T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER TIP ANABİLİM DALI

Tez danışmanı:
Prof.Dr.Turgay İsbir

AKCİĞER KANSERLİ VAKALARDA FAZ I VE FAZ II ENZİMLERİNDEN SİTOKROM p450 1A1 GEN POLİMORFİZMİNİN ve GLUTATYON S-TRANSFERAZ ENZİMİNİN DÜZEYİ ve GEN POLİMORFİZMİNİN SAPTANMASI

DOKTORA TEZİ

Uzm.Dr. Oğuz Öztürk

91669

İstanbul-2000

Bu çalışma İ.Ü. Araştırma Fonun'ca desteklenmiştir. Proje No: T-556/240698

Doktora çalışmam boyunca desteğini ve ilgisini esigemeyen sayın hocam Prof.Dr.Turgay İsbir'e, mesai arkadaşlarıma ve aileme sonsuz teşekkürler...

İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ ve AMAÇ, (1-3)

2. GENEL BİLGİLER (4-14)

2.1. AKCİĞER KANSERİNİN EPİDEMİYOLOJİSİ

2.2. SİGARANIN AKCİĞER KANSERİNDEKİ YERİ

2.3. KARSİNOJEN METABOLİZMASI

2.3.1- CYP1A1 (ARİL HİDROKARBON HİDROKSİLAZ ENZİMİ VEYA SİTOKROM P1-450) ENZİMİ ÖZELLİKLERİ VE KLİNİK ÖNEMİ

2.3.2- GLUTATYON S-TRANSFERAZ ENZİMİ MOLEKÜLER ÖZELLİKLERİ VE KLİNİK ÖNEMİ

3. MATERYAL METOD (15-31)

3.1. SEÇİLEN ÖRNEKLERİN TANIMI

3.2. KULLANILAN KİMYASAL MADDELER

3.3. KULLANILAN GEREÇLER

3.4. ÇÖZELTİLER

3.4.1. DNA İZOLASYONUNDA KULLANILAN ÇÖZELTİLER:

3.4.2. AGAROZ JEL ELEKTROFOREZİ'NDE KULLANILAN ÇÖZELTİLER

3.4.3 LOWRY YÖNTEMI ILE PROTEIN TAYININDE KULLANILAN ÇÖZELTILER

3.4.4 GST ve TAYİNİ İÇİN KULLANILAN ÇÖZELTİLER

3.5. KULLANILAN YÖNTEMLER

3.5.1. PERİFERİK KANDAN DNA İZOLASYONU

3.5.2. DNA SAFLIK TAYİNİ

3.5.3. DNA KONSANTRASYONUNUN HESAPLANMASI

3.5.4. PCR YÖNTEMİYLE DNA'DA GST GEN BÖLGESİNİN ÇOĞALTILMASI

3.5.5. PCR YÖNTEMİYLE DNA'DA CYP1A1 GEN BÖLGESİNİN ÇOĞALTILMASI

3.5.6. PCR ÜRÜNLERİNİN AGAROZ JEL ELEKTROFOREZİ İLE DEĞERLENDİRİLMESİ

3.5.7. AMPLİFİKASYON ÜRÜNLERİNDE CYP1A1 GEN EKZON 7-İLE/VAL POLİMORFİZMİNİN NCOI ENZİM KESİMİ İLETESPİTİ

3.6. GST ENZİMİ KİNETİK ÇALIŞMASI İÇİN AKCİĞER DOKUSUNDAN SİTOZOLİK FRAKSİYONUN ELDE EDİLMESİ

3.6.1. GST AKTİVİTESİNİN SAPTANMASI

3.6.2. OPTİMAL GST AKTİVİTESİNİN SAPTANMASI

3.6.3. GLUTATYON VE 1-KLORO-2,4-DİNİTRO BENZEN (CDNB) KONSANTRASYON DEĞİŞİMLERİNİN AKTİVİTE ÜZERİNE ETKİLERİ

3.6.4. ISI VE PH DEĞİŞİMLERİNİN VE AKTİVİTE ÜZERİNE ETKİLERİ

3.6.5. GLUTATYON S-TRANSFERAZ ENZİMİNİN SAKLANMA KOŞULLARININ SAPTANMASI

3.7. LOWRY YÖNTEMİ İLE PROTEİN TAYİNİ

3.8. SONUÇLARIN DEĞERLENDİRİLMESİ

4. BULGULAR (32-53)

4.1. GLUTATYON S-TRANSFERAZ ENZİMİNİN KİNETİK ÖZELLİKLERİNİN GÖSTERİLMESİ

4.1.1 DOKU HOMOJENATLARININ HAZIRLANMASI

4.1.2 DEĞİŞEN SUBSTRAT DÜZEYLERİYLE GLUTATYON S-TRANSFERAZ ENZİMİNİN KİNETİK ÖZELLİKLERİ

4.1.3 DEĞİŞEN ISI DÜZEYLERİYLE GLUTATYON S-TRANSFERAZ ENZİMİNİN KİNETİK ÖZELLİKLERİ

4.1.4 DEĞİŞEN PH DEĞİŞİMLERİNİN GLUTATYON S-TRANSFERAZ ENZİMİNİN KİNETİK ÖZELLİKLERİ

4.1.5 SAKLAMA KOŞULLARININ GLUTATYON S-TRANSFERAZ ENZİMİNİN AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİ

4.2. GLUTATYON S-TRANSFERAZ ENZİMİNİN PLAZMA DÜZEYLERİNİN GÖSTERİLMESİ

4.3. Glutatyon S-Transferaz Enziminin ve CYP 1A1 (Ekzon7 İzolösine-Valin değişimi) Gen Polimorfizmlerinin Gösterilmesi

5. Tartışma ve Sonuç (54-63)

6. Özet (64)

7. Summary (65)

8. Kaynaklar (66-74)

9. Özgeçmiş (75)

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Sigara içimi ile meydana gelen veya çevresel kirlilikle vücuda giren benzopirenler ve benzeri kimyasal kanserojenler çeşitli etkileşimler sonrasında bir seri oksidasyon ve konjugasyon reaksiyonları ile detoksifiye edilmekte veya yeni aktif kanserojenlere dönüştürülmektedir. (57). Genetik çeşitlilik sebebiyle aktiviteleri artan Faz I sitokrom P450 1A1 (CYP1A1) enzimleri veya aktiviteleri azalmış Faz II Glutatyon S-transferaz enzimleri ile kanser riski artışı arasında paralellik olableceği çeşitli araştırmalarla ortaya konulmuştur(1). Glutatyon S-transferazl (GST) çok sayıda ksenobiotik, sitotoksik ajanların ve kanserojenin metabolizmasından sorumlu bir enzim ailesi içerisinde yer almaktadır. Bu enzim geniş bir yelpazede yer alan organik bileşiklerin glutatyon ile reaksiyona girmesi ve tiyoester oluşturması yanında detoksifikasyonun ilk kademelerinde yer alarak merkaptoürik asit oluşumundan sorumludur(20). Bu özelliğinin yanında hem halkası, bilurubin, polisiklik hidrokarbonlar, bazı kemoterapötikler ve deksametazon gibi hidrofobik bileşiklere bağlanabilme özelliğine sahip olduğu gösterilmiştir(79).

Harada ve arkadaşları tarafından 168 karaciğer doku örnekleri üzerinde yaptıkları çalışmada GST1'in "null" genotipinde (genin komplet yokluğu) hepatit ve hepatomanın kontrolden fazla olduğu gösterilmiştir (30). Bu bulgu Board'ın null genotipi taşıyanların bazı elektrofilik kanserojenlerden daha yüksek derecede etkilenebileceği görüşünü desteklemektedir(9).

Bu görüşün ışığı altında yapılan çalışmalarda GST null genotipi olanların bazı tip kanserojenlere karşı duyarlılığının arttığı gözlenmiştir. Bir çok

araştırmacı tarafından akciğer kanserine yatkınlık ile null genotipi arasında ilişki olabileceği görüşünü ileri sürülmüşlerdir (28, 37, 38, 63, 64). Benzer ilişkiler kolorektal kanserler ve skuamoz hücreli kanserler içinde geçerlidir(95). Bu konuda yapılan vaka-kontrol çalışmalarında kanserle ilişki var olduğu gösterilirken(28,37, 38,43, 63,64) bir çok çalışmada ise kanserle ilişki kurulamamıştır(12,19, 39, 45, 54, 65). Bu konuda yapılan araştırmalar mu sınıf Glutatyon S-transferaz (GSTM1) beyazlarda, Çinlilerde ve Hintlilerde %40-50 oranında null genotipi taşıdıkları görüşünü desteklemektedir. Siyah ırkta ise ise GSTT1 null genotipinin daha yüksek oranda olduğu saptanmıştır(84).

CYP1A1 (Aril Hidrokarbon Hidroksilaz Enzimi veya Sitokrom P1-450) 15. kromozomda yer almaktadır ve P-450 grupları içersinde en fazla hidrokarbonlarla indüklenebilen enzim aktivitesine sahip olduğu gösterilmiştir(18). CYP1A1 enziminin 7. eksonunda bir amino asit değişimine (izolösinden valine değişim) bağlı olarak enzimin aktivitesi artmakta ve dolayısıyla faz I reaksiyon hızlanmaktadır. Bu olayın sonucuna bağlı olarak polisiklik aromatik hidrokarbonların (PAH) metabolizmasında artış gözlenmektedir. Ayrıca GST mu null genotipi taşıyan bireylerde kanser riskinin artabileceği görüşü ileri sürülmüştür(1). Bu yüksek indüklenebilme kabiliyeti(homozigot mutant olanlar) popülasyonun yaklaşık %10'unda mevcuttur (48). Petersen (73) ve Kawajiri (43)90'lı yılların başında bu polimorfizmle birlikte skuamöz hücreli akciğer kanseri riskinin arttığını göstermişlerdir. Özellikle az sigara içen ve riskli genotipi taşıyanlarda taşımayanlardan yedi kat daha fazla kanser olma ihtimali varken yoğun sigara içicilerde ise kanser ihtimali riskli grupta sadece iki kattan daha az artmaktadır.

Perera (70), Japon sigara içenlerde yaptığı çalışmada riskli genotipe sahip olanlarda p53 mutasyonunun istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığını göstermiştir. Bazı çalışmalarda ise bu polimorfizm ile kanser arasında ilişki kurulamamıştır. Bu polimorfizme beyaz ırkta daha az rastlanırken(1,22,34,82) Uzakdoğuda, Güney Amerikada, Amerikan zencilerinde, Hawaii'de yüksek olarak rastlandığı bildirilmiştir(1,22, 31, 36, 51,71, 75).

Yukarda özetlenen bilgiler ışığı altında çalışmamızın ilk kısmında insan normal ve kanserli akciğer dokusunun GST aktivitesi açısından değişen glutatyon(GSH) , 1-kloro-2,4-dinitro benzen (CDNB) substrat konsantrasyonları karşısında Michellis-Menten kinetiğine ait parametrelerin gösterilmesi düşünülmüştür. Bu kinetik parameterlerin tamamlayıcısı olarak değişen ısı ve pH düzeylerinde kinetik davranışlar araştırılmıştır. Ayrıca çalışmanın bu kısmında enzimin değişik ortamlardaki dayanıklılığı araştırılmıştır.

Çalışmamızın ikinci kısmında ise akciğer kanserli vakalar ve Türk toplumunun CYP 1A1 ve GST mu enzimleri gen polimorfizmlerinin incelenmesi planlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. AKCİĞER KANSERİNİN EPİDEMİYOLOJİSİ

Tüm dünyada akciğer kanseri yılda 945.000 ölüme neden olmaktadır. Amerika dışındaki ülkelerde akciğer kanserinden ölümler erkeklerde daha sık iken Amerikada yıllık 170.000 dolayındaki yeni vakanın %47'sini, yaklaşık 160.000 ölümün ise %42'sini kadınlar oluşturmaktadır. 1987'den bu yana ise Amerikada akciğer kanserinden ölen kadınlardaki artış meme kanserinden ölen kadınlardan çoktur(89). Akciğer kanserleri klinik seyri sessiz olabilir ve göğüs veya metastatik hastalığın şikayet ve bulguları ile ortaya çıkabilir. Bu sebepten dolayı bir çok kez hastalarda tanı geç olarak konulabilmektedir. Diğer yandan hastalığın evresi prognoz ve tedavi yöntemleri açısından farklılıklar gözettiği için öncelikle erken tanı çok önemlidir. Örneğin erken dönem küçük hücreli dışı akciğer kanserleri en iyi cerrahi tedaviden fayda görürür iken geç evrelerde kemoterapi ve/ veya radyoterapi ile tedavi edilebilmektedir. Tabii bunun yanında hasta geç döneme kaldığı için cerrahi tedavi ile "şifa" şanşını çok aza indirmektedir.

Özellikle erken tanı ve cerrahi tekniklerdeki gelişmeler ile geçtiğimiz 40 yıl içinde kısa dönem yaşam beklentisinde artış görülmektedir. Tüm evreler dahil edildiğinde bir yıllık yaşam beklentisi 1973'te %32 iken 1994'te %41'lere ulaşmış olmasına rağmen beş yıllık yaşam beklentisi %14'te kalmaktadır.

Sadece %15 vaka da tümör henüz lokalize iken tanı konabilmektedir ve beş yıllık yaşam beklentisi %49 olarak saptanmıştır(89).

Akciğer kanserleri genel olarak "Küçük hücreli akciğer kanseri" ve "küçük hücreli dışı akciğer kanserleri" olmak üzere iki grupta incelenirler. Bu ayrımda en önemli faktör orijin alınan hücrelerin farklılığıdır. Küçük hücreli akciğer kanserleri nöroektoderm orijinli iken diğerleri epiderm ve endodermden orijin alırlar. Ayrıca tedavi yaklaşımlarıda farklılık gösterir, örneğin küçük hücreli bir akciğer kanseri daha sıklıkla orta hatta yerleşirken hızla yayılır ve sıklıkla cerrahi sınır dışında tanı konur fakat bunun yanında aynı zamanda kemoterapiye daha duyarlıdır. Diğer grupta ise cerrahi tedavi neredeyse tek şanstır.

Çalışmamıza "küçük hücreli dışı akciğer kanserleri" olan vakalar dahil edilmişlerdir. "Küçük hücreli dışı" ismi altında epidermoid veya skuamöz, adenokarsinom, büyük hücreli ve bunların mikst tipleri olmak üzere üç ana değişik histolojik tipte kanser toplanmıştır. Bu grubun ortak özelliği, cerrahi tedavi ile şifa şansına sahip iken sistemik kemoterapi ve radyoterapiden ancak ileri vakalarda palyatif tedavi açısından faydalanılmasıdır.

2.2. SİGARANIN AKCİĞER KANSERİNDEKİ YERİ

Sigara kullanımı bir çok hastalığa neden olmasına rağmen vucutta en çok hasara yol açtığı organ akciğerdir ve ilk akla gelen hastalık ise akciğer kanseridir. 1970'lere kadar akciğer kanseleri içinde en sık rastalanan skuamöz hücreli kanser idi. O dönemlerde yüksek katranlı sigara yoğun olarak tüketilmekte ve katranın en çok depolandığı bölgeler olan trakea veya büyük bronşlarda en sık rastlanmaktaydı. Günümüzde ise akciğerin daha uç

bölgelerine kadar inhale edilebilen orta ve düşük katranlı sigaraların tüketiminde artma ile adenokarsinomalarda artış gözlenmektedir (51,89). Bu iş için tütün bitkisinin yaprağı yerine karışımda gövde ve yaprak damarları oranı arttırılarak katran miktarı azlatılmış yani polisiklik aromatik hidrokarbonlar azaltımış olmaktadır. Yeni formülasyon sigara dumanında PAH'ları azaltırken nitrik oksit ve N-nitrosamnilerin artmasına sebep olmaktadır. Bunuda akciğer adenokarsinomalarının artmasına sebep olduğu düşünülmektedir(51).

1950 ve 1960'lardaki çalışmalarda uzun dönem sigara içenlerin %10'unda akciğer kanseri geliştiği gösterilmesine rağmen yakın zaman istatistiklerinde diğer ölüm sebepleri dışarda tutulduğunda uzun süre sigara içen erkeklerin %24'ünde akciğer kanseri geliştiği gösterilmiştir(25). Pasif olarak sigara dumanına maruz kalmanında akciğer kanserlerinden ölümü arttırdığı bilinmektedir. Diğer sebeplerden radon ve asbeste, mesleki olarak arsenik, krom, kadminyum ve kok kömürü fırınlarında dumana maruz kalmanında akciğer kanserine neden olduğu bilinmektedir ve sigara içimiyle riskin daha da arttığı gösterilmiştir(89).

Akciğer kanserinden korunmanın en iyi yolu var olan sebeplerden uzak durmaktır. Bu sebeplerin içinde en önemlisi ve üzerinde en çok çalışılanı tütün ve mamülleridir. Geç dönemlerde sigara içimini bırakmak akciğer kanseri riskini çok azaltmamaktayken, en doğrusu mümkün olan en erken dönemde sigarayı bırakmak ve dahada önemlisi hiç kullanmamaktır. Diğer yandan bir çok genetik farklılığın sigara kullanımı eşliğinde akciğer kanserini arttırabildiği gösterilmiştir. Glutatyon S-transferaz (GST) gen polimorfizmi sitokrom p450 1A1 gen polimorfizmi, bir takım tümör süpresör genler üzerinde meydana gelen

mutasyonların varlığı ve bir çok genetik özelliğinde akciğer kanserine yatkınlığa sebep olduğu ileri sürülmüştür. Bu genetik çalışmaların temeli toplumda genetik yatkınlığa sahip bireylerin belirlenmesi ve bu kişilerin risk faktörlerinden uzak tutulmaya çalışılması olacaktır.

2.3. KARSİNOJEN METABOLİZMASI

Bir çok lipofilik karsinojen detoksifiye edilmek ve ekskrete edilmek amacıyla polar konjugasyon ile metabolize edilirler. Bu lipofilik maddelerin eliminasyonun en önemli adımı sitokrom p450 (EC1.14.14.1) bağımlı oksidasyondur. P450 ailesi 30'un üzerinde izoenzimden oluşur. Bu enzimler genellikle farklı substratlara karşı spesifite gösterirler(92). Ksenobiotiklerin metabolizması genellikle faz I ve faz II olmak üzere ikiye ayrılır. Faz I metabolizma genellikle sitokrom P450 sistemiyle yapılırken nadiren flavin karışık oksidayon ile olur, bazen okside ürün ileri faz I reaksiyonlara girer (örneğin nitroredüksiyon veya epoksid hidrolizi). Faz I reaksiyonlar oksidasyon, redüksiyon ve hidroliz reaksiyonlarını içermektedir. Bunların içinden oksidasyon diğerlerine oranla daha önemli bir rol oynamaktadır. Genelde karsinojenlerin elektrofilik maddelere döngüsünde en az bir adım oksidasyon (Faz I) vardır. Bu sayede daha toksik özelliklede genotoksik bir ara ürün oluşur (örneğin polisiklik aromatik hidrokarbon diol epoksidleri). Bunun yanında bazı faz II reaksiyonlarıda genotoksik elektrofillerin oluşumu için kritik rol oynayabilirler. Sulfasyon özellikle zayıf elektrofilik aril hidoksilaminlerin ve benzalkollerin aktivasyonunda bilinen bir aktivasyon adımıdır. Bunun yanında açilasyon ve glukuronidasyon ve nadiren GSH konjugasyonuda aktivasyona

sebep olabilir. Özetle yeterli veya doğru detoksifikasyonun yapılamadığı hücrelerde tamir edilemeyen DNA hasarları ortaya çıkabilir(20).

