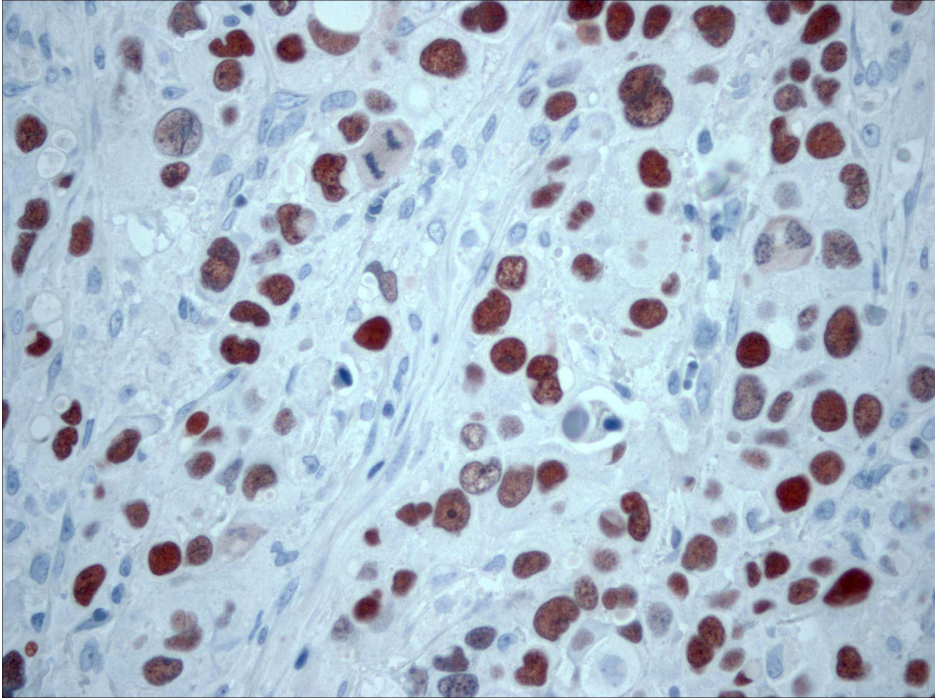
Resim 15: Yüksek gradeli transizyonel karsinomda p53 ile yüksek oranda boyanma X200 (CTF patoloji protokol no 16656/2005).



Resim 16: Aynı vakanın büyük büyütmesi X 400(CTF patoloji protokol no 16656/2005).



Resim 17: Yüksek gradeli vakada yaygın ve yoğun p53 boyanması X200(CTF patoloji protokol no 1408/2004).



Resim 18: Aynı vakanın büyük büyütmesi X 400(CTF patoloji protokol no 1408/2004)

Tablo-8 İnvaziv veya mikst büyüme paterni ile patolojik ve klinik parametrelerin ilişkisi.

İnvaziv veya mikst büyüme paterni						
		Sayı n		χ^2 (ki-kare)	P değeri	Göreceli risk – (%95 güvenlik aralığı) (OR- %95 CI)
		İnvaziv ve mikst	papiller			
Vasküler invazyon	var n (%)	15(41,7)	11,6)	27,16	0,0001	
	yok n (%)	21 (58,3)	63 (98,4)			
Perinöral invazyon	var n (%)	12(33,3)	0	23,89	0,0001	
	yok n (%)	24(66,7)	64(100)			
Yüksek grade	düşük n (%)	2(5,6)	34(53,1)	22,62	0,0001	
	yüksek n(%)	34(94,4)	30(46,9)			
Çevre mesanede in situ karsinom	var n (%)	10(52,6)	4(20)	4,07	0,044	
	yok n (%)	9(47,4)	16(80)			
Uzak metastaz	var n (%)	9(29)	4(6,9)	7,93	0,005	
	yok n (%)	22(71)	54(93,1)			
Mesane dışı yayılım	var n (%)	10(55,6)	4(18,2)	7,42	0,006	
	yok n (%)	8(44,4)	18(81,8)			
Perivezikal yağlı doku invazyonu	var n (%)	6(75)	1(33,3)		> 0,05	2,25 (0,43- 11,71)
	yok n (%)	2(25)	2(66,7)			
Cerrahi rezeksiyon	TUR n (%)	23(63,9)	59(92,2)	12,50	0,0001	
	Rezeksiyon n (%)	13(36,1)	5(7,8)			
p53 ≥%1 boyanma	var n (%)	30(83,3)	43(67,2)	3,04	>0,05	1,24 (0,99- 1,55)
	yok n (%)	6(16,7)	21(32,8)			
p53 ≥%3 boyanma	var n (%)	27(75)	32(50)	5,95	0,015	
	yok n (%)	9(25)	32(50)			
p53 ≥%5 boyanma	var n (%)	25(69,4)	31(48,4)	4,126	0,042	
	yok n (%)	11(30,6)	33(51,6)			
p53 ≥%10 boyanma	var n (%)	23(63,9)	26(40,6)	4,99	0,025	
	yok n (%)	13(36,1)	38(59,4)			
p53 orta/ yoğun boyanma	soluk n(%)	6(16,7)	18(28,1)	3,82	0,05	1,37 (1,00- 1,87)
	orta/yoğun n(%)	24(66,7)	25(39,1)			
Geçmişinde kanser	var n(%)	6(19,4)	1(1,7)	12,03	0,001	
	yok n (%)	25(80,6)	57(98,3)			
Ailede kanser hikayesi	var n(%)	5(16,1)	2(3,4)	4,48	0,034	
	yok n (%)	26(83,9)	56(96,6)			
Ölüm	ölü n(%)	13(41,9)	10(17,9)	5,95	0,015	
	Sağ n(%)	18(58,1)	46(82,1)			
Sigara>40 paket/yıl	var n(%)	11(30,6)	14(21,9)		>0,05	1,44 (0,78- 2,66)
	yok n(%)	13(36,1)	30(46,9)			

Kanserojen ile temas araştırıldığında cinsiyet, GST-M1 null genotipleri, p53 %1'den fazla boyanma, p53 boyanma yoğunluğu, yüksek grade, kas tabakası invazyonu, özgeçmişinde başka bir organda kanser varlığı ve nüks varlığı ile istatistiki anlam saptanmamış ancak artmış göreceli risk gözlenmiştir ($p>0,05$). Uzak organ metastazı ve kanserojen teması açısından ise istatistiki anlamlı fark bulunmuştur ($p<0,05$) (Tablo-9 ve 10).

Tablo-9 ve 10 p53 boyanma yüzdeleri ile klinik ve patolojik parametrelerin ilişkisi

tablo-9	p53 $\geq$ %1		p53 $\geq$ %3		p53 $\geq$ %5		p53 $\geq$ %10	
	χ^2	p	χ^2	p	χ^2	p	χ^2	p
Lamina propria invazyonu	8,11	0,004	7,51	0,006	6,50	0,01	5,84	0,01
Kas tabakası invazyonu	8,65	0,03	7,38	0,007	5,13	0,02	7,07	0,008
Vasküler invazyon	7,15	0,007	9,72	0,02	7,88	0,005	8,2	0,004
Yüksek grade	18,96	0,000	15,31	0,000	14,78	0,000	19,66	0,000
Perinöral invazyon	5,12	0,02	6,15	0,01	7,21	0,007	6,63	0,01
Perivezikal yağlı doku invazyonu	4,27	0,03		>0,05		>0,05		>0,05
Sigara>20 paket/yıl		>0,05		>0,05		>0,05	4,22	0,04

tablo-10	Göreceli risk – (%95 güvenlik aralığı) ;OR (%95 CI)			
	p53 $\geq$ %1	p53 $\geq$ %3	p53 $\geq$ %5	p53 $\geq$ %10
Ölüm	1,17 (0,91- 1,50)	1,27 (0,89- 1,80)	1,39 (0,96- 2,00)	1,49 (0,99-2,24)
Geçmişinde kanser	1,14 (0,23-5,51)	3,64 (0,40- 32,60)	4,22 (0,47- 37,72)	5,64 (0,63- 50,39)
Sigara $\geq$ 10	3,0 (0,39- 23,07)	4,68 (0,46-47,53)	4,11 (0,40- 41,70)	3,19 (0,31- 32,35)

