

44742

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ÇEŞİTLİ KANSER VAKALARINDA
SERUM GLUTATYON - S TRANSFERAZ (GST)
İZOENZİMLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

(DOKTORA TEZİ)

Dr.Hüsamettin VATANSEV

T 44742

DANIŞMAN

Yrd.Doç.Dr. Mehmet AKÖZ

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
T.C. SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KONYA - 1995

TEŐEKKÜR

Tezimin hazırlanmasında ve doktora eğitimim süresince gösterdiği ilgi ve maddi-manevi katkılarından dolayı, her zaman Őükranla anacağım, kıymetli hocam Sayın Doç. Dr. İdris AKKUŐ'a, danışmanım Sayın Yrd. Doç. Dr. Mehmet AKÖZ'e, hocam Sayın Doç. Dr. Sadık BÜYÜKBAŐ'a, Sayın Doç.Dr. Mehmet GÜRBİLEK'e, yardımlarından dolayı Uzm. Dr. Bünyamin KAPTANOĐLU'na, Uzm. Dr. Celalettin VATANSEV'e tüm öğretim üyesi hocalarım ile çalışma arkadaşlarıma, ayrıca desteklerinden dolayı aileme ve büyüklerime minnettarım.

Dr.Hüsamettin VATANSEV

İÇİNDEKİLER

KISALTMALAR

1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR BİLGİLER	2
2.1. Kanser	2
2.1.1. Kanserin Önemi ve Tanımı	2
2.1.2. Kanserin Nedenleri	4
2.2. Tümör Markırları	4
2.2.1. Enzim Yapısındaki Markırlar	6
2.2.2. Hormon Markırlar	6
2.2.3. Karbonhidrat Yapısındaki Markırlar	8
2.2.4. Protein Yapısındaki Markırlar	8
2.2.5. Genetik Markırlar	9
2.2.6. Diğer Markırlar	11
2.3. Glutasyon-S Transferaz (GST) Enzimi	12
2.3.1. GST'ların Tarihçesi ve İsimlendirmesi	12
2.3.2. GST'ların Tanımlanması	14
2.3.3. GST'ların Türler Arası ve Dokular Arası Dağılımı ve Gelişime Bağlı Sentezleri	15
2.3.4. GST'ların Sınıflandırılması	18
2.3.5. GST'ların Genetiği	19
2.3.6. GST'ların Saflaştırılması	21
2.3.7. GST'ların Fizyolojik Önemi	21
2.3.8. GST'ların Fonksiyonları	22
2.3.9. GST Enziminin Katalitik ve Kinetik Özellikleri	26
2.3.10. GST İzoenzimlerinin Klinik Önemi	29
2.3.10.1. GST- α	29
2.3.10.2. GST- π	31
2.3.10.3. GST- μ	32
3. MATERYAL VE METOD	33
3.1. Materyal	33
3.1.1. Vaka Seçimi	33
3.1.2. Cihaz ve malzemeler	34
3.1.3. Kullanılan Reaktifler	34
3.2. Metod	35
3.2.1. GST- α Tayini	35
3.2.2. GST- π Tayini	36
3.2.3. GST- μ Tayini	37
3.3. İstatistik Analiz	39
4. BULGULAR	41
5. TARTIŞMA	43
6. ÖZET	58
7. KAYNAKLAR	52

KISALTMALAR

ACTH	:Adrenokortiko Tropik Hormon
ADH	:Antidiüretik Hormon
AFP	:Alfa -feto Protein
ALT	:Alanin Transaminaz
AST	:Aspartat Transaminaz
CDNB	:1-Cloro,2-4 Dinitrobenzen
CEA	:Karsino Embriyonik Antijen
ELİSA	:Enzim Linked İmmuno Sorbent Assay
GIS	:Gastro İntestinal Sistem
GSH	:Glutatyon (-SH)
GST	:Glutatyon-S transferaz
hCG	:Human Koryonik Gonodotropin
HPLC	:Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi
kD	:Kilo Dalton
nm	:nanometre
PAP	:Prostatik asit fosfataz
PBST	:Fosfat Tamponu Yıkama Solusyonu
PSA	:Prostat Spesifik Antijen
RIA	:Radyoimmünöassay
SDS	:Sodyum Dodesil Sülfat
TPA	:Doku Peptit Antijen
TSO	: <i>trans</i> -stilben oksit

1. GİRİŞ

Glutatyon-S-Transferaz (GST) lar E.C: 2.5.1.18 kodlu çok fonksiyonlu iki alt birimden oluşmuş (dimerik) bir enzim ailesidir(6,9,11-16,18-20,22-32,35-37,39-44 46-59,61-86,88-93,95,96). Bu ailedeki enzimlerin hem detoksifikasyon yapıcı hem de hücre içi bağlayıcı ve taşıyıcı görevlerinin olduğu bilinmektedir(58). Bunlar ksenobiyotiklerin (yabancı maddeler) biyotransformasyonunda önemli rol alırlar ve enzim olarak Glutatyonun (GSH) pek çok elektrofilik bileşik ile konjugasyonunu sağlarlar. Konjugasyon sonunda oluşan bileşik bu şekilde organizmadan atılır veya ksenobiyotiklerin klasik atılma yolu olan Merkaptürük asitlere çevrilir(53).Bu işlevlerin anlaşılmasıyla GST'ların mutajen, karsinojen ve diğer zararlı kimyasal maddelerin hücre içi detoksifikasyonunda rollerinin olduğu bildirilmiştir.Ayrıca metabolize edilemeyen hidrofobik-lipofilik pek çok bileşiği bağlamaları bu proteinlerin hücre içinde sınırlı çözünürlüğe sahip moleküller için depo ve transport rolü gördüklerinin delilidir(22,48,78). Bu rolleri GST'ların albüminin hücre içi eşdeğerleri olduğunu düşündürmektedir(58).

Çalışmamızda,GST izoenzimlerinin çeşitli kanser vakalarının teşhisinde ve hastalığa yakalanma riski bakımından birer markır olup olmadıkları ve sonuçların rutin çalışmalara uygulanıp uygulanamayacağıın araştırılması amaçlanmıştır.

2. LİTERATÜR BİLGİLER

2.1. Kanser

2.1.1. Kanserin Önemi ve Tanımı:

2000 yıllarında insanlar arasında ölüm sebeplerinin başında kanserin geleceğine inanılmaktadır. Yapılan geniş bir mortalite araştırmasına göre, ovaryal kanserlerin mortalite oranının son kırk yılda değişmediği ancak kanser mortalite trendinin kanser tiplerine bağlı olarak değiştiği görülmüştür(29). Hodgkin hastalığı, serviks, mide ve uterus kanserlerinde ise mortalite de belirgin bir düşme gözlenmiştir. Diğer taraftan akciğer kanseri, melanoma, multiple myeloma ve non-hodgkin lenfoma mortalitesinde belirgin bir artış bulunmuştur. Ancak, erken teşhis, sigara içmeyi azaltma ve uygun diyet gibi önlemler ile kombine edilen çok etkili bir tedavi sonucu mortalite oranı azalmaktadır(29).

Organ ve dokular oluşurken hücreler belirli bir düzen içinde, belirli iş bölümleri yaparak biraraya gelirler. Bu hücreler belirli bir hızda ve kontrol altında çoğalırlar, belirli bir hızda yıkılırlar(38).

Kanser, dokunun nisbeten kendi kendine (otonom olarak) normal dışı büyümesi olarak tarif edilebilir(10,29,38). Kanser sebebi olan maddelere "Karsinojen" adı verilir. Karsinojen madde, radyasyon gibi fiziksel, polisiklik hidrokarbon gibi kimyasal yada virus gibi biyolojik ajan olabilir. Bu gibi bir ajana maruz kalma kansere sebep olabilir. Karsinojenler, DNA üzerine direk genotoksik

etki yapabilirler(radyasyon gibi), hücre proliferasyonunda artışa yol açabilirler (hormonlar gibi), yada her iki etkiyi birden gösterebilirler (sigara dumanı gibi)(10).

Normal hücrelerin proliferasyonu onkogenler ile regüle edilir ve tümör supresör genler ile dengelenir. Kanser gelişiminde onkogenin etkisinin aktivasyona sebep olduğu yada etkisinin değiştiği veyahut bir tümör süpresör geninin kaybı yada inaktivasyonu yada ikisinin birlikte görüldüğü ileri sürülmektedir(29,38).

Anormal şekilde çoğalmaya başlayan kanser hücreleri buldukları yerdeki doku ve organları, hatta daha uzaktaki organları işgal ederek bu bölgelerin görevlerini engellerler. Sebebi iyi bilinmeyen bu hastalıkların oluş mekanizması da tam olarak bilinmemektedir(38).

1990 yılında yeni kanser vakalarının sayısı yaklaşık 1 milyon olarak tespit edilmiştir. Kanser çeşitlerinden en çok akciğer kanseri, bunu sırasıyla kolorektal kanseri, meme kanseri, prostat kanseri, mesane kanseri, non-hodgkin lenfoma, uterus kanseri, farinks ve oral kavite kanseri, pankreas kanseri, lösemi, melanoma, böbrek, mide,over,beyin ve sinir sistemi, serviks, karaciğer, larinks ve tiroid bezi kanseri, multiple myeloma, özefagus kanseri, hodgkin hastalığı ve testis kanseri izler. Gelişen teknoloji ile insanların kanser yapıcı maddelere daha çok maruz kalmaları da kanser sıklığını etkilemektedir.Görülme sıklığı ve yüksek ölüm oranına ilave olarak kanser tedavisinin pahalılığı da sosyoekonomik bazı sorunları ortaya çıkarmaktadır(29).

2.1.2. Kanserlerin Nedenleri

Kanser, tek bir sebebe bağlanamayan multifaktöryal bir hastalıktır. Bu sebeplerin arasında genetik faktörlerin yanında çevresel faktörlerin de rolü olduğu ileri sürülmektedir(38). Başlıca çevresel faktörler şunlardır:

1-İyonize radyasyon

2-Ultraviyole ışınları

3-Hava kirliliği

4-Kimyasal karsinojenler (katran, kömürün yanma ürünleri, benzen, naftilaminler, asbest, vinil klorür, krom, katkı maddeleri ve bazı ilaçlar.)

5-Beslenme faktörleri

6-Sigara

7-Alkol

8-Virusler

2.2. Tümör Markırları:

Bazı tümör markırlarının kısa bir tarihçesi Tablo-1 özetlenmiştir(10).

Tablo-1:Tümör markırlarının kısa bir tarihçesi.

YIL	ORTAYA KOYAN ²⁷	MARKIR
1846	H. Bence Jones	Bence-Jones Proteini
1928	W.N.Brown	Ektopik Hormon
1930	B.Zondek	hCG
1932	H.Cushing	ACTH
1949	K.Oh-Uti	Kan grubu antijenlerinin delesyonu
1959	C.Markert	İzoenzimler
1963	G.I.Abele	AFP
1965	P.Gold ve S.Freeman	CEA
1969	R.Heubner ve G.Todaro	Onkojenler
1975	H.Kohler ve G.Milstein	Monoklonal antikolarlar
1980	G.Cooper,R.Weinberg veM.Bishop	Onkojen problrı
1985	H.Haris,R.Sager ve A.Knudson	Supresör gen

Erken tanı ve tedavi ile kanserli hastalarda önemli oranda iyileşme mümkün olabilmektedir. Erken teşhis edilen kanser potansiyel olarak tedavi edilebilir. Amaç tümörün cerrahi olarak tamamen uzaklaştırılacak kadar küçük olduğu zaman teşhis etmektir. Maalesef, pek çok kanserde tümör ya cerrahi olarak uzaklaştırmak için çok büyük olur yada kanser hücreleri diğer dokulara metastaz yaparlar. Dahiliyeciler ve cerrahlar tedavide kimyasal toksinleri veya radyasyonu kullanırlar. Bunlar pek çok tümör hücresine karşı etkili olmasına rağmen genellikle tedavi edici değildirler. Çünkü arta kalan tümör hücrelerinin küçük bir fraksiyonu proliferasyonla büyümeye başlar ve hatta hastayı öldürebilirler(10). İdeal bir tümör markırı kanser tipini veren bir spesifiklikte ve erken teşhis yada tarama süresince küçük tümörleri saptamak için yeterli duyarlılıkta olmalıdır. Maalesef bugün bilinen pek çok tümör markırı ne çok spesifik nede yeterince duyarlıdır. Tümör markırları halihazırda:

- 1-Tarama amacıyla,
- 2-Semptomatik hastaların ayırıcı tanısında,
- 3-Kanserin klinik derecelendirilmesinde,
- 4-Tümör hacmini belirlemede,
- 5-Hastalık prognozu hakkında ön bilgi temin etmede,
- 6-Tedavi başarısının değerlendirilmesi ve tedaviye cevabın izlenmesinde,
- 7-Nükslerin saptanmasında,
- 8-Tümör kitlesinin yerinin tespitinde,
- 9-İmmunoterapi için yer belirleyici olarak kullanılmaktadırlar(1,10).

2.2.1. Enzim Yapısındaki Markırlar

Bazı istisnalar dışında bir enzim yada izoenzimdeki bir artış kanserin tipini veya spesifik organ tutulumunu tespit etmede yeterince spesifik ve duyarlı değildir. Ancak, PSA bir istisnadır. PSA hafif proteaz aktivitesine ve kallikrein ailesinin serin proteazı ile homolog aminoasit sırasına sahiptir(10). Normal, benign, hiperplastik ve kanserli prostat dokuları tarafından salgılanır fakat diğer dokulardan salgılanmaz. Enzimler tümör markırları olarak onkofetal antijenler ve monoklonal antikorlardan önce kullanılmaya başlamıştır(5).

Enzimler hücre içinde hücre dışından daha yüksek konsantrasyonda bulunurlar. Enzimlerin tümörün nekrozisi yada tümör hücresinin membran permabilitesinin değişmesi sonucu sistemik dolaşıma salınırlar. Bazen sistemik dolaşıma salınmalarına tümörün metastazıda sebep olabilir. Pek çok enzim tek bir organa spesifik değildir(5). Çeşitli organ kanserlerinin teşhisinde kullanılan enzimler Tablo-2'de verilmiştir.

2.2.2. Hormon Markırlar

Bazı hormonlar yarım yüzyıldan fazla bir süreden beridir tümör markırı olarak kullanılmaktadırlar İmmunoassay'in sunuluşu ve monoklonal antikorların kullanılışı ile hormonların ölçümü günümüzde doğru ve kesin olarak yapılabilmektedir. Kanserde hormonlar ya ilgili organ tarafından aşırı miktarlarda salgılanır veya ilgili olmayan normalde salgılanması beklenmiyen uzak ve non-endokrin doku tarafından üretilir. Uzak ve non-endokrin doku tarafından üretilme

Tablo -2:Tümör markırı olan enzimler.