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

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

CYP1A1 (Aril Hidrokarbon Hidroksilaz Enzimi veya Sitokrom P1-450) 15. kromozomda yer almaktadır. P-450 formları içinde en fazla hidrokarbonlarla indüklenebilen enzim aktivitesine sahiptir (18,20). Tetraklorodibenzo-p-dioksin (TCDD) sitokrom p450 dahil olmak üzere bir çok enzim ve proteinin kuvvetli bir indükleyicisidir. TCDD ile indüklenen sitokrom p1-450 ise "aril hidrokarbon hidroksilaz" ile aynı enzimdir. Nebert ve Gonzales 1987 yılında TCDD ile indüklenen p-450 gen ailesinin fenobarbütal ile indüklenen p 450 gen ailesinden evrimsel anlamda 750 milyon yıl önce ayrıldığını ileri sürmüşlerdir. Brookes ve Lawley(13) 1964 yılında PAH'ların DNA'ya bağlanmaları ile kanser ilişkisi göstermişlerdir. Jaiswal 1985 yılında hızlı ve yavaş indükleyen polimorfik varyantlarının olduğu ve çevre kirliliğine maruz kala kişilerde muhtemel riski belirleyebileceğini ileri sürmüştür. Kouri (49) 1982 yılında toplumda yaklaşık olarak %10 dolayında bulunan yüksekleyicilerin sigara içimi ile ortaya çıkabilecek akciğer kanser riskinin daha yüksek olacağını ileri sürmüştür. Daha sonra AHH enziminin hızlı indükleyicilerinin akciğer kanseri riskinin arttığı

çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir(3,41,73). Ayrıca kronik obstrüktif akciğer hastalığı ve PAH metabolizmasının ilişkili olduğu(87), aterosklerotik damar hasarında da PAH-DNA hasarının rolü olduğu gösterilmiştir(94). CYP1A1 enziminin 7. Eksonunda bir amino asit değişimi ile (izolösinden valine değişim)(31) enzimin aktivitesinde artma ve dolayısıyla faz I reaksiyon hızlanması ve bunun sonucunda Polisiklik aromatik hidrokarbonların metabolizmasının artmasına ve GST null fenotipi taşıyanlarda özellikle kanser riskinin artmasına sebep olduğu bildirilmektedir (1). Sigara içiminin akciğer dokusundaki detoksifikayon enzimleri üzerinde uzun süreli etkileri araştırıldığında bir çok enzimin yanında epoksid hidrolaz ve aril hidrokarbon hidroksilaz (AHH) enzimini sigara içenlerde yüksek olduğu yaklaşık 60 günde yüksek seyrettiği gösterilmiştir. Bunun yanında aynı çalışmada GST aktivitesinin sigara içenlerede düşük olduğu sigaranın bırakılmasından sonra artmaya başladığı gösterilmiştir. Bu AHH enzimi ile ortaya çıkan oksidasyon ürünlerinin konjugasyonunda GST'nin tüketildiğini düşündürmektedir(74).

Petersen(73) ve Kawajiri(43) 90'lı yılların başında bu polimorfizmi tarif etmişler sonrasındada çeşitli araştırmacılarla birlikte artan skuamöz hücreli akciğer kanseri riskinin arttığını göstermişlerdir(76). Bu özellikle az sigara içen ve riskli genotipi taşıyanlarda taşımayanlardan 7 kat daha fazla kanser olma ihtimali varken yoğun sigara içicilerde kanser ihtimali riskli grupta sadece 2 kattan daha az artmaktadır. Perera, Japon sigara içenlerde yaptığı çalışmada riskli genotipe sahip olanlarda p53 mutasyonunun istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığını göstermiştir (70).

2.3.2- GLUTATYON S-TRANSFERAZ ENZİMİ MOLEKÜLER ÖZELLİKLERİ VE KLİNİK ÖNEMİ

Glutatyon S-Transferazlar (GST; EC2.5.1.18), yine aynı adla anılan bir gen süper ailesinin ürünleridir.Bu dimerik proteinler glutatyon ile çeşitli ksenobiotik ve reaktif metabolitlerinin konjugasyonunu katalizler. Aminoasit dizi benzerliği ve antikorlara çapraz cevap oluşturabilirliğine göre alfa, mu, pi, GST olmak üzere üç sınıf alt üniteden meydana gelmektedir. Ayrıca yapısal olarak farklı fakat glutatyon transferinde rol oynayan diğer GST'ler tarif edilmiştir (GST teta- mikrozomal GST)(79).

GST süper ailesi en az beş gen ve gen ailelerinden oluşmaktadır. H(a) veya A genleri alfa sınıfı alt üniteleri, H(b) veya B genleride mu sınıfı alt üniteleri oluşturmaktadır. Yine pi sınıfı, teta sınıfı ve bir tanede mikrozomal GST için olmak üzere ayrıca muhtemel üç tane daha gen vardır(79). Lisney ve arkadaşları 1983 yılında daha sonraları ismi GST pi olarak değişecek GST 3'ü 11. kromozomun q13-q22 bölgelerinde haritalandırmıştır. Chow ve arkadaşları 1988 yılında alfa sınıfı geni 6. kromozomun p12 bölgesinde haritalamışlardır ve insan genomunda aynı lokalizasyonda bir çok kopya halinde bulunduğu gösterilmiştir. Pearson ve arkadaşları (66) 1993 yılında mu sınıfı geni 1. kromozomda p13'te haritalamışlardır.

Scott ve Wright (83) 1980'de eritrosit GST'sinin elektroforetik çalışmalarında homojen bir yürüme görürlerken kişiler arasında 6 kata kadar varan miktar değişiklikleri saptamışlardır . Başlangıçta bir genetik belirleyici olarak düşünülmezken 1981'de Board (9) karaciğerin en aktif olan iki GST enziminin iki ayrı otozomal lokus ürünü olduğunu (GST1=GST μ ve GST2=

GST α) ve polimorfizim gösterdiklerini bildirmiştir. Strange ve arkadaşları (88) 1984 yılında GST1'in karaciğer, böbrek, adrenal bez ve midede kolayca gösterilebilen polimorfizmi olduğunu ayrıca iskelet kası ve kalp kasında zayıf bir ekspresyonunun olduğu fakat fetal karaciğer, fibroblast, eritrositler, lenfosit ve trombositlerde bulunmadığını göstermişlerdir. GST2 fetal karaciğer hariç diğer 4 organda gösterilememiş (88). GST3 (GST pi) ise erişkin karaciğer hariç hemen tüm dokularda ve eritrositlerde gösterilmiştir. İzoenzimlerin dağılımı dokudan dokuya büyük farklılıklar göstermektedir(88).

Kimyasal kanserojenlerin elektrofilik metabolitlerinin DNA gibi makromoleküllere kovalent olarak bağlanmalarının önemi 1960'lı yıllarda anlaşıldıktan sonra makromoleküller yerine alternatif elektrofilik bölge sunarak DNA üzerinde genotoksik etkileri engelleyecek maddeler araştırılmaya başlanmıştır. Glutatyon (GSH) bu maddelerden biridir ve 1969 yılında Boyland ve Chasseaud (10) tarafından tanımlanmıştır. Bunun yanında GSH ile elektrofilik maddelerin bağlanmalarının GST ile adlandırdıkları bir enzim tarafından yapıldığını tarif etmişlerdir(10).

Genotoksik elektrofillerin GSH ile spontan detoksifikasyonu zayıf olduğu için GSH konjugasyonunu katalizleyen GST'ler çok önem kazanmaktadır ve etkili bir detoksifikasyon yapabilmektedir. Bunun yanında metabolizma açısından bakılınca tüm elektrofilik ürünler gözönüne alındığında tek başına yeterli olamasıda mümkün değildir. Spontan konjugasyon için tiol konsantrasyonu ve pH önemlidir. Oysa enzimatik reaksiyonda GSH için Km 0.1 mM dolaylarındadır hatta değişik elektrofilik maddelerle değişen,

muhtemelende enzimdeki konformasyonel değişikliğe bağlı olan düşük Km değerleri gözlenmiştir(20).

GST çok sayıda ksenobiotik, sitotoksik ajanların ve kanserojenin metabolizmasından sorumlu bir enzim ailesidir. Bu enzim geniş bir yelpazede yer alan organik bileşiklerle glutatyonun reaksiyona girmesi ve tiyoester oluşturmasını bazen de detoksifikasyonun ilk adımında yer alarak merkaptoürik asit oluşumunu katalizler(79). Ayrıca çeşitli derecelerde hem halkası, bilurubin, polisiklik hidrokarbonlar ve deksametazon gibi hidrofobik bileşiklere bağlanabilmektedir. Hücrede lipid peroksidasyon ve serbest radikal olşumu ile ortaya çıkan propenallerin ve doymamış aldehid ürünlerinin detoksifikayonunda GST'lerin rol oynadıkları gösterilmiştir (8). Diğer yandan GST izoenzimlerinin bronşial epitelden salgılandıkları gösterilmiş bununda ekstrasellüler toksinlerden epitelin korunmasında rolü olabileceği bildirilmiştir(53). İnsan alveolar yıkantı sıvısındada GST pi varlığı gösterilmiştir(15). Enzimin aktif bölgesi iki bağlanma bölgesi içermektedir. G-bölgesi glutatyon bağlayan, H-bölgesi substrat bağlayan bölgedir (79).

Bir takım tümör tiplerinde artmış olarak saptanan GST enzim düzeylerinin kanser hücrelerinin kemoterapötiklere karşı direnç mekanizmalarından biri olduğu düşünülmüştür (4,7,9,33). GST-π transfeksiyon çalışmalarında adriamisin-rezistan meme cancer hücrelerinin (Adr^{R}MCF-7) eksperese etmedikleri GST-π enzimini 15 kat daha fazla ürettikleri ve bu hücrelerin diğerlerinden daha fazla (1.4 - 4.1 kat) benz(a)pirenler ve metabolitlerine dirençli oldukları bunun yanında doksorubisin, melfelan ve Cisplatin gibi kemoterapötiklere direnç artışı gösterilmemiştir. Bunun yanında

bazı çalışmalarda ise spesifik GST'lerin bazılarının fazla eksprese edilmesi kanser tedavisinde kullanılan alkilleyici ilaçlara direnç geliştirilmesinde önemli olduğu gösterilmiştir. Henüz daha fazla çalışmaya ihtiyaç duymasına rağmen belkide kemoterapiye dirençli bazı kanser türlerinde spesifik GST inhibisyonun gerekliliğinden de bahsetmek gerekecektir(79).

Ayrıca bazı hastalıklarda da GST tedavide hedef enzim olacaktır. Örneğin astım hastalığında Lökotrienlerin (LT) yeri çok önemlidir. Bunların kilit molekülü ise LTC4 tür daha sonra LTD4, bir molekül L-glutamatın , γ–glutamil transpeptidaz ile uzaklaştırılması ile oluşur. Araşidonik asitten LTC4 oluşumunu sağlayan , LTC4 sentaz enzimi bir çeşit GST'dir. Bu enzimin inhibisyonu sonuç olarak astım patofizyolojisinde kilit moleküllerden biri olan LTD4 üretilemiyecektir(79).

GST'lerin aktif bölgelerinin yapısı ve fonksiyonları hakkında ayrıntılı bilgi yoktur. Ancak aktif bölgenin dimerik bir protein olan enzim üzerinde lokalizasyonu ile ilgili iki model tarif edilmiştir: 1) Aktif bölge iki alt birimin katkılarıyla olusur. 2) Her iki alt birim birbirinden bağımsız aktif bölgelere sahipitir. Kinetik ve bağlanma deneyleri her GST altbiriminin birbirinden yapısal ve işlevsel olarak bağımsız birer aktif bölgeye sahip olduğunu göstermektedir(23). Her aktif bölge glutatyon bağlayan (G bölgesi) ve hemen onun yanında kısmen hidrofobik, elektrofilik substratın bağlandığı (H bölgesi) iki farklı bölgeden oluştuğu düşünülmektedir(79).

GSH'ın bağlanmasında iyonik bağlar rol onamaktadır. Burada GSH'ın karboksil gruplarıyla etkileşen arginin rezidüleri gösterilmiştir(23). Bu enzimin iki altbiriminin kooperatif etkileşmesinin bulunmadığıda gösterilmiştir.

Katalitik mekanizma için önemli bir aşama olan GSH'ın tiyol grubunun aktivasyonu muhtemelen bir baz yardımıyla sülfidril grubunun deprotene olmasıyla sağlanmaktadır. Elektrofilik substratın ise aktivasyonu ise daha karışıktır.

3. MATERYAL METOD

3.1. SEÇİLEN ÖRNEKLERİN TANIMI

Bu çalışmada iki örnek grubu kullanılmıştır. Birinci grupta bilinen kanser tanısı olmayan ve aile hikayesinde kanser hastalığı rastlanmayan sağlıklı bireyler kontrol grubu olarak tanımlanmışlardır. İkinci grup ise "küçük hücreli dışı akciğer kanseri" tanısı almış ve cerrahi tedavi uygulanan hastalardan oluşmaktadır. Histopatolojik incelemesinde küçük hücreli histopatolojik tip saptanan ve karışık hücreli veya nöroendokrin diferansiyasyon gösteren küçük hücreli dışı tümörler çalışmamıza dahil edilmemişlerdir.

Akciğer kanserli bireylere ait örnekler Yedikule, Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Süreyyapaşa, Siyami Ersek ve Marmara Tıp Fakültesi Göğüs Cerrahisi Bilim Dallarında takip edilen hastalardan temin edilmişlerdir. Hastaların klinik parametrelerine göre yapılan ayırımlarla kanser evrelendirilmeleri, kan örneklerinin sağlandığı klinikler tarafından yapılarak, bu analize göre hastalar çalışma grubuna alınmıştır. Buna göre, akciğer grafisinde kitle tespiti yapılmış ve biyopsilerinde küçük hücreli dışı akciğer kanseri tespit edilen hastalara ait örnekler araştırmada kullanılmıştır. Diğer taraftan herhangi bir organ kanserine ait hikaye ve klinik bulgusu olmayan akciğer grafisi temiz çıkan ve ailede bilinen bir kanser hastalığı olmayan bireyler kontrol grubuna alınmıştır. Hastaların alınan hikayelerinde sigara, alkol ve çeşitli ilaç alışkanlıkları, beslenme ve sosyoekonomik düzeyleri de ayrıntılı olarak incelemeye alınmasına özen gösterilmiştir.

Glutatyon S-transferaz enziminin normal ve akciğer kanserli dokulardaki kinetik özelliklerine ait değişkenliklerini incelemek üzere alınan doku örnekleri kuru buz içinde laboratuvara getirilerek çalışmaya alınmıştır.

Glutatyon S-transferaz ve CYP 1A1 gen polimorfizmleri için kan örnekleri steril EDTA'lı tüplere alınarak, DNA izolasyonu için, en geç bir gün içinde çalışılmak üzere oda ısısında saklanmıştır.

3.2. KULLANILAN KİMYASAL MADDELER

Agaroz (Promega MBG) , Amonyum asetat (Sigma A-8920), Amonyum klorid (Sigma A-5666), Asetik asit (MECK K-04134156), Borik asit (Sigma B-6768), Hidroklorik asit (% 37 Merck K-13190114), Brom fenol blue (Sigma B-6896), dNTP seti (MBI Fermentas), EDTA (dihidrat) (Merck K-90602121), Etanol (%99 Tekel), Etidium bromid (Sigma E-8751), Hidrojen peroksit (%35 Merk K-22035097), Mineral yağ (Sigma M-5904), Potasyum bikarbonat (Merck K-126223552), Sodium doedocyl (lauryl) sulfate (Sigma L-5750), Sodyum hidroksit (Merck C754962), Kalium dihidrogen phosphat (A 741071 Merck), Sodyum klorid (Carlo Erba 368257), Trizma base (Sigma T-1503), Taq polimerase (Promega), Metaphor agaroz (FMC 50182), Agaroz (Sigma A 9414) Xylene cyanol (Sigma X-4126), Ficoll 400 (Sigma F-9378), Sodium Klorür (Carlo Erba 368257), Trizma Baz (Sigma T 1503), DNA marker (100 bp DNA ladder, PUC 19/Msp 1), DNA marker (PBR 322 Msp I, Biolabs 303-2S), Proteinaz K (Stratagene 300-141), Sodyum karbonat (Sigma S 7795), Bakır sülfat Potasyum sodyum tartarat (Sigma P 0165), Folin-Ciocalteau (Sigma F 9252), Sığır serum albumini (Sigma p5304) Sodyum tungstat (Sigma S 0765),

Sodyum molibdat (Sigma S 6646), Lityum sülfat (Sigma L6375),Primerler (Promega); 1-kloro-2,4-dintrobenzen (CDNB) (Sigma c-6396), sükroz(S-5016), Di sodyum hidrojen fosfat (Carlo Erba 480137), Sodyum dihidrojen fosfat (sigma s-9638)

GST gen bölgesi için kullanılan primer dizileri (21,95):

P1:5'CgCCATCTTgTgCTACATTgCCCg 3'

P2: 5' ATCTTCTCCTCTTCTgTCTC 3'

P3: 5' TTC TggATTgTAgCAgATCA 3'

CYP 1A1(ekzon 7 ,İle/Val)polimorfizmi için kullanılan primerler(86);

P1: 5'gAAAggCTgggTCCACCCTCT3'

P2: 5'CCAggAAgAgAAAgACCTCCCAgCgggCCA3'

3.3. KULLANILAN GEREÇLER

Elektroforez için güç kaynağı (E-C apparatus corp. 250-90 powersupplier), Hassas terazi (Shimadzu AX200), Polaroid kamera (DS34 Direct screen instant camera), Manyetik karıştırıcı (ısıtıcılı) (Elektromag), Mikrowave fırın (Philco), Mikrosantrifüj (Hereaus), PCR aleti (MJ Research, Techne), pH metre - (Hanna HI 9321), Pipet takımı (Eppendorff), Falkon santrifüj (Hereaus, Hettich universal 32R), Spektrofotometre (Shimadzu UV-1208, kinetik kartı) Thermomix spektro için dolaşımlı su banyosu, Su banyosu (Elektromag), UV transilluminator (Stratagene UV/White light Transilluminator), Vorteks (Nuve mix), Elektroforez Sistemi (E-C Midicell EC350 gel sys.) Sorvall S80 (ultra santrifüj), homojenizatör (Ultra Thorax Tp 18/2N).

3.4. ÇÖZELTİLER

3.4.1. DNA İZOLASYONUNDA KULLANILAN ÇÖZELTİLER:

1. Eritrosit Parçalama Tamponu (Lysis Buffer)

8.74 gram NH_4Cl, 1 gram $KHCO_3$, 200 ml EDTA (0.5 molarlık EDTA kullanılır.)'nın tartımları yapılarak Erlen içine alındı. 900 mililitre ddH_2O eklendi ve çözeltinin pH'sı 1 normal NaOH ile 7.4'e ayarlandı. Daha sonra balon joje içine alınarak 1 litreye tamamlandı. Çözelti ısıya dayanıklı cam şişelere aktarılarak 120°C'de 15 dakika otoklavlandı ve +4°C'de muhafaza edildi.

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

186.1 gram EDTA tartılarak beher içine alındı ve 800 ml ddH_2O eklendi. Manyetik karıştırıcı yardımıyla çözündürüldü ve pH'sı NaOH ile 8.0'e ayarlanarak ddH_2O ile 1 litreye tamamlandı. 120°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildi.

3. 4 Molar Sodium Chloride (NaCl)

233.6 gram NaCl tartılarak erlene alındı. Üzerine 800 mililitre ddH2O ilave edildi ve manyetik karıştırıcı yardımıyla iyice çözündürüldü. Bolon jojeye aktarılarak 1 litreye tamamlandı. 120°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildi.

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

25 mililitre 4 molar NaCl ve 50 mililitre 0,5 molar 50 mililitre EDTA direk balon jojeye konularak 1 litreye tamamlandı. 120°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildi. Oda ısısında saklandı.

5. 1 Molar Tris

121.1 gram Tris base tartılarak ve bir behere alındı. Üzerine 42 mikrolitre hidroklorik asit (HCL) ile yaklaşık 800 mililitre ddH_2O eklenerek manyetik karıştırıcı yardımıyla iyice çözündürüldü. Daha sonra balon jojeye aktarıldı ve 1 litreye tamamlandı. 120^{0}C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildi.

6. 9,5 Molar Amonyum asetat

73.22 gram amonyum asetat tartılarak beher içine alındı. Üzerine 80 mililitre ddH_2O eklenerek manyetik karıştırıcıda çözündürüldü. Balon jojeye aktarıldı ve ddH_2O ile 100 mililitreye tamamlandı. 0.22 mikronluk filtreden geçirilerek sterilize edildi ve $+4^{0}$C'de muhafaza edildi.

