



T.C

MARMARA ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**MESANE KANSERLİ OLGULARDA
PLAZMA D VİTAMİNİ DÜZEYLERİ VE D VİTAMİNİ RESEPTÖR
GEN POLİMORFİZMLERİNİN HASTALIK VARLIĞINA
ETKİLERİ VE RİSK ÖNGÖRME DEĞERLERİ**

Dr. ÖZGÜR BAYKAN

UZMANLIK TEZİ

İSTANBUL 2013



T.C

MARMARA ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**MESANE KANSERLİ OLGULARDA
PLAZMA D VİTAMİNİ DÜZEYLERİ VE D VİTAMİNİ RESEPTÖR
GEN POLİMORFİZMLERİNİN HASTALIK VARLIĞINA
ETKİLERİ VE RİSK ÖNGÖRME DEĞERLERİ**

Dr. ÖZGÜR BAYKAN

UZMANLIK TEZİ

Danışman: Prof. Dr. GONCAGÜL HAKLAR

İSTANBUL 2013

TEŞEKKÜR

Tezimi tamamlama sürecimde bana yardımcı olan;

Nezaket ve güler yüzünü hiç esirgemeyen danışman hocam Prof. Dr. Goncagül Haklar başta olmak üzere, Prof. Dr. Önder Şirikçi, Prof. Dr. Levent Türkeri, Prof. Dr. Ali Sazcı, Yrd. Doç. Dr. Emel Ergül, Uzm. Dr. İlker Tınay, Araştırma Görevlileri Dr. Murat Akgül, Biyolog Nihal Üren, Dr. Fethullah Gerin, Dr. Medeni Arpa, Dr. Duygu Altınok, Dr. Ali Yaman, Dr. Dilber Ramazan Çoban, Kim. Pınar Özdilek ile örnekleri toplama ve/veya analiz etme sürecinde yardımlarını esirgemeyen; Güner Ekşi, Cüneyt Türkmen, Zeynep Tophan, Nergis Öztürk, Meral Eker, Emine Kara ve Sema Eroğlu nezdinde laboratuvarımızın tüm çalışanlarına,

Tez aşamasına gelme yolunda geçirdiğim eğitim serüveninde katkılarından dolayı;

Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Nesrin Kartal Özer, öğretim üyelerimiz Prof. Dr. Süha Yalçın, Prof. Dr. Goncagül Haklar, Prof. Dr. Önder Şirikçi, Doç. Dr. Betül Karademir ve Yrd. Doç. Dr. Saime Batırel'e

Aslında doğduğum gün başlayan bu eğitim maratonunda desteklerini hiç esirgemeyen canım anne ve babama,

Bu zorlu maratonda gösterdikleri sabır ve anlayıştan dolayı sevgili eşim ve biricik oğluma,

Sonsuz teşekkürler...

ÖZET

Mesane kanseri erkeklerde en sık görülen dördüncü kanserdir. Etiyolojisinde sigara en önemli risk faktörü iken hastaların %40'ında sebebin ne olduğu tam olarak bilinmemektedir. Çalışmamızda, ürotelyal tip mesane kanserlerinin etiolojisinde, D vitamini düzeyi ve D vitamini reseptör geninde yaygın görülen rs1544410 (*BsmI*), rs2228570 (*FokI*), rs731236 (*TaqI*) ve rs7975232 (*Apal*) tek nükleotid polimorfizmlerinin hastalık oluşumundaki etkilerini araştırmak amaçlandı.

Çalışmamıza ürotelyal tip mesane kanseri tanısı almış 101 hasta ile benzer yaş ve cinsiyet özellikleri taşıyan, kendisi ve ailesinde kanser öyküsü bulunmayan, 109 sağlıklı kontrol alındı. D vitamini düzeyleri HPLC yöntemi kullanarak, VDR polimorfizmleri ise polimeraz zincir reaksiyonu-restriksiyon fragman uzunluk polimorfizmi yöntemi kullanarak belirlendi.

FokI polimorfizmi *FF*, *Ff* ve *ff* genotip sıklıkları hasta grubunda sırasıyla %60.4, %31.7 ve %7.9 iken kontrol grubunda %44, %47.7 ve %8.3 olarak gözlemlendi ($p=0.048$). *FF* genotip sıklığı hasta grubunda istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek iken ($p=0.018$), *Ff* genotip sıklığı ise düşük bulundu ($p=0.018$). Kanser oluşumunda risk oluşturabilecek faktörleri öngörmede lojistik regresyon analizi yapılarak, düzeltilmiş OR (OR_{adj}) değerleri hesaplandı. Sigara kullanma öyküsü ve *FokI* polimorfizmi birlikte değerlendirildiğinde genotip dağılımı ve allel frekansının kanser riskini öngörmede istatistiksel olarak anlamlı derecede etkili olmadığı, sigaranın ise mesane kanseri riskini 7.27 kat artırdığı gözlemlendi. ($OR_{adj}= 7.27$; %95 GA= 3.8–13.9; $p<0.001$) *TaqI*, *Apal* ve *BsmI* genotip ve allel dağılımları açısından ise gruplar arasında fark gözlenmedi. Araştırdığımız polimorfik bölgelerin tümünde, hem hasta hem de kontrol grubu bireylerin genotip dağılımları Hardy-Weinberg dengesinde bulundu. D vitamini düzeyleri ile mesane kanseri arasında ise istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmadı.

Anahtar Sözcükler: VDR, D vitamini, polimorfizm, mesane, kanser

ABSTRACT

Bladder cancer is the fourth most common cancer in men. Although smoking is known to be the most important etiological factor in bladder cancer, etiology in 40% of the remains to be unknown. In our study we aimed to investigate the contribution of vitamin D levels and four common single nucleotid polymorphisms rs1544410 (*Bsml*), rs2228570 (*FokI*), rs731236 (*TaqI*), rs7975232 (*Apal*) in the vitamin D receptor gene to the development of urothelial bladder cancer.

Age and gender matched 101 patients diagnosed as urothelial bladder cancer and 109 healthy individuals who has no history of cancer in their first degree relative were included in the study. Polymerase chain reaction, and restriction fragment lenght polymorphism techniques were used to determine the polymorphisms and plasma 25-hydroxyvitamin D levels were measured with high performance liquid chromatography.

The frequencies of *FokI* polymorphism *FF*, *Ff* and *ff* genotypes were 60.4%, 31.7%, 7.9% in bladder cancer and 44%, 47.7% and 8.3% in control groups, respectively ($p=0.048$). *FF* genotype frequencies were higher ($p=0.018$) in patients with bladder cancer, while *Ff* frequencies were lower ($p=0.018$) compared with control groups. Associations between risk factors and cancer were estimated by calculating OR_{adj} using logistic regression analyses. When smoking status and *FokI* polymorphism analysed together, the effect of genotype and allele frequencies on cancer risk prediction were not statistically significant, however smoking increased bladder cancer risk 7.27 times ($OR_{adj}= 7.27$; 95% CI= 3.8-13.9; $p<0.001$). *TaqI*, *Apal* and *Bsml* genotype and allelic distribution were not different between the groups. The genotype distributions of the polymorphisms were in agreement with Hardy-Weinberg equilibrium among the cases and controls. We could not find any statistically significant association between vitamin D levels and bladder cancer.

Keywords: VDR, vitamin D, bladder, cancer, polymorphism,

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
ÖZET	ii
ABSTRACT	iii
İÇİNDEKİLER	iv
TABLolar DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
SEMBOLLER VE KISALTMALAR.....	viii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Mesane Anatomisi	3
2.2. Mesane Histolojisi.....	3
2.3. Mesane Fizyolojisi	4
2.4. Mesane Kanseri Epidemiyolojisi	4
2.5. Mesane Kanseri Etiyolojisi.....	5
2.6. Mesane Kanseri Patolojisi	6
2.6.1. Ürotelyal tümörler	6
2.6.2. Ürotelyal olmayan tümörler.....	8
2.7. Mesane Kanseri Evrelendirilmesi.....	8
2.8. Mesane Kanseri Tanısı ve Prognostik Belirteçler	9
2.9. Mesane Kanseri Tedavisi	11
2.6. D Vitamini	12
2.6.1. D vitamininin keşfi.....	12
2.6.2. D vitamini metabolizması.....	15
2.6.3. D vitamininin fizyolojik etkileri	17
2.6.4. D vitamini reseptörü.....	18
2.6.5. D vitamininin klinik önemi	20
2.6.6. D vitamini ölçüm yöntemleri.....	21
2.6.7. Referans aralıkları	21
2.6.8. VDR geni	21

3. GEREÇ VE YÖNTEM	24
3.1. Araştırmanın Özellikleri.....	24
3.1.1. Araştırmanın yapıldığı yer ve özellikleri	24
3.1.2. Veri toplama araçları	24
3.2. Plazma D Vitamini Düzeylerinin Belirlenmesi	24
3.2.1. Örneklerin toplanması	24
3.2.2. HPLC yöntemi ile plazma D vitamini düzeylerinin belirlenmesi ...	25
3.3. Genotip Tayini.....	27
3.3.1. Örneklerin toplanması	27
3.3.2. Periferik kandan DNA izolasyonu	27
3.3.3. PCR-RFLP	28
3.4. Verilerin Değerlendirilmesi.....	37
4. BULGULAR.....	38
5. TARTIŞMA.....	49
KAYNAKLAR	54

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1. İnvaze ve invaze olmayan ürotelyal neoplazilerin sınıflandırılması. .	7
Tablo 2. Mesane kanserlerinin TNM sınıflaması (2009).....	8
Tablo 3. Polimeraz zincir reaksiyonu koşulları.	29
Tablo 4. VDR geni SNP tespitinde kullanılan primerler.	31
Tablo 5. SNP tayininde kullanılan enzimler, alleller ve bantları.	32
Tablo 6. Enzimler ve kesim bölgeleri.	33
Tablo 7. Enzimler ile PCR ürünlerinin kesim şartları.	34
Tablo 8. Poliakrilamid jel elektroforezi koşulları.	34
Tablo 9. Hasta ve kontrol grubu katılımcılarının cinsiyet dağılımları.	38
Tablo 10. Yaş verileri açısından grupların her 2 cinsiyette karşılaştırılması.	39
Tablo 11. Grupların VKİ değerlerinin karşılaştırılması.....	40
Tablo 12. Hasta ve kontrol grubunda sigara kullanım oranları.	40
Tablo 13. Cinsiyetlere göre sigara kullanım oranları.	41
Tablo 14. Maruz kalınan “paket yılı” sigara ortancaları.	42
Tablo 15. Hasta ve kontrol grupları alkol kullanım verileri.	43
Tablo 16. Alkol kullanım durumlarının cinsiyetlere göre karşılaştırılması.....	43
Tablo 17. Cinsiyetlere göre ek hastalık varlığının karşılaştırılması.	44
Tablo 18. Katılımcılarda D vitamini eksikliği görülme oranları.	45
Tablo 19. <i>BsmI</i> polimorfizmi genotip dağılımları.	46
Tablo 20. <i>FokI</i> polimorfizmi genotip dağılımları.	47
Tablo 21. <i>TaqI</i> polimorfizmi genotip dağılımları.	48
Tablo 22. <i>Apal</i> polimorfizmi genotip dağılımları.	48

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. D vitamini metabolizması.	16
Şekil 2. D vitamininin Ca^{+2} ve fosfat metabolizmasındaki rolü.	17
Şekil 3. Steroid hormon reseptörlerinin şematik gösterimi.	19
Şekil 4. VDR'ye bağlanan $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ 'nin şematik gösterimi.	20
Şekil 5. VDR geni polimorfik bölgelerinin şematik gösterimi.	22
Şekil 6. HPLC kromatogram örnekleri.	26
Şekil 7. <i>TaqI</i> ve <i>ApaI</i> PCR şartları.	30
Şekil 8. <i>FokI</i> PCR şartları.	30
Şekil 9. <i>BsmI</i> PCR şartları.	31
Şekil 10. D vitamini düzeyleri açısından grupların karşılaştırılması.	45

SEMBOLLER VE KISALTMALAR

UV-B	: Ultraviyole-B
VDR	: Vitamin D reseptörü
OR _{adj}	: Düzeltilmiş odds oranı
%95 GA	: %95 güven aralığı
HPLC	: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
RFLP	: Restriksiyon fragman uzunluk polimorfizmi
SNP	: Tek nükleotid polimorfizmi
HWE	: Hardy-Weinberg dengesi
SCC	: Skuamöz hücreli karsinom
TUR	: Transüretal rezeksiyon
FGFR3	: Fibroblast büyüme faktör reseptörü 3
DBP	: D vitamini bağlayıcı protein
PTH	: Paratiroid hormon
WBL	: Lökosit lizis solüsyonu
RBCL	: Eritrosit lizis solüsyonu
SS	: Standart sapma
VKİ	: Vücut kitle indeksi

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Mesane kanseri oldukça yaygın görülen kanser türleri arasındadır. Erkeklerde tüm kanserler arasında 4. sıklıkta, genitoüriner kanserlerde ise prostat kanserinden sonra 2. sıklıkta görülmektedir (1,2). Etiyolojisinin yaklaşık %40'ından sigara sorumlu olup, 2 ile 6 kat arasında tahmini bir rölatif riske sahiptir. Mesleki etkenler %5–25 oranında suçlanırken, geri kalan %35–55 neden henüz net bir şekilde açıklanamamaktadır (3). Ultraviyole-B (UV-B) ışınlarına daha az maruz kalan coğrafi bölgelerde yaşayanlarda, Afrika kökenli Amerikalılar ve obez kişilerde kansere bağlı mortalitenin daha fazla olduğuna dair verilerin bildirilmesi, bu durumun söz konusu kişilerde gözlenen düşük D vitamini düzeyleri ile ilişkili olabileceğini akla getirmektedir (4). Bu ve benzeri veriler, diğer bazı kanser türlerinin etiyolojisinde rolü olduğu düşünülen, D vitamini eksikliği ya da D vitamini reseptör (*Vitamin D receptor*, VDR) gen polimorfizmlerinin mesane kanseri etiyolojisinde de yer alabileceğini düşündürmektedir.

D vitamini güneş ışınlarının sayesinde ciltten endojen olarak sentezlenebildiği gibi ekzojen yollarla da vücuda alınabilir. Etkisini, biyolojik olarak aktif formu 1,25-dihidroksivitamin D'ye dönüşerek, nükleer steroid hormon reseptör ailesinin bir üyesi olan VDR proteini aracılığıyla göstermektedir. Aktif metabolitin bu proteine spesifik bir şekilde bağlanması, gen ekspresyonunun regülasyonunu ve hedef hücrelerde etki gösterecek proteinlerin yapımını indüklemektedir. Dolayısıyla hücrelerde D vitaminine cevap VDR içeriği ile doğru orantılı olacaktır (5).

D vitamininin kalsiyum metabolizması üzerine bilinen etkileri dışında, immün cevabın düzenlenmesi ve epitel farklılaşması üzerine etkilerini destekler veriler artmaktadır. Ayrıca çeşitli *in vitro* ve hayvan çalışmalarında, birçok kanser türünde D vitamininin kanserlere karşı yararlı etkilerinden bahsedilmektedir. Bu çalışmalarda D vitamininin proliferasyon, invazyon, metastaz ve anjiyogenezin azaltılması yanında hücre diferansiyasyonunun kontrolü üzerinde de etki gösterdiği bildirilmiştir (4,6,7).

Çalışmamızda ele aldığımız mesane kanseri ve D vitamini ilişkisi hakkında literatürde henüz çok az sayıda ve sınırlı araştırmaya rastlanmaktadır. D vitamini ile mesane kanseri ilişkisinin ortaya net bir şekilde konulabilmesi halinde, önlenabilir bir neden rahatlıkla belirlenebilecektir. Bu çalışmada amacımız, sağlıklı kişilerde ve mesane kanserli olgularda D vitamini düzeylerinin ve VDR genindeki rs1544410 (*BsmI*), rs2228570 (*FokI*), rs731236 (*TaqI*) ve rs7975232 (*ApaI*) polimorfizmlerinin hastalık oluşumundaki etkilerini araştırmak, tümör tipi ve/veya evresi ile ilişkilerini inceleyerek bu değişkenlerin riski öngörme kabiliyetlerini tespit etmek ve oluşabilecek risklerin önceden engellenebilmesi yönünde atılabilecek adımları belirleyebilmektir. Bu amaçla T.C. Marmara Üniversitesi Pendik Eğitim ve Araştırma Hastanesi üroloji polikliniğine başvuran ve ürotelyal tip mesane kanseri tanısı almış 101 hasta ile benzer yaş ve cinsiyet özellikleri taşıyan sağlıklı 109 kişiden alınan kan örneklerinden, yüksek performanslı sıvı kromatografisi (*high performance liquid chromatography*, HPLC) yöntemi kullanılarak D vitamini düzeyleri, polimeraz zincir reaksiyonu-restriksiyon fragman uzunluğu polimorfizmi (*polimerase chain reaction-restriction fragment lenght polymorphism*, PCR-RFLP) yöntemi kullanılarak da gen polimorfizmleri belirlenmiştir. Araştırmada amaçladığımız hedeflere ulaştığımızda, çok ciddi ve sık görülen bir sağlık sorunu olan mesane kanseri için risk altındaki kişileri belirleyebileceğimiz ipuçları elde ederek, hastalık oluşumunun engellenebilmesi yönünde adımlar atılabilecektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Mesane Anatomisi

Vücudumuzda idrar depolama ve boşaltma fonksiyonunu üstlenen mesane, pelvik yerleşimli, içi boş, musküler bir organdır. Şekli ve konumu boş ve dolu oluşuna göre değişmektedir. Boş mesane erişkinlerde simfisis pubisin arkasında yer alır. Tabanı erkeklerde rektumla, kadınlarda ise vajina ön duvarı ve uterus ile komşudur. Üst yüzeyinde erkeklerde sigmoid kolon ve ince barsaklar, kadınlarda ise uterus ve ince barsaklar bulunur (8).

2.2. Mesane Histolojisi

Mesanenin iç yüzeyini örten mukoza, 4–8 katlı değişici epitelden oluşmuştur. Mesane boş iken çok katlı bu epitelin yüzeyindeki hücreler oval, derindeki hücreler ise kübik şekilde sıralanırlar. Mesane dolduğunda ise yassı epitel şekline dönüşür. Submukoza tabakasında (lamina propria) her yöne uzanan elastik ve kollajen liflerden oluşan gevşek bağ dokusu ve kapiller damarlar yer alır. Mesane mukozası kas tabakasına gevşek submukoza tabakasıyla bağlanmıştır. Bu da boş mesanenin iç yüzünün plikalı ve buruşuk bir görünüme sahip olmasına, dolu mesanede ise duvarın gerilmesiyle bu kıvrımların kaybolup, düz görünmesine neden olur. Trigon bölgesi ise submukoza bulunmaması ve mukozanın kas tabakasına sıkıca bağlı olması nedeniyle her zaman düz görünümündedir (8).

