

**NAD(P)H: KİNON OKSİDOREDÜKTAZ 1 GEN POLİMORFİZMİ İLE
AKUT LÖSEMİ ARASINDAKİ İLİŞKİNİN İNCELENMESİ**

Derya Deniz KULAK

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**HAZİRAN 2006
ANAKARA**

Derya Deniz Kulak tarafından hazırlanan NAD(P)H: KİNON OKSİDOREDÜKTAZ
1 GEN POLİMORFİZMİ İLE AKUT LÖSEMİ ARASINDAKİ İLİŞKİNİN
İNCELENMESİ adlı tezin yüksek lisans tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. Leyla AÇIK
Tez Yöneticisi

Prof. Dr. Şefik GÜRAN
Tez Yöneticisi

Bu çalışma, jürimiz tarafından Biyoloji Anabilim Dalında yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: : Prof.Dr. Cihan Öner

Üye : Prof.Dr. Leyla Açık

Üye : Prof.Dr. Şefik Güran

Üye : Prof.Dr. Yavuz Beyatlı

Üye : Prof.Dr. Fatma Ünal

Tarih : 14.06.2006

Bu tez, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygundur.

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada orijinal olmayan her türlü kaynağa eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Derya Deniz KULAK

**NAD(P)H: KİNON OKSİDOREDÜKTAZ 1 GEN POLİMORFİZMİ İLE
AKUT LÖSEMİ ARASINDAKİ İLİŞKİNİN İNCELENMESİ**

(Yüksek Lisans Tezi)

Derya Deniz KULAK

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

Haziran 2006

ÖZET

Kanser genetik bir çok bileşenin oluşturduğu, hücre düzeyinde genetik bir hastalık olarak düşünülebilir. Bir çok kanser genetik ve çevresel faktörlerin karşılıklı etkileşimleri sonucunda ortaya çıkar. Bazı kanserlere olan bireysel yatkınlık, ksenobiyotiklerin aktivasyon ve detoksifikasyon mekanizmalarında meydana gelen genetik değişikliklerle açıklanabilmektedir. NAD(P)H:kinon oksidoredüktaz 1 (NQO1) ksenobiyotiklerin oksidasyonu sonucunda ortaya çıkan kinonların detoksifikasyonunda görevlidir. NQO1 enzimi hücreyi oksidatif stresten korur. NQO1 geninin 187. kodonunda meydana gelen nokta mutasyonu sonucunda (C609T) enzimin aktifliği homozigot bireylerde tamamen ortadan kalkmaktadır. Yaban tip alleli homozigot olarak taşıyan bireylerde ise normal aktivite vardır. Düşük veya ortadan kalkmış enzim aktivitesinin akut lösemi etiyolojisinde rol oynadığı düşünülmektedir.

Biz bu çalışmada NQO1 genindeki genetik polimorfizm ile akut lösemi arasındaki ilişkiyi araştırdık. NQO1 allel dağılımı 87 sağlıklı bireyde ve 78 akut lösemili hastada araştırıldı. NQO1 genindeki mutasyonu tespit edebilmek için PZR (polimeraz zincir reaksiyonu) tabanlı RFLP (restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi) metodu kullanılmıştır. Yaban (yt/yt) ve mutant (mt/mt) tip genotiplerin sağlıklı bireylerde %60,92, %5,75 iken akut1 lösemili bireylerde bu oran %62,82, %8,97 olarak hesaplanmıştır. NQO1 C609T allel sıklığı kontrol

grubuyla kıyaslandığında istatistiksel olarak farklılık gözlenmemiştir (OR:1,133; 0,675-1,902; CI: %95). NQO1 genotip ayrımı, akut lösemili hastalarla kontrol grubu kıyaslandığında da istatistiksel bir farklılık görülmemiştir (OR:0,923; 0,492-1,731; CI: %95). Tüm bu bulgular NQO1 C609T polimorfizminin akut lösemi etiyolojisinde bir etkisinin olmadığını göstermiştir.

Bilim Kodu : 203.1.104
Anahtar Kelimeler : NQO1 gen polimorfizmi, akut lösemi
Sayfa Adedi : 65
Tez Yöneticisi : Prof.Dr. Leyla AÇIK, Prof Dr. Şefik GÜRAN

**NAD(P)H: QUINONE OXIDOREDUCTASE 1 GENETIC POLYMORPHISM
AND ITS ASSOCIATION TO ACUTE LEUKEMIA**

(M.Sc. Thesis)

Derya Deniz KULAK

**GAZI UNIVERSITY
INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY**

June 2006

ABSTRACT

Cancer has a genetic component and at the level of the cell it can be said to be genetic disease. Most cancer results from interaction between environment and genetics. Individual susceptibility to some of cancers maybe explained partly by genetic differences in the activation and detoxification of xenobiotics. NAD(P)H: quinone oxidoreductase1(NQO1) detoxifies quinones derived from the oxidation of phenolic metabolites of benzene. NQO1 enzyme activity protects cells from oxidative stress. A point mutation in codon 187 (C609T) results in complete loss of enzyme activity in homozygous subjects, whereas those with 2 wild-type alleles have normal activity. Low or null enzyme activity may play a role in etiology of acute leukemia

In this study, we investigated associations between genetic polymorphism in NQO1 susceptibility to acute leukemia. The distribution of NQO1 alleles were determined in 87 healthy individuals and 78 patients with acute leukemia. NQO1 polymorphism was studied using polymerase chain reaction based restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP), followed by digestion with restriction enzyme was used to analyze the mutation in NQO1 gene. The distribution of wt/wt and mt/mt genotypes were determined as %60,92, %5,75 in the healthy control population and %62,82, %8,97 in acute leukemia. The NQO1 C609T allele frequency was not statistically different in acute leukemia

in comparison to the controls (OR:1,133; 0,675-1,902; CI: %95). The distribution of NQO1 genotypes acute leukemia was not statistically different from the control group (OR:0,923; 0,492-1,731; CI: %95). These findings do not support the role of NQO1 C609T polymorphism in the etiology acute leukemia.

Science Code : 203.1.104
Key Words : NQO1 gene polymorphism, acute leukemia
Page Number : 65
Adviser : Prof. Dr. Leyla AÇIK, Prof Dr. Şefik GÜRAN

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım boyunca değerli yardım ve katkılarıyla beni yönlendiren hocam Prof. Dr. Leyla AÇIK'a, kıymetli tecrübelerinden yararlandığım ve çalışma boyunca manevi desteğini benden esirgemeyen hocam Prof. Dr. Şefik GÜRAN'a, laboratuvar çalışmalarım boyunca verdiği destekten ötürü GATA Tıbbi Biyoloji Anabilimdalı ve Tıbbi Genetik Bilimdalı Öğretim Üyeleri Prof. Dr. Davut Gül ve Doç Dr. Yusuf Tunca'ya ve tüm laboratuvar çalışanlarına, çalışmamın istatistiksel değerlendirmesinde değerli görüşlerinden faydalandığım Biyoistatistik Bilimdalı Öğretim Üyesi Yavuz SANİSOĞLU'na, laboratuvar çalışmalarımı yaparken iş yerimde bana anlayış ve destek gösteren çalışma arkadaşım Setenay AKGÜL'e, ve son olarak tüm tez çalışmam boyunca manevi desteğini benden esirgemeyen aileme, teyzem Asiye KURU'ya ve Gökhan ERCAN'a teşekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	vi
TEŞEKKÜR.....	viii
İÇİNDEKİLER.....	ix
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	xi
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1 Kanserin Moleküler Temeli.....	5
2.2 Akut Lösemiler.....	16
2.3 Detoksifikasyon.....	19
2.4 Kinon Oksidoredüktazlar.....	24
3. MATERYAL METOD.....	40
3.1 Materyal.....	40
3.2 Metod.....	42
3.2.1 DNA izolasyonu.....	42
3.2.2 PZR reaksiyonu.....	43
3.2.3 PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi.....	43
3.2.4 PZR ürünlerinin <i>Hinf-I</i> restriksiyon enzimi ile kesimi.....	44
3.2.5 Genotip tayini.....	44
3.2.6 İstatiksel analiz.....	44

	Sayfa
4. BULGULAR.....	45
5. TARTIŞMA.....	54
KAYNAKLAR.....	60
ÖZGEÇMİŞ.....	65

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Sebebi bilinen ölüm oranları.....	15
Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan çözeltiler.....	41
Çizelge 4.1. Hasta ve kontrol grubunun yaş, cinsiyet ve akut lösemi tipine göre dağılımları.....	51
Çizelge 4.2. Akut Lösemi hastalarında ve kontrol gruplarında NQO1 genotip ve allel frekanslarının dağılımları.....	52
Çizelge 4.3. NQO1*1 ve NQO1*2 allel frekanslarının Akut Lösemi hastalarında ve kontrol grubundaki dağılımlarının karşılaştırılması.....	53
Çizelge 4.4. NQO1*1 ve NQO1*2 genotiplerinin Akut Lösemi hastalarında ve kontrol grubundaki dağılımlarının karşılaştırılması.....	53
Çizelge 4.5. NQO1 genotipinin lösemi tiplerine göre dağılımı.....	54

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Doku homeostazını etkileyen genlerin şematik görünümü.....	6
Şekil 2.2. Karsinogenezin şematik gösterimi	11
Şekil 2.3. Kansерleşen hücrenin tumör oluşumuna kadar izlediği yolun şematik gösterimi	12
Şekil 2.4. Detoksifikasyonun şematik gösterimi.....	22
Şekil 2.5. NQO1 enziminin detoksifikasyon şeması.....	27
Şekil 2.6. NQO1 geninin düzenlenmesi.....	30
Şekil 2.7. NQO1 geninin 6. ekzonunda belirlenen polimorfizmin şematik gösterimi.....	31
Şekil 2.8. NQO1 polimorfizminin diyagram gösterimi.....	31
Şekil 2.9. Çift iplikli DNA zincirinin PZR tekniği ile çoğaltılması.....	34
Şekil 4.1. Kontrol grubu PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	47
Şekil 4.2. Hasta grubu PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	47
Şekil 4.3. Kontrol grubu <i>Hinf-I</i> enzimi ile kesim ürünlerinin agaroz jel görüntüsü.....	48
Şekil 4.4. Hasta grubu <i>Hinf-I</i> enzimi ile kesim ürünlerinin agaroz jel görüntüsü 1	49
Şekil 4.5. Hasta grubu <i>Hinf-I</i> enzimi ile kesim ürünlerinin agaroz jel görüntüsü 2.....	50
Şekil 4.6. Hasta grubu <i>Hinf-I</i> enzimi ile kesim ürünlerinin agaroz jel elektroforezi 3.....	50

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış bazı simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklama
µl	Mikrolitre
Bç.	Baz çifti
C	Sitozin
EtBr	Etidyum bromür
Gr	Gram
Kb	Kilobaz
mt/ mt	Mutant NQO1 genotipine sahip birey
ng	nanogram
Rpm	Dakikadaki devir sayısı
yt/ mt	Heterozigot NQO1 genotipine sahip birey
yt/ yt	Normal NQO1 genotipine sahip birey
Kısaltmalar	Açıklama
AIDS	Kazanılmış Bağışıklık Yetmezlik Sendromu
ALL	Akut Lenfatik Lösemi
AML	Akut Myeloid Lösemi
AP-2	Aktivatör protein 2
ARE	Antioksidant cevap elementi
CoQ	ko-enzim Q
CYP450	Sitokrom-P-450
DNA	Deoksiribonükleik asit
DOE	Amerikan Enerji Dairesi

Kısaltmalar	Açıklama
EDTA	Etilendiamintetraasetikasit
FAD	Flavin adenindinükleotit
GSTM	Glutasyon-S- transferaz
HIV	İnsan bağışıklık yetmezliği virusü
KLL	Kronik Lenfatik Lösemi
KML	Kronik Myeloid Lösemi
MPO	Myeloperoksidaz
NAD	Nikotinamid adenindinükleotit
NAT2	N- asetil transferaz
NIH	Amerikan Ulusal Sağlık Örgütü
NQO1	NAD(P)H: kinonoksidoredüktaz 1
NQO1*1	NQO1 geninin normal allelini taşıyan birey
NQO1*2	NQO1 geninin mutant allelini taşıyan birey
NQO2	NRH: kinonoksidoredüktaz 2
OR	Odds oranı
PZR	Polimeraz Zincir reaksiyonu
RE	Restriksiyon Endonükleaz Enzimi
RFLP	Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi
ROS	Reaktif oksijen türevleri
UV	Ultraviyole ışınları
XRE	Ksenobiyotik cevap elementi

1. GİRİŞ

İnsanlık tarihinin önemli bilimsel projelerinden bire de hiç kuşkusuz İnsan Genom Projesidir. Amerikan Enerji Dairesi (DOE) ve Amerikan Ulusal Sağlık Örgütü (NIH) gibi Amerikan kurumları tarafından 1990 yılında resmen başlatılan proje; Avustralya, Brezilya, Kanada, Çin, Danimarka, Fransa, İngiltere, İsrail, Japonya, Almanya, İtalya, Hollanda, Kore, Meksika, Rusya, İsveç gibi çeşitli ülkelerin katılmasıyla uluslar arası bir boyut kazanmıştır [Ulutin, 2005].

İnsan Genom Projesi ile 100,000 olduğu tahmin edilen insan genlerinin; yapılarını, genomdaki yerlerini ve fonksiyonlarının anlaşılabilmesi için 3 milyar baz diziliminin belirlenmesi amaçlanmıştır. Planlanandan iki yıl önce haritanın kabaca olduğu açıklanmıştır. İnsan genom çalışmalarıyla tek yumurta ikizleri dışında her insanın kendine özel bir genom versiyonuna sahip olduğu gösterilmiştir [Goldstein, 2003]. Genomlar arasındaki farklılıkların en büyük kaynağı, tek nükleotid polimorfizmleridir. İnsan DNA'sında 1,4 milyon kadar tek nükleotid polimorfizmi belirlenmiştir. İnsan genom projelerinden sağlanan bilgilerin farmakogenetiğe uyarlanmasıyla bireysel tedaviler gündeme gelmekte ve tedavi için verilebilecek ilacın metabolik hızı, potansiyel risk yada yan etki olasılığı önceden belirlenebilmektedir [Evans, 2003]. Genetik farklılıklar, ilaç metabolizmasını değiştirerek ya da enzim ve/veya reseptörleri, substrat ya da ligantlara olan bağlanma etkilerini değiştirerek organizmanın ilaca olan yatkınlıklarını etkileyebilmektedir [Bennet ve ark., 1996]. Bireyler arasındaki bu farklılığın kanser, diyabet, çeşitli dolaşım ve mental hastalıkların moleküler temelini oluşturduğu düşünülmektedir. Elde edilen bu bilgilerle bir çok hastalığın temelinde yatan genetik değişimler aydınlatılabilecektir. Bireyler arasındaki bu farklılığın aydınlatılmasıyla kişiye özel tedavi yaklaşımları geliştirilebilecektir [Johnson, 2003].

Kanser temelinde bir hücre hastalığı olup latince yengeç anlamına gelmektedir. Kanser, hücresel genlerdeki mutasyona bağlı olarak hücre çoğalmasının kontrolünün kaybolması sonucunda ortaya çıkan özünde genetik bir hastalıktır [Sarasin, 2003]. Hücrede meydana gelen morfolojik, biyokimyasal ya da çoğalma özelliklerinde

anormal sapmalar sonucu hücre kanserleşir. Hücre üreme hızı artar, kontak inhibisyon kaybolur. Besin maddelerinin hücreye girişi artar, metabolik hız ve glikoliz artar. Kanserli hücrenin, çoğalması için gerekli olan büyüme faktörlerine olan ihtiyacı azalır, bir süre sonra gerekli olan büyüme faktörlerini kendisi üretir. Bir takım hücresel genler inaktive olurken bir kısmı aktive olur [Hanahan ve Weinberg, 2000].

Kanser oluşumunda bir çok faktör özellikle yaş, cinsiyet, çevresel etmenler rol oynamaktadır. Sigara kullanımı, mesleki nedenlerle kimyasal maddelere (benzen, arsenik, kadmiyum, krom) maruziyet, fiziksel çevreden gelen iyonize ve iyonize olmayan radyasyon, çeşitli viruslar gibi etmenler genetik faktörlerle birleşerek kanser oluşum riskini artırmaktadır [Hunter, 2005].

İnsan vücudu hayat boyunca iç veya dış kaynaklı bir çok toksine maruz kalmaktadır. Vücudumuzda toksinlerin kötü etkilerini ortadan kaldırmak için çeşitli enzim sistemleri bulunmaktadır. Bu enzimler toksinlerin zararlı etkilerini azaltmayı (detoksifikasyon) hedefler [Liska, 1998]. Bugüne kadar yapılan birçok çalışmada detoksifikasyon mekanizmalarındaki bozuklukların çeşitli kronik hastalıkların ve kanserin üzerinde etkili olduğu ve bu hastalıkların etiyoloji ve seyrini etkilediği ortaya konulmuştur [Liska ve ark., 1999].

Detoksifikasyon; polar olmayan bileşiklerin, polar bileşiklere çevrilip, boşaltım organlarından (böbrek, karaciğer, akciğer, deri) atılmasıdır. Bireyler arasındaki oluşan farklılıkların bir sonucu da detoksifikasyon mekanizmasında yer alan enzimleri kodlayan genlerdeki polimorfizimlerdir. Bu durum bireyin yaşadığı çevreye, hayat tarzına, yaşına ve cinsiyetine göre değişiklik göstermektedir [Liska, 1998].

Populasyonda %1'den daha yüksek oranda bulunan gen seçenekleri polimorfizm olarak tanımlanır. Toplumdaki bir organizma birden fazla fenotip oluşturan aynı lokustaki birden fazla allelin mevcudiyeti sonucu ortaya çıkan bir özelliktir. Enzimleri kodlayan genlerdeki polimorfizm sonucu enzimlerin allelik varyantları

ortaya çıkar [Vineis. 2002]. Bunun sonucunda vücuda giren ksenobiyotiklerin bu enzimlerle detoksifiye olma kapasitesi etkilenir. Polimorfizmin fenotipe yansması sonucunda protein ve enzim ifadesinde farklılıklar, dolayısıyla enzimin aktivasyonunda değişiklikler meydana gelir. Enzimlerde oluşan bu polimorfik durum ile bireyin kansere yatkınlığı arasındaki yakın ilişkiler üzerine çalışmalar yoğunlaşmıştır [Bennet ve ark., 1996].

Akut lösemiler hızlı ilerleyiş gösteren bir hastalık olup, olgunlaşmamış ve fonksiyonel olmayan hücrelerin kemikiliği ve kanda birikmesiyle karakterizedir. Kansereleşmiş kan hücrelerinin anormal artışına bağlı olarak normal hücrelerin gelişimi baskılanmaktadır [Yakut ve Gülten, 2005].

Bu çalışmada; 78 akut lösemi hastası ve 87 sağlıklı bireyden izole edilen DNA örneklerinde, detoksifikasyonun faz-I safhasında görevli olup, kinon ve türevlerinin biyoaktivasyonunda görev alan *NAD(P)H: kinon oksidoredüktaz* (NQO1) adlı enzimi kodlayan gen üzerindeki C→T polimorfizminin dağılımını ve allel frekanslarını belirlemek suretiyle mutant genotipin Akut lösemiye yatkınlık sağlayıp sağlamadığı araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

Kanser, temelde bir hücre hastalığıdır. Canlı organizmada görülen hücre çoğalmasının düzenlenmesi çeşitli nedenlerden ötürü bozulmaktadır. Canlının ihtiyacı olmadığı halde, herhangi bir dokuda meydana gelen kontrolsüz hücre bölünmesi sayısal olarak hücre artışına ve neticede tümör oluşumuna sebep olmaktadır. Kanser, hücresel genlerdeki mutasyona bağlı olarak hücre çoğalmasının kontrolünün kaybolması sonucunda ortaya çıkan, özünde genetik bir hastalıktır. Hücrelerde ortaya çıkan morfolojik, biyokimyasal yada çoğalma özelliklerindeki anormal sapmalar transformasyon olarak adlandırılır. Bu transforme hücrelerin tümör oluşturabilme özelliğine de malign transformasyon denir [Dixon ve Kopras, 2004].

Transforme olan hücrelerde morfolojik, fenotipik ve genotipik değişiklikler meydana gelir. Kansereleşen hücrelerin üreme hızı artar, kontak inhibisyon kaybı gözlenir. Normal hücreler kültür ortamında kontak inhibisyonu nedeniyle birbirlerine sıkı bir biçimde bağlıdırlar ve hücreler tek tabaka oluşturduktan sonra çoğalmazlar. Kanser hücrelerinde kontak inhibisyon kaybı gözlenir dolayısıyla sürekli çoğalarak birkaç tabakalı düzensiz kitleler oluştururlar. Kanser hücrelerinin büyüme faktörlerine gereksinimleri azalır, kendi büyüme faktörlerini kendileri sentezleyebilirler. Yarı-katı ortamda koloni oluşturabilirler. Katı yüzeylere tutunma özellikleri kaybolur. Besin maddelerinin hücreye girişi artar. Hücre içinde proteaz ve proteaz aktivatörlerinin salınımı artar. Hücre yüzeyindeki glikoprotein ve glikolipit yapılarında değişiklikler meydana gelir. Hücrenin metabolik hızı ve glikoliz artar. Hücre iskeletindeki değişiklikler sonucunda yuvarlaklaşır [Delerenko, 1998].

2.1. Kanserin Moleküler Temeli

Kanser ilk bakıldığında tek bir hastalık gibi görülse de; gerçekte hücre ve dokuları etkileyen karmaşık bir sürecin tümüdür. Tümör bölgesindeki hücreler sayısal olarak artış gösterirler ve buna bağlı olarak artan besin ihtiyacını gidermek için en yakın kan ve lenf yoluna kendi damarlarını oluşturarak ulaşırlar. Bu hücreler şekil ve fonksiyon bakımından normal hücrelerden farklı bir durum gösterirler. Sonuçta hem yapısal

hem de işlevsel olarak anormal bir doku kitlesi oluşur. Bulunduğu yerdeki organı işgal eder, oluşturduğu kan damarlarıyla dolaşıma girer ve yeni dokulara yayılabilir. Buna metastaz denir. Böylece kontrolsüz olarak çoğalan, başka dokulara yayılıp onların fonksiyonlarını da etkileyen ve organizmanın tüm dengesini sarsan kanser hücreleri çeşitli nedenlerle ölüme yol açar [Macdonald ve ark., 2004].