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

10 gr SDS tartıldı. SDS tozlarını kaldırmamaya dikkat ederek beher içine alındı ve üzerine 80 mililitre ddH2O eklendi. Manyetik karıştırıcı yardımı ile çözündürüldü ve pH'sı 7.2'ye ayarlandı. 0.22 mikronluk filtreden geçirilerek sterilize edildi ve oda ısısında muhafaza edildi.

8. Proteinaz K (20 mg/ml)

20 miligram proteinaz K tartılarak steril bir gode içinde steril ddH2O ile 1 militreye tamamlandı. -20 ^{o}C'de muhafaza edildi.

3.4.2. AGAROZ JEL ELEKTROFOREZİ'NDE KULLANILAN ÇÖZELTILER

1. Etidyum Bromür(10 mg/ml)

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

2. Agaroz Jel Yükleme Tamponu (5x)

20 gram Ficoll 400, 1 gram SDS, 0.2 mililitre 0.5 molarlık EDTA, 1 mililitre 1 molarlık Tris (pH 8.0), 200 miligram Brom fenol blue, 200 miligram Xylen cyanol

tartılarak steril ddH2O ile 100 mililitreye tamamlandı. Oda ısısında muhafaza edildi.

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

242 g Tris base tartılarak bir behere alındı. Üzerine 57,1 mililitre Glacial acetic acid ve100 ml 0,5 molarlık EDTA ve 800 mililitre ddH_2O ilave edilerek manyetik karıştırıcıda çözündürüldü. Balon jojeye aktarılarak 1 litreye tamamlan dı. 120^{0}C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildi ve oda ısısında muhafaza edildi.

5x Tris-Borik asit-EDTA (TBE)

54 gram Tris base ve 27,5 gram Boric acid tartılarak beher içine aktarıldı.Üzerine 20 mililitre 0.5 molarlık EDTA (pH'sı 8.0) ve 800 ml ddH_2O ilave edilerek manyetik karıştırıcıda çözündürüldü. Çözelti balon jojeye aktarılarak 1 litreye tamamlandı ve 120 ^oC'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildi. Oda ısısında bırakıldı.

3.4.3 LOWRY YÖNTEMI ILE PROTEIN TAYININDE KULLANILAN ÇÖZELTILER

A:0.1 N NaOH içinde %2 Na_2CO_3(4 gr NaOH+ 2 gr Na_2CO_3 100ml distile su içinde)

B:%1 sodyum potasyum tartarat içinde %0.05 $CuSO_4.5H_2O$

C:50ml (A) + 1 ml (B) (Hazırlandığı gün kullanılır)

D:1N Folin-Ciocelteau Fenol Ayıracı Sigma firmasından hazır olarak temin edildi.

3.4.4 GST ve TAYİNİ İÇİN KULLANILAN ÇÖZELTİLER

0.25 M Sükroz : 8.56 gr sükroz 100 ml distile suda çözüldü.

0.4 M Stok Na_2HPO_4. 12 H_2O= 35.8 gr madde 250 ml'de çözüldü.

0.4 M Stok $NaH_2PO_4.2H_2O$= 15.6 gr madde 250 ml içinde çözüldü.

40 mM Stok GSH= 81.04 mg GSH 10ml içinde çözüldü.

40 mM Stok CDNB= 122,9 mg CDNB 2.5 ml saf etanolde çözüldü.

3.5. KULLANILAN YÖNTEMLER

3.5.1. PERİFERİK KANDAN DNA İZOLASYONU

10 ml periferik kan örneği steril EDTA'lı tüplere alındıktan sonra çalışma için falkon tüpüne aktarıldı. Üzerine 1:3 oranında (30ml) eritrosit parçalama çözeltisi eklenerek karıştırıldı ve +4^{0}C'de 15 bekletildi. +4^{0}C'den çıkarılan örneklerin 1500 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek süpernatant kısımları atıldı ve pelletleri tamamen süspanse edilerek üzerlerine tekrar 15-20 ml eritrosit parçalama çözeltisi eklendi. Örnekler +4^{0}C'de 15 dakika bekletildikten sonra 1500 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatantları atılarak pelletleri süspanse edildi. Süspanse olan pellet üzerine 500 µl %10'luk SDS 50µl proteinaz K (20 mg/ml) ve 9.4 ml lökosit parçalama çözeltisi eklenerek 560C su banyosunda 1 gece inkübe edildi. İnkübasyon sonrası her 1 ml örnek başına 0.37 ml 9.5 M 'lık amonyum asetat çözeltisi eklendikten sonra yavaşça karıştırıldı ve 3000 rpm'de 25 dakika santrifüj edilerek proteinler çöktürüldü. Santrifüj sonrası süpernatant kısmı temiz bir falkona aktarılarak üzerine 1:2 oranında %99'luk absolü alkol eklendi ve böylece DNA'nın presipitasyonu sağlandı. Yoğunlaşan DNA'nın alkol yüzeyine çıkması beklendi ve DNA steril bir mikropipet ucuyla alındı. DNA %70'lik alkolde yıkanarak ve korunmak üzere Tris-EDTA çözeltisi içinde çözündürüldü. DNA örnekleri +4°C'de muhafaza edildi(60).

3.5.2. DNA SAFLIK TAYİNİ

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

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

3.5.3. DNA KONSANTRASYONUNUN HESAPLANMASI

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

DNA Konsantrasyonu (ng/µl): Sulandırma katsayısı (100) x A_{260} x 50

3.5.4. PCR YÖNTEMİYLE DNA'DA GST GEN BÖLGESİNİN ÇOĞALTILMASI

İki gruba ait DNA örneklerinden GST gen bölgesinin çoğaltılması için 50 µl hacminde PCR karışımı hazırlandı. 37.5 µl ddH_2O , 2.5 ünite Taq polimeraz enzimi , 5µl Taq Polimeraz enziminin çalışması için gereksinim duyduğu 10 x Reaksiyon çözeltisi ($MgCl_2$'süz) , 3□l $MgCl_2$ eklendi,GST gen bölgesine özgü primerler sırasıyla 300, 150, 150 ng eklendi, herbiri 200 mMolacak şekilde deoksinükleotid trifosfat karışımı (dNTP) kullanarak PCR

reaksiyon ortamı hazırlandı ve DNA örnekleri yaklaşık 500 ng olacak şekilde PCR karışımlarına eklendi. Buharlaşmanın engellenmesi için karışımın üzerine 50 µl mineral yağ damlatılarak örneklerin Stratagene Mini Thermal Cycler'da aşağıda belirtilen koşullarda PCR'ları gerçekleştirildi(81,95).

PCR gen bölgesi için kullanılan amplifikasyon koşulu:

94^0C' de 5 dk denatürasyon

72^0C'ye soğutulup primer ve Taq polimeraz eklendi

94^0C'de 1dakika denatürasyon

60^0C'de 1:30 dakika bağlanma

72^0C'de 2 dakika uzama

Son üç kademe 35 döngü yapıldı.

72^0C'de 5 dakika son uzama için beklendikten sonra döngü durduruldu.

3.5.5. PCR YÖNTEMİYLE DNA'DA CYP1A1 GEN BÖLGESİNİN ÇOĞALTILMASI

İki gruba ait DNA örneklerinden CYP1A1 gen bölgesinin çoğaltılması için 50 µl hacminde PCR karışımı hazırlandı. 36.5 µl ddH_2O , 2.5 ünite Taq polimeraz enzimi , 5µl Taq Polimeraz enziminin çalışması için gereksinim duyduğu 10 x Reaksiyon çözeltisi , CYP 1A1 gen bölgesine özgü primer çifti 20'şer pmol eklendi, herbiri 200 mMolacak şekilde deoksinükleotid trifosfat karışımı (dNTP) kullanarak PCR reaksiyon ortamı hazırlandı ve DNA örnekleri yaklaşık 500 ng olacak şekilde PCR karışımlarına eklendi. Buharlaşmanın engellenmesi için karışımın üzerine 50 µl mineral yağ damlatılarak örneklerin

Stratagene Mini Thermal Cycler'da aşağıda belirtilen koşullarda PCR'ları gerçekleştirildi881,86).

PCR gen bölgesi için kullanılan amplifikasyon koşulu:

94^0C' de 2 dk denatürasyon

94^0C'de 1dakika denatürasyon

60^0C'de 1 dakika bağlanma

72^0C'de 1 dakika uzama

Son üç kademe 35 döngü yapıldı.

72^0C'de 5 dakika son uzama için bekletildi

3.5.6. PCR ÜRÜNLERİNİN AGAROZ JEL ELEKTROFOREZİ İLE DEĞERLENDİRİLMESİ

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

%2'lük Agaroz Jelin Hazırlanması:

1 g agaroz tartılarak behere alındı. Üzerine 50 ml 1xTBE çözeltisi eklenerek mikrodalga fırında kaynatıldı. Daha sonra üzerine 1µl 10 mg/ml'lik etidyum bromür eklenerek karıştırıldı. Yaklaşık 70^0C'ye soğutularak küvete döküldü. Tarak yerleştirildi ve jel soğumaya bırakıldı. Jel donduktan sonra tank 1xTBE çözeltisi ile doldurulduu. Alınan 15 µl PCR ürünleri son konsantrasyonu 1x olacak şekilde eklenen 5x'lık yükleme tamponu ile karıştırılarak jeldeki kuyucuklara yüklendi. Kuyucuklardan birine PBR 322 Msp I DNA markerı veya

PUC19 DNA/MSP I makerı yüklendi. Yükleme işlemi bittikten sonra elektrotlar yerleştirilerek örnekler 100-120 V'ta yürütüldü. Elektroforez tamamlandıktan sonra jel UV altında incelendi ve Poloroid kamera ile jelin fotoğrafı çekildi.

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

Amplifiye olan PCR ürünleri %2'lik agarozda gösterildikten sonra Ncol Restriksiyon Endonükleaz enzimi ile kesildi(32). Kesim işlemi şu prosedüre göre uygulandı:

15 µl PCR amplifikasyon ürünü

2.5 µl didistile su

2 µl 10 x buffer

0.5 µl Ncol Restriksiyon Endonükleaz enzimi

Kesim işlemi için karışım hazırlandıktan sonra örnekler 37 ^{0}C su banyosunda 1 saat inkübe edildi. Kesim ürünleri% 2'lük Metaphor agaroz'da 1zTBE çözeltisi içinde, 120 volt'luk elektrik akımında yürütüldü. Elektroforez tamamlandıktan sonra jel UV altında incelendi ve Polaroid kamera ile fotoğrafı çekildi.

3.6. GST ENZİMİ KİNETİK ÇALIŞMASI İÇİN AKCİĞER DOKUSUNDAN SİTOZOLİK FRAKSİYONUN ELDE EDİLMESİ

Ameliyathaneden taze olarak alınmış normal ve kanserli doku içeren akciğer örneği kuru buz içinde laboratuara ulaştırıldıktan sonra örneklerin etrafından yağ dokusu, nekrotik ve hemorajik alanlar temizlendi. Hemen 4^0 de soğutulmuş 0.25 M sükroz ile 1:3 oranında (ağırlık/hacim) karıştırılarak Ultra Thorax (Tp18/2N) homojenitörle 1 dakikada homojenize edildi. Örnekler 15000xg'de 30 dk santrifüj edilerek süpernatantı alındı ve 105000xg'de 60 dk santrifüj edildi. Mikrozomal fraksiyonları uzaklaştırılmış süpernatant alınarak GST enziminin tayini ve saklama koşulları için deneylere başlandı(40).

3.6.1. GST AKTIVITESININ SAPTANMASI

Çalışmayla ilgili hesaplamalar için Mannervik ve Guthenberg tarafından tanımlanan ünite tarifleri kullanılmıştır (58). Buna göre 1 ünitelik enzim aktivitesi, 1mM GSH ve 1 mM CDNB varlığında, 30^0 de , 1 mmol S-2,4-dinitrofenilglutatyon oluşturan enzim miktarı olarak alınmış ve spesifik aktivite cinsinden mg protein başına ünite enzim miktarı olarak verilmiştir.

Enzim aktivitesi GSH ve CDNB'un konsantrasyon değişimleri (0,5; 1; 2 mM), ortam pH değişimleri (4; 5; 6; 6,5; 7) ısı (25; 30; 37; 40 ^{0}C) ve reaksiyon zamanı değişimleri saptandıktan sonra optimum aktivite için 1mM GSH, 1mM CDNB ve 1 mM EDTA içeren 100 mM sodyum fosfat tamponundan oluşan pH'sı 6.5 olan

inkübasyon ortamı kullanılmıştır. Bu yöntem ile aktivite ölçümünün temeli glutatyon ile konjuge olmuş CDNB'un 340 nm'de absorbans vermesine (E_{340}=9.6 mM^{-1} cm^{-1}, 30^0) dayanmaktadır (29). Çalışmanın tüm ölçümlerinde kendiliğinden oluşan konjugat miktarları, enzimatik reaksiyon ile elde edilen değerlerden çıkartılmıştır.

3.6.2. Optimal GST Aktivitesinin Saptanması

1) Sitozolik örneklerde Lowry yöntemiyle (56) protein tayini yapıldı. İnkübasyon ortamına eklenmek amacıyla sitozol örnekleri 1/50 oranında sulandırıldı.

2) Son konsantrasyonu 1mM GSH, 1mM CDNB, 1mM EDTA, 100 mM NA fosfat olacak şekilde inkübasyon ortamı hazırlandı. Ortam pH' sı 6.5 ve ortam ısısı 30 ^{0}C olacak şekilde ayarlandı(29).

3) Karışım sitozol eklendikten sonra 3 dk 30 ^{0}C'de inkübe edildi. CDNB en son olarak ortama, reaksiyonun başlatılması amacıyla eklendi spektrofotometrede 340 nm'de reaksiyon okundu. Reaksiyonun platoya erdiği 3.dakika Vmax olarak kabul edildi.

Kinetik deneylerde enzim substrat ilişkisinin pH'ya, ısıya, substrat konsantrasyonlarına bağımlı değişimleri gösterilmesi amaçlandı. Shimadzu UV 1208 spektrofotometre analizlerin değerlendirilmesinde kullanıldı. Taze olarak hazırlanan stok GSH ve CDNB çözeltileri ve enzim ihtiva eden sulandırılmış örnekler deney süresince buz banyosunda ve ağzı kapalı olarak tutuldu. Glutatyon derişimleri Ellmann'ın (26) yöntemine göre deneyin başlangıcında ve sonunda ölçülerek deney süresince oluşabilecek oksidasyon kontrol edildi. Deneyi süresince GSH'un ihmal edilebilecek kadar okside olduğu saptandı.

CDNB çözeltileri, inkübasyon ortamında etanol derişimi %5'ten az olacak şekilde hazırlandı.

3.6.3. Glutatyon ve 1-Kloro-2,4-Dinitro Benzen (CDNB) Konsantrasyon Değişimlerinin Aktivite Üzerine Etkileri

Aktivite ölçümleri için son konsantrasyonda 100 mM sodyum fosfat tamponu (pH:6.5) 1 mM EDTA, enzim ve istenen derişimdeki GSH (0.5, 1, 2 mM) içeren inkübasyon ortamı oluşturularak 3 dakika 30 ^{0}C de inkübe edildikten sonra istenen konsantrasyonda CDNB (0.5, 1, 2 mM) eklenerek reaksiyon başlatıldı. Reaksiyonun plato değerlere 3. dakikada ulaştığı saptandı ve absobanslar kaydedildi. Tüm deneylerde enzim ilave edilmeksizin gözlenen spontan aktivite enzimle elde edilen değerlerden çıkarıldı. Enzimim Km değerleri hem normal akciğer dokusunda hemde kanserli akciğer dokusunda hesaplandı.

Kullandığımız deney koşullarında GST enzimi varlığında substratı GSH'ın CDNB ile reaksiyona girmesi göz önüne alınarak Km ve Vmax değerleri saptandı. Giderek artan substrat konsantrasyonları kullanarak sitozol fraksiyonunda söz konusu enzimin ürün oluşturma hızını belirlendi. Bu deney koşulları en az üç kez yeniledi. Her deneyle elde edilen değerler, 1/V ile 1/[S] şekline dönüştürüldü. Apsis eksenine, kullandığımız substrat konsantrasyonlarını 1/[S] şeklinde, ordinat eksenine 1/V değerlerinin aritmetik ortalamalarını işaretleyerek elde ettiğimiz noktalar arasından, eğimi a parametresinin aritmetik ortalamasına eşit olan ve ordinat ekseni b parametresinin aritmetik ortalamasına uyan noktada kesen bir doğru geçirdik.

Bulgular bölümünde sunacağımız tüm Lineweaver Burk eğrileri bu şekilde çizilmiştir.

3.6.4. Isı ve pH Değişimlerinin ve Aktivite Üzerine Etkileri

Ortamın ısı değerleri (25, 30, 37, 40^{0}C lerde) pH değerleri (4, 5, 6, 6.5, 7) değiştirilerek GSH ve CDNB konsantrasyonları 1mM olarak sabit tutularak absorbans ölçümleri yapıldı.

3.6.5. Glutatyon S-Transferaz Enziminin Saklanma Koşullarının Saptanması

Normal akciğer dokusu ve kanserli akciğer dokusundan elde edilen sitozol örneklerindeki GST enziminin dayanıklılığının saptanması amacıyla -20, +4 ve oda sıcaklığında 30 gün bekletilmesiyle oluşacak absorbans değişimlerine bakıldı.

3.7. LOWRY YÖNTEMİ İLE PROTEİN TAYİNİ

Hazırlanan sitozol örneklerinin kapsadığı protein düzeylerinin belirlenmesinde, Lowry ve ark'nın (56) önerdiği yöntem kullanıldı. 0.1 N NaOH içinde %2 lik olacak şekilde hazırlanmış Na_2CO_3 çözeltisinden 50 ml alındı ve %1'lik sodyum potasyum tartarat içindeki %0.05 CuSO4.5H2O çözeltisinin 1 ml'sine katıldı. Hazırlanan bu taze çözeltiden 2 ml alınarak, üzerine 0.1 ml sitozol katıldı, iyice karıştırıldı ve 10 dak. Oda ısısında tutuldu. 0.1 ml Folin ayıracı katılmasından 30 dak. sonra, spektrofotometrede 546 nm dalga

boyunda absorbans okundu. Sığır serum albumini kullanılarak çizilen standart eğriden, sitozol ve homojenat örneklerinin içerdiği protein düzeyleri hesaplandı.

3.8. SONUÇLARIN DEĞERLENDİRİLMESİ

Elde edilen sonuçlar windows için hazırlanmış SPSS 8.0 pkaet programı kullanılarak değerlendirilmiştir. Değerlendirmede Pearson k2 testi, Fisher's exact test, risk belirlenmesi için (Odd sayısı, %95 güvenlik aralığı), Student T testi kullanılmıştır.