ENZİM	KANSER TİPİ
Alkol dehidrogenaz	Karaciğer
Aldolaz	Karaciğer
Alkalın fosfataz	Kemik,Karaciğer,Lösemi, Sarkoma
" " plental	Over,Akciğer,Trofoblastik Ca,Mide-barsak,Seminoma,Hodgkin
Amilaz	Pankreas,Çeşitli
Aril sulfataz B	Kolon,Meme
Kreatin-kinaz BB	Prostat,Akciğer,Meme,Kolon,Over
Esteraz	Meme
Galaktozil transferaz	Kolon,Mesane,Mide-barsak,Çeşitli
Hekzokinaz	Karaciğer
γ-Glutamil transferaz	Karaciğer
Lösin aminopeptidaz	Pankreas,Karaciğer
Laktat dehidrogenaz	Karaciğer,Lenfoma,Lösemi,Çeşitli
φ-Nükleotidaz	Karaciğer
Piruvat kinaz	Karaciğer,Çeşitli
Ribonükleaz	Çeşitli(over,akciğer,kolon)
Terminal deoksiribotransferaz	Lösemi
Timidin kinaz	Çeşitli,Lösemi,Lenfoma,Akciğer
Nöron spesifik enolaz	Akciğer,Nöroblastom,Karsinoid tm ,melanom, Feokromastoma
Prostatik asit fosfataz	Prostat
PSA	Prostat

olayı Ektopik Sendrom olarak bilinir. Küçük hücreli akciğer kanserlerinde ACTH salgılanması ektopik sendroma bir örnek olarak verilebilir. İlgili organın aşırı salgılamasına da hipofizden ACTH üretiminin arttığı Cushing sendromu örnek olarak verilebilir(10).Tümör markırı olarak kullanılan hormonlardan bazı örnekler Tablo -3 de verilmiştir.

Tablo -3: Tümör markırı olarak hormonlar.

HORMON	KANSER TİPİ
ACTH	Cushing sendromu,Akciğer
ADH	Akciğer,Adrenal korteks,Pankreas,Duodenum
Bombesin	Akciğer
Kalsitonin	Tiroid
Gastrin	Glukagonoma
Growt hormon	Hipofizer adenoma,Böbrek,Akciğer
hCG	Embriyonal koriokarsinoma,Testis
İnsan plental laktojen	Trofoblastik Ca,Gonadlar,Akciğer,Meme
Nörofisins	Akciğer
Pratiroid hormon	Karaciğer, Böbrek,Meme,Akciğer,Çeşitli
Prolaktin	Hipofiz adenomu,Böbrek,Akciğer
Vazoaktif intestinal polipeptit	Pankreas,Bronş,Feokromastoma,Nöroblastom

2.2.3. Karbonhidrat Yapısındaki Markırlar

Bu markırlar tümör hücre yüzeyinde bulunan antijen özelliği gösteren ve tümör hücreleri tarafından salgılanan karbonhidrat yapısında olan maddelerdir(87). Monoklonal antikolar hücre yüzeyindeki bu antijenlere karşı gelişirler.Bu tümör markırları klinik olarak faydalı yeni bir generasyon olarak bildirilmektedir. Bunların, enzimler ve hormonlar gibi doğal olarak salgılanan markırlardan daha spesifik oldukları bildirilmiştir. Yüksek molekül ağırlıklı müsinler ve kan grubu antijenleri karbonhidrat yapısında olan markırlar olarak bilinmektedir(10). Bunların çeşitli örnekleri Tablo-4 de görülmektedir.

Tablo 4: Müsin ve kan grubu antijenleriyle ilişkili tümör markırları

KARBONHİDRAT MARKIRLAR	KANSER TİPİ
Müsinler:	
CA 125	Over,Endometriosis
Episialin	*CA 15-3 *CA 549 *CA27-29
MCA	Meme,Over
DU-PAN-2	Pankreas,Over,GIS,Akciğer
Kan grubu antijenleri:	
CA 19-9	Pankreas,Mide-barsak,Karaciğer
CA 19-5	Mide-barsak,Pankreas,Over
CA 50	Pankreas,Mide-barsak,Kolon
CA 72-4	Over,Meme,Mide-barsak,Kolon
CA 242	Mide-barsak,Pankreas

2.2.4. Protein Yapısındaki Markırlar

Monoklonal immunoglobulin, yüz yıldan fazla bir süredir Multiple Myeloma için markır olarak kullanılmaktadır.Monoklonal paraproteinler serum elektroforezinde globulin bandında sivri bir band olarak görülürler.Multiple Myelomalı hastaların %95 inden fazlasında böyle bir elektroforetik band görülmektedir(10). Non-malingnant monoklonal immunoglobulinlerin görünüşünün

yaş ile artığı ve 75 yaşın üstündeki hastalarda % 5 olarak görüldüğü bildirilmiştir. Bu non-malignant monoklonal bandlar genellikle malignant bandlardan daha düşük konsantrasyonda olduğu ve Bence-Jones proteini ile birlikte olmadığı görülmüştür. Bence-Jones proteininin idrardaki serbest monoklonal immunoglobulinin hafif zinciri olduğu ve idrardaki monoklonal immunoglobulinin seviyesinin hastalığın seyrinin bir prognostik işareti olduğu bildirilmiştir. Aynı şekilde tedavi süresince idrar Bence-Jones proteininin konsantrasyonunun tedavinin etkinliğini yansıttığı bildirilmektedir(10).

Tümör markırı olarak kullanılmak üzere çeşitli proteinler önerilmiştir (Tablo-5). Bu markırların çoğunu klinik olarak değerlendirebilmek için ilave araştırmalara ihtiyaç olduğu bildirilmektedir(1).

Tablo - 5: Tümör markırı olarak proteinler.

ADI	KANSER TİPİ
β 2-Mikroglobulin	M.Myeloma, B hücreli lenfoma, KLL
C Peptit	İnsilünoma
Ferritin	Karaciğer, Akciğer, Meme, Lösemi
Melanoma ilişkili antijen	Melanoma
İmmunoglobulin	M.Myeloma, Lenfoma
Pankreas ilişkili antijen	Pankreas, Mide
Yeni doğan spesifik protein-1	Trofoblastik Ca, Germ hücreli Ca
Protrombin prekürsör	Hepatosellüler
Tümör ilişkili tripsin inhibitör	Akciğer, Mide-barsak, Over

2.2.5. Genetik Markırlar

Kanserlerin, hücrelerde kalıtsal ve genetik değişiklikler sonucu olabileceği bildirilmektedir. Genetik değişiklikler nedeniyle hücre normal durumdan kanserli duruma gelmekte ve sonunda metastas yapmaktadır. Kanser

risk indeksini kanıtlama ve taramada serumdaki markırların biyokimyasal metodlarla geleneksel takibi yanında kromozomal değişikliklerde değerlendirilmektedir(10).

Kanserin gelişmesinde Onkojen ve supresör genlerin etkili olduğu bildirilmektedir(Tablo-6 ve Tablo-7). Onkojenlerin dominant mutasyonlarla aktive olabilen protoonkojenlerden meydana geldiği ve nokta mutasyon, ilave (insersiyö), ayrılma (delasyon), yer değiştirme (translokasyon), veya ters dönme (inversiyö) gibi mutasyon tipleri gösterdikleri bildirilmektedir. Pek çok onkojenin lösemi gibi hematolojik malignitelerle ve daha az miktarda da solid tümörlerle ilişkili olduğu bulunmuştur. Supresör genler ise sadece solid tümörlerden izole edilmiştir(1).

Tablo -6: Onkojen markırlar.

ONKOJENLER	KANSER TİPİ
N-ras mutasyon	AML,Nöroblastom
c-myc-translokasyon	B ve T hücreli Lenfoma
c-erb B-2amplifikasyon	Meme,Over,Barsak-mide
c-abl/bcr translokasyon	KML
N-myc. Amplifikasyon	Nöroendokrin Ca.

Tablo -7: Süpresör gen markırları

SÜPRESÖR GEN	KROMOZOM
DCC (kolon karsinoması)	18q21.3
NF-1 (nörofibromatosis)	17q11.2
RB (retinoblastom)	13q14
p53 (kolon karsinomu)	17q
WT (Wilms Tm.)	11p13
erb B-2 (hepatoselüler Ca.)	7p

2.2.6. Diğer Markırlar

Katekolaminler, poliaminler, sialik asid ile bağlı lipidler ve reseptörleri içeren diğer tümör markırları çeşitli derecelerde klinik olarak değerlendirilmektedir (Tablo - 8)(10).

Tablo - 8: Diğer tümör markırları.

ADI	YAPISI	KANSER TİPİ
Östrojen ve Progesteron reseptörleri	Doku	Meme
Katekolamin metabolitleri: *VMA,**HVA, Metanefrin	İdrar	Nöroblastom, Feokromastoma
Hydroksiprolin	İdrar	Kemik metastazı(meme), M. Myelom
Poliamin	BOS / İdrar	Beyin / Çeşitli

* VMA:Vanil mandelik asit, **HVA:Homovanillik asit

Bu grub markırların belkide en değerlileri olabilen reseptörler doku preparatlarında ölçülebilmektedir. Östrojen ve progesteron reseptörleri meme kanserinde hormonal tedavi için indikatör olarak kullanılmaktadır. Pozitif östrojen ve progesteron reseptörlü hastaların hormonal tedaviye cevap vermeye meyilli oldukları, negatif reseptörlülerin ise kemoterapi gibi diğer tedavi şekilleriyle tedavi edildikleri bildirilmiştir. Hormon reseptörlerinin aynı zamanda meme kanserinde prognostik faktörler olarak değerlendirildikleri, pozitif reseptör seviyelerine sahip hastaların daha uzun surviye meyilli oldukları bildirilmiştir(10). Çok kullanılan tümör markırlarından bazılarının normal değerleri, özellikleri ve kanser tipleri Tablo-9 da görülmektedir(33).

Tablo-9: Bazı tümör markırlarının özet bilgileri.

	NORMAL DEĞERLER	ENDİKASYON	ÖZELLİKLERİ
AFP	< 15 ng/ml	Karaciğer kanseri, germinatif hücreli tümör.	Benign karaciğer hastalıklarında yükselir.
β2-Mikroglobulin	1.2-2.5 mg/L	Multipl miyelom, non-hodgkin lenfoma	Böbrek hastalıklarında ve AIDS' te yükselir.
CA 15-3	< 28 U/ml	Meme kansinomu, over kansinomu.	Karaciğer sirozunda yükselir.
CA 19-9	< 37 U/ml	Pankreas, Kolorektal, Safra kesesi ve safra yolları kansinomu.	Safra taşlarında, pankreatitte, karaciğer sirozunda yükselir.
CA 72-4	< 3 U/ml	Mide kansinomu	
CA 125	< 35 U/ml	Over ve pankreas kansinomu	
Kalsitonin	< 100 pg/ml	Modüller tiroid kansinomu	
CEA	< 3 ng/ml	Kolorektal, mide, meme ve bronş kansinomları.	Sigara içenlerde yükselmesi mümkündür
HCG	0-5 mU/ml	Koryon kansinomu, teratom, mol hidatiforme ve erkekde seminom	
Nöron spesifik enolaz	< 12.5 ng/ml	Küçük hücreli bronş kansinomu, apudoma, nöroblastoma.	Bir saat içerisinde santrifüj edilmeli.
PSA	3.7 ng/ml	Prostat kansinomu	Rektal incelemesi öncesinde kan alınmalı! Dokuya özgü.
PAP	< 4 µg/ml	Prostat kansinomu	Rektal inceleme öncesinde kan alınmalı! Dokuya özgüdür.
Skuamaz hücreli kansinom antijen	< 2.5 ng/ml	Yassı epitel hücreli kansinom (KBB, akciğer, uterus, özefagus bölgesi)	Deri ve tükürük bulaşmasında yükselir.
TPA	< 80 U/L	Mesane kansinomu	Düşük özgüllük.

2.3. Glutatyon-S Transferaz (GST) Enzimi

2.3.1. GST'lerin Tarihçesi ve İsimlendirmesi

GST'ler ilk olarak 1961 yılında Combes ve Stakelum ile Booth ve arkadaşları tarafından ayrı ayrı yapılan çalışmalarda(6,78) tanımlanmış olup halen yoğun bir biçimde araştırılmaktadır. Bayland ve Chasseaud, bu enzimleri 1969 yılında substratlarının kimyasal yapısına göre; 1.)Aril transferaz 2.)Epoksit transferaz 3.)Alkil transferaz 4.)Aralkil transferaz 5.)Alken transferaz, olarak beş ayrı grubda sınıflandırmışlardır(39,66).

GST'lar üzerine yapılan çalışmalardan ayrı olarak bilirubin metabolizmasında rol alan bir karaciğer proteini üzerinde de çalışmalar yapılmıştır. Bilirubin safraya verilmeden önce glukronik asitle konjuge olduğu yer olan endoplazmik retikulumda hücre içi taşınmasında rol oynadığı bildirilen bu protein Levi ve arkadaşları(40) tarafından "Y" PROTEİNİ veya "LİGANDİN" olarak adlandırılmıştır. Daha sonra Habig ve arkadaşları(22,23), bunun bir GST izoenzimi olduğunu ortaya koymuşlardır.

1973 de üç sıçan transferazının birbirinden ayrılarak tanımlanması ve saflaştırılması(63) ve bu transferazların daha önce tanımlanan alt grubların herhangi birine özgül olmayıp içiçe geçmiş substrat özgüllüğüne sahip olduğunun bulunmasıyla alt grublandırma bırakılıp tanımlanan tüm enzimler *Glutasyon-S-Transferaz* başlığı altında toplanmıştır.İzoenzimlerin homolog veya heterolog iki alt birimden oluştuğunun bulunması; isimlendirmede de alt birim tiplendirmesinin kullanılması fikrini doğurmuştur(51). 1983 de bu düşünceyle yapılan toplantı sonucunda sıçan izoenzimlerinin arab rakamlarıyla numaralandırılması kabul edilmiştir. İnsan GST'ları Yunan harfleriyle isimlendirilmektedir. Ancak bu izoenzimlerinde sıçan izoenzimlerine benzer şekilde alt birimlerini de belirleyecek şekilde isimlendirilmeleri önerilmektedir. Sıçan izozimlerinin eski ve yeni isimlendirilmesi Tablo-10 da gösterilmiştir(35).

Tablo-10:Sitozolik sıçan Glutasyon S-Transferazlarının isimlendirilmesi.

