

T.C.

CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

738363

**BİR TÜRK POPULASYONUNDA GSTM1 POLİMORFİZMİ VE  
AKCİĞER KANSERİ İLİŞKİSİ**

DOKTORA TEZİ

**Hatice PINARBAŞI**

Danışman Öğretim Üyesi

Prof. Dr. Öge ÇETİNKAYA

SİVAS 2002



Bu tez Cumhuriyet Üniversitesi Senatosunun 5. 1. 1984 tarih ve 84/1 no lu kararı ile kabul edilen Tez Yazma Yönergesine göre hazırlanmıştır.



## TEŞEKKÜR

Bu tezin hazırlanmasında değerli katkılarını esirgemeyen danıőmanım Sayın Prof. Dr. Öge ÇETİNKAYA'ya içten teşekkürü bir borç bilirim. Ayrıca çalışmanın istatistik bölümünde yardımcı olan Sayın Yard. Doç. Dr. Hafize Sezer'e de teşekkür ederim.

| <b>İÇİNDEKİLER</b>   | <b>Sayfa No</b> |
|--|-----------------|
| <b>1. GİRİŞ VE AMAÇ</b>  | 1               |
| <b>2. GENEL BİLGİLER</b>   | 3               |
| 2.1. Ksenobiyotiklerin Metabolizması                             | 3               |
| 2.2. Glutasyon -S-Transferazlar                                  | 4               |
| 2.2.1. Adlandırma  | 5               |
| 2.2.2. Glutasyon-S-Transferazların Biyolojik Rolü                | 7               |
| 2.2.3. GST ler tarafından katalizlenen konjugasyon reaksiyonları | 8               |
| 2.2.4. GST lerin doku dağılımı                                   | 9               |
| 2.2.5. GST lerin Substratları                                    | 10              |
| 2.2.6. Glutasyon Transferazların İnhibisyonu                     | 11              |
| 2.2.7. GST lerin Kromozomal Yerleşimi                            | 13              |
| 2.2.8. GST leri Kodlayan DNA Dizileri                            | 13              |
| 2.2.9. GST lerin Yapısı  | 14              |
| 2.2.10. GST Aktivite Ölçümleri                                   | 15              |
| 2.2.11. GSTM1 Polimorfizmi                                       | 15              |
| 2.2.11.1. GSTM1 Polimorfizminin Fonksiyonel Önemi                | 16              |
| 2.2.11.2. GSTM1 Polimorfizmi ve Kansere Yatkınlık                | 17              |
| 2.3. Akciğer Kanseri   | 18              |
| 2.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu                                 | 22              |
| <b>3. GEREÇ VE YÖNTEM</b>  | 24              |
| 3.1. Gereçler ve Dispozibl Malzemeler                            | 24              |
| 3.2. Kimyasallar   | 25              |
| 3.3. Genel Çözeltiler ve Tamponlar                               | 25              |

|   |    |
|---|----|
| 3. 4. Hastalar ve Kontrol Grubu               | 26 |
| 3. 4. 1. Hastalar                             | 26 |
| 3. 4. 2. Kontroller                           | 26 |
| 3. 5. Kan Örneklerinin Toplanması             | 26 |
| 3. 6. Genomik DNA İzolasyonu                  | 27 |
| 3. 7. DNA Kalitesi ve Miktarının Belirlenmesi | 27 |
| 3. 8. Genotipleme                             | 28 |
| 3. 9. Agaroz Jel Elektroforezi                | 28 |
| 3. 10. İstatistiksel Değerlendirme            | 29 |
| <b>4. BULGULAR</b>                            | 30 |
| <b>5. TARTIŞMA VE SONUÇ</b>                   | 39 |
| <b>KAYNAKLAR</b>                              | 50 |
| <b>ÖZET</b>                                   |    |
| <b>SUMMARY</b>                                |    |
| <b>ÖZGEÇMİŞ</b>                               |    |

## **TABLULAR DİZİNİ**

**Sayfa No**

|  |    |
|--|----|
| <b>Tablo 1:</b> İnsan GST lerinin adlandırılması<br>(Mannervik ve arkadaşları,1992) den alınmıştır.                              | 6  |
| <b>Tablo 2:</b> GST izoenzimlerinin doku dağılımı  | 12 |
| <b>Tablo 3:</b> Farklı etnik gruplarda GSTM1 gen<br>delesyon sıklığı   | 16 |
| <b>Tablo 4:</b> Sigara dumanındaki katran ve gaz<br>fazlarındaki belli başlı bileşimler  | 22 |
| <b>Tablo 5:</b> Akciğer kanseri ve hastalarının<br>yaş ve cinsiyet özellikleri ve sigara hikayesi                                | 31 |
| <b>Tablo 6:</b> Akciğer kanseri hastaları ve kontrollerin<br>sigara alışkanlığı bakımından karşılaştırılması                     | 32 |
| <b>Tablo 7:</b> Akciğer kanseri hastaları ve kontrollerde<br>ailede kanser hikayesi sıklığı                                      | 32 |
| <b>Tablo 8:</b> Kontroller ve akciğer kanseri hastaları<br>arasında GSTM1 polimorfizminin dağılımı                               | 35 |
| <b>Tablo 9:</b> Akciğer kanseri hastalarında kanserin<br>histopatolojik tipi ile GSTM1 genotipi arasındaki ilişki                | 37 |
| <b>Tablo 10:</b> Akciğer kanseri hastalarında sigara alışkanlığı<br>ile GSTM1 genotipi arasındaki ilişki                         | 38 |
| <b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b>   |    |
| <b>Şekil 1:</b> GSTM sınıfı proteinleri kodlayan genlerin düzenlenişi  | 13 |
| <b>Şekil 2:</b> GSTM1 (215 bç) ve GPDH (140 bç) nın birlikte<br>amplifikasyonu sonucu oluşan PZR ürünlerinin agaroz jel görünümü | 34 |

|  |    |
|--|----|
| <b>Şekil 3:</b> Yirmiyedi akciğer kanseri hastaya ait genotipleme sonucu       | 35 |
| <b>Şekil 4:</b> Çok basamaklı akciğer kanserine kişisel duyarlılık             | 40 |
| <b>Şekil 5:</b> B[ a] pren in sitokrom P450 sistemi tarafından biyoaktivasyonu | 41 |



## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Akciğer kanseri XX. yüzyılın başlarında nadir görülmesine karşın günümüzde önemli sağlık problemi olarak karşımıza çıkmaktadır. Tüm dünyada erkeklerde en sık görülen kanser tipidir. Tüm malign tümörlerin % 16 sından, tüm kanser ölümlerinin % 18 inden ve tüm ölümlerin % 6 sından sorumludur (1). Türkiye de insidans ve ölümler arasındaki yeri açısından gerçekçi bir rakam vermek olası değilse de günümüzde kalp-damar hastalıklarından sonra ikinci sıradadır (2). Sanayileşmenin artması, düşük sosyo-ekonomik düzey ve sigara içimi akciğer kanseri insidansının yükselmesine neden olmuştur. Bunların içinde özellikle sigara içiminin insanlarda akciğer kanserinin en önemli nedenlerinden olduğu bilinmektedir. Bununla birlikte sigara içenlerin ortalama % 15-20 sinde akciğer kanseri oluşumu sözkonusudur. Bu ise kişilerde genetik olarak bu kanser türüne bir yatkınlık olabileceğini düşündürmektedir. Özellikle prokarsinojenlerin aktivasyonu ve detoksifikasyonundaki genetik farklılıkların kişinin akciğer kanserine karşı yatkınlığının belirleyicisi olabileceği bildirilmiştir (3).

Glutasyon-S-Transferazlar (GST) karsinojen ve mutajenleri de içeren reaktif ve potansiyel olarak toksik kimyasalların detoksifikasyonunda aktivite gösteren enzim grubudur. GST detoksifikasyon görevini ilgili bileşiklerin elektrofilik bölgelerini glutasyonun (GSH) tiyol grubu (SH) ile nötralize ederek yapar (4). Oluşan suda çözünür ürün merkaptürik asittir ve idrar yoluyla vücut dışına atılır (5). GST lerin farklı formları çeşitli kaynaklardan saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir. Şimdiye kadar memelilerde Alpha, Mu, Pi, Teta olmak üzere dört sınıf GST tanımlanmıştır (6, 7). GSTM1 sigara dumanında da bulunan poliaromatik hidrokarbonlar ve benzopren gibi karsinojenlerin oksidatif ürünlerini de içeren



çok geniş yelpazedeki epoksidlerin detoksifikasyonundan sorumlu, insan popülasyonlarında polimorfik olarak kalıtıldığı bilinen bir GST izoenzimidir (8, 9). GSTM1 geni 1. kromozom üzerindedir ve 3 allel içerir (GSTM1a, GSTM1b ve GSTM1 null). Null allel gendeki homozigot delesyon nedeniyle enzimin inaktif formunun ekspresyonuna neden olur (10). Kafkas popülasyonu yaklaşık olarak %45-55 oranında null genotipi içermektedir ve bu oran etnik farklılıklar göstermektedir (11).

GSTM1 polimorfizminin karsinogenezde rol oynadığı ve null genotipin özellikle solunum yolları ile ilgili kanserlerin oluşumunda bir risk faktör olabileceğini bildiren, farklı popülasyonlarda yapılmış moleküler epidemiyoloji çalışmalarının sayısı artmakla birlikte bir ilişkinin olmadığını savunan bazı çalışmalar da bulunmaktadır (12, 13, 14). Ayrıca GSTM1 null genotipin mesane ve kolon kanseri oluşumu için de bir risk faktör olabileceği bildirilmiştir (15, 16). Türk popülasyonunda GST enzimlerinin polimorfizmi genotip düzeyinde bilinmemektedir. Bu çalışma Türk popülasyonunda GSTM1 null genotip ile akciğer kanseri oluşumu arasında bir ilişki olup olmadığının belirlenmesi amacıyla planlanmıştır. Ayrıca 167 kontrol de çalışmaya alınarak hasta ve kontroller GSTM1 null genotip yönünden PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) ye dayalı bir yöntemle karşılaştırılmıştır. Yüzaltmış yedi kontrolden elde edilen sonuçların bizim popülasyonumuzda GSTM1 null genotipi içerme oranının belirlenmesi çalışmalarına katkıda bulunacağı düşüncesindeyiz.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Ksenobiyotiklerin Metabolizması

Ksenobiyotiklerin metabolizması, bileşiklerin daha polar ve suda çözünebilen ve safra ve böbreklerden kolay atılabilen ürünler haline dönüştürülmesini sağlayan biyolojik işlemlerdir. Genellikle bu işlemler sonucu bileşiğin farmakolojik veya toksikolojik olarak aktivitesini kısmen veya tamamen kaybettiği tahmin edilir. Fakat bazı durumlarda oluşan ürün molekülün kendisinden daha aktif olabilir veya daha toksik etki gösterebilir ki bunlara reaktif ara ürünler denir (17). Ksenobiyotik metabolizması iki fazlı işlemdir:

Faz I reaksiyonları karaciğerde, özellikle karaciğer hücrelerinin endoplazmik retikulumu içinde bulunan enzim sistemleri tarafından yürütülür. Bununla birlikte belli bir miktar enzimatik aktivite barsaklar, böbrek, akciğer, adrenaller, beyin ve deride de bulunabilir. Reaksiyonların çoğu Sitokrom P450 (Sit P<sub>450</sub>) sistemini içeren mikrozomal membran bağlı karışık fonksiyonlu oksidazlar tarafından katalizlenir (18). Oksidatif reaksiyonlar; aromatik halkaların oksidasyonu, alkil zincirlerinin oksidasyonu, oksidatif dealkilasyon, N- oksidasyonu, sülfoksidasyon, epoksidasyon ve S ve O in yer değişimi reaksiyonlarını içermektedir (19). Aromatik halkanın oksidasyonu genellikle hidroksilasyon olarak adlandırılır ve bu metabolik yol çok sayıda ksenobiyotiğin metabolizmasında rol alır. Sonuçta fenoller oluşur. Alkil zincirlerinin oksidasyonu sonucunda ise alkoller ve bazende karboksilik asitler oluşur. Ayrıca epoksidasyon da aromatik bileşikler ile reaktif ara ürünlerin oluşumunda oldukça önemlidir. İndirgenme reaksiyonları daha çok nitrobileşiklerin ve azobileşiklerin aminlere ve ketonların da ikincil aminlere dönüşümlerini içerir. Ester ve aminlerin hidrolizi sonucu fenoller, alkoller ve

karboksilik asitler oluşur. Hidrolizden sorumlu enzimler çok geniş dağılımlıdır. Özellikle epoksit hidrolazlar reaktif elektrofilik epoksit araürünlerin oluşturacağı hasara karşı koruma görevi üstlenmektedir. Bu kararsız araürünlerin oluşumu sadece direkt olarak organ toksitesi değil, mutagenез ve karsinogenezde de önemli rol oynamaktadır(20).

Faz II reaksiyonları konjugasyon reaksiyonları olarak da adlandırılır. Konjugasyon reaksiyonları detoksifikasyon olarak kabul edilirler. Bunlar, ksenobiotiklerin endojen bir moleküle kovalent olarak bağlanması sonucu bir konjugatın oluştuğu reaksiyonlardır (21). Konjugasyon bir ilaç veya onun OH, COOH, NH, SH grupları içeren metabolitinin vücutta glukronik asit, glutatyon, asetil grupları, metil grupları, tiyol grupları, glisin, taurin, ve glukozamin gibi ara metabolizma ürünleri ile birleşerek polar ve suda çözünebilen ürünler oluşması olayıdır. Oluşan konjugatlar, böbrek ve safra yoluyla atılırlar (22). Safra ile atılanlar genellikle yüksek molekül ağırlıklı ve güçlü polar anyonlar (örn: glukronid konjugatları), katyonlar (örn: kuaterner amonyum bileşikleri) veya nötral bileşikler (örn: kardiyak glikozidler) olabilir(23).

## 2. 2. Glutatyon -S-Transferazlar

Glutatyon-S-Transferazlar (EC 2.5.1.18) insan hücrelerinin çoğunda yüksek konsantrasyonda bulunan enzimlerdir. Bu enzimler oldukça geniş yelpazede elektrofilik kimyasallara karşı koruma görevi üstlenir (8) ve hücrel detoksifikasyon sisteminin en önemli bileşeni olarak kabul edilirler. GST lerin çeşitli formları vardır ve çoğu çok geniş, birbiri ile çakışan substrat özgüllüğüne sahiptir. Enzimlerin çoğu hücrenin sitoplazmik fraksiyonunda bulunur. Bu

proteinler sitoplazma dışında hücrenin diğer organellerinde de bulunabildikleri halde sitozolik veya çözünebilen GST ler olarak adlandırılır (24).

#### 2. 2. 1. Adlandırma

GST ler primer yapılarına göre farklı sınıflar içinde gruplandırılır. Şimdiye kadar memelilerde Alfa, Mu, Pi ve Teta olmak üzere dört sınıf GST tanımlanmıştır (6, 7). Sitozolik GST ler dimerik proteinlerdir ve altbirim içeriğine göre isimlendirilir (Tablo 1). Herbir altbirim sınıfı belirten bir harf ve Arap numaralandırma, sınıf içindeki farklı altbirimleri birbirinden ayırır. Örneğin GSTA1-1 homodimerik, altbirim 1 in iki kopyasını içeren alfa sınıfı enzimi gösterir. GSTA1-2 ise heterodimerik, 1 ve 2 altbirimlerini içeren alfa sınıfı enzimi gösterir. GSTM1-1 a ve b harfleriyle ayrılan iki allelik varyanttan oluşur. GSTM1a-1a, M1a-1b ve M1b-1b olmak üzere üç alloenzim elektroforetik ve kromatografik olarak birbirinden ayrılabilir (25).

Tablo 1: İnsan GST lerinin adlandırılması (Mannervik ve arkadaşları,1992 den alınmıştır).

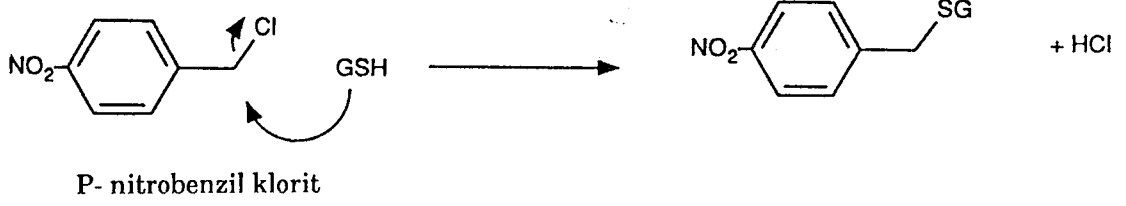
| ENZİM              |       |   | GEN   |          |       |
|--------------------|-------|---|-------|----------|-------|
| Şimdiki adlandırma | Sınıf | Önceki adlandırma   | Lokus | Kromozom | Bant  |
| GSTA1-1            | Alfa  | $\epsilon$ , B <sub>1</sub> B <sub>1</sub> , GST2-tip1,<br>Ha(subunit1), $\alpha_x\alpha_x$ | GSTA1 | 6        | 6p12  |
| GSTA2-2            | Alfa  | $\gamma$ , B <sub>2</sub> B <sub>2</sub> , GST2-<br>tip2, Ha(subunit2), $\alpha_y\alpha_y$  | GSTA2 | 6        | 6p12  |
| GSTM1a-1a          | Mu    | $\mu$ , GST1-tip2,<br>H <sub>b</sub> (subunit4)   | GSTM1 | 1        | 1p13  |
| GSTM1b-1b          | Mu    | $\psi$ , GST1-tip1  | GSTM1 | 1        | 1p13  |
| GSTM2-2            | Mu    | Kas, GST4   | GSTM2 | 1        | 1p13  |
| GSTM3-3            | Mu    | Beyin, GST5   | GSTM3 | 1        | 1p13  |
| GSTM4-4            | Mu    |   | GSTM4 | 1        | 1p13  |
| GSTM5-5            | Mu    |   | GSTM5 | 1        | 1p13  |
| GSTP1-1            | Pi    | $\pi$ , GST3  | GSTP1 | 11       | 11q13 |
| GSTT1-1            | Teta  | $\theta$  | GSTT1 |          |       |
| GSTT2-2            | Teta  |   | GSTT2 |          |       |
| Mikrozomal         |       |   | GST12 |          |       |

### 2. 2. 2. Glutasyon-S-Transferazların Biyolojik Rolü

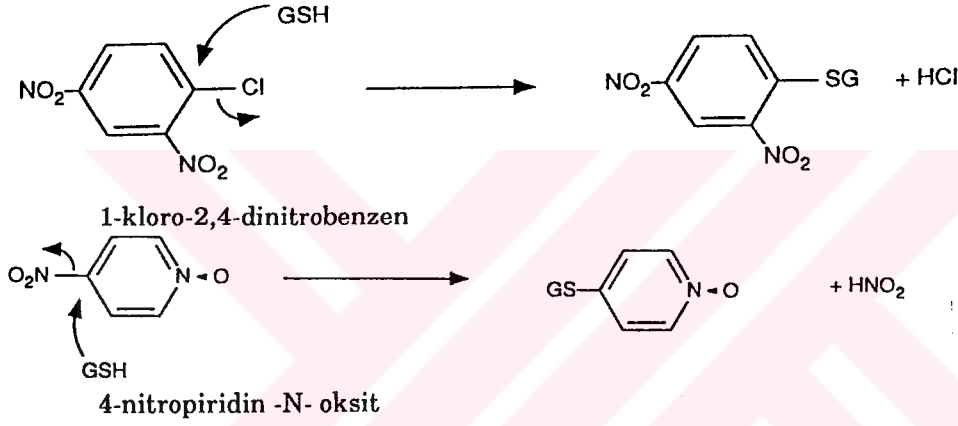
GST ler elektrofilik kimyasallara karşı hücrel savunmada önemli rol oynayan enzimlerdir. Bu bileşikler protein ve nükleik asitlerle reaksiyona girerek toksik ve genotoksik etki oluşturabilen çok geniş yelpazedeki molekülleri içerir. GST lerin substratları polisiklik aromatik hidrokarbon epoksidleri gibi karsinojenlerdir. GST lerin katalizlediği reaksiyon ile toksik ajanlar glutasyon ile konjuge edilerek inaktive edilirler. Doğadaki maddelerin çoğu oksidatif işlemler sonucu oluşur ve glutasyon ile ilişkili enzimlerin oksijen metabolizması sonucu oluşan toksik ürünlere karşı koruma amacıyla evrimleştiği öne sürülmektedir (26). Endüstriyel kimyasallar ve ilaçların bazıları glutasyon ile direkt olarak konjuge olabildiği halde birçok durumda elektrofilik merkezler sit P450 sistemi veya diğer oksidazlar tarafından katalizlenen enzimatik reaksiyonlar sonucu oluşurlar. Örneğin benzo[a]pren Sit P4501A1 tarafından karsinojenik ve mutajenik epoksidlere dönüştürülür (27). Parasetamol ise diğer bir enzimatik yolla oldukça güçlü elektrofilik molekül, N-Asetil benzokinon a oksidatif olarak dönüştürülür. Glutasyon içeren detoksifikasyon reaksiyonları, glutasyonun nükleofilik özelliklerine bağlıdır ve kimyasal işlemler indirgenme ve konjugasyon olmak üzere iki bölümde incelenebilir (28). İndirgenmede glutasyonun sülfürü substrat molekülü üzerindeki elektrofilik bölgeye elektronlarını verir ve kovalent konjugat oluşur. Oksidatif işlemlerle birlikte (faz I reaksiyonları) bu konjugasyon reaksiyonları (fazII) suda zayıf çözünen moleküllerin suda çözünebilen ve böylelikle vücuttan atılabilen ürünlere dönüştürülmesini sağlar.