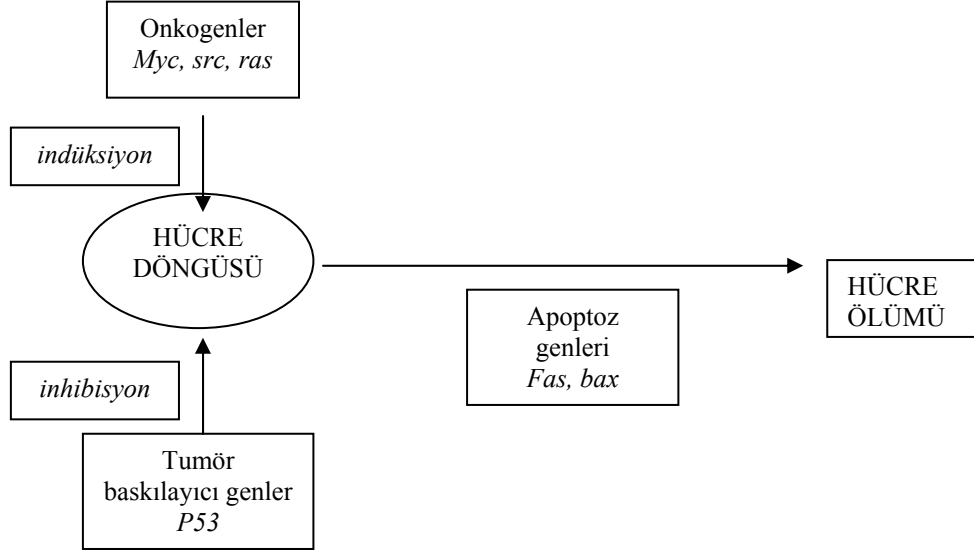
Vücudumuzdaki birçok hücrenin serbest dolaşıma izni yoktur, yani doğdukları yerde yaşar ve ölürler. Kanserli hücrelerin en tehlikelileri ise hastalığın ileri aşamalarında vücudun içinde dolaşmaya başlarlar ve bu durum kanser tedavisinin en önemli engellerinden biridir. Gezici kanser hücreleri, kanserli dokudan kopup dokular arası duvarları özel enzimlerle eriterek dokudan kan bazen de lenf sistemine karışırlar. Kalp tarafından sürekli vücudun dokularına pompalanan kan sıvısı içinde yolculuğa çıkan bu gezici hücreler genelde immün sistemin T hücreleri tarafından doğrudan yok edilir. Bunlardan kurtulan bazı kanser hücreleri kendilerine saklanmaya ve üremeye uygun dokular bulduklarında yeniden çoğalmaya başlayabilirler.

Kanser hücrelerini normal hücrelerden ayıran tüm bu özellikler hücrenin DNA'sında meydana gelen mutasyonlar sonrasında oluşmaktadır. Hücre çoğalmasını negatif ve pozitif yönde etkileyen bir takım genler mevcuttur. Hücrenin yaşamı bu genlerin kontrolü altındadır. Sağlıklı bir dokuda bu genlerin belli bir dengede kalması gerekmektedir. Bu denge pozitif yönde etkileyen genler lehine bozulursa hücre kanserleşir [Klug ve Cummings, 2002].

Hücre içindeki ve hücre dışındaki dengenin korunmasını sağlamak için gerekli tüm işlemlere homeostaz denir. Dinamik bir denge durumudur. Doku homeostazını etkileyen genler üç gruba ayrılabilir. Bunlar onkogenler, tümör baskılayıcı genler, apoptozda görev alan genleridir. Bu genlerin hücre üzerine olan etkisi şematik olarak Şekil 2.1'de gösterilmiştir [Macdonald ve ark., 2004].

Normal dokulardaki hücreler programlı şekilde bölünür, farklılaşır ve ölürler. Proto-onkogenler, normal hücre bölünmesiyle ilgili metabolik yolları, farklılaşmayı düzenleyen proteinlerin genleridir. Proto-onkogenler evrimsel süreçte türler arasında

oldukça iyi korunmuştur. Çünkü bu genlerin normal işleyişleri, hücreyi kontrollü şekilde çoğaltmak, özgün şekilde farklılaştırmak ve organizmayı oluşturmaktır.



Şekil 2.1. Doku homeostazını etkileyen genlerin şematik gösterimi [Macdonald ve ark., 2004].

Onkogenler ise hücre genlerinden olan proto-onkogenlerin değişmiş şekilleridir. Hücre reseptörlerine bağlanan büyüme faktörleri, hücre zarında bulunan transmembran trozin kinazlar, hücre sitoplazmasında bulunan sinyal iletiminde görevli olan proteinler, hücre çekirdeğinde gen ifadesinden sorumlu olan transkripsiyon faktörlerinin hepsi proto-onkogen ürünleridir. Proto-onkogenleri onkogenlere dönüştüren mutasyonlar; nokta mutasyonları, kromozomal translokasyonlar, gen çoğalması, inversiyonlar, protein-protein etkileşimleridir. Bu genlerde meydana gelen mutasyon sonucunda hücre anormal olarak uyarılmakta, çevreden gelen sinyallere gerek kalmaksızın kontrolsüz hücre bölünmesine başlamaktadır. Onkogen olması gerektiğinden çok daha fazla ifade edilebilir, yanlış zamanda yapılan protein fosforilizasyonu nedeniyle hücre bölünmesi tetiklenebilir yada yapısı değişmiş proteinler sentezlenebilir [Brenner ve Dugogan, 2004].

Normal bir hücrenin bölünmesi ve farklılaşması, büyüme faktörleri, sitokinler, hormonlar ve onların reseptörleri ile ilişkilidir. Reseptörlerin aktivasyonu ile hücre

içi sinyaller iletilir ve hücre ölümüyle ilgili genler baskılanır. Proto-onkogenlerin ürünleri bu basamaklarda kritik noktalarda görev alırlar. Hücre dışı büyüme faktörlerinin uyarılmasını sağlarlar. DNA replikasyonunu tetiklerler [Sherr, 2004].

Hücre döngüsü DNA replikasyonu ve hücre bölünmesini içeren G_1 , S, G_2 , Mitoz safhalarından oluşur. G_1 , S, G_2 hücre bölünmesinin interfazını oluşturur. G_1 safhasında DNA replikasyonu ve hücre bölünmesi için gerekli proteinlerin sentezi yapılır, S safhasında DNA replikasyonu gerçekleşir, G_2 safhasında da hücre bölünmesi için gerekli son hazırlıklar tamamlanır. Eğer tüm bu aşamalar sağlıklı bir biçimde tamamlanırsa hücre mitoz girer. Hücrede mutasyonların en sık ortaya çıktığı dönemler S ve G_2 safhalarındadır. S safhası ne kadar uzun olursa mutasyon oluşma ihtimali o kadar artmaktadır. Mitoz ile çoğalan hücrelerin bölünme kapasiteleri de sınırlıdır, hücrelerdeki bu programlı fizyolojik yaşlanma ve ölüm mekanizmasına apoptoz denir. Bu mekanizmanın bozulması kanser oluşumunun temelidir [Klug ve Cummings, 2002].

Hücre döngüsünün herhangi bir safhasında hata söz konusu ise döngü muhtemel tamir için bloke olur. Hücre döngüsü iki noktada genetik kontrolden geçirilir. İlki DNA sentezinden hemen önce (G_1/S), ikincisi mitozdan hemen önce (G_2/M) yapılır. İlk kontrolde DNA sentezi için uygun hücre dışı sinyaller ve tüm mekanizmanın kontrolü yapılır. DNA replikasyonu başlamadan DNA'nın hatasız olduğundan emin olunur. Eğer herhangi bir hata varsa hücre döngüsü yavaşlatılır ve tamir yapılır, tamir edilemiyorsa hücre apoptozla gönderilir. İkinci kontrol mitoz girmeden hemen önce oluşacak yeni hücrelere hatasız DNA kopyalandığından emin olunmak için yapılır. Aynı zamanda mitozun sorunsuz tamamlanabilmesi için gerekli tüm proteinler, iğ iplikçiklerini oluşturacak tüm materyaller eksiksiz olarak tamamlandıysa hücrenin mitoz girmesine izin verilir. Bu geçiş dönemlerinde varsa, hatalar düzeltilir. Büyümeyi durduran sinyaller ile büyümeyi tetikleyen sinyaller arasındaki denge, hücrenin döngüyü tamamlamasına ya da sonlandırmasına karar verir [Klug ve Cummings, 2002]. DNA tamir genlerinde meydana gelen mutasyonlar sonucunda bu genler aktifliklerini kaybederler. Dolayısıyla oluşan mutasyonlar tamir edilemez, birikir. Bunun sonucunda hücre kanserleşme yolunda ilerler. Kanserleşme sürecinde

en çok mutasyona uğrayan proto-onkogenlere örnek olarak *ras*, *myc*, *siklin-D*, *bcl-abl* genleri verilebilir [Sherr, 2004].

Organizmadaki doku homeostazı için, hücre bölünmesi ve ölümü arasında bir denge olmalıdır. Proto-onkogenlerin düzenlenmesinin bozulması hücre çoğalmasına neden olur. Benzer şekilde hücre çoğalmasını durduran, apoptozu tetikleyen genlerin aktifliğini kaybetmesi de kanser gelişimini (karsinogenez) hızlandırmaktadır [Derelenko, 1998].

Tumör baskılayıcı genler hücre çoğalmasını engelleyen genlerdir. Apoptozu tetiklerler. Apoptoz genetik kontrol altında olan, organizmanın kendi iyiliği için hücrenin kendi kendisini yıkmaya karar verdiği, programlı hücre intiharıdır. Çok hücreli canlılarda apoptoz kullanılmayan hücrelerin ortadan kaldırılmasında, varlığı organizma için tehdit oluşturan hücrelerin ortadan kaldırılmasında görev alır [Macdonald ve ark., 2004].

Tumör baskılayıcı genler ilk kez çok seyrek görülen kanser türlerinden olan retinoblastoma üzerinde yapılan çalışmalar sonucunda keşfedilmiştir. Tanımlanması onkogenlere oranla çok daha zor olmuştur. Tumör baskılayıcı genler kalıcı olarak aktifliğini kaybettiği zaman, hücre kontrolü olmaksızın bölünmeye devam eder ve nihayet kanserleşir. Bu gen ürünlerinin bir çoğu transkripsiyon faktörüdür. Transkripsiyon faktörleri genin promotor bölgesine bağlanırlar. Bu bölge hücre bölünmesinin G₁/S fazları arasındaki geçiş dönemini kontrol eder. Dolayısıyla bu transkripsiyon faktörlerinde meydana gelen mutasyon sonucunda G₁ hazırlık dönemi tamamlanmadan sentez aşamasına geçilir. Ayrıca DNA replikasyonu esnasında meydana gelen mutasyonlar da tamir edilmeksizin döngü tamamlanır. Bu sayede değişime uğramış hücreler oluşur ve neticede kanserleşir. Tumör baskılayıcı genlerden *p53* geni insan kanserlerinin yaklaşık %50 sinde aktifliğini kaybetmiştir. Normal bir hücrede *p53* konsantrasyonu düşüktür. Fakat hücrenin DNA'sı hasar gördüğünde bu oran dramatik bir şekilde artmakta, ortalama 60 katına çıkmaktadır. Bunun sonucunda hücre döngüsü G₁ safhasında bloke edilir ve apoptoz tetiklenir [Macdonald ve ark., 2004]. Tumör baskılayıcı genler tarafından sentezlenen

proteinler hücredeki önemli efektör proteinlere bağlanarak bunların işlevlerini engeller. En önemli baskılayıcı genler; *BRCA-1*, *BRCA-2*, *Rb*, *p53*'tür [Sherr, 2004].

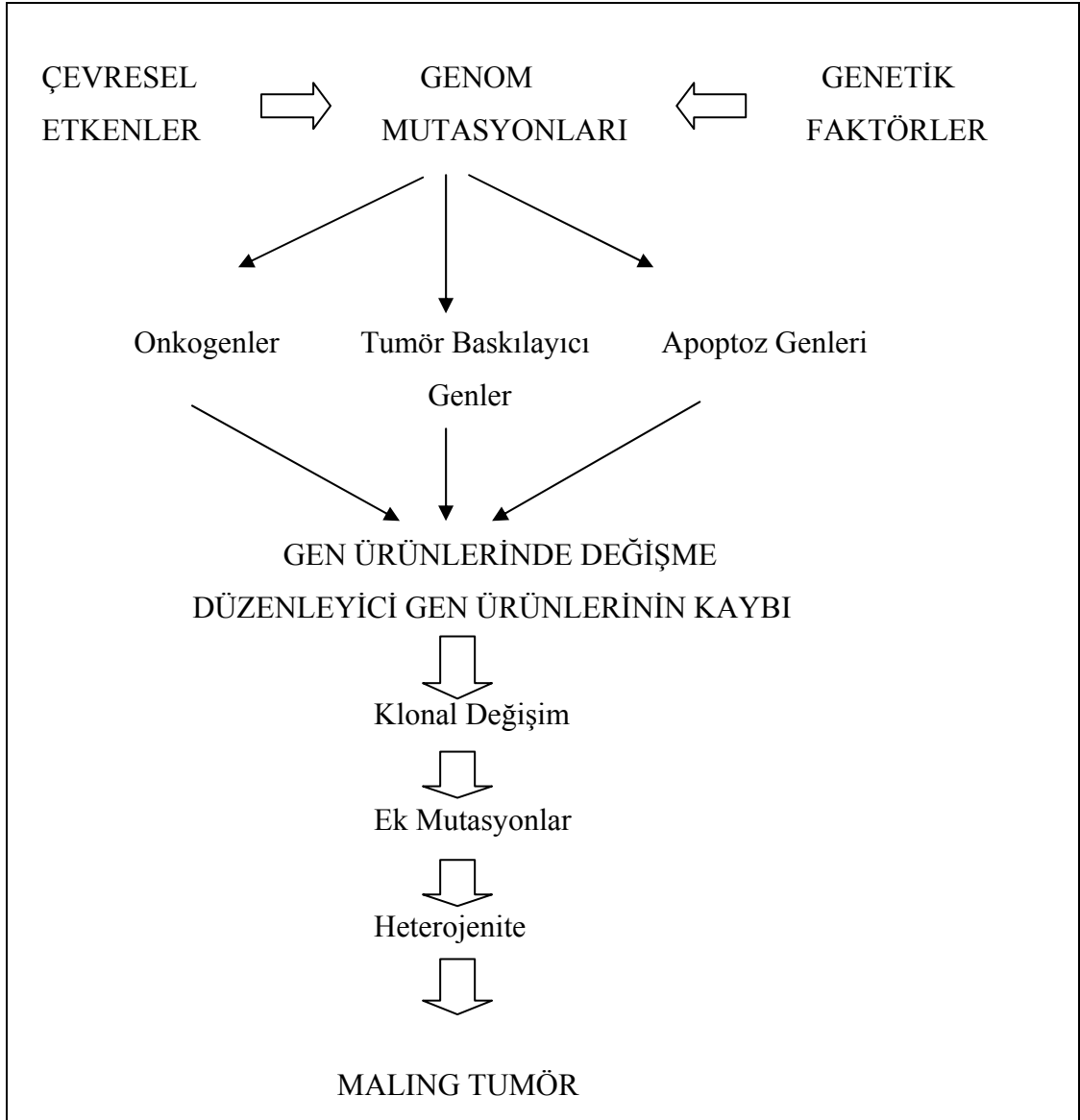
Organizmadaki hücrelerin sınırlı bir bölünme sayısı ve ömür uzunluğu vardır. Kanser hücrelerinin sınırsız sayıda çoğalmalarının bir diğer sebebi de kromozom uçlarındaki telomer bölgeleridir. Kromozomların uç kısımlarında kromozomları parçalanmaktan ve uçlarının kısılmasından koruyan telomer adı verilen tekrarlanan diziler bulunmaktadır. İşlevsel telomerler olmaksızın, genetik bilgi kaybolabilir, yeniden düzenlenebilir ya da kararsızlaşır. Normal bir hücre her DNA replikasyonu sonrasında replikasyonda kullanılan primer boyu kadar kısalmaktadır. Telomerin eşik değere kadar kısılması hücre genomunda kararsızlığa ve sonuçta apoptotik ölüme götüren bir sinyal olarak algılanır. Dolayısıyla normal hücreler telomerlerinin yeterince kısılması sonucunda yeni bir bölünmeye giremezler, sonuçta hücre yaşlanır ve ölür. Oysa ki; embriyonik kök hücrelerde ve birçok kanserli hücrede telomeraz enzimi sayesinde telomerler hiç kısılmamakta ve hücre ölümsüzleşmektedir [Cech, 2004].

Tüm bu mutasyonların yanında DNA ve histon metilasyonu, asetilasyonu, fosforilasyonu gibi bazı epigenetik değişimlerle de kanser genlerinin ifadenme özelliklerini değişikliğe uğratılabilmektedir. Örneğin proto-onkogenlerin promotorunun CG bölgesindeki metilasyonun ortadan kalkması genin aşırı ifadenmesine neden olurken, çok fazla metillenmesi gen ifadenmesini engellemektedir [Feinberg ve Tyco, 2004].

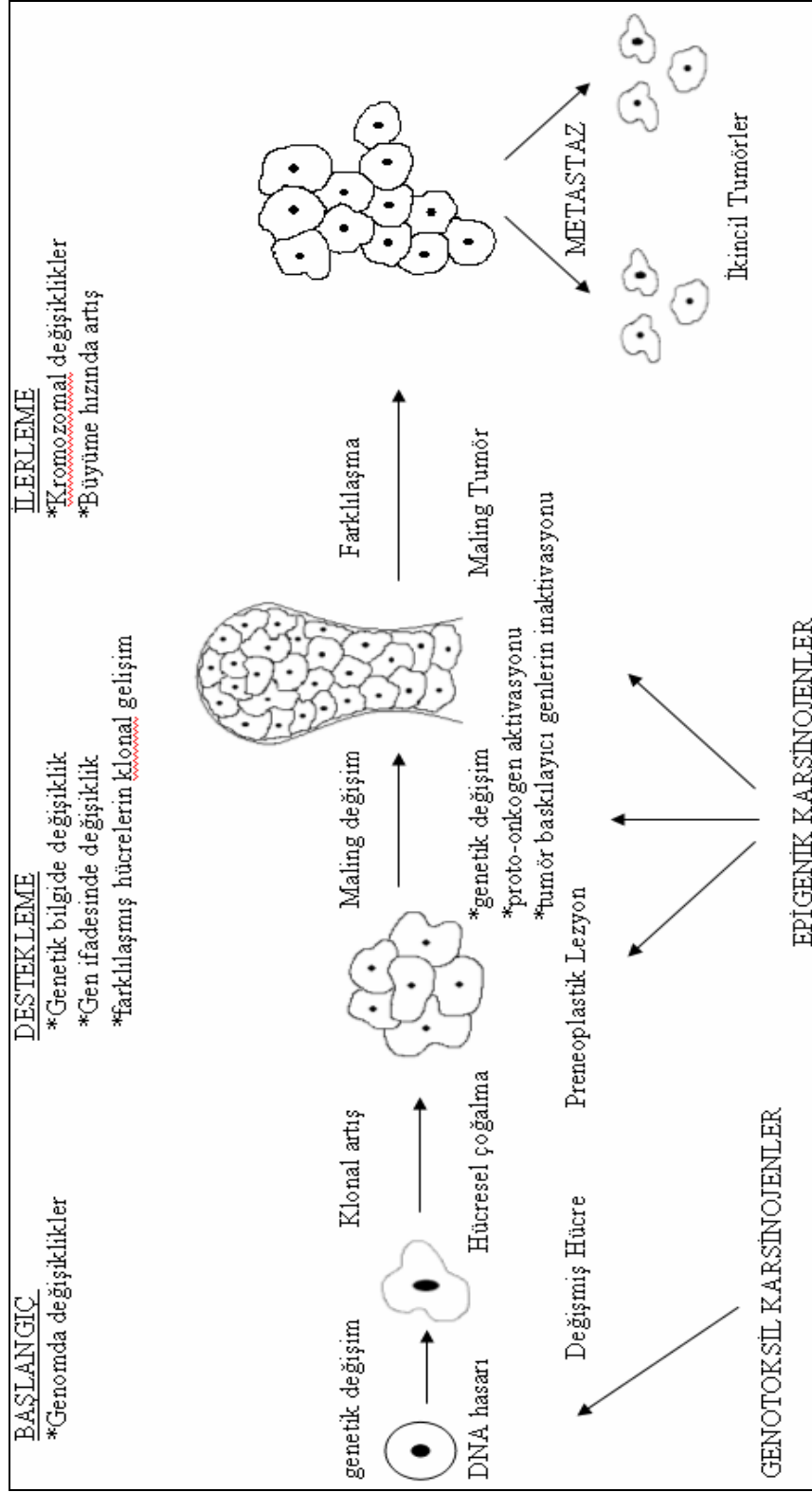
Günümüzde kabul gören görüşe göre karsinogenez çok basamaklı karmaşık bir süreçtir. Tek bir hücreden, kötü huylu tümöre uzanan süreç kabaca üç ana bölüme ayrılmaktadır. Bunlar; başlangıç (initasyon), desteklenme (promosyon), ilerleme (progresyon) aşamalarıdır [Derelenko, 1998]. Başlangıç aşamasında, karsinogene maruz kalınmasından kısa bir süre sonra, tek bir hücrede geri dönüşümsüz olarak çeşitli genomik değişiklikler meydana gelmektedir. Genetik değişikliğe uğramış olan hücreler çoğalmaya başlayarak sayılarını artırılır. Fenotipik anormallikler ortaya çıkıncaya kadar, DNA da yeni mutasyonlar oluşur. Oluşan yeni mutasyonlar bu

hücrelere seçici çoğalma özelliği kazandırır. Başlangıç aşamasının genellikle DNA'da ortaya çıktığı kabul edilse de, bu ilk aşama RNA'da veya bunların ürünü olan enzimlerde, proteinlerde de ortaya çıkabilir. Destekleme aşaması ile ilerleme safhaları arasındaki ayırım net değildir ve destekleme aşamasındaki biyokimyasal ve morfolojik değişikliklerin bir kısmı ilerleme sırasında da devam eder. İlerleme aşamasında çoğalma, invazyon, metaztas özellikleri daha yüksek olan yeni klonlar oluşturulur [Derelenko, 1998]. Aynı tümör içindeki her bir kanser hücresi çok yüksek oranda genotipik ve fenotipik heterojeniteye sahiptir. Sonraki kanser hücrelerinin çok daha dirençli ve kötü huylu olma özelliği kanser tedavisini zorlaştıran bir durumdur.