YENİ İSİM	ESKİ İSİMLER		ALTERNATİF ALTBİRİM TANIMLAMASI
GST 1-1		L2	Y _a
GST 1-2	B (ligandin)	BL	Y _a , Y _c
GST 2-2	AA	B2	Y _c
GST 3-3	A	A2	Y _{b1}
GST 3-4	C	AC	Y _{b1} , Y _{b2}
GST 3-6	P		
GST 4-4	D	C2	Y _{b2}
GST 4-6	S		
GST 5-5	E		
GST 6-6	M _T		Y _n
GST 7-7	P		Y _p veya Y _f
GST 8-8	K		Y _k

2.3.2. GST'lerin Tanımlanması

Herhangi bir organizmada çok sayıda GST izoenziminin bulunması her bir formun ayrı ayrı tanımlanmasını güçleştirmektedir. Mesela sıçanda şimdilik en az 12 sitozolik ve 1 mikrozomal, insanda 7 sitozolik GST tanımlanmıştır. Bir enzim formunun tanımlanması için enzimin fizikokimyasal özellikleri, spesifik antiserumlarla reaksiyonu, substrat özgülüğü ve inhibitörlere duyarlılığı gibi özellikleri göz önüne alınmaktadır. İnsan GST izoenzimlerinin fizikokimyasal özellikleri Tablo-11 de, çeşitli substratlarla gösterdikleri spesifik aktiviteler Tablo-12 de, inhibisyon karakteristikleri Tablo-13 de görülmektedir(66).

Tablo -11:İnsan GST'lerinin fizikokimyasal özellikleri.

İZOENZİM	SINIF	GÖRÜNÜR ALTBİRİM MOLEKÜL AĞIRLIĞI(kDA)	İZOELEKTRİK NOKTA
B1B1	Alfa	25	8.9
B1B2	Alfa	25	8.75
B2B2	Alfa	25	8.4
μ	Mü	26.5	6.6
ψ	Mü	26.5	5.5
π	Pi	23	4.8
skin"9.9"	Alfa	27.5	9.9

Tablo -12:İnsan GST'lerinin spesifik aktiviteleri.*

SINIF: İZOENZİM:	Alfa			Mü		Pi
	B1B1	B2B2	Skin"9.9"	$\alpha - \epsilon$	μ	π
1-kloro-2,4-dinitrobenzen	82	80	-	64	187	105
1,2-dikloro-4-nitrobenzen	0.25	0.79	-	0.05	0.032	0.11
Bromsulfoftalein	-	-	0	0.005	<0.002	<0.002
Etakrinik asit	0.11	0.14	0.31	0.03	0.081	0.86
Trans-4fenil-3büten-2on	0	0	0	0.0015	0.36	0.01
4-hidroksinonenal	-	-	-	0.009	0.044	0.002
Lökotrien A4	0	0	-	0	0.11	0.37
1,2-epoksi-3(p-nitro-fenoksi)propan	0.0006	<0.00001	-	0.019	5.2	0.0024
trans-Stilben oksit	-	-	-	0.047	0.92	0.13
Benzo(a)piren 7,8diol-9,10-epoksit	-	-	-	0.038	0.57	0.83
Kumen hidroperoksit	31	104	4.3	10.6	0.63	0.03
H ₂ O ₂	-	-	-	<0.01	<0.01	<0.01
p-nitrofenil asetat	0.66	0.24	-	0.18	0.22	-

Tablo -13:İnsan GST izoenzimlerinin inhibisyon karakteristikleri.*

	SINIF: İZOENZİM	Alfa			Mü		Pi
		B1B1	B2B2	Skin"9.9"	$\alpha - \epsilon$	μ	π
Cibacron Blue		2.5	24	13	4	0.05	0.5
Tribütiltin asetat		<0.001	0.989	-	0.1	0.5	4
Trietiltin bromür		1.55	0.145	-	10	5	6
Trifeniltin klorür		0.3	1.5	1	0.25	0.5	>10
Bromsulfoftalein		10.5	125	120	75	2	100
Hematin		1.5	40	1	0.5	1	5
S-hekzilglutasyon		4.6	6.6	-	3	10	20
S-(p-bromobenzenil)glutasyon		-	-	-	4	1	4

*Tüm değerler μM cinsindedir. μM : pH:6.5,100mM fosfat tamponunda substrat olarak 1 mM CDNB kullanılarak ölçülen enzim aktivitesini %50 inhibe eden inhibitör konsantrasyonlarıdır.

2.3.3. GST'lerin Türler ve Dokular Arası Dağılımı ve Gelişime Bağlı

Sentezleri

GST'lar bakterilerden, memelilere ve çeşitli bitkilere kadar pekçok canlı türünde tanımlanmıştır.Konu ile ilgili olarak çok sayıda çalışma yapılmıştır(11,48).

İnsan GST izoenzimlerinin gelişmeye bağlı dağılımı abörtus olmuş fetusların organları sitolojik çalışmalarla incelenmiş ve bireysel büyük farklılıklar gözlenirken fetal gelişmeyle paralel önemli bir farklılık bulunamamıştır. Yani

çalışma grublarına ait izoenzimlerin yapıları arasında farklılık görülememiştir. Bununla birlikte en azından 3.trimester sonundan itibaren fetal-spesifik enzim sentez edildiği görülmüştür(19).Yapılan çalışmalarda enzim aktivitelerinin perinatal olarak arttığı bildirilmiştir(48).

GST izoenzim kompozisyonunun organ bağımlı olduğu ve en kompleks örneğin de karaciğer ve adrenal bezde olduğu görülmüştür(76). Gebeliğin erken dönemlerinde görülen organlar arası GST farklılıkları yanında karaciğer ve böbrek üstü bezi gibi bazı organlardaki GST izoenzimlerinde gelişme safhasına göre değişiklikler görülmüştür. Bazik izoenzimler 10 haftalık gebelikten sonra tüm karaciğer ve böbrek üstü bezi hücrelerinin sitozolünde görülmüştür(19).

GST'lerin yapı ve fonksiyonları hakkında pekçok şey bilinmesine rağmen selüler ve subselüler lokalizasyonları hakkında az şey bilinmektedir(27). Selüler ve subsellüler yerleşimin fizyolojik rolleri açısından önemli olduğu bildirilmiştir(12). Transferazlar küçük molekül ağırlıklı (45000 kD) enzimler olarak bilinirler. Bunların çözünür hepatik proteinlerin yaklaşık % 3-5 i kadarını oluşturdukları bilinmektedir (53,60,78). Mikrozomal GST'lerin yüksek oranda endoplazmik retikulumda ve mitekondri dış membranında mevcut olduğu görülmüştür(58). Asidik GST'lerin bilier epitelde bulunup taşıyıcı bir protein gibi görev yaptıkları bildirilmektedir(24).

Her dokuda aktiviteye raslanmakla birlikte izoenzim tiplerinin farklı olduğu bulunmuştur. Karaciğer enzimlerinin genetik defektini incelemek için

eritrositler yaygın olarak kullanılmaktadır. 2mM kadar GSH ve fazla miktarda GST'a sahip olan eritrositlerin dolaşımdaki ksenobiyotiklerin uzaklaştırılması için ideal bir lokalizasyon yeri olduğu ve detoksifikasyondaki genel rolleri ile uyumlu olduğu gösterilmiştir(53). Karaciğerde GST izoenzimlerinin hücresel düzeyleri o konağın kimyasal durumu ile düzenlenir. Bazı hastalıkların ve hormonal değişimlerin izoenzimlerin hücresel düzeyini değiştirdiği gösterilmiştir(88). Asidik GST'lar insanın plasenta, akciğer, böbrek, kalp ve beyin dokusunda yüksek konsantrasyonlarda, diğer dokularında ise düşük konsantrasyonlarda bulunmuştur. Yetişkin karaciğerinde bulunmasına rağmen fetal karaciğerde daha fazlaca bulunmuştur(27). Nötral GST (GST- μ) izoenziminin insanların yaklaşık %40-47'sinde eksikliği gösterilmiştir(28,39,71-73,77). GST'ların fetus ve yetişkinde organlar arası dağılımı Tablo-14 de verilmiştir.

Tablo -14:İnsan GST'larının doku dağılımı.

DOKU	TRANSFERAZ		
	Bazik (pI>7.5)	Nötral (pI-6.5)	Asidik (pI<5.5)
Yetişkin:			
Böbrek üstü bezi	+	+	+/-
Beyin			+
Duodenum	+		
Eritrosit			+
Böbrek	+		+
Lens			+
Karaciğer	+	+/-	+/-
Akciğer			+
Over	+		+
Plasenta			+
Dalak			+
Testis	+	+	+
Fetal:			
Böbrek üstü bezi	+		+
Karaciğer	+		+
Akciğer			+
Böbrek			+
Beyin			+

2.3.4. GST'lerin Sınıflandırılması

Son zamanlara kadar GST'ler, Aril transferaz, Epoksit transferaz gibi katalizledikleri reaksiyona göre sınıflandırılmışlardır(39,66). Günümüzde ise türe bağlı olmayan bir sınıflama yapılmış ve üç sitozolik birde mikrozomal olmak üzere dört ana grubda sınıflandırılmışlardır. Sitozolik GST'ler, SDS-Poliakrilamid jel elektroforezindeki molekül ağırlıklarına ve izoelektrik noktalarına göre; 1.)*Alfa(Bazik)*, 2.)*Pi(Asidik)*, 3.)*Mü(Nötral)* diye adlandırılmışlardır(27,69).

İnsan GST'lerinin bu şekilde sınıflandırılmalarında henüz tam bir netliğe ulaşılamamıştır. Mesela nötral sınıfına giren GST'lerin tümünün pI'sı 7 den düşük bulunmuştur(57,69). Suzuki ve arkadaşlarının (32) insan beyninden elde ettikleri pI'sı 4,25 olan GST, asidik sınıfına dahil edilmemiştir. Yine GST-E formunun ana grupların hiç birine uymadığı görülmüştür(57,69).

Bir grub içindeki izoenzimlerin enzimatik özellikleri arasında belirgin farklılıklar olmadığı için insan GST'leri sadece 3 grubun üyeleri olarak ayırt edilmişlerdir. Bu üç grubun fiziksel, kimyasal ve katalitik özellikleri yönünden farklılıkları belirlenmiştir(48). Kamisaka ve arkadaşları(19) $\alpha, \beta, \gamma, \delta, \epsilon$ isimli benzer aminoasid kompozisyonu ve immunolojik karakterlere sahip 5 değişik bazik GST formu ortaya koymuşlardır. Nötral sınıfı GST lar için ise çok benzer 2 form bildirilmiştir ki bunlar; μ ve ψ dir (62).

2.3.5. GST'lerin Genetiği

Canlıların pek çok fizyolojik fonksiyonları yapabilmeleri için çok sayıda GST izoenzimi kodlayabilecek genetik kapasiteye sahip oldukları bildirilmiştir. Çok sayıda gen olması ve alt birimlerin hibridizasyonu izoenzim oluşumunun nedenleri olarak bildirilmektedir(48). GST alt birimlerinin değişik ksenobiotikler ile (fenobarbital, 3-metilkolantren, transtilben oksit gibi) uyarılabildiği ve dokuya has düzenlemenin incelenmesinde faydalı bir sistem olduğu bildirilmektedir(64).

İnsan GST'lerinin en az 4 otozomal gen lokusu tarafından kodlandığı farklı gen sınıflarının farklı kromozomlar üzerinde yerleştiği ve bazı canlılarda bir sınıfa ait GST genlerinin en az üç kromozom üzerine dağılmış olduğu gösterilmiştir(95).

1981 yılında Board'ın (4) yaptığı genetik model, GST'lerin asidik, bazik ve nötral diye yapılan sınıflaması ile uyum halindedir. Bu modele göre sitozolik transferazlar:

GST μ(Nötral) , GST-1 genleriyle,

GST $\alpha, \beta, \gamma, \delta$ ve ϵ ...(Bazik) , GST-2 genleriyle,

GST π(Asidik) , GST-3 genleriyle kodlanmaktadır(19).

GST-1 genlerinin, nişasta-jel elektroforezi kullanılarak:

GST-1 *0

GST-2 *1

GST-3 *2 alellerinin kombinasyonu ile 4 fenotipi belirlenmiş ve genetik etkinliğin, dominant geçişten dolayı GST-1 *0 / GST-1 *0 alellerinin kombinasyonu ile ortaya çıktığı gösterilmiştir(19,48,52).

Bazik GST izoenzimlerinin ($\alpha, \beta, \gamma, \delta, \epsilon$) oluşumu hakkında farklı teoriler vardır. Mesela, bunlar benzer aminoasit kompozisyonu ve immunolojik karakterlere sahip olduğu için tek bir ana formun deaminasyonu sonucu olduğu farzedilmektedir. Post translasyonel modifikasyon ikinci bir izoenzim oluşum teorisidir. Ancak Mannervik ve Gutenberg (48), bu değişikliğin genetik özellikten olduğunu ileri sürmüşlerdir. 1985 de Stockman ve arkadaşları(19), ise aynı genlere ait ürünler olduğu görülen iki enzim monomeri tanımlamışlardır. Bu iki gen 6p12 kromozom bandı üzerindedir(2). Bu ayrı genlerin kodladığı B1 ile B2 alt birimlerinin değişik kombinasyonları ile de 5 değişik GST ortaya çıkmıştır. Bunlar:

α, β, γB2B2 transferazlar,

ϵB1B1 transferazlar,

δB1B2 transferazlardır(19).

2.3.6. GST'lerin Saflaştırılması

GST'ler E.Coli den insana kadar pek çok organizmadan saflaştırılmıştır. Doku GST izoenzimlerinin tayini için yapılan daha önceki çalışmalar ya immunokimyasal analiz yada enzimatik deneyleri takiben yapılan GST izoenzimlerinin ayrıştırılmasından ibarettir(63). Ancak mevcut GST antikorlarının çoğu monospesifik olmadığı için antikora dayalı deneyler genellikle yapısal olarak ilgili alt birimin tümünü tayin eder. Bunun gibi içiçe geçmiş substrat özellikleri ve klasik ayırım metodları ile GST izoenzimlerinin tam bir ayırımı ve elde edilmelerinin zorluğundan dolayı katalitik reaksiyonlara bağlı deneyler ancak birden çok izoenzim tayinine imkan vermektedir(91).

Son zamanlarda basit bir metod GST alt birimlerinin tayini ve saflaştırılması için tarif edilmiştir. Bu metod affinite kromatografisi ile GST izoenzimlerinin saflaştırılmasını ve HPLC ile de alt birimlerinin ayırımını kapsar(64). 1-kloro,2-4-dinitrobenzen (CDNB), GST'lerin saflaştırılmaları ve değerlendirilmelerinde en iyi ve en çok kullanılan bir substrattır(14,18,22-25,28,55,91).

2.3.7. GST'lerin Fizyolojik Önemi

GST enzimlerinin ksenobiotikleri detoksifiye etmeleri yanında karaciğer gibi bazı dokularda çözünebilir sitozolik proteinlerin %10 unu oluşturabilmeleri gibi dokularda yüksek miktarlarda bulunmaları bu enzimlerin endojen

substratlarının da bulunduğunu düşündürmektedir. Pek çok endojen maddenin oksidatif metabolizması sonucu ortaya çıkan elektrofillerin GST'ların muhtemel substratları olduğu düşünülmektedir. Karbon-karbon çift bağı içeren bileşikler reaktif oksidasyon ürünleri verme eğilimindedirler. Bu gruba aromatik bileşikler ve poliansatüre yağ asitleri girmektedir(49). Muhtemel substrat grupları şunlardır:

- 1) Kinonlar.
- 2) Organik hidroperoksitler.
- 3) Epoksitler.
- 4) Araşidonik asit türevleri.
- 5) Alkenler(alfa-beta ansatüre karbonil bileşikleri).
- 6) Diğerleri.