4. BULGULAR

4.1. GLUTATYON S-TRANSFERAZ ENZİMİNİN KİNETİK ÖZELLİKLERİNİN GÖSTERİLMESİ

4.1.1 DOKU HOMOJENATLARININ HAZIRLANMASI

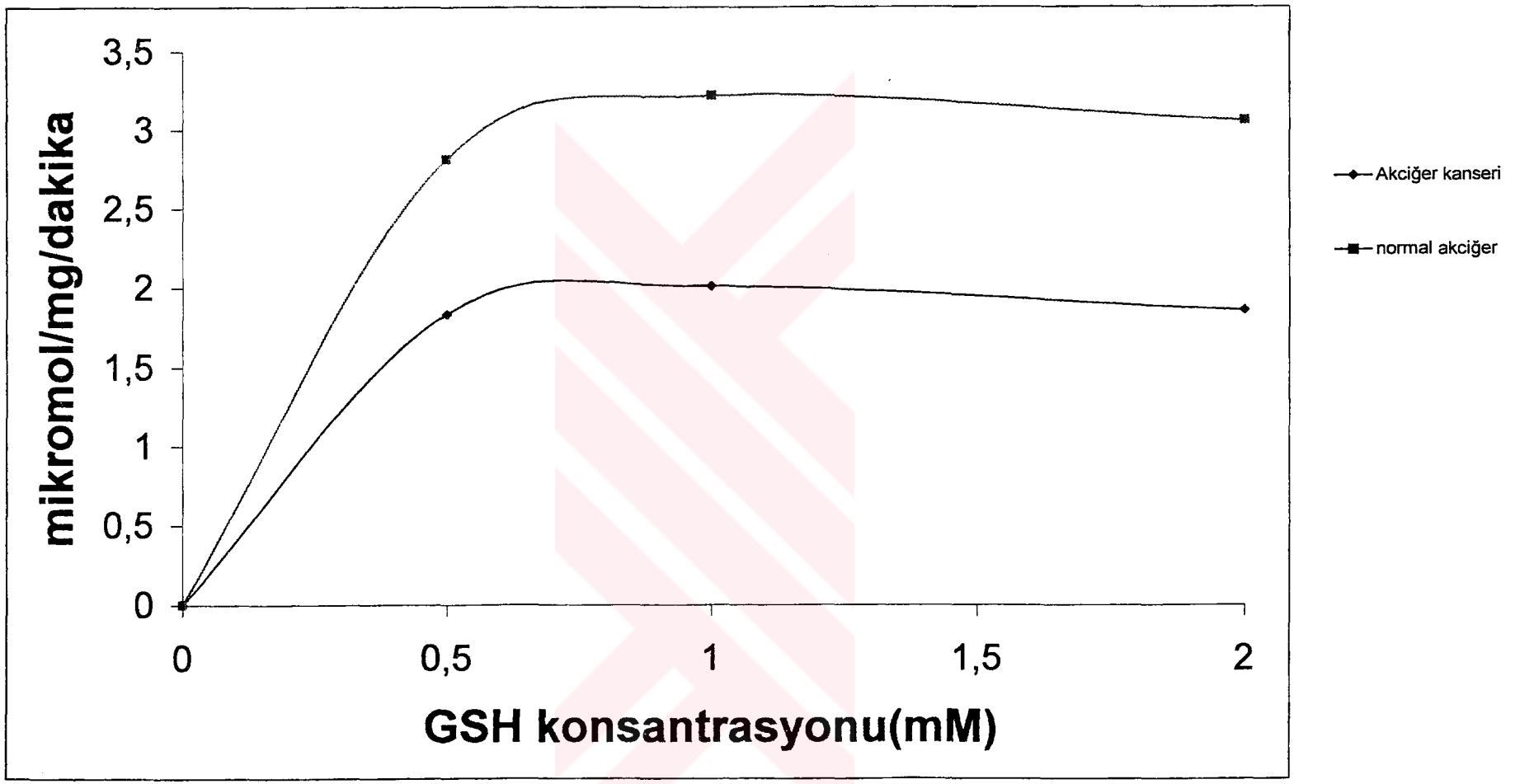
Yaş ağırlıkları yaklaşık 10-15 gr olan her iki gruba ait doku örnekleri kuru buz içerisinde laboratuara ulaştırıldıktan sonra soğuk 0.15 M KCL tamponuyla yıkandıktan sonra yağ dokusu, nekrotik ve hemorajik kısımlar ortamdan mekanik işlemlerle uzaklaştırılmıştır. Buz içerisinde küçük parçalara ayrılan örnekler +4 C'de soğutulmuş 0.25 M sükroz ile 1:3 oranında (ağırlık/hacim) karıştırılarak homojenize edilmişlerdir. Örnekler 15000x g' de 30 dakika santrifüj edilerek süpernatantı alınıp 105000x g'de 60 dakika santrifüj edildi. Böylece kaba partiküller ve mikrozomal fraksiyonundan uzaklaştırılmış sitozol elde edildi. Hem kanser hemde normal akciğer dokusundan elde edilen sitozolik örneklerde protein tayini yapıldı. Kanserli dokuda protein 2,4mg/ml, normal akciğer dokusunda ise 2.17 mg/ml olarak saptandı.

4.1.2 DEĞİŞEN SUBSTRAT DÜZEYLERİYLE GLUTATYON S-TRANSFERAZ ENZİMİNİN KİNETİK ÖZELLİKLERİ

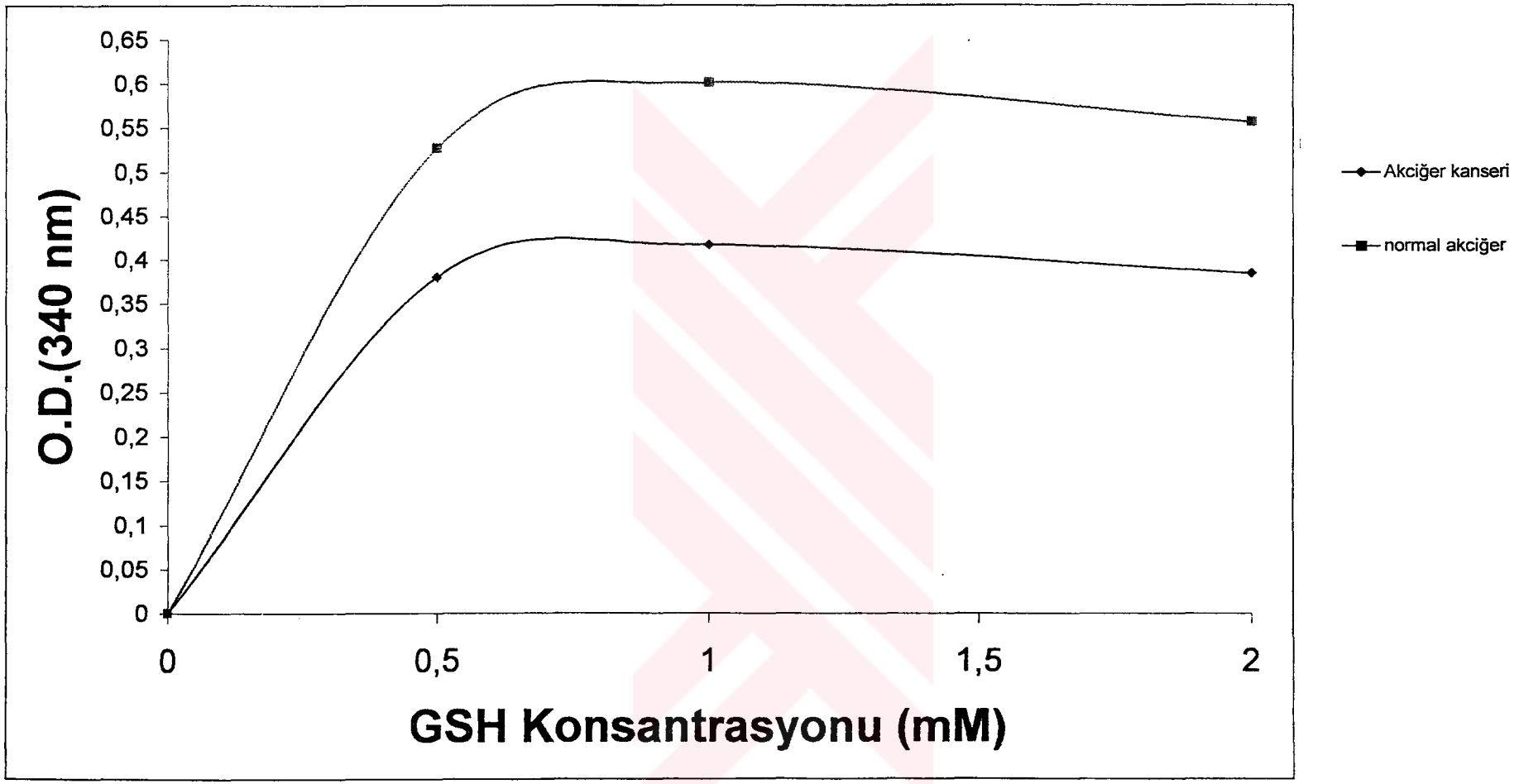
Elde edilen normal ve kanserli akciğer doku homojenatları için GSH ve CDNB konsantrasyonları 0.5 , 1, 2 mM olamak üzere, her iki substrat içinde ayrı ayrı uygulandı. Konsantrasyon değişimleri sonucunda hem GSH hemde CDNB

için maksimum absorbans değerlerinin 1mM düzeyinde olduğu saptanmıştır(Şekil-2 ve 4). Şekil-1'de değişen GSH konsantrasyonlarının spesifik aktiviteleri gösterilmiştir.

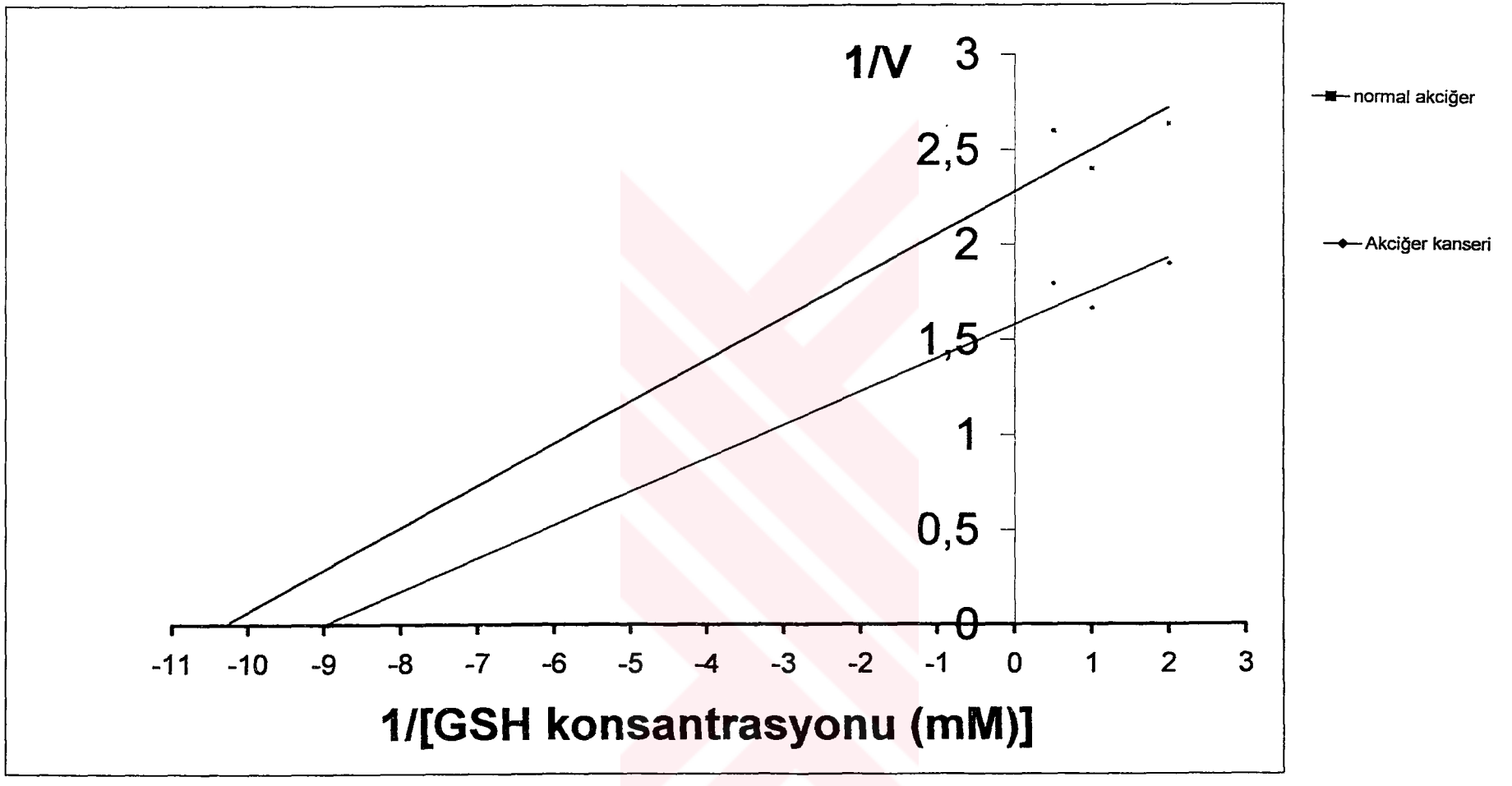
Tüm değişkenlerin varlığında kanser dokusunun değerleri komşu normal akciğer dokusunda düşük olarak saptandı. Km değerleri normal dokuda 96 mikromolar GSH, kanserli dokuda ise 112 mikromolar GSH olarak saptanmıştır (Şekil-3).



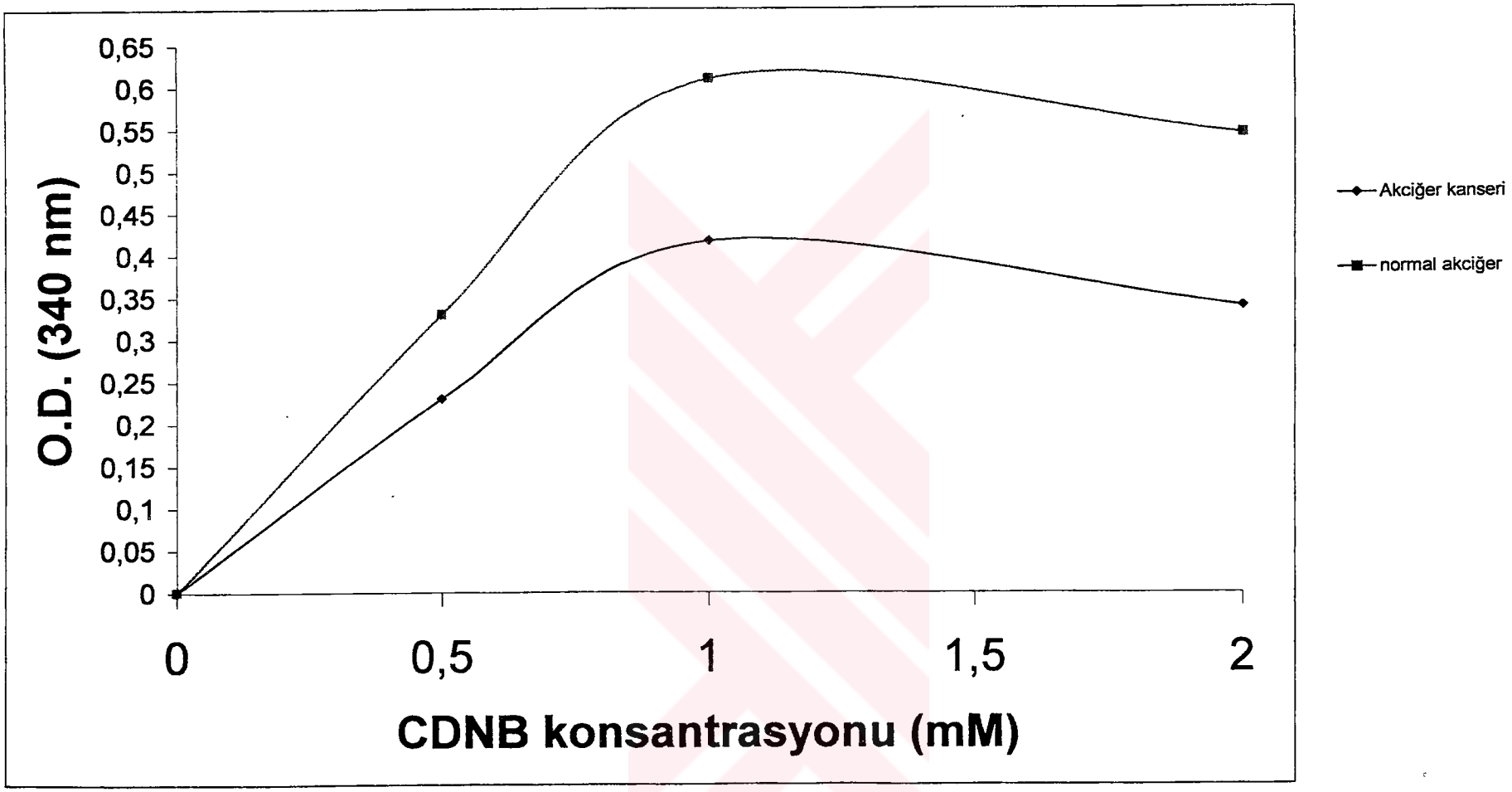
Şekil-1 Değişen GSH konsantrasyonu ile elde edilen GST enziminin spesifik aktivitesi görülmektedir.



Şekil-2 Değişen GSH konsantrasyonlarında maksimum aktiviteler görülmektedir.



Şekil-3 Kanserli ve normal akciğer dokusundaki GST enziminin Km değerleri görülmektedir.
Km_{normal}=112 mM GSH
Km_{kanser}=96mM GSH



Şekil-4 Değişen CDNB konsantrasyonlarında elde edilen maksimum aktiviteler gösterilmiştir.

4.1.3 Değişen Isı düzeyleriyle Glutatyon S-Transferaz enziminin kinetik özellikleri

Sitozolik örneklerin 25, 30, 37, 40 ^{0}C'de inkübe edilmesinin aktivite üzerine etkileri şekil-5'te gösterilmiştir. Aktivite 30 ^{0}C de en yüksek olarak saptanmıştır.

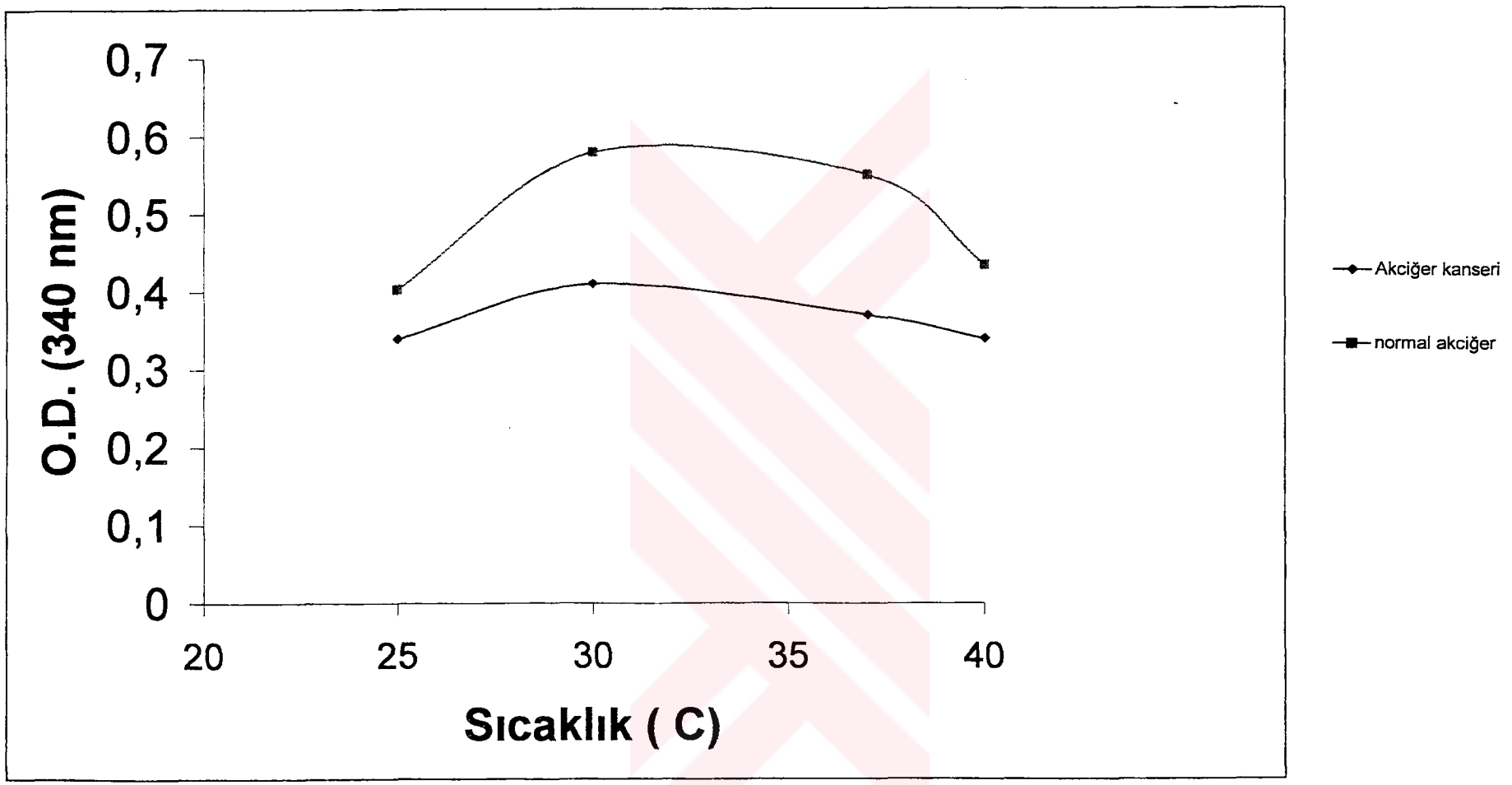
4.1.4 Değişen pH değişimlerinin Glutatyon S-Transferaz enziminin kinetik özellikleri

Aktivite üzerine pH değişmlerinin etkileri şekil-6'da görülmektedir. Görüldüğü gibi GST enzimi maksimum aktivitesini pH 5.5'te göstermektedir.