Kanser yapan (karsinojen) maddeler etkili oldukları aşamaya göre kendi aralarında ayrılırlar. Başlangıç safhası olmadıkça desteklenme aşamasında etkili olan maddeler malign transformasyona neden olamaz. Başlangıç safhası geri dönüşümsüz olmasına rağmen, desteklenme safhası özellikle erken dönemlerde geri dönüşümlüdür. Kanserleşen hücrenin gelişimi şematik olarak Şekil 2.2 ve Şekil 2.3'de gösterilmiştir [Derelenko, 1998].



Şekil 2.2. Karsinogenezin şematik gösterimi



Şekil 2.3: Kanserleşen hücrenin tümör oluşumuna kadar izlediği yolun şematik gösterimi [Derelenko, 1998].

Kanser kimyasal mutajenler, fiziksel etmenler (radyasyon ve ultraviyole ışınları), alınan gıdalar, sigara, yaşlanmış hücrede biriken toksik maddeler, virüsler ve çevre kirliliği, yaşam tarzı ve stres tarafından tetiklenmektedir. Günümüzde insanoğlunun hizmetine sunulmuş olan 2-3 milyon kimyasal madde mevcuttur. Bunlardan sadece belli bir kısmının mutajenik ve kanserojenik etkileri incelenmiş, geri kalanının etkisi bilinmemektedir. Mesleki nedenlerden ötürü bazı ağır metaller ve çeşitli kimyasallara maruziyet bazı kanser türlerine yatkınlık sağlamaktadır. Bunlar benzen, naftilamin, is, katran, mineral yağlar, yangın söndürmede kullanılan karbonditriklorid ve naylon yapımında kullanılan akrilnitril, inorganik bileşiklerden asbest, arsenik, kadmilyum, krom gibi maddeler yer almaktadır. Boya sanayisi gibi alanlarda aromatik amin ve anilin boyları ile çalışanlarda mesane kanseri gelişme riskinin arttığı görülmüştür. İzolasyon sanayinde kullanılan asbest ise mezotelyoma çok sık izlenmiştir [Hunter, 2005].

Fiziksel karsinojenlerden iyonize radyasyon, ultraviyole ışınları (UV) sayılabilir. Yaşanan nükleer patlamalar sonrasında insanlarda lösemi, lenfoma, tiroid kanseri görölme riski artmıştır. Ultraviyole ışınlar ise deri kanserine yakalanma riskini arttırmaktadır. Kanserleşme süreci Şekil 2.3’de şematik olarak gösterilmiştir.

Aspergillus flavus, *Aspergillus parasiticus* ile enfekte olan besinlerde oluşan alfatoksinler DNA mutasyonu ile karaciğer kanserine yol açmaktadır. Besin zinciri yoluyla insanlara ulaşan pestisitlerin çoğu, besinlere renk vermekte kullanılan boya maddeleri, korumada kullanılan katkı maddelerin çoğunun mutajenik özelliğe sahip olduğu bilinen gerçektir. Yine beslenme alışkanlığı da kanser gelişimini etkilemektedir. Kırmızı et, hayvansal yağ, tavuk derisinin tüketilmesi kanser gelişiminde rol oynayan çevresel faktörlerdir [Sarasin, 2003].

Diğer taraftan ultraviyole ve radyasyon da kanserojen maddelerdir. Ultraviyole ışığına maruz kalan deride deri kanseri, X ışınlarına maruz kalan kişide tiroid kanserine sebep olmaktadır. Bu yüksek enerjili ışınlar etki ettikleri hücrelerin DNA’sında kırılmalara ve mutasyonlara neden olmaktadır [Sarasin, 2003].

Sigarada özellikle benzopiren maddesi akciğer, üst solunum yolları, özefagus, pankreas, mide, karaciğer, barsak ve böbreklerde kansere yol açmaktadır. DNA'daki guanin bazlarını timine dönüştürerek etki eder. Sigara akciğer kanserinin neredeyse tamamından sorumludur [Sarasin, 2003].

Bazı virusler kanser gelişimini tetiklemektedir. HIV (İnsan bağışıklık sistem eksikliği virüsü) virusüne bağlı gelişen AIDS (Kazanılmış Bağışıklık Yetmezlik Sendromu) hastalarında Kaposi sarkoma, hepatit B ve C geçiren bireylerde karaciğer kanseri gelişmektedir.

Genetik faktörler ise kanser vakalarının %5 açıklayabilmektedir. Kalıtsal geçiş gösteren kanser tipleri kalınbarsak, meme, yumurtalık, beyin ve deri kanseridir [Klug ve Cummings, 2002].

Kanser, günümüzün en önemli sağlık sorunlarından biridir. Sık görülmesi ve öldürücülüğünün de yüksek olması nedeniyle de bir halk sağlığı sorunudur. Tanı olanaklarının gelişmesi ve sağlık kurumlarından yaralanma olanaklarının artması ile her yıl daha çok kanser vakası teşhis edilmektedir. Ayrıca enfeksiyon hastalıklarının kontrol altına alınması, diğer hastalıklara karşı etkin tedavi yöntemlerinin kullanılması, toplum bilincinin gelişmesi ve kanser tedavisindeki gelişmeler nedeniyle kanser sıkça rastlanan bir hastalık durumuna gelmiştir. Yaşam standardının yükselmesi dolayısı ile yaşam süresinin uzaması ve yaşlı nüfusun artması, gelişen teknoloji ile çevresel karsinojenlere daha fazla maruz kalma durumu da kanser insidansının artmasına neden olmaktadır.

Dünya sağlık örgütünün yaptığı kapsamlı çalışmalar, kurulan kanser kayıt sistemlerinden gelen bilgilerin ışığında kanser prevalansı, mortalitesi ve insidansı hakkında istatistiksel bilgiler toplanmaktadır.

Parkin ve arkadaşlarının 2002 yılına ait, oldukça kapsamlı yapılan veri toplama çalışmaları sonucunu 2005 yılında yayınlamışlardır. Buna göre 5 kıtada kanser insidansı, mortalitesi ve prevalansı, yaş ve cinsiyet durumuna göre 26 kanser tipi

araştırılmıştır. Buna göre dünyadaki en yaygın ve ölümcül kanser olarak akciğer kanseri belirlenmiştir. 2002 yılında 1,35 milyon akciğer kanseri tanısı konulmuştur. Tek başına tüm kanserlerin içinde %12,5'lük yer kaplamaktadır. Akciğer kanserini 1,15 milyon insanla meme kanseri izlemektedir. Kadınlarda en sık rastlanan kanser tipi meme kanseri olmuştur. Kolon ve rektum kanseri %9,4'lük bir oranla üçüncü sırada yer almaktadır. Mide kanseri bugüne kadar dünyada ikinci en yaygın kanser tipi iken 2002 yılında 934,000 kişi ile dördüncü sıraya gerilemiştir. 679,000 kişi ile prostat kanseri tüm kanserler içinde beşinci sırada yer alırken, erkeklerde rastlanan ikinci sırada yer alan kanser tipi olmuştur. Karaciğer kanseri altıncı sırada yer alırken, serviks kanseri 493,000 adet yeni olgularla yedinci sırada yer almıştır. Serviks kanseri meme kanserinden sonra kadınlarda rastlanan ikinci kanser tipidir. Bunları sırasıyla özefagus, mesane, lenfoma, lösemi takip etmektedir [Parkin ve ark., 2005].

Çizelge 2.1. Sebebi bilinen ölüm oranları

Ölüm Sebebi	% oranı
Kardiyovasküler hastalıklar	36
Kanser	11
Serebrovasküler hastalıklar	7
İnfeksiyon hastalıkları	7
Kazalar	4
Diğer Sebepler	35

Ülkemizde 1970'li yıllarda sebebi bilinen ölümler arasında dördüncü sırada yer alan kanser, son yıllarda kardiyovasküler sistem hastalıklarından sonra ikinci sıraya yükselmiştir. Gelişmiş ülkelerde bir yılda görülen kanser insidansı, yüzbinde 400 civarında iken sağlık bakanlığı kanser kayıt merkezine bildirilen kanser oranı yüzbinde 35-40 civarındadır. Kanser, Türkiyede 1982 yılında “bildirimi zorunlu hastalıklar” listesine alınmış olmasına rağmen ülkemizde gerçek kanser insidansı bilinmemektedir. Sağlık Bakanlığı Kanserle Savaş Daire Başkanlığın yaptığı açıklamaya göre bu oranın gerçekte, yüzbinde 150-200 olduğu düşünülmektedir.

Türkiye’de erkeklerde görülen ilk beş kanser tipi; akciğer (%32), mide (%7,2), mesane (%6,5), larinks (%5,5), kolon / rektum (%5) kanseridir. Türkiye’de kadınlarda görülen ilk beş kanser tipi; meme (%23,4), mide (%6,2), ovaryum (%5,6), akciğer (%4,9), hodgkin dışı lenfoma (%4) kanseridir.

2.2. Akut Lösemi

Kan hücreleri kemikiliğinde hematopoez adı verilen sıkı kontrol altındaki ama esnek bir süreç neticesinde kan yapıcı ana hücreler (hematopoetik kök hücre) tarafından üretilirler. Tüm kan hücreleri kemikiliğindeki az sayıda bulunan, uzun ömürlü pluripotent hematopoetik kök hücrelerinden köken alır. Kök hücreleri kendini yenileyebilme ve farklılaşma özelliklerine sahiptirler. Bu farklılaşmanın son aşamasında hücreler dolaşıma salınır ve bundan sonra bölünmezler. Bu farklılaşma ve çoğalma, kemikiliğindeki hücrelerin birbiriyle iletişimleri, büyüme faktörleri ile kontrol altında tutulur. Bir büyüme sinyali olmadığında, hematopoetik hücrelerin dengesini sürdürmek için apoptoz başlar [Yakıcıer, 2005].

Hematolojik kanserler, kan hücrelerinin kontrolsüz olarak çoğalması sonucunda ortaya çıkarlar. Bütün kanserlerde olduğu gibi tek bir hücrenin genetik değişimlerle büyüme ve yaşama avantajı kazandığı çok basamaklı bir süreç olduğu bilinmektedir [Yakut ve Gülten, 2005].

Lösemi ise normal kan hücrelerinin gelişim, olgunlaşma ve/veya hematopoez sürecinde rol oynayan genlerin mutasyon ya da epigenetik değişiklik sonucunda hatalı çalışmaları sonucunda gelişir. Kontrolsüz olarak olgunlaşmamış kan hücrelerinin birikimi ile karakterizedir. Dört kategoriye ayrılmaktadır. Hastalığın klinik seyrine göre akut/ kronik, köken aldığı hücreye göre miyeloid/ lenfatik olarak adlandırılır. Buna göre Akut Lenfatik Lösemi (ALL), Kronik Lenfatik Lösemi (KLL), Akut Myeloid Lösemi (AML), Kronik Myeloid Lösemi (KML) olmak üzere dörde ayrılır [Rowe, 1995].

Akut lösemiler hızlı ilerleyiş gösteren bir hastalık olup, olgunlaşmamış ve fonksiyonel olmayan hücrelerin kemikiliği ve kanda birikmesiyle karakterizedir. Bir süre sonra kemikiliği normal eritrosit, lökosit ve trombosit üretemez hale gelir. Kemikiliğinde oluşan primer hematopoetik kanserli hücreler vücutta dolaşır ve her biri metastatik hücrelerdir. Lösemi tedavisinde diğer kanser tiplerinden farklı olarak cerrahinin yeri yoktur [Yakut ve Gülten, 2005].

Kanserleşmiş kan hücrelerin anormal artışına bağlı olarak normal hücrelerin gelişimi baskılanmaktadır. Bu da, kan elemanlarının azalmasına yol açmaktadır. Lökosit sayısındaki azalma sonucunda; enfeksiyona yatkınlık, ateş; eritrosit sayısındaki azalma sonucunda kansızlık, tansiyon düşüklüğü, üşüme, çarpıntı, halsizlik, yorgunluk, baş dönmesi; trombosit sayısındaki azalmaya bağlı olarak da diş eti, burun kanaması, morarıklıklar, deri lezyonları, eklem ağrıları gibi sıkıntılar baş gösterir [Yakut ve Gülten, 2005].

Her yaştan ve cinsiyetten insan lösemi olabilir. Çeşitli kimyasallara maruziyet, radyasyon gibi çevresel etmenler hastalıkların ortaya çıkmasını tetiklemektedir. Japonya' ya atılan atom bombası sonrasında lösemi insidansının önemli ölçüde artması radyasyonun ne kadar etkili olduğunu göstermiştir. Çeşitli kanser tiplerinin (meme, ovaryum kanseri, lenfoma) kemoterapik tedavisinde kullanılan ilaçlardan alkilleyici ajanlar, topoizomerez inhibitörleri lösemi oluşumunu tetiklemektedir [Rowe, 1995].

Akut lösemiler kronik lösemilere oranla daha sık izlenmektedir. Lösemilerde insidans yaşa göre değişmektedir. Çoğunda hastalığın ileri yaşlarda ortaya çıktığı izlenmektedir. Bunun yanında çocuk çağı kanserlerinin 2/3'sini ALL oluşturmaktadır [Smith ve ark., 2005]. Tüm lösemi tiplerinin insidansı kadınlara oranla erkeklerde daha yüksektir. 2005 yılında tüm lösemi tiplerinin %56'sını erkeklerin oluşturacağı tahmin edilmektedir [Rowe, 1995].

Lösemi, üzerinde yapılan sitogenetik ve moleküler çalışmalar sonucunda, sık tekrarlayan kromozom anomalileri (translokasyonlar, inversiyonlar, delesyonlar)

izlenmiştir. Proto-onkogenlerin aktivasyonu, DNA metilasyon mutasyonları, tümör baskılayıcı genlerin kaybı, DNA tamir mekanizmasındaki değişiklikler, telomeraz aktivitesindeki değişiklik gibi birçok moleküler düzeyde değişiklikler sonucu ortaya çıkmaktadır [Hoelzer ve Seipelt, 2004].

Kromozom anormallikleri lösemilerde oldukça fazladır. Örneğin bugüne kadar AML’ de 160’a yakın kromozom anormalliği tespit edilmiştir. Bu anormalliklerden bazıları hastalığın ilerleyişini ve sağ kalımını belirlemektedir. Bunlardan bazıları sitogenetik analizle belirlenebilmektedir. Bu kromozomal değişiklikler lösemide bazı onkogenlerin aktivasyonuna neden olmaktadır. Lösemilerde meydana gelen moleküler değişiklikler hakkında bazı genellemeler yapılabilir. Hematopoetik hücrelerde görülen kromozom anomallileri sonucu gen ifadesinin kontrolü bozulmaktadır. Gen düzenlenmesinin bozulması iki tipte olabilmektedir. Bunlardan biri gen füzyonudur. Farklı bir gen, genellikle bir transkripsiyon faktörü yada tirozin kinazın promotörü ile füzyona uğrar ve bunu ifadesi sonucunda kimerik bir protein meydana gelir. Myeloid lösemilerin çoğunda t(9, 22) translokasyonu sonucunda oluşan *Philedelphia kromozomu* gözlenmektedir. Moleküler düzeyde olaya baktığımızda *bcr-abl* translokasyonu gözlenmektedir. Diğer bir mekanizma da, normal hücrelerde gen ifadesini kontrol eden bir genin, uygun olmayan bir biçimde başka bir genin aktif promotörünün yada enhansırının kontrolü altına girmesidir. Bu tip değişiklikler genellikle T hücresi ya da immunoglobulinleri reseptörlerinin gen lokuslarında meydana gelmektedir [Yakıcıer, 2005]. Bunların dışında diğer genetik ve epigenetik mekanizmalar (tümör baskılayıcı genlerde yada onko-genlerde görülen nokta mutasyonları, gen delesyonları, DNA metilasyonu/ asetilasyonu) lösemilerin ortaya çıkmasına yada ilerlemesine neden olabilmektedir [Hoelzer ve Seipelt, 2004].

Lösemiler de diğer kanser tipleri gibi tek bir hücreden gelişmekte, yeni klonlar oluşturarak çoğalmaktadırlar. Malign klonun baskın hale gelmesi normal klona göre daha hızlı ve dirençli şekilde çoğalması ile mümkündür. Bu nedenle lösemi gelişiminin (lökogenez) en az iki basamaktan oluştuğu düşünülmektedir. Hücrelerin klonal çoğalabilmesi için farklılaşmanın engellenmesi ve aşırı çoğalma ile hücresel basamakların aşılması gerekmektedir. Zaten lösemilerde gözlenen

translokasyonların genellikle hematopoetik farklılaşmada rol oynayan, transkripsiyon faktörlerinin paketlenildiği bölgelerde meydana geldiği gözlenmiştir. Bu faktörlerden biri öz bağlanma faktörü (*CBF*) olup kromozonun kırılma noktasında bulunmaktadır. Bu faktör AML’de sık gözlenen t(8, 21) traslokasyonu ile oluşan kimerik protein ile etkisiz hale getirilmektedir. Fakat sadece farklılaşmanın engellenmesi tek başına löseminin gelişmesi için yeterli değildir. Aynı zamanda hücre çoğalması tetiklenerek lökomogenez tamamlanmaktadır [Rowe, 1995].

2.3. Detoksifikasyon

İnsan vücudu hayat boyunca iç veya dış kaynaklı bir çok toksine maruz kalmaktadır. Bu toksinler; çevresel toksinler, su, hava ve yiyeceklerdeki kimyasal maddeler, ilaçlar gibi dışardan alınabileceği gibi; hormon metabolizmalarının ürünleri, bakteriyal ürünler gibi vücut içinde de oluşabilmektedir. Her kimyasal madde doza bağlı olarak toksik etki gösterebilmektedir. Bu kimyasallar ilaç, kozmetik, tarım ilacı, gıda katkı maddesi, temizlik malzemesi, endüstriyel kimyasallar gibi çok geniş alana yayılmaktadır. Bütün bu kimyasallara, organizmaya yabancı anlamına gelen ksenobiyotik adı verilmektedir [Liska, 1998].

Vücudumuzda toksinlerin kötü etkilerini ortadan kaldırmak için çeşitli enzim sistemleri bulunmaktadır. Bu enzimler toksinlerin zararlı etkilerini azaltmayı hedefler. Bugüne kadar yapılan birçok çalışmada detoksifikasyon mekanizmalarındaki bozuklukların çeşitli kronik hastalıkların ve kanserin üzerinde etkili olduğu ve bu hastalıkların etiyoloji ve seyrini etkilediği ortaya konulmuştur [Liska, 1998].

Detoksifikasyon; polar olmayan (lipofilik) bileşiklerin, polar (hidrofilik) bileşiklere çevrilip, boşaltım organlarından (böbrek, karaciğer, akciğer, deri) atılmasıdır. Detoksifikasyon oldukça karmaşık olup, bireyden bireye farklılık göstermektedir. Bu durum bireyin yaşadığı çevreye, hayat tarzına, yaşına ve cinsiyetine göre değişiklik göstermektedir [Bock ve ark, 1990].

1947 yılında R. T. Williams; reaktif olmayan toksinlerin iki basamaklı mekanizmayla biyotransformasyona uğradığını bulmuştur. Öncelikle bileşiğe oksijen kullanarak fonksiyonel grup eklenmekte, oluşan reaktif bileşiklerle (glutamin, glisin, sülfat) konjugasyon reaksiyonlarına girmekte ve böylece suda çözünür hale gelmektedir [Liska ve ark., 1999]. Bu iki basamak sırasıyla Faz-I ve Faz-II olarak adlandırılmıştır. Bu reaksiyonlar sonunda yağda çözünen bileşikler suda çözünür hale gelmekte ve üre ile atılmaktadır [Estabrook, 1996].

Aslında toksinler reaktif olmayan (reaktif site içermeyen) bileşiklerdir. Faz-I siteminde bu toksinlere; oksidasyon, redüksiyon ve hidroliz reaksiyonları ile yapısal guruplar eklenmektedir. Bu sayede reaktif hale gelen toksin Faz-II reaksiyonlarına girebilecek ve suda çözünür hale gelebilecektir. Çok nadir olarak bu reaksiyonlar sonrasında doğrudan atılım olmaktadır [Hutt ve Cadwell, 1990].

Faz-I reaksiyonları birçok enzim ailesinin görev aldığı karmaşık bir sistemdir. Temel olarak; birçok substrata özel izoenzimden oluşan *sitokrom P450 (CYP450)* süpergen ailesi görev almaktadır. *CYP450* enzimleri oksijeni ve *NADH* (nikotinamid adenin dinükleotid) substratlara reaktif gurup eklerken, ko-faktör olarak kullanmaktadır [Estabrook, 1996]. Bu reaksiyon sonucunda ilkinden daha toksik ve reaktif molekül oluşmaktadır. Eğer bu oluşan ara ürün Faz-II sisteminde detoksifikasyona uğramazsa hücresel DNA, RNA ve proteinlere zarar verebilir [Hutt ve Cadwell, 1990].

Birçok çalışma Faz-I reaksiyonlarının indüklendiği yada Faz-II reaksiyonlarının inhibe edildiği durumlarda; Parkinson, kanser gibi hastalıkların ortaya çıkma riskinin attığını ortaya koymuştur. İnsanda *CYP450* enzimlerinden 10 aile tanımlanmıştır. Bu ailelerin birçok alt aileleri de bulunmaktadır ki bunların aminoasit dizileri oldukça yakındır [Estabrook, 1996].

Faz-I reaksiyonlarını takip eden Faz-II konjugasyon reaksiyonları sonrasında reaktif toksik moleküller, suda çözünür hale gelip, safra ve üre ile vücuttan atılır. İnsan vücudunda glukronidasyon, sülfasyon, asetilasyon, metilasyon, glutatyon ve aminoasit konjugasyonları gerçekleşmektedir. Tüm bu reaksiyonlar için enerji ve

kofaktöre gereksinim vardır. Faz-II enzimlerine örnek olarak glukuroniltransferaz, glutatyontransferaz, sulfotransferaz, N-asetil transferaz verilebilir [Hutt ve Cadwell, 1990]. Detoksifikasyonun mekanizması Şekil 2.4’de şematik olarak gösterilmiştir.

Son zamanlarda anti-porter aktivite adı verilen bir detoksifikasyon hareketi izlenmiştir. Anti-porter aktivite enerji gerektiren, hücre içindeki ksenobiyotikleri hücre dışına pompalayan bir sistemdir. Böylelikle hücre içindeki ksenobiyotikler hücre dışına pompalanarak ve faz-I sistemine girmeleri sağlanır. Böylece daha etkili detoksifikasyon olmaktadır. Bazı ilaçlara gösterilen direncin nedeni olarak anti-porter aktivasyon gösterilmektedir [Liska ve ark., 1999].