Kas yapısı düzensiz bir şekilde her yöne uzanan liflerden oluşmuştur. Detrüsör olarak adlandırılan bu yapı mesane boynunda belirgin 3 tabaka oluşturur ve bir kısmı kadında üretranın eksternal meatusuna, erkekte prostatik üretranın distaline kadar uzanır ve kısmen prostatın yapısına katılır. Mesane ile birlikte diğer pelvik organların en dış tabakasını örten seroza (adventisya) gerçek seroza yapısında olmayıp, kollajen ve bir kaç elastik kas

lifinden oluşur. İçinde kan damarları, küçük sinirler ve çok küçük ganglionlar bulunur (8).

2.3. Mesane Fizyolojisi

Mesane iç yüzeyini kaplayan üroepitel veya histolojik olarak transizyonel hücreli epitel olarak da adlandırılan çok katlı epitel yapısının absorpsiyon özelliği çok düşük, buna karşın genişleyebilme özelliği oldukça fazladır. Seroza ve üroepitel arasında kalan ve detrüsör olarak adlandırılan kas yapısı, üreter ya da gastrointestinal sistemde izlenen, belirgin olarak birbirinden ayrı sirküler ve longitudinal tabakalardan ziyade, rastgele yönlerde demetler haline gelmiş miyofibrillerden oluşmaktadır. Bu sayede belirli bir hacme kadar, gerildikçe gevşeyerek içinde biriken idrarı düşük basınçlarda depolayabilmektedir. Miksiyon ihtiyacı durumunda ise sürekli ve eşgüdümlü bir kontraksiyonla hiç idrar kalmayacak şekilde içeri boşaltabilmektedir. İşlevsel mesane kapasitesi erişkinde 400–500 mL kadardır. Ancak miksiyon sıklıkları ve hacimleri çok geniş kişisel farklılıklar gösterebilmektedir (9).

2.4. Mesane Kanseri Epidemiyolojisi

Mesane kanseri ülkemizde 2. en sık görülen üriner sistem kanseridir. Sağlık Bakanlığı verilerine göre ülkemizde tüm kanserler arasında erkeklerde %7.48 genel popülasyonda da %4.86 sıklıkta görülmektedir. Amerika Birleşik Devletleri (ABD) verilerinde ülkemiz verilerine benzer şekilde erkeklerde en sık görülen 4. kanser olup %7 oranında gözlemlendiği bildirilmiştir. Yine ABD’de erkeklerde kanserden ölüme mesane kanseri 8. sıradadır ve tüm kanserlere bağlı ölümlerin %3’ünü oluşturmaktadır. Mesane kanseri erkeklerde kadınlardan 3–4 kat daha fazla sıklıkta gözlenmektedir. Sigara kullanım sıklığı ve çevresel etkenlere erkeklerin daha fazla maruz kalmasının bu durumda rolü olabileceği düşünülmektedir. Rusya’da ve Asya ülkelerinde

sigara kullanım prevalansındaki artış ile birlikte mesane kanseri insidansı da artmıştır. 40 yaş altı bireylerde oldukça nadir görülmekte olup genellikle iyi diferansiye ve agresif değildir. İnsidans ve mortalite sıklığı yaşla birlikte artmaktadır. Ortanca görülme yaşı hem erkek, hem de kadınlarda 70'tir. Histolojik tipi de coğrafi olarak değişkenlik göstermektedir. Kuzey Amerika ve Avrupa'da %95–97, Afrika ülkelerinde ise %60–90 oranında ürotelyal tip görülür. Mısır'da *Schistosoma Hematobium* enfeksiyonuna bağlı skuamöz hücreli tip sık görülmektedir. Skuamöz hücreli karsinomun (*squamous cell carcinoma*, SCC) agresif seyri nedeniyle Mısır'da mesane kanserinden ölüm, Avrupa'dan 3 kat, Kuzey Amerika'dan 8 kat daha fazladır (1,2,10).

2.5. Mesane Kanseri Etiyolojisi

Etiyolojik faktörler arasında genetik yatkınlık, sigara, mesleki karsinojenlere maruziyet, beslenme alışkanlıkları, analjezik kullanımı, enfeksiyonlar, radyasyon, kemoterapi ve herediter nedenler sayılabilir. Ürotelyal kanser oluşumunda sigara en önemli etiyolojik faktördür. Sigara kullanıldığı süre ve miktarla ilişkili olarak değişmekle birlikte riski 2–6 kat artırmaktadır. İçilen tütün tipi ile kanser arasında da ilişki bildirilmiştir. Siyah tütündeki aromatik amin miktarının sarı tütünden daha fazla olması riski daha da artırmaktadır. Mesleki karsinojenler mesane kanseri etiyolojisinde sigaradan sonra 2. sırada yer almaktadır. Olguların yaklaşık %20'si endüstriyel ürünlere maruziyet sonucu ortaya çıkmaktadır. Boya, lastik, deri, kâğıt, kozmetik ve petrol sanayisinde çalışan işçilerin sıklıkla maruz kalabildiği benzidin, β naftilamin, arsenik, benzopiren, 4-aminobifenil gibi kimyasallar etiyolojik ajanlardır. Besin öğeleri ve/veya metabolitlerinin idrar ile atılması, mesanenin bunlara uzun süre maruz kalabilmesine neden olduğundan kanser etiyolojisinde suçlanmaktadır. Meyve ve sebzelerde bulunan polifenoller, antioksidanlar ve enzimler nitrozaminlerin detoksifikasyonunda rol alırlar. Bu nedenle, akdeniz diyetiyle beslenen bireylerin mesane kanserine yakalanma riski standart diyete göre daha düşük bulunmuştur. *Schistosoma*

Hematobium ve diğer ajanların neden olduğu kronik enfeksiyonların da skuamöz hücreli mesane kanseri ile yakın ilişkisi bilinmektedir. Kemoterapötik ajanlardan siklofosfamid doz ve süre bağımlı olarak mesane kanseri etiyolojisinde rol almaktadır (10,11).

2.6. Mesane Kanseri Patolojisi

Mesane kanserlerinin %90'ı ürotelyal kökenli olup, %5'i skuamöz, geriye kalanları ise adenokarsinom ve diğer tiplerden oluşmaktadır. Yüksek dereceli ürotelyal kanserlerde mikroskopik olarak glandüler ve skuamöz metaplazi bulunabilir. Daha nadir görülen tümör tipleri tek başına bulunduğu zaman anlamlıdır ve prognozu genellikle daha kötüdür. Çünkü lokal invazyon yapma eğilimleri ürotelyal kanserlerden daha fazla olup kemoterapi ve radyoterapiye duyarlılıkları da daha azdır.

Ürotelyal kanserlerde tümörün histopatolojik derecelendirilmesi de tedavi ve prognoz açısından oldukça önemlidir. Günümüzde ürotelyal tümörlerin derecelendirilmesinde 2004 Dünya Sağlık Örgütü sınıflaması kullanılmaktadır. Ürotelyal tümörler mitotik aktivite artışı, düzensiz büyüme paterni gibi birtakım histopatolojik bulgular varlığı veya bu bulguların şiddetine göre yüksek veya düşük olmak üzere 2 derecede sınıflandırılmaktadır (10,11).

2.6.1. Ürotelyal tümörler

Dünya Sağlık Örgütü'nün 2004 sınıflamasına göre ürotelyal karsinom, invaze olması ve olmamasına göre 2 grupta incelenmektedir (12) (Tablo 1). Mesane kanserlerinin çoğu (%75–80) ilk başvuruda kasa invaze olmamış tümörlerden oluşmaktadır (Ta,T1 ve karsinoma in situ). Karsinoma in situ yüksek dereceli bir yüzeysel mesane tümörü olup tanı esnasında invazyon göstermese de 5 yıl

içerisinde %60–80 oranda invaziv mesane kanserine ilerlemekte ve hastaların %39’unda ölüm sebebi olmaktadır (13).

Tablo 1. İnvaze ve invaze olmayan ürotelyal neoplazilerin sınıflandırılması.

İnvaze Olmayan Ürotelyal Neoplaziler
Hiperplazi
Reaktif atipi
Önemi bilinmeyen atipi
Ürotelyal displazi
Ürotelyal karsinoma in situ
Ürotelyal papillom
Ürotelyal papillom invert tip
Düşük malign potansiyelli papiller ürotelyal neoplazm
Düşük dereceli papiller ürotelyal karsinom
Yüksek dereceli papiller ürotelyal karsinom
İnvaze Olan Ürotelyal Neoplaziler
Lamina propria invazyonu
Muskularis propria invazyonu

2.6.2. Ürotelyal olmayan tümörler

Bu tümörler %5–10 oranında görülmektedir. Tanıları genelde ileri evrelerde konulmakta ve çoğunda radikal sistektomi yanında adjuvan ve neoadjuvan kemoterapiye ihtiyaç duyulmaktadır. Mesanenin ürotelyal olmayan epitelyal tümörlerinin başında skuamöz hücreli karsinom gelir. *Schistosoma Hematobium* isimli parazitin sebep olduğu kronik irritasyon, kronik kateter irritasyonu, kronik enfeksiyon ve mesane divertikülü gibi nedenler skuamöz hücreli karsinom gelişme riskini artırmaktadır. Adenokarsinom primer olarak mesane tümörlerinin % 2’den azını oluştururken, küçük hücreli karsinom yaklaşık %1.7 oranında görülmektedir (14).

2.7. Mesane Kanseri Evrelendirilmesi

Mesane tümörü için evreleme sistemi ‘International Union Against Cancer’ (UICC) ve ‘American Joint Commission on Cancer’ (AJCC) tarafından geliştirilmiştir. Primer tümör, lenf nodları ve uzak metastazı içeren TNM sınıflaması Tablo 2’de gösterilmiştir (15).

Tablo 2. Mesane kanserlerinin TNM sınıflaması (2009).

T – Primer Tümör	
T0	Primer tümör varlığına dair bir belirti yok
Ta	İnvaziv olmayan papiller karsinoma
Tis	Karsinoma in situ: “yassı tümör”
T1	Tümör subepitelyal bağ dokuya invazidir
T2	Tümör kas tabakasına invazidir T2a Yüzeyel kas (iç yarı) T2b Derin kas (dış yarı)

T3	Tümör perivezikal dokuya invazedir T3a Mikroskopik olarak T3b Makroskopik olarak (mesane dışında kitle)
T4	Tümör aşağıdakilerden herhangi birisine invazedir: T4a Prostat, uterus veya vajina T4b Pelvik duvar veya abdominal duvar
N - Lenf Nodülleri	
N0	Bölgesel lenf nodu metastazı yok
N1	Gerçek pelviste (hipogastrik, obturator, eksternal iliak veya presakral) tek bir lenf noduna metastaz
N2	Gerçek pelviste (hipogastrik, obturator, eksternal iliak veya presakral) birden fazla lenf noduna metastaz
N3	Ortak iliak lenf nodlarına metastaz
M - Uzak Metastaz	
M0	Uzak metastaz yok
M1	Uzak metastaz var

2.8. Mesane Kanseri Tanısı ve Prognostik Belirteçler

Ağrısız makroskopik hematüri yeni tanı almış mesane kanserli hastaların %85'inde görülen en sık semptomdur. Mikroskopik hematüri ise hemen hemen her hastada gözlenebilir. Hematüri sürekli olmaktan ziyade aralıktır. Hastaların küçük bir kısmında huzursuz mesane, sık acil işeme ve dizüri ile birliktedir. Yaygın karsinoma in situ saptanan hastalarda miksiyon semptomları daha sıktır. Mesane kanserlerinde kesin tanı sistoskopi ile birlikte yapılan biyopsiler ile konulur (10,16,17).

İdrar sitolojisi mesane yüzeyinden dökülen hücrelerin mikroskopik analizidir. Düşük dereceli tümörlerde sitolojinin duyarlılığı %30–60, özgüllüğü

ise %85'in üzerindedir. Rekürren yüksek dereceli tümörlerde ise çok daha etkin olup pozitif tanı koyma değeri %90'ların üzerine çıkmaktadır. Ancak üst üriner sistemi iyi değerlendirememesi, renal parankim, prostat ve nonagresif tümörleri atlayabilmesi, ürotelyal olmayan veya yüzey komponenti az olan invaziv tümörleri değerlendirememesi sınırlılıkları arasında olmasına rağmen özellikle karsinoma in situ ve yüksek dereceli tümörlerde tanı koyma değerlerinin yüksek olması, invaziv olmaması ve ucuz olması halen vazgeçilmez kılmaktadır (11).

Yüzeyel mesane tümörlerinin transüretral rezeksiyon (TUR) ile tedavisi sonrası hastalar belirli dönemlerde sistoskopi, sitoloji ve üst üriner sistem incelemesi gibi yaklaşımlar ile takip edilmelidir. Ancak sistoskopi gibi invaziv yöntemlerden uzaklaşabilmek için son yıllarda tanı ve izlemde yeni belirteçlerin bulunması arayışı hız kazanmıştır (11).

Günümüzde bu alanda yaygın kullanılan tanı koyma araçlarından olan nükleer matriks protein-22, hücre çekirdeği içerisinde bulunur ve hücre çekirdeği yapısının korunmasında rol alır. Mesane kanserli hasta idrarlarında 20 katına kadar çıkabilmektedir. Evre ile de yakın ilişkili olup Ta,T1 ve T2 tümörlerde duyarlılığı sırasıyla %36, %65 ve % 88 olarak bildirilmiştir (10,18). Lewis kan grubu antijen X, erişkin ürotelyal hücrelerinde nadir görülür. Ancak mesane kanserlerinde evre ve dereceden de bağımsız olarak artmaktadır. Mesane kanseri tanısı koymadaki duyarlılık ve özgüllüğü sırasıyla %75 ve %85 olarak raporlanmıştır (10).

Mesane tümörlerinin tanı ve tedavisinin takibinde son yıllarda mikrosatellit analizleri de sıklıkla kullanılmaktadır. Birçok kanserde heterozigosite kaybı (*loss of heterozygosity*, LOH) veya mikrosatellit tekrarlama uzunluğundaki somatik alterasyonlar gözlenmektedir. Heterozigosite kaybı, bir allelin daha önceden inaktive olduğu bir hücrede, kalan allelin de normal fonksiyonunu yitirmesi olarak tanımlanmaktadır. Mesane kanserlerinde 9. kromozomdaki LOH yaygın görülen genetik değişikliklerdendir. Özellikle de uzun koldaki kayıpların kısa koldakilere göre daha fazla prognostik değer taşıdığına dair veriler bildirilmektedir (11,19).

Fibroblast büyüme faktör reseptörü 3 (*fibroblast growth factor receptor* 3, FGFR3) tirozin kinaz reseptör gen ailesinin 4 üyesinden birisidir. FGFR3 gen mutasyonlarının, genin kodladığı fibroblast büyüme faktörü reseptörünün artmış ve uzamış aktivasyonuna neden olduğu bildirilmektedir. Ürotelyal karsinomlar arasında düşük dereceli kasa invaze olamayan papiller tümörlerin %70'inden fazlasında FGFR3 mutasyonları saptanırken, bu oran invazyon gösteren tümörlerde %10-20'dir (19).

Tümör baskılayıcı genlerden p53 mutasyonları birçok tümörde olduğu gibi mesane tümörlerinde de en sık gözlenen genetik değişikliklerden biridir. 17. kromozomun kısa kolunda yer alır. Özellikle ileri evre ve yüksek dereceli tümörlerde görülmekte iken kasa invaze olmayan tümörlerde daha az saptanmaktadır (19).

2.9. Mesane Kanseri Tedavisi

Kasa invaze olmayan mesane tümörleri (Ta,T1,Tis) tanı esnasında hastalığın yaklaşık %70-80'ini oluşturmaktadır. Bunlarında %70'i Ta, %20'si T1 ve %10'u da oldukça invaziv olabilen karsinoma in situ'dur. TUR mesane kanserlerinde genelde ilk tedavi yaklaşımıdır. Yüzeyel tümörlerde tedavi olanağı sağladığı gibi tüm tümörlerde histopatolojik değerlendirme ve evrelemede de kullanılır. Başarılı transüretral tedavilere rağmen, nüks ve progresyon görülmesini önlemek amacıyla, seçilmiş vakalarda intrakaviter immünstimülan ve sitotoksik ilaçlar verilebilir (11,20).

Kasa infiltrate tümörlerin tedavisinde temel amaç kür sağlamaktır. Bu amaçla radikal sistektomi ve mesane koruyucu tedaviler uygulanmaktadır. Mesane koruyucu tedavilerde hedef, tümörü eradike etmekle birlikte yeterli mesane fonksiyonu sağlayabilmektir. Ancak TUR sonrası yapılan radyoterapi ve kemoterapi gibi mesane koruyucu tedaviler her zaman küratif olamamaktadır (11).

2.6. D Vitamini

2.6.1. D vitamininin keşfi

Uzun yıllardır ciddi bir halk sağlığı sorunu olarak önemli yer tutan ve ilk bilimsel tanımı Glisson tarafından 1650'de yapılan raşitizm hastalığı, 20. yy başlarında bile Avrupa ve Kuzey Amerika'da %80'den fazla çocuğu etkilemiş ve çeşitli derecelerde iskelet sorunlarıyla mücadele etmeye mahkûm bırakmıştır. Raşitizm'in bu derece önemli ve yaygın bir halk sağlığı sorunu olması aslında D vitamini keşfini de hızlandıran en önemli faktörlerden biri olmuştur. Bu süreçte bilim adamları çeşitli zamanlarda güneş ışığı veya beslenme ile ilişkili bir takım faktörlerin bu hastalığı önlemede rolleri olduğunu söyleseler de bu durum ancak 1930'lu yıllardan sonra net bir şekilde ortaya konmaya başlanmıştır. 1822'de Sniadecki, Varşova'nın iç bölgelerinde yaşayan çocuklarda raşitizm insidansının hemen yanı başındaki kırsal alanda yaşayanlardan daha fazla olduğunu gözlemlemiş ve raşitizm'e bağlı iskelet anomalilerinin ve büyüme geriliğinin önlenmesinde güneş ışığının önemini vurgulamıştır. 1889 yılında Palm benzer bir açıdan olaya yaklaşarak, Londra ve Glasgow'lu çocukları ciddi şekilde etkileyen bu hastalıktan, çok daha kötü şartlarda büyüyen Hindistan ve Asyalı çocukların etkilenmediğini ve güneşin önleyici ve tedavi edici etkisi olabileceğini belirtmiştir. 1824 yılında Schütte, raşitizm ve osteomalazi tedavisinde morina balığı karaciğerinden ekstrakte edilen yağı önererek olayın bir diğer yönünü vurgulamıştır (21-24).