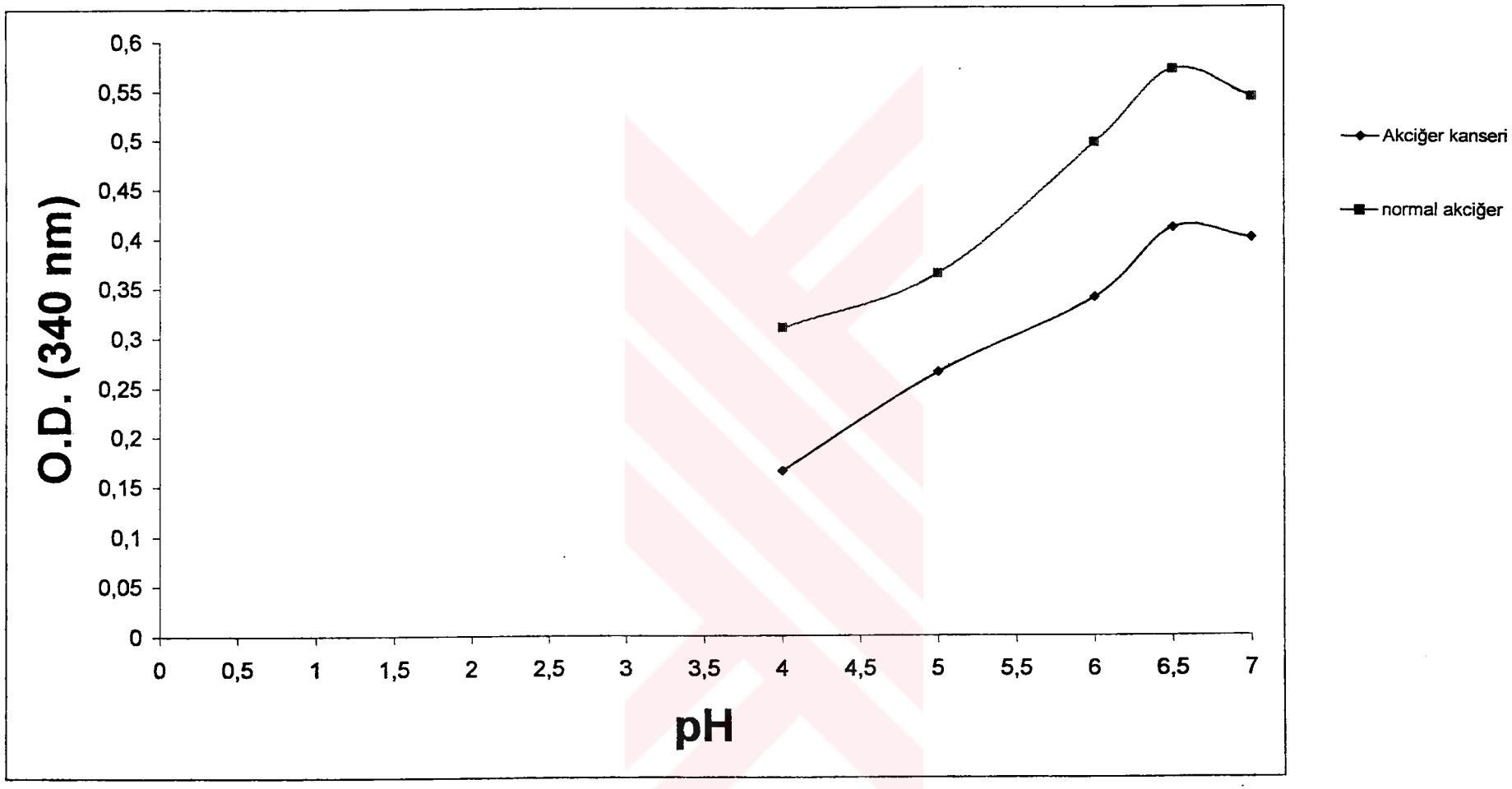
4.1.5 Saklama Koşullarının Glutatyon S-Transferaz Enziminin Aktivitesi Üzerine etkileri

Akciğer dokusundan elde edilen her iki gruba ait sitazol fraksiyonları porsiyonlara bölünerek oda ısısında, +4 ^{0}C'de ve –20 ^{0}C'de 1, 2, 7, 10, 20 ve 30 gün bekletilerek aktivite değişimleri ölçüldü. Kanser ve normal akciğer dokuları için aktivite değişimleri sırasıyla şekil-7 ve 8'de 340 nm dalga boyunda göstermiş olduğu absorbans şiddeti cinsinden verilmiştir.

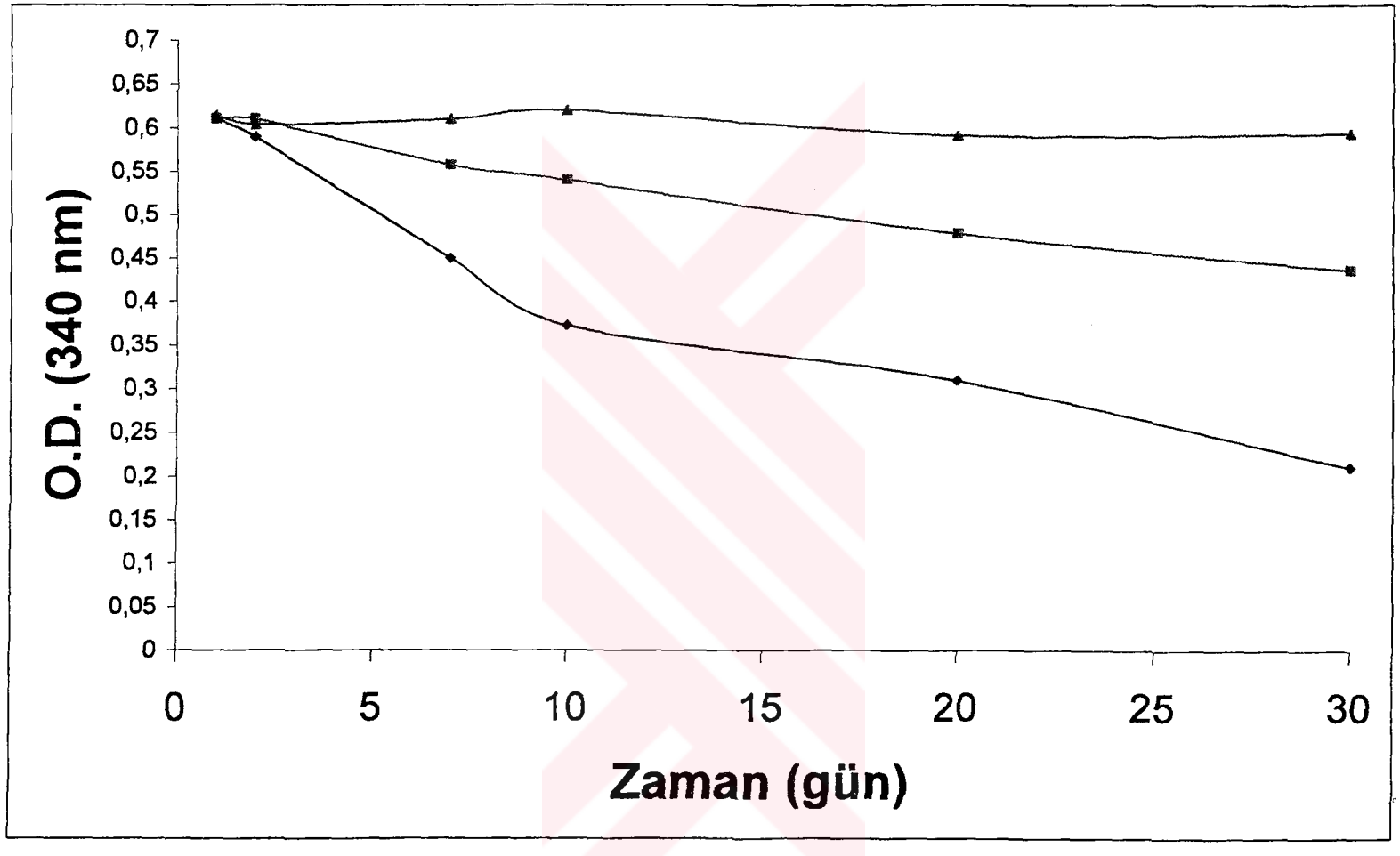
Sitozolün çeşitli ısılarda koruyucusuz olarak saklanmasının aktivite üzerine etkileri incelendiğinde bir aylık bekletme esnasında –20 ^{0}C'de değişme olmaz iken +4 ^{0}C ve oda sıcaklıklarında düşüşler gözlenmiştir. Oda sıcaklığında aktivite yaklaşık 20.günde yarıya düşmesine rağmen 1.ay sonunda hala aktivite alınıyor olması (normalin yaklaşık %30'u) enzimin çok dayanıklı olduğunu düşündürmektedir. Buzdolabında +4 ^{0}C'de bekletilme ile ise aktivitede 1.ay'da aktivitenin yaklaşık %70-80'inin korunduğu gösterilmiştir.



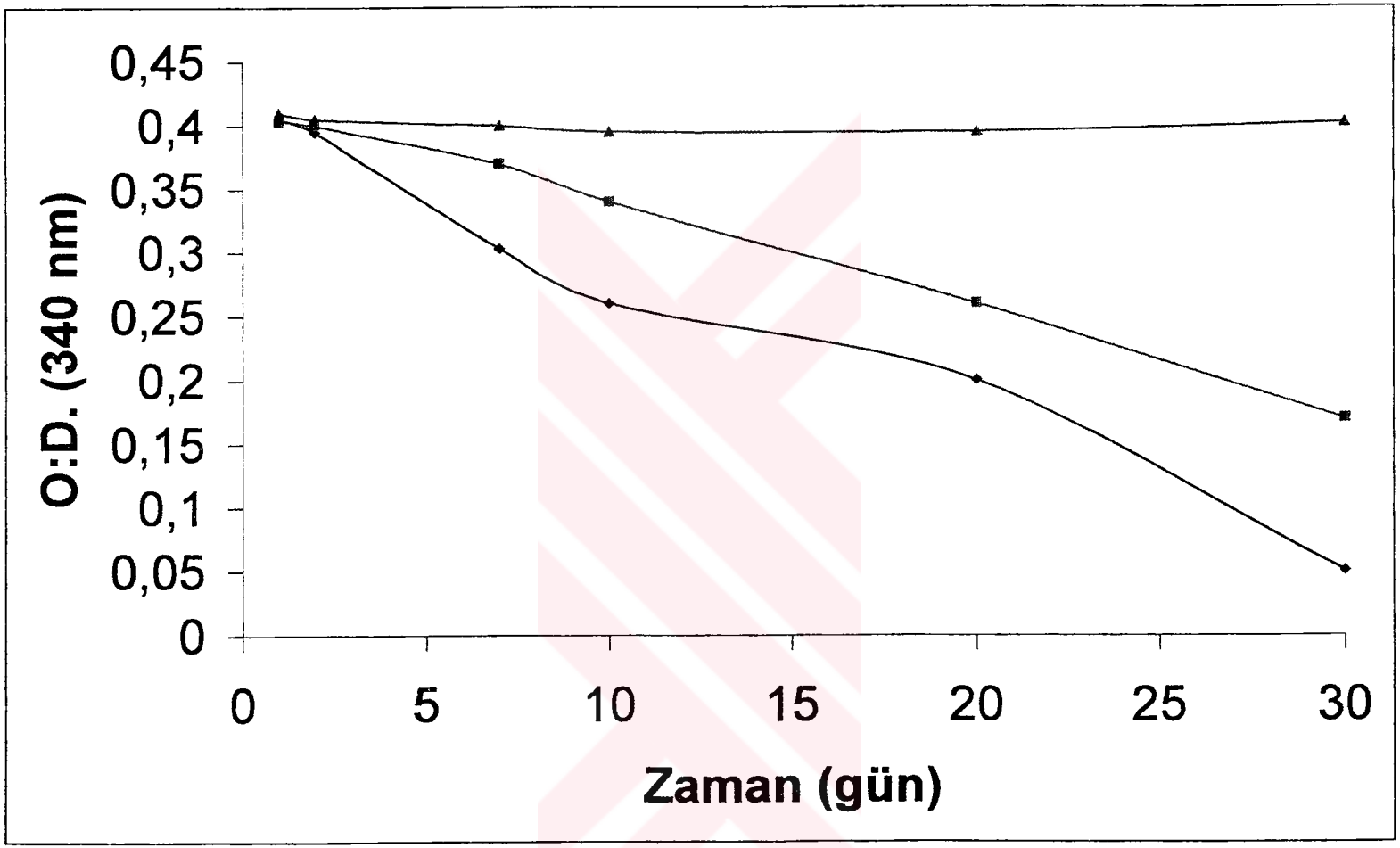
Şekil-5 Değişen ısı düzeylerinin aktivite üzerine etkileri gösterilmiştir.



Şekil-6 Değişen pH'nın aktivite üzerine etkileri sunulmuştur.



Şekil-7 Normal akciğer dokusundan elde edilen sitozolün değişik sıcaklıklarda bekletilmesi sonrasında GST enziminin değişimleri gösterilmektedir.



Şekil-8 Kanserli akciğer dokusundan elde edilen sitozolün değişik sıcaklıklarda bekletilmesi sonrasında GST enziminin aktivitesindeki değişimleri gösterilmektedir.

4.2. GLUTATYON S-TRANSFERAZ ENZİMİNİN PLAZMA DÜZEYLERİNİN GÖSTERİLMESİ

Her iki gruptan 20'şer adet örnekte GST plazma düzeyleri ölçümü yapıldı. Kanserli grupta 340 nm dalga boyunda spesifik aktivite 233±84,2 nmol/dakika/mg protein, normal grupta ise 372±67,2 nmol/dakika/mg protein olarak bulundu

Sonuç olarak reaksiyon için optimum şartların hem kanserli hemde normal doku için literatürde önceden bildirilen 1mM GSH, 1 mM CDNB konsantrasyonlarında 30 ^{0}C'lik ısı düzeylerinde ve pH 6,5'ta gerçekleştiği gösterildi. Reaksiyonun 3.dakikada platoya ulaştığı optik dansite Vmax olarak saptandı.

4.3. GLUTATYON S-TRANSFERAZ ENZİMİNİN VE CYP 1A1 (EKZON7 İZOLÖSİNE-VALİN DEĞİŞİMİ) GEN POLİMORFİZMLERİNİN GÖSTERİLMESİ

Kontrol ve hasta grubunun demografik özellikleri tablo-1'de verilmiştir. Her iki grup arasında sadece kontrol grubunda kadın örnek fazlalığı ve kanserlilerde sigara içiminin fazla olması açısından fark saptanmıştır. Diğer özellikleri uyumludur. Kontrol ve hasta grubunda yaş, sigara kullanımı, vucut kitle indeksleri tablo-1'de gösterilmiştir.

Tablo-1 Kontrol grubu ve akciğer kanserli vakaların özellikleri.

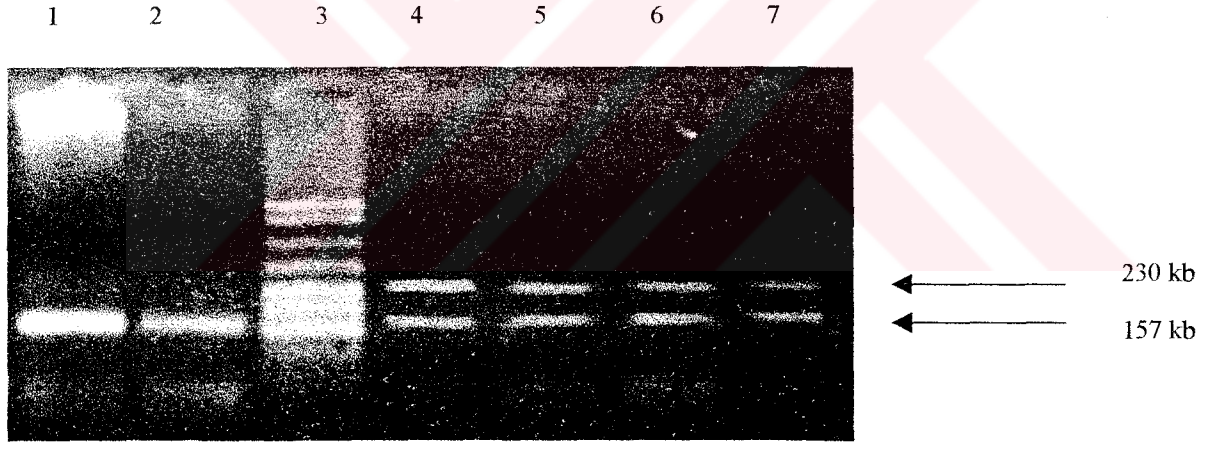
	Cinsiyet		**Yaş**	**Sigara**	**Vucut kitle**
	Kadın(%)	Erkek(%)	Yıl±S.D.	Paket/yıl±S.D.	İndeksi±S.D.
Kontrol	39,4 (n=26)	60,6 (n=40)	54,56±15,03 (n=66)	26,5±36,14	24,72±4,05
Hasta	12 (n=9)	88 (n=66)	58,33±10,73 (n=75)	41,5±24,45	25,12±4,24

Her iki grupta genetik polimorfizmler karşılaştırıldığında k^2 testi ile istatistiksel fark gözlenmedi ve Fisher exact test ile her iki grup biribiriyle tam uyumlu olduğu saptandı. Bulgular tablo-2'de sunulmuştur.

Tablo-2 GST ve CYP 1A1 gen polimorfizmlerinin hasta ve kontrol grubunda incelenmesi.

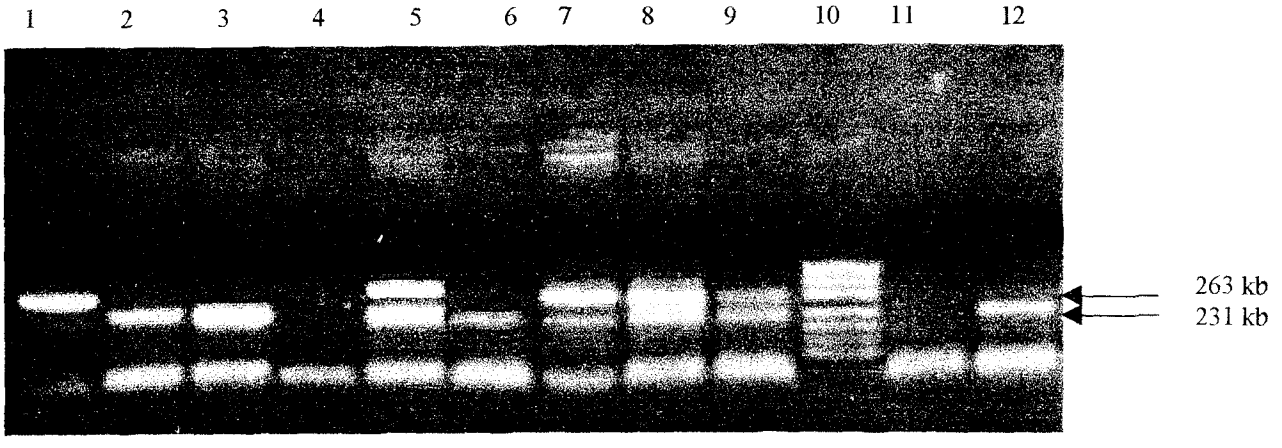
	GST mu		**CYP 1A1(Ekzon7, Ncol restriksiyonu)**		
	Null (%)	**+ (%)**	**Homozigot wild (İle/İle) (%)**	**Heterozigot mutant (İle/Val) (%)**	**Homozigot mutant (Val/Val) (%)**
Kontrol	51,7 (n=31)	48,3 (n=29)	52,4(n=33)	44,4(n=28)	3,2(n=2)
Hasta	51,5 (n=34)	48,5 (n=32)	62,5(n=45)	36,1(n=26)	1,4(n=1)

(p>0.05)



Şekil-9 GST mu polimorfizminin jel fotografı görülmektedir

Sıra 1 ve 2'de GST mu null genotipinin jel üzerindeki görüntüsü sadece 157kb'lik band gözlenmektedir. Sıra 3'te DNA markeri (pBR322 DNA/Msp I) . Sıra 4-7 'de her iki bantta görülmekte olduğundan GST mu + genotipi olarak değerlendirildi.