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Mesane kanserlerinin çevresel veya mesleki olarak maruz kalınan kimyasallarla ilişkisi 19.yüzyıl sonlarından 20.yüzyıl ortalarına kadar açık bir şekilde ortaya konmuştur. Bununla beraber her kimyasala maruz kalan kişide kanser gelişmemesi bu konudaki araştırmaların kişiler arasındaki diğer farklılıklara yönelmesine neden olmuştur. Bu kişisel farklılıklar muhtemelen beslenme alışkanlıkları, genetik, yaşadığı çevre ve diğer maruz kalınan kimyasallarla belirlenmektedir. Bunların içinde değişemeyecek tek ve belki de en önemli farklılık genetik altyapıdır (51, 67). Ayrıca, genetik yapının yanı sıra maruz kalınan maddenin dozu ve maruz kalma süresi de önemlidir. Diğer yandan yapılan birçok çalışmanın sonucunda genetik özellikler ile çeşitli kanserler arasında ilişkiler gösterilmişken yine bir o kadar çalışmada da bu ilişkinin olmadığı bildirilmiştir. Zararlı kimyasallar vücut içerisine girdikten sonra başta karaciğer olmak üzere çeşitli dokularda, daha az toksik veya hiç zararı olmayan maddelere dönüştürülmek istenmektedir. Bu işleri yapacak detoksifikasyon enzimlerinin aktivitelerinin genetik yapı ile belirlendiği çeşitli araştırmalarda gösterilmiştir(44, 51, 67).

Bizim çalışmamızda transizyonel hücreli mesane karsinomları ile CYP1A1, GST-M1 gen polimorfizmleri ve p53 immünohistokimyasal boyanma ilişkileri araştırılmıştır. CYP1A1 benzopirenlerin metabolizmasında yer alan

enzim olup ekzon 7 mutasyonu ile enzim aktivitesinde artış gösterilmiştir. Artan enzim aktiviteleri benzopirenlerin daha çok aktiflenmelerine ve daha fazla DNA'ya bağlanarak hasar oluşturmalarına neden olmaktadır. Benzopirenlerin özellikle akciğer başta olmak üzere solunum-gastrointestinal sistem kanserleri ile ilişkileri kesin olarak gösterilmiştir. Bununla beraber mesane kanserlerinin etyolojisinde daha çok arilaminler yer almaktadır. Mesane kanserlerinde görülen p53 mutasyonlarının sıklığına bakıldığında benzopirenlerin yol açtığı mutasyon tipleri (GC→TA) çok az iken arilaminlerin neden olduğu mutasyonlar (GC→CG) sık olarak görülmektedir. GC:→CG değişiminin özellikle bir arilamin olan 4-aminobifenil ile oluştuğu gösterilmiştir (68). Benzopirenlerin başlıca rol oynadığı akciğer kanserlerinde en sık tespit edilen %32,4 oranı ile GC→TA p53 mutasyonu olup, bu mutasyon mesane kanserlerinde görülmemiştir (69). Yine akciğer kanserlerinde diğer sık rastlanan GC→CG mutasyonu olup mesane kanserlerinde de en sık rastlanan mutasyonlardandır. Bu mutasyonun her iki kanser türünde de sık rastlanmasının nedeni sigaranın arilaminleri de içermesiyle açıklanabilir(39).

CYP 1A1 heterozigot mutant genotipine beyaz ırkta az oranda (%10-20) rastlanırken Amerikan zencilerinde, Japonlar, Çinliler, Koreliler, Hawaii'liler, Şilililerde birbirine yakın oranda yaklaşık %35-55 gibi yüksek değerlerde gözlenmiştir (5, 12, 15, 16, 18, 19, 36). Bizim çalışmamızda CYP 1A1 heterozigot mutant genotipi kontrol grubunda %41,6 hasta grubunda ise %22,7 olarak bulunmuştur. Bu değerler kontrol grubu baz alındığında bizim beyaz ırktan farklı olarak yukarıda adı geçen diğer etnik gruplara benzediğimizi düşündürmektedir.

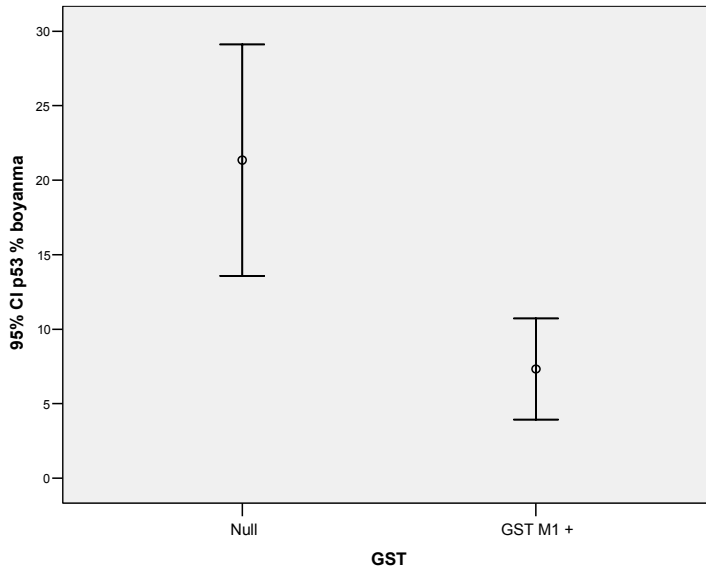
Bizim çalışmamızda da hasta grubunda bir benzopiren detoksifikasyon enzimi olan CYP1A1 mutant allel genotipi taşıyanların sıklığının artmadığı hatta kontrollere göre heterozigot mutant genotipin anlamlı derecede az olduğu gözlenmiştir($p=0,033$). Bu bulgu literatürdeki mesane kanserlerinin etyolojisinde benzopirenlerden ziyade arilaminlerin çok daha önemli olduğu bilgisi ile uyumludur(68). Bununla beraber hasta grubunda heterozigot veya homozigot mutant allel taşıyanlarda p53 immünhistokimya boyası ile %1, %3 ve %5'ten fazla hücrede boyanma homozigot doğal genotipe göre anlamlı olarak farklı bulunmuştur($p<0,05$).

GSTM1 genotipinin beyaz ırkta, Japon, Hawaii, Şili, Çin, Kore ve Hint toplumlarında %31–66 null genotipini taşıdıkları, siyahlarda ise GSTT1 null genotipinin yüksek olduğu gösterilmiştir (16, 18, 34, 35, 36, 37). Bizim toplumumuzda kontrol grubunda null genotipi %52, mesane kanserli vakalarda %55,8 olarak bulunmuştur. Beyaz ırk için literatürde bildirilen oranlarla uyumluluk göstermektedir.

Yapılan çalışmalarda null genotipi olanların akciğer, kolorektal ve oral kavite kanserlerine eğilimlerinin arttığı saptanmıştır (23, 24, 25, 26, 27, 70, 71). GST-M1 genotipleri incelendiğinde literatürde mesane kanserleri ile istatistiki anlamlılık olan çalışmalar (31, 32, 33, 75) bildirilmiştir ($p<0,05$). Bu çalışmalarda artmış göreceli risk değerleri 1,2–2,24 arasında bulunmuş özellikle de sigara içimi ile ilişkilendirilmişlerdir. Bunun yanında kontrollerle anlamlı farklılık gösterilememesine ($P>0,05$) rağmen artmış risk bildirilen çalışmalar da mevcuttur (76, 77, 78, 79, 80, 81, 82). Bu çalışmalardaki göreceli risk 1,12–1,75 olarak gösterilmiştir.

