

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DOCETAXEL/ADRIAMYCİN KEMOTERAPİSİ ALAN GÖĞÜS
KANSERLİ HASTALARDA SERUM L-KARNİTİN VE
GLUTATYON S- TRANSFERAZ DÜZEYLERİNİN
SPEKTROFOTOMETRİK OLARAK İNCELENMESİ**

**Tezi Hazırlayan
Dilek KAAAN**

**Tezi Yöneten
Yrd. Doç. Dr. Ebru SAATÇI**

**Biyoloji Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi**

**Ocak 2010
KAYSERİ**

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DOCETAXEL/ADRIAMYCİN KEMOTERAPİSİ ALAN GÖĞÜS
KANSERLİ HASTALARDA SERUM L-KARNİTİN VE
GLUTATYON S- TRANSFERAZ DÜZEYLERİNİN
SPEKTROFOTOMETRİK OLARAK İNCELENMESİ**

Tezi Hazırlayan
Dilek KAAAN

Tezi Yöneten
Yrd. Doç. Dr. Ebru SAATÇI

Biyoloji Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi

**Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
EÜBAP-FBY-09-855 kodlu proje ile desteklenmiştir.**

Ocak 2010
KAYSERİ

Yrd. Doç. Dr. Ebru SAATÇI danışmanlığında **Dilek KAAN** tarafından hazırlanan “**Docetaxel/Adriamycin Kemoterapisi Alan Göğüs Kanserli Hastalarda Serum L-Karnitin Ve Glutasyon S-Transferaz Düzeylerinin Spektrofotometrik Olarak İncelenmesi**” adlı bu çalışma, jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında **Yüksek Lisans** tezi olarak kabul edilmiştir.

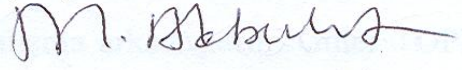
14/01/2010

JÜRİ:

Başkan : Yrd.Doç.Dr. Servet ÖZCAN

Üye : Yrd.Doç.Dr. Ebru SAATÇI

Üye : Yrd.Doç.Dr. Mikail AKBULUT

**ONAY:**

Bu tezin kabulü, Enstitü Yönetim Kurulunun 19/01/2010 tarih ve 2010/03_02 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

19/01/2010

Prof. Dr. Nusret AYYILDIZ

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım boyunca bana göstermiş olduğu yardım ve yönlendirmelerden dolayı değerli hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Ebru SAATÇİ' ye teşekkürü bir borç bilirim.

İhtiyaç duyduğumda değerli yardımlarını benden esirgemeyen Sayın hocam Yrd. Doç. Dr. Servet ÖZCAN'a sonsuz teşekkür ederim.

Ayrıca hasta serum örneklerinin toplanması sırasında bana yardımlarını esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Şerif AKMAN'a, Doç. Dr. Özlem ER'e ve Uzman Dr. Halit KARACA'ya teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım sırasında hep yanımda olan desteğini hiç esirgemeyen değerli arkadaşlarım Ömer ERGİN ve Bekir RASEL'e sonsuz teşekkür ederim.

Laboratuvar ortamını uyum içinde paylaştığım çalışma arkadaşlarım Güler TOPRAK, Şeyda ERDOĞAN, Canan TORUN, Serkan KAYA, Esmâ ÖZHÜNER, Leyla KIRIM, Osman İBİŞ, Dilek DABANLI ve Handan ÖZLÜ'ye yardım ve desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

FBY-09-855 kodlu projeye desteklerinden dolayı Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine teşekkür ederim.

En özel teşekkürlerim beni yalnız bırakmayan aileme...

DOCETAXEL/ADRIAMYCİN KEMOTERAPİSİ ALAN GÖĞÜS KANSERLİ HASTALARDA SERUM L-KARNİTİN VE GLUTATYON S- TRANSFERAZ DÜZEYLERİNİN SPEKTROFOTOMETRİK OLARAK İNCELENMESİ

Dilek KAAN

Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü

Yüksek Lisans Tezi, Ocak 2010

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Ebru SAATÇİ

ÖZET

Bu çalışmada Docetaxel/Adriamycin kemoterapisi alan göğüs kanserli hastalarda serum L-karnitin ve Glutasyon S-transferaz düzeyleri spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Sağlıklı kişilerden (kontrol grubu) (n=24), ilaç tedavisine başlamamış olan meme kanseri tanısı konmuş hastalardan (n=24) ve aynı hastaların Docetaxel/Adriamycin kemoterapisi (n=24) almasından sonra alınan serum örneklerinde L-karnitin düzeyleri ve Glutasyon S-transferaz (GST) aktiviteleri spektrofotometrik olarak incelenmiştir. L-karnitin düzeylerinin incelenmesi sonucunda L-karnitin ortalama değerleri kontrol grubunda $38,38 \pm 10,25$ $\mu\text{mol/L}$, tedavi öncesi hastalarda $47,31 \pm 24,79$ $\mu\text{mol/L}$ ve tedavi sonrası hastalarda $49,31 \pm 28,04$ $\mu\text{mol/L}$ olarak bulunmuştur. Genel GST substratı olan CDNB'ye karşı ortalama GST aktiviteleri incelendiğinde, serum GST aktivitesi kontrol grubunda $0,70 \pm 0,33$ nmol/dk/mg, tedavi öncesi hastalarda $1,70 \pm 0,64$ nmol/dk/mg ve tedavi sonrası hastalarda $1,58 \pm 0,58$ nmol/dk/mg olarak, GST Pi izoenzim substratı etakrinik asit (EA)'e karşı ortalama serum GST aktiviteleri kontrol grubunda $5,52 \pm 2,88$ nmol/dk/mg, tedavi öncesi hastalarda $4,10 \pm 2,05$ nmol/dk/mg ve tedavi sonrası hastalarda $8,35 \pm 3,58$ nmol/dk/mg olarak bulunmuştur. DCNB ve EPNP'nin substrat olarak kullanıldığı çalışma koşulları altında serumlarda GST aktivitesi gözlenmemiştir.

Çalışmada elde edilen L-karnitin değerleri için, İki örnek t-testi ile yapılan gruplar arası istatistiksel karşılaştırmalarda kontrol grubu - tedavi öncesi hastalar ve kontrol grubu - tedavi sonrası hastalar arasındaki farklılık anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$). Tedavi öncesi ve tedavi sonrası hastalar arasındaki farklılık anlamlı bulunmamıştır ($p > 0,05$). Bulunan CDNB'ye karşı total serum GST değerleri için, İki örnek t-test'e göre yapılan gruplar arası istatistiksel karşılaştırmalarda kontrol grubu - tedavi öncesi hastalar ve kontrol grubu - tedavi sonrası hastalar arasındaki farklılık anlamlı bulunmuştur ($p <$

0,05). Tedavi öncesi ve tedavi sonrası hastalar arasındaki farklılık anlamlı bulunmamıştır ($p > 0,05$). Ayrıca serum GST Pi izoenzim karşılığı olan etakrinik asitin substrat olarak kullanıldığı GST aktivitesi değerleri için, İki örnek t-test'e göre yapılan gruplar arası istatistiksel karşılaştırmalarda kontrol grubu - tedavi sonrası hastalar ve tedavi öncesi - tedavi sonrası hastalar arasındaki farklılık anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$). Kontrol grubu ve tedavi öncesi hastalar arasındaki farklılık anlamlı bulunmamıştır ($p > 0,05$).

Bu çalışma meme kanseri metabolizması ve meme kanseri tedavisinde kullanılan söz konusu ilaçların, L-karnitin'in rol aldığı metabolik yolların ve Glutatyon S-transferaz'ların katalizlediği detoksifikasyon mekanizmaları üzerine etkilerinin incelenmesine, kanser biyolojisi üzerine yapılan çalışmalara ve tedavi yöntemlerinin etkinliklerine dair noktaların ortaya çıkarılmasına önemli ölçüde katkıda bulunacağını göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Göğüs kanseri, Docetaxel, Adriamycin, L-karnitin, Glutatyon S-transferazlar.

SPECTROPHOTOMETRIC DETECTION OF SERUM L-CARNITINE AND GLUTATHIONE S-TRANSFERASE ACTIVITIES ON BREAST CANCER PATIENTS WHOM GOT DOCETAXEL/ADRIAMYCIN CHEMOTHERAPHY

Dilek KAAN

Erciyes University, Graduate School of Natural and Applied Sciences

M. Sc. Thesis, January 2010

Thesis Supervisor: Assist. Prof. Dr. Ebru SAATÇI

ABSTRACT

In this study, the goal is to determine serum L-carnitine and Glutathione S-transferase (GST) activities on breast cancer patients whom got Docetaxel/Adriamycin chemotherapy. The blood samples were taken from healthy women (control group) (n=24), breast cancer patients before chemotherapy (n=24) and the same patients after Docetaxel/Adriamycin chemotherapy (n=24). The serum L-carnitine mean levels were found as $38,38 \pm 10,25$ $\mu\text{mole/L}$, $47,31 \pm 24,79$ $\mu\text{mole/L}$ and $49,31 \pm 28,04$ $\mu\text{mole/L}$ for control group, patients before chemotherapy and patients after chemotherapy, respectively. Glutathione S-transferase activities were determined by using their general substrate CDNB, GST Mu isozyme substrate DCNB, GST Tau substrate EPNP and GST Pi substrate etachrinic acid (EA). GST mean activities in the serum which were found as $0,70 \pm 0,33$ nmole/min/mg for control group, $1,70 \pm 0,64$ nmole/min/mg for patients before chemotherapy and $1,58 \pm 0,58$ nmole/min/mg for patients after chemotherapy by using CDNB as substrate. GST mean activities in the serum which were found as $5,52 \pm 2,88$ nmole/min/mg for control group, $4,10 \pm 2,05$ nmole/min/mg for patients before chemotherapy and $8,35 \pm 3,58$ nmole/min/mg for patients after chemotherapy by using EA as substrate. Serum GST activities were not determined by using DCNB and EPNP as substrates.

Paired Sample Test statistical analysis were used to compare calculated serum L-carnitine levels and GST activities. For the serum L-carnitine levels, the statistically significant differences were found for the comparison of control-patients before chemotherapy groups ($p < 0,05$), and for the comparison of control and patients after chemotherapy groups ($p < 0,05$). The statistically significant difference was not found for

the comparison of patients before chemotherapy and patients after chemotherapy groups ($p > 0,05$).

The statistically significant differences were found for the comparison of control and patients before chemotherapy groups ($p < 0,05$), and for the comparison of control and patients after chemotherapy groups ($p < 0,05$) for GST enzyme activities by using CDNB as substrate. The statistically significant difference was not found for the comparison of patients before chemotherapy and patients after chemotherapy groups ($p > 0,05$). On the other hand, statistically significant differences were found for the comparison of control and patients after chemotherapy groups ($p < 0,05$), and for the comparison of patients before and patients after chemotherapy groups ($p < 0,05$) for GST enzyme activities by using CDNB as substrate. The statistically significant difference was not found for the comparison of control and patients before chemotherapy groups ($p > 0,05$).

The study contributes to determine breast cancer metabolism and Docetaxel/Adriamycin chemotherapy effect on serum L-carnitine levels and Glutathione S-transferase activities, have role in drug detoxification and cancer metabolisms. The study shows that the results can be used as an indicator of some significant therapies and cancer metabolism studies on breast cancer biology.

Keywords: Breast cancer, Docetaxel, Adriamycin, L-carnitine, Glutathione S-transferase.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	i
TEŞEKKÜR.....	ii
ÖZET.....	iii
ABSTRACT	v
KISALTMA ve SİMGELER	x
TABLOLAR LİSTESİ.....	xii
ŞEKİLLER LİSTESİ	xiii
1. BÖLÜM	
GİRİŞ	1
2. BÖLÜM	
GENEL BİLGİLER	4
2.1. Meme Kanseri	4
2.1.1. Meme Kanserinde Kemoteropik İlaçlar	5
2.2. Karnitin	6
2.2.1. Karnitin Sistemi	8
2.3. Glutatyon S-Transferaz Enzim Ailesi	10
2.3.1. GST'lerin Yapıları ve Fonksiyonları	11
2.3.1.1. GST'lerin Katalitik Aktiviteleri	11
2.3.1.2. GST'lerin Protein Yapıları.....	11
2.4. Memeli GST'leri İçin Sınıflandırma Kriterleri	13
2.4.1 Alfa /Mu/Pi Sınıfları	16
2.5. Enzimik Defoksifikasyonda GST'lerin Rolü	17
2.6. GST'lerin Karakterizasyonunda Kullanılan Model Substratlar	19

2.7.	Glutasyon S-Transferaz Aktivitesini Etkileyen Faktörler	22
2.7.1.	Bireysel Faktörlerin ve Fizyolojik Dönemlerin Etkisi	22
2.7.2.	Glutasyon S-transferaz Aktivitesini Etkileyen Ksenobiyotikler	22
2.7.3.	Bazı Patolojik Durumlarda GST Aktivitesi	24
2.7.3.1.	Çoklu İlaç Rezistansında (Multidrug Resistance MDR) Glutasyon S- Transferazların Rolü.....	25
3. BÖLÜM		
MATERYAL ve YÖNTEM.....		26
3.1.	Kan Örneklerinin Toplanması	26
3.2.	Kan Örneklerinin Alınması	26
3.3.	Serum Örneklerinde Protein Miktarı Tayini	26
3.4.	L-Karnitin Düzeyi Tayin Yöntemi	27
3.4.1.	Çözeltiler ve Hazırlanışı.....	27
3.4.2.	Serum Örneklerinin Dializ Edilmesi.....	28
3.4.3.	L-Karnitin Düzeyinin Spektrofotometrik Olarak İncelenmesi	30
3.5.	GST Aktivitesi Tayin Yöntemi	30
3.5.1.	CDNB (1-kloro-2,4-dinitrobenzen) ile GST Aktivite Tayini	31
3.5.1.1.	Çözeltiler ve Hazırlanışı	31
3.5.2.	DCNB (1,2-dikloro-4-nitrobenzene) ile GST Aktivite Tayini	32
3.5.2.1.	Çözeltiler ve Hazırlanışı	32
3.5.3.	EA (Etikraynik Asit) ile GST Aktivite Tayini	34
3.5.3.1.	Çözeltiler ve Hazırlanışı	34
3.5.4.	EPNP (1,2-epoxy-3-(<i>p</i> -nitrophenoxy)propane) ile GST Aktivite Tayini	35
3.5.4.1.	Çözeltiler ve Hazırlanışı.....	35
4. BÖLÜM		
BULGULAR.....		37

4.1.	L-Karnitin Aktivite Sonuçları	37	
4.1.1.	L-Karnitin Aktivitesi Süre Optimizasyonu	37	
4.1.2.	L-Karnitin Aktivitesi Diyaliz Optimizasyonu.....	37	
4.1.3.	Kontrol Gurubunda, Tedavi Öncesi ve Tedavi Sonrası Hastalarda L-Karnitin Aktivitesi.....	39	
4.2.	GST Aktivite Sonuçları.....	42	
4.2.1.	CDNB (1-kloro-2,4-dinitrobenzen) ile GST Aktivitesi	42	
4.2.2.	EA (Etakrinik Asit) ile GST Aktivitesi	47	
4.2.3.	DCNB (1,2-dikloro-4-nitrobenzene) ile GST Aktivitesi	51	
4.2.4	EPNP (1,2-epoksi-3-(<i>p</i> -nitrofenoksi)propan) ile GST Aktivite Tayini	52	
5. BÖLÜM			
TARTIŞMA-SONUÇ VE ÖNERİLER			53
5.1.	L-Karnitin Aktivitesi.....	53	
5. 2.	GST Aktivitesi	55	
KAYNAKLAR			59
ÖZGEÇMİŞ			67

KISALTIMA ve SİMGELER

ALCAR	: Asetil-L-Karnitin
Asetil KoA	: Asetil-Koenzim A
ATP	: Adenin Tri Fosfat
ATPaz	: Adenin Tri Fosfataz
BCNU	: 1,3- <i>bis</i> (2-chloroethyl)-1-nitrosoürea
BSA	: Bowin Serum Albümin
CAT	: Karnitin Asetil Transferaz
CDNB	: 1-Kloro-2,4-Dinitrobenzen
DCNB	: 1,2-Dikloro-4-Nitrobenzen
DTNB	: 5,5'Dithio-Bis(2-Nitrobenzoic Acid)
EA	: Ethacrynic Acid
EDTA	: Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
EH	: Epoksit Hidrolaz
EPNP	: 1,2-epoxy-3-(<i>p</i> -nitrophenoxy)propane
FAD	: Flavin Adenin Dinükleotid
GSH	: Glutatyon
GST	: Glutatyon S- Transferazlar
HCl	: Hidroklorik Asit
HEPES	: Hidroksietilpiperazin Etansülfonik Asit
H ₂ O	: Hidrojen Oksit
H ₂ O ₂	: Hidrojen Peroksit
i.v.	: İntravenöz
KPO ₄	: Potasyum Fosfat
MDR	: Çoklu İlaç Rezistansı

NAD	: Niasin Adenin Dinükleotid
NO	: Nitrik Oksit
PAH	: Polisiklik Aromatik Hidrokarbonlar
pL-C	: Propiyonil-L-Karnitin
Se	: Selenyum

TABLolar LİSTESİ

Tablo 2.1.	GST'ler için bazı faydalı sınıflama kriterleri	15
Tablo 3.1.	CDNB ile GST aktivitesi ölçümünde kullanılan reaksiyon içeriği.....	32
Tablo 3.2.	DCNB ile GST aktivitesi ölçümünde kullanılan reaksiyon içeriği.....	33
Tablo 3.3.	EA ile GST aktivitesi ölçümünde kullanılan reaksiyon içeriği.....	35
Tablo 3.4.	EPNPile GST aktivitesi ölçümünde kullanılan reaksiyon içeriği	36
Tablo 4.1.	L-karnitin aktivitesi gruplar arası iki örnek T-testi istatistiksel analiz sonuçları	39
Tablo 4.2.	Kontrol grubu, tedavi öncesi ve sonrası hastalarda serum L-karnitin aktiviteleri	40
Tablo 4.3.	Kontrol grubu, tedavi öncesi ve sonrası hastalarda CDNB üzerinden serum GST aktivite düzeyleri	44
Tablo 4.4.	CDNB substratı ile GST aktivitesi gruplar arası iki örnek T-testi istatistiksel analiz sonuçları.....	45
Tablo 4.5.	EA substratı ile GST aktivitesi gruplar arası iki örnek T-testi istatistiksel analiz sonuçları.....	48
Tablo 4.6.	Kontrol grubu, tedavi öncesi ve sonrası hastalarda EA üzerinden serum GST aktivite düzeyleri	49

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1.	Meme kanserinin yaş grubuna göre dağılımı	5
Şekil 2.2	L-Karnitin molekülünün kimyasal yapısı	8
Şekil 2.3.	GST'lerin domen yapılarının altüniteleri	13
Şekil 2.4.	Detoksifikasyon fonksiyonlarıyla beraber GST'lerle katalizlenen bazı reaksiyonlar	18
Şekil 2.5.	GST'lerin karakterizasyonda kullanılan substratlar	20
Şekil 2.6.	M1-1 izoenzim kristal yapısının ó-complex ara ürün analogu.....	24
Şekil 3.1.	Bradford standart eğri grafiği.....	27
Şekil 3.2.	Diyaliz ünitesine örneklerin konulması	29
Şekil 3.3.	Standartların sırası ile aparatındaki boşluklara konulması.....	29
Şekil 4.1.	L-Karnitin aktivitesi süre optimizasyonu.....	37
Şekil 4.2.	Diyaliz edilmiş L-karnitin standart grafiği.....	38
Şekil 4.3.	Diyaliz edilmemiş L-karnitin standart grafiği.....	38
Şekil 4.4.	Kontrol grubu, tedavi öncesi hastalar ve tedavi sonrası hastalarda serum L-karnitin düzeyi 3D dağılım nokta grafiği	41
Şekil 4.5.	Kontrol, tedavi öncesi ve sonrası hastalardan elde edilen serum L-karnitin miktarı ölçümleri box-plot grafiği (p>0.05)	42
Şekil 4.6.	CDNB'nin substrat olarak kullanıldığı, zamana karşı doğrusal GST aktivite grafiği.	43
Şekil 4.7.	CDNB'nin substrat olarak kullanıldığı, zamana karşı enzim miktarına karşı GST aktivite saturasyon grafiği	43
Şekil 4.8.	Kontrol grubu, tedavi öncesi hastalar ve tedavi sonrası hastalarda CDNB'ye karşı serum GST aktivite ölçümleri 3D dağılım nokta grafiği	46
Şekil 4.9.	Kontrol, tedavi öncesi ve sonrası hastalardan elde edilen CDNB'ye karşı serum GST aktivite değerleri Box-plot grafiği (p>0.05).....	46

- Şekil 4.10. Etakrinik asit'in (EA) substrat olarak kullanıldığı, zamana karşı enzim miktarına karşı GST aktivite satürasyon grafiği 47
- Şekil 4.11. Etakrinik asit'in (EA) substrat olarak kullanıldığı, zamana karşı doğrusal GST aktivite grafiği..... 47
- Şekil 4.12. Kontrol grubu, tedavi öncesi hastalar ve tedavi sonrası hastalarda EA'ya karşı serum GST aktivite ölçümleri 3D dağılım nokta grafiği 50
- Şekil 4.13. Kontrol, Tedavi öncesi ve sonrası hastalardan elde edilen EA'ya karşı serum GST aktivite değerleri Box-plot grafiği. ($p>0.05$) 50
- Şekil 4.14. DCNB'nin substrat olarak kullanıldığı zamana karşı GST aktivite grafiği 51
- Şekil 4.15. EPNP'nin substrat olarak kullanıldığı zamana karşı GST aktivite grafiği 52

1. BÖLÜM

GİRİŞ

Meme kanseri ve diğer maligniteler hücre büyümesi ve gelişimine katılan önemli hücresel yolları etkileyen genetik değişimler ile metabolik işlemler sonucu ortaya çıkmaktadır. Çoğu genetik değişimler sadece kanserli dokudaki kanser hücrelerinde gözlenirken, daha az sıklıkla da olsa germ hücrelerindeki genetik değişimler ile ortaya çıkan maligniteler kalıtsal özellik taşımaktadırlar [1].

Kadınlar arasında sık görülen meme kanserinin 5 yıllık sağ kalım oranının %75 olması nedeniyle en iyi yaşam süresine sahip kanser türü olduğu literatürde bildirilmektedir [2]. Avrupa'da yılda 180.000, Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) yılda 184,000 yeni olgu saptanmaktadır. Meme kanseri sıklığı dünya üzerinde ülkeden ülkeye farklılık göstermektedir. Hawaii, Kaliforniya, Kanada yılda yüzbinde 80-90 görülme sıklığı ile ilk sıralarda yer alırken, aynı değer Japonya'da sadece yüzbinde 12-15 arasındadır. Japonya, Singapur ve Çin'de ekonomideki batı tarzı gelişim ve doğurganlığın batıya benzemesi nedeniyle 1975'den bu yana meme kanser görülme oranındaki fark giderek azalmaktadır. Avrupa ülkelerinde ise görülme sıklığı, kuzey ülkelerinden güneye ve batı ülkelerinde doğuya doğru gidildikçe azalmaktadır. Görülme sıklığındaki en büyük artış Kanada, ABD, İspanya ve İsveç'te ortaya çıkmıştır [2].

Meme kanserinin tedavi evresi olan kemoterapide kullanılacak ilaçların ilke olarak her şeyden önce aynı tümörde ileri dönem olgularda etkili olduğu bilinen ilaçlardan ya da onların kombinasyonundan oluşması gerekmektedir. Çoğu kemoterapik ilaç etkisini hücre bölünmesini inhibe ederek göstermektedir [3]. Docetaxel ve adriamicin meme kanserinin tedavisinde kullanılan en aktif antikanser etmenlerinden biridir. Docetaxel metastatik meme kanseri hastalarının tedavisinde sıklıkla kullanılmaktadırlar [4].

