

KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**KRONİK AKTİF HEPATİT B HASTALARINDA HİSTOPATOLOJİK
FİBROZİS EVRELERİ İLE GLUTATYON S TRANSFERAZ
İZOZİMLERİNİN EXPRESYONLARININ KARŞILAŞTIRILMASI**

ERGÜN EROĞLU

OCAK 2020

Biyoloji Anabilim Dalında Ergün EROĞLU tarafından hazırlanan “KRONİK AKTİF HEPATİT B HASTALARINDA HİSTOPATOLOJİK FİBROZİS EVRELERİ İLE GLUTATYON-S-TRANSFERAZ İZOZİMLERİNİN EXPRESYONLARININ KARŞILAŞTIRILMASI ” adlı Yüksek Lisans Tezinin anabilim dalı standartlarına uygun olduğunu onaylıyorum.

Prof. Dr. Aysun ERGENE
Anabilim Dalı Başkanı

Bu tezi okuduğumu ve tezin **Yüksek Lisans Tezi** olarak bütün gereklilikleri yerine getirdiğini onaylıyorum.

Prof. Dr. Serpil OĞUZTÜZÜN
Danışman

Jüri Üyeleri:

Başkan : Doç. Dr. Metin KONUŞ _____
Üye (Danışman) : Prof. Dr. Serpil OĞUZTÜZÜN _____
Üye : Prof. Dr. Nazife YİĞİT KAYHAN _____

.../.../.....

Bu tez ile Kırıkkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu Yüksek Lisans derecesini onaylamıştır.

Prof. Dr. Recep ÇALIN
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ÖZET

KRONİK AKTİF HEPATİT B HASTALARINDA HİSTOPATOLOJİK FİBROZİS EVRELERİ İLE GLUTATYON S TRANSFERAZ İZOZİMLERİNİN EXPRESYONLARININ KARŞILAŞTIRILMASI

EROĞLU, Ergün

Kırıkkale Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Prof. Dr. Serpil OĞUZTÜZÜN

Ocak 2020, 43 sayfa

Bu çalışmada, kronik aktif hepatit B hastalarında histolojik fibrozis evreleri ile glutatyon s-transferaz izozimlerinin ekspresyonlarının karşılaştırılması GSTP1 izoenziminin olası etkisini immünohistokimyasal boyama ile araştırdık. Yapılan çalışmada elli dokuz hepatit B dokusunda , GSTP1 (P1) izoziminin immünohistokimyasal bulguları değerlendirildi. Bu hastalara ait dokular boyanma şiddetine göre karşılaştırıldığında Hepatit B dokularının GSTP1(P1) izoziminin protein ekspresyonunun viral hepatit karaciğer dokularında yüksek düzeyde ekspresyon göstermiştir. Bu bulgulara göre GSTP1 izoziminin viral Hepatit B hastalığının gidişatında önemli rol oynayabileceği gösterilmiştir.

Anahtar kelimeler: Hepatit B, GSTP1, immünohistokimya

ABSTRACT

COMPARISON OF THE EXPRESSIONS OF GLUTATHIONE- S -TRANSFERASE ISOENZYMES WITH HISTOPATHOLOGICAL FIBROUS STAGES IN CHRONIC ACTIVE HEPATITIS B PATIENTS

EROĞLU, Ergün

Kırıkkale University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology, Master Thesis

Advisor: Prof. Dr. Serpil OĞUZTÜZÜN

January 2020, 43 pages

In this study, histological fibrosis stages and expression of glutathione S-transferase (GST) pi isoenzyme in chronic active hepatitis B patients were compared and the possible effect of GSTPi isoenzyme was investigated by immunohistochemical staining method. In the study, immunohistochemical findings of GSTPi (GSTP1) isoenzyme were evaluated from fifty-nine liver tissue of hepatitis B patients. When the tissues of these patients are compared according to the staining intensity, protein expression of the GSTP1 isozyme showed high levels of expression in the liver tissues of viral hepatitis B patients.

According to these findings, it was shown that GSTP1 isozyme may play an important role in the development of viral hepatitis B disease.

Key Words: Hepatit B, Liver tissue, GSTP1, immunohistochemistry

TEŐEKKÖRLER

Tanıdığım andan itibaren karşılaştığım her zorlukta yanımda olan bilgi ve tecrübesi ile bana yön veren, tez çalışmamın her zeresinde tecrübelerinden yararlandığım bilgisi ve yönlendirmesi ile bana yardımcı olan sayın hocam Prof. Dr. Serpil OĞUZTÖZÜN' e teşekkürlerimi sunarım.

Hayatımın her anında yanımda olan sevgisini, sabrını ve yardımlarını esirgemeyen değerli eşim Fahriye EROĞLU' na, biricik oğluma ve kıymetli aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜRLER	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ÇİZELGELER	vi
ŞEKİLLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	viii
1. GİRİŞ	1
1.1. HEPATİT B.....	1
1.1.1. Virolojik Özellikler ve Sınıflandırma	1
1.1.2. Epidemiyoloji.....	2
1.1.3. Risk Grupları ve Bulaşma Yolları	2
1.1.4. Hepatit B Histopatolojik Tanısı	3
1.2. KARACİĞER.....	3
1.2.1. Karaciğer Morfolojisi	3
1.2.2. Karaciğerin İşlevleri	4
1.2.3. Karaciğer Fizyolojisi.....	4
1.2.4. Karaciğer Enzimleri.....	6
1.2.5. Karaciğer Hasarı	6
1. 2. 6. Karaciğerde Rejenerasyon	7
1.3. SERBEST RADİKALLER	8
1.3.1. Antioksidanlar.....	9

1.3.2. Antioksidan Savunma Sistemleri.....	9
1.3.3. Oksidatif Stres ve Hastalıkla İlişkisi.....	10
1.4. GLUTATYON	10
1.4.1. Glutasyon ve Glutasyon S Transferaz	11
1.4.2. GST'lerin Substratları	11
1.4.3. GST'lerin Sınıflandırılması	12
1.4.4. GST Pİ Sınıfı	14
1.4.5. GST Alfa sınıfı.....	14
1.4.6. GST Mü sınıfı	14
1.4.7. GST Teta sınıfı.....	15
1.4.8. GST Omega Sınıfı	15
1.4.9. GST Kappa Sınıfı.....	16
1.4.10. Glutasyon-S Transferaz ve Hepatit B.....	16
1.5. ÇALIŞMANIN AMACI.....	17
2. MATERYAL VE YÖNTEM.....	19
2.1. MATERYAL.....	19
2.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	19
2.1.2 Kullanılan Cihazlar	20
2.2. KULLANILAN YÖNTEM.....	21
2.2.1. Hasta Dokularının Toplanması ve Klinik Bilgiler	21
2.2.2. İstatistiksel Analiz.....	21
3. BULGULAR	22
3.1. GSTP1 İN KRONİK HEPATİT B Lİ KARACİĞER DOKULARINDAKİ PROTEİN İFADESİ.....	28
4. TARTIŞMA VE SONUÇ	33
KAYNAKLAR	35

ÇİZELGELER

<u>ÇİZELGE</u>	<u>Sayfa</u>
Çizelge 1.1. GST “lerin substratları	12
Çizelge 1.2. GST izozimleri ve buldukları organlar	13
Çizelge 3.3. Hastaların kategorize edilmiş demografik özellikleri	22
Çizelge 3.4. Hastaların yaş özellikleri.....	23
Çizelge 3.5. Hasta dokularının immünohistokimyasal GSTPi boyanma düzeyleri ...	24
Çizelge 3.6. Hastaların demografik özelliklerine göre immünohistokimyasal GSTPi boyanma düzeyleri	25
Çizelge 3.7. Dokuların immünohistokimyasal GSTPi boyanma düzeylerinin hastaların yaşları ile korelasyon analizleri	26
Çizelge 3.8. Hastaların ortalama ALT ve AST düzeyleri	26
Çizelge 3.9. Hastaların ALT ve AST düzeyleri ile karaciğer dokularının immünohistokimyasal GSTPi boyanma düzeyleri.....	27
Çizelge 3.10. Hastaların HBV DNA düzeyleri ile dokuların immünohistokimyasal GSTPi boyanma düzeyleri	28

ŞEKİLLER

ŞEKİL

Sayfa

Şekil 3.1. Kronik Hepatit B li karaciğer dokularında immunohistokimyasal GSTP1 proteini (Hepatositlerde proteinin ifadesi (++) , 20X)	29
Şekil 3.2. Kronik Hepatit B li karaciğer dokularında immunohistokimyasal GSTP1 proteini (Hepatositlerde proteinin ifadesi (++) , 40X)	29
Şekil 3.3. Kronik Hepatit B li karaciğer dokularında immunohistokimyasal GSTP1 proteini (Hepatositlerde proteinin ifadesi (+) , 20X)	30
Şekil 3.4. Kronik Hepatit B li karaciğer dokularında immunohistokimyasal GSTP1 proteini (Hepatositlerde proteinin ifadesi (+) , Portal alan (-) 40X)	30
Şekil 3.5. Kronik Hepatit B li karaciğer dokularında immunohistokimyasal GSTP1 proteini (Hepatositlerde proteinin ifadesi (-) ,40X)	31
Şekil 3.6. Kronik Hepatit B li karaciğer dokularında immunohistokimyasal GSTP1 proteini (Hepatositlerde proteinin ifadesi (-) ,20X)	32

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

GSH : γ - Glutamil Sisteinil Glisin = Glutasyon

GST : Glutasyon S-Transferaz

WHO : Dünya Sağlık Örgütü

HBV : Hepatit B virüsü



1. GİRİŞ

Dünya nüfusunun her geçen gün artması hastalıklara yakalanma riskimizde aynı oranda artırmaktadır. Çünkü artan nüfusun doğal kaynakları aşırı ve yanlış kullanması, tahrip etmesi sonucunda çevrede dengenin olumsuz yönde bozulması daha çok serbest radikallerle karşılaşmamıza neden olmaktadır. Bu serbest radikaller bir çok hastalığa sebep olmaktadır bunlardan bir tanesi de karaciğer yapısında gerçekleşen Kronik Hepatit B hastalığıdır.

1.1. HEPATİT B

Hepatit B uzun yıllar öncesinden zamanımıza kadar var olan genellikle halk arasında “sarılık” olarak adlandırılan bir hastalıktır. Hepatit B hastalığı kan yoluyla bulaşmaktadır. Hepatit B edinilen en eski bilgilere göre Hipokrat tarafından “epidemik sarılık” olarak anılmış ve bulaşıcı olabileceği düşüncesi ile önlemler alınmıştır [1,2]. Kayıt altına alınan en büyük hepatiti salgını 1942 yılında, insan serumu içeren sarı humma aşısı yapılan 50 bin askerde sarılık gözlenmesi ile rapor edilmiştir [3]. II. Dünya Savaşı sırasında gerçekleşen bu salgınlarda karaciğerdeki enfeksiyonların virüsler sebebiyle olduğu düşünülerek “viral hepatit” terimi kullanılmıştır [4]. 1965 yılında Blumberg ve arkadaşları tarafından Avustralya’lı bir hastanın kanından “Avustralya antijeni” adı verilen serum proteini (HBsAg) keşfedilmiş ve HBV’nin tanınmasında ilk adım olan bu buluş Blumberg’e 1976 yılında Nobel ödülünü kazandırmıştır [1, 2, 3].

1.1.1. Virolojik Özellikler ve Sınıflandırma

HBV, hepadnaviridae ailesinin orthohepadnavirüs cinsinde yer alır. Hepatotropik, zarflı, kısmi çift iplikli, çembersel DNA virüsüdür [1,5,6]. Bilinen en küçük DNA virüsüdür [6]. Viral genom 3200 nükleotid uzunluğundadır ve rcDNA (relaxed circular) olarak adlandırılır [7]. İkozehedral bir kapsid içinde bulunur ve bu kapsidin dışında da 3 farklı yüzey antijenini taşıyan lipid yapılı zarf vardır. Zarflı bir virüs olmasına rağmen diğer zarflı virüslerden farklı olarak eter, düşük pH ve

ısıya dirençlidir. Bu özellik virüsün dezenfektanlara direncine ve kişiden kişiye geçişteki etkinliğine katkı sağlar [8]. DNA virüsü olmasına karşın “revers transkriptaz (RT)” enzimi kodlar ve bu sayede RNA üzerinden replike olur [7].