## 2. 2. 3. GST ler tarafından katalizlenen konjugasyon reaksiyonları

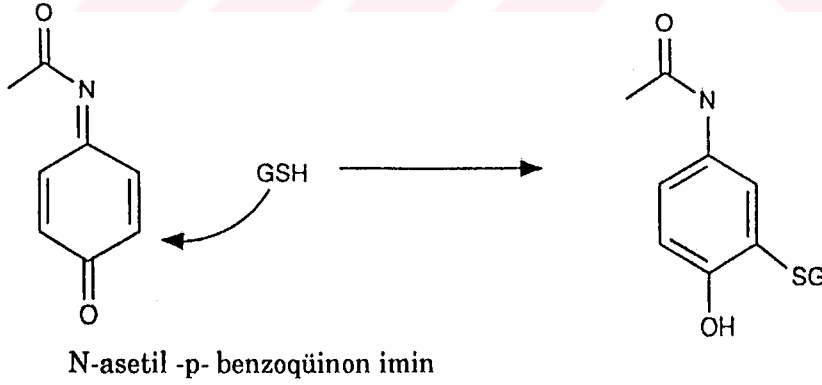
### 1. Doymuş karbondan nükleofilik yerdeğiştirme



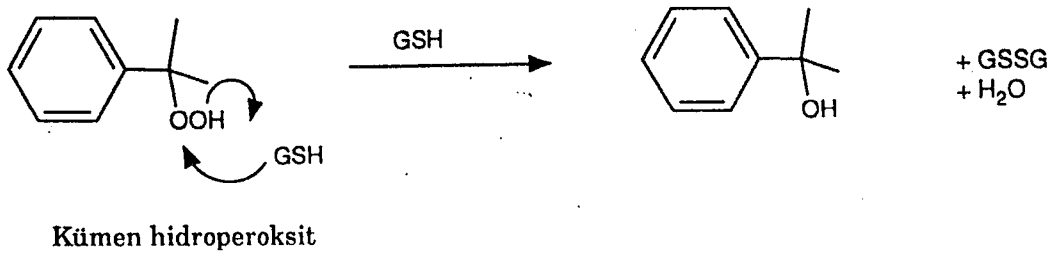
### 2. Aromatik karbondan nükleofilik yerdeğiştirme



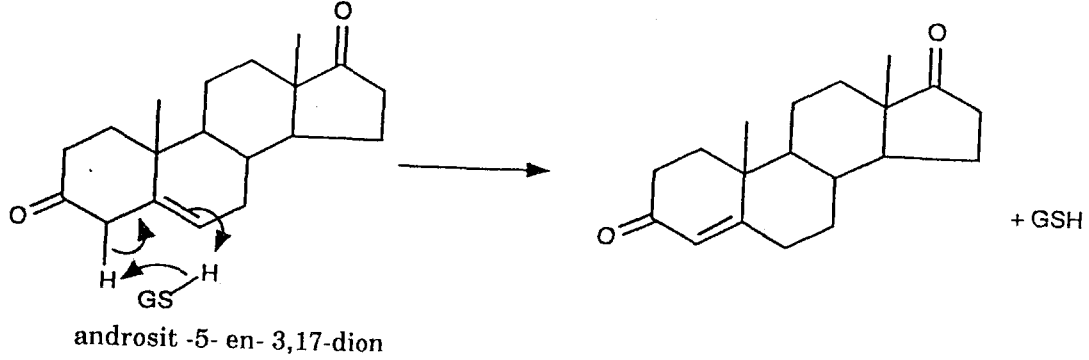
### 3. Çift bağa mişel katılımı



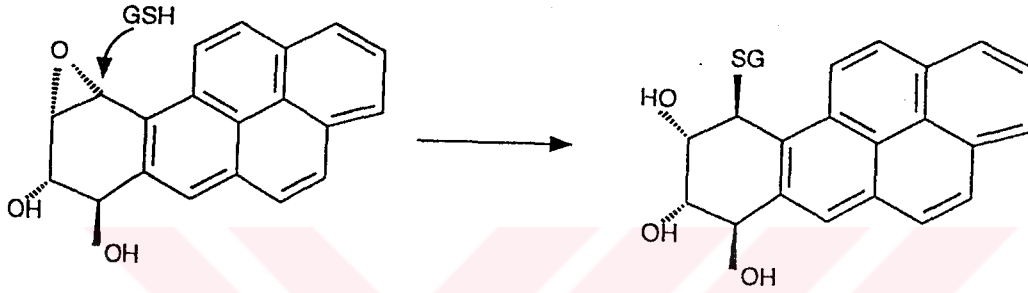
### 4. Peroksidaz aktivitesi



### 5. İzomeraz aktivitesi



### 6. Gergin oksiran halka açılımı



### 2. 2. 4. GST lerin doku dağılımı

Fazla sayıda izoenzim içermesi ve bu izoenzimlerin benzer özelliklere sahip olmaları GST lerin doku dağılımının anlaşılmasını zorlaştırmaktadır. Tablo 2 de insan dokularındaki GST izoenzimlerinin dağılımı verilmiştir. Bir dokudaki farklı hücre tiplerinde bile farklı izoenzim paternleri görülebilir. Örneğin, Alfa, Mu ve Pi sınıflarını temsil eden yedi GST altbiriminin rat böbreğinin farklı bölgelerinde farklı dağılım gösterdiği bildirilmiştir (29). İnsanlarda da renal GST lerin farklı dağılımı gösterilmiştir (30). GST lerin çoklu formlarda bulunmaları ve yapısal benzerlikleri nedeniyle biyolojik örneklerin incelenmesinde izoelektrik fokalama (31) ve kromatofokalama (32) en güçlü yöntemlerdir. Altbirim ayırımında ise heterodimerik olmaları gözönünde bulundurulmadan denature koşullarda ters faz yüksek basınçlı sıvı kromatografisi yöntemi kullanılabilir (33). Homojenize



edilmiş doku örneklerinden S-heksil glutatyon agaroz veya glutatyon agaroz ile affinite kromatografisi yoluyla saflaştırılabilir (34).

GST lerin kantitatif analizlerinde katalitik aktiviteyi temel alan yöntemler özellikle fraksiyonlarına ayrılmamış örneklerde kesin sonuç vermez. Çünkü farklı izoenzimlerin birbirlerinin substratlarına olan özgülükleri sözkonusudur ve herbir izoenzim için seçici substratlar bilinmemektedir. Diğer bir faktör ise heterodimerlerin bulunması ve ayrıca da şimdiye kadar karakterize edilenlerden daha fazla enzimin bulunabilme olasılığıdır.

Spesifik antikorları bulunan GST ler için kantitatif immunoassay temeline dayalı daha doğru yaklaşım getiren metodlar uygulanabilir. Poliklonal antikorlar ile hem radyoimmunoassay (35, 36) hem de enzim bağı immunosorbent assay (ELISA) (37) de oldukça yüksek özgülük göstermiştir. Örneğin, GSTM1-1 in immunoaffinite ile saflaştırılmış antikorlarının GSTM2-2, GSTM3-3 ve GSTM4-4 gibi Mu sınıfı enzimlerin hiçbiriyle çapraz tepkime vermediği gözlenmiştir (37).

#### 2. 2. 5. GST lerin Substratları

Glutatyon, sülfür atomu yüksek nükleofilik özelliğinden dolayı güçlü elektrofil fonksiyonel gruba sahip hemen hemen her molekül ile tepkimeye girebilir. Glutatyonun tiyol grubunun iyonize formu en reaktif molekülden çok daha fazla reaktiftir ve glutatyon transferazın fonksiyonu enzimin aktif merkezinde glutatyon-tiyolat oluşumunu sağlamaktır. Glutatyon transferazların aktivitesini tayin etmek amacıyla spektrofotometrik metotlarda çok sayıda substrat kullanılabilir. GSTM1-1 in epoksidlerle yüksek aktivite gösterdiği belirlenmiştir. (38). Bu enzimin aktivitesinin bulunmadığı bireyler bu grup mutajenik ve karsinojenik moleküllerin toksik etkilerine karşı daha az korumalıdır. Bununla

birlikte bazı karsinojenik aren oksidler diğler GST ler tarafından daha etkili bir biçimde detoksifiye edilmektedirler (39). Propenal (acrolein) ve DNA nın irradyasyonu ile oluşabilen baz propenaller oksidatif işlemler ve radikal reaksiyonlar sonucu oluşurlar ve GSTP1-1 tarafından daha etkin bir biçimde detoksifiye edilirler (40). Diğler önemli grup ise lipit peroksidasyonu sonucu oluşan toksik 4-hidroksialkenallerdir. Rat enzimlerinin çoğu özellikle GST8-8 4-hidroksialkenallerle yüksek aktivite gösterir (41) ve insan dokularında da benzer aktiviteler gösterilmiştir (42). Genelde oksidatif metabolizma ürünleri alkenler, epoksidler, organik hidroperoksidler, kinonlar GST ler için doğal substratlardır (8). Kanser kemoterapisinde ilaç direncinin önemi nedeniyle insan GST leri için potansiyel substrat olan sitostatik ajanlar ile ilgili çalışmalar yapılmış (43), özellikle alkileyici ilaçların glutasyon ile *invivo* konjugasyon oluşturduğu bildirilmiştir. GSTA1-1 in klorambusil ile düşük fakat gözlenebilir bir aktivite gösterdiği bildirilmiştir (44, 45). GSTM3-3 ün ise 1,3-bis(2-kloroetil)-1-nitrozoüre ile aktivite gösterdiği gösterilmiştir (46). Direnç mekanizması olarak tümör hücrelerinin GST lerin yeni formlarını eksprese edebilmeleri ve böylece sitostatik ilaçları inaktive etme kapasitelerini artırmaları mümkündür fakat henüz bu formlar belirlenememiştir.

#### 2. 2. 6. Glutasyon Transferazların İnhibisyonu

GST lerin inhibitörleri farklı izoenzimlerin belirlenmesi, enzimlerin fonksiyonel özelliklerinin belirlenmesi ve hücre veya organizmalardan elde edilen örneklerde GST substratları olan moleküllerin metabolizmasını incelemek amacıyla kullanılabilir. Tıpta ise hastalıkların tedavisinde kullanılan sitostatik ilaçların inaktivasyonunu etkileyecek, kanser hücrelerindeki GST lerin inhibisyonu yoluyla

ilaç direncinin ortadan kaldırılması amacıyla önemlidir. Çok sayıda bileşik GST lerin inhibitörü olarak denenmiştir Bromosulfoftalein, cibacron blue, tributiltin asetat, S-heksil glutatyon, S-2,4 dinitrofenil glutatyon, S-etakrinik asit önemli inhibitörler arasında sayılabilir (47). Glutatyonun inhibitörü aktif bölgeye yönlendirdiği düşünülmektedir ve glutatyon molekülü üzerindeki değişiklikler bağlanmanın kuvvetini ve izoenzimlerin seçiciliğini değiştirmektedir (48).

Tablo 2: GST izoenzimlerinin doku dağılımı

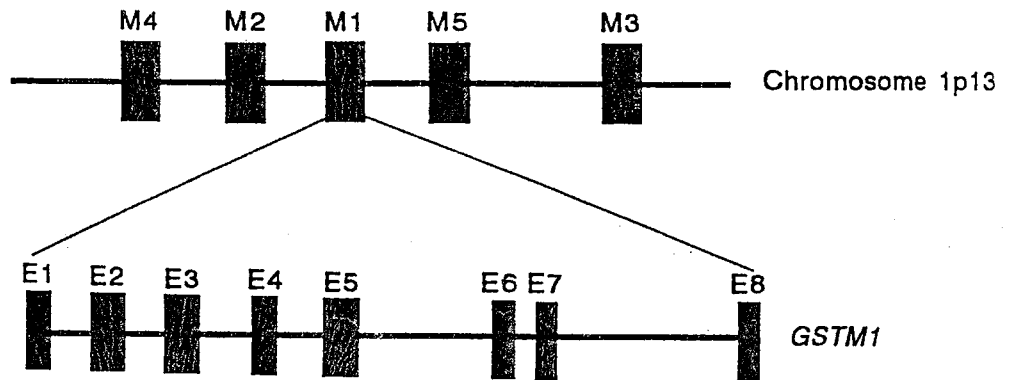
| Doku      | Alfa |      | Mu   |      |      |      |      | Pi   | Teta |      | Microso<br>mal |
|-----------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|----------------|
|           | A1-1 | A2-2 | M1-1 | M2-2 | M3-3 | M4-4 | M5-5 | P1-1 | T1-1 | T2-2 |                |
| Yağ       |      |      |      |      |      |      |      | +    |      |      |                |
| Beyin     |      |      |      |      | +    | +    | +    | +    |      |      |                |
| Meme      |      |      | +    |      |      |      |      | +    |      |      |                |
| Kolon     |      |      |      |      |      |      |      | +    |      |      |                |
| Eritrosit |      |      |      |      |      |      |      | +    |      |      |                |
| İ.barsak  | +    |      |      |      |      |      |      | +    |      |      |                |
| Böbrek    | +    | +    | +    |      | +    |      |      | +    |      |      |                |
| Lökosit   |      |      |      |      |      |      |      | +    |      |      |                |
| K.ciğer   | +    | +    | +    |      | +    | +    |      |      | +    | +    | +              |
| A.ciğer   | +    | +    |      |      | +    |      | +    | +    |      |      |                |
| Kas       |      |      |      | +    |      | +    |      |      |      |      |                |
| Kalp      |      |      | +    | +    | +    | +    | +    | +    |      |      |                |
| Retina    |      |      |      |      |      |      |      | +    |      |      |                |
| Deri      |      |      |      |      |      |      |      | +    |      |      |                |
| Mide      |      |      |      |      |      |      |      | +    |      |      |                |
| Testis    |      |      |      |      | +    |      | +    |      |      |      |                |
| Uterus    |      |      |      |      |      |      |      | +    |      |      |                |

## 2. 2. 7. GST lerin Kromozomal Yerleşimi

GST genleri enzimler arasındaki evrimsel ilişkiyle uyumlu bir biçimde farklı kromozomlar üzerinde bulunmaktadır. Örneğin Mu sınıfı enzimlerin genleri 1. kromozom üzerindedir. Alfa GST genleri 6. kromozom üzerinde bulunur. Böylece GST lerin izoenzimleri gen duplikasyonları veya gen konversiyonu gibi genetik yeniden düzenlenmeler sonucu oluşmuştur (49). Bilinen gen yerleşimleri Tablo 1 de verilmiştir.

## 2. 2. 8. GST leri Kodlayan DNA Dizileri

cDNA nın moleküler klonlanması, GST formlarının mRNA dizilerinin ortaya çıkarılmasını sağlamıştır . Bazı intron dizileri yüksek oranda korunmuştur. Mu sınıfı genler kodlanmayan bölgelerde dahil olmak üzere çok yüksek benzerliğe sahiptir. Bu ise iki gen arasında daha sonraları non-resiprokal rekombinasyon gibi bir gen konversiyonu olduğuna dair delil teşkil etmektedir (Şekil 1), (49, 50).



Şekil 1: GSTM sınıfı proteinleri kodlayan genlerin düzenlenişi

## 2. 2. 9. GST lerin Yapısı

Alfa, Mu ve Pi sınıfını temsil eden enzimlerin bilinen 3 boyutlu yapıları ile uygun bir biçimde primer yapıları karşılaştırılmıştır. Bilinen protein dizilerinin çoğu DNA dizisinden çıkarılmıştır, bazılarında ise protein düzeyinde belirlenmiştir. GST izoenzimlerinin çoğu N-terminalinden modifiye olmuştur (51).

İnsan GSTP1-1 (52), GSTA1-1 (51) ve GSTM2-2 (53) ün yapıları X-Ray difraksiyon analizi ile belirlenmiştir. Sitozolik GST ler iki altbirimden oluşmaktadır. Herbir altbirim komşu altbirimdekenden 15-20Å<sup>o</sup> uzakta bir aktif bölgeye sahiptir. Aktif bölge, bir glutatyon bağlanma bölgesi (G bölgesi) ve bunun hemen yanında az-çok hidrofobik bir elektrofilik substrat bağlanma bölgesi (H bölgesi) içerir. Herbir altbirim G bölgesini oluşturan 80 amino asitlik bir N terminali ve H bölgesini oluşturan yaklaşık 150 amino asitlik bir C terminali olmak üzere iki domainden oluşur. Polipeptid zincirlerinin üçboyutlu yapı oluşturmak üzere katlanmaları GST lerin alfa, mu ve pi sınıflarında esas olarak aynıdır. Fakat aktif bölgede bazı farklar sözkonusudur (51, 52, 53). Mu sınıfı enzimler 36-42 amino asitler arasında "Mu-loop" denilen bir bölge içerir (54) ki bu bölgede aktif bölgeyi sanki bir kapak gibi kapatma görevi yapar. Mikrozomal GST lerin üç boyutlu yapısı ile ilgili daha az bilgi mevcuttur. Fakat elektron mikroskopi, hidrodinamik ve kimyasal cross-link çalışmaları enzimin bir trimer olduğunu göstermektedir (55).

Glutatyon molekülü için bağlanma bölgesi (G bölgesi) glutatyon transferazlarda esas olarak korunmuştur. Polar tripeptid ( $\gamma$ -glutamil-sisteinil glisin) iyonik yüklerle ve hidrojen bağlarıyla yapıdaki komplementer protein cebine bağlanır (8). Bütün GST yapılarında bu göze çarpar fakat bazı pozisyonlarda değişiklik

vardır. G bölgesindeki interaksiyonların Alfa, Mu ve Pi sınıfları için aynı olduğu bildirilmiştir (8).

#### 2. 2. 10. GST Aktivite Ölçümleri

GST aktivite ölçümlerinin çoğu katalitik olarak aktif enzimin ekspresyon düzeyini, enzimin katalitik mekanizmasını, inhibitörlerin fonksiyonel özelliklere etkisini göstermeyi amaçlar. Bu amaçlar için spektrofotometrik metodlar uygundur. En genel reaksiyon 1-kloro-2,4 dinitrobenzen (CDNB) deki klorürün GSH ile yer değiştirerek tiyoeter S-2,4 dinitrofenilglutatyonun oluşturduğu tepkimedir (56). GST lerin çoğu bu substratla yüksek aktivite gösterir. Fakat bazı enzim formları için CDNB ile aktivite ölçümü uygun değildir. Tepkimelerin önemli bir grubu glutatyon ile, aktive olmuş alkenlerin ve epoksitlerin konjugasyonudur. Bu gruptaki substratlar, radikal reaksiyonlar, lipid peroksidasyonu ve sitokrom P450 sistemi tarafından katalizlenen oksidasyon gibi normal hücre sel bileşiklerden kaynaklanan moleküllerdir. GST aktivitesi için alternatif metodlar kromatografi veya diğer ayırım tekniklerinden izole edilen karışımların GSH konjugatlarının tayinine dayanır. Ayrıca substratın kullanımı izlenebilir. GSH nın kullanımının izlenmesi daha genel bir metoddur. Substrat konsantrasyonundaki değişikliklerin ölçülmesi genelde ürün oluşumunun tayinine göre daha az doğru sonuç verir.