Kanser kemoterapisi sonucu değişen metabolik etkileşimlerden biri kabul edilen karnitinler, küçük, suda eriyebilen ve memelilerde yağ metabolizmasında görev alan moleküllerdir. Mitokondri tarafından yağ asitlerinin normal oksidasyonu için gereklidirler ve açıl koenzim A (KoA)'nın transesterifikasyonu ve atılımı, dallı zincirli a-ketoasitlerin oksidasyonu, toksik açıl-karnitin esterlerinin mitokondride ki yıkım olaylarına da katılmaktadır [6]. Karnitin yapı olarak amino asitlere benzeyen, trimetillizin'den köken alan kuaterner bir amindir. Açık biyokimyasal formülü 3-hidroksi-4-N-trimetilamino-butirat şeklindedir [5].

Karnitinlerin kardiyoprotektif etkileri ile ilgili olarak, karnitin yetmezliğinin kardiyomiyopati ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte, karnitinin iskemi, miyokard enfarktüsü nedeni hasara karşı miyokardı koruduğu da bilinmektedir. Kanser ve antikanser ilaçlara etkisi üzerine ve kanser ile ilişkili dış metabolik sendromda, karnitinlerin rolünü araştıran çalışmalar sürmekte ve çeşitli deneysel ve klinik kanser modellerinde karnitinlerin etkisi araştırılmaktadır [7,8].

Çalışmamızda bir diğer inceleme konusu olan Glutasyon S-transferazlar (GST), çok çeşitli elektrofilik maddeler ile glutasyon arasında konjugasyon reaksiyonlarını katalizleyen multigen süperailisi izozimleridir. Endüstriyel orijinli bir çok kimyasal madde veya onların metabolitleri, sitotoksik ilaçlar ve kimyasal karsinojenler dahil birçok ksenobiyotik, kimyasal yapılarında elektrofilik merkezler bulundurduğundan, glutasyon ile çok kolay reaksiyona girebilmektedir. GST'lerin katalizlediği Faz II detoksifikasyon reaksiyonları, çeşitli kanserojen madde, toksik madde ve genelde ksenobiyotiklere karşı vücudu koruyucu rol üstlenmektedir. Canlı dokularında sentezlenen Glutasyon S-transferaz izoenzimleri Alpha, Mu, Pi, Teta, Kappa, Omega ve Zeta gen ailelerinden oluşmaktadır. Glutasyon S-transferazlar izoenzimlerinin polimorfizmi, protein miktarı ve aktivite özellikleri meme kanseri dokularında, [9,10,11] meme kanserli hastaların kanlarında [12] akciğer kanserli hastaların kanlarında [13] araştırmacılar tarafından çalışılmıştır. Ayrıca GST'lerin, anti-kanser ilaçlarının (örneğin chlorambucil, melphalan, thiotepa, 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea (BCNU), cyclophosphamide, gibi) detoksifikasyon mekanizmalarında görev aldığı bilinerek, bu ilaç tedavileri alan hastalarda aktivite çalışmaları yapılmıştır [14,15].

Çalışmadaki amacımız hücre içi detoksifikasyon mekanizmalarında görev alan ve özellikle meme kanseri için biyomarker olarak kabul edilen glutasyon S-transferaz

izoenzim (Pi ve Mu) aktiviteleri ve, kanser ve ilaç etkileşimleri ile etkilenen mitokondriyal karnitin/açıl karnitin sonucunda değişen serum L-karnitin düzeylerinin kontrolünde meme kanseri tedavisinde kullanılan Docetaxel/Adriamycin kombine ilaç tedavisinin etkilerini araştırmaktır. Elde edilen sonuçlardan, özellikle ilaç tedavisi başlamadan ve ilaç tedavisinden sonraki GST aktivite ve L-karnitin düzey sonuçlarının karşılaştırılması ile bu araştırma, hem kanser metabolizması hem de tedavi sırasında kullanılan ilaçların söz konusu metabolik yollar üzerilerindeki etkilerinin gösterilmesi açısından klinik olarak önem teşkil etmektedirler.

2. BÖLÜM

GENEL BİLGİLER

2.1. Meme Kanseri

Meme kanseri ve diğer maligniteler, hücre büyümesi ve gelişimine katılan önemli hücresel yolları etkileyen genetik değişimler ile çok adımlı bir işlem sonucu ortaya çıkmaktadır. Çoğu genetik değişimler sadece kanserli dokudaki kanser hücrelerinde gözlenirken, daha az sıklıkla da olsa germ hücrelerindeki genetik değişimler ile ortaya çıkan maligniteler kalıtsal özellik taşımaktadır. Genomdaki bu kalıtsal veya kalıtsal olmayan genetik değişimler, belli hücresel genlerin belli özel değişimleri ile ilişkili bulunmuştur. Bunlar onkogenler olarak isimlendirilirler ve normal işlevlere sahip bir diğer gen grubundan (protoonkogenlerden) türevlenmektedir. Protoonkogenler normal hücre büyümesi ve farklılaşması için önemli olan bazı proteinlere ait kodlar içermektedir. Eğer bir mutasyon sonucu protoonkogenin yapısı değişirse oluşan hasar, genin dolayısı ile gen ürününün yapısının değişmesine neden olmaktadır ve çeşitli yollarla hücre bölünmesinin kontrolü ortadan kalkar ve malignite ortaya çıkmaktadır. Kanseri oluşumunda, onkogenlerden önemli ikinci bir gen grubu da tümör-baskılayıcı genlerdir. Bu iki gen grubu kanserojenezde birbiriyle zıt etki etmektedir. Onkogenler malign transformasyona neden olurken tümör baskılayıcı genler, hücre büyümesinde işlev gören genleri kontrol ederek tümör oluşumunu engellemektedirler. Eğer bu tümör baskılayıcı genlerde bir hasar olursa büyüme kontrolü ortadan kalkacağından kanser ortaya çıkmaktadır [1].

Meme kanseri memelilerden sadece insan ve farede görülen genlerle ilişkili bir hastalıktır. Genel belirti memede şişliktir. 25 yaş civarında başlar ve yaş ilerledikçe insidans artmaktadır. Meme kanserinin yaş grubuna göre dağılımı Şekil 2.1’de gösterilmektedir. Kadınlarda en çok görülen malignitedir ve kansere bağlı ölümler içinde akciğer kanserinin ardından 2. sırada gelmektedir [16].



Şekil.2.1. Meme kanserinin yaş grubuna göre dağılımı [16]

2.1.1. Meme Kanserinde Kemoterapik İlaçlar

Meme kanseri vakalarının büyük çoğunluğunda etyolojileri bilinmemektedir. Hastalık için çok sayıda risk faktörleri belirlenmiştir. Bu faktörler arasında kadın olmak ve ilerleyen yaş en önemlileridir. Hasta gurubunda daha az rol oynayan faktörler, ailede genç yaşta meme kanseri öyküsü, erken menarş, genç menopoz, geç yaşta ilk canlı doğum, uzamış hormon replasman tedavisidir.

Kemoterapide kullanılacak ilaçların ilke olarak her şeyden önce aynı tümörde ileri dönem olgularda etkili olduğu bilinen ilaçlardan ya da onların kombinasyonundan oluşması gerekmektedir. Kemoterapik ilaçlar etkilerini hücre bölünmesini inhibe ederek yapmaktadır [3].

Meme kanseri tedavisinde kemoterapi uygulanacağı zaman bir takım kombine kemoterapi rejimlerini düşünmek uygun olmaktadır. Bu rejimler arasında şunlar yer almaktadır: Fluorourasil, doxorubicin ve cyclophosphamide (FAC/CAF) veya cyclophosphamide epirubicin ve fluorourasil (CEF); doxorubicin, epirubicin ve cyclophosphamide (AC/EC) üçlü kombinasyonu. Ardışık paklitakselle birlikte AC, 3

haftada bir veya 2 haftada bir filgrastim desteğiyle uygulanır. FEC (doxorubicin-paklitakseli-cyclophosphamide) her biri tek ajan olarak, 2 haftada bir filgrastim desteğiyle birlikte, 4 siklus verilmektedir ve fluorourasil, epirubicin, cyclophosphamide sonrasında docetaxel uygulanır [3].

Docetaxel (Taxotere): Uygulaması damar yoluyla yapılır. Doz kısıtlayıcı yan etkileri nötropeni (düşük kan akyuvar sayısı) ve nadiren düşük trombosit sayısıdır. Alerjik reaksiyonlara, akciğerde ve bacaklarda şişliklere neden olabilmektedir. Ellerde ve ayaklarda karıncalanma ve hissizlik yaratan sinir hasarı yapabilmektedir.

Doxorubicin (Adriamycin): Kullanılan genel uygulamaları damar yoluyla yapılır. Yan etkileri; kemik iliği baskılanması, stomatit (ağızda oluşan yara), bulantı, kusma ve nadiren ishaldir. Deride hiperpigmentasyon (deri renginde koyulaşma) ve tırnaklarda renk değişiklikleri yanı sıra, gözlerde yanma ve aşırı yaşlanma görülebilecek olası yan etkiler arasındadır. Fark edilebilir saç kaybına sebep olur. Radyoterapi almış hastalarda yenileyen yumuşak deri reaksiyonları görülmektedir. Damar dışına sızması durumunda (Ekstravazasyon), sızıntı olan bölgede derin doku hasarına yol açabilir. Ekstravazasyon görülen hastaların %33'ünde ciltte derin yara oluşumu görülmüştür. Oluşan yaranın iyileşmediği durumlarda bazen cerrahi müdahale gerekebilmektedir. Doksorubicin uygulamasının en önemli yan etkisi kalp hasarı gelişimidir. Uygulanan doza bağımlı gelişen kalp hasarının tıbbi tedavisi oldukça zordur. Bu komplikasyonun ortaya çıkmasında etkili olan risk faktörleri; maksimum doz olan 550mg/m² doza ulaşılması, hastanın 70 yaş ve üzeri olması, kalp bölgesinden radyoterapi almış olması ve geçmişte kalp krizi yada yüksek kan basıncı gibi kalp hastalıklarına sahip olmasıdır [3].

2.2. Karnitin

Karnitin yapı olarak amino asitlere benzeyen, trimetillizin'den köken alan kuaterner bir amindir. Karnitinler küçük, suda eriyebilen ve memelilerde yağ metabolizmasında görev alan moleküllerdir [6]. Serbest karnitinin plazma konsantrasyonu 30-70 µmol/L arasındadır. Kalp, iskelet kasları, yağ dokuları, epididimis ve seminal sıvı karnitince zengindir. Epididimiste testosteronun etkisiyle karnitin düzeyi artmaktadır. Ancak burada karnitin sentezi yapılmaz, plazmadan sağlanmaktadır.

Karnitinlerin kardiyoprotektif etkileri ile ilgili olarak, karnitin yetmezliğinin kardiyomiyopati ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte, karnitinin iskemi ve miyokard enfarktüsü nedeni hasara karşı miyokardı koruduğu da bilinmektedir. Kanser ve antikanser ilaçlara etkisi üzerine ve kanser ile ilişkili dış metabolik sendromda, karnitinlerin rolünü araştıran çalışmalar sürmekte ve çeşitli eksperimental ve klinik kanser modellerinde karnitinlerin etkisi araştırılmaktadır [7,8].

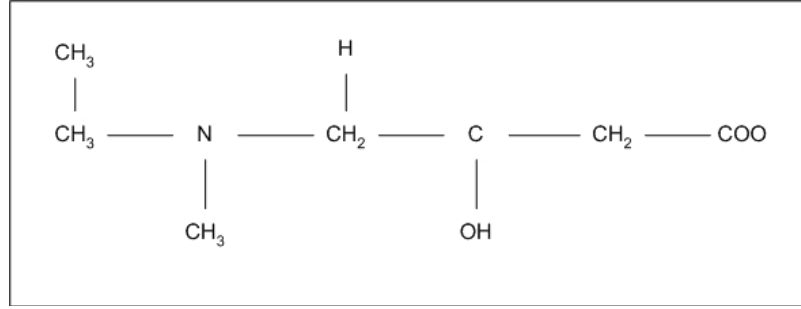
Karnitin doğada sadece L formunda bulunmaktadır. D formu ise laboratuvar koşullarında üretilmektedirler. Ayrıca bir diğer form olan D-L formu ise bu iki aktif maddenin %50'sini içerir. L-karnitin plazmada veya dokularda serbest ve açilkarnitin türevleri olarak yağ asitlerine bağlı şekillerde bulunabilmektedirler. L-karnitin ve türevleri birçok önemli intraselüler fonksiyona ve farmakolojik etkiye sahiptir. L-Karnitinin Açık biyokimyasal formülü 3-hidoksi-4-N-trimetilamino-butirat şeklindedir ve şekil 2.2'de gösterilmektedir. Karnitinlerin birçok serbest radikaller ve oksijen aracılı hastalıkların tedavisinde etkili olduğu görülmüştür [17].

Karnitinin %75'i diyetle vücuda alınmaktadır. Kalan %25'i vücutta iskelet kası, kalp, beyin, karaciğer ve böbrek gibi organlarda esansiyel aminoasitler olan lizin ve metioninden endojen olarak sentezlenebilmektedir. Bu olay için C vitamini, niasin adenin dinükleotid (NAD), flavin adenin dinükleotid (FAD), piridoksin, demir ve S-adenozilmetiyonine ihtiyaç duyulmaktadır [18]. Günde 200-500 µmol serbest karnitin idrarla atılır. Hemodiyaliz hastalarında karnitin kaybı oldukça fazladır. Bu nedenle dışarıdan verilme zorunluluğu vardır [18].

Besinlerden ileri gelen L-karnitin eksikliğine seyrek rastlanılmaktadır. Daha çok metabolizmanın bozulması sonucu endojen kaynaklı eksiklikler görülmektedir. Özellikle biyosentezinin bozulması aşırı elimasyonu ya da harcanmasından kaynaklanmaktadır. Bazı kalıtsal metabolizma hastalıklarında kanda organik asitlerin artması, harcanmasını arttırabilmektedir. Eksiklik belirtileri çizgili kas ve kardiyak bozukluklar şeklinde ortaya çıkmaktadır. Eforlarda kas zayıflıkları, miyaljiler, kaslarda yağ infiltrasyonu gibi çizgili kas bozuklukları ve kardiyomiyopati gibi kardiyak bozukluklar görülmektedir [18].

Normal kişilerde yüksek dozlarda da olsa dışarıdan L-karnitin alınması hiçbir yan etkiye neden olmamaktadır. L-karnitin oral ve intravenöz (i.v.) yolla özellikle

hemodializ uygulaması sonucu meydana gelen karnitin eksikliklerinin tedavisinde kullanılmaktadır. Kardiyovasküler ve çizgili kas hastalıklarında kullanılması önerilmektedir [18] Seminal sıvıda yüksek oranda karnitin bulunduğundan bazı erkek kısırlıklarının tedavisinde kullanılması önerilmektedir [19]. Karnitin sporcularda ve yarış atlarında performans artırıcı olarak denenmektedir [20].



Şekil 2.2. L-karnitin molekülünün kimyasal yapısı [6].

2.2.1. Karnitin Sistemi

L-karnitin, asetil-L-karnitin (ALCAR) ve propiyonil-L-karnitin (pL-C) gibi karnitin esterleri, çeşitli özgül hücre içi enzimler gibi sistemlerden oluşmaktadır. Bunlar kısa ve uzun zincirli yağ asitlerinin hücre içi-dışı geçişlerinde rol oynamaktadırlar. Ayrıca karnitin sistemi; 1) mitokondrial düzeylerde enerji üreten substratların kullanımında; 2) enerji üretimi ile ilişkili olmayan, peroksizomal düzeyde lipid peroksidasyonunda; 3) endoplazmik retikulum düzeylerinde düşük dansiteli lipoproteinler gibi proteinlerin açıl ve deaçilasyonunda; 4) membran fosfolipid devrinde; 5) hücre osmotik dengesinin sürdürülmesinde görev almaktadır. L-karnitin ve türevlerinin reaktif oksijen türevleri oluşumunu önleme, serbest radikalleri süpürme ve hücreleri peroksidatif stresten koruma etkileri olduğu da bilinmektedir. L-karnitinin gastrik mukoza lezyonları üzerine etkileri ile ilgili yapılan çalışmada, gastrik mukozayı koruyucu etkisinin antioksidatif, antiperoksidatif ve serbest radikal süpürücü özelliğine bağlı olduğu düşünülmüştür [21,22]. İskemi ve reperfüzyon hasarından korumada Packer ve arkadaşları tarafından pL-C'nin, hidroksil radikal oluşumu için gerekli olan demiri selasyona uğratarak ve serbest radikalleri süpürerek reperfüzyon hasarından iskemik kalbi koruduğu gösterilmiştir [23].

Anemilerde ve hemodializ hastalarında oral veya i.v. karnitinlerin kullanımı hematokrit, retikülosit sayısı, hemoglobin düzeyi, eritrosit sayısı ve yaşam süresini artırmakta ve hastaların eritropoetin ihtiyacını azaltmaktadır. Karnitinin hücrel membranları sabitleştirdiği ve eritrosit osmotik rezistansını arttırdığı görülmüştür [24,25].

Meme kanserli hücrelerde Doxorubicin stereoizomeri olan epirubicin tedavisinin etkisinin çalışıldığı L-karnitin eklemesinin yapıldığı bir çalışmada, Epirubicin ile tedavi edilen meme kanseri hastasına verilen karnitin takviyesinin kardiyak toksisite gelişimini azaltacak bir hipotez incelenmiştir. İn vitro hücreleri kullanarak L-karnitin eklentisinin epirubicinin tümör sitotoksik etkilerini azaltıp azaltmadığını incelenmiştir. L-karnitin takviyesinin, epirubicinin meme kanserli hücreleri öldürmesinde hiçbir katkısı olmadığı belirlenmiştir. Yine bu çalışmada metionin ve lizinden gelen sentezlenen bir kuaterner amonyum bileşik olan L-Karnitin, mitokondrideki oksidatif metabolizması için gerekli olduğu ve kalp fonksiyonu, L-karnitin temel bir kofaktör olduğu, oksidatif metabolizması ile yakından bağlantılı olduğu belirtilmiştir [26].

Karnitinlerin nöroprotektif ve nöromodülatör etkileri üzerine yapılan birçok çalışma, karnitinlerin nöronal aktivitede rollerinin olduğunu göstermiştir. Bunlar arasında, Alzheimer hastalığı gibi kognitif fonksiyonlardaki olumlu etkisini [27,28], antidepresan-benzeri etkisini, analjezik etkiyi ve Parkinson gibi nörodejeneratif hastalıklardaki etkisini sayabiliriz [29].

Meme kanserinde karnitinin koruyucu etkisini ve "arjinaz-nitrik oksit" etkileşimini araştıran bir çalışmada tümör dokularındaki histopatolojik incelemeyle arjinaz etkinliği, ornitin ve nitrik oksit (NO) seviyeleri saptanmıştır. Tedavi gruplarında mitotik hücreler, hücre arginaz etkinliği ve ornitin seviyeleri karnitin ile birlikte önemli oranda azalmıştır. Nitrik oksit seviyeleri tedavi gruplarında önemli oranda yüksek olduğu belirtilmiştir. Tümör ilerlemesindeki karnitinin koruyucu rolündeki olası mekanizmalardan biri karnitin NO değerinin yükseltmesi olabileceği düşünülmüştür. Bu mekanizmanın tümör-arttırma ajanlarının üretimini azaltabileceği düşünülmüş, poliaminler ve NO üretiminin artmasının kanser gelişiminde koruyucu etki sahip olduğu saptanmıştır [30].

2.3. Glutasyon s-Transferaz Enzim Ailesi

Glutasyon S-transferazlar (EC.2.5.1.18), endojen bileşiklerin detoksifikasyonuna kadar, dış kaynaklı elektrofilik bileşiklerin vücut içi detoksifikasyonunda rol alan ksenobiyotik metabolizmasındaki önemli enzimlerdendir [31].



Glutasyon S-transferazlar (GST), bir tripeptid olan glutasyonun (GSH, γ -glu-cys-gly) yapısında yer alan sisteinden ötürü sülfidril (-SH) grubu ile nükleofilik bazı toksik bileşik veya metabolitlerin konjugasyonunu katalizlemektedirler [32].

Glutasyon S-transferaz süpergen ailesi karsinojenik potansiyele sahip birçok endojen ve ekzojen kimyasallara karşı hücrel enzim savunmasının önemli bir bölümünü oluşturur ve dolayısıyla glutasyon S-transferaz enzimleri birçok elektrofilik maddelerin geleneksel aktivasyonu ve inaktivasyonunda önemli bir rol oynarlar. İnsan dokularında sentezlenen glutasyon S-transferaz izoenzimleri Alpha (α), Mu (μ), Pi (π), Sigma (σ), Teta (θ), Kappa (κ), Omega (ω) ve Zeta (ζ) gen ailelerinden oluşur. Bütün GST izozimleri GSH'nin redüklendiği reaksiyonda görev alırlar. Ancak GSH sisteinin tiyol gruplarına transfer edilen substrat özgülüğü göstererek farklı izozimler adı altında toplanmaktadırlar. GST'ler, bütün ökaryotik ve prokaryotik canlıların sitoplazmasında, mikrozomlarında ve mitokondrilerinde bulunmaktadırlar [33]. GST izozimlerinin molekül ağırlıkları 20,000 ve 26,000 Dalton arasında değişmektedir [34]. Bu klasifikasyon substrat özgülüğünden başka izozimlerin kimyasal affiniteleri, amino asit dizileri ve kinetik özellikleri de göz önünde bulundurularak yapılmaktadır [35]. İzozimlerin amino asit dizileri %70'e yakın benzerlik göstermekle beraber izozimler arası farklılık oranı %30'lardadır [36].

2.3.1. GST'lerin Yapıları ve Fonksiyonları

2.3.1.1. GST'lerin Katalitik Aktiviteleri

Glutasyon S-transferazlar, glutasyon ile eksojen veya endojen substratları arasındaki konjugasyonu katalizlemekten başka peroksidaz ve izomeraz aktivitesi de göstermektedirler [37].

Sitozolde sentezlenen GSH konjugasyon reaksiyonları, H₂O₂ reaksiyonu ve hücre zarını geçen biyolojik radikallerin varlığında tüketilmektedir. GSH'ın oksidasyonu ile glutasyon disülfid (GSSG) oluşmaktadır. Glutasyon disülfid, glutasyon redüktazın katalizlediği reaksiyon ile hızlıca redükte durumuna (GSH) dönüşmektedir. Bu döngülerle, hücre içinde ki GSH:GSSG oranı 99:1 oranında tutulmaktadır [38].

Bütün GST sınıfları, elektofilik ko-substratlara GSH'ın nükleofilik reaksiyon hızını arttırmak amacıyla bağlı GSH'ın tiyol grubunun pKa'sını 9.0'dan 6.0-6.9 arasına düşürmek için fonksiyon gösterirler. Bu deprotonizasyon, enzimatik katalizin temel basamağının hızını fizyolojik pH'da 200-300 kat artmasını sağlamaktadır [39]. Sonuçlar göstermektedir ki glutasyon, neutral pH da, GST ile bağlandığı sırada tiyolat (GS⁻) anyonu şeklinde bulunmaktadır. GST'ler aktivitelerini GS⁻ oluşumu ve elektofilik, hidrofobik bileşiklerin enzim üzerine bağlamasıyla göstermektedirler [40,41,42,43].