Şekil-10 CYP 1A1 polimorfizminin jel fotografı görülmektedir.

Sıra 1'de homozigot Ncol ile kesilmemiş homozigot mutant (Val/Val) varyant ; Sıra 2, 3, 6, 12'de Ncol ile tam kesilmiş homozigot wild (İle/İle) varyant; Sıra 5, 7, 8, 9'da her iki bandın bulunduğu heterozigot mutant (İle/Val) varyant görülmektedir.

Hasta grubunda null genotipi taşıyanların taşımayanlara göre yaş, sigara tüketimi açısından farklılıkları yoktur. Hastalarımızın dört tanesi sigarayı hiç içmediklerini bildirmiştir(%5,3). Bu vakaların dördüde kadın olup hepsi 40 yaşın üzerindedir, üçünde adenokarsinom birinde epidermoid karsinom tanısı konmuştur (k2=4,596; p=0,032). Bu hastaların tanıları en az evre III olarak saptanmıştır. On bir vakada ise sağlıklı bir şekilde sigara hikayesi alınamamıştır.

CYP 1A1 polimorfizmininde hasta grubunda sigara tüketimi ve hastalığın ortaya çıktığı yaş açısından farklılık yoktur. GST polimorfizmi ile CYP 1A1

genotiplerinin birlikteliği gerek kontrol gereksede hasta grubu içerisinde farklılık göstermemiştir.

Tümör tipleri arasında sigara tüketimi ve yaş açısından istatistiksel farklılık saptanmamıştır(Tablo-3).

Tablo-3 Hasta grubunda tümör tiplerine bağlı yaş ve sigara tüketimi ortalamaları.

Tümör tipi	YAŞ Ort.±S.D.	Sigara paket yıl Ort.±S.D.
Adenokarsinom	59,81±8,49(n= 16)	32,94±26,52(n= 17)
Epidermoid	57,35±11,58(n= 42)	44,19±23,81(n= 43)

Tabloda değerler ort.±S.D. olarak verilmiştir($p>0.05$).

Her iki grup arasında öz geçmişinde akciğer hastalığı (tübürküloz ve kronik obstrüktif akciğer hastalığı vs gibi) bulunup bulunmaması açısından istatistiksel fark gözlenmemesine rağmen kanserli hastaların geçmişinde akciğer hastalığı varlığı kanser için artmış bir riski göstermektedir(Tablo-4).

Tablo-4 Kontrol ve hasta grubunun özgeçmişlerinde akciğer hastalığı varlığının gösterilmesi

		GEÇMİŞTE AKCİĞER HASTALIĞI		Total
		Yok	Var	
GRUPLAR	Kontrol	17	1	18
	Kanserli Hastalar	53	12	65
	Total	70	13	83

K^2 =1,777; df=1 ; p=0,182 ; Odds değeri=3,849; %95 CI =0,466- 31,808

Hasta grubunun cinsiyet farklılığına göre GST değerleri biribirleriyle uyumludur, istatistiksel fark gözlenmemiştir. GST polimorfizmleri ile tümör tipleri, veya başka primer bir malignitenin bulunması 2.-3.derece akrabalarda kanser varlığı arasında ilişki saptanmamıştır.

GST Mu (-) olanlarda özgeçmişte akciğer hastalığının varlığı yüksek bulunmasına rağmen istatiksel anlamlılığa ulaşmamıştır (k^2:3,207;p=0.073). Bu incelemede beklenen sıklık %25,8 Odd değeri=3,355 (%95 CI :0,780-14,434) olarak saptanmıştır(Tablo-5).

Tablo-5 Hasta grubunda GST mu gen polimorfizmi ile özgeçmişinde akciğer hastalığının varlığının gösterilmesi.

		GEÇMİŞTE AKCİĞER HASTALIĞI		Total
		Yok	Var	
GST Mu	-	23	8	31
	+	24	2	26
Total		47	10	57

(p>0.05)

Yine GST Mu (-) taşıyanların 1.derece akrabalarında kanser varlığı değerlendirildiğinde istatistiksel anlamlılık saptanmamasına rağmen çeşitli kanserlerin varlığı yüksek olarak bulunmuştur (k^2 =1,413 df=1 ;p=0,235). Bu incelemede Odd değeri=1,733 (%95 CI= 0,680- 4,421) dir. GST polimorfizminin tümör büyüklüğü, farklılaşması, nodal tutulum ve ever üzerine istatistiksel etkileri gözlenmemiştir (Tablo-6).

Tablo-6 Hasta grubunda GST mu gen polimorfizmi ile 1.derece akrabalarında kanser varlığının gösterilmesi.

		Ailede 1.derceden ca		Total
		yok	var	
GST Mu	-	20	10	30
	+	21	5	26
Total		41	15	56

(k^2=1,413 df=1 ;p=0,235)

GST polimorfizminin kanser grubu içerisinde muhtemel kanserojenler ile temas ilişkisine bakıldığında özgeçmişinde muhtemel sigara harici kanserojenlerle (asbest, petrol ürünlerine, ham deri işleme işinde çalışmak, solventlere maruz kalmak, yoğun tozlu ortamda çalışmak vs. gibi) teması olupta akciğer kanseri gelişenlerde GST mu null genotipi diğerlerinden analmlı bir şekilde yüksek olarak bulunmuştur(Tablo-7).

k2 değeri=8,158 df:1 ,p=0,006 (Fisher's exact test two tailed sig.). Kanserojen teması ile GST Mu null genotipi taşımanın Odd değeri=8,846 (%95 CI 1,224 ;63,916) dir.

Tablo-7 Hasta grubunda GST mu null genotipi olanların kanserojenlerle teması arasındaki ilişkinin gösterilmesi.

			KANSEROJEN TEMASI		Total
			yok	var	
GST	Mu (-)	Sıklık	16	10*	26
		Beklenen sıklık	20,2	5,8	26,0
	Mu (+)	Sıklık	22	1	23
		Beklenen sıklık	17,8	5,2	23,0
Total		Sıklık	38	11	49
		Beklenen sıklık	38,0	11,0	49,0

(*p<0.01)

CYP 1A1 polimorfizminin hasta grubunda geçirilmiş akciğer hastalığı, geçmişteki diğer primer maligniteler, 1.derece ve 2.-3.derece akrabalardaki kanser bulunması, sigara hariç muhtemel diğer kanserojenlerle temas açısından mutant allel taşımasının istatistiksel olarak farklı olmadığı saptandı.

Vakalarımızda tespit edilen tümörler histopatolojik olarak değerlendirildiğinde epidermoid karsinoma %72.1, adeno karsinoma %23, Bronko alveolar karsinoma %4.9 olarak saptanmıştır. İstatistiki değerlendirmeler esnasında bronkoalveolar karsinom adenokanserlere dahil edilmiştir. Büyük hücreli kanser tipine vakalarımızda rastlanmamıştır. Hastaların %94.1 inde özgeçmişlerinde kanser hikayesi yok iken %5.9 (4 vakada daha önce başka primer tümör tanısı konmuş; prostat , larenks, cilt kanseri, endometrium kanseri). Birinci ve2.-3. derece akrabalarda kanser tespit edilenlerle edilmeyenler istatistiki olarak birbirlerinden farklı olarak gözlenmedi.

Hastaların %18.1'inde geçmişte tüberküloz veya Kr. Obstrüktif akciğer hastalığı varlığı tespit edildi. Ayrıca sigara öyküsü sağlıklı olarak elde edilen 51 akciğer kanserli vakanın %28,3'ü 20 paket yıldan daha az, %71,7'si ise daha fazla sigara tükettiği ortaya çıkmıştır.

Hastalarda 20 paket yıldan fazla sigara tüketiminin epidermoid kanser olasılığını anlamlı şekilde arttırdığı gösterilmiştir (p= 0.049, k2=3,864, df=1). Odd değeri=4,063 (%95 CI=0,938- 17,587) dir. Sigara tüketiminin geçmişteki primer kanser varlığı, akciğer hastalığı varlığı ile istatistiksel anlamı olmadığı saptanmıştır(Tablo-8).

Tablo-8 Sigara tüketimi ile kanser tipleri arasındaki ilişkinin gösterilmesi.

			Tumor tipi		Total
			Adenokarsinom	epidermoid	
Sigara	<20p/yıl	Sıklık	5(%55,6)	4(%44, 4)	9
		Beklenen sıklık	2,6	6,5	9,0
		Totalin %	%8,3	%6,7	%15,0
	>=20 p/yıl	Sıklık	12(%23,5)	*39(%76,5)	51
		Beklenen sıklık	14,5	36,6	51,0
		Totalin %	20,0%	65,0%	85,0%
Total		Sıklık	17(%28,3)	43(%71,7)	60
		Beklenen sıklık	17,0	43,0	60,0
		Totalin %	%28,3	%71,7	100,0%

($p<0.05$)

Hastalarda nodal tutulum ile gen polimorfizmleri, geçmiş özellikleri ve kanserojen teması, tümör tipi ve büyüklüğü ile istatistiksel olarak anlamlılık saptanmamıştır.

Özgeçmişinde akciğer kanseri dışında diğer bir primer malignite sahip olanların evre I ve II'den daha ileri bir evrede iken tanı kondukları anlaşılmıştır ($p=0,29$, $k^2=4,788$). Gen polimorfizmleri, yaş, ortalama sigara tüketimleri, tümör tipi, geçirilmiş akciğer hastalığı ve ailede kanser hikayesinin, hastalığın erken ve geç evreleri ile istatistiksel olarak farklılığı gözlenmemiştir.

Hastalarda GST null alleli ve CYP 1A1 (İle/ile) homozigot wild tip (%36,2) birlikteliği incelendiğinde bu haplotipi taşıyan ve taşımayanların cinsiyet, sigarayı 20 paket yıldan az veya fazla tüketmeleri açısından, tümör büyüklüğü, nodal tutulum, hastalığın evresi, özgeçmiş ve soygeçmişinde kanser olup olmaması açısından fark yoktur. Tümör tipi için bu haplotipte istatistiksel anlama ulaşmasa dahi

adenokarsinom gelişmesi daha düşük olarak gözlenmiştir. Bu grupta adenokarsinom %17,4 iken diğer CYP 1A1'in en az bir mutant allelini taşıyanlarda %31,4 olarak saptanmıştır (Odd değeri=2,177 %95 CI=0,597- 7,933). Sigaradan hariç muhtemel kanserojen ile temas açısından bakıldığında bu haplotip diğerlerinden istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha fazla temasa sahiptir(k2= 5,669, p=0.017; Odd değeri= 4,875; %95 CI=1,249- 19,032). GST null ve CYP 1A1 (ile/Val) birlikteliği ise %13 olarak saptanmıştır ve adenokarsinom oranı anlamlı şekilde fazladır (p=0.034 k2=4,507) fakat kontrol grubumuzla karşılaştırıldığında ise bu haplotip kontrol grubumuzda (%29,5) anlamlı bir şekilde yüksektir (p=0.021).

Hastalarımızın 40 yaş altında olanlar sadece 5 (%7,7) tane olduğu için 40 yaş üstü grupla istatistiksel olarak sağlıklı değerlendirilmeleri mmümkün olmamıştır.

Tablo-9 Hastaların zeytin yağı ve meyva tüketimleri tablo-9'da görülmektedir.

	Hastaların zeytin yağı tüketimleri		Hastaların meyve tüketimi	
	n	%	n	%
az	21	38,9	18	33,3
orta	23	42,6	22	40,7
bol	10	18,5	14	25,9
Total	54	100,0	54	100,0

Meyva tüketimi az olan grupta epidermoid kanser gelişme oranı diğer gruptan istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksektir(k^2=6,024; df:1 ; p=0,014; Odd değeri=1,563 (%95 CI=1,159- 2,106) (Tablo-10).

Tablo-10 Hasta grubunda meyva tüketimi ve kanser tipleri arasındaki ilşkinin gösterilmesi.

			Tümor tipi		Total
			Adenokarsinom	epidermoid	
MEYVA TÜKETİMİ	AZ	Sıklık	1(%6,3)	*15(%93,8)	16
		Beklenen sıklık	4,7	11,3	16,0
		Totalin %	%2,0	%29,4	%31,4
	ORTA Ve BOL	Sıklık	14(%40,0)	21(%60,0)	35
		Beklenen sıklık	10,3	24,7	35,0
		Totalin %	%27,5	%41,2	%68,6
Total		Sıklık	15(%29,4)	36(%70,6)	51
		Beklenen sıklık	15,0	36,0	51,0
		Totalin %	29,4%	70,6%	100,0%

($p<0.05$)

Öz geçmişinde akciğer hastalığı olanların meyva tüketimleri olmayanlara göre anlamlı şekilde düşük olarak bulundu ($k^2=5,708$; df=1; p=0,017; Odd değeri=3,500 %95 CI=1,176- 10,414)(Tablo-11).

Tablo-11 Hasta grubunda meyva tüketimi ile geçmişte akciğer hastalığı varlığı ilişkisinin gösterilmesi.

			GEÇMİŞTE AKCİĞER HASTALIĞI		Total
			Yok	Var	
MEYVA	Az	Sıklık	11(%61,1)	*7(%38,9)	18
		Beklenen sıklık	14,3	3,7	18,0
		Totalin %	%20,3	%13,0	33,3%
	Orta ve bol	Sıklık	32(%88,9)	4(%11,1)	36
		Beklenen sıklık	28,7	7,3	36,0
		Totalin %	%59,3	%7,4	%66,7
Total		Sıklık	43(%79,6)	11(%20,4)	54
		Beklenen sıklık	43,0	11,0	54,0
		Totalin %	%79,6	%20,4	100,0%

($p<0.05$)

Meyva ve zetin yağı tüketiminin tümör farklılaşması, büyüklüğü, Nodal tutulum ve dolayısıylada hastalığın evresi üzerine istatistiksel fark saptanmamıştır.

Sigarayı 20 paket yıldan fazla içenlerin diğerlerinden anlamlı bir şekilde daha az meyve tükettikleri saptanmıştır(k^2 =4,696; df=1 ; p=0,030 ; Odd değeri=1,286 ; %95 CI=1,080- 1,531)(Tablo-12).

Tablo-12 Hasta grubunda meyva tüketimi ve ssigar tüketimi işkisinin gösterilmesi.

			Sigara		Total
			<20p/yıl	>=20 p/yıl	
MEYVA TÜKETİMİ	AZ	Sıklık	0	18(%100)	18
		Beklenen sıklık	2,7	15,3	18,0
		Totalin %	,0%	33,3%	33,3%
	ORTA ve BOL	Sıklık	8(%22,2)	28(%77,8)	36
		Beklenen sıklık	5,3	30,7	36,0
		Totalin %	14,8%	51,9%	66,7%
Total		Sıklık	8(%14,8)	46(%85,2)	54
		Beklenen sıklık	8,0	46,0	54,0
		Totalin %	14,8%	85,2%	100,0%

(p<0.05)

Tablo-13 Hastaların köken aldıkları bölgeler ve son 20 yıldır yaşadıkları bölgeler.

	Hastaların köken aldığı bölgeler		Son 20 yıldır yaşadıkları bölgeler	
	n	%	n	%
Marmara	22	29,3	42	56,0
Ege	5	6,7	2	2,7
Akdeniz	2	2,7	3	4,0
Ic anadolu	4	5,3	8	10,7
Karadeniz	16	21,3	2	2,7
Doğu anadolu	7	9,3	57	76,0
Güneydoğu anadolu	2	2,7	18	24,0
Total	58	77,3	75	100,0
Bilinmeyen	17	22,7		
Total	75	100,0		

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Sigara, diyet, mesleki olarak bir takım maddelere maruz kalmak gibi çevresel bir takım faktörler kanserlerin %90'ında muhtemel sebepler olarak düşünülmektedir. Genetik yatkınlık hakkında da giderek artan araştırma ihtiyacı ortaya çıkmıştır, çünkü bunlara maruz kalan her kişide kanser gelişmemektedir. Bazı duyarlı kimselerde genetik faktörlerin bu çevresel etmenlerle etkileşerek kişinin olası kanser ihtimalini arttırabileceği 1990'ların başında gösterilmiştir (69,76) . Doğal olarak bu konuda sadece genetik değil maruz kalınan maddenin dozu ve maruziyet süreside önemlidir. Diğer yandan yapılan bir çok çalışmanın sonucunda genetik özellikler ile çeşitli kanserler arasında ilişkiler gösterilmişken yine bir çok çalışmada da bu ilişkinin olmadığı bildirilmiştir. Genetik polimorfizmlerin kansere yakınlıkları hakkındaki sonuçları değerlendirilirken bir çok güçlük bulunmaktadır. Örneğin çalışılan bir çok polimorfizm intronlardaki veya DNA üzerindeki diğer sessiz bölge üzerinde meydana gelen mutasyonlara dayandığından kanser ile polimorfizm arasında ortaya çıkan ilişkinin şansa bağlı olma ihtimalini yükseltmektedir. Diğer bir sorun gözlemlenen vakaların çoğunda kanser ve genotipler arasında makul olabilecek bir biyolojik mekanizma yokluğudur. Bir başka problem ise bir etnik grupta kurulan ilişkiler diğer etnik gruplarda gösterilememesidir. Bu yüzden halen PCR dahil diğer herhangi bir metodla gösterilen, ksenobiotiklerin neden olduğu kanserlerde kişisel yatkınlığın saptanmasının gelecekteki değerleri hakkında yorum yapmak güçtür.

Normal akciğer dokusunda proksimal ve distal bölgelerin GST izoenzimlerinin oranları farklılık göstermektedir(15). Bir çalışmada akciğer dokusunun yaklaşık %90-97'sinin GST pi izoenzimden oluştuğu bildirilmiştir

(25,47). Bununla birlikte kanserli akciğer dokusu ile komşu normal dokununda tümör hücresi ve tipiyle ilgili farklılıklar gösterdiği, bazı tümörlerde arttığı (2,4,16,61,85,91), bazılarında azaltıdığı (2,85,91) , bazılarında ise fark gözlenmediği(67,90,91) çeşitli araştırmacılar tarafından bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda incelenen doku örneği adenokarsinoma aittir. Bu örnek ile komşu normal dokunun aktivite ve kinetik çalışmaları yapıldığında tümör dokusunda belirgin olarak azalmış olduğu fakat benzer ısı, substrat konsantrasyonu, pH, zaman değişkenliği ile ilgili kinetik özellikler sergilediği gösterilmiştir. Normal doku için GST Km değeri 96 mikromol GSH, kanser dokusunda ise 112 mikromol GSH olarak saptanmıştır. Değerler literatürde bildirilen sonuçlar ile uyumludur(20,59,77). GST düzeylerinin yüksek seyrettiği hücre kültürü çalışmalarında kanser hücre soyunun kemoterapötiklere direnç gösterdiği saptanmıştır(4,71,77,91). Rezistans olamayan adenokarsinomda ise GST değerlerinin düşük olduğu bildirilmiştir(91). Bu anlamda tümör dokusunda GST düzeylerinin tespiti belkide kemoterapi rezistansından sorumlu bir neden teşkil ettiğinden kanser tedavisinin sonuçlarının önceden değerlendirilmesinde önemli bilgiler sağlayabilecektir.