Zhong ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada GST M1 “null” genotipinin mesane ve meme kanserinde normal popülasyondan farklı olmadığı, kolon kanseri riskini ise 1.7 kat artırdığı gösterilmiştir (24). Diğer yandan Brockmöller ve diğer bir çok araştırmacı ise mesane kanserlerinin de dahil olduğu çeşitli tip kanserlerde null genotipi ile ilişki olmadığını bildirmiştir(28, 29, 30, 72, 73, 74).

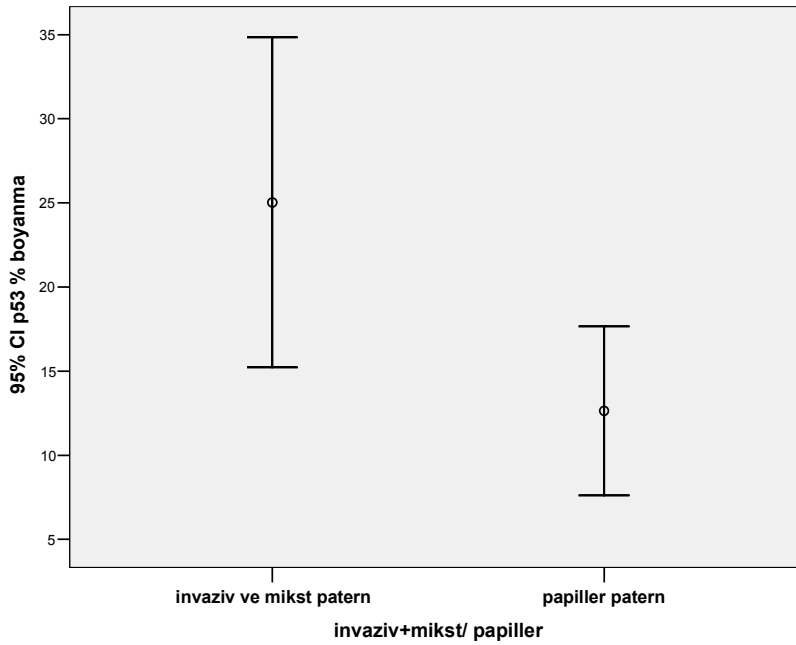
Bizim çalışmamızda hastalarda kontrollerden fazla GST-null genotipi sayısı bulunmasına rağmen istatistiki açıdan anlamlı farklılık gözlenmemiş ($p=0,61$), mesane kanserli vakalarda null genotipinin göreceli riski 1,09 (%95 güvenlik aralığında 0,77–1,52) olarak saptanmıştır. Buradan null genotipinin Türk toplumunda hastalık oluşumuna katkısının az olduğu düşünülebilir. Ancak çalışmamızda null genotipi taşıyan mesane kanserli vakaların vasküler invazyon, perinöral invazyon, tümörün multifokal oluşu, pelvik lenf nodu tutulumu, uzak metastaz, kanserojenle temas ve hastalıktan ölüm oranları açısından M1(+) genotipe göre 1,11–2,42 değerleri arasında artmış göreceli risk olduğu saptanmıştır. P53 immünohistokimyasal boyanma açısından; null genotipi taşıyanların M1(+) genotipi taşıyanlardan anlamlı farklılık gösterdiği ($p<0,01$) bulunmuştur. Bu anlamda artmış göreceli risk ve p53 boyanmanın anlamlı olarak farklı tespit edilen GST-M1 null genotipinin hastalığın daha agresif ve kötü seyretmesine katkısı olduğu söylenebilir.



Resim 19: p53 boyanma yüzdesi ile GST-M1 genotiplerinin ilişkisi grafik olarak gösterilmiştir(p=0,01). En alt ve üst değerler %95 güvenlik aralığında verilmiştir.

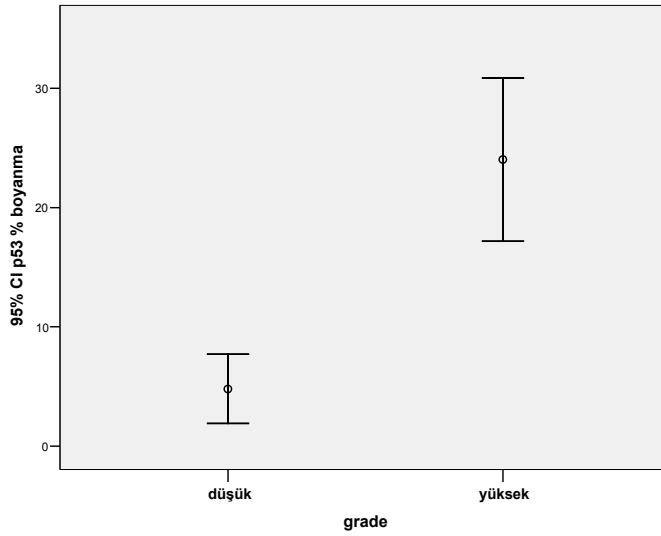
P53 mutasyonları sıklıkla doğal tip p53 proteininin değişerek normalden uzun yarı ömre sahip olmalarına neden olur ve bu mutant protein hücrenin çekirdeğinde birikerek immünohistokimyasal boyanmalarla gösterilebilir hale gelir. Bu anlamda p53 birikimi mutant p53 varlığı ile korelasyon göstermektedir hatta serum ve idrarda artmış p53 protein düzeyleri gösterilebilir(83, 84, 85). Bununla beraber önemli sayıda vakada yanlış pozitiflik de bildirilmiştir (84, 86). P53 boyanmanın mesane karsinomlarında invazyon, yüksek grade, evre, vasküler invazyon, perinöral invazyon, nüks ve sağ kalımla ilişkili olduğu bildirilmiştir. Yapılan birçok çalışmada invaziv mesane karsinomlarında p53 boyanma yaygınlığı ve yoğunluğu yüksek oranda bulunmuştur (87,88). Erken evre ve lokal olarak ilerlemiş mesane kanserlerinde p53 prognostik belirleyicidir(89, 90, 91, 92, 93, 94). P53 boyanması pozitif olan vakaların kemoterapi ve radyoterapiye daha az cevap verdiği gösterilmiştir(95, 96).

Mesane kanserinin büyüme paterni patolojik parametreler ile kıyaslandığında invaziv veya mikst büyüme paterni gösterenlerin papiller büyüme paterni gösterenlerden vasküler invazyon, perinöral invazyon, yüksek grade, çevre mesane dokuda in situ karsinom, perivezikal yağlı doku invazyonu, cerrahi rezeksizyon, p53 ile boyanma ve yoğunluk, özgeçmiş ve soygeçmiş kanser hikayesi, hastalıktan ölüm açısından istatistiki olarak anlamlı farklılık gösterdiği saptanmıştır ($p<0,05$).



Resim 20: p53 boyanma yüzdesi ile büyüme paterni ilişkisi görülmektedir ($p<0,05$). En alt ve üst değerler %95 güvenlik aralığında verilmiştir.

P53 ile boyanma açısından araştırıldığında boyanma ile lamina propria, kas, vasküler, perinöral, perivezikal invazyon ve yüksek grade açısından istatistiki olarak ileri derecede anlamlılık saptanmıştır ($p<0,0001$). Bunun yanında p53 boyanma ile özgeçmişinde kanser hikayesi, hastalıktan ölüm ve 10 paket/ yıldan fazla sigara tüketimleri açısından istatistiki anlam saptanmamış ($p>0,05$) ancak artmış göreceli risk bulunmuştur.



Resim 21: p53 boyanma yüzdesi ile grade ilişkisi görülmektedir ($p < 0,0001$). En alt ve üst değerler %95 güvenlik aralığında verilmiştir.