2.3.1.2. GST'lerin Protein Yapıları

Kappa sınıf GST'ler haricinde, bütün izozimlerin kristal yapıları literatürde bulunmaktadır. Memeli GST izozimlerinin kristallografi şekillerini de içeren literatürler: insan karaciğerinden α [hGSTA1-A1] [44]; sıçan karaciğerinden μ [rGSTM1-1] domuz akciğerinden π [pGSTP1-1] [45]; [44]; insan plasentasından hGSTP1-1 [46] mürekkep balığı sindirim bezinden δ [s GSTS1-1] [45] ve *Lucilia cuprina*'dan elde edilen θ [50] izozimleri. Ayrıca farklı organizmalardan elde edilen GST proteinlerinin de kristallografik yapıları yayınlanmıştır: *Arabidopsis thaliana*'dan [46]; *Fasciola Hepatica*'dan [47] ve *Schistosoma japonicum*'dan elde edilen GST (SjGST), Bu GST proteinin yapısı μ tip GST izozimine benzemektedir [48]

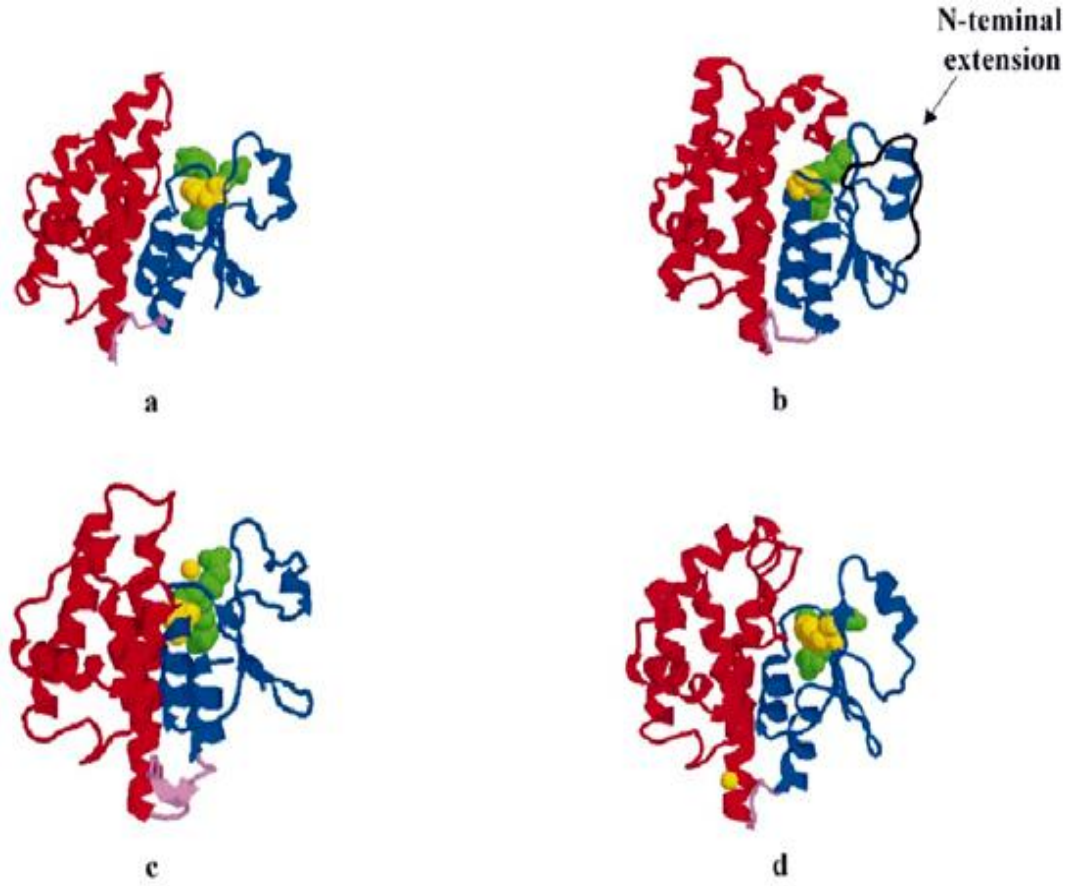
GST sınıfları arasında düşük seviyede dizi benzerliği gözlenmekle beraber, bütün GST protein yapıları iki farklı domenden oluşmaktadır. Domen I, N-terminal domendir ve

glutasyonun bağlandığı bölgeyi içermesi nedeniyle G-site adını almaktadır. Domen II, ksenobiyotik substratın bağlandığı bölgedir ve H-site adını almaktadır. Bütün sınıflarda glutasyonun bağlandığı domenin (G-site) konservativ bölge olduğu gözlenmiştir. GSH'ın bağlanma bölgesi, domene kısa bir zincirle bağlı bulunmaktadır. GST'ler, sis-pro kavisleri olarak bilinirler. Bu kavis katalizde direkt bir rol oynamamakla beraber, proteinin katalitik yapısını oluşturmada önemli bir görev almaktadır [49].

Domen II, yaklaşık olarak 87-210 amino asitten oluşmaktadır. C-terminalin zincir dizisi olarak başlayarak, pi ve mu sınıflarında 5 adet α sarmal [45], α sınıfta ise 6 α sarmal adet içermektedir [44]. Sarmalların sayısı sınıflara göre değişiklik göstermektedir. C-terminal domen, N-terminale göre sınıflar arasında daha az bir benzerlik göstermektedir [50]. C-terminal domendeki farklılıkların, sınıflar arasındaki substrat özgüllüğünü oluşturduğu düşünülmektedir (Şekil 2.3.) [50].

GSH'ın enzime üç değişik şekilde bağlandığı gözlenmiştir; μ sınıf GST'ler ve SJ GST ortak bir GSH bağlama şekli göstermektedir. Sisteinil karbonil hidrojen, Trp 7'nin indonil nitrojenine bağlanmaktadır [45-48]. α , π ve σ sınıf GST'lerde, sisteinil karbonil, Phe 8'in amide grubu ile hidrojen bağı oluşturmaktadır [44-45- 46]. Üçüncü tip bağlanma, teta sınıf GST'lerde gösterilmiştir. Genellikle değişmeyen bir tirozin residüsü sisteinil sülfür ile göstermekle beraber, üçüncü tipte bu tirozin residüsünün yanındaki serin veya C-terminal domende bulunan başka bir tirozin residüsü GSH'ın sülfidril grubu ile interaksiyona girmektedir [51].

Sitozolik GST'lerin biyolojik olarak aktif formları, her altünitenin bağımsız olarak aktivite gösterdiği homodimerler veya heterodimerler şeklinde bulunmaktadır. Her iki altünite birbirlerine bilye-ve-soket hidrofobik etkileşimi ile bağlantı kurmaktadır.



Şekil 2.3. GST'lerin domen yapılarının altüniteleri [50].

Şekil 2.3.'de GST altünitelerinin üç-boyutlu yapısı gösterilmektedir. Domen I mavi renkli olarak, Domen II kırmızı renkli olarak şematize edilmiştir. Katalitik olarak öneme sahip olan bölgeler (a ve d de tirozin; b ve c de sistein) sarı olarak, protein ile birlikte kristalize edilmiş olan ligandlar yeşil ve iki domeni birbirine bağlayan zincir uzantı mor renklerle gösterilmişlerdir. Protein veritabanı ve referanslar parantez içinde verilmektedir: (a) Sigma sınıf mürekkep balığı GST'si (1GSQ; [45]); (b) Omega sınıf insan GST'si (1EEM; [51]) [C-terminal uzantısı C-terminal uzantısı bu sınıf için özgüdür ve siyah renkle gösterilmiştir]; (c) Beta sınıf bakteri (*Proteus mirabilis*) GST'si (1PM7; [36]) (d) Mu sınıf *Fasciola hepatica* GST'si (1FHE; [47]).

2.4. Memeli GST'leri İçin Sınıflandırma Kriterleri

Özel bir sınıf içerisinde bir GST yeri için gereken sıra benzerliğinin derecesi ile ilgili kriterler açık bir şekilde saptanmadığından, genelde GSTlerin bir sınıf içerisinde

%60dan fazla benzerlik paylaştığı kabul edilmektedir ve %30'dan az benzerlik olanlar ayrı sınıflara atanmaktadır (Tablo 2.1.) Vurgular ilk önce N-ucundaki yapı üzerinde olmaya meyillidir çünkü bu bölge aktif bölgenin önemli bir parçasını içerdiği için sınıflar içerisinde diğerlerinden daha iyi korunmaya meyillidirler. Bu bölge GSH'nin tiyol gurubu ile etkileşen katalitik olarak gerekli tirozin, serin veya sistein kalıntısı ihtiva etmektedir. Böylece, pKa'sını kendi değeri olan 9.0'dan yaklaşık olarak 6-7'ye düşürür. Bu GSTler içindeki katalizörlerin anahtar bir bileşik olduğu düşünülmektedir [52,53,54].

Özel bir sınıf içerisinde açık bir şekilde eşsiz alt birim türlerini temsil eden alt familya olarak bilinenler bazen belirlenebilirler. Her bir alt familya, kimliğin %90'dan fazlasını paylaşan beş ayrı, oldukça homojen polipeptidler içerebilir [55,56] 60 ve 80 pozisyonlarında bulunan amino asit kalıntılarının özellikle iyi korunduğu görülmektedir. Sınıfların ayrı GST familyalarını temsil ettiğine dair olan hipotez, daha sonra genlerinin ve kromozomal lokalizasyonlarının ayrı yapıları ile desteklenmiştir. Alpha-, Mu-, Pi- ve Theta-sınıf GST genleri büyüklük ve intron/ekson yapıları bakımından birbirinden önemli derecede farklıdır ve insan GST genleri için sınıf- spesifik gurupları içinde bulunma eğilimi vardır [55].

Substrat özgüllükleri ve inhibitör hassasiyetleri gibi kinetik özellikler bazen farklı GST izoenzimlerini farketmek için de kullanılabilir. Açık ve sık sık örtüşen değerlerden ötürü GST sınıfları arasında sıra veya immunolojik analizler açısından açık bir fark vermezler. Memeli GSTleri kıyaslarken, kinetik özellikler düşük bir seviyede sıra benzerliği olduğunda kinetik özellikler önemlidir Kinetik özelliklerin daha kapsamlı bir analizi çok değişkenli ($n>2$) analizlerle yapılabilir Mannervik ve arkadaşları [57] çok değişkenli analizleri kullanarak çeşitli memeli türlerine mahsus üç sınıf sitozolik GST belirlemişlerdir. Dokuz substrat için özgül aktivite değerleri ve 11 inhibitör için IC değerleri 15 GST izoenzimini karakterize etmek için değişken olarak kullanılmışlardır. Üç bölgeye kümelenmişleridir ve her bir bölge diğer yapısal ve fonksiyonel özelliklerle tanımlandığı gibi bir sınıfın üyelerini içermektedir. Bitki, mikrobiyal ve böcek GSTsi çalışmalarından da belli olduğu gibi memelilerin enzimlerinin aksine, substrat spesifitesi memelilerin sınıflarını memeli olmayanların kaynaklarına uzatmak için oldukça az bir kriterdir.

GST alt birimleri, aynı sınıftan alt birimlerle sadece melezleşebildiği görülmektedir [55]. Homo ve hetero dimerlerin oluşumu büyük olasılıkla, sınırlı sayıda genden daha büyük sayıda enzimin oluşumunu mümkün kılmaktadır. Mesela, bir çift homodimer akabinde diyaliz işleminin yapıldığı in vitro 8M üre içinde denatürasyona uğratıldığında, alt birimlerinden birinden oluşan üç izoenzim (iki homodimer ve bir heterodimer) oluşturmak üzere birlikte melezleşirler [57].

Tablo 2.1. GSTler için bazı faydalı sınıflama kriterleri [57].

Ölçüt	Örnek
Ana yapı karşılaştırmaları	Alpha/Mu/Pi sınıfları
	Theta sınıfı
	Kappa sınıfı
	Zeta sınıfı
	Omega sınıfı
Immuno-blotting	Alpha/Mu
	MIF
	Böcek sınıfları I and II
	<i>Fasciola hepatica</i>
Kinetik özellikler	
Substrat belirliliği/affinite	Alpha/Mu/Pi
	Mu
	Theta
Inhibitör hassasiyeti	Alpha/Mu/Pi
Tersiyer yapı: aktif site	Alpha/Mu/Pi
	Theta
	Omega
	Beta
	Sigma
Kuaterner yapı	
Dimerlere melezleşebilme	Mu/Alpha
Ara-alt birim arayüzeyi	Hidrofobik kilit ve anahtar
	Alpha/Mu/Pi/Theta sınıfları
	Beta sınıfındaki polar ara yüzey

Rastgele dimer oluşumuna benzer bir işlemin, dönüşümselden sonra olduğu düşünülmektedir. Temel sınıflardan örnek kristal yapılarının elde edilebilirliği, alt birimler arası ara yüzeyindeki yapısal etkileşimlerin dimer birleşimi ve stabilitesi için önemli ve sık sık sınıf özellik olması bulgularını açıklamıştır. Bu sebepten, stabil bir GST dimeri oluşturmak için birlikte melezleşebilme, sınıflaşmanın bir kriteri olarak görülebilir ve alt birimler arasında ara yüzeyde ileri GST sınıflarını göstermek için değişik bir yapı kullanılmıştır [58,59].

2.4.1. Alfa/Mu/Pi Sınıfları

Yukarıda bahsedilen kriterlere dayanarak, memelilerin sitozolik GST'leri Alfa, Mu ve Pi sınıflarına ayrılmışlardır [60]. Pi sınıfı orijinal olarak sadece GST P proteinini içerirken çeşitli enzimler Alfa ve Mu sınıflarına ait olarak tanınmışlardır. En azından 6 farklı Mu- sınıfı alt birimi (M1, M2, M3, M4, M5 ve M6 tam bir ilk yapının GST için uygun olmadığını göstermektedir), sıçanlarda insandaki ilk beşi için homolog gen yöntemi ile tayin edilmiştir. Oksidatif strese karşı korumaya sahip enzimlerin gen kodlanmasındaki polimorfizm, kanser gibi hastalık durumlarına eğilim içermiştir [61]. Mu sınıfı halinde, GST M1 lokusunda dört allelik varyant insan popülasyonunda tayin edilmiştir [62]. Bu dördünden insan popülasyonunun %50'sinde sıfır allel mevcuttur ki bu durum belirli bireyleri toksik ksenobiyotiklerden daha büyük risklere eğilimli hale getirebilir. Kinetik ve alt birim melezleşme kriterlerine dayanarak, mGST M5 ve hGST M3 ile beraber rGSTM5, Mu sınıfının belirli bir alt sınıfını oluşturduğu sunulmuştur [63-64]. Altı tür (A1, A2, A3, A4, A5 ve A6) alt birim içeren çok sayıda Alfa-sınıfı, A1-A4 için insanlardaki homolog gen yöntemi ile farelerde belirlenmiştir [65,66].

Substrat tercihleri ve dizi benzerlikleri mukayesesi, Alfa sınıfı içerisinde alt grupların belirlenmesini sağlamıştır; A4 alt biriminin, diğer Alfa-sınıfı enzimleri ile dizi ve immünolojik benzerlikler paylaşarak etakrinik asit, lipid hidro-peroksitler ve 4-hidroksialkenallar ile özellikle yüksek aktivite gösterdiği bulunmuştur [67]. Fare yumurtalık ve testis içinde Alfa-sınıfı GSTlerin steroid izomeraz aktivitelerine sahip olduğu görülmüştür [68]. Bu, Alfa-sınıfı GSTler için endojen bir non-detoksifikasyon fonksiyon örneğidir. Diğer çeşitli izomeraz aktiviteleri diğer GST sınıflarında bulunmuştur. Mesela, hGST P1-1'nin 13-cis-retinoik asidin tüm-trans-retinoik asite izomerizasyonunu katalizlediğini göstermiştir. Bu izomerizasyon GSH'den bağımsız

olduğundan, diğer pekçok genelde GSH'ye ihtiyaç duyan GSTler için bildirilmiş izomerizasyon reaksiyonlarından farklıdır. Polimorfizm, çeşitli insana özgü safha II enzimleri ve özellikle GSTler içinde tayin edilmiştir [69]. Alfa-sınıfı GSTleri halinde, A2 lokusunda polimorfizm belirli sayıda Pi-sınıfı polimorfizmi de anlatılmıştır. İzomerizasyon ve GSH-konjugasyon aktivitelerine ilaveten memeliler içerisinde bu enzimler, selenyum ve bağımsız GSH peroksidaz (Alfa sınıfı) aktivitelerinin her ikisinin etkisi ve HO[•]lu hücre ölümlerinden hücreleri koruyan Jun N-terminal kinaz (Pi sınıfı) inhibitörü rolü ile oksidatif strese karşı koruma sağlamaktadır [70,71].

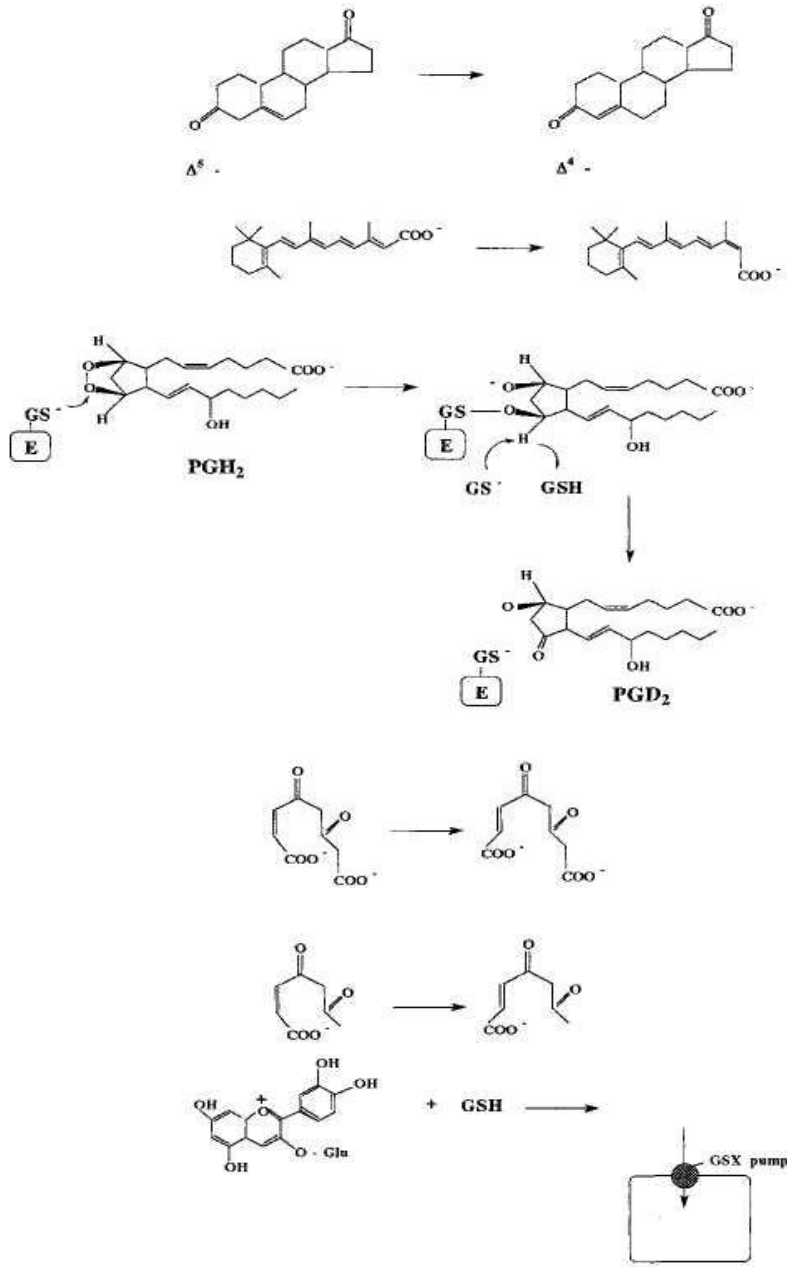
2.5. Enzimik Detoksifikasyonda GST'lerin Rolü

Yaşayan organizmalar sürekli olarak yabancı kimyasal türlere maruz kalmaktadırlar. Bu ksenobiyotikler toksik ve bazen kanserojen etkilere sebebiyet vererek bir organizma ile etkileşebilirler. Bu tür bileşenlerle konumlanmış tehlike, yeni insan yapımı kimyasalların çevreye verilmesinin çeşitliliğinden ötürü son iki yüzyılda büyük miktarda artmışken, belki de kendisi uzun süredir var olmaktadır. Doğal olarak toksik olan bileşenler bitkisel ve mantar toksinleri (mesela bitkisel fenoller ve aflatoksinler) ve süperoksit radikal ve hidrojen peroksit (H₂O₂) gibi reaktif oksijen türleri içermektedirler. Endojenik olarak üretilmiş ve/veya ksenobiyotik bileşenlerle konumlanmış tehlikenin giderilebilmesi belki de kurtuluşa biyolojik bir adaptasyon temeli göstermektedir [55,72].

Pek çok diğer metabolitler de oluştuğu halde, benzo[a]pirenin olası bir metabolik akıbeti gösterilmiştir. Ksenobiyotik serbestçe plazma membranına dağılır ve burada sitokrom P450 sistemi için bir substrat haline gelerek bir epoksit oluşumuna neden olur. Bu dönüşte epoksit hidrataz için bir substrat olur. Sitokrom P450 tekrardan bu reaksiyonun diol ürününe göre ksenobiyotiğin kansorejen ve mutajenik diol-epoksit türevini oluşturmak için hareket edebilir. Bu enzimlerin her ikisi de mikrozomaldır ve enzimik detoksifikasyonun 1. safhasını oluşturmaktadırlar. GSTler genellikle konjugasyonu GSH'ye katalizleyen sitozolik safha enzimleridir. GSH-ksenobiyotik konjugesi hücreden serbestçe difüze olamayacak kadar hidrofildir ve GS-X pompası gibi bir transmembran ATPaz ile aktif bir şekilde pompalanmalıdır [73] Bu ksenobiyotiklerin hücreden tek yönlü salınımı ile sonuçlanmaktadır, çünkü hidrofilik

GSH kısmı plazma membranına tekrardan difüzyonu engellemektedir. Bu konjuge memelilerden merkapturik asit olarak en sonunda salgılanır.

Ayrılma, temizleme ve bağlama gibi stratejilerle beraber katalitik biyotransformasyon, toksik kimyasal türlere karşı önemli bir biyokimyasal koruma mekanizması olarak gelişmektedir (Şekil 2.4.). Hücreler, farklı kimyasal yapı ve fonksiyonların biyotransformasyonunu becerebilen bir dizi etkileyici enzime sahiptirler



Şekil 2.4. Detoksifikasyon fonksiyonlarıyla beraber GST'lerle katalizlenen bazı reaksiyonlar [72].

GST'ler detoksifikasyondaki katalitik rollerine ek olarak geniş bir ligand bağlayıcı özelliklere sahip, dimerik ve özellikle sitozolik enzimlerdir. Ayrıca, kanser kemoterapi ajanları böcek ilaçları bitki ilaçları ve mikrobiyal antibiyotikleri [73] içeren çeşitli direnç durumlarına da sokulmuşlardır. GSTlerin ayrı bir mikrozomal sınıfı sitozolik enzimlerden oldukça farklı olarak var olmaktadır ve eikozanoid ve glutatyon metabolizması içinde membrana bağlı proteinler olarak tayin edilir [74].

GST'ler aminoasit/nükleotid sırası ve immünolojik, kinetik ve tersiyer/kuaterner yapısal özellikleri içeren çeşitli kriterlere dayanan giderek artan sayıda sınıfa bölünmüş, kompleks ve yaygın bir enzim üst familyasını kapsamaktadır. Temsili kristal yapılar pek çok tür için mevcuttur ve sınırlı toplam sıra benzerliğine rağmen, genelde özellikle aktif bölge üzerinde ve ara alt birim yüzeyinde yoğunlaşan yapısal farklılıklarla aynı yolu takip ederler. Memeli kaynaklardaki (özellikle sıçan, insan ve fare) GST genleri ve proteinler özellikle iyi karakterize edilmiştir. Fakat, memeli olmayan kaynaklardaki GST çalışmaları çeşitli yeni sınıfların varlığını göstermiştir ve böylece bu proteinlerin yapısal ve fonksiyonel farklılıkları ile ilgili bilgimizi artırmıştır [66,75,76].