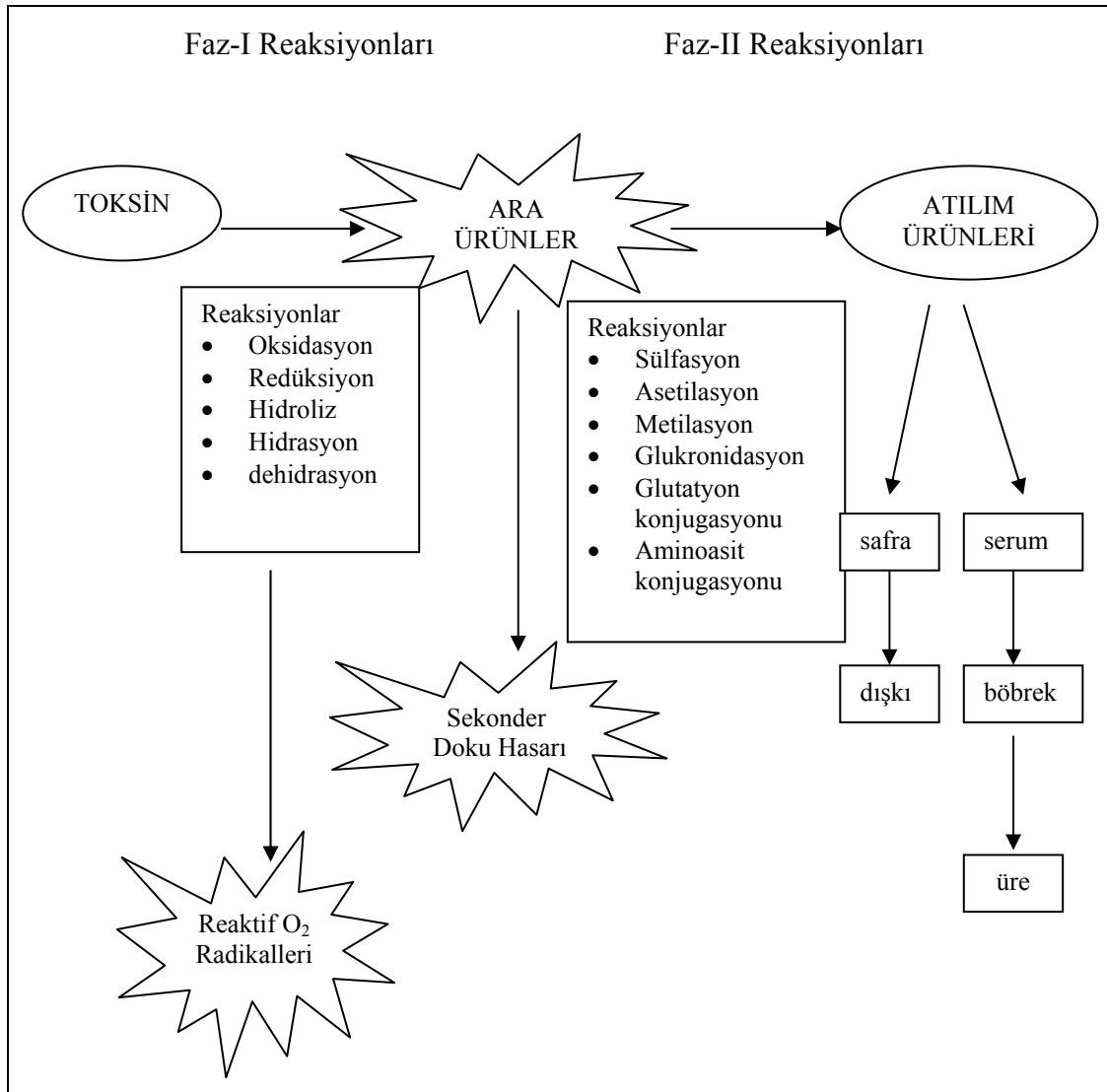
Birçok faktör detoksifikasyonda yer alan enzimlerin aktivitesini düzenler. Bu detoksifikasyon mekanizmaları; çevresel faktörlere, vücutta artan ksenobiyotiklere, yaşa, cinsiyete, yaşam tarzına, genetik faktörlere bağlı olarak baskılanmakta veya indüklenmektedir.

Vücutta biriken ksenobiyotikler faz-I ve faz-II enzimlerinin devreye girmesine neden olur. İndükleyicilerin bazıları tek-etkili bazıları ise çoklu-etkili olmaktadır. Tek etkili indükleyiciler tek bir enzimi yada mekanizmanın tek bir basamağını aktive eder. Çoklu etkili indükleyiciler ise birden fazla basamağı etkiler [Liska ve ark., 1999].

Bazı substratlar sadece faz-I enzimlerini indükler. Bunun sonucunda çok fazla miktarda reaktif ürünlerin oluşmasına neden olur. Üretilen bu ara ürünler hücresel DNA, RNA ve proteinlere zarar verir. Buna örnek olarak sigara dumanındaki polisiklik hidrokarbonlar, yanık etdeki aril aminler verilebilir. Bunun yanında birçok sebze ve meyvada bulunan flavonoidler birçok faz-II enzimini indükler [Estabrook, 1996].

Detoksifikasyon mekanizması çeşitli nedenlerden ötürü inhibe olabilir. Örneğin; aynı enzimle reaksiyona giren bileşikler aynı ortamda bulunduğunda birbirleriyle yarışır. Bu duruma kompetitif inhibisyon denir. Bunun yanında bazı bileşikler

vardır ki, seçici olarak tek bir detoksifikasyon basamağını inhibe eder. Bazı ilaçlar, H_2 inhibitörleri, makroloit antibiyotikleri, faz-I enzimlerinin reaktif sitelerine bağlanarak inhibisyona neden olabilmektedir. Enzimlerin kullandığı ko-faktörlerin ortamda yeterli miktarda bulunmaması da bir inhibisyon nedeni olabilir [Liska ve ark., 1999].



Şekil 2.4. Detoksifikasyonun şematik gösterimi [Liska ve ark., 1999]

Detoksifikasyon reaksiyonlarında yer alan enzimlerin ko-faktör, ko-enzimleri ve diğer bileşiklere karşı olan ihtiyaçları beslenme yoluyla alınır. Detoksifikasyon aktivitesinde yaş önemli bir role sahiptir. Yeni doğanlarda ve küçük çocuklarda

detoksifikasyon reaksiyonları yetişkinler kıyasla çok daha yavaş gerçekleşmektedir. En az yaş kadar önemli olan bir diğer faktörde cinsiyettir. Menopoz öncesi ve menopoz sonrası kadınların ilaç dozlarına verdikleri tepkilerin farklılığını, hormonların faz-I enzimleri üzerindeki etkisi açıklamaktadır [Liska ve ark.,1999].

İnsan genom çalışmalarıyla tek yumurta ikizleri dışında her insanın kendine özel bir genom versiyonuna sahip olduğu gösterilmiştir. Genomlar arasındaki farklılıkların en büyük kaynağı, tek nükleotid polimorfizmleridir [Vineis, 2002]. İnsan DNA'sında 1,4 milyon kadar tek nükleotid polimorfizmi belirlenmiştir. İnsan genom projelerinden sağlanan bilgilerin farmakogenetiğe uyarlanmasıyla bireysel tedaviler gündeme gelmekte ve tedavi için verilebilecek ilacın metabolik hızı, potansiyel risk ya da yan etki olasılığı önceden belirlenebilmektedir [Johnson, 2003]. Genetik farklılıklar, ilaç metabolizmasını değiştirerek ya da enzim ve/veya reseptörleri, substrat ya da ligantlara olan bağlanma etkilerini değiştirerek organizmanın ilaca olan yatkınlıklarını etkileyebilmektedir [Golstein ve ark., 2003].

Mutasyon, kalıtım molekülünde oluşan ve kuşaktan kuşağa aktarılan kalıcı değişikliklerdir. Mutasyonlar büyüklüğüne göre (nokta, gen veya kromozom), nedenine göre (kendiliğinden yada uyarılmış) etkilenen doku tipine göre (vücut veya eşey) genetik şifrenin anlamlılığı gibi birçok özelliğe göre sınıflandırılabilir. Mutasyonlar rastgele oluşmaktadır. DNA'daki nokta mutasyonları, DNA'daki tek bir baz çiftindeki değişiklik olarak tanımlanabilir. Bu değişiklik, baz eklenip/eksilmesi şeklinde olabileceği gibi baz değişikliği ile de oluşabilmektedir. Baz değişiklikleri, bir baz çifti yerine başka bir baz çiftinin geçmesi şeklindeki mutasyonlardır. Bunlar transisyonlar (bir bazın yerine aynı kimyasal gruptan bir başka bazın geçmesi), transversiyonlar (bir bazın yerine farklı kimyasal gruptan bir başka bazın geçmesi) şeklinde olmaktadır [Sarasin, 2003].

Bir organizmanın taşıdığı tüm genler bireyin genotipini, ortaya çıkardığı fiziksel görünüm ve işlevi ise fenotipini oluşturur. Genlerin nükleotid dizilimindeki herhangi bir değişiklik kodladığı tüm proteinin kopyalarını etkilediği için mutasyonlar bir organizmanın tüm hücrelerinin zarar görmesine neden olabilir. Bir genin kontrol

yada yapısal bölgesindeki mutasyon, proteinin işlev kazanmasına, kaybetmesine ya da yeni bir özellik kazanmasına neden olur [Hartl ve Andrew,1997].

Toplumda %1'den daha yüksek oranda bulunan gen seçenekleri polimorfizm olarak tanımlanmaktadır. Genetik mutasyonlar bir çeşit genetik polimorfizmdir. Polimorfizmler de tıpkı mutasyonlar gibi bazı DNA bölgelerinde eksilme, artma, rekombinasyonlar, gen duplikasyonu ve gen kaybı şeklinde görülse de genomda en çok tek nükleotid polimorfizmleri olarak görülür. Nükleotid değişimi genin kontrol, intron ve ekzon bölgesinde olabilir. Kodlayıcı bölge içinde olup birinci ve ikinci nükleotidde değişikliğe neden olan ve üçüncü nükleotidde değişiklik olduğu halde aminoasit diziliminde değişikliğe neden olmayan sinonim polimorfizimlerdir. DNA düzeyindeki bu genetik değişiklikler kodlayıcı bölgede yaklaşık 500-1000 nükleotidde bir, kodlayıcı olmayan bölgede 300-500 nükleotidde bir nükleotid değişimi gözlenmektedir [Weber, 1997].

Genetik polimorfizm çalışmaları, hastalıklar için risk altındaki kişilerin belirlenmesi ve ilaç tedavisi için yeni hedeflerin belirlenmesine fırsat verir. Kimyasalları ya da karsinojenleri metabolize eden enzim polimorfizmleri kalıtsal yada çevresel olarak hastalık oluşumunda doğrudan etki gösterirken, DNA onarım genlerindeki polimorfizmler dolaylı etki gösterir [Vineis, 2002]. Polimorfizm toplumdaki bir organizmada birden fazla fenotip oluşturan aynı lokustaki birden fazla allelin bulunması durumudur. Polimorfizmin fenotipe yansması sonucu gen ürününün ifadesinde farklılıklar olmasına neden olur. Eğer polimorfizm enzimi kodlayan bölgede oluşmuş ise vücuttaki enzim seviyesi populasyon içerisinde farklılıklar oluşturur. Ortaya çıkan farklılık ksenobiyotiklerin detoksifikasyonunu da etkiler. Enzimlerin bu polimorfik durumları çeşitli hastalıklara ve kansere yatkınlık sağlamaktadır. Bu nedenle, bu konu çalışmaların ilgi odağı haline gelmiştir [Weber, 1997].

2.4. Kinon Oksidoredüktaz

Kinon bileşikleri oldukça reaktif bileşikler olup, otomobil ekzosu, sigara dumanı ve şehir havasında bol miktarda bulunduğu gibi, yediğimiz çoğu besinin içerisinde de doğal olarak bulunmaktadır. Ksenobiyotikler organizmada bir takım enzimler vasıtasıyla metabolize edilirler. Kinoid yapısına uygun bileşiklere özgü enzimler, kinon ve türevlerinden bir veya iki elektron kopararak indirgenmesine sebep olurlar [Iskander ve Jaiswal, 2005].

Ksenobiyotik metabolizmasına katılan enzimlerden *ubikinon oksidoredüktaz*, *sitokrom P450 redüktaz* gibi enzimler kinon ve türevlerinden bir elektron kopararak semikinon bileşiklerin oluşmasına neden olurlar. Oluşan bu bileşikler oksidatif stres, DNA hasarı, membran hasarı, sitotoksositeye neden olarak reaktif oksijen türevlerini oluştururlar [Estabrook, 1996].

Kinonlardan iki elektronun koparılması kinon oksidoredüktazlar tarafından gerçekleştirilir. Kinon türevlerinden, kinon oksidoredüktazların iki elektron indirgemesi ile *Sitokrom P450 redüktaz*'ın bir elektron indirgemesi yarışır. Fakat bu reaksiyon sonrasında semikinon bileşikler oluşmadığından hücre, kinon ve kinon türevlerinin olası zararlarından korunmuş. Hidrokinon bileşikleri, semikinon bileşikleri gibi reaktif oksijen türevleri oluşturmadığından daha kararlı bir durum yaratılmış olur [Jaiswal, 2000]

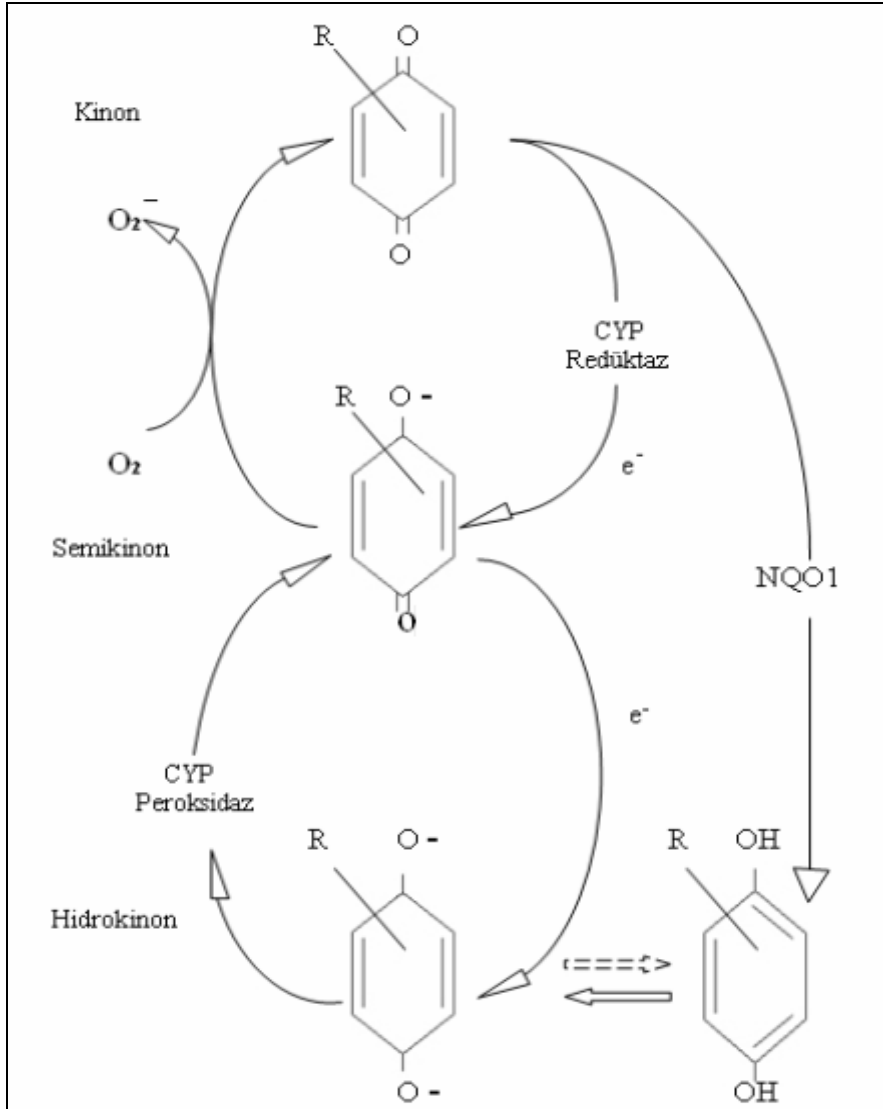
İnsanlarda *NAD(P)H kinon oksidoredüktaz-1* (NQO1) ve *NRH kinon oksidoredüktaz-2* (NQO2) olmak üzere iki sitosolik formu vardır. Son zamanlarda çalışmalar daha ziyade NQO1 üzerine yoğunlaşmıştır. Enzimin yaklaşık 40 yıllık bir geçmişi vardır. 1958 yılında Ernster ve Navazio tarafından kısmi olarak saflaştırılmış ve bazı özellikleri tanımlanmıştır. NQO1 tanımlanmasının ardından yapısal olarak NQO1' a çok benzeyen flavoprotein yapısında olan ikinci bir enzim tanımlanmıştır. İlk kez Liao ve William-Ashman tarafından keşfedilen bu enzim *NRH: kinon oksidoredüktaz-2* (NQO2) olarak adlandırılmıştır [Chen ve ark., 2000].

Diğer enzimlere olan üstünlükleri ve biyolojik fonksiyonları nedeniyle NQO'ların farklı sitosolik formları içerisinde en çok çalışılan enzim NQO1'dir. NQO1 kinon ve kinon türevlerinden iki elektron indirgeyen bir flavoproteindir. İndirgeme işlemi *NAD(P)H* ve *FAD* (flavin adenindinükleotit) yardımıyla oluşur. Reaksiyon sonucunda hidrokinon bileşikler oluşur. Kinonlardan *sitokrom P450* enzimiyle de bir elektron kopararak indirgeme yapılabilir. Bu iki reaksiyon birbirleriyle yarışır. Kinonlardan bir elektron indirgenmesiyle semikinon bileşikler oluşur ve bu bileşikler serbest oksijenle reaksiyona girerek reaktif oksijen radikalleri (ROS) oluştururlar. Reaktif oksijen radikalleri DNA, RNA ve proteinlere zarar vererek hücre hasara neden olurlar. Oysa ki; NQO1 enzimi ile reaksiyona giren hidrokinonlardan iki elektron indirgenerek hidrokinon bileşikler oluşur. Hidrokinon bileşikler, semikinon bileşikler gibi reaktif oksijen türevleri oluşturmadığından daha kararlı bir durum yaratılmış olur. İndirgeme sonucunda oluşan hidrokinonlar faz-II enzimleri ile konjugasyona girerek detoksifiye olurlar ve vücuttan atılırlar. Fakat bazı durumlarda oluşan hidroksikinon bileşikler kendilerini oksidasyona uğratarak ROS oluşturabilirler. NQO1 enziminin detoksifikasyon reaksiyonları Şekil 2.5'de gösterilmiştir [Chen ve ark., 2000].

Sonuç olarak; NQO1 enzimi kinoid bileşiklerin detoksifikasyonunda yer aldığı gibi bileşiklerin reaktif formunu da aktive edebilme özelliğine sahiptir. NQO1 kimyasal toksisiteye ve karsinojeniteye karşı hücreleri koruyucu etkisi nedeniyle son zamanlardaki çalışmaların ilgi kaynağı olmuştur [Joseph ve ark., 2000].

NQO1 gen ifadesi, ksenobiyotiklere, antioksidanlara, ağır metallere, UV, iyonize radyasyona cevabı artırır. Bu sayede hücre oksidatif strese, serbest radikallerden ve kanserden korunmuş olur [Ross, 2005]. NQO1 iki düzine genin indüklenmesini sağlayarak hücre savunmayı tetikler. Bu genler; *Glutasyon-S-transferaz* (hidrofobik elektrofilleri ve reaktif oksijen türevleriyle konjugasyona girer), *UDP-glukuroniltransferaz* (ksenobiyotikler ve ilaçlarla konjugasyon yaparlar), *γ-glutaminsistein sentetaz* (glutasyon mekanizmasında anahtar rolü oynar). Ksenobiyotik bileşikler organizmaya girdiğinde hücre savunma mekanizması aktif

olarak işlemeye başlar. Bu mekanizmada NQO1 önemli bir role sahiptir [Ross ve ark., 2000].



Şekil 2.5. NQO1 enziminin detoksifikasyon şeması

NQO1 kinon oksidasyonunda doğrudan görev almasının yanında *CoQ* (ko-enzim Q), E vitamini gibi çeşitli doğal antioksidanların indirgenmesinde ve bu bileşiklerin bu şekilde kararlı kalmasına yardımcı olmaktadır. İndirgenmiş formdaki antioksidanlar tüm hücrelerde ve membranlarda bulunur. Hücre membranının fizyokimyasal yapısının düzenlenmesinde görev alır. NQO1 aynı zamanda tumor baskılayıcı

genlerden p53 kararlılığını korumasında görev alır. *p53* bağlanarak daha kararlı bir hale geldiği düşünülmektedir [Iskander ve Jaiswal, 2005].

NQO1 insanda 16. kromozomun kısa kolunda (16q22.1) lokalize olmuş tek kopya halinde bir gendir. Restiksiyon haritası ve dizi analizi sonucunda genin; ortalama 20 kb. büyüklüğünde 6 ekzon, 5 introndan oluştuğu gösterilmiştir. 274 aminoasitten oluşmuştur. Sitosolik bir protein olup ilk kez ratların karaciğerinden izole edilip klonlanmıştır [Ross ve ark., 2000].