1906 yılında Hopkins diyetteki bir takım esansiyel faktörlerin raşitizm ve skorbüt gibi hastalıkları önlediği öngörüsünde bulunmuştur. Funk ise benzer bir yaklaşımı biraz ileri taşımış, diyetle normal metabolizma için esansiyel bir takım maddelerin eksikliğinin veya yeterli miktarda olmayışının raşitizm'in ortaya çıkmasında rolü olabileceğini ve bu maddelerin anne sütünde, balık karaciğeri yağında varken, sterilize sütte ve tahıl ürünlerinde olmadığını belirtmiştir. 1919 yılında Huldshinsky, civa lambası ışığı ile raşitik çocuklarda iyileşme tariflemiştir. 1921'de Hess ve Unger raşitik çocukları

hastane çatısına çıkartarak güneş ışığına maruz bıraktıklarında tedavilerinde dramatik iyileşmeler gözlediklerini bildirmişlerdir (21,22,24).

McCollum ve arkadaşlarının 1914'de başlayan çalışmalarında, tereyağından yağda çözünebilen ve genç sıçanlarda kseroftalmi gelişimini önleyen, başlangıçta '*fat soluble factor A*' daha sonra ise vitamin A adını verdikleri bir madde izole etmişlerdir. 1919'da Mellanby yavru köpekler ile çalışma yapmış ve raşitizm'i önlemede '*fat soluble factor A*' nın etkili olduğunu göstermiştir. 1922'de McCollum ve arkadaşları, balık karaciğeri yağının ısıtıldığında ve okside edildiğinde sıçanlardaki kseroftalmiyi önlemezken, raşitizm'i önlediğini bulmuşlardır. Bunun kemik gelişiminde önemli rolü olan bir madde olduğunu ve '*fat soluble factor A*' nın oksidasyon ile etkisiz hale getirilebilirken, bu maddenin aktivitesini kaybetmediğini göstermişlerdir. Sonuç olarak da '*fat soluble factor A*' nın aslında 2 bileşeni bulunduğunu; bunlardan birinin vitamin A, diğerinin ise antiraşitizm faktör olduğunu keşfetmişlerdir. Daha önce keşfedilen '*water soluble factor*'e B vitamini, bilinen '*antiskorbüt faktör*'e C vitamini denildiğinden, bu da D vitamini olarak adlandırılmıştır (24).

Raşitizm'in önlenmesinde UV'nin rolü benzer tarihlerde araştırılmaya devam edilmiştir. 1921'de Hess ve Unger gözlemlerinde güneşin mevsimsel değişikliği ile raşitizm insidansındaki değişikliği, Chick ve arkadaşları ise güneş ışığının, balık karaciğeri yağı gibi raşitizm'de tedavi sağlayabileceğini gözlemlediklerini bildirmişlerdir (24).

İki farklı ucu olduğu düşünülen bu durum 1924'ten sonra yapılan araştırmalarla sarsılmıştır. Hume ve Smith raşitik sıçanların sadece verilen UV ışıktan değil, yaşadıkları kavanozda UV'e maruz kalan içeri dökülmüş yiyecek, feçes ve talaşı daha sonra yiyerek de fayda gördüklerini bulmuşlardır. Goldblatt ve Soames, UV'e maruz kalan sıçanların karaciğerlerini raşitik ratlara verdiklerinde tam iyileşme elde ettiklerini raporlamışlardır. Steenbock ve Black sıçan karaciğerinin dışarıda UV'e maruz kaldığında da aktive olabileceğini düşünmüş ve hiç UV almamış sıçandan çıkardığı karaciğer ve kas dokusunu UV'e maruz bırakarak, UV

almayan raşitik sıçanlara verdiğiinde, kemik kalsifikasyonunda ve büyümesinde artış olduğunu bulmuştur (24).

Prof. Adolf Windaus, 1928 yılında, kolesterol yapıda (ergosterol) vitamin D prekürsörlerinin bulunduğunu ve bunların güneş ışığı ile vitamin D'ye dönüştüğünü göstermesi sonrası Nobel ödülünü kazanmıştır. 1931 yılında Windaus ve arkadaşları, Reerink ve arkadaşları ile eş zamanlı olarak ergosterol'ün UV etkisi sonrası dönüştüğü ürünü saflaştırarak kristalize etmeyi başarmışlar ve adını Vitamin D₂ veya kalsiferol koymuşlardır. Oldukça potent olan bu molekölü 0.01 µg/gün dozda raşitik sıçanlara verdiklerinde, 2 ayda tam iyileşme elde etmişlerdir. Vitamin D₃ veya kolekalsiferol'ün yapısının doğru bir şekilde keşfi ise 1937'de yine Windaus ve arkadaşlarınca domuz derisinden izole edip tanımladıkları 7 dehidrokolesterolün UV'ye maruziyeti sonucu olmuştur (22,24).

1930'lu yıllarda ortaya çıkan tüm bu gelişmeler sonrası özellikle vitamin D₂'nin ergesterolden kolayca sentezlenmesi ve gıdaların vitamin D içeriğinin artırılması sonucu kısa sürede raşitizm'in bir halk sağlığı sorunu olması önlenebilmiştir. Ancak bu durum bir taraftan da D vitamininin pek çok gıdaya hatta biraya bile katılması ile sonuçlanmış ve 1950'de Büyük Britanya da infantlarda patlak veren hiperkalsemi vakalarının ortaya çıkmasında gıdalara aşırı D vitamin takviyesini akla getirmiştir. Her ne kadar bu durum ispatlanmasa da gıdalara D vitamini katılmasının durdurulması ile sonuçlanmışdır. Sonrasında pek çok Avrupa ülkesi de bu yasağı desteklemiş ve sadece margarine ilave edilmesi ile D vitamini eksikliği giderilmeye çalışılmışdır. Günümüzde birçok Avrupa ülkesinde sadece kahvaltılık tahıllar D vitamini ile zenginleştirilmektedir. 1990'lı yıllardan beri Finlandiya ve İsveç'te süte katılarak verilmeye başlanmışdır. Ancak Avrupa'nın bütününe bakıldığında farklı politikalar izlendiği görölmektedir (21). Amerika Birleşik Devletlerinde ise özellikle süt ve süt ürünlerinin bu alanda kullanıldığı bildirilmektedir (25).

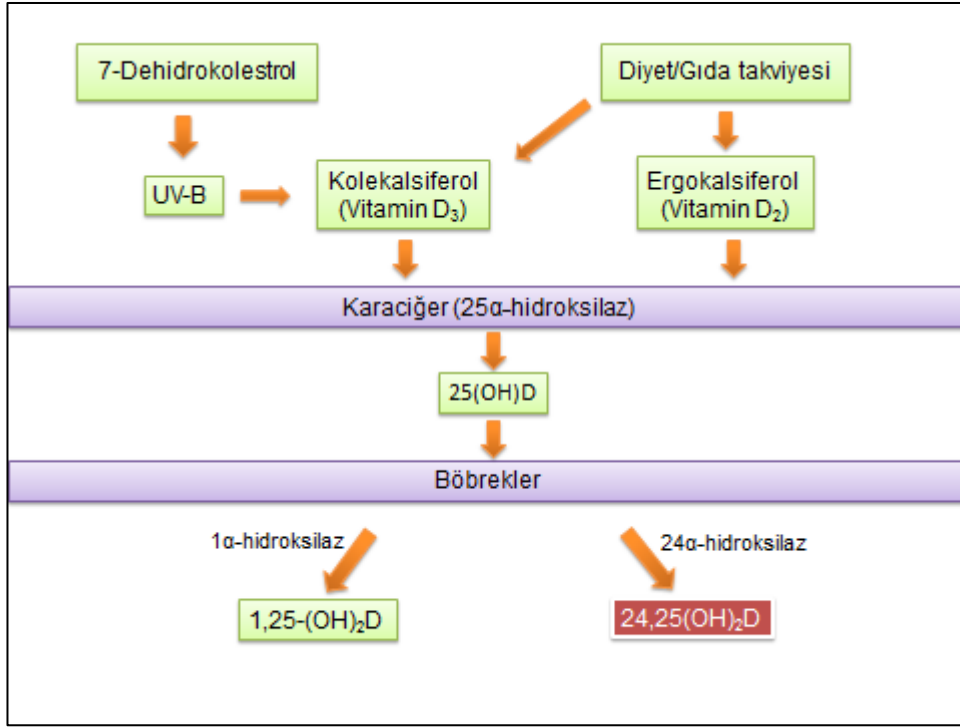
2.6.2. D vitamini metabolizması

D vitamininin bitkisel kaynaklı ergokalsiferol (D_2) ve hayvansal kaynaklı kolekalsiferol (D_3) olmak üzere 2 formu bulunmaktadır. Vücudumuzda D vitamini, cilde güneş ışığı maruziyeti sonrası endojen olarak (D_3) sentezlenebileceği gibi gıdalardan emilerek de (D_2 veya D_3) alınabilir. Vitamin D_2 ticari olarak kullanılmak amacıyla genellikle mantarda bulunan ergosterolün, UV ışık altında ergokalsiferole dönüşmesi sonucu elde edilir. Yapısal olarak ergokalsiferol ve kolekalsiferol birbirlerine oldukça benzerdir. Ergokalsiferolün kolekalsiferolden farkı; yan zincirinde 22 ve 23. karbonlarda çift bağ bulunması ve 24. karbondaki bir metil grubu içermesidir (7).

Kolekalsiferol deride enzimatik olmayan yolla epidermin stratum spinosum ve basale tabakalarında en yüksek konsantrasyonlarda bulunan 7-dehidrokolesterolden oluşmaktadır. 290-320 nm dalga boyları arasında ışık sterol B halkasındaki 9 ve 10. karbonlar arasındaki bağları kırarak halkanın açılmasına neden olur. Halkanın açılması sonucu oluşan previtamin D_3 (sekosterol halka) cilt sıcaklığının etkisiyle 2–3 günden daha uzun bir sürede vitamin D_3 'e dönüşür. Ciltten difüzyon yoluyla dolaşıma geçer ve vitamin D bağlayıcı proteine (*D vitamin binding protein*, DBP) bağlanarak taşınır. Güneş ışığına aşırı maruziyet ise previtamin D_3 'ün biyolojik olarak inaktif formlar olan lumisterol₃ ve takisterol₃ formlarına dönüşmesine neden olur. Melanin gelen ışığın bir kısmını emerek previtamin D_3 oluşumunu azaltır. Yaş ile ciltte bulunan 7-dehidrokolesterol miktarının azaldığı da bildirilmektedir. Ergokalsiferol ise bir bitki sterolü olan ergosterolün benzer şekilde ışığa maruz kalması sonucu meydana gelir (26).

Hem kolekalsiferol, hem de ergokalsiferol biyolojik olarak aktif değildirler. Vitamin D karaciğerde 25 α -hidroksilaz tarafından 25(OH)D'ye dönüşür. Karaciğerde iki 25 α -hidroksilaz enzimi vardır. Major formu mitokondriyal, diğer formu ise düz endoplazmik retikulumda bulunur. Her ikisi de NADPH ve moleküler oksijeni kullanır. Karaciğer dışında barsak, böbrek ve akciğerlerde de 25 α -hidroksilaz aktivitesi vardır. D vitamininin dolaşımdaki ana formu 25(OH)D'dir. Diğer bir hidroksilasyon enzimi olan 25(OH)D-1 α -

hidroksilaz ise proksimal renal tübül hücrelerinin mitokondri iç membranında bulunmaktadır. Aktivite için moleküler oksijen, flavoprotein, ferrodoksin ve sitokrom P450'e ihtiyaç duyar. Böbrekler dışında plasenta ve makrofajların da 1 α -hidroksilaz aktivitesi vardır (26).



Şekil 1. D vitamini metabolizması.

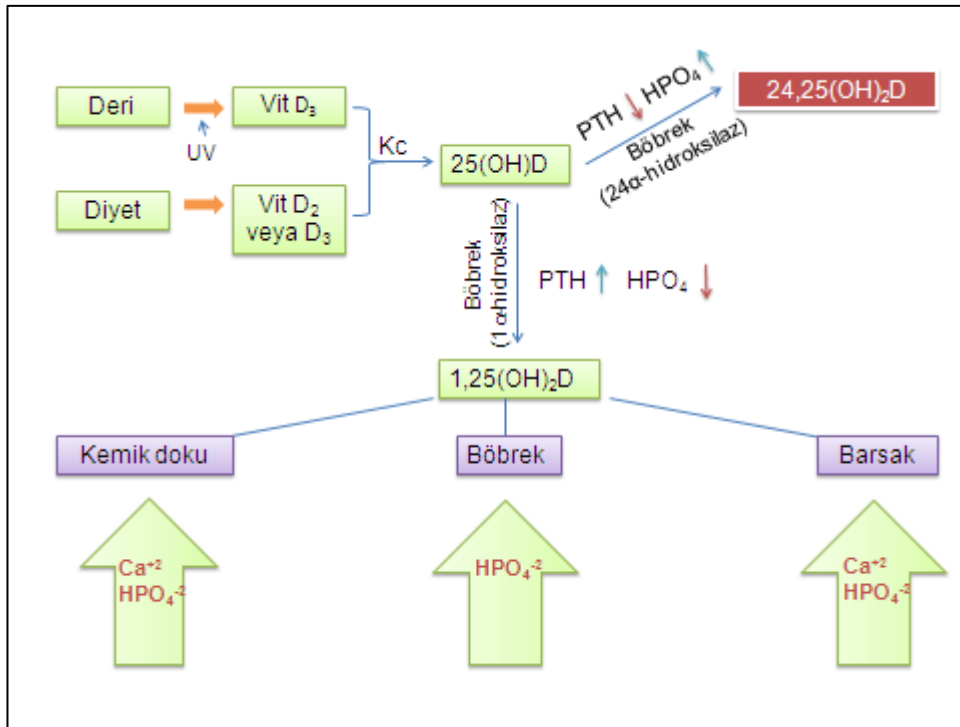
Kolekalsiferol ister ciltten sentezlensin, isterse gıdalarla alınsın, aktif metaboliti olan 1,25(OH)₂D'ye (kalsitriol) dönüşebilmesi için 2 kez hidroksilasyon reaksiyonuna girmelidir (Şekil 1). Gıdalarla alınan ergokalsiferolün de aktif metabolitine (erkalsitriol) dönüşebilmesi için benzer hidroksilasyon basamakları gerekmektedir (27). Her ne kadar 25(OH)D formu biyolojik olarak aktif olsa da, 1,25(OH)₂D'nin reseptöre (VDR) bağlanma isteği bundan 1000 kat daha fazla olduğundan, D vitamini ailesinin biyolojik olarak majör aktif metaboliti 1,25(OH)₂D kabul edilmektedir (28).

Dolaşımda hem 25(OH)D hem de 1,25(OH)₂D, *Gc-Globulin* olarak da bilinen spesifik ve yüksek afiniteli DBP'e bağlanarak taşınır. DBP 51335 Da ağırlığında, 458 aminoasitten oluşan albümin ve α -fetoprotein gen ailesine ait, karaciğerde sentezlenen bir proteindir. Dolaşımdaki 25(OH)D'nin

%0.03'ü, 1,25(OH)₂D'nin ise sadece %0.4'ü serbest formdadır. Gebelik ve östrojen tedavisinde düzeyi artarken nefrotik sendromda azalmaktadır (7).

2.6.3. D vitamininin fizyolojik etkileri

Kan kalsiyum ve fosfat dengesinin düzenlenmesinde 1,25(OH)₂D barsak, kemik, böbrek ya da paratiroid bezler üzerindeki etkisi aracılığıyla önemli rol oynar (Şekil 2).



Şekil 2. D vitamininin Ca⁺² ve fosfat metabolizmasındaki rolü.

1,25(OH)₂D barsaklarda kalsiyum Emilimini öncelikle duodenum'dan, fosfat Emilimini ise jejunum ve ileum'dan stimüle eder. DBP'e bağlı olarak gelen 1,25(OH)₂D ince barsaklarda ayrılarak serbestleşir. Serbest form hücreler tarafından alınarak spesifik nükleer reseptör proteinine taşınır (VDR). Ca⁺²'un fırçalı kenar hücre sitoplazmasına girişine aracılık eden CaT1 (epitelyal kalsiyum transporter) sentezi %90 D vitaminine bağımlı iken, hücre içinde difüzyonunu sağlayan sitozolik kalsiyum bağlayıcı protein olan kalbindin-D9k ise tamamıyla D vitamini bağımlıdır. Aşırı kalsiyum içeren diyet 1,25(OH)₂D

düzeylerini azaltarak CaT1 ve kalbindin-D9k ekspresyonunu azaltır (7). Yüksek 1,25(OH)₂D düzeyleri kemik iliğinde hem monositik kök hücrelerin osteoklastlara farklılaşmasına neden olarak, hem de osteoblastik aktivite artışı yoluyla, sitokin ve diğer faktörlerin üretimindeki artış aracılığıyla osteoklastik aktiviteyi artırarak kemik rezorbsiyonunu artırır. Osteoblast artışı ayrıca kan alkalen fosfataz ve osteokalsin düzeylerinin de artmasına neden olur (7). Paratiroid bezlere direkt etki ederek paratiroid hormon (PTH) sentez ve sekresyonunu inhibe eder. Ayrıca direkt transkripsiyonel mekanizma ile paratiroid bezlerde, kalsiyum duyarlı reseptörlerin konsantrasyonunu artırarak, bezi Ca⁺² inhibisyonuna duyarlı hale getirir (7).

2.6.4. D vitamini reseptörü

Her ne kadar D vitamini, vitamin olarak tanımlanmış olsa da, sadece yetersiz güneş ışığı alanlarda esansiyel olup, insan vücudunda sentezlenebiliyor olması, etkisini hücre içi reseptörü aracılığıyla gösteriyor olması, hatta bazı steroid yapıda hormonlar ile aynı reseptörü kullanıyor olması nedeniyle, günümüzde vitaminden çok hormon olarak adlandırılmaktadır. 1,25(OH)₂D, hedef dokularda bahsettiğimiz etkilerini, vitamin D reseptörü denilen bu özel reseptör aracılığıyla gerçekleştirmektedir.