Sitozolün çeşitli ısılarda koruyucusuz olarak saklanmasının aktivite üzerine etkileri incelendiğinde bir aylık bekletme esnasında –20 ^{0}C'de değişme olmaz iken +4 ^{0}C ve oda sıcaklıklarında düşüşler gözlenmiştir. Yapılan bir çalışmada sitozolik örnekler –20, -80, -196 ^{0}C'de iki yıl saklanması sonucunda aktivitede değişiklik olmadığı bildirilmiştir(72). Oda sıcaklığında aktivite yaklaşık 20.günde yarıya düşmesine rağmen 1.ay sonunda hala aktivite alınıyor olması (normalin yaklaşık %30'u) enzimin çok dayanıklı olduğunu düşündürmektedir.

Buzdolabında +4 °C'de bekletilme ile ise aktivitede 1.ay'da aktivitenin yaklaşık %70-80'inin korunduğu gösterilmiştir.

Sigara içimi kuşkusuz akciğer kanserinin en önemli nedenidir. Bunun yanında sigara içimi ile kuvvettli ilişki kurulan diğer kanserleri içinde larenks, oral kavite ve mesane kanserleri en öne çıkanlardır. Sigara içimi ile meydana gelen veya çevresel kirlilikle özellikle de fosil yakıtların yanmaları ile ortaya çıkan ve bir çok yolla vücuda giren benzopirenler gibi kimyasal kanserojenler biyotransformasyonları sırasında bir seri oksidasyon ve konjugasyon reaksiyonları ile detoksifiye edilmekte veya yeni daha aktif kanserojenlere dönüştürülmektedir (3,13,41). Bunlara örnek olarak polisiklik aromatik hidrokarbonları (PAH) verebiliriz. PAH'lar kendileri daha düşük düzeyli kanserojenler iken vucutta bir seri oksidasyon ile daha aktif ve zararlı kanserojenlere dönüştürülmektedirler(20). Ksenobiotikler vucutta Faz I ve Faz II enzimleri ile detoksifiye edilirken faz I genellikle Sitokrom p450 sistemi ile nadiren flavin-karışık fonksiyonlu oksidasyon ile yükseltgenir (karsinojenler daha sonra sıklıkla nitro-redüksiyon veya epoksid hidrolaz ile aktiflenir) ve daha sonra faz II enzimleri ile glukronillenir veya glutatyon konjugatları oluşturularak polar hale getirilerek idrar ile atılmaları sağlanır. Bunun yanıda kanserojenlerin elektrofilik maddelere döngüsünde en az bir adım oksidasyon (faz I) vardır ve toksik olabilmeleri için yeterli olabildiği gibi daha geri planda faz II ile de bazı durumlarda genotoksik elektrofillerin ortaya çıkmaları mümkündür(20). Zayıf elektrofilik bazı maddeler (örneğin aril-hidroksilaminler ve benzil alkoller) sulfasyon, asilasyon ile, glukronidasyon ve hatta daha az miktarda olmak üzere GSH ile aktiflenerek toksik hale geçebilir(20).

Genetik çeşitlilik sebebiyle aktiviteleri artan Faz I sitokrom P450 1A1 (CYP1A1) enzimleri veya azalmış Faz II Glutatyon transferaz enzimleri ile kanser riskinde artma olduğu gösterilmiştir (1). Petruzelli (74)ve arkadaşları 1988 yılında aril hidrokarbon hidroksilaz enzim düzeylerinin sigara içen akciğer kanserli vakalarda yüksek olduğunu göstermiştir. Pelkonen (69) ve Kouri (48) aril hidrokarbon hidroksilaz enzim indüklenebilirliği ile sigaraya bağımlı akciğer kanserleri arasında ilişki olduğunu göstermiştir. Fakat son yıllarda tek başına aril hidrokarbon hidroksilaz enzim aktivitesinin benzopirenleri aktifleyerek DNA 'ya bağlanmaları konusunda yeterli olmadığı düşünülerek doku spesifik CYP 1A1 ekspresyonu daha önem kazanmıştır. Petersen ve arkadaşları (73) 1991 yılında CYP1A1'in yüksek indüklenebilen fenotipini ve MspI polimorfizmini tarif etmiştir. CYP 1A1 için MspI polimorfizmi ile yakından bağlatılı enzimin hem bağlayıcı bölgesinde değişikliğe yolaçan ekzon 7 de izolösin ile valinin yer değiştirmesi ile oluşan bir başka polimorfizm 1991'de Hayashi (31) tarafından tarif edilmiş ve bu genotip enzimin değişmesine ve epidermoid ve küçük hücreli akciğer kanserlerine sebep olduğu bildirilmiştir.

Kawajiri ve Nakachi (43)1990'ların başında homozigot MspI m2 (nadir görülen) varyantının Japon topluluğunda akciğer kanseri yatkınlığı arasında önemli bir korelasyon olduğunu göstermişlerdir. Sonradan m2 allelinin beyaz ırkta nadir olduğu gösterilmiştir (1,34,62,76,81,86). Ambrosone ve arkadaşları (1) meme kanserli olgularda GST null genotipi ile CYP 1A1 (ekzon 7 İle/val)polimorfizmi incelemesinde normalden farklılık saptamamışlardır. CYP 1A1 MspI polimorfizmi ile uyumlu beyaz ırk değerlerine(%15-25) benzer oranlar

diğer çalışmalarda da bildirmiştir(22,34,82). Bu çalışmalarda riskli allel ile çalışmalardaki diğer parametrelerle ilişki kurulamamıştır.

Hawaii'de yapılan bir başka çalışmada CYP 1A1 MspI polimorfizminde varyant tip Japonlarda %36.8, beyazlarda %8.9, Hawaii'lilerde %42.4 olarak tespit edilmiş aynı zamanda CYP 1A1 ekzon 7 İle/Val varyantında ise sırasıyla %24.4, % 3.4, 16.3 olarak bulunmuştur. Aynı çalışmada GST mu null fenotipi daha önce bildirilen diğer örneklemelerle uyumlu olduğu gösterilmiştir. En az bir MspI alleli taşımanın küçük hücreli kanser gelişim riskini 2.4 kat arttırdığı ileri sürülmüş olup tüm akciğer kanserleri bir arada tutulduğunda ise istatistiksel bir bağlantı tespit edilmemiştir(52).

CYP 1A1 ekzon 7 İle/Val varyantı ve m2 varyantı beyaz ırkta az oranda (%10-20) rastlanırken Amerikan zencilerinde, Japonlar, Çinliler, Koreliler, Hawaii'liler, Şilililerde birbirine yakın bir şekilde yaklaşık %35-55 gibi oranlarda yüksek olarak gözlenmiştir (1,22,31,36,52,71,75).

Bizim çalışmamızda CYP 1A1 ekzon 7 İle/Val varyantı kontrol grubunda %44,4 hasta grubunda ise %36,1 olarak bulunmuştur. Bu değerler bizim beyaz ırka dahil olmamıza rağmen bu polimorfizm açısından diğer etnik gruplara benzediğimizi göstermektedir.

Mu sınıf glutatyon transferaz (GSTM1) beyaz ırkta, Japon, Hawaii, Şili, Çin, Kore ve Hint toplumlarında %31-66 null genotipini taşıdıkları, siyahlarda ise GSTT1 null genotipinin yüksek olduğu gösterilmiştir (17,36,52,55,71,84). Diğer yandan her iki GST altgrubunun null genotiplerinin birlikteliğinde kanser ihtimalinin daha yüksek olduğu gösterilmiştir(19,45,80). Bizim toplumumuzda kontrol grubunda null genotipi %51,7 akciğer kanserli vakalarda %51,5 olarak

bulunmuştur. Beyaz ırk için literatürde bildirilen oranlarla uyumluluk göstermektedir.

Yapılan çalışmalarda null genotipi olanların bazı tip kanserlere meylinin arttığı saptanmıştır. Bir çok çalışmacı akciğer kanserine meyil ile null genotipi arasında ilişki bulmuşlardır(28,37,38,63,64).Benzer ilişkiler kolorektal kanserler(95) ve skuamoz hücreli kanserler, oral kavite kanserleri (42) içinde konulmuştur. Sigara içenlerde mesane ve larenks kanseri olanlar arasında GST mu null genotipi olanların diğerlerinden 2 kat fazla olduğu gösterilmiştir(50). Zhong ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada GST M1 "null" genotipinin mesane ve meme kanserinde normal populasyondan farklı değil iken kolon kanserini 1.7 kat arttırdığı gösterilmiştir (95). Çocukluk çağı ALL için CYP 1A1 mutasyonları ve GST mu null genotipi birlikteliği risk teşkil ettiği bildirilmiştir(49). Japonya'da yapılan otopsi çalışması sonrasında Harada ve arkadaşları tarafından 168 karaciğer doku örneklerini incelediklerinde GST1 için "null" genotipi olanlarda hepatit ve hepatomanın kontrolden fazla olduğu gösterilmiştir (30). Çevresel bir diğer etmen olan aflatoksin B1'e maruz kalmanın ile p53 mutasyonları ve hepatosellüler karsinoma açısından araştırıldığında GST mu null taşıyanların çok yüksek olduğu gösterilmiştir(35). Bu bulgular Board'ın null allel taşıyanların bazı elektrofilik kanserojenlere daha yüksek dozajda maruz kaldıkları fikrini desteklemektedir. Diğer yandan Brockmöller ve diğer bir çok araştırmacı ise çeşitli tip akciğer kanserlerinde, kolorektal adenomalarda null genotipi ile ilişki olmadığını bildirmiştir(12,19,39,45,54,65). İngilterede yapılan 23 vaka-kontrol çalışmasının meta analizi sonucunda GST mu null genotipinin akciğer kanseri riskini arttırmadığı ileri sürülmüştür(38). Sigara içipte kanser olmamış vakalarda

GST mu pozitifliğinin yüksek olduğu bununda bir çeşit protektif etki olduğu bildirilmiştir(27).

Bizim çalışmamızda kanser ve kontrol grupları arasında anlamlı fark gözlenmemesine rağmen null genotipi olanların özgeçmişlerinde asbest, solvent, petrol ürünleri ve aşırı tozlu ortamlarda çalışmak, ham deri işlenmesinde çalışmak gibi diğer olası kanserojenlerle temasının GST mu + olanlardan anlamlı şekilde fazla olduğu saptanmıştır (p=0.006). Yine istatistiksel anlama ulaşmasa dahi null genotipi taşıyanların özgeçmişinde geçirilmiş akciğer hastalığı ve 1.derece akrabalarda kanser varlığı diğer gruptan fazla olarak tespit edilmiştir.

PAH ve diğer elektrofilik maddelerin DNA gibi makromoleküllere ilgisi1960'lardan itibaren bilinmektedir(20). PAH-DNA birleşimi düzeylerinin sadece hızlı indüklenebilir CYP ailesi gen polimorfizmleri (69,74,76,93) ile değil aynı zamanda GST mu null genotipi taşıyanlarda diğerlerine göre daha yüksek PAH-DNA bileşim düzeyleri tespit edilmiştir(6,78,82,86). Polonyanın çevre kirliliği olan bölgelerindeki akciğer kanserli vakalarda PAH-DNA bileşiminin anlamlı bir şekilde daha yüksek olduğu ve aynı grupta GST mu null genotipi ve CYP 1A1 İle/Val varyantı taşıyanlarda adenokarsinom oranının ileri derecede anlamlı olduğu bildirilmiştir(14).

Bizim çalışmamızda da GST null ve CYP 1A1 (ile/Val) %13 olarak saptanmıştır ve adenokarsinom oranı anlamlı şekilde fazladır (p=0.034 k2=4,507) fakat kontrol grubumuzla karşılaştırıldığında ise bu haplotip kontrol grubumuzda (%29,5) anlamlı bir şekilde yüksektir (p=0.021). Almanyada 12 vaka-kontrol çalışmasının meta analiziyle GST mu null genotipi ile CYP 1A1 in

m2/m2 ve Val/Val varyantlarından her hangi birisiyle birlikteliğinin akciğer kanserini arttırdığı gösterilmiştir(32). Muhtemelen çalışma grubumuzun sayısının azlığından homozigot mutant CYP 1A1 genotipi çok düşük bulunmuştur. Bu yüzden istatistiksel yorum yapmak mümkün olamamıştır. Sigara içenlerde bu genotiplerin birlikteliği p53 geninde daha sık mutasyon ile seyrettiği gösterilmiştir(11). Bunun yanında baş boyun tümörleri ile ilgili bir çalışmada ise kanser vakalarındaki gen polmorfizmleri ile kontrollerde saptananlar arasında istatistiksel fark gözlenmemiştir(66). Kolo-rektal, akciğer, özefagus, oral kavite kanseri riskinin de riskli genotiplerin kombinasyonuna sahip kişilerde arttığı gösterilmiştir(5,46).

Bizim çalışmamız da GST mu null ve CYP 1A1 (İle/İle) birlikteliği %36,2 olarak saptanmıştır ve bu grupta istatistiksel anlama ulaşmasa dahi epidermoid kansere fazla, adenokarsinoma daha az oranda rastlanmıştır. Bu grupta adenokarsinom %17,4 oranındayken en az bir mutant CYP alleli taşıyanlarda %31,4 olarak gözlenmiştir(Odd değeri 2,177 %95 CI=0,597-7,933).

Hastalarımızda yaptığımız anket sonucunda meyva yemek ile alışkanlıkları sorgulandığında az meyva tüketenlerde anlamlı bir şekilded epidermoid kanser gelişiminin yüksek olduğu (p=0.014) ve özgeçmişinde akciğer hastalığı oların meyva tüketimlerinin diğerlerine göre anlamlı bir şekilde düşük olduğu görülmüştür(p=0.017). Yine sigarayı 20 paket yıldan fazla içenlerin anlamılı bir şekilde az meyva tükettikleri saptanmıştır (p=0.03).

Sonuç olarak

1) İncelenen normal ve kanserli akciğer doku örneklerinin GST enziminin kinetik özellikleri açısından farklı bulunmamıştır. Bizim çalışmamızda

kullanılan adenokarsinom dokusunun GST enzim aktivitelerinin komşu normal dokudan düşük oldukları gözlenmiştir.

2) Hem normal hem kanserli dokudan elde edilen sitozolik örneklerin çeşitli ısılarda saklanmaları sonucunda aktivitelerinde paralel değişiklikler gözlenmiştir. Oda sıcaklığında bekletilmelerine rağmen birinci ayın sonunda başlangıç değerlerinin yaklaşık %30 dolayında aktivite ölçülmesi enzimin çevresel etmenlere karşı oldukça dirençli olduğu fikri elde edilmiştir.

3) Hem akciğer kanserli hastalardan hemde sağlıklı kontrollerden elde edilen plazma örneklerinin GST aktivitesinin substrat olarak GSH-CDNB kullanılmalarıyla yapılan spektrofotometrik ölçümlerinde çok düşük aktivitelerin gözlendi. Sitozolik bir enzim olan GST'nin plazmada spektrofotometrik olarak ölçülmesinin uygun olmadığı kanaatine varıldı. Ölçülen aktiviteler zemin aktivitesi olarak değerlendirildi. Literatür incelemesinde plazma ölçümlerinin ELİZA ile yapıldığı görülmüştür.

4) CYP 1A1 ve GST mu gen polimorfizmleri açısından hasta ve kontrol grubu arasında farklılık saptanmamıştır. Benzer bulgular bir çok çalışmada da gözlenmiştir. CYP 1A1 heterozigot mutan genotipinin bizim toplumumuzda yüksek olduğu gösterilmiştir. Beyaz ırka dahil olmamıza rağmen bu bulgu CYP polimorfizmi açısından Uzakdoğululara benzer olduğumuzu ortaya koymaktadır.

5) Hasta grubu kendi içinde dğerlendirildiğinde GST mu null genotipi taşıyanların kanserojen temasının daha fazla olduğu saptanmış ve daha önceden bildirilen null genotipine sahip olanların elektrofilik

kanserojenlere duyarlılığının arttığını bildiren çalışmalar ile uyumlu olduğu tespit edilmiştir.

6) GST null ve CYP 1A1 heterozigot mutant genotiplerine aynı anda sahip olanlarda adenokarsinomanın daha sık olduğu gösterilmiştir ve literatür ile uyumludur.

7) Hastalara yapılan anket sonucunda az meyva tüketenlerde anlamlı bir şekilde yüksek epidermoid karsinom geliştiği saptandı.

Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar literatür ile karşılaştırıldığında uyumlu olarak saptanmıştır. Kanserli dokuda GST enzim aktivitesi düşük olarak bulunmuştur. Literatür ile karşılaştırıldığında hem yüksek, hem aynı, hemde düşük sonuçlar bildirilmiştir. Kinetik çalışmalar açısından kanserli ve normal dokudan elde edilen sitozolde benzer kinetik davranışlar gözlenmiştir. Beyaz ırka dahil olmamıza rağmen CYP 1A1 polimorfizmi açısından Uzakdoğulu, Güney Amerikalılara benzediğimiz saptanmıştır. GST polimorfizmi diğer topluluklarda bildirilenlerle uyumludur. Hasta ve kontrol grubunda benzer oranlarda gen polimorfizmleri saptanmıştır. Homozigot mutant CYP 1A1 genotipi düşük oranda bulunmasının nedeni olarak çalışma gruplarımızın sayısının nispeten düşük olmasından kaynaklandığını ve Türk toplumundaki değerleri daha iyi saptamak amacıyla vaka sayısının arttırılması gerektiğini düşünmekteyiz.

6.ÖZET

Sigara içimi ile meydana gelen veya çevresel kirlilikle vücuda giren benzopirenler gibi kimyasal kanserojenler bir seri oksidasyon ve konjugasyon reaksiyonları ile detoksifiye edilmekte veya yeni aktif kanserojen olarak üretilmektedir. Genetik çeşitlilik sebebiyle artan Faz I sitokrom P450 1A1 (CYP1A1) enzimleri veya azalmış Faz II Glutatyon S-transferaz(GST) enzimleri ile kanser riskinde artma olduğu gösterilmiştir. Çalışmamızda Türk toplumundaki GST mu null genotip sıklığı ve CYP 1A1 mutant varyantların sıklığı hem akciğer kanserli hem de kontrol vakalarında tespit edilmesi amaçlandı.

Kanserli ve normal akciğer dokusunda yapılan GST enziminin kinetik analizinde kanserli dokuda enzimin daha düşük aktiviteye sahip olduğu gözlenmiştir. Her iki dokudan elde edilen sitozolik örneklerde benzer Km değerleri elde eilmiştir. GST enziminin saklama koşulları incelendiğinde oda sıcaklığında bir ay bekleme sonrasında hala başlangıç değerinin yaklaşık %30'u kadar enzim aktivitesi tespit edilmiştir, +4 C'de bir ay sonrasınd enzim aktivitesi normalin yaklaşık %70-80'ı kadar bulunmuş bunun yanında –20C'de aktivite değişimi gözlenmemiştir.

Her iki gen polimorfizmi sıklığı açısından hasta ve kontroller arasında farklılık saptanmadı. CYP 1A1 mutant varyant (ile/Val) sıklığının hem hasta hemde kontrol grubunda (sırasıyla %36.1 , %44.4) diğer beyaz ırka dahil olan topluluklardan yüksek olduğu saptandı. Hasta ve konrol gruplarında GST mu null genotipi sıklığı ise diğer topluluklarla uyumlu olarak saptandı (sırasıyla %51.5, %51.7). Oran olarak her iki grup birbirlerine benzemelerine rağmen hasta grubu içinde yapılan incelemede geçmişinde sigaradan hariç diğer bir olası kanserojenle temas GST mu null genotipi taşıyanlarda anlamlı bir şekilde yüksek saptandı ($p<0.01$). Yine null genotipi taşıyanlarda CYP 1A1'in mutant formları varlığında adenokarsinom anlamlı bir şekilde yüksek olarak bulunmuştur($p<0.05$, $k2=4.507$). fakat bu haplotip kontrol grubunda daha da yüksektir ($p<0.05$). GST null ve CYP 1A1 homozigot normal varyantı beraber taşıyanlarda ise epidermoid kanser yüksek olup istatistiksel anlamlılığa ulaşmamıştır. Diğer taraftan meyva tüketimi az olan hastalarda epidermoid kanser gelişimi anlamlı şekilde yüksek olarak bulunmuştur.($p<0.05$).