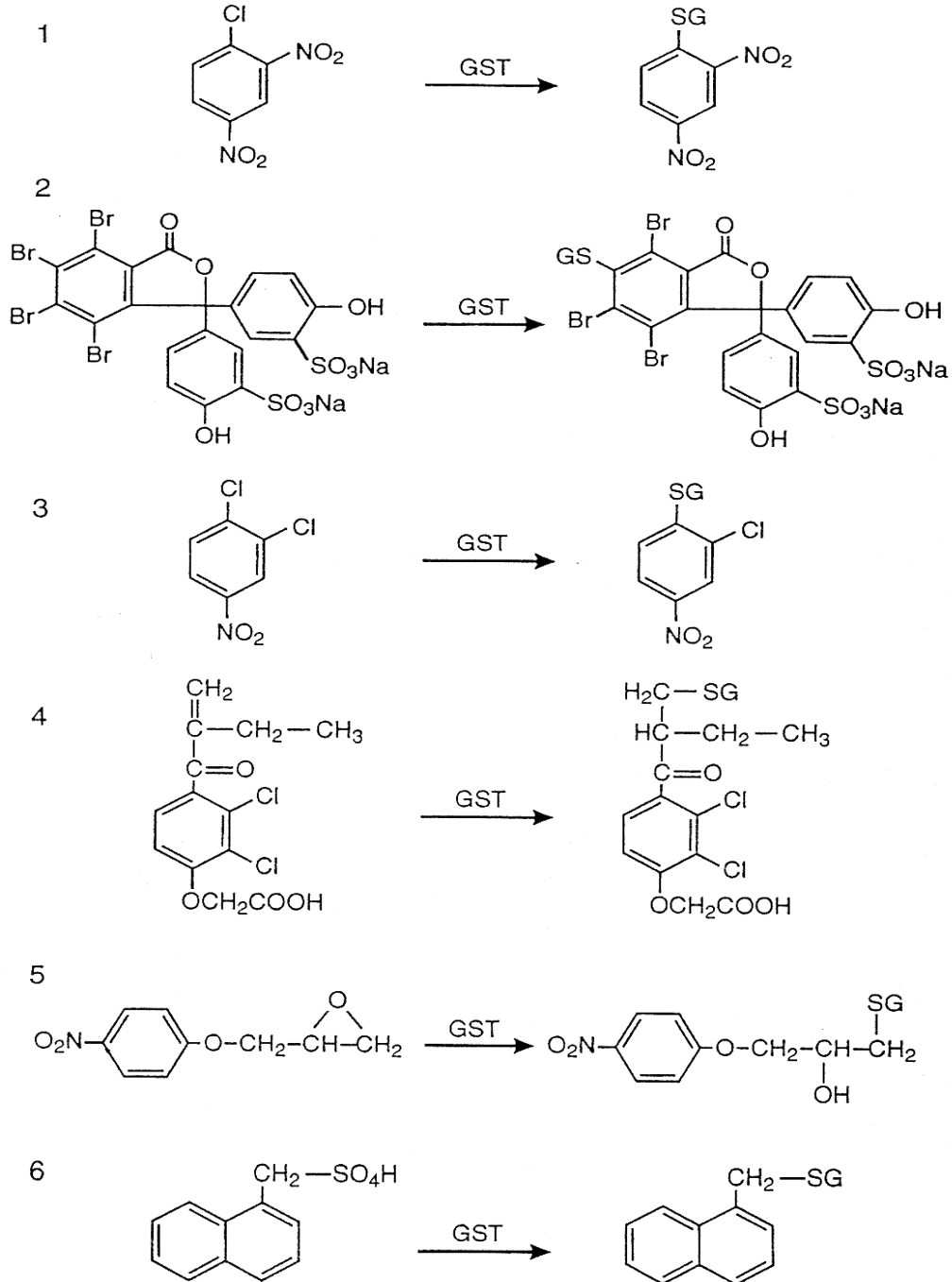
2.6. GST'lerin Karakterizasyonunda Kullanılan Model Substratlar

GST izozimleri, GSH'nin farklı elektrofillerle konjugasyonu katalizlemekte belirgin farklılıklar göstermektedirlerdir. 1-kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB), çeşitli biyolojik örneklerde, birçok GST izozimlerinin aktivitelerinin ölçülmesinde kullanılan genel bir substrattır. GSH ile konjuge edildiğinde, spektrofotometrik ölçümde, 340 nm'de takip edilebilen *S*-(2,4-dinitrofenil) glutatyon ürününü vermektedir [77].

1-kloro-2,4-dinitrobenzen, elektrofil, metabolik olarak parasetamol N-asetiliminokinon'dan türetilmiştir. Benzo(a)piren-4-5-oksit, kolesterol-5a,6a-oksit, benzo(a)piren-7,8-diol-9,10-oksit ve elektrofiller, metabolik olarak aflatoksin B (2,3-oksit)den türetilmiştir. Substrata göre, en uygun enzim oranı 10^{-1} den 10^{-12} mol/dakika/mg ye kadar olan büyüklüğün yedinci kuvvetinin üzerinde değişir [54].

1,2-dikloro-4-nitrobenzen (DCNB), mu tip GST'lerin karakteristik substratı olarak bilinmektedir. Glutatyonun, DCNB ile konjugasyonu sonucu 1-glutatyon-S-yl ürünü açığa çıkmaktadır. Ürün, 345 nm'de spektrofotometrik olarak takip edilebilmektedir

[77]. GST izozimlerinin klasifikasyonunda kullanılan model substratların reaksiyonları Şekil 2.5.de verilmektedir.



Şekil 2.5. GST'lerin karakterizasyonunda kullanılan model substratlar: (1) CDNB; (2) bromosülfofitalein; (3) DCNB; (4) etakrinik asit; (5) EPNP; (6) 1-menaftil sülfat; (7) 4-NBC; (8) 4-nitrofenilasetat; (9) 4-NPB; (10) trans-4-fenil-3-büten-2-on; (11) stiren-7,8-oksit; (12) kümen hidroperoksit [78].

2.7. Glutasyon S-Transferaz Aktivitesini Etkileyen Faktörler

Glutasyon S-transfeaz'ların aktivitesini etkileyen faktörleri şu alt başlıklar altında toplayabiliriz:

1. Bireysel faktörlerin ve fizyolojik dönemlerin etkisi
2. Glutasyon S-transferaz aktivitesini etkileyen ksenobiyotikler
2. Bazı patolojik durumların etkisi

2.7.1. Bireysel Faktörlerin ve Fizyolojik Dönemlerin Etkisi

İnsanda GST düzeyleri fizyolojik dönemlerden etkilenmektedir. GST'ler fütal dokularda erken gelişmektedirler, ancak ne fütal dokularda, ne de yetişkin dokularında GST aktivitesi ile yaş arasında bir korelasyon saptanamamıştır. Ancak dokudan dokuya farklı dağılım gösterirler. Herhangi bir doku incelendiğinde GST içeriğinin gelişme, seksüel olgunlaşma, indüksiyon, tümör başlangıcı ve gelişimi ile değiştiği görülür. Yapılan çalışmalarda fütus karaciğeri ve diğer dokularında GST aktivitesi yetişkine göre daha düşük bulunmuştur. Fütal akciğer sitozolünde GST aktivitesi karaciğere nazaran 1,6 kez yüksektir [72]. Oysa yetişkinde bağırsaklarla birlikte akciğer en düşük aktiviteye sahiptir. GST'ler insan fütusunda erken gelişirler, ayrıca iyi dağılım gösterirler. Toksikiteye neden olan ksenobiyotiklerin ve/veya reaktif metabolitlerinin inaktivasyonunda GSH konjugasyonu rol oynadığından GST'lerin yaygın dağılımı fütusun korunması açısından son derece önemlidir. GST aktivitesinin cinsiyete göre farklılıkları çeşitli nedenlerle ölen insan nekropsi materyallerinde araştırılmış ve substrat olarak CDNB kullanılarak yapılan çalışmada aktivitede cinsiyete bağlı önemli bir fark saptanamamıştır. GSH-Px'in önemli etnik varyasyon gösterdiği bildirilmiştir. GST'lerin mu izoziminin Avrupa popülasyonunun %40'ında saptanamamış olması bir diğer önemli bulgudur [53].

2.7.2. Glutasyon S-transferaz Aktivitesini Etkileyen Ksenobiyotikler

İlaç metabolize edici diğer sistemler gibi GST'lar da birçok ksenobiyotikten etkilenir. Bu etki indüksiyon, aktivasyon ya da inhibisyon şeklindedir. Bu konuda çalışmalar en çok karaciğer enzimleriyle yapılmıştır. İlaç metabolize edici enzim genel indükleyicileri

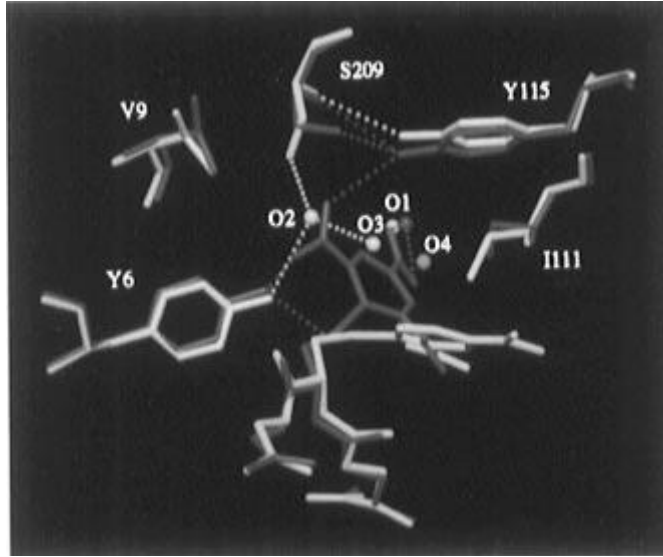
olan fenobarbital, polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH) ve bazı organoklorlu bileşikler hepatik GST'ları da indüklerler.

Fenobarbitalin uygulanmasını takiben sıçanda Ya ve Yc alt ünitelerinden oluşan GST izoenzimi, GST-B için fonksiyonel mRNA'da hızlı bir artış olduğu göstermişlerdir. Bu mRNA, sıçanda Ya alt ünitesinin sentezini düzenlenmekte ve Ya alt ünitesi fenobarbital tarafından selektif olarak arttırılmaktadır. Oysa Yc alt ünitesi nispeten etkilenmemektedir. Benzer olarak GST-B indüksiyonu polisiklik aromatik hidrokarbonlarla da gözlenmiştir. 3-metil kolantren ise büyük olasılıkla Ya alt ünitesi sentezini artırıcı etki yapmaktadır [79].

GST aktivitesine etkilerinin araştırılması açısından çeşitli steroid türevleriyle yapılan çalışmada inhibisyon etkisi artan sıra ile pregnolon sülfat, östradiol-17-sülfat, dehidroizoandrosten sülfat, östradiol-3,17-disülfat ve östradiol-3-sülfat şeklinde saptanmıştır. Sıçan karaciğer izozimleri ile substrat olarak CDBN kullanılarak yapılan çalışmada östradiol disülfatın transferaz A ve C üzerinde transferaz B (ligandin)'ye göre farklı kinetik mekanizmayla inhibisyon yaptığı bildirilmiştir. Antiinflamatuvar ilaçlara ek olarak sülfasalazin, diüretik ilaçlardan etakrinik asit, furosemid ve bumetanidinin sıçan izozimlerini inhibe ettiği gösterilmiştir. Metal bileşiklerinden kadmiyum iyodür, kadmiyum klorür, civa klorür, civa asetat, bakır klorür ve kurşun asetatın da hepatik GST'lar üzerinde inhibitör etkileri bildirilmiştir [79].

GST transferlerinin en yaygın kullanılan analizi GSH'nın 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDBN) eklenmesidir, ekleme yolu ile bir nükleofilik aromatik yerini alma reaksiyonu oluşur. (seri eliminasyonlar kısa ömürlü gama-complex ara ürün içerir). Bu ara ürünün yüksek çözünürlüklü kristal yapısı veya geçiş hali analogu için mevcut tek reaksiyon tipidir Kompleksdeki rat M1-1 izoenzim kristal yapısının *o*-complex ara ürün analogu, 1-(S-glutathionyl)-2,4,6-trinitrocyclohexadienate, ve ürün, 1-(S-glutathionyl)-2,4-dinitrobenzene ile karşılaştırması ara ürün ve ürün için iki tamamen farklı bağlayıcı modu göstermektedir. Ara ürün için "in" bağlayıcı modu gözlemlenirken ürünün aktif bölgenin dışını işaret etmesi özel reaksiyon koordinat hareketlerinin ara ürünün ürüne yığılmasıyla (çökmesiyle) ilgili olduğunu ortaya koymaktadır (Şekil 2.6). Ayrıca, *o*-complex in yapısı Tyr 6 ve Tyr 115 için ara ürünün o-nitro grup ile hidrojen bağlanma etkileşiminde dengelenmesine yardım edebileceğini göstermektedir. Bu fikrin karşıtı ise Tyr 115 in hidrosil grubunun kaldırılmasının aslında CDBN'nin aktivitesini

artırdığının gözlemlenmesidir. Ürün salınımı, M1-1 deki GSH'nın CDNB ye katalizörlü eklenmesinin oran sınırlama adımıdır, öyle ki kimyasal adımı Tyr115 ile hızlandırılabilir fiziksel adımla maskelenebilir [80].



Şekil 2.6. M1-1 izoenzim kristal yapısının δ -complex ara ürün analogu [80].

2.7.3. Bazı Patolojik Durumlarda GST Aktivitesi

Hemolitik anemili 513 hastada eritrosit GST aktivite ilişkisi araştırılmış ve anemi ile GST eksikliği arasında anlamlı bir ilişki saptanmıştır. Eritrositleri hücresel hasardan korumada rol alan GST düzeyleri azaldıkça hücre stabilitesinin azaldığı ve anemi riskinin arttığı bildirilmiştir. Preeklampsi gelişen hamilelerde reaktif oksijen türevlerine karşı koruma sağlayan GSH-Px düzeylerinin çok arttığı bildirilmiştir. Deneysel diyabet oluşturulan sıçanlarda mikrozomal epoksit hidrolaz (EH) ve sitozolik glutatyon Stransferaz aktivitesi incelenmiş, EH aktivitesinde önemli düşüş olurken GST aktivitesinde belirgin olmamakla birlikte kontrole oranla ~%20 gibi bir düşüş olduğu bildirilmiştir. 10 gün süre ile insülin tedavisi sonucu her iki enzim aktivitesi kontrol düzeyine ulaşmıştır. Down sendromlu çocuklarda Se yüklemesi sonucu eritrosit GSH-Px aktivitesinde azalma olması ve yükleme sonrası dönemde eski değerine ulaşmaması şaşırtıcı bir sonuçtur. Araştırmacılar bu durumu Down sendromlu çocuklarda hücre içi Se tüketiminin yüksek olmasına bağlamaktadırlar [79].

2.7.3.1. Çoklu İlaç Rezistansında (Multidrug Resistance MDR) Glutatyon S-Transferazların Rolü

Elektrofilik atağa karşı organizmanın savunucusu durumunda olan GST'lerin organizma açısından son derece yararlı bu fonksiyonlarına karşın aynı mekanizmayla biyoaktivasyonun yanısıra yol açtıkları bir başka sorun vardır. Bu durum GST'lerin klinikte çoklu ilaç rezistansı (MDR) olarak bilinen sorunla ilişkileridir. MDR günümüzde kanser tedavisinde en büyük engel oluşturmaktadır. Tümör hücresi tek bir sitotoksik ajana kronik olarak maruz kaldığında bir süre sonra yapıca benzer olmayan birçok antineoplastik ajanın letal dozlarına da direnç yeteneği kazanmaktadır. MDR tek bir mekanizma ile açıklanamamaktadır. Ana olarak ileri sürülen mekanizmalardan ilki hücreye ilaç akışında rol alan membran P-glikoproteinlerinin modifikasyonu, ikincisi ise düzenlenmeleri değişmiş faz I ve faz II reaksiyonlarına bağlı olarak GSH sisteminin modifikasyonudur [79]. GST'nin kazanılmış dirençle ilişkisinin düşünülmesi tümör hücrelerinde GST jt'nin aşırı artmasından kaynaklanmaktadır. Bir çalışmada adriyamisine direnç meme kanseri hücrelerinde GST aktivitesi normalin 45 katı fazla bulunmuştur. Bu yüzden GST it'nin çeşitli dokularda karsinogenez başlangıcı ve sonrası için iyi bir biyogösterge olabileceği ileri sürülmüştür. MDR temelinde yatan ana mekanizmalar olarak ileri sürülen membran P-glikoproteinlerinin ve GST n düzeylerinin artması birbiri ile ilişki halindedir, çünkü her iki protein genleri birbirine bağlı yolla ifade edilmektedir. Aynı zamanda klinikte kanser tedavisinde kullanılan kemoterapötiklerin çoğu GSH konjugasyonu ile inaktive edilmektedir [79].

3. BÖLÜM

MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Kan Örneklerinin Toplanması

L-karnitin düzeyini belirlemek ve GST aktivitelerini çalışmak üzere toplanan serumlar, sağlıklı kişilerden (n=24) (negatif kontrol grubu), Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Onkoloji hastanesinde ilaç tedavisine başlamamış olan meme kanseri tanısı konmuş hastalardan (n=24) (pozitif kontrol hasta grubu) ve aynı hastaların Docetaxel/Adriamycin kemoterapisi (n=24) (tedavi gören hasta grubu) almasından sonra alınan kanlardan hazırlanmıştır. Bu çalışmanın yapılabilmesi için Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı İlaç Araştırmaları Yerel Etik Kurulu'na başvurulmuştur ve 03.02.2009 tarihinde izin verilmiştir (Karar No: 09/53).

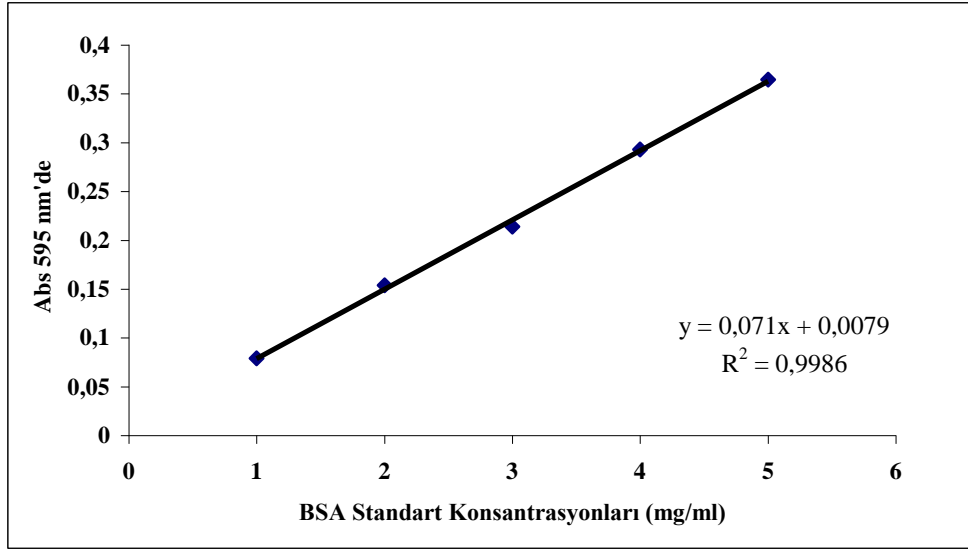
3.2. Kan Örneklerinin Alınması

Çalışmaya alınan hastalardan, tedavi başlangıcında ve tedavi başlangıcından sonraki üç hafta sonunda venöz kanlar EDTA'sız tüplere alınmıştır. Kanlar 10 dakika bekletildikten sonra masa üstü soğutmalı santrifüjde 6000/dk devirde 10 °C de 10 dk santrifüj (Sigma 3C-30) edilip serumları ayrılarak alikvatlar haline getirilerek, çalışma gününe kadar -80°C'de bekletilmiştir.

3.3. Serum Örneklerinde Protein Miktarı Tayini

Sağlıklı kişilerden (n=26) (negatif kontrol grubu), ilaç tedavisine başlamamış olan meme kanseri tanısı konmuş hastalardan (n=24) (pozitif kontrol hasta grubu) ve aynı hastaların Docetaxel/Adriamycin kemoterapisi (n=24) (tedavi gören hasta grubu) almasından sonra alınan serum örneklerinden protein konsantrasyonu tayini, bradford

metodu ile tayin edilmiştir. Serum dilüsyon oranı 1/50 olarak kullanılmıştır. Ölçümlerde Hitachi U-1800 spektrofotometre kullanılmıştır. Standart eğri grafiği 50 dilüsyon oranı ile çarpılarak Bowin Serum Albumin (BSA) konsantrasyonu 1, 2, 3, 4, 5 mg/ml olacak şekilde çizilmiştir.



Şekil 3.1. Bradford standart eğri grafiği

3.4. L-Karnitin Düzeyi Tayin Yöntemi

3.4.1. Çözeltiler ve Hazırlanışı

Hidroksietilpiperazin etansülfonik asit (HEPES) tamponu, 50 mM pH:7,5: Molekül ağırlığı 260,3 g olan HEPES'den 13g tartılarak 1 litre hacimli balon jöjeye konulmuştur. Yaklaşık 500-600 ml distile suda çözülmüştür. Konsantre HCl ile pH 7,5 olacak şekilde ayarlanmıştır. Geri kalan hacim distile su ile 1 litreye tamamlanmıştır.

DTNB, 2g/L: Molekül ağırlığı 396,3g olan DTNB'den 100mg tartılarak, 50ml hacimli balon jöjeye aktararak ve pH'sı 7,5 25 mM olan HEPES tamponunda çözülerek 50 ml'ye HEPES tamponu ile tamamlanmıştır.

Asetil-Koenzim A (Asetil KoA), 1,2 g/L: Molekül ağırlığı 809,6 g olan Asetil KoA'dan 12 mg tartılarak, 10ml hacimli balon jöjeye aktarılmıştır ve distile suda

çözülerek 10 ml'ye tridistile su ile tamamlanmıştır. Hazırlanan bu solüsyon, 500µl'lik hacimlere bölünerek -20° C'de saklanmıştır.

Karnitin asetil transferaz (CAT): 1 ünite enzim aktivitesi içermekte olan CAT seyreltilmeden kullanılmıştır.

L-Karnitin stok çözeltisi, 500 µmol/L: L-karnitinden 80,6 mg tartılarak, 1000 ml'ye distile su ile tamamlanmıştır.

L-Karnitin çalışma standartları (30, 25, 20, 15, 10, 5 µmol/L): L-karnitin stok standart çözeltisinden distile su ile seri dilüsyonlar hazırlanmıştır ve bu dilüsyonlardan standartlar hazırlanarak çalışma yapılmıştır.