Genel olarak peptid hormonlar, kendisi için özgün reseptörler içeren hedef hücrenin davranışını etkilerler. Bu etkileşim, hedef hücrede gen ekspresyonundaki değişikliklerden bağımsız olarak, biyokimyasal bir takım değişiklikler gerçekleşmesi ile sonuçlanır. Ancak steroid hormon ve reseptörlerinden oluşan bir grup, esas etkilerini hedef genlerin ekspresyonunu düzenleyerek yapmaktadır. Bu hormonlar kolesterolden sentezlenen progesteron, 17β-östradiol, testosteron, kortizol, aldosteron ve 1,25(OH)₂D'den oluşmaktadır. Buna ilaveten, yapısal olarak steroid hormonlardan farklı olmasına rağmen, reseptörlerinin yapısal ve fonksiyonel benzerlik göstermesinden dolayı, steroid hormon benzeri olarak adlandırılan, retinoik asit ve tiroid hormonunu da içermektedir. Steroid hormon reseptörleri

sitoplazma (glukokortikoidler vb) veya çekirdek içerisinde (östradiol, progesteron, $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ vb.) serbest bulunur. Etki gösterebilmeleri için hücre içi reseptörlerine bağlanmaları gerekmektedir. Bunu lipofilik özelliklerinden faydalanarak yaparlar. Sonuç olarak aracı protein kinaz aktivitesi olmadan gen ekspresyonunu direkt etkileyebilirler (29).

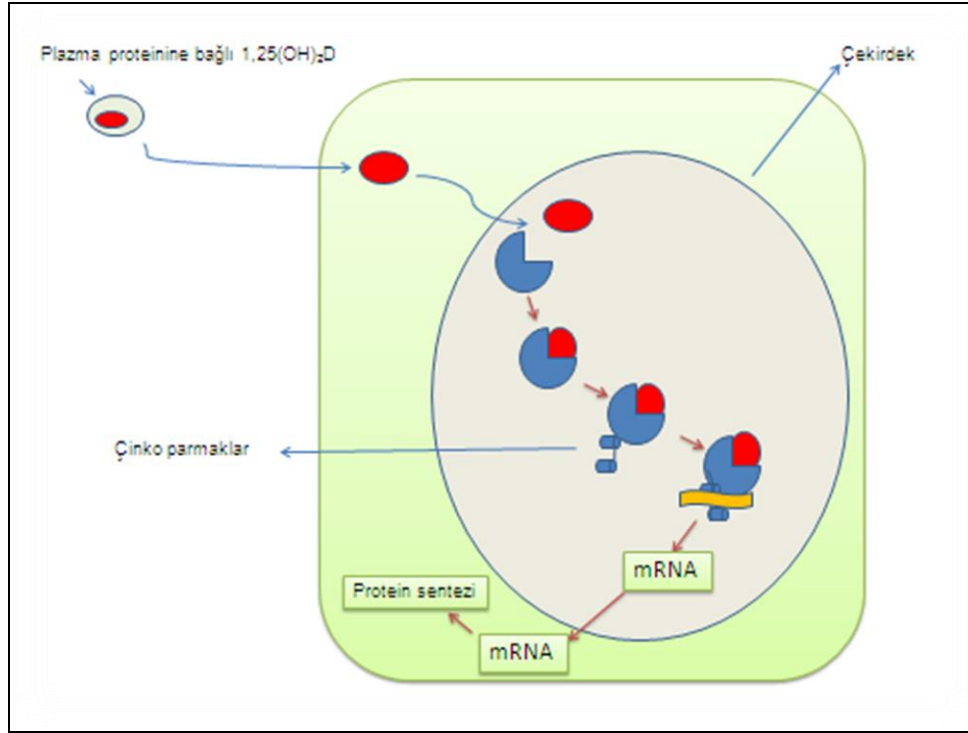
Steroid hormon reseptörlerinin 3 fonksiyonel kısmı bulunmaktadır. C ucunda steroid bağlayıcı kısım, ortada DNA bağlayıcı kısım ve N ucunda da transkripsiyonel aktivasyon kısmı bulunmaktadır (Şekil 3) (29).



Şekil 3. Steroid hormon reseptörlerinin şematik gösterimi.

VDR, nükleer reseptör ailesinin (NR11) bir üyesidir. Büyük oranda dokularda eksprese edilir ve pek çok hücre $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ 'ye duyarlıdır. Ligand'ın reseptöre bağlanması ile konformasyonel değişikliklere uğrayarak, retinoik X reseptör (RXR) üyeleri ile heterodimer kompleks oluştururlar. Reseptör DNA'yı, 21–96. aminoasitler arasındaki DNA bağlayıcı bölgenin, 24–44 ve 60–84. aminoasitleri arasında bulunan, nükleer reseptör C4 tip çinko parmaklar aracılığıyla bağlar (7). Ligand-VDR-RXR kompleksi ilave koaktivatörler toplar ve hedef genlerin promotor bölgelerindeki vitamin D response elementlere (VDREs) bağlanır. Bu spesifik bağlanma 2 adet çinko parmak modülü aracılığıyla gerçekleşir (Şekil 4) (26). Çinko parmak bölgeler çinko iyonlarını bağlayan sistein ve histidin aminoasit tekrarlarına sahip, DNA'ya bağlanan bir ilmik veya parmak yapısına benzeyen yapılardır (30). Oluşan kompleks $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ 'ye cevap veren genlerde transkripsiyon mekanizmasını etkiler. Hedef genlerdeki etki upregülasyon veya downregülasyon şeklinde olabilir. Kalsiyum bağlayıcı protein aracılığıyla

barsaktan kalsiyum emiliminin artışının sağlanması upregülasyona, paratiroid bezlerde paratiroid gen ekspresyonunun inhibisyonu da downregülasyona örnek olabilir (26).



Şekil 4. VDR'ye bağlanan 1,25(OH)₂D'nin şematik gösterimi.

2.6.5. D vitamininin klinik önemi

VDR, yukarıda verdiğimiz örnekte olduğu gibi sadece majör fonksiyonlarını gerçekleştirdiği dokularda değil, vücudumuzun pek çok dokusunda bulunmaktadır. Tiroid, cilt, adrenaller, karaciğer, meme, pankreas, kas, prostat, lenfosit ve çok sayıda kanser hücresinde bulunabilir. Bu durum bizlere iskelet sistemi dışında, proliferasyon, diferansiyasyon ve immünmodülatuar gibi etkileri de olduğunu düşündürmektedir (26). Günümüzde düşük 25(OH)D düzeylerinin, kanserler de dâhil pek çok hastalıkla ilişkisine dair, ileride ayrıntılarıyla tartışacağımız çok sayıda çalışma rapor edilmektedir.

2.6.6. D vitamini ölçüm yöntemleri

Vitamin D₂ ve D₃'ün 30'dan fazla metaboliti bulunmakla birlikte klinik olarak 25(OH)D ve 1,25(OH)₂D'in ölçümü önemlidir. Vücuttaki D vitamini kompozisyonunu en iyi yansıtan ise 25(OH)D'dir. Çünkü yarılanma ömrü 1,25(OH)₂D'den (5–8 saat) oldukça uzun olup 2–3 hafta kadardır. Ayrıca güneş ışığı ve diyetle sınırlı dalgalanma göstermesi, kan konsantrasyonunun çok daha fazla olması ve ölçüm kolaylığı diğer avantajlarındandır. Günümüzde referans yöntem kütle spektrometrisi olmakla birlikte, HPLC, Radyoimmünoassay, Elektrokemilüminesans immünoassay gibi ölçüm yöntemleri de sıklıkla kullanılmaktadır (28,31-34).

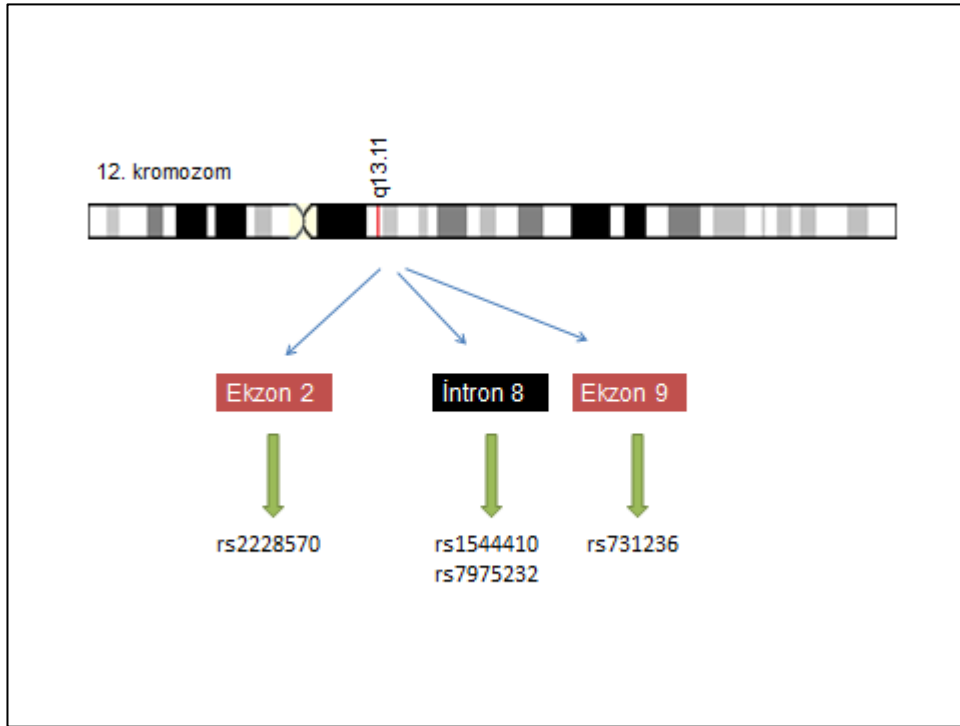
2.6.7. Referans aralıkları

25(OH)D düzeyleri, kişinin güneş ışığına ne ölçüde maruz kaldığı başta olmak üzere, yaşadığı bölgenin coğrafi özellikleri, cilt pigmentasyonu, güneş kremi kullanması, yaş, karaciğer fonksiyonunu bozan patolojiler ve benzeri pek çok faktörden etkilenebilmektedir. 20 µg/L ve daha düşük konsantrasyonlar, PTH serum konsantrasyonlarında artma ve kalsiyum emiliminde azalmayla ilişkili olabileceğinden, bu değer alt referans sınırı olarak kabul edilmiştir. Konsantrasyonları yaş ile azalmakta, gebelik ve çocukluk döneminde artmaktadır (7). Bir başka sınıflamaya göre ise 10 µg/L altı yetmezlik, 10–24 µg/L arası eksiklik, 25–80 µg/L arası yeterli, 80µg/L üzeri ise toksik doz olarak bildirilmektedir (26).

2.6.8. VDR geni

VDR geni D vitaminin hücre içi reseptörü olan VDR proteinini kodlamaktadır. D vitamini (1,25-dihidroksivitamin D₃) reseptör geni *Entrez gene* verilerine göre 12. kromozomda 12q13.11 lokalizasyonda yer almaktadır. VDR geni

48298811 – 48235315 bazları arasında yaklaşık 63.5 kb içermektedir (35). Literatürde yaygın olarak 4 polimorfik bölge tanımlanmaktadır. Ekzon 2’de görülen rs2228570 polimorfik bölgesi *FokI* restriksiyon enzimi kullanılarak, intron 8’de gözlenen rs1544410 ve rs7975232 polimorfizmleri ise sırasıyla *BsmI* ve *Apal* enzimlerince, ekzon 9’da gözlenen rs731236 polimorfizmi ise *TaqI* restriksiyon enzimi kullanılarak tespit edilebilir (Şekil 5) (36-38).



Şekil 5. VDR geni polimorfik bölgelerinin şematik gösterimi.

Ekzon 2’de yer alan *FokI* bölgesi polimorfizmi dışındakiler, kodladığı proteinin aminoasit sekansını değiştirmezler. Ancak *FokI* polimorfizminde gözlenen tek nükleotid değişimi başlama kodonunda olduğundan, transkripsiyon ancak 10 baz çifti ileride alternatif bir başlama kodonu ile gerçekleşir. Bu durum, sentezlenecek VDR proteini yapısında 3 aminoasitlik bir farkın oluşması ile sonuçlanacaktır. *TaqI* polimorfizminde gözlenen T/C değişimi sonucu ATT kodonu ATC’e dönüşür. Hem ATT, hem de dönüşüm sonrası oluşan ATC izolösin aminoasidini kodlaması sonucu sessiz mutasyon gözlenmektedir.

Apal ve *Bsml*'in ise sessiz tek nükleotid polimorfizmleri olduğu düşünülmektedir (36-39).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araştırmanın Özellikleri

3.1.1. Araştırmanın yapıldığı yer ve özellikleri

Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Pendik Eğitim ve Araştırma Hastanesi Üroloji Kliniğine başvuran, ürotelyal tip mesane kanseri tanısı almış 101 hasta ile kontrol grubu olarak cinsiyet ve yaş açısından benzer özellikler gösteren, kendisi ya da 1. derecede yakınlarında kanser öyküsü olmayan 109 gönüllü çalışmaya alınmıştır.

3.1.2. Veri toplama araçları

Çalışma için Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'ndan onay alınmıştır. Hastalar ve kontrol grubu katılımcılarına gerekli zaman ayrılıp bilgilendirme yapılarak onam formları alınmıştır. Sosyodemografik veriler ise hazırlanmış olan bir form aracılığıyla eş zamanlı olarak kaydedilmiştir.

3.2. Plazma D Vitamini Düzeylerinin Belirlenmesi

3.2.1. Örneklerin toplanması

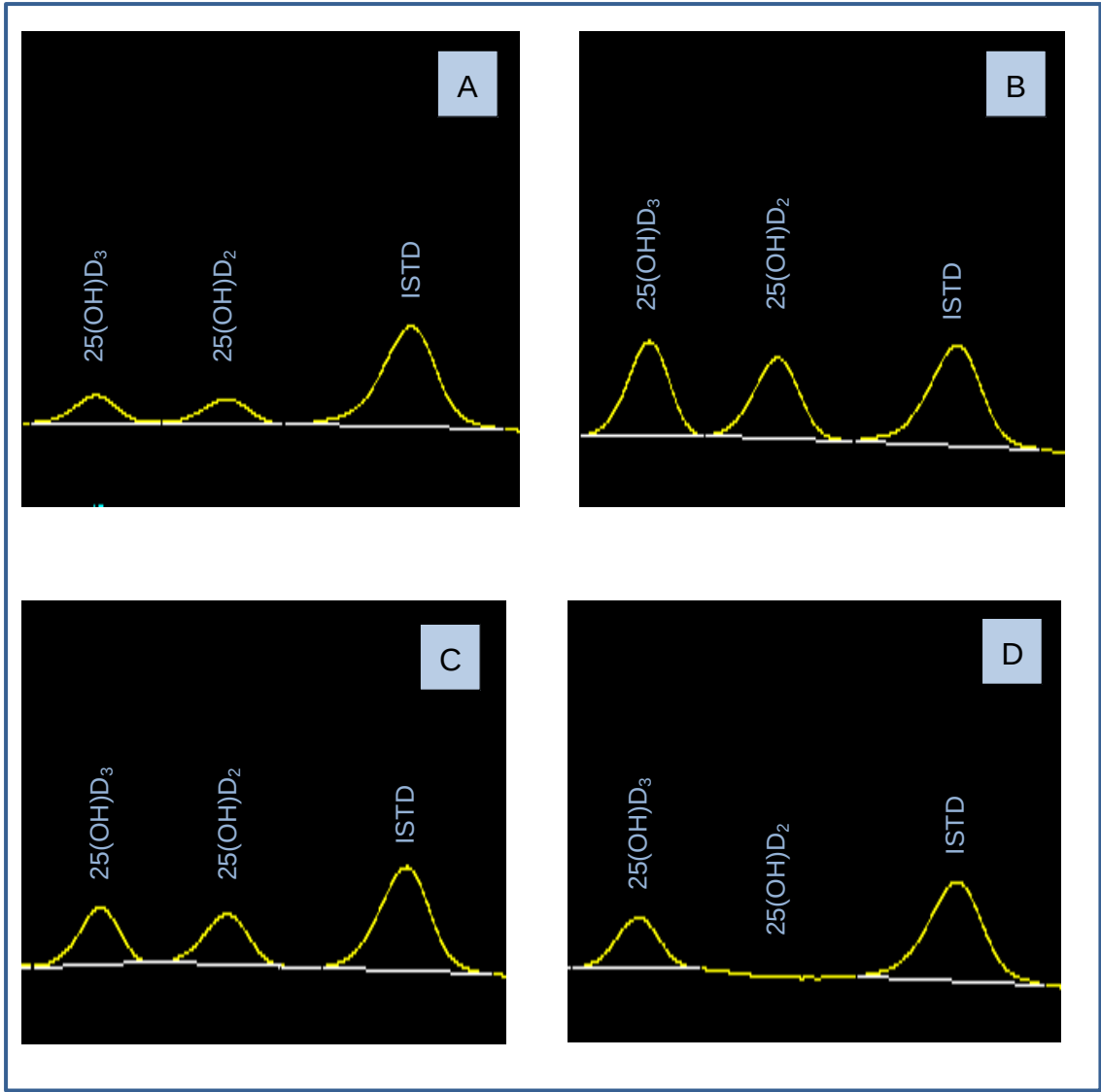
Örnekler, mesane kanseri şüphesi ile sistoskopi planlanan hastalardan, üroloji kliniğinde rutin analizleri için kan alındığı sırada alınmıştır. EDTA'lı tüplere alınan örnekler yardımcı araştırmacı tarafından etiketlenerek biyokimya laboratuvarına ulaştırılmıştır. D vitamini çalışılacak örnekler 1300 x g'de 10 dakika santrifüj edilerek alikotlanmış ve -20 °C'de analiz süresine kadar saklanmıştır.

3.2.2. HPLC yöntemi ile plazma D vitamini düzeylerinin belirlenmesi

HPLC; herhangi bir karışımda bulunan bir veya daha fazla analitin, hareketli sıvı bir faz aracılığıyla, sabit bir faz arasından değişik hızlarla hareket etmesi prensibine dayanan bir ayırıştırma tekniğidir. Taşıyıcı olan sıvı faz, pompalar aracılığıyla yüksek basınçla kolona gönderilir. Kolon özelliklerine göre sabit faz ile etkileşime giren analit ve karışım içeriği, kolon içerisinde değişik hızlarda ilerler. Ayrılan analit kolon çıkışında uygun bir dedektörle tespit edilerek miktar tayini yapılır.