#### 2. 2. 11. GSTM1 Polimorfizmi

İlk defa 1985 de Seidegard ve arkadaşları transstilben oksit (TSO) kullanarak yaptıkları lenfosit GST aktivitesi tayininde genetik polimorfizm olduğunu göstermişlerdir (57, 58). TSO ya karşı hiç veya çok az aktivite gösteren bireylerin GSTM1 geninde bir bölgenin delesyonu yönünden homozigot oldukları daha

sonra bildirilmiştir (10, 59). Şimdilerde ise Kafkas popülasyonunun %45-55'inin GST delesiyonu yönünden homozigot oldukları bildirilmiştir. Tablo 3 de farklı etnik gruplarda GSTM1 gene delesiyonunun sıklığı verilmiştir. GSTM1 in üç allelik formu vardır; GSTM1a, GSTM1b ve GSTM1 0 olmak üzere. GSTM1 0 delesiyona uğramış veya null alleli göstermektedir. GSTM1a ve GSTM1b 173. pozisyondaki amino asit yönünden farklıdır ve şimdiye kadar denenen tüm substratlara karşı benzer aktiviteye sahiptir (60).

Tablo 3: Farklı etnik gruplarda GSTM1 gen delesiyon sıklığı

| Etnik grup        | GSTM1 null genotip (%) |
|-------------------|------------------------|
| Çinli             | 58                     |
| Kafkasyalı        | 35-62                  |
| Japon             | 48                     |
| Fransız           | 43                     |
| Afrikalı Amerikan | 28-35                  |
| Hintli            | 33                     |
| Nijeryalı         | 22                     |

#### 2. 2. 11. 1. GSTM1 Polimorfizminin Fonksiyonel Önemi

GSTM1, benzo[a]pren gibi bilinen bazı karsinojenlerin oksidatif ürünlerini içeren çeşitli epoksidlerin detoksifikasyonunda aktiftir (61). Benzopren sigara dumanında bulunan bir yan ürün olan poliaromatik hidrokarbon (PAH) dur. İnsan hücre veya vücut sıvıları ile yapılan *in vitro* çalışmaların hepsi olmasa da bazıları GSTM1 yönünden eksik bireylerin epoksit karsinojenlerin genotoksik etkilerine daha duyarlı olabileceği söylenmektedir. Örneğin GSTM1 0 / 0 genotipe

sahip sigara içen bireylerin idrarının GSTM1 in bir veya iki aktif allelini taşıyan sigara içen bireylere göre 3 kez daha mutajenik olduğu bildirilmiştir (62). Diğer çalışmalar GSTM1 pozitif sigara içenlerle karşılaştırıldığında GSTM1 negatif bireylerde lenfosit sister chromatid değişimi oranının arttığını bildirmiştir (63). Ayrıca lenfositlerde PAH-DNA adductları sigara içenlerin lenfositlerinde direkt olarak incelenmiş, GSTM1 alleli ve adduct düzeyi arasında bir ilişki bulunamamıştır (64). Bununla birlikte GSTM1 ce eksik örneklerde akciğer dokusunda PAH-DNA adductlarında belirgin bir artış gözlemlendi (65). Bu farklılıklar herbir GST izoformunun ekspresyon düzeyindeki farklılıklardan ve/veya GST substratı olan epoksitlerin oluşumu için gerekli oksidatif enzimlerin aktivitesindeki doku spesifik farklılıklardan kaynaklanmaktadır.

#### 2. 2. 11. 2. GSTM1 Polimorfizmi ve Kansere Yatkınlık

GSTM1 geninin bulunmayışının özellikle sigara içenleri akciğer kanseri açısından artan riske soktuğunu ileri süren araştırmalar vardır (66, 67, 68). Bununla birlikte bazı çalışmalar ise GSTM1 null genotipi ile akciğer kanseri arasında bir ilişki olmadığını ileri sürmektedir (69, 14). Onbir araştırmanın sonuçlarını değerlendiren bir metaanaliz çalışması GSTM1 null genotip ile akciğer kanseri arasında OR 1.6 (%95 Güven Aralığı (CI) 1.26-2.04) olan bir ilişki olduğunu göstermiştir (70). Bu çalışma sigara içimi ile ilişkilendirildiğinde OR hafifçe artarak 1.76 (%95 CI 1.43-2.17) ye yükseldiği gözlemlenmiştir (70). Bazı çalışmalar ise özellikle Japon popülasyonunda GSTM1 null genotipin diğer duyarlılık genotipleri ile özellikle CYP1A1 *MspI* değişken allel ile birlikte olduğu zaman akciğer kanseri için risk oluşturduğunu öne sürmektedir (71).



Mesane kanseri ile GSTM1 null genotip arasında ilişki olduğunu gösteren çalışmalar vardır (15). Kafkas popülasyonunda yapılmış 6 çalışmanın değerlendirildiği bir metaanaliz çalışmasının sonuçları OR 1.54 (%95 CI 1.28-1.85) olan bir ilişki ortaya koymuştur (70). Afrikalı Amerikalılarda ve Asyalılarda benzer ilişkiler gözlenmiştir (sırasıyla OR 1.4 %95 CI 0.48-4.10 ve 2.40 %95 CI 1.3-4.45) (73). Sigara içimi mesane kanseri ile ilişkilidir çünkü sigara içenlerde daha fazla görülür. Fakat sigara içmeyenlerde de GSTM1 null genotipin artan risk oluşturduğunu gösteren bazı çalışmalar vardır. Bazı araştırmalar ise GSTM1 null genotipe sahip sigara içenlerin idrarının pozitif olanlara oranla daha mutajenik olduğunu göstermiştir (62). Ayrıca sigara içen ve içmeyenlerde GSTM1 null genotipe sahip olanlarda yüksek oranda 3-ve 4-aminobifenil-hemoglobin adductları saptanmıştır (74).

Bazı çalışmalar GSTM1 null genotipin mide kanseri riskini artırdığını ortaya koyarken, bazılarında hiçbir ilişki olmadığı belirtilmektedir (75). Kolorektal kanserlerle ilgili olarak ilk birkaç çalışma %60-70 ilişki ortaya koyarken (76) daha sonraki yıllarda yapılan çalışmalarda böyle bir ilişki doğrulanmamıştır (75).

GSTM1 null genotip ile meme (77), beyin (78), deri (79), ovaryum (80), serviks (81) kanseri arasında bir ilişki belirlenememiştir. Karaciğer kanseri ile GSTM1 null genotip arasında bir ilişki saptanamadığı halde diyetle aflatoxin B1 e maruz kalanlarda GSTM1 null genotipe sahip olanlar pozitiflere oranla daha fazla risk altındadırlar (82).

### 2. 3. Akciğer Kanseri

Göğüs kafesinde mediastenın sağ ve solunda bulunan akciğerler koni şeklinde ve dış yüzeyleri toraks ile çevrili, iç yüzleri mediasten e dönüktür. İç yüzde bronş ve

damarların akciğere girdikleri yere hilus denir. Sağ akciğer iki fissur ile 3 loba, sol akciğer bir fissur ile 2 loba ayrılmıştır. Loblar segmentlere ayrılır ve her segment bronş ve damar yatağıyla birlikte ayrı bir ünedir. Segmentler tabanı periferde, tepesi hilusa doğru koni biçimindedir. Akciğerlerin esas fonksiyonu, atmosfer gazlarının solunum ünitelerine taşınması ve metabolik artıkların atılmasıdır.

Akciğerler bu olayı ventilasyon, perfüzyon, gaz değişimi ve solunum kontrolü olmak üzere dört ana yolla gerçekleştirir. Normal sağlıklı kişilerde ventilasyon ile alveollere yeterli miktarda hava sağlanır ve bu hava volümü perfüzyonu bulunan alveollere eşit dağılır. Aynı şekilde yeterli kan perfüzyonunda yeterli ventilasyonu bulunan alveollere eşit dağılır. Böylece arter kanında PO<sub>2</sub> 85-95 mmHg, PCO<sub>2</sub> ise 35-45 mmHg arasında tutulur (1).

Bronş epitelinden kaynaklanan malignansilere bronkojenik karsinoma yani akciğer kanseri denir. Akciğer kanserinin %95 i bronş epitelinden kaynaklanır. Geri kalan %5 i arasında bronşial karsinoid, mezotelyoma, mezenkimal malignansiler, lenfomalar ve hamartomlar yer alır (2). Dünya Sağlık Örgütü' nün 1998 yılındaki modifiye sınıflandırmasına göre alttıpleri şöyledir:

1. Skuamoz hücre karsinomu (Squamous Cell Carcinoma, SQC Ca)
2. Küçük hücreli karsinom (Small Cell Carcinoma, SC Ca)
3. Adenokarsinom (Adenocarcinoma, Adeno Ca)
4. Büyük hücreli karsinom (Large Cell Carcinoma, LC Ca)
5. Adenoskuamoz karsinom (Adenosquamous Carcinoma, AdenoSQ Ca)

Akciğer karsinomlarının %90-95 gibi büyük bir çoğunluğunu ilk dört tipi oluşturmaktadır. Bu dört tipin insidansı ülkeye ve sosyoekonomik duruma göre değişiklik göstermektedir. Birçok Avrupa ülkesinde dört tipin görülme sıklığı

SQC Ca için % 40, adeno Ca için %25, SC Ca için %25 ve LC Ca için %10 oranındadır. SQC Ca ve SC Ca çoğunlukla santral yerleşimli ve LC Ca ise genellikle periferik yerleşimlidir. Özellikle SC Ca karaciğer, adrenaller, beyin, kemikler ve hemen her organa metastaz yapma potansiyeline sahiptir (2).

Akciğer kanserinin relatif riski sigara içen erkeklerde iki kat artarken kadınlarda dört kat artmaktadır. Ayrıca pasif sigara dumanına maruz kalma ile de bu riskin devam ettiği gösterilmiştir. ABD de her yıl 500-5000 kişinin pasif sigara dumanına maruziyeti sonucu akciğer kanserine yakalandığı tespit edilmiştir. Bütün tipleri sigara içimi ile ilişkilidir fakat SQC ve SC Ca da %90, adeno Ca da %40 ilişki saptanmıştır (2). Akciğer kanseri gelişiminde karsinojenlere maruz kalmanın önemli bir predispoze faktör olduğu bilinmektedir. Bunlar arasında arsenik, asbest, klorometileter, radon, nikel, vinilklorür, polisiklik aromatik hidrokarbonlar vb sayılabilir. Akciğer kanseri en sık 50-70 yaşlarda ortaya çıkmaktadır (2). Kanser gelişimi çok aşamalı bir işlemdir. Moleküler ve hücre biyolojisindeki gelişmeler kanser gelişimindeki bilgilerimize her geçen gün yeni bilgiler eklemektedir. Sigara içimi akciğer kanserlerinde önemli bir etiyolojik faktör olsa da sigara içenlerin ortalama %15-20 sinde akciğer kanseri gelişmesi başka etkenlerin, özellikle bazı genetik faktörlerin rolü olduğunu düşündürmektedir (3). Akciğer kanserlerinde ras, myc ve neu onkogenleri ile p53 ve Rb tümör baskılayıcı gendeki mutasyonların rol oynadığına dair deliller bulunmaktadır (3). Sigara dumanındaki oksidanlar, hem serbest radikaller hem de radikal olmayan oksidanlar oluşur. Bunlar sigara dumanının DNA, proteinler ve lipidler üzerinde oluşturduğu biyolojik harabiyetten sorumludur. Sigara dumanı partikül faz (katran) ve gaz olmak üzere iki faza ayrılmaktadır (83). Her iki fazda

bulunan önemli bileşimler Tablo 4 de görülmektedir. Gaz fazı yüksek konsantrasyonda oksiradikaller ve nitrojen oksidleri, özellikle nitrik oksidi (NO) içermektedir. Bu fazdaki organik radikaller NO in yavaş oksidasyonu ile nitrojendioksit e(NO<sub>2</sub>) dönüşür. NO<sub>2</sub> organik bileşimlere karşı daha reaktiftir. Gaz fazdaki radikaller kısa ömürlüdür. Oysa katran fazda oldukça stabil radikaller yüksek konsantrasyonda bulunur. Katran radikalleri suda erime özelliğindedir, bu nedenle de akciğerlerin sıvı yapısında bu uzun ömürlü radikaller bulunmakta ve biyolojik tahrip oluşturabilmektedir. Bu radikal sistem yeterince uzun ömürlüdür; akciğerin içini kaplayan sıvı boyunca yayılabilir, hücrelere, hücre içi organellere ve DNA ya ulaşabilir. Katran fazı ayrıca oldukça fazla nikotin ve nitrozaminleri içerir. Bunlarda katran fazda bulunan diğer radikaller gibi DNA ya ulaşabilmektedir. Katran fazındaki radikaller aracılığı ile dioksijenin redüksiyonundan superoksit ve hidrojen peroksit oluşmakta, bunlarda DNA harabiyetine neden olmaktadır. Hem gaz fazındaki radikaller, hem de katran fazındaki radikaller DNA harabiyetine neden olabilmektedir. Bu iki faz sigaranın hem ana dumanında hem de yan dumanında bulunmaktadır (83). Bu maddeler akciğer kanserlerinin %85-90 ından sorumludur. Sigara dumanının karsinojenik etkisi karsinojenlerin DNA ya ulaşması, bozuk tekrarların ve mutasyonların oluşmasına neden olmasındandır. Teori olarak bireylerin kansere duyarlılığı solunan prokarsinojenleri aktive ve detoksifiye etme kapasiteleri arasındaki dengeden etkilenmektedir. Giderek artan bir şekilde tanımlanan toplumda yaygın olan genetik polimorfizmler bu işlemlerin herbirini etkileyebilir. Böylece bu kalıtsal faktörlere sahip bireylerin akciğer kanserine duyarlılığı sigara dumanına maruz kalma ile ikiye katlanmaktadır. Son 10 yılda akciğer kanserinin biyolojisi

ve moleküler özelliklerinin daha iyi anlaşılması hastalığın önlenmesi ve tedavisinde yeni stratejiler belirlenmesini sağlamıştır.

Tablo 4: Sigara dumanındaki katran ve gaz fazlarındaki belli başlı bileşimler

| Katran fazı   | mg/sigara | Gaz faz     | mg/sigara |
|---------------|-----------|-------------|-----------|
| Nikotin       | 1.6       | NO          | 0.3       |
| Polifenoller  | 0.6       | Etilen      | 0.2       |
| Aldehitler    | 0.5       | Isopren     | 0.4       |
| Nitrosaminler | 1.5       | Metanol     | 0.2       |
| PAH           | 0.004     | Asetaldehit | 0.9       |

#### 2. 4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) uygun oligonükleotidler kullanılarak spesifik DNA dizilerinin *in vitro* amplifikasyonu için kullanılan ve çok geniş kullanım alanı olan bir tekniktir. PZR için ilk protokol Saiki ve arkadaşları (84) tarafından bildirilmiştir. Bu protokolde *E.coli* DNA polimeraz I enziminin Klenow fragmenti dizisi bilinen DNA fragmentlerinin çoğaltılması için kullanılmıştır. 1988 de yine Saiki ve arkadaşları (85) termofilik bakteri *Thermus aquaticus* dan saflaştırılmış termostabil DNA polimerazın bu amaçla kullanılmasının uygun olduğunu bildirmişlerdir. Bu enzim 95 °C deki sıcaklık ile inaktive olmamaktadır. Daha sonraki yıllarda polimeraz Tth, long expand polimeraz ve high fidelity polimeraz olmak üzere sentez sırasında hata yapma olasılığı daha düşük polimerazlar kullanılmaya başlanmıştır. Genel prensip olarak PZR kalıp DNA üzerindeki dizisi bilinen bir bölgeye özgü seçilmiş bir çift oligonükleotid primer ile DNA

sentezidir. Başlangıç materyali çift zincirli DNA molekülüdür. Zincirler reaksiyon karışımının 95 °C ye kadar ısıtılmasıyla birbirinden ayrılır ve ardından soğutulularak primerlerin herbir zincir üzerindeki hedef diziye bağlanmaları sağlanır. Sıcaklık, Taq DNA polimerazın optimum aktivite gösterdiği sıcaklık olan 72 °C ye yüksetilir. Taq polimeraz herbir zinciri kalıp olarak kullanır ve kalıp DNA ya komplementer yeni DNA zincirini 5' → 3' yönünde sentezler. Bu işlemler herbir döngüde tekrarlanır ve genellikle 30-35 döngü sonunda istenilen DNA bölgesi çoğaltılmış olur. PZR son yıllarda her türlü kaynaktan izole edilen DNA ların dizi analizinde, genetik hastalıkların tanısında, kanser terapisinin izlenmesinde bakteriyel ve viral enfeksiyonların tayininde, cinsiyet tayini ve prenatal tanıda, moleküler evrim çalışmalarında, adli tıp örneklerinin genetik incelenmesinde bitki biyoteknolojisinde çok sık kullanılan ve kullanım alanları gittikçe artan ve yaygınlaşan bir tekniktir.

Bu çalışmada PZR tekniği, akciğer kanseri hastaları ve sağlıklı kontrollerin GSTM1 enzimini kodlayan gende delesyon içerip içermediklerini belirlemek amacıyla kullanılmıştır.

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3. 1. Gereçler ve Dispozibl Malzemeler

- Mikrosantrifüj tüpleri (steril): 1.5 ml ve 0.5 ml
- Steril pipetler: 5 ml ve 10 ml
- Steril test tüpleri: 10 ml ve 50 ml
- Steril sitratlı tüp: 5 ml Venoject
- Otomatik pipetler: P20, P200, P1000 Gilson
- Otomatik pipet uçları: Sarı, mavi, beyaz Rainin
- Poloroid film
- Santrifüj: Eppendorf 5415C
- Terazi: Sartorius BL120S
- pHmetre: Jenco 672 Digital
- Vorteks: Nuvemix
- Su banyosu: LKB Brumma 2209 Multitemp
- Istima Bloğu: Stuart Scientific
- Mikrodalga Fırın: Arçelik MD500
- Derin Dondurucu
- Otoklav
- Spektrofotometre: Hitachi 220
- Kamera: Poloroid MP4
- Thermal Cycler: Thermolyne Amplitron 1
- UV Transilluminatör:
- Jel elektroforez aparatları: Biorad
- Horizontal Mini subcell, Wide mini subcell

### 3. 2. Kimyasallar

- Taq DNA polimeraz ve tamponu: MBI (Fermentas)
- dNTP ler : MBI (Fermentas)
- Agaroz : Prona
- MgCl<sub>2</sub> solüsyonu : MBI (Fermentas)
- Proteinaz K : MBI (Fermentas)
- DNA Marker (PUC19DNA/MspI): MBI (Fermentas)
- Amonyum Asetat: Sigma
- Tris: Applichem
- Etanol: Carlo Erba

- SDS: Sigma
- Etidyum bromid: Applichem

### 3. 3. Genel Çözeltiler ve Tamponlar

- Çekirdek Lizis Tamponu:

10mM Tris-HCl

400 mM NaCl

2mM EDTA, pH8.2

- TE Tamponu:

10mM Tris-HCl

1mM EDTA, pH7.5

- TAE Tamponu:

40mM Tris-asetat

1mM EDTA, pH8

- Agaroz Jel Yükleme Tamponu:



%0.25 Bromfenol blue

%0.25 Xylene cyanol FF

%30 Gliserol

### 3. 4. Hastalar ve Kontrol Grubu

#### 3. 4. 1. Hastalar

Bu çalışma Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı'nda primer akciğer kanseri tanısı alan 82 hasta üzerinde yapıldı. Yalnızca daha önce herhangi bir kanser hikayesi olmayanlar, ayrıca daha önce radyoterapi veya kemoterapi almamış, yeni akciğer kanseri tanısı konulmuş hastalar çalışmaya alındı. Hastalar arasında cinsiyet, yaş veya kanserin histopatolojik tipi ile derecesi yönünden bir kısıtlama yapılmadı. Akciğer kanserinin tanısı histolojik olarak doğrulandı. Tüm hastaların ve kontrollerin Türk anne ve babadan doğmuş olmaları dikkate alındı. Tüm hastalar çalışmaya katılmayı kabul ettiler. Çalışma Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi İnsan Araştırmaları Etik Komitesi tarafından onaylandı.

#### 3. 4. 2. Kontroller

Kontrol grubu Cumhuriyet Üniversitesi Hastanesi'ne başvuran, daha önce herhangi bir kanser tanısı almamış 167 kişiden oluştu. Çalışmaya dahil edilen tüm hasta ve kontroller için Ek Tablo 1 ve 2 de verilen soru formu karşılıklı konuşarak soru-cevap şeklinde dolduruldu.