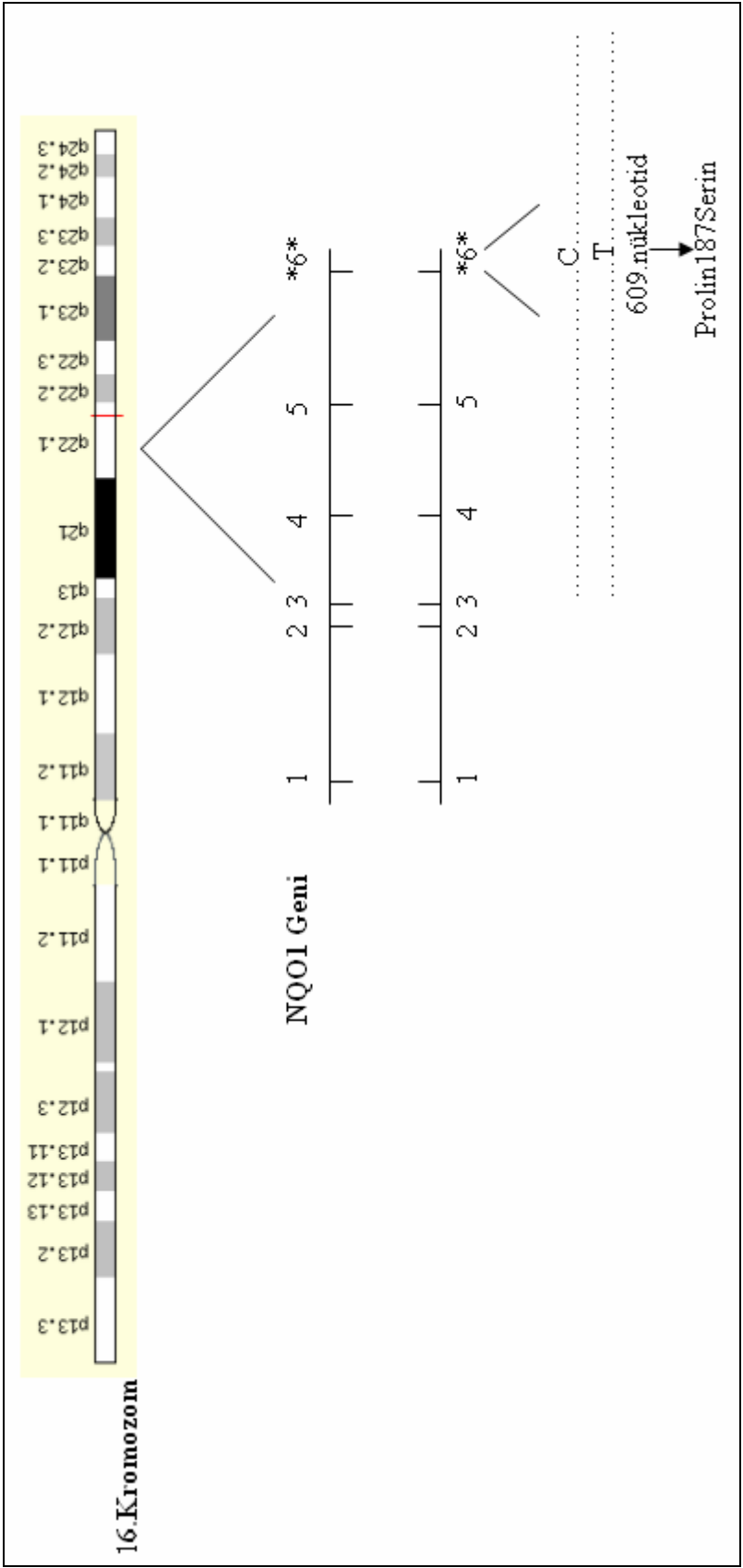
Genin regülasyonu, promoter bölgesindeki *cis* elementler vasıtasıyla olmaktadır. *NQO1* genini kontrol eden *cis* elementler tespit edilmiştir. Bunlar antioksidant cevap elementi (*ARE*), ksenobiyotik cevap elementi (*XRE*), aktivatör protein-2 (*AP-2*) gibi elementleridir. Bu elementler genin hem indüklenmesine hem de baskılanmasını sağlar. Çeşitli antioksidant, oksidanlar maruziyetinde *NQO1* geni *ARE* elementiyle pozitif düzenlenir. *NQO1* geni gibi birçok detoksifikasyon enzimlerinin düzenlenmesi *ARE* cis elementi vasıtasıyla yapılmaktadır. *ARE* bölgesine bağlanan bir takım transkripsiyon faktörleri tanımlanmıştır. Bunlar; *AP-1*, *Nrf-1*, *Nrf-2*, *Maf*, *c-Jun*, *Jun-B*, *Jun-D*, *c-Fos*’dur. *Nrf-2* ksenobiyotiklere veya antioksidantlara maruz kalmamış olan normal hücrelerin sitoplazmasında *Keap-1* proteini tarafından tutulmuştur. Hücre ksenobiyotiklere maruz kaldığında *Keap-1* ve *Nrf-2* birbirinden ayrılır, serbest kalan *Nrf-2* çekirdeğe transloke olur [Yu ve Kensler, 2005]. *Keap-1*’in oksidatif strese duyarlı bir sensör protein olduğu düşünülmektedir. Burada *c-Jun* faktörüyle heterodimerize olarak *ARE* bölgesine bağlanır. *Nrf-2* ile *c-Jun* birbirine bağlanmasını çeşitli bilinmeyen sitosolik faktörler sitümüle eder. Bu sayede transkripsiyon tetiklenir ve gen ifade edilir. *Nrf-2* ve *c-Jun* gibi *Nrf-1*, *Jun-B*, *Jun-D* de *ARE* bölgesine bağlanarak düzenleme yapabilmektedir. Diğer transkripsiyon faktörleri de benzer mekanizmalara sahip olduğu düşünülmektedir. *NQO1* gen ifadesinin düzenlenmesi Şekil 2.6’da gösterilmiştir [Jaiswal, 2000].

NQO1 geninin ifadesi bireyden bireye farklılıklar gösterirken, aynı kişinin farklı dokularında bile farklılık gösterebilmektedir. Tümör dokularında, sağlıklı dokulardakine nazaran daha fazla ifade edilmektedir.

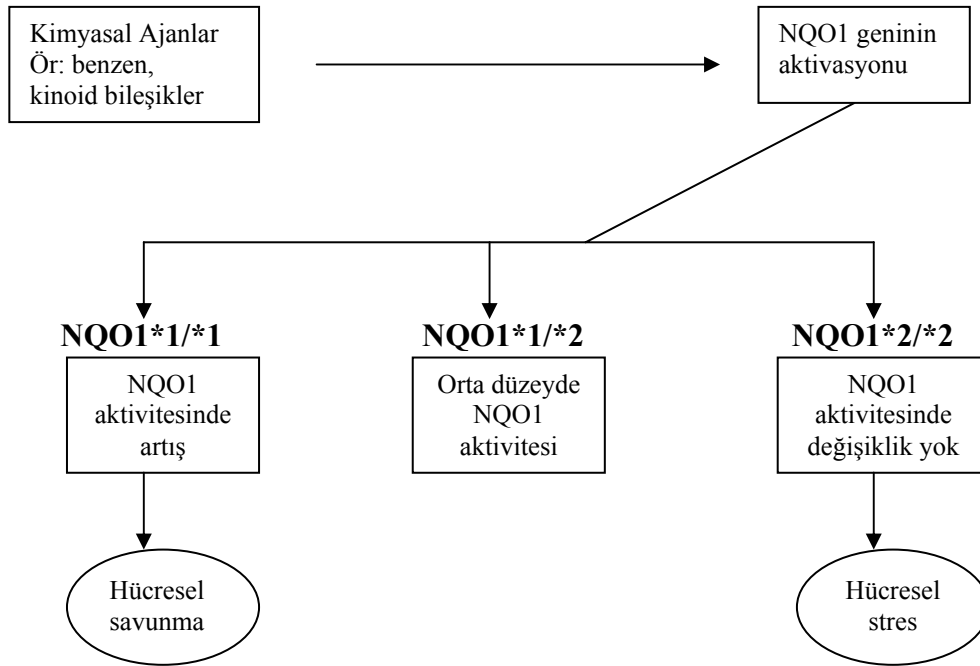
Polimorfizm bir popülasyondaki aynı lokusta birden fazla allelin mevcudiyeti sonucunda birden fazla genotipin ortaya çıkmasına neden olan bir özelliktir. Genel olarak aminoasit değişimi ile ilgilidir. Gen dizisindeki bir aminoasitin değişmesi oluşan ürünün değişmesine neden olmaktadır. Genin ürünü bir enzim ise bu değişiklik enzimin aktivitesinde değişikliğe yol açmaktadır. Aktivitenin azalmasına yada ortadan kaybolmasına neden olur. Bunun sonucunda organizmaya giren ksenobiyotiklerin detoksifikasyonun da aksaklıklar olabilmektedir. Tüm bunların sonucunda; toplumda polimorfizm gösteren bireylerin çeşitli hastalıklara daha yatkın olabileceği düşünülmektedir [Weber, 1997].

Faz-I enzimlerinden olan *NQO1* 16. kromozomun kısa kolunda lokalize olmuştur. 1980 yılında Edward ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada İngiliz toplumunun %4'ünün *NQO1* enzim aktivitesi göstermediğini saptamıştır. Polimorfizm genin üç bölgesinde olabilir. Genin promotor bölgesinde (ARE, XRE bölgelerinde), transkripsiyon olmayan 3' bölgesinde yada genin içerisindeki herhangi bir bölgede olabilir [Nebert, 1991].

Traver ve arkadaşları kolon karsinom hücre gruplarında enzim aktivitesinin azalmasına yol açan 6. ekzonun 609. nükleotidinde bir baz değişimi sonucu oluşan polimorfizmi tanımlamıştır. Genin 6. ekzonunun 187. nükleotidinin sitozinden timine değişmesi (C→T) gen ürünlerindeki aminoasit dizisini değiştirmekte ve prolin'in serin'e dönüşmesine neden olmaktadır. Bu durum proteine kararsız bir yapı kazandırmakta ve enzim aktivitesini durdurmaktadır.



Şekil 2.7. NQO1 geninin 6. ekzonunda belirlenen polimorfizmin şematik gösterimi



Şekil 2.8. *NQO1* polimorfizminin diyagram ile gösterimi [Ross, 2005]

Genetik polimorfizm çalışmaları, hastalıklar için risk altındaki kişilerin belirlenmesi ve ilaç tedavisi için yeni hedeflerin belirlenmesine fırsat verir. Kimyasalları ya da karsinojenleri metabolize eden enzim polimorfizmleri hastalık oluşumunda doğrudan etki gösterirken, DNA onarım genlerindeki polimorfizmler dolaylı etki gösterir. *NQO1* polimorfizmini homozigot mutant olarak taşıyan bireylerde (*NQO1*2*) enzim aktivitesi ortadan kalktığı için hücrel strese maruz kalmakta, bu durumun bir çok hastalığa yatkınlık sağladığı düşünülmektedir [Siegel ve ark., 1999]. Bu nedenle bir çok kanser tipinde bu gen polimorfizmi araştırılmıştır. Populasyon çalışmalarında her ne kadar da farklı sonuçlar elde edilmiş ise de, bazı çalışmalar sonucunda $^{609}\text{C}\rightarrow\text{T}$ polimorfizmi taşıyan bireylerde enzim aktivitesinin düşük olması nedeniyle hematolojik kanserlere yatkınlık sağladığı düşünülmektedir [Nebert ve ark., 2002].

Yapılan çalışmalarda PZR-RFLP yöntemi kullanılarak *NQO1* polimorfizmi değerlendirilmiştir. Bu yöntem DNA'nın *in vitro* ortamda istenilen bölgesinin çoğaltılması sonrasında belli nükleotid dizilerini tanıyarak kesen ve DNA'yı farklı

boylarda parçalara ayıran restriksiyon enzimiyle kesimine ve bu parçaların jel üzerinde değerlendirilmesine dayanır [Klug ve Cummings, 2002].

In vitro koşullarda istenilen bir genin yada özgün bir DNA dizisinin çok sayıda kopyasının elde edilmesi için rekombinant DNA yöntemleri ile DNA klonlamasına ek olarak 1986 yılında Polimeraz Zincir Reaksiyonu'da (PZR) kullanılmaya başlanmıştır. Kary Mullis tarafından geliştirilen PZR, özel bir DNA parçasının kopyalarının primerler tarafından yönlendirilerek, enzimatik olarak sentezlenmesi şeklinde tanımlanan *in vitro* bir yöntemdir. Sistemin Cetus firması tarafından geliştirilmesiyle birlikte klinik tıpta hızla kullanılmaya başlanmıştır. PZR ile insan genomik DNA'sı gibi karmaşık yapıdaki DNA molekülünden özel DNA parçalarının sentezinin birkaç saat içinde gerçekleştirilebilir hale gelmesi, bu teknolojinin yaygınlaşmasında başlıca neden olmuştur [Klug ve Cummings, 2002] .

Polimeraz zincir reaksiyonu, çift iplikli DNA molekülünde hedef dizilere iki oligonükleotid primerin bağlanması ve uzaması esasına dayanır. Yüksek sıcaklıkta denatüre olan DNA molekülü tek iplikli hale geldikten sonra primerlerin tamamlayıcı bölgeden DNA'ya bağlanır. DNA polimeraz enzimi uygun tampon ve dört çeşit deoksiribonükleikasit trifostat (dNTP) varlığında primerin 3' hidroksil ucundan uzamasını sağlar. Böylece kalıp DNA ipliğine tamamlayıcı olan yeni DNA molekülü sentezlenmiş olur [Manniatis ve ark., 1989] .

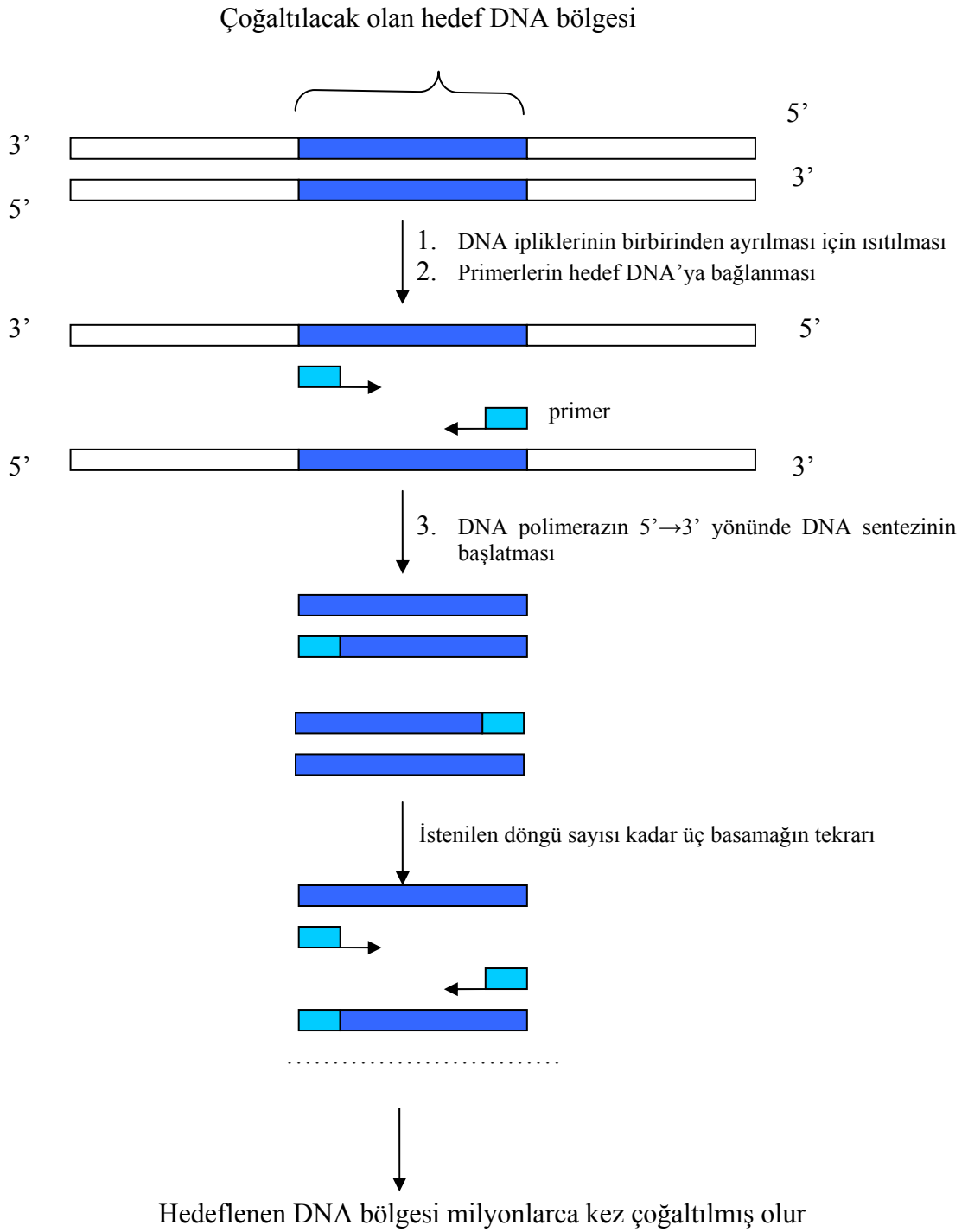
Bir PZR döngüsü denatürasyon, primerlerin bağlanması ve uzaması olmak üzere üç aşamadan oluşur. PZR'ın temel bileşenleri kalıp DNA, DNA polimeraz enzimi, primerler, dNTP karışımı, tampon ve $MgCl_2$ 'dür. DNA polimeraz enzimleri, dört çeşit dNTP kullanarak tamamlayıcı diziyi sentezlerler. Bunun için kalıp moleküldeki diziyeye bağlanan kısa DNA parçaları (primer) olması gerekir. Sentez 5' yönünden 3' yönüne doğru devam eder. Bunun için yüksek sıcaklıkta yaşayabilen bakteri veya arkelerden izole edilen sıcaklığa dayanıklı DNA polimerazlar kullanılır. DNA polimerazın senteze başlayabilmesi için kalıp DNA'ya uygun primerlere ihtiyaç vardır. Ticari olarak elde edilebileceği gibi primer tasarımı da yapılabilir. NTP'lerde yüksek saflıkta tek tek yada 4'lü grup karışım halinde ticari olarak satılmaktadır.

Karışımda kullanılan tamponlarda enzime uygun olarak (set halinde) 10X konsantrasyonda satılmaktadır. Mg^{+2} iyonları NTP ile çözünebilir kompleksler oluştururlar, polimeraz aktivitesini uyarır, primer-kalıp etkileşimini sağlarlar. Bu nedenle $MgCl_2$ PZR özgülüğü ve ürün verimi üzerinde oldukça önemli etkisi vardır. Düşük Mg^{+2} konsantrasyonu ürün oluşumunda azalmaya, yüksek Mg^{+2} konsantrasyonu ise özel olmayan ürün birikimine yol açar [Manniatis ve ark., 1989].

Başlangıç denatürasyonu için genomik DNA gibi karmaşık kalıpların denatüre olmasını sağlamak üzere yüksek sıcaklıklar ($92-100^{\circ}C$) kullanılır. Primerlerin uzaması aşamasında genellikle polimerazların polimerizasyon aktivitesi için en uygun sıcaklık derecesi olan $72^{\circ}C$ kullanılır. PZR ürünü olan tüm moleküllerde reaksiyonun tamamlandığından emin olmak için son döngünün uzama süresi çoğunlukla uzun (10-15 dakika) tutulur. Toplam döngü sayısının arttırılması halinde istenmeyen ürünler fazlaşırken istenilen ürünlerde herhangi bir artış meydana gelmez Bu yüzden kırk döngüden fazla yapılan PZR reaksiyonları başarılı sonuç vermez [Manniatis ve ark., 1989] .

PZR ürünlerinin boyları primerlerle sınırlıdır. Çoğaltılmış ürünlerin saptanması ve doğrulanması için çeşitli yöntemler kullanılabilir. Bu yöntemlerden en basit ve genel olanı elektroforezdir.

Yöntem avantajları basit ve hızlı olması ayrıca diğer yöntemlerden yeterli düzeyde ayrılamayan DNA parçalarının ayrılabilmesini sağlamaktadır. UV ışığı altında florasan etki gösteren EtBr (etidyumbromür) boyasının kullanımı ile düşük derişimlerde olsa bile DNA'nın jel üzerinde yerini belirlemek mümkündür. Güç kaynağından elektroforez cihazına uygun miktarda akım vererek DNA moleküllerinin hareketi sağlanır. DNA ve RNA molekülleri içerdikleri fosfat grubundan olayı pH'ları 5-7 arasında olup negatif yüklülerdir. DNA'nın elektroforetik analizinin temeli, bu molekülün elektriksel bir alanda, jel üzerinde (-) yüklü DNA molekülünün (+) yüklü alana doğru göçüne dayanmaktadır. Bu göç hızı molekülün büyüklüğüne, yapısına, jelde kullanılan maddenin yoğunluğuna, iyonik kuvvete, uygulanan akıma bağlı olarak değişir [Klug ve Cummings, 2002].



Şekil 2.9. Çift iplikli DNA zincirini PZR tekniği ile çoğaltılması

Jel elektroforezinde kullanılan destekleyici madde mekaniksel etkiyi engellemek, molekülleri büyüklüklerine göre ayırmak için kullanılır. Matriks poliakrilamid, agaroz, agaroz-akrilamid karışımı olabilir. Poliakrilamid jellerin ayırma güçleri fazla olduğundan boyut bakımından birbirine çok yakın DNA parçalarının ayırımında kullanılır. Agaroz bir alg türü olan *Agar agar*'dan izole edilmiş olan doğrusal bir polisakkarittir. Agaroz sıcak suda çözünür, soğuduğu zaman karşılıklı kurulan H bağları nedeniyle yol yapısı oluşmaktadır. Bu oluşum geri dönüşümlüdür [Klug ve Cummings, 2002].

DNA'nın jelde görünür hale gelmesi EtBr'ün DNA bağları arasına bağlanarak 300-360 nm'de ışığı absorblaması sonucu fluorasan etki göstermesi ile olur. Bu etki DNA derişimine bağlı olarak kuvvetli yada zayıf olabilmektedir. Jele fazla miktarda DNA yüklendiğinde kenar ve hız etkisi ile jelde yanlış yorumlara yol açabilecek görüntüler ortaya çıkabilir. Örneğin, içinde bulunduğu çözeltinin tuz konsantrasyonundan DNA'nın jelde yürümesi etkilenmektedir. İyonik kuvvetin artışı küçük parçaların hızını yavaşlatmaktadır [Manniatis ve ark., 1989].