Çalışmamızda D vitamin düzeyleri HPLC yöntemi ile (Thermo Finnigan, Germany) D vitamini ekstraksiyon kiti, kalibratör ve kontrol serumları ticari olarak temin edilerek ölçüldü (Zivak Teknolojileri, Türkiye). 25(OH)D₂'de 24.6–80.7 µg/L, 25(OH)D₃'de ise 21.5–75.5 µg/L değerleri için çalışma içi ve çalışmalar arası değişkenlik katsayıları belirlendi. Tüm konsantrasyonlarda ortalama çalışma içi ve çalışmalar arası değişkenlik katsayılarının %5'in altında olduğu gözlemlendi. Hem Vitamin D₂, hem de Vitamin D₃'ün 200 µg/L'e kadar yapılan linearite çalışmasında ise bu aralıkta lineer olduğu gözlemlenmiştir.

Ekstraksiyon amacıyla plazma örneği presipitat solüsyon ve internal standart içeren solüsyon ile karıştırılarak 30 sn. vortekslendi. Ardından 5 dakika 10000 x g'de santrifüj edildi. Üst fazdan 200 µL vialle alındı. Enjeksiyon için HPLC sistemine verildi. Akış hızı 1.2 mL/dk ve analiz süresi 8 dk. idi. Analitler kolon sonrası UV dedektör kullanılarak 264 nm dalga boyunda tarandı. Retansiyon süreleri 25(OH)D₃ için 4.4 dk, 25(OH)D₂ için 5.0 dk. ve internal standart için 5.8 dk. olarak gözlemlendi (Şekil 6).



Şekil 6. HPLC kromatogram örnekleri.

A) Düzey 1 kontrol materyali; B) Düzey 2 kontrol materyali; C) Kalibratör; D) Hasta numunesi

3.3. Genotip Tayini

3.3.1. Örneklerin toplanması

Polimorfizm çalışmaları için her bir hasta veya kontrol grubu katılımcısından 6 mL tam kan örneği EDTA'lı tüplere (Becton Dickinson, USA) alınarak DNA izolasyonu yapılncaya kadar -20 °C'de saklandı. DNA izolasyonu tuz çöktürme yöntemi (amonyum asetat) kullanılarak yapıldı (40).

3.3.2. Periferik kandan DNA izolasyonu

1. 6 mL kan 50 mL'lik Falcon tüpe (Greiner Bio-One, Almanya) aktarıldı. Üzerine 40 mL oranında eritrosit lizis çözeltisi eklendi. +4 °C'de 20 dakika bekletildikten sonra 10 dakika 405 x g'de santrifüj edildi.
2. Santrifüj sonrası üst kısımda kalan süpernatant uzaklaştırıldı. Dipte kalan pellet üzerine tekrar 30 mL eritrosit lizis çözeltisi eklendikten sonra 405 x g'de 10 dakika daha santrifüj edildi. Ardından tekrar süpernatant kısım uzaklaştırıldı. Bu hipotonik solüsyon eritrositlerin lizisine neden olurken, beyaz küreler intakt olarak dipte kalmaktadır.
3. Dipte kalan pellet üzerine 500 µL %10'luk SDS (Sodium dodecyl sulfate ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{OSO}_3\text{Na}$), 50 µL proteinaz K (20mg/mL) ve 10mL WBC lizis solüsyonu (*White Blood Cell Lysis Solution*, WBL) eklenerek 56 °C'de gece boyu bekletildi. Bu sayede lökositlerin parçalanarak, DNA-protein kompleksinin ayrılması sağlanmıştır.
4. İnkübasyon sonrası geride kalan proteinlerin çöktürülerek uzaklaştırılmasını sağlamak amacıyla üzerine 4 mL amonyum asetat (9.5M) eklenerek karıştırıldı. Ardından 25 dakika 3645 x g'de santrifüj edildi.
5. Bu kez süpernatant kısım yeni bir falkon tüpe aktarılırken pellet kısmı atıldı. Süpernatant üzerine 20 mL %100 etanol eklenerek DNA'nın toplanması beklendi. Toplanan DNA'lar eppendorf tüpe alınarak

üzerine 1 mL %70 etanol konuldu. Maximum hızda (15700 x g) 5 dakika santrifüj edilerek DNA çöktürüldü. Üstte kalan süpernatant dökülerek uzaklaştırıldı. Geriye kalan az miktardaki etanol ise uçurularak uzaklaştırıldı.

6. Elde edilen DNA üzerine 200 µL TE (Tris-EDTA) tamponu eklendi. 56°C'de 1saat bekletildikten sonra saklanmak üzere +4 °C'ye kaldırıldı.

3.3.3. PCR-RFLP

Genotip tayini, alınan kan örneklerinden izole edilen DNA'lardan, PCR-RFLP yöntemi kullanılarak belirlendi (36,37).

3.3.3.1. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)

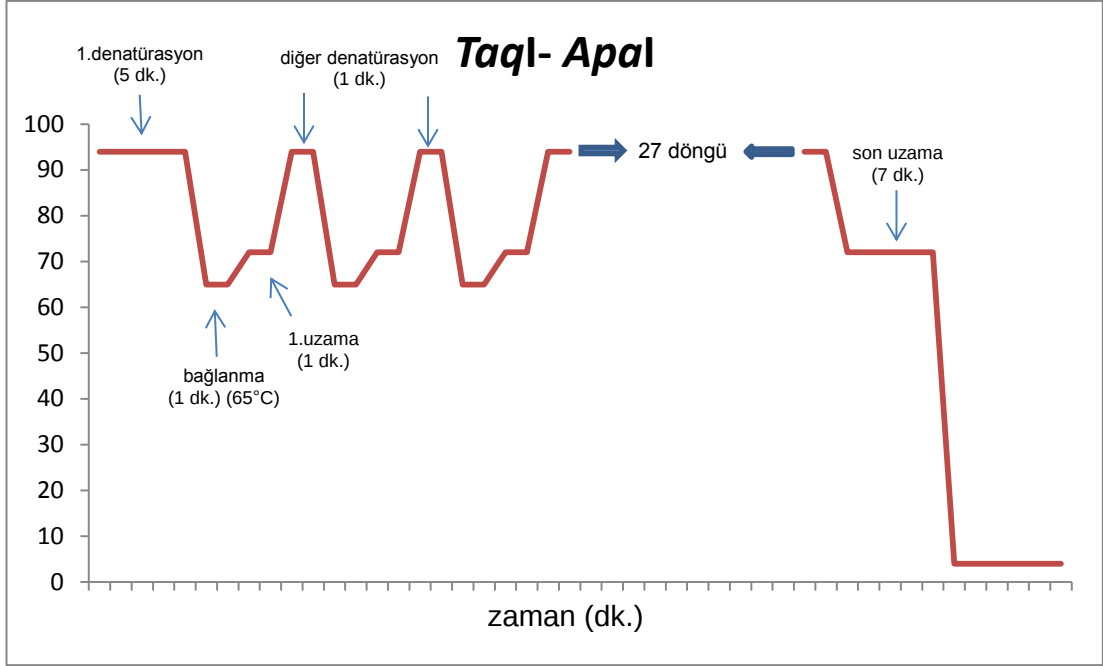
DNA molekülünün daha önce belirlediğimiz bir hedef bölgesinin canlı organizma dışında çoğaltılması işlemidir. Bu selektif çoğaltma işleminde öncelikle çift iplikli DNA moleküllerin sıcaklık artışı ile ayrılması sağlanır. DNA molekülünün yüksek sıcaklıkta denatüre edilmesiyle ortaya çıkan tek iplikli kalıp DNA'lara, oligonükleotid primerlerin komplementer olarak bağlanması ile devam eder. Bağlanma sonrası uzamanın gerçekleşebilmesi için yüksek sıcaklıkta stabilitesini koruyabilen bir DNA polimeraz enzimine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu amaçla yaygın olarak sıcak sularda yaşayan *Thermus Aquaticus'un* DNA polimeraz l'i olan Taq polimeraz kullanılır. Enzimin uzama işlemini gerçekleştirmesinde tamponlar, dNTP (deoksiribonükleozid trifosfat) karışımı ve MgCl₂'ninde rolü vardır. dNTP karışımları yüksek saflıkta dATP, dGTP, dTTP ve dCTP içermektedir. Ticari olarak tek tek veya karışım olarak sağlanabilir. Mg⁺² iyonları dNTP'ler ile çözünebilir kompleksler oluşturur, primer/kalıp etkileşimini sağlar, enzim aktivitesini ve doğru eşleşmiş baz çiftinin yarısının ayrıldığı sıcaklık olan T_m değerini artırır (Bağlanma sıcaklığı T_m değerinin hemen altındaki sıcaklık olarak kabul edilir) (41,42).

PCR reaksiyonunda 100 ng genomik DNA (2 µL), 10 pmol forward ve reverse primerler (1 µL) kullanıldı. Toplam miktarı 25 µL olan PCR ürününde; 15.3 µL distile su, 2.5 µL10X Taq Buffer [(NH₄)₂ SO₄ (+)], 2.5 µL dNTP mix (2mM), 1.5 µL MgCl₂ (25mM) ve 0.2 µL Taq DNA polimeraz (5U/µL) (Thermo Scientific, ABD) bulunmaktadır. PCR koşulları Tablo 3 ve Şekil 7–8–9 da ayrıntılı olarak gösterilmiştir.

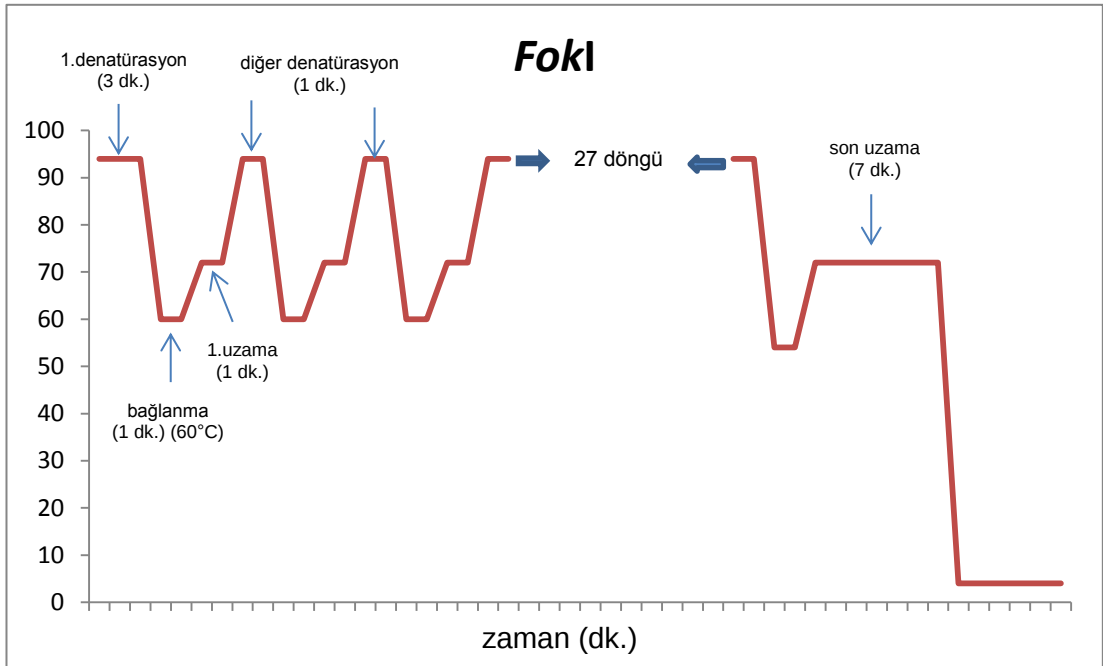
Tablo 3. Polimeraz zincir reaksiyonu koşulları.

	Denatürasyon Sıcaklığı (°C/dk)		Bağlanma Sıcaklığı (°C/dk)		Uzama Sıcaklığı (°C/dk)		Siklus Sayısı
	Birinci Döngü	Sonraki Döngüler	Birinci Döngü	Sonraki Döngüler	Son Döngü	Önceki Döngüler	
<i>TaqI</i>	94/5	94/1	65/1	65/1	72/7	72/1	30
<i>Apal</i>	94/5	94/1	65/1	65/1	72/7	72/1	30
<i>FokI</i>	94/3	94/1	60/1	60/1	72/7	72/1	30
<i>BsmI</i>	94/3	94/1	54/1	54/1	72/7	72/1	30

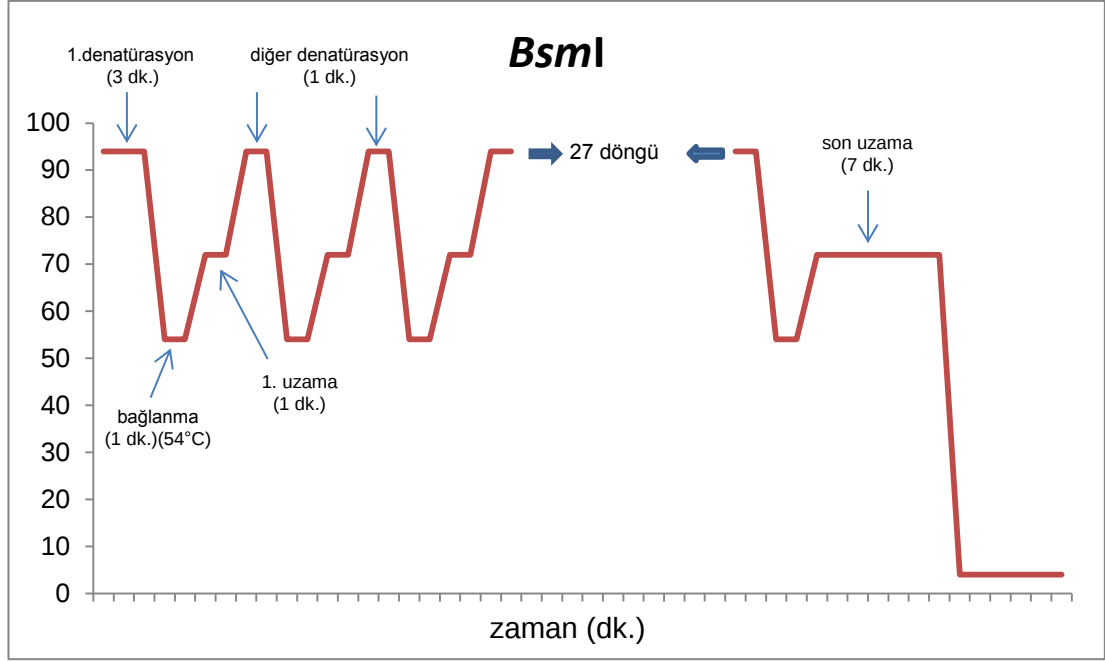
Çalıştığımız tüm bölgelerde denatürasyon sıcaklığı 94 °C, uzama sıcaklığı 72°C olup toplam 30 siklustan oluşmaktadır. *TaqI* ve *Apal* enzimi ile kesilen polimorfik bölgelerin, polimeraz zincir reaksiyonu koşulları, gerek sıcaklık değerleri gerekse bu sıcaklıklarda kaldıkları süreler açısından birebir örtüşmektedir. Sıcaklık değerleri açısından farklı olarak, *FokI* bölgesinde bağlanma ısısının 60 °C, *BsmI* bölgesinde ise 54 °C olduğu gözlenmiştir (Tablo 3). Polimorfik bölgelerin sıcaklık-zaman açısından polimeraz zincir reaksiyonu koşulları, *TaqI* ve *Apal* için Şekil 7’de, *FokI* için Şekil 8’de, *BsmI* içinse Şekil 9’da şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 7. TaqI ve Apal PCR şartları.



Şekil 8. FokI PCR şartları.



Şekil 9. BsmI PCR şartları.

VDR gen polimorfizmi varlığını belirlemede, polimeraz zincir reaksiyonu aşamasında kullanılacak primerler Tablo 4'te gösterilmiştir (36,37).

Tablo 4. VDR geni SNP tespitinde kullanılan primerler.

SNP	Primer
rs731236 (<i>Taq</i> I)	F: 5'-CAG AGC ATG GAC AGG GAG CAA G-3' R: 5'-GCA ACT CCT CAT GGC TGA GGT CTC A-3'
rs7975232 (<i>Apa</i> I)	F: 5'-CAG AGC ATG GAC AGG GAG CAA G-3' R: 5'-GCA ACT CCT CAT GGC TGA GGT CTC A-3'
rs2228570 (<i>Fok</i> I)	F: 5'-GAT GCC AGC TGG CCC TGG CAC TG-3' R: 5'-ATG GAA ACA CCT TGC TTC TTC TTC CTC-3'
rs1544410 (<i>Bsm</i> I)	F: 5'-GGG AGA CGT AGC AAA AGG-3' R: 5'-AGA GGT CAA GGG TCA CTG-3'

3.3.3.2. Restriksiyon fragman uzunluğu polimorfizmi (RFLP)

DNA moleküllerinin yapısının uzun olması, doğrudan analizlerini zorlaştırmaktadır. Bu nedenle restriksiyon endonükleazlar denilen kesim enzimleri ile küçük fragmanlara ayrılabilirler. Bu enzimler DNA'da özel nükleotid dizilerini tanır ve her iki ipliğini de keserler. Genellikle 37 °C'de aktiftirler. Çalışmada hasta ve kontrol gruplarında VDR geni üzerinde olası farklı DNA dizilerinin bulunup bulunmadığının belirlenmesi, restriksiyon sonrası farklı fragmanların varlığının, poliakrilamid jel elektroforezi ile gösterilmesi prensibine dayanmaktadır. SNP tespitinde kesim amacıyla kullanılan enzimler ve kesim sonrası oluşan fragmanların büyüklükleri aşağıda gösterilmiştir (Tablo 5) (37).

Tablo 5. SNP tayininde kullanılan enzimler, alleller ve bantları.

Gen	Restriksiyon Enzimi	SNP	Alleller ve Bantları
VDR geni	<i>TaqI</i>	rs731236	TT(496-247) Tt (496-291-247-205) tt (291-247-205)
VDR geni	<i>ApaI</i>	rs7975232	AA (740) Aa(740,529,211) aa (529,211)
VDR geni	<i>FokI</i>	rs2228570	FF(265) Ff (265,196,69) ff (196,69)
VDR geni	<i>BsmI</i>	rs1544410	BB (360) Bb (360,191,169) bb (191,169)

Tablo 6. Enzimler ve kesim bölgeleri.

Enzim adı	Kesim Bölgesi	Konsantrasyon	Üretici firma
<i>TaqI</i>	5'...T C G A...3' 3'...A G C T...5'	10U/ µL	Fermantes
<i>Apal</i>	5'...G G G C C C...3' 3'...C C C G G G...5'	10U/ µL	Thermo Scientific
<i>FokI</i>	5'...G G A T G N N...3' 3'...C C T A C N N...5'	10U/ µL	Thermo Scientific
<i>BsmI</i>	5'...G A A T G C N...3' 3'...C T T A C G N...5'	10U/ µL	Thermo Scientific

Restriksiyon enzim kesiminde toplam hacim 15 µL olup, her enzime uygun tampon çözeltisi, enzim, PCR ürünü ve steril distile su içerecek şekilde hazırlandı. Kesim Tablo 7’de belirtilen sıcaklıklarda gece boyunca (16 saat) bekletilerek yapıldı. Kesim ürünleri poliakrilamid jelde yürütülüp, gümüş nitrat metodu ile boyanarak görüntülendi.