2.3.8. GST'ların Fonksiyonları

Homodimerik veya heterodimerik enzimler olan GST'ların araştırılan tüm canlı türlerinde bulunması bunların hayati öneminin göstergesidir. Bu enzimler katalitik ve non-katalitik çok sayıda fonksiyona sahiptirler. Hem detoksifikasyon yaparlar hemde hücre içi bağlayıcı ve taşıyıcı rolleri vardır(22,48,58,78).

Katalitik olarak; yabancı maddeleri glutatyon (GSH) daki sisteine ait (-SH) grubu ile bağlayarak onların elektrofilik özelliklerini nötralize ederler ve ürünün daha fazla suda çözünür hale gelmesine neden olurlar. Oluşan bu GSH konjugatları böylece organizmadan atılabilir veya daha ileri metabolize

olurlar.Ksenobiyotiklerin klasik atılım ürünleri olan merkaptürik asitler organizmadan safra ile atılırlar.Şekil-1 de merkaptürik asit oluşum mekanizması gösterilmektedir(66,91).

Bu yol GST ların kanserojen,mutajen ve diğer zararlı kimyasalların hücre içi detoksifikasyonunda rolleri olduğunu göstermektedir. Metabolize edilemeyen lipofilik-hidrofobik pek çok bileşiği bağlamaları ise bu enzimlerin hücre içinde sınırlı çözünürlüğe sahip moleküller için hem depo hemde taşıma rolü üstlendiklerini göstermektedir(22,24,48,54,64,78,88).

Sıçan karaciğerinde bilirübini, karsinogenleri ve azotlu bileşikleri bağlayan bir protein tanımlanmış ve "ligandin" veya "Y" ve "Z" proteinleri olarak isimlendirilmiştir(36,90). Daha sonra ligandin ile sıçan GST 1-1 (GST- γ) izoenziminin aynı protein olduğu gösterilmiştir(23). Bilirübinle yapılan çalışmalar GST'ların hücre dışından içeriye bilirübin girişini artırmadığını ancak hücre içinden dışarıya bilirübin çıkışını azalttığını göstermiştir.Bu şekliyle bir depo proteini gibi davranmaktadır.Bilirübin gibi bir çok pigment (hematin, bromsülfaftalein, indosiyenin green gibi), kolik asitler, polisiklik aromatik hidrokarbonlar bu proteinler tarafından bağlanıp taşınabilmektedirler(53,64,68).

GST'ların sitozolde yüksek miktarda bulunması; albuminin kan dolaşımında üstlendiği rolü bu proteinlerin hücre içinde yerine getirdiği hipotezini doğrumuştur(18). Deneylede "hem" molekülünün son sentez basamağının bulunduğu mitekondri iç zarından dışarıya hareketini GST'ların kolaylaştırdığı

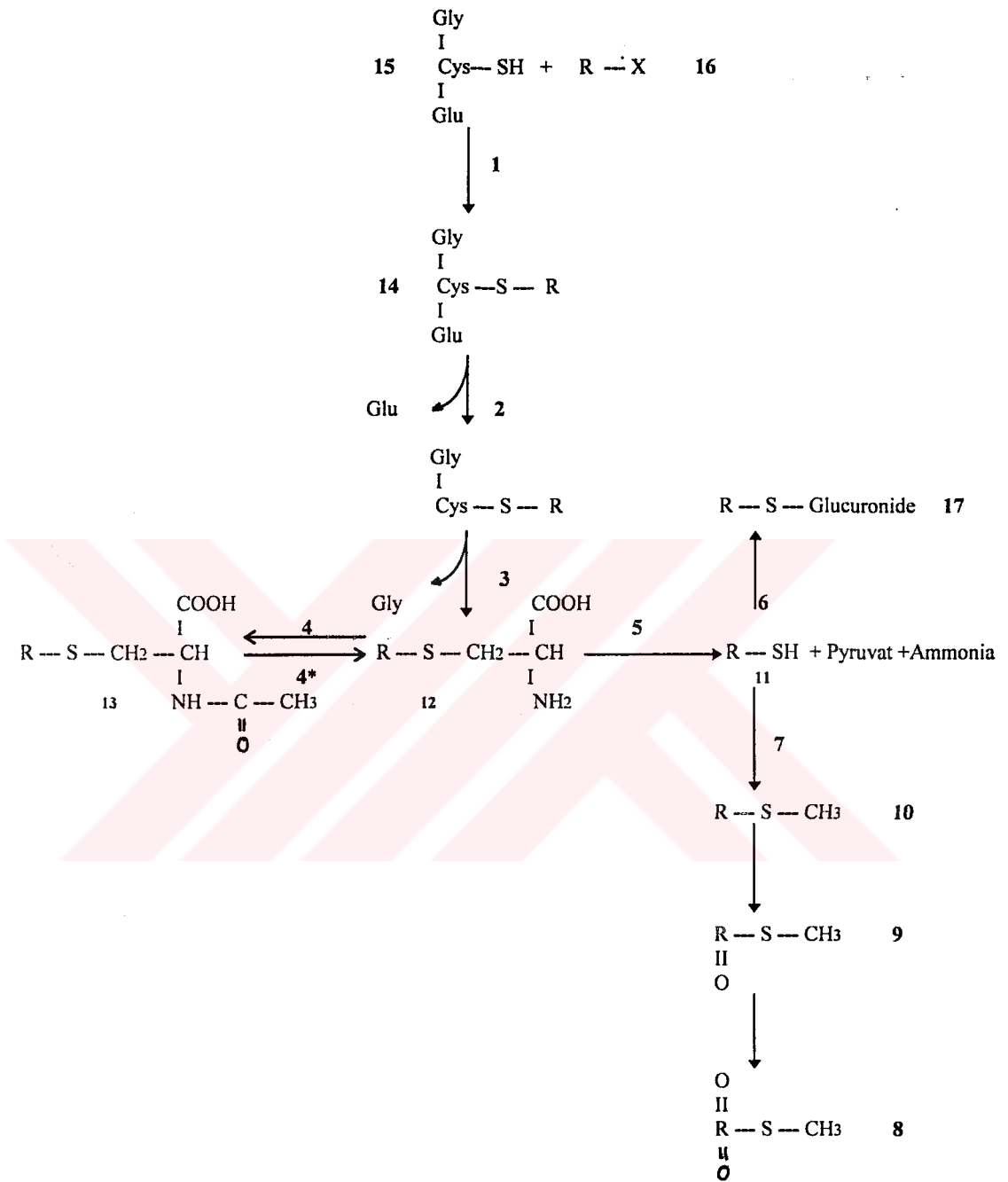
gösterilmiştir(34,75). GST'larla yapılan bağlanma çalışmalarında steroid ve hormonları bağladıkları anlaşılmıştır. Hormonların çekirdeğe nakli görevini de yerine getirdiği düşünülmüşse de bu olayın fizyolojik sonuçları ve anlamı henüz tam açık değildir(34,75). Tablo-15 de GST' lara bağlanan hormonlar ve bazı diğer bileşiklerin listesi verilmiştir.

Tablo-15:Hormonlar ve bazı bileşiklerin GST'lara bağlanma özellikleri.

HORMONLAR	AFFİNİTE**
Triiyodotironin (T3)	++++
Tetrayodotironin (T4)	++++
Kortikosteron	++++
Hidrokortizon	+++
Deksametazon	++++
Prednizolon	+++
Aldesteron	+++
Progesteron	++++
Androsteron	++++
Testesteron	+++
Diethylstilbesteron	++
17 β-estradiol	++
Estron	++
Dhidroepiandrosteron	+++
Kolesterol	--
2.3-benzantresen	++++
Naftoflavon	++
Akridin oranj	++++
Fenantren	+++
1.25-dihidroksi vitamin D3	++
Difenilhidantoin	--
Klofibrat	--
Bilirübin	++++
İndometazin	++

** :Relatif affiniteler:(+ + + +)= $K_d < 0,000001M$;(+ + +)= $0,000001 < K_d < 0,00001M$;(+ +)= $0,00001 < K_d < 0,0001M$;
Kd>0,001M olan bileşiklerin bağlanmadığı kabul edilmiştir.

Bu fonksiyonlarına ilaveten GST'lar çok sayıda başka görevlere de sahiptirler. Lökotrien C4'ün sentezi, lökotrien C sentaz aracılığı ile lökotrien A4'ün GSH ile bağlanması sonucu olur. Bu reaksiyon GST'lar tarafından da katalizlenebilmektedir(20,83).



1=GST, 2=Gama-glutamil transpeptidaz, 3=Sisteinil glisin dipeptidaz, 4=N-asetil transferaz, 4*=Deasetilaz, 5=Sistein konjugat β liyaz, 6=UDGP glukuronil transferaz, 7=S-metil transferaz, 8=Metil sülfinil, 9=Metil sülfinil, 10=metil-tiyo konjugatı, 11=Merkaptan, 12=Sistein konjugatı, 13=Merkaptürük asit türevleri, 14=Glutatyon konjugatı, 15=Glutatyon, 16=Elektrofilik madde, 17=Tiyoglukuronid.

Şekil-1:GST aracılığı ile toksik maddelerin merkaptürük asitlere dönüşüm basamakları:

Özellikle araşidonik asit ve lineolat hidroperoksitleri olmak üzere lipid peroksitlerine karşı GST'lar Se-bağımsız GSH peoksidaz aktivitesi göstererek bir defans mekanizması oluştururlar(15,18,20,83,86).

Prostoglandinlerin konjugasyonunda görevlidirler(8). Prostoglandin sentezinde Prostoglandin izomeraz etkisine sahiptirler(56,89).

GST- π 'nin çekirdekte bulunması sitozolden gelen genotoksik maddeleri detoksifiye etmelerini yada hormon ve büyüme uyarıcı faktörler gibi endojen ve eksojen bileşikler için taşıyıcı proteinler olarak hareket ettiklerini akla getirmektedir(68).

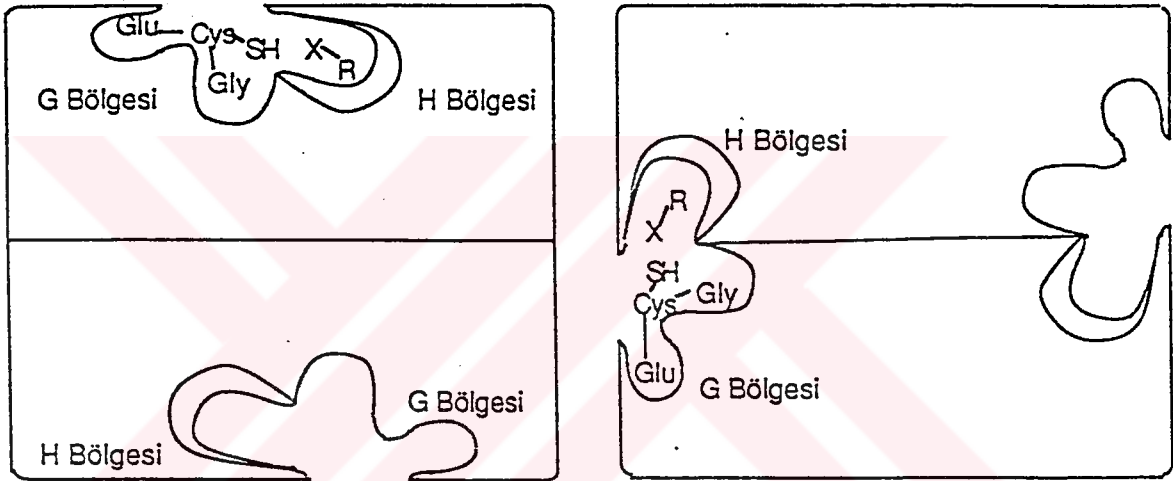
GST'ların kanser ilaçlarına karşı gelişen dirençle ilgilerinin olup olmadığı araştırılan konulardan biri olup direnç gelişimiyle ilgilerinin olduğu yönünde bulgular elde edilmiştir(61,67,68).

2.3.9. GST Enziminin Katalitik ve Kinetik Özellikleri

GST enzimlerinin aktif bölgelerinin yapısı ve fonksiyonları hakkında ayrıntılı bilgi yoktur,ancak genel bazı bilgiler vardır.Aktif bölgenin dimerik bir protein olan enzim üzerinde lokalizasyonu ile ilgili iki model kurulmuştur (13)(Şekil-2). Bunlar:

- 1)Aktif bölgeler iki alt birimin ortak katkısıyla oluşur.
- 2)Aktif bölgeler her iki alt birimin birbirinden bağımsız bölgelerindedir.

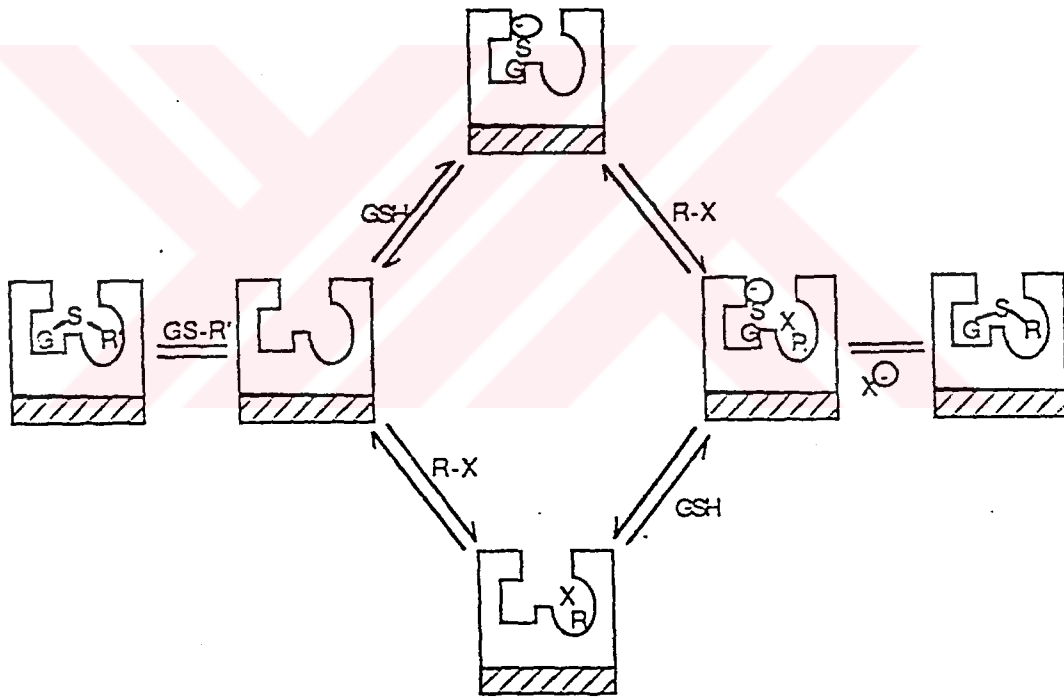
Kinetik ve bağlanma deneyleri her GST alt biriminin birbirinden yapısal ve fonksiyonel olarak bağımsız birer aktif bölgeye sahip olduğunu göstermektedir. Her aktif bölgede GSH bağlayan bir "G bölgesi" ve hemen onun yanında kısmen hidrofobik, elektrofilik substratın bağlandığı "H bölgesi" nin varlığı kabul edilmektedir.