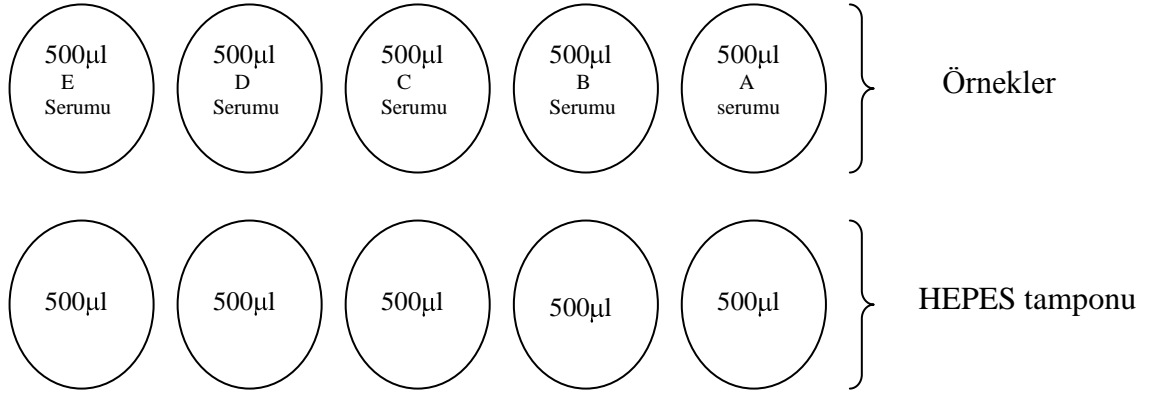
3.4.2. Serum Örneklerinin Diyaliz Edilmesi

Çalışmada kullanılmak üzere, -80 °C'de saklanan serum örnekleri Science-ware mini diyaliz ünitesi ile MW cutoff değeri 6000-8000 dalton arası olan sentetik membran ile diyaliz edilerek, L-karnitin diyalizi 50 mM, pH'sı 7,5 olan HEPES tamponuna karşı yapılmıştır.

Membranlar kaynar durumdaki %2'lik sodyumbikarbonat içerisine atılarak ve 10 dakika kaynamaya bırakılmıştır. Süre sonunda ısıtıcıdan uzaklaştırılarak soğumaya bırakılmıştır. Soğuduktan sonra yine kaynama halindeki 1mM EDTA içerisine atılarak ve 10 dakika daha kaynatılmıştır. Sonra soğumaya bırakılmıştır. İçerisinde membranlar bulunan 1 mM'lık EDTA solüsyonu soğuduktan sonra 5mM'lık sodyum azit eklenerek buzdolabında saklanmıştır.

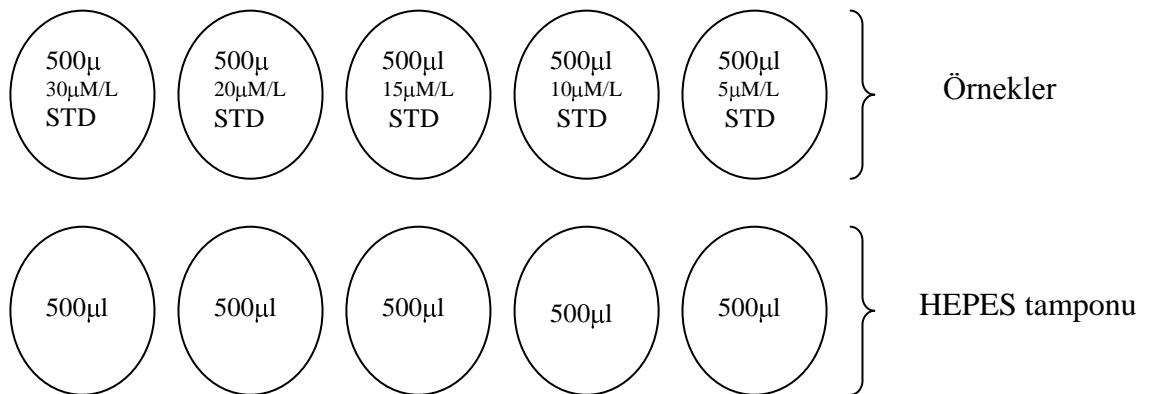
Çalışmada kullanılmak üzere, -80 °C'de saklanan serum örnekleri çözülmüştür. Buzdolabında muhafaza edilen membran ve HEPES tamponu oda sıcaklığına getirilmiştir. Membran, (MW cutoff: 6000-8000 dalton) içerisinde 5 mM sodyum azit bulunan 1 mM'lık EDTA solüsyonundan alınarak distile su ile 2–3 defa yıkandıktan sonra cihaza yerleştirilmiştir. Aparat diyalize uygun şekilde dizayn edildiği için membran arada kalmak üzere eşit hacimde karşılıklı 5 toplamda 10 boşluk elde edilmiştir. Bu boşluklara karşılıklı gelmesi koşulu ile bir tarafa serum (örnek) diğer tarafa eşit miktarda HEPES tamponu konulmuştur ve 3 saat çalkalayıcı üzerinde diyalize bırakılmıştır (Şekil 3.2.) 3 saatin sonunda HEPES tamponu koyduğumuz

tarafındaki sıvı (diyализat) alınmıştır ve tüm örnekler bittikten sonra reaksiyon kurmak üzere ependorfa konularak $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de saklanmıştır.



Şekil 3.2. Diyализ ünitesine örneklerin konulması

Çalışmada kullandığımız $500\text{ }\mu\text{M/L}$ stok karnitin standart çözeltisinden dilüsyonlar yapılarak, $30\text{ }\mu\text{M/L}$, $20\text{ }\mu\text{M/L}$, $15\text{ }\mu\text{M/L}$, $10\text{ }\mu\text{M/L}$ ve $5\text{ }\mu\text{M/L}$ konsantrasyonlarında olacak şekilde standart seri hazırlanmıştır. Her bir standart çözeltiden $500\text{ }\mu\text{l}$ alınarak yukarıda belirtildiği üzere serum numunesi gibi iki defa aynı membran kullanılarak çalışılmıştır (Şekil 3.3.).



Şekil 3.3. Standartların sırası ile aparatındaki boşluklara konulması.

3.4.3. L-Karnitin Düzeyinin Spektrofotometrik Olarak İncelenmesi

Serum örnekleri diyaliz edildikten sonra saklandığı -20°C 'den alınarak reaksiyonu kurmak üzere çözülmüştür. Diyalizattan $200\mu\text{l}$ alınarak, $50\mu\text{l}$ DTNB ve $12,5\mu\text{l}$ Asetil KoA içeren çalışma solüsyonuna eklenmiştir. Bu çalışma ortamına $2\mu\text{l}$ Karnitin asetil transferaz eklenmesi ile reaksiyon başlatılmıştır. Enzimatik reaksiyon, 410 nm 'de köre karşı absorbans kinetiği ELISA Plate Reader (Bio-Tek) ile 5 dk süre takip edilmiştir. Kör için; pH 7,5 25 mM 200 μl HEPES, 50 μl DTNB, 12,5 μl Asetil-KoA kullanılmıştır. Köre karşı absorbans kinetiğinin takip edilmesinden sonra end-point okuması için ependorflara reaksiyonlar seri bir şekilde kurulmuştur. İlk olarak 200 μl diyalizat sonra 50 μl DTNB daha sonra 12,5 μl Asetil-KoA ve en son 2 μl karnitin asetil transferaz eklenmiştir. Yaklaşık 40 dakika sonunda reaksiyon tamamlanmıştır. Kör için; 25 mM 200 μl HEPES, 50 μl DTNB, 12,5 μl Ac CoA 2 μl karnitin asetil transferaz kullanılmıştır. Örnekler ependorflardan alınarak küvete yerleştirilmiştir. Oda ısısında, 410nm dalga boyunda, spektrofotometrede köre karşı absorbans değişiklikleri okundu. Standartların absorbans değerlerine göre standart grafik çizilmiştir. L-Karnitin düzeyinin spektrofotometrik olarak incelenmesi denemeleri sağlıklı kişiler, ilaç tedavisine başlamamış olan meme kanseri tanısı konmuş hastalar ve Docetaxel/Adriamycin kemoterapisi alan meme kanserli hastalarda aynı şekilde uygulanmıştır. Elde edilen absorbans değeri aşağıdaki formüle uyarlanarak L-karnitin ünite değeri ($\mu\text{mol/l}$) hesaplama yapılmıştır.

$$\text{L-karnitin } (\mu\text{mol/l}) = \Delta\text{OD} \times \frac{2}{13,6} \times \frac{527}{400} \times \frac{1000}{\text{Diyaliz geri alınma yüzdesi (recovery)}}$$

(410 nm'de molar absorpsiyon katsayısı)

Çalışma metodu Shihabi ve ark. (1992)'nin çalışma metodundan uyarlanmıştır.

3.5. GST Aktivitesi Tayin Yöntemi

Elde edilen serumlarda total GST aktivitesi, GST substratı 1-kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB) ($\epsilon = 9.6\text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$), GST Mu aktivitesi substratı 1,2-dikloro-4-nitrobenzene

(DCNB) ($\epsilon = 8.5 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$), GST Pi aktivitesi substratı Etakrinik asit (EA) ($\epsilon = 5.0 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) ve GST tau aktivitesi substratı 1,2-epoxy-3-(*p*-nitrophenoxy)propane (EPNP) ($\epsilon = 0.5 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) kullanılarak Habig (1974) metoduna göre glutatyon ile konjugasyonunu katalizlendiği reaksiyonlarda sırasıyla 340nm, 345 nm, 270 nm ve 360 nm'de spektrofotometrik olarak 5 dk izlenerek tayin edilmiştir. Aktivite tayinleri, CDNB için 1 mM (1x PBS tamponu pH 6,9, 43 mM Na₂HPO₄, 14,7 mM KH₂PO₄, 0,137 mM NaCl, 2,7 mM KCl içinde), DCNB için 5 mM (0,1 M Potasyum fosfat tamponu, pH 7,2 içinde) ve EA için 0,25 mM (0,1 M Potasyum fosfat tamponu, pH 6,5 içinde) redükte glutatyon (GSH) konsantrasyonları içeren reaksiyon ortamında yapılmıştır.

3.5.1.CDNB (1-kloro-2,4-dinitrobenzen) ile GST Aktivite Tayini

3.5.1.1. Çözeltiler ve Hazırlanışı

Fosfat Tampon Solüsyonu (PBS) (10x): Aktivite tayini için 1 mM 1x PBS tamponu, pH 6,9: 43 mM Na₂HPO₄, 14,7 mM KH₂PO₄, 0,137 mM NaCl, 2,7 mM KCl içinde hazırlanmıştır.

CDNB (1-kloro-2,4-dinitrobenzen), 10mM, 2ml: Molekül ağırlığı 202,55 g/mol CDNB' den 0,0040g tartılarak önce 1,2 ml etanol daha sonra 0,8 ml distile su eklenmiştir ve çalkalanmıştır. CDNB ışığa duyarlı olduğu için tüpün yüzeyi alüminyum folyo ile sarılmıştır.

GSH (Glutatyon), 10mM, 2 ml: Molekül ağırlığı 307,33 g/mol olan GSH ' dan tartıldı, 1ml distile su eklenerek çalkalanmıştır.

Toplanan serum örneklerinin GST aktivitesi, GST substratı 1-kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB) kullanılarak, Habig (1974) metoduna göre ölçülmüştür. Bu ölçüm metodunda, enzim CDNB'nin glutatyon ile konjugasyonunu katalizlemektedir. Bu metot, konjugasyon sonucu oluşan CDNB-glutatyon ürününün 340 nm'de verdiği güçlü molar absorpsiyonun ($\epsilon = 9.6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) spektrofotometrik olarak izlenmesi prensibine dayanmaktadır. Ölçümlerde ELISA Plate Reader (Bio-Tek) kullanılmıştır.

Ölçümdeki reaksiyon içeriği Tablo 3.1’de verilmiştir. Absorbanstaki değişiklik 340 nm’de 5 dk izlenmiştir ve örneklerdeki GST enzim aktivitesi nmol/min/mg olarak hesaplanmıştır.

Tablo 3.1. CDNB ile GST aktivitesi ölçümünde kullanılan reaksiyon içeriği

Reaksiyon İçeriği	Eklenen Hacim (µl)
Distile Su	170
10x Reaksiyon Tamponu ^a	25
10mM CDNB	25
10mM GSH	25
Enzim Kaynağı: Serum Örneği	5
Toplam Hacim	250

Denemeler 2 tekrarlı yapılmıştır ve sağlıklı kişiler, ilaç tedavisine başlamamış olan meme kanseri tanısı konmuş hastalar ve aynı hastalardan Docetaxel/Adriamycin kemoterapisi alan meme kanserli hastalarda aynı şekilde uygulanmıştır. Elde edilen CDNB aktivite tayini absorban değeri aşağıdaki formüle uyarlanarak hesaplama yapılmıştır.

$$\frac{dA / dt}{\epsilon \text{ (mM}^{-1}\text{)}} \times \frac{0,250 \text{ ml}}{1000 \text{ ml}} \times \frac{1000}{\mu\text{l Enzyme}} \times \text{DF} \times \frac{1}{\text{mg prot. / ml}}$$

3.5.2. DCNB (1,2-dikloro-4-nitrobenzene) ile GST Aktivite Tayini

3.5.2.1. Çözeltiler ve Hazırlanışı

Potasyum Fosfat Tamponu Solüsyonu (10x): pH 7,5 1M K₂HPO₄’den 50ml alınıp 1M KH₂PO₄’den pH 7,5 oluncaya kadar ekleme yapılarak pH 7,5 1M KPO₄ tamponu hazırlanmıştır.

DCNB (1,2-dikloro-4-nitrobenzene) 10mM, 2ml: Molekül ağırlığı 192 g/mol GST Mu aktivitesi substratı DCNB den 0,0038g tartılarak önce 1,2 ml etanol daha sonra 0,8 ml distile su eklenerek çalkalanmıştır.

GSH (Glutasyon) 50mM, 2 ml: Molekül ağırlığı 307,33 g/mol olan GSH'dan 0,0307 tartılarak, 2ml distile su eklenerek çalkalanmıştır.

Toplanan serum örneklerinin GST aktivitesi, GST substratı 1,2-dikloro-4-nitrobenzene (DCNB) kullanılarak, Habig (1974) metoduna göre ölçülmüştür. Bu ölçüm metodunda, enzim DCNB'nin redükte glutasyon ile konjugasyonunu katalizlemektedir. Bu metot, konjugasyon sonucu oluşan DCNB-glutasyon ürününün 345 nm'de verdiği molar absorpsiyonun ($\epsilon = 8.5 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) spektrofotometrik olarak izlenmesi prensibine dayanmaktadır. Ölçümlerde ELISA Plate Reader (Bio-Tek) kullanılmıştır. Ölçümdeki reaksiyon içeriği Tablo 3.2'de verilmiştir.

Tablo 3.2.DCNB ile GST aktivitesi ölçümünde kullanılan reaksiyon içeriği

Reaksiyon İçeriği	Eklenen Hacim (μl)
Distile Su	170
10x Reaksiyon Tamponu ^a	25
10 mM DCNB	25
50 mM GSH	25
<u>Enzim Kaynağı:</u> Serum Örnekleri	5
Toplam Hacim	250

Denemeler 2 tekrarlı yapılmıştır ve sağlıklı kişiler, ilaç tedavisine başlamamış olan meme kanseri tanısı konmuş hastalar ve aynı hastalardan Docetaxel/Adriamycin kemoterapisi alan meme kanserli hastalarda aynı şekilde uygulanmıştır.

3.5.3. EA (Ethacrynic Acid) ile GST Aktivite Tayini

3.5.3.1. Çözeltiler ve Hazırlanışı

Potasyum Fosfat Tamponu Solüsyonu: pH 6,5 1M K₂HPO₄'den 50ml alınıp 1M KH₂PO₄'den pH 6,5 oluncaya kadar ekleme yapılarak pH 6,5 1M KPO₄ tamponu hazırlanmıştır.

EA (Ethacrynic Acid) 2mM, 2ml: Molekül ağırlığı 303,1g/mol GST Pi aktivitesi substratı Etikraynik asit'den 0,0012 g tartılarak önce 1,2 ml etanol daha sonra 0,8 ml distile su eklenerek çalkalanmıştır.

GSH (Glutatyon) 2,5mM, 2 ml: Molekül ağırlığı 307,33 g/mol olan GSH'dan 0,0015 g tartılarak, 2ml distile su eklenerek çalkalanmıştır.

Küvet içerisindeki toplam hacim 1000 µl olacak şekilde küvet içi konsantrasyonları pH 6,5 KPO₄ tamponu 0,1 M, Etakrinik asit (EA) 0,2 mM, GSH 0,25 mM olmuştur. Kör tüpünü hazırlamak için kuartz küvete sırasıyla; 700 µl distile su, 100 µl tampon, 100 µl Etakrinik asit'den eklenerek kuartz küvet aşağı yukarı olacak şekilde çalkalanmıştır. Daha sonra 100 µl GSH (Glutatyon) eklenerek kuvartz küvet yine aşağı yukarı olacak şekilde çalkalanmıştır. Hazırlanan kuvartz küvet spektrofotometre sıfırlandıktan sonra yerleştirilmiştir ve 270nm'de 5dk okuma yapılmıştır. Yapılan okuma sonrası spektrofotometre tekrar sıfırlama yapılmıştır ve diğer örnekler hazırlanmıştır.

5 µl diyaliz edilmemiş serum örneği içerecek kuvartz küvete sırasıyla; 695µl distile su, 100 µl tampon, 100 µl Etikraynik asit'den eklenerek ve kuvartz küvet aşağı yukarı olacak şekilde çalkalanmıştır. Daha sonra 100 µl GSH (Glutatyon) eklenerek ve kuvartz küvet yine aşağı yukarı olacak şekilde çalkalanmıştır. Son olarak da 5 µl diyaliz edilmemiş serum örneği eklenerek kuvartz küvet aşağı yukarı olacak şekilde çalkalanmıştır. Habig (1974) metoduna göre glutatyon ile konjugasyonunu katalizlendiği reaksiyonlarda 270 nanometrede spektrofotometrik olarak 5 dk izlenerek tayin edilmiştir. Ölçümdeki reaksiyon içeriği Tablo 3.3'de verilmiştir Denemeler 2 tekrarlı yapılmıştır. Elde edilen EA aktivite tayini absorbans değeri aşağıdaki formüle uyarlanarak hesaplama yapılmıştır.

$$\frac{dA / dt}{\epsilon \text{ (mM}^{-1}\text{)}} \times \frac{0,250 \text{ ml}}{1000 \text{ ml}} \times \frac{1000}{\mu\text{l Enzyme}} \times DF \times \frac{1}{\text{mg prot. / ml}}$$

Tablo 3.3 EA ile GST aktivitesi ölçümünde kullanılan reaksiyon içeriği

Reaksiyon İçeriği	Eklenen Hacim (µl)
Distile Su	695
1M Reaksiyon Tamponu ^a	100
2 mM EA	100
2,5 mM GSH	100
Enzim Kaynağı: Serum Örnekleri	5
Toplam Hacim	1000

3.5.4. EPNP (1,2-epoxy-3-(*p*-nitrophenoxy)propane) ile GST Aktivite Tayini

3.5.4.1. Çözeltiler ve Hazırlanışı

Potasyum Fosfat Tamponu Solüsyonu: pH 6,5 1 M K₂HPO₄'den 50ml alınıp 1M KH₂PO₄'den pH 6,5 oluncaya kadar ekleme yapılarak pH 6,5 1M KPO₄ tamponu hazırlanmıştır.

EPNP (1,2-epoxy-3-(*p*-nitrophenoxy)propane) 2,5 mM, 2ml: Molekül ağırlığı 195,17g/mol GST Pi aktivitesi substratı EPNP'den 0,0009 g tartılarak önce 1,2 ml etanol daha sonra 0,8 ml distile su eklenerek çalkalanmıştır.

GSH (Glutatyon) 2,5 mM, 2 ml: Molekül ağırlığı 307,33 g/mol olan GSH'dan 0,0015 g tartılarak, 2 ml distile su eklenerek çalkalanmıştır.

Toplanan serum örneklerinin GST aktivitesi, GST substratı 1,2-epoxy-3-(*p*-nitrophenoxy)propane (EPNP) kullanılarak, Habig (1974) metoduna göre ölçülmüştür. Bu ölçüm metodunda, enzim EPNP'nin redükte glutatyon ile konjugasyonunu katalizlemektedir. Bu metot, konjugasyon sonucu oluşan EPNP-glutatyon ürününün 360 nm'de verdiği molar absorpsiyonun ($\epsilon = 0.5 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) spektrofotometrik olarak izlenmesi prensibine dayanmaktadır. Ölçümlerde ELISA Plate Reader (Bio-Tek) kullanılmıştır. Ölçümdeki reaksiyon içeriği Tablo 3.4'de verilmiştir. Absorbanstaki değişiklik 360 nm'de 5 dk izlenmiştir.

Tablo 3.4 EPNP ile GST aktivitesi ölçümünde kullanılan reaksiyon içeriği

Reaksiyon İçeriği	Eklenen Hacim (µl)
Distile Su	175
1M Reaksiyon Tamponu ^a	25
2,5 mM EPNP	25
2,5 mM GSH	25
<u>Enzim Kaynağı</u> : Serum Örnekleri	5
Toplam Hacim	250

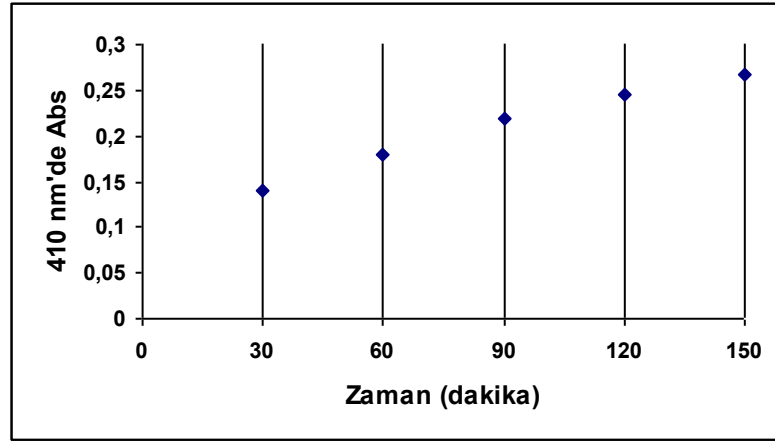
4.BÖLÜM

BULGULAR

4.1. L-Karnitin Aktivite Sonuçları

4.1.1. L-Karnitin Aktivitesi Süre Optimizasyonu

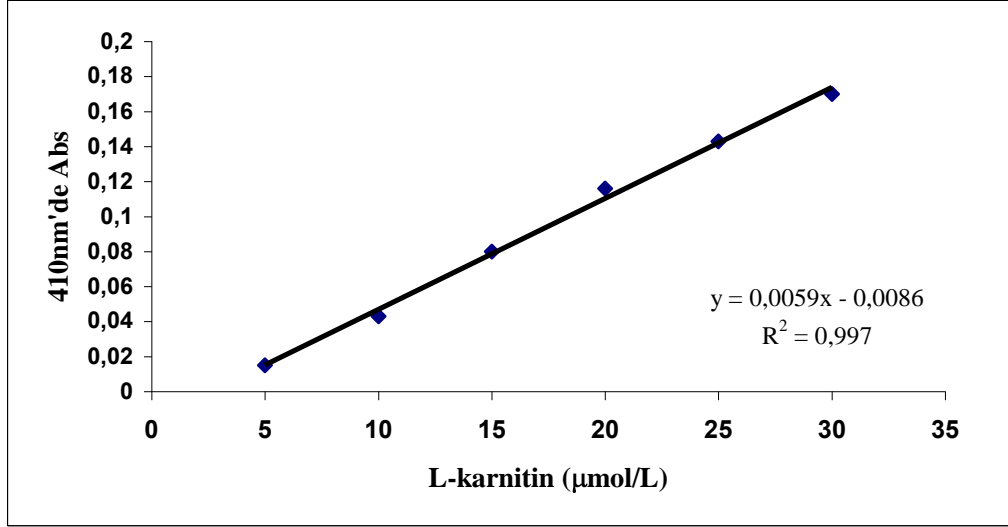
30 $\mu\text{M/L}$ - Karnitin standardı absorbanısı, köre karşı süre optimizasyonu için 150 dk 410 nm'de takip edilmiştir ve optimizasyon grafiği şekil 4.1.de gösterilmiştir.