### 3. 5. Kan Örneklerinin Toplanması

Kontrollerden ve primer akciğer kanseri tanısı konulan hastalardan, herhangi bir kemoterapi veya radyoterapiye başlanmadan önce, 2-3 ml kan örneği steril, sitratlı tüplere alındı. Kan örneklerinden mümkün olduğunda, laboratuvara ulaşır ulaşmaz

genomik DNA izole edildi veya örnekler +4 °C de en fazla 24 saat bekletildikten sonra DNA izole edildi. DNA izolasyonundan geriye kalan kan -20 °C de korundu.

### 3. 6. Genomik DNA İzolasyonu

Genomik DNA, yüksek tuz konsantrasyonu ile DNA izolasyonu yöntemiyle izole edildi. Kısaca, 1 ml kan 5 ml steril disposibil santrifüj tüpüne alındı, üzerine 4 ml soğuk, steril bidistile su ileve edilerek 2-3 dakika karıştırıldı. 10 dak. 2000 rpm de oda sıcaklığında santrifüj edildi. Pelet üzerine 2.5 ml soğuk, steril bidistile su eklenerek karıştırıldı ve 10 dak 2000 rpm de santrifüj edildi. Pelete 300 µl çekirdek lizis tamponu, 20 µl %10 SDS, 10 µl proteinaz K (15 mg/ml) eklendi ve 55 °C de 3 saat inkübe edildi. Üzerine 200 µl amonyum asetat eklenerek 10 dak. bekledikten sonra 3500 rpm de mikrosantrifüjde 15 dak. santrifüj edildi. Süpernatant temiz bir tüpe alınarak üzerine hacminin 2 katı, oda sıcaklığındaki alkol eklendi. DNA pipet ucuyla toplanarak başka bir tüpe alındı ve 50 µl TE içerisinde çözüldü. Hazırlanan genomik DNA lar -20 °C de korundu.

### 3. 7. DNA Kalitesi ve Miktarının Belirlenmesi

İzole edilen DNA örneklerinin PZR reaksiyonunda kullanılabilir kalitede olup olmadığı, yani izolasyon sırasındaki hatalardan kaynaklanabilen degradasyon (DNA nın küçük parçalara ayrılması) olup olmadığı örneklerin % 0.8 lik agaroz jelde elektroforeze tabi tutularak görüntülenmesi ile kontrol edildi.

DNA konsantrasyonları ise spektrofotometrik olarak belirlendi. İzole edilen DNA örnekleri 1/50 oranında sulandırılarak 260 nm de absorbanları ölçüldü. Aynı örneğin 280 nm deki absorbanı da alınarak içerisindeki protein kirliliği belirlendi.  $A_{260}/A_{280}$  oranı 1.5 in altındaki DNA örnekleri için yeniden DNA

izolasyonu yoluna gidildi.  $A_{260}$  da ölçülen 1 değeri 50  $\mu\text{g/ml}$  çift zincirli DNA ya karşılık geldiğinden konsantrasyonlar aşağıdaki formülden yararlanılarak hesaplandı (86).

$\text{DNA } (\mu\text{g/ml}) = A_{260} \times 50 \times \text{sulandırma faktörü}$

### 3. 8. Genotipleme

GSTM1 geninde delesyon olup olmadığı PZR metodu ile tayin edildi. Glukoz-6-fosfat Dehidrogenaz geni reaksiyon içi standart olarak coamplifiye edildi. PZR reaksiyonu toplam hacim olarak 25  $\mu\text{l}$  içinde herbir GSTM1 primerinden 50 pmol; GSTM1F(5' GAACTCCCTGAAAAGCTAAAGC 3'), GSTM1R(5' GTTGGGCTCAAATATACGGTGG 3'), kontrol primerlerinin herbirinden 20 pmol; GPDF (5' GGCTGAGAACGGGAAGCTTGTCAT 3'), GPDR (5' CAGCCTTCTCCATGGTGGTGAAGA 3'), 200  $\mu\text{M}$  dNTP ler, 100ng DNA, 1.5 U Taq DNA polimeraz enzimi, 2 mM  $\text{MgCl}_2$  ve 1XPZR tamponu olacak şekilde hazırlandı. PZR karışımının üzeri reaksiyon sırasındaki sıcaklık değişimlerinden kaynaklanan buharlaşmayı önlemek amacıyla birkaç damla mineral yağ ile kapatıldı. DNA amplifikasyonu. Thermal cycler cihazında 95 °C de 5 dak. başlangıç denaturasyonunu takiben 35 döngü olarak 94 °C de 2 dak., 55 °C de 1 dak., 72 °C de 1 dak. olarak programlandı. 35 döngü sonunda reaksiyonlar 72 °C de 7 dak. final uzamaya tabi tutuldu.

### 3. 9. Agaroz Jel Elektroforezi

İzole edilen DNA örnekleri ve PCR ürünleri agaroz jelde büyüklüklerine göre ayrıldı. Jeller Tris-asetat EDTA (TAE) tamponu içinde hazırlandı ve elektroforeze tabi tutuldu (86). Jelin hazırlanması aşamasında 1 mg/ml etidyum bromid eklendi. Jel üzerindeki kuyucuklara yükleme sırasında DNA örneği üzerine 1/6 hacim

yükleme tamponu eklendi. Elektroforez 100 V da 45 dak. yapıldı. Elektroforez sonrasında DNA UV transilluminasyonu ile görünür hale geldi ve turuncu filtre kullanılarak fotoğraflandı.

### 3. 10. İstatistiksel Değerlendirme

Bu çalışmada akciğer kanseri hastaları ve kontroller sigara alışkanlığı, ailede akciğer kanseri ve diğer kanser hikayesi yönünden Khi kare ( $X^2$ ) testi kullanılarak (yanılma değeri  $\alpha=0.05$ ) karşılaştırıldı. Ayrıca akciğer kanseri oluşumu, tümör histolojisi, sigara alışkanlığı (günde 1 paketten az ( $<1$  p/g), 1 paket ve çok ( $\geq 1$  p/g) olarak) ve GSTM1 in genotipi arasındaki ilişki yine  $X^2$  testi kullanılarak değerlendirildi. İlişkinin derecesi % 95 CI (Confidence Interval: Güvenlik aralığı) da OR (Odds Ratio: İhtimal oranı, relatif riskin tahmini) olarak tarif edildi. Verilerin istatistiksel analizi Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) programı (Versiyon 8) kullanılarak yapıldı.

#### 4. BULGULAR

Bu çalışma 2001 yılından itibaren Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı'nda primer akciğer kanseri tanısı alan 82 hasta ve yine aynı hastaneye kanser dışındaki hastalıklar nedeniyle başvuran 167 kontrol üzerinde yapıldı. Çalışmaya alınan tüm hasta ve kontrollerle yüzyüze görüşülerek, kendilerine yöneltilen sorulara verdikleri cevaplardan Ek Tablo 1 ve 2 oluşturuldu. Bu tablodaki veriler ile GSTM in genotipi arasındaki ilişki istatistiksel olarak analiz edildi. Akciğer kanseri hastaları ve kontrollerin cinsiyet, yaş özellikleri ve sigara hikayesi Tablo 5 de verilmiştir. Kontrollerin 68 i erkek, 99 u kadın bireylerden oluşurken hastaların 70 i erkek, 12 tanesi kadındı. Hastaların ve kontrollerin yaş ortalamaları sırasıyla  $61.9 \pm 10.3$  ve  $53.0 \pm 8.3$  idi. Kadınlarda yaş ortalaması hastalar ve kontrollerde sırasıyla  $61.1 \pm 10.8$  ve erkeklerde  $62.1 \pm 10.2$  ve  $53.3 \pm 8.1$  olarak belirlendi. Akciğer kanseri hastaları ve kontroller sigara içip içmemeleri yönünden değerlendirildiğinde hastaların % 77 si sigara içtiği halde kontroller için bu değer % 36 idi. Sigara içen kontrollerin % 26 sı erkek, % 10 u kadın, sigara içen hasta grubunun ise % 68i erkek ve % 9 u kadındı. Sigara alışkanlığı bakımından kontroller ve akciğer kanseri hastaları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlemlendi ( $X^2$ : 36.81, P: 0.0000). Akciğer kanseri hastalarında sigara içme oranı kontrollere kıyasla daha fazla idi (Tablo 6).

Tablo 5: Akciğer kanseri ve hastalarının yaş, cinsiyet özellikleri ve sigara hikayesi

|                         | <b>Kontrol</b> | <b>Akciğer kanseri hastaları</b> |
|-------------------------|----------------|----------------------------------|
| <b>Örnek sayısı</b>     | 167            | 82                               |
| <b>Cinsiyet</b>         |                |                                  |
| Erkek                   | 68 (%41)       | 70 (%85)                         |
| Kadın                   | 99 (%59)       | 12 (%15)                         |
| <b>Yaş(yıl)</b>         |                |                                  |
| Aralık                  | 38-75          | 40-85                            |
| Ortalama±standart sapma | 53.0±8.3       | 61.9±10.3                        |
| Erkek                   | 53.3±8.1       | 62.1±10.2                        |
| Kadın                   | 52.8±8.5       | 61.1±10.8                        |
| <b>Sigara hikayesi</b>  |                |                                  |
| İçenler                 | 60 (%36)       | 63 (%77)                         |
| Erkek                   | 44 (%26)       | 56 (%68)                         |
| Kadın                   | 16 (%10)       | 7 (%9)                           |

Tablo 6: Akciğer kanseri hastaları ve kontrollerin sigara alışkanlığı bakımından karşılaştırılması

| Sigara alışkanlığı | Kontrol   | A.c kanseri hasta |
|--------------------|-----------|-------------------|
| İçenler            | 60 (%36)  | 63 (%77)          |
| İçmeyenler         | 107 (%64) | 19 (%23)          |
| X <sup>2</sup>     | 36.81     |                   |
| P                  | 0.00000   | P<0.05            |

Tablo 7: Akciğer kanseri hastaları ve kontrollerde ailede kanser hikayesi sıklığı

|                                    | Kontrol   | A.c. kanseri hastaları |
|------------------------------------|-----------|------------------------|
| <b>Ailede kanser hikayesi</b>      |           |                        |
| Var                                | 28 (%17)  | 12 (%15)               |
| Yok                                | 139 (%83) | 70 (%85)               |
| X <sup>2</sup>                     | 0.19      |                        |
| P                                  | 0.66      | P>0.05                 |
| <b>Ailede a.c kanseri hikayesi</b> |           |                        |
| Var                                | 9 (%5)    | 5 (%6)                 |
| Yok                                | 158 (%95) | 77 (%94)               |
| X <sup>2</sup>                     | 0.05      |                        |
| P                                  | 0.81      | P>0.05                 |

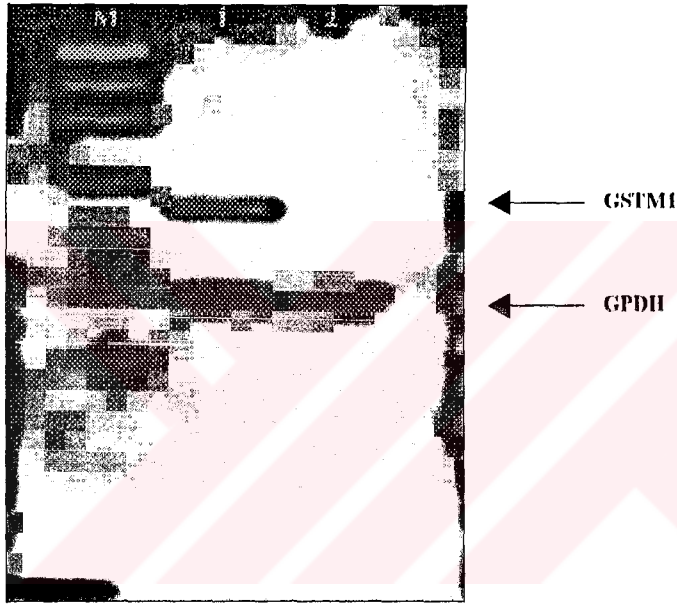
Ailede (anne, baba, kardeş, çocuk, hala, dayı, amca, teyze, kuzen) kanser görülme sıklığı açısından akciğer kanseri hastaları ve kontroller karşılaştırıldığında, kontrollerin % 17 sinin ve kanser hastalarının ise % 15 nin 1. derece akrabalarında

kanser vakası görüldüğü izlendi. Ailelerinde kanser hikayesi olanların kontrollerde % 5 inde hasta grubunda ise % 6 sında akciğer kanseri görüldüğü belirlendi. Ailede herhangi bir kanser ve akciğer kanseri bulunma sıklığı bakımından kontroller ve akciğer kanseri hastaları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmedi (sırasıyla  $X^2$ : 0.9 P: 0.66,  $X^2$  0.05 P: 0.81) (Tablo 7).

Hasta ve kontrollerin GSTM1 geninde delesyon içerip içermedikleri PZR metoduyla belirlendi. GSTM1 geninde 215 bç lik homozigot delesyona sahip bireyler GSTM1 null, delesyon olmayanlar bireyler ise GSTM1 (+) olarak değerlendirildi (Şekil 2). Gereç ve Yöntem bölümünde de belirtildiği gibi PZR ortamına Glukoz 6-fosfat dehidrogenaz enziminin gen bölgesine özgü primerler de eklenerek bu bölge reaksiyon içi standart olarak birlikte amplifiye edildi (140 bç). Glukoz 6-fosfat dehidrogenaz bölgesine ait PZR ürününün görülmediği örnekler değerlendirmeye alınmadı. Yirmiyedi akciğer kanseri hastası bireye ait genotipleme sonucu şekil 3 de görülmektedir. Buna göre 2, 5, 6, 13, 14, 15, 16, 18, 22, 24, 25 nolu örneklerin GSTM1 (+), 1, 3, 4, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 17, 19, 20, 21, 23, 26, 27 nolu örneklerin ise GSTM1 null olduğu belirlendi. Aynı yöntemle çalışmaya alınan tüm akciğer kanseri hastaları (82) ve kontroller (167) genotiplendi ve aralarında GSTM1 genotipi yönünden farklılık olup olmadığı istatistiksel olarak değerlendirildi. Tablo 8, tüm hasta ve kontrollerin GSTM1 genotipi yönünden istatistiksel analizini göstermektedir. Buna göre 167 kontrolün 139 u (% 83) GSTM1 (+) iken, 82 akciğer kanseri hastasının 46 sının (% 56) GSTM1 (+) olduğu belirlendi. Kontrollerin 28 i (% 17) GSTM1 null olduğu halde, kanser hastalarının 36 sının (% 44) GSTM1 null olduğu görüldü. GSTM1



(+) ve null genotipin dağılımında hastalar ve kontroller arasında istatistiksel olarak önemli bir farklılığın olduğu gözlemlendi ( $X^2$ : 21.21 P:0.000004). Akciğer kanseri hastalarında GSTM1 null genotipin bulunma olasılığı kontrollere göre daha fazladır ve OR: 3.89 (% 95 CI: 2.05-7.37) akciğer kanseri oluşumunda GSTM1 null genotip ile ilişkili 3 kat risk olabileceğine işaret etmektedir.



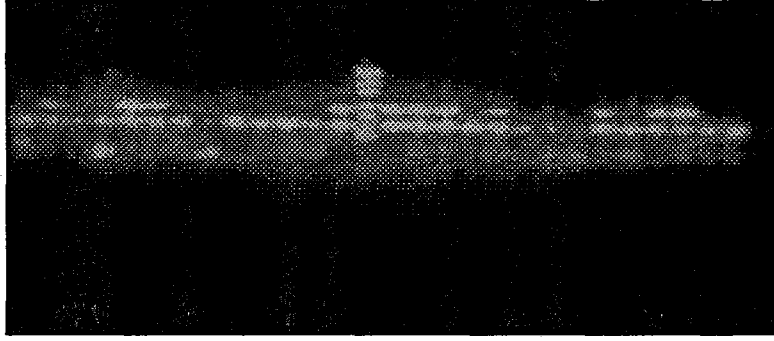
Şekil 2: GSTM1 (215 bç) ve GPDH (140 bç) nin birlikte amplifikasyonu sonucu oluşan PZR ürünlerinin agaroz jel görünümü

M: PUC 19 DNA/ MspI Marker (510, 404, 331, 242, 190, 147, 111, 67)

Sıra 1: GSTM1 (+) genotip

Sıra2: GSTM1 null genotip

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 M 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27



Şekil 3: Yirmiyedi akciğer kanseri hastaya ait genotiplenme sonucu

M: PUC 19 DNA/ MspI Marker

Sıra: 2, 5, 6, 13, 14, 15, 16, 18, 22, 24, 25 GSTM1(+) genotip

Sıra: 1, 3, 4, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 17, 19, 20, 21, 23, 26, 27 GSTM1 null genotip

Tablo 8: Kontroller ve akciğer kanseri hastaları arasında GSTM1 polimorfizminin dağılımı

| Genotip (n=82) | Kontrol (n=167)          | A.c. kanseri hastaları |
|----------------|--------------------------|------------------------|
| GSTM1 (+)      | 139 (%83)                | 46 (%56)               |
| GSTM1 null     | 28 (%17)                 | 36 (%44)               |
| P              | 0.000004                 |                        |
| X <sup>2</sup> | 21.21                    |                        |
| OR             | 3.89 (%95 CI: 2.05-7.37) |                        |

Akciğer kanseri hastaları tümörün histopatolojik tipi (Adeno Ca, SQC Ca, SC Ca ve LC Ca) yönünden değerlendirilmiş ve sonuçlar Tablo 9 da verilmiştir. Tüm akciğer kanserleri içinde Adeno Ca % 11, SQC Ca % 37, SC Ca % 23 ve LC Ca % 10 sıklıkta bulunmuştur. 15 tümör için histopatolojik tip yukarıda belirtilenlerin dışındaki akciğer kanseri tipleri arasında (mezotelyoma, epidermoid,

adenoskuamoz, papilloma) dağılım göstermektedir ve diğer olarak gruplandırılmış, bu grup genotip ile ilişkilendirilmemiştir. Tümörün histopatolojik tipi ve GSTM1 null genotip arasındaki ilişki incelendiğinde, 9 adenokarsinomlu hastanın 7 si (% 78) GSTM1 (+) iken 2 si (% 22) GSTM1 null olarak belirlenmiştir. Bu ise istatistiksel olarak önemli bir farklılığı ortaya koymamaktadır (P: 0.21 OR: 0.37 %95 CI: 0.05-2.10). Otuzbir skuamoz karsinoma vakasının 18 i (% 58) GSTM1 (+) ve 13 ü (% 42) GSTM1 null dir. OR 0.92 (%95 CI: 0.37-2.30) olarak hesaplanmış ve istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır (P: 0.85). 19 küçük hücreli karsinoma hastaları (% 23) içinde GSTM1 (+) genotip sayısı 10 (% 53), GSTM1 null genotip sayısı 9 (% 47) dir. OR 1.15 (%95 CI: 0.38-3.48 P: 0.78) olması nedeniyle küçük hücreli karsinom ile GSTM1 null genotip arasında önemli bir ilişki belirlenememiştir. Büyük hücreli akciğer karsinomunda da benzer sonuçlar elde edilmiş, 8 hastanın 4 ü (% 50) GSTM1 (+) iken 4 ü (% 50) GSTM1 null dir ki buda 1.28 OR %95 CI: 0.25-6.65) vermekte ve istatistiksel olarak anlamlı bir ilişkiye işaret etmemektedir (P: 0.74). Sonuç olarak akciğer kanserinin histopatolojik tipi ile GSTM1 null genotip arasında anlamlı bir ilişki gözlenmemiştir ve GSTM1 null genotip akciğer kanserinin herhangi bir tipi için riski, kontrollere göre değiştirmemektedir

Tablo 9: Akciğer kanseri hastalarında kanserin histopatolojik tipi ile GSTM1 genotipi arasındaki ilişki

|                          | <u>GSTM1(+)</u> |        | <u>GSTM1null</u> |                 | P    | X <sup>2</sup> |
|--------------------------|-----------------|--------|------------------|-----------------|------|----------------|
|                          | N(%)            | n(%)   | n(%)             | OR(%95 CI)      |      |                |
| <b>A.c. Ca hastaları</b> | 82              | 46(56) | 36(44)           | 1.00            |      |                |
| <b>Adeno Ca</b>          | 9(11)           | 7(78)  | 2(22)            | 0.37(0.05-2.10) | 0.21 | 1.57           |
| <b>SQC Ca</b>            | 31(37)          | 18(58) | 13(42)           | 0.92(0.37-2.30) | 0.85 | 0.04           |
| <b>SC Ca</b>             | 19(23)          | 10(53) | 9(47)            | 1.15(0.38-3.48) | 0.78 | 0.08           |
| <b>LC Ca</b>             | 8(10)           | 4(50)  | 4(50)            | 1.28(0.25-6.65) | 0.74 | 0.11           |
| <b>Diğer</b>             | 15(18)          | -      | -                | -               |      |                |

GSTM1 genotipi ile akciğer kanseri hastalarının sigara içme durumları arasındaki ilişki incelenmiş ve sonuçlar Tablo 10 da verilmiştir. Buna göre sigara içmeyen 19 (% 23) hastanın 15 i (% 79) GSTM1 (+), 4 ü (% 21) GSTM1 null dir. Sigara içenlerin sayısı ise 63 (% 77) dir ve bunlardan 31 i (% 49) GSTM1 (+), 32 si (% 51) GSTM1 null dir. Akciğer kanseri hastalarının sigara içimi ile GSTM1 null genotip arasında anlamlı bir ilişki sözkonusudur (X<sup>2</sup>: 5.24 P: 0.02). OR 3.87 (%95 CI : 1.04-15.66) ise GSTM1 null genotipin sigara içenlerde içmeyenlere oranla akciğer kanserine yatkınlık riskini 3 kat artırdığını göstermektedir. Ayrıca akciğer kanseri hastaları tarafından içilen sigara miktarı da gözönünde bulundurulmuş, sigara içenler günde 1 paketten az veya çok içenler olarak gruplandırılmıştır. Günde 1 paketten az (<1 paket/gün) içenlerin sayısı 9 dur (% 14) ve bunların 2 si (% 22) GSTM1 (+), 7 si (% 78) GSTM1 null dir. Günde 1 paketten fazla (≥ 1 paket/gün) içenlerin sayısı 54 (% 88) dır ve bunların da 29 u (% 54) GSTM1 (+), 25 i (% 46) GSTM1 null genotipe sahiptir. Dolayısıyla akciğer kanseri

hastalarında içilen sigara miktarı ile GSTM1 null genotipe sahip olma arasında istatistiksel olarak önemli bir ilişki yoktur (X<sup>2</sup>: 3.06 P: 0.08). Sonuç olarak GSTM1null genotipe sahip bireyler sigaranın az veya çok içiminden bağımsız olarak (OR:0.25 %95 CI: 0.03-1.49) içmeyenlere oranla 3 kat fazla risk altında olabilirler.