Tablo 7. Enzimler ile PCR ürünlerinin kesim şartları.

SNP no	Enzim Adı	Enzim Miktarı (µL)	Enzim Tamponu (µL)	Distile su (µL)	PCR Ürünü (µL)	Kesim sıcaklığı (°C)	Son Hacim (µL)
rs731236	<i>TaqI</i>	0.2	1.5	11.3	2	65	15
rs7975232	<i>Apal</i>	0.2	1.5	11.3	2	37	15
rs2228570	<i>FokI</i>	0.2	1.5	11.3	2	55	15
rs1544410	<i>BsmI</i>	0.5	1.5	10.5	2.5	37	15

3.3.3.3 Kesim ürünlerinin poliakrilamid jel elektroforezi

Dikey elektroforez cihazında kullanılacak 35x10 cm ebatlarında jel hazırlandı. Jel kalınlığı 0.5 mm olacak şekilde hazırlanan cam aralığına döküm yapıldı. Polimerizasyonun tamamlanması için en az 30 dakika beklendi.

Polimerizasyon tamamlandıktan sonra jel cam içerisinde elektroforez düzeneğine yerleştirildi. 1XTBE içeren yürütme tamponu eklendi. Beraberinde yükleme tamponu içerisinde bulunan ve elektriksel alanda hareket eden bromfenol mavisini ve ksilen siyanol boya ile de yürüdükleri mesafe takip edilerek akım Tablo 8’de olduğu şekilde ayarlandı. Daha sonra jel çıkartılarak gümüş boyama işlemine geçildi.

Tablo 8. Poliakrilamid jel elektroforezi koşulları.

SNP	Akım		PAGE(%)	Yürüme zamanı (dk.)
	V	W		
rs731236	~220	~20	%11	50 dk.
rs7975232	~220	~20	%11	50 dk.
rs2228570	~220	~20	%12	50 dk.
rs1544410	~220	~20	%8	30 dk.

3.3.3.4. Gümüş boyama

1. A Solüsyonu; %5 asetik asit ve %95 absolüt etil alkol ile hazırlanan stok solüsyondan 200 mL distile suya 15 mL ilave edilerek hazırlandı. Elektroforez sonrası jel ilk olarak bu solüsyonla 5 dk. muamele edildi.
2. B Solüsyonu; % 1'lik gümüş nitrat stok solüsyonundan 10 mL, 200 mL distile suya ilave edilerek hazırlandıktan sonra jel bu solüsyonda 10 dakika muamele edildi.
3. C Solüsyonu; 200 mL distile suya 2.5 gr NaOH ve 0.02 gr boraks ilave edilerek kullanmadan hemen önce taze olarak stok solüsyon hazırlandı. Jel stok solüsyon ile muamele edildiği sırada 1 mL %0.2'lik formaldehid ilave edildi. Bantlar görülünceye kadar jel solüsyon içerisinde tutuldu. Tüm aşamalar arasında ve bu aşama sonrasında jel distile su ile yıkanarak asetat arasına alındı. Değerlendirilmek üzere kurumaya bırakıldı.

3.3.3.5 DNA izolasyonu ve PCR-RFLP aşamalarında kullanılan kimyasallar

Agaroz, bisakrilamid, bromfenol mavisi, EDTA, ksilen siyanol, sodyum bikarbonat, trizma baz, TEMED (Sigma Aldrich, ABD), etanol, (Merck, Almanya), amonyum asetat, asetik asit, formaldehit, borik asit, sodyum hidroksit, sodyum klorid (Riedel-de Haen, Almanya), gümüş nitrat (Carlo Erba, İtalya) ve sodyum dodesil sülfat, amonyum persülfat, akrilamid, (Fluka, Almanya) ve proteinaz K (Roche, Almanya) kullanılmıştır.

3.3.3.6. DNA izolasyonu ve PCR-RFLP aşamalarında kullanılan tampon ve çözeltiler

1. RBCL (Eritrosit lizis çözeltisi): 0.15M NH_4Cl , 0.01M KHCO_3 ve 0.01 M EDTA karışımından hazırlandı (pH=8.0).

2. WBL (Lökosit lizis solüsyonu): 0.1 M NaCl ve 0.025 M EDTA karışımı ile hazırlandı (pH=8.0).
3. Amonyum asetat çözeltisi: 9.5 M $\text{NH}_4\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2$ 0.2 mikron çaplı filtre ile filtrelendi.
4. TE Tamponu: 10 mM Tris-Cl ve 1 mM EDTA (pH=8.0) (+20 °C'de).
5. SDS Stok Solüsyonu: %10 SDS 0.2–0.45 μm membran ile filtre edildi.
6. 5xTBE: 0.45 M trisma base ($\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3$), 0.45 M boric asid ($\text{B}(\text{OH})_3$) ve 0.01 M EDTA (pH=8.0).
7. %12'lik non denatüre poliakrilamid jel solüsyonu: (29/1 akrilamid/bisakrilamid) karışımdan %12 ve 1xTBE ile hazırlanır. Polimerizasyon için 0.001M amonyum persülfat ($(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$) ve %0.1 TEMED (Tetramethylethylenediamine, $(\text{CH}_3)_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$) ilave edildi.
8. %11'lik non denatüre poliakrilamid jel solüsyonu: (29/1 akrilamid/bisakrilamid) karışımdan %11 ve 1xTBE ile hazırlanır. Polimerizasyon için 0.001M amonyum persülfat ($(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$) ve %0.1 TEMED (Tetramethylethylenediamine, $(\text{CH}_3)_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$) ilave edildi.

3.3.3.7. DNA izolasyonu ve PCR-RFLP aşamalarında kullanılan cihazlar

1. Dikey Elektroforez (Biorad)
2. Güç Kaynağı (Biorad Power Pac 3000)
3. Thermocycler (Eppendorf Mastercycler)
4. Santrifüjler (Eppendorf 5415R, 5804R)
5. Canon Scanner N670U
6. Bilgisayar

3.4. Verilerin Değerlendirilmesi

Çalışma sonucu elde edilen veriler araştırmacı tarafından Microsoft Excel programı aracılığıyla bilgisayara kaydedildi. İstatistiksel analizler SPSS 15.0 (*Statistical Package for Social Sciences*) ve MedCalc 12.3.0 paket programları kullanılarak yapıldı. Verilerin normalliğinin değerlendirilmesinde görsel grafikler (histogram vb.) yanında uygun istatistiksel testler (Kolmogorov-Smirnov ve Shapiro-Wilk) kullanıldı. Bağımsız 2 grup ortalamalarının karşılaştırılmasında, dağılımların normalliği göz önüne alınarak Student's t-testi veya Mann-Whitney U testi kullanıldı. Varyansların homojenliği Levene testi ile değerlendirildi. İki'den fazla bağımsız grup karşılaştırılmasında, dağılımlar normal ve varyanslar homojen ise ANOVA, normal dağılım göstermeyen 2'den fazla bağımsız grup ise Kruskal Wallis testi kullanılarak karşılaştırıldı. Kategorik verilerin değerlendirilmesinde çapraz tablolar oluşturularak ki-kare veya Fisher's exact testi yapıldı. Kanseri oluşumu riskini öngörmede bağımsız değişkenlerin etkisini belirleyebilmek amacıyla lojistik regresyon analizi yapıldı. Genotipin kanser oluşum riski üzerindeki muhtemel rolüne, diğer bağımsız değişkenlerin etkisi incelenerek, düzeltilmiş OR değerleri hesaplandı. Hasta ve kontrol grubu bireylerin Hardy-Weinberg dengesinde olup olmadığı exact test kullanılarak belirlendi. Tüm analizlerde istatistiksel anlamlılık düzeyi olarak $p < 0.05$ kabul edildi.

4. BULGULAR

Mesane kanseri ön tanısı ile sistoskopi yapılan ve çalışmamıza katılmayı kabul eden 111 hastanın patoloji sonuçlarında; 4 hastada eş zamanlı prostat karsinomu, bir hastada da renal hücreli karsinom tanısı raporlanmış olduğundan, bu hastalar çalışmadan çıkarılmıştır. Ayrıca bir hastanın patoloji sonucunun mesane adenokanseri olması, iki hastanın da patoloji sonuçlarına ulaşılamaması nedeniyle çalışmaya dahil edilmemiştir. Sistoskopi yapılmış olan 2 hastanın biyopsi materyallerinin patolojik incelenmesi sonucu herhangi bir özellik rapor edilmemiş olması nedeniyle, bu kişiler de hasta grubuna alınmamıştır. Sonuç olarak ürotelyal tip mesane kanseri tanısı patoloji raporuyla doğrulanmış 101 hasta ile sağlıklı 109 kontrol grubu katılımcısı araştırmaya dahil edilmiştir.

Çalışmamıza katılan toplam 210 katılımcının 42'si kadın 168'i erkeklerden oluşmaktadır. Hasta grubunda kadın ve erkek oranları sırasıyla %15.8 ve %84.2 olarak gözlenmişken, kontrol grubu katılımcılarının %23.9'u kadın, %76.1'i erkeklerden oluşmaktadır. Cinsiyet dağılımları açısından hasta ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p=0.147$) (Tablo 9).

Tablo 9. Hasta ve kontrol grubu katılımcılarının cinsiyet dağılımları.

		Kadın	Erkek	Toplam
Kontrol	n	26	83	109
	%	%23,9	%76,1	%100
Hasta	n	16	85	101
	%	%15,8	%84,2	%100
Toplam	n	42	168	210
	%	%20	%80	%100

Kontrol ve hasta grupları yaş ortancaları (en küçük-en büyük) sırasıyla 68 (30-85) ve 64(27-84) olup aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p=0.108$). Hasta yaşları kadın ve erkeklerde ayrı ayrı karşılaştırıldığında sırasıyla hem kontrol ($p=0.120$) hem de hasta grubunda ($p=0.273$) istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmemiştir (Tablo 10).

Tablo 10. Yaş verileri açısından grupların her 2 cinsiyette karşılaştırılması.

		n	Ortalama	SS	Ortanca	En küçük	En büyük	p*
Kadın	Kontrol	26	64,8	12,2	67,5	37	80	0.120
	Hasta	16	61,8	9,1	61	44	81	
	Toplam	42	63,7	11,1	64,5	37	81	
Erkek	Kontrol	83	64,5	13,2	68	30	85	0.273
	Hasta	85	63,9	11,0	65	27	84	
	Toplam	168	64,2	12,1	67	27	85	
Toplam	Kontrol	109	64,6	12,9	68	30	85	0.108
	Hasta	101	63,6	10,7	64	27	84	
	Toplam	210	64,1	11,9	66	27	85	

*Mann-Whitney U testi

Ürotelyal tip mesane kanseri olan hastaların evrelerine göre dağılımlarının %46.5 Ta-düşük derece, %5 Ta-yüksek derece, %12.9 T1-düşük derece, %26.7 T1-yüksek derece, %8.9'u T2 olduğu görülmüştür. Evresi T2 olan 3 hasta ve evresi T1-yüksek derece olan bir hastada beraberinde skuamöz diferansiyasyon gözlenmiştir.

Hasta ve kontrol grupları VKİ (Vücut kitle indeksi) ortalamaları sırasıyla 27.3 ± 4.6 ve 26.7 ± 4.2 olup kontrol ve hasta grup ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p=0.346$) (Tablo 11).

Tablo 11. Grupların VKİ değerlerinin karşılaştırılması.

	Kontrol Grubu			Hasta Grubu			p
	n	Ortalama	SS	n	Ortalama	SS	
VKİ(kg/m ²)	109	26,7	4,2	101	27,3	4,6	0.346

Sigara kullanım öyküsü değerlendirildiğinde kontrol grubu katılımcılarının %37.6'sı, hasta grubunun ise %82.2'sinin sigara kullandığı gözlenmiştir. Sigara kullanımı açısından gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı bulunmuştur ($p<0.001$) (Tablo 12).

Tablo 12. Hasta ve kontrol grubunda sigara kullanım oranları.

		Sigara kullanımı		
		Yok	Var	Toplam
Kontrol	n	68	41	109
	%	%62,4	%37,6	%100
Hasta	n	18	83	101
	%	%17,8	%82,2	%100
Toplam	n	86	124	210
	%	%41,0	%59,0	%100

Sigara kullanımı her 2 cinsiyette ayrı ayrı değerlendirilmiş ve kadınların kontrol grubunda %19.2'sinin, hasta grubunda ise % 68.8'inin sigara kullandığı görülmüştür. Erkeklerde kontrol grubunda % 43.4, hasta grubunda ise %84.7 oranında sigara kullanıldığı saptanmıştır. Kadınlarda hasta ve kontrol grupları arasında sigara kullanımı açısından istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmiştir ($p=0.001$). Benzer şekilde erkek katılımcılarda da hasta ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı fark gözlenmiştir ($p<0.001$) (Tablo 13).

Tablo 13. Cinsiyetlere göre sigara kullanım oranları.

		Sigara Kullanımı				p
			Yok	Var	Toplam	
Kadın	Kontrol	n	21	5	26	0.001
		%	%80,8	%19,2	%100	
	Hasta	n	5	11	16	
		%	%31,3	%68,8	%100	
Erkek	Kontrol	n	47	36	83	<0.001
		%	%56,6	%43,4	%100	
	Hasta	n	13	72	85	
		%	%15,3	%84,7	%100	

Kişinin bugüne kadar toplam sigara kullanım miktarı kaydedilirken “paket yılı” hesabı yapılmıştır. Örneğin 30 yıldır sigara içen hasta, ilk 10 yıl günde 2 paket, son 20 yıl günde 1 paket sigara içmiş olsun. Buna göre hasta; $(10 \times 2 = 20) + (20 \times 1 = 20)$, yani 40 paket yılı sigara içmiştir. Toplam sigara içme süresi 30 yıl görünmesine karşın bu hasta, 40 yıldır günde 1 paket sigara içen bir hasta kadar maruziyet yaşamıştır.

Hasta ve kontrol grupları arasında maruz kalınan ‘paket yılı’ sigara ortancaları arasında hem erkekler ($p < 0.001$), hem kadınlar ($p = 0.002$), hem de toplamda istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmiştir ($p < 0.001$) (Tablo 14).

Tablo 14. Maruz kalınan “paket yılı” sigara ortancaları.

		n	Ortanca	En küçük	En büyük	p*
Kadın	Kontrol	26	0	0	60	0.002
	Hasta	16	19	0	40	
	Toplam	42	0	0	60	
Erkek	Kontrol	83	0	0	100	<0.001
	Hasta	85	35	0	130	
	Toplam	168	20	0	130	
Toplam	Kontrol	109	0	0	100	<0.001
	Hasta	101	30	0	130	
	Toplam	210	12,5	0	130	

*Mann-Whitney U testi

Kontrol grubunun %15.6’sının, hasta grubunun ise %36.6’sının alkol kullandığı saptanmıştır. Alkol kullanımı açısından iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmiştir ($p<0.001$) (Tablo 15). Ancak cinsiyetler açısından değerlendirildiğinde, kadınlarda hasta ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p=0.517$) (Tablo 16). Erkeklerde ise her 2 grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmiştir ($OR=3.494$, %95 GA= 1.727–7.069; $p<0.001$) (Tablo 16).

Yapılan tek değişkenli analizde erkeklerde alkol kullanımının mesane kanseri riskinde istatistiksel olarak anlamlı bir artışa neden olduğu düşünülse de sigara ve alkol kullanımı lojistik regresyon analizinde birlikte değerlendirildiğinde, alkolün neden olduğu bu risk artışının istatistiksel olarak anlamlı olmadığı gözlenmiştir ($OR_{adj}=1.997$; %95 GA= 0.925–4.311; $p=0.078$).

Tablo 15. Hasta ve kontrol grupları alkol kullanım verileri.

		Alkol		Toplam
		Kullanmıyor	Kullanıyor	
Kontrol	n	92	17	109
	%	%84,4	%15,6	%100
Hasta	n	64	37	101
	%	%63,4	%36,6	%100

Tablo 16. Alkol kullanım durumlarının cinsiyetlere göre karşılaştırılması.

			Alkol Kullanımı		Toplam	p
			Kullanmıyor	Kullanıyor		
Kadın	Kontrol	n	24	2	26	0.517*
		%	%92,3	%7,7	%100	
	Hasta	n	16	0	16	
		%	%100	%0	%100	
Erkek	Kontrol	n	68	15	83	<0.001
		%	%81,9	%18,1	%100	
	Hasta	n	48	37	85	
		%	%56,5	%43,5	%100	

Fisher's exact test

Ek hastalık varlığı her 2 grupta da sosyodemografik veri formu aracılığıyla hastaların vermiş oldukları bilgilerden elde edilmiştir. Ek hastalık varlığı açısından hasta ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir (p=0.371). Tablo 17'de verildiği üzere her iki cinsiyet ayrı ayrı değerlendirildiğinde de gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Ek patolojilerin varlığı ayrı ayrı değerlendirildiğinde, hipertansiyon ($p=0.376$), DM ($p=0.580$), koroner arter hastalığı ($p=0.497$), hiperlipidemi ($p=0.668$), konjestif kalp yetmezliği ($p=0.912$) açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmemiştir.

Tablo 17. Cinsiyetlere göre ek hastalık varlığının karşılaştırılması.