1.1.2. Epidemiyoloji

Hepatit B enfeksiyonu dünyada sıklıkla görülen önemli bir sağlık sorunudur. Dünya sağlık örgütü (WHO); dünya nüfusunun yaklaşık üçte birinin (2 milyar kişi) HBV ile enfekte olduğunu belirtmektedir [1]. Bunların yaklaşık 240 milyonunun kronik HBV taşıyıcısı olduğu tahmin edilmektedir [9]. HBV enfeksiyonu; akut hepatit, kronik hepatit, fulminan hepatit, siroz, hepatoselüler karsinoma (HSK) gibi geniş tablolara neden olur. Kronik hepatit B enfeksiyonu olan kişilerin hayatları boyunca yaklaşık %15-40 oranında karaciğer sirozu, karaciğer yetmezliği ve karaciğer kanseri gibi komplikasyonlar gelişme riski bulunmaktadır (1,10,3). Dünyada yaklaşık olarak her yıl 600 bin ile 1 milyon arasında kişi HBV’ne bağlı bu komplikasyonlar nedeniyle yaşamını yitirmektedir [1,9,11].

1.1.3. Risk Grupları ve Bulaşma Yolları

HBV nin bulaşmasında kronik HBV taşıyıcıları ve akut HBV geçirmiş olanlar önemli rol almaktadır. En yüksek risk grubu sağlık çalışanları, bakımevlerinde kalanlar sık kan transfüzyonu yapılanlar, hemodiyaliz hastaları, damar içi uyuşturucu madde kullanıcıları, çok partnerli cinsel ilişki ve homoseksüeller, HIV/HCV koenfekte hastalar yer almaktadır. Bu hastalarda HBsAg taraması önerilmektedir [12].

HBV virüsü dört farklı yolla bulaşmaktadır: perinatal (enfekte anneden yenidoğana bulaşma/vertikal bulaşma), cinsel temas, perkutan (enfekte vücut sıvıları ile parenteral temas ile bulaşma), horizontal (enfekte kişilerle cinsellik içermeyen yakın temas ile bulaşma) [13,11,14]. Son yıllarda HBV’nin sağlık

uygulamaları yoluyla bulaşma yani “nozokomiyal bulaşma” da tanımlanmaktadır [13,11].

1.1.4. Hepatit B Histopatolojik Tanısı

Karaciğer biyopsisi; karaciğerde meydana gelen nekroinflamasyon ve fibrozis düzeyini belirlemek ve tedavi kararını vermek ve başka karaciğer hastalıklarını ayırt etmek için kullanılan invaziv yöntemdir. Tarihte ilk karaciğer biyopsini 1883 yılında Paul Ehrlich tarafından Almanya da alınmıştır [15]. Genellikle perkütan KC biyopsi tekniği kullanılmaktadır. Perkütan biyopsi; palpasyon/perküsyon ile kör biyopsi, USG ile işaretli biyopsi ve görüntüleme eşliğinde biyopsi şeklinde yapılabilir [15]. Günümüzde genellikle perkütan biyopsi tekniği daha az komplikasyon riski ve daha iyi sonuç elde edilmesi nedeniyle artan sıklıkta kullanılmaya başlanmıştır [16]. Karaciğer hasarının biyokimyasal göstergesi olarak genellikle alanin aminotransferaz (ALT) ve beraberinde aspartat aminotransferaz (AST) kullanılmaktadır.

1.2. KARACİĞER

1.2.1. Karaciğer Morfolojisi

Karaciğer organı karın boşluğunda mide ile bağırsağın üstünde diyaframın altında yer almaktadır. Vücudumuz da bulunan ikinci en büyük organdır. Aynı zamanda vücudumuzun en büyük bezidir. Ayrıca sindirim sistemine yardımcı bezdir [17]. Karaciğer, safra kanalları yoluyla safrayı duodenuma boşalttığından ekzokrin; glikoproteinler, fibrinojen, protrombin, albumin, globulinler gibi proteinleri ve glikoz sentezlemesi ve bu maddeleri kana doğrudan doğruya vermesinden dolayı endokrin bir bezdir [18].

1.2.2. Karaciğerin İşlevleri

Karaciğerin işlevlerini aşağıdaki şekilde sıralayabiliriz [19].

- a. Vücuttaki toksik etkiyi ortadan kaldırır.
- b. Kandaki besin maddeleri depolanır yada işlenir.
- c. Glikoz, glikojene çevrilir ve depolanır. Glikoza ihtiyaç olduğu zaman glikojen parçalanır ve kana glikoz salgılanır.
- d. Bakteri ve yıpranmış kırmızı kan hücrelerini fagosite eder.
- e. Safra salgılar ve yağların yakımını gerçekleştirir.
- f. Aminoasitleri, yağ asidine ve üreye çevirir.
- g. Protein, karbonhidrat ve yağların metabolizmasında birçok önemli fonksiyonu yerine getirilmesinden sorumludur.
- h. Vücuttaki kanı depolar.
- i. Karaciğer vücudun savunma sistemini destekler.

Karaciğerin önemli görevlerinden biriside vücudun ihtiyaç duyduğu enerji kaynaklarını üretmesidir. Glikozu vücudun ihtiyacı olduğu seviyede üretir. Kandaki glikoz oranı kontrol eder glikozu glikojene çevirir. Karaciğer de depolanmasını sağlar. Kandaki glikoz oranı azaldığında karaciğer depolamış olduğu glikojeni glikoza çevirerek kandaki glikoz miktarının azalmasını engellemiş olur.

Karaciğer önemli özelliklerinden biriside kendi kendini onarabilmesidir. Bir kısmı zarar gördüğünde veya tahrip olduğunda kalan diğer hücreler tahrip olan kısmı onararak eksik kısmı tamamlar. Ölen hücreleri karaciğerden uzaklaştırır ve eksik kalan kısmı tamamlar.

1.2.3. Karaciğer Fizyolojisi

Vitaminlerin ve besin maddelerinin kan dolaşımından alınmasından, dağıtılmasından ve depolanmasından karaciğer sorumludur. Bunların yanı sıra çok düşük dansiteli lipoprotein (VLDL) seviyelerini de düzenler. Ayrıca kan glukoz düzeylerini korur. Plazma proteinleri üretilmesine ve sağılanmasına sağlar.

Karaciğer çok sayıda toksik maddeleri bağlar ve indirger, ama aşırı miktardaki toksik madde tarafından harap edilebilir. Karaciğer, dolaşımdaki plazma proteinlerinin çoğunu üretir. Bunların başlıcaları [20]:

Non-immün α - ve β - globülinler: plazma kolloid ozmatik basıncının korunmasına yardımcı olur ve değişik maddelerin taşıyıcı proteini olarak rol oynar.

Albumin: plazma kolloid ozmotik basıncını koruyarak plazma hacminin ve doku sıvı dengesinin düzenlenmesini sağlar.

Protrombin ve fibrinojen: kan pıhtılaşmasında görev alan önemli bileşiklerdir.

Lipoproteinler: Karaciğerde VLDL yüksek seviyede sentezlenir, bunlar trigliseritlerin karaciğerden diğer organlara taşınmasına yardımcı olur.

Glikoproteinler: demir taşınımından sorumlu proteinlerdir.

Karaciğer, çeşitli vitaminleri depolar ve bunlar biyokimyasal olarak modifiye edilirler. Bu vitaminlerden bazıları [21]:

K Vitamini: İnce bağırsaktaki bakteriyel flora tarafından sentezlenir ve vücuda diyetel olarak alınmasından sonra burada hızlı şekilde absorbe edilip, daha sonra VLDL ile salgılanır.

A Vitamini: karaciğer A vitamininin depolanmasından, alınmasından ve dolaşım düzeylerinin korunmasında önemli bir rol oynar.

D Vitamini (kolekalsiferol): D vitamini, A vitamininden farklı olarak karaciğerde depolanmaz, fakat yağ dokusuna ve iskelet kaslarına dağılır. Fosfat ve kalsiyum mekanizmasında önemli bir vitamindir. Bunun yanı sıra karaciğer, demir dengesini ayarlamak ve düzenlemekten de görevlidir. Demirin büyük bölümü karaciğerde ferritin şeklinde depo edilir. Karaciğer hücrelerinde, demirle birleşebilen apoferritin adında bir protein bulunmaktadır. Vücut sıvılarında demir

miktarı arttığı zaman, apoferritinle birleşerek ferritini oluşturur ve gerektiğinde başka yerde kullanılmak üzere saklanır. Vücut sıvılarında demir miktarı düştüğü zaman ferritin demiri serbest bırakır. Böylece, karaciğerdeki apoferritin-ferritin sistemi bir demir deposu görevi yaptığı gibi kan demirinin tamponu işlevini de yürütür [22].

1.2.4. Karaciğer Enzimleri

Karaciğerdeki hücre hasarı hakkındaki genel bilgiyi ALT, AST veya AGT VE GGT enzim aktivitelerine bakılarak anlaşılmaktadır [23]. ALT ve AST değerleri karaciğer hasarının belirlenmesinde ayrı bir önem taşır. Tüm karaciğer hastalıklarında, serum ALT ve AST düzeylerinde yükselme gözlenir. İlerlemiş hücre nekrozuna sebep olan durumlarda daha belirgin düzeylerde yükselme meydana gelir [24].

1.2.5. Karaciğer Hasarı

Farklı tiplerde mikrobik, toksik, metabolik, neoplastik ve dolaşım hastalıkları karaciğeri etkiler. Alkolizm, kanser ve kalp yetmezliği gibi birçok hastalık da karaciğeri hasara uğratar. Karaciğerin depo özelliği olmasından dolayı, karaciğer bozukluklarının anlaşılması bir süre belirgin olmayabilir, fakat hasarın belirgin olduğu durumlarda karaciğer parankiminin ilerleyici kaybı ve safra akışının çeşitli sebeplerle engellenmesi sonucu karaciğer fonksiyonları ciddi derecede etkilenebilir [23]

Karaciğerin hasara karşı beş adet cevap şekli vardır:

-İnflamasyon: İnflamasyon parankimde yayılabileceği gibi lökositlerin giriş bölgesiyle sınırlı olabilir. Karaciğere gelen inflamatuvar hücrelerin hepatosit hasarına hepatit adı verilir. İnflamasyonu hepatosit apoptozisi ya da nekrozu izleyebilir ancak ters durum olarak iyileşme de görülebilir. Kupffer hücreleri hepatositlerin nekroza uğramaları ile ölü hücreleri fagosite ederler ve bunun sonucunda parankim içerisinde inflamatuvar hücre grupları oluştururlar [26].

-Dejenerasyon: Hüresel şişme, balonlaşma dejenerasyonu olarak adlandırılır. Atılamayan safra, bakır ve demir gibi bazı maddeler de canlı hepatositlerde birikebilir [23].

-Nekroz: Canlı organizmada bir hücre grubunun ve lokal dokunun ölümü sonucu meydana gelen lezyona nekroz denir. Nekroz ağır bir hücre zedelenmesi sonucu oluşabilir [26].

-Fibrozis: Doğrudan toksik hasar veya inflamasyona cevap olarak fibrotik doku oluşur. Fibrozis başlangıç döneminde portal bölgenin çevresinde, içinde veya sentral venler çevresinde gelişebilir veya sinüzoidler içinde depolanabilir. Fibröz bantlar zamanla karaciğerin çeşitli bölgelerini birleştirir ve bu olay 'köprüleşme fibrozisi' olarak adlandırılır [26].

-Siroz: Karaciğerin anatomik yapısının nodülleşme ve fibrozis sonucu bozulmasıdır. İleri düzey bir karaciğer hastalığıdır. Batı ülkelerinde başta gelen 10 ölüm nedeninden biridir. Kronik karaciğer hastalığının bu son dönemi üç karakteristik özellik ile tanımlanabilir [26].