Şekil-2: Dimerik yapıdaki GST molekülü üzerinde iki aktif bölgenin olduğunu gösteren modeller.

Glutatyonun bağlanmasında muhtemelen iyonik bağlar rol oynamaktadır. Katalitik mekanizmanın önemli bir aşaması olan glutatyonun tiyol grubunun aktivasyonu, muhtemelen bir baz yardımı ile sülfidril grubunun proton kaybetmesiyle sağlanmaktadır. Substratın aktivasyonu 4-hidroksi-alkenal ile yapılan çalışmada alkenalin belirleyici yapısı karbon-karbon çift bağı ve hemen yanında karbonil grubudur. Karbonil grubu çift bağı aktive etmektedir(13).

GST'larla yapılan kinetik çalışmalarda sıklıkla gözlenen bulgu nonhiperbolik eğilerdir (Sabit glutatyona karşı farklı CDNB konsantrasyonlarında). Bu enzimin iki alt biriminin kooperatif etkileşmesinin bulunmadığıda gösterilmiştir. GST enziminin kinetiği araştırılırken single displacement sequential reaksiyon şeması ortaya konmuş ve bazı çalışmalarda bunu desteklemiştir (13,46,47). Reaksiyon şeması Şekil-3 de görülmektedir.



Şekil-3:GST'in katalizlediği glutatyonun elektrofilik substrata konjugasyon reaksiyonunun şeması.

Bilirubin bağlanmasıyla enzimin kinetiğinin değiştiğinin bulunması bir "enzim-memory" mekanizmasının kurulmasına yol açmıştır(92,93). İnhibisyon

çalışmaları GST'lar için oldukça çok sayıda yapılmıştır. Tablo-16 de bu inhibitörlerin bir kısmı görülmektedir(50). Glutasyon türevleri de bu enzim için güçlü inhibitörlerdir. Bazı steroidler ve porfirin türevleri için aktif bölge dışında üçüncü bir bağlanma bölgesinin varlığı ileri sürülmüştür(7).

2.3.10. GST İzoenzimlerinin Klinik Önemi

2.3.10.1. GST- α

Bu bazik izoenzimler 10 haftalık gebelikten sonra tüm akciğer ve adrenal sitozolünde görülürler(19). Fetus karaciğerinde en fazla asidik GST'lar bulunur ve bu miktar gebelik yaşı ile gittikçe azalır. Doğumda ise bazik GST'lar baskın hale geçerler(19,41,88).

Serum GST konsantrasyonu tayininin aminotransferazlardan (ALT ve AST) daha duyarlı bir hepatosellüler hasar indeksi sağladığı gösterilmiştir (2,3,26,69). Fetuslar, yeni doğanlar ve yetişkinlerde karaciğer GST'larının dağılımına ait son immunohistokimyasal çalışmalar, bunların hem periportal hemde sentrilobüler hepatositlerde eşit bir şekilde dağıldığını göstermiştir. Halbuki aminotransferazlar esas olarak periportal hücrelerde bulunurlar. Hipoksi ve toksik maddelerin etkisiyle kolaylıkla hasara uğrayan hücreler ise sentrilobülerdirler(2,3). GST'lar nispeten küçük olduğu ve sentrilobüler hücrelerde bulunduğu için GST- α 'nın plazmaya sızmasıyla erken karaciğer hasarı duyarlı bir şekilde ölçülebilir (24,26). Akut

karaciğer hasarı ve kronik aktif hepatitdeki çalışmalar aminotransferazların aksine GST aktivitelerinin histolojik anormalliklerle daha iyi bağdaştığını göstermiş(2,3).

Tablo-16:GST ların bazı inhibitörleri.

	ETKİ*	ENZİM KAYNAĞI				
		Sıçan	insan	fare		
<u>Glutasyon türevleri</u>						
S-etilglutasyon	+	Sıçan				
S-hekzilglutasyon	+++	Sıçan	insan	fare		
S-(p-bromobenzil)glutasyon	+++	Sıçan	insan	fare		
D-1-glutamil-1-serilglisin	++		insan			
<u>Safra asitleri</u>						
Kolik asit	+		insan	fare		
Deoksikolik asit	++	Sıçan	insan			
Litokolik asit	+++	Sıçan				
<u>Steroid hormon türevi</u>						
17 β-estradiol disülfat	+++	Sıçan				
Estradiol-17-sülfat	++	Sıçan				
Kortizol	++	Sıçan				
<u>Antienflamatuar ilaçlar</u>						
İndometazin	+++	Sıçan	insan	fare		
Sulfasalazin	+++	Sıçan				
<u>Diüretikler</u>						
Etakrinik asit	+++	Sıçan				
Furosemid	++	Sıçan				
<u>Porfirinler</u>						
Üroporfin 1	+	Sıçan				
Hematin	+++	Sıçan	insan	fare		
Bilirubin	++	Sıçan	insan			
<u>Herbisidler</u>						
2,4-D	+++	Sıçan	insan			
2,4,5-T	++	Sıçan	insan			
<u>Metal bileşikleri</u>						
Trietiltin bromür	+++	Sıçan	insan	fare		
Trietiltin klorür	+++	Sıçan				
Trifeniltin asetat	+++	Sıçan				
Kurşun asetat	+				dana	
<u>Boyalarda</u>						
Bromsülfalein	+++	Sıçan	insan			
Fluoresein	+++	Sıçan				karasinek
Rose bengal	++	Sıçan	insan			
Cibacron blue	+++	Sıçan	insan	fare		
Bromfenol blue	+++					karasinek

*:Relatif inhibitör etki şöyle tanımlanmıştır:(+++)=Ki <5 μM, (++)=Ki < 100 μM, (+)=Ki <1mM.

2.3.10.2. GST- π

GST- α ve GST- μ sınıfı izoenzimler yetişkin karaciğerinde fazla iken, GST- π sınıfı esas olarak akciğer, böbrek, plasenta ve fetus karaciğerinde bulunmaktadır. Dokularda GST- π üretimi ile malignensi arasında bir ilişki vardır. Bu enzim normal karaciğerde bulunmazken, kimyasal maddeler kullanarak oluşturulan sıçan hepatomalarında veya onun prekanseröz devresinde (hiperplastik nodül) bulunmaktadır(16,18,30,39,53,69).

GST- π nin tümör belirleyici olarak tanımlanmasıyla ilgili çok sayıda çalışma yayınlanmakta ve çeşitli kanser türlerinde bu enzimin ortaya çıkışı araştırılmaktadır. İmmunokimyasal çalışmalar; kolon adenoma ve karsinoması, serviks displazi ve karsinoması, memenin Paget hastalığı, melanoma, midede atipik epitel ve karsinomalar, kolanjiokarsinoma, özefagus kanseri, renal karsinoma ve akciğer kanserlerinde GST- π nin düzeyinin arttığını göstermiştir(14,16,18,24,30,54,61,69,91,96).

GST- π aynı zamanda çok önemli bir karaciğer fonksiyon testidir. Çünkü bu enzim karaciğerin özellikle lobular ve sentrilobular bölgelerinde yerleşmiştir. Bu yüzden sentrilobuler bölgelerdeki karaciğer hasarı için diğer karaciğer fonksiyon testlerinden çok daha iyi bir markırdır(12,24,25,32,45,60,64,66,69,72,77).

Halihazırda insanda hepatoma, kolon, mide ve akciğer kanserlerinde bulunduğu tespit edilmiş potansiyel bir tümör markırdır(16,18,30,39,61,69).

2.3.10.3. GST- μ

Diğer metabolik faz-2 enzimleri gibi GST'lar faz-1 sitokrom P-450 enzim sistemi tarafından reaktif ara ürünlere dönüştürülen yabancı maddelerin daha az reaktif konjugatlara dönüşümünü katalizlerler(28,39,77). GST- μ izoenziminin özellikle epoksitlerin konjugasyonunu katalizlediği ve böylece şahısları kimyasal mutajen ve kanserojen maddelere karşı koruyabileceği tahmin edilmektedir (28,39,72,73,77). Bu izoenzim dominant olarak geçer ve insan popülasyonunda görülme oranı % 53-60 kadardır(39,65,70,77,82). Sığıçında çok sayıda GST- μ izoenzim tipi olmasına rağmen insanda tek bir tip bilinmektedir. Bu enzimin varlığı mononükleer lokositlerde TSO 'ya karşı enzimatik aktiviteye bakılarak araştırılmıştır(28,70-74). Genetik olarak bu enzimden yoksun olup sigara içen şahıslarda koruma mekanizması zayıfladığından akciğer kanseri riskinin yüksek olduğu bildirilmiştir (28,70-73,77). Sigara mesane ve larinks kanserinde en önemli risk faktörüdür (19,28,39). Sigara içmenin bu kanserlere yol açması sigara dumanındaki metabolik ara ürünler olduğu ileri sürülmektedir(28). Bu metabolik ara ürünlerin çoğu aromatik aminler ve polisiklik-aromatik hidrokarbonlar olup, mesane ve larinks epiteline etkisine sebep olan okside olmuş metabolitleridir. Her sigara içende bu tür neoplazmların olmayışı sigara içen şahısların duyarlılığını etkileyebilecek kişisel faktörlerin varlığını araştırmaya yöneltmiştir. Böyle bir markır ise GST- μ ' nün var olup olmamasıdır. GST- μ yoksa kansere yakalanma riski daha fazladır denilmektedir(17,19,39,71-73,77).

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

3.1.1. Vaka Seçimi

Bu çalışmamız Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi ve Konya SSK Hastanesinin Genel Cerrahi, Üroloji, Dahiliye, Göğüs Hastalıkları, İntaniye ve Cildiye servislerinde yatan klinik ve laboratuvar bulguları ile kanser teşhisi konmuş 25-90 yaşları arasında (ortalama 54 ± 14) toplam 88 (43 Kadın, 45 Erkek) hasta ile klinik olarak herhangi bir şikayeti ve bulgusu olmayan 21-69 yaşları arasında (ortalama 44 ± 14) toplam 40 (20 Kadın, 20 Erkek) sağlıklı kişi üzerinde gerçekleştirildi.

Hastalardan ve kontrol vakalarından toplam 10ml venöz kan örneği alındı. Bu kanın 2ml si GST- μ çalışması için heparinize tüplere aktarıldı. Hafifce alt üst edildikten sonra tüplerin ağızları parafinlenerek çalışma gününe kadar derin dondurucuda saklandı. Geriye kalan 8ml kan pıhtılaştıktan sonra 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek serumu ayrıldı ve bu serum çalışma gününe kadar derin dondurucuda saklandı. Bu numunelerden en geç bir ay içinde GST- π ve GST- α analizleri yapıldı. Ancak serum yetersizlikleri ve bazı imkansızlıklarından dolayı tüm serumlarda aynı parametreler çalışılmadı.

3.1.2. Cihaz ve Malzemeler

ELİSA Cihazı	:Biotek Instruments.Microplate EL 310 Autoreader, Fransa .
Otomatik Yıkayıcı	:Diagnostics,Pasteur,LP 35 ,Fransa .
Gama Sayıcı	:DPC Gamby-Cr, İngiltere.
Otomatik Pipetleyici	:DPC Delta, İngiltere.
Santrifuj	:Heraeus Sepatech Medifuje,Almanya.
Soğutmalı Santrifuj	:Hettich,Universal 30 RF,Almanya.
Derin Dondurucu	:Şenocak,İzmir,Türkiye.
Mikropipet	:(0-20,10-100,2-200 µl ayarlanabilir ve 500 ile 1000µl lik sabit pipetler.)

3.1.3. Kullanılan Reaktifler

Analizlerimizi isimleri aşağıda verilen ticari kitleri kullanarak gerçekleştirdik.

HEPKIT (GST-α)	:Biotrin İnternational,County Dublin,İrlanda.
MUKIT (GST-µ)	:Biotrin İnternational,County Dublin,İrlanda.
GST-π	:Immunodiagnostik GmbH,Wilhelmstr.7,64625 Bensheim, Almanya.

3.2. Metod

3.2.1. GST- α Tayini

Çalışmada ELISA yöntemine göre hazırlanmış ticari kit kullanıldı. Kitin çalışma prensibi, GST- α 'ya has saflaştırılmış monospesifik antikorlarla kaplı mikroçukurcularda Biotinile edilmiş tavşan anti-GST- α %0.095 lik Sodyum azid ihtiva eden antikor konjugatı ilavesiyle oluşan renkli antijen-antikor kompleksinin 690 nm de okunmasına dayanmaktadır.

Çalışma prosedürü; Her 100 ml distile su başına bir tablet olmak üzere 5 tablet ile 500 ml lik dilue etme / yıkama tamponu hazırlanıp (PBST) yine her 100 ml ye 4'er damla olacak şekilde hazır %25 lik Tween 20 çözeltisi ilave edildi. İlk önce bir şişe standarda 1,5 ml PBST ilave edilerek 50 ng/ml'lik stok çözeltisi hazırlandı. Bundan aşağıdaki şekilde 6 standart hazırlandı.

Konsantrasyon (ng / ml) :	25	10	5	2,5	0,75	0
Pozitif Kontrol (μ l) :	250	100	50	25	7,5	0
PBST (μ l) :	250	400	450	475	492,5	500

Yeterli sayıda mikroçukurcuk ayrılarak spora yerleştirildi. Serumlar PBST ile 1/5 oranında (1 hacim numune, 4 hacim PBST) sulandırıldı. Her bir standart ve numuneden 200'er μ l birer kuyucuğa pipetlendi. Oda ısısında 60 dk inkübe edildi. Kuyucuklar otomatik yıkayıcı ile 4 kez PBST kullanarak

yıkandı. Antikor konjugatı hafifce çalkanarak bundan her bir kuyucuğa 50'şer µl eklendi. 60 dk oda ısısında bırakıldı. Tekrar PBST ile 4 kez yıkandı. 5 ml PBST içinde bir tablet enzim konjugatı çözüldü (20dk beklenerek) ve 50'şer µl pipetlendi. Oda sıcaklığında 60 dk inkübe edildi. Tekrar PBST ile 6 kez yıkandı. Bir şişe substrat A içine bir şişe substrat B tableti çözerek substrat hazırlandı. Bundan 200'er µl her bir kuyucuğa eklendi. 15 dk kadar renk oluşumu için beklendi ve daha sonra her kuyucuğa 50'şer µl stop solusyonu eklenerek reaksiyon durduruldu. Okumalar 490 nm de yapıldı. Sonuçda standartların grafiği çizildi. Daha sonra grafik yardımıyla numuneye ait değerler elde edildi.