Sonuç olarak,

- 1) Hasta ve kontrol gruplarının gen polimorfizmleri incelendiğinde GST-M1 geni açısından istatistiki anlamlı fark bulunmamıştır. CYP 1A1 açısından hasta grubunda heterozigot mutant allelin kontrol grubundan az olduğu saptanmıştır.
- 2) GST-M1 null genotipinin hastalığın oluşumu açısından katkısının az olduğu fakat hasta grubunda özellikle invaziv gidiş için artmış risk, p53 immünohistokimyasal boyanma için istatistiki anlamlı fark gözlenmiştir.
- 3) CYP 1A1 heterozigot ve homozigot mutant genotiplerinin p53 ile boyanma açısından homozigot doğal genotipten istatistiki açıdan anlamlı fark olduğu bulunmuştur.
- 4) Büyüme paternleri açısından GST-M1 ve CYP 1A1 genotipleri dağılımlarında farklılık yoktur.
- 5) İnvaziv ve mikst büyüme paterni görülen tümörlerde vasküler, perinöral, perivezikal yağlı doku invazyonları, p53 boyanmaları, özgeçmiş ve

soygeçmişte kanser hikayeleri ve hastalıktan ölüm açısından istatistiki anlamlı farklılık saptanmıştır.

6) Kanserojen ile temas araştırıldığında cinsiyet, GST-M1 null genotipleri, p53 %1'den fazla boyanma, p53 boyanma yoğunluğu, yüksek grade, kas invazyonu, özgeçmişinde başka bir organda kanser varlığı ve nüks varlığı ile istatistiki anlamlılık saptanmamış, ancak artmış göreceli risk gözlenmiştir. Uzak organ metastazı ve kanserojen teması açısından ise istatistiki anlamlı farklılık bulunmuştur.

7) Tüm p53 boyanma yüzdeleri ile yüksek grade, invaziv ve mikst (invaziv+diğer büyüme paternleri) büyüme paternleri, bazı boyanma yüzdeleri ile de lamina propria invazyonu, kas invazyonu, vasküler invazyon, perinöral invazyon, perivezikal yağlı doku tutulumu arasında ileri derecede anlamlı ilişki saptanmıştır. Hastanın özgeçmişinde kanser varlığı, ölüm, sigara içimi ile de bazı p53 boyanma yüzdeleri arasında istatistiki anlam bulunmamakla birlikte artmış göreceli risk gözlenmiştir.

Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar literatür ile karşılaştırıldığında uyumlu olarak saptanmıştır. Beyaz ırka dahil olmamıza rağmen CYP 1A1 polimorfizmi açısından Uzakdoğululara ve Güney Amerikalılara benzediğimiz saptanmıştır. GST M1 polimorfizmi diğer topluluklarda bildirilenlerle uyumludur. GST-M1 açısından hasta ve kontrol grubunda benzer oranlarda gen polimorfizmleri saptanmıştır. Hastalarda heterozigot mutant CYP 1A1 genotipinin düşük oranda bulunmasının nedeni; birincil olarak CYP1A1 enziminin benzopirenlerin metabolizmasında rol oynamasıdır. Oysa mesane kanserlerinin gelişimiyle ilgili

kimyasal olarak arilaminler daha çok suçlanmaktadır ve mesane kanseri grubunda benzopirenleri daha fazla aktifleyecek mutant genotiplerin bulunmaması doğal olabilir. İkincil olarak çalışma gruplarımızın sayısının nispeten düşük olmasından kaynaklandığını ve Türk toplumundaki değerleri daha iyi saptamak amacıyla vaka sayısının artırılması gerektiğini düşünmekteyiz.

6. ÖZET

Çalışmamızda Türk toplumunda Transizyonel Hücreli Mesane kanserli hastalarda GST-M1 ve CYP1A1 gen polimorfizmlerinin incelenmesi, gen polimorfizmleri ile p53 immunhistokimyasal boyanmanın yoğunluk ve yaygınlık ilişkisinin araştırılması ve patolojik, klinik parametrelerle karşılaştırılması planlanmıştır.

Çalışmamıza 2000-2006 yılları arasında CTF Patoloji ABD na cerrahi materyalleri gelmiş ve Transizyonel Hücreli Mesane karsinomu tanısı almış 100 adet hasta, kontrol grubuna ise 101 adet sağlıklı kişi dahil edilmiştir. Hastaların DNA ları tümörlü parafin bloklardan, kontrollerinki ise periferik kan örneklerinden elde edilmiştir.

Yapılan çalışmalar sonucunda özetle;

- Hasta ve kontrol grupları gen polimorfizmleri açısından karşılaştırıldığında anlamlı fark bulunmadığı ancak CYP1A1 heterozigot mutant genotipinin hasta grubunda kontrol grubundan daha az olduğu,
- GST-M1 null genotipinin transizyonel hücreli mesane karsinomu oluşumunda anlamlı risk oluşturmadığı ancak kanser oluşuktan sonra hastalığın prognozunu etkileyen vasküler invazyon, perinöral invazyon, tümörün multifokal oluşu, pelvik lenf nodu tutulumu, uzak metastaz ve hastalıktan ölüm riskini arttırdığı,
- GST M1 null genotipli hastalarda invaziv büyüme paterni için artmış risk, p53 immunhistokimyasal boyanma açısından istatistiki anlamlı fark olduğu,

- CYP1A1 hem heterozigot hem de homozigot mutant genotipli hastalarda p53 immunhistokimyasal boyanma açısından istatistiki anlamlı fark olduğu,

- Büyüme paterni açısından GST-M1ve CYP1A1 genotipleri arasında anlamlı farklılık olmadığı,

- İnvaziv ve mikst büyüme paterni görülen tümörlerde vasküler invazyon, perinöral invazyon, perivezikal yağlı doku invazyonu ve p53 immunhistokimyasal boyanma riskinin arttığı, hastanın özgeçmişinde ve soygeçmişinde kanser hikayesi ve hastalıktan ölüm ile invaziv ve mikst büyüme paternleri arasında istatistiki anlamlı ilişki olduğu,

- Kanserojen ile temas araştırıldığında, kanserojen temasının cinsiyet, GST-M1null genotipi, p53 immunhistokimyasal boyanma, yüksek grade, kas invazyonu, özgeçmişinde başka organ kanseri varlığı ve nüks ile artmış göreceli riski, uzak organ metastazı ile istatistiki anlamlı ilişkisi olduğu,

- Tüm p53 immunhistokimyasal boyanma yüzdeleri ile yüksek grade, invaziv ve mikst büyüme paternleri, bazı boyanma yüzdeleri ile de lamina propria invazyonu, kas invazyonu, vasküler invazyon, perinöral invazyon, perivezikal yağlı doku invazyonu arasında ileri derecede anlamlı ilişki olduğu,

- Yine bazı p53 boyanma yüzdeleri ile sigara içimi, hastanın özgeçmişinde kanser varlığı ve hastalıktan ölüm arasında istatistiki anlamlı ilişki bulunmamakla birlikte artmış göreceli risk olduğu sonuçları bulunmuştur.

7. SUMMARY

The aim of this study was to identify the polymorphisms of the GST M1 and CYP 1A1 genes, the correlation between those polymorphisms and the P53 expression as well as comparing with pathological clinical parameters with the patients with transitional cell carcinoma of the bladder in Turkish population.

A total of 100 patients diagnosed as transitional cell carcinoma of the bladder at Cerrahpaşa Medical School, Department of Pathology between 2000 and 2006 were included in the study. 100 healthy individuals were chosen as the control group. DNA was extracted from formalin – fixed, paraffin –embedded blocks of the patients and the peripheral blood samples of the control group.