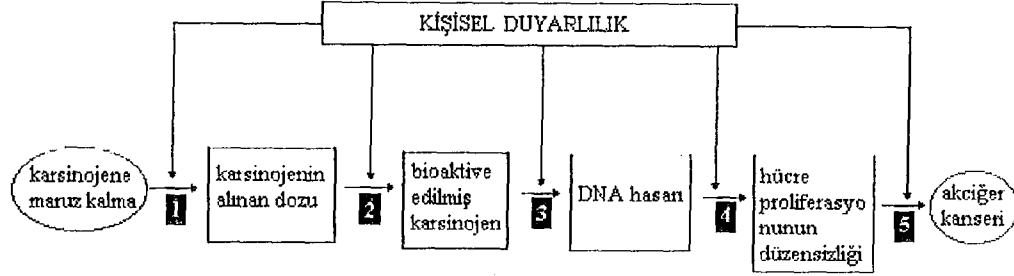
Tablo 10: Akciğer kanseri hastalarında sigara alışkanlığı ile GSTM1 genotipi arasındaki ilişki

|                              | <b>GENOTİP</b> |                 |                  |          |                   |
|------------------------------|----------------|-----------------|------------------|----------|-------------------|
|                              | <b>N(%)</b>    | <b>GSTM1(+)</b> | <b>GSTM1null</b> | <b>P</b> | <b>OR(%95 CI)</b> |
| <b>Sigara içme durumu</b>    |                |                 |                  |          |                   |
| İçmeyenler                   | 19(23)         | 15(79)          | 4(21)            |          | 1.00              |
| İçenler                      | 63(77)         | 31(49)          | 32(51)           | 0.02     |                   |
| <b>İçilen sigara miktarı</b> |                |                 |                  |          |                   |
| <1 paket/gün                 | 9(14)          | 2(22)           | 7(78)            |          | 1.00              |
| ≥1paket/gün                  | 54(88)         | 29(54)          | 25(46)           | 0.08     | 0.25(0.03-1.49)   |

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Akciğer kanseri dünyada kardiyovasküler hastalıkların neden olduğu ölümlerden sonra ikinci sırada yer alır. Günümüzde kullanılan tedavi yöntemleri genellikle hastalığın erken tanındığı dönemlerde etkili olmakta fakat hastalık ne yazıkki genellikle geç dönemlerde tanınabilmektedir. Çalışmalar ise erken tanı yöntemlerinin geliştirilmesi ile birlikte bu hastalığa kişisel yatkınlık kaynaklarının araştırılması yönünde ilerlemektedir. Yaklaşık ömür boyu sigara içenlerin % 15-20 sinde akciğer kanseri gelişmektedir. Bu gerçek iki olasılığı ortaya koymaktadır. Birincisi akciğer kanseri tesadüfen (rastgele) gelişen bir olaydır ki istatistiksel olarak bir kısım sigara içicisini şansa bağlı olarak etkilemektedir. İkincisi ise bireyler akciğer kanserine kişisel yatkınlık açısından birbirinden farklıdır. Başlangıçta rastgele etkileme hipotezi eğer kişinin karsinogeneze olan yatkınlık faktörleri gözardı edilirse anlamsız görülebilir. Dolayısıyla heriki olasılıkta sonuçta bireysel özelliklerle yakından ilişkilidir. Kansere kişisel yatkınlık çok basamaklı bir olay olan kanser gelişiminde bu basamaklardan herhangi birisindeki (prokarsinojen metabolik aktivasyonu ve deaktivasyonu, DNA adduct oluşumu ve mutasyon oranları, DNA onarım hızı ve hücre döngüsü özellikleri) kişisel farklılığa bağlı olduğu gözönünde bulundurulsa da şimdiye kadar elimizdeki toksikolojik veriler daha çok prokarsinojen metabolizması basamaklarını adres göstermektedir. Sigara içimine bağlı akciğer kanserine kişisel yatkınlık solunan prokarsinojenlerin karsinojen haline dönüştürülme (faz I reaksiyonları) kapasitesi ve karsinojenlerin detoksifiye edildiği faz II kapasitesi arasındaki dengenin bozulması sonucu ortaya çıkar. Ayrıca karsinogenezin ilk evrelerinde izlenebilen DNA adduct oluşumu, spesifik hücre gen mutasyonları ve

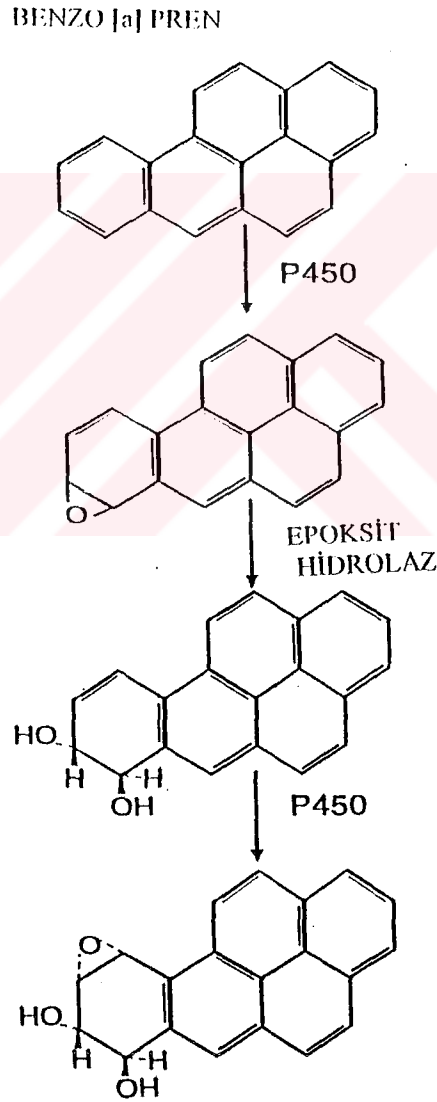
daha sonra ortaya çıkabilen onkogen mutasyonu akciğer kanserinin klinik olarak tanınması için biyomarker olabilirler (şekil 4) (87).



Şekil 4: Çok basamaklı akciğer kanserine kişisel duyarlılık

Hayvan deneylerinde tümörjenik olduğu kanıtlanmış, sigara dumanı içinde bulunan moleküller insan enzim sistemleri tarafından aktivasyon ve detoksifikasyona uğrarlar. Polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH), örneğin benzo [a] pren insanlarda karsinojen olarak bilinen bir moleküldür. Sitozolik arilhidrokarbon reseptörüne bağlanır, ligand-reseptör kompleksi promotör bölgelere bağlanarak karsinojen metabolize eden enzimlerin indüklenmesine yol açar. Böylece oksidasyon ve konjugasyon basamaklarından sonra suda çözünebilen ve idrarla atılabilen ürünler oluştururlar. Fakat araürünleri potansiyel karsinojenlere biyoaktif olurlar. Arilaminler ve N-nitrozaminler de benzer modifikasyona uğrarlar (88). Sigara dumanında bulunan prokarsinojenlerin faz I metabolizması, sitokrom P450 ailesinin formları, örneğin CYP1A1 ile başlar ve Glutatyon-S-transferaz, NADPH:kinon oksidoredüktaz (NQD, DT-diaforaz), N-asetil transferaz gibi faz II metabolizması ile devam eder. Diol epoksidler ve

solunan ksenobiyotiklerin semikinon formları gibi bu metabolizmanın aktive olmuş araürünlerinin karsinojen ve DNA ile interaksiyona girebilen elektrofiller olduğu bilinmektedir (şekil 5). Bu moleküllerin deaktivasyonu oldukça önemlidir. Solunan karsinojenlerin aktive-deaktive edilmesi kişiden kişiye değişmektedir ve hayvan modellerinde ve insanlarda kanser riski oluşturduğunu bildiren çalışmalar vardır. Ligand bağlanması, hedef makromolekül adduct oluşumu akciğer kanserinde risk faktörlerdir.



Şekil 5: B[ a] pren in sitokrom P450 sistemi tarafından biyoaktivasyonu



GST ler elektrofilik xenobiyotikleri glutasyon ile konjuge eden enzim ailesidir. Glutasyon konjugatı daha polardır ve kolaylıkla atılabilir. B [a] p 7, 8-diol-9,10-epoksit (BPDE) gibi elektrofiller GST tarafından GSH ile konjuge edilirler ve böylece DNA-adduct oluşumu, dolayısıyla da kanserin başlaması engellenir (64). GST nin antikarsinogenez rolü ratlarda çalışılmıştır. Aflatoksin AFB1-8,9-oksit in GST tarafından yavaş konjugasyonu bileşiğin ratlarda güçlü hepatokarsinojen olmasına neden olmaktadır. GST ekspresyonunun indüklenmesi AFB1 in DNA ya bağlanmasını ve AFB1 e bağlı karsinogenezi engellemektedir (64, 89). PAH gibi sigara dumanında bulunan karsinojenler için ise yapılan çalışmalarda sigara içen ve GSTM1 aktivitesi olmayan bireylerin akciğer dokusunda 32p işaretli PAH-DNA adduct miktarı GSTM1 aktivitesine sahip olanlara oranla daha fazla bulunmuştur (64). Karsinojen-DNA adductları mutajene maruz kalma, absorpsiyon, aktivasyon, deaktivasyon, DNA onarımı ve hücre proliferasyonunun net etkisinin göstergesidir (90).Belirlenen DNA hasarı karsinojenin biyolojik olarak aktif dozunu, nasıl biyoaktive ve detoksifiye edildiğinin mekanizmasının anlaşılmasında önemli bilgiler ortaya koyar. B [a] P, epoksit metabolitler örneğın benzo a pren 4,5 oksit GSTM1 in katalitik aktivitesi ile detoksifiye edilir (64). Diğer sigara dumanı bileşenleri olan nitrozaminler ve aromatik aminler için GST yolu henüz gösterilmemiştir. İnsanda akciğer GST aktivitesi sigara dumanına maruz kalma ile indüklenmemektedir. Fakat ratlarda endojen ve eksojen oksidanlara maruz kalma ile indüklendiğı gösterilmiştir (91).İnsanlarda genetik, diyetsetel ve çevresel faktörler kan ve diğer hedef organlarda GSTM1 ekspresyonu ve aktivitesinin kişisel farklılıklar göstermesine katkıda bulunuyor olabilir (64, 12, 92). İnsan GSTM sınıfı içinde 3 farklı allel belirlenmiştir. GSTM1 A ve B benzer

aktiviteye sahip enzimlerdir, (10). GSTM1 0 ise null alleldir ve aktif enzim üretmez. GSTM1 null genotipe sahip bireylerin akciğerinde hem tümör hem de normal dokuda daha fazla PAH-DNA adductlarına rastlanmıştır (93). GSTM1 null genotip lenfosit sister kromatid değişimi ve p53 mutasyonları ile de ilişkilidir (94). GSTM1 null genotip Japon, Avrupa ve Kuzey Amerika populasyonlarında % 40-50 oranında rastlanan yaygın bir polimorfizmdir. Bu nedenle eğer bu genotip çok az da olsa akciğer kanserine yatkınlıkta bir katkı oluşturuyorsa, bunun halk sağlığı açısından önemi çok büyük olacaktır. Seidegard (10) periferal lenfosit GSTM1 aktivitesinin trans-stilben oksite (TSO) karşı Kuzey Amerika populasyonunda, akciğer kanserlilerde % 58 oranında GSTM1 aktivitesi bulamazken bu oranı kontrollerde %37 olarak bildirmiştir (OR 2.4 %95 CI: 1.6-3.6). Soni ve arkadaşları (72) Hint populasyonunda lenfosit TSO konjugasyonunu sigara içimi ile ilgili kanserlerde belirlemiş ve sigara içenlerin çoğunun GSTM1 null genotipte olduğunu göstermiştir (OR: 3.7, CI: 1.6-8.5). Geçen 30 yıl içinde yapılan çalışmalar çevresel kimyasalların metabolizmasında hem deney hayvanlarında hem de insanlarda çok büyük farklılıklar olduğunu ortaya koymuştur. Çeşitli kimyasalların metabolizmasındaki kişisel farklılıklar hem kalitatif hem de kantitatif olarak fenotip düzeyde incelenmiştir. Bu farklılıklar ilaç metabolizması enzimlerinin ekspresyonundaki değişikliklerin analizi sonucu ortaya çıkarılmıştır. Klasik enzimoloji ve immunolojik çalışmalar enzimlerin farklı allelik formlarının metabolik fenotipe yansiyıp yansımadığı konusunda sonuca gidilmesinde kullanılamaz. Son yıllarda moleküler biyoloji yöntemlerinin bu alanda kullanılması, genetik dizideki farklılıkların fenotip ile ilişkisinin anlaşılmasına büyük katkı sağlamıştır. Bu çalışmalar bilim adamlarının direkt

olarak genin yapısı ve fonksiyonu arasındaki korelasyonun belirlenmesi, ayrıca organizmanın genetik özellikleri ile karşılaştıkları çevresel karsinojenlere verdikleri cevap arasındaki ilişkinin mekanizmasının anlaşılmasında yarar sağlamıştır. Biz de bu çalışmada akciğer kanseri hastaları ve kontrolleri GSTM1 geni yönünden genetik düzeyde inceledik ve bu gendeki delesyonun akciğer kanseri oluşumu ile ilişkisinin bulunup bulunmadığını Türk popülasyonundan bir örnekle yorumlamaya çalıştık. Çalışmamızda yer alan akciğer kanseri hasta sayısı 82 idi ve bunların yalnızca % 15 ini kadın hastalar oluşturmaktaydı. Bu durum literatür ile uyumludur. Akciğer kanseri erkeklerde daha sık görülmektedir ve bunun nedeni belkide erkeklerde sigara içiminin kadınlara oranla daha fazla olmasıdır. Fakat son yıllarda, özellikle Avrupa ve Kuzey Amerika, popülasyonlarında kadınlarda akciğer kanserine yakalanma hızının kadınlar arasında sigara içiminin artmasına bağlı olarak arttığını bildiren çalışmalara rastlanmaktadır (95). Bizim çalışmamızda akciğer kanseri hastaları ve kontroller sigara alışkanlığı bakımından karşılaştırıldığında akciğer kanseri hastalarında sigara içme oranının kontrollere göre yüksek olduğu görülmüştür ki literatürde incelenen tüm çalışmaların sonuçlarını desteklemektedir (96, 97, 98). İşlenmiş tütün 3000 in üzerinde bileşik içermektedir ve bunların 30 tanesi karsinojenik etkiye sahiptir. Sigara yakıldığında oluşan asıl dumanı ve yan dumanı yaklaşık 50 karsinojenik bileşik içermektedir. Bunların içinde 3 büyük sınıf (PAH, NA ve aromatik aminler) sigara ilişkili kanserlerde önemli rol oynamaktadır. Çünkü tütün karsinojenlerinin çoğu DNA ile etkileşebilen reaktif ara ürünlere dönüşmektedir. Sigara içimi akciğer kanserinin en önemli nedenidir ve larinks, ağız, özofagus, mesane ve böbrek kanseri riski ile de ilişkilidir.

Ksenobiyotik metabolizmasındaki genetik hasar ile kanser oluşumu arasındaki ilişkiyi açıklayan mekanizmalar 2 grupta incelenebilir. Ya ksenobiyotik metabolizmasındaki enzimler direkt olarak kanserin başlamasından sorumludur veya bu enzimleri kodlayan genler ile kanser oluşumundan sorumlu başka genler arasında linkaj söz konusudur. Mutasyona uğramış allelin sıklığında çok büyük etnik farklılıklar vardır ve kansere neden olan gen ile ksenobiyotik metabolizmasındaki genler bir popülasyonda link yapabildiği halde diğerinde yapmıyor olabilir. Akciğer kanseri hastaları ailede herhangi bir kanser görülme sıklığı açısından değerlendirildiğinde kontrollerle arada bir fark olmadığı görülmüştür. Epidemiyolojik çalışmalar, birkaçı hariç (99), ailede kanser hikayesi genetik faktörlerin akciğer kanseri için bağımsız bir faktör olduğuna işaret etmektedir. Çok sayıda vaka-kontrol çalışması birinci derece akrabalarda akciğer kanseri bulunanlarda akciğer kanseri bulunma olasılığını OR 1.7-5.3 arasında bildirmektedir (100). Bu sonuçlar genellikle onbinlerle ifade edilen çok sayıda birey üzerinde yapılmış çalışmalardan elde edilmiştir. Bizim çalışmamızda incelenen birey sayısının az olması nedeniyle literatür ile uyumsuz böyle bir sonuç elde edilmiş olabilir. Çünkü şimdiye kadar yayınlanmış büyük bir çoğunlukta makale akciğer kanseri ile aile hikayesi arasında güçlü bir ilişkiden söz etmektedir.