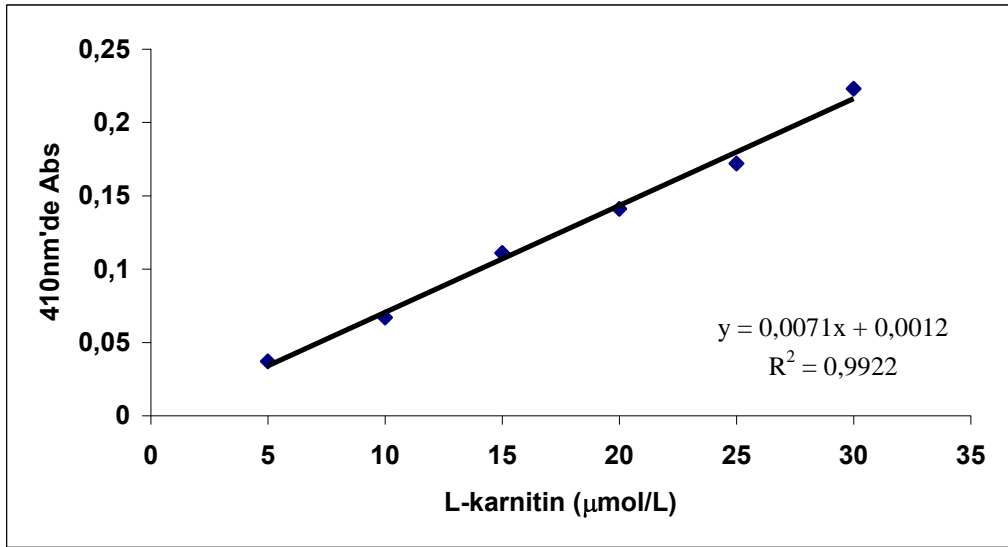
Şekil 4.1. L-Karnitin aktivitesi süre optimizasyonu

4.1.2. L-Karnitin Aktivitesi Diyaliz Optimizasyonu

Diyalizin etkisi ve diyalizin tekrarlanabilirliği 5-30 $\mu\text{mol/L}$ L-karnitin standart serisi ile gösterilmiştir (Şekil 4.2). Diyaliz verimliliği %75 olarak bulunmuştur Diyaliz membranın tekrar kullanılabilirliği aynı membran iki defa kullanılarak gösterilmiştir. Diyaliz edilmiş ve diyaliz edilmemiş L-karnitin standartları karşılaştırılmıştır (Şekil 4.3).



Şekil 4.2. Diyaliz edilmiş L-karnitin standart grafiği



Şekil 4.3. Diyaliz edilmemiş L-karnitin standart grafiği

4.1.3. Kontrol Gurubu, Tedavi Öncesi ve Tedavi Sonrası Hastalarda L-Karnitin Aktivitesi

Kontrol grubu (sağlıklı kişiler), tedavi öncesi ve tedavi sonrası hastalardan alınan serum örneklerinde L-karnitin aktivitesi $\mu\text{mol/L}$ olarak bulunmuştur. Kontrol grubunda ($n=24$) $38,38\pm 10,25$ $\mu\text{mol/L}$, tedavi öncesi hastalarda ($n=24$) $47,31\pm 24,79$ $\mu\text{mol/L}$ ve tedavi sonrası hastalarda ($n=24$) $49,31\pm 28,04$ $\mu\text{mol/L}$ olarak ortalama L-karnitin değerleri bulunmuştur. Serum örneklerinde kontrol grubu-tedavi öncesi, kontrol grubu-tedavi sonrası, tedavi öncesi-tedavi sonrası hastalar kendi aralarında karşılaştırılarak L-karnitin aktivitesinin anlamlılığı, SPSS-15 analiz programının kullanılmasıyla, iki örnek t-test istatistik testine göre %95 güven aralığında bulunmuştur (Tablo 4.1). İki örnek t-test'e göre yapılan gruplar arası istatistiksel karşılaştırmalarda sağlıklı kişiler (kontrol grubu) - tedavi öncesi hastalar ve kontrol grubu - tedavi sonrası hastalar arasındaki farklılık anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$). Tedavi öncesi ve tedavi sonrası hastalar arasındaki farklılık anlamlı bulunmamıştır ($p > 0,05$).

Tablo 4.2'de kontrol grubu (sağlıklı kişiler), tedavi öncesi ve tedavi sonrası hastalardan alınan serum örneklerinde End-point L-karnitin spektrofotometrik metodu ile elde edilen L-karnitin standart grafiği kullanılarak hesaplanan serum L-karnitin konsantrasyonları gösterilmiştir.

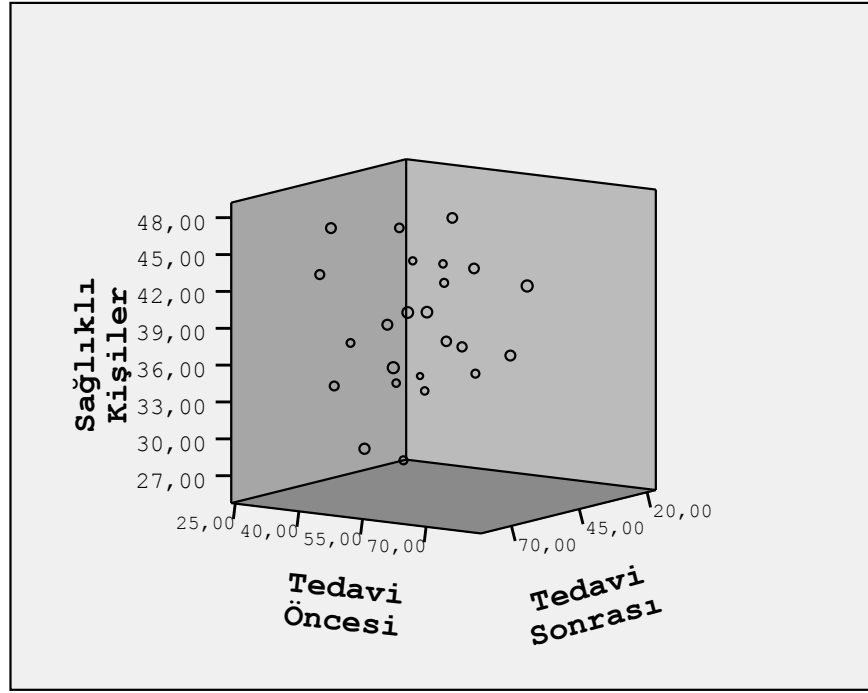
Tablo 4.1. L-karnitin aktivitesi gruplar arası iki örnek T-testi istatistiksel analiz sonuçları

		Paired Differences				t	df	Sig. (2-tailed)	
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
					Lower				Upper
Pair 1	Sağlıklı Kişiler - Tedavi Öncesi	-9,05000	13,05100	2,66402	-14,56096	-3,53904	-3,397	23	,002
Pair 2	Sağlıklı Kişiler - Tedavi Sonrası	-10,93333	15,29804	3,12270	-17,39313	-4,47354	-3,501	23	,002
Pair 3	Tedavi Öncesi - Tedavi Sonrası	-1,88333	15,40154	3,14383	-8,38683	4,62017	-,599	23	,555

Tablo 4.2. Kontrol grubu, tedavi öncesi ve sonrası hastalarda serum L-karnitin aktiviteleri

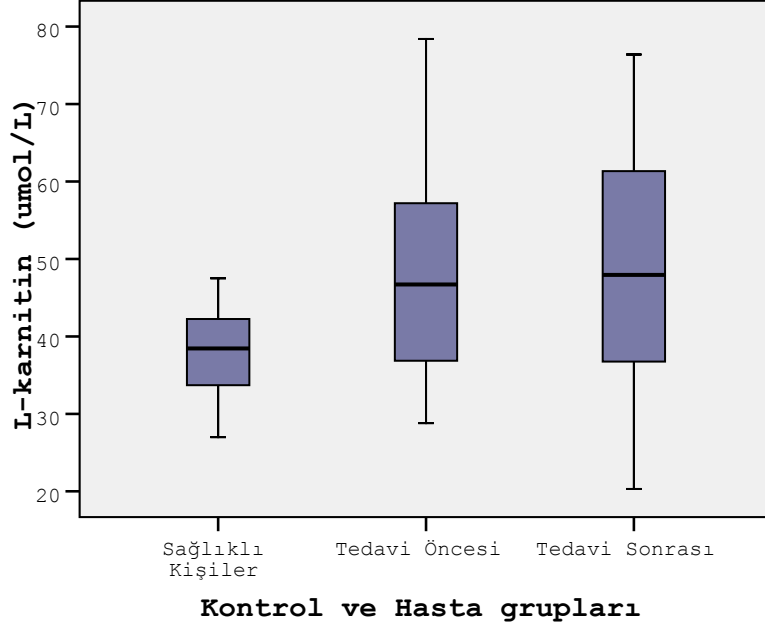
Kontrol (Sağlıklı Kişiler) Grubu	L-katninin aktivitesi $\mu\text{mol/L}$	Tedavi Öncesi Hastalar	L-katninin aktivitesi $\mu\text{mol/L}$	Tedavi Sonrası Hastalar	L-katninin aktivitesi $\mu\text{mol/L}$
G. C.	37	S. P.	56,8	S. P.	47,3
Ü. T.	33,8	S. T.	50,9	S. T.	33,2
N. K.	41	F. C.	57,6	F. C.	68,6
A. D.	47,5	M. K.	55,3	M. K.	48,6
G. D.	41	N. M.	44,5	N. M.	34,7
M. Ö.	32	M. Y.	29,6	M. Y.	20,3
N. O.	32,7	Ş. Ç.	35,8	Ş. Ç.	38,8
S. Y.	36,9	L. K.	69,2	L. K.	48,9
N. E.	37	S. Y.	59,4	S. Y.	76,4
S. A.	29,8	H. Y.	49,9	H. Y.	72,5
D. Ü.	39,3	N. A.	48,9	N. A.	62,5
H. Ö.	40,9	E. Ç.	59,7	E. Ç.	64,8
Ü. C.	43,5	G. K.	56,6	G. K.	47,3
G. A.	43,4	F. T.	78,4	F. T.	57,1
N. E.	36	D. A.	28,8	D. A.	44,7
E. S.	27	G. D.	41,5	G. D.	45
H. U.	42,5	D. Ö.	31,3	D. Ö.	59,9
F. İ.	42	N. U.	33,3	N. U.	28,8
Y. A.	37,6	A. O.	55,5	A. O.	51,1
İ. U.	45,8	İ. A.	40	İ. A.	44,2
Z. O.	32	M. Ş.	39,8	M. Ş.	34,5
G. Ö.	33,6	R. Ö.	34,9	R. Ö.	60,2
N. G.	46,9	G. F.	37,9	G. F.	66,1
H. K.	42	N. A.	40	N. A.	28,1

Kontrol grubu, tedavi öncesi hastalar ve tedavi sonrası hastalarda serum L-karnitin değerlerinin noktasal dağılımı, 3D Nokta Dağılım Grafiği ile gösterilmiştir (Şekil 4.4) Bu grafiğe göre L-karnitin aktivitesinin minimum ve maksimum görüldüğü noktalar kontrol grubu'nda (sağlıklı kişiler) 27 – 48 $\mu\text{mol/L}$, tedavi öncesi hastalarda 25 – 70 $\mu\text{mol/L}$, tedavi sonrası hastalarda 20 – 70 $\mu\text{mol/L}$ olduğu gösterilmiştir.



Şekil 4.4. Kontrol grubu, tedavi öncesi hastalar ve tedavi sonrası hastalarda serum L-karnitin düzeyi 3D dağılım nokta grafiği.

Kontrol grubu, tedavi öncesi hastalar ve tedavi sonrası hastalarda serum L-karnitin değerlerinin dağılımları Box-plot grafikleri incelendiğinde normal dağılım gösterdikleri görülmüştür ($p < 0.05$) (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. Kontrol, tedavi öncesi ve sonrası hastalardan elde edilen serum L-karnitin miktarı ölçümleri box-plot grafiği. ($p>0.05$)

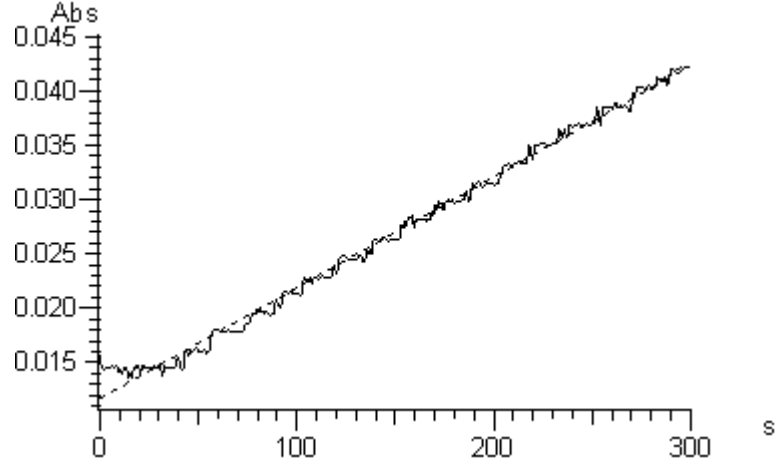
4.2. GST Aktivite Sonuçları

4.2.1. CDNB (1-kloro-2,4-dinitrobenzen) ile GST Aktivitesi

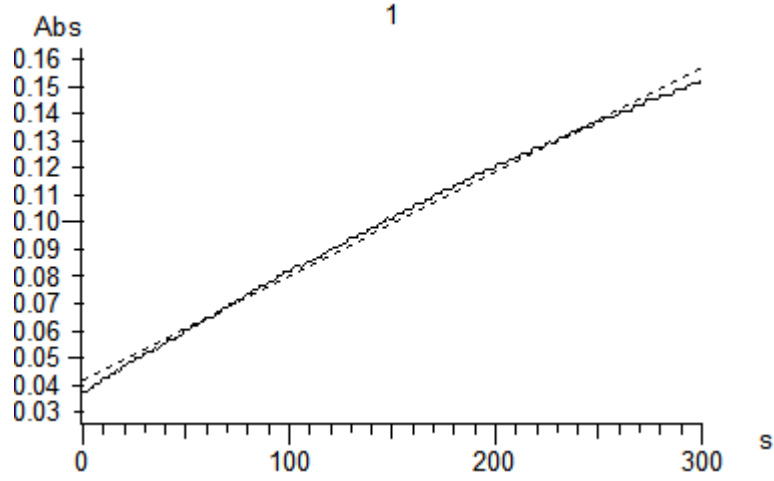
1-Kloro-2,4-dinitrobenzen'in (CDNB) substrat olarak kullanıldığı GST aktivitesi ölçümleri, sağlıklı ve hasta kişilerden elde edilen serumlar kullanılarak, metotlar kısmında verilen Habig ve ark.'nın (1974) çalışma metoduna göre çalışılmıştır.

CDNB'ye karşı ortalama GST aktiviteleri kontrol grubunda ($n=24$) $0,70\pm 0,33$ nmol/dk/mg, tedavi öncesi hastalarda ($n=24$) $1,70\pm 0,64$ nmol/dk/mg ve tedavi sonrası hastalarda ($n=24$) $1,58\pm 0,58$ nmol/dk/mg olarak hesaplanmıştır (Tablo 4.5).

CDNB substrat olarak kullanıldığı, optimize koşullar altında ($500 \mu\text{g}$ protein miktarı) zamana karşı doğrusal GST aktivite grafiği Şekil 4.6'da verilmiştir. Şekil 4.7'da küvet içi enzim miktarı optimizasyonu sırasında gözlemlenen protein miktarına ($756 \mu\text{g}$) bağlı zamana karşı satüre olmuş enzim aktivitesi grafiği verilmiştir.



Şekil 4.6. CDNB'nin substrat olarak kullanıldığı, zamana karşı doğrusal GST aktivite grafiği.



Şekil 4.7. CDNB'nin substrat olarak kullanıldığı, zamana karşı enzim miktarına karşı GST aktivite satürasyon grafiği

Tablo 4.3. Kontrol grubu, tedavi öncesi ve sonrası hastalarda CDNB üzerinden serum GST aktivite düzeyleri.

Sağlıklı Kişiler (Kontrol grubu)	CDNB (nmol/dk/mg)	Tedavi Öncesi Hastalar	CDNB (nmol/dk/mg)	Tedavi Sonrası Hastalar	CDNB (nmol/dk/mg)
G. C.	1,031	S. P.	1,802	S. P.	1,448
Ü. T.	0,548	S. T.	1,230	S. T.	1,753
N. K.	0,506	F. C.	1,102	F. C.	2,180
A. D.	0,471	M. K.	2,138	M. K.	1,589
G. D.	0,616	N. M.	1,232	N. M.	1,652
M. Ö.	0,929	M. Y.	1,623	M. Y.	2,452
N. O.	0,398	Ş. Ç.	1,555	Ş. Ç.	1,226
S. Y.	0,817	L. K.	1,245	L. K.	1,855
N. E.	0,741	S. Y.	1,250	S. Y.	1,640
S. A.	0,676	H. Y.	2,015	H. Y.	1,932
D. Ü.	0,356	N. A.	1,553	N. A.	1,351
H. Ö.	0,916	E. Ç.	1,478	E. Ç.	2,020
Ü. C.	0,695	G. K.	1,553	G. K.	0,709
G. A.	0,733	F. T.	1,569	F. T.	1,435
N. E.	0,658	D. A.	1,711	D. A.	1,442
E. S.	0,784	G. D.	1,764	G. D.	1,463
H. U.	0,646	D. Ö.	1,139	D. Ö.	2,355
F. İ.	0,779	N. U.	1,317	N. U.	1,284
Y. A.	0,768	A. O.	1,604	A. O.	1,62
İ. U.	0,723	İ. A.	1,441	İ. A.	1,571
Z. O.	0,970	M. Ş.	1,372	M. Ş.	1,263
G. Ö.	0,905	R. Ö.	2,207	R. Ö.	1,104
N. G.	0,774	G. F.	1,666	G. F.	1,013
H. K.	0,544	N. A.	0,914	N. A.	1,794

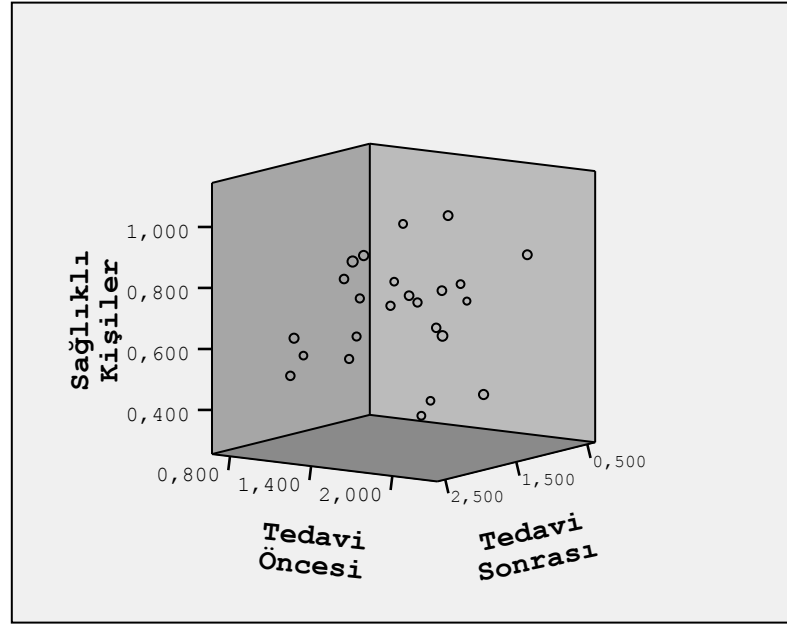
Serum örneklerinde kontrol grubu-tedavi öncesi, kontrol grubu–tedavi sonrası, tedavi öncesi–tedavi sonrası hastalar kendi aralarında karşılaştırılarak CDNB’ye karşı GST aktivitelerinin anlamlılığı, SPSS-15 analizprogramının kullanılmasıyla, İki örnek t-test istatistik testine göre %95 güven aralığında bulunmuştur (Tablo 4.4). İki örnek t-test’e göre yapılan gruplar arası istatistiksel karşılaştırmalarda sağlıklı kişiler (kontrol grubu) - tedavi öncesi hastalar ve kontrol grubu - tedavi sonrası hastalar arasındaki farklılık anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$). Tedavi öncesi ve tedavi sonrası hastalar arasındaki farklılık anlamlı bulunmamıştır ($p > 0,05$).

Tablo 4.4. CDNB substratı ile GST aktivitesi gruplar arası iki örnek T-testi istatistiksel analiz sonuçları

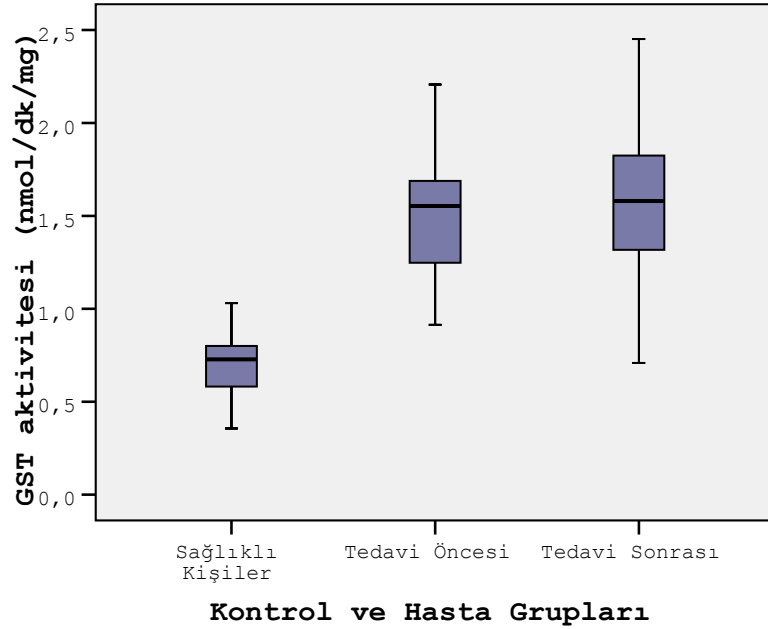
		Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
					Lower	Upper			
Pair 1	Sağlıklı Kibiler - Tedavi Öncesi	-,808958	,337621	,068916	-,951523	-,666394	-11,738	23	,000
Pair 2	Sağlıklı Kibiler - Tedavi Sonrası	-,881958	,451789	,092221	-1,072732	-,691184	-9,564	23	,000
Pair 3	Tedavi Öncesi - Tedavi Sonrası	-,073000	,610549	,124628	-,330812	,184812	-,586	23	,564

Kontrol grubu, tedavi öncesi hastalar ve tedavi sonrası hastalarda CDNB’ye karşı serum GST değerlerinin noktasal dağılımı, 3D Nokta Dağılım Grafiği ile gösterilmiştir (Şekil 4.8). Bu grafiğe göre CDNB substratı ile GST aktivitesinin minimum ve maksimum görüldüğü noktalar, kontrol grubu (sağlıklı kişiler)’nda GST aktivitesi 0,4–1 nmol/dk/mg arasında, tedavi öncesi hastalarda 0,8–2 nmol/dk/mg arasında, tedavi sonrası hastalarda 0,5– 2,5 nmol/dk/mg arasında olduğu gösterilmiştir.

Kontrol grubu, tedavi öncesi hastalar ve tedavi sonrası hastalarda CDNB’ye karşı serum GST değerlerinin dağılımları Box-plot grafikleri incelendiğinde tedavi öncesi ve tedavi sonrası hasta grafikleri normal dağılımın dışında kaldığı görülmüştür ($p < 0,05$) (Şekil 4.9).



Şekil 4.8. Kontrol grubu, tedavi öncesi hastalar ve tedavi sonrası hastalarda CDNB'ye karşı serum GST aktivite ölçümleri 3D dağılım nokta grafiği.