According to our results:

- There is no significant difference in gene polymorphisms between the patients and control group, however, CYP 1A1 heterozygote mutant genotype was less common in patient group.
- GST M1 null genotype is not is risk factor on prognosis increasing perineural and vascular invasion, multifocality, involvement of the pelvic lymph nodes, metastatic spread and death from the disease.
- The risk of invasive growth pattern is greater in the patients with GST M1 null genotype. These patients show higher p53 expression as well.
- There is a significant difference in p53 expression between heterozigot and homozigot patients with CYP 1A1 mutant gene.
- Regarding growth pattern of the tumor, no significant difference was found between heterozigot and homozigot patients with CYP1A1 mutant gene.

- Regarding growth pattern of the tumor, no significant difference was found between GST M1 and CYP 1A1 genotypes.
- Tumor with invasive and mix-growing pattern show higher vascular and perineural invasion, perivesical fatty tissue invasion and p53 expression. Additionally, there is a correlation between prior cancer history, family history of cancers, death from the disease and mixed growing pattern.
- There is a relatively higher risk of high grade tumor, muscle invasion; local recurrences and the increased expression of p53 in the patients were high in number amongst carcinogen exposed group as compared to remaining groups.
- There is a correlation between p53 expression and high grade tumor, invasive and mix-growing pattern, whilst some levels of the expression is significantly correlated with invasion of the lamina propria, muscle and perivesical fatty tissue invasion as well as vascular and perineural invasion.
- There is a no correlation between some percentages of p53 expression and the history of cigarette smoke, prior cancers and family history of cancer and death from the disease. Nevertheless, there is a relatively higher risk.

8. KAYNAKLAR

1. SS.Sternberg: Diagnostic Surgical Pathology, third Edition, the C.V. Mosby Company. 2004, p2045-2050.
2. Eble NJ, Sauter G, Epstein JI, SesterhannIA: Pathology and genetics; Tumours of the urinary system and male genital organs. WHO classification of Tumours. IARC Pres, Lyon. 2004 p89-154.
3. Vogelzang NJ, Scardio PT, Shipley WU, Debruyne FMJ, Linehan WM: Comprehensive textbook of genitourinary oncology 3th.edition.Lippincott Williams and Wilkins.2006, p355-417.
4. Mannervik, B.; Awasthi, Y.C; Board, P.G.; Hayes, J.D; Di Ilio, C.; Ketterer, B.; Litowsky, I.; Morgenstern, R.; Muramatsu, M.; Pearson, W.R.; Pickett, C.B.; Sato, K.; Widersten, M.; Wolf, R.C.: Nomenclature for human glutathione transferases. Biochem.J. 1992; 282:305-306 .
5. Ambrosone, C.B.; Freudenheim, J.L.; Graham, S. et al: Cytochrome P4501A1 and Glutathione S-Transferase (M1) Gentetic polymorphisms and Postmenopausal Breast Cancer Risk. Cancer. Res. 1995; 55: 3483-3485.
6. Chen, Y.T.; Tukey, R.H.; Swan, D.C.; Negishi, N.;Nebert, D.W.: Characterization of human P1-450 genomic gene. Clin. Res. 1983; 31:456A.
7. Kawajiri, K.; Watanabe, J.; Gotoh, O.; Tagashira, Y. et al.: Structure and drug inducibility of human cytochrome P-450c gene. Europ.J.Biochem. 1986; 159: 219-225.
8. Kouri, R.E.; McKinney, C.E.; Slomiany, D.J.; Snodgrass, D.R. et al.: Positive correlation between high aryl hydrocarbon hydroxylase activity and primary lung cancer as analysed in cryopreserved lymphocytes. Cancer Res. 1982; 42: 5030-5037.
9. Petersen, D.D.; McKinney, C.E.; Ikeya, K.; Smith, H.H. et al.: Human CYP 1A1 gene: cosegration of the enzyme inducibility phenotype and an RFLP. Am.J.Hum.Genet. 1991; 48:720-725.

10. Kawajiri, K.; Nakachi, K.; Imai, K.; Yoshii, A. et al.: Identification of genetically high-risk individuals to lung cancer by DNA polymorphism of cytochrome P4501A1 gene. *FEBS Lett.* 1990; 263: 131-133.
11. Perera, F.P.: Environment and cancer: who are susceptible? *Science* 1997; 278: 1068-1073.
12. Cosma G., Crofts F., Taioli E., Toniolo P., Garte S.: Relationship between genotype and function of the human CYP1A1 gene. *J Toxicol. Env. Health.* 1993; 40:309-316.
13. Hirvonen A., Pusiainen K.H., Antilla S., Karjalainen A., Vainio H.: Polymorphism in CYP 1A1 and CYP 2D6 genes: Possible association with susceptibility to lung cancer. *Env. Heal.Perspec. Suppl.* 1993; Vol.101(suppl.3):109-112.
14. Schoket B., Phillips D.H., Kostic S., Vincze I.: Smoking associated bulky DNA adducts in bronchial tissue related to CYP 1A1 MspI and GSTM1 genotypes in lung patients. *Carcinogenesis* 1998; 19 (5):841-846.
15. Hayashi S.I., Watanabe J., Nakachi K., Kawajiri K.: PCR detection of an A/G polymorphism with in exon 7 of CYP 1A1 gene: *Nuc. Acids.Res.* 1991; Vol 19 no:17-pp 4797.
16. Hong YS, Chang JH, Kwon OJ, Ham YA, Choi JH.: Polymorphism of the CYP1A1 and glutathione-S-transferase gene in Korean lung cancer patients. *Exp Mol Med.*1998;30(4):192-8.
17. Le Marchand L, Sivaraman L, Pierce L, Seifried A, Lum A, Wilkens LR, Lau AF.:Associations of CYP1A1, GSTM1, and CYP2E1 polymorphisms with lung cancer suggest cell type specificities to tobacco carcinogens. *Cancer Res.* 1998; 58(21):4858-63.
18. Persson I, Johansson I, Lou YC, Yue QY, Duan LS, Bertilsson L, Ingelman-Sundberg M.:Genetic polymorphism of xenobiotic metabolizing enzymes among Chinese lung cancer patients. *Int J Cancer.* 1999; 81(3):325-9.

19. Quinones L, Berthou F, Varela N, Simon B, Gil L, Lucas D.:Ethnic susceptibility to lung cancer: differences in CYP2E1, CYP1A1 and GSTM1 genetic polymorphisms between French Caucasian and Chilean populations. *Cancer Lett.* 1999; 141(1-2):167-71.
20. Coles B, Ketterer B. :The role of glutathione and glutathione transferases in chemical carcinogenesis.*Crit Rev Biochem Mol Biol.* 1990;25(1):47-70.
21. Harada, S.; Abei, M.; Tanaka, N.; Agarwal, D.P.; Goedde, H.W.: Liver glutathione S-transferase polymorphism in Japanese and its pharmacogenetic importance. *Hum.Genet.* 1987; 75:322-325.
22. Board, P.G.: Biochemical genetics of glutathione S-transferase in man. *Am.J.Hum.Genet.* 1981; 33: 36-43.
23. Grinberg-Funes RA, Singh VN, Perera FP, Bell DA, Young TL, Dickey C, Wang LW, Santella RM.:Polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in smokers and their relationship to micronutrient levels and the glutathione-S-transferase M1 genotype. *Carcinogenesis.* 1994 ;15(11):2449-54.
24. Zhong, S.; Wolf, C.R.; Spurr, N.K.: Relationship between the GSTM1 genetic polymorphism and susceptibility to bladder, breast and colon cancer. *Carcinogenesis* 1993; 14: 1821-1824.
25. Houlston RS.:Glutathione S-transferase M1 status and lung cancer risk: a meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1999; 8(8):675-82.
26. Nakajima T, Elovaara E, Anttila S, Hirvonen A, Camus AM, Hayes JD, Ketterer B, Vainio H.:Expression and polymorphism of glutathione S-transferase in human lungs: risk factors in smoking-related lung cancer. *Carcinogenesis.* 1995 ,16(4):707-11.
27. Nazar-Stewart V, Motulsky AG, Eaton DL, White E, Hornung SK, Leng ZT, Stapleton P, Weiss NS.:The glutathione S-transferase mu polymorphism as a marker for susceptibility to lung carcinoma.*Cancer Res.* 1993; 15;53(10 Suppl):2313-8.
28. Kim JW, Lee CG, Park YG, Kim KS, Kim IK, Sohn YW, Min HK, Lee JM, Namkoong SE.:Combined analysis of germline polymorphisms of p53, GSTM1,

GSTT1, CYP1A1, and CYP2E1: relation to the incidence rate of cervical carcinoma. *Cancer*. 2000; 88(9):2082-91.