1. 2. 6. Karaciğerde Rejenerasyon

Karaciğer, rejenerasyonu fazla olan bir organdır. Karaciğer dokusunun cerrahi yolla ya da toksik ajanlarla kaybedilmesi durumunda, karaciğer hücrelerinin bölünmesini başlatan ve dokunun orjinal kitlesi oluşuncaya kadar devam eden bir süreci meydana getirir. Sıçanlarda karaciğerin % 75'i çıkarılırsa bir ayda kaybedilen dokunun yenilendiği görülür. Fakat insanda bu düzeyde bir gelişme görülemez [18]. Doku çıkarılması gibi durumlarda şalon miktarının düşmesine bağlı olarak hızlı bir mitoz olayı başlar. Kanda dolaşan şalon denen mitoz inhibitörleri ile karaciğerdeki mitoz olayı kontrol edilir ve şalon miktarının artması rejenerasyon ilerledikçe devam eder, bunun sonucunda da mitotik aktivite azalır ve biter [18]. Büyüme faktörü ve sitokinler karaciğer rejenerasyonunda önemli rol oynarlar. Bu faktörler şunlardır:

- 1) **Epidermal büyüme faktörü (EGF)** : Hepatositlerde DNA sentezini uyardığı belirlenen ilk faktördür [28].
- 2) **Hepatosit büyüme faktörü (HGF)** : Plazma ve birçok dokudaki protein yapısında bulunan bir büyüme faktörüdür [27]. D-galaktozamin ve karbon tetraklorür gibi toksik maddeler de karaciğer nonparankimal hücrelerinde HGF artışına neden olur [28].
- 3) **TNF- α ve IL-6**: IL-6 gen delesyonu ve TNF- α ve reseptör eksikliği olan koyunlarda karaciğer DNA sentezinin bozulduğu saptanmıştır [29].
- 4) **Transforme edici büyüme faktörü alfa (TGF- α)** : EGF ile benzer reseptörleri etkileyen ve rejenerasyonun başlangıç safhasından sonra rol aldığı belirtilmektedir [28].
- 5) **Norepinefrin**: EGF'yi arttırarak indirekt yolla, α 1-adrenerjik reseptör yoluyla direkt karaciğer rejenerasyonunu arttırır [29].
- 6) **Diğerleri**: Karaciğer rejenerasyonunda en önemli inhibitör TGF- β 1' dir. Ayrıca bunun yanında retinoik asit, triiyodotironin, vasküler endotel büyüme faktörleri (VEGF), fibroblast büyüme faktörleri (FGF), ilaçlar, büyüme hormonu, siklosporin, vazopressin gibi faktörlerin karaciğer rejenerasyonunda olumlu yönde önemli rol oynadığı belirtilmektedir [30].

1.3. SERBEST RADİKALLER

Dış orbitallerinde tek sayıda elektron taşıyan, molekül veya atomlara serbest radikal denilmektedir [31]. Serbest radikaller, kısa ömürlü ve reaktiftirler. Elektriksel olarak; pozitif, negatif ve nötral yüklere sahiptirler [32]. Yüksek enerjiye sahip olan elektronlar çevrelerindeki elektronları ayırıp yapısını bozar, bu durum serbest radikalleri hem kullanışlı kılmaktadır hem de tehlikeli [33].

Bütün hücrelere kolaylıkla girebilen herhangi bir zorlukla karşılaşmayan en çok kullanılan madde moleküler oksijendir. Aerobik canlılar için ise serbest radikallerin en önemli kaynaklarından birisi oksijendir.

Çeşitli araştırmalarda, serbest radikallerin birçok dejenerasyona ve yaşlanmaya yol açtığı saptanmıştır [34].

1.3.1. Antioksidanlar

Oksijenli yaşama geçiş ile anaerobik yaşam formları; ya adapte olmuşlar, ya ölmüşler, ya da oksijensiz yerlere göç etmişlerdir. Oksijenli yaşama geçiş döneminde anaerobik yaşam formları buldukları duruma ya adapte olmuşlar ya oksijensiz ortama göç etmişler ya da ölmüşlerdir. Adapte olanlar kendilerini oksijenin zararlı etkilerinden koruyabilmek için antioksidan savunma mekanizmalarını geliştirmişlerdir.(aerobik organizmalar) [35].

Antioksidanlar lipitleri, proteinleri, nükleik asitleri ve diğer hedef makromolekülleri koruyucu etkileri olduğu bilinmektedir. Antioksidan etki mekanizmalarına bakıldığında tutucu ('scavenger'), baskılayıcı ('quencher'), onarıcı ve zincir kırıcı etkiler bulunur [38,39].

Antioksidanlar hasar oluşmadan önce radikal oluşumunu engeller, oksidatif hasarı onarır, hasara uğrayan molekülleri temizler ve mutasyonu engeller.

1.3.2. Antioksidan Savunma Sistemleri

Biyolojik sistemlerde serbest radikallerin etkilerini ortadan kaldırmak için çeşitli savunma mekanizmaları gelişmiştir. Bu mekanizmalara 'antioksidan savunma mekanizmaları ya da antioksidanlar' adı verilir. Antioksidanlar; lipit peroksidasyonunu engellerler ve okside olan substratlara göre daha az konsantrasyonlarda bile substratın oksidasyonunu geciktirirler ve inaktif duruma getirirler [36]. Antioksidanlar, birbiriyle ilişkili ya da birbirinden bağımsız altı farklı mekanizma ile etkilerini gösterirler [37].

- 1) Oksijenin yerini alarak veya reaksiyona girerek lokal oksijen konsantrasyonu azaltabilirler.
- 2) Hidroksil radikali yapısında yer alan hidrojen atomları bağ oluşturabilecek yapıdaki ürünleri temizleyerek peroksidasyonun başlamasını önleyebilirler.
- 3) Membran lipitlerini güçlü şekilde etkileyerek peroksit oluşturan singlet oksijeni temizleyebilir.

- 4) Metal iyonlarını bağlamak vasıtasıyla reaktif grupların ve lipit peroksitlerden peroksil ve alkoksil radikallerin oluşumunu önleyebilirler.
- 5) Peroksitleri, radikal olmayan ürünlere çevirebilir.
- 6) Zincir oluşumuna neden olan serbest radikallerle reaksiyona girebilirler ve böylece zincir kırılması meydana gelebilir.

Bu mekanizmalardan ilk dört tanesi ile önleyenler, 'koruyucu antioksidanlar' olarak kabul edilmektedir. Dördüncü mekanizma ile etki edenler reaksiyon sırasında tüketilmezler. Beşinci mekanizma ile etki eden antioksidanlar ise koruyucu olmakla birlikte reaksiyon sırasında tüketilir ya da tüketilmezler. Altıncı mekanizma ile etki eden zincir kırıcı antioksidanlar zincir uzama reaksiyonlarına sebep olan radikallerle kompleks yaptıklarından kırma reaksiyonu süresinde tüketilirler. Bir antioksidanın etkisini gösterebilmesi için, o maddenin serbest radikalleri indirgeme hızı yeterli seviyede olması gerekir. Antioksidanların çoğunun tek bir mekanizma üzerinden etkisinin çok olmadığı ve birden fazla mekanizma ile asıl etkisinin olduğu söylenebilir [36,37].

1.3.3. Oksidatif Stres ve Hastalıkla İlişkisi

Serbest radikaller hücrelerde ve dokularda çeşitli zararlara yol açar. DNA hasarına, enzim aktivitelerinde değişikliklere, lipit yapısındaki değişikliklere, zar yapısı ve fonksiyonların bozulmasına, zar proteinlerinin ve taşıyıcı proteinlerin tahribine sebep olmaktadır. Serbest radikaller ayrıca karaciğer hastalıklarında da etken rol oynamaktadır. Serbest radikallerin yol açtığı hasara "Oksidatif Stres" denilmektedir.

1.4. GLUTATYON

Glutatyon (gama glutamil sisteinil glisin) molekülü; glutamik asit, sistein ve glisinden oluşur ve genelde GSH olarak kısaltılır; -SH sülfidril grubuna işaret eder ve molekülün alış veriş yapan kısmıdır. Karsinojenik etkilerden korunmada glutatyonun önemli bir rolü vardır. Reaktif ara metabolitleri olan epoksidler ve diğer bazı toksik bileşikler dokularda nükleofilik endojen bileşiklerle özellikle glutatyon ile konjuge edilerek inaktif duruma getirilirler [40].

1.4.1. Glutasyon ve Glutasyon S Transferaz

Glutasyon; glutamat ,sistein ve glisein gibi aminoasitlerden oluşana en güçlü antioksidan olarak bilinen bir moleküldür. Glutasyon vücudumuzda bulunduğu gibi yediğimiz içtiğimiz besinlerden de almaktayız. Glutasyon yaşlandıkça vücudumuzun üretimini azalttığı bir antioksidandır.

Yediğimiz, içtiğimiz hatta aldığımız nefeste dahi bulunan düzensiz moleküler yapıda olan serbest radikaller vücudumuzun en büyük düşmanıdır. Bu serbest radikallerin vücudumuza ve sağlığımıza olan etkisini antioksidanlar yardımıyla azaltmak mümkündür. Glutasyon serbest radikallerle savaşta diğer antioksidanlarla beraber onlara önderlik eden bir numaralı serbest radikal koruyucusudur. Canlı hücreleri serbest radikallerin hasarından koruyan başlıca enzimlerden bir tanesi de glutasyon s transferaz (GST)'dir. GST izoenzimlerin dokuların oksidatif stresten korunmasında, ksenobiyotiklerin detoksifikasyonunda, ilaç dirençliliği ve apoptoziste önemli rol alan çok fonksiyonlu enzim grubudur [41].

Glutasyon S-Transferaz (GST) elektrofilik ve hidrofilik bileşiklerin glutasyon ile etkileşimlerini sağlayarak, hücrel makromolekülleri reaktif elektrofillere karşı koruyan bir grup enzimdir. Bu enzimler hayvanlarda , bitkilerde ve çeşitli mikroorganizmalarda bulunmaktadır. Moleküler 25kD'dur ve her bir alt birim 200-240 aminoasitten oluşur [42]. Başta karaciğer olmakla birlikte kalın bağırsak, ince bağırsak, böbrek, kas, meme, dalak, plasenta, testis gibi bir çok organda çok sıklıkla rastlanır aynı zamanda sitosölü ve membranıdır [43].

1.4.2. GST' Lerin Substratları

Endojen moleküller, (Adenin propenal, 9-Hidropeksi-linoleik, Kolesterol-5,6-oksit), kemoterapik ilaçlar (Cis-platin, Klorambusil, siklofomid), çevresel karsinojenler (Stiren oksit, Trikloroetilen, Akrolein, vb) gibi toksikbileşikler Glutasyon S transferaz enzimlerinin substratlarıdır.(çizelge 1) GSH" un kosubstratına özgül olan bir G bölgesi ve hidrofobik elektrofilik substratların

bağlandığı bir H bölgesi vardır. GSH”un tiyol grubu, cebin açık olan kısmına dönüktür. Diğer substratlara bağlanan kısım bu tiyol grubudur [44, 45].

GSTA için organik hidroperoksitler, GSTP için etakrinik asit, GSTT için 1,2-epoksi3-(p-nitro feroksi) propen, GSTM için 1,2-dikloro-4-nitrobenzen, GSTZ için z-bütül hidro peroksit, GSTS için ise 1-kloro-2,4-dinitrobenzen GST izozimlerinin spesifik substratlarıdır(46). GST” lerin substratları Tablo 1’ de gösterilmektedir [47].