		Ek Hastalık Varlığı		Toplam	p
		Ek Hastalık Yok	Ek Hastalık Var		
Kadın	Kontrol	6	20	26	0.720*
		%23,1	%76,9	%100	
	Hasta	5	11	16	
		%31,3	%68,8	%100	
Erkek	Kontrol	27	56	83	0.194
		%32,5	%67,5	%100	
	Hasta	20	65	85	
		%23,5	%76,5	%100	

*Fisher's exact test

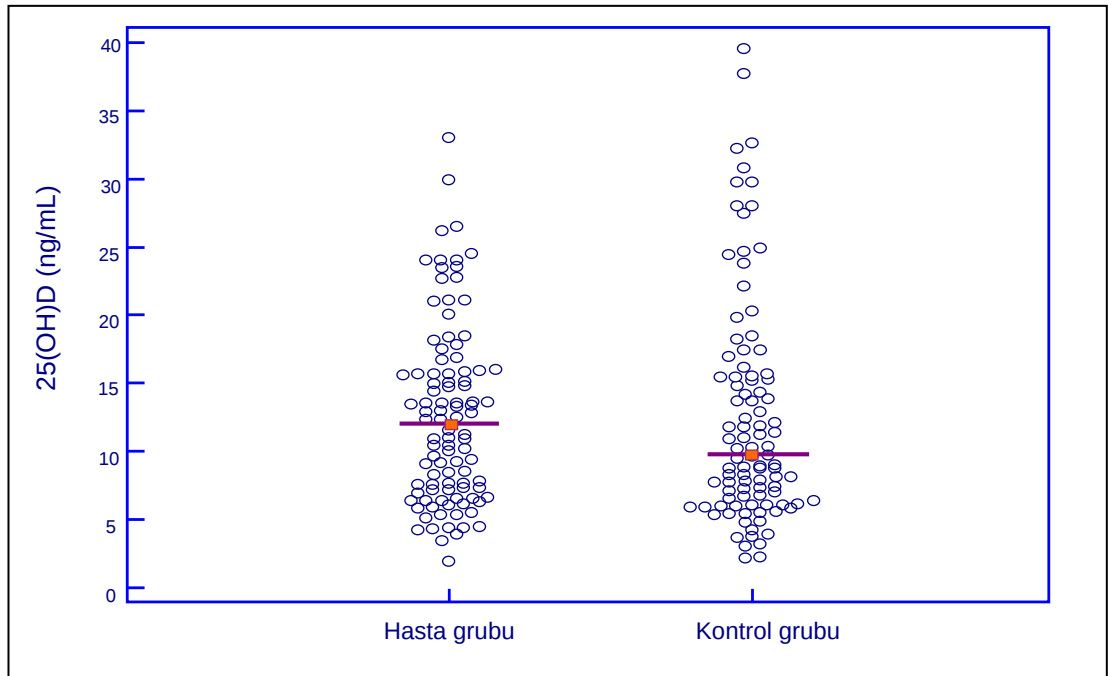
Hasta ve kontrol grubu katılımcıların 25(OH)D plazma düzeyleri ortanca (en küçük ve en büyük) değerleri sırasıyla 11.9 ng/mL (1.90-33.0) ve 9.7 ng/mL (2.13-39.53) olarak belirlenmiştir. D vitamini düzeyleri açısından 2 grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p=0.402$) (Şekil 10).

D vitamini düzeylerinin 20 ng/mL altında olması eksiklik olarak kabul edildiğinde kontrol grubu bireylerinin %83.7'sinde, mesane kanserli hastaların ise %84'ünde D vitamini eksikliği olduğu tespit edilmiştir. Hasta ve kontrol grubu bireyler D vitamini eksikliği olup (<20 ng/mL) olmaması (>20 ng/mL) açısından karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p=0.95$) (Tablo 18).

Tablo 18. Katılımcılarda D vitamini eksikliği görülme oranları.

		25(OH)D		Toplam
		<20 ng/mL	≥20 ng/mL	
Kontrol	n	82	16	98
	%	%83,7	%16,3	%100
Hasta	n	84	16	100
	%	%84,0	%16,0	%100
Toplam	n	166	32	198
	%	%83,8	%16,2	%100

D vitamini düzeyleri kategorize edilmeden, sürekli değişken olarak ele alınarak yapılan lojistik regresyon analizinde de, mesane kanserini öngörmede istatistiksel olarak anlamlı risk artışına neden olmadığı gözlenmiştir (p=0.98).



Şekil 10. D vitamini düzeyleri açısından grupların karşılaştırılması.

Hastalık evresi ile plazma 25(OH)D düzeyleri arasındaki ilişki incelendiğinde; Ta-düşük derece, Ta-yüksek derece, T1-düşük derece, T1-yüksek derece ve T2 grupları 25(OH)D düzeyleri ortancaları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p=0.268$).

VDR geni *Bsml* polimorfizmi genotip frekansları açısından kontrol ve ürotelyal tip mesane kanseri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki gözlenmemiştir ($P=0.867$). Hasta grubunda B ve b allel frekansları sırasıyla %39 ve %61, kontrol grubunda %40 ve %60 olarak bulunmuştur. Hasta ve kontrol grupları arasında allel frekansları açısından istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmemiştir. Hem hasta hem de kontrol grupları Hardy-Weinberg dengesi içerisinde bulunmuştur (Tablo 19).

Tablo 19. *Bsml* polimorfizmi genotip dağılımları.

VDR geni	Hasta (n=101)	Kontrol (n=109)	p	OR (%95 GA)
BB	19(%18.8)	20(%18.3)	0.931 ^a	1.031(0.51–2.07)
Bb	40(%39.6)	47(%43.1)	0.605 ^b	0.865(0.50–1.50)
bb	42(%41.6)	42(%38.5)	0.652 ^c	1.136(0.65–1.97)

^a BB <> (Bb+bb); ^b Bb <> (BB+bb) ; ^c bb <> (Bb+BB)

Çalışmamızda, *FokI* polimorfizmi genotip dağılımı açısından kontrol grubu ile ürotelyal tip mesane kanseri grubu arasında gözlenen fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($P=0.048$). *FF* genotipi varlığı, diğer değişkenlerden bağımsız tek başına irdelendiğinde, ürotelyal tip mesane kanserine yakalanma riskini 1.94 kat arttırmaktadır ($OR=1.938$; %95 GA= 1.12-3.36, $p=0.018$). Lojistik regresyon analizine, sigara kullanım öyküsü karıştırıcı bağımsız değişken olarak dâhil edilerek, düzeltilmiş odds oranları (OR_{adj}) hesaplanmıştır (Tablo 20). Sigara kullanımı ile birlikte değerlendirildiğinde *FF* genotipe sahip olma ile mesane kanseri arasındaki istatistiksel anlamlı ilişkinin ortadan kalktığı gözlenmiştir ($p=0.114$). Sigara kullanımı ile birlikte, kanser ile muhtemel ilişkili olabilecek; D vitamini düzeyleri, VKİ, alkol

kullanım öyküsünün de dahil edildiği çok değişkenli analizlerde, bu değişkenlerin istatistiksel sonucu değiştirebilecek ölçüde etkili olmadığı belirlenmiştir. Yaş ve cinsiyet açısından kontrol grubu hasta grubu ile eşleştirilerek alındığından bu parametreler çok değişkenli analizlere dahil edilmemiştir. Allel frekanslarına bakıldığında *F* alleli görülme sıklığı hasta grubunda % 76, kontrol grubunda ise % 68; *f* alleli görülme sıklığı ise hasta ve kontrol gruplarında sırasıyla %24 ve % 32 olarak gözlenmiştir. Her 2 grup da Hardy-Weinberg dengesinde bulunmuştur (Tablo 20).

Tablo 20. *Fokl* polimorfizmi genotip dağılımları.

VDR geni	Hasta (n=101)	Kontrol (n=109)	OR (%95 GA)	p	OR _{adj} [*] (%95 GA)	p [*]
FF	61 (%60.4)	48 (%44.0)	1.94 (1.12–3.36)	0.018 ^a	1.64 (0.89–3.02)	0.114 ^a
Ff	32 (%31.7)	52 (%47.7)	0.51 (0.29–0.89)	0.018 ^b	0.63 (0.34–1.19)	0.154 ^b
ff	8 (%7.9)	9 (%8.3)	0.96 (0.35–2.58)	0.929 ^c	0.82 (0.27–2.48)	0.727 ^c

^aFF<>Ff+ff; ^bFf <> FF+ff; ^cff<>FF+Ff

^{*}Sigara kullanım öyküsüne göre düzeltilmiş OR ve %95 güven aralıkları

VDR *TaqI* polimorfizmi ile ürotelyal tip mesane kanserleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişkiye rastlanmamıştır (p=0.463). Hasta ve kontrol grubu katılımcıları *T* allel frekansları sırasıyla %65 ve %64 iken *t* allel frekansları %35 ve %36 olarak saptanmıştır. Allel dağılımlar açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır. Hasta grubu sınırda olmakla birlikte (p=0.051) her 2 grup da Hardy-Weinberg dengesinde bulunmuştur (Tablo 21).

Tablo 21. Taql polimorfizmi genotip dağılımları.

VDR geni	Hasta (n=101)	Kontrol (n=109)	p	OR (%95 GA)
TT	47(%46.5)	45(%41.3)	0.444 ^a	1.238(0.72–2.14)
Tt	37(%36.6)	49(%45.0)	0.221 ^b	0.708(0.41–1.23)
tt	17(%16.8)	15(%13.8)	0.536 ^c	1.268(0.60–2.70)

^aTT<>Tt+tt; ^bTt <> TT+tt; ^ctt<>TT+Tt

VDR geni Apal polimorfizmi ile ürotelyal tip mesane kanserleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki gözlenmemiştir (p=0.764). A allel frekansı hasta ve kontrol gruplarında sırasıyla %57 ve %55 iken, a allel frekansı ise %43 ve %45 olarak belirlenmiştir. Allel dağılımları açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmemiştir. Her 2 grup da Hardy-Weinberg dengesinde bulunmuştur (Tablo 22).

Tablo 22. Apal polimorfizmi genotip dağılımları.

VDR geni	Hasta (n=101)	Kontrol (n=109)	p	OR (%95 GA)
AA	34(%33.7)	35(%32.1)	0.811 ^a	1.073(0.60–1.91)
Aa	48(%47.5)	49(%45.0)	0.709 ^b	1.109(0.64–1.91)
aa	19(%18.8)	25(%22.9)	0.463 ^c	0.779(0.40–1.52)

^aAA<>Aa+aa; ^bAa<>AA+aa; ^caa<>AA+Aa

Çalıştığımız 4 polimorfik bölgedeki tüm genotipler D vitamini ortanca değerleri açısından hem erkek, hem de kadın katılımcılarda ayrı ayrı karşılaştırılmış, hasta ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir.

5. TARTIŞMA

Literatürde, D vitamininin aktif formu olan $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ 'nin hücre diferansiyasyonunu düzenleme, proliferasyon, invazyon, anjiyogenez ve metastazı azaltma üzerine olumlu etkilerini bildiren veriler raporlanmakla birlikte, mesane kanseri ile D vitamini düzeyleri veya VDR gen polimorfizmleri arasındaki ilişkiyi irdelleyen araştırma sayısı oldukça sınırlıdır (4,43,44). Konety ve arkadaşlarının (45), 2001 yılında yaptıkları *in vitro* ve *in vivo* deneylerde, D vitamininin mesane kanserinde hücre proliferasyonunu inhibe ettiği ve ratlarda mesane kanserini önlediğine dair bildirdikleri veriler, D vitamini ile mesane kanseri arasındaki ilişki için temel oluşturmuştur. Mondul ve arkadaşları (6), 2010 yılında sigara içen erkek hastalarda yaptıkları çalışmada, düşük $25(\text{OH})\text{D}$ seviyesinin mesane kanseri riskini artırdığını bildirmişlerdir. Bu araştırmadan 2 yıl sonra ise yaş, cinsiyet, ırk ve kan alma zamanı açısından hastalar ile eş kontrol grubu olarak yaptıkları çalışmada, mesane kanser riski ile serum $25(\text{OH})\text{D}$ düzeyleri arasında, istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulmadıklarını ön rapor olarak sunmuşlardır (44). Amaral ve arkadaşları (46) ise 2012 yılında Mondul'un araştırmalarıyla ters yönde veriler elde etmiş, düşük $25(\text{OH})\text{D}$ düzeylerinin ürotelyal tip mesane kanseri riskini istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artırdığını ($\text{OR}_{\text{adj}}=1.83$; %95 GA= 1.19–2.82; $p=0.006$) raporlamışlardır. 2011 yılında Brinkman ve arkadaşlarının (47) yaptığı vaka-kontrol çalışmasında, 200 mesane kanserli hasta ve 386 kontrol grubu bireyin, son bir yıl içerisindeki diyet alışkanlıkları, vitamin ve mineral takviyeleri sorgulanarak, gıdaların ve belirledikleri 29 maddenin günlük alım miktarları hesaplanmıştır. Sonuç olarak artmış kalsiyum alımı ile mesane kanseri arasında anlamlı bir ilişki gözlemlendiği ($\text{OR}=1.77$; %95 GA= 1.00–3.15; $p=0.049$), ancak D vitamini düzeylerinin kalsiyum ve mesane kanseri arasındaki ilişkiyi etkilemediği bildirilmiştir. Bireylerin son bir yıl içerisindeki beslenme alışkanlıklarını sorgulayan bu yöntemde, cevaplar kişilerin hatırladıkları veya algıladıkları ile sınırlı olduğundan, beraberinde bir takım hataları da barındırabileceğini

düşündürmüştür. Ayrıca bu tip araştırmalarda, diyet ile alınan miktarın kan düzeyini direkt yansıttığı varsayılmakta, biyolojik varyasyonlar göz ardı edilmektedir. Afzal ve arkadaşları (48), 2013 yılında düşük 25(OH)D vitamini düzeyleri ve tütün ile ilişkili kanserler arasında anlamlı ilişki rapor etmişlerdir. Sınırlı sayıda ve farklı yönde sonuçlar rapor edilmesi, bize uzun takipli prospektif kohortlara halen ihtiyaç duyulduğunu düşündürmüştür.

Çalışmamızda, plazma 25(OH)D düzeyleri ile mesane kanseri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki gözlenmemiştir. D vitamini düzeylerinin 20 ng/mL altında olması eksiklik olarak kabul edildiğinde, kontrol grubu bireylerin %83,7'sinde, mesane kanserli hastaların ise %84'ünde, D vitamini eksikliği olduğu tespit edilmiştir. Amaral ve arkadaşlarının (46) yaptığı çalışmada, bu oran kontrol ve hasta gruplarında sırasıyla %75 ve %71 olarak bildirilmiştir. Ancak literatürde D vitamini eksikliği ile ilgili oldukça değişik oranlar da bildirilmektedir. Bu durum D vitamini düzeylerinin yaş, coğrafi şartlar, ten rengi, VKİ gibi bireysel varyasyonlar dışında, ölçüm yöntemlerinin standardize olmaması gibi analitik pek çok değişkene bağlı olması ile de açıklanabilir. Ülkemizde de birçok hasta grubunda yapılan çalışmalarda, eksiklik oranlarının oldukça değişken olduğu gözlenmiştir. Bu nedenle ulusal ölçekte daha geniş katılımcı sayısı ve D vitamin düzeylerini etkileyecek değişkenlerin maksimum oranda göz önünde tutulacağı çalışmalar yapılması, D vitamini eksikliği prevalansının belirlenmesine önemli katkı sağlayacaktır. Özellikle gelişmiş ülkelerde, zaman zaman tartışılmakla birlikte, seçilmiş gıda veya vitamin tabletleri içerisine D vitamini takviyesi genellikle yapılmaktadır. Ülkemizde ise halen D vitaminin gıdalara katılıp katılmayacağı, ya da hangi gıdaya veya takviye ürünlerine ne oranda katılacağı ve bunun toplumda D vitamini eksikliğini ne ölçüde etkileyeceğine dair kapsamlı bir araştırma veya düzenlemeye rastlanmamıştır. Araştırmamız sürecinde marketlerde yaptığımız gözlemlerde, özellikle ithal süt ve süt ürünlerinin bazılarının D vitamini içerdiği gözlenmiştir. Analizlerimiz sırasında hem kontrol, hem de hasta grubunda D₂ formuna rastlanmaması, ülkemizde bu formun gıdalara neredeyse hiç katılmadığını veya bu ürünlerin çok az tüketildiğini düşündürmüştür. Multivitamin tabletlerde de yine oldukça değişen

miktarlarda D vitamini takviyesi olduğu gözlenmiştir. Ancak gıdalara katılan ya da multivitamin takviyelerinin D vitamini içeriğinde standardizasyon sağlanmaması veya toplumun bu konuda bilinç düzeyinin yükseltilememesi halinde, düzenli multivitamin takviyesi alan bireylerde bile D vitamini eksikliği görülebileceği gibi, farkında olmadan toksik dozlara da çıkılabileceği akılda tutulmalıdır. Sağlık Bakanlığı tarafından, belirli yaş gruplarına D vitamini desteği sağlanmasının oldukça yerinde bir yaklaşım olduğu kuşkusuzdur. Ancak toplumun tüm bireylerini kapsayacak politikaların da tartışılması gerektiği, tüm bu aşamalar öncesi ise ülkemizde D vitamini eksikliğini net şekilde ortaya koyacak prevelans belirleme çalışmalarına ihtiyaç olduğu kanaatini taşımaktayız.

D vitamini her ne kadar vitamin olarak tanımlanmış olsa da, esansiyel olmaması, yeterli UV-B'ye maruz kalındığında insan vücudunda da sentezlenebilmesi, hücre içi reseptörü aracılığıyla ve hatta bazı steroid yapıda hormonlar ile aynı reseptörü kullanıyor olması nedeniyle, günümüzde vitaminden çok hormon olarak adlandırılmaktadır. 1,25(OH)₂D bahsettiğimiz etkilerini, yaygın adıyla VDR denilen bir özel reseptör aracılığıyla, hedef genlerin ekspresyonunu düzenleyerek yapmaktadır. D vitaminin hücre içi reseptörü olan VDR proteini, VDR geni tarafından kodlanmaktadır. Çalışmamızda bu gende yaygın olarak tanımlanan *Bsml*, *FokI*, *Apal* ve *TaqI* polimorfizmlerinin ürotelyal tip mesane kanseri üzerine etkisini de inceledik. Literatürde mesane kanseri ile VDR gen polimorfizmi hakkında yayımlanmış sadece bir araştırma makalesine ulaşabildik. Bu çalışmada Mittal ve arkadaşları *FokI* ve *TaqI* polimorfizmlerini incelediklerini bildirmişlerdir. Araştırmalarında, her ne kadar *FF* genotipinin mesane kanseri riskini 2.04 kat artırdığını (%95GA= 0.803–5.193) bildirmişlerse de, % 95 güven aralığının “1.0” ve altındaki değerleri içeriyor olması, bu eğilimin istatistiksel olarak anlamlı olmadığını düşündürmüştür. Ayrıca hastalık oluşumu üzerine etki edebilecek diğer bağımsız parametreler (sigara, 25(OH)D düzeyleri vb.) ile birlikte değerlendirildiğinde, polimorfizmin etkisinin halen anlamlı olup olmadığına dair bir veri de bildirilmemiştir. Aynı çalışmada *TaqI* polimorfizmi ile hastalık arasında anlamlı bir ilişki rapor edilmemiştir (49).