GSTM1 gen delesyonu polimorfizminin incelenen popülasyonlarda % 21-% 63 arasında bulunduğu bildirilmiştir (100). Bizim çalışmamızda ise GSTM1 null genotip sıklığı %17 olarak bulunmuştur. Türk popülasyonunda GSTM1 polimorfizmi ile ilgili sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır ve bildiğimiz kadarıyla bu çalışma Türk popülasyonunda GSTM1 null genotip ile akciğer kanseri

ilişkinini inceleyen ilk çalışmadır. Aktaş ve arkadaşları(101) GSTM1 polimorfizmi- mesane kanseri ilişkisini inceledikleri makalelerinde kontrol popülasyonunda GSTM1 delesyonunun %34 oranında olduğunu bildirmişlerdir ki bizim sonuçlarımız bununla uyumlu değildir. Bu farklılığın nedeni bu iki çalışmaya dahil edilen kontrollerin yöresel farklılığına bağlı olabilir. Biz bu çalışmada yalnızca Türk anne babadan doğma bireyleri inceledik. Aktaş ve arkadaşlarının makalesinde ise böyle bir özellikten söz edilmemektedir. Bununla birlikte bir popülasyonda bir enzimin polimorfik allel sıklığını belirlerken homojen seçilmiş, çok sayıda bireyi içeren araştırmaların sonuçlarının birlikte değerlendirilmesi (meta analizi) ancak o toplumdaki allel sıklığı hakkında fikir verebilir. Dolayısıyla bizim çalışmamızda incelenen birey sayısının azlığı nedeniyle Türk popülasyonunun genotipini yansıtmayabilir fakat biz bu çalışmanın ileride yapılacak çalışmalarla birlikte değerlendirilerek Türk popülasyonundaki GSTM1 genotipinin belirlenmesine katkıda bulunacağına inanmaktayız. Akciğer kanseri hastaları ve kontroller GSTM1 null genotip yönünden karşılaştırıldığında ortaya çıkan OR: 3.89 akciğer kanseri ile GSTM1(-) genotip arasında güçlü bir ilişkiye işaret etmektedir. Bu alanda farklı popülasyonlarda yapılan vaka-kontrol çalışmalarının sonuçlarının incelendiği meta analiz çalışmasında GSTM1 null genotipin akciğer kanseri için bir risk faktör olabilmesi olasılığı OR: 1.6 olarak bulunmuştur (102). Bizim çalışmamızda bu risk 3.89 OR olarak bulunmuştur. Bunun nedeni ise çalıştığımız popülasyonda kontrollerin GSTM1 null genotipe sahip olma oranının %17 gibi oldukça düşük bir değerde bulunması olabilir. İkinci ve daha büyük bir olasılık ise çalışmamızda yer alan akciğer kanseri hastası bireylerde GSTM1 null genotip ile birlikte diğer yatkınlık genotiplerinin (örneğin

CYP1A1) birarada bulunmasıdır. Hayashi ve arkadaşları (103) Japon popülasyonunda homozigot CYP1A1 Val ve GSTM1 genotipe sahip bireylerde akciğer kanseri için relatif riskin 5.8 kez arttığını bildirmiştir. Nakachi ve arkadaşları (71) 85 skuamoz akciğer kanserli birey üzerinde yaptıkları çalışmada CYP1A1 MspI polimorfizmini GSTM1 null genotiple birlikte içeren bireyler için OR 16.0 olan oldukça yüksek bir risk bildirmişlerdir. Eğer CYP1A1 in diğer polimorfik formu (Val/Val) de bu birliktelik içinde yer alırsa OR 41.0 e yükselmektedir. Aynacıoğlu ve arkadaşları (104) Türk popülasyonunda CYP1A1\*2B allelinin Orta Avrupa popülasyonlarına göre daha yüksek oranda bulunduğunu göstermiştir. Dolayısıyla bizim çalışmamızda da bulunan yüksek ORda CYP1A1 genotiplerinin de etkisi olabilir. Bu nedenle biz çalıştığımız popülasyonu CYP1A1 mutasyonları yönünden de incelemeyi düşünmekteyiz. Çinliler üzerinde yapılan bir çalışmada GSTM1 null ve CYP1A1 Val/Val genotip birlikte akciğer kanseri riski için 3.27 OR vermektedir ki bu değer bizim sonucumuza oldukça yakındır.

Çalışmamızda GSTM1 null genotip akciğer kanseri riskini artırmasına rağmen akciğer kanserinin spesifik olarak herhangi bir tipi ile ilişkili bulunmamıştır. Akciğer kanseri hastaları Adeno karsinom, küçük hücreli karsinom, büyük hücreli karsinom ve skuamoz hücre karsinomu yönünden istatistiksel olarak incelenmiştir. Onbeş kanser tipi belirtilenlerin dışındaki kanser tipleri arasında dağılım gösterdiğinden istatistiksel olarak değerlendirilmemiştir. GSTM1 genotipin özellikle skuamoz hücre karsinomu ve küçük hücreli karsinom için risk faktör olabileceğini belirten çalışmalar olduğu gibi (96, 105), bazılarında akciğer kanserinin histopatolojik tipi ile GSTM1 null genotip arasında bir ilişki

bulunmamıştır (98). Şimdiye kadar yayınlanmış epidemiyolojik çalışmaların sonuçlarından giderek henüz bu konuda bir fikir birliğine varılabılır görülmemektedir. Sigara içimi akciğer kanseri için kesin risk faktördür. Bu çalışmada da kontrollerle karşılaştırıldığında, akciğer kanserli hastaların daha fazla oranda sigara içtiği görülmüş ve sigara içen akciğer kanseri hastalarında GSTM1 null genotipin oranı içmeyenlere göre daha fazla bulunmuştur (OR: 3.87 %95 CI: 1.04-15.66) ki bu sonuç literatür ile uyumludur (98). Fakat akciğer kanseri hastalarının içtikleri sigara miktarı ile GSTM1 null genotipe sahip olma arasında anlamlı bir ilişki gözlenememiştir (P: 0.08). Bazı çalışmalarda ağır sigara içicilerde akciğer kanseri ve GSTM1 null genotip arasındaki ilişki daha güçlü iken (105,106), bazılarında hafif içicilerde daha güçlü bulunmuştur (14, 71). Bu sonuçlar ise sigaranın az veya çok tüketilmesi GSTM1 null genotipin akciğer kanseri oluşumu üzerindeki risk etkisini değiştirmemektedir yorumuna götürmektedir.

Moleküler epidemiyoloji çevresel karsinojenlere maruz kalma ile ilişkili riskleri değiştiren yatkınlık ve genetik faktörlerin öneminin anlaşılmasına katkıda bulunmuştur. Çünkü kanser büyük bir ölçüde önlenabilir bir hastalıktır ve moleküler epidemiyolojinin gelecek önceliği kansere yatkınlık oluşturan genotiplerin kombinasyonu açısından karsinojenlere maruz kalan bireyleri analiz etmektir. Bir sonuç nokta olarak kanserin belirlenmesi yerine DNA-adduct, sitogenetik hasar ve mutasyonlar gibi ara risk markerlerin belirlenmesi akciğer kanserinden ölüm oranını büyük ölçüde azaltacaktır. DNA chip teknolojisi ile gen analizi kansere yatkınlık genlerindeki mutasyonların belirlenmesinde hızı artıracaktır. Fakat daha da önemlisi insanlarda bu gen varyantlarının fonksiyonel

farklılığının karakterize edilmesi olacaktır. Bu tür çalışmalar halihazırda devam etmektedir. Örneğin, Çevresel Genom Projesi (Environmental Genom Project) Amerika da Ulusal Çevresel Sağlık Bilimleri Enstitüsü (National Environmental Health Sciences Institute) tarafından kurulmuştur ve çalışmalarına devam etmektedir (107). Bu çalışmanın amacı Amerikan popülasyonunu yaklaşık 200 gendeki varyanslar yönünden incelemek ve bunları kişisel yatkınlık, hastalık riski ve özellikle fiziksel ve kimyasal maruz kalma ile kombinasyon halinde belirlemektir. Genel genetik yatkınlık faktörlerinin sıklığı ve dağılımının, yatkın bireylerin ve alt grupların bilinmesi ve özellikle düşük düzeydeki maruz kalmada bile yatkınlığı olabilecek kesin risk altındaki bireylerin tespiti hastalıkların başlamadan önlenmesi açısından önemlidir. Böylece bu kişiler çok sıkı bir sigara bırakma programına alınabilir ve bunun için daha kolay ikna edilebilirler, ilaçla hastalığın önceden önlenmesi (chemoprevention) programlarına alınabilirler veya genel popülasyon için uygulanması mümkün olmayan kanser izleme programlarına alınabilirler. Fakat sözü edilen noktalara gelinebilmesi için öncelikle daha fazla sayıda kansere yatkınlık geninin belirlenmesi, gen-çevre ve gen-gen ilişkisinin incelenmesi gerekir. Bu amaçla da geniş, toplumsal çalışmalara gereksinim vardır.



## KAYNAKLAR

1. Solunum Hastalıkları Temel Yaklaşım. Dr. Y. İzzettin Barış, Atlas Yayıncılık, 3. Baskı, 1998.
2. Akciğer Kanseri, Multidisipliner Yaklaşım, Toraks Yayınları, Sayı 1, 1999.
3. Akciğer Kanseri, Akciğer Kanserinin Moleküler Biyolojisi, Editörler: Serap Hastürk, Mustafa Yüksel, Bilmedya Grup, İstanbul, 1-27, 2000.
4. Ketterer B. Detoxication reactions of glutathione and glutathione transferases. *Xenobiotica* 1986; 16 (10): 957-73.
5. Vermeuken NPE. Analysis of mercapturic acid as atool in biotransformation, biomonitoring and toxicological studies."Glutathione-S-Transferases and Drug Resistance". Taylor and Francis, London 1: 141-153, 1990.
6. Suzuki T, Shaw DC and Board PG. Purification and characterization of acidic GST 6 from human brain. *Biochem. J.* 1991; 274: 405-408.
7. Stockman PK, Mclellan LI, Hayes JD. Characterization of the basic glutathione-S-transferase B1 and B2 subunits from human liver. *Biochem. J.* 1987; 224: 55-61.
8. Mannervik B. The izoenzymes of glutathione-S-transferase. *Adv.Enzymol. Rel. Areas Mol. Biol.* 1985; 57: 357-417.
9. Laisney V, Van Cong N, Gross MS, Frezal J. Human genes for glutathione-S-transferases. *Hum. Genet.* 1984; 68: 221-227.
10. Seidegard J, Varachek WR, Pero, RW, Pearson WR. Hereditary differences in the expression of human glutathione-S-transferase active on transstilbene okside are due to a gene deletion. *PNAS* 1988; 85: 7293.
11. Bell DA, Thompson CL, Taylor J, Miller CR, Perera F, Hsieh LL, Lucier G. W.Genetic monitoringof human polymorphic cancer susceptibility genes by polymerase chain reaction: application to glutathione transferase  $\mu$ . *Environ.Health Perspect.* 1992; 98: 113-117.
12. Brockmoller J, Kerb R, Drakoulis N, Roots I. Genotype and phenotype of glutathione S-transferase class  $\mu$  isoenzymes  $\mu$  and  $\psi$  in lung cancer patients and controls. *Cancer Res.* 1993; 43: 647-650.

13. Heckbert SR, Wein S, Hornung SK, Eaton DL, Motulsky AG. Glutathione S-transferase and epoxide hydrolase activity in human leukocytes in relation to risk of lung cancer and other smoking-related cancers. *J. Natl. Cancer Inst.* 1992; 84: 414-422.
14. London SJ, Daly AK, Cooper J, Navidi WC, Carpenter CL, Idle JR. Polymorphism of glutathione S transferase M1 and lung cancer risk among African-Americans and Caucasians in Los Angeles County, California. *J. Natl. Cancer Inst.* 1995; 87: 1246-1253.
15. Anwar WA, AbdelRahman SZ, ElZein RA, Mostafa HM, Au WW. Genetic polymorphism of GSTM1, CYP2E1 and CYP2D6 in Egyptian bladder cancer patients. *Carcinogenesis* 1996; 17: 1923-1929.
16. Caporaso N. Commentary: Genetic susceptibility and common cancers. *Biomarkers* 1996; 1: 6810-6815.
17. Pessayre D. Cytochromes P450s in formation of metabolic reactives. *Terapie* 1993; 48: 537-548.
18. Guengerich FP. Characterization of human microsomal cytochrome P450 enzymes. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1989; 29: 241-246.
19. Vural N. Ksenobiyotiklerin biyotransformasyon mekanizmaları. *Toksikoloji, Ankara Üniversitesi Yayinevi* 56: 34-51, 1984.
20. Perucca E, ManzoL. Biotransformation. In Levy R, Mattson R, Meldrum B, Penry JK, Dreyfus FE. *Antiepileptic drugs: Third edition*, Raven Press, N. Y., 23-48, 1989.
21. Caldwell J. Conjugation reactions in foreign compound metabolism: definition, consequences and specific variations. *Drug Metab. Rev.* 1982; 13: 745-777.
22. Hodgson E, Silver IS, Butler LE, Lawton MP, Levi PE. Biotransformation: *Met. Handbook of Pesticide Toxicology* 3: 107-143, 1991.
23. Smith RL. Excretion of drugs in bile. *Concepts in Biochemical Pharmacology Part 2*, Springer Verlag, Berlin, 354-389, 1971.
24. Pacifici GM, Fracchia GN. Human Glutathione Transferase. In *Advances in Drug Metabolism in Man*, Off. Pub. of the Eur. Comm., Luxembourg, 1995.

25. Board PG. Biochemical genetics of glutathione S-transferase in man. *Am. J. Hum. Genet.* 1994; 33: 1480-1484.
26. Fahey RC, Sundquist AR. Evolution of glutathione metabolism. *Adv. Enzymol. Rel. Areas Mol. Biol.* 1991; 64: 1-53.
27. Guengerich PF. Metabolic activation of carcinogens. *Pharmacol. Ther.* 1992; 54: 17-61.
28. Mannervik B, Carlberg I, Larson K. Glutathione. General review of mechanism of action. In *Coenzymes and Cofactors 3A*, John Wiley and Sons, New York, 475-516, 1989.
29. Rozell B, Hansson HA, Guthenberg C, Tahir MK, Mannervik B. Glutathione S-transferases of classes alpha, mu and pi show selective expression in different regions of rat kidney. *Xenobiotica* 1993; 23: 835-849.
30. Sundber AGM, Appelkvist EL, Backman L, Dallner G. Urinary pi-class glutathione transferase as an indicator of tubular damage in the human kidney. *Nephron* 1994; 67: 308-316.
31. Warholm M, Guthenberg C, Mannervik B, Von Bahr C, Glauman H. Identification of a new glutathione S-transferase in human liver. *Acta. Chem. Scand.* 1980; 34: 607-610.
32. Alin P, Jensson H, Guthenberg C, Danielson UH, Tahir MK, Mannervik B. Purification of major basic glutathione transferase isoenzymes from rat liver by use of affinity chromatography and fast protein liquid chromatofocusing. *Anal Biochem.* 1985; 146: 313-20.
33. Ostlund AK, Meyer DJ, Ciles B., Southan C. The separation of glutathione transferase subunits by using reverse phase high pressure liquid chromatography. *Biochem. J.* 1987; 245: 423-428.
34. Mannervik B, Guthenberg C. Glutathione transferase (human placenta). *Methods Enzymol.* 1981; 77: 231-5.
35. Hayes JD, Gilligan D, Chapman BJ. Purification of human hepatic GST and the development of radioimmunoassay for their measurement in plasma. *Clin. Chim. Acta*, 1983; 134: 107-121.

36. Howie AF, Hayes, JD, Becket GJ. Purification of acidic GST from human lung placenta and erythrocyte and the development of a specific RIA for their measurement. *Clin. Chim. Acta* 1988; 177: 65-76.
37. Hao XY, Castro VM, Bergh J, Sundstrom B, Mannervik B. Isoenzyme-specific quantitative immunoassays for cytosolic glutathionetransferases and measurement of the enzymes in blood plasma from cancer patients and in tumor cell lines. *Biochim Biophys Acta*. 1994; 1225(2): 223-30.
38. Warholm M, Guthenberg C, Mannervik B. Molecular and catalytic properties of glutathione transferase mu from human liver: an enzyme efficiently conjugating epoxides. *Biochemistry*. 1983; 22(15): 3610-7.
39. Jernstrom B, Seidel A, Funk M, Oesch F, Mannervik B. Glutathione conjugation of trans-3,4-dihydroxy 1,2-epoxy 1,2,3,4-tetrahydrobenzo[c]phenanthrene isomers by human glutathione transferases. *Carcinogenesis*. 1992; 13(9): 1549-55.
40. Berhane K, Widersten M, Engstrom A, Kozarich JW, Mannervik B. Detoxication of base propenals and other alpha, beta-unsaturated aldehyde products of radical reactions and lipid peroxidation by human glutathione transferases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994; 91(4): 1480-4.
41. Jensson H, Guthenberg C, Alin P, Mannervik B. Rat glutathione transferase 8-8, an enzyme efficiently detoxifying 4-hydroxyalk-2-enals. *FEBS Lett*. 1986; 203(2): 207-9.
42. Singhal SS, Zimniak P, Awasthi S, Piper JT, He NG, Teng JI, Petersen DR, Awasthi YC. Several closely related glutathione S-transferase isozymes catalyzing conjugation of 4-hydroxynonenal are differentially expressed in human tissues. *Arch. Biochem. Biophys*. 1994; 311(2): 242-50.
43. Ciaccio PJ, Tew KD, GST in Teicher BA (ed) *Drug resistance in oncology*, New York, 351-374, 1993.
44. Ciaccio PJ, Tew KD, LaCreta FP. Enzymatic conjugation of chlorambucil with glutathione by human glutathione S-transferases and inhibition by ethacrynic acid. *Biochem Pharmacol*. 1991; 42(7): 1504-7.

45. Meyer DJ, Gilmore KS, Harris JM, Hartley JA, Ketterer B. Chlorambucil-mono-glutathionyl conjugate is sequestered by human alpha class glutathione S-transferases. *Br J Cancer*. 1992; 66(3): 433-8.
46. Berhane K, Hao XY, Egyhazi S, Hansson J, Ringborg U, Mannervik B. Contribution of glutathione transferase M3-3 to 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea resistance in a human non-small cell lung cancer cell line. *Cancer Res*. 1993; 53(18): 4257-61.
47. Mannervik B, Danielson UH. Glutathione transferases: structure and catalytic activity. *CRC Crit Rev Biochem*. 1988; 23(3): 283-337.
48. Lyttle MH, Hocker MD, Hui HC., Caldwell CG., Isosyme specific GST inhibitors *J.Med.Chem*. 1994; 37: 189-194.
49. Pearson WR, Vorachek WR, Xu SJ, Berger R, Hart I, Vannais D, Patterson D. Identification of class-mu glutathione transferase genes GSTM1-GSTM5 on human chromosome 1p13. *Am J Hum Genet*. 1993; 53(1): 220-33.
50. Taylor JB, Oliver J, Sherrington R, Pemble SE. Structure of human GST class Mu genes. *Biochem J*. 1991; 274: 587-93.
51. Sinning I, Kleywegt GJ, Cowan SW, Reinemer P, Dirr HW, Huber R, Gilliland GL, Armstrong RN, Ji X, Board PG. 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*. 1993; 232(1): 192-212.
52. Reinemer P, Dirr HW, Ladenstein R, Huber R, Lo Bello M, Federici G, Parker MW. Three-dimensional structure of class pi glutathione S-transferase from human placenta in complex with S-hexylglutathione at 2.8 Å resolution. *J Mol Biol*. 1992; 227(1):214-26.
53. Raghunathan S, Chandross RJ, Kretsinger RH, Allison TJ, Penington CJ, Rule GS. Crystal structure of human class mu glutathione transferase GSTM2-2. Effects of lattice packing on conformational heterogeneity. *J Mol Biol*. 1994; 238(5): 815-32.
54. Ji X, Zhang P, Armstrong RN, Gilliland GL. 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-A resolution. *Biochemistry*. 1992; 31(42): 10169-84.

55. Armstrong RN Glutathione S Transferases: reaction mechanism, structure and function. *Chem. Res. Toxicol* 1991; 4: 131-140.

56. Cohen AJ, Smith JN, Turbert H. Comparative detoxication. The enzymic conjugation of chloro compounds with glutathione in locusts and other insects *Biochem J*. 1964; 90(3): 457-64.

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

58. Seidegard J, Pero RW. The hereditary transmission of high glutathione transferase activity towards trans-stilbene oxide in human mononuclear leukocytes. *Hum Genet*. 1985; 69(1): 66-8.

59. Seidegard J, Pero RW, Stille B. Identification of the trans-stilbene oxide-active glutathione transferase in human mononuclear leukocytes and in liver as GST1. *Biochem Genet*. 1989; 27(3-4): 253-61.

60. Bell DA, Taylor JA, Paulson DF, Robertson CN, Mohler JL, Lucier GW. Genetic risk and carcinogen exposure: a common inherited defect of the carcinogen-metabolism gene glutathione S-transferase M1 (GSTM1) that increases susceptibility to bladder cancer. *J Natl Cancer Inst*. 1993; 85(14): 1159-64.

61. Robertson IG, Guthenberg C, Mannervik B, Jernstrom B. Differences in stereoselectivity and catalytic efficiency of three human glutathione transferases in the conjugation of glutathione with 7 beta,8 alpha-dihydroxy-9 alpha,10 alpha-oxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo(a)pyrene. *Cancer Res*. 1986; 46(5): 2220-4.