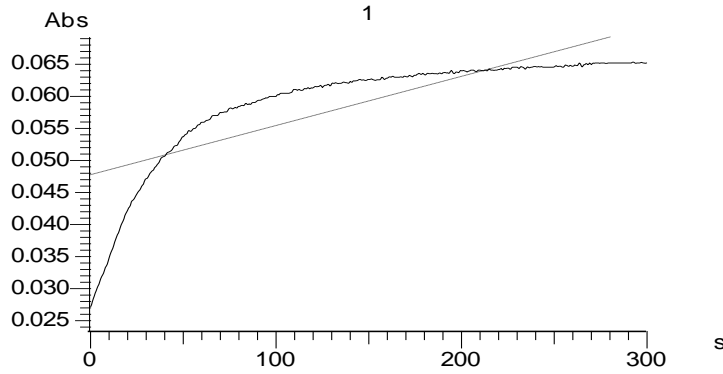


Şekil 4.9. Kontrol, tedavi öncesi ve sonrası hastalardan elde edilen CDNB'ye karşı serum GST aktivite değerleri Box-plot grafiği. ($p>0,05$)

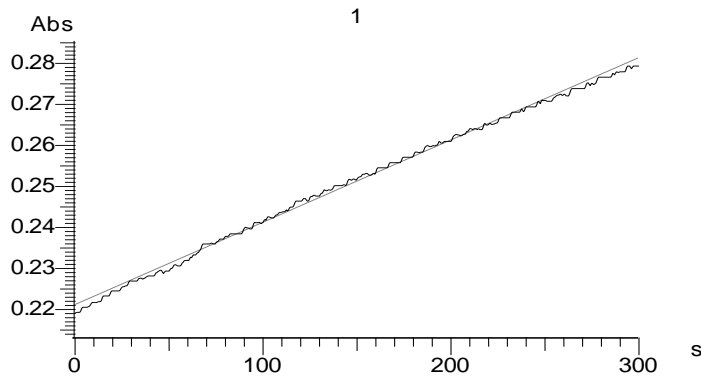
4.2.2. EA (Etakrinik Asit) ile GST Aktivitesi

Etakrinik asit'in (EA) substrat olarak kullanıldığı GST aktivitesi ölçümleri, sağlıklı ve hasta kişilerden elde edilen serumlar kullanılarak, metotlar kısmında verilen Habig ve ark.'nın (1974) çalışma metoduna göre çalışılmıştır.

Şekil 4.10'da küvet içi enzim miktarı optimizasyonu sırasında gözlemlenen protein miktarına (393 µg) bağlı zamana karşı satüre olmuş enzim aktivitesi grafiği verilmiştir. EA'nın substrat olarak kullanıldığı, optimize koşullar altında (262,5 µg protein miktarı) zamana karşı doğrusal GST aktivite grafiği Şekil 4.11'de verilmiştir.



Şekil 4.10. Etakrinik asit'in (EA) substrat olarak kullanıldığı, zamana karşı enzim miktarına karşı GST aktivite satürasyon grafiği



Şekil 4.11. Etakrinik asit'in (EA) substrat olarak kullanıldığı, zamana karşı doğrusal GST aktivite grafiği

Serum örneklerinde kontrol grubu-tedavi öncesi, kontrol grubu-tedavi sonrası, tedavi öncesi-tedavi sonrası hastalar kendi aralarında karşılaştırılarak EA'ya karşı GST

aktivitelerinin anlamlılığı, SPSS-15 analiz programının kullanılmasıyla, iki örnek t-test istatistik testine göre %95 güven aralığında bulunmuştur (Tablo 4.5). İki örnek t-test'e göre yapılan gruplar arası istatistiksel karşılaştırmalarda kontrol grubu - tedavi sonrası hastalar ve tedavi öncesi - tedavi sonrası hastalar arasındaki farklılık anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$). Kontrol grubu ve tedavi öncesi hastalar arasındaki farklılık anlamlı bulunmamıştır ($p > 0,05$).

Tablo 4.5. EA substratı ile GST aktivitesi gruplar arası iki örnek T-testi istatistiksel analiz sonuçları

		Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
					Lower	Upper			
Pair 1	Sağlıklı Kipiler - Tedavi Öncesi	,044167	2,329867	,475582	-,939650	1,027983	,093	23	,927
Pair 2	Sağlıklı Kipiler - Tedavi Sonrası	-2,823667	2,857723	,583330	-4,030377	-1,616956	-4,841	23	,000
Pair 3	Tedavi Öncesi - Tedavi Sonrası	-2,867833	2,707984	,552765	-4,011315	-1,724352	-5,188	23	,000

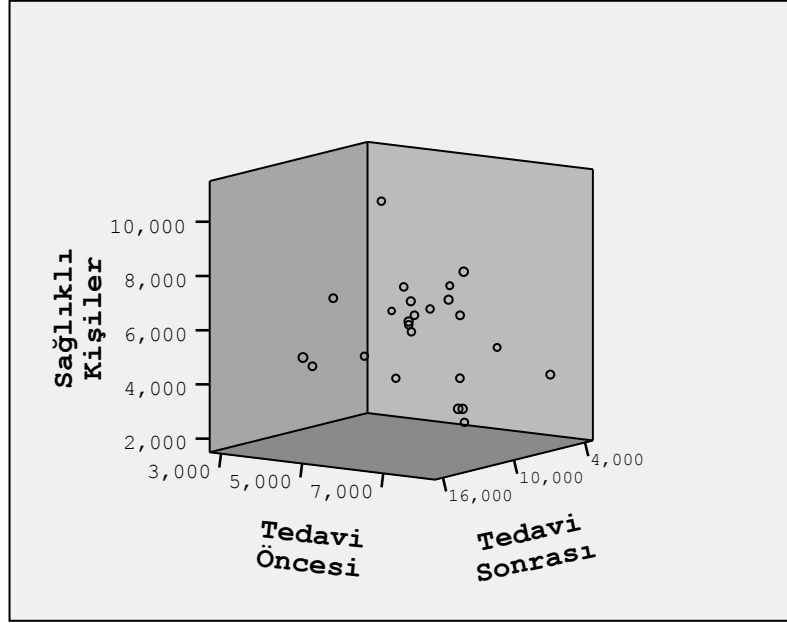
EA'ya karşı ortalama GST aktiviteleri kontrol grubunda ($n=24$) $5,52 \pm 2$, nmol/dk/mg, tedavi öncesi hastalarda ($n=24$) $4,10 \pm 2,5$ nmol/dk/mg ve tedavi sonrası hastalarda ($n=24$) $8,35 \pm 3$, nmol/dk/mg olarak hesaplanmıştır (Tablo 4.6).

Kontrol grubu, tedavi öncesi hastalar ve tedavi sonrası hastalarda EA'ya karşı serum GST değerlerinin noktasal dağılımı, 3D Nokta Dağılım Grafiği ile gösterilmiştir (Şekil 4.12). Bu grafiğe göre EA substratı ile GST aktivitesinin minimum ve maksimum görüldüğü noktalar, kontrol grubunda GST aktivitesi 2-10 nmol/dk/mg arasında, tedavi öncesi hastalarda 3 -7 nmol/dk/mg arasında, tedavi sonrası hastalarda 4-16 nmol/dk/mg arasında olduğu gösterilmiştir.

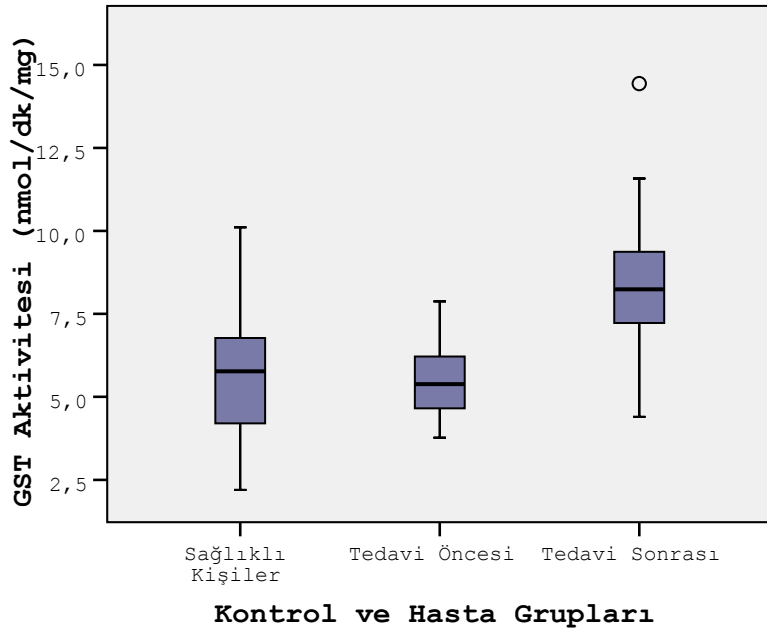
Kontrol grubu, tedavi öncesi hastalar ve tedavi sonrası hastalarda EA'ya karşı serum GST değerlerinin dağılımları Box-plot grafikleri incelendiğinde tedavi sonrası hasta grubu grafiğinin normal dağılım dışında kaldığı görülmüştür ($p < 0,05$) (Şekil 4.13).

Tablo 4.6. Kontrol grubu, tedavi öncesi ve sonrası hastalarda EA üzerinden serum GST aktivite düzeyleri

Sağlıklı Kişiler (Kontrol grubu)	EA (nmol/dk/mg)	Tedavi Öncesi Hastalar	EA (nmol/dk/mg)	Tedavi Sonrası Hastalar	EA (nmol/dk/mg)
G. C.	7,073	S. P.	4,985	S. P.	8,024
Ü. T.	3,74	S. T.	4,922	S. T.	8,476
N. K.	4,310	F. C.	3,771	F. C.	11,579
A. D.	3,076	M. K.	6,867	M. K.	9,50
G. D.	6,109	N. M.	5,629	N. M.	9,823
M. Ö.	7,965	M. Y.	6,576	M. Y.	8,412
N. O.	3,849	Ş. Ç.	6,179	Ş. Ç.	7,371
S. Y.	4,50	L. K.	4,306	L. K.	9,026
N. E.	5,824	S. Y.	4,128	S. Y.	6,11
S. A.	3,171	H. Y.	6,963	H. Y.	10,205
D. Ü.	2,198	N. A.	6,207	N. A.	7,087
H. Ö.	10,107	E. Ç.	4,386	E. Ç.	7,86
Ü. C.	4,673	G. K.	6,227	G. K.	4,397
G. A.	5,436	F. T.	5,148	F. T.	7,936
N. E.	6,770	D. A.	5,513	D. A.	9,24
E. S.	6,124	G. D.	5,34	G. D.	8,345
H. U.	5,05	D. Ö.	4,372	D. Ö.	14,438
F. İ.	6,134	N. U.	6,111	N. U.	7,13
Y. A.	6,876	A. O.	6,225	A. O.	8,488
İ. U.	5,716	İ. A.	5,138	İ. A.	8,133
Z. O.	6,263	M. Ş.	5,43	M. Ş.	7,323
G. Ö.	6,881	R. Ö.	5,323	R. Ö.	5,297
N. G.	4,097	G. F.	7,874	G. F.	5,55
H. K.	6,776	N. A.	4,038	N. A.	10,736



Şekil 4.12. Kontrol grubu, tedavi öncesi hastalar ve tedavi sonrası hastalarda EA'ya karşı serum GST aktivite ölçümleri 3D dağılım nokta grafiği.

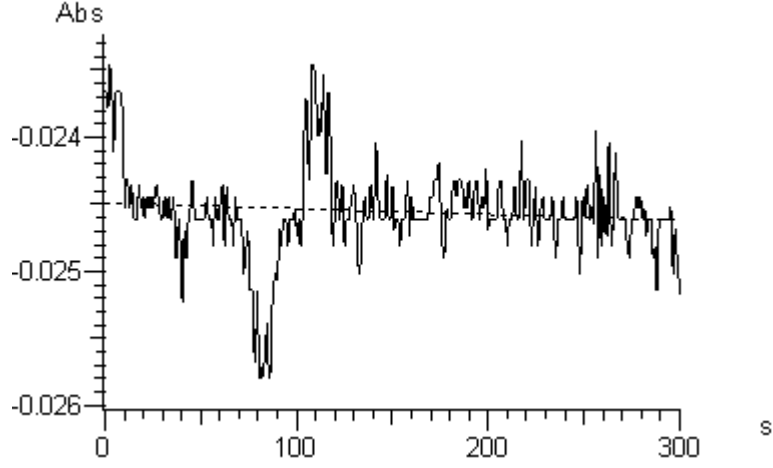


Şekil 4.13. Kontrol, Tedavi öncesi ve sonrası hastalardan elde edilen EA'ya karşı serum GST aktivite değerleri Box-plot grafiği. ($p>0.05$)

4.2.3. DCNB (1,2-dikloro-4-nitrobenzene) ile GST Aktivitesi

1,2-dikloro-4-nitrobenzene (DCNB) substrat olarak kullanıldığı GST aktivitesi ölçümleri, sağlıklı ve hasta kişilerden elde edilen serumlar kullanılarak, metotlar kısmında verilen Habig ve ark.'nın (1974) çalışma metoduna göre çalışılmıştır.

DCNB'nin substrat olarak kullanıldığı, optimize koşullar altında serumlarda GST aktivitesi gözlenmemiştir. DCNB'nin substrat olarak kullanıldığı koşullar altında zamana karşı GST aktivite grafiği Şekil 4.14'de verilmiştir.

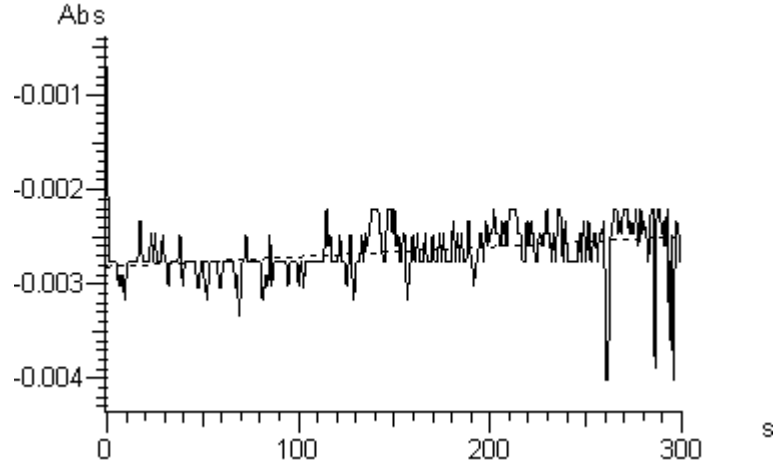


Şekil 4.14. DCNB'nin substrat olarak kullanıldığı zamana karşı GST aktivite grafiği.

4.2.4. EPNP (1,2-epoksi-3-(*p*-nitrofenoksi) propan) ile GST Aktivite Tayini

1,2-epoksi-3-(*p*-nitrofenoksi) propan'ın (EPNP) substrat olarak kullanıldığı GST aktivitesi ölçümleri, sağlıklı ve hasta kişilerden elde edilen serumlar kullanılarak, metotlar kısmında verilen Habig ve ark.'nın (1974) çalışma metoduna göre çalışılmıştır.

EPNP'nin substrat olarak kullanıldığı, optimize koşullar altında serumlarda GST aktivitesi gözlenmemiştir. EPNP'nin substrat olarak kullanıldığı koşullar altında zamana karşı GST aktivite grafiği Şekil 4.15'de verilmiştir.



Şekil 4.15. EPNP'nin substrat olarak kullanıldığı zamana karşı GST aktivite grafiği.

5.BÖLÜM

TARTIŞMA- SONUÇ VE ÖNERİLER

Kemoterapik ilaçların meme kanseri üzerindeki etkilerini araştıran çalışmalar son yıllarda giderek ivme kazanmaktadır. Göğüs kanseri tedavisinde kullanılan Docetaxel ve Adriamycin (Doxorubicin) ilaçlarının hem glutatyon S-transferaz izoenzimleri üzerine [10,81,82] hem de L-karnitin sistemi üzerine etkileri araştırmacılar tarafından çalışılmaktadır [7,8].

Yapılan bu çalışmada sağlıklı kişilerden (kontrol grubu), (n=24) ilaç tedavisine başlamamış olan meme kanseri tanısı konmuş hastalardan (n=24) ve aynı hastaların Docetaxel/Adriamycin kemoterapisi (n=24) almasından sonra alınan serum örneklerinde L-karnitin ve GST izoenzim aktiviteleri spektrofotometrik olarak incelenmiştir.

5.1. L-Karnitin Aktivitesi

Literatüre bakıldığında Wenzel ve ark (2005) yaptığı bir çalışmada karnitinlerin kardiyoprotektif etkileri ile ilgili olarak, karnitin yetmezliğinin kardiyomiyopati ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte, karnitinin iskemi, miyokard enfaktüsü nedeni hasara karşı miyokardı koruduğu da bilinmektedir. Kanser ve antikanser ilaçlara etkisi üzerine ve kanser ile ilişkili dış metabolik sendromda, karnitinlerin rolünü araştıran çalışmalar sürmekte ve çeşitli eksperimental ve klinik kanser modellerinde karnitinlerin etkisi araştırılmaktadır [7,8].

Delaney ve ark. (2006) epirubicin ile tedavi edilen meme kanseri hastasına verilecek L-karnitin takviyesinin kardiyak toksisite gelişimini azaltacak bir hipotez incelemiştir. Bu çalışmada BT549, MDA-MB-435, NCI-ADR- RES, MCF7 ve T47D tipinde birkaç in vitro hücreleri kullanarak L-karnitin eklentisinin epirubicinin tümör sitotoksik etkilerini

azaltıp azaltmadığı belirlenmiştir. RT-PCR kullanılarak yapılan karnitin metabolik enzimlerinin analizini takiben, hücrelerin L-karnitine cevap verebilme yeteneğini incelenmiştir. L-karnitin takviyesinin, epirubicinin meme kanserli hücreleri öldürmesinde hiçbir katkısı olmadığını gösterilmiştir [83].

Erbaş ve ark. (2007) meme kanserinde karnitinin koruyucu etkisini ve arginaz nitrik oksit etkileşimini bozma olasılığını araştırmışlardır. Tümör dokularındaki histopatolojik incelemeyle yüksek arginaz etkinliği, yüksek ornitin miktarı ve düşük nitrik oksit (NO) seviyeleri saptanmıştır. Tedavi gruplarında mitotik hücreler önemli oranda azalmıştır. Hücre arginaz etkinliği ve ornitin seviyelerinin karnitin ile birlikte önemli oranda azaldığını saptamışlardır. Tümör ilerlemesindeki karnitinin koruyucu rolündeki olası mekanizmalardan birinin karnitin NO değerinin yükseltmesi olabileceğini göstermişlerdir. Bu mekanizma tümör-artırma ajanlarının üretimini azaltabildiğini, poliaminler ve NO'nun üretiminin artmasının kanser gelişiminde koruyucu etki gösterdiğini saptamışlardır [84].

Çalışmamızda, kontrol grubunda (n=24) $38,38 \pm 10,25$ $\mu\text{mol/L}$, tedavi öncesi hastalarda (n=24) $47,31 \pm 24,79$ $\mu\text{mol/L}$ ve tedavi sonrası hastalarda (n=24) $49,31 \pm 28,04$ $\mu\text{mol/L}$ olarak ortalama L-karnitin değerleri bulunmuştur. İki örnek t-test'e göre yapılan gruplar arası istatistiksel karşılaştırmalarda kontrol grubu - tedavi öncesi hastalar ve kontrol grubu - tedavi sonrası hastalar arasındaki farklılık anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$). Tedavi öncesi ve tedavi sonrası hastalar arasındaki farklılık anlamlı bulunmamıştır ($p > 0,05$).

Bulunan bu sonuçların ışığı altında, kontrol grubu ve hasta grupları arasındaki istatistiksel farklılık, göğüs kanserinin serum L-karnitin düzeyine arttırıcı bir etkisi olduğunu göstermiştir. L-karnitin'in tümör dokularındaki hücre arginaz etkinliği ve ornitin seviyelerini önemli oranda azaldığını, NO seviyesinin arttığı saptanmış olduğundan (30) ve bu sonuçların gösterdiği doğrultuda, göğüs kanserli kişilerin vücudunda doğal olarak koruma amaçlı L-karnitin seviyesinin yükseldiğini belirtebilmekteyiz.

5.2. GST Aktivitesi

Glutasyon S-transferazlar (GSTs), hem dokuya özel hem de belirli bir genetiğe sahip detoksidan enzimlerin bir çoklugen ailesindedir. Bir veya daha fazla GST izoenzimlerinin düzeylerindeki değişiklikler, kültürlü hücre hatlarındaki antikanser ilaç direncindeki gelişimi ile ilişkilidir [85]

Östrojen reseptör proteinler gibi diğer tümör izlerine bağlı olabilecek ve ilaç direncinin gelişimi ile alakalı olabilecek in vitro çalışmalarda elde edilecek durumlar nedeniyle çalışmalarda glutasyon transferazlar seçilmiştir [85].

Literatüre bakıldığında Thomas ve ark. (1990) meme kanserinde toplam GST aktivitesinin ve GST izoenzim aktivitelerinin incelendiği çalışmada 1-kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB) substrat tahlili ve western blot yöntemi kullanarak 45 insan meme karnisomları için GST aktiviteleri belirlenmiştir. GST aktivitesi ortalaması 67 mU/mg protein olup 5 ile 208 mU/mg protein arasında değişmiştir. GST aktiviteleri ve GST izoenzimlerinin yoğunluğunun primer meme kanseri karnisomları arasında önemli farklılıklar olduğu fakat bunlar tümör veya hormon reseptör durumuna bağlı olmadığı saptanmıştır. Bu enzim düzeylerinin nüksetme risklerinden veya antikanser tedaviye cevap vermesinden bağımsız olup olmadığı henüz test edilmemiştir [85].

Gudmundsdottir ve ark. (2001) yaptığı bir çalışmada, Glutasyon S-transferaz genleri çeşitli kanserojen metabolizmalarında bulunmaktadır. GSTM1 ve GSTT1 genlerindeki polimorfizimlerinin silinmesi ve GSTP1 genindeki A-G polimorfizmi 500 meme kanserli hasta ve 395 kontroldeki meme kanseri riski ile ilgili olarak araştırıldı. 388 meme karsinomlarındaki p53 mutasyonlarının frekansı ve dağılımındaki GST genotiplerinin etkisi çalışılmıştır. GSTP1'in G allellerindeki artışla ilişkili meme kanser riskindeki artış gözlemlenmiştir. GSTM1 ve GSTT1 polymorfizimlerinin meme kanseri ile ilgili olduğu görülmemiştir. Genotipleri kombinasyonlarındaki risk artışı olduğu gözlemlenmemiştir [12]

Armstrong ve ark. (1990) yaptığı çalışmada etakrinik asit gibi GST inhibitörleri bazı kanser hücrelerine duyarlı gözüksüklerinden melphalan gibi bazı ilaçların etkileri birçok araştırmacıyı kemoterapik rejimler için "adjuvant" gibi engelleyicilerin gelişiminin alkilleyici ajanları içerdiğini hesaba katmak zorunda bırakmıştır. GSH transferazları muhtemelen normal hücrelerdeki alkilleyici ilaçların detoksifikasyonu için önemli bir yol olduğundan, herhangi bir etkin strateji, enzimatik aktivasyonun engellenmesi

amacıyla alkilleyici ilaç kemoterapisi için adjuvant olarak normal hücrelerin korunmasına olan muhtemel zararlı etkilerini göz önüne almalıdır [80].