Çizelge 1.1. GST “lerin substratları

ÇEVRESEL KARSİNOJENLER	PESTİSİDLER	İLAÇLAR	ENDOJEN MOLEKÜLLER
Stiren oksit	Lindan	Cis-platin	4-Hidroksi-2-nonenal
4-Nitrokinolin oksit	Alaklor	Klorambusil	Kolesterol-5-6-oksit
Akroleyn	Atrazin	Siklofosfamid	Adenin propenal
Hekzaklorobutadien	DDT	Tiyotepa	9-hidropeksi-linoleik asit
Trikloroetilen	Metil paration	Fosfomisin	Dopaminokrom
Metilen klorür		Adriamisin	Kateşol estrojenleri
Etien oksit		Nitrogliserin	

1.4.3. GST’lerin Sınıflandırılması

GST”ler yapılan araştırmalar sonucunda ilk defa 1961 yılında fare karaciğerinde GSH” in gözlenmesi sonucu sitozolik, mikrozomal, ve mitokondriyal olmak üzere üç grub şeklinde sınıflandırılmıştır. Bu sınıflandırmaya göre sitoplazmik GST”ler: GST Alfa (GSTA1-1, GSTA2-2, GSTA3-3, GSTA4-4, GSTA5-5), GST Mü (GSTM1-1, GSTM 2-2, GSTM3-3, GSTM4-4, GSTM5-5), GST Pi (GSTP1-1), GST Sigma (GSTS1-1), GST Teta (GSTT1-1, GSTT2-2), GST Zeta (GSTZ1-1),

ve GST Omega (GSTO1-1, GSTO2-2) olmak üzere 7 sınıfa, mikrozomal GST'ler; MGST1, MGST2 ve MGST3 olarak üç sınıfa, mitokondriyal GST sınıfını oluşturan GST Kappa (GSTK1-1) olmak üzere toplam 11 sınıfta incelenmektedir. Tablo 2'de GST ailesinin izozimleri ve buldukları organlar gösterilmiştir [48].

Çizelge 1.2. GST izozimleri ve buldukları organlar

Süperaille	Sınıf	Protein	Organ
Sitozolik	Alfa	GSTA1	Testis,karaciğer,böbrek,adrenal,pankreas
		GSTA2	Karaciğer,testis,pankreas,böbrek,adrenal,beyin
		GSTA3	Plesanta
		GSTA4	İnce bağırsak, dalak, karaciğer, böbrek,beyin
Sitozolik	Mu	GSTM1	Karaciğer, testis,beyin,adrenal,böbrek,akciğer
		GSTM3	Testis, beyin,ince bağırsak,iskelet kası,akciğer
		GSTM4	Beyin, kalp,iskelet kası
		GSTM5	Beyin, kalp,akciğer,testis
Sitozolik	Pi	GSTP1	Beyin, kalp,akciğer,testis,böbrek,pankreas
Sitozolik	Teta	GSTT1	Böbrek, karaciğer,ince bağırsak,beyin,prostat
		GSTT2	Karaciğer
Sitozolik	Sigma	GSTS1	Fetal karaciğer,kemik iliği
Sitozolik	Zeta	GSTZ1	Fetal karaciğer, iskelet kası
Sitzolik	Omega	GSTO1	Karaciğer,kalp,iskelet kası,pankreas,böbrek
		GSTO2	Karaciğer
Mitokondriyal	Kappa	GSTK1	Karaciğer mitokondrisi
		GSTK2	Karaciğer mitokondrisi
Mikrozomal (MAPEG)		MGST1	Karaciğer,pankreas,prostat,kolon,böbrek,beyin
		MGST1	Testis,prostat,ince bağırsak,kolon
		MGST2	Karaciğer,iskelet kası,ince bağırsak,testis
		MGST3	Kalp,iskelet kası,adrenal bez,tiroid
		LTC4S	Trombosit,akciğer,karaciğer
		FLAP	Akciğer,dalak,timus,ince bağırsak

1.4.4. GST Pİ Sınıfı

GST' izozimleri içerisinde en yaygın olarak bulunan pi sınıfıdır. Akciğer, özafagus, böbrek, adrenal bez, kalp, beyin ve plasenta gibi birçok organda eksprese edilir [49,50,51]. İlk olarak insan plasentasında bulunan anyonik GST'lerin GSTP1 olduğu tespit edilmiştir [52]. Daha sonra beyin, akciğer, kalp, testis, adrenal bez, böbrek, pankreas ve karaciğer olmak üzere dokuların büyük çoğunluğunda sentezlendiği görülmüştür [53]. Glutasyon-S Transferaz P1 (GSTP1) geni insanlarda polimorfiktir. Glutasyon –S Transferaz P1 (GSTP1) ksenobiyotik metabolizmasının faz II evresinde rol oynayan GST enzim ailesinin bir üyesidir. GSTP enzimlerinin farklı kanser tedavilerinde uygulanan kemoterapi ve radyoterapiye dirençlilik gösterdiği izlenmiştir [54].

1.4.5. GST Alfa sınıfı

Alfa gen ailesi tarafından eksprese edilen dört GST izoenzimi tanımlanmıştır. GSTA1 ve GSTA2 insan dokularında bol miktarda eksprese edilir; ancak ekspresyon düzeyleri farklı doku ve bireylerde farklılık gösterir [55, 56]. Karaciğer, böbrek ve adrenal dokuda bol miktarda eksprese edilir ve insan karaciğerinde total GST'lerin %80'ininden fazlasını kapsar [57].

Alfa sınıfı GST izoenzimlerinin spesifik substratları organik hidrojenperoksitlerdir ve bu bileşiğe karşı selenyumdan bağımsız glutasyon peroksidaz aktivitesi gösterirler [58]. İnsan derisinde bulunan GSTA izozimlerinin ise UV ışınlarının yol açtığı oksidatif strese karşı korunmada etkili olabileceği düşünülmektedir [59].

1.4.6. GST Mü sınıfı

GST mü sınıfı, insanlarda M1'den M5'e kadar numaralanan 5 izoenzimden oluşmaktadır [60]. Ekspresyonları dokular arasında varyasyon gösterir. En yaygın eksprese edilen GSTM1'dir ve kemik, beyin, akciğer, paratiroid, kalp, böbrek, over, uterus gibi organlarda bulunur. GSTM2 daha çok iskelet kasında, GSTM3

ise kaslara ilave olarak beyin, akciğer ve testiste bulunur. GSTM4 insan lenfoblastoid hücre soylarında, GSTM5 ise beyinde eksprese edilir [61, 62].

1.4.7. GST Teta sınıfı

İnsanlarda GSTT1 ve GSTT2 olmak üzere iki sınıfı bulunmuştur [63]. GSTT1 239 aminoasitten oluşan bir homodimerdir. Beyin, kolon, kalp böbrek, overler, paratiroid, prostat, tonsil, testis, uterus gibi organlarda ekspresyonu tespit edilmiştir [64]. GSTT1 geninde enzimin fonksiyonel yetersizliğine yol açan gen delesyon polimorfizmi vardır ve bu enzimatik aktivite eksikliğinin kanser riskini artırdığı bildirilmiştir [60, 65, 66].

1.4.8. GST Omega Sınıfı

GSTO 10. Kromozomun büyük kolonunda bulunur. Yapısal olarak diğerlerinde benzemelerine rağmen diğerlerinin substratlarıyla çok etkileşime girmezler. GST ailesinin diğer üyelerinin aktif bölgelerinde serin ya da tirozin bulunurken GSTO sınıfında sistin bulunmaktadır.

Omega sınıfının insanda, farede, sıçanda, C. Elegans' da, Drosophila melanogaster'de bulunduğu tespit edilmiştir. GSTO sınıfının GSTO1 ve GSTO2 olmak üzere iki izoenzimi bulunmaktadır. GSTO1'in N terminalinde fazladan 19 aminoasit vardır. GSTO2' nin N terminalinde 19 aminoasit fazladan vardır.

Omega sınıfı indirgeme reaksiyonlarını kataliz eder. İlaç dirençliliğinde, radyasyon dirençliliğinde, içme suyuyla arseniği indirgemedi, oksidatif strese rolü olduğu gibi alzaymır, Parkinson, sinir sistemi hastalıklarında da koruyucu role sahiptir. Yapılan çalışmalarda kanserde rolü olduğu tespit edilmiştir [67, 68].

1.4.9. GST Kappa Sınıfı

GST ailesinin bu sınıfı hakkında literatürde pek bilgiye rastlanamamıştır. GSTK1 (GSTK1-1) enziminin 1-kloro-2,4-dinitrobenzen ve etakrinik asit substratlarına aktiviteleri bulunmaktadır. Önceleri GSTT izoziminin alt grubundan olduğu düşünülmüş fakat geçen yıllar içerisinde GSTK' nın ayrı bir GST ailesi olduğu ortaya çıkmıştır.

GSTK1-1 ve GSTK2 olmak üzere iki adet izoenzimi bulunmaktadır. Hücrede mitokondride ve peroksizomda bulunur. Kemiriciler, insan ve C.elegans da bulunan GST kappa mitokondri ve peroksizomda enerji ve lipit metabolizmasında görevlidir. GST' lerin aktivitelerine benzemesine karşın mitokondri ve peroksizomda bulunmaktadır. GST kappa mitokondriyal GST olarak bilinir. Bakteri ve ökaryotlarda bulunur. GSTK ayrıca adiponektin (beyaz yağ) biyosentezinde anahtar görevindedir ve proteinlerin doğru katlanmasında şaperon proteini olarak fonksiyon göstermektedir.

GSTK insülin resistansı, obesite ve diyabette de rolü vardır. Yapılan bir çalışmada fare ve insan yağ dokusunda GSTK1 obezite ile negatif korelasyon göstermiştir. GSTK1 böylece metabolik hastalıklarda rolü olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, GSTK1 polimorfizm çalışmaları insülin salınımı ve yağ depolamanın ilişkili olduğunu göstermiştir.

GSTK1-1 birçok dokuda özellikle beyaz yağ dokusunda eksprese olmaktadır. GSTK1-1 fare ve insanda obesite ile negatif olarak ilişkilidir ve insülin direnci hastalığının tedavisinde geliştirilen ilaçlar için hedef olarak düşünülmektedir [68, 69].

1.4.10. Glutatyon-S Transferaz ve Hepatit B

Kuralay ve ark. 88 kronik aktif hepatitli (KAH) hastada karaciğer biyopsileriyle birlikte ALT ve GST-Alfa tayinleri için kanlarında ALT standart analitik prosedür, serum GST-A düzeyleri ise ELISA-Hepkit (Biotrin, DublinIreland) ile

çalışıldı. Hepatitli olguların ALT ve GST-A düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu. GST-A ile ALT arasında anlamlı bir korelasyon bulundu ($p < 0,0001$; $r = 0.556$). GST-A, karaciğerdeki histolojik hasarı belirlemede ALT' den daha duyarlı olduğu, ancak, ALT ile birlikte değerlendirildiğinde kronik hepatitli olgulardaki karaciğer hasarının ayırt edilmesine tanısal doğruluğu arttırarak katkıda bulunduğunu göstermişlerdir [70].

Shen ve ark. (2002) GSTP izozimlerinin siroz, hepatit ve kanserli karaciğer dokularında normale göre yüksek miktarda olduğunu göstermiştir [71].

Yusof ve ark. (2003) hepatit B ve karaciğer kanseri hasta dokularında GSTP izozimlerinin yüksek miktarda olduğunu göstermiştir [72].

Ming-Whei ve ark. (2003) 577 karaciğer kanser ve 389 kontrol vakasında GSTmü enziminin yokluğunun karaciğer kanser olma riskini artırdığını göstermiştir [73].

Shahrokh ve ark. (2006) 37 kronik hepatit, 38 siroz ve 41 kontrol vakasında GST Mü, Teta ve Pi enzimlerinin Kronik hepatit olma riskinde bir etkisi olduğunu göstermiştir [74].

Chen ve ark. (2010) 386 kontrol ve 177 kraciğer kanserli hastada GST P ve GST A” nın polimorfizini çalışmışlardır. GST A nın karaciğer kanserine yakalanma riskinde bir etkisi olmadığını fakat GST P nin mutasyonu karaciğer kanseri olma riskini artırdığını göstermişlerdir [75].

1.5. ÇALIŞMANIN AMACI

GST pi izozimleri hepatit b hastalığında önemli olduğu görülmektedir. Bu tez çalışmasında oksitativ stresin elimine edilmesinde büyük ölçüde rolü olan II. Faz Reaksiyonlarından Glutasyon S-Transferaz enziminin sitozolik GSTP1 'in immunohistokimyasal yöntemle kronik aktif Hepatit B'li karaciğer dokularında protein ekspresyonlarına bakılmıştır. Elde edilen sonuçların yaş, cinsiyet, ALT , AST, HBVDNA, arasındaki istatistiksel ilişkilerinin araştırılması

amaçlanmaktadır. Ayrıca bulgularımız klinik parametrelerle olan ilişkilere bakılarak hastalığın teşhisi hakkında kullanılabilirliği değerlendirilecektir.