62. Hirvonen A, Nylund L, Kociba P, Husgafvel-Pursiainen K, Vainio H. Modulation of urinary mutagenicity by genetically determined carcinogen metabolism in smokers. *Carcinogenesis*. 1994; 15(5): 813-5.

63. Cheng TJ, Christiani DC, Wiencke JK, Wain JC, Xu X, Kelsey KT. Comparison of sister chromatid exchange frequency in peripheral lymphocytes in lung cancer cases and controls. *Mutat Res.* 1995; 348(2): 75-82.
64. Ketterer B, Harris JM, Talaska G, Meyer DJ, Pemble SE, Taylor JB, Lang NP, Kadlubar FF. The human glutathione S-transferase supergene family, its polymorphism, and its effects on susceptibility to lung cancer. *Environ Health Perspect.* 1992; 98: 87-94.
65. Kato S, Bowman ED, Harrington AM, Blomeke B, Shields PG. Human lung carcinogen-DNA adduct levels mediated by genetic polymorphisms in vivo. *J Natl Cancer Inst.* 1995; 87(12): 902-7.
66. To-Figueras J, Gene M, Gomez-Catalan J, Galan C, Firvida J, Fuentes M, Rodamilans M, Huguet E, Estape J, Corbella J. Glutathione-S-Transferase M1 and codon 72 p53 polymorphisms in a northwestern Mediterranean population and their relation to lung cancer susceptibility. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1996; 5(5): 337-42.
67. Anttila S, Luostarinen L, Hirvonen A, Elovaara E, Karjalainen A, Nurminen T, Hayes JD, Vainio H, Ketterer B. Pulmonary expression of glutathione S-transferase M3 in lung cancer patients: association with GSTM1 polymorphism, smoking, and asbestos exposure. *Cancer Res.* 1995; 55(15): 3305-9.
68. Alexandrie AK, Sundberg MI, Seidegard J, Tornling G, Rannug A. Genetic susceptibility to lung cancer with special emphasis on CYP1A1 and GSTM1: a study on host factors in relation to age at onset, gender and histological cancer types. *Carcinogenesis.* 1994; 15(9): 1785-90.
69. Brockmoller J, Kerb R, Drakoulis N, Nitz M, Roots I. Genotype and phenotype of glutathione S-transferase class mu isoenzymes mu and psi in lung cancer patients and controls. *Cancer Res.* 1993; 53(5): 1004-11.
70. dErrico A, Taioli E, Chen X, Vineis P. Genetic metabolic polymorphisms and the risk of cancer. *Biomarkers* 1996; 1: 149-171.
71. Nakachi K, Imai K, Hayashi S, Kawajiri K. Polymorphisms of the CYP1A1 and glutathione S-transferase genes associated with susceptibility to lung cancer

- in relation to cigarette dose in a Japanese population. *Cancer Res.* 1993; 53(13): 2994-9.
72. Soni MG, Krishna TP, Krishnaswamy K. Human leukocyte glutathione S-transferase isoenzyme (class mu) and susceptibility to smoking-related cancers. *J. Toxicol Environmental Health.* 1995; 46(1): 1-8.
73. Katoh T, Inatomi H, Nagaoka A, Sugita A. Cytochrome P4501A1 gene polymorphism and homozygous deletion of the glutathione S-transferase M1 gene in urothelial cancer patients. *Carcinogenesis.* 1995; 16(3): 655-7.
74. Yu MC, Ross RK, Chan KK, Henderson BE, Skipper PL, Tannenbaum SR, Coetzee GA. Glutathione S-transferase M1 genotype affects aminobiphenyl-hemoglobin adduct levels in white, black and Asian smokers and nonsmokers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1995; 4(8): 861-4.
75. Deakin M, Elder J, Hendrickse C, Peckham D, Baldwin D, Pantin C, Wild N, Leopard P, Bell DA, Jones P, Duncan H, Brannigan K, Aldersea J, Fryer AA, Strange RC. Glutathione S-transferase GSTT1 genotypes and susceptibility to cancer: studies of interactions with GSTM1 in lung, oral, gastric and colorectal cancers. *Carcinogenesis.* 1996; 17(4): 881-4.
76. Zhong S, Wyllie AH, Barnes D, Wolf CR, Spurr NK. Relationship between the GSTM1 genetic polymorphism and susceptibility to bladder, breast and colon cancer. *Carcinogenesis.* 1993; 14(9): 1821-4.
77. Ambrosone CB, Freudenheim JL, Graham S, Marshall JR, Vena JE, Brasure JR, Laughlin R, Nemoto T, Michalek AM, Harrington A. Cytochrome P4501A1 and glutathione S-transferase (M1) genetic polymorphisms and postmenopausal breast cancer risk. *Cancer Res.* 1995; 55(16): 3483-5.
78. Hand PA, Inskip A, Gilford J, Aldersea J, Elexpuru-Camiruaga J, Hayes JD, Jones PW, Strange RC, Fryer AA. Allelism at the glutathione S-transferase GSTM3 locus: interactions with GSTM1 and GSTT1 as risk factors for astrocytoma. *Carcinogenesis.* 1996; 17(9): 1919-22.
79. Lear J, Heagerty A, Smith A, Bowers B, Jones P, Gilford J, Aldersea J, Fryer A, Strange R. Polymorphism in detoxifying enzymes and susceptibility to skin cancer. *Photochem Photobiol.* 1996; 63(4): 424-8.



80. Sarhanis P, Redman C, Perrett C, Brannigan K, Clayton RN, Hand P, Musgrove C, Suarez V, Jones P, Fryer AA, Farrell WE, Strange RC. Epithelial ovarian cancer: influence of polymorphism at the GSTM1 and GSTT1 loci on p53 expression. *Br J Cancer*. 1996; 74(11): 1757-61.
81. Warwick AP, Redman CW, Jones PW, Fryer AA, Gilford J, Alldersea J, Strange RC. Progression of cervical intraepithelial neoplasia to cervical cancer: interactions of cytochrome P450 CYP2D6 EM and GST GSTM1 null genotypes and cigarette smoking. *Br J Cancer*. 1994; 70(4): 704-8.
82. Chen CJ, Yu MW, Liaw YF, Wang LW, Chiamprasert S, Matin F, Hirvonen A, Bell DA, Santella RM. Chronic hepatitis B carriers with null genotypes of glutathione S-transferase M1 and T1 polymorphisms who are exposed to aflatoxin are at increased risk of hepatocellular carcinoma. *Am J Hum Genet*. 1996; 59(1): 128-34.
83. Pryor WA. Cigarette smoke damage to DNA and other biomolecules. Pass, H. I. Mitchell, J. B., Johnson, d. H. Minna, J. D. (eds) *Lung Cancer Principals and Practice*, Lippincott Williams, Wilkins 2nd Ed. 2000, 82.
84. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*. 1985; 230(4732): 1350-4.
85. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*. 1988; 239(4839): 487-91.
86. Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, New York, 1982.
87. Devereux TR, Domin BA, Philpot RM. Xenobiotic Metabolism by isolated pulmonary cells. *Pharmacol. Ther*. 1989; 41: 243.
88. Jeffrey AM, Weinstein IB, Jennette KW, Grzeskowiak K, Nakanishi K, Harvey RG, Autrup H, Harris C. Structures of benzo(a)pyrene--nucleic acid adducts formed in human and bovine bronchial explants. *Nature*. 1977; 269(5626): 348-50.

89. Kensler TW, Egner PA, Davidson NE, Roebuck BD, Pikul A, Groopman JD. Modulation of aflatoxin metabolism, aflatoxin-N7-guanine formation, and hepatic tumorigenesis in rats fed ethoxyquin: role of induction of glutathione S-transferases. *Cancer Res.* 1986; 46(8): 3924-31.
90. Kato S, Bowman ED, Harrington AM, Blomeke B, Shields PG. Human lung carcinogen-DNA adduct levels mediated by genetic polymorphisms in vivo. *J Natl Cancer Inst.* 1995; 87(12): 902-7.
91. Pinkus R, Weiner LM, Daniel V. Role of quinone-mediated generation of hydroxyl radicals in the induction of glutathione S-transferase gene expression. *Biochemistry.* 1995; 34(1): 81-8.
92. Offord EA, Mace K, Ruffieux C, Malnoe A, Pfeifer AM. Rosemary components inhibit benzo[a]pyrene-induced genotoxicity in human bronchial cells. *Carcinogenesis.* 1995; 16(9): 2057-62.
93. Shields PG, Bowman ED, Harrington AM, Doan VT, Weston A. Polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in human lung and cancer susceptibility genes. *Cancer Res.* 1993; 53(15): 3486-92.
94. Ryberg D, Kure E, Lystad S, Skaug V, Stangeland L, Mercy I, Borresen AL, Haugen A. p53 mutations in lung tumors: relationship to putative susceptibility markers for cancer. *Cancer Res.* 1994; 54(6): 1551-5.
95. Dresler CM, Fratelli C, Babb J, Everley L, Evans AA, Clapper ML. Gender differences in genetic susceptibility for lung cancer. *Lung Cancer.* 2000; 30(3): 153-60.
96. Nakachi K, Imai K, Hayashi S, Watanabe J, Kawajiri K. Genetic susceptibility to squamous cell carcinoma of the lung in relation to cigarette smoking dose. *Cancer Res.* 1991; 51(19): 5177-80.
97. Gsur A, Haidinger G, Hollaus P, Herbacek I, Madersbacher S, Trieb K, Pridun N, Mohn-Staudner A, Vetter N, Vutuc C, Micksche M. Genetic polymorphisms of CYP1A1 and GSTM1 and lung cancer risk. *Anticancer Res.* 2001; 21(3): 2237-42.

98. Stucker I, de Waziers I, Cenee S, Bignon J, Depierre A, Milleron B, Beaune P, Hemon D. GSTM1, smoking and lung cancer: a case-control study. *Int J Epidemiol.* 1999; 28(5): 829-35.
99. Braun MM, Caporaso NE, Page WF, Hoover RN. Genetic component of lung cancer: cohort study of twins. *Lancet.* 1994; 344(8920): 440-3.
100. Spivack SD, Fasco MJ, Walker VE, Kaminsky LS. The molecular epidemiology of lung cancer. *Crit Rev Toxicol.* 1997; 27(4): 319-65.
101. Aktas D, Ozen H, Necmettin A, Tekin A, Sozen S, Tuncbilek E. Glutathione S-transferase M1 gene polymorphism in bladder cancer patients: a marker for invasive bladder cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 2001; 125: 1-4.
102. Houlston RS. Glutathione S-transferase M1 status and lung cancer risk: a meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1999; 8(8): 675-82.
103. Hayashi S, Watanabe J, Kawajiri K. High susceptibility to lung cancer analyzed in terms of combined genotypes of P450IA1 and Mu-class glutathione S-transferase genes. *Jpn J Cancer Res.* 1992; 83(8): 866-70.
104. Aynacioglu AS, Cascorbi I, Mrozikiewicz PM, Roots I. High frequency of CYP1A1 mutations in a Turkish population. *Arch Toxicol.* 1998; 72(4): 215-8.
105. Hirvonen A, Husgafvel-Pursiainen K, Anttila S, Vainio H. The GSTM1 null genotype as a potential risk modifier for squamous cell carcinoma of the lung. *Carcinogenesis.* 1993; 14(7): 1479-81.
106. Nazar-Stewart V, Motulsky AG, Eaton DL, White E, Hornung SK, Leng ZT, Stapleton P, Weiss NS. The glutathione S-transferase mu polymorphism as a marker for susceptibility to lung carcinoma. *Cancer Res.* 1993 ; 53(10 Suppl): 2313-8.
107. Kaiser J. Environment institute lays plans for gene hunt. *Science.* 1997; 278(5338): 569-70.

## ÖZET

Glutasyon-S-transferaz (GST) izoenzimleri tütün dumanında bulunan karsinojenlerin detoksifikasyonunda görev alırlar. GSTM1 lokusu GSTM1a, b ve GSTM1 null olmak üzere en az üç allelik varyanta sahiptir. GSTM1 polimorfizmi, GSTM1 geninin tamamının homozigot delesyonunun bir sonucudur. GSTM1 null genotip sıklığı %21 ile %60 arasında değişen etnik varyasyon gösterir. GSTM1 null genotipin Türk populasyonundaki sıklığı ve akciğer kanseri riski arasındaki ilişkiyi incelemek amacıyla PZR tekniği kullanılarak, 82 akciğer kanseri hastası ve kanser içermeyen 167 kontrolden oluşan bir vaka-kontrol çalışması yapıldı. Güvenlik aralığı (CI) %95 de odds ratio (OR) hesaplamak için  $X^2$  analizi yapıldı. Sonuçlar, Türk populasyonunda GSTM1 null genotip sıklığının %17 olduğunu gösterdi. GSTM1 null genotip ve akciğer kanser riski arasındaki ilişki için OR 3.89 (%95 CI: 2.05-7.37) olarak hesaplandı. GSTM1 null genotip ile akciğer kanserinin hiçbir histopatolojik tipi arasında ilişki yoktu. Sigara içen ve içmeyen akciğer kanseri hastaları, GSTM1 null genotip yönünden değerlendirildiğinde, sigara içimi ile null genotip arasında belirgin bir ilişki vardı (OR 3.87, %95 CI: 1.04-15.66). Bununla birlikte <1 ve  $\geq 1$  paket/gün olarak ifade edilen içilen sigara miktarı ile GSTM1 null genotip arasında bir ilişki gözlenmedi.

Sonuç olarak, bu çalışma Türk populasyonunda GSTM1 null genotipin akciğer kanserine genetik duyarlılığı tek başına etkileyebileceği fikrini vermektedir.

## SUMMARY

Glutathione-S-transferase (GST) isoenzymes are involved in the detoxification of several tobacco smoked-derived carcinogens. GSTM1 locus contains at least three allelic variants GSTM1a, b and GSTM1 null allele. The GSTM1 polymorphism is a result of a homozygous deletion of the entire GSTM1 locus. The GSTM1 null genotype frequency shows marked ethnic variation ranging from 21% to 62%. To investigate the prevalence of GSTM1 null genotype and its association with increased risk of lung carcinoma in a Turkish population, a PCR technique was employed in a case-control study of 82 lung cancer patients and 167 controls, free of malignancy. Chi square ( $\chi^2$ ) analysis was performed to calculate the odds ratio (OR) and 95% confidence interval (CI). The results showed that the frequency of GSTM1 null genotype in Turkish population was 17%. The OR for the association between GSTM1 null genotype and lung cancer risk was estimated as 3.89 (95% CI: 2.05-7.37). There were no association between GSTM1 null genotype and any histopathologic type of lung cancer. The evaluation of smoker and nonsmoker lung cancer patients for GSTM1 genotype revealed that there was a significant association between GSTM1 null genotype and smoking in lung cancer patients (OR 3.87, 95% CI: 1.04-15.66). However no association was observed between GSTM1 null genotype and smoking exposure expressed as <1 and  $\geq 1$  packs/day.

In conclusion, this study suggest that the GSTM1 null genotype independently might affect the genetic susceptibility to lung cancer in Turkish population.

Ek Tablo 1: Akciğer kanseri hastalara ait veri tablosu

| Hasta no | Yaş | Cinsiyet | D. yeri   | Sigara hikayesi |       | Ailede Ca hikayesi |         | A.c Ca tipi |    |    |    | GSTM1 |      |
|----------|-----|----------|-----------|-----------------|-------|--------------------|---------|-------------|----|----|----|-------|------|
|          |     |          |           | Paket/gün       | Yıl   | A.c                | Diğer   | Ad          | SQ | LC | SC | (+)   | Null |
| 1        | 70  | E        | Niksar    | 1               | 50    |                    |         |             |    |    | X  |       | +    |
| 2        | 47  | E        | Yıldızeli | 1               | 20    |                    |         |             |    |    | X  |       | +    |
| 3        | 75  | E        | Sivas     | 1               | 45    |                    |         |             |    |    |    |       | +    |
| 4        | 55  | E        | Sivas     | 0.5             | 10    |                    |         |             |    |    | X  |       | +    |
| 5        | 68  | K        |           | 1               |       |                    |         |             |    |    |    |       | +    |
| 6        | 61  | E        | Erzincan  | 1               | 40    |                    |         | X           |    |    |    |       | +    |
| 7        | 54  | E        | Tokat     | 1-3             | 30    |                    |         |             | X  |    |    |       | +    |
| 8        | 67  | K        |           | 1               |       |                    |         |             | X  |    |    |       | +    |
| 9        | 59  | E        | Sivas     | -               | -     |                    |         |             | X  |    |    |       | +    |
| 10       | 76  | E        | Sivas     | 1               | -     |                    |         |             |    | X  |    |       | +    |
| 11       | 48  | E        | Sivas     | 1               | -     |                    |         |             |    |    |    |       | +    |
| 12       | 52  | K        | Sivas     | 1               | -     |                    | Larinks | X           |    |    |    |       | +    |
| 13       | 69  | K        | Kangal    | 1               | -     |                    |         |             |    |    | X  |       | +    |
| 14       | 74  | E        | Tokat     | 1               | 30    |                    |         |             |    | X  |    |       | +    |
| 15       | 73  | E        | Artvin    | 0.5             | 20    |                    |         |             | X  |    |    |       | +    |
| 16       | 61  | E        | Sivas     | 1               | 29    |                    |         | X           |    |    |    |       | +    |
| 17       | 61  | K        | Tokat     | 1               | -     |                    |         |             |    |    |    |       | +    |
| 18       | 46  | E        | Tokat     | -               | -     | Baba               |         |             |    |    | X  |       | +    |
| 19       | 67  | E        | Sivas     | 0.5             | 50    |                    |         |             | X  |    |    |       | +    |
| 20       | 80  | E        | Tokat     | 1               | 40    |                    |         |             |    |    |    |       | +    |
| 21       | 62  | E        | Sivas     | 0.5             | 50    |                    |         |             | X  |    |    |       | +    |
| 22       | 63  | E        | Sivas     | 1               |       |                    |         |             |    |    |    |       | +    |
| 23       | 51  | E        | Sivas     | 1               | 35    |                    |         |             | X  |    |    |       | +    |
| 24       | 50  | E        |           | 1               | 20-30 |                    |         |             |    | X  |    |       | +    |
| 25       | 67  | E        | Tokat     | 1-2             | 10    |                    |         |             | X  |    |    |       | +    |
| 26       | 65  | E        | Tokat     | 1-2             | 40    |                    |         |             | X  |    |    |       | +    |
| 27       | 60  | E        | Sivas     | 1               | 40    |                    |         |             |    | X  |    |       | +    |
| 28       | 58  | K        | Sivas     | 1               |       |                    |         |             |    |    |    |       | +    |
| 29       | 43  | K        |           | 1               |       |                    |         |             | X  |    |    |       | +    |
| 30       | 85  | E        |           | 1               |       |                    |         |             |    |    | X  |       | +    |
| 31       | 75  | E        | Sivas     | 1               | 55    | Kardeş             |         |             | X  |    |    |       | +    |
| 32       |     | E        | Sivas     | 1               |       |                    |         |             |    | X  |    |       | +    |
| 33       | 65  | E        | Tokat     | 1               | 25    |                    |         |             |    |    | X  |       | +    |
| 34       | 68  | E        | Sivas     | 0.5             | 30    |                    | Deri    |             |    |    | X  |       | +    |
| 35       | 67  | E        |           | 0.5             | 35    |                    |         |             | X  |    |    |       | +    |
| 36       | 72  | E        | Sivas     | 1-2             | 50    |                    |         |             | X  |    |    |       | +    |
| 37       | 72  | E        | Sivas     | 1               | 60    |                    |         |             | X  |    |    |       | +    |
| 38       | 47  | E        | Sivas     | 1               | 40    |                    |         | X           |    |    |    |       | +    |
| 39       | 63  | E        | Sivas     | -               | -     |                    |         |             | X  |    |    |       | +    |
| 40       | 68  | K        | Sivas     | -               | -     |                    | Kc      |             |    |    | X  |       | +    |
| 41       | 65  | K        | Sivas     | -               | -     |                    |         |             |    | X  |    |       | +    |
| 42       | 67  | E        | Sivas     | -               | -     |                    |         |             | X  |    |    |       | +    |
| 43       | 58  | E        | Tokat     | 1               | 30    |                    |         |             |    |    | X  |       | +    |
| 44       | 67  | E        | Sivas     | 1.5             | 50    | Abla               |         |             | X  |    |    |       | +    |
| 45       | 45  | E        | Erzincan  | 1               | 25    |                    |         |             |    |    | X  |       | +    |
| 46       | 67  | E        | Sivas     | -               | -     |                    |         |             | X  |    |    |       | +    |
| 47       | 58  | E        | Tokat     | -               | -     |                    |         |             | X  |    |    |       | +    |
| 48       | 48  | E        | Tokat     | 1               | 25    |                    |         |             |    |    | X  |       | +    |
| 49       | 66  | E        | Sivas     | -               | -     | Kardeş             |         |             | X  |    |    |       | +    |
| 50       | 68  | K        | Tokat     |                 |       |                    |         |             | X  |    |    |       | +    |
| 51       | 47  | E        | Sivas     | 2               | 25    |                    |         |             | X  |    |    |       | +    |
| 52       | 56  | E        | Sivas     | 1               | 45    |                    |         |             | X  |    |    |       | +    |
| 53       | 72  | E        | Sivas     | -               | -     |                    |         |             | X  |    |    |       | +    |
| 54       | 40  | K        | Sivas     | -               | -     |                    |         |             |    |    |    |       | +    |