DNA'nın enzimatik kesimi restriksiyon endonükleaz (RE) enzimlerinin kullanımı ile yapılır. Bu enzimlerin keşfi rekombinant DNA teknolojisinde önemli bir köşe taşı olmuştur. 1978 yılında Nobel ödülü restriksiyon enzimleri ile yaptığı çalışmalardan ötürü H. Smith, D. Nathans', W. Alber'e verilmiştir. Bugüne kadar 500 den fazla restriksiyon endonükleazları bu kadar özel yapan özellikleri, DNA'yı her zaman özgün bölgelerden kesebilmeleridir. Kesim sonucu küt yada yapışkan uçlu DNA parçaları oluşmaktadır. *E. coli*'den izole edilen *EcoRI* ilk tanımlanan enzim olmuştur. Günümüzde RE ticari olarak üretilmektedir. Genellikle 10U/μl konsantrasyonda satılmaktadırlar. Bir unit RE aktivitesi, uygun koşullarda 1 mg DNA'yı 1 saatte kesebilen enzimdir. Enzimin aktif olarak çalıştığı koşulları sağlayan özel tamponlarda üretilmektedir. Restriksiyon enzimlerin çoğu 37°C aktifleşirken, bazıları 30°C, bazıları 60°C'de optimum aktivite göstermektedir [Manniatis ve ark., 1989]

İnsan genomu boyunca her 200 nükleotitte bir dizi farklılığı görülmektedir. Nükleotitteki bu değişim nokta mutasyonları, delesyon veya inversiyonlarla

oluşmaktadır. Bu değişiklik neticesinde bir restriksiyon enziminin kesim noktasını ortadan kaldırabilir yada yeni bir kesim noktası oluşturabilir. Kromozomun bir allelinde bu nokta kaybolurken diğerinde bulunmaktadır. Dolayısıyla restriksiyon enzimiyle oluşturulan parça uzunluklarındaki farklılıklarına restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi (RFLP) olarak adlandırılır. RFLP'ler oldukça yaygın olup insan genomunda binlercesi tanımlanmıştır. RFLP analizinde temelde iki teknik uygulanır. Birisi PZR diğeri ise Southern Blotlamadır [Kirby, 1990].

Southern blotlama tekniği PZR geliştirilmeden önce Edward Southern tarafından bulunmuştur. Çok yaygın olarak kullanılmayan bir teknik olmakla beraber bazı durumlarda kullanılması daha uygun olmaktadır. Örneğin büyük inversiyon veya delesyonların tespitinde kullanılması uygundur. Tekniğin temeli izolasyonu yapılan DNA örneğinin restriksiyon enzimiyle kesilmesiyle oluşan DNA parçalarının elektroforezle ayrıştırılıp, daha sonra agaroz jelin nitroselülöz veya naylon membran üzerine aktarılmasına dayanmaktadır. Daha sonra bu membran radyoaktif olarak işaretlenmiş olan DNA problemleriyle inkübe edilir. Bu sayede hedef DNA'daki eşlenik bölgeler radyoaktif olarak belirlenmiş olmaktadır [Kirby, 1990].

PZR tekniği Southern tekniği ile kıyaslandığı zaman oldukça kolay, hızlıdır. Southern blotlama 3-4 gün sürebilmektedir, oysa PZR bir günden daha kısa sürede tamamlanmaktadır. PZR tekniği oldukça duyarlı olmasının yanında çok daha az miktardaki DNA örneği ile çalışılabilmektedir. PZR radyoaktif materyallerin kullanılmasına da gerek yoktur [Macdonald ve ark., 2004].

Aşağıda örnek olan verilen populasyon çalışmalarında farklı sonuçlar elde edilmiştir. Bazı çalışmalar $^{609}\text{C} \rightarrow \text{T}$ polimorfizmi taşıyan bireylerde enzim aktivitesinin düşük olması nedeniyle hematolojik kanserlere yatkınlık sağladığını gösterirken bazıları bu polimorfizm ile hematolojik kanserler arasında bir ilişki bulamamıştır. Yapılan çalışmalarda PZR-RFLP yöntemi kullanılmıştır. Çalışmalarda kullanılan DNA örnekleri geleneksel metotla ya da ticari kitler yardımıyla izole edilmiş, sense ve anti-sense primerler kullanılarak PZR ile çoğaltılmıştır. PZR ürünleri *Hinf-I* restriksiyon enzimi ile kesilmiş, agaroz jel üzerinde UV altında değerlendirilmiştir.

Smith ve arkadaşları yaptığı çalışmada düşük ya da ortadan kalkmış olan *NQO1* aktivitesinin Akut Lösemiler üzerindeki etkisini araştırdığı çalışmasında kullanılan DNA örnekleri uygun primerler kullanılarak PZR ile çoğaltılmış ve *Hinf-I* restriksiyon enzimi ile kesilmiştir. Agaroz jelde yapılan değerlendirme sonrasında *NQO1* polimorfizminin akut lösemi riskini arttırdığı gösterilmiştir [Smith ve ark., 2001].

Larson ve arkadaşları primer ve tedavi sonrası gelişen lösemiler ile yaptığı populasyon çalışmasında *NQO1* polimorfizminin tüm lösemi tiplerinde bir risk faktörü olduğunu göstermişlerdir [Larson ve ark., 1999].

Krajinoviç ve arkadaşları yaptıkları çalışmada faz-I ve faz-II enzimlerinden *sitokrom P-450*, *myeloperoksidaz*, *kinonoksidodedüktaz*, *glutatyon-S-transferaz*, *N-asetil transferaz* enzimlerinin varyantlarının akut lenfasitik lösemi (ALL) gelişimi üzerine olan etkilerini araştırmışlardır. PZR-RFLP ile değerlendirilen çalışmada bu enzimlerin polimorfik formlarının ALL gelişimine katkıda bulunduğu hatta hastalığın relaps (hastalığın tekrarlama durumu) riskini de artırdığı gösterilmiştir [Krajinoviç ve ark., 2001].

NQO1 polimorfizminin akut lösemi gelişimin etkilediği gösterilen çalışmaların yanında lösemi gelişiminde etkisinin olmadığı söylenen populasyon çalışmaları da mevcuttur. Çünkü *NQO1* polimorfizmi etnik gruplar arasında farklılıklar göstermektedir.

Kelsey ve arkadaşlarının *NQO1* polimorfizminin anti-kanser kemoterapisindeki rolünü araştırmak için farklı etnik kökenli populasyonlarda taramalar yapmıştır. Fakat oranlar etnik gruplar arasında, rastlanma sıklığı açısından farklılıklar göstermiştir. Avrupa kökenlilerde %4, Meksika kökenli Amerikalılarda %16, Afrika kökenli Amerikalılarda %5, Asya kökenlilerde %20 olarak hesaplanmıştır. *NQO1**2 allel sıklığı ise sırasıyla 0,22, 0,39, 0,23, 0,45 bulunmuştur. *NQO1* polimorfizmi her

ne kadar etnik gruplar arasında farklılık da gösterse en yüksek %22 ile Çin popülasyonu olmuştur [Kelsey ve ark., 1997].

Sırma ve arkadaşlarının Türk popülasyonunda yaptıkları ve *NQO1* polimorfizminin pediatrik akut lösemiler üzerindeki etkisini araştırdığı çalışmada polimorfizmin bir etkisinin olmadığını göstermişlerdir. Olgu ve kontrol grupları arasında yapılan genotip ayrımında istatistiksel bir anlam bulunamamıştır. Mutant allel sıklığı kontrol grubunda 24,8 iken akut lösemilerde 20,1 bulunmuştur [Sırma ve ark., 2004].

Krancht ve arkadaşlarının Avrupa kökenli olgularla yaptığı çalışmada çeşitli hematolojik kanserlerde *NQO1* polimorfizminin etkisini araştırmış, Burkitt's lenfoma dışında akut lösemiler üzerinde bir risk oluşturmadığı gösterilmiştir [Krancht ve ark., 2004].

Lösemi dışında bir çok kanser tipinde *NQO1* polimorfizmi araştırılmış kimi kanser türlerinde anlamlı bulunurken kimisinde etkisiz olduğu gösterilmiştir.

Hamajima ve arkadaşlarının Japon popülasyonunda *NQO1* polimorfizmini 8 farklı kanser tipinde (özefagus, mide, kolan, rektum, akciğer, meme, prostat kanseri, lenfoma) araştırmışlardır. Sonuçta akciğer kanseri dışında diğer kanser tipleri ile kontrol grubu arasında anlamlı bir farklılık gösterilmemiştir [Hamajima ve ark., 2002].

Bu çalışmada; 78 akut lösemi hastası ile 87 sağlıklı bireyde detoksifikasyonun faz-I safhasında görevli olup, kinon ve türevlerinin biyoaktivasyonunda görev alan *NAD(P)H: kinon oksidoredüktaz* (NQO1) adlı enzimi kodlayan 16. kromozomun kısa kolunda (16q22.1) lokalize olmuş gen üzerindeki polimorfizim Türk popülasyonundaki dağılımı ve bu polimorfizim sonunda meydana gelen genotiplerin akut lösemilere yakınlık sağlayıp sağlamadığı araştırılmıştır.

3. MATERİYAL METOD

3.1. Materyal

Bu çalışmada kontrol grubu olarak seçilerek incelenen 87 sağlıklı bireylere ait kan örnekleri Gülhane Askeri Tıp Akademisi'ne genetik ve kanser harici müracaat eden gönüllü kişilerden toplanmıştır. Seçilen kişilerin Türkiye'nin değişik bölgelerinden olmasına, yaş ve cinsiyet dağılımına dikkat edilmiştir. Böylece oluşturulan kontrol grubunun homojen bir dağılım göstermesine dikkat edilmiştir. Kan örnekleri 10 ml steril EDTA' lı tüplerde toplanmıştır. Kontrol grubuna ait yaş, cinsiyet özellikleri Çizelge 4.1'de gösterilmiştir.

Bu çalışmada 87 sağlıklı bireye ait DNA örnekleri ile Gülhane Askeri Tıp Akademisi Hematoloji Bilimdalı'na 1996-2000 yılları arasında başvurmuş ve ALL/AML tanısı konmuş olan 78 hastadan alınan kan örneklerinden izole edilen DNA örnekleri kullanılmıştır. Akut Lösemi tanısı konmuş olan olgulardan ilk tanı evresinde alınan kemikiliği ve periferik kan örneklerine ait DNA'lar Gülhane Askeri Tıp Akademisi Tıbbi Biyoloji Anabilimdalı ve Tıbbi Genetik Bilimdalında Manniatis ve arkadaşlarının tarif ettiği metoda uygun olarak izole edilmiştir [Manniatis ve ark., 1989]. Çalışmada kullanılan çözeltiler Çizelge 3.1'de gösterilmiştir.

Kullanılan kimyasallardan; Tris baz, Borik asit, EDTA, Bromfenol mavisi, Etidyum bromür SIGMA'dan; agaroz SERVA'dan; Etanol MERCK'ten temin edilmiştir.

Taq DNA polimeraz, MgCl₂, 10X PZR tamponu, *Hinf-I* (RE), 10X RE (*Hinf-I*) tamponu BIORON'dan; 100-3000 bç. DNA marker, dNTP karışımı AMRESCO'dan temin edilmiştir.

Çalışmada kullanılan primerlerin dizileri aşağıda gösterilmiştir.

NQO1-R

5' - TCT CCT CAT CCT GTA CCT CT - 3'

NQO1-F

5' - AAG CCC AGA CCA ACT TCT - 3'

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan çözeltiler

TBE (5X) Çözeltisi	: 54 g Tris baz 27,5 g Borik asit 20 ml 0,5 M EDTA (pH:8.0)
TBE (0,5X) Çözeltisi	: 100 ml 5X tampon 900 ml distile su
Yükleme Tamponu	: %25 bromfenol mavisi %25 ksilen siyanol %40 süktroz
PZR Tamponu (10X)	: 10 mM potasyumfosfat (pH:7,4) 0,1 mM EDTA %50 Gliserol %0,1 TritonX-100 %0,1 Tween 20
RE (<i>Hinf</i> -I) Tamponu (10X)	: 50mM TrisHCl (pH:7,6) 10mM MgCl ₂ 100 mM NaCl 1 mM DDT

3.2. Metod

3.2.1. DNA izolasyonu

Olgu grubunda incelenecek olan akut lösemi hastalarının kanları 1996-2000 tarihleri arasında toplanmış olup, Gülhane Askeri Tıp Akademisi Tıbbi Biyoloji Anabilimdalı ve Tıbbi Genetik Bilimdalın'da Manniatis ve arkadaşlarının tarif ettiği metoda uygun olarak izole edilmiştir [Manniatis ve ark., 1989].

Kontrol grubunda incelenecek olan sağlıklı bireylerin DNA'ları ise QIAamp DNA Kan Mini Kit (Kat. No: 51306) ile firmanın önerdiği çözeltiler kullanılarak izole edilmiştir.

DNA izolasyon kiti ile 200 µl kan örneğinden 6 µl DNA elde edilmiştir. 200µl distile suda çözülmüş olan DNA'nın yoğunluğu ortalama 30 ng/ µl olmakla beraber A_{260} / A_{280} absorbansta ölçüldüğünde 1,7-1,9 saflıkta çıkmaktadır.

3.2.2. PZR reaksiyonu

NQOI lokusunun genotiplendirilmesi, BioRad termal döngü aleti kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu ile gerçekleştirilmiştir. DNA örneklerinin herbirinin çoğaltılması için aşağıda belirtilen PZR karışım hazırlandı.

10X Tampon	2,5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	1,5µl
dNTP (2,5mM)	2,5µl
DNA (30 ng/ml)	2,5µl
F Primer (30pmol/ µl)	1 µl
R Primer (30 pmol/ µl)	1 µl
<i>Taq DNA polimeraz</i> (5 U/µl)	0,25µl
Steril damıtık su	16,25

PZR programı aşağıda gösterildiği gibi hazırlandı.

• İlk denatürasyon	95 ⁰ C	5 dakika	x 1 Döngü
• Denatürasyon	95 ⁰ C	50 saniye	} x 40 Döngü
• Primerlerin bağlanması	52 ⁰ C	50 saniye	
• Uzama	72 ⁰ C	30 saniye	
• Son uzama	72 ⁰ C	10 dakika	x 1 Döngü

3.2.3. PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi

PZR ürünleri %2'lik agaroz jelde değerlendirilmiştir. Bunu için 0,6 gr agaroz, 30 ml 0,5X TBE çözeltisi ile çözüldü. Mikrodalga fırında agaroz tamamen çözünüp kaynatıldı. DNA'nın UV altında görülebilmesi için jele EtBr (0,5µl/ml) eklendi. Karıştırılarak boyanın homojen hale gelmesi sağlandı. Jel tabağına dökülen jelin soğuması beklendikten sonra PZR ürünleri jeldeki kuyucuklara yüklendi. İlk kuyuya 3 µl DNA marker, diğerlerine de sırayla 3 µl PZR ürünlerinde yüklendi. 120 V'da 1 saat yürütülerek, UV altında değerlendirildi (UVI tec).

3.2.4. PZR ürünlerinin *Hinf-I* restriksiyon enzimi ile kesimi

Kesim karışımı

10X tamponu	2 µl
<i>Hinf-I</i> (10U/µl)	1,5 µl
PZR ürünü	20 µl

Karışım 37⁰C'de su banyosunda bir gece boyu inkübe edildi. Kesim ürünleri %2'lik agaroz jelde değerlendirildi. Bunun için 2 gr agaroz, 100 ml 0,5X TBE (EK-1) solüsyonu ile çözüldü. Mikrodalga fırında agaroz tamamen çözünüp kaynayınca kadar ısıtıldı. DNA'nın UV altında görülebilmesi için jele EtBr (0,5µl/ml) eklendi.

Karıştırılarak boyanın homojen hale gelmesi sağlandı. Jel tabağına dökülen jelin soğuması beklendikten sonra PZR ürünleri jeldeki kuyucuklara yüklendi. İlk kuyuya 5 µl DNA marker, diğerlerine de sırayla 15 µl PZR ürünlerinde yüklendi. 150 V’ da 1 saat yürütülerek, UV altında değerlendirildi (UVI tec).

3.2.5. Genotip tayini

NQOI genine ait PZR ürünü 271 bç uzunluğundadır. Kesim sonucunda 151 ve 120 bç iki parça oluşmaktadır. Eğer 271 bç tek bir bant gözleniyorsa homozigot normal, 151 ve 120 bç iki bant gözleniyorsa homozigot mutant, 271,151 ve 120 bç üç bant oluşuyorsa heterozigot olarak değerlendirilmektedir.

3.2.6. İstatistiksel analiz

Verilerin istatistiksel analizleri için SPSS 10.5 (SPSS Inc., Chicago. IL., USA) programı kullanıldı. Tüm parametreler için frekanslar ve yüzde değerleri hesaplandı. Bu frekansların hasta ve kontrol gruplarında görülme sıklıkları arasındaki ilişkiler Ki-Kare testi ile araştırıldı. Odds oranları (OR) hesaplandı. Yanılma düzeyi olarak 0,05 değeri seçildi. Bu değere eşit ya da küçük p değeri için “parametreler arası ilişkinin istatistiksel açıdan anlamlı” olduğu yorumu yapıldı.

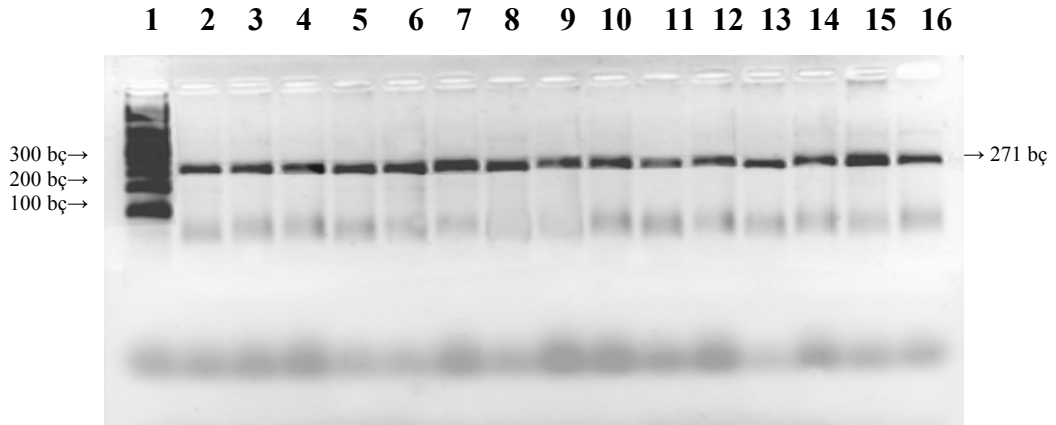
4. BULGULAR

Çalışmamızda kontrol grubu olarak Türkiye'nin değişik bölgelerinden gelen ve aralarında akrabalık ilişkisi bulunmayan 87 sağlıklı, 78 akut lösemili bireylerden izole edilmiş DNA örnekleri kullanılmıştır. Akut lösemi hastalarının DNA'ları 1996-2000 yılları arasında, Gülhane Askeri Tıp Akademisi Tıbbi Biyoloji Anabilimdalı ve Tıbbi Genetik Bilimdalında Manniatis ve arkadaşlarının tarif ettiği metoda uygun olarak izole edilmiş ve çalışmaya hazır olarak dahil edildi. Sağlıklı bireylerin DNA örnekleri ise ticari kit (QIAamp DNA Blood Mini Kit) kullanılarak izole edildi.

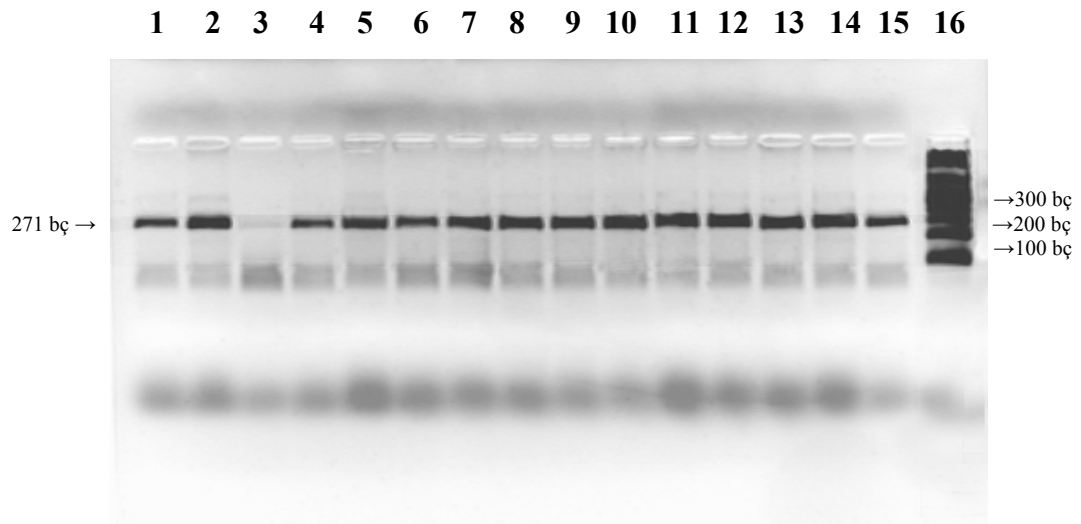
Türk toplumunda bu genin frekansını doğru belirleyebilmek için çalışmaya dahil edilen bireylerin Türkiye'nin her bölgesinden mümkün olduğu kadar eşit sayıda denek çalışmaya dahil edildi. Çalışmada kullanılan olguların genel bilgileri Çizelge 4.1'de ayrıntılı olarak gösterilmiştir. Çalışmaya dahil edilen hastaların 54'ü erkek, 24'ü kadındır. Yaşları ise 4-68 arasında değişmektedir. Hastaların 52'si AML, 26'sı ise ALL hastasıdır.

NQO1 geninin 6. ekzonunda 458. nükleotidi ile 729. nükleotidi arasındaki DNA bölgesi metod bölümünde belirtilen primerler kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltıldı. PZR ürünleri %2'lik agaroz jelde yürütülerek UV altında değerlendirildi.

Kontrol grubunun PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüleri Şekil 4.1'de gösterildi. Şekildeki 1. hata 1000 bp DNA marker yüklendi. 2-16. hatlara kontrol grubunun PZR ürünleri yüklendi. PZR ürünlerinin boyu 271 bp olarak bulundu. Hasta grubunun PZR ürünlerinin jel elektroforez görüntüleri Şekil 4.2'de gösterildi. Şekildeki 16. hata 1000 bp DNA marker yüklendi. 1-15. hatlara kontrol grubunun PZR ürünleri yüklendi. PZR ürünlerinin boyu 271 bp olarak bulundu. 3. hatta PZR çoğalması gözlenmedi.