Çalışmamızda *FokI* polimorfizminde *FF* genotipe sahip olmanın tek başına ele alındığında mesane kanseri riskini 1.938 (%95 GA=1.12–3.36; $p=0.018$) kat artırdığını veya *Ff* genotipinin ($OR=0.508$, %95 GA=0.29–0.89; $p=0.018$) mesane kanserine karşı koruyucu olduğunu gözlemledik. Genotip dağılımı ve karıştırıcı değişken olarak öngördüğümüz sigara kullanımını lojistik regresyon analizi ile birlikte değerlendirip, düzeltilmiş OR (OR_{adj}) değerlerini hesapladık. Sigaranın mesane kanseri riskini 7.27 kat artırırken ($OR_{adj}= 7.27$ (%95 GA= 3.8–13.9; $p<0.001$), genotipin mesane kanseri riski üzerine olan etkisinin istatistiksel olarak anlamlı olmadığını gözlemledik. Her ne kadar çalışmamızda ortaya çıkan veriler, genotipin mesane kanseri riski üzerindeki etkisinin istatistiksel olarak anlamlı olmadığını gösterse de, *FokI* polimorfizmi genotip dağılımlarının hasta ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı derecede farklı olduğunu gözledik ($p=0.048$). Yapılacak ileri çalışmalar ile bu farkın ve varsa etkilerinin araştırılmasının yararlı olabileceği kanaatini taşımaktayız. Bununla birlikte *BsmI*, *ApaI* ve *TaqI* polimorfizmlerinin varlığı ile mesane kanseri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır.

Özellikle kolorektal ve prostat olmak üzere birçok kanser türü, diyabet ve tüberküloz gibi pek çok hastalıkta yapılmış çok sayıda araştırmaya ve hatta metaanalizlere rastlanmaktayken, mesane kanseri ve VDR gen polimorfizmi ilişkisini inceleyen çalışma sayısının oldukça sınırlı olduğu gözlenmiştir (50-55). Türk toplumunda yapılmış, mesane kanseri ile VDR gen polimorfizmi arasındaki ilişkiyi irdeleyen bir araştırmaya ise rastlanmamıştır. Bu nedenle *FokI* polimorfizmi genotip dağılımı, ülkemizde başka hastalıklarda yapılan araştırmalarda elde edilen verilerle karşılaştırılmıştır. Yavuz ve arkadaşlarının (56) 2011 yılında Tip-I DM’li hastalarda yaptıkları araştırmada *FF*, *Ff* ve *ff* frekanslarını hasta grubunda %52, %39.3 ve %8.5 kontrol grubunda ise %44.8, %47 ve %8.2 olarak raporlanmıştır. Bizim çalışmamızda kontrol grubunda *FF*, *Ff* ve *ff* oranları ise sırasıyla %44, %47.7 ve %8.3 olarak bulunmuş olup bu çalışma ile kontrol grubu genotip dağılım oranları açısından oldukça benzer veriler elde edildiği gözlenmiştir. Toptaş ve arkadaşları (57) beyin kanserli hastalarda yaptıkları çalışmada *FF* genotip

frekansını kontrol grubunda %45.9 meningioma grubunda ise %43.2 olarak bildirmişlerdir. Yoldemir ve arkadaşları ise (58) postmenapozal Türk kadınlarında *FF* genotip frekansını, premenapozal kadınlar ile karşılaştırdıklarında, sıklık oranlarını sırasıyla %50.77 ve %47.69 olarak raporlamışlardır. Dayangaç ve arkadaşları (59), sağlıklı Türk popülasyonunda yaptıkları çalışmada; *FF* frekansını %55, *Ff* ve *ff* frekanslarını ise sırasıyla %36 ve %9 olarak bildirmişlerdir. Aynı çalışmada *F* allel frekansı %73 iken *f* allel frekansı ise % 27 olarak raporlanmıştır.

Sonuç olarak araştırmamızda elde ettiğimiz veriler bizlere D vitamini düzeyleri veya VDR gen polimorfizmlerinin, ürotelyal tip mesane kanserinde istatistiksel olarak anlamlı risk artışına neden olmadığını göstermektedir. *FokI* polimorfizminde, genotip dağılımı açısından hasta ve kontrol grupları arasında gözlediğimiz istatistiksel olarak anlamlı farkın, daha geniş gruplarda irdelenmesinin yararlı olabileceğini düşünmekteyiz. Ayrıca hayvan deneyleri ile D vitamini kanser ilişkisine dair önemli veriler bildirilmesi bu alanda insan çalışmalarının yapılmasına halen ihtiyaç olduğunu, özellikle de D vitamini düzeyleriyle ilgili uzun takipli prospektif kohortlar ile bu durumun aydınlatılmasının faydalı olabileceği kanaatini taşımaktayız.

KAYNAKLAR

- (1) Aydın S. Türkiye'de Üriner Sistem Kanserlerin Görülme Sıklığı. Türk Üroloji Dergisi 2007;33(4):392-7.
- (2) Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012. CA Cancer J Clin 2012 Jan;62(1):10-29.
- (3) Mohr SB, Garland CF, Gorham ED, Grant WB, Garland FC. Ultraviolet B irradiance and incidence rates of bladder cancer in 174 countries. Am J Prev Med 2010 Mar;38(3):296-302.
- (4) Giovannucci E. The epidemiology of vitamin D and cancer incidence and mortality: a review (United States). Cancer Causes Control 2005 Mar;16(2):83-95.
- (5) Sahin MO, Canda AE, Yorukoglu K, Mungan MU, Sade M, Kirkali Z. 1,25 Dihydroxyvitamin D(3) receptor expression in superficial transitional cell carcinoma of the bladder: a possible prognostic factor? Eur Urol 2005 Jan;47(1):52-7.
- (6) Mondul AM, Weinstein SJ, Mannisto S, Snyder K, Horst RL, Virtamo J, et al. Serum vitamin D and risk of bladder cancer. Cancer Res 2010 Nov 15;70(22):9218-23.
- (7) Risteli J, Kleerekoper M, Risteli L. Bone and Mineral Metabolism. Ed: Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE. Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics. 5 ed. Missouri: Elsevier; 2012. p. 1733-801.
- (8) Baykara M. Ürogenital Organların Anatomik ve Histolojik Yapısı. Ed: Anafarta K, Arikan N, Bedük Y. Temel Üroloji. 4. Basım. Ankara: Günes Tıp Kitapevleri; 2011. p. 1-19.

- (9) Özkardeş H. Ürogenital Sistemin Fizyolojisi. Ed: Anafarta K, Arıkan N, Bedük Y. Temel Üroloji. 4 Basım. Ankara: Güneş Tıp Kitapevleri; 2011. p. 27-42.
- (10) David P.Wood. Urothelial Tumors of the Bladder. Ed: Wein.Alan J, Kavoussi.Louis R, Andrew C.Novick, Alan W.Partin, Craig A.Peters. Campbell-Walsh Urology.Philadelphia: Elsevier; 2012. p. 2309-34.
- (11) Bedük Y, Yazıcı C, Türker P, Türkeri L. Ürogenital Tümörler. Ed: Anafarta K, Arıkan N, Bedük Y. Temel Üroloji. 4.Basım. Ankara: Güneş Tıp Kitapevleri; 2011. p. 721-872.
- (12) Montironi R, Lopez-Beltran A. The 2004 WHO classification of bladder tumors: a summary and commentary. Int J Surg Pathol 2005 Apr;13(2):143-53.
- (13) Türker P, Ekici S. Mesane Kanseri; Karsinoma In Situ (CIS). Üroonkoloji Bülteni 2011;(1):9-12.
- (14) Çitgez S, Erözenci A, Yörükoğlu K. Non-ürotelyal mesane kanserleri. Üroonkoloji Bülteni 2007;(4):9-13.
- (15) Edge SB, Compton CC. The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. Ann Surg Oncol 2010 Jun;17(6):1471-4.
- (16) Badrinath R Konety, Peter R.Carroll. Ürotelyal Karsinom: Mesane, Üreter ve Böbrek Pelvisi Kanserleri. Ed: Emil A.Tanagho, Jack W.McAninch. Smith Genel Üroloji.(Çeviri: Kazancı G) 17 ed. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevi; 2004. p. 308-27.
- (17) S.Bruce Malkowicz, David J.Vaughn, Alan J.Wein. Erişkin Genitoüriner Kanseri - Prostat ve Mesane. Ed: Philip M.Hanno, S.Bruce Malkowicz, Alan J.Wein. Üroloji El Kitabı. (Çeviri: Sağlam H) Ankara: Güneş Tıp Kitapevi; 2009. p. 523-69.

- (18) van Rhijn BW, van der Poel HG, van der Kwast TH. Urine markers for bladder cancer surveillance: a systematic review. *Eur Urol* 2005 Jun;47(6):736-48.
- (19) Tinay İ, Türkeri L. Mesane Kanserinde Moleküler Süreç ve Tedaviler. Ed: Türkeri L, Özer A, Narter F. *Moleküler Üroloji*. 1 Basım. İstanbul: Üroonkoloji Derneği; 2012. p. 411-21.
- (20) J.Stephan Jones, William A.Larchian. Non-Muscle İnvasive Bladder Cancer. Ed: Wein.Alan J, Kavoussi.Louis R, Andrew C.Novick, Alan W.Partin, Craig A.Peters. *Campbell-Walsh Urology*. 10 ed. Philadelphia: Elsevier; 2012. p. 2335-54.
- (21) Michael F.Holick. The Vitamin D Deficiency Pandemic: a Forgotten Hormone Important for Health. *Public Health Reviews* 2010;32(1):267-83.
- (22) Norman AW. The history of the discovery of vitamin D and its daughter steroid hormone. *Ann Nutr Metab* 2012;61(3):199-206.
- (23) Rajakumar K, Greenspan SL, Thomas SB, Holick MF. SOLAR ultraviolet radiation and vitamin D: a historical perspective. *Am J Public Health* 2007 Oct;97(10):1746-54.
- (24) Wolf G. The discovery of vitamin D: the contribution of Adolf Windaus. *J Nutr* 2004 Jun;134(6):1299-302.
- (25) Holick MF. Vitamin D status: measurement, interpretation, and clinical application. *Ann Epidemiol* 2009 Feb;19(2):73-8.
- (26) Bhagavan NV, Edlin GJ, Chung-Eun Ha, Gosnell W, Jackson CM, Lally DA. Mineral Metabolism. Ed: Bhagavan NV, Chung-Eun Ha. *Essentials of Medical Biochemistry with Clinical Cases*. first ed. London: Elsevier; 2011. p. 487-502.

- (27) Bender DA. Micronutrients: Vitamins and Minerals. Ed: Murray RK, Bender DA, Botham KM, Kennelly PJ, Rodwell VW, Weil PA. Harper's Illustrated Biochemistry. 28 ed. McGraw Hill Companies; 2009. p. 467-81.
- (28) Klemm KM, Klien MJ. Biochemical Markers of Bone Metabolism. Ed: McPherson RA, Pincus MR. Henry's Clinical Diagnosis and Management. 22 ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2011. p. 193-209.
- (29) Goodman SR. Hücre Sinyal İleti Olayları. Ed: Goodman SR. Tıbbi Hücre Biyolojisi (Çeviri: Rosti RÖ). 3 ed. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri; 2008. p. 249-72.
- (30) Cooper GM, Hausman RE. RNA Sentezi ve İşlenmesi. Ed: Cooper GM, Hausman RE. Hücre: Moleküler Yaklaşım (Çeviri: Sakızlı M, Atabey N). 3.Basım. İzmir: İzmir Tıp Kitabevi; 2006. p. 231-81.
- (31) Barake M, Daher RT, Salti I, Cortas NK, Al-Shaar L, Habib RH, et al. 25-hydroxyvitamin D assay variations and impact on clinical decision making. J Clin Endocrinol Metab 2012 Mar;97(3):835-43.
- (32) Farrell CJ, Martin S, McWhinney B, Straub I, Williams P, Herrmann M. State-of-the-art vitamin D assays: a comparison of automated immunoassays with liquid chromatography-tandem mass spectrometry methods. Clin Chem 2012 Mar;58(3):531-42.
- (33) Heijboer AC, Blankenstein MA, Kema IP, Buijs MM. Accuracy of 6 routine 25-hydroxyvitamin D assays: influence of vitamin D binding protein concentration. Clin Chem 2012 Mar;58(3):543-8.
- (34) Leino A, Turpeinen U, Koskinen P. Automated measurement of 25-OH vitamin D3 on the Roche Modular E170 analyzer. Clin Chem 2008 Dec;54(12):2059-62.

- (35) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/IEB/Research/Acembly/av.cgi?db=human&c=Gene&l=VDR>
- (36) Yaylım-Eraltan I, Arzu EH, Arikan S, Okay E, Ozturk O, Bayrak S, et al. Investigation of the VDR gene polymorphisms association with susceptibility to colorectal cancer. *Cell Biochem Funct* 2007 Nov;25(6):731-7.
- (37) Mitra S, Desai M, Ikram KM. Vitamin D receptor gene polymorphisms and bone mineral density in postmenopausal Indian women. *Maturitas* 2006 Aug 20;55(1):27-35.
- (38) Kostner K, Denzer N, Muller CS, Klein R, Tilgen W, Reichrath J. The relevance of vitamin D receptor (VDR) gene polymorphisms for cancer: a review of the literature. *Anticancer Res* 2009 Sep;29(9):3511-36.
- (39) Raimondi S, Johansson H, Maisonneuve P, Gandini S. Review and meta-analysis on vitamin D receptor polymorphisms and cancer risk. *Carcinogenesis* 2009 Jul;30(7):1170-80.
- (40) Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988 Feb 11;16(3):1215.
- (41) T.A.Brown. Polimeraz Zincir Reaksiyonu. Ed: T.A.Brown. Gen Klonlama ve DNA Analizi (Çeviri: Bardakçı F, Yenidünya AF, Yılmaz N). 5 Basım. İstanbul: Nobel Yayın Dağıtım; 2009. p. 181-95.
- (42) Şule Arı. DNA'nın Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile Çoğaltılması. Ed: Temizkan G, Arda N. Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler. 3 Basım. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri; 2008. p. 101-20.

- (43) Holick MF. Vitamin D: importance in the prevention of cancers, type 1 diabetes, heart disease, and osteoporosis. *Am J Clin Nutr* 2004 Mar;79(3):362-71.
- (44) Mondul AM, Weinstein SJ, Horst RL, Purdue M, Albanes D. Serum vitamin D and risk of bladder cancer in the Prostate, Lung, Colorectal, and Ovarian (PLCO) Cancer Screening trial. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2012 Jul;21(7):1222-5.
- (45) Konety BR, Lavelle JP, Pirtskalaishvili G, Dhir R, Meyers SA, Nguyen TS, et al. Effects of vitamin D (calcitriol) on transitional cell carcinoma of the bladder in vitro and in vivo. *J Urol* 2001 Jan;165(1):253-8.
- (46) Amaral AF, Mendez-Pertuz M, Munoz A, Silverman DT, Allory Y, Kogevinas M, et al. Plasma 25-hydroxyvitamin D(3) and bladder cancer risk according to tumor stage and FGFR3 status: a mechanism-based epidemiological study. *J Natl Cancer Inst* 2012 Dec 19;104(24):1897-904.
- (47) Brinkman MT, Buntinx F, Kellen E, Dagnelie PC, van Dongen MC, Muls E, et al. Dietary intake of micronutrients and the risk of developing bladder cancer: results from the Belgian case-control study on bladder cancer risk. *Cancer Causes Control* 2011 Mar;22(3):469-78.
- (48) Afzal S, Bojesen SE, Nordestgaard BG. Low plasma 25-hydroxyvitamin D and risk of tobacco-related cancer. *Clin Chem* 2013 May;59(5):771-80.
- (49) Mittal RD, Manchanda PK, Bhat S, Bid HK. Association of vitamin-D receptor (Fok-I) gene polymorphism with bladder cancer in an Indian population. *BJU Int* 2007 Apr;99(4):933-7.

- (50) Li L, Wu B, Liu JY, Yang LB. Vitamin D receptor gene polymorphisms and type 2 diabetes: a meta-analysis. *Arch Med Res* 2013 Apr;44(3):235-41.
- (51) Touvier M, Chan DS, Lau R, Aune D, Vieira R, Greenwood DC, et al. Meta-analyses of vitamin D intake, 25-hydroxyvitamin D status, vitamin D receptor polymorphisms, and colorectal cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2011 May;20(5):1003-16.
- (52) Wu YJ, Yang X, Wang XX, Qiu MT, You YZ, Zhang ZX, et al. Association of vitamin D receptor BsmI gene polymorphism with risk of tuberculosis: a meta-analysis of 15 studies. *PLoS One* 2013;8(6):e66944.
- (53) Yin M, Wei S, Wei Q. Vitamin D Receptor Genetic Polymorphisms and Prostate Cancer Risk: A Meta-analysis of 36 Published Studies. *Int J Clin Exp Med* 2009;2(2):159-75.
- (54) Bai YH, Lu H, Hong D, Lin CC, Yu Z, Chen BC. Vitamin D receptor gene polymorphisms and colorectal cancer risk: a systematic meta-analysis. *World J Gastroenterol*. 2012 Apr; 18(14):1672-79
- (55) Guo Z, Wen J, Kan Q, Huang S, Liu X, Sun N, Li Z. Lack of association between vitamin D receptor gene FokI and BsmI polymorphisms and prostate cancer risk: an updated meta-analysis involving 21,756 subjects. *Tumour Biol*. 2013 Oct;34(5):3189-200.
- (56) Gogas YD, Keskin L, Kiyıcı S, Sert M, Yazıcı D, Sahin I, et al. Vitamin D receptor gene BsmI, FokI, ApaI, TaqI polymorphisms and bone mineral density in a group of Turkish type 1 diabetic patients. *Acta Diabetol* 2011 Dec;48(4):329-36.
- (57) Toptas B, Kafadar AM, Cacina C, Turan S, Yurdum LM, Yigitbası N, et al. The vitamin D receptor (VDR) gene polymorphisms in Turkish brain cancer patients. *Biomed Res Int* 2013;2013:295791.

- (58) Yoldemir T, Yavuz DG, Anik G, Verimli N, Erenus M. Vitamin D receptor gene polymorphisms in a group of postmenopausal Turkish women: association with bone mineral density. *Climacteric* 2011 Jun;14(3):384-91.
- (59) Dayangaç D, Özaydın A, Gerçeker FÖ, Coşkun T, Yurter HE. Sağlıklı Türk Popülasyonunda Vitamin D Reseptör (VDR) Gen Polimorfizm Analizi . *Türk Biyokimya Dergisi* 2002;27(1):11-6.

Bu araştırma Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından SAG-C-TUP-130213-0034 proje numarası ile desteklenmiştir