29. Lin H.J., Probst-Hensch N.M., Ingles S.A., et al: Glutathione Transferase (GSTM1) null genotype, smoking, and prevalence of colo-rectal adenomas. *Can.Res.* 1995; 55:1224-1226.

30. Nyberg F, Hou SM, Hemminki K, Lambert B, Pershagen G.: Glutathione S-transferase mu1 and N-acetyltransferase 2 genetic polymorphisms and exposure to tobacco smoke in nonsmoking and smoking lung cancer patients and population controls. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1998; 7(10):875-83.

31. Garcia-Closas M, Malats N, Silverman D, Dosemeci M, Kogevinas M, Hein DW, Tardon A, Serra C, Carrato A, Garcia-Closas R, Lloreta J, Castano-Vinyals G, Yeager M, Welch R, Chanock S, Chatterjee N, Wacholder S, Samanic C, Tora M, Fernandez F, Real FX, Rothman N.: NAT2 slow acetylation, GSTM1 null genotype, and risk of bladder cancer: results from the Spanish Bladder Cancer Study and meta-analyses. *Lancet*. 2005 Aug 20-26;366(9486):649-59.

32. Steinhoff C, Franke KH, Golka K, Thier R, Romer HC, Rotzel C, Ackermann R, Schulz WA. Glutathione transferase isozyme genotypes in patients with prostate and bladder carcinoma. *Arch Toxicol.* 2000 Nov;74(9):521-6.

33. Aktas D, Ozen H, Atsu N, Tekin A, Sozen S, Tuncbilek E. Glutathione S-transferase M1 gene polymorphism in bladder cancer patients. A marker for invasive bladder cancer? *Cancer Genet Cytogenet.* 2001 Feb;125(1):1-4.

34. Seigard, J.; Vorachek, W.R.; Pero, R.W.; Pearson, W.R.: hereditary differences in expression of the human glutathione transferase active on trans-stilbene oxide are due to a gene deletion. *Proc.Nat.Acad.Sci.* 1988; 85: 7293-7297.

35. London SJ, Daly AK, Cooper J, Navidi WC, Carpenter CL, Idle JR.: Polymorphism of glutathione S-transferase M1 and lung cancer risk among

African-Americans and Caucasians in Los Angeles County, California. *J Natl Cancer Inst.* 1995; 87(16):1246-53.

36. Le Marchand L, Sivaraman L, Pierce L, Seifried A, Lum A, Wilkens LR, Lau AF.:Associations of CYP1A1, GSTM1, and CYP2E1 polymorphisms with lung cancer suggest cell type specificities to tobacco carcinogens. *Cancer Res.* 1998; 58(21):4858-63.

37. Chen CL, Liu Q, Relling MV.:Simultaneous characterization of glutathione S-transferase M1 and T1 polymorphisms by polymerase chain reaction in American whites and blacks. *Pharmacogenetics.* 1996; 6(2):187-91.

38. Levine, A.J.; Mohammad, J.; Finlay, C.A.: The p53 tumour suppressor gene. *Nature* 351: 453-456, 1991.

39. Cetin-Atalay R, Ozturk M. P53 mutations as fingerprints of environmental carcinogens. *Pure App.Chem.* 2000 72(6): 995-999.

40. Iggo, R.; Gatter, K.; Bartek, J. et al.: Increased expression of mutant forms of p53 oncogene in primary lung cancer. *Lancet* 335: 675-679, 1990.

41. Chung, R.Y.; Whaley, J.M.; Anderson, K.M.; Freiman, R.N. et al.: P53 gene mutations in human glioblastomas associated with early age onset and better survival. *Am.J.Hum.Genet* 47 (suppl.): A4, 1990

42. Lee, J.M.; Bernstein, A.: P53 mutations increase resistance to ionizing radiation. *Proc.Nat.Acad.Sci.* 90: 5742-5746, 1993.

43. Caelles, C.; Helmborg, A.; Karin, M.: p53- dependent apoptosis in the absence of transcriptional activation of p53- target genes. *Nature* 370: 220-223, 1994.

44. Jung I, Messing E. : Molecular mechanisms and pathways in bladder cancer development and progression.*Cancer Control.* 2000 Jul-Aug;7(4):325-34.

45. P.Walsh,A.B.Retik,E.D.Vaughan,A.J.Wein Bladder :Campbell's Urology. Bladder Cancer 7th. Edition. Saunders Company. 1997, Vol 3 . 2329-2383.

46. Urinary bladder. In: American Joint Committee on Cancer.: AJCC Cancer Staging Manual. 6th ed. New York, NY: Springer, 2002, pp 335-340.

47. Wiede J., Steijns L.S.W.: cytochrome p450 enzyme system: genetic polymorphism and impact on clinical pharmacology. *Ann.Clin.Biochem* 1999; 36:722-729.

48. Brookes P., Lawley D.: Evidence for the binding of polynuclear aromatic hydrocarbon to the nucleic acids of mouse skin: relation between carcinogenic power of hydrocarbons and their binding to deoxyribonucleic acid. *Nature* 1964; 202:781-784.

49. Jett J.R., Moses H.L., Branum E.L., Taylor W.F., Fontana R.S.: Benzopyrene metabolism and blast transformation in peripheral blood mononuclear cells from smoking and nonsmoking populations and lung cancer patients. *Cancer* 1978; 41:192-200.

50. Raunio H, Husgafvel-Pursiainen K, Anttila S, Hietanen E, Hirvonen A, Pelkonen O.: Diagnosis of polymorphisms in carcinogen-activating and inactivating enzymes and cancer susceptibility. *Gene*. 1995;159(1):113-21.

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

52. Smith C.A.D., Harrison D.J.: Association between polymorphism in gene for microsomal epoxide hydrolase and susceptibility to emphysema. *Lancet* 1997; vol 350:630-633.

53. Zhang Y.J., Weksler B.B., Wang L.Y., Schwartz J., Santella R.M.: Immunohistochemical detection of polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA damage in human blood vessels of smokers and non-smokers. *Atherosclerosis* 1998; 140:325-331.

54. Petruzzelli S, Camus AM, Carrozzi L, Ghelarducci L, Rindi M, Menconi G, Angeletti CA, Ahotupa M, Hietanen E, Aitio A, et al.: Long-lasting effects of

tobacco smoking on pulmonary drug-metabolizing enzymes:a case-control study on lung cancer patients.Cancer Res. 1988; 48(16):4695-700.

55. Rushmore T.H.; Pickett C.B.: Glutathione S-Transferases, Structure, Regulation, and Therapeutic Implications. J.Biol. Chem. 1993; 268, 11475-11478.

56. Strange, R.C.; Faulder, C.G.; Davis, B.A.; Hume, R. et al.: The human glutathione S-transferases: studies on the tissue distribution and genetic variation of GST1, GST2, GST3 isozymes. Ann.Hum.Genet. 1984; 48: 11-20.