7. SUMMARY

Environmental factors, such as tobacco smoke, diet and occupational exposures produce the electrophilic chemical carcinogens like benzo(a)pyrens in body. In general, the metabolism of carcinogens to electrophiles involves at least one oxidative (phase I) step than those are conjugated with (phase II) a series of materials, such as glutathione to achive detoxification. Because of the genetic diversity, It was suggested that an increased phase I enzyme activity (CYP1A1) and meanwhile a decreased ability of phase II enzyme (Glutathione S-transferase) can incerease cancer risk individually. In present study we planned to expose genetic polymorphism of CYP 1A1 and GST mu in Turkish patients with lung cancer and controls.

Kinetic analysis of GST activity in normal lung tissue and lung tissue with cancer showed that cancer tissue had decreased activity than normal one. Both cytosolic fraction had similar Km for GSH nearly 100μM levels. Storage of cytosols in room temperature for one month caused the decrease of GST activity to 30% levels of initial activity. In +4 ^{0}C, Storage of cytosols caused the decrease only 20 to 30% of initial values and showed no changes for activity in –20 ^{0}C for one month.

this study showed that no differences between patient and control groups for genetic polymorphism of genes. We found CYP 1A1 mutant variant (Ile/Val) higher than the other Caucasian populations. Our findings is similar Far East populations in both groups (36,1% for patients group, 44,4% for controls). In spite of similarity between both groups for GST mu polymorphism, in paitents group, patients with GST mu null genotype had statistically significant positive history for exposure of carcinogens other than smoking, such as asbest, petrochemicals, and other chemicals exposure($p<0.01$). In addition the patiens who had both GST mu null and CYP 1A1 mutant variant together, had increased risk for adenocarcinoma of lung ($p<0.05$) and also the patients who consumed fruits lesser amount daily had greater risk for epidermoid carcinoma of lung($p<0.05$).

8. KAYNAKLAR

1. Ambrosone, C.B.; Freundenheim, J.L.; Graham, S. et al: Cytochrome P4501A1 and Glutathione S-Transferase (M1) Gentetic polymorphisms and Postmenopausal Breast Cancer Risk. Cancer. Res. 1995; 55: 3483-3485.

2. Awasthi YC, Singh SV, Ahmad H, Moller PC, Gupta V.:Expression of glutathione S-transferase isoenzymes in human small cell lung cancer cell lines. Carcinogenesis.1988; 1:89-93.

3. Ayesh R., Idle J.R., Ritchie J.C., Crothes M.J.,Hetzel M.R.: Metabolic oxidation phenotypes as marker for susceptibility to lung cancer. Nature 1984; vol 312. 169-170.

4. Bai F, Nakanishi Y, Kawasaki M, Takayama K, Yatsunami J, Pei XH, Tsuruta N,Wakamatsu K, Hara N.:Immunohistochemical expression of glutathione S-transferase-Pi can predict chemotherapy response in patients with nonsmall cell lung carcinoma.Cancer 1996; 78(3):416-21.

5. Bartsch H, Nair U, Risch A, Rojas M, Wikman H, Alexandrov K.: Genetic polymorphism of CYP genes, alone or in combination, as a risk modifier of tobacco-related cancers. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2000 ;9(1):3-28.

6. Bartsch H, Rojas M, Nair U, Nair J, Alexandrov K.:Genetic cancer susceptibility and DNA adducts: studies in smokers, tobacco chewers, and coke oven workers.Cancer Detect Prev 1999; 23(6):445-53.

7. Berhane K, Hao XY, Egyhazi S, Hansson J, Ringborg U, Mannervik B.:Contribution of glutathione transferase M3-3 to1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea resistance in a human non-small cell lung cancer cell line.Cancer Res. 1993;53(18):4257-61 .

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

9. Board, P.G.: Biochemical genetics of glutathione S-transferase in man. Am.J.Hum.Genet. 1981; 33: 36-43.

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

11. Brockmoller J, Kaiser R, Kerb R, Cascorbi I, Jaeger V, Roots I.: Polymorphic enzymes of xenobiotic metabolism as modulators of acquired P53 mutations in bladder cancer. Pharmacogenetics. 1996; 6(6):535-45.

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

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

14. Butkiewicz D, Cole KJ, Phillips DH, Harris CC, Chorazy M. :GSTM1, GSTP1, CYP1A1 and CYP2D6 polymorphisms in lung cancer patients from an environmentally polluted region of Poland: correlation with lung DNA adduct levels. Eur J Cancer Prev. 1999; 8(4):315-23.

15. Cantlay AM, Smith CA, Wallace WA, Yap PL, Lamb D, Harrison DJ.: Heterogeneous expression and polymorphic genotype of glutathione S-transferases in human lung.Thorax 1994 ; 49(10):1010-4.

16. Castro V.M., Soderstorm M., Carlberg I., Widerstein M., Platz A., Mannervik B.,: Differences among human tumor cell lines in expression of glutathione transferase and other glutathione linked enzymes. Carcinogenesis 1990; 9:1569-76.

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

18. Chen, Y.T.; Tukey, R.H.; Swan, D.C.; Negishi, N.;Nebert, D.W.: Characterization of human P1-450 genomic gene. Clin. Res. 1983; 31:456A.

19. Chenevix-Trench G, Young J, Coggan M, Board P.:Glutathione S-transferase M1 and T1 polymorphisms: susceptibility to colon cancer and age of onset.Carcinogenesis. 1995; 16(7):1655-7.

20. Coles B, Ketterer B. :The role of glutathione and glutathione transferases in chemical carcinogenesis.Crit Rev Biochem Mol Biol. 1990;25(1):47-70.

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

22. Cosma G., Crofts F., Taioli E., Toniolo P., Garte S.: Relationship brtween genotype and function of the human CYP1A1 gene. J Toxicol. Env. Health. 1993; 40:309-316.

23. Danielson U.H., Mannervik B.,: Kinetic independence of subunits of cytosolic glutathione transferase from rat. Biochem.J. 1985; 231:263-267.

24. DeJong, J.L.; Mohandas, T.; Tu, C.-P.D.: The human H(b) (mu) class glutathione S-transferases are encoded by a dispersed gene family. Biochem.Biophys.Res.Commun. 1991; 180: 15-22.

25. Di Ilio C., Del Boccio G., Aceto A., Casaccia R., Mucilli f., Federici G.: elevation of glutathione trasnferase activity in human lung tumor. Carcinogenesis 1988; 9(2):335-340.

26. Ellmann G.L.: tissue sulphydryl groups. Arch.Biochem.Biophys. 1959; 82:70-77.

27. Ge H, Lam WK, Lee J, Wong MP, Yew WW, Lung ML.:Analysis of L-myc and GSTM1 genotypes in Chinese non-small cell lung carcinoma patients. Lung Cancer. 1996;15(3):355-66.

28. Grinberg-Funes RA, Singh VN, Perera FP, Bell DA, Young TL, Dickey C, Wang LW, Santella RM.:Polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in smokers and their relationship to micronutrient levels and the glutathione-S-transferase M1 genotype. Carcinogenesis. 1994 ;15(11):2449-54.

29. Habig W.H., Jakoby W.B.: Assays for diferantiation of Glutathione S-transferases. Methods in Enzymology 1981; 77:398-405.

30. Harada, S.; Abei, M.; Tanaka, N.; Agarwal, D.P.; Goedde, H.W.: Liver glutathione S-transferase polymorphism in Japanese and its pharmacogenetic importance. Hum.Genet. 1987; 75:322-325.

31. Hayashi S.I., Watanabe J., Nakachi K., Kawajiri K.: PCR detection of an A/G polymorphism with in exon 7 of CYP 1A1 gene: Nuc. Acids.Res. 1991; Vol 19 no:17-pp 4797.

32. Hengstler JG, Arand M, Herrero ME, Oesch F.Polymorphisms of N-acetyltransferases, glutathione S-transferases, microsomal epoxide hydrolase and sulfotransferases: influence on cancer susceptibility. Recent Results Cancer Res. 1998; 154:47-85.

33. Hida T, Kuwabara M, Ariyoshi Y, Takahashi T, Sugiura T, Hosoda K, Niitsu Y,Ueda R.:Serum glutathione S-transferase-pi level as a tumor marker for non-small celllung cancer. Potential predictive value in chemotherapeutic response.Cancer. 1994; 73(5):1377-82.

34. Hirvonen A., Pusiainen K.H., Antilla S., Karjalainen A., Vainio H.: Polymorphism in CYP 1A1 and CYP 2D6 genes: Possible association with susceptibility to lung cancer. Env. Heal.Perspec. Suppl. 1993; Vol.101(suppl.3):109-112.

35. Hollstein MC, Wild CP, Bleicher F, Chutimataewin S, Harris CC, Srivatanakul P, Montesano R.:p53 mutations and aflatoxin B1 exposure in hepatocellular carcinoma patients from Thailand.:Int J Cancer. 1993; 2;53(1):51-5.

36. Hong YS, Chang JH, Kwon OJ, Ham YA, Choi JH.: Polymorphism of the CYP1A1 and glutathione-S-transferase gene in Korean lung cancer patients. Exp Mol Med.1998;30(4):192-8.

37. Hou SM, Ryberg D, Falt S, Deverill A, Tefre T, Borresen AL, Haugen A, Lambert B.: GSTM1 and NAT2 polymorphisms in operable and non-operable lung cancer patients. Carcinogenesis. 2000; 21(1):49-54.

38. Houlston RS.:Glutathione S-transferase M1 status and lung cancer risk: a meta-analysis. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 1999; 8(8):675-82.

39. Hsieh LL, Huang RC, Yu MW, Chen CJ, Liaw YF.:L-myc, GST M1 genetic polymorphism and hepatocellular carcinoma risk among chronic hepatitis B carriers. Cancer Lett. 1996; 103(2):171-6.

40. Jenesson H., Alin P., Mannervik B.: Glutathione transferase isoenzymes from rat liver cytosol. Meth. Enzymol. 1985; 113:504-507.

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

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

43. Kawajiri, K.; Nakachi, K.; Imai, K.; Yoshii, A. et al.: Identification of genetically high-risk induviduals to lung cancer by DNA polymorphism of cytochrome P4501A1 gene. FEBS Lett. 1990; 263: 131-133.

44. Kawajiri, K.; Watanabe, J.; Gotoh, O.; Tagashira, Y. et al.: Structure and drug inducibilty of human cytochrome P-450c gene. Europ.J.Biochem. 1986; 159: 219-225.

45. Kim JW, Lee CG, Park YG, Kim KS, Kim IK, Sohn YW, Min HK, Lee JM, Namkoong SE.:Combined analysis of germline polymorphisms of p53, GSTM1, GSTT1, CYP1A1, and CYP2E1: relation to the incidence rate of cervical carcinoma.Cancer. 2000; 88(9):2082-91.

46. Kiss I, Sandor J, Pajkos G, Bogner B, Hegedus G, Ember I.: Colorectal cancer risk in relation to genetic polymorphism of cytochrome P450 1A1, 2E1, and glutathione-S-transferase M1 enzymes. Anticancer Res. 2000; 20(1B):519-22.

47. Koskelo K., Valmet E., Tenhunen R.: purification and characterization of an acid glutathione S-transferase from human lung. Scan J.clin.Lab.Invest 1981; 41(7):683-689.

48. Kouri, R.E.; McKinney, C.E.; Slomiany, D.J.; Snodgrass, D.R. et al.: Positive correlation between high aryl hydrocarbon hydroxylase activity and primary lung cancer as analysed in cryopreserved lymphocytes. Cancer Res. 1982; 42: 5030-5037.

49. Krajinovic M, Labuda D, Richer C, Karimi S, Sinnett D.: Susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia: influence of CYP1A1, CYP2D6, GSTM1, and GSTT1 genetic polymorphisms. Blood. 1999; 93(5):1496-501.

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

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

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

53. Lee M.J., Disdale D.: Immunolocalization of glutathione S-transferase isoenzymes in bronchiolar epithelium of rats and mice. Am.J.Physiol 1994; 267:L766*74.

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

55. London SJ, Daly AK, Cooper J, Navidi WC, Carpenter CL, Idle JR.:Polymorphism of glutathione S-transferase M1 and lung cancer risk among African-Americans and Caucasians in Los Angeles County, California. J Natl Cancer Inst. 1995; 87(16):1246-53.

56. Lowry O.H., Rosebough N.J., Farr A.L.,Raandall R.J.: Protein measurement with folin phenol reagent. J. Biol.Chem. 1951; 193:265-275.

57. Mannervik, B.; Awasthi, Y.C; Board, P.G.; Hayes, J.D; Di Ilio, C.; Ketterer, B.; Litowsky, I.; Morgenstern, R.; Muramatsu, M.; Pearson, W.R.; Pickett, C.B.; Sato, K.; Widersten, M.; Wolf, R.C.: Nomenclature for human glutathione transferases. Biochem.J. 1992; 282:305-306 .

58. Mannervik B., Guthenberg C.,: Glutathione transferase(human plecenta). Meth.Enzymol. 1981; 77:231-235.

59. Meyer DJ.:Significance of an unusually low Km for glutathione in glutathione transferases of the alpha, mu and pi classes. Xenobiotica. 1993; 23(8):823-34.

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

61. Moscow JA, Fairchild CR, Madden MJ, Ransom DT, Wieand HS, O'Brien EE, Poplack DG, Cossman J, Myers CE, Cowan KH.: Expression of anionic glutathione-S-transferase and P-glycoprotein genes in human tissues and tumors. Cancer Res. 1989; 49(6):1422-8.

62. Mrozikiewicz P.M., Landt O., Cascorbi I., Roots I.: Peptide nucleic acid-mediated polymerse chain reaction clamping allows allelic allocation of CYP 1A1 mutations. Anal.Biochem. 1997; 250:256-257.

63. Nakajima T, Elovaara E, Anttila S, Hirvonen A, Camus AM, Hayes JD, Ketterer B, Vainio H.:Expression and polymorphism of glutathione S-transferase in human lungs: risk factors in smoking-related lung cancer. Carcinogenesis. 1995 ,16(4):707-11.

64. Nazar-Stewart V, Motulsky AG, Eaton DL, White E, Hornung SK, Leng ZT,Stapleton P, Weiss NS.:The glutathione S-transferase mu polymorphism as a marker for susceptibility to lung carcinoma.Cancer Res. 1993; 15;53(10 Suppl):2313-8.

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

66. Oude Ophuis MB, van Lieshout EM, Roelofs HM, Peters WH, Manni JJ.:Glutathione S-transferase M1 and T1 and cytochrome P4501A1 polymorphisms in relation to the risk for benign and malignant head and neck lesions.Cancer. 1998; 82(5):936-43.

67. Pasquini r., Sforzolini G.S., Cavaliere A., Savino A., Monarca S., Pucetti P., Fatigoni C., Antonini G.: Enzymatic activation of human lung tissue: relationship with smoking habits. Carcinogenesis 1988; 9(8):1411-1416.

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

69. Pelkonen O.: Carcinogen metabolism and individual susceptibility. Scan.J.Work Environ.Health, 1992 ; 18:17-21 .

70. Perera, F.P.: Envoriment and cancer: who are susceptible? Science 1997; 278: 1068-1073.

71. Persson I, Johansson I, Lou YC, Yue QY, Duan LS, Bertilsson L, Ingelman-Sundberg M.:Genetic polymorphism of xenobiotic metabolizing enzymes among Chinese lung cancer patients. Int J Cancer. 1999; 81(3):325-9.

72. Peters W.H., Roelofs H.M.: Effect of long term storage on cytosolic glutathione S-transferases. Biochem.Mol.Biol.Int 1997; 41(5):913-917.

73. Petersen, D.D.; McKinney, C.E.; Ikeya, K.; Smith, H.H. et al.: Human CYP 1A1 gene: cosegration of the enzyme inducibility phenotype and an RFLP. Am.J.Hum.Genet. 1991; 48:720-725.

74. Petruzzelli S, Camus AM, Carrozzi L, Ghelarducci L, Rindi M, Menconi G,Angeletti CA, Ahotupa M, Hietanen E, Aitio A, et al.:Long-lasting effects of tobacco smoking on pulmonary drug-metabolizing enzymes:a case-control study on lung cancer patients.Cancer Res. 1988; 48(16):4695-700.

75. Quinones L, Berthou F, Varela N, Simon B, Gil L, Lucas D.:Ethnic susceptibility to lung cancer: differences in CYP2E1, CYP1A1 and GSTM1 genetic polymorphisms between French Caucasian and Chilean populations. Cancer Lett. 1999; 141(1-2):167-71.

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

77. Ricci G.,Caccuri A.M., Bello M.L., Pastore A.,Pemonte F., Federici G.: Colorimetric and fluorometric assays of Glutathione Transferase based on 7-chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole: Anal. Biochem. 1994; 218, 463-465.

78. Rojas M, Alexandrov K, Cascorbi I, Brockmoller J, Likhachev A, Pozharisski K, Bouvier G, Auburtin G, Mayer L, Kopp-Schneider A, Roots I, Bartsch H.: High benzo[a]pyrene diol-epoxide DNA adduct levels in lung and blood cells from individuals with combined CYP1A1 MspI/Msp-GSTM1*0/*0 genotypes. Pharmacogenetics 1998; 8(2):109-18.

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

80. Salagovic J, Kalina I, Stubna J, Habalova V, Hrivnak M, Valansky L, Kohut A, Biros E.:Genetic polymorphism of glutathione S-transferases M1 and T1 as a risk factor in lung and bladder cancers. Neoplasma. 1998; 45(5):312-7.

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

82. Schoket B., Phillips D.H., Kostic S., Vincze I.: Smoking associated bulky DNA adducts in bronhial tissue related to CYP 1A1 MspI and GSTM1 genotypes in lung patients. Carcinogenesis 1998; 19 (5):841-846.

83. Scott, E.M.; Wright, R.C.: Variability of glutathione S-transferase of human erythrocytes. Am.J.Hum.Genet. 1980; 32:115-117.

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

85. Singh SV, Haque AK, Ahmad H, Medh RD, Awasthi YC.:Glutathione S-transferase isoenzymes in human lung tumors. Carcinogenesis. 1988; 9:1681-5.

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

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

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

89. Thun M.J.: Mixed progress againist lung cancer. Tobacco Control. 1998; 7:223-226.

90. Toussaint C, Albin N, Massaad L, Grunenwald D, Parise O Jr, Morizet J, Gouyette A, Chabot GG.:Main drug- and carcinogen-metabolizing enzyme systems in human non-small cell lung cancer and peritumoral tissues.Cancer Res. 1993;53(19):4608-12.

91. Volm M, Mattern J, Samsel B.:Relationship of inherent resistance to doxorubicin, proliferative activity andexpression of P-glycoprotein 170,

and glutathione S-transferase-pi in human lungtumors.Cancer. 1992; 70(4):764-9.

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

93. Zhang J., Ichiba M., Feng y., Pan G., Hanaoka T., Yamano Y., Hara K., Takahashi K., Tomokuni K.: Aromatic DNA adduct in coke-oven workers, in relation to exposure, lifestyle and genetic polymorphism of metabolic enzymes. Int Arch.Occup.Environ Health 2000; 73(2):127-135.

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

95. Zhong, S.; Wolf, C.R.; Spurr, N.K.: Relationship between the GSTM1 genetic polymorphism and susceptibility to bladder, breast and colon cancer. Carcinogenesis 1993; 14: 1821-1824.

9. Özgeçmiş

İstanbul'da 1966 yılında doğdum. İlköğrenimimi Bahçelievler Fikret Yüzatlı ilkokulu'nda tamamladıktan sonra orta ve lise eğitimimi Bakırköy Çavuşoğlu Lisesi'nde tamamladım. 1989 yılında İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi'nden mezun oldum. 1990-1995 yılları arasında İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı'nda Uzmanlık eğitimimi tamamladım. Aynı yıl İ.Ü.Sağlık Bilimleri Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalı'nda doktora eğitimime başladım. İ.Ü. Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü'nde Moleküler Tıp Anabilim Dalı'nda 1995 yılında Uzman olarak çalışmaya başladım ve halen bu kurumda çalışmaktayım. Askerlik görevimi 2000 yılında İzmir Jandarma Dispanseri'nde tamamladım.

Uzm.Dr. Oğuz Öztürk