2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. MATERYAL

2.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

- Primer Antikor(GSTP1)
- Sekonder Antikor (Biotinylated secondary antikor), (Santa Cruz)
- TBS buffer (Santa Cruz)
- %30' luk H₂O₂ Solusyonu (Sigma)
- Ksilol (Merck)
- Etanol (Merck)
- Metanol (Merck)
- Sodyum Sitrat (Sigma)
- Sitrik Asit (Sigma)
- Protein Blokajı (Normal Swine Serum, Normal Goat Serum) (Santa Cruz)
- ABC HRP (Avidin Biotin Complex Horse Radish Peroxidase) (Santa Cruz)
- Hematoksilen (Shandon)
- DAB (Diamino benzidin) (Santa Cruz)
- Etanol (Merck)
- Metanol (Merck)
- Sodyum Sitrat (Sigma)
- Sitrik Asit (Sigma)
- Protein Blokajı (Normal Swine Serum, Normal Goat Serum) (Santa Cruz)
- ABC HRP (Avidin Biotin Complex Horse Radish Peroxidase) (Santa Cruz)
- Hematoksilen (Shandon)
- DAB (Diamino benzidin) (Santa Cruz)

2.1.1.1 Solusyonların Hazırlanışı

- i. H₂O₂ Blokajı Solusyonu Hazırlanışı: 30 ml %30' luk H₂O₂ üzerine 470 ml metanol ilave edilerek hazırlandı.
- ii. Antijen Retrieval Solusyonunun Hazırlanışı (0,01 M, pH: 6.0): 2,101 gr sitrik asit (A) 100 ml distile suda; 0,1 M 14,7 gr sodyum sitrat (B) 500 ml distile suda çözüldü. 27 ml A solusyonundan, 123 ml B solusyonundan alınarak 1500 ml'ye distile su ile tamamlandı.
- iii. 0,005 M Tris Tamponunun Hazırlanışı: 60,55 gr tris base, 85,20 gr NaCl 500 ml distile suda çözülür. 370 ml 1 M HCl eklenerek pH: 7,6'ya getirilip 1 lt'ye tamamlanır. (1 ml TBS 100 ml distile suyla dilüe edilerek kullanılır.

2.1.2 Kullanılan Cihazlar

- Etüv
- -20'lik derin dondurucu ve buzdolabı
- pH-metre
- Vortex
- Düdüklü tencere
- Isıtıcı
- Hassa terazi
- Işık mikroskobu
- Fotoğraf makinesi

2.2. KULLANILAN YÖNTEM

2.2.1. Hasta Dokularının Toplanması ve Klinik Bilgiler

Çalışmada Ankara Keçiören Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nden onayı alınan ve adı geçen hastaneye 2012-2016 yılları arasında başvuran 59 Hepatit B hastalarından patoloji kliniği tarafından yapılan parafin bloklardan her bir vaka için poly-L-lysin kaplı lamlara 1 kesit alındı. Alınan kesitlere GSTP1 izozimi immunohistokimyasal olarak uygulandı. Ayrıca hastaların yaş, cinsiyet, ALT, AST, HBVDNA, parametreleri istatistiksel analizlerle çalışıldı.

2.2.2. İstatistiksel Analiz

Verilerin analizi amacıyla IBM SPSS Versiyon 25.0. (Armonk, NY: IBM Corp) istatistik paket programı kullanılmıştır. Hastaların demografik özellikleri ve sayısal değişkenler ortalama±standart hata (SH) ve en düşük-en yüksek değerler; kategorize edilen değişkenler ise betimleyici istatistiklerle hasta sayısı (n) ve yüzde (%) olarak ifade edilmiştir. Sayısal değişkenlerin dağılım profilleri Shapiro Wilk, varyansların homojenliği Levene testi ile değerlendirilmiştir. Normal dağılım gösteren, parametrik test varsayımlarının sağlandığı değişkenler için grup sayısına göre student-t veya one-way ANOVA testi kullanılmıştır. Parametrik test varsayımlarının sağlanmadığı değişkenler için grup sayısına göre Man-Whitney U veya Kruskal Wallis testi kullanılmıştır. Post-hoc analizler için Bonferroni düzeltmesi yapılmıştır. Sürekli sayısal değişkenlerin arasındaki ilişki Spearman'ın sıra korelasyon testiyle değerlendirilmiştir. $p < 0.05$ düzeyindeki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

3. BULGULAR

Hasta grubumuzun demografik özellikleri kategorize edilerek Tablo 3’de açıklanmıştır. Toplam 59 hastadan oluşan çalışma grubumuzda 40 yaş ve altında olan 14 hasta (% 23,7) olduğu görülmüştür. 15 hasta (% 25,4) 41-50 yaş aralığında, 16 hasta (% 27,1) ise 51-59 yaş aralığında yer almıştır. 60 yaş ve üzerindeki hasta sayısının ise 14 (% 23,7) olduğu bulunmuştur. Hasta grubumuzun % 40,7’sini (24 hasta) kadınlar, % 59,3’ünü erkekler oluşturmuştur.

Çizelge 3.3. Hastaların kategorize edilmiş demografik özellikleri

DEĞİŞKEN	KATEGORİ	HASTA SAYISI (N, %)
Yaş	≤40	14 (% 23,7)
	41-50	15 (% 25,4)
	51-59	16 (% 27,1)
	≥60	14 (% 23,7)
	Toplam	59 (%100)
Cinsiyet	Kadın	24 (% 40,7)
	Erkek	35 (% 59,3)
	Toplam	59 (%100)

Hasta grubumuzun yaş özellikleri Tablo 4’de gösterilmiştir. Hastaların yaş ortalaması 49,39 olup; en düşük yaş 23, en yüksek yaş ise 85 olarak bulunmuştur.

Çizelge 3.4. Hastaların yaş özellikleri

DEĞİŞKEN	YAŞ (N=59)
Ortalama±SH	49,39 ± 1,68
En Düşük-En Yüksek	23-85

Kronik viral hepatit karaciğer dokularının GSTPi boyanma düzeyleri değerlendirilmiştir (Tablo 5). İncelenen dokuların % 27,1'inde (16 numune) GSTPi boyanması görülmezken; % 52,5'inde (31 numune) düşük düzey, % 20,3'ünde orta düzey pozitif boyanma görülmüştür. Tüm sonuçlar bir arada değerlendirildiğinde ortalama 0,93 pozitif boyanma olduğu bulunmuştur.

Çizelge 3.5. Hasta dokularının immünohistokimyasal GSTPi boyanma düzeyleri

Boyanma Düzeyi	GSTPi
0	16 / 59 ^a (% 27,1)
1	31 / 59 ^a (% 52,5)
2	12 / 59 ^a (% 20,3)
Ortalama	0,93 ± 0,09 ^b (0-2) ^c

Boyanma skorları kronik viral hepatit karaciğer dokularının boyanma yoğunluğuna göre belirlenmiştir.

0: negatif boyanma, 1: zayıf pozitif boyanma, 2: orta düzey pozitif boyanma olarak tanımlanmıştır.

a: Belirtilen düzeyde boyanan numune sayısı / Toplam numune sayısı (yüzde)

b: Ortalama Boyanma Düzeyi ± SH

c: En Düşük Boyanma Düzeyi - En Yüksek Boyanma Düzeyi

Hastaların yaş ve cinsiyet gibi demografik özellikleri ile dokuların immünohistokimyasal GSTPi boyanma düzeyleri gruplandırılmış ve Tablo 6'te gösterilmiştir. Kadın ve erkek hastalar arasında GSTPi boyanma düzeyleri açısından anlamlı farklılık görülmemiştir ($p>0.05$). 40 yaş ve altı, 41-50 yaş aralığı, 51-59 yaş aralığı, 60 yaş ve üzerindeki hasta grupları; GSTPi boyanma düzeyleri açısından karşılaştırılmıştır. En yüksek GSTPi boyanma düzeyleri 40 yaş ve altındaki hastalarda görülmüştür. Ancak farklı yaş aralıklarında yer alan hasta grupları arasında GSTPi boyanma düzeyleri açısından anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p>0.05$).

Çizelge 3.6. Hastaların demografik özelliklerine göre immünohistokimyasal GSTPi boyanma düzeyleri

DEĞİŞKEN	GSTPİ
CİNSİYET	
KADIN	0,92±0,15 ^a (0-2) ^b
ERKEK	0,94±0,12 ^a (0-2) ^b
P-DEĞERİ	0,879
YAŞ	
≤ 40	1,14±0,21 ^a (0-2) ^b
41 – 50	0,93±0,15 ^a (0-2) ^b
51 – 59	0,75±0,17 ^a (0-2) ^b
≥ 60	0,93±0,20 ^a (0-2) ^b
P-DEĞERİ	0,502

Boyanma skorları kronik viral hepatit karaciğer dokularının boyanma yoğunluğuna göre belirlenmiştir.

0: negatif boyanma, 1: zayıf boyanma, 2: orta düzey boyanma olarak tanımlanmıştır.

a: Ortalama Boyanma Düzeyi ± SH

b: En Düşük Boyanma Düzeyi - En Yüksek Boyanma Düzeyi

Dokuların immünohistokimyasal GSTPi boyanma düzeyleri ile hastaların yaşları arasında korelasyon analizi yapılmıştır (Tablo 7). Hastaların yaşları ile dokuların GSTPi boyanma düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon bulunmamıştır ($p>0.05$).

Çizelge 3.7. Dokuların immünohistokimyasal GSTPi boyanma düzeylerinin hastaların yaşları ile korelasyon analizleri

DEĞİŞKEN		GSTPİ
YAŞ	Korelasyon Katsayısı	-0,109
	p-değeri	0,413

Hastaların karaciğer fonksiyon testlerinden alanin aminotransaminaz (ALT) ve aspartat aminotransferaz (AST) düzeyleri ölçülmüş ve veriler Tablo 8'de özetlenmiştir. 59 hastadan 56'sının ALT, 52'sinin AST düzeyi kayıt altına alınmıştır. Ortalama ALT düzeyi 63,45 U/L; ortalama AST düzeyi ise 46,23 U/L bulunmuştur.

Çizelge 3.8. Hastaların ortalama ALT ve AST düzeyleri

Karaciğer Fonksiyon Testleri	n (sayı)	Ortalama ± SH (U/L)	En Düşük (U/L)	En Yüksek (U/L)
ALT	56	63,45 ± 10,04	0,68	401,00
AST	52	46,23 ± 6,75	15,00	332,00

Hastalardan 34'ünün ALT değeri 45 U/L ve altında, 22'sinin ALT değeri ise 45 U/L'den yüksek bulunmuştur. 30 hastanın AST düzeyinin 35 U/L ve altında, 22 hastanın AST düzeyinin ise 35'in üzerinde olduğu görülmüştür. Dokuların immünohistokimyasal GSTPi boyanma düzeyleri ile normal ve yüksek ALT düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p>0.05$). Normal ve yüksek AST düzeyleri ile GSTPi boyanma düzeyleri arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p>0.05$) (Tablo 9).

Çizelge 3.9. Hastaların ALT ve AST düzeyleri ile karaciğer dokularının immünohistokimyasal GSTPi boyanma düzeyleri

DEĞİŞKEN	GSTPİ
ALT	
NORMAL (0-45) (N=34)	0,91± 0,11 ^a (0-2) ^b
YÜKSEK (>45) (N=22)	0,86 ± 0,17 ^a (0-2) ^b
P-DEĞERİ	0,738
AST	
NORMAL (0-35) (N=30)	0,87 ±0,12 ^a (0-2) ^b
YÜKSEK (>35) (N=22)	0,95 ± 0,15 ^a (0-2) ^b
P-DEĞERİ	0,662

Boyanma skorları kronik viral hepatit karaciğer dokularının boyanma yoğunluğuna göre belirlenmiştir.