Şekil 4.1. Kontrol grubu PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi
 Hat 1 :1000 bç DNA marker
 Hat 2-16 :Kontrol grubunun PZR ürünleri

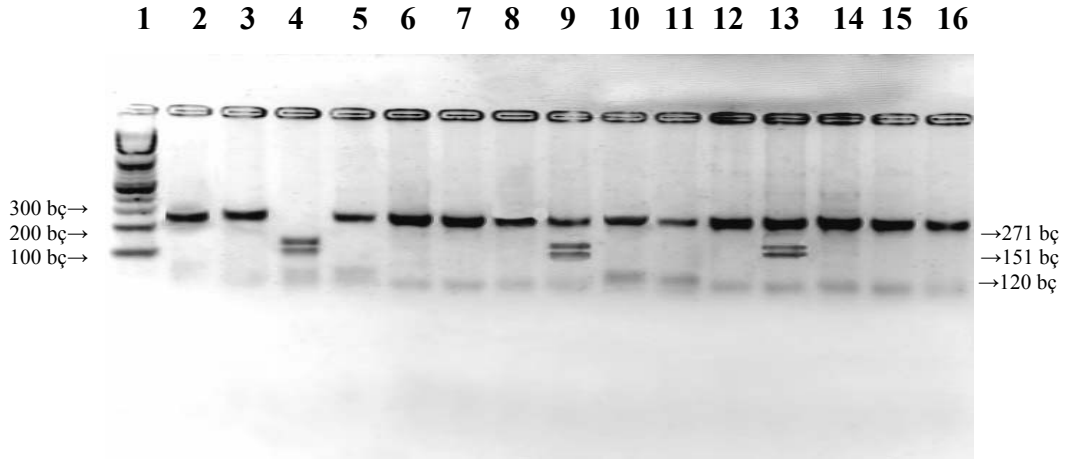


Şekil 4.2. Hasta grubu PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi
 Hat 16 : 1000 bç DNA marker
 Hat 1-15 : Hasta grubunun PZR ürünleri

Polimorfizm varlığını incelemek için PZR ürünleri metod kısmında belirtilen şekilde *Hinf-I* restriksiyon enzimi ile bir gece inkübasyona bırakıldı. Kesim ürünleri %2'lik agaroz jelde yürütülerek UV altında değerlendirildi. Kesim sonucunda 151 ve 120 bç iki parça oluşmaktadır. Eğer 271 bç tek bir bant gözleniyorsa homozigot normal, 151 ve 120 bç iki bant gözleniyorsa homozigot mutant, 271, 151 ve 120 bç üç bant oluşuyorsa heterozigot olarak değerlendirildi. Kontrol grubunun kesim ürünlerinin

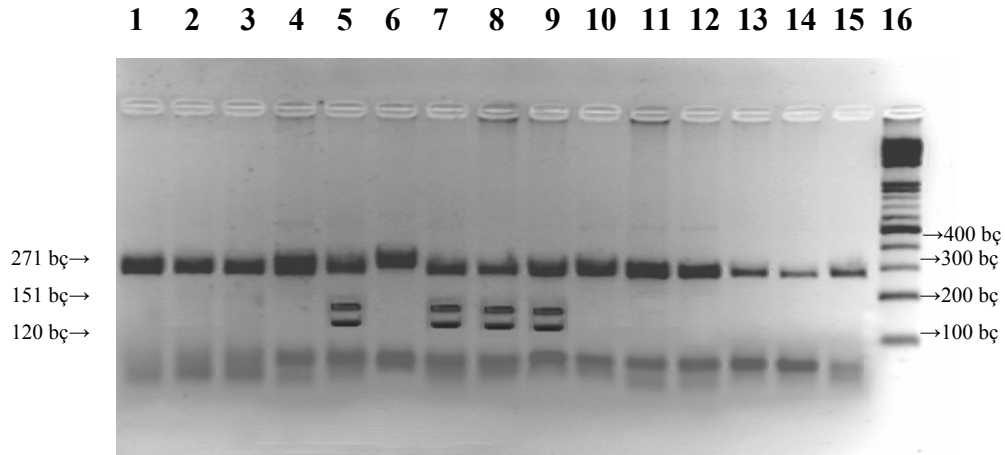
agaroz jel elektroforez görüntüleri Şekil 4.3, 4.4, hasta grubununkiler ise Şekil 4.5, 4.6’da gösterildi.

Şekil 4.3’de 1. hata 1000 bç DNA marker yüklendi. 2-16. hatlara kontrol grubunun *Hinf-I* enzimi ile kesim ürünleri yüklendi. Hat 1, 2, 5-8, 10-12, 14-16’daki kesim ürünleri 271 bç büyüklüğünde olup homozigot normal (CC) olarak değerlendirildi. Hat 9 ve 13’deki kesim ürünlerinde ise 271, 151, 120 bç büyüklüğünde üç farklı bant gözlemlendi. Bu bireyler *NQOI* gen polimorfizmi açısından heterozigot (CT) olarak değerlendirildi. Hat 4’te ise 151 ve 120 bç iki bant gözlemlendi.



Şekil 4.3. Kontrol grubu *Hinf-I* enzimi ile kesim ürünlerinin agaroz jel elektroforezi

Hat 1	: 1000 bç DNA marker
Hat 2-3	: 271 bç homozigot normal (CC) birey
Hat 4	: 151, 120 bç homozigot mutant (TT) birey
Hat 5-8	: 271 bç homozigot normal (CC) birey
Hat 9	: 271, 151, 120 bç heterozigot (CT) birey
Hat 10-12	: 271 bç homozigot normal (CC) birey
Hat 13	: 271, 151, 120 bç heterozigot (CT) birey
Hat 14-16	: 271 bç homozigot normal (CC) birey

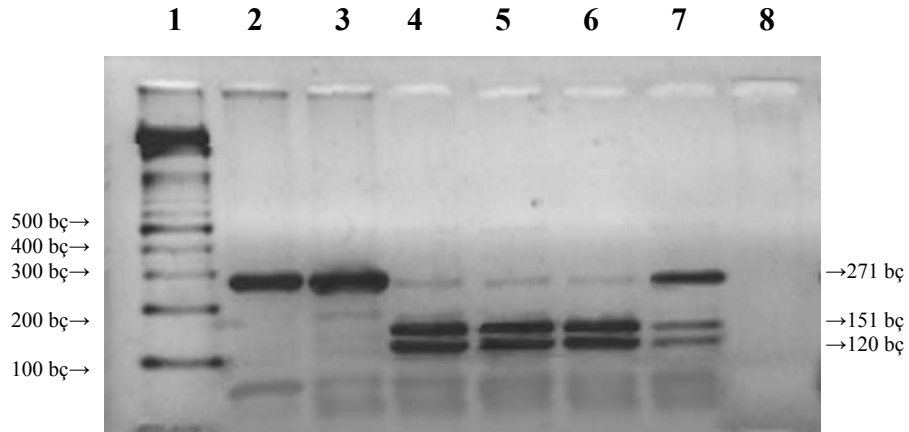


Şekil 4.4. Hasta grubu *Hinf-I* enzimi ile kesim ürünlerinin agaroz jel elektroforezi 1

- Hat 1 : 1000 bç DNA marker
- Hat 1-4 : 271 bç homozigot normal (CC) birey
- Hat 5 : 271, 151, 120 bç heterozigot (CT) birey
- Hat 6 : 271 bç homozigot normal (CC) birey
- Hat 7-9 : 271, 151, 120 bç heterozigot (CT) birey
- Hat 10-1 : 271 bç homozigot normal (CC) birey

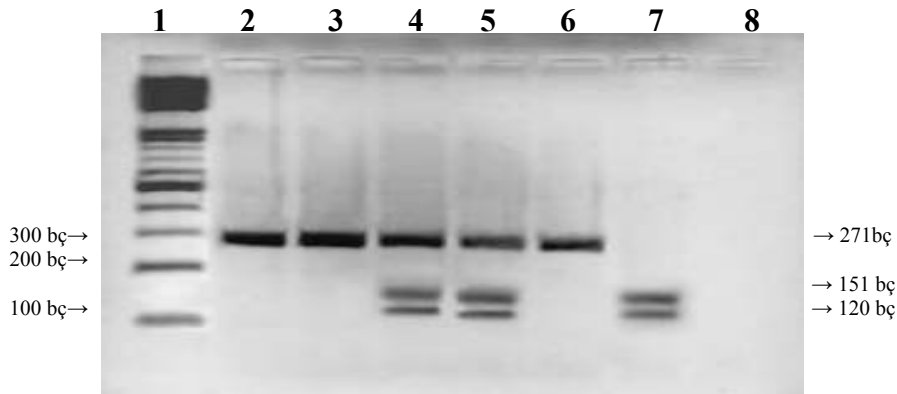
Şekil 4.4’de 16. hata 1000 bç DNA marker yüklendi. 1-15. hatlara hasta grubunun *Hinf-I* enzimi ile kesim ürünleri yüklendi. Hat 1-4, 6, 10-15’deki kesim ürünleri 271 bç büyüklüğünde olup homozigot normal (CC) olarak değerlendirildi. Hat 5, 7-9’daki kesim ürünlerinde ise 271, 151, 120 bç büyüklüğünde üç farklı bant gözlemlendi. Bu bireyler *NQOI* gen polimorfizmi açısından heterozigot (CT) olarak değerlendirildi.

Şekil 4.5’de 1. hata 1000 bç DNA marker yüklendi. 2-7. hatlara hasta grubunun *Hinf-I* enzimi ile kesim ürünleri yüklendi. Hat 2-3’deki kesim ürünleri 271 bç büyüklüğünde olup homozigot normal (CC) olarak değerlendirildi. Hat 4-6’daki kesim ürünlerinde ise 151, 120 bç büyüklüğünde iki farklı bant gözlemlendi. Bu bireyler *NQOI* gen polimorfizmi açısından homozigot mutant (CT) olarak değerlendirildi. Hat 7’deki kesim ürünlerinde ise 271, 151, 120 bç büyüklüğünde üç farklı bant gözlemlendi. Bu bireyler ise, *NQOI* gen polimorfizmi açısından heterozigot (CT) olarak değerlendirildi. Hat 8’e ise kontrol amaçlı steril damıtık su konuldu.



Şekil 4.5. Hasta grubu *Hinf-I* enzimi ile kesim ürünlerinin agaroz jel elektroforezi 2

- Hat 1 : 1000 bç DNA marker
 Hat 1-2 : 271 bç homozigot normal (CC) birey
 Hat 4-6 : 151, 120 bç homozigot mutant (TT) birey
 Hat 7 : 271, 151, 120 bç heterozigot (CT) birey
 Hat 8 : Steril damıtık su



Şekil 4.6. Hasta grubu *Hinf-I* enzimi ile kesim ürünlerinin agaroz jel elektroforezi 3

- Hat 1 : 1000 bç DNA marker
 Hat 2-3 : 271 bç homozigot normal (CC) birey
 Hat 4-5 : 271, 151, 120 bç heterozigot (CT) birey
 Hat 6 : 271 bç homozigot normal (CC) birey
 Hat 7 : 271 bç homozigot mutant (TT) birey
 Hat 8 : Steril damıtık su

Şekil 4.6'da 1. hata 1000 bç DNA marker yüklendi. 2-7. hatlara hasta grubunun *Hinf-I* enzimi ile kesim ürünleri yüklendi. Hat 2-3, 6'daki kesim ürünleri 271 bç büyüklüğünde olup homozigot normal (CC) olarak değerlendirildi. Hat 4-5'deki ise

271, 151, 120 bç büyüklüğünde üç bant gözlemlendi. Bu bireyler, *NQOI* gen polimorfizmi açısından heterozigot (CT) olarak değerlendirildi. Hat 7’de ise 151, 120 bç büyüklüğünde iki farklı bant gözlemlendi. Bu bireyler ise *NQOI* gen polimorfizmi açısından homozigot mutant (CT) olarak değerlendirildi. Hat 8’e ise kontrol amaçlı steril damıtık su konuldu.

Polimorfizmler belirlendikten sonra, kontrol ve akut lösemi hasta gruplarında *NQOI* geninin allel ve genotip frekansları SPSS 10.5 (SPSS Inc., Chicago. IL., USA) programı kullanılarak hesaplandı (Çizelge 4.2). Kontrol grubuna ait allel ve genotip dağılımları akut lösemili hastaların allel ve genotip frekansları ile karşılaştırıldı.

Kontrol grubu içerisinde yt/yt (normal) ve MT/MT (mutant) genotiplerinin dağılımları sırasıyla % 60,92, %5,75 iken akut lösemili hastalarda bu oran %62,82, %8,97 olarak hesaplandı. Bu polimorfizmi heterozigot olarak taşıyan bireylerin oranı ise kontrol grubunda %33,33, hasta grubunda ise %28,21 olarak bulundu. Bununla beraber mutant allel frekansı ($NQOI^*2$) hasta ve kontrol gruplarında sırasıyla 0,2466 ve 0,2241 olarak hesaplandı. Elde edilen gen frekansları Hardy-Weinberg kuralına uymaktadır.

Daha sonra mutant ($NQOI^*2$) ve normal ($NQOI^*1$) allel frekanslarının akut lösemi hastalarında ve kontrol grubundaki dağılımları karşılaştırıldı (Çizelge 4.3). $NQOI^*2$ alleli kontrol grubunun %22,41’de, hasta grubunun ise %24,66’sında, gözlenmiştir. Buna göre normal alleli taşıyan bireyin akut lösemi hastası olmama şansı 1,133 (0,675-1,902; CI: %95, $p=0,734$) kat fazladır. Yani hasta ve kontrol grubuna ait allel frekansları birbirleriyle kıyaslandıkları zaman istatistiksel açıdan bir fark olmadığı gözlenmiştir.

Allel frekanslarının dağılımının yanında, *NQOI* genotiplerinin dağılımlarında hasta ve kontrol gruplarında incelenmiş, sonuçları ise Çizelge 4.4’de gösterilmiştir. Buna göre *NQOI* geni açısından normal genotipe sahip bireyler (yt/yt) kontrol grubunun %60,92’sini, hasta grubunun %62,82’sini oluşturmaktadır. Mutant genotipe sahip bireyler (yt/yt, yt/mt) ise oranlar sırasıyla %39,08, %37,18 bulunmuştur. Normal

veya mutant genotipe sahip olma durumunun akut lösemi hastalığı için bir risk oluşturmadığı ortaya çıkmıştır. Mutant genotipe sahip olan bireyin akut lösemi hastası olma şansı 0,923 (0,492-1,731; CI: %95, p=0,928) kat fazladır. İki grup istatistiksel olarak karşılaştırıldığında bu sonuç anlamlı bulunmamıştır.

NQO1 genotipinin Akut lösemi tiplerinde dağılımları ise Çizelge 4.5’de gösterilmiştir. AML hastalarının %43,40’ında mutant genotip gözlenirken, ALL hastalarının %23,08’inde gözlenmiştir. AML hastalarının %30,4’ünü homozigot mutant genotipe sahip bireyler oluştururken, ALL hastalarında homozigot mutant genotip hiç gözlenmemiştir. Yapılan istatistik değerlendirme sonucunda AML hastası olan bireyin ALL hastası olan bireye oranla normal genotipi taşıma şansı 0,391 (0,135-1,131; CI: %95, p=0,130) kat fazla olduğu bulunmuştur. İstatistiksel olarak anlamlı bir değer izlenmemiştir..

Çizelge 4.1. Hasta ve kontrol grubunun yaş, cinsiyet ve akut lösemi tipine göre dağılımları (n:toplam olgu sayısı)

	Kontrol Grubu (n=87)	Hasta Grubu (n=78)
Cinsiyet		
Erkek	58	54
Kadın	29	24
Yaş		
<20	26	20
20-40	38	30
>40	23	28
Lösemi Tipi		
AML	-	52
KML	-	26

Çizelge 4.2. Akut Lösemi hastalarında ve kontrol gruplarında *NQO1* genotip ve allel frekanslarının dağılımları

Genotip	Kontrol Grubu (n:87)	Hasta Grubu (n:78)
yt/yt	53 (%60,92)	49 (%62,82)
yt/mt	29 (%33,33)	22 (%28,21)
mt/mt	5 (%5,75)	7 (%8,97)
NQO1*1 allel frekansı	0,775	0,769
NQO1*2 allel frekansı	0,225	0,231

Çizelge 4.3. NQO1*1 ve NQO1*2 allel frekanslarının Akut Lösemi hastalarında ve kontrol grubundaki dağılımlarının karşılaştırılması

Allel	Kontrol Grubu	Hasta Grubu	OR (%95 CI)	χ^2	p
NQO1*1	135 (%77,59)	110 (%75,34)	1,030 (0,911-1,164)	0,115	0,734
NQO1*2	39 (%22,41)	36 (%24,66)	0,909 (0,612-1,351)		

Çizelge 4.4. NQO1*1 ve NQO1*2 genotiplerinin Akut Lösemi hastalarında ve kontrol grubundaki dağılımlarının karşılaştırılması

Genotip	Kontrol Grubu	Hasta Grubu	OR (%95 CI)	χ^2	p
yt/yt	53 (%60,92)	49 (%62,82)	1,039 (0,774-1,395)	0,008	0,928
yt/mt mt/mt	34 (%39,08)	29 (%37,18)	0,958 (0,685-1,340)		

Çizelge 4.5. *NQO1* genotipinin lösemi tiplerine göre dağılımı

Lösemi Tipi	yt/yt	yt/mt mt/mt	OR (%95 CI)	χ^2	p
Akut myeloid lösemi(AML) (n:52)	30 (%56,60)	23 (%43,40)	0,757 (0,564-1,014)	2,287	0,130
Akut lenfoblastik lösemi(ALL) (n:26)	20 (%76,92)	6(%23,08) (mt/mt gözlenmedi)	1,933 (0,878-4,257)		

5. TARTIŞMA

Kanser, genetik ve çevresel faktörlerin bir araya gelmesiyle ortaya çıkan hücresel bir hastalıktır. Çevresel toksinler, vücudumuzda faz-I ve faz-II detoksifikasyon metabolizması ile zararsız hale getirilmektedir. Faz-I enzimleri ile toksik maddelere işlevsel grup ekleyerek çok daha reaktif formlar oluşturmakta, faz-II enzimlerinin konjugasyon reaksiyonları ile etkisiz hale getirilmektedir [Liska, 1998]. Kişilerin kansere olan yatkınlığının belirlenmesinde göz önünde bulundurulacak mekanizmalardan biride detoksifikasyon mekanizmalarında rol oynayan enzimlerin gösterdiği polimorfizmlerdir [Estabrook, 1996]. Ortaya çıkan polimorfizmler sonucunda enzimlerin niceliksel ve niteliksel özellikleri değişmektedir. Aynı miktardaki toksik madde bireyin sahip olduğu genotipe bağlı olarak enzimlerde meydana gelen bu polimorfizmlerin çeşitli hastalıklara ve kansere yatkınlık sağladığı düşünülmektedir [Vineis, 2002].

Bugüne kadar farklı etnik gruplarda detoksifikasyon enzimlerini kodlayan gen ürünlerindeki polimorfizmler birçok kanser türünde olduğu gibi lösemilerde de araştırılmıştır. Bu polimorfizmlerin löseminin patogeneğinde rol oynadığı düşünülmektedir.

NOQ1 kinon ve kinon türevlerinden iki elektron indirgeyen bir flavoproteindir. Bir çok dokuda ifade edilen NQO1, ksenobiyotiklerden iki elektron indirgenmesini katalize ederek semikinon ve serbest radikal oluşumunu engeller. Dolayısıyla hücreyi oksidatif stres, sitotoksiklik, mutajenlik ve karsinojenlikten korur. İndirgeme sonucunda oluşan hidrokinonlar faz-II enzimleri ile konjugasyona girerek detoksifiye olurlar ve vücuttan atılırlar. NQO1 kimyasal toksisiteye ve karsinojeniteye karşı hücreleri koruyucu etkisi nedeniyle son zamanlardaki çalışmaların ilgi kaynağı olmuştur [Joseph ve ark., 2000].

Ksenobiyotik metabolizmasında önemli yere sahip olan NQO1 enzimini kodlayan gen üzerinde meydana gelen mutasyon sonucunda ortaya çıkan polimorfizm enzimin etkisini azaltmakta ya da ortadan kaldırmaktadır. 16. kromozomun kısa kolunda

lokalize olmuş *NQO1* geninin 6. ekzonunun 609. nükleotidinde C→T dönüşümü aminoasitlerden prolinin serine dönüşmesine neden olmaktadır. Polimorfik alleli heterozigot olarak taşıyan bireylerde enzim aktivitesi düşük iken, homozigot olarak taşıyan bireylerde enzim aktivitesi ortadan kalkmaktadır [Traver ve ark., 1997]. *NQO1* geni aynı zamanda tümör baskılayıcı genlerden *p53* geninin kararlılığını sağladığı için bu genin varyantını taşıyan bireylerde *p53* geni kararlı olmadığından diğer kromozomal düzensizliklerin oluşmasına meyilli bir ortam yaratılmıştır. Genomik kararsızlık nedeniyle mutasyonların hedefi haline gelen hücre nihayetinde kanserleşir [Iskander ve Jaiswal, 2005].

Sonuç olarak mutant *NQO1* allelini taşıyan bireylerin çeşitli hastalıklara ve kansere yatkınlığı sağladığı düşünülmektedir.

Biz bu çalışmada kontrol grubu olarak Türkiye'nin değişik bölgelerinden gelen ve aralarında akrabalık ilişkisi bulunmayan sağlıklı 87 bireyden ve akut lösemili 78 bireyden izole edilmiş DNA örnekleri kullanarak, *NQO1* C→T polimorfizminin dağılımını ve allel frekanslarını belirlemek suretiyle, iki grup arasında anlamlı bir fark olup olmadığını inceledik.

Kontrol grubu içerisinde yt/yt (normal) ve mt/mt (mutant) genotiplerinin dağılımları sırasıyla % 60,92, %5,75 iken akut lösemili hastalarda bu oran %62,82, %8,97 olarak hesaplanmıştır. Bununla beraber mutant allel frekansı ($NQO1^{*2}$) hasta ve kontrol gruplarında sırasıyla 0,231 ve 0,225 olarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.2). Buna göre normal alleli ($NQO1^{*1}$) taşıyan bireyin akut lösemi hastası olmama şansı 1,133 (0,675-1,902; CI: %95) kat fazladır. Mutant genotipe sahip olan bireyin akut lösemi hastası olma şansı ise 0,923 (0,492-1,731; CI: %95) kat fazla bulunmuştur. İki grup istatistiksel olarak karşılaştırıldığında sonuçlar anlamlı bulunmamıştır.

Yaptığımız bu çalışma sonucunda *NQO1* geninin 187. kodonundaki aminoasitin prolinden serine dönmesi sonucunda ortadan kalkan enzim aktivitesinin Türk popülasyonunda Akut lösemi gelişimine herhangi bir katkısı olmadığı gösterilmiştir.