3.2.2. GST-π Tayini

Bu izoenzimin tayini için radyoimmunoassay (RIA) yöntemine dayalı ticari kit kullanıldı. Kitin çalışma prensibi iyot-125 ile işaretli GST-π tracer'ı ile numunede ve standartlarda bulunan GST ile oluşturdukları kompleksin çöktürülmesi neticesi gama sayıcı yardımı ile sayılması esasına dayanmaktadır.

Test çalışma prosedürü; İşaretli tüplere her bir standarttan, kontrollerden ve hasta ile kontrol serumlarından çift olarak 25'er µl pipetlendi. Üzerine 50'şer µl ilk antikor ilave edildi. 50 µl de tracer kondu. Bu karışım oda ısısında 16 saat inkübe edildi. Daha sonra her bir tüpe 125 µl çöktürme solusyonu eklenerek tekrar oda ısısında 1 saat daha inkübe edildi. Soğutmalı santrifujde (4°C) 1800 rpm' de 10 dk santrifuj edildi. Sonra dikkatlice süpernatant aspire edildi. Gama sayıcı ile 1 dk

sayıldı. Standart ve kontroller yardımı ile elde edilen kalibrasyon eğrisine göre numunelerin değerleri bulundu.

3.2.3. GST- μ Tayini

Bu çalışma sadece hasta grubu için ELISA (Enzyme-Linked İmmuno Sorbent Assay) yöntemi ile ticari kit kullanılarak yapıldı. Kitin çalışma prensibi, GST- μ 'ya has saflaştırılmış monospesifik antikorla kaplı mikroçukurcuklarda Biotinile edilmiş tavşan anti-GST- μ antikor konjugatı ve enzim konjugatlarının oluşturduğu renkli kompleksin ELISA cihazında 630 nm de okunması esasına dayanmaktadır.

Test çalışma prosedürü: Dondurulmuş total kanlar çalışma günü çözülüp oda sıcaklığına getirildi. Her numuneden 0,5 ml alınarak üzerine kandaki hücrelerin parçalanması için bir damla (% 1 oranında) Titon X-100 çözeltisi ilave edildi. Her 100 ml distile suya 1 tablet olacak şekilde 500 ml dilue etme / yıkama tamponu (PBST) hazırlanarak üzerine yine her 100 ml için 4'er damla Tween 20 çözeltisi ilave edildi. Pozitif ve negatif kontroller 0,5'er ml distile su ile sulandırıldı. Pozitif ve negatif kontroller ve numunelerden 100'er μ l çukurcuklara pipetlendi. Kontroller paralel çalışıldı. Oda ısısında 60 dk inkübe edildi. İnkübasyondan sonra kuyucuklar PBST çözeltisi ile 6 kez yıkandı. Her kuyucuğa bir damla (50 μ l) antikor konjugatı eklendi. Oda ısısında 60 dk bekletildi. Dökülüp, 4 kez PBST ile yıkandı. İki şişe enzim konjugatı 3'er ml PBST ile sulandırıldı. Enzim

konjugatından 50 µl her bir kuyucuğa ilave edildi. Oda ısısında 60 dk bekletildi. Kuyucuklar dökülüp PBST ile 4 kez yıkandı. Son olarak her kuyucuğa 100 µl substrat ilave edildi.10 dk içinde ELISA cihazı ile 630 nm'de absorbanları alındı. Pozitif kontrollerin ortalaması alındıktan sonra buna eşit veya daha yüksek bulunan absorbanlar pozitif olarak değerlendirildi. Düşük bulunanlar ise negatif olarak kaydedildi.



3.3. İstatistiki Analiz

GST- α ve GST- π bulgular "istatistiki olarak kantitatif ortalamaların incelenmesi" metodu ile değerlendirildi.(21,79,80,94) Bu maksatla sonuçların ortalama değerleri ve standart sapmaları aşağıdaki formüller yardımı ile hesaplandı.

$$\text{Aritmetik Ortalama: } \bar{X} = \frac{\sum X}{N} \quad (21,80)$$

$$\text{Standart Sapma : } SD = \frac{(X)^2 - (\sum X)^2 / N}{N - 1} \quad (21,79)$$

$$\text{"t" Testi : } t = \frac{X_1 - X_2}{S_{X_1 - X_2}} \quad (21,94)$$

Grup ortalamaları arasındaki farkın önemli olup olmadığını göstermek için "t" testi yapıldı. Ortalama farkına ait standart hatanın hesaplanması ise aşağıdaki şekilde yapıldı.

$$(S_{X_1})^2 = \frac{(N_1-1).(S_1)^2 + (N_2-1).(S_2)^2}{N_1 + N_2 - 2} \quad (21)$$

$$S_{X_1 - X_2} = \sqrt{(S_{X_1})^2 \cdot (1/N_1 + 1/N_2)} \quad (21)$$

- Σ : Toplama işareti
- N : Analiz sayısı
- t : Kritik oran
- X : Her bir gözlem
- X_1 : Kontrol grubu ortalaması
- X_2 : Hasta grubu ortalaması
- SD : Standart sapma
- $N_1 + N_2 - 2$: Serbestlik derecesi
- $S_{x_1-x_2}$: Ortalamalar arasındaki farkın hatası
- $(S_{x_1})^2$: Her iki grubun ortak varyansı
- p(probability): "t" tablosundan serbestlik derecesine göre bulunan değer.

GST- μ bulguları Khikare testi ile değerlendirildi. Hesaplamalar aşağıdaki formüller yardımı ile yapıldı.

$$f^t = \frac{\text{sıra toplamı} \times \text{sütun toplamı}}{\text{genel toplam}} \quad (21,79)$$

$$X^2 = \sum \frac{(f_A - f_A^t)^2}{f_A^t} + \sum \frac{(f_B - f_B^t)^2}{f_B^t} \quad (21,79)$$

$$S_D = (S_s - 1) \times (K_s - 1) \quad (21,79)$$

- X : Khikare deęeri
 f^t : Beklenen frekans
 f_A : 1.sıra bulunan frekanslar
 f_B : 2. " " "
 f_A^t : 1. " " beklenen frekanslar
 f_B^t : 2. " " "
 S_D : Serbestlik derecesi
 S_s : Sıra sayısı
 K_s : Kolon sayısı

4. BULGULAR

Çalışmamızda elde ettiğimiz sağlam ve kanserli hastalara ait GST- α ve GST- π aktivitelerinin ortalama değerleri, standart sapmaları ve istatistiki karşılaştırmaları sırasıyla Tablo-17 ve Tablo-18 de verilmiştir.

Tablo-17 den görüldüğü gibi serum GST- α düzeyi kontrol grubunda 4.77 ± 3.24 ng/ml, GIS kanserlilerde 5.60 ± 3.74 ng/ml, karaciğer kanserlilerde 6.20 ± 2.56 ng/ml, mide kanserlilerde 5.73 ± 4.91 ng/ml, diğer kanserlilerde 3.46 ± 4.62 ng/ml ve toplam kanserlilerde 4.90 ± 4.11 ng/ml olarak bulunmuştur.

Tablo -17:GST- α düzeyleri.

VAKA	N	X \pm SD ng/ml	t	p
Kontrol	32	4,77 3,24		
GIS Ca	46	5,60 3,74	1,018	> 0,4
Karaciğer Ca	14	6,20 2,56	1,462	> 0,2
Mide Ca	16	5,73 4,91	0,811	> 0,4
Diğer Ca	20	3,46 4,62	1,226	> 0,2
Toplam CA	66	4,90 4,11	0,156	> 0,5

Tablo-18 den görüldüğü gibi serum GST- π düzeyi, kontrol grubunda 23.46 ± 9.81 ng/ml, GIS kanserlerinde 35.84 ± 12.04 ng/ml, karaciğer kanserlilerde 33.79 ± 9.79 ng/ml, mide kanserlilerde 38.92 ± 13.69 ng/ml, diğer kanserlilerde 22.99 ± 13.46 ng/ml ve toplam kanserlilerde 33.10 ± 13.37 ng/ml olarak bulunmuştur

Tablo-18:GST- π düzeyleri.

VAKA	N	X + SD	ng/ml	t	p
Kontrol	33	23,46	9,81		
GIS Ca	63	35,84	12,04	5,086	< 0,001
Karaciğer Ca	18	33,79	9,79	3,596	< 0,001
Mide Ca	24	38,92	13,69	4,972	< 0,001
Diğer Ca	20	22,99	13,46	0,146	> 0,500
Toplam Ca	83	33,10	13,37	3,755	< 0,001

Kanserli hastalarda tespit edilen GST- μ pozitiflik oranının sigara içen veya içmeyen kişilerde ve cinsiyete göre dağılımı Tablo-19 da verilmiştir. Tablo-19'dan görüldüğü gibi GST- μ 25 hastada pozitif, 17 hastada negatif, pozitiflik oranı ise %59.53 olarak bulunmuştur. Ayrıca 27 erkek hastadan 15 pozitif, 12 negatif bulunmuştur. Pozitiflik oranı % 55.55 tespit edilmiştir. Yine 15 kadın hastadan 10'unda pozitif, 5'inde negatif çıkmıştır. Pozitiflik oranı % 66.66 olarak bulunmuştur. Sigara içmeyen 22 kişiden 14 tanesi pozitif, 8 tanesi negatif çıkmıştır. Pozitiflik oranı % 63.63 olarak bulunmuştur. Yine sigara içen 20 kişiden 11 tanesi pozitif, 9 tanesi negatif çıkmıştır. Pozitiflik oranı % 55 olarak bulunmuştur.

Tablo-19:GST- μ sonuçları ve pozitiflik yüzdeleri.

GST- μ	N	%	Sigara içen	%	Sigara içmeyen	%	Erkek	%	Kadın	%
Pozitif	25	59,53	11	55,00	14	63,63	15	55,55	10	66,66
Negatif	17	40,47	9	45,00	8	36,37	12	44,45	5	33,34
Toplam	42	100,00	20	100,00	22	100,00	27	100,00	15	100,00

5. TARTIŞMA

Total GST ve izoenzimlerinin araştırılmasında çoğunlukla Habig ve ark. (22)'nin metoduna dayanan elektroforetik metodlar kullanılmıştır. Araştırmamızda kullandığımız ticari kitler ise rutin çalışmalara yönelik olarak imal edilmiş çok daha hassas kitlerdir. Bu kitlerden GST- π RIA, GST- α ve GST- μ ELİSA prensibine dayanmaktadırlar. Bu yüzden sonuçlarımız hassas ve güvenilirdir. Literatürde GST- π dışında bu kitleri kullanan araştırmacıya rastlayamadık. GST- π 'yi ise çok az sayıda araştırmacı kullanmıştır. Kitler nispeten pahalı olmakla beraber hem araştırma hem de rutin çalışmalar için idealdirler.

Sağlıklı kişilere ait bulgularımız Tablo-20 de diğer araştırmacıların bulguları ile birlikte toplu halde verilmiştir. GST- π bulgularımız diğer araştırmacıların bulgularından daha yüksek olup, Howie ve arkadaşlarının (30), bulgularına biraz yakındır. Bulgular arasındaki bu fark kullanılan metodlar, çevresel ve genetik faktörlerin bir sonucu olabilir. Zira bu enzimin genetik varyasyonlar gösterdiği bilinmektedir. Öte yandan GST- α bulgularımız hemen hemen diğer tüm araştırmacıların bulguları ile uyum halindedir.

Literatürde kanserli vakaların serumunda GST- α izoenzimini tayin eden herhangi bir çalışmaya rastlayamadık. Bu yüzden bulgularımızı literatür bulguları ile karşılaştırma imkanı bulamadık. Ancak bu izoenzimin iyi bir karaciğer fonksiyon testi olduğu gösterilmiştir(2,3,24,26,70,74). Hussey ve ark.(26), halotan

hepatoksisitesi, Hayes ve ark.(26), otoimmün kronik aktif hepatit, Beckett ve ark.(2), doğum asfiksisinin karaciğere etkisi ve Beckett ve ark.(3), parasetamol zehirlenme neticesi meydana gelen karaciğer hasarı üzerine yaptıkları çalışmalar da GST- α 'nın karaciğer fonksiyonunu göstermek açısından rutin olarak kullanılan diğer karaciğer fonksiyon testlerinden (ALT, AST, vb.) daha iyi olduğunu göstermişlerdir.

Tablo-20 :Sağlıklı kişilerde bulduğumuz GST- α ve GST- π düzeylerinin literatür bulguları ile karşılaştırılması.

KAYNAK	GST- α	GST- π
Nitsu ve ark. (61)	---	9.2 \pm 3.1 ng/ml
Howie ve ark. (32)	4 ng/ml	10 ng/ml den az
Howie ve ark. (30)	---	16 (8-30) ng/ml
Hayes ve ark. (26)	0.5 - 4 ng/ml	---
Beckett ve ark. (3)	4 ng/ml	---
Bizim bulgularımız	4.77 \pm 3.24 ng/ml	23.46 \pm 9.81 ng/ml

GST- π ile ilgili olarak yapılmış immunohistokimyasal çalışmaların çoğunda onkofetal orjinli olduğuna inanılan kanserlerde GST- π seviyelerinde artış gözlenmiştir. Nitekim, Satoh ve ark.(69), hepatik tümörlerde, Di İlio ve ark.(14), böbrek tümörlerinde, Tsutsumi ve ark.(61), mide karsinomasında, Di İlio ve ark.(15), Di İlio ve ark.(16), Howie ve ark.(30) ve Eimoto ve ark(18), akciğer kanserinde, Nitsu ve ark.(61), gastrointestinal sistem

malignansilerinde GST- π izoenziminin immunohistokimyasal bir kanser markırı olabileceğini göstermişlerdir. Ayrıca, kolonik karsinomalarda GST- π 'nin differansiyasyon derecesine paralel olarak arttığı tespit edilmiştir. Öte yandan, kemoterapi esnasında ve cerrahi girişimler sonrasında da seviye değişiminin olduğu bildirilmiştir(24,54,61).

Yukarıdaki çalışmaların çoğu kanserli dokular üzerinde gerçekleştirilmiştir (14,16,18,69). Serumda yapılmış çalışma sayısı ise oldukça azdır(30,61). Bunlardan Nitsu ve ark.(61), kanserli vakalarda serum GST- π düzeyinin kontrollere göre önemli oranda yüksek olduğunu bulmuşlardır ki bu bulgu bizim bulgularımızı desteklemektedir. Aynı şekilde Howie ve ark.(30)'da akciğer kanserli hastalarda plazma GST- π düzeyinin kontrollere göre önemli oranda yüksek olduğunu bulmuşlardır

Tablo-19'dan görüldüğü gibi çalışmamıza alınan kanserli hastalardaki pozitiflik oranı yaklaşık %59.53 olarak bulunmuştur ki bu oran literatürde sağlıklı kişiler için verilen orandan farklı değildir(Tablo-21). Bu konuda yapılmış benzer bir çalışmada Strange ve ark.(82)'da meme kanserlilerde GST- μ pozitiflik oranını sağlıklı kişilerden farklı bulmamışlardır.Bu araştırmaların bulguları bizim bulgularımıza uymaktadır.