0: negatif boyanma, 1: zayıf boyanma, 2: orta düzey boyanma olarak tanımlanmıştır.

a: Ortalama Boyanma Düzeyi ± SH

b: En Düşük Boyanma Düzeyi - En Yüksek Boyanma Düzeyi

Toplamda 59 hastadan oluşan çalışma grubumuzda 42 hastanın HBV DNA düzeyleri belirlenmiştir (Tablo 10). 42 hastanın 7'sinde (%16.7) kopya görülmemiş, elde edilen sonuç negatif kabul edilmiştir. Geriye kana 35 hastada (%83.3) ise HBV DNA kopya/ml düzeyi 0'dan yüksek çıkmıştır. HBV DNA düzeyleri ile GSTPi boyanma düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır (p>0.05).

Çizelge 3.10. Hastaların HBV DNA düzeyleri ile dokuların immünohistokimyasal GSTP1 boyanma düzeyleri

HBV DNA	GSTP1
Negatif	0,86±0,26 ^a
(n=7)	(0-2)^b
> 0 kopya/ml	0,86±0,12 ^a
(n=35)	(0-2)^b
p-değeri	0,985

Boyanma skorları dokuların boyanma yoğunluğuna göre belirlenmiştir.

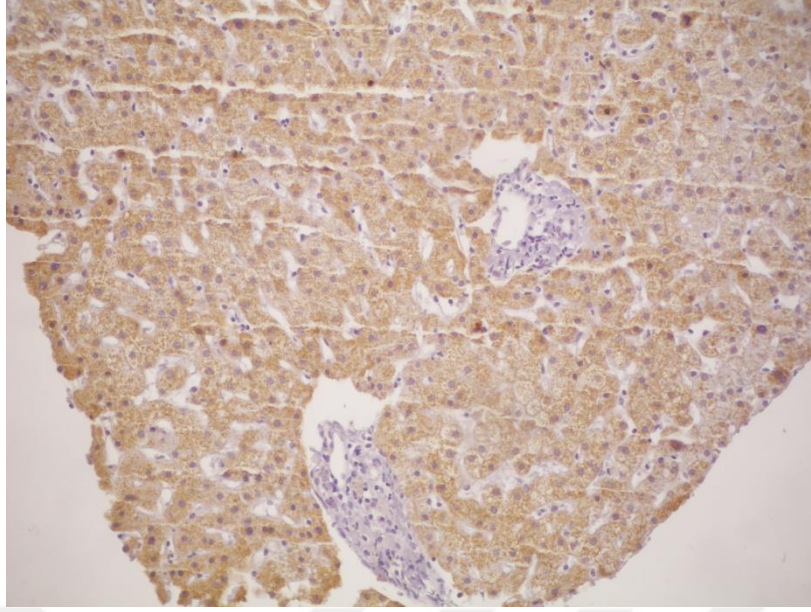
0: negatif boyanma, 1: zayıf boyanma, 2: orta düzey boyanma olarak tanımlanmıştır.

a: Ortalama Boyanma Düzeyi ± SH

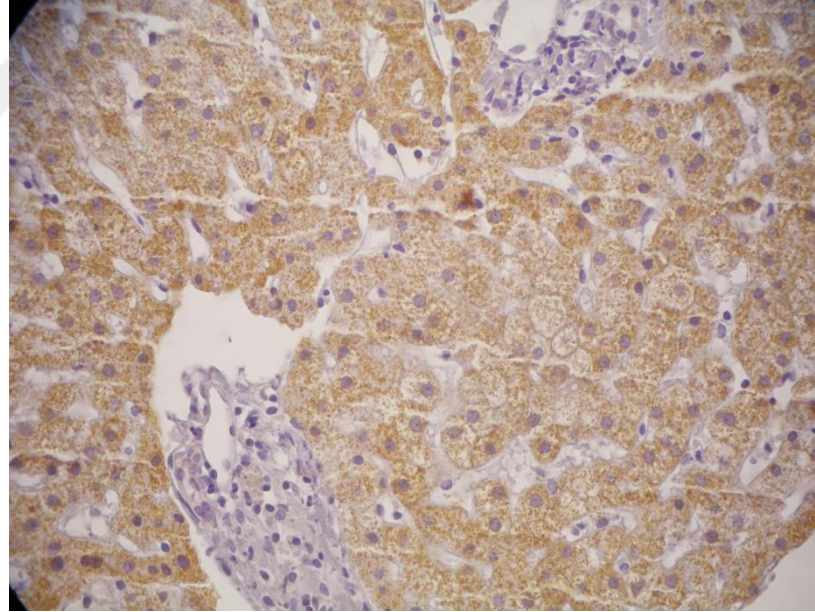
b: En Düşük Boyanma Düzeyi - En Yüksek Boyanma Düzeyi

3.1. GSTP1 İN KRONİK HEPATİT B Lİ KARACİĞER DOKULARINDAKİ PROTEİN İFADESİ

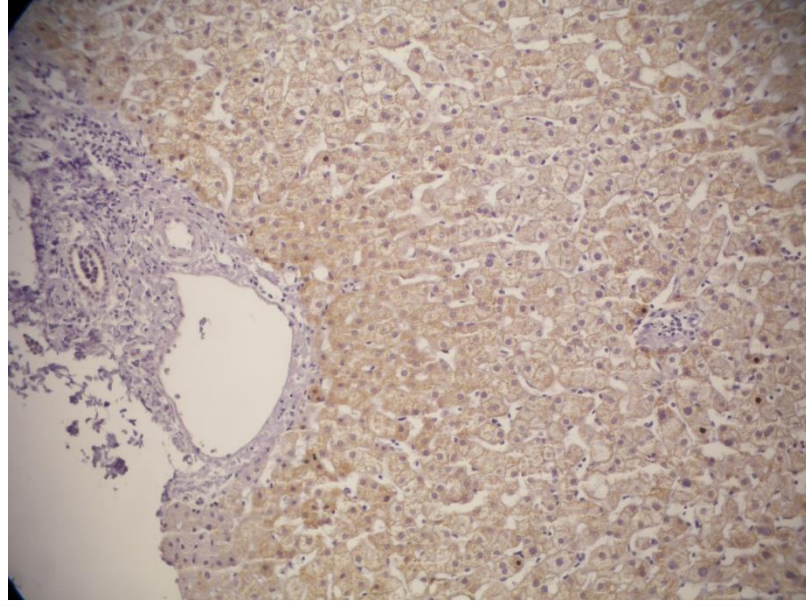
Kronik Hepatit B li karaciğer dokularında GSTP1 izozimlerinin ekspresyonlarının immünohistokimya sonuçlarına baktığımızda; GSTP1 izoziminin hepatositlerde orta düzey (++) GST pi ifadesinin olduğu ve portal alanlarda GSTP1 ekspresyonu görülmemiştir (Figür 1, Figür 2). Ayrıca GSTP1 bazı hastalarda hafif düzeyde boyanmıştır (Figür 3, Figür 4). Bazı hastalarda GSTP1 negatif ekspresyon göstermiştir(Figür 5, Figür 6).



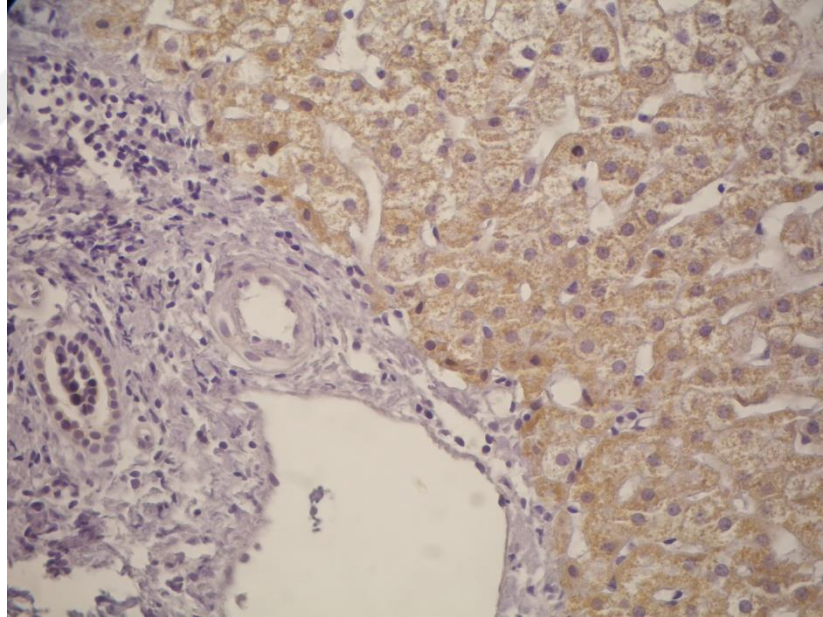
Şekil 3.1. Kronik Hepatit B li karaciğer dokularında immunohistokimyasal GSTP1 proteini (Hepatositlerde proteinin ifadesi (++) , 20X)



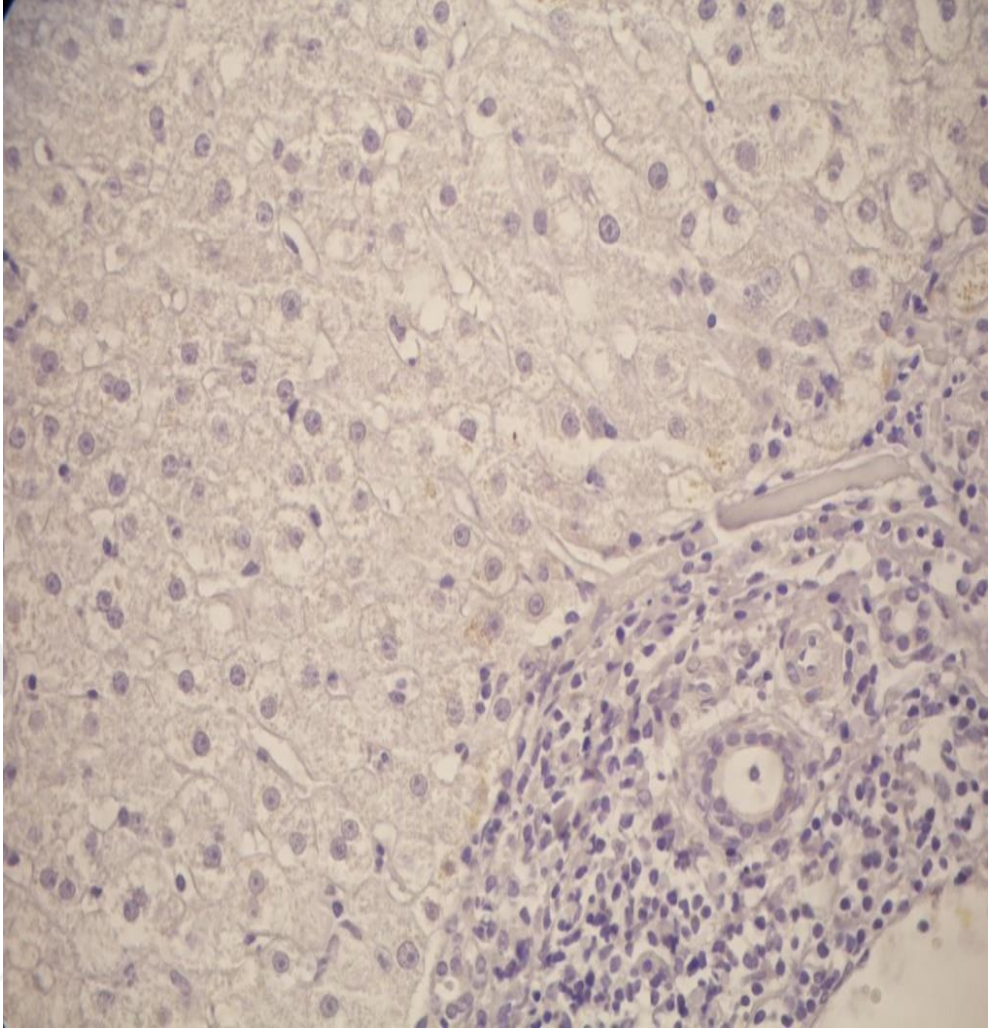
Şekil 3.2. Kronik Hepatit B li karaciğer dokularında immunohistokimyasal GSTP1 proteini (Hepatositlerde proteinin ifadesi (++) , 40X)