57. Pearson, W.R.; Vorachek, W.R.; Xu S.J.; Berger, R. et al.: Identification of Class-mu Glutathione Transferase Genes GSTM1-GSTM5 on Human Chromosome 1p13. Am.J.Hum.Genet. 1993; 53:220-223 .

58. Boyland E., Chasseaud L.F.: The role of glutathione and glutathione S-transferases in mercapturic acid biosynthesis. Adv. Enzymol. 1969; 32:173-178.

59. Berhane K, Widersten M, Engstrom A, Kozarich JW, Mannervik B.:Detoxication of base propenals and other alpha, beta-unsaturated aldehyde products of radical reactions and lipid peroxidation by human glutathione transferases. Proc Natl Acad Sci U S A. 1994; 91(4):1480-4.

60. Warholm M, Guthenberg C, Mannervik B. : Molecular and catalytic properties of glutathione transferase mu from human liver: an enzyme efficiently conjugating epoxides. Biochemistry. 1983 , 22(15):3610-7.

61. Comstock, K.E.; Sanderson, J.S.; Clafin, G.; Henner, W.D.: GST1 gene deletion determined by Polymerase Chain Reaction. Nucleic Acids Res. 1990; 18, 3670.

62. Israeli D, Patael Y, Friedman T, Friedman E. The m2 and m4 polymorphisms in CYP1A1 by NcoI digest-revision of detection method. Hum Mutat. 2000 Jan;15(1):120.

63. Shields PG, Bowman ED, Harrington AM, Doan VT, Weston A. :Polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in human lung and cancer susceptibility genes. Cancer Res. 1993 ;53(15):3486-92.

64. Miller, S.A.; Dykes, D.D.; Polesky, H.S.: Simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acid Res.* 16/3: 1988 ; 1215.

65. Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White Tj: PCR protocols; A guide to methods and applications. Academic Press. 1990 p153-158.

66. Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T.: In vitro amplification of DNA by the Polymerase Chain Reaction. In: *Molecular Cloning Laboratory Manual, Vol2* (J. Sambrook, Ed.) CSH Press, Spring Harbor, NY, 1989, pp 14.2-14.35.

67. Miller MC 3rd, Mohrenweiser HW, Bell DA: Genetic variability in susceptibility and response to toxicants. *Toxicol Lett.* 2001 Mar 31;120(1-3):269-80.

68. Verghis SB, Essigmann JM, Kadlubar FF, Morningstar ML, Lasko DD.

Specificity of mutagenesis by 4-aminobiphenyl: mutations at G residues in bacteriophage M13 DNA and G→C transversions at a unique dG(8-ABP) lesion in single-stranded DNA. *Carcinogenesis.* 1997 18(12):2403-14.

69. Denissenko MF, Pao A, Tang M, Pfeifer GP. Preferential formation of benzo[a]pyrene adducts at lung cancer mutational hotspots in P53. *Science.* 1996, 274(5286):430-2.

70. Katoh T, Kaneko S, Kohshi K, Munaka M, Kitagawa K, Kunugita N, Ikemura K, Kawamoto T.: Genetic polymorphisms of tobacco- and alcohol-related metabolizing enzymes and oral cavity cancer. *Int J Cancer.* 1999; 83(5):606-9.

71. Lafuente A, Pujol F, Carretero P, Villa JP, Cuchi A.: Human glutathione S-transferase mu (GST mu) deficiency as a marker for the susceptibility to bladder and larynx cancer among smokers. *Cancer Lett.* 1993; 15;68(1):49-54.

72. Brockmöller J., Kerb R., Drakoulis N., Nitz M., Roots I.: Genotype and Phenotype of Glutathione S-Transferase Class μ isoenzyme μ and Ψ in lung cancer patients and controls. *Can. Res.* 1993; 53:1004-1011.

73. Chenevix-Trench G, Young J, Coggan M, Board P.:Glutathione S-transferase M1 and T1 polymorphisms: susceptibility to colon cancer and age of onset.Carcinogenesis. 1995; 16(7):1655-7.
74. Hsieh LL, Huang RC, Yu MW, Chen CJ, Liaw YF.:L-myc, GST M1 genetic polymorphism and hepatocellular carcinoma risk among chronic hepatitis B carriers. Cancer Lett. 1996; 103(2):171-6.
75. Lee SJ, Cho SH, Park SK, Kim SW, Park MS, Choi HY, Choi JY, Lee SY, Im HJ, Kim JY, Yoon KJ, Choi H, Shin SG, Park TW, Rothman N, Hirvonen A, Kang D. Combined effect of glutathione S-transferase M1 and T1 genotypes on bladder cancer risk. Cancer Lett. 2002 Mar 28;177(2):173-9.
76. Martone T, Vineis P, Malaveille C, Terracini B. Impact of polymorphisms in xeno(endo)biotic metabolism on pattern and frequency of p53 mutations in bladder cancer. Mutat Res. 2000 Apr;462(2-3):303-9.
77. Srivastava DS, Mishra DK, Mandhani A, Mittal B, Kumar A, Mittal RD. Association of genetic polymorphism of glutathione S-transferase M1, T1, P1 and susceptibility to bladder cancer. Eur Urol. 2005 Aug;48(2):339-44.
78. Vineis P. The relationship between polymorphisms of xenobiotic metabolizing enzymes and susceptibility to cancer. Toxicology. 2002 Dec 27;181-182:457-62.
79. Jong Jeong H, Jin Kim H, Young Seo I, Ju Kim H, Oh GJ, Cheon Chae S, Sik Lim J, Taeg Chung H, Joong Kim J. Association between glutathione S-transferase M1 and T1 polymorphisms and increased risk for bladder cancer in Korean smokers. Cancer Lett. 2003 Dec 30;202(2):193-9.
80. Brockmoller J, Cascorbi I, Kerb R, Roots I. Combined analysis of inherited polymorphisms in arylamine N-acetyltransferase 2, glutathione S-transferases M1 and T1, microsomal epoxide hydrolase, and cytochrome P450 enzymes as modulators of bladder cancer risk. Cancer Res. 1996 Sep 1;56(17):3915-25.

81. Moore LE, Wiencke JK, Bates MN, Zheng S, Rey OA, Smith AH. Investigation of genetic polymorphisms and smoking in a bladder cancer case-control study in Argentina. *Cancer Lett.* 2004 Aug 10;211(2):199-207.
82. Toruner GA, Akyerli C, Ucar A, Aki T, Atsu N, Ozen H, Tez M, Cetinkaya M, Ozcelik T. Polymorphisms of glutathione S-transferase genes (GSTM1, GSTP1 and GSTT1) and bladder cancer susceptibility in the Turkish population. *Arch Toxicol.* 2001 Oct;75(8):459-64.
83. Gumus E, Erdamar S, Demirel G, Horasanli K, Kendirci M, Miroglu C. Association of positive serum anti-p53 antibodies with poor prognosis in bladder cancer patients. *Int J Urol.* 2004 Dec;11(12):1070-7.
84. Habuchi T, Marberger M, Droller MJ, Hemstreet GP 3rd, Grossman HB, Schalken JA, Schmitz-Drager BJ, Murphy WM, Bono AV, Goebell P, Getzenberg RH, Hautmann SH, Messing E, Fradet Y, Lokeshwar VB. : Prognostic markers for bladder cancer: International Consensus Panel on bladder tumor markers. *Urology.* 2005 Dec;66(6 Suppl 1):64-74.
85. Gumus E, Erdamar S, Demirel G, Horasanli K, Ozmen G, Miroglu C. Relation between serum anti-p53 antibodies and microvessel density in bladder cancer patients. *Urol Int.* 2004;73(3):219-25.
86. Kelsey KT, Hirao T, Schned A, Hirao S, Devi-Ashok T, Nelson HH, Andrew A, Karagas MR. A population-based study of immunohistochemical detection of p53 alteration in bladder cancer. *Br J Cancer.* 2004 Apr 19;90(8):1572-6.
87. Marsit CJ, Karagas MR, Andrew A, Liu M, Danaee H, Schned AR, Nelson HH, Kelsey KT. Epigenetic inactivation of SFRP genes and TP53 alteration act jointly as markers of invasive bladder cancer. *Cancer Res.* 2005 Aug 15;65(16):7081-5.
88. Esrig D, Elmajian D, Groshen S, Freeman JA, Stein JP, Chen SC, Nichols PW, Skinner DG, Jones PA, Cote RJ. Accumulation of nuclear p53 and tumor progression in bladder cancer. *N Engl J Med.* 1994 Nov 10;331(19):1259-64.