|    |    |   |           |       |       |     |         |  |   |   |   |   |   |   |
|----|----|---|-----------|-------|-------|-----|---------|--|---|---|---|---|---|---|
| 55 | 62 | E | Sivas     | -     | -     |     |         |  | X | X |   |   | + |   |
| 56 | 49 | E | Sivas     | 1     | 35    |     |         |  | X |   |   |   | + |   |
| 57 | 71 | E | Sivas     | 1     | 50    |     |         |  |   |   |   |   | + |   |
| 58 | 60 | E | Sivas     | -     | -     |     |         |  |   | X |   |   | + |   |
| 59 | 60 | E | Sivas     | -     | -     |     |         |  |   |   | X |   | + |   |
| 60 | 74 | K | Sivas     | -     | -     |     |         |  |   |   | X |   | + |   |
| 61 | 65 | E | Erzincan  | 1     | 30    |     |         |  |   | X |   |   | + |   |
| 62 | 64 | E | Sivas     | 1     | 40    |     |         |  |   | X |   |   | + |   |
| 63 | 51 | E | Sivas     | 1     | 30    |     |         |  |   |   | X |   |   | + |
| 64 | 55 | E | Tokat     | -     | -     |     |         |  |   |   |   |   | + |   |
| 65 | 60 | E | Şarkışla  | 1     | 30    |     |         |  |   | X |   |   | + |   |
| 66 | 41 | E | Sivas     | -     | -     |     | Larinks |  |   | X |   |   | + |   |
| 67 | 81 | E | Sivas     | 2     | 60    |     |         |  |   |   | X |   | + |   |
| 68 | 62 | E | Sivas     | 1     | 48    |     | Kemik   |  |   |   |   | X | + |   |
| 69 | 68 | E | Tokat     | -     | -     |     |         |  |   |   |   |   | + |   |
| 70 | 63 | E | Sivas     | 1,5   | 46    |     |         |  | X |   |   |   | + |   |
| 71 | 46 | E | Sivas     | 0,5   | 30    |     |         |  |   | X |   |   | + |   |
| 72 | 72 | E | Sivas     | 1     | 55    |     |         |  |   |   |   |   | + |   |
| 73 | 52 | E | Erzincan  | 1     | 35    |     |         |  |   |   |   | X |   | + |
| 74 | 52 | E | Tokat     | 1,5   | 40    |     |         |  |   |   |   | X | + |   |
| 75 | 47 | E | Sivas     | 1     | 15    |     |         |  | X |   |   |   | + |   |
| 76 | 76 | E | Sivas     | 1     | 20    |     |         |  | X |   |   |   | + |   |
| 77 | 69 | E | Yıldızeli | 1     | 30    | Abi |         |  |   |   |   |   | + |   |
| 78 | 75 | E | Sivas     | 0,5   | 25    |     |         |  |   |   |   |   |   | + |
| 79 | 72 | E | Sivas     | 0,5   | 20    |     | Meme    |  |   |   |   |   |   | + |
| 80 | 48 | E | Tokat     | 1,5-2 | 30    |     |         |  | X |   |   |   | + |   |
| 81 | 70 | E | Yıldızeli | 1-1,5 | 40-45 |     |         |  |   |   |   | X | + |   |
| 82 | 56 | E | Tokat     | 1,5   | 40    |     |         |  |   |   |   | X |   | + |

Ad (Adenokarsinom, SQ (Skvamoz hücre karsinomu), LC (Büyük hücreli karsinom), SC (Küçük hücreli karsinom), A.c (akciğer), K.c (karaciğer), Ca (kanser)

**Ek Tablo 2: Kontrollere ait veri tablosu**

| Kont. no | Yaş | Cinsiyet | Doğum Yeri | Sigara Hikayesi |     | Ailede kanser hikayesi |               | GSTMI |      |
|----------|-----|----------|------------|-----------------|-----|------------------------|---------------|-------|------|
|          |     |          |            | Paket/gün       | Yıl | Akciğer                | Diğer         | (+)   | Null |
| 1        | 40  | E        | Sivas      | 1               | 20  |                        |               | +     |      |
| 2        | 58  | E        | Ankara     | 1               | 20  |                        |               | +     |      |
| 3        | 47  | E        | Sivas      | 1               | 30  |                        |               | +     |      |
| 4        | 48  | K        | Sivas      | 1               | 29  |                        |               | +     |      |
| 5        | 48  | E        | Sivas      | 1-2             | 20  |                        |               | +     |      |
| 6        | 46  | E        | Gaziantep  | 1 den az        | 20  |                        |               | +     |      |
| 7        | 52  | E        | Kars       | 1-3             | 30  |                        |               | +     |      |
| 8        | 59  | E        | Elazığ     | -               | -   | Amca                   | Yaygın kanser | +     |      |
| 9        | 53  | E        | Erzurum    | 1               | 30  |                        | Meme          | +     |      |
| 10       | 42  | K        | Sivas      | -               | -   |                        | Uterus        | +     |      |
| 11       | 59  | K        | Tokat      | -               | -   |                        |               | +     |      |
| 12       | 43  | K        | Sivas      | 1               | 10  |                        | Mide, uterus  | +     |      |
| 13       | 57  | K        | Sivas      | -               | -   |                        |               | +     |      |
| 14       | 43  | K        | Sivas      | -               | -   |                        |               |       | +    |
| 15       | 59  | K        | Sivas      | -               | -   |                        | Mide          | +     |      |
| 16       | 48  | K        | Sivas      | -               | -   |                        |               | +     |      |
| 17       | 45  | K        | Yozgat     | -               | -   |                        |               | +     |      |
| 18       | 46  | E        | Sivas      | 1-2             | 25  |                        |               | +     |      |
| 19       | 42  | K        | Sivas      | -               | -   |                        |               | +     |      |
| 20       | 61  | K        | Sivas      | -               | -   |                        |               |       | +    |
| 21       | 53  | E        | Sivas      | 1               | 25  |                        |               | +     |      |
| 22       | 50  | K        | Sivas      | -               | -   |                        |               |       | +    |
| 23       | 63  | K        | Sivas      | -               | -   |                        |               | +     |      |
| 24       | 45  | K        | Sivas      | -               | -   |                        |               |       | +    |
| 25       | 47  | K        | Sivas      | 0,5             | 25  |                        |               | +     |      |
| 26       | 58  | K        | Sivas      | -               | -   |                        |               | +     |      |
| 27       | 57  | K        | Sivas      | 1,5             | 25  |                        |               | +     |      |
| 28       | 59  | E        | Sivas      | 1               | 40  |                        |               | +     |      |
| 29       | 51  | K        | Sivas      | -               | -   |                        |               | +     |      |
| 30       | 46  | K        | Sivas      | -               | -   |                        |               | +     |      |
| 31       | 54  | K        | Sivas      | -               | -   |                        |               |       | +    |
| 32       | 55  | E        | Sivas      | 1               | 33  |                        |               |       | +    |
| 33       | 49  | K        | Sivas      | -               | -   |                        |               | +     |      |
| 34       | 61  | K        | Erzincan   | -               | -   |                        |               | +     |      |
| 35       | 53  | K        | Samsun     | -               | -   | Kuzen                  |               |       | +    |
| 36       | 59  | E        | Tarsus     | -               | -   | Amca                   |               | +     |      |
| 37       | 54  | K        | Sivas      | -               | -   |                        |               | +     |      |
| 38       | 45  | E        | Sivas      | -               | -   |                        |               | +     |      |
| 39       | 64  | K        | Sivas      | -               | -   |                        |               | +     |      |
| 40       | 62  | K        | Sivas      | -               | -   |                        |               |       | +    |
| 41       | 56  | E        | Sivas      | -               | -   |                        |               |       | +    |
| 42       | 48  | K        | Sivas      | -               | -   |                        |               |       | +    |
| 43       | 67  | E        | Sivas      | 1               | 15  |                        |               | +     |      |
| 44       | 71  | E        | Ordu       | -               | -   |                        | Baba ?        | +     |      |
| 45       | 73  | E        | Sivas      | -               | -   |                        |               | +     |      |
| 46       | 67  | K        | Sivas      | 1 den az        | 10  |                        |               | +     |      |
| 47       | 48  | K        | Sivas      | -               | -   |                        |               | +     |      |
| 48       | 48  | K        | Tokat      | -               | -   |                        |               | +     |      |
| 49       | 70  | E        | Sivas      | 1 den az        | 15  |                        |               | +     |      |
| 50       | 70  | K        | Samsun     | -               | -   |                        |               | +     |      |
| 51       | 75  | K        | Sivas      | -               | -   |                        |               | +     |      |
| 52       | 57  | K        | Sivas      | -               | -   |                        |               | +     |      |
| 53       | 48  | E        | Sivas      | 1               | 20  |                        |               | +     |      |



|     |    |   |          |          |    |        |               |   |   |
|-----|----|---|----------|----------|----|--------|---------------|---|---|
| 54  | 57 | E | Sivas    | 1-2      | 30 |        |               | + |   |
| 55  | 48 | K | Sivas    | -        | -  |        |               | + |   |
| 56  | 47 | E | Sivas    | 1        | 25 |        |               |   | + |
| 57  | 60 | K | Sivas    | -        | -  |        |               | + |   |
| 58  | 46 | K | Sivas    | -        | -  |        |               | + |   |
| 59  | 45 | K | Sivas    | -        | -  |        | Mide CA       | + |   |
| 60  | 54 | K | Sivas    | -        | -  | Dayı   | Lösemi , mide | + |   |
| 61  | 55 | K | Tokat    | -        | -  |        |               | + |   |
| 62  | 58 | K | Tokat    | -        | -  |        |               |   | + |
| 63  | 55 | K | Tokat    | 1 den az | 15 |        |               | + |   |
| 64  | 51 | E | Sivas    | 1        | 30 |        |               | + |   |
| 65  | 44 | K | Sivas    | 1 den az | 20 |        |               | + |   |
| 66  | 58 | K | Sivas    | -        | -  |        |               | + |   |
| 67  | 45 | E | Sivas    | -        | -  |        |               | + |   |
| 68  | 46 | K | Erzincan | 1 den az | 4  |        |               |   | + |
| 69  | 46 | K | Yozgat   | -        | -  |        |               | + |   |
| 70  | 60 | E | Sivas    | -        | -  |        |               | + |   |
| 71  | 46 | E | Sivas    | -        | -  |        |               | + |   |
| 72  | 50 | K | Sivas    | -        | -  |        |               | + |   |
| 73  | 59 | K | Sivas    | -        | -  |        |               |   | + |
| 74  | 58 | K | Sivas    | -        | -  |        |               |   | + |
| 75  | 72 | K | Sivas    | -        | -  |        |               | + |   |
| 76  | 50 | K | Sivas    | Az       | 2  |        |               | + |   |
| 77  | 47 | K | Sivas    | -        | -  |        |               | + |   |
| 78  | 52 | E | Sivas    | 1        | 30 |        |               | + |   |
| 79  | 68 | K | Sivas    | -        | -  |        | Mide          | + |   |
| 80  | 57 | E | Sivas    | 1        | 20 |        |               | + |   |
| 81  | 45 | E | Sivas    | -        | -  |        |               | + |   |
| 82  | 46 | K | Sivas    | Az       | 6  |        |               | + |   |
| 83  | 48 | K | Sivas    | -        | -  |        |               |   | + |
| 84  | 50 | E | Sivas    | 1-2      | 30 |        |               | + |   |
| 85  | 65 | K | Sivas    | -        | -  |        |               | + |   |
| 86  | 45 | K | Sivas    | -        | -  | Baba   |               | + |   |
| 87  | 50 | E | Sivas    | 1-2      | 15 | Baba   |               | + |   |
| 88  | 51 | K | Sivas    | -        | -  |        |               | + |   |
| 89  | 46 | E | Sivas    | 1-2      | 25 |        |               | + |   |
| 90  | 43 | E | Sivas    | Az       | 20 |        |               |   | + |
| 91  | 54 | E | Yozgat   | -        | -  |        |               | + |   |
| 92  | 46 | E | Sivas    | 1        | 35 |        |               | + |   |
| 93  | 57 | E | Sivas    | Az       | 35 |        |               | + |   |
| 94  | 72 | E | Sivas    | 1-2      | 60 | Kardeş |               | + |   |
| 95  | 42 | K | Ardahan  | -        | -  |        |               | + |   |
| 96  | 41 | K | Sivas    | 1        | 20 |        |               | + |   |
| 97  | 45 | E | Sivas    | -        | -  |        |               | + |   |
| 98  | 61 | E | Sivas    | 1-2      | 25 |        |               | + |   |
| 99  | 53 | E | Sivas    | 1        | 35 |        |               |   | + |
| 100 | 54 | K | Tokat    | -        | -  |        |               | + |   |
| 101 | 45 | E | Sivas    | -        | -  |        |               | + |   |
| 102 | 55 | E | Sivas    | 1        | 6  |        | Kardeş ?      | + |   |
| 103 | 48 | E | Sivas    | -        | -  |        |               |   | + |
| 104 | 48 | K | Sivas    | -        | -  |        |               | + |   |
| 105 | 60 | E | Sivas    | -        | -  |        |               | + |   |
| 106 | 46 | E | Sivas    | -        | -  |        |               | + |   |
| 107 | 62 | E | Sivas    | 1        | 30 |        |               | + |   |
| 108 | 74 | K | Sivas    | -        | -  |        |               | + |   |
| 109 | 49 | K | Sivas    | 1        | 10 |        |               | + |   |
| 110 | 60 | K | Sivas    | -        | -  |        |               | + |   |
| 111 | 57 | E | Sivas    | 1-2      | 43 |        |               | + |   |

|     |    |   |             |    |       |      |                 |   |   |
|-----|----|---|-------------|----|-------|------|-----------------|---|---|
| 112 | 52 | K | Sivas       | -  | -     |      |                 | + |   |
| 113 | 55 | K | Sivas       | -  | -     |      |                 | + |   |
| 114 | 45 | K | Sivas       | -  | -     |      | Kolon           |   | + |
| 115 | 46 | E | Sivas       | -  | -     |      | Anne ?          | + |   |
| 116 | 46 | K | Sivas       | -  | -     |      |                 | + |   |
| 117 | 51 | K | Sivas       | -  | -     |      |                 | + |   |
| 118 | 63 | K | Erzincan    | -  | -     |      |                 | + |   |
| 119 | 43 | K | Sivas       | Az | 6     |      |                 | + |   |
| 120 | 51 | E | Sivas       | 1  | 40    |      |                 | + |   |
| 121 | 49 | K | Sivas       | -  | -     |      |                 | + |   |
| 122 | 38 | K | Sivas       | -  | -     |      |                 | + |   |
| 123 | 46 | K | Sivas       | -  | -     |      |                 | + |   |
| 124 | 64 | E | Sivas       | -  | -     |      |                 |   | + |
| 125 | 43 | K | Sivas       | -  | -     |      |                 | + |   |
| 126 | 51 | E | Sivas       | 1  | 30    |      |                 | + |   |
| 127 | 70 | E | Sivas       | -  | -     |      |                 | + |   |
| 128 | 67 | K | Sivas       | -  | -     |      |                 | + |   |
| 129 | 41 | K | Sivas       | -  | -     |      |                 | + |   |
| 130 | 64 | K | İzmir       | 1  | 40    |      | Meme            | + |   |
| 131 | 58 | E | Sivas       | 1  | 50    |      |                 | + |   |
| 132 | 52 | E | Şarkışla    | 1  | 25    |      | Gırtlak         | + |   |
| 133 | 48 | K | İmranlı     |    |       |      |                 | + |   |
| 134 | 45 | K | Divriği     |    |       |      |                 | + |   |
| 135 | 45 | K | Akdağmadeni | 1  | 20    |      |                 | + |   |
| 136 | 55 | K | Sivas       |    |       |      |                 | + |   |
| 137 | 48 | E | Akdağmadeni | 1  | 20    |      |                 | + |   |
| 138 | 62 | E | Yıldızeli   | 1  | 40    |      |                 | + |   |
| 139 | 68 | K | Sivas       | -  | -     |      |                 | + |   |
| 140 | 47 | E | Tokat       | 1  | 30    |      | Deri            | + |   |
| 141 | 43 | K | Divriği     | -  | -     |      |                 | + |   |
| 142 | 47 | E | Reşadiye    | 1  | 30    |      |                 | + |   |
| 143 | 55 | E | Kangal      | -  | -     |      |                 | + |   |
| 144 | 60 | K | Elazığ      | -  | -     |      |                 | + |   |
| 145 | 44 | K | Yıldızeli   | -  | -     | Dayı |                 | + |   |
| 146 | 66 | K | Kangal      | -  | -     |      |                 | + |   |
| 147 | 49 | K | Sivas       | -  | -     | Dayı | Lenfoma,gırtlak | + |   |
| 148 | 51 | E | Yıldızeli   | -  | -     |      |                 | + |   |
| 149 | 54 | E | Sivas       | 1  | 35    |      | Oğlu ?          | + |   |
| 150 | 49 | K | Sivas       | -  | -     |      |                 | + |   |
| 151 | 50 | K | Sivas       | -  | -     |      |                 | + |   |
| 152 | 47 | K | Zara        | -  | -     |      |                 | + |   |
| 153 | 52 | K | Konya       | -  | -     |      | Meme            | + |   |
| 154 | 43 | K | Yıldızeli   | -  | -     |      | Mide            | + |   |
| 155 | 50 | K | Tokat       | -  | -     |      |                 | + |   |
| 156 | 41 | E | Şarkışla    | 1  | 20    |      |                 |   | + |
| 157 | 50 | K | Sivas       | 1  | 2     |      |                 |   | + |
| 158 | 63 | E |             | -  | -     |      |                 | + |   |
| 159 | 57 | K | Zara        | -  | -     |      |                 |   | + |
| 160 | 65 | E | Tokat       | 1  | 20-25 |      |                 | + |   |
| 161 | 57 | K | Koyulhisar  | -  | -     |      |                 | + |   |
| 162 | 60 | E | Tokat       | 1  | 29    |      |                 |   | + |
| 163 | 48 | E | Koyulhisar  | -  | -     |      |                 |   | + |
| 164 | 49 | E | Sivas       | -  | -     |      |                 | + |   |
| 165 | 62 | K | Gürün       | -  | -     |      |                 | + |   |
| 166 | 68 | K |             | -  | -     |      |                 |   | + |
| 167 | 60 | E | Sivas       | 2  | 19    |      |                 |   | + |

## ÖZGEÇMİŞ

1963 yılında Merzifon/Amasya' da doğdu. İlk ve orta ve lise öğrenimini Merzifon' da tamamladı. 1986 yılında Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden mezun oldu. 1987 yılında Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'nda yüksek lisans öğrenimine başladı ve 1989 yılında "**Dimetilnitrozamin' in *Proteus vulgaris'* in üreme hızı ile L-Asparajinaz ve Proteaz enzim aktiviteleri üzerine etkisi**" adlı tez ile yüksek lisans öğrenimini tamamladı. Aynı yıl Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'nda doktora yapmaya başladı. 1991 yılında yeterlilik sınavını aşarak, doktorasını tamamlayamadan 1992 yılında yeni bir doktora yapmak üzere yurtdışında görevlendirildi. 1996 yılında "Sheffield University,, Molecular Biology and Biotechnology" bölümünde "**Protein Engineering of the *AquI* DNA Methyltransferase**" adlı tez ile doktorasını tamamladı ve yurda döndü. Halen Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'nda çalışmaktadır.