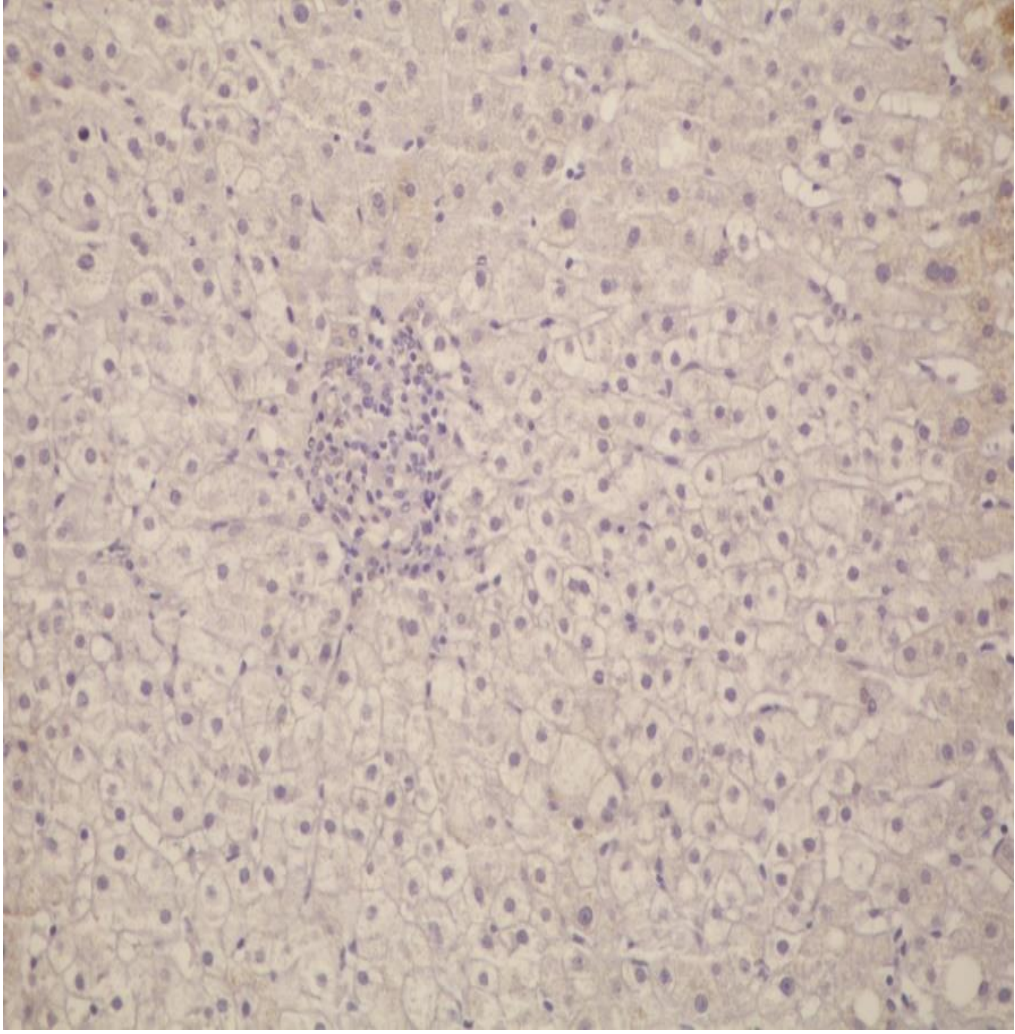
Şekil 3.3. Kronik Hepatit B li karaciğer dokularında immunohistokimyasal GSTP1 proteini (Hepatositlerde proteinin ifadesi (+), 20X)



Şekil 3.4. Kronik Hepatit B li karaciğer dokularında immunohistokimyasal GSTP1 proteini (Hepatositlerde proteinin ifadesi (+), Portal alan (-) 40X)



Şekil 3.5. Kronik Hepatit B li karaciğer dokularında immunohistokimyasal GSTP1 proteini (Hepatositlerde proteinin ifadesi (-),40X)



Şekil 3.6. Kronik Hepatit B li karaciğer dokularında immunohistokimyasal GSTP1 proteini (Hepatositlerde proteinin ifadesi (-),20X)

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Hepatitis B (HBV) bütün dünyada ve ülkemizde de önemli bir halk sağlığı problemidir. Dünya’da yaklaşık olarak sağlık örgütünün verilerine göre 400 milyon HBV taşıyıcısı olduğu tahmin edilmekte bunlarında çoğunluğu Asya ve Doğu Pasifik bölgesindedir [76]. Her yıl 1 milyona yakın insan HBV ile ilişkili karaciğer hastalıklarından dolayı hayatını kaybetmektedir.

Hepatit B genellikle halk arasında “sarılık” olarak bilinmektedir. Hepatit B hastalığı kan yoluyla bulaşan hastalıktır.

Serbest radikaller, kısa ömürlü ve reaktiftirler. Son yörüngesinde bir ya da daha fazla eşlenmemiş elektron bulunduran atom veya moleküller serbest radikaller olarak adlandırılmaktadır. Serbest radikaller eşlenmemiş elektron bulundurduklarından dolayı kararsız yapıdadır ve diğer maddelerle reaksiyona girerek kararlı duruma geçme eğilimindedirler. Serbest radikaller oksijen ve nitrojen kaynaklı olabilir [77].

Organizmadaki serbest radikaller hem endojen hem de eksojen kaynaklar tarafından meydana getirilebilir. Serbest radikaller hücrede ve çevrede sürekli olarak üretilir [78].

Bütün hücrelere kolaylıkla girebilen herhangi bir zorlukla karşılaşmayan en çok kullanılan madde moleküler oksijendir. Aerobik canlılar için ise serbest radikallerin en önemli kaynaklarından birisi oksijendir.

Çeşitli araştırmalarda, serbest radikallerin birçok dejenerasyona ve yaşlanmaya yol açtığı saptanmıştır.

Organizmada devamlı olarak serbest radikaller oluşmasının yanında güçlü savunma sistemleri de vardır. Serbest radikallerin oluşum hızı ile ortadan kaldırılma hızı yani oksidatif denge sağlandığı sürece organizma bu bileşiklerden etkilenmemektedir. Antioksidan savunma sistemleri yeterince etkili olmadığında, organizmada serbest radikal üretimi artar ve doku hasarı meydana gelir. Bu duruma "oksidatif stres" adı verilir [79].

Yediğimiz, içtiğimiz hatta aldığımız nefeste dahi bulunan düzensiz moleküler yapıda olan serbest radikaller vücudumuzun en büyük düşmanıdır. Bu serbest radikallerin vücudumuza ve sağlığımıza olan etkisini antioksidanlar yardımıyla azaltmak mümkündür. Glutasyon, serbest radikallerle savaşta diğer antioksidanlarla beraber onlara önderlik eden bir numaralı serbest radikal koruyucusudur. Canlı hücreleri serbest radikallerin hasarından koruyan başlıca enzimlerden bir tanesi de glutasyon s transferaz (GST)'dir. GST izoenzimlerin dokuların oksidatif stresten korunmasında, ksenobiyotiklerin detoksifikasyonunda, ilaç dirençliliği ve apoptoziste önemli rol alan çok fonksiyonlu enzim grubudur [41].

Yapılan bu tez çalışmasında Kronik viral hepatit karaciğer dokularının GSTP_i boyanma düzeyleri değerlendirilmiştir. İncelenen dokuların % 72,9'unda GSTP_i boyanması görülmüştür.. Hastaların immünohistokimyasal GSTP_i boyanma düzeyleri yaş ve cinsiyet gibi demografik özelliklerine göre belirlenmiş ve GSTP_i boyanma düzeyleri açısından anlamlı farklılık görülmemiştir (p>0.05).

Yapılan tez çalışmasındaki bulgulara paralel olarak Shen ve ark. (2002) Yusof ve ark. (2003) GSTP izozimlerinin siroz, hepatit B ve kanserli karaciğer dokularında normale göre yüksek miktarda olduğunu göstermiştir.

Sonuç olarak GSTP₁ Kronik viral hepatit karaciğer dokularında yüksek düzeyde ekspresyon göstermiştir. Yapılan bu çalışma ile GSTP nin Hepatit B hastalığının gidişatında rol oynayabileceğini göstermiştir. Bu çalışma yapılacak diğer çalışmalara ön bir çalışma olacaktır ileriki çalışmalarda daha fazla örnek sayısı ile GST enziminin diğer izozimlerinde rolünün araştırılması amaçlanmaktadır.

KAYNAKLAR

- 1 -Datta S, Chatterjee S, Veer V, Chakravarty R. Molecular biology of the hepatitis B virus for clinicians. *J Clin Exp Hepatol*; 2(4):353–365, 2012.
- 2- Değertekin H, Oğuz AK. Akut ve Kronik HBV Enfeksiyonunda Doğal Seyir. *Güncel Gastroenteroloji*; 14(2):54-58, 2010.
- 3- Burns GS, Thompson AJ. Viral Hepatitis B: Clinical and Epidemiological Characteristics. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 4(12):1-14, 2014.
- 4- Thomas E, Yoneda M, Schiff ER. Viral Hepatitis: Past and Future of HBV and HDV. *Cold Spring Harb Prespect Med* ,5:1-11, 2015.
- 5-Thio CL, Hawkins C. Hepatitis B virus and Hepatitis Delta Virus. Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. 8th ed. Ed: Bennet JE, Dolin R, Blaser MJ, 1815-1839, 2014.
- 6- Dandri M, Petersen J. HBV virology. *Hepatology A Clinical Textbook*. 8th ed. Ed: . In Mauss S, Berg T, Rockstroh J, Sarrazin C, Wedemeyer H. Germany Flying Publisher, 85-106, 2017.
- 7- Tütüncü E. Hepatit B Virüsünün Moleküler Virolojisi. Hepatit B'den D'ye Hep Güncel Klinik El Kitabı. Ed: Kandemir Ö, Danalıoğlu A. Viral Hepatitle Savaşım Derneği, 3-16, 2015.
- 8- Seeger C, Mason WS. Hepatitis B virus biology. *Microbiol Mol Bio Rev*; 64:51-68, 2000.
- 9- European Association for the Study of the Liver. Clinical Practice Guidelines on the management of hepatitis B virüs infection. *J Hepatol*; 67:370– 398, 2017.

- 10-Saltoğlu N. Kronik Hepatit B Tedavisinde Güncel Kılavuzların Değerlendirilmesi. Türkiye Klinikleri J Inf Dis-Special Topics; 6(1):714, 2013.
- 11- Yamazhan T. HBV enfeksiyonunun epidemiyolojisi. Hepatit B“den D“ye Hep Güncel Klinik El Kitabı. Ed: Kandemir , Danalıoğlu A. Viral Hepatitle Savaşım Derneği:17-21, 2015.
- 12- Türk Karaciğer Araştırmaları Derneği, Viral Hepatitle Savaşım Derneği. Türkiye Viral Hepatitler Tanı ve Tedavi Kılavuzu,:1-90, 2017.
- 13- Güçlü E, Geyik MF. Hepatit B Enfeksiyonu ve Korunma. Konuralp Tıp Dergisi; 4(2):54-58, 2012.
- 14- Urbanus AT, vanHoudt R, van de Laar TJ, Coutinho RA. Viral hepatitis among men who have sex with men, epidemiology and public health consequences. Euro Surveill; 14(47):1-5, 2009.
- 15-Büyükkaya R, Oktay M, Büyükkaya A, ztrk B, zel MA, Başır FH et al. Kronik viral hepatitli hastalarda ultrasonografi eşliğinde kesici iğne ile yapılan perkütan karaciğer biyopsilerinin değerlendirilmesi. Abant Medical J; 3(2):112-115, 2014.
- 16-Flemming JA, Hurlbut DJ, Mussari B, Hookey LC. Liver biopsies for chronic hepatitis C: should nonultrasound guided biopsies be abandoned? Can J Gastroenterol; 23:425-430, 2009.
- 17-Ross Mh, Kaye GI, Pawlina W. Histology: A text and atlas. 4nd Ed. Liipincott Williams and Wilkins; p. 533-51, 2003.
- 18-Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO. Temel Histoloji. 8. Baskı. Barış Kitapçılık; 1998.
- 19-Solomon EP. İnsan anatomisi ve fizyolojisine giriş. İstanbul: Birol Kitabevi; 1997.