Peter ve ark.(1991) yaptığı çalışmada GST inhibitörü olan etakrinik asit seviyeleri ilerlemiş ve tedavi başlangıcında olan 27 kanserli hastada gözlenmiştir. Hastalara ilk etapta hergün 6 saatte 3 doz 25 ile 75 mg/m² olarak verilmiştir. Etakrinik asitin 2. dozundan sonra i.v. olarak 30 ile 55 mg/m² olarak verilmiştir. Bütün hastalarda etakrinik asit seviyesi spektrofotometrik olarak incelenmiştir. Herbir doz seviyesin de etakrinik asit eklenmesini takiben GST aktivitesinin arttığı gözlemlenmiştir [81].

Glutatyon S-transferaz izoenzimlerinin polimorfizmi, protein miktarı ve aktivite özellikleri meme kanseri dokularında, [9,10,11] meme kanserli hastaların kanlarında [12] akciğer kanserli hastaların kanlarında [13] araştırmacılar tarafından çalışılmıştır. Ayrıca GST'lerin, anti-kanser ilaçlarının (örneğin chlorambucil, melphalan, thiotepa, 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea (BCNU), cyclophosphamide, gibi) detoksifikasyon mekanizmalarında görev aldığı bilinerek, bu ilaç tedavileri alan hastalarda aktivite çalışmaları yapılmıştır [14,15].

Kanser kemoterapisinde kullanılan bazı ilaçlar GSH ile birleşerek metabolize olabilen alkilleyici ajanlardır. İlaç direncinin gelişimi birçok kemoterapik protokol için ciddi bir engeldir. İlaç dirençlerinde hangi GSH içerildiği net olmamakla birlikte ikinci dereceden kanıtlar bir bağlantı olabileceğini ortaya koymaktadır. Neoplastik dokularda bulunan yükseltilmiş seviyedeki sınıf pi enzimlerinin birleşimi, alkilleyici ilaçlara esas direncin yüksek enzim seviyelerinden dolayı olabileceğini ortaya koymaktadır. Ek olarak, insan meme kanseri hücrelerinde multi ilaç direncinde gösterilen GSH transferazlarının artan sentezi, enzim tarafından oluşturulan direncin işareti olabilir. Bununla birlikte esas veya ilaç uyarılı GSH transferazlarının artan sentezinin ilaçları alkilemek için kanser hücrelerinin direncini artırdığına dair kliniksel direkt bir kanıt yoktur [79].

Kelley ve ark. (1994) yaptığı çalışmada meme kanserli hastaların kanında GST seviyelerini çalışmışlardır ve kemoterapi alan meme kanserli hastalar için ayırıcı bir faktör olarak GST Pi-1 izoenziminin seviyesii tanımlamışlardır. Meme tümöründeki GST izoenzim çeşitliliğinin, standart kemoterapinin klinik etkisinde rol oynayabileceğini göstermişlerdir. Sonuçta normal meme dokusunda P1 izoenziminin

yoğun olduğu ve meme kanserli hastaların büyük çoğunluğunda da meme dokusunda arttığı gözlenmiştir [10].

Yapılan bu çalışmada kontrol grubu (sağlıklı kişiler), tedavi öncesi ve tedavi sonrası hastalardan alınan serum örneklerinde GST aktivitelerinin incelenmesi sonucunda CDNB'ye karşı ortalama GST aktiviteleri kontrol grubunda (n=24) $0,70\pm 0,33$ nmol/dk/mg, tedavi öncesi hastalarda (n=24) $1,70\pm 0,64$ nmol/dk/mg ve tedavi sonrası hastalarda (n=24) $1,58\pm 0,58$ nmol/dk/mg olarak bulunmuştur. İki örnek t-test'e göre yapılan gruplar arası istatistiksel karşılaştırmalarda kontrol grubu - tedavi öncesi hastalar ve kontrol grubu - tedavi sonrası hastalar arasındaki farklılık anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$). Tedavi öncesi ve tedavi sonrası hastalar arasındaki farklılık anlamlı bulunmamıştır ($p > 0,05$).

Bulunan bu sonuçların gösterdiği doğrultuda, kontrol grubu ve hasta grupları arasındaki istatistiksel farklılık, göğüs kanserinin serum total Glutasyon S-transferaz aktivitesine artırıcı bir etkisi olduğu ifade edilebilmektedir.

Etakrinik asit'e (EA) karşı ortalama GST aktiviteleri kontrol grubunda (n=24) $5,52\pm 2,88$ nmol/dk/mg, tedavi öncesi hastalarda (n=24) $4,10\pm 2,05$ nmol/dk/mg ve tedavi sonrası hastalarda (n=24) $8,35\pm 3,58$ nmol/dk/mg olarak bulunmuştur. İki örnek t-test'e göre yapılan gruplar arası istatistiksel karşılaştırmalarda kontrol grubu - tedavi sonrası hastalar ve tedavi öncesi - tedavi sonrası hastalar arasındaki farklılık anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$). Kontrol grubu ve tedavi öncesi hastalar arasındaki farklılık anlamlı bulunmamıştır ($p > 0,05$).

Etakrinik asit, GST Pi izoenzimleri için ayırt edici substrat olduğundan, tedavi sonrası ilaç etkileşimleriyle tedavi sonrası artan GST aktivite düzeylerinin özellikle GST Pi izoenzimi tarafından meydana geldiği anlaşılmaktadır. Daha önceki çalışmalarda kemoterapi alan meme kanserli hastaların kanında GST Pi-1 izoenziminin seviye artışı gösterildiğinden (Kelley ve ark, 1994), meme tümöründeki GST izoenzim çeşitliliğinin, standart kemoterapinin klinik etkisiyle artabileceği bizim sonuçlarımız tarafından da desteklenmiştir.

Sırasıyla GST Mu ve GST Tau izoenzimlerinin substratları olan DCNB ve EPNP'nin kullanıldığı çalışmalarda serum GST aktivitesi gözlenememiştir. Bu sonuçlar bize, söz konusu GST izoenzimlerinin, sağlıklı ve hasta kişilerin serumlarında aktiviteleri ölçülebilinecek miktarlarda bulunmadığını göstermiştir.

Bu alışma, meme kanseri metabolizması ve meme kanseri tedavisinde kullanılan söz konusu ilaçların L-karnitinin rol aldığı metabolik yolların ve Glutasyon S-transferaz'ların katalizlediği detoksifikasyon mekanizmaları üzerine etkilerinin incelenmesine, kanser biyolojisi üzerine yapılan çalışmalara ve tedavi yöntemlerinin etkinliklerine dair önemli noktaların ortaya çıkarılmasına önemli ölçüde katkıda bulunacağını göstermektedir.

KAYNAKLAR

1. Öztürk, M., Meme Kanserinin Genetiği ve Risk Faktörleri. İ.Ü. İstanbul No: 54 Aralık 15-26, 2006.
2. Haydaroğlu, A., Ege Üniversitesinde Meme Kanserleri 3897 Olgunun Değerlendirilmesi. Meme Sağlığı Dergisi Cilt:1 Sayı:1, 2005.
3. Aydın, A., Topuz, E., Akyan, A., Meme Kanserinde Tanı Tedavi Takip s 33, ISBN 975-450-527-2 İstanbul Konsensusu 2006.
4. Kouzimi. K., Matoba. Ryo., Prediction of Docetaxel Response in Human Breast Cancer by Gene Expression Profiling, Journal of Clinical Oncology, 23,3 January 20, 2005.
5. Erciyas, A., Prematür Yenidoğanlarda Respiratuar Distres Sendromunun Serum Serbest Karnitin Düzeyleri ile İlişkisi. Uzmanlık Tezi, Erciyes Üniversitesi, Kayseri 2003.
6. Shihabi, Z., Serum and Tissue Carnitine Assay Based on Dialysis. Clin. Chem., 38 (8): 1414-1417, 1992.
7. Wenzel, U., Nickel, A., Daniel H., Increased Carnitine-Dependent Fatty Acid Uptake into Mitochondria of Human Colon Cancer Cells Induces Apoptosis. J. Nutr. 135: 1510-1514, 2005.
8. Yeh, C., Wang, J., Fatty acid metabolism pathway play an important role in carcinogenesis of human colorectal cancers by Microarray-Bioinformatics analysis. Cancer Letters. 233:297-308, 2006.
9. Shea. T, C., Clafin G., Glutathione transferase activity and isoenzyme composition in primary human breast cancer. Cancer Res., 50:6848-6853, 1990.
10. Kelley. M, K., Variability of glutathione S-transferase isoenzymes patterns in matched normal and cancer human breast tissue. Biochem.J., 304:843-848, 1994.
11. Smith, R, A., Investigation of glutathione S-transferase zeta and the development of sporadic breast cancer. Breast Cancer Res., 3:409-411, 2001.
12. Gudmundsdottir, K., GSTM1, GSTT1, GSTP1 Genotypes in Relation to Breast Cancer Risk and Frequency of Mutations in the p53 Gene. Cancer Epidemiology, Biomarkers Prevention, 10: 1169 -1173, 2001.

13. Figueras, J., Glutathione S-transferase M1 (*GSTM1*) and (*GSTT1*) polymorphisms and lung cancer risk among Northwestern Mediterraneans. *Carcinogenesis*, 18: 1529-1533, 1997.
14. Lewis, A, D., Glutathione and glutathione-dependent enzymes in ovarian adenocarcinoma cell lines derived from a patient before and after the onset of drug resistance: intrinsic differences and cell cycle effects. *Carcinogenesis*, 9:1283-1287, 1988.
15. Kearns P. R., Glutathione and the response of malignant cells to chemotherapy. *DDT.*, 3:113-121, 1998.
16. Arıkan, R., Travmatik Bir Yaşantı: Meme Kanseri ve Mastektomi Kriz Dergisi 9(1) 39-46, 2000.
17. Brevetti, G., European Multicenter Study on Propionyl-L-Carnitine in Intermittent Claudication. *Journal of American College of Cardiology*, 34 (5): 1618 -1624, 1999.
18. Dökmeçi, I: Vitaminler; Farmakoloji-Temel Kavramlar. Nobel Tıp Kitabevi,789-820, 2000.
19. Aitken, R. J., Baker MA, Sawyer D. Oxidative stress in the male line and its role in the aetiology of male infertility and genetic disease. *Reprod Biomed Online* 7(1):65-70. 2003.
20. Dokmeçi, D., Oxidative stress, male infertility and the role of carnitines. *Folia Med* 47(1):26-31, 2005.
21. Dokmeçi, D.,L-carnitine inhibitsethanol-induced gastric mucosal injury in rats. *Pharmacol Rep* 57:481 8, 2005.
22. Arafa, M., Protective role of carnitine esters against alcoholinduced bgastric lesions in rats. *Pharmacol Res* 48:285-90 2003.
23. Packer, L., Free radical scavenging is involved in the protective effect of L-propionyl-carnitine against ischemia-reperfusion injury of the heart. *Arch Biochem Biophys* 288(2):533-7, 1991.
24. Nikolaos, S., Effect of L-carnitine supplementation on red blood cells deformability in hemodialysis patients. *Ren Fail* 22(1):73-80, 2000.

25. Matsumoto, Y., Effects of Lcarnitine supplementation on renal anemia in poor responders to erythropoietin. *Blood Purif* 19(1):24-32, 2001.
26. Christie, E., Supplementation with L-carnitine does not reduce the efficacy of epirubicin treatment in breast cancer cells. *Science direct Cancer Letters* 252 195–207, 2006.
27. Pettegrew, W., Acetyl-L-carnitine physical-chemical, metabolic, and therapeutic properties: relevance for its mode of action in Alzheimer's disease and geriatric depression. *Mol Psychiatry* 5(6):616-32 2000.
28. Bianchetti, A., Effects of acetyl-L-carnitine in Alzheimer's disease patients unresponsive to acetylcholinesterase inhibitors. *Curr Med Res Opin* 19(4):350-3, 2003.
29. Cavallini, G., Carnitine versus androgen administration in the treatment of sexual dysfunction, depressed mood, and fatigue associated with male aging. *Urology* 63(4):641-6, 2004.
30. Erbas, H., Protective role of carnitine in breast cancer via decreasing arginase activity and increasing nitric oxide, *Cell Biology International* 31 1414e1419, 2007.
31. Armstrong, R.N., Glutathione S-transferases: reaction mechanism, structure, and function, *Chem.Res.Toxicol.*, 4, 131-140, 1991.
32. Coles B., Ketterer B., The role of glutathione and glutathione transferases in chemical carcinogenesis, *CRC Crft. Rev. Biochem J.*, 25, 47-70, 1990.
33. Abu-Hijleh, A.A., Purification, and kinetic and Immunologic characterization of theta class glutathione S-transferase GSTT1-1 from normal and cancerous human breast tissues, (Doktora Tezi), Ortadoğu Teknik Üniversitesi, 1999.
34. Mannervik, B. ve Jansson H., Binary combination 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, 1982.
35. Landi, S., Mammalian class theta GST & differential susceptibility to carcinogens; a review, *Mutation research*, 463, 247-283, 2000.

36. Rossjohn, J., McKinstry W.J., Oakley A.J., Verger D., Flanagan J., Chelvanayagam G., Tan K.L., Board P.G., Parker M.W., Human theta class glutathione transferase: the crystal structure reveals a sulfate-binding pocket within a buried active site, *Structure*, 6, 309-322, 1998.
37. Mannervik, B. ve Danielson U.H., Glutathione transferases- Structure and catalytic activity, *CRC Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 23, 283-337, 1988.
38. Kearns P.R., Hall A.G., Glutathione and the response of malignant cells to chemotherapy , *DDT.*, 3, 113-121, 1998.
39. Caccuri A.M., Giovanni A., Proton release on binding of glutathione to alpha Mu and Delta class glutathione transferases, *Biochem.*, 344, 419-425, 1999.
40. Jakoby W.B., The glutathione S-transferases: a group of multifunctional detoxification proteins, *Adv. Enzymol.*, 46, 383-414, 1978.
41. Chen W.J., Graminski G.F., Armstrong R.N., Dissection of the catalytic mechanism of isoenzyme 4-4 of glutathione S-transferases with alternative substrates, *Biochemistry*, 27, 647-654, 1988.
42. Graminski G.F., Kubo Y., Armstrong R.N., Spectroscopic and kinetic evidence for the thiolate anion of glutathione at the active site of glutathione S-transferase, *Biochemistry*, 28, 3562-3568, 1989.
43. Huskey S.E., Huskey W.P. ve Lu A.Y.H., Contributions of thiolate “desolvation” to catalysis by glutathione S-transferase isoenzymes 1-1 and 2-2: evidence from kinetic solvent isotope effects, *J.Am.Chem.Soc.*, 113, 2283-2290, 1991.
44. Sinning I., Kleywegt G.J., Cowan S.W., Reinemer P., Dirr H.W., Huber R., Gilliland G.L., Armstrong R.N., Ji, X., Board P.G., Olin B., Mannervik B., Jones T.A., Structure determination and refinement of human alpha class glutathione transferase A1-1, and a comparison with the mu and pi class enzymes, *J.Mol.Biol.*, 232, 192-212, 1993.
45. Ji X., Zhang P., Armstrong R.N. ve Gilliland G.L., The three-dimensional structure of a glutathione S-transferase from the Mu gene class. Structural analysis of the binary complex of isoenzyme 3-3 and glutathione at 2.2 Å resolution, *Biochemistry*, 31, 10169-10184, 1992.

46. Reinemer P., Prade L., Holf P., Neufiend T., Huber R., Zettl R., Palme K., Shell J., Koelln I., Bartnnik H. D., Bieseler, B., Three-dimensional structure of GSTs from *A. thaliana* at 2.2 Å resolution, *J. Mol. Biol.*, 255, 289-305, 1996.
47. Rossjohn J., Feil S.C., Wilce M.C.S, et.al., Crystallization, structural determination and analysis of a novel parasitic vaccine candidate: *Fasciola hepatica* Glutathione-S-transferase, *J. Mol. Biol.*, 273, 857-872, 1997.
48. Lin D., Meyer D.J., Effects of human and rat glutathione-S transferases on the covalent DNA binding of the N-acetoxy derivatives of heterocyclic amine carcinogens in vitro a possible mechanism of organ specificity in their, *Cancer Res.*, 54, 4920-4926, 1994.
49. Allocati N., Functional analysis of the evolutionarily conserved proline 53 residue in *proteus mirabilis* Glutathione-S-transferase B1-1, *FEBS lett.* 445,347-350, 1999.
50. Wilce M.C.J., Board P.G., Feil S.C., Parker M.W., Crystal structure of a theta-class glutathione transferase, *EMBO J.*, 14, 2133-2143, 1995.
51. Board P.G., Zeta, A novel class of glutathione transferases in a range of species from plants to humans, *Biochem.J.*, 238, 929-935, 1997.
52. Keen, J. M., ve ark. Mechanism of the several activities of the glutathione S transferases. *J. Biol. Chem.* 251: 6183-6188, 1976.
53. Ketterer, B. The role of nonenzymatic reactions of glutathione in xenobiotic metabolism. *Drug Metab. Rev.* 13:161-187, 1982.
54. Kosower, N. S., Glutathione status of cells. *Int. Rev. Cytol.* 54: 109-160, 1978.
55. Chasseaud, L. F., Conjugation with glutathione and mercapturic acid excretion. In: *Glutathione: Metabolism and Function* (I. M. Arias and W. B. Jakoby, Eds.), Raven Press, New York, pp. 77114, 1976.
56. Gillette, J. R., Kinetics of decomposition of chemically unstable metabolites in the presence of nucleophiles: derivation of equations used in graphical analyses. *Pharmacology* 20: 64-86, 1980.
57. Nemoto, N., ve ark. K-region benzo(a)pyrene-4,5-oxide is conjugated by homogeneous glutathione S-transferases. *Nature* 255: 512, 1975.

58. Hesse, S., ve ark. Inactivation of DNA binding metabolites of benzo(a)pyrene and benzo(a)pyrene-7,8- dihydrodiol by glutathione and glutathione Stransferases. *Carcinogenesis* 3: 757-760, 1982.
59. Hernandez, O., ve ark. Regiospecificity and stereospecificity in the enzymatic conjugations of glutathione with (\pm) benzo(a)pyrene-4,5-oxide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 96: 1494-1502, 1980.
60. Black, H. S., and Douglas, D. R., Formation of a carcinogen of natural origin in the etiology of ultraviolet light-induced carcinogenesis. *Cancer Res.* 33: 2094-2096, 1973.
61. Kadlubar, F. F., Formation of 3-(glutathion-S-yl)-N-methyl-4-aminoazobenzene and inhibition of aminoazo dye-nucleic acid binding in vitro by reaction of glutathione with metabolically generated N-methyl-4-aminoazobenzene-Nsulfate. *Chem.-Biol. Interact.* 31: 265-278, 1980.
62. Ketterer, B., The isolation of carcinogen-binding protein from livers of rats given 4-dimethylaminoazobenzene. *Biochem. J.* 103: 316- 324, 1967.
63. De Baun, J. R., N-Hydroxy- 2-acetylaminofluorene sulfotransferase: its probable role in carcinogenesis and protein-(methion-S-yl)-binding in rat liver. *Cancer Res.* 30: 577-595, 1970.
64. Meerman, J. H. N., Identification of glutathione conjugates formed from N-hydroxy-2-acetylaminofluorene in the rat. *Chem.-Biol. Interact.* 39: 149-168, 1982.
65. Irving, C., Persistent binding of 2-acetylaminofluorene to rat liver DNA in vivo and consideration of the mechanism of binding of N-hydroxy-2-acetylaminofluorene to rat liver nucleic acids. *Cancer Res.* 29: 1799-1804, 1969.
66. Kriek, E., On the mechanism of action of carcinogenic aromatic amines. 1. Binding of 2-acetylaminofluorene and Nhydroxy-2-acetylaminofluorene to rat liver nucleic acids in vivo. *Chem.-Biol. Interact.* 1: 3-17, 1969.
67. Bartsch, H., Electrophilic N-acetyl-amino-arenes by enzymatic deacetylation and transacetylation in liver. *Biochim. Biophys. Acta* 286: 272-298, 1972.

68. Mulder, G. J., Formation and identification of glutathione conjugates from 2-nitrofluorene and N-hydroxy-2-aminofluorene. *Chem.-Biol. Interact.* 39: 111-127, 1982.
69. Boroujerdi, M., Metabolism and DNA binding of benzo(a)-pyrene in vivo in the rat. *Cancer Res.* 41: 951-957, 1981.
70. Akerboom, T. P. M., ve ark. Competition between transport of glutathione disulfide (GSSG) and glutathione S-conjugates from perfused rat liver into bile. *FEBS Letters* 140: 73-76, 1982.
71. McCay, P. B., ve ark. Effect of glutathione peroxidase activity on lipid peroxidation in biological membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 431: 459-468, 1976.
72. Tipping, E., The influence of soluble binding proteins on lipophilic transport and metabolism of hepatocytes. *Biochem. J.* 195: 441-452, 1981
73. Grover, P. L., and Sims, P. Conjugations with glutathione. Distribution of glutathione S-aralkyltransferase in vertebrate species. *Biochem. J.* 90: 603-606 (1964).
74. Husby, P., Srai, S. K. S., Ketterer, B., and Romslo, I. Effect of ligandin on the efflux of co-deuteroporphyrin from isolated rat liver mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 100: 651-659 (1981).
75. Beale, D., Ketterer, B., Carne, T., Meyer, D., and Taylor, J. B. Evidence that the Ya and Y. subunits of glutathione transferase B (ligandin) are the products of separate genes. *Eur. J. Biochem.* 126: 459-463 (1982).
76. Beale, D., Ketterer, B., Carne, T., Meyer, D., and Taylor, J. B. Evidence that the Ya and Y. subunits of glutathione transferase B (ligandin) are the products of separate genes. *Eur. J. Biochem.* 126: 459-463 (1982).
77. Habig W. H., ve ark. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation, *J.Biol.Chem.*, 249(20), 7130-7139, 1974.
78. Hayes J.D. ve Pulford D.J., The Glutathione S-transferase supergene family: Regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance, *CRC Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 30(6), 445-600, 1995.

79. Orhan, H., Şahin, G., Glutasyon S- Transferazların Klinik ve Toksikolojik Önemi, TKlin Tıp Bilimleri, 15, 1995.
80. Armstrong, R., Structure, Catalytic Mechanism, and Evolution of the Glutathione Transferases, Chem. Res. Toxicol., 10, 2-18, 1990.
81. O'dwyer, P., ve ark. Phase of Study of Thiotea in Combination WITH the Glutathione Transferase Inhibitor Ethacrynic Acid Cancer Research 51, 6059-6065 November 15, 1991.
82. Kauvar, L., ve ark. Glutathione Based Approaches to İmproving Cancer Treatment Chemico-Biological Interactions 111-112 225-238 1998.
83. Delaney,.C., ve ark. Supplementation with L-carnitine does not reduce the efficacy of epirubicin treatment in breast cancer cells. Canada K1H 8L6 Received 10 October 2006
84. Erbaş, H., Protective role of carnitine in breast cancer via decreasing arginase activity and increasing nitric oxide Received 23 March 2007; revised 9 May 2007;
85. Shea, T., Glutathione Transferase Activity and Isoenzyme Composition in Primary Human Breast Cancers1 Cancer Reeach 50, 6848-6853, November 1, 1990

ÖZGEÇMİŞ

Dilek KAAN 25.04.1985 tarihinde Kayseri’de doğdu. İlköğrenimini Şehit Doktor Ulucan Dayan İlkokulunda, orta öğrenimini Kayseri Melikgazi Lisesi’nde tamamladı. 2003 yılında Cumhuriyet Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü’nü kazandı. 2007 yılında bu programdan mezun oldu. 2007 yılında Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Ana Bilim Dalında yüksek lisansa başladı. Halen Erciyes Üniversitesin de yüksek lisansa devam etmektedir.

Adres : Caferbey Mh. Necipfazıl Cd.

Yörük Apt.No:140/48

Melikgazi / KAYSERİ

e-posta : dlkceylan@qmail.com