Öte yandan Seidegard. ve ark.(72,73), akciğer kanserli hastalarda GST- μ pozitiflik oranını %35, Lafuente ve ark.(39), mesane ve larinks kanserli hastalarda %33.3 olarak bulmuşlardır. Görüldüğü gibi bu araştırmacıların çalıştıkları kanser

Tablo - 21 : Çeşitli araştırmacıların kaydettikleri farklı toplumlara ait GST- μ pozitiflik yüzdeleri.

ARAŞTIRMACI	GST- μ POZİTİF (%)	ÖZELLİK
Seidegard ve ark. (77)	55	(Sağlıklı gönüllülerde)
Seidegard ve ark. (73)	58.3	(İlk grup kontrol)
	59	(İkinci grup kontrol)
Nazar ve ark. (59)	50	(Causian toplumunda)
	66.7	(Sigara içenlerde)
	51.5	(Sigara içmeyenlerde)
Lafuente ve ark. (39)	52	(Japonlarda)
	57.2	(Fransızlarda)
	59.2	(İngilizlerde)
	60	(Kendi çalışması)

vakaları sigara ile ilişkili kanserlerdir. GST- μ , sigara dumanındaki benzo(a)piren gibi kansorejen maddeleri konjuge ederek detoksifiye ederler. Dolayısı ile enzimin yokluğu sigara içenlerde kansere yakalanma riskini artırmaktadır. Öte yandan uzun süre ve günde 30 adet sigara içen kişilerde ise GST- μ negatiflik oranının arttığı gösterilmiştir(39,72). Hatta, Lafuente ve ark.(39), mesane ve larinks kanserli hastalarda GST- μ yokluğunun önemli olduğunu ve sigara içme hikayesi varsa riskin iki kat arttığını bildirmişlerdir. Aynı şekilde Heckbert ve ark.(28)'da sigaranın kanserle olan ilişkisinin GST- μ yokluğuna bağlı olduğunu ortaya koymuşlardır.

Hem bizim çalışmamız hemde yukarıdaki çalışmalardan GST- μ yokluğunun daha çok sigara içimi ile ilgili kanserlerde bir risk faktörü olduğunu göstermektedir. Nitekim bizim çalışmamızda, istatistiki açıdan önemli olmasa bile içenlerde GST- μ pozitiflik oranı %55, sigara içmeyenlerde %63.63 olarak bulunmuştur. Çalışmamıza sigara ile ilişkili olan ve olmayan her çeşit kanser vakasının alınmış olmasının her iki gruba ait farkın daha da büyümesini engellediği anlaşılmaktadır.

Çalışmamızda elde ettiğimiz GST- μ pozitiflik oranının cinsiyete göre dağılım oranları Tablo-19'da verilmiştir. Tablo-19'dan görüldüğü gibi GST- μ pozitiflik oranı erkeklerde %55.55, kadınlarda %66.66 dır. Bulgularımız Seidegard ve ark.(73)'nın bulguları ile uyum halindedir. Bu araştırmacılarda sağlıklı erkek kişilerde GST- μ pozitiflik oranını %55, kadınlarda %64.6 olarak bulmuşlardır.

Sonuç olarak, GST izoenzimlerinden GST- π 'nin özellikle GIS kanserleri için önemli bir markır olduğu, GST- μ yokluğunun ise bilhassa sigara içen kişiler için önemli bir risk faktörü oluşturduğu kanaatine varıldı.

6. ÖZET

Bu çalışma, 25-90 yaşları arasında (ortalama 54 ± 14) toplam 88 kanserli vaka (43 kadın, 45 erkek) ile 21-69 yaşları arasında (ortalama 44 ± 14) 40 sağlıklı kişi (20 kadın, 20 erkek) üzerinde gerçekleştirildi. Hastalarda ve sağlıklı kişilerde serum GST- α ve GST- π ile kanserli hastalarda plazma GST- μ düzeyleri araştırıldı.

Çeşitli kanser vakalarına ait GST- α ve GST- π değerleri sırasıyla GIS kanserinde; 5.60 ± 3.74 ng/ml, 35.84 ± 12.04 ng/ml, karaciğer kanserinde; 6.20 ± 2.56 ng/ml, 33.79 ± 9.79 ng/ml, mide kanserinde; 5.73 ± 4.91 ng/ml, 38.92 ± 13.69 ng/ml, diğer kanserlerde; 3.46 ± 4.62 ng/ml, $22,99 \pm 13.46$ ng/ml, toplam kanserlerde; 4.90 ± 4.11 ng/ml, 33.10 ± 13.77 ng/ml olarak bulunurken, kontrol grubunda bu değerler sırasıyla 4.77 ± 3.24 ng/ml, 23.46 ± 9.81 ng/ml olarak bulundu. Ayrıca, kanserli hasta grubunda GST- μ izoenziminin %59.53 oranında pozitif olduğu tespit edildi ki bu değer sağlıklı kişiler için literatürde verilen değerlerden farklı değildir.

Tüm hasta grupları ile kontrol grubuna ait GST- α değerleri arasında istatistiki açıdan önemli bir fark bulunmazken, GIS, karaciğer, mide ve toplam kanser gruplarına ve kontrol gruplarına ait GST- π düzeyleri arasında istatistiki açıdan önemli fark olduğu bulundu.

Bu sonuçlardan, GST- π 'nin özellikle GIS, mide ve karaciğer kanserlerinin teşhisinde önemli bir markır olduğu, GST- μ 'nün ise tüm kanser vakaları bir arada değerlendirildiğinde, sağlıklı kişilerden önemli bir farklılık göstermediği sonucuna varıldı.



SUMMARY

INVESTIGATION OF GLUTATHION S-TRANSFERASE (GST) AND ITS ISOENZYMES IN VARIOUS CANCER PATIENTS AND HEALTHY CONTROLS

This study was carried out on 88 cancer patients (43 females, 45 males) aged 25 to 90 years and 40 healthy subjects (20 females, 20 males) aged 21 to 69 years. Serum GST- α and GST- π of both cancer patients and healthy controls and plasma GST- μ level of cancer patients were investigated.

GST- α and GST- π level of patients with GIS, liver and stomach cancers were 5.60 ± 3.74 ng/ml and 35.84 ± 12.04 ng/ml, 620 ± 2.56 ng/ml and 33.79 ± 9.79 ng/ml and 5.73 ± 4.91 ng/ml and 38.92 ± 13.65 ng/ml respectively. The same parameters of patients with other type of cancers and those of total cancer group were 3.46 ± 4.62 ng/ml and 22.99 ± 13.46 ng/ml and 4.90 ± 4.11 ng/ml and 33.10 ± 13.77 ng/ml respectively. On the other hand, GST- α level of the control group was 4.77 ± 3.24 ng/ml and GST- π level was 23.46 ± 9.81 ng/ml.

Also, the positivity of GST- μ isoenzyme of cancer patients was 59.53% which was not significantly different from that of healthy subjects recorded in literature.

As a result, no significant difference between GST- α level of the control group and cancer patients was found whereas the difference between GST- π levels of the control group and that of patients with GIS, liver and stomach cancer and total cancer group was statistically significant. From these results, GST- π was concluded to be a significant marker for GIS, stomach and the liver cancers.



7. KAYNAKLAR

1-Bates,S.E.(1991) Clinical applications of serum tumor markers. Ann.Intern.Med.,115:623-638.

2-Beckett,G.J., Hussey,A.J., Laing,I., Howie,A.F., Hayes,J.D., Strange,R.C., Faulder,C.G. and Hume,R.(1989) Measurement of glutathione S-transferase B₁ in plasma after birth asphyxia:An early indication of hepatocellular damage. Clin.Chem.35(6):995-999.

3-Beckett,G.J., Foster,G.R., Hussey,A.J., Oliveire,D.B.G., Donovan, J.W., Prescott,L.F. and Proudfoot A.T.(1989) Plasma glutathione S-transferase and F Protein are more sensitive than alanine aminotransferase as markers of paracetamol(acetaminophen)-induced liver damage.C.Chem.35(11):2186-2189.

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

5-Bonfrer,J.M.G.(1990) Working group on tumor marker criteria. Tumour Biol.11:287-288.

6-Booth,J.,Boyland,E. and Sims,P.(1961) An enzyme from rat liver catalysing conjugations with glutathione.Biochem.J.79:516-524.

7-Boyer,T.D.(1986) Covalent labeling of the nonsubstrate ligand-binding side of glutathione S-transferases with bilirubin-Woodward's Reagent K. J.Biol.Chem.261:5363-5367.

8-Cagen,L.M.,Pisano,J.J.,Ketley,J.N.,Habig,W.H. and Jakoby,W.B.
(1975) The conjugation of prostaglandin A1 and glutathione catalysed by homogeneous glutathione S-transferases from human and rat liver. *Biochem. Biophys. Acta.* 398:205-208.

9-Carmichael, J., Forrester, L. M., Lewis, A. D., Hayes, J. D., Hayes, P. C. and Wolf,C.R. (1988) Glutathione S-transferase isoenzymes and glutathione peroxidase activity in normal and tumour samples from human lung. *Carcinogenesis.* 9(9):1617-1621.

10-Chan,D.W. and Sell,S.(1994) Tumor Markers. In: "Tietz Textbook of Clinical Chemistry. 2th Edition. Ed: Burtis, C.A. and Ashwood, E.R. p:897-927. W.B. Saunders Company, Philadelphia.

11-Clark,A.G.(1989) The comparative enzymology of the glutathione S-transferases from non-vertebrate organisms. *Comp. Biochem. Physiol.* 92B :419-446.

12-Danielson,U.H.,Hermann,E. and Bengt,M (1987) Activity profiles of different mammalian glutathione transferases for a homologous series of 4-hydroxyalk-2-enals. In "Glutathione S-transferases and carcinogenesis". Ed: Hayes, D.J., Mantle, T.J., Pickett, C.B., eds. p:61-62. Taylor and Francis, London.

13-Danielson,U.H. and Mannervik,B.(1985) Kinetic independence of the subunits of cytosolic glutathione transferase from the rat. *Biochem. J.* 231: 263-267.

14-Di Ilio, C., Aceto, A., Bucciarelli, T., Angelucci, S., Felaco, M., Grilli, A. and Federici, G.(1990) Glutathione transferase isoenzymes from human prostate. *Biochem.J.*271:481-485.

15-Di Ilio, C., Boccio, G. D., Casaccia, R., Aceto, A., Giacomo, F. D. and Federici, G.(1987) Selenium level and glutathione-dependent enzyme activities in normal and neoplastic human lung tissues. *Carcinogenesis*, 8 (2): 281-284.

16-Di Ilio, C., Boccio, G. D., Aceto, A., Casaccia, R., Mucilli, F. and Federici, G.(1988) Short Communication: Elevation of glutathione transferase activity in human lung tumour. *Carcinogenesis*. 9 (2):335-340.

17-Dipes, G. and A. Jay, G.(1991) Biotransformation of toxicants. In: "Caserett and Doull's Toxicology, 4th edition". Ed: Amdur, M.O., Jhon, D. and Curtis, D. K. p:88-126. Pergamon Press, USA.

18-Eimoto, H., Tsutsumi, M., Nakajima, A., Yamamoto, K., Takashima, Y., Maruyama, H. and Konishi, Y.(1988) Expression of the glutathion S-transferase placental form in human lung carcinomas. *Carcinogenesis*. 9(12): 2325-2327.

19-Faulder, C.G., Hirrell, P.A., Hume, R. and Strange, R.C.(1987) Studies of the development of basic, neutral and acidic isoenzymes of glutathione S-transferase in human liver, adrenal, kidney and spleen. *Biochem. J.* 241: 221-228.

20-Federici,G.,Di Ilio,C.,Sacchetta,P.,Polidoro,G.and Bannister, J.V.
(1985) The isolation, characterisation and kinetics of glutathione-S-transferase from human platelets. *Int. J. Biochem.* 17(5):653-656.

21-Fişek, N. H. ve Dirican, M. R. (1970) Hekimlikde İstatistik. s:64-68.
Atatürk Üni. Tıp Fak.Basımevi,Erzurum.

22-Habig, W. H., Pabst, M. J. and Jakoby, W. B. (1974) Glutathione S-transferases. *The Journal of Biological Chemistry.* 249(22):7130-7139.

23-Habig, W.H., Pabst, M.J., Fleischner, G., Gatmaitan, Z., Arias, I. M. and Jakoby, W.B.(1974) The identity of glutathione S-transferase B with ligandin a major binding protein of liver.*Proc.Nat. Acad. Sci. USA,* 71: 3879-3882.

24-Hayes, J. D., Gilligan, D., Chapman, B. J. and Beckett, G. J. (1983) Purification of human hepatic GST and the development of a radioimmunoassay for their measurement in plasma. *Clinica Chimica Acta.* 134:107-121.

25-Hayes, J. D. and Clarkson, G. H. D. (1982) Purification and charecterization of three forms of glutathione S-transferase. *A. Biochem. J.* 207: 459-470.

26-Hayes, P.C., Hussey, A.J., Keating, J., Bouchier, I.A.D., Wiliams, R., Beckett, G.J. and Hayes, J.D.(1988) Glutathione S-transferase levels in autoimmune chronic active hepatitis:a more sensitive index of hepatocellular damage than aspartate transaminase.*Clinica Chimica Acta.*172:211-216.

27-Hayes, P.C., Bernard, P., Peter, M.A., Roger, W. and John, D.H.
(1987) Glutathione S-transferases and human pathology. In "Glutathione S-transferases and (pre)neoplasia.", Ed:Hayes,D.J., Mandle,T.J., Pickett,C.B., eds., p:175-187, Taylor and Francis,London.

28-Heckbert, S.R., Weiss, N.S., Hornung, S.K., Eaton, D.L. and Motulsky, A.G.(1992) Glutathione S-transferase and epoxide hidrolase activity in human leukocytes in relation to risk of lung cancer and other smoking-related cancers. Journal of the National Cancer Institue. 84(6):414-422.

29-Henderson, B.E., Ross, R.K., Pike, M.C.(1991) Toward the primery prevention of cancer. Science. 24:1131-1138.

30-Howie, A.F., Douglas, J.G., Fergusson, R.J. and Beckett, G.J.
(1990) Measurements of glutathione S-tranferases Pi isoenzyme in plasma, a possible marker for adenocarcinoma of lung.Clin.Chem.36(3):453-456.