89. Lopez-Beltran A, Luque RJ, Alvarez-Kindelan J, Quintero A, Merlo F, Requena MJ, Montironi R. Prognostic factors in survival of patients with stage Ta and T1 bladder urothelial tumors: the role of G1-S modulators (p53, p21Waf1, p27Kip1, cyclin D1, and cyclin D3), proliferation index, and clinicopathologic parameters. *Am J Clin Pathol*. 2004 Sep;122(3):444-52.
90. Tzai TS, Tsai YS, Chow NH. The prevalence and clinicopathologic correlate of p16INK4a, retinoblastoma and p53 immunoreactivity in locally advanced urinary bladder cancer. *Urol Oncol*. 2004 Mar-Apr;22(2):112-8.
91. Malats N, Bustos A, Nascimento CM, Fernandez F, Rivas M, Puente D, Kogevinas M, Real FX. P53 as a prognostic marker for bladder cancer: a meta-analysis and review. *Lancet Oncol*. 2005 Sep;6(9):678-86.
92. Llopi J, Alcaraz A, Ribal MJ, Sole M, Ventura PJ, Barranco MA, Rodriguez A, Corral JM, Carretero P. p53 expression predicts progression and poor survival in T1 bladder tumours. *Eur Urol*. 2000 Jun;37(6):644-53.
93. Rodriguez-Alonso A, Pita-Fernandez S, Gonzalez-Carrero J, Nogueira-March JL. p53 and ki67 expression as prognostic factors for cancer-related survival in stage T1 transitional cell bladder carcinoma. *Eur Urol*. 2002 Feb;41(2):182-8.
94. Saint F, Le Frere Belda MA, Quintela R, Hoznek A, Patard JJ, Bellot J, Popov Z, Zafrani ES, Abbou CC, Chopin DK, de Medina SG. Pretreatment p53 nuclear overexpression as a prognostic marker in superficial bladder cancer treated with Bacillus Calmette-Guerin (BCG). *Eur Urol*. 2004 Apr;45(4):475-82.
95. Sarkis AS, Bajorin DF, Reuter VE, Herr HW, Netto G, Zhang ZF, Schultz PK, Cordon-Cardo C, Scher HI. Prognostic value of p53 nuclear overexpression in patients with invasive bladder cancer treated with neoadjuvant MVAC. *J Clin Oncol*. 1995 Jun;13(6):1384-90.
96. Kakehi Y, Ozdemir E, Habuchi T, Yamabe H, Hashimura T, Katsura Y, Yoshida O. Absence of p53 overexpression and favorable response to cisplatin-based neoadjuvant chemotherapy in urothelial carcinomas. *Jpn J Cancer Res*. 1998 Feb;89(2):214-20.

9.ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı: Tülin (Kılıçaslan) Öztürk

Ünvanı: Araştırma Görevlisi Doktor

Doğum Tarihi ve Yeri: 28.12.1974/Yozgat

Tabiyeti: T.C.

Medeni Hali: Evli

Ev Adresi: Atakent 3. etap C11/2 D:37 Küçükçekmece/ İstanbul

Telefon: 212 414 30 00/21712

Cep Telefonu: 0533 3472753

e-mail: kilicaslantulin@yahoo.com

yabancı dil: İngilizce

2-EĞİTİM DURUMU

ilkokul: Fatih İlkokulu / Şefaatli Yozgat

Ortaokul lise: İstanbul Çamlıca Kız lisesi

Üniversite : Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Edirne

3-KATILDIĞI ULUSAL KURSLAR

1. Türk Patoloji Derneği, Gastrointestinal Stromal Tümörler Kursu Aralık 2003
2. Türk Patoloji Derneği, Gastroenteropatik Endokrin Tümörler Kursu Mart 2004
3. Türk Patoloji Derneği, Basic and Application of Molecular Pathology March-2004

4. Türk Patoloji Derneği, Patolojide temel histopatolojik laboratuvar tetkikleri nisan 2004
5. Sitopatoloji Derneği İstanbul toplantısı Nisan 2004
6. Kalıtsal Hastalıkların Moleküler Tıp açısından Değerlendirilmesi ve PCR kursu Mayıs 2004
7. Çukurova Patoloji Derneği ve Sitopatoloji Derneği, Temel Sitopatoloji Kursu Ekim 2004
8. Türk Patoloji Derneği, Gastrointestinal Sistem Patolojisi Günleri Mart 2005
9. Türk Patoloji Derneği, Cerrahi Meme Patolojisi Günleri Nisan 2005
- 10.1. Ulusal Moleküler Tıp Kongresi, Kök hücre kursu Nisan 2005
- 11.VIII. Ulusal Meme Hastalıkları Kongresi, Meme Patolojisi Kursu Eylül 2005
12. Türk Patoloji Derneği, Endokrin Patoloji Günleri Mart 2006

4- KATILDIĞI ULUSAL KONGRELER ve POSTER SUNUMLARI

1. 18. Ulusal Biyokimya Kongresi Mayıs 2004
2. Pleksiform fibrohistiositik tümör olağan dışı yerleşim: Olgu sunumu. A. Midi, TK. Öztürk , C. Demirkese, S. Dervişoğlu. 17. Ulusal Patoloji Sempozyumu Ekim 2004
3. Annüler Tubul Yapımıyla Giden Sex-Cord Stromal Tümör: Olgu sunumu. TK. Öztürk, Z. Calay, Ş. İlvan, N. Oruç. 17. Ulusal Patoloji Sempozyumu Ekim 2004
4. Mezenter Arter Dallarını Tutan Dev Hücreli Arterit. TK. Öztürk, S. Göksel, H. Durak, S. Erdamar, G. Doğusoy. 17. Ulusal Patoloji Sempozyumu Ekim 2004

5. Acral myxoinflammatory fibroblastic sarcoma: S. Dervişoğlu, C. Demirkese, T.K. Öztürk, A.Midi 17. Ulusal Patoloji Sempozyumu Ekim 2004
6. Ulusal Moleküler Tıp Kongresi Nisan 2005
7. Türk toplumunda transizyonel hücreli mesane karsinomlarında p53 immünreaktivitesinin patolojik ve klinik parametrelerle ilişkisi. TK. Öztürk, M. Çetinkaya, H. Durak, C. Çakalır. 18. Ulusal Patoloji Sempozyumu Mayıs 2006

6-ULUSAL MAKALELER

1. Pleksiform fibrhistiyositik tümör: Olgu sunumu: Ahmet MİDİ, Tülin ÖZTÜRK, Cuyan DEMİRKESEN, Sergülen DERVİŞOĞLU. Türk Patoloji Dergisi 2005, cilt 21 sayı 1-2 27-30.
2. Glandüler nörofibrom: Olgu sunumu: Ahmet MİDİ, Tülin ÖZTÜRK, Cuyan DEMİRKESEN, Sergülen DERVİŞOĞLU. Türk Patoloji Dergisi 2005, cilt 21 sayı 1-2 24-26.

5-ÜYE OLDUĞU BİLİMSEL DERNEKLER

- 1- Türk Patoloji Derneği
- 2- Türk Moleküler Tıp Derneği