Sonuçlarımız Sırma ve arkadaşlarının yaptığı çalışmayla benzerlik gösterirken, farklı etnik gruplarda yapılan çalışmalarda farklılık göstermektedir [Sırma ve ark., 2004]. Yapılan çalışmalarda incelenen kanser tipine ve popülasyonuna bağlı olarak birbiriyle çelişkili sonuçlar elde edilmiştir. Bunun nedeni, etnik grupların bu polimorfizm açısından farklılık göstermesidir. *NQO1* geninin 609. nükleotidinin sitozinden timine dönüşmesiyle ortaya çıkan polimorfizmin insan popülasyonunun ortalama %50'sinde görüldüğü, bunun %10'nun bu polimorfizm için homozigot özellik gösterdiği düşünülmektedir. Fakat bu oranlar etnik gruplar arasında rastlanma sıklığı açısından farklılıklar göstermektedir. Avrupa kökenlilerde %4, Meksika kökenli Amerikalılarda %16, Afrika kökenli Amerikalılarda %5, Asya kökenlilerde %20 olarak hesaplanmıştır. *NQO1**2 allel sıklığı ise sırasıyla 0,22, 0,39, 0,23, 0,45 bulunmuştur. *NQO1* polimorfizmi her ne kadar etnik gruplar arasında farklılık da gösterse en yüksek %22 ile Çin popülasyonu olmuştur [Kelsey ve ark., 1997].

Örneğin; Avrupa popülasyonunda yapılmış bir çalışmada çeşitli kromozom anomalisi taşıyan (*MLL/AF4*, *BCR/ABL*, *TEL/AML1*) 138 Pediatrik ALL hastası ile Burkitt's lenfoma hastası olan 71 hasta ile 190 sağlıklı bireyi *NQO1* polimorfizmi açısından karşılaştırmışlardır. İstatistiksel değerlendirme sonucunda, ALL hastaları kontrol grubuyla kıyaslandığında *NQO1* polimorfizminin hastalık için bir risk oluşturmazken sadece Burkitt's lenfoma hastaları kontrol grubuyla kıyaslandığında anlamlı bir sonuç (OR: 1,81; %95 CI: 1,04-3,15; p=0,036) elde edilmiştir. Yaş ve cinsiyet açısından kıyaslandığında yine anlamlı sonuçlar elde edilmemiştir [Kracht ve ark., 2004].

Wielmes ve arkadaşlarının yaptıkları bir diğer çalışmada genetik değişimler geçirmiş 136 lösemi vakasını, 100 sağlıklı bireyden oluşmuş olan kontrol grubuyla karşılaştırarak *NQO1* polimorfizminin dağılımını incelemişlerdir. Yapılan değerlendirme sonucunda *NQO1* polimorfizm frekansı kontrol grubunda %17 iken, *MLL* füzyon genini taşıyan lösemi hastalarında %32, *MLL/AF4* füzyon genini taşıyan lösemi hastalarında %45, *TEL/AML1* füzyon genini taşıyan hastalarında %22, hiperdiploidi taşıyan lösemi hastalarında %16 olarak hesaplanmıştır. İstatistiksel olarak değerlendirildiğinde *MLL* füzyon genini taşıyan lösemi hastalarında *NQO1**2

genotipinin gözlenme olasılığı kontrol grubuyla kıyaslandığında 2,5 kat daha fazladır. Diğer translokasyonları taşıyan lösemi hastaları için *NQO1* polimorfizmi bir risk oluşturmamaktadır [Wielmes ve ark., 1999].

Sırma ve arkadaşlarının yaptığı benzer çalışmada, *NQO1**2 mutant genotipinin pediatrik lösemi üzerindeki dağılımını incelemişlerdir. Çalışmada *NQO1* C609T polimorfizminin allel sıklığı kontrol grubunda %3,5 iken akut lösemi hastalarında %2,5 bulunmuştur. Bu allel sıklığı kontrol grubuyla kıyaslandığında anlamlı bulunmamıştır (OR: 0,76, CI %95: 0,58-1,01, p=0,06). Farklı *NQO1* genotiplerinde akut lösemili hastaları kontrol grubuyla kıyasladıklarında da istatistiksel bir anlam (p=0,13) bulunamamıştır [Sırma ve ark., 2004].

Bunun yanında Smith ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada düşük veya ortadan kalkmış *NQO1* aktivitesinin akut lösemi riskini arttırdığı gösterilmiştir. Kontrol grubunda *NQO1* genotip dağılımı %67 (CC), %29 (CT), %4 (TT) iken akut lösemi grubunda %58 (CC), %38 (CT), %4 (TT) olarak hesaplanmıştır. Akut lösemi grubunun %49'unu homozigot mutant veya heterozigot allel taşıyan bireyler oluşturduğu gösterilmiştir. *NQO1* polimorfizminin akut lösemi oluşturma riskini arttırdığı, bu artışın AML'ye oranla ALL'de daha belirgin olduğu belirlense de bunun istatistiksel bir anlamı bulunamamıştır. Çalışmada yaş, cinsiyet ve sigara kullanma alışkanlığı açısından da iki grup kıyaslanmış ancak istatistiksel bir anlam bulunamamıştır [Smith ve ark., 2002].

Krajinović ve arkadaşları yaptıkları çalışmada faz-I ve faz-II enzimlerinden *Sitokrom P450 enzimleri (CYP1A1, CYP2E1)*, *myeloperoksidaz (MPO)*, *kinon oksidoredüktaz (NQO1)*, *glutasyon-S-transferaz (GSTM1, GSTM2)*, *N-asetil transferaz (NAT2)* enzimlerinin ALL gelişimine olan etkisini incelemişlerdir. Sonuçta bu enzimlerin polimorfik varyantlarını taşıyan bireylerde ALL gözlenme riskinin arttığı aynı zamanda hastalığın relaps riskinin arttırdığı da gösterilmiştir. Aynı grubun yaptığı bir diğer çalışmada ksenobiyotiklerin biyotransformasyonunda görev alan CYP2E1, MPO, *NQO1* enzimlerinin varyantlarının çocuk çağı ALL oluşturma riskini Kanada-Fransa kökenli bireylerde araştırmışlardır. CYP2E1 varyantını taşıyan bireylerde

ALL gelişme riski 2,8 kat artığı gösterilmiştir. NQO1 varyantının risk oluşturduğu fakat MPO varyantının tek başına etkisiz olduğu belirlenmiştir [Krajinović ve ark., 2001].

Lösemi dışında bir çok kanser türünde de *NQO1* polimorfizmi araştırılmış, kimi kanser türünde risk oluştururken kimisinde etkisiz bulunmuştur.

Japon popülasyonunda yapılan ve 8 farklı kanser türünde (özefagus, mide, kolon, rektum, akciğer, meme, prostat kanseri, lenfoma) *NQO1* polimorfizminin etkisinin araştırıldığı çalışmada; akciğer kanseri dışında diğer kanser tipleri ile polimorfizm arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır [Hamajima ve ark., 2002].

Park ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada mesane kanseri ile *NQO1* polimorfizmi arasındaki ilişkinin araştırıldığı çalışmada NQO1*2 genotipinin mesane kanseri için oldukça yüksek risk oluşturduğunu belirlenmiştir. Özellikle sigara kullanan bireylerde bu risk daha da artmıştır [Park ve ark., 2003].

İngiliz popülasyonunda yapılan bir diğer çalışmada da *NQO1* polimorfizminin küçük hücreli akciğer kanseri üzerine olan etkisi araştırılmış ve herhangi bir risk oluşturmadığı gösterilmiştir [Lewis ve ark., 2001].

Organizmada önemli bir görevi olan NQO1 geninin aktivitesinin ortadan kalkması kanser gelişimine katkıda bulunması ihtimalinin yüksek olduğunu düşünerek yola çıktığımız araştırmamızda tam tersi bir sonuç elde ettik. Yaptığımız çalışma sonucunda ortadan kalkan NQO1 aktivitesinin akut lösemi oluşumuna herhangi bir katkı sağlamadığı gösterilmiştir. Bunun durum bizlere, öncelikle kanserin karmaşık ve çok basamaklı bir süreç sonucu ortaya çıktığını göstermektedir. Hastalığın ortaya çıkabilmesi için çok sayıda genetik değişikliğin bir arada bulunması gerekmektedir. Diğer yandan, NQO1 geninin 1958 yılında Ernster ve Navazio tarafından kısmen saflaştırılıp bir takım özellikleri belirlenip yayınlanmasından sonra *NRH: kinon oksidoredüktaz-2* (NQO2) adı verilen, yapısal olarak NQO1' e çok benzeyen, flavoprotein yapısında, ikinci bir enzim tanımlanmıştır. Birbiriyle homoloji gösteren

bu iki enzimden NQO1 genin kaybı NQO2 gen ürünüyle tolere edilebileceğini düşündürmektedir.

Yapılan moleküler epidemiyolojik çalışmalar ile kanser-genetik faktörler ve kanser-çevresel faktörler arasındaki ilişkinin altında yatan nedenler çok daha rahat irdelenebilmektedir. Yaptığımız bu çalışmada kansere yatkınlıkta önemli bir basamak olan ksenobiyotik metabolizmasında yer alan enzimlerden *NAD(P)H: kinon oksidoredüktaz-1* (NQO1) geninin polimorfizmini inceleyerek, bireylerin sahip olduğu genotipe bağlı olarak kansere yakalanma riskinin belirlenmesi bu doğrultuda uygun ilaç tedavisinin uygulanabilmesi, elde edilen bulgular sayesinde erken tanıya olanak sağlayabilmeyi amaçladık.

İnanıyoruz ki; bu çalışma sonucunda elde ettiğimiz bu bulgular akut lösemi ile ilişkili olduğu düşünülen diğer gen polimorfizmleri ile birlikte değerlendirildiğinde çok daha aydınlatıcı olacak diğer çalışmalar için bir ön çalışma niteliğinde değerlendirilebilecektir. Tüm bu çalışmalar ile günümüzde insan sağlığı açısından büyük bir tehlike olarak görülen kansere karşı kısmen de olsa kendimizi savunabileceğimiz bir alan oluşabilecektir

KAYNAKLAR

1. Bennet L.Z., Kroetz D.L, Sheiner L.B, "Pharmacokinetics: The Dynamics of Drug Absorption, Distribution and Elimination", Pharmacological Basis of Therapeutics, Molinoff P.B, Ruddon R.W, Goldman G., **NY: McGraw-Hill**, New York, 3-27 (1996).
2. Bock K.W, Lipp H.P., Bock-Henning B.S, "Review: Induction of drug metabolizing enzymes by xenobiotics", *Xenobiotica*, 20:1101-1110 (1990).
3. Brenner C., Dugogan D.(ed.), "Oncogenomics: Molecular Approaches to cancer", **JohnWiley& sensInc**, London, 78-96 (2004).
4. Cech R., "Beginning to understand the end of the chromosome", *Cell*, 24: 273-279 (2004).
5. Chen S., Wu K., Know R., "Structure-Function Studies of DT-Diaphorase (NQO1) and NRH: Quinone Oxidoreductase (NQO2)", *Free Radical Biology & Medicine*, 29(3/4): 276-284 (2000).
6. Derelenko, MJ., "Carcinogenesis", Hand Book of Toxicology (2nd ed.), **NY: McGraw-Hill**, New York, 124-140 (1998).
7. Dinkova-Kostova A.T, Talalay T, "Persuasive evidence that quinone reductase type1 (DT-Diaphorase) protects cell against the toxicity of electrophiles and reactive form of oxygen", *Free Radical Biology & Medicine*, 29(3/4): 231-240 (2000).
8. Dixon K., Kopras E., "Genetic Alterations and DNA Repairs in Human Carcinogenesis", *Seminars in Cancer Biology*, 14(6): 441-448 (2004).
9. Estabrook R.W, "Cytochrome P450: From a single protein to a family of proteins with some personal reflections", Cytochrome P450: Metabolic and Toxicological Aspects, Ionnides, C.(ed), **Boca Rator FL:CRC Press**, Newyork, 3-28 (1996).
10. Evans W.E., "Pharmacogenomics: marshalling the human genome to individualise drug therapy", *Pharmacogenomics*, 52: 10-18 (2003).
11. Feinberg A.P., Tyco B., The history of cancer epigenetics, *Nat. Rev. Cancer*, 36: 143-153 (2004).
12. Goldstein D.B, Tate S.K, Sisodya S.M, "Pharmacogenetics Goes Genomic", *Nature Rev. Genet.*, 4: 937-947 (2003).

13. Hamajima N, Matsuo K, Iwata H, Shinoda M, Yamamura Y, Kato T, Hatooka S, Mitsudomi T, Suyama M, Kagami Y, Ogura M, Ando M, Sugimura Y, Tajima K, "NAD(P)H: quinone oxidoreductase1 (NQO1) C609T polymorphism and the risk of eight cancer for Japanese", *Int J Clin Oncol*, 7: 103-108 (2002).
14. Hanahan D., Weinberg R.A, "The hallmarks of Cancer", *Cell*, 100: 57-70 (2000).
15. Hartl D., Andrew G., "Principles of population genetics", *Sinaver Associates*, Sunderland, 56-75 (1997).
16. Hoelzer D., Seipelt G., "Leukemias", Textbook of Medical Oncology, Cavalli F., Hanson H., Kaye S.B, *Taylor& Francis*, London, 249-271 (2004).
17. Hunter D.J, "Gene-Environment Interactions in Human Diseases", *Nature Rev. Genet.*, 6: 287-298 (2005).
18. Hutt A.J., Cadwell, J.A., "Aminoacid conjugation", Conjugation Reakctions in Drug Metabolism, Mulder, J.G(ed), *Taylor& Francis*, Newyork, 273-305 (1990).
19. Iskander K., Jaiswal A.K, "Quinone oxidoreductases in protection against myelogenous hyperplasia and benzene toxicity", *Chemico-Biological Interactions*, 153: 147-157 (2005).
20. Jaiswal A.K, "Human NAD(P): quinone oxidoreductase (NQO1) gene structure and Induction by Dioxin", *Biochemistry*, 30: 10646-10653 (1991).
21. Jaiswal A.K; "Regulation of genes encoding NAD(P)H: Quinone oxidoreductase"; *Free Radikal Biology & Medicine*, 9:254-262 (2000).
22. Jaiswal A.K; "Characterization and Partial Purification of Microsomal NAD(P)H: Quinone oxidoreductase"; *Archieves of Biochemistry and Biophysics*, 375(1): 62-68 (2000).
23. Johnson J.A, "Pharmacogenetics: Potential for Individualized Drug Therapy Through Gentic", 19(11): 660-666 (2003).
24. Joseph P, Long II D. J., Klein-Szanto A. J. P., Jaiswal A.K., "Role of NAD(P)H: Quinone Oxidoreductase 1 (DT Diaphorase) in Protection aganist Quinone Toxicity", *BioChemical Pharmacology*, 60: 207-214 (2000).
25. Kelsey K.T., Wiencke J.K., Christiani D.C, Zuo Z., Spitz M.R., Xu X., Lee B.K., Schwartz B.S, Traver R.D., Ross D., "Ethnic variation in the prevalance of a commen NQO1: quinone oxidoreductase polymorphism and its implicatins of anti-cancer chemotherapy", *Br. J. Cancer*, 76: 852-854 (1997).

26. Kirby L.T., "DNA Fingerprinting: An Introduction", *Stockton Press*, Newyork, 135-147 (1990).
27. Klug, W.S., Cummings, M.R., "Genetik ve Kavramlar", Öner,C.(çeviri editörü.), *Palme Yayıncılık*, Ankara, 635-657, 715-717 (2002).
28. Kracht T., Schrappe M., Strehl S., Reither A., Elsner H., Trka J., Cario G., Viehmann S., Harbortt J, Brorkhardt A., Metzler M., Langer T., Repp R., Marschalek R., Welte K., Haas O., Stanulla M., "NQO1 polymorphism in distinct entities of pediatric hematologic neoplasms", *Pediatric Malignacies*, 89: 1492-1497 (2004).
29. Krajinović M., Labuda D., Sinnett D., "Childhood acute lymphoblastic leukemia: genetic determinants of susceptibility and disease outcome", *Rev. Environ Health*, 16(4): 263-279 (2001).
30. Larson R.A, Wang Y., BanerjeeM., Wimels J, Hartford C., Beau MM., Smith MT, "Prevalance of the inactivating ⁶⁰⁹C→T polymorphism in the NAD(P)H: quinone oxidoreductase(NQO1) gene in patients with primary and therapy-related myeloid leukemia", *Blood*, 94(2): 803-807 (1999).
31. Lewis S.J, Cherry N.M, Niven R.M, Barber P.V, Povey A.C, "Polymorphism in the NAD(P)H: quinone oxidoreductase gene and small cell lung cancer risk in a UK population", *Lung Cancer*, 34: 177-183 (2001).
32. Liska, D. J., "The Detoksification Enzyme Systems", *Altern. Med. Rew.*, 3(3): 187-198 (1998).
33. Liska, D.J., Lukaczer, D., Furlong J., "Detoksification: A Clinical monograph", Gig Harbor, *Wash: Institute for Functional Medicine*, Newyork, 165-176 (1999).
34. Macdonald F., Ford C.H.J., Carsson A.G., "Molecular Biology of Cancer", *Bios Scientific Publishers*, London, 11-29, 31-34, 173-188 (2004).
35. Manniatis, J., Fritsch, E.F., Sambrook J., "Molecular Cloning a Laboratory Manual", *Cold Spring Harbour Press*, 1540-1556, 1856-1888 (1989).
36. Nebert D.W, "Role of Genetics and Drug metabolism in human cancer risk", *Mutation Research*, 247: 267-281 (1991).
37. Nebert D.W., Roe A.L, Vandale S.E, Bingham E., Oakley G.G, "NAD(P): quinone oxidoreductase (NQO1) polymorphism, expose to benzene, and prediposition to disease: A HuGe review", *Genet. in Med.*, 4(2): 62-70 (2002).

38. Park S.A, Zhao H., Spitz MR, Grossman H.B, Wu X., “An association between NQO1 genetic polymorphism and risk of bladder cancer”, *Mutation Research*, 536: 131-137 (2003).
39. Parkin D.M, Bray F., Ferlay J, Pisani P, “Global Cancer Statistics, 2002”, *A Cancer Journal for Clinicians*, 55: 74-108 (2005).
40. Ross D., “Functions and distribution of NQO1 in human bone marrow: Potential clues to benzene toxicity”, *Chemico-Biological Interactions*, 153-154: 137-146 (2005).
41. Ross D., Kepa J.K, Winski S.L, Beall H.D, Anwar A., Siegel D., “NAD(P): quinone oxidoreductase (NQO1): chemoprotection, bioactivation, gene regulation genetic polymorphisms”, *Chemico-Biological Interactions*, 129: 77-97 (2000).
42. Rowe J.M, “Epidemiology and Etioloji”, In: Rowe J.M, Liesveld J.L, Diagnosis and Therapy of Acute Leukemia in Adults, *Harward Academic Publishers*, New York, 1-25 (1995).
43. Sarasin A, “An overview of the mechanisms of mutagenesis and carcinogenesis”, *Mutat Res/ Rew*, 15: 99-106 (2003).
44. Sherr C.J., “Principles of tumor suppression”, *Cell*, 235-246 (2004).
45. Sirma S., Agaoglu I., Yıldız I, cayli D., Horgusluoglu E., Anak S., Yüksel L., Unuvar A., Celkan T., Apak H., Karakas Z., Devecioglu O., Ozbek U., “NQO1: quinone oxidoreductase 1 null genotype is not associated with pediatric de nova acute leukemia”, *Pediatr Blood Cancer*, 43: 568-570 (2004).
46. Siegel D., Mc Guinness, Winski S.M, Ross D, “Genotyping phenotype relationships in studies of a polymorfism in NAD(P): quinone oxidoreductase1”, *Pharmacogenetics*, 9: 113-121 (1999).
47. Smith T.M, McHale MC, Wiemels J.L, Zhang L., Wiencke J.K., Zhang S., Gunn L., Skibola C.F, Buffer A.P, “Molecular Biomarkers for The Study of Childhood Leukemia”, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 206: 237-245 (2005).
48. Smith M.T., Wang Y., Skiloba C.F., Slater D.J, Nigro L.L, Nowell P.C, Lange B.J., Felix A.C, “Low NAD(P)H: quinone oxidoreductase activity is associated with increased risk of leukemia with Mll translocations in infants and children”, *Blood*, 100(13): 4590-4593 (2002).
49. Smith MT., Wang Y., Kane E., Rollinson S., Wiemels J.L, roman E., Rodam P., Cartwright R., Morgan G., “Low NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1

activity is associated with increased risk of acute leukemia in adults”, *Blood*, 97(5), 1422-1426 (2001).

50. Traver R.D, Siegel D., Beall H.D, Phillips R.M, Gibson N.W, Franklin W.A, Ross D., “Characterization of a polymorphism in NAD(P): quinone oxidoreductase”, *Br. J. Cancer*, 75: 69-75 (1997).
51. Ulutin T., “İnsan Genom Projesi”, *Türk Hematoloji Derneği Temel Moleküler Hematoloji Kursu*, Mersin, 70-72 (2005).
52. Vineis S, Relationship between polymorphism of xenobiotic metabolizing enzymes and susceptibility to cancer, *Toxicology*, 24: 457-462 (2002)
53. Weber W.W,” Pharmacogenetics”, *Oxford University Pres*, London, 3-18 (1997).
54. Wiemels J.L. ve ark., “A Lack of a functional NAD(P)H: quinone oxidoreductase allele is selectively associated with pediatric leukemias that have MLL fusions”, *Cancer Research*, 59: 4095-4099 (1999).
55. Yakıcıer C., “Lösemilerin Moleküler Genetiği”, *Türk Hematoloji Derneği Temel Moleküler Hematoloji Kursu*, Mersin, 443-45 (2005).
56. Yakut T., Gülten T., “Çocuklukçağı Lösemilerindeki Genetik Değişiklikler ve Klinik Önemi”, *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 31(1),57-62 (2005).
57. Yu X., Kensler T., “Nrf-2 as a target for chemoprevention”, *Mutation Research*, 591: 92-102 (2005).

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : KULAK, Derya Deniz
Uyruğu : T. C
Doğum tarihi ve yeri : 20.06.1981 Ankara
Medeni hali : Bekar
Telefon : 0 532 705 85 03
e-mail : kulakdeniz@yahoo.com

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Lisans	Gazi Üniversitesi/ Biyoloji Bölümü	2003
Lise	Çankaya Lisesi	1999

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2004-.....	Centrum Clinic Özel Ankara Tüpbebek Merkezi	Biyolog

Yabancı Dil

İngilizce

Hobiler

Yüzme, müzik