31-Howie, A. F., Forrester, L. M., Glancey, M. J., Schlager, A., Powis, G., Beckett, G. J., Hayes, J. D. and Wolf, C. R. (1990) Glutathione S-transferase and glutathione peroxidase expression in normal and tumour human tissues. Carcinogenesis. 11(3):451-458.

32-Howie, A.F., Hayes, J.D. and Beckett, G.J.(1988) Purification of acidc glutathione S-tranferases from human lung,placenta and erythrocyte and the development of a specific radioimmunoassay for their measurement. Clinica Chimica Acta.177:65-76.

33-Hubmann, J.(1993) Memorix cep kitabı Cerrahi. p:268. Turgut yayıncılık ve ticaret A.Ş.,İstanbul.

34-Husby, P., Srai, K. and Ketterer, B.(1981) Effect of ligandin on the efflux of co-deuteroporphyrin from isolated rat liver mitochondria. Biochem. Biophys. Res. Comm. 100:651-655.

35-Jakoby, W. B., Ketterer, B. and Mannervik, B. (1984) Glutathione transferases: nomenclature. Biochem. Pharmacol. 33:2539-2540.

36-Ketterer, B., Ross-Manse l, P. and Whitehead, J.K.(1967) The isolation of carcinogen-binding protein from livers of rats given 4-dimethylaminoazobenzene. Biochem. J.103:316-324.

37-Ketterer, B., Tan, K. H., Meyer, D. J. and Coles, B. (1987) Glutathione transferases:A possible role in the detoxication of DNA and Lipid hydroperoxides. In:"Glutathione S-transferases and carcinogenesis.", Ed:Hayes, J.D., Mantle,T.J., Pickett, C.B.,eds.p:149-163. Taylor and Francis. London

38-Kutluk, T., Kars, A. (1994) "Kanser Konusunda Genel Bilgiler", 6.Baskı, Türk Kanser Araştırma ve Savaş Kurumu Yayınları, Başbakanlık Basımevi, Ankara.

39-Lafuente, A., Pujol,F., Carretero, P., Villa,J.P. and Cuchi,A. (1993) Human glutathione S-transferase μ (GST- μ) deficiency as a marker for the susceptibility to bladder and larynx cancer among smokers. Cancer Letters. 68:49-54.

40-Levi, A.J., Gatmaitan, Z. and Arias, I.M. (1969) Two hepatic cytoplasmic protein fractions, Y and Z and their possible role in the hepatic uptake of bilirubin sulfobromophthalein and other anions. *J. Clin. Invest.* 48:2156-2167.

41-Lewis, A D., Forrester, L. M., Hayes, J. D., Wareing, C.J., Carmichael, J., Harris, A.L., Mooghen, M. and Wolf, C.R.(1989) Glutathione S-transferases isoenzymes in human tumours and tumour derived cell lines. *Breast. Cancer.* 60:327-331.

42-Listowsky, I., Abramovitz, M., Homma, H. and Nitsu, Y. (1988) Intracellular and transport of hormones and xenobiotics by glutathione S-transferases. *Drug Metab. Rev.* 19:305-318.

43-Listowsky, I., Gatmaitan, Z. and Arias, I. M. (1978) Ligandin retains and albumin loses bilirubin binding capacity in liver cytosol. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA,* 75:1213-1216.

44-Loscalzo, J. and Freedman, J. (1986) Purification and characterization of human platelet glutathione S-transferase. *Blood.* 67 (6): 1595-1599.

45-Mandelson, J. (1991) Principles of neoplasia, In "Harrison's Principles of Internal Medicine", 12th Edition, p :1576-1587, 1552-1561.

46-Mangold, J. B. and Abdel-Monem, M. M. (1980) Stereoselectivity of the glutathione S-transferase catalysed conjugations aralkyl halides. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 96:333-340.

47-Mangold, J. B. and Abdel-Monem, M.M. (1983) Stereochemical aspects of conjugation reactions catalysed by rat liver glutathione S-transferase isoenzymes. *J. Med. Chem.* 26:66-71.

48-Mannervik, B. (1985) The isozymes of glutathione transferase. *Adv. Enzymol.* 57:357-417.

49-Mannervik, B. (1987) The application of glycosyl-polyprenyl phosphate intermediate to the study of glycoconjugates biosynthesis. *Chem.Scr.* 27A:121.

50-Mannervik, B. and Danielson, U. H. (1988) Glutathione transferases structure and catalytic activity. *CRC.Crit. Rev. Biochem.* 23:283-337.

51-Mannervik, B. and Jensson, H.(1982) Binary combinations of four protein subunits with different catalytic specificities explain the relationship between six basic glutathione S-transferases in rat liver cytosol. *J. Biol. Chem.* 257:9909-9912.

52-Mannervik, B., Per, A. U., Helena, D., Claes, G., Helgi, J., Nazmi, Ö. M., Kalim,T., Margareta, W. and Hans, J. (1987) Three classes of mammalian glutathione transferaz and their occurrence in the rat and the mouse. In "Glutathione S-transferases and Carcinogenesis"Ed: Hayes, J.D., Mantle,T.J., Pickett C.B., eds., Taylor and Francis, London.

53-Marcus, C.J., Habig, W.H. and Jakoby, W.B. (1978) Glutathione transferase from human erythrocytes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 188(2):287-293.

54-Mc Quaid, S., O'Brien, A., Butler, M. R. and Humphries, P. (1988) Transcriptional activation of the glutathione S-transferase π gene in human ureteric and bladder carcinomas. *Cancer Letters*. 39:209-216.

55-Medh, R. D., Saxena, M., Singhal, S. S., Ahmad, H. and Awasthi, Y. C. (1991) Characterization of a novel glutathione S-transferase isoenzyme from mouse lung and liver having structural similarity to rat glutathione S-transferase 8-8. *Biochem. J.* 278:793-799.

56-Meyer, D. J. and Birian, C. (1987) Prostaglandin isomerase activity of purified rat Glutathione transferases. In: "Glutathione S-transferases and carcinogenesis", Ed: Hayes, D.J., Mandle, T.J., Pickett, C.B., eds. p:57-59.

57-Meyer, D. J., Coles, B., Pemble, S. E., Gilmore, K. S., Fraser, G. M. and Ketterer, B. (1991) Theta, a new class of glutathione transferases purified from rat and man. *Biochem. J.* 274:409-414.

58-Morgenstern, R., Hakan, W. and Joseph, W. D. (1987) Mechanisms of activation of the microsomal glutathione transferase. In: "Glutathione S-transferases and carcinogenesis". Ed: Hayes, D.J., Mantle, T.J., Pickett, C.B., eds. p:29-37. Taylor and Francis, London.

59-Nazar, S.V., Arno, G.M., David, L.E., Emily, W., Sigrid, K.H., Zhong-Tai,L., Pat,S. and Noel, S.W. (1993) Glutathione S-transferases. Cancer Research. 53:2313-2318.

60-Niemayer, C.M. and Stephan, E.S. (1993) Acute Lymphoblastic Leukemia, In"Nathan and Oski, Hamatology of Infancy and Childhood", 4th Edition, p:1249-1287.

61-Nitsu, Y., Takahashi, Y., Saito, T., Hirata, Y., Arisato, N., Maruyama, H., Kohgo,Y. and Listowsky, I. (1989) Serum glutathione-S-transferase- π as a tumor marker for gastrointestinal malignancies. Cancer. 63: 317-323.

62-Ommen, B. V. ,Bogaards, J. J. P., Peters, W. H. M., Blaauboer, B. and Bladeren, P.J.V. (1990) Quantification of human hepatic glutathione S-transferases. Biochem. J. 269:609-613.

63-Pabst, M. J., Habig, W. H. and Jakoby, W. B. (1973) Mercapturic acid formation:The several glutathione transferases of rat liver.Biochem.Biophys. Res. Comm. 52:1123-1128.

64-Pickett, C.B. (1989) Glutathione S-transferases: Gene structure, regulation, and biological function. Annu. Rev. Biochem. 58:743-764.

65-Pickett, C. B. and Lu, A. Y. H. (1989) Glutathione S-transferases: Gene structure, regulation, and biological function. Annual. Rev. Biochem. 58: 743-764.

66-Rodwell, V.W. (1985) General Properties of Enzymes, In "Harper's Review of Biochemistry", 20th Edition, p: 52-64. USA.

67-Sato, K. (1989) Glutathione transferases as markers of preneoplasia and neoplasia. *Adv. Cancer Res.* 52:206-255.

68-Sato, K., Kimihiko, S., Ichiro, H., Shigeki, T., Yasushi, S., Yuhko, S., Noboru, T., Yukio, I. and Akio, K. (1987) Placental glutathione S-transferase as a marker for (pre)neoplastic tissues. In: "Glutathione S-transferases and carcinogenesis". Ed: Hayes, D.J., Mantle, T.J., Pickett, C.B., eds. p:127-137. Taylor and Francis, London.

69-Sato, K., Sato, K., Tsuchida, S., Hatayama, I., Tamai, K. and Shen, H. (1989) Glutathione S-Transferases and (pre)neoplasia. *Adv. Cancer Res.* 5:105-155.

70-Seidegard, J., DePierre, J. W. and Pero, R. W. (1985) Hereditary interindividual differences in the glutathione transferase activity towards trans-stilbene oxide in resting human mononuclear leukocytes are due to a particular isozyme(s). *Carcinogenesis.* 6(8):1211-1216.

71-Seidegard, J. and Pero, R. W. (1985) The hereditary transmission of high glutathione transferase activity towards trans-stilbene oxide in human mononuclear leukocytes. *Hum. Genet.* 69:66-68.

72-Seidegard, J., Pero, R. W., Miller, D. G. and Beattie, E. J. (1986)

A glutathione transferase in human leukocytes as a marker for the susceptibility to lung cancer. *Carcinogenesis*. 7(5):751-753.

73-Seidegard, J., Pero, R.W., Markowitz, M.M., Roush, G., Miller,

D.G. and Beattie, E.J. (1990) Isoenzyme(s) of glutathione transferase (class Mü) as a marker for the susceptibility to lung cancer: a follow up study. *Carcinogenesis*. 11(1):33-36

74-Seigers, C.P., Bossen, K.H., Younes, M., Mahlke, R. and

Oltmanns, D. (1982)Glutathione and Glutathione S-transferases in the normal and diseased human liver. *Pharm. Res. Comm.* 14(1):61-72.

75-Senjo, M., Ishibashi, T. and Imar, Y. (1985) Purification and

characterization of cytosolic liver protein facilitating heme transport into apocytochrom b5 from mitochondria. *J. Biol. Chem.* 260:9191-9196.

76-Short Communications.(1986) Organ distribution of glutathione

transferase izoenzymes in the human fetus:differences between liver and extrahepatic tissues. *Biochemical Pharmacology*. 35(9)1616-1619.

77-Short Communications.(1987) The polymorphic expression of

neutral glutathione S-transferase in human mononuclear leucocytes as measured by specific radioimmunoassay. *Biochemical Pharmacology*. 36(22)4013-4015.

78-Simons, P.C. and Jagt, D.L.V.(1977) Purification of GST from human liver by Glutathione - affinity Chromatography. Analytical Biochemistry., 82:334-341.

79-Snedecor,G.W. and Cochran,W.G. (1971) Statistical methods.4th. p:102-198. The Iowa State University press,Lowa.

80-Spiegel, R.M.(1972) Statistics,p:45,Mc Graw-Hill International book Company, New York.

81-Stenius, U. (1993) Different inhibition of DNA synthesis by transforming growth factor β and phenobarbital on GST-P- positive and GST-P-negative hepatocytes. Carcinogenesis. 14(1):159-161.

82-Strange, R. C., Faulder, C. G., Davis, B. A. and eds. (1984) The human glutathione S-transferases: Studies on the tissue distribution and genetic variation of the GST1, GST2 and GST3 isozymes. Ann. Hum. Genet.48:11-20.

83-Söderström, M., Sven, H. and Bengt, M. (1987) Glutathione transferases in murine mastocytoma cells.In:"Glutathione S-transferases and carcinogenesis". Ed:Hayes, D.J., Mantle, T.J., Pickett, C.B., eds.p:257-258. Taylor and Francis, London.

84-Suzuki, T., Shaw, D. C. and Board, P. G. (1991) Purification and charecterizitation of acidic Glutathione S-transferase 6 from human brain. Biochem. J.274:405-408.

85-Te Koppele, J. M., Coles, B., Ketterer, B. and Mulder, G. J. (1988)

Stereoselectivity of rat liver glutathione transferase isoenzymes for α -bromoisovaleric acid and α -bromoisovalerylurea enantiomers. *Biochem. J.* 252:137-142.

86-Toshihisa, I.(1987) The role of cardiac glutathione S-transferases and

energy-linked transport system for glutathione S-conjugates. In:"Glutathione S-transferases and carcinogenesis". Ed: Hayes,D.J., Mantle,T.J., Pickett,C.B., eds. p:51-52.Taylor and Francis.London.

87-Totawa, N.J., Sell, S.(1992) Serological Cancer Markers. The

Humana Press,Germany.

88-Trakshel, G.M and Maines, M.D. (1988) Charecterization of

glutathione S-transferases in rat kidney. *Biochem.J.*252:127-136.

89-Tsuchida, S. and Sato, K.(1990) Rat spleen glutathione transferases.

A new acidic form belonging to the Alpha class. *Biochem. J.* 266:461-465.

90-Tu, C.P.D., Hui-Chen, J.L. and Chanma, C.R.(1987) The rat

glutathione S-transferases supergene family: Molecular basis of gene multiplicity.

In:"Glutathione S-transferases and carcinogenesis". Ed: Hayes, D.J., Mantle, T.J., Pickett, C.B., eds.p:87-109.Taylor and Francis, London.

91-Ünsal, İ. (1990) Koyun karaciğeri glutatyon S-transferazının

saflaştırılması ve izozimlerinin tanımlanması., Doktora tezi,Ankara.

92-Vander Jagt, D.L., Wilson, S.P., Dean, W. and Simons, P.C.(1982) Bilirubin binding to rat liver ligandins (Glutathione transferases A and B) relationship between bilirubin binding and transferase activity. J. Biol.Chem. 257:1997-2001.

93-Vander Jagt, D.L., Wilson, S.P. and Roger, R.E.(1983) Regulation of the glutathione S-transferase activity of bilirubin transport protein (ligandin) from human liver. J. Biol. Chem. 258:5689-5694.

94-Velicangil, S. (1972) Tıbbi Biyometri ve tatbikatı. 3. baskı. s: 159-178. Sermet Matbası, İstanbul.

95-Yann-Pyng, S. T., Hsieh, T. and Tu, C. D. (1993) The glutathione S-transferase D genes. The J.Biol.Chem.268(13):9737-9746.

96-Yokohama, Y., Tsuchida, S., Hatayama, I. and Sato, K.(1993) Lack of peroxisomal enzyme inducibility in rat hepatic preneoplastic lesions induced by mutagenic carcinogens:contrasted expression of glutathione S-transferase P form and enoyl CoA hydratase. Carcinogenesis. 14(3):393-398.