- 20- Rumevleklioğlu Y. Cep telefonunun karaciğer gelişimi üzerine teratojenik etkileri. Yüksek Lisans Tezi. Gaziantep Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Gaziantep, Türkiye. 2007.
- 21- Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO. Basic Histology. 10nd Ed. by Appletonand Lange; 332-50, 2003.
- 22- Guyton AC. Textbook of Medical Physiology. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2001.
- 23- Robbins SL, Cotran RS, Kumar V. Basic pathology. 6nd Ed. W.B. Philadelphia: Saunders Company; 516-9, 2000.
- 24-Roderick P. Liver function tests: defining what's normal. British Medical Journal; 328: 987, 2004.
- 25-Soyak G. Lenfoid löykozlu etçi anaç tavuklarda karaciğer enzim (alanin amino transferaz, aspartat amino transferaz, alkali fosfataz) düzeyleri. Yüksek Lisans Tezi. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, Türkiye. 2006.
- 26- Vınay Kumar MD, Ramzı S. Cotran MD, Stanley L. Robbins MD. Temel Patoloji. 6. Baskı. Çeviri: Uğur Çevikbaş. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; s. 517, 2000.
- 27- Nishizaki T, Takenaka K, Yoshizumi T et al. Alteration in levels of human hepatocyte growth factor following hepatectomy. Journal of The American College of Surgeons ; 181: 6-10, 1995.
- 28- Michalopoulos GK. Liver regeneration: molecular mechanism of growth control. The Faseb Journal 4: 176-87, 1990.
- 29- Michalopoulos GK, De Frances MC. Liver regeneration. Science; 276: 60-66, 1997.

- 30-Tsujii H, Okamoto Y, Kikuchi E. Prostaglandin E2 and liver regeneration. *Gastroenterology*; 105: 495-9, 1993.
- 31-Valko M, Izakovic M, Mazur M, Rhodes CJ, Telser J. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol Cell Biochem*, 266: 37-56, 2004.
- 32-Castaner A, Roig E, Serra A, De Flores T, Magrina J, Azqueta M, Sanz G and Betriu A. Risk stratification and prognosis of patients with recent onset angina. *Eur Heart J*, 11: 868-875, 1990.
- 33-Uysal M. Serbest radikaller, lipit peroksitleri ve organizmada prooksidanantioksidan dengeyi etkileyen koşullar. *Klinik Gelişim*, 11: 336-340, 1998.
- 34-Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol*, 11: 298-300, 1956.
- 35-Gutteridge JMC, Halliwell B. *Antioxidants in nutrition, health and disease*. Oxford University Press, New York, 1994.
- 36-Yanbeyi S. Aspirin ve antioksidant buthylated hydroxyanisole'ün tavşanlarda eritrosit total katalaz, süperoksit dismutaz ve glutatyon peroksidaz aktiviteleri üzerine etkileri. Doktora Tezi. Ondokuz Mayıs Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı, Samsun, Türkiye. s. 88, 1999..
- 37- Cross CE, Halliwell B, Borish ET. Oxygen radicals and human disease. *Annals of Internal Medicine*; 107: pp. 526-545, 1987.
- 38-Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3rd edn. Oxford University Press, New York, 1999.
- 39-Yalçın AS. Serbest radikaller ve patolojik etkileri. *Sendrom*, 4: 40-43, 1992.
- 40- Parkin, D. Max, et al. "Global cancer statistics, 2002." *CA: a cancer journal for clinicians* 55.2: 74-108.2005.

- 41- Orhan H.Şahin Gönül (1995) Clinical and Toxicological Importance of Glutathione S-Transferases. *T Klinik Tıp Blimleri*, 15, 1995.
- 42- Sandra Gottschling, Philipp A. Schnabel, Felix J.F. Herth And Esther Herpel, Are We Missing The Target—Cancer Stem Cells And Drug Resistance In Non-Small Cell Lung Cancer, *Cancer Genomics & Proteomics* 9: 275-286, 2012.
- 43- H. W. Habig, J. M. Pabst, W. B. Jakoby *J. Biol. Chem* Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. 249 (22), 7130-7139, 1974.
- 44- Gulick, A. M., Fahl W. E., Mammalian glutathione S-transferase: regulation of an enzyme system to achieve chemotherapeutic efficacy. *Pharmacol ther.*, 66: 237-257, 1995.
- 45- E. P. Anton, B. Johannes, G. Arne Vander, J. M. Gerard. *J. Biochem*, 265, 47-54, 1990.
- 46- Blackburn A.C., Woallat E., Sutherland G.R., Board P.G., Characterization and chromosome location of the gene GSTZ1 encoding in human zeta class glutathione transferase and maleylacetoacetate isomerase. *Cytogenet. Cell Genet.* 83; 109-114, 1998.
- 47- Boyer, T.D., The Glutathione S-transferases: An Update *Hepatology*, 9 (3), 486-96, 1989.
- 48- Hayes J.D., Flanagan, J.U., Jowsey, I.R. Glutathione Transferases, *Annu.Rev.Pharmacol. Toxicol.*, 45:51–88, 2005.
- 49- Hayes J.D., Pulford D.J., The glutathione S-transferase super gene family: regulation of GST and the contribution of isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 30; 445-600, 1995.

- 50- Hirvonen A., Polymorphisms of xenobiotic-metabolizing enzymes and susceptibility to cancer. *Environ Health Prospect.* 107; 37-47, 1999.
- 51- Eaton D.L., Bammler T.K., Concise review of glutathione S-transferase and their significance to toxicology. *Toxicological Sciences.* 49; 156-164, 1999.
- 52- Etseller, M., Corn, P.G., Urena, J.M., Gabrielson, E., Baylin, S.B., Herman, J.G., 1998, Inactivation of glutathione S-transferase P1 gene by promoter hypermethylation in human neoplasia, *Cancer Research*, 58, 4515–4518 p.
- 53- Hayes J.D., Flanagan, J.U., Jowsey, I.R. Glutathione Transferases, *Annu.Rev.Pharmacol. Toxicol.*, 45:51–88, 2005.
- 54- A. Özaydın, Glutatyon S-Transferaz GST-M1 ve GST T-1 polimorfizmlerinin glutatyonla ilişkili detoksifikasyon sistemlerine etkisi, Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi, İstanbul, 2000.
- 55-Seidgard J., Ekstöm G., The role of human GST's and epoxide hydrolases in metabolism of xenobiotics. *Environ Health Perspect.* 105 (4): 791, 1997.
- 56- Hayes, John D., and David J. Pulford. "The Glutathione S-Transferase Supergene Family: Regulation of GST and the Contribution of the Isoenzymes to Cancer Chemoprotection and Drug Resistance Part I." *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 445-520, 1995.
- 57- La Torre G, Boccia S, Ricciardi G. Glutathione S-transferase M1 status and gastric cancer risk: a meta-analysis. *Cancer Lett.* 10;217(1):53-60, 2005.
- 58- Benson A.M., Talalay P., Role of reduced glutathione in the keto steroid isomerase reaction of liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 6; 1073, 1976.
- 59-Kimura J., Hayakari M., Kumano T., Nakano H., Satah K., Tsuchida S., Altered Glutathione transferase in rat skin inflamed due to Alpha-class subunit. *Biochem. J.* 335; 605, 1998.

- 60- Hayes J.D., Pulford D.J., The glutathione S-transferase super gene family: regulation of GST and the contribution of isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 30; 445-600, 1995.
- 61- La Torre G, Boccia S, Ricciardi G. Glutathione S-transferase M1 status and gastric cancer risk: a meta-analysis. *Cancer Lett.* 10;217(1):53-60, 2005.
- 62- Guthenberg, C., Akorfeldt, K., Mannervick, B. Purification of glutathione S-transferase from human placenta. *Acta chem. Scand. Ser. B*, 33:595-596, 1979.
- 63- Coggan M., Whitbread A., Whittington A., Board P., Structure and organization of the human theta-class glutathione s-transferase and Ddopachrom tautomerase gene complex. *Biochem. J.* 334; 617, 1998.
- 64- Mainwaring G.W., et al., The distribution of theta class glutathione transferase in the liver and lung of Mouse rat and human. *Biochem. J.* 318; 297, 1996.
- 65- Clapper M.L., Genetic polymorphism and cancer risk. *Curr. Oncol. Rep.* 2; 251-256, 2000.
- 66-Knudsen L.E., Loft S.H., Autrup H., Risk assessment: the importance of genetic polymorphisms in man. *Mutat. Res.* 482; 83-88, 2001.
- 67- Board, Philip G. "The omega-class glutathione transferases: structure, function, and genetics." *Drug metabolism reviews* 43.2: 226-235, 2011.
- 68- Harju, Terttu H., et al. "Glutathione S-transferase omega in the lung and sputum supernatants of COPD patients." *Respir Res* 8: 48, 2007.
- 69- Hong SH, Kim HG, Chung WB, et al. DNA Hypermethylation of Tumor-Related Genes in Gastric Carcinoma. *J Korean Med Sci*; 20: 236-41., Fourth Edition, 2003 LWW, 480-490, 2005.
- 70- Kuralay, F., Ersöz, G., Akarca, U., Kronik Hepatitite Glutasyon S-Transferaz-Alfa'nın Tanısal Yararlılığı *Türkiye Klinikleri J Gastroenterohepatol*, 15, 2004.

71- Shen LJ1, Zhang ZJ, Zhang HX, Yang WB, Run Huang Search articles by 'Run Huang' Huang R [Expression of GST-pi and HBV infection in hepatocellular carcinoma]. *Ai Zheng = Aizheng = Chinese Journal of Cancer*, 21(1):29-32, 2002.

72- Yusof YA1, Yan KL, Hussain SN, Immunohistochemical expression of pi class glutathione S-transferase and alpha-fetoprotein in hepatocellular carcinoma and chronic liver disease. *Analytical and Quantitative Cytology and Histology*, 25(6):332-338, 2003.

73- Ming-Whei Yu, Shi-Yi Yang, I-Jen Pan, Chih-Lin Lin, Chun-Jen Liu, Yun-Fan Liaw, Shi-Ming Lin, Pei-Jer Chen, Shou-Dong Lee, Chien-Jen Chen, Polymorphisms in XRCC1 and Glutathione S-Transferase Genes and Hepatitis B-Related Hepatocellular Carcinoma, *Journal of the National Cancer Institute*, Vol. 95, No. 19, October 1, 2003.

74-Shahrokh Mohammadzadeh Globadloo, Bahram Yaghmaei, Abdolamir Allameh, Parkhideh Hassani, Babak Noorinayer, Mohammad Reza Zali , Polymorphisms of Glutathione S- Transferase M1,T1 and P1'in patients with HBV-related liver cirrhosis, chronic hepatitis, and normal carriers, Received 18 November 2004; Received in revised form 8 August 2005; accepted 19 October 2005 Available online 28 November 2008.

75- Yao-Li Chen^{1,2}, Hsin-Shun Tseng¹, Wu-Hsien Kuo^{3,4}, Shun-Fa Yang⁵, Darren Chen^{1,2} , Hsiu-Ting Tsai^{6,7} Glutathione S-Transferase P1 (GSTP1) gene polymorphism increases age-related susceptibility to hepatocellular carcinoma *BMC Medical Genetics*, 11:46 <http://www.biomedcentral.com/1471-2350/11/46>, 2010.

76- Lavanchy D. Hepatitis B virus epidemiology, disease burden, treatment, and current and emerging prevention and control measures. *J Viral Hepat*, 11:97-110, 2004.

77-Karabulut, H. ,Gülay, M.Ş.(2016). serbest radikaller. *MAKÜ Sag. Bil. Enst. Derg.* 4(1): 50-59, 2016.

78- Ali ve ark., 1996; Bagchi ve Puri, 1998; Cadenas, 1989; Nagendrappa, 2005; Pham-Huy ve ark., 2008; Sarma ve ark., 2010; Sen ve ark., 2010.

79- Hailiwell B: Free radicals antioxidants and human disease: curiosity, cause or consequence? The Lancet 344: 721- 724